

**Detektion von Membranpotentialen in
Modellsystemen und lebenden Zellen mit
nichtlinear optischer Spektroskopie und
Mikroskopie**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Thomas Wimmer
aus Düsseldorf

Düsseldorf
30. April 2002

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referentin: Prof. Dr. C. Kryschi
Koreferent: Prof. Dr. D. Schmid
Koreferent: Prof. Dr. K. Schierbaum

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Oktober 2002

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
2	Membranen	6
2.1	Organisation von Membranen	6
2.2	Membranpotentiale	8
2.3	Mikroskopische Membranpotentialbeiträge	12
2.4	Einlagerung lipidähnlicher Moleküle	14
2.5	Cholesterinvesikel	15
2.6	ZNS des medizinischen Blutegels	17
2.7	Herzmuskelzellen	19
3	Nichtlineare Optik	21
3.1	Elektromagnetische Wellen in Dielektrika	21
3.2	Ausbreitung von Laserpulsen in Dielektrika	25
3.3	Elektromagnetische Wellen an Grenzflächen	27
3.4	Bestimmung der Suszeptibilitäten	27
3.5	Eigenschaften der Suszeptibilität 2. Ordnung	33
3.6	Potentialsensitivität der Suszeptibilität 2.Ordnung	35
3.7	Zwei-Photonen-Absorption	38
4	Nichtlineare Optik an Potentialsonden	39
4.1	Fluoreszenz-Potentialsonden	39
4.2	Frequenzverdoppelnde Potentialsonden	41
4.3	Einflüsse auf das SH-Signal	44
4.4	Frequenzverdoppelnde Mikroskopie	46
4.5	SH- vs. TPEF-Mikroskopie	48
5	Experimenteller Aufbau	54
5.1	Femtosekunden-Lasersystem	54
5.1.1	Titan:Saphir-Laseroszillator	54
5.1.2	Puls-Verstärkung	57
5.2	Aufbau der SHG an Cholesterinvesikeln	58
5.3	Aufbau des SH-Mikroskopes (SHM)	60
5.3.1	CCD-Kamera	60
5.3.2	Bildverstärker	61
5.3.3	Einstrahliger Messaufbau	62

5.3.4	Zweistrahliger Messaufbau	62
6	Charakterisierung der Laserpulse	65
7	Einlagerung der Potentialsonden	68
7.1	Einlagerung in Cholesterinvesikel	68
7.2	Einlagerung in Neuronen	71
8	Potentialabhängige Messungen an Membranen	73
8.1	Messungen an Cholesterinvesikeln	73
8.1.1	Elektrische Eigenschaften der Cholesterinvesikel	73
8.1.2	SHG an Cholesterinvesikeln	74
8.2	Messungen an Neuronen	81
8.2.1	Mikroelektroden-Messungen	81
8.2.2	SHG-Messungen	85
8.2.3	SHG-Effizienz	94
8.2.4	SHM	95
8.3	Messungen an Herzmuskelzellen	98
9	Zusammenfassung	101
A	Schnittfläche Zylinder-Kugel	103

Kapitel 1

Einleitung

Die Lebenswissenschaft ist heute ein hochaktuelles interdisziplinäres Gebiet. Es reicht von vielseitigen Grundlagen bis hin zu praktischen Anwendungen und berührt außerordentlich viele Wissenschaftsgebiete. Hierbei obliegt es dem Physiker, das auf physikalischen Gesetzen basierende, quantitative Verständnis der vielfältigen biologischen und chemischen Phänomene voranzutreiben. Für quantitative Messungen muss er die geeigneten Apparate konzipieren, sowie einfache Theorien und Modelle entwickeln, die die experimentellen Ergebnisse möglichst exakt wiedergeben [12]. Molekulare Mechanismen in lebenden Zellen sind dabei von besonderem Interesse. Alle Funktionen einer Zelle laufen über molekulare Steuermechanismen über die Zellmembran. Diese ermöglicht eine räumliche Trennung von intrazellulärem Zytoplasma und der extrazellulären Umgebung. Schnell ablaufende Aktivitäten in Zellen werden durch elektrische Ströme, den sogenannten Aktionspotentialen, vermittelt. Voraussetzung für das Verständnis der Änderung dieser elektrischen Signale durch äußere Einflüsse, ist eine nichtinvasive, hochsensible und spezifische Messung dieser Prozesse.

Da biologische Membranen oftmals zu komplex für systematische Untersuchungen sind, werden Experimente zunächst an Modellmembranen aus Lipiddoppelschichten durchgeführt. Mit den hieran gewonnenen Erkenntnissen lassen sich biologische Mechanismen leichter deuten. Doch auch der Schritt zu biologischen Systemen erfolgt über wohl bekannte Systeme. Der medizinische Blutegel liefert ein System, das als Referenz in der Entwicklung neuer Techniken eine große Rolle spielt. Erst dann erfolgen Untersuchungen an essentiellen Systemen der Pharmakologie, wie den Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) von Nagern.

Membranpotentiale werden in größeren Zellen, wie den Blutegel-Neuronen, durch konventionelle Mikroelektroden-Messungen bestimmt, bei denen die Zellwand durchdrungen wird und daher eine Beeinflussung der zu messenden Größen erfolgt. Die Detektion der Membranpotentiale erfolgt dabei sehr indirekt, über eine größere räumliche Distanz. Der elegantere Weg verfolgt die Änderungen der linear optischen Eigenschaften von eingefärbten Zellen, induziert von einer Membranpotentialänderung am Ort ihrer Entstehung, nämlich direkt an der Membran. Diese Technik ermöglicht auch Untersuchungen an Zellsuspensionen. Dazu werden Fluoreszenzänderungen in der Intensität oder in der Emissionswellenlänge, meist im sichtbaren Spektralbereich, detektiert [9]. Hierin liegt auch schon ein Problem der Fluoreszenzdetektion. Denn eine vorherige Anregung mit energiereicherer elektromagnetischer Strahlung ist notwendig, die in der

Regel im ultravioletten Bereich liegt und somit ein Schädigungspotential für die lebenden Zellen und die Farbstoffmoleküle darstellt. Abhilfe schafft hier die Methode der Zwei-Photonen-Absorption mit anschließender Fluoreszenz (two photon excited fluorescence: TPEF). Doch leider sind viele Fluoreszenzfarbstoffe nur wenig potentialsensitiv und waren anfänglich kaum selektiv für den Ort der Entstehung eines Membranpotentials [50]. Nur wenige Veröffentlichungen berichten über den Einsatz der Frequenzverdopplung (second harmonic generation: SHG) an molekularen „Voltmetern“ als Kontrastmechanismus zur Detektion von Membranpotentialen. Der große Vorteil liegt zum einen im Gebrauch von langwelligem Licht, das von Zellen und Farbstoffen kaum absorbiert wird und somit auch kein schädigender Energieübertrag in die Zelle erfolgt. Zum anderen ist diese Technik extrem Membranpotential-sensitiv, da nur Potentialsonden am Ort der Entstehung eines Membranpotentials zum Messsignal beitragen.

Generell sind nichtlinear optische Techniken, wie die Frequenzverdopplung (SHG), die Summenfrequenzerzeugung (SFG) und die Zwei-Photonen-Absorption, Effekte großer elektromagnetischer Felder. Daher ist der Einsatz von kurzpulsigen Lasersystemen mit hoher spektraler Leistungsdichte unumgänglich.

Die optischen intrinsischen Eigenschaften der Materie werden in der Modellvorstellung des anharmonischen Oszillators durch das starke elektromagnetische Feld derart beeinflusst, dass eine einfallende Welle eine nichtlineare Antwort im System induziert [19]. Diese wird beschrieben durch die optisch induzierte molekulare Polarisierung $\vec{p}$, die in eine Potenzreihe des elektrischen Feldes $\vec{E}$ entwickelt wird.

$$\vec{p} = \vec{\mu}_g + \epsilon_0 \vec{\alpha} \vec{E} + \epsilon_0 \vec{\beta} \vec{E}^2 + \dots \quad [71, 72, 24]$$

Die lineare Polarisierbarkeit $\vec{\alpha}$ beschreibt die linear optischen Effekte wie Absorption und Brechung von Licht in einem Medium. Die Hyperpolarisierbarkeit $\vec{\beta}$ beschreibt die wesentlich kleineren nichtlinearen Effekte, wie die Frequenzverdopplung und die Summenfrequenzerzeugung. Sie vermittelt die Wechselwirkung zweier Photonen miteinander. Die Methode der Frequenzverdopplung ist beinahe so alt wie die Entwicklung des Lasers selbst und in der Optik mit ihm erst möglich geworden [65, 85]. Zuerst wurde diese in der Grenzflächenanalyse von Metalloberflächen eingesetzt, da hier eine „natürliche“ Symmetriebrechung vorliegt, die zur Erzeugung der zweiten optischen Harmonischen im Rahmen der Dipolnäherung in Medien notwendig ist. Der Hyperpolarisierbarkeitstensor enthält nur nichtverschwindende Beiträge für nichtzentrosymmetrische Moleküle. Weiterhin ist die geometrische Anordnung der Moleküle in einer kondensierten Phase für die Effizienz der SHG von Bedeutung. Nur eine Anordnung der Moleküle mit ebenfalls verschwindender Zentrosymmetrie liefert kohärente, nichtlineare Effekte zweiter Ordnung.

In den letzten 20 Jahren wurden auch verstärkt fest-flüssige, flüssig-gasförmige und flüssig-flüssige Grenzflächen, wie z.B. Langmuir-Blodgett-Filme mit dieser Methode untersucht, da das zentrosymmetrische Substrat keine Beiträge liefert [31]. Hierbei konzentrierte man sich auf die Untersuchung von Orientierungen der Moleküle an Oberflächen, strukturellen Phasenübergängen und elektrochemischen Potentialen [101], sowie dynamische Grenzflächenprozesse, wie Photoisomerisation von organischen Molekülen und Adsorptionskinetiken. Einen Überblick hierüber erhält man in [32].

Auch biologische Materialien wie Zellen oder Vesikel besitzen an ihrer Oberfläche eine

Brechung der Symmetrie, die inhärente Asymmetrie der Lipiddoppelschicht, weshalb sie den Einsatz der SHG und SFG zur Charakterisierung nahelegen. Dies erfolgte erstmals Anfang der 80iger Jahre an den polaren Strukturen der Rattenschwanz-Sehnen [67] und später an Modellmembranen [35, 36]. Ende der 90iger Jahre fand diese Technik zunehmendes Interesse für die Untersuchung lebender Zellsysteme [37, 38, 39, 64]. Aufgrund der Beobachtungsmöglichkeit lebender Objekte sind optische Mikroskope ein wertvolles Werkzeug in der Biophysik geworden. Den ersten Einblick in die Feinstruktur von Lebewesen eröffnete das Lichtmikroskop. Mit ihm konnten schon in den Dreißiger-Jahren des 19. Jahrhunderts einzelne Zellen beobachtet werden.

Durch Einfärben von Zellen mit fluoreszierenden Farbstoffen konnte letztlich die Detektionsfähigkeit optischer Mikroskope bis zu einem Punkt gebracht werden, an dem es nun möglich ist, feinste intrazelluläre Strukturen und Morphologien zu beobachten. Aufgrund der ausschließlichen Grenzflächenselektivität der SHG bieten sich aber besonders mikroskopische Untersuchungen basierend auf nichtlinear optischen Spektroskopiemethoden an. Die frequenzverdoppelnde Mikroskopie (second harmonic microscopy: SHM) wurde erstmals an ZnSe-Oberflächen in den 70iger Jahren eingesetzt [33, 34]. Biologische Strukturen wurden mit der SHM erstmals Ende der 80iger Jahre charakterisiert [66, 68, 40]. Der Zunehmende Einsatz der Femtosekunden-Festkörper-Laser, speziell der Titan:Saphir-Lasersysteme, ist mit einem Anstieg der Publikationszahl in diesem Gebiet verbunden [41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 70, 69].

Im Folgenden werden die Strukturen von Membranen und deren Potential erläutert. Anschließend wird die Ausbreitung elektromagnetischer Wellen, besonders der zweiten Harmonischen und deren Erzeugung beschrieben. Schließlich wird die technische Realisierung der SHG und der SHM dargestellt, die für die Detektion von Membranpotentialen in Verbindung mit neu synthetisierten und optimierten Hemicyanin-Potentialsonden eingesetzt werden. Diese molekularen „Voltmeter“ werden zunächst in eine hemisphärische Vesikel aus oxidierten Cholesterin, die eine Doppelschichtmembran ausbildet eingelagert. Später werden die SHG und SHM an lebenden Blutegel-Neuronen und Kardiomyozyten eingesetzt, um Membranpotentialänderungen zu spektroskopieren bzw. zu mikroskopieren. Die Ergebnisse werden an vergleichbaren Messungen mittels konventioneller Mikroelektroden diskutiert. Die Hemicyanin-Farbstoffe besitzen aufgrund ihres linearen π -Elektronensystems große Polarisierbarkeiten und Hyperpolarisierbarkeiten. Bei optischer Anregung erfolgt ein intramolekularer Ladungstransfer entlang der langen Molekülachse, wie es für den nichtzentrosymmetrischen Farbstoff di-4-ANEPPS in der Literatur wohl bekannt ist [36]. Ein elektrostatisches Feld kann die Hyperpolarisierbarkeit derart beeinflussen, dass die Moleküle inhärent sensitiv gegenüber Membranpotentialänderungen sind. Somit liegt ein molekularer Mechanismus zur Detektion von Membranpotentialen vor, was die Detektion von Membranpotentialänderungen am Ort ihrer Entstehung ermöglicht. Damit können Membranpotentialänderungen auch an Zellsuspensionen detektiert werden, was mittels konventioneller Mikroelektroden-Methoden nicht gelingt. Desweiteren treten phototoxische und photobleichende Effekte in frequenzverdoppelnden Messungen nicht signifikant auf.

Kapitel 2

Membranen

Biologische Membranen zählen zu den wichtigsten Funktionselementen sämtlicher lebenden Organismen. Ohne Membranen können die essentiellen biochemischen Prozesse in hochentwickelten Lebewesen, die einer räumlichen Trennung von intrazellulärem Zytoplasma und der extrazellulären Umgebung bedürfen, nicht erfolgen. Ein gesteuerter Austausch von Botenstoffen und Ionen zwischen den beiden Umgebungen wird erst über integrale Membranproteine ermöglicht. Insbesondere biochemische Prozesse wie der Energieumsatz in Mitochondrien, die Photosynthese oder die Reizweiterleitung der Nervenzellen erfolgen nur durch Zellmembranen.

In dieser Arbeit wird der Schwerpunkt auf die Untersuchung der elektrischen Signale von lebenden Zellen gelegt. Im Folgenden wird kurz auf die Ausbildung von Membranen und dem Ursprung ihrer Transmembranpotentiale eingegangen.

Weiterhin werden die als Modellsystem verwendete Cholesterinvesikel und die Nervenzellen des medizinischen Blutegels vorgestellt.

2.1 Organisation von Membranen

Alle Aspekte der Struktur und Funktion einer Zelle und ihrer Membranen sind an die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Wassers angepasst. Das Wassermolekül bestimmt daher die Struktur und Selbstorganisation der Membrankomponenten. Die Wasserlöslichkeit der Biomoleküle ist eine Folge der Hydratisierung und Ladungsabschirmung durch die Wassermoleküle.

Löst man einen Stoff in Wasser, so behindern die im Wasser gelösten Moleküle die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen in ihrer unmittelbaren Umgebung. Polare oder geladene Stoffe gleichen dies durch die Bildung neuer Wechselwirkungen mit dem Wasser teilweise wieder aus, so dass diese sich in Wasser lösen. Die gesamte Enthalpieänderung $\Delta H = \Delta U + pV$ bleibt bei der Auflösung polarer oder geladener Stoffe eher klein, da sich die Reaktionsenergie ΔU und die Volumen- oder Druckarbeit pV wenig ändern. Hydrophobe Substanzen erfahren bei Lösung im Wasser keine anderen Wechselwirkungen, so dass es aufgrund der Hinderung der Wasserstoffbrückenbindungen im Wasser zu einer Erhöhung der Enthalpie ΔH kommt, da die Innere Energie U durch das Aufbrechen der Wasserstoffbrücken größer wird. Weiterhin nimmt die Entropie ΔS ab, da die Wassermoleküle in der direkten Umgebung der hydrophoben Substanz in ihren möglichen Orientierungen stark eingeschränkt sind und eine hochgeradig

geordnete Hülle aus Wassermolekülen um den hydrophoben Teil der Substanz herum bilden (siehe Abbildung 2.2). Die Anzahl der Wassermoleküle dieser Hydrathülle ist proportional zur Oberfläche der gelösten hydrophoben Moleküle. Da eine Reaktion nur dann selbständig spontan abläuft, wenn die Änderung der Freien Enthalpie ΔG negativ wird

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2.1)$$

und im Fall der Lösung hydrophober Substanzen in wässriger Umgebung $\Delta H > 0$ und $\Delta S < 0$ wird, lösen sich unpolare Substanzen nicht in polaren Lösungsmitteln. Daher neigen diese Moleküle in wässrigen Lösungen dazu, sich zusammenzulagern und so die energetisch ungünstigen Auswirkungen ihrer Anwesenheit so gering wie möglich zu halten.

Verbindungen die aus einem lipophilen und einem hydrophilen Teil bestehen sind grenzflächenaktive Substanzen. Hierzu zählen auch die Phospho- und Glycolipide¹. Sie sind amphiphile Verbindungen, die polare oder geladene und unpolare Teile enthalten (siehe Abbildung 2.1). Derartige Verbindungen erfahren in Wasser so unter-

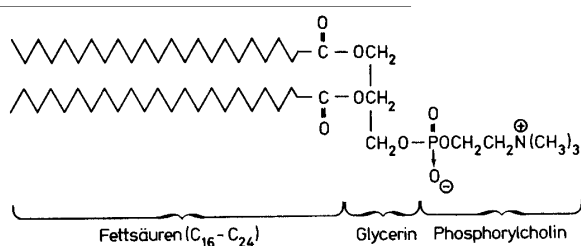


Abbildung 2.1:
Molekülstruktur des Membranmoleküls *Lecithin* (Phosphatidylcholin) [120].

schiedliche Effekte. Das polare oder geladene hydrophile Ende des gelösten Moleküls kann mit dem Wasser attraktiv wechselwirken und wird solvatisiert, während das unpolare, hydrophobe Ende die entgegengesetzte Tendenz zeigt, den Kontakt mit Wasser zu meiden. Die unpolaren Moleküleenden aggregieren, um dem Lösungsmittel die kleinstmögliche hydrophobe Fläche zu bieten und die Entropie zu erhöhen (siehe Abbildung 2.2). Die polaren Teile sind derart angeordnet, dass sie ihre Wechselwirkung mit dem Wasser optimieren. Daher bilden amphiphile Moleküle organisierte Strukt-

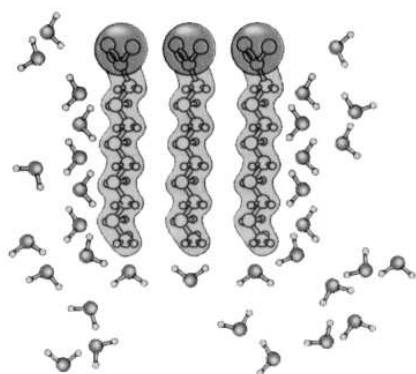


Abbildung 2.2:
Amphiphile Moleküle lagern sich zu großen Flächen zusammen an deren Rande die umgebenden Wassermoleküle in einen hochgradig geordneten Zustand gezwungen werden. Es sind somit weniger Wassermoleküle in einem geordneten Zustand und die Entropie ist größer [14].

ren, wie beispielsweise Micellen, aus (siehe Abbildung 2.3). Die unpolaren Molekülteile

¹Lipide: griechisch lipos für Fett

werden durch hydrophobe Wechselwirkungen, den entropischen Kräften zusammengehalten. Die entropische Bindung liegt in der Größenordnung der thermischen Energie bei Raumtemperatur. Die Stärke der Wechselwirkungen ergibt sich aus dem Bestre-

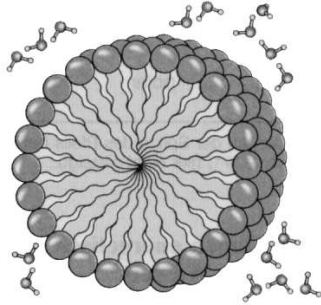


Abbildung 2.3:

In der micellaren Anordnung der Lipide sind alle hydrophoben Gruppen vom Wasser getrennt. Somit gibt es keine hochgradig geordnete Schicht des Wassers mehr und die Entropie ist noch größer [14].

ben des Systems die größtmögliche thermodynamische Stabilität zu erreichen, indem es die Entropieabnahme ΔS , die eine hohe Ordnung von Wassermolekülen in der Umgebung des hydrophoben Moleküls bewirken würde, minimiert. Weiterhin existieren van-der-Waals-Anziehungskräfte zwischen den lipophilen Kohlenwasserstoffenden. Dadurch wird eine enge Packung der Ketten begünstigt. Ebenfalls bilden sich elektrostatische Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den polaren Köpfen und den Wassermolekülen der Umgebung aus. Somit werden Lipidaggregate durch eine Vielzahl von verschiedenen Kräften stabilisiert, die jeweils nicht größer als die thermische Energie sind.

Die Bildung von Micellen ist für jede Verbindung konzentrationsabhängig und erfolgt beim Überschreiten eines Grenzwertes, der kritischen micellaren Konzentration (CMC).

Die bevorzugte Struktur der meisten Phospho- und Glykolipide in wässrigen Medien ist nicht die Micelle, sondern die Lipiddoppelschicht (siehe Abbildung 2.4). Der Grund dafür liegt in dem beanspruchten Volumen der beiden Fettsäureketten, so dass eine Micellenform ungünstig wird. Sie erfordert eine große flächenhafte Ausdehnung und vollständige Absättigung der lipophilen Kohlenwasserstoffketten. Dies führt zur selbstständigen Bildung von Kompartimenten (self-assembly), die sich selbstreparierend verhalten, da ein Defekt in der Doppelschicht aus entropischen Gründen ungünstig ist.

Das macht die Membranen für die Kapselung eines mesoskopischen Volumens in wässriger Lösung so erfolgreich.

2.2 Membranpotentiale

Schnell ablaufende Aktivitäten in Zellen werden durch elektrische Ströme den sogenannten Aktionspotentialen vermittelt. Aus physiologischer Sicht ist die Kenntnis des physikochemischen Milieus der Zellen eine Voraussetzung für das Verständnis der Entstehung der elektrischen Signale.

Zellmembranen bilden eine Barriere zwischen dem Intrazellulärraum und dem Extrazellulärraum. Diese Barriere ist für Ionen und die meisten polaren Moleküle mittels Diffusion sehr wenig permeabel. Lediglich Wasser passiert die Membran nahezu unge-

Ion	Permeabilität/ $\frac{cm}{s}$
Na^+	10^{-12}
K^+	$5 \cdot 10^{-12}$
Cl^-	$7 \cdot 10^{-11}$
H_2O	$5 \cdot 10^{-3}$

Tabelle 2.1: Permeabilitäten verschiedener Ionen durch eine reine Lipiddoppelschichtmembran.

hindert, was man an den Permeabilitätskoeffizienten erkennt (siehe Tabelle 2.1). Die Permeabilitätskoeffizienten kleiner Moleküle stehen mit dem Verhältnis ihrer Löslichkeit in unpolaren Lösungsmitteln, zu der in Wasser in Beziehung. Daraus erkennt man den Transportmechanismus. Die Substanz verliert zuerst ihre Hydrathülle und wird im Kohlenwasserstoffkern der Lipiddoppelschicht gelöst. Sie diffundiert schließlich durch den Kern auf die andere Seite der Membran, wo sie wieder hydratisiert wird. Ein Ion wie Na^+ durchquert die Membran sehr langsam, weil die Entfernung der Hydrathülle energetisch sehr ungünstig ist².

Da aber ein Informationsaustausch des Zellinneren mit der Umgebung schnelle Reaktionszeiten erfordert, bedient sich die Zelle anderer Mechanismen als der ungesteuerten Diffusion. So überwinden Ionen die Barriere mittels spezifischer Membrantransportproteine, die in die Membran derart eingelagert sind, dass sie die Membran mit ihren helikalen Strukturen mehrmals vollständig durchdringen und somit einen Kanal oder eine Ionenpumpe bilden. Aufgrund dieser sehr großen Moleküle, im Vergleich zu einer reinen Lipiddoppelschicht, haben biologische Membranen Schichtdicken bis zu 11 nm (siehe Abbildung 2.4). Ionenpumpen wie das Na^+/K^+ -ATPase Enzym erzeugen K^+ -Konzentrationsunterschiede über die Membran. Diese Membranproteine transportieren die Ionen aktiv unter direktem ATP-Verbrauch durch Phosphorylierung des Kanalproteins. Hierbei werden im Mittel 3 Na^+ -Ionen in den Extrazellulärraum befördert und 2 K^+ -Ionen auf die zytosolische Seite³. Da die Ionenpumpen (bei Anwesenheit von ATP) ständig aktiv sind, wird eine stetig steigende K^+ -Anreicherung in der Zelle stattfinden, wenn nicht die Ionenkanäle genau soviel K^+ wieder aus der Zelle hinaus lassen würden, wie die Pumpen hineintransportieren. Somit stellt sich im Ruhezustand der Zelle ein dynamisches Gleichgewicht zwischen den Ionenkonzentrationen innerhalb und außerhalb der Zelle ein (siehe Tabelle 2.3). Das Volumen der extrazellulären Seite kann als unendlich groß gegenüber der zytosolischen Seite angenommen werden, so dass die Konzentration im extrazellulären Bereich stets als konstant anzusehen ist.

Da die Na^+/K^+ -ATPase laufend Na^+ aus der Zelle heraus- und K^+ in die Zelle hineinpumpt, polarisiert die Zellmembran. Das Ruhemembranpotential einer Zelle beträgt etwa $E_M = -80\text{ mV}$, wobei die Differenz zu einem reinen Gleichgewichtspotential der K^+ -Ionen aus den Na^+ -Beiträgen ($E_{Na^+} = +60\text{ mV}$) und den Cl^- -Beiträgen resul-

²Die Durchmesser der Kationen liegen einschließlich Hydrathülle für Na^+ bei $0,5\text{ nm}$ und für K^+ bei $0,36\text{ nm}$ [11].

³Ionenkanäle befördern etwa 10^7 bis 10^8 Ionen pro Sekunde, während aktive Pumpen weniger als 1000 Ionen pro Sekunde befördern.

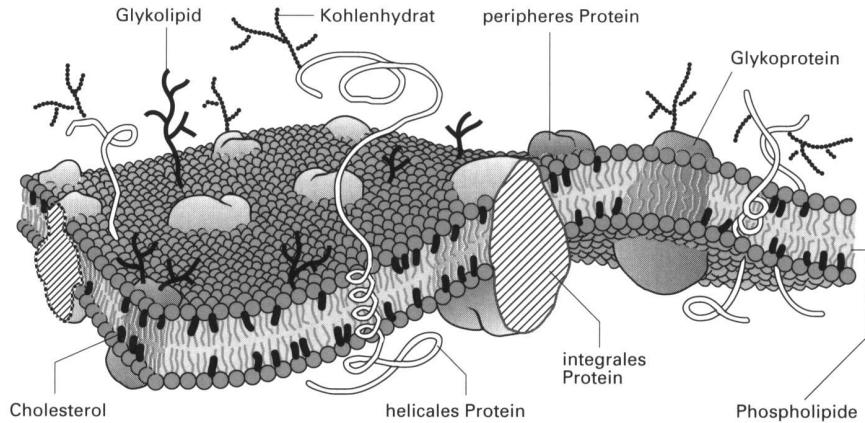


Abbildung 2.4: *Fluides Mosaikmodell einer biologischen Zellmembran nach J. Singer und G. Nicholson (1972) [119]. Neben den Phospholipiden mit eingelagerten funktionellen Molekülen erkennt man kleinere Cholesterinmoleküle.*

tiert. Da eine Zellmembran also auch für andere Ionen außer K^+ -Ionen, jedoch mit geringeren Permeabilitäten permeabel ist (siehe Tabelle 2.2), werden die verschiedenen Beiträge der hochkonzentrierten Ionen zum Gleichgewichtspotential⁴ mit ihren zugehörigen Permeabilitäten in der Goldman-Gleichung berücksichtigt⁵:

$$E = \frac{RT}{F} \ln \left[\frac{P_K \cdot [K^+]_a + P_{Na} \cdot [Na^+]_a + P_{Cl} \cdot [Cl^-]_i}{P_K \cdot [K^+]_i + P_{Na} \cdot [Na^+]_i + P_{Cl} \cdot [Cl^-]_a} \right] \quad (2.2)$$

Aus der Ladungstrennung über der Membran folgt, dass an der Innenseite der Membran ein Überschuss an Anionen und an der Außenseite ein Überschuss an Kationen besteht. Damit könnte die Elektroneutralität verletzt sein. Doch reichen die Konzentrationsunterschiede für Potentiale im mV-Bereich, aufgrund der zu großen Zellvolumina, nicht aus um die Elektroneutralität messbar zu verletzen. Bei $25 \mu m$ -Zellradius erhält man bei $120 mM$ Kationenkonzentration $4 \cdot 10^{12}$ Kationen. Ein Ruhepotential von $-90 mV$ benötigt etwa $4 \cdot 10^7$ Kationen auf der Innenseite, also nur den 10^5 -ten Teil der Gesamtkonzentration. Das bedeutet, dass Membranpotentiale strikt lokale, nur über die Membran existierende Spannungen sind. Die Elektroneutralität im Großen bleibt gewahrt.

Hochspezialisierte Zellen wie Sinneszellen oder Rezeptorzellen sind besonders empfindlich für selektive Reize wie Licht, Duft, Schall oder Druck. Für ihre jeweiligen Reize haben diese Zellen eine sehr niedrige Reizschwelle. Dabei werden die Ionenkanäle der Sinneszelle von außen durch die Anwesenheit von Agonisten, mechanischen Reiz oder wieder über die Membranspannung selber reguliert. Ein Reiz induziert somit eine Änderung des Membranpotentials der Sinneszelle. Der Reiz wird jedoch erst in ein körpereigenes Signal, dem Aktionspotential umgesetzt (Transduktion).

⁴Gleichgewichtspotentiale sind Nernst-Potentiale gemäß: $E_{Gg} = \frac{RT}{Fz} \ln \frac{c_a}{c_i}$. Mit c_a als Ionenkonzentration außerhalb, c_i innerhalb der Zelle, R als Gaskonstante und F als Faraday-Konstante.

⁵Für die Goldman-Gleichung wurde angenommen, daß das Membranpotential konstant über die Membran abfällt und nur einwertige Ionen transportiert werden.

Ion	Permeabilität/ $\frac{cm}{s}$
K^+	10^{-7}
Na^+	$3 \cdot 10^{-9}$
Cl^-	10^{-8}

Tabelle 2.2: Permeabilitäten verschiedener Ionen durch selektive Ionenkanäle einer Zellmembran.

Ion	Konz. Außen/ $\frac{mmol}{l}$	Konz. Innen/ $\frac{mmol}{l}$	Gg-Potential/ mV
K^+	4	155	-98
Na^+	145	12	+67
Ca^{2+}	1,5	—	+129
Anionen	—	155	—
Cl^-	123	4	-90

Tabelle 2.3: Ionenkonzentrationen im Extrazellulären und Intrazellulären eines Warmblüter-Skelettmuskels mit entsprechenden Ionengleichgewichtspotentialen [122].

Die Änderung des Rezeptorpotentials kodiert die Reizstärke, da mit zunehmender Entfernung vom Rezeptor der Effekt des Ioneneinstroms bei Reizung immer kleiner wird und die Depolarisation über die Länge der Zelle exponentiell abnimmt. Daher wird die Amplitude des Rezeptorsignals, die die Reizstärke repräsentiert, in eine Sequenz von Aktionspotentialen umkodiert.

Das Aktionspotential wird durch eine Vordepolarisation ab einem gewissen Schwellwert (etwa $-40 mV$), entsprechend der Stärke des Reizes, aktiviert. Beim Erreichen der Schwelle öffnen sich schnelle Na^+ -Kanäle, die einen raschen Einstrom von Na^+ -Ionen ins Zellinnere ermöglichen, was die Zelle schnell⁶ depolarisiert, also in Richtung $E_{Na^+} = +60 mV$ treibt. Ebenso schnell gehen diese Kanäle wieder in einen inaktiven Zustand über und eine etwas verzögerte erhöhte K^+ -Leitfähigkeit der Membran setzt ein, was eine rasche Repolarisation und darüber hinaus sogar noch eine Nachhyperpolarisation der Membran bewirkt (siehe Abbildung 2.5). Hierbei ist jedoch zu

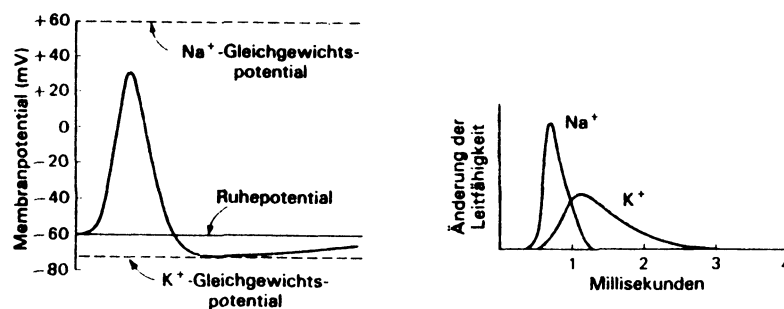


Abbildung 2.5:
Zeitlicher Verlauf eines Aktionspotentials und der Permeabilitäten für Na^+ - und K^+ -Ionen [124].

⁶Die Depolarisation ist an die Umladezeit der Membran gebunden, so dass sich das Potential gemäß $E_E = E_{E_{max}}(1 - e^{-t/\tau})$ ändert.

berücksichtigen, dass ein Na^+ -Einstrom in die Zelle bei Aktivierung aus Gründen der Erhaltung der Elektroneutralität immer mit einem Ausstrom von K^+ -Ionen verbunden ist. Somit wird das Membranpotential bei Aktivierung in rascher Folge zwischen den Gleichgewichtspotentialen hin- und hergeschaltet.

Aktionspotentiale können so entlang der Nervenfasern größere Strecken zurücklegen, weil sie ständig neu erzeugt werden und sich die Amplitude dadurch nicht ändert. Die Reizstärke wird dabei durch die Häufigkeit bzw. die Frequenz der Aktionspotentiale kodiert. Somit liegt eine Pulsfrequenzmodulation vor (siehe Abbildung 2.6).

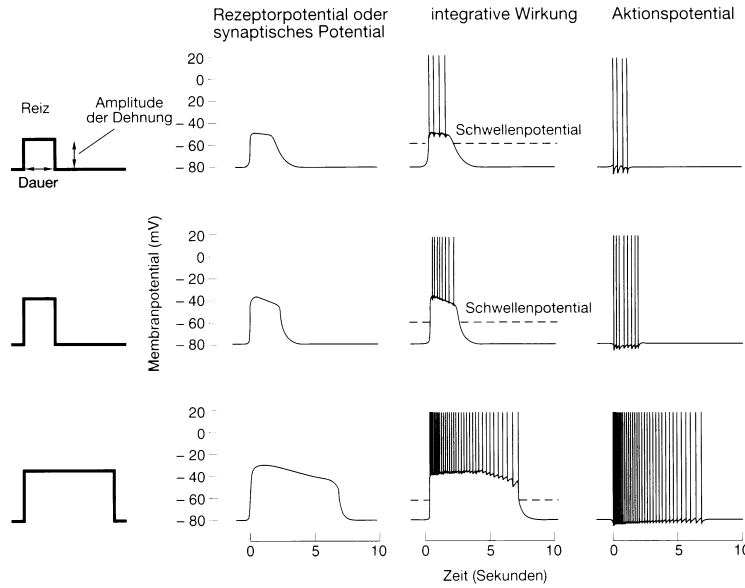


Abbildung 2.6:
Erzeugung von Aktionspotentialen durch Reizung einer Rezeptorzelle und deren Weiterleitung entlang eines Neurons [123].

Mathematisch hat man versucht die Ausbreitung der Aktionspotentiale durch die Hodgkin-Huxley-Gleichungen zu beschreiben, was sich bei der Untersuchung von Retzius-Neuronen (siehe Kapitel 2.6) mittels SH- und Fluoreszenz-Mikroskopie an di-4-ANEPPS-Potentialsonden (siehe Kapitel 4.1 und 4.2) nicht bestätigt hat [9].

2.3 Mikroskopische Membranpotentialbeiträge

Betrachtet man Membranpotentiale nicht aus physiologischer Sicht, sondern als strikt lokale Ladungsunterschiede über die Membran, so differenziert man das Membranpotential in seine mikroskopischen Beiträge. Dabei unterscheidet man zwischen dem Transmembranpotential

$$\Delta\psi = \psi_{\text{innen}} - \psi_{\text{außen}}, \quad (2.3)$$

dem Oberflächenpotential ψ_O und dem Dipolpotential ψ_D (siehe Abbildung 2.7). Das Transmembranpotential $\Delta\psi$ resultiert aus einer Ladungsseparation über die Membran. Es ist die Potentialdifferenz zwischen den wässrigen Lösungen auf beiden Seiten der Membran und ist mittels zweier Elektroden messbar. Es ergibt sich aus den Gradienten der selektiv transportierten Ionen und damit aus der Arbeit der Ionenpumpen und Kanäle (siehe Kapitel 2.2). Gewöhnlich wird ein konstantes Feld im Inneren der Membran angenommen, so dass $\Delta\psi$ kontinuierlich über die Schichtdicke der Membran abnimmt.

Das Oberflächenpotential ψ_O ist die Potentialdifferenz zwischen der Membranoberfläche und der sie umgebenden wässrigen Phase. Es entsteht durch die fixierten Ladungen in der Membran nahe der Membran-Wasser-Oberfläche und den beweglichen Gegenionen des Elektrolyten. Die theoretische Behandlung des Oberflächenpotentials

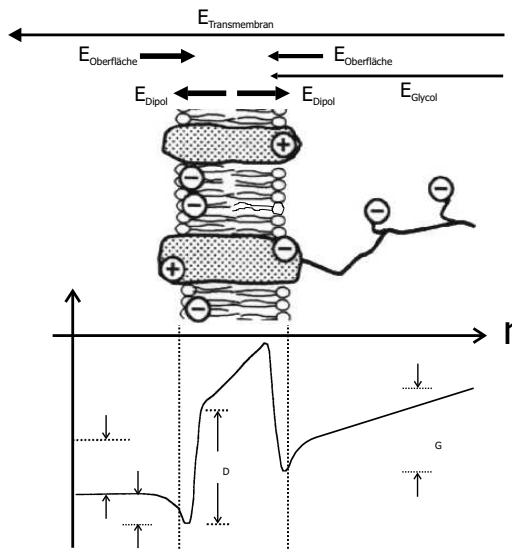


Abbildung 2.7:
Elektrostatistisches Potentialprofil über eine Biomembran im depolarisierten Zustand. Die elektrischen Felder der verschiedenen Potentialbeiträge sind durch Pfeile dargestellt. Der Ort und ihre Länge kennzeichnen die Region in der die Felder auftreten. Die Dicke der Pfeile kennzeichnet die Feldstärke. [144]

erfolgt durch die Gouy-Chapman-Theorie, die für den Potentialverlauf den Ausdruck

$$\psi_O(r) = \psi_0 e^{-\frac{r}{l_D}} \quad (2.4)$$

liefert, wobei l_D die Debye-Länge bezeichnet, und r den Abstand des gemessenen Potentials von der Membranoberfläche angibt [121]. Die Debye-Länge hängt von der Konzentration des Elektrolyten c_E und der Dielektrizitätskonstanten der Lösung ϵ_r gemäß

$$l_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r R T}{2 c_E F^2}} \quad (2.5)$$

ab. In biologischen Membranen entsteht ψ_O hauptsächlich durch die negativ geladenen Köpfe der Lipide, wobei man vereinfachend annimmt, dass die Ladungsdichte auf beiden Seiten der Membran identisch ist. ψ_O liegt in der Größenordnung von einigen 10 mV und hat einen physiologischen Einfluss auf die Leitfähigkeit der Membrankanäle und die Bindung geladener Moleküle an die Zellmembran.

Das Dipolpotential ψ_D resultiert aus orientierten Dipolen an der Membran-Wasser-Oberfläche sowie aus den polaren Kopfgruppen der Lipide und ihren unpolaren Alkylketten. Diese können eine Potentialdifferenz zwischen dem neutralen Inneren der Membran und der Membranaußenseite verursachen. Das Dipolpotential spielt eine wichtige

Rolle für die Steuerung der Membranfunktionen. ψ_D bestimmt die Durchlässigkeit der Membran für hydrophobe Ionen und die Bindung solcher an die Membran. In kleinerem Umfang kann es die Leitfähigkeitseigenschaften der Ionenkanäle in der Membran beeinflussen. ψ_D steigt innerhalb weniger Å in der Membran an und ist wesentlich größer als das elektrische Feld, das durch $\Delta\psi$ erzeugt wird. Der Dipolpotentialgradient ist etwa acht mal steiler als der Gradient des Transmembranpotentials. Das Dipolpotential breitet sich nicht in die wässrige Phase an der Membranoberfläche aus.

Um nun derartige Membranpotentiale in biologischen Zellen zu bestimmen, bedient man sich häufig der Mikroelektroden-Detektion. Diese Methode hat zum einen den Nachteil, dass sie nur für größere Zellen geeignet ist. Zum anderen liefern sie eine schlechte räumliche Auflösung der elektrischen Eigenschaften innerhalb der Membran. Diese Region ist deshalb von besonderem Interesse, weil die für die molekularen Steuermechanismen der Zellen zuständigen Potentiale hier vorliegen.

Eine ergänzende Methode der Membranpotentialdetektion die diesen Problemen Rechnung trägt, beruht auf der Einlagerung von potentialsensitiven Farbstoffen in die Zellmembran, exakt an dem Ort an dem die steuernden Potentialbeiträge wirken.

2.4 Einlagerung lipidähnlicher Moleküle

Lipidähnliche Moleküle lagern sich aufgrund entropischer Kräfte (wie oben gezeigt) geordnet und fixiert in die Zellmembran ein. Bei der Einlagerung der Kohlenwasserstoffschwänze der Lipide in das unpolare Innere einer Lipiddoppelschicht werden Wassermoleküle von entropischen Kräften verdrängt. Aufgrund ihrer Struktur vermeiden sie Störungen der Membranstruktur.

Die Bindung dieser Moleküle an Biomembranen kann dabei durch ein Verteilungsgleichgewicht zwischen einer dreidimensionalen Phase, der Lösung und einer zweidimensionalen Phase, der Lipidmembran in der sich die amphiphilen Moleküle lösen können, beschrieben werden. Dieses Gleichgewicht wird durch Ostwald-Koeffizienten und formale Bindungskonstanten der amphiphilen Moleküle welche die Bindung charakterisieren bestimmt [8]. Der Verteilungskoeffizient γ für die Moleküle zwischen der Lipid- und der wässrigen Phase, ist das Verhältnis der Konzentrationen in den beiden Phasen⁷:

$$\gamma = \frac{c_{Lipid}}{c_{Wasser}} \quad (2.6)$$

Experimentell ermittelt man diesen aus Fluoreszenz-Einlagerungs-Experimenten der Farbstoffe in Modellmembranen, wobei eine bekannte Farbstoffkonzentration mit Lipidvesikeln titriert und die ansteigende Fluoreszenz gemessen wird [124, 115].

Bei Raumtemperatur sind die meisten Lipidmembranen in der flüssigkristallinen Phase, was eine hohe laterale Beweglichkeit der Moleküle zur Folge hat. Laterale Diffusionskoeffizienten von bis zu $D = 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ sind keine Seltenheit. Experimentell untersucht werden derartige Diffusionen mittels Ausbleichen eines fluoreszenzmarkierten Membranareals und der Detektion der Fluoreszenzerholung aufgrund der Eindiffusion von Fluoreszenzsonden.

Eine transversale Diffusion (Flip-Flop-Mechanismus) ist im Vergleich zur lateralen

⁷Für di-4-APEPPS ist $\gamma = 77248$ [115].

Diffusion äußerst selten. Ein derartiger Molekülaustausch erfolgt auf der Zeitskala von einigen Tagen, da die hydrophile Kopfgruppe des lipidähnlichen Moleküls durch die unpolare lipophile Region der Kohlenwasserstoffschwänze unter sehr hohem Energieaufwand dringen muss (siehe Kapitel 4.2).

Die Einlagerung der Potentialsonden in die Membran ist ein dynamisches Problem. Neben Translations- und Rotationsbewegungen der eingelagerten Potentialsonden existieren auch temperaturinduzierte Fluktuationen der Membranlipidmoleküle, die aufgrund einer äußeren Störung, z.B. einer Laserbestrahlung induziert werden. Das hat zur Folge, dass sich bei Laserbestrahlung mit konstanter Leistung ein thermisches Gleichgewicht zwischen den Molekülen in der Lösung und denen in der Membran einstellt.

Die Detektion der optischen Signale der eingelagerten Moleküle kann deshalb nur über sehr komplexe funktionale Beziehungen mit den Membranpotentialänderungen in Zusammenhang gebracht werden.

2.5 Cholesterinvesikel

Da biologische Systeme äußerst komplex sind, und viele Parameter ihre Funktion beeinflussen, werden für gezielte Untersuchungen Modellmembranen eingesetzt. Derartige Modellmembranen bilden Lipiddoppelschichten aus, die im Gegensatz zu biologischen Membransystemen ohne integrale Membranproteine, also ohne ionenselektive Kanäle, angelegt werden können. Modellmembranen werden aus den Bestandteilen biologischer Membranen, z.B. aus oxidiertem Cholesterin oder Phospholipiden erzeugt.

Aufgrund seiner starren Steroid-Struktur (siehe Abbildung 2.8) dient Cholesterin in biologischen Membranen der Stabilisierung der Zellmembran. Das Steroidgerüst ist von

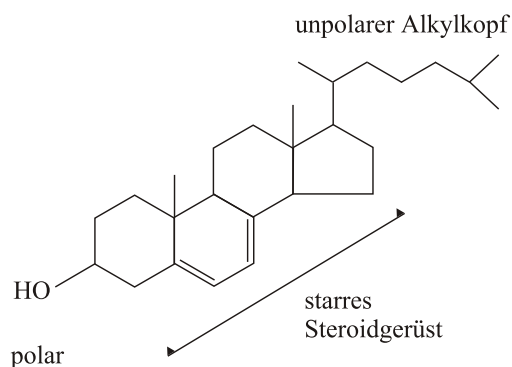


Abbildung 2.8:
Cholesterin Oxidationsprodukt 7-dehydrocholesterin

einer polaren Hydroxylgruppe und einem unpolaren Alkylkopf flankiert. Über die Hydroxylgruppe kann das Cholesterin Wasserstoffbrückenbindungen zur wässrigen Phase ausbilden und besitzt somit hydrophilen Charakter. Das starre Steroidgerüst beansprucht viel Raum was dem Cholesterin schlechte Lipideigenschaften verleiht. Daher sind Membranen aus reinem Cholesterin nicht stabil. Erst die Vielzahl der Oxidationsprodukte (7-hydroxylcholesterin, 8-epoxycholesterin, 7-ketocholesterin) ermöglicht die Ausbildung sehr stabiler aber wenig flexibler Doppelschichtmembranen. Diese Stabilisierung wird auf die gegenseitige Orientierung der Oxidationsprodukte zurückgeführt, die durch Wasserstoffbrücken stabilisiert werden könnten. Eine zusätzliche Einlage-

rung von amphiphilen Molekülen, die ein flexibleres Grüst aufweisen (siehe Kapitel 4.2) verbessert die Vesikelstabilität noch einmal erheblich. Damit können Vesikel aus oxidierten Cholesterin erzeugt werden, die bis zu 3 Stunden ohne äußere Einwirkung stabil existierten.

Eine hemisphärische Vesikel aus oxidierten Cholesterin wird durch Aufblasen eines Cholesterintropfens auf der Spitze einer Teflonspritze, die mit einer Elektrolytlösung gefüllt ist, erzeugt. Dabei wird die Elektrolytlösung der Spritze gegen eine Elektrolytlösung in eine Küvette gedrückt. Diese Technik ist im Detail in [20] beschrieben. Der hydrostatische Druck der Elektrolytlösung innerhalb der Vesikel stabilisiert ihre hemisphärische Form. Zu beobachten ist dabei ein stetes Ausdünnen der Membran durch Abnahme der Flüssigkeitslipidphase die in der hydrophoben Mitte der Cholesterindoppelschicht liegt. Diese Phase beinhaltet Wasser und ungeordnete Cholesterinmoleküle. Der Restgehalt an Flüssigkeit innerhalb der Membran wirkt sich dabei entscheidend auf die Membrankapazität aus. Die jeweils äußeren Cholesterinschichten halten dabei die Grenzflächen aufrecht. Daher stellen sie einen elektrischen Isolator mit

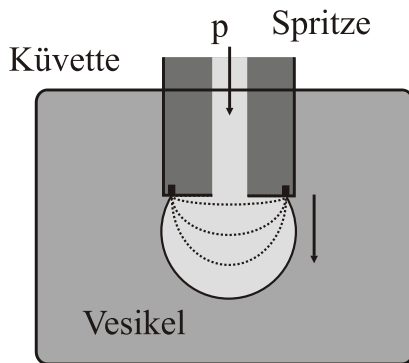


Abbildung 2.9:

Erzeugung einer Vesikel durch aufblasen eines Tropfens oxidierten Cholesterins gegen eine Elektrolytlösung mittels einer Spritze.

sehr hohem Widerstand innerhalb einer sehr gut leitenden Elektrolytlösung dar. Der elektrische Widerstand R_M einer Membran nimmt mit der Größe der Membranfläche ab $R_M = R_m/A$. R_m ist der auf die Einheitsfläche bezogene spezifische Membranwiderstand und beträgt für Cholesterinvesikel in $0,1 \text{ mol/l NaCl}$ -Leitsalzlösung etwa $109 \Omega \text{ cm}^2$ [20].

Die Ionenundurchlässigkeit führt beim Anlegen eines elektrischen Feldes über der Membran zu einer Ladungstrennung im Elektrolyten vor der Membran, so dass der Membran auch kapazitive Eigenschaften zukommen. Die Kapazität des Membransystems C_M wird analog zum Widerstand durch die spezifische Kapazität ausgedrückt $C_M = C_m A = \epsilon_0 \epsilon_r A/d$. Die Größenordnung von C_m beträgt für Vesikel aus oxidierten Cholesterin in $0,1 \text{ M NaCl}$ -Lösung $0,57 \text{ mF/cm}^2$ [20].

Die elektrischen Membraneigenschaften der Cholesterinvesikel in wässriger Lösung werden durch die Zeitkonstante $\tau_M = R_E R_M C_M / (R_M + R_E)$ beschrieben. Sie beträgt für Cholesterinvesikel in einer $0,05 \text{ M NaCl}$ -Lösung $0,5 \text{ ms}$. Eine Erhöhung der Leitsalzkonzentration auf $0,5 \text{ mol/l}$ und eine Vesikelvergrößerung, die die Membrankapazität herabsetzt, verringert die Zeitkonstante auf 2 ms bis 6 ms [107].

Zum einen wird der Ausdünnprozess der Membran durch Anlegen einer Membranspannung beschleunigt. Beim Anlegen eines Transmembranpotentials kann es bei zu hohen Feldstärken zu Durchschlägen der Membran kommen. Die Durchschlagsfeldstärken von Cholesterinvesikeln (in $0,1 \text{ M NaCl}$ -Lösung) liegen bei $7 \cdot 10^7 \text{ V/m}$, so dass ein Trans-

membranpotential von 280 mV zu einem Zusammenbruch der Membran der Dicke von 4 nm führt [20]. Zum anderen macht sich der Ausdünnvorgang im elektrischen Verhalten der Membran derart bemerkbar, dass der Membranwiderstand abnimmt. Das zeitliche Verhalten ist streng linear und korreliert mit der Membranstärke. Jedoch treten des öfteren sprunghafte Störungen des linearen Verhaltens auf, die zu einem unnatürlich niedrigen transienten Widerstand führen. Diese Störungen resultieren aus kleinen Membrandefekten, die durch Verunreinigungen begünstigt werden. Tritt ein solcher Defekt auf, so stehen die Elektrolytlösungen auf beiden Seiten der Membran in direktem Kontakt zueinander und es kommt zu einem elektrischen Kurzschluss. Diese Membrandefekte schließen sich jedoch nach kurzer Zeit wieder, da die Membran bei Raumtemperatur stets im flüssig-kristallinen Zustand vorliegt und entropische Kräfte einen Selbstheilungsmechanismus erzwingen.

Vesikel aus Cholesterin stellen nur ein grobes Modell für eine biologische Membran dar. Sie sind aber experimentell leicht zu handhaben, da sie problemlos mit Radien bis zu 3 mm über einen längeren Zeitraum stabil erzeugt werden können.

2.6 ZNS des medizinischen Blutegels

Das zentrale Nervensystem des medizinischen Blutegels (*hirudo medicinalis*) hat sehr komplexe biologische Strukturen. Es ist in zahlreichen Studien seit dem 19. Jahrhundert ausgiebig untersucht worden [2].

Der Blutegel ist ein streng segmentiertes Lebewesen (siehe Abbildung 2.10). Jedes

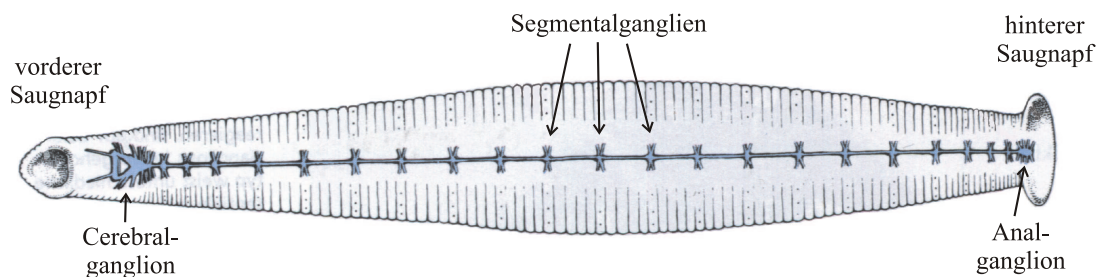


Abbildung 2.10: Segmentierung des medizinischen Blutegels [5]

Segment des Blutegels besteht aus fünf kreisförmigen Ringen, von denen der mittlere sensorische Organe, die Sensillen, die auf optische, mechanische und chemische Reize reagieren, enthält. Der Nervenstrang des Zentralnervensystems (ZNS) liegt, von einem Blutsinus umgeben, auf der Ventralseite des Körpers (siehe Abbildung 2.11). Das ZNS besteht aus einer Kette diskreter Ansammlungen von Neuronen, den Segmentalganglien, die untereinander und mit der Peripherie durch Axonbündel, den Konnektiven verbunden sind. Weiterhin gehört das Zerebralganglion und das Analganglion, die sich jeweils aus mehreren Ganglien herausgebildet und spezialisiert haben, zum ZNS.

Die Segmentalganglien kommunizieren mit ihren Nachbarzellen und entfernten Teilen des Nervensystems und durchsetzen den Hautmuskelschlauch über jeweils zwei Axonbündel, den Wurzeln.

Die einzelnen Segmentalganglien enthalten jeweils sechs Pakete, die durch Bindege-

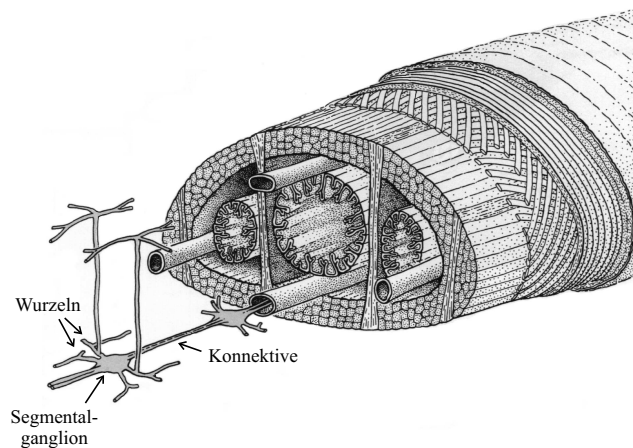


Abbildung 2.11:
ZNS des medizinischen Blutegels [5]

webslamellen voneinander getrennt sind. In diesen befinden sich insgesamt nur etwa 200 Neuronenpaare, die hoch geordnet sind, und sich in Gestalt, Größe, Position, Verzweigungsmuster und Spezialisierung unterscheiden. Sie sind innerhalb des Segmentalganglions als einzelne Zellen klar erkennbar und gut zugänglich (siehe Abbildung 2.12). Die Neuronen entsenden ihre Fortsätze in das darunter liegende Neuropil, wo sie von zwei großen Neuropil-Gliazellen umgeben sind. Im Neuropil erfolgt die synaptische Verschaltung mit den peripheren Nervensystemen und den Konnektiven.

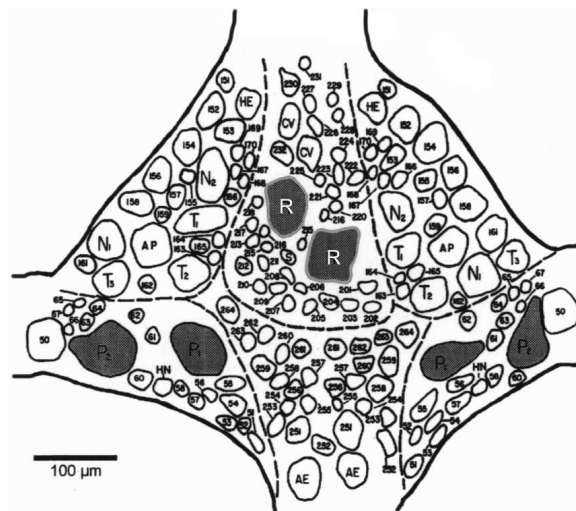


Abbildung 2.12:
Schematische Anordnung der Neuronen innerhalb eines Segmentalganglions. Die drei Paar Sinneszellen, die auf Berührung (T), die Zellpaare, die auf mechanische Druck- (P) oder Schmerzreize (N) auf der Haut reagieren sind, ebenso wie die beiden großen Retzius-Neuronen mit etwa $80\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser [2] und die AE-Motoneuronen, im Bild hervorgehoben [6].

Die drei Paar Sinneszellen, die auf Berührung (T für touch) und die Zellpaare, die auf mechanische Druck- (P für pressure) oder Schmerzreize (N für noxious) auf der Haut reagieren sind in Abbildung 2.12 gekennzeichnet. Mit R sind die beiden großen Retzius-Neuronen⁸ bezeichnet, die wie die P-Zellen eindeutig durch ihre Größe und Lage im Segmentalganglion identifiziert werden können. Die Retzius-Neuronen sind multifunktionelle Neuronen, da sie unter anderem bei der Schleimsekretion, dem Fressverhalten, dem Kontraktionszustand der Längsmuskulatur und dem Auslösen von Schwimmbewegungen eine wichtige Rolle spielen [2]. Sie zeigen daher spontane Aktionspotentiale.

⁸nach ihrem Entdecker, Gustav Retzius benannt

Die beiden AE-Motoneuronen sind auf die Fortbewegung des Blutegels spezialisiert, indem sie die Haut wie eine Ziehharmonika in Falten ziehen lassen. Hierbei liefert jeder Impuls der Zelle im Axon, das zum Muskel führt, ein Aktionspotential, das in der Muskelfaser ein synaptisches Potential auslöst. Auch das Motoneuron, das das Herz innerviert liegt in den Segmentalganglien.

Die Spezialisierung der einzelnen Zellen auf unterschiedliche Reize mit ihren unterschiedlichen Signalverarbeitungseigenschaften und Aktionspotentialformen können durch Anzahl und Typ der Ionenkanäle erklärt werden, die sie enthalten. Hierbei ist besonders die K^+ -Kanalanzahl unterschiedlich. Auf dem Zellkörper liegt die Kanaldichte zwischen $1 \mu m^{-1}$ und $100 \mu m^{-1}$. Jeder Zelltyp weist daher unterschiedliche Aktionspotentiale auf, anhand deren eine Zuordnung erfolgen kann.

Isolierte Segmentalganglien können über längeren Zeitraum in Gewebekultur gehalten werden und bilden daher ein vielversprechendes Präparat zur Untersuchung zahlreicher Mechanismen über die Zellmembran. Diese Zellen behalten in vitro ihre Membraneigenschaften bei.

2.7 Herzmuskelzellen

Die direkte Detektion von Aktionspotentialen des Herzens ist beispielsweise von essentieller Bedeutung für die Entwicklung von Medikamenten zur erfolgreichen Behandlung der Herzinsuffizienz. Einen kompletten Einblick in die elektrische Aktivierung des Herzens lieferte erstmals Dürrer [146], indem er eine Vielzahl extrazellulärer Elektroden in ein menschliches Herz steckte. Somit liess sich der makroskopische Pulsausbreitungsmechanismus zwar klären, doch blieben strukturelle mikroskopische Beiträge der einzelnen Myozyten verborgen. Daher führt man Untersuchungen an Zellsuspensionen individueller Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) durch. Myokardzellen sind längli-

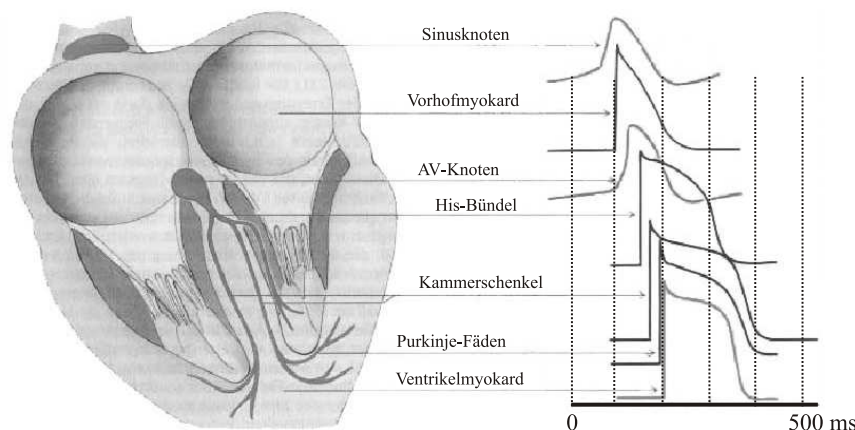


Abbildung 2.13:
Menschliches Herz
mit den für ver-
schie-
dene Bereiche cha-
rakteristischen Ak-
tionspotentialen.

che (etwa $170 \mu m \times 40 \mu m$ große) quergestreifte Muskelzellen (Arbeitsmuskulatur). Das Ruhepotential von Säugetier Kardiomyozyten beträgt $-90 mV$. Durch elektrische Stimulation vom Erregungs- und Leitungssystem wird ein sich fortpflanzendes Aktionspotential erzeugt, das die Kontraktion der Kardiomyozyten induziert. Hierfür ist im Herz der Sinusknoten und der atrioventrikuläre Knoten (AV-Knoten) verantwortlich. Die Fortpflanzung des Aktionspotentials, die auch als elektrotonische Erre-

gungsausbreitung bezeichnet wird, erfolgt durch Ladungsströme zwischen benachbarten Membransegmenten von Kardiomyozyten, die über die sogenannten Gap Junctions elektrisch miteinander gekoppelt sind. Derartige Verbindungen ermöglichen Intermembranabstände von 2 nm , die ohne derartige Kopplungen bei 20 nm bis 30 nm liegen. In Zellsuspensionen aus Kardiomyozyten befinden sich Zellen mit teilweise sehr unterschiedlichen Aktionspotentialen, da in verschiedenen Regionen des Herzens verschiedene Aktionspotentiale ablaufen (siehe Abbildung 2.13). Die Anstiegszeiten der Aktionspotentiale variieren je nach Zelltyp (1 ms bis 20 ms), ebenso wie die Dauer der Aktionspotentiale (150 ms bis 300 ms). Die initiale Phase des Aktionspotentials im Kardiomyozyt ist identisch mit der in Neuronen. Anschließend folgt beim Herzen eine längere Plateauphase, die auf dem depolarisierenden Einfluss von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen beruht. Diese haben eine Aktivierungsschwelle von etwa -40 mV und inaktivieren innerhalb von 150 ms bis 300 ms . Daher werden sie zu Beginn des Aktionspotentials aktiviert und bleiben während der gesamten Plateauphase geöffnet. Zur Repolarisation tragen außer der Inaktivierung der Ca^{2+} -Kanäle besonders spannungsabhängige K^+ -Kanäle bei. Diese werden wie in Nervenzellen durch Depolarisation aktiviert. In Herzmuskelzellen erfolgt die Aktivierung der K^+ -Kanäle mit Verzögerung, so dass die Repolarisation nicht sofort erfolgt. Die Inaktivierung der Kanäle ist indessen schneller, so dass keine Hyperpolarisation gegenüber dem Ruhepotential auftritt. Speziell im Sinusknoten des Herzens liegt ein Ruhepotential von -70 mV vor. Die Depolarisation erfolgt bis zu Werten von $+20\text{ mV}$.

Kapitel 3

Nichtlineare Optik

In dieser Arbeit werden mittels nichtlinearer optischer Techniken Änderungen von Membranpotentialen detektiert. Daher ist es notwendig im Folgenden kurz auf die Ausbreitung, Entstehung und Beeinflussung der nichtlinearen optischen Antwort des Mediums einzugehen.

Zur Beschreibung der nichtlinearen optischen Phänomene wird die Ausbreitung der elektromagnetischen Wellen mittels klassischer Elektrodynamik beschrieben. Lediglich an essentiellen Stellen, wo Licht-Materie-Wechselwirkungen behandelt werden, werden die auftretenden Wechselwirkungskoeffizienten quantenmechanisch beschrieben. Weiterhin wird die Modulation der nichtlinearen optischen Komponenten durch ein „langsam“ veränderliches elektrisches Feld, dem Membranpotential, erklärt.

3.1 Elektromagnetische Wellen in Dielektrika

Die Ausbreitung ebener elektromagnetischer Wellen in einem dielektrischen Medium wird durch die Wellengleichung, die sich aus den Maxwell-Gleichungen ergibt, beschrieben:

$$\vec{\nabla}^2 \vec{E} - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} - \mu_0 \frac{\partial^2 \vec{P}}{\partial t^2} = 0 \quad (3.1)$$

Hier sind $\vec{E}$ der elektrische Feldvektor, c die Lichtgeschwindigkeit, ϵ_0 die Dielektrizitätskonstante des Vakuums, μ_0 die Permeabilität des Vakuums und $\vec{P}$ die Polarisierung des Dielektrikums. Die magnetische Feldkomponente beeinflusst die Bewegung der Elektronen in einem Dielektrikum kaum, so dass diese nicht weiter betrachtet wird. Die Wellenausbreitung einer ebenen monochromatischen Welle in z -Richtung wird beschrieben durch:

$$\vec{E}(r, z, t) = \frac{1}{2} \vec{E}_0(r, z, t) e^{i(kz - \omega t)} + \frac{1}{2} \vec{E}_0^*(r, z, t) e^{i(\omega t - kz)} \quad (3.2)$$

mit den transversalen räumlichen Koordinaten $r = (x, y)$, der Amplitude $\vec{E}_0$, der Kreisfrequenz ω und dem Betrag des Wellenvektors $k = 2\pi n/\lambda = \omega n/c$.

Da kurze Pulse elektromagnetischer Strahlung aus einem breiten Spektrum bestehen, werden hier auch Beiträge zum totalen elektrischen Feld mit verschiedenen Frequenzen

ω_j betrachtet:

$$\vec{E}_T(r, z, t) = \frac{1}{2} \sum_j \vec{E}_{0,j}(r, z, t) e^{i(k_j z - \omega_j t)} + \frac{1}{2} \sum_j \vec{E}_{0,j}^*(r, z, t) e^{i(\omega_j t - k_j z)} \quad (3.3)$$

Äquivalent dazu ist die Polarisation, die durch die elektrischen Felder induziert wird,

$$\vec{P}(r, z, t) = \frac{1}{2} \sum_j \vec{P}_j(r, z, t) e^{i(k_j^P z - \omega_j t)} + \frac{1}{2} \sum_j \vec{P}_j^*(r, z, t) e^{i(\omega_j t - k_j^P z)}. \quad (3.4)$$

Der Wellenvektor k_j^P kann vom Wellenvektor des elektrischen Feldes k_i abweichen, sobald unterschiedliche Phasengeschwindigkeiten zwischen der Polarisation und dem erzeugenden Feld vorliegen.

Die Abhängigkeit der Polarisation vom erzeugenden elektrischen Feld wird näherungsweise durch eine Multipolentwicklung beschrieben, in der die Polarisation in Ladungsbeiträge wie Dipolterm, Quadrupolterm, usw. aufgeteilt wird. Dem liegt die Voraussetzung zugrunde, dass die elektrischen Felder schwach gegenüber der Bindung der Elektronen im Medium sind (Näherung der schwachen Felder).

$$\vec{P}(r, z, t) = \mathcal{P}(r, z, t) + \nabla \mathcal{Q}(r, z, t) + \nabla \cdot \cdot \nabla \mathcal{O}(r, z, t) + \dots \quad (3.5)$$

Der erste Term entspricht der Dipol-Polarisation, der zweite der Quadrupol-Polarisation und der nächste der Oktupol-Polarisation, usw. Im weiten Bereich der optischen Wellenlängen konvergiert diese Reihe sehr schnell, da die charakteristischen Dimensionen des atomaren Oszillators deutlich kleiner sind. Somit wird die Dipol-Polarisation die dominierende Antwort (Dipolnäherung) auf ein einfallendes elektrisches Feld sein.

Um eine Beziehung zwischen den Komponenten der Polarisation und denen des einfallenden optischen Feldes herzustellen, betrachtet man zunächst die Fourier-Komponenten der Polarisation. Unter der Bedingung der Näherung der schwachen Felder können die Fourier-Komponenten jedes Terms in eine Potenzreihe des elektrischen Feldes entwickelt werden. Somit erhält man für die Fourier-Transformierte die totale Polarisation:

$$\begin{aligned} \vec{P}_T(r, z, \omega) &= \epsilon_0 \vec{\chi}^{(1)} \vec{E}_T(r, z, \omega) + \epsilon_0 [\vec{\chi}^{(2)} \vec{E}_T^2(r, z)]_\omega + \epsilon_0 [\vec{\chi}^{(3)} \vec{E}_T^3(r, z)]_\omega + \dots \\ &+ \epsilon_0 Q^{(1)} \nabla \vec{E}_T(r, z, \omega) + \epsilon_0 [Q^{(2)} \nabla \vec{E}_T^2(r, z)]_\omega + \epsilon_0 [Q^{(3)} \nabla \vec{E}_T^3(r, z)]_\omega + \dots \end{aligned} \quad (3.6)$$

$\vec{E}_T(r, z, \omega)$ ist die Fourier-Transformierte des totalen optischen Feldes $\vec{E}_T(r, z, t)$ aus Gleichung (3.3). $[\]_\omega$ symbolisiert, dass nur die Fourier-Komponente der Frequenz ω zum Wert in der Klammer beitragen soll. Die Koeffizienten der einzelnen Terme bezeichnet man dabei als Dipol-Suszeptibilität n-ter Ordnung und Quadrupol-Suszeptibilität n-ter Ordnung.

Zerlegt man nun die Polarisation in die Summe ihrer linearen und nichtlinearen Anteile, so erhält man:

$$\vec{P}_T(\omega) = \vec{P}_T^L(\omega) + \vec{P}_T^{NL}(\omega) \quad (3.7)$$

Mit den Beiträgen $\vec{P}_T^L$ für die lineare Polarisation erhält man:

$$\vec{P}_T^L(r, z, \omega) = \epsilon_0 \vec{\chi}^{(1)} \vec{E}_1(r, z, \omega) + \epsilon_0 Q^{(1)} \nabla \vec{E}_T(\omega) + \dots \quad (3.8)$$

und für $\vec{P}_T^{NL}$ für die nichtlineare Polarisierung erhält man:

$$\begin{aligned} \vec{P}_T^{NL}(r, z, \omega) = & \epsilon_0 \left[\vec{\chi}^{(2)} \vec{E}_T^2(r, z, \omega) \right]_\omega + \epsilon_0 \left[\vec{\chi}^{(3)} \vec{E}_T^3(r, z, \omega) \right]_\omega + \dots \\ & + \epsilon_0 \left[Q^{(2)} \nabla \vec{E}_T^2 \right]_\omega + \epsilon_0 \left[Q^{(3)} \nabla \vec{E}_T^3 \right]_\omega + \dots \end{aligned} \quad (3.9)$$

Eine Bedingung für die Gültigkeit der Amplitudengleichungen ist die Näherung der schwachen Felder, aufgrund der die Störungsentwicklung in $\vec{P}$ schnell konvergiert. Somit sind die Dipol-Polarisations-Terme die dominierenden Wechselwirkungs-Terme mit optischen Feldern, und man erhält durch Rücktransformation jedes Betrages der Gleichungen (3.8 und 3.9) die totale Polarisation in der Zeit-Domäne. Die resultierende Gleichung beinhaltet Faltungen der Potenzen der zeitabhängigen elektrischen Felder mit den zeitabhängigen Antwortfunktionen des Mediums. Diese entsprechen den inversen Transformationen der frequenzabhängigen Suszeptibilitäten. Ist die charakteristische Antwortzeit der Polarisationskomponenten wesentlich schneller als die Änderung der optischen Feldamplituden, so können die Faltungsintegrale durch einfache Produkte ersetzt werden:

$$\vec{P}_T(t) = \epsilon_0 \vec{\chi}^{(1)} \vec{E}_T(t) + \epsilon_0 \vec{\chi}^{(2)} \vec{E}_T^2(t) + \epsilon_0 \vec{\chi}^{(3)} \vec{E}_T^3(t) + \dots \quad (3.10)$$

Einsetzen der totalen zeitabhängigen Polarisation und des zeitabhängigen elektrischen Feldvektors in die Wellengleichung (3.1) liefert einen Satz gekoppelter Differentialgleichungen der elektrischen Feldamplituden mit Termen der nichtlinearen Polarisation als Quellterm kohärenter Strahlung neuer Frequenzen ω_j :

$$\vec{\nabla}^2 \vec{E}_j + \frac{1 + \chi_j^{(1)}}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{E}_j}{\partial t^2} + \mu_0 \frac{\partial^2 \vec{P}_j^{NL}}{\partial t^2} = 0 \quad (3.11)$$

In der Näherung der langsam variierenden Einhüllenden kann das elektrische Feld als Produkt zweier Komponenten dargestellt werden. Eine oszilliert mit der optischen Frequenz der einfallenden Strahlung, die andere mit einer wesentlich geringeren Frequenz der Einhüllenden der optischen Pulse ¹ (für weitere Annahmen und Näherungen siehe [89]).

Somit nähert man:

$$\frac{\partial^2 \vec{E}_j}{\partial z^2} \ll k_j \frac{\partial \vec{E}_j}{\partial z} \quad \text{und} \quad \frac{\partial^2 \vec{E}_j}{\partial t^2} \ll \omega_j \frac{\partial \vec{E}_j}{\partial t} \quad (3.12)$$

und erhält mit $k_j^2 = \omega_j^2(1 + \chi_j^{(1)})/c^2 = \omega_j^2 n_j^2/c^2$ und $\Delta k_j = k_j - k_j^P$ als Wellenvektorfehlانpassung für die Welle der j-ten Frequenz:

$$\vec{\nabla}_\perp^2 \vec{E}_j + 2ik_j \frac{\partial \vec{E}_j}{\partial z} + \frac{2i\omega_j n_j^2}{c^2} \frac{\partial \vec{E}_j}{\partial t} + \frac{\omega_j^2}{\epsilon_0 c^2} \vec{P}_j^{NL} e^{-i\Delta k_j z} = 0 \quad (3.13)$$

Hierbei wurden die Suszeptibilitäten als dispersionslos angenommen, d.h. die Frequenzabhängigkeit von $\vec{\chi}_j^{(i)}$ wurde vollständig vernachlässigt. Dies ist bei monochromatischen Wellen zulässig, da hier die Feldamplituden zeitunabhängig sind.

¹Die Periodendauer einer optischen Oszillation bei 820nm ist etwa 300mal kürzer als die Dauer eines Pulses von 100fs.

Die nichtlineare Polarisation $\vec{P}^{NL}$ ist der Quellterm der nichtlinearen Strahlungsanteile im elektrischen Feld. Aus der Wellengleichung (3.13) erhält man für monochromatische, ebene Wellen, die sich in z-Richtung ausbreiten, einen Satz gekoppelter Differentialgleichungen:

$$\frac{\partial E_0(\omega, z)}{\partial z} = \frac{ik}{2\epsilon_0 n^2} \vec{P}^{NL}(\omega, z) e^{-ikz} \quad (3.14)$$

Die Kopplungsterme für einen nichtlinearen Prozess zweiter Ordnung enthalten dabei die Polarisationssterme:

$$\begin{aligned} \vec{P}^{(2)}(2\omega, z) &= \epsilon_0 \vec{\chi}^{(2)}(2\omega; \omega, \omega) \vec{E}_0^2(2\omega) e^{2ik_\omega z} \\ \vec{P}^{(2)}(\omega_3 = \omega_1 + \omega_2, z) &= \epsilon_0 \vec{\chi}^{(2)}(-\omega_3; \omega_1, \omega_2) \vec{E}_0(\omega_1) \vec{E}_0(\omega_2) e^{i(k_{\omega_1} + k_{\omega_2})z} \\ \vec{P}^{(2)}(\omega_3 = \omega_1 - \omega_2, z) &= \epsilon_0 \vec{\chi}^{(2)}(-\omega_3; \omega_1, -\omega_2) \vec{E}_0(\omega_1) \vec{E}_0^*(\omega_2) e^{i(k_{\omega_1} - k_{\omega_2})z} \\ \vec{P}^{(2)}(\omega_3 = 0, z) &= \epsilon_0 \vec{\chi}^{(2)}(0; \omega, -\omega) \vec{E}_0(2\omega) \vec{E}_0^*(\omega) e^{i(k_{2\omega} - k_\omega)z} \end{aligned} \quad (3.15)$$

In diesen Termen ist neben der Frequenzverdopplung, der Summenfrequenz- und Differenzfrequenzbildung auch die optische Gleichrichtung enthalten. Hierbei bewirkt eine Nettoverschiebung der Elektronen einen konstanten Polarisationsbeitrag. Dies ist vergleichbar mit einer Polarisation, die durch ein externes elektrisches DC-Feld induziert wird. Phasenbetrachtungen sind hierbei nicht notwendig, so dass auch keine Kohärenz existiert. Dieser Effekt ist mit dem elektrooptischen Pockels-Effekt vergleichbar, so dass dieser Tensor durch den Pockels-Effekt bestimmbar wird. Er bewirkt eine Ausrichtung der nichtlinear optischen Moleküle in einer flexiblen Matrix.

Im Fall der Erzeugung der zweiten Harmonischen erhält man zwei gekoppelte Differenzialgleichungen mit $\vec{E}_\omega = E_0(z) e^{ik_\omega z}$ und $\vec{E}_{2\omega} = E_0(z) e^{ik_{2\omega} z}$ [79, 90, 91, 19]:

$$\begin{aligned} \frac{\partial \vec{E}_{2\omega}}{\partial z} &= \frac{i\omega}{2n_{2\omega}c} [\vec{\chi}^{(2)}(-2\omega; \omega, \omega) \vec{E}_\omega^2] e^{i\Delta k z} \\ \frac{\partial \vec{E}_\omega}{\partial z} &= \frac{i\omega}{2n_{2\omega}c} [\vec{\chi}^{(2)}(-2\omega; \omega, \omega) \vec{E}_\omega^* \vec{E}_{2\omega}] e^{i\Delta k z} \end{aligned} \quad (3.16)$$

mit $\Delta \vec{k} = \vec{k}_{2\omega} - 2\vec{k}_\omega = \frac{4\pi(n_{2\omega} - n_\omega)}{\lambda_\omega}$ und $\vec{E}^*(\omega) = \vec{E}(-\omega)$.

Die Energie die von einer elektromagnetischen Welle durch eine Fläche transportiert wird, beschreibt der Poynting-Vektor $\vec{S}$. Die zeitliche Mittelung von $\vec{S}$ liefert die Intensität des Strahlungsfeldes als direkte Messgröße:

$$I \equiv \langle |\vec{S}| \rangle = \frac{1}{2} n \epsilon_0 c \langle E_0 E_0^* \rangle \quad [W/m^2] \quad (3.17)$$

Im Rahmen der Kontinuum-Feld-Näherung erhält man für den Photonenfluss:

$$\phi = \frac{\langle |\vec{S}| \rangle}{\hbar\omega} = \frac{n \epsilon_0 c \langle |\vec{E}_0|^2 \rangle}{2 \hbar \omega} \quad [Photonen/m^2 s] \quad (3.18)$$

Bei geringer Schwächung der Intensität der monochromatischen Fundamentalen I_ω

ergibt sich für die Intensität der zweiten Harmonischen $I_{2\omega}$ in Abhängigkeit von der Ausbreitungslänge l im nichtlinearen Medium die Beziehung

$$I_{2\omega}(l) = \frac{\omega^2}{2\epsilon_0 c^3} \frac{|\vec{\chi}^{(2)}(-2\omega; \omega, \omega)|}{n_{2\omega}^2 n_{2\omega}} I_{\omega}^2 l^2 \left(\frac{\sin(\Delta k l / 2)}{(\Delta k l / 2)} \right)^2 \quad (3.19)$$

Da die erzeugten nichtlinearen Strahlungsanteile eine größere Phasengeschwindigkeit als ihr Quellterm besitzen, kommt es im nicht phasenangepassten Fall zu einer Dephasierung. Im Fall der zweiten Harmonischen ist $\vec{k}_{2\omega} \neq 2\vec{k}_{\omega}$, so dass die Amplitude bis zu einem zurückgelegten Weg Z_c maximal wird:

$$Z_c = \frac{\pi}{|\vec{k}_{2\omega} - 2\vec{k}_{\omega}|} = \frac{\lambda_1}{4 |n_{2\omega} - n_{\omega}|} \quad (3.20)$$

Diese Distanz bezeichnet man als Kohärenzlänge der zweiten Harmonischen. Sie liegt in der Größenordnung der fundamentalen Wellenlänge. Je besser also $\vec{k}_{2\omega}$ und $2\vec{k}_{\omega}$, bzw. $n_{2\omega}$ und n_{ω} übereinstimmen, um so größer ist die Kohärenzlänge der SHG und somit auch der effektive Weg, auf dem sie generiert und nicht durch destruktive Interferenz begrenzt wird.

Im phasenangepassten Fall der Gleichung (3.19) ist $\Delta \vec{k} = 0$. Für kleine Argumente der $(\sin x)/x$ -Funktion steigt $I_{2\omega}(l)$ proportional zu l^2 . Falls die Schwächung der Intensität der Fundamentalen nicht vernachlässigt werden kann, erhält man als Lösung der Gleichungen (3.16):

$$I_{2\omega}(l) = I_{\omega}(0) \tanh^2(Gl) \quad \text{und} \quad I_{\omega}(l) = I_{\omega}(0) \frac{1}{\cosh^2(Gl)} \quad (3.21)$$

$$\text{mit} \quad G = \frac{\omega^2}{2\epsilon_0 c^3} \frac{|\vec{\chi}^{(2)}(-2\omega; \omega, \omega)|}{n^3} I_{\omega}(0) \quad (3.22)$$

Hieraus erhält man die Sättigung der Intensität der zweiten Harmonischen durch die Schwächung der Intensität der Fundamentalen während der Frequenzkonversion.

3.2 Ausbreitung von Laserpulsen in Dielektrika

Die Pulsdauer nimmt durch den Einfluss linear dispersiver optischer Elemente in der Regel zu. Der entscheidende Einfluss auf die Pulsdauer in einem Medium mit linearer Dispersion wird durch die unterschiedlichen Gruppengeschwindigkeiten der spektralen Anteile eines Laserpulses verursacht (Gruppengeschwindigkeitsdispersion). Der Effekt der zeitlichen Pulsverbreiterung wächst mit der spektralen Breite des Laserpulses. Für transformlimitierte Pulse verhalten sich Pulsdauer und spektrale Breite reziprok zueinander. Der Einfluss der Dispersion auf die Pulsdauer nimmt daher für kürzere Pulse zu. Die Zunahme der Pulsdauer τ durch die lineare Dispersion des Mediums kann durch den Dispersionsparameter $\frac{\partial^2 k}{\partial \omega^2} = \frac{\lambda^3}{2\pi c^2} \cdot \frac{\partial^2 n}{\partial \lambda^2}$ und die Pulsdauer im Transformlimit τ_0 ausgedrückt werden.

$$\tau = \tau_0 \sqrt{1 + \frac{L}{L_d}} \quad \text{mit} \quad L_d = \frac{\tau_0^2}{2 \frac{\partial^2 k}{\partial \omega^2}} \quad (3.23)$$

Man definiert eine für ein Material charakteristische Dispersionslänge L_d . Nachdem ein Transform-limitierter Laserpuls der Dauer τ_0 die Dispersionslänge durchlaufen hat, hat sich die Pulsdauer um einen Faktor $\sqrt{2}$ erhöht. Die Dispersionslänge für die Wellenlänge 800 nm in der Glassorte BK7 bei einem Transform-limitierten 100 fs -Puls ist $L_d = 0,74\text{ m}$, so dass diese Pulsverbreiterung im Folgenden nicht weiter betrachtet wird.

Die Wellengleichung (3.13) muss bei pulsförmiger elektrischer Strahlung, d.h. zeitabhängigen Feldamplituden, aufgrund der Dispersion der Suszeptibilitäten durch Einführung der Gruppengeschwindigkeit modifiziert werden:

$$v_{gr,j} = \frac{c/n_j}{1 + (\omega_j/n_j)d\omega_j/dn_j} \quad (3.24)$$

Ersetzt man die Phasengeschwindigkeiten durch die Gruppengeschwindigkeiten, so erhält man:

$$\vec{\nabla}_\perp^2 \vec{E}_j + 2ik_j \left(\frac{\partial \vec{E}_j}{\partial z} + \frac{1}{v_{gr,j}} \frac{\partial \vec{E}_j}{\partial t} \right) + \frac{\omega_j^2}{\epsilon_0 c^2} \vec{P}_j^{NL} e^{-i\Delta k_j z} = 0 \quad (3.25)$$

Eine Beschränkung der Konversion für die Frequenzverdopplung von nicht monochromatischen Wellen, den zeitlich kurzen und deshalb spektral breiten Pulsen, liegt in der Gruppengeschwindigkeitsdispersion. Für einen 800 nm -Fundamental-Puls und der zweiten Harmonischen (SHG) bei 400 nm beträgt die reziproke Gruppengeschwindigkeitsdifferenz 190 fs/mm , da gilt:

$$\frac{1}{\Delta v_{gr}} = \frac{1}{v_{gr,\lambda_2}} - \frac{1}{v_{gr,\lambda_1}} = \frac{1}{c} \left(n_{\lambda_2} - \lambda_2 \frac{\partial n_2}{\partial \lambda_2} - n_{\lambda_1} - \lambda_1 \frac{\partial n_1}{\partial \lambda_1} \right) \quad (3.26)$$

Die Divergenzlänge l_w zwischen dem Fundamental-Puls und dem zweiten Harmonischen-Puls ergibt sich aus der Gruppengeschwindigkeitsdifferenz Δv_{gr} .

$$l_w = \tau_1 \Delta v_{gr} \quad (3.27)$$

Das bedeutet für einen 100 fs langen Fundamentalpuls der Wellenlänge 800 nm eine obere Beschränkung der Wechselwirkungslänge in einem frequenzverdoppelnden Kristall auf $500\text{ }\mu\text{m}$.

So ist der β -Barium-Borat-Kristall (BBO) für die phasenangepasste Typ-I-Frequenzverdopplung bei einer Wellenlänge von 800 nm und für den senkrechten Einfall des Fundamental-Pulses optimiert. Die Konversionseffizienz erreicht für eine Kristalllänge von $200\text{ }\mu\text{m}$ annähernd Sättigung und liegt bei maximal 30 % [92].

In Quarz ist keine Phasen Anpassung möglich, da sich die winkelabhängigen Indexkurven für den ordentlichen und außerordentlichen Strahl nicht schneiden. Daher sind zur SHG sehr dünne Quarzplättchen notwendig, deren Dicke ein ungeradzahliges Vielfaches der Kohärenzlänge sein muß.

Die Intensität des SH-Signals pro Laserpuls kann nach [31] abgeschätzt werden:

$$I(2\omega) = \frac{32 \pi^3 \omega}{c \cos^2 \alpha_{2\omega} \hbar c^3 \epsilon_{2\omega} \sqrt{\epsilon_\omega}} \left| \vec{F}(2\omega) \times \vec{\chi}^{(2)} \cdot \vec{F}(\omega) \vec{F}(\omega) \right|^2 I^2(\omega) A \tau \quad (3.28)$$

Hier sind α der Einfallswinkel der Laserpulse, $\vec{F}(\omega)$ das Produkt der Fresneffaktoren an der Grenzfläche (siehe Kapitel 3.3) mit der Polarisationsrichtung des Lasers bei der Kreisfrequenz ω und $I(\omega)$, A , τ , sind die Intensität, die Wechselwirkungsfläche und die Pulsdauer der fundamentalen Laserpulse. Die SH-Intensität steigt quadratisch mit der Pulsleistung, doch wird ein Signal nur während der Dauer der Pulse generiert, da die SHG ein instantaner Prozess ist.

3.3 Elektromagnetische Wellen an Grenzflächen

Zur Erzeugung der zweiten Harmonischen muss eine Symmetriebrechung vorliegen, die im einfachsten Fall an Grenzflächen auftritt (siehe Kapitel 3.5). Daher werden hier kurz die amplitudenmodifizierenden Koeffizienten, des auf eine Grenzfläche treffenden elektrischen Feldes, beschrieben.

An einer Grenzfläche zweier Medien ist die tangentielle Komponente des elektrischen Feldes beim Übergang vom Medium mit dem Brechungsindex $n_{ein} = n_{ref}$ in das Medium mit dem Brechungsindex n_{trans} stetig. Hierbei ist die xz-Ebene die Einfallsebene und α der Einfallswinkel gegen die Grenzflächennormale. Das bedeutet für die Wellenvektoren:

$$k_{ein,x} = k_{ref,x} = k_{trans,x} \quad (3.29)$$

Hieraus lassen sich die Fresnelschen-Formeln für senkrechte ($\perp$) und parallele ($\parallel$) Polarisation bezüglich der Einfallsebene ableiten. Für die Amplitudenreflexionskoeffizienten R_i und die Amplitudentransmissionskoeffizienten T_i (Fresnel-Faktoren) gilt [98]:

$$R_{\perp} \equiv \left(\frac{E_{0,ref}}{E_{0,ein}} \right)_{\perp} = \frac{k_{ein,z} - k_{trans,z}}{k_{ein,z} + k_{trans,z}} = \frac{n_{ein} \cos \alpha - \sqrt{n_{trans}^2 - n_{ein}^2 \sin^2 \alpha}}{n_{ein} \cos \alpha + \sqrt{n_{trans}^2 - n_{ein}^2 \sin^2 \alpha}} \quad (3.30)$$

$$T_{\perp} \equiv \left(\frac{E_{0,trans}}{E_{0,ein}} \right)_{\perp} = \frac{2 k_{ein,z}}{k_{ein,z} + k_{trans,z}} = \frac{2 n_{ein} \cos \alpha}{n_{ein} \cos \alpha + n_{trans} \sqrt{n_{trans}^2 - n_{ein}^2 \sin^2 \alpha}} \quad (3.31)$$

$$R_{\parallel} \equiv \left(\frac{E_{0,ref}}{E_{0,ein}} \right)_{\parallel} = \frac{n_{trans}^2 \cos \alpha - n_{ein} \sqrt{n_{trans}^2 - n_{ein}^2 \sin^2 \alpha}}{n_{trans}^2 \cos \alpha + n_{ein} \sqrt{n_{trans}^2 - n_{ein}^2 \sin^2 \alpha}} \quad (3.32)$$

$$T_{\parallel} \equiv \left(\frac{E_{0,trans}}{E_{0,ein}} \right)_{\parallel} = \frac{2 n_{ein} n_{trans} \cos \alpha}{n_{trans}^2 \cos \alpha + n_{ein} \sqrt{n_{trans}^2 - n_{ein}^2 \sin^2 \alpha}} \quad (3.33)$$

3.4 Bestimmung der Suszeptibilitäten

Bis hierher wurde nur die Ausbreitung und Beeinflussung elektromagnetischer Wellen in Dielektrika beschrieben. Im Folgenden wird die Erzeugung der zweiten Harmonischen aufgrund der Wechselwirkung der einfallenden Strahlung mit der Materie beschrieben.

Die Wechselwirkung eines elektromagnetischen Feldes mit dielektrischer Materie erhält

man aus der Betrachtung zweier wechselwirkender Subsysteme. Das eine ist das Strahlungsfeld, das andere die optisch effektiven Elektronen der Materie, die sich im Potentialfeld des wechselwirkenden Moleküls bewegen. Diese Betrachtungen erfordern quantenmechanisches Vorgehen, da klassische Betrachtungsweisen wie das Drude-Lorentz-Modell des anharmonischen Oszillators die nichtlinearen Effekte nur unvollständig wiedergeben [71].

Da zu einer quantenmechanischen Beschreibung des Systems oft nur die Energieniveaus der beteiligten Atome und ihre Übergangsdipolmomente zur Verfügung stehen, wird hier der Dichtematrix-Formalismus angesetzt, um die Suszeptibilitäten eines Systems zu bestimmen. Nur mittels des Dichtematrix-Formalismus lassen sich im Falle resonanter Prozesse auch die Relaxationsprozesse richtig beschreiben.

Die zeitliche Entwicklung des Dichtematrix-Operators $\hat{\rho}$ wird durch die quantenmechanische Liouville-Gleichung beschrieben:

$$i\hbar \frac{\partial \hat{\rho}}{\partial t} = [\hat{H}, \hat{\rho}] \quad (3.34)$$

Der Hamiltonian besteht dabei aufgrund eines Störungsansatzes aus drei Termen: $\hat{H} = \hat{H}_0 + \hat{H}_{WW} + \hat{H}_{relax}$. Hierin ist $\hat{H}_0$ der Operator des ungestörten Materialsystems, $\hat{H}_{WW}$ der Operator, der die Wechselwirkungen des Lichtes mit der Materie beschreibt und $\hat{H}_{relax} \propto \Gamma_{nm} = 1/T_{nm}$ der Operator, der die Relaxation des gestörten $\hat{\rho}$ proportional zur inversen Relaxationszeit zwischen den Zuständen ins thermische Gleichgewicht beschreibt. Hierbei liefert die Dämpfungskonstante Γ_{ii} die Besetzungsrelaxation der Diagonalelemente und Γ_{ij} die Dephasierung der Nichtdiagonalelemente des Dichtematrix-Operators.

In der oben verfolgten elektrischen Dipol-Näherung ist $\hat{H}_{WW} = -e \hat{r} \cdot \vec{E} = -\hat{\mu} \cdot \vec{E}$. Hier ist $\hat{\mu}$ der Dipolmoment-Operator mit seinen Dipol-Übergangsmatrixelementen $\mu_{nm} = \mu_{mn}^* = \langle m | -e \hat{r} | n \rangle$, dessen Diagonalelemente identisch null sind. Der Erwartungswert von $\hat{\mu}$ ist gegeben durch:

$$\langle \hat{\mu} \rangle = \text{Spur} \left[\begin{pmatrix} \rho_{nn} & \rho_{nm} \\ \rho_{mn} & \rho_{mm} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 & \mu_{nm} \\ \mu_{mn} & 0 \end{pmatrix} \right] = \sum_{nm} (\rho_{nm} \mu_{mn}) = \rho_{nm} \mu_{mn} + \rho_{mn} \mu_{nm} \quad (3.35)$$

Betrachtet man im Folgenden Übergänge zwischen den Zuständen $\langle n |$ und $| m \rangle$, so erhält man für die quantenmechanische Liouville-Gleichung:

$$\frac{\partial \rho_{nm}}{\partial t} = \frac{1}{i\hbar} [\hat{H}_0, \hat{\rho}]_{nm} + \frac{1}{i\hbar} [\hat{H}_{WW}, \hat{\rho}]_{nm} - \Gamma_{nm} (\rho_{nm} - \rho_{nm}^{(0)}) \quad (3.36)$$

Im ungestörten Fall ist $\hat{H}_0 | n \rangle = E_n | n \rangle$ mit den Eigenzuständen $| n \rangle$ als Eigenfunktionen des ungestörten Hamiltonian und den Eigenenergien E_n . Daher ist $\hat{H}_0$ von diagonalen Gestalt, und es gilt $H_{0,nm} = E_0 \delta_{nm}$. Betrachtet man zunächst den ungestörten Kommutator, so folgt:

$$\begin{aligned} [\hat{H}_0, \hat{\rho}]_{nm} &= (\hat{H}_0 \hat{\rho} - \hat{\rho} \hat{H}_0)_{nm} = \frac{1}{i\hbar} \sum_{\nu} (H_{0,n\nu} \rho_{\nu m} - \rho_{n\nu} H_{0,\nu m}) \\ &= \sum_{\nu} (E_n \delta_{n\nu} \rho_{\nu m} - \rho_{n\nu} E_m \delta_{\nu m}) = (E_n - E_m) \rho_{nm} = \hbar \omega_{nm} \rho_{nm} \end{aligned} \quad (3.37)$$

Somit erhält man für die zeitliche Entwicklung der gestörten Dichtematrix ρ_{nm} :

$$\frac{\partial \rho_{nm}}{\partial t} = -i \omega_{nm} \rho_{nm} + \frac{1}{i \hbar} [\hat{H}_{WW}, \hat{\rho}]_{nm} - \Gamma_{nm} (\rho_{nm} - \rho_{nm}^{(0)}) \quad (3.38)$$

Diese Gleichung ist analytisch meist nicht lösbar, daher erfolgt ein Störungsansatz gemäß:

$$\rho_{nm} = \rho_{nm}^{(0)} + \rho_{nm}^{(1)} + \rho_{nm}^{(2)} + \dots \quad (3.39)$$

Eingesetzt in die Gleichung (3.38), ergibt einen Satz Differentialgleichungen für $q \in N$:

$$\begin{aligned} \frac{\partial \rho_{nm}^{(0)}}{\partial t} &= -i \omega_{nm} \rho_{nm}^{(0)} - \Gamma_{nm} (\rho_{nm}^{(0)} - \rho_{nm}^{(0)}) = -i \omega_{nm} \rho_{nm}^{(0)} \\ \frac{\partial \rho_{nm}^{(q)}}{\partial t} &= -i \omega_{nm} \rho_{nm}^{(q)} - \Gamma_{nm} \rho_{nm}^{(q)} + \frac{1}{i \hbar} [\hat{H}_{WW}, \hat{\rho}^{(q-1)}]_{nm} \end{aligned} \quad (3.40)$$

Die erste Gleichung beschreibt die Entwicklung des Systems in Abwesenheit eines externen Feldes. Die Diagonalmatrixelemente $\hat{\rho}_{nn} \equiv \langle n | \hat{\rho} | n \rangle$ beschreiben die Besetzung des Systems im Zustand $|n\rangle$, während die Nichtdiagonalelemente $\hat{\rho}_{nm} \equiv \langle n | \hat{\rho} | m \rangle$ das System als Mischzustand von $|n\rangle$ und $|m\rangle$ beschreiben. $\hat{\rho}_{nn}^{(0)}$ ist im thermischen Gleichgewicht durch die Boltzmann-Verteilung bestimmt und $\hat{\rho}_{nm}^{(0)} = 0$ für $n \neq m$. Die Besetzungsrelaxation ist ein Ergebnis von Übergängen zwischen Zuständen, induziert durch Wechselwirkungen mit dem umgebenden thermischen Reservoir.

Eine Integration der Gleichungen erfolgt durch Substitution, die partiell nach der Zeit integriert und anschließend zurücks substituiert wird²:

$$\rho_{nm}^{(1)}(t) = \int_{-\infty}^t \frac{1}{i \hbar} [\hat{H}_{WW}(t'), \hat{\rho}^{(0)}]_{nm} e^{(i\omega_{nm} + \Gamma_{nm})(t-t')} dt' \quad (3.41)$$

Analog verlaufen die übrigen Integrationen für die höheren Korrekturen des Dichtematrix-Operators ab, so dass allgemein gilt:

$$\rho_{nm}^{(q)}(t) = e^{-(i\omega_{nm} + \Gamma_{nm})t} \int_{-\infty}^t \frac{1}{i \hbar} [\hat{H}_{WW}(t'), \hat{\rho}^{(q-1)}]_{nm} e^{(i\omega_{nm} + \Gamma_{nm})t'} dt' \quad (3.42)$$

Berechnet man zunächst den Kommutator für den linearen Fall, mit dem Wechselwirkungs-Hamiltonian $\hat{H}_{WW}(t') = -\hat{\mu} \cdot \vec{E}(t')$ und den Bedingungen der ungestörten Dichtematrix $\rho_{nm}^{(0)} = 0$ für $n \neq m$, so folgt:

$$\begin{aligned} [\hat{H}_{WW}(t), \hat{\rho}^{(0)}]_{nm} &= \sum_{\nu} (H_{WW,n\nu}(t) \rho_{\nu m}^{(0)} - \rho_{n\nu}^{(0)} H_{WW,\nu m}(t)) \\ &= - \sum_{\nu} (\vec{\mu}_{n\nu} \rho_{\nu m}^{(0)} - \rho_{n\nu}^{(0)} \vec{\mu}_{\nu m}) \cdot \vec{E}(t) = (\rho_{mm}^{(0)} - \rho_{nn}^{(0)}) \vec{\mu}_{nm} \cdot \vec{E}(t) \end{aligned} \quad (3.43)$$

Setzt man dieses Ergebnis für den Kommutator in die Gleichung (3.41) des Dichtematrix-Operators ein, so folgt mit dem externen elektrischen Feld $\vec{E}(t) = \sum_p E(\omega_p) e^{-i\omega_p t}$:

$$\rho_{nm}^{(1)} = \frac{i}{\hbar} (\rho_{mm}^{(0)} - \rho_{nn}^{(0)}) \vec{\mu}_{nm} \cdot e^{-(i\omega_{nm} + \Gamma_{nm})t} \int_{-\infty}^t \vec{E}(t') e^{(i\omega_{nm} + \Gamma_{nm})t'} dt'$$

²eine ausführliche Darstellung findet man in [118]

$$\begin{aligned}
&= \frac{i}{\hbar} (\rho_{mm}^{(0)} - \rho_{nn}^{(0)}) \vec{\mu}_{nm} \cdot \sum_p \vec{E}(\omega_p) e^{-(i\omega_{nm} + \Gamma_{nm})t} \left[\frac{e^{(i(\omega_{nm} - \omega_p) + \Gamma_{nm})t'}}{i(\omega_{nm} - \omega_p) + \Gamma_{nm}} \right]_{-\infty}^t \\
&= (\rho_{mm}^{(0)} - \rho_{nn}^{(0)}) \sum_p \frac{\vec{\mu}_{nm} \cdot \vec{E}(\omega_p)}{\hbar((\omega_{nm} - \omega_p) - i\Gamma_{nm})} e^{-i\omega_p t}
\end{aligned} \quad (3.44)$$

Mit diesem Ergebnis kann der Erwartungswert des induzierten atomaren Dipolmomentes berechnet werden:

$$\langle \hat{\mu} \rangle = \sum_{nm} \rho_{nm}^{(1)} \vec{\mu}_{nm} = \sum_{nm} (\rho_{mm}^{(0)} - \rho_{nn}^{(0)}) \sum_p \frac{\vec{\mu}_{mn} (\vec{\mu}_{nm} \cdot \vec{E}(\omega_p))}{\hbar((\omega_{nm} - \omega_p) - i\Gamma_{nm})} e^{-i\omega_p t} \quad (3.45)$$

Zerlegt man $\langle \hat{\mu} \rangle$ in seine Frequenzkomponenten $\sum_p \langle \vec{\mu}(\omega_p) \rangle e^{-i\omega_p t}$, so erhält man über die lineare Polarisation $\vec{P}(\omega_p) = N \langle \vec{\mu}(\omega_p) \rangle = \epsilon_0 \vec{\chi}^{(1)}(\omega_p) \cdot \vec{E}(\omega_p)$ die lineare Suszeptibilität $\vec{\chi}^{(1)}$ mit N als Teilchenzahldichte:

$$\vec{\chi}^{(1)}(\omega_p) = \frac{N}{\hbar \epsilon_0} \sum_{nm} (\rho_{mm}^{(0)} - \rho_{nn}^{(0)}) \frac{\vec{\mu}_{mn} \vec{\mu}_{nm}}{(\omega_{nm} - \omega_p) - i\Gamma_{nm}} \quad (3.46)$$

Somit ist die lineare Suszeptibilität proportional zur Besetzungsdifferenz $(\rho_{mm}^{(0)} - \rho_{nn}^{(0)})$ der Niveaus $|m\rangle$ und $|n\rangle$. Vertauscht man noch die Indizes in dem zweiten Summanden, nutzt Symmetrieeigenschaften³ und setzt eine vollständige Besetzung des Grundzustandes $|g\rangle$ an, was zu $\rho_{gg}^{(0)} = 1$ und $\rho_{mm}^{(0)} = 0$ für $m \neq g$ führt, so erhält man:

$$\vec{\chi}^{(1)}(\omega_p) = \frac{N}{\hbar \epsilon_0} \sum_n \left[\frac{\vec{\mu}_{gn} \vec{\mu}_{ng}}{(\omega_{ng} - \omega_p) - i\Gamma_{ng}} + \frac{\vec{\mu}_{ng} \vec{\mu}_{gn}}{(\omega_{ng} + \omega_p) - i\Gamma_{ng}} \right] \quad (3.47)$$

Ist die einfallende Frequenz ω_p energetisch in der Nähe eines Überganges mit der Übergangsfrequenz ω_{ng} so kann man den zweiten Term vernachlässigen.

Bestimmt man nun den Kommutator, der zur Suszeptibilität 2.Ordnung führt, so erhält man:

$$[\hat{H}_{WW}, \hat{\rho}^{(1)}]_{nm} = - \sum_{\nu} (\vec{\mu}_{n\nu} \rho_{\nu m}^{(1)} - \rho_{n\nu}^{(1)} \vec{\mu}_{\nu m}) \vec{E}(t) \quad (3.48)$$

Tauscht man in Gleichung (3.44) die Indizes passend aus, so ergeben sich:

$$\begin{aligned}
\rho_{\nu m}^{(1)} &= (\rho_{mm}^{(0)} - \rho_{\nu\nu}^{(0)}) \sum_p \frac{\vec{\mu}_{\nu m} \cdot \vec{E}(\omega_p)}{\hbar((\omega_{\nu m} - \omega_p) - i\Gamma_{\nu m})} e^{-i\omega_p t} \\
\rho_{n\nu}^{(1)} &= (\rho_{\nu\nu}^{(0)} - \rho_{nn}^{(0)}) \sum_p \frac{\vec{\mu}_{n\nu} \cdot \vec{E}(\omega_p)}{\hbar((\omega_{n\nu} - \omega_p) - i\Gamma_{n\nu})} e^{-i\omega_p t}
\end{aligned} \quad (3.49)$$

Man erhält damit völlig analog zur Bestimmung der linearen Suszeptibilität, für die Korrektur 2.Ordnung der Dichtematrix, mit dem elektrischen Feld $\vec{E}(t) = \sum_q \vec{E}(\omega_q) e^{-i\omega_q t}$:

$$\begin{aligned}
\rho_{nm}^{(2)} &= \sum_{\nu} \sum_{pq} \left[(\rho_{mm}^{(0)} - \rho_{\nu\nu}^{(0)}) \frac{(\vec{\mu}_{m\nu} \cdot \vec{E}(\omega_q)) (\vec{\mu}_{\nu m} \cdot \vec{E}(\omega_p))}{\hbar^2((\omega_{nm} - \omega_p - \omega_q) - i\Gamma_{nm})((\omega_{\nu m} - \omega_p) - i\Gamma_{\nu m})} \right. \\
&\quad \left. - (\rho_{\nu\nu}^{(0)} - \rho_{nn}^{(0)}) \frac{(\vec{\mu}_{n\nu} \cdot \vec{E}(\omega_p)) (\vec{\mu}_{\nu m} \cdot \vec{E}(\omega_q))}{\hbar^2((\omega_{nm} - \omega_p - \omega_q) - i\Gamma_{nm})((\omega_{n\nu} - \omega_p) - i\Gamma_{n\nu})} \right] e^{-i(\omega_p + \omega_q)t} \quad (3.50)
\end{aligned}$$

³ $\omega_{mn} = -\omega_{nm}$ und $\Gamma_{nm} = \Gamma_{mn}$ [118]

Mit dem Erwartungswert für das atomare Dipolmoment $\langle \hat{\mu} \rangle = \sum_{nm} \rho_{nm} \vec{\mu}_{mn}$ und $\langle \hat{\mu} \rangle = \sum_r \langle \vec{\mu}(\omega_r) \rangle e^{-i\omega_r t}$ erhält man, zusammen mit der komplexen Amplitude des nichtlinearen Dipolmomentes $\langle \vec{\mu}(\omega_p + \omega_q) \rangle$, das mit der Frequenz $(\omega_p + \omega_q)$ oszilliert, für die nichtlineare Polarisation 2.Ordnung:

$$\begin{aligned} \vec{P}^{(2)}(\omega_p + \omega_q; \omega_q, \omega_p) &= N \langle \vec{\mu}(\omega_p + \omega_q) \rangle = \\ \frac{N}{\hbar^2 \epsilon_0} \sum_{nm\nu} \sum_{pq} &\left[(\rho_{mm}^{(0)} - \rho_{\nu\nu}^{(0)}) \frac{(\vec{\mu}_{m\nu} \cdot \vec{E}(\omega_q))(\vec{\mu}_{\nu m} \cdot \vec{E}(\omega_p)) \vec{\mu}_{mn}}{((\omega_{nm} - \omega_p - \omega_q) - i\Gamma_{nm})(\omega_{\nu m} - \omega_p) - i\Gamma_{\nu m}} \right. \\ &\left. - (\rho_{\nu\nu}^{(0)} - \rho_{nn}^{(0)}) \frac{(\vec{\mu}_{n\nu} \cdot \vec{E}(\omega_p))(\vec{\mu}_{\nu n} \cdot \vec{E}(\omega_q)) \vec{\mu}_{mn}}{((\omega_{nm} - \omega_p - \omega_q) - i\Gamma_{nm})(\omega_{n\nu} - \omega_p) - i\Gamma_{n\nu}} \right] \end{aligned} \quad (3.51)$$

Ein Vergleich mit $\vec{P}^{(2)} = \epsilon_0 \vec{\chi}^{(2)}(\omega_1 + \omega_2; \omega_1, \omega_2) \vec{E}^2$ liefert schließlich für die Suszeptibilität 2.Ordnung:

$$\begin{aligned} \vec{\chi}^{(2)}(\omega_p + \omega_q; \omega_q, \omega_p) &= \\ \frac{N}{\hbar^2 \epsilon_0} \sum_{nm\nu} &\left[(\rho_{mm}^{(0)} - \rho_{\nu\nu}^{(0)}) \frac{(\vec{\mu}_{mn} \cdot \vec{\mu}_{n\nu} \cdot \vec{\mu}_{\nu m})}{((\omega_{nm} - \omega_p - \omega_q) - i\Gamma_{nm})(\omega_{\nu m} - \omega_p) - i\Gamma_{\nu m}} \right. \\ &\left. - (\rho_{\nu\nu}^{(0)} - \rho_{nn}^{(0)}) \frac{(\vec{\mu}_{mn} \cdot \vec{\mu}_{\nu m} \cdot \vec{\mu}_{n\nu})}{((\omega_{nm} - \omega_p - \omega_q) - i\Gamma_{nm})(\omega_{n\nu} - \omega_p) - i\Gamma_{n\nu}} \right] \end{aligned} \quad (3.52)$$

Diese Darstellung besitzt jedoch noch keine Permutationssymmetrie, die für den $\vec{\chi}^{(2)}$ -Tensor jedoch gefordert wird (siehe Kapitel 3.5). Diese erhält man nach Aufteilung der Terme und Vertauschen der Tensorkomponenten:

$$\begin{aligned} \chi_{IJK}^{(2)}(\omega_p + \omega_q; \omega_q, \omega_p) &= \\ \frac{N}{2\hbar^2 \epsilon_0} \sum_{nm\nu} &\left[(\rho_{mm}^{(0)} - \rho_{\nu\nu}^{(0)}) \left(\frac{\mu_{mn}^I \mu_{n\nu}^J \mu_{\nu m}^K}{((\omega_{nm} - \omega_p - \omega_q) - i\Gamma_{nm})(\omega_{\nu m} - \omega_p) - i\Gamma_{\nu m}} \right. \right. \\ &\left. + \frac{\mu_{mn}^I \mu_{n\nu}^K \mu_{\nu m}^J}{((\omega_{nm} - \omega_p - \omega_q) - i\Gamma_{nm})(\omega_{\nu m} - \omega_p) - i\Gamma_{\nu m}} \right) \\ &\left. - (\rho_{\nu\nu}^{(0)} - \rho_{nn}^{(0)}) \left(\frac{\mu_{mn}^I \mu_{\nu m}^J \mu_{n\nu}^K}{((\omega_{nm} - \omega_p - \omega_q) - i\Gamma_{nm})(\omega_{n\nu} - \omega_p) - i\Gamma_{n\nu}} \right. \right. \\ &\left. + \frac{\mu_{mn}^I \mu_{\nu m}^K \mu_{n\nu}^J}{((\omega_{nm} - \omega_p - \omega_q) - i\Gamma_{nm})(\omega_{n\nu} - \omega_p) - i\Gamma_{n\nu}} \right) \left. \right] \end{aligned} \quad (3.53)$$

Da über die Indizes m, n, ν summiert wird, stellen diese nur Scheinindizes dar, so dass man diese auch ersetzen kann. Mit den Beziehungen $\omega_{ij} = -\omega_{ji}$ erhält man eine kompakte Form für den Suszeptibilitäts-Tensor 3.Stufe:

$$\begin{aligned} \chi_{IJK}^{(2)}(\omega_p + \omega_q; \omega_q, \omega_p) &= \\ \frac{N}{2\hbar^2 \epsilon_0} \sum_{gma} &(\rho_{gg}^{(0)} - \rho_{mm}^{(0)}) \left[\frac{\mu_{ga}^I \mu_{am}^J \mu_{mg}^K}{((\omega_{ag} - \omega_p - \omega_q) - i\Gamma_{ag})(\omega_{mg} - \omega_p) - i\Gamma_{mg}} \right. \\ &\left. + \frac{\mu_{ga}^I \mu_{am}^K \mu_{mg}^J}{((\omega_{ag} - \omega_p - \omega_q) - i\Gamma_{ag})(\omega_{mg} - \omega_p) - i\Gamma_{mg}} \right] \end{aligned} \quad (3.54)$$

$$\begin{aligned}
& + \frac{\mu_{ga}^J \mu_{am}^I \mu_{mg}^K}{((\omega_{am} + \omega_p + \omega_q) + i \Gamma_{am})(\omega_{mg} - \omega_p) - i \Gamma_{mg}} \\
& + \frac{\mu_{ga}^K \mu_{am}^I \mu_{mg}^J}{((\omega_{am} + \omega_p + \omega_q) + i \Gamma_{am})(\omega_{mg} - \omega_q) - i \Gamma_{mg}} \Big]
\end{aligned}$$

Hierbei können Übergänge zwischen dem Grundzustand $|g\rangle$ und dem angeregten Zustand $|a\rangle$ über einen Zwischenzustand $|m\rangle$ erfolgen. Sind alle beteiligten Frequenzen jedoch weit entfernt von den Resonanzen des Systems, so können alle imaginären Anteile vernachlässigt werden, was den Ausdruck für die nichtlineare Suszeptibilität 2.Ordnung weiter vereinfacht.

Prinzipiell sind anhand Gleichung (3.54) die Beiträge zu den Komponenten der Suszeptibilität 2.Ordnung, die Übergangsdipolmomente abzulesen. Diese sind letztendlich verantwortlich für die vermittelnde Wechselwirkung zweier Photonen, die ein Photon der doppelten Energie generiert.

Die Ausdrücke für $\vec{\chi}^{(n)}$ sind in der vorliegenden Form nur für stark verdünnte Medien korrekt. In kondensierter Materie werden induzierte Dipol-Dipol-Wechselwirkungen relevant und führen zu notwendigen Lokalen-Feld-Korrekturen. Die allgemeine Herleitung der Lokalen-Feld-Korrekturen nimmt isotrope Medien mit gut lokalisierten Bindungselektronen an.

Das lokale Feld an einem Punkt ist die Summe aus dem angelegten $\vec{E}$ -Feld und dem Dipolfeld der Nachbaratome $\vec{E}^{Dipol}$:

$$\vec{E}^{lokal} = \vec{E} + \vec{E}^{Dipol} \quad (3.55)$$

Im Lorentz-Modell des harmonischen Oszillators ist:

$$\vec{E}^{Dipol} = \frac{\vec{P}}{3 \epsilon_0} \quad (3.56)$$

Drückt man die Polarisierung durch die mikroskopischen Polarisierbarkeiten $\vec{\alpha}$, $\vec{\beta}$, $\vec{\gamma}$ aus (siehe Kapitel 3.6), so gilt:

$$\begin{aligned}
P_i(\omega) &= \epsilon_0 N [\alpha_{ij} E_i^{lokal}(\omega) + \beta_{ijk} E_j^{lokal}(\omega_1) E_k^{lokal}(\omega_2) + \dots] \\
&= \frac{\epsilon_0 N}{\left(1 - \frac{N \alpha(\omega)}{3 \epsilon_0}\right)} [\alpha_{ij} E_i(\omega) + \beta_{ijk} E_j(\omega_1) E_k(\omega_2) + \dots]
\end{aligned} \quad (3.57)$$

Die Beiträge von $\vec{P}^{(n)}$ mit $n > 1$ zu $\vec{E}^{lokal}$ werden hierbei vernachlässigt, da diese sehr klein sind.

$$\vec{E}^{lokal}(\omega_i) = \frac{\vec{E}(\omega_i)}{\left(1 - \frac{N \alpha(\omega_i)}{3}\right)} \quad (3.58)$$

Ein Vergleich liefert dann:

$$\vec{\chi}^{(1)}(\omega) = \frac{N \alpha(\omega)}{\left(1 - \frac{N \alpha(\omega_i)}{3}\right)}$$

$$\vec{\chi}^{(2)}(\omega = \omega_1 + \omega_2) = \frac{N\beta(\omega)}{\left(1 - \frac{N\alpha(\omega)}{3}\right) \left(1 - \frac{N\alpha(\omega_1)}{3}\right) \left(1 - \frac{N\alpha(\omega_2)}{3}\right)} \quad (3.59)$$

Mit Clausius-Mosotti $\frac{\epsilon_r - 1}{\epsilon_r + 2} = \frac{n\lambda}{3\epsilon_0}$ und $\epsilon_r = 1 + \chi^{(1)}$ liefert ein Vergleich mit Gleichung (3.57) die lokalen Feldkorrekturen $L^{(i)}$:

$$\begin{aligned} \vec{\chi}^{(1)}(\omega) &= N L^{(1)} \alpha(\omega) \\ L^{(1)} &:= \frac{1}{\left(1 - \frac{N\alpha}{3}\right)} = \frac{\epsilon_r + 2}{3\epsilon_0} \end{aligned} \quad (3.60)$$

Und für die Suszeptibilität zweiter Ordnung erhält man:

$$\begin{aligned} \vec{\chi}^{(2)}(\omega = \omega_1 + \omega_2) &= N L^{(2)} \beta(\omega) \\ L^{(2)} &= \left(\frac{\epsilon_r(\omega) + 2}{3\epsilon_0}\right) \left(\frac{\epsilon_r(\omega_1) + 2}{3\epsilon_0}\right) \left(\frac{\epsilon_r(\omega_2) + 2}{3\epsilon_0}\right) \end{aligned} \quad (3.61)$$

Derartige Korrekturen sind jedoch nur dann notwendig, wenn die mikroskopisch relevanten Objekte dicht gepackt sind. Im Fall der Einlagerung von molekularen Potentialsonden in Membranen wird eine etwa 1%-ige Beladungen der Membran eingesetzt, so dass Korrekturen aufgrund intramolekularer Wechselwirkungen nicht immer notwendig sind.

3.5 Eigenschaften der Suszeptibilität 2. Ordnung

Die ausgeprägte Oberflächensensitivität der SHG wurde zuerst an Metalloberflächen gezeigt. Dafür erhielt man starke SH-Signalintensitätsänderungen bei Oxidations-Reduktions-Zyklen von Silber-Elektroden durch Zugabe eines 0,1 M-KCl Elektrolyten [87]. Diese starke Oberflächenspezifität resultiert aus einem Symmetriebruch an der Oberfläche. Nur Medien ohne Inversionszentrum liefern im Rahmen der Dipolnäherung frequenzverdoppelte Beiträge. Das zentrosymmetrische Substrat trägt hierzu nicht bei ⁴.

Das Argument hierfür liefert das unsymmetrische Potential des Moleküls in dem sich die Elektronen bewegen. Nur Moleküle mit unsymmetrischen Potentialen liefern auch gerade Beiträge zu den Nichtlinearitäten. Ihre Potentiale haben somit die Gestalt:

$$V(E) = -\epsilon_0 \left(\frac{1}{2} \alpha E^2 + \frac{1}{3} \beta E^3 + \frac{1}{4} \gamma E^4 + \dots \right) \neq V(-E) \quad (3.62)$$

Mit $P = -\partial V / \partial E$ erhält man bei diesen unsymmetrischen Potentialen auch gerade Anteile zu den nichtlinearen Polarisierungen:

$$\begin{aligned} P_I &= \epsilon_0 \sum_{J=1}^3 \chi_{IJ}^{(1)} E_J + \epsilon_0 \sum_{J,K=1}^3 \chi_{IJK}^{(2)} E_J E_K + \epsilon_0 \sum_{J,K,L=1}^3 \chi_{IJKL}^{(3)} E_J E_K E_L + \dots \\ &\quad I, J, K, L \in \{X, Y, Z\} \end{aligned} \quad (3.63)$$

⁴Frequenzverdopplung erhält man auch aus elektronischen Quadrupolwechselwirkungen in Materie mit großen dielektrischen Konstanten im optischen Bereich. Diese Wechselwirkungen ermöglichen auch die SHG in zentrosymmetrischen Regionen, doch sind diese Intensitäten deutlich schwächer als die bisher betrachteten Dipolbeiträge.

$\vec{\chi}^{(2)}$ verknüpft die drei Komponenten der Polarisation mit den 3x3 Komponenten der Felder:

$$\begin{pmatrix} P_X^{(2)} \\ P_Y^{(2)} \\ P_Z^{(2)} \end{pmatrix} = \epsilon_0 \begin{pmatrix} \chi_{XXX} & \chi_{XYX} & \chi_{XZX} & \chi_{XXY} & \chi_{XXZ} & \chi_{XXZ} \\ \chi_{YXX} & \chi_{YYX} & \chi_{YZX} & \chi_{YXY} & \chi_{YXZ} & \chi_{YYZ} \\ \chi_{ZXX} & \chi_{ZXY} & \chi_{ZZX} & \chi_{ZXY} & \chi_{ZXZ} & \chi_{ZZZ} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} E_X E_X \\ E_Y E_Y \\ E_Z E_Z \\ 2E_Y E_Z \\ 2E_X E_Z \\ 2E_X E_Y \end{pmatrix} \quad (3.64)$$

$\chi_{IJK}^{(2)}$ ist also ein komplexer Tensor 3.Stufe mit 27 verschiedenen Elementen.

Eine Reduzierung von $\chi_{IJK}^{(2)}$ auf 18 linear unabhängige Elemente in Gleichung (3.64) erhält man durch die Permutationsmöglichkeit der einfallenden Wellen, so dass gilt:

$$\begin{aligned} \chi_{IJK}^{*(2)}(\omega = \omega_1 + \omega_2) &= \chi_{JKI}^{(2)}(\omega_1 = -\omega_2 + \omega) = \chi_{KIJ}^{(2)}(\omega_2 = \omega - \omega_1) \\ \chi_{IJJ}^{*(2)}(2\omega = \omega + \omega) &= \frac{1}{2}\chi_{JII}^{(2)}(\omega = 2\omega - \omega) = \frac{1}{2}\chi_{JJI}^{(2)}(\omega = -\omega + 2\omega) \end{aligned} \quad (3.65)$$

Eine weitere Reduzierung erhält man unter der Voraussetzung, dass die Dämpfung vernachlässigt werden kann⁵ und die Dispersion nicht berücksichtigt wird. Mit $\chi_{IJK}^{(2)} = \chi_{JIK}^{(2)}$ erhält man gemäß der Kleinmann-Symmetrie [100] 9 weitere unabhängige Nebenbedingungen aus den möglichen Permutationen der Indizes in Gleichung (3.63):

$$\chi_{IJK}^{(2)} = \chi_{KIJ}^{(2)} = \chi_{JKI}^{(2)} = \chi_{JIK}^{(2)} = \chi_{KJI}^{(2)} = \chi_{IKJ}^{(2)} \quad (3.66)$$

Hierdurch werden die 27 Komponenten des $\vec{\chi}^{(2)}$ -Tensors auf gerade 10 unabhängige reduziert.

Strukturelle Symmetrien der nichtlinearen Medien und deren Bausteine, z.B. der Moleküle, resultieren aus den Symmetriegruppen dieser und können die Anzahl der unabhängigen Tensorelemente noch weiter reduzieren (siehe Kapitel 4.2).

Da die räumliche Symmetrie senkrecht zu einer Oberfläche immer gebrochen ist, wird die SHG maximal, wenn die Richtung des einfallenden Feldes parallel zu dieser Oberfläche ist.

Die SHG ist im Gegensatz zur Zwei-Photonen-Absorption mit Fluoreszenzrelaxation (TPEF)⁶ vollständig unabhängig von absorptiven Prozessen und erfolgt ausschließlich instantan über die nichtlineare Polarisation in den vermittelnden Medien. Die Intensität des SH-Signals kann jedoch zusätzlich eine resonante Steigerung bis zu zwei Größenordnungen erfahren, wenn die Energie der Harmonischen mit einer elektronischen Absorptionsbande des vermittelnden Systems überlappt [49]. Somit wird die gesamte Antwort zweiter Ordnung zu einer Summe von nichtresonanten und resonanten Beiträgen:

$$\chi_{Gesamt}^{(2)} = \chi_{Nichtresonant}^{(2)} + \chi_{Resonant}^{(2)} \quad (3.67)$$

⁵d.h. die Wellenausbreitung erfolgt verlustfrei, somit ist die pro Schwingungsperiode geleistete Arbeit null $\oint \vec{P} d\vec{E} = 0 \Rightarrow \vec{\nabla}_E \times \vec{P} = 0$

⁶Siehe Kapitel 3.7.

3.6 Potentialsensitivität der Suszeptibilität 2.Ordnung

In der vorliegenden Arbeit werden Membranpotentiale von biologischen Zellen mittels nichtlinear optischer Methoden untersucht. An dieser Stelle soll die Potentialsensitivität der nichtlinearen Suszeptibilität beschrieben werden, die die Kopplung des Membranpotentials an das elektrische Feld der Harmonischen beinhaltet. Hierfür gibt es mehrere Ansätze.

Man unterscheidet zwischen induzierten Änderungen der molekularen Orientierung der dominierenden Hyperpolarisierbarkeitsachse, wie bei der Elektrischen-Feld-Induzierten-SHG (kurz: EFISH), und der direkten Beeinflussung der Hyperpolarisierbarkeit bzw. der nichtlinearen Suszeptibilität.

Auf molekularer Ebene korrespondieren $\vec{\chi}^{(1)}$ mit $\vec{\alpha}$ und $\vec{\chi}^{(2)}$ mit $\vec{\beta}$, der mikroskopischen Polarisierbarkeit und Hyperpolarisierbarkeit.

Die Potenzreihenentwicklung der induzierten molekularen Polarisation $\vec{p}$ in der elektrischen Feldstärke verläuft analog zu der der makroskopischen Polarisierbarkeit:

$$p_i = \mu_{g,i} + \epsilon_0 \sum_{j=1}^3 \alpha_{ij} E_j + \epsilon_0 \sum_{j,k=1}^3 \beta_{ijk} E_j E_k + \epsilon_0 \sum_{j,k,l=1}^3 \gamma_{ijkl} E_j E_k E_l + \dots i, j, k, l \in \{x, y, z\} \quad (3.68)$$

mit $\mu_{g,i}$ dem permanenten Dipolmoment des Moleküls.

Hierbei ergibt sich $\chi_{IJK}^{(2)}$ aus β_{ijk} durch Koordinatentransformation aus dem molekularen in das makroskopische Koordinatensystem und Summation über alle Beiträge:

$$\chi_{IJK}^{(2)} = N R_{Ii} R_{Jj} R_{Kk} L_{ijk}^{(2)} \beta_{ijk} \quad (3.69)$$

mit R_{Ii} als Projektionsfaktoren ($R_{Ii} = \cos \alpha_{Ii}$), die die molekulare Orientierung relativ zu den makroskopischen Koordinaten beinhaltet, $L_{ijk}^{(2)}$ den lokalen Feldkorrekturen gemäß Kapitel 3.4 und N der Anzahldichte der Moleküle.

Werden polare Moleküle in Lösung durch ein externes, im Vergleich zur Variation der optischen Feldamplitude, statisches elektrisches DC-Feld ausgerichtet, so induziert die gesamte Ausrichtung eine polare Achse in dem Medium. Die Suszeptibilität zweiter Ordnung steigt hierdurch um einen Faktor an, den die Langevin-Funktion liefert:

$$L_n = \frac{\int_0^\pi e^{p \cos \alpha} \cos^n \alpha \sin \alpha d\alpha}{\int_0^\pi e^{p \cos \alpha} \sin \alpha d\alpha} \quad [102] \quad (3.70)$$

Im Fall eines linearen Moleküls mit einer dominierenden Hyperpolarisierbarkeitsachse in z-Richtung erhält man somit als relevante Beiträge für die Suszeptibilität zweiter Ordnung:

$$\begin{aligned} \chi_{ZXX}^{(2)} &= \frac{1}{2} N L^{(2)} (L_1 - L_3) \beta_{zzz} \\ \chi_{ZZZ}^{(2)} &= N L^{(2)} L_3 \beta_{zzz} \end{aligned} \quad (3.71)$$

Derselbe Effekt der molekularen Ausrichtung wird auch durch die EFISH beschrieben. Hierbei geht man jedoch den Weg über die Suszeptibilität 3.Ordnung $\vec{\chi}^{(3)}$. Statt drei

wechselwirkender Photonen setzt man hier zwei gleiche Photonen, wie im Fall der SHG, mit $\omega = 2\omega$ und ein statisches $\vec{E}_{DC}$ -Feld als $\omega = 0$ an.

$$\vec{P}_{EFISH}^{(3)} = \epsilon_0 \chi^{(3)}(2\omega; \omega, \omega, 0) \vec{E}_{2\omega}^2 \vec{E}_{DC} \quad (3.72)$$

Hat das einfallende optische Feld und das DC-Feld dieselbe Polarisierung, so gilt [103]:

$$\vec{P}_{EFISH}^{(3)} = \epsilon_0 N L^{(3)} \left(\gamma^{(3)}(2\omega; \omega, \omega, 0) + \frac{\vec{\mu}_0 \cdot \vec{\beta}}{5 k_B T} \right) \vec{E}_{2\omega}^2 \vec{E}_{DC} \quad [141] \quad (3.73)$$

Hier wird durch Anlegen eines äußeren DC-Feldes an ein molekulares Ensemble in Lösung eine mittlere Orientierung der Moleküle induziert, die damit ein Medium mit verschwindender Zentrosymmetrie bilden, so dass die SHG möglich wird.

Im Gegensatz dazu kann ein äußeres DC-Feld die Hyperpolarisierbarkeit bereits ausgerichteter Moleküle, also in Medien mit verschwindender Zentrosymmetrie, beeinflussen. Derartige Medien beinhalten oft Moleküle mit großen permanenten Dipolmomenten und daher meist auch großen Hyperpolarisierbarkeiten aufgrund von Donor-Akzeptor substituierten Gruppen. Sind dies darüber hinaus noch konjugierte Moleküle, so besitzen sie energetisch niedrig liegende angeregte Ladungstransferzustände mit großen Änderungen des Dipolmomentes $\vec{\mu}$ aufgrund einer Ladungsverschiebung entlang der Molekülachse (siehe Kapitel 4.2).

Das nichtresonante zwei-Niveau-Modell ($S_0 \rightarrow S_1$) von Oudar und Chemla [27] liefert für den Ladungstransferbeitrag in Molekülen die Hyperpolarisierbarkeit⁷:

$$\beta_{CT}(-2\omega; \omega, \omega) \approx \frac{3 \omega_{ga}^2 \vec{\mu}_{ga}^2 \Delta\mu}{2 \epsilon_0 \hbar^2 (\omega_{ga}^2 - \omega^2)(\omega_{ga}^2 - (2\omega)^2)} \quad (3.74)$$

mit der Übergangsdipolmoment-Matrix $\vec{\mu}_{ga}$ (vergleiche mit Gleichung (3.54)). Die gesamte resultierende Hyperpolarisierbarkeit setzt sich additiv aus dem Ladungstransferbeitrag und dem energetisch höheren Beitrag der Donor-Akzeptor-Gruppen $\vec{\beta}_{add}$ zusammen.

$$\vec{\beta} = \vec{\beta}_{add} + \vec{\beta}_{CT} \quad (3.75)$$

Ein externes DC-Feld beeinflusst die Dipolmomentänderung $\Delta\mu$. Daher ist die SHG inhärent sensitiv auf Membranpotentialänderungen $\vec{E}_{DC}$. Entwickelt man die Änderung des Dipolmomentes im Grundzustand aufgrund des DC-Feldes in eine Potenzreihe gemäß:

$$\vec{\mu}_g(\vec{E}_{DC}) = \sum_{n=0}^m \left[\frac{1}{n!} \frac{\partial^n \vec{\mu}_g}{\partial E_{DC}^n} \Big|_0 \vec{E}_{DC}^n \right] = \vec{\mu}_{g,0} + \vec{\alpha} \cdot \vec{E}_{DC} + \vec{\beta} \cdot \vec{E}_{DC} \vec{E}_{DC} + \dots, \quad (3.76)$$

so erhält man für die dominierende potentialabhängige Hyperpolarisierbarkeit [72, 19, 80]:

$$\beta_{CT}(-2\omega; \omega, \omega) \approx \frac{3 \omega_{ga}^2 \vec{\mu}_{ga}^2}{2 \epsilon_0 \hbar^2 (\omega_{ga}^2 - \omega^2)(\omega_{ga}^2 - (2\omega)^2)} (\Delta\mu_0 + \Delta\alpha E_{DC}) = \beta_0 + \beta(\vec{E}_{DC}) \quad (3.77)$$

⁷Die Herleitung der Hyperpolarisierbarkeit verläuft völlig analog zur Suszeptibilität zweiter Ordnung in Kapitel 3.4.

Für die gesamte Intensität ergibt sich nach Gleichung (3.17) und (3.68) in diesem Fall:

$$I_i \sim \left(\sum_{j=1}^3 \alpha_{ij} E_j \right)^2 + \left(2 \sum_{j=1}^3 \alpha_{ij} E_j \sum_{k=1}^3 \beta_{ijk} E_j E_k \right) + \left(\sum_{j,k=1}^3 \beta_{ijk} E_j E_k \right)^2 \quad (3.78)$$

Der erste Term beschreibt die lineare Wechselwirkung des Mediums mit der einfallenden elektromagnetischen Strahlung. Der zweite Term und der dritte Term beschreiben die nichtlineare Wechselwirkung. Für den zweiten Term gilt:

$$\left(2 \sum_{j=1}^3 \alpha_{ij} E_j \sum_{k=1}^3 \beta_{ijk} E_j E_k \right) \sim 2 \alpha_{ij} E_j^2 E_k [(\mu_a - \mu_g) + (\alpha_a - \alpha_g) E_{DC}] \quad (3.79)$$

$$= 2 \alpha_{ij} (\mu_a - \mu_g) E_j^2 E_k + 2 \alpha_{ij} (\alpha_a - \alpha_g) E_{DC} E_j^2 E_k \quad (3.80)$$

Für den dritten Term gilt:

$$\left(\sum_{j,k=1}^3 \beta_{ijk} E_j E_k \right)^2 \sim [((\mu_a - \mu_g) + (\alpha_a - \alpha_g) E_{DC}) E_j E_k]^2 \quad (3.81)$$

$$= (\mu_a - \mu_g)^2 E_j^2 E_k^2 + 2(\mu_a - \mu_g)(\alpha_a - \alpha_g) E_{DC} E_j^2 E_k^2 + (\alpha_a - \alpha_g)^2 E_{DC}^2 E_j^2 E_k^2 \quad (3.82)$$

Man erhält Beiträge des statischen elektrischen Feldes zur SH-Intensität die linear und auch quadratisch sind.

Analog zur EFISH gibt es auch hier eine Beschreibung, die makroskopische nichtlineare Suszeptibilitäten nutzt. Hierbei setzt sich die gesamte Suszeptibilität 2.Ordnung additiv aus einem Oberflächenbeitrag, und einem Suszeptibilitätsbeitrag 3.Ordnung modifiziert durch das externe DC-Feld zusammen:

$$\vec{\chi}_{Gesamt}^{(2)} = \vec{\chi}_{Oberfläche}^{(2)} + \vec{\chi}^{(3)} \vec{E}_{DC} \quad [101] \quad (3.83)$$

Dabei resultiert $\vec{\chi}_{Oberfläche}^{(2)}$ aus der strukturellen Asymmetrie der Grenzfläche, $\vec{E}_{DC}$ aus dem statischen elektrischen DC-Feld und $\vec{\chi}^{(3)}$ aus denselben Symmetriebedingungen wie $\vec{\chi}^{(2)}$. Die Suszeptibilitäten dritter Ordnung sind in der Regel um vier bis fünf Größenordnungen kleiner als die zweiter Ordnung. Nur durch große Felder, wie im Fall von Intramembranfeldern von bis zu $3 \cdot 10^7 \text{ V/m}$, liefert dieser Term einen signifikanten Beitrag zur gesamten Suszeptibilität. An dieser Stelle sei ganz klar angemerkt, dass dieser Effekt deutlich von der Induktion der zweiten Harmonischen durch elektrische Felder (EFISH) zu unterscheiden ist. Bei EFISH organisiert ein von außen angelegtes elektrisches Feld die zufällig orientierten frequenzverdoppelnden Farbstoffmoleküle in einer geordneten Art und Weise. Erst durch diese induzierte Ordnung ist die SHG möglich. In den hier vorgestellten Fällen sind die Moleküle jedoch schon durch den Einbau, z.B. in eine Membran, orientiert und radial angeordnet und ein externes elektrisches Feld modifiziert lediglich die Größe der Hyperpolarisierbarkeit, bzw. der Suszeptibilität 2.Ordnung.

Aufgrund dieses Mechanismus ist die SHG eine inhärent sensitive Messmethode zur Detektion von Transmembranpotentialen.

3.7 Zwei-Photonen-Absorption

Ein physikalisch vollständig anderer, aber in Verbindung mit der resonanten SHG häufig auftretender Effekt ist die Zwei-Photonen-Absorption.

Maria Göppert-Mayer [104] sagte bereits 1931 mittels Störungstheorie zweiter Ordnung die Möglichkeit einer Zwei-Photonen-Absorption voraus. Hierbei erfolgt ein resonanter elektronischer Übergang in einem Molekül, der gleichzeitig zwei Photonen benötigt. Die Auswahlregeln, die im Fall eines einfachen Übergangs gelten, haben dabei keine Gültigkeit mehr. Linear-optisch verbotene Übergänge können unter Umständen nicht-linear optisch erlaubte Übergänge sein.

Nach Reintjes [89] wird die Zwei-Photonen-Absorption durch den Imaginärteil eines $\chi^{(3)}$ -Prozesses beschrieben⁸:

$$P_I^{(3)} = \frac{3}{4} \text{Im} \left[\chi_{IJKL}^{(3)}(\omega; -\omega, \omega, \omega) \right] E_J^*(-\omega) E_K(\omega) E_L(\omega) \quad (3.84)$$

$$\text{Im} \chi^{(3)} = \frac{N \Gamma |\vec{\mu}_{ag}|^2}{\pi \hbar ((\Delta\omega)^2 + \Gamma^2)} (\rho_g - \rho_a) \quad (3.85)$$

Mit dem Übergangsdipol-Matrixelement $\vec{\mu}_{ag}$:

$$\vec{\mu}_{ag} = \sum_m \left[\frac{\vec{\mu}_{am} \cdot \vec{\mu}_{mg}}{\hbar (\omega_1 - \omega_{mg})} + \frac{\vec{\mu}_{am} \cdot \vec{\mu}_{mg}}{\hbar (\omega_2 - \omega_{mg})} \right] \quad (3.86)$$

Durch die Ausbreitung der elektromagnetischen Welle im Medium findet ein Energieaustausch mit dem Medium statt. Damit wird die einfallende Welle durch Absorption gedämpft. Die Absorption durch das Medium entlang der Strecke z wird beschrieben durch:

$$\frac{\partial I_\omega}{\partial z} = -\omega \gamma I_\omega^2 \quad (3.87)$$

mit dem Zwei-Photonen-Absorptionskoeffizient γ :

$$\gamma = \frac{3\pi}{n^2 \epsilon_0 c \lambda} \text{Im} \left[\chi^{(3)}(\omega; -\omega, \omega, \omega) \right] \quad (3.88)$$

Mit der Technik der Zwei-Photonen angeregten Fluoreszenz (kurz: TPEF) wird ein Farbstoffmolekül simultan vom Grundzustand S_0 über einen virtuellen Zwischenzustand in ein angeregtes Niveau (S_1 oder S_2) angeregt. Aus S_2 würde ein schneller, strahlungsloser Zerfall nach S_1 stattfinden, so dass die Fluoreszenzemission $S_1 \rightarrow S_0$ unabhängig vom Anregungsweg erscheint.

Die Fluoreszenzstrahlung kann spektral in der Nähe des SH-Signals liegen, weshalb sie in nichtlinear optischen Experimenten oftmals simultan zur SHG detektiert werden.

⁸Dies stellt mathematisch den Umkehrprozess der Selbstphasenmodulation dar, die durch den Realteil beschrieben wird.

Kapitel 4

Nichtlineare Optik an Potentialsonden

Molekulare „Voltmeter“, die intrinsisch oder extrinsisch in Zellmembranen eingelagert werden, bilden heute wichtige Instrumente zur minimalinvasiven Detektion von schnellen Spannungstransienten in Zellen. Diese Spannungstransienten, auch Aktionspotentiale genannt, sind für den schnellen Informationsaustausch der Zelle mit ihrer Umgebung notwendig.

Die Entwicklung der potentialsensitiven Farbstoffe für Zellmembranen begann mit den sogenannten Fluoreszenz-Nernst-Farbstoffen, die auf der Sekundenskala auf Membranpotentialänderungen reagieren, und wurde mit den fest in der Zellmembran verankerten Fluoreszenzsonden fortgesetzt, die aufgrund ihrer amphiphilen Struktur in der Membran fixiert sind. Farbstoffe, deren Antwortmechanismus auf nichtlinear optischen Effekten beruht, stellen die schnellsten „Voltmeter“ dar, da sie instantan auf Potentialänderungen reagieren.

4.1 Fluoreszenz-Potentialsonden

Fluoreszenzfarbstoffe werden seit mehr als 30 Jahren zur Detektion von Membranpotentialen eingesetzt [9, 133, 127, 132]. Pionierarbeit auf diesem Gebiet leisteten Arbeitsgruppen um Cohen, Waggoner, Grinvald, Salzberg und Loew [125, 126, 129, 128, 127]. Die anfänglich eingesetzten Nernst-Farbstoffe, wie Cyanine, Oxonole oder das Rhodamin 123, besitzen keine amphiphile Struktur und unterliegen daher einem Verteilungsgleichgewicht entsprechend der Nernst-Gleichung (siehe Kapitel 2.2), das durch eine Membranpotentialänderung gestört werden kann. Diese Umverteilung zwischen wässriger Phase und lipophiler Phase induziert aufgrund des elektrischen Reaktionsfeldes eine Dipolmomentänderung in den Farbstoffen und beeinflusst somit die Lage der elektronischen Niveaus. Dies führt zu einer Verschiebung der Absorptions- und Fluoreszenzbanden und zu Änderungen in den Fluoreszenzintensitäten [106]. Aufgrund des Umverteilungsmechanismus, reagieren diese Farbstoffe jedoch nur auf der Millisekunden- bis Sekunden-Skala [107]. Die Diffusionsgeschwindigkeit in die Membran wird zusätzlich noch durch die Membranviskosität beeinflusst. Weiterhin können sich bei diesem Typ Farbstoff, bei höheren Konzentrationen, Dimere mit einer anti-

parallelen Ausrichtung der Dipole zueinander ausbilden. Diese Dimere fluoreszieren nicht mehr. Das Membranpotential kann jedoch dieses Monomer-Dimer-Gleichgewicht stören [107]. Bei Oxonolen beobachtete man ein vollständiges Hindurchtreten der Farbstoffe durch die Zellmembran in das Zytoplasma. Hier beeinflussen Wechselwirkungen mit zytosolischen Bestandteilen die Fluoreszenz [130]. Die Potentialsensitivität ist mit bis zu 80% Intensitätsänderung pro 100 mV Membranpotential sehr hoch [131], aber wenig aussagekräftig für lokale Transmembranpotentiale.

Aktuelle Fluoreszenz-Farbstoffe wie di-4-ANEPPS besitzen eine lipidähnliche Struktur, die eine effiziente und geordnete Einlagerung in die Membran ermöglicht. Sie reagieren schnell, im Bereich von Mikro- bis Millisekunden [124], auf Änderungen des Membranpotentials. Der Grund hierfür liegt in der Verschiebung der Energieniveaus des Farbstoffmoleküls um $\Delta W = \Delta\vec{\mu} \cdot \vec{E}_{DC} + 1/2\Delta\vec{\alpha} \cdot \vec{E}_{DC}^2$ durch das Membranpotential $\vec{E}_{DC}$, was als Stark-Effekt bezeichnet wird. Aufgrund des geringen Einflusses des Stark-Effektes liefern diese Fluoreszenzfarbstoffe trotz der hervorragenden Einlagerungscharakteristik nur schwache Membranpotentialabhängigkeiten von bis zu 10% Intensitätsänderung bei 100 mV Potentialänderung¹.

Diese Klasse von Fluoreszenzfarbstoffen zeigt in fluiden Membranen verstärkt ein strahlungsloses Deaktivieren aufgrund von TICT-Zuständen². In Abhängigkeit vom Zellmembranpotential erfolgt im angeregten Zustand eine Konformationsänderung, so dass die Konjugation des Chromophors aufgehoben wird und damit die Fluoreszenz gelöscht wird. Das elektrische Feld des Membranpotentials wechselwirkt mit einer Ladungsumverteilung über das π -Elektronensystem des Farbstoffs. Das Feld behindert oder unterstützt diese Umverteilung je nach Richtung. Dadurch wird die Aktivierungsenergie für die Konformationsänderung des chromophoren Systems verändert, was die Fluoreszenzquantenausbeute beeinflusst [134].

Unterschiede in den Absorptions- und Fluoreszenzspektren von di-4-ANEPPS in drei verschiedenen Membrantypen lassen auf eine leichte Verkipfung des Farbstoffs in den weniger starren Matrizen, wie der biologischen Membran und besonders der Lipiddoppelschicht im Gegensatz zum starren Langmuir-Blodgett-Film, schließen. Das resultiert aus der Ladungsanhäufung in der Pyridiniumgruppe im angeregten Zustand, im Vergleich zur Ladungsanhäufung in der Anilingrouppe im Grundzustand. Im Grundzustand wird das Elektronensystem stabilisiert, wenn die Anilingrouppe aus der lipophilen Phase der Membran in Richtung polare, wässrige Phase gerichtet ist.

Die schlechte räumlich-zeitliche Auflösung aufgrund der nur schwach selektiven Einfärbung, ihre begrenzte Photostabilität und ihre Phototoxizität erlaubten zunächst kaum Erkenntnisse der elektrischen Signale in Zellen [9, 129, 135, 136]. Der größte Nachteil der Fluoreszenzsonden ist jedoch ihr schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis aufgrund von zu vielen Beiträgen zum detektierten Signal. Diese stammen zum einen aus Regionen, die nicht direkt dem lokalen Membranpotential entsprechen, und zum anderen existieren eine Vielzahl nicht reproduzierbarer Einflüsse auf das Fluoreszenzsignal.

¹für di-4-ANEPPS

²TICT: twisted intramolecular charge transfer

4.2 Frequenzverdoppelnde Potentialsonden

Eine bedeutende Weiterentwicklung stellen frequenzverdoppelnde Farbstoffe dar, da nur die fest in der Zellmembran orientierten Farbstoffe zum detektierten Signal beitragen.

Die ersten nichtlinear optischen Farbstoffe, die sich stabil orientiert in eine Zellmembran einlagerten, waren amphiphile Styrylpyridin-Farbstoffe wie das oben erwähnte di-4-ANEPPS und seine Analogen JPW 1290 u.ä [108, 109, 110, 36, 37, 111, 112, 113, 81]. Di-4-ANEPPS ist mittlerweile ein kommerziell³ erhältlicher Farbstoff.

Prinzipiell ist die Entwicklung neuer Potentialsonden mit immer größeren Hyperpolarisierbarkeiten ein aktives Forschungsgebiet [59, 60, 61, 62, 63, 58, 74, 75, 73]. Dafür werden optimierte Farbstoffstrukturen entwickelt. So sollte das Molekül ein delokalisiertes, ausgedehntes π -Elektronensystem besitzen. Es sollten die aromatischen Heteroatome durch Stickstoff- oder Schwefelatome substituiert sein und Elektronen-Donor-Akzeptor-Endgruppen existieren, die über einen Ladungskonjugationspfad für optisch angeregten Ladungstransfer entlang der molekularen Achse verfügen. Das ist mit großen Änderungen des Dipolmomentes zwischen Grund- und angeregtem Zustand und daher mit großen Hyperpolarisierbarkeiten verbunden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten nichtlinear optischen Potentialsonden sind am Institut für Organische und Makromolekulare Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bei Herrn Prof. Dr. H.-D. Martin von Frau Dipl.-Chem. Christine Fuchs neu synthetisiert worden. Diese amphiphilen Hemicyanin-Farbstoffe (di-4-APEPPS)⁴ erfüllen die Anforderungen eines frequenzverdoppelnden Farbstoffes exzellent und repräsentieren den aktuellen Stand der Entwicklung. Ihre molekulare Struktur ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Diese neuen Farbstoffe bestehen aus einem quarternier-

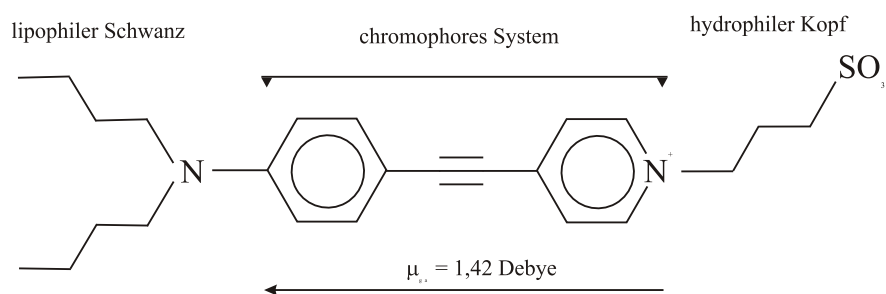


Abbildung 4.1: Molekulare Struktur der amphiphilen Potentialsonde di-4-APEPPS (4(-p-Dibutylaminophenylethynyl)-pyridiniumpropylensulfonat) [3]. Das Übergangsdipolmoment beträgt: $\mu_{ga} = 5 \cdot 10^{-30} \text{ Cm}$.

ten Pyridiniumring, der über einen acetylenischen Bindungsblock mit einem N,N-Dialkylanilinring verknüpft ist. Damit diese Farbstoffe nicht durch die Membran dif-

³Molecular Probes

⁴Die Synthese des 4(-p-Dibutylaminophenylethynyl)-pyridiniumpropylensulfonat ist in Detail in [115] beschrieben.

fundieren, tragen sie am Pyridiniumstickstoff eine Alkylsulfonatgruppe, die über eine flexible Brücke mit dem Pyridiniumstickstoff verbunden ist. Diese Gruppe trägt eine negative Partialladung, die als hydrophiler Anker in der wässrigen Lösung den Farbstoff in der Membran fixiert. Weiterhin dient die negative Ladung am Anker dem Ausgleich der positiven Ladung am Pyridiniumstickstoff, so dass das Oberflächenpotential ψ_O der Membran (siehe Kapitel 2.3) möglichst wenig beeinflusst wird. Die Energie, die erforderlich ist, um diese Gruppe aus der wässrigen Phase mit der Permittivität $\epsilon_{Wasser} = 80,2$ durch die Membran mit der Permittivität $\epsilon_{Hexan} = 1,9$ [117] zu transportieren, ist nach $U = \frac{e^2}{2r} \left(\frac{1}{\epsilon_{Hexan}} - \frac{1}{\epsilon_{Wasser}} \right)$ [107], mit r als Radius der geladenen Gruppe, acht Größenordnungen größer als die thermische Energie. Daher gilt die Fixierung der Sulfonatgruppe in der wässrigen Phase als gesichert. Aufgrund der instantanen nichtlinearen Antwort des Farbstoffs, dessen Elektronendichten im optischen Frequenzbereich oszillieren, kann die um elf Größenordnungen langsamere Umorientierung des Farbstoffes innerhalb der Membran vernachlässigt werden.

Die Effektivität der Einlagerung zeigt die ausgeprägte SHG, die bei einer Diffusion

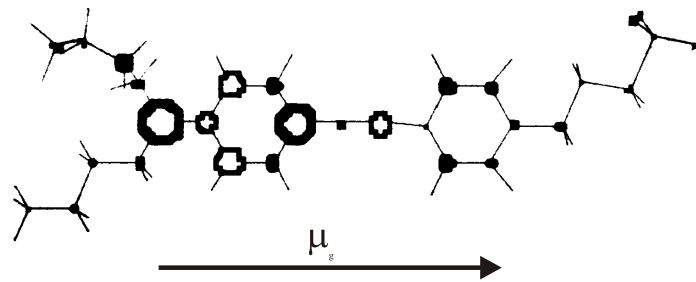


Abbildung 4.2: Elektronendichteverteilung des di-4-APEPPS im Grundzustand aus semiempirischen AM1 Rechnungen mit MOPAC (unter Vernachlässigung der geladenen Sulfonatgruppe). Man erhält eine hohe Elektronendichte am Anilin-Stickstoff.

durch die Membran aus Symmetriegründen verboten wäre. Die Einlagerungstiefe der Farbstoffe in der Membran steigt mit der Länge der Kohlenwasserstoffkette zwischen dem chromophoren System und den kovalent gebundenen Gegenionen, ebenso wie mit der Länge der Kohlenwasserstoffschwänze [81]. Farbstoffmoleküle mit kurzen Alkylketten, wie das di-4-ANEPPS lagern sich schneller in die äußere Membran von Zellen ein, als Farbstoffe mit längeren Alkylketten, wie das di-8-ANEPPS [53]. Zu kurze Ketten führen jedoch zu einer schwachen Bindung in der Lipiddoppelschicht, so dass hier ein Kompromiss gefunden werden muss.

Eigene Untersuchungen ergaben intensivere SH-Signale an di-5-APEPPS, so dass eine bessere Einlagerung vermutet wird. Im Folgenden werden die Betrachtungen jedoch für di-4-APEPPS fortgesetzt da dafür mehr Vergleichsdaten existieren.

Die optische Nichtlinearität dieser Potentialsonden resultiert aus ihrem ausgedehnten π -Elektronensystem, das einen intramolekularen Ladungstransfer $\pi \rightarrow \pi^*$ ermöglicht⁵. Bei optischer Anregung der di-4-APEPPS Farbstoffe, erfolgt ein Ladungstransfer von

⁵ $\sigma \rightarrow \sigma^*$ Übergänge liegen energetisch deutlich höher, so dass ihre Beiträge zur SHG im sichtbaren vernachlässigbar sind [114].

der Anilingroup (im Fall des di-4-ANEPPS von der Aminonaphthalingroup) in den Pyridiniumring um etwa $0,3\text{ nm}$ [111]. Diese Verschiebung der Elektronendichteverteilung erfolgt entlang einer Molekülachse, die parallel zum permanenten Dipolmoment im Grundzustand μ_g liegt. Dies zeigen semiempirische AM1 Rechnungen (MOPAC) der di-4-APEPPS-Potentialsonden (siehe Abbildung 4.2 und 4.3). Somit besitzen diese Moleküle nicht nur eine große Polarisierbarkeit, sondern auch eine große Hyperpolarisierbarkeit β_{zzz} entlang dieser Molekülachse⁶. Durch die Annahme einer einachsigen Hyperpolarisierbarkeit wird der Tensor zum Skalar vereinfacht.

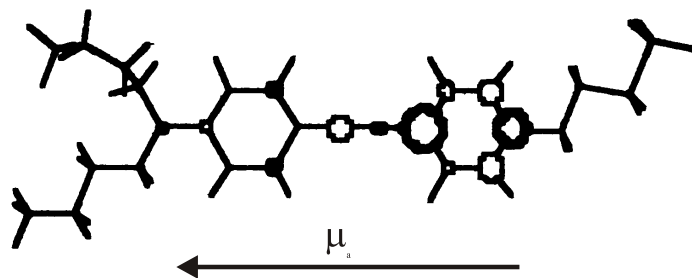


Abbildung 4.3: Elektronendichteverteilung des di-4-APEPPS im angeregten Zustand aus semiempirischen AM1-Rechnungen mit MOPAC (unter Vernachlässigung der geladenen Sulfonatgruppe). Man erhält eine hohe Elektronendichte am Pyridin-Stickstoff. Somit dreht sich die Richtung des Dipolmomentes im Vergleich zum Grundzustand um.

Die zweizählige Rotationsachse und die zur Hauptebene parallele Spiegelebene des di-4-APEPPS-Moleküls klassifizieren es nach Schönflies als C_{2v} -symmetrisch. In ihrer Anordnung innerhalb der äußeren Membran ergibt sich eine C_∞ -Symmetrie (siehe Abbildung 4.4). Für die C_∞ -Klasse sind im $\chi^{(2)}$ -Tensor nur Komponenten ungleich null, die einen Z-Index tragen [49] (vergleiche Gleichung (3.64)).

Daher erhält man makroskopisch eine große Suszeptibilität 2.Ordnung, die eine ausgeprägte SHG ermöglicht. Aufgrund des großen permanenten Dipolmomentes kann jedoch eine paarweise antiparallele Ausrichtung der Moleküle erfolgen, was zu einer zentrosymmetrischen Gesamtkonfiguration mit verschwindender SHG führt. Die Membran stellt jedoch eine Matrix für eine nichtzentrosymmetrische Einlagerung der Farbstoffmoleküle zur Verfügung. Lediglich außerhalb der Membran kann es, abhängig von der Konzentration der Farbstoffmoleküle zur Dimerbildung kommen. Für Konzentrationen oberhalb der CMC kann es sogar zur Kompartimentbildung aus Farbstoffmolekülen kommen. Aufgrund der Inversionssymmetrie dieser Kompartimente tragen auch sie nicht zum SH-Signal bei. Daher ist sichergestellt, dass (im Rahmen der Dipolnäherung) nur die in der Membran stabil eingelagerten, orientierten Farbstoffmoleküle ein SH-Signal vermitteln.

Der intramolekulare Ladungstransfer, der im wesentlichen zur SHG beiträgt, erfolgt

⁶di-4-ANEPPS hat eine Hyperpolarisierbarkeit von $\beta_{zzz} = 2,4 \cdot 10^{-38} \text{ m}^4/\text{V}$, während für Hemicyanine $\beta_{zzz} \approx 3,8 \cdot 10^{-38} \text{ m}^4/\text{V}$ gemessen wurden und Hemicyanine mit acetylenischen Bindungsblock sogar $\beta_{zzz} \approx 8,4 \cdot 10^{-38} \text{ m}^4/\text{V}$ lieferten [142].

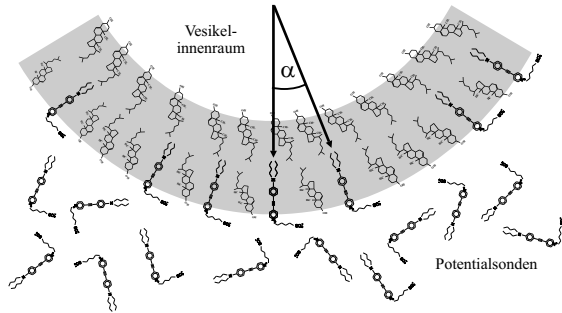


Abbildung 4.4:

Einlagerung der di-4-APEPPS Potentialsonden in die Membran aus oxidiertem Cholesterin unter einem Kippwinkel α zur Vesikelnormalen.

entlang der Molekülhauptachse und somit entlang der Membrannormalen (siehe Abbildung 4.4). Das elektrische Feld über die Zellmembran liegt daher exakt parallel zur großen Hyperpolarisierbarkeitsachse der Potentialsonden. Das führt zu einer maximalen Modulation der Hyperpolarisierbarkeit durch das Transmembranpotential. Dadurch ist eine große Potentialsensitivität gegeben. Die Sensitivität von Styrylfarbstoffen wie JPW1290 zeigten 10%-ige Intensitätsänderungen der zweiten Harmonischen für Membranpotentialänderungen von 10 mV [37]. Derartige Farbstoffe sind zudem Photostabil und zeigen nur geringe Zelltoxizitäten.

4.3 Einflüsse auf das SH-Signal

Mikroskopische Untersuchungen an Lipiddoppelschichtmembranen mit eingelagerten di-6-ASPBS-Styrylfarbstoffen ergaben für die Detektion der SHG eine Abnahme der SH-Signalintensität auf 10% über einen Zeitraum von 3 Stunden [76]. Da die TPEF-Intensität über diesen Zeitraum nahezu konstant blieb, schloss der Autor auf einen Flip-Flop-Mechanismus der Farbstoffe innerhalb der Membrandoppelschicht⁷, der zu einer Zunahme der Zentrosymmetrie des Systems führt. Die TPEF-Intensität ändert sich dadurch nicht, da diese nur von der Farbstoffkonzentration abhängt. Erfahrungsgemäß ist ein Flip-Flop-Mechanismus innerhalb von wenigen Stunden jedoch nicht zu erwarten, da ein derartiger Prozess abhängig von der molekularen Struktur bis zu Tagen dauern kann [121].

Desweiteren wurde eine Steigerung der SH-Signalintensität durch die Anwesenheit eines chiralen Zentrums des nichtlinear optischen Moleküls beobachtet [50, 58]. Diese Untersuchungen ergaben ein, um den Faktor von zwei erhöhtes $\chi^{(2)}$ im Vergleich zu einer Verbindung mit demselben chromophoren System, da die Chiralität die molekulare Asymmetrie erhöht. Für diese Untersuchungen wurden die Potentialsonden di-4-ANEPPS und ein chirales JPW-1259 (oder Analoge), bei dem die Pyridiniumsulfonatgruppe durch eine chirale Zuckergruppe ersetzt ist, verglichen. Mit chiralen Molekülen eingefärbte Zellen zeigten keinen Informationsunterschied zwischen der SH-Mikroskopie und der TPEF-Mikroskopie⁸. Mit achiralen di-4-ANEPPS-Farbstoffen eingefärbte Zellen lieferten jedoch signifikante Unterschiede zwischen den Messmethoden. Nur TPEF-Signale waren hierbei zu detektieren und keine SH-Signale. Dies

⁷Flip-Flop ist ein transversaler Austausch der Farbstoffe zwischen den beiden Membranschichten.

⁸Zu den Mikroskopieverfahren in Kapitel 4.4.

resultiert nach Ansicht der Autoren aus einer beidseitigen Einlagerung der Farbstoffe in die Lipiddoppelschicht der Zellwand. Aufgrund der fehlenden Chiralität der Moleküle liegt hierbei eine Inversionssymmetrie vor, die keine SHG mehr gestattet. Chirale Verbindungen hingegen zeigten auch bei einer beidseitigen Einlagerung, d.h. auch im Falle eines Flip-Flop-Mechanismus, noch signifikante SH-Beiträge in Langzeitmessungen.

Ein weiterer Effekt auf molekularer Ebene ist die Aufweichung der scheinbar scharfen Bedingung der fehlenden Zentrosymmetrie. Diese beschränkt sich nur auf einen räumlichen Abstand der Farbstoffschichten, bei beidseitiger Einlagerung in eine Membran. Dieser räumliche Abstand wird von der Kohärenzlänge Z_c bestimmt (siehe Gleichung (3.20)). Ist dieser größer als die Kohärenzlänge, so ist auch hier wieder eine Frequenzverdopplung möglich, andernfalls interferieren die kohärenten SH-Signale aus beiden Membranschichten destruktiv. Messungen an Phosphatidylcholinvesikeln mit einer Größenverteilung zwischen 20nm und 100nm liefern keine SH-Signale, da alle Beiträge der inneren und äußeren Oberfläche sich aus Symmetrie-Gründen aufheben. Dies resultiert aus der Vesikelgröße, die unterhalb der Kohärenzlänge liegt [50].

Die einzelnen Moleküle können daher nicht als einzelne, unabhängig strahlende Quellen betrachtet werden. Wird jedes Molekül als Hyper-Streuzentrum der einfallenden Strahlung betrachtet, abhängig von seinem SH-Streuquerschnitt $\sigma_{2\omega}$ (siehe Gleichung (4.4)) und seinen einzelnen Beiträgen zum elektromagnetischen Feld in der Strahlungszone, so müssen diese Einzelbeiträge phasenrichtig aufsummiert werden um die gesamte abgestrahlte SH-Signalintensität aus der Integration des Strahlungsprofils über alle Emissionsrichtungen zu erhalten.

$$I_{2\omega} \approx 0,4 \cdot w_0^4 N^2 \sigma_{2\omega} I_0^2 \quad [76] \quad (4.1)$$

Hier ist I_0 die Intensität der Fundamentalen im Fokus, w_0 die Strahltaile und N die molekulare Flächendichte, der zur SHG beitragenden Moleküle. Die Intensität skaliert mit $1/w_0^2$, so dass die SH-Signalintensität nahezu unabhängig von der Fokussierung ist und quadratisch von der Anzahl der Moleküle abhängt [76].

Es kann zu einer Zerstörung der kohärenten Eigenschaften der SHG kommen, wie für ferroelektrische Kristalle, die anisotrope Domänen verschiedener Orientierung besitzen. Hier kann die SHG ohne besondere Indexanpassung generiert werden. Zufällige Phasendiskontinuitäten an den Grenzflächen zwischen den Domänen zerstören die Kohärenz zwischen der einfallenden und der lokal erzeugten Harmonischen, die ansonsten zur destruktiven Interferenz führen würden. Der Effekt wird maximal, wenn die Domänengröße vergleichbar mit der Kohärenzlänge Z_c wird.

Eine systematische Untersuchung der kohärenten Eigenschaften der SHG wurde von Moreaux [57] durchgeführt. Die amphiphilen Farbstoffmoleküle (di-6-ASPBS), wurden von außen in zwei Vesikelmembranen eingelagert und mittels SHM im selben Laserfokus untersucht. Die Vesikel wurden einander in dem Fokus gezielt genähert und die Abhängigkeit der SH-Signalintensität gemessen. Wie Abbildung 4.5 zeigt, hängt die SH-Signalintensität sehr empfindlich vom Vesikelabstand ab. Der Autor sieht den Grund dafür in der Abstandsabhängigkeit der Zentrosymmetrie des gesamten Systems aus beiden Vesikeln, in denen sich die Farbstoffmoleküle antiparallel gegenüberstehen und die SH-Beiträge destruktiv miteinander interferieren. Entfernt man die Vesikelmembranen voneinander, so steigt die SH-Intensität an, d.h. die SH-Signale interfe-

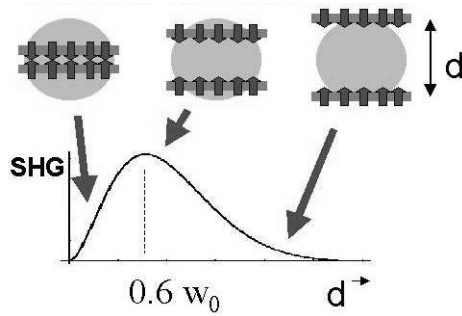


Abbildung 4.5:

SH-Signalintensität aus zwei mit di-6-ASPBS beladenen Vesikelmembranen, deren Abstand d zueinander variiert wurde. $w_0 = 510 \text{ nm}$ ist die Strahltaile des Laserstrahls [57].

rieren konstruktiv, bis beide letztlich außerhalb des Fokus liegen und die SH-Signale vollständig unabhängig voneinander sind [57].

Inwieweit hier die Flächenänderung der Wechselwirkungszone von Laser und Vesikel eine Rolle spielt, ist nicht klar, da der Autor dieses Problem nicht diskutiert (siehe Kapitel 8.1.2 und Anhang A). Mit dieser Messmethode wäre eine Distanzmessung zweier Vesikel jenseits des Beugungslimits und oberhalb von Fluoreszenz mit resonantem Energietransfer (FRET), die mit r^{-6} skaliert, möglich.

4.4 Frequenzverdoppelnde Mikroskopie

Die Summenfrequenz- oder frequenzverdoppelnde Mikroskopie (second harmonic microscopy: SHM) nutzt zur mikroskopischen Bildgebung das optische Signal eines nicht-linearen Mediums. Die Methode ist nicht zuletzt an Langmuir-Blodgett-Filmen in jüngerer Zeit von Flörsheimer etabliert worden [21, 22, 23]. Die Symmetrien der nicht-linearen Moleküle und ihre Anordnung können in-situ lateral aufgelöst dargestellt und quantitativ erfaßt werden. Durch den Einsatz kurzpulsiger Lasersysteme können mit geeigneten Detektoren schnelle Oberflächenprozesse abgebildet werden. Hierbei wird die makroskopische Größe der optischen Suszeptibilität zweiter Ordnung $\chi^{(2)}$ indirekt über die Intensität der entsprechenden Frequenzkomponenten und ihrer Polarisation gemessen.

Ein Hauptproblem im Fall der Summenfrequenz- oder SH-Mikroskopie einer Grenzfläche ist, die Lage der Hyperpolarisierbarkeitsachse der Moleküle. Zur Mikroskopie mit normalem Einfall der Fundamental zur Grenzfläche, wie im Falle der konfokalen Mikroskopie, müssen die Moleküle Hyperpolarisierbarkeitskomponenten in der Ebene der Grenzfläche besitzen, da die Polarisation der Fundamental stets senkrecht zur Einfallrichtung liegt. Hyperpolarisierbarkeitskomponenten normal zur Grenzfläche liefern somit keine SHG. Dies zeigt die $1/\cos^2(\alpha)$ -Abhängigkeit der SH-Signalintensität aus Gleichung (3.28).

Kann man auf hohe Intensitäten und Konversionsraten verzichten, so lässt sich eine konfokale Mikroskopie mit großer Apertur realisieren, da hier stets eine $\vec{E}$ -Vektor-Komponente in Normalenrichtung vorhanden ist (siehe Abbildung 4.6). Die große Krümmung der Membranen liefert daher günstige Geometrien für intensive SH-Signale und minimiert zugleich SH-Beiträge von bedeckten Substratoberflächen.

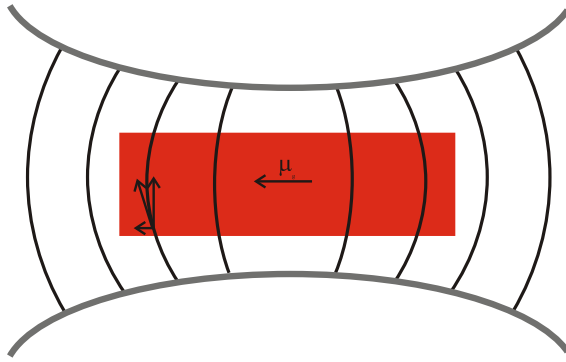


Abbildung 4.6:

Potentialsonden mit dem Dipolmoment $\vec{\mu}_g$ im Laserfokus bei konvokaler Beleuchtung. Die Parallelkomponente des $\vec{E}$ -Feldes ist hierbei sehr klein. Somit auch die erwartete Antwort der nichtlinearen Moleküle.

Ändert man jedoch die Geometrie des Fundamentalstrahls derart ab, dass er unter einem Kippwinkel α auf die Grenzfläche trifft, so existiert bei Zerlegung der Polarisation des Fundamentalstrahls eine Komponente in der Ebene der Grenzfläche und eine in Richtung der Normalen. Somit können auch Moleküle mit einer Hyperpolarisierbarkeitsachse in der Normalenrichtung der Grenzfläche die Wechselwirkung zwischen zwei Photonen des Fundamentalstrahls vermitteln. Die Detektion würde dann unter einem Kippwinkel α' (gemäß den Fresnel-Faktoren⁹) in Reflexion oder Transmission erfolgen.

Aufgrund der hohen Tiefenschärfe eines Mikroskopobjektives würde man nur schmale scharfe Streifen der Grenzfläche erhalten, wenn nicht ein Raster-Verfahren, das zeitliche Begrenzungen der Detektion auferlegt, eingesetzt würde.

Eine Möglichkeit der Mikroskopie in Normalenrichtung mit schrägem Einfall der Fundamentalstrahlen ist eine nicht-kollineare Geometrie der Fundamentalstrahlen. Hier wird die $\vec{k}$ -Erhaltung in Reflexion ausgenutzt. Eine Phasenanpassung bedeutet, dass der Impuls jedes neu erzeugten SH-Photons gleich der Summe aus den Impulsen der beiden fundamentalen Photonen ist. Aus dieser Sicht kann man $\vec{k}_{2\omega} = \vec{k}_\omega + \vec{k}_{\omega'}$ schreiben, wobei die $\vec{k}_\omega$ nicht notwendigerweise parallel verlaufen müssen. Lediglich die Vektorbedingung

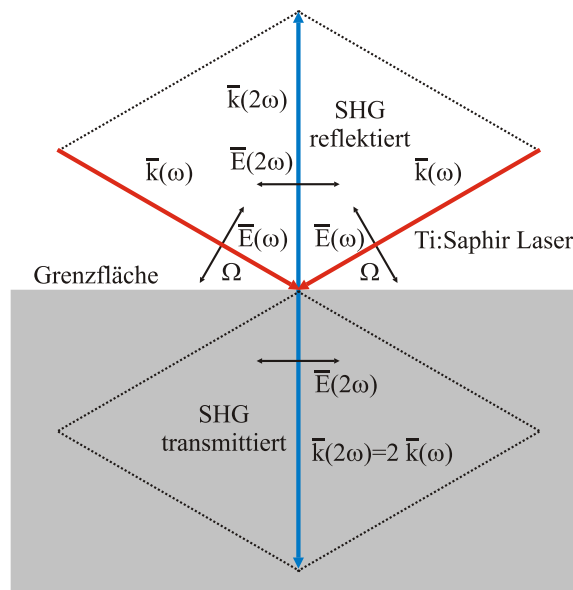


Abbildung 4.7:

Schematischer Aufbau des SHM entsprechend der $\vec{k}$ -Erhaltung.

⁹siehe Kapitel 3.3

muss erfüllt bleiben. Daher kann auch eine Spreizung der fundamentalen Photonenrichtungen die SH-Photonen erzeugen. Somit gelingt die Summenfrequenz-Mikroskopie ebenso wie die Fokussierung der Fundamentalen als konvergentes Strahlenbündel und die kollineare SHG.

Beim Einsatz von Kurzpulslasern zur Erzeugung der zweiten Harmonischen muss für den nicht-kollinearen Einfall der Pulse streng auf die Kohärenz der beiden Fundamentalen geachtet werden. Eine Interferenz der beiden Teilstrahlen ist nur möglich, wenn die Polarisationen der beiden Strahlen parallel zueinander sind und die Pulse gleichzeitig am nichtlinearen Molekül eintreffen.

Die Intensität des SH-Signals berechnet sich für den schrägen Einfall der Fundamentalen auf die Probe aus Gleichung (3.28).

Doch auch ohne Farbstoffmoleküle können Membranen mittels SHM untersucht werden, wenn die integralen Membranproteine die Bildgebung übernehmen. So wurden z.B. Muskelzellen von Hühnern mittels SHM abgebildet. Doch sind die resultierenden Intensitäten aufgrund der kleinen Hyperpolarisierbarkeiten der Proteine so gering, dass Belichtungszeiten von mehreren Stunden zur Erzeugung eines Bildes notwendig waren [64]. Freund [66, 67, 68] untersuchte Rattenschwanz-Sehnen mittels SHM. Diese weisen eine dichte Anordnung von parallel orientierten Kollagenfibrillen in einer Matrix auf, die alternierende polare Ausrichtungen besitzen. Aufgrund dieser Anordnung ist eine SHG möglich. Freund unterschied die beobachtete SHG dabei in kohärent und inkohärent gestreute Anteile. Besitzt das Objekt eine polare Ordnung über Dimensionen, die groß verglichen mit der Wellenlänge des einfallenden Lichtes sind, so wird kohärentes frequenzverdoppeltes Licht in Einstrahlungsrichtung, d.h. unter $\vec{k}$ -Erhaltung, erzeugt. Ist die Dimension der polaren Ordnung des Objektes hingegen kleiner als die fundamentale Wellenlänge, so wird eine inkohärente frequenzverdoppelte Strahlung erzeugt, deren Intensität etwa 10% der kohärenten SHG beträgt. Intensitäten von ungeordneten Objekten auf der molekularen Größenskala, wie Wasser, sind so schwach, dass sie auch nicht zu den inkohärent gestreuten SH-Signalintensitäten beitragen. Aufgrund der geringen Intensitäten benötigte Freund ebenfalls mehrere Stunden Belichtungszeit für seine SHM. Theoretisch wurde die kohärente und inkohärente SHG an einzelnen Molekülen im Rahmen der Streutheorie zuerst von Bloembergen [85] und später vollständiger von Bersohn [149] beschrieben.

4.5 SH- vs. TPEF-Mikroskopie

Ein Vergleich von SH- und TPEF-Mikroskopie ist in Abbildung 4.8 zu sehen [57]. Hier wurden zwei Riesenvesikel von bis zu $50\ \mu m$ Durchmesser mit di-6-ASPBS eingefärbt und mit Titan:Saphir-Laserpulsen beleuchtet. Beleuchtung und Detektion erfolgten mit klassischen mikroskopischen Aufbauten, d.h. kollinear und nicht wie in Abbildung 4.7 beschrieben. Hierdurch werden bei der SHG nur Beiträge tangential zur Mikroskopieebene sichtbar.

Die Adhäsionsfläche, an der die beiden Membranen miteinander verschmolzen sind, liefert in der SHM keine Signale, da diese Region nun eine Zentrosymmetrie aufweist. Hier werden SH-Signale generiert, die in ihrer Phase um π gegeneinander verschoben sind und daher destruktiv miteinander interferieren. Die TPEF-Mikroskopie hingegen

ist von Symmetriebetrachtungen und Phasenlagen vollkommen unabhängig.

Einen Vergleich zwischen TPEF- und SH-Mikroskopie in Mäusezellen ist in Abbildung

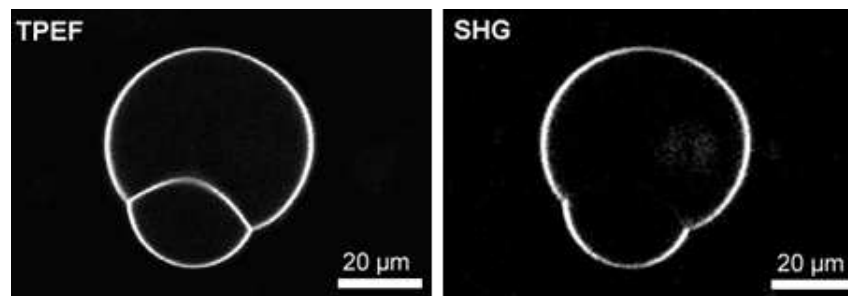


Abbildung 4.8: Vergleich der TPEF- und SH-Mikroskopie an zwei Riesenvesikeln, deren Grenzflächen über einen kleinen Bereich verschmolzen sind. Eingefärbt wurde mit $2\text{ }\mu\text{M}$ di-6-ASPBS. Jedes Bild wurde $1,5\text{ s}$ mit Titan:Saphir-Laserpulsen einer mittleren Leistung von 1 mW belichtet (Rasteraufnahme mit $40\text{ }\mu\text{s}$ Pixelintegrationszeit) [57].

4.9 dargestellt. Auch hier erfolgt die Detektion mittels klassischer Mikroskopieaufbauten. Die Farbstoffe, die in das Zytoplasma durch die Zellmembran eingedrungen sind, liefern in der SHM aus Symmetriegründen keine Signale. Das belegt eindrucksvoll die



Abbildung 4.9: Gleichzeitige Rasteraufnahmen von TPEF und SHG von Mäusezellen die mit $1\text{ }\mu\text{M}$ RH237-Farbstoff [82] beladen wurden. Im TPEF-Bild erkennt man Farbstoffe, die in das Zytoplasma der Zellen eingedrungen sind. Diese sind aus Symmetriebedingungen in der SHM nicht zu erkennen. Der Skalierungsbalken ist $15\text{ }\mu\text{m}$. [76]

große Sensitivität der SHG gegenüber molekularen Symmetrien, was mit Fluoreszenztechniken nicht erreicht werden kann. Zur Untersuchung von Grenzflächen nimmt die SHG daher eine herausragende Stellung ein, die keine andere optische Methode derart selektiv und hochauflösend meistern kann. Doch können mit Fluoreszenztechniken oft hilfreiche Zusatzinformationen erhalten werden.

Im Falle der TPEF kann das fluoreszierende Molekül selbst als unabhängig strahlende Quelle mit zufällig fluktuierender Phase betrachtet werden. Daher skaliert die Fluoreszenzintensität linear mit der Anzahl der fluoreszierenden Moleküle. Bei geeigneter Farbstoffbeladung einer Membran kann man SHG und TPEF simultan detektieren,

da die Intensitäten vergleichbar groß sind¹⁰. Hierbei empfiehlt es sich, den Quotienten der Intensitäten zu betrachten:

$$\frac{I_{2\omega}}{I_{TPEF}} \approx 0,2 \cdot \lambda w_0 N \left(\frac{\sigma_{2\omega}}{\sigma_{TPEF}} \right) \quad [76] \quad (4.2)$$

Mit λ als Wellenlänge der einfallenden Welle und w_0 als Radius der Strahltaile. Für den Wirkungsquerschnitt σ_{TPEF} erhält man:

$$\sigma_{TPEF} = \frac{3 \hbar^2 \omega^6}{2 \pi n^2 \epsilon_0^4 c^6} |\vec{\gamma}|^2 \quad [57] \quad (4.3)$$

Bloembergen [71] bezeichnete die SHG anfänglich als Streuprozess einer harmonischen Aufwärts-Konversion. Für einen derartigen Streuprozess lässt sich ein molekularer Streuquerschnitt für die SHG ermitteln aus¹¹:

$$\sigma_{2\omega} = \frac{4 \hbar \omega^5}{3 \pi n \epsilon_0^3 c^5} |\vec{\beta}|^2 [m^4 s / Photon] [76] \quad (4.4)$$

Um Intensitätsgleichheit zu erhalten, müssen die Wirkungsquerschnitte für SHG und TPEF abgeschätzt werden. So kann anschließend die Farbstoffflächendichte N und damit die Konzentration zur Beladung der Grenzfläche zu bestimmt werden.

Jedoch ist die SHG im Vergleich zur TPEF für ein einziges Molekül ein wesentlich uneffektiverer Prozess [76, 77, 78]. Lediglich das kohärente Zusammenwirken aller beteiligten Farbstoffmoleküle verschafft der SHG ähnliche Intensitäten wie der TPEF. Im Falle des di-6-ASPBS erhält man für $\sigma_{2\omega} \approx 10^{-61} m^4 s / Photon$ und für $\sigma_{TPEF} \approx 3 \cdot 10^{-57} m^4 s / Photon$ ¹², was ein Verhältnis von etwa 10^{-4} ergibt [76]. Daher benötigt man Farbstoffkonzentrationen im mol%-Bereich ($N \approx 2 \cdot 10^4$). Für die Färbung von Zellen für Fluoreszenzuntersuchungen werden Farbstoffkonzentrationen von etwa 1% Farbstoff bezüglich der gesamten Lipidkonzentration eingesetzt. Damit erreicht man vergleichbare Intensitäten für die SHG und die TPEF.

Wie Loew [50] in mikroskopischen Aufnahmen bewies, ist die SHG die deutlich Membranpotential-empfindlichere Methode als die TPEF. Zellsuspensionen die mit dem chiralen Farbstoffmolekülen JPW-2080 eingefärbt wurden, zeigen im Ruhezustand (Ruhepotential) keinen deutlichen Unterschied in den detektierten SHM- und TPEF-Intensitäten (siehe Abbildung 4.10). Für eine Depolarisation um 25 mV mittels 135 mM K^+ -Pufferlösung ist hingegen eine deutliche Intensitätsabnahme des SH-Signals im Vergleich zum TPEF-Signal zu erkennen (siehe Abbildung 4.11). Das TPEF-Signal änderte sich hierbei nicht so deutlich, so dass keine verlässlichen Aussagen über die Größe der erfolgten Depolarisation gemacht werden können. Dies steht im Einklang mit bisher bekannten konventionellen Fluoreszenzmessungen [37, 38], da es sich bei der TPEF um einen nichtlinearen Absorptionsprozess handelt, jedoch die anschließende

¹⁰Misst man die TPEF-Intensitäten z.B. in ethanolischer Lösung, so muss man die blau-Verschiebung der Absorptionsbande und den Anstieg der Quantenausbeute bei Einlagerung des Moleküls in die Membran berücksichtigen [81].

¹¹Hierbei wurde eine dominierende molekulare Hyperpolarisierbarkeitsachse mit paralleler Orientierung zur Polarisation des einfallenden Lasers angenommen.

¹²Im Fall des di-4-ANEPPS ist σ_{TPEF} sehr hoch und beträgt $10^{-55} m^4 s$ [50]. Weitere Größen verwandter Farbstoffe findet man in [59].

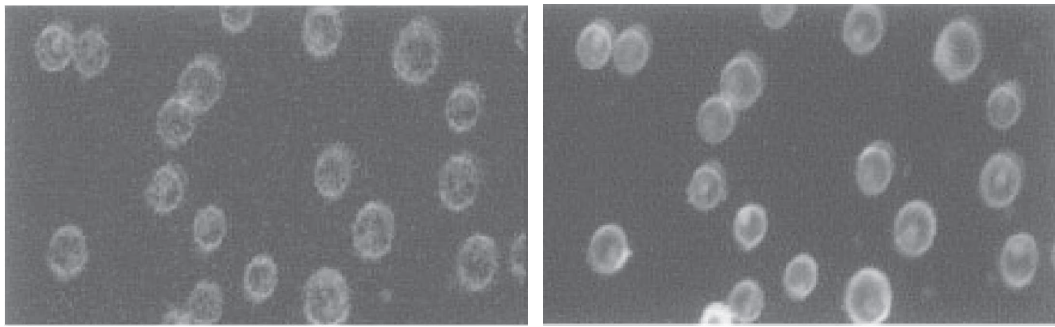


Abbildung 4.10: *SHM und TPEF von JPW-2080 gefärbten Zellen mit Ruhepotential* [50].

strahlende Relaxation dieselbe Potentialsensitivität wie die linear angeregte Fluoreszenz hat¹³

Die Zellsuspension steht dabei keinesfalls im Widerspruch zu den oben gemachten Aussagen des unbedingten Fehlens der Inversionssymmetrie, da die Zellgröße mit etwa $10\ \mu\text{m}$ schon deutlich größer als die Kohärenzlänge ist. Daher sind keine destruktiven Effekte aus gegenüberliegenden Membranschichten zu erwarten. Die SH-Signale von jeder Seite können sogar konstruktiv miteinander interferieren, was an Plastikugeln schon gezeigt wurde [54].

In neuronalen Zellen wurden SH-Signalintensitätsabnahmen von 59% gemessen, als die extrazelluläre KCl -Konzentration von $5,4\ \text{mM}$ auf $44,7\ \text{mM}$ erhöht wurde. Letzteres bewirkt einen K^+ -Einstrom in die Zellen und damit eine Depolarisation [38].

Eine Depolarisation einer Zelle kann also zu einer Abnahme der SH-Signalintensität in der Größenordnung von 60% führen.

Aufgrund der hohen Potentialsensitivität des SH-Signals und der ausschließlichen

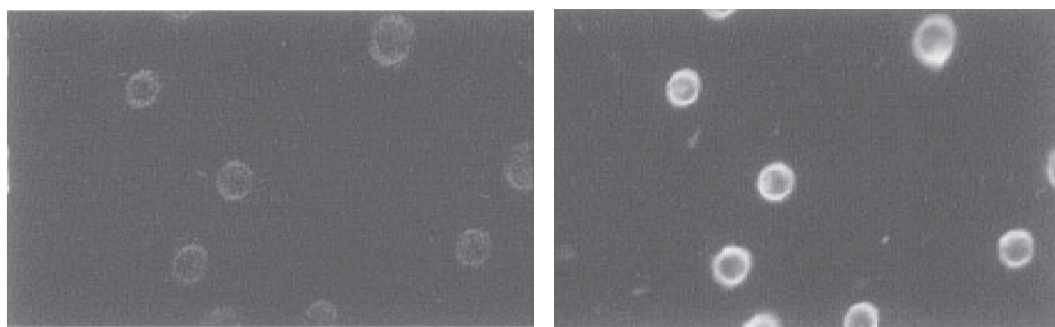


Abbildung 4.11: *SHM und TPEF von JPW-2080 gefärbten Zellen die um etwa $25\ \text{mV}$ depolarisiert wurden (aufgrund einer $135\ \text{mM}$ K^+ -Pufferzugabe)* [50].

Grenzflächenselektivität sollte sich die SHM in Zukunft als eine aussagekräftige Messmethode der Membranphysiologie etablieren.

¹³Einen Vergleich der Fluoreszenz- und SH-Potentialsensitivität von Styrylfarbstoffen liefern [36, 38, 50].

Doch trotz der vielfältigen und bestechenden Vorteile der nichtlinear optischen Methoden zur Untersuchung von lebender Materie, gibt es auch Nachteile die apparativ bedingt sind. Aufgrund der notwendigen hohen Intensitäten, die in Pulsen auf die Proben treffen, kann es unerwünschte toxische Effekte in den Zellen geben. Beispielsweise können durch Drei-Photonen-Absorption Nukleinsäuren oder Proteine angeregt werden, was sie denaturieren oder spalten könnte. Weiterhin kann es aufgrund der hohen Intensitäten zu einer zerstörenden Plasmabildung in der Zelle kommen. Sollte weiterhin eine Absorptionsbande energetisch nur in der Nähe eines denkbaren Effektes liegen, so kann es zum Ausbleichen der Farbstoffmoleküle oder zur Erzeugung toxischer freier Radikale kommen, wie es der Fall für die konventionelle Fluoreszenztechnik ist. Diese freien Radikale werden durch einen resonanten Energietransfer von den angeregten Farbstoffmolekülen zu den zytoplasmatischen Sauerstoffmolekülen gebildet. Der angeregte Farbstoff dringt in das Zytoplasma der Zelle ein und spaltet das Sauerstoffmolekül in freie Radikale, die entweder am Farbstoff anlagern und toxische Derivate bilden, oder die Zelle direkt oxidieren [147]. Das Eindringen der Farbstoffmoleküle in das Zytoplasma wurde von Rohr und Salzberg [145] an di-4-ANEPPS-Molekülen beobachtet. Sie beobachteten in Fluoreszenzexperimenten schon nach Farbstoffinkubationszeiten auf der Sekundenskala eine Einfärbung zytoplasmatischer Bestandteile, die mit di-8-ANEPPS deutlich später auftritt. Da ein Flip-Flop-Mechanismus auf kurzen Zeitskalen ausgeschlossen werden kann, interpretierten Rohr und Salzberg die Einfärbung des Zytoplasmas durch einen natürlichen Transportmechanismus der Membranbestandteile in das Zytoplasma. Dieser, als Endozytose bezeichnete Mechanismus, transportiert Makromoleküle durch einstülpen und abschnüren der Zellmembran, was zur Vesikelbildung führt, durch die Zellmembran auf die zytoplasmatische Seite. Dabei verlassen neben den Lipidmolekülen der Membran auch die Farbstoffmoleküle mit geringeren Membranbindungskonstanten die Membran in Richtung Zytosol. Die endozytischen Vesikel fusionieren anschließend mit anderen intrazellulären Zellorganellen. Die Exozytose stellt letztendlich ein Verteilungsgleichgewicht der Farbstoffe über die gesamte Zelle her.

Phototoxische Effekte und ein Ausbleichen des Farbstoffs begrenzen die Detektionszeit erheblich. So war innerhalb von 60 s eine 50%-ige Fluoreszenzintensitätsabnahme mit erheblichen zytosolischen Beiträgen zu beobachten [145]. Daher wurden in verschiedenen Untersuchungen akzeptable Belichtungsgrenzen für einen nichtdestruktiven Einsatz auch nichtlinear optischer Methoden ermittelt [51, 52].

Da die SHG ein parametrischer Prozess ist, können durch geeignete Wahl der Wellenlänge der Fundamentalen (nichtresonanter Einfall), Photobleichen und phototoxische Effekte weitgehend vermieden werden. Geht man überdies noch in den infraroten Bereich des elektromagnetischen Spektrums, so können auch Zwei- und Drei-Photonen-Absorption minimiert werden und somit auch die zellzerstörenden Effekte vermieden werden. Die optimale Wellenlänge sollte in der Flanke einer Absorptionsbande, zur resonanten Steigerung der SH-Signalintensität liegen.

Eine Einstrahlung im Infraroten liefert aufgrund ihrer größeren Eindringtiefe zudem noch Informationen aus tieferen Zellschichten.

Ein ausgezeichnetes Lasersystem, das die notwendigen spektralen Leistungsdichten für nichtlineare Effekte zur Verfügung stellt und darüber hinaus auch noch im nahen Infra-

roten betrieben wird, ist das Femtosekunden-Titan:Saphir-Lasersystem (siehe Kapitel 5.1).

Kapitel 5

Experimenteller Aufbau

5.1 Femtosekunden-Lasersystem

Die nichtlinear optischen Messungen werden mit einem Titan:Saphir-Lasersystem (CPA 1000, Clark-MXR) zur Erzeugung von Femtosekunden-Pulsen durchgeführt.

Die Erzeugung der $80 - 100\text{ fs}$ und $808 - 828\text{ nm}$ Ausgangspulse erfolgt in einem passiv Moden-gekoppelten Oszillator (NJA-4, Clark-MXR). Die Oszillatorpulse mit $3,3\text{ nJ}$ Pulsenergie werden nach der „Chirped-Puls“-Methode auf 1 mJ bis $1,5\text{ mJ}$ in einem regenerativen Verstärker (TRA1-1000, Clark-MXR) verstärkt. Dafür werden die Pulse in einem Pulsstreckter (PS-1000, Clark-MXR) zunächst auf 250 ps zeitlich gestreckt und nach der Verstärkung nahezu auf die Ausgangspuls-Dauer von 100 fs im Puls-kompressor (PC-1000, Clark-MXR) bei $400\text{ }\mu\text{J}$ Pulsenergie rekomprimiert.

Im Folgenden werden kurz die Komponenten des Femtosekunden-Lasersystems beschrieben. Eine ausführliche Darstellung dieses Systems findet man in [88].

5.1.1 Titan:Saphir-Lasersoszillator

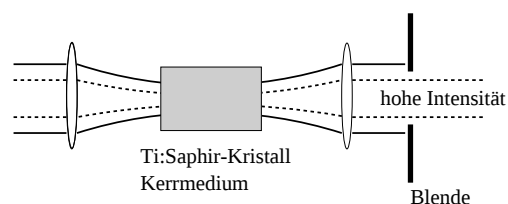


Abbildung 5.1: Selbstfokussierende Kerrlinsen-Wirkung des Titan:Saphir-Kristalls im Oszillator für hohe Intensitäten. Die Blende stabilisiert als massive Apertur den Femtosekunden-Pulsbetrieb gegenüber dem Dauerstrich-Betrieb [17].

Der Pumplaser des Titan:Saphir-Oszillators (NJA-4, Clark-MXR) ist ein Argonionen-Laser, der bei $4,5\text{ W}$ im Dauerstrich-Betrieb und mit Multilinen-Emission betrieben wird (Innova 90, Coherent).

Die Dauer der Oszillator-Pulse wird zwischen 80 fs und 100 fs durch Änderung des

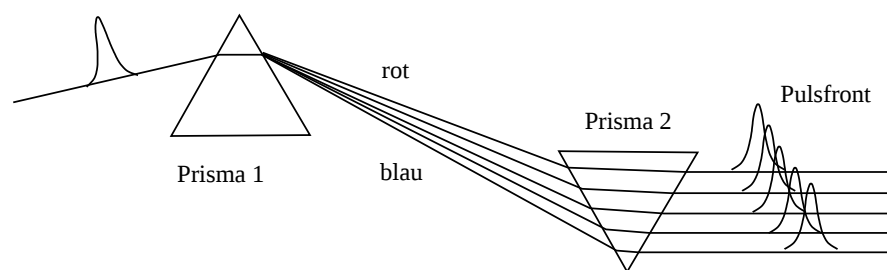


Abbildung 5.2: Das Prismenpaar als ein Element mit negativer Gruppengeschwindigkeitsdispersion. Der Gangunterschied in einem Prismenpaar für die blauen und roten Wellenlängenanteile führt zu einer Verzögerung der roten Wellenlängenanteile eines Laserpulses [17].

Prismenpaarabstands eingestellt (siehe Abbildung 5.2 und 5.3). Bei einer Repetitionsrate von 96 MHz besitzen die Einzelpulse eine Energie von $\frac{320\text{ mW}}{96\text{ MHz}} = 3,3\text{ nJ}$, so dass man eine Pulsleistung von $\frac{3,3\text{ nJ}}{80\text{ fs}} = 42\text{ kW}$ und eine Leistungsdichte von 6 MW/m^2 bei einer spektralen Breite von $10 - 20\text{ nm}$ erhält.

Die Femtosekunden-Pulsbildung wird durch Kerr-Linsen-unterstützte Modenkopplung erreicht [93]. Hier wird der Kerr-Effekt (Intensitätsabhängigkeit des Brechungsindex) im Titan:Saphir-Lasermedium ausgenutzt:

$$n(t) = n_0 + n_2 \cdot I(t) \quad (5.1)$$

Das führt zur Selbstfokussierung des Laserstrahl-Profiles im Titan:Saphir-Kristall. Der Kerr-Effekt beruht überwiegend auf elektronischen Polarisierungseffekten und besitzt sehr kurze Relaxationszeiten ($\leq 10\text{ fs}$). Der modengekoppelte Betrieb des Titan:Saphir-Oszillators mit hohen Maximalintensitäten $I(t)$ wird gegenüber dem Dauerstrich-Betrieb durch eine weiche oder massive Apertur im Resonator stabilisiert (siehe Abbildung 5.1).

Die Verluste durch die Apertur sind im Dauerstrich-Betrieb höher als im Femtosekunden-Pulsbetrieb, da der Strahlquerschnitt durch Selbstfokussierung abnimmt. Das Pumpstrahl-Profil des Argonionen-Lasers wird auf einen Profildurchmesser von etwa $50\text{ }\mu\text{m}$ innerhalb des Titan:Saphir-Kristalls fokussiert. Werden Intensitätsfluktuationen im Dauerstrichbetrieb so groß, dass der Kerr-Effekt einsetzt, so werden dadurch automatisch die Photonen der longitudinalen Resonatormoden, die im spektralen Verstärkungsprofil liegen, in ihren Phasen gekoppelt¹. Dadurch ist der Laserresonator für den kleinen Lasermode-Querschnitt während der Kerr-Linsen-Wirkung im Femtosekunden-Pulsbetrieb stabilisiert. Die große Verstärkungsbandbreite des Lasermediums Titan:Saphir von etwa 5000 cm^{-1} erlaubt theoretisch eine Pulsbildung bis in den Sub-10 fs-Bereich.

Eine Femtosekunden-Pulsdauer kann jedoch nur durch eine Kompensation der positiven Gruppengeschwindigkeitsdispersion des Titan:Saphir-Kristalls im Laserresonator erreicht werden [94, 95]. Ein Brewster-Winkel-Prismenpaar wird als Element mit ne-

¹häufig ist jedoch eine Störung von außen notwendig

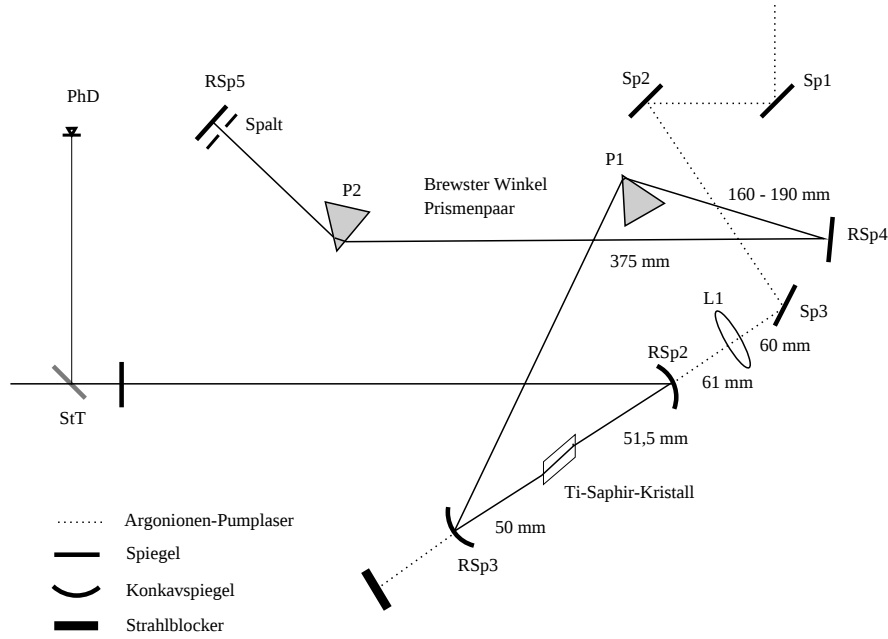


Abbildung 5.3: Aufbau des passiv Moden-gekoppelten Titan:Saphir-Oszillators (NJA-4, Clark-MXR) [17].

gativer Gruppengeschwindigkeitsdispersion eingesetzt (siehe Abbildung 5.2 und 5.3) [96, 97]. Die resultierende Gruppengeschwindigkeitsdispersion im Resonator ist über den Abstand der beiden Prismen und über die Wegstrecke der Laserpulse innerhalb des Prismas 2 einstellbar. Der optisch längere Weg für größere Wellenlängen im zweiten Prisma kompensiert den geometrisch kürzeren Weg für diese Wellenlängen außerhalb der Prismen über, so dass die Gruppengeschwindigkeitsdispersion insgesamt negativ ist. Eine weitere Pulsverkürzung durch die Erhöhung der Anzahl der im Titan:Saphir-Oszillator gekoppelten Moden erfolgt durch Selbstphasenmodulation. Die gesamte induzierte Phasenänderung $\Delta\phi$ entlang des Weges z kann aufgrund einer Änderung des Brechungsindizes (Kerr-Effekt) beschrieben werden durch:

$$\Delta\phi = \frac{\omega}{c} \int_0^z \Delta n dz \quad (5.2)$$

Somit liefert $\Delta\phi$ zusätzliche Frequenzkomponenten gemäß:

$$\Delta\omega(t) = -\frac{\partial}{\partial t}(\Delta\phi), \quad (5.3)$$

und es entstehen rot und blau verschobene Frequenzkomponenten an den Vorder- und Hinterflanken des generierenden Pulses. Daraus resultiert eine Erweiterung des Modenspektrums². Der spektral erweiterte Puls wird durch die negative Gruppengeschwindigkeitsdispersion des Prismenpaares komprimiert.

²Der Titan:Saphir-Laser ist aufgrund der Pulsspektrumerweiterung durch Selbstphasenmodulation in Verbindung mit einem Resonator ohne Gruppengeschwindigkeitsdispersion ein Solitonen-Laser.

5.1.2 Puls-Verstärkung

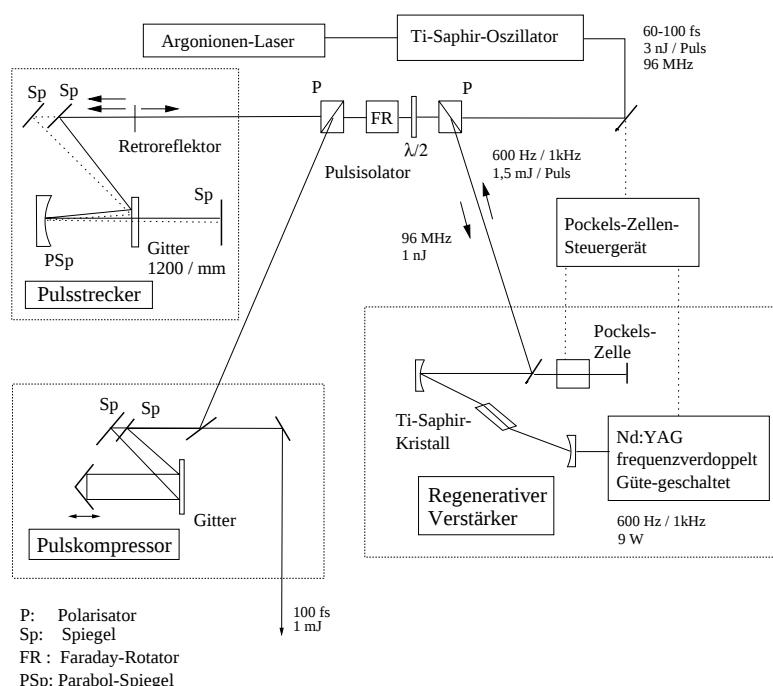


Abbildung 5.4: Schematischer Aufbau der Chirped-Puls-Verstärkung bestehend aus Pulsstrecke, regenerativem Verstärker, Pulskompressor, Pulsisolator und Pockels-Zelle mit Steuereinheit [17].

Zur Verstärkung der $3,3 \text{ nJ}$ Titan:Saphir-Oszillatorpulse wird die Technik der Chirped-Puls-Verstärkung (CPA) in einem regenerativen Verstärker angewendet (siehe Abbildung 5.4). Dafür werden die Oszillator-Pulse in einem Pulsstrecke (PS-1000, Clark-MXR) zeitlich um das 2500-fache gestreckt. Das dispersive Element bildet dabei ein Gitter, das den Puls spektral zerlegt und über Spiegel die verschiedenen Frequenzanteile auf der optischen Achse wieder vereint. Dafür besitzt der zeitlich gestreckte Puls einen linearen Chirp, d.h. eine zeitlich lineare Verschiebung der unterschiedlichen Frequenzanteile gegeneinander.

Eine Auskoppeloptik, bestehend aus einem Faraday-Dreher, der sich zwischen zwei Nicols-Prismen und einem $\lambda/2$ -Plättchen befindet, schickt den Puls nach dem Streckvorgang (die Pulsdauer beträgt jetzt ungefähr 250 ps und die Pulsenergie 1 nJ) in den regenerativen Verstärker.

Der Oszillator-Puls wird im regenerativen Verstärker (TRA1-1000, Clark-MXR) um etwa den Faktor von $1,5 \cdot 10^6$ auf $1,5 \text{ mJ}$ verstärkt. Der regenerative Verstärker ist ein Titan:Saphir-Resonator und wird von einem Güte-geschalteten, frequenzverdoppelten Nd:YAG-Laser (ORC-1000, Clark-MXR) mit einer Pulsenergie von etwa 9 mJ bei einer Repetitionsrate von 1 kHz gepumpt. Zur Synchronisation der zu verstärkenden Pulse mit den Nd:YAG-Laserpulsen dient eine elektronisch gesteuerte Einkoppeloptik, in Form einer Pockelszelle im Verstärker, die von der Oszillatordiode mit 96 MHz getriggert wird. Während der Zeit, in der sich der Nd:YAG-Puls, der wesentlich länger

als die Umlaufzeit im Verstärkerresonator ist, im Verstärker befindet, ist immer nur ein zu verstärkender Puls in der Verstärkerkavität. Dieser läuft in der Verstärkerkavität mehrmals umher, bis eine elektronische Auskopplung für gesättigte Verstärkung erfolgt. Die verstärkten Pulse werden in einem Gitterkompressor (PC-1000, Clark-MXR) nahezu auf die ursprüngliche Oszillator-Pulsbreite mit jetzt $400 \mu J$ Pulsenergie zurückkomprimiert.

Mit den fokussierten CPA-Pulsen können Intensitäten bis ungefähr $10^{19} W/m^2$ erreicht werden. Im täglichen Betrieb wird eine Pulsbreite von etwa $140 fs$ (FWHM) erreicht [17].

5.2 Aufbau der SHG an Cholesterinvesikeln

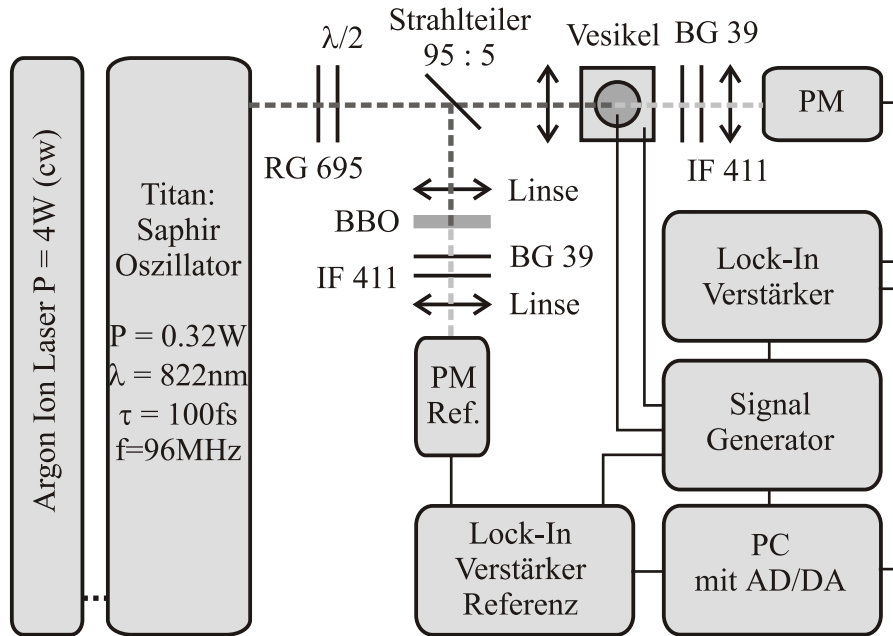


Abbildung 5.5: Messaufbau zur SHG an Cholesterinvesikeln.

Für die SHG-Experimente an Cholesterinvesikeln wurden als Fundamentale die Titan:-Saphir-Oszillator-Pulse verwendet.

Die Cholesterinvesikel (siehe Kapitel 2.5), gefüllt mit einer $0,1 M KCl$ -Lösung, wird im Mittel auf einen Radius von $2,5 mm$ gegen eine Farbstoff- KCl -Lösung in einer Küvette (Hellma, Typ 101 QS, $10 \times 10 mm^2$) aufgepumpt. Am Cholesterinvesikel wurden di-4-APEPPS-Potentialsonden (siehe Abbildung 4.1) eingesetzt. Die Potentialsonden wurden in einer Konzentration von $c = 10^{-3} mol/l$ in 50% ethanolischer und 50% wässriger Lösung angesetzt. In der Probenküvette wurde eine, mit einer $0,1 mol/l KCl$ -Lösung auf $c = 5 \cdot 10^{-5} mol/l$ verdünnte Farbstoff-Leitsalz-Lösung verwendet.

Nach der Ausdünnphase der Cholesterinvesikel erhält man eine Doppelschichtmembran von etwa $4 nm$ Dicke, in die sich nichtlinear optische Potentialsonden von außen über eine Gleichgewichtsverteilung einlagern (siehe Kapitel 2.1 und 2.5). An der tiefsten

Stelle der Vesikel wird der Titan:Saphir-Laser tangential auf die Vesikel fokussiert. Die fokussierende Linse mit $f = +180\text{ mm}$ liefert bei $\lambda = 822\text{ nm}$ eine Strahltaille (kleinster Radius des Strahls) gemäß

$$w_0 = \sqrt{\frac{f \lambda}{2 \pi}}, \quad (5.4)$$

von $w_0 = 153\text{ }\mu\text{m}$, die sich gemäß

$$w_z = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{2z}{f}\right)^2} \quad (5.5)$$

bei $z = \pm 156\text{ mm}$ auf $2w_0$ vergrößert hat. Dadurch erhält man eine homogene Intensitätsverteilung im Bereich der Wechselwirkungszone von Laserstrahl und Vesikelmembran.

Hier vermitteln die nichtlinear optischen Potentialsonden die Wechselwirkung zwei-

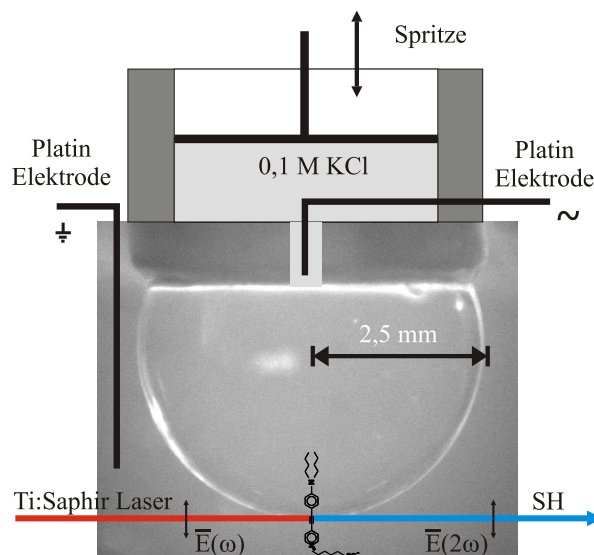


Abbildung 5.6:

Vesikel aus oxidierten Cholesterin auf einer Teflonspitze. Innerhalb der Vesikel liegt eine Platinelektrode in der Leitsalzlösung. In die Leitsalzlösung außerhalb der Vesikel taucht die Gegenelektrode aus Platin. Der Titan:Saphir-Laserstrahl streift die Vesikel am tiefsten Punkt orthogonal zur Oberflächennormalen. Hier sind die Polarisation des Lasers und die Hyperpolarisierbarkeitsachse der Potentialsonden parallel [3].

er Photonen miteinander, so dass ein frequenzverdoppeltes Signal der ausgerichteten Potentialsonden innerhalb der äußeren Membran entsteht. Die Polarisation des Fundamentalstrahls wurde durch eine $\frac{\lambda}{2}$ -Platte parallel zur Oberflächennormalen der Vesikel eingestellt. Somit ist die Polarisation parallel zur Richtung der größten Hyperpolarisierbarkeitsachse der Potentialsonden.

Ein RG-695-Farbfiler (Schott, Dicke = 3 mm) absorbiert die Frequenzanteile des Argonionen-Lasers, der den Titan:Saphir-Laser pumpt. Die SH-Signalintensität wird mit einem Peltier-gekühlten Photomultiplier (Hamamatsu R 928) in Richtung des Fundamentalstrahls detektiert. Eine Filterung der fundamentalen des Lasers erfolgt durch einen Farbfiler BG 39 (Schott, Dicke = 3 mm). Fluoreszenzanteile aus den Potentialsonden werden mittels eines Interferenzfilters (Bandbreite $FWHM = 20\text{ nm}$ mit $T_{max} = 60\%$ bei $\lambda = 411\text{ nm}$ und $FW1\%M = 30\text{ nm}$, BK Interferenzoptik und Elektronik GmbH) herausgefiltert. Ein zweiter, identischer Photomultiplier bildet einen

Referenzweig, der die SHG eines β -Barium-Borat-Kristalls³ detektiert. Die Photomultiplier werden durch Lock-In-Verstärker (Itaco Dynatrac 395 und 393), die auf die Trägerfrequenz, der an die Vesikel angelegten Spannung eingelockt sind, analog ausgelesen. Ein PC speichert die angelegte Spannung und die Daten der Lock-In-Verstärker über eine 12 bit-AD/DA-Umsetzerkarte (Keithley)(siehe Abbildung 5.5). Der Vergleich mit einer Referenz, dem BBO-Kristall liefert nicht nur Aussagen über die Stabilität der Laserpulse, sondern ermöglicht auch Aussagen über Konversionseffizienz bezüglich dieser Referenz. Um ein definiertes Membranpotential über die Vesikelmembran zu erzeugen, werden zwei Platinelektroden, eine innerhalb des Vesikels in der reinen Leitsalzlösung und eine außerhalb der Vesikel in die Potentialsonden-Leitsalzlösung eingebracht (siehe Abbildung 5.6). Das Membranpotential kann nun in einem Bereich von $\pm 120 mV_{SS}$ durch einen Signalgenerator (Rohde + Schwarz Funktionsgenerator AFGU) eingestellt werden. Dieser liefert auch das Referenzsignal für die Lock-In-Verstärker. Die SHG-Messungen stellen eine Integration der Grenzflächeneigenschaften des beleuchteten Bereiches aus der Probe dar. Man erhält nur die mittlere molekulare Ordnung und Symmetrie der untersuchten Grenzfläche. Die Frequenzverdopplungsmikroskopie (SHM) hingegen ermöglicht zusätzlich zur SH-Spektroskopie die örtlich aufgelöste Detektion von Membranpotentialänderungen. Die SHM ist insbesondere empfindlich gegen Änderungen der Symmetrie auf molekularer Ebene. Doch auch hier erhält man nur SH-Signale, wenn die lokale Ordnung nicht-zentrosymmetrisch ist und die Moleküle polare Komponenten in der Ebene haben.

5.3 Aufbau des SH-Mikroskopes (SHM)

5.3.1 CCD-Kamera

Die moderne Mikroskopie bedient sich zur quantitativen Erfassung von Bildern hochauflösender CCD-Kameras. CCD's (Charge Coupled Device) im wissenschaftlichen Bereich sind im Hinblick auf größtmögliche Ortsauflösung, Quanteneffizienz, elektronisches Rauschen, Auslesegeschwindigkeit und den Spektralbereich optimiert. Um quantitative Messungen durchzuführen, müssen sämtliche Eigenschaften des CCD's über den gesamten Bildbereich möglichst homogen sein. Abweichungen in der Sensitivität von Pixel (Picture Element) zu Pixel dürfen 0,6% nicht überschreiten [15]. Daher sind die Ansprüche an ein CCD als Messinstrument sehr hoch. Die Kantenlänge der quadratischen Pixel des SVGA-Chips (Sony) der hier eingesetzten CCD-Kamera (PCO, SensiCam Long Exposure) beträgt $6,7 \mu m$ und somit die gesamte Detektionsgröße des 1280×1024 -Pixel Chips $8,576 mm \times 6,861 mm$.

Für die Abbildung von Objekten mit schwachen Intensitäten ist neben einer hohen Quanteneffizienz ein geringes Gesamttrauschen notwendig, um ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten. CCD-Chips erreichen heute Rauschwerte von wenigen Elektronen. Die Speicherkapazität der Pixel beträgt beim SVGA-Chip (Sony) 25000 Elektronen. Daher beträgt der dynamische Bereich der CCD-Elektronik 16 bit. Die Umsetzung des analogen Spannungssignals aus dem Ausleseverstärker in einen digitalen Wert erfolgt außerhalb des Sensors mit einem 12bit-A/D-Umsetzer, und damit in

³BBO hat ein $\chi_{YY}^{(2)}$ von $2,3 \cdot 10^{-12} m/V$ [103]

4096 Spannungsstufen.

Das Gesamtuschen setzt sich dabei additiv aus voneinander unabhängigen Rauschquellen zusammen [16]:

$$N_t = \sqrt{N_r^2 + N_d^2 + N_{cte}^2} \quad (5.6)$$

N_r ist das Rauschen der Ausleseelektronik, das von der Temperatur, der Verstärkung und der Auslesegeschwindigkeit abhängt. N_d ist das Dunkelstromrauschen, das durch die Dunkelladungen $S_d = N_d^2$, die sich in den Pixeln während der Belichtungszeit ansammeln, verursacht wird. S_d wächst proportional mit der Integrationszeit und sinkt exponentiell mit der Temperatur. N_{cte} ist das Rauschen, das durch den unvollständigen Transfer der Pixelladungen zum Ausleseknoden entsteht. Bei niedrigen Intensitäten liefert daher eine Kühlung des CCD's auf -12°C und Softwareseitig zum Auslesen des Bildes zusammengefasste benachbarte Zellblöcke (Binning), die jedoch die Auflösung vermindern, eine deutliche Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses. Bei sehr kleinen Signalintensitäten wachsen die Belichtungszeiten des CCD-Chips so stark an, dass selbst langsame Dynamiken der Objekte zu drastischen Auflösungsverlusten führen. Aus diesem Grund setzt man Bildverstärkersysteme ein.

5.3.2 Bildverstärker

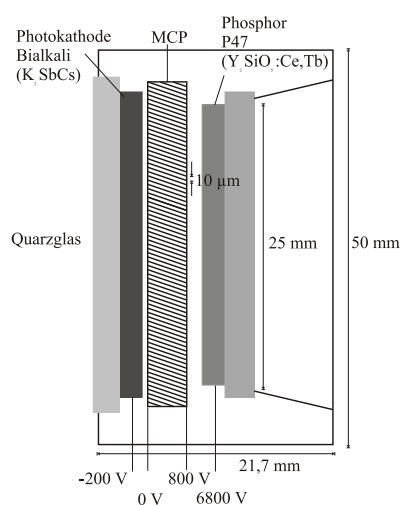


Abbildung 5.7:

Aufbau und Beschaltung des Bildverstärkersystems. Der hier eingesetzte Bildverstärker liefert bei 400 nm eine Verstärkung von 25 kW/W .

Bildverstärkersysteme verstärken die Lichtintensitäten bis zu einem Faktor von 10^5 . Das Bildverstärkersystem besteht aus drei wesentlichen Komponenten. Licht mit schwacher Intensität fällt auf eine Photokathode und löst dort Elektronen aus. Diese werden im Vakuum in Richtung einer Mikrokanalplatte (MCP) beschleunigt und lösen lawinenartig neue Elektronen aus (vergleichbar dem Photomultiplier-Prinzip). Das in Elektronen konvertierte Lichtsignal wird reproduziert, indem die Elektronen auf einen Phosphorschirm beschleunigt werden. Eine nachgeschaltete CCD-Kamera bildet den Phosphorschirm auf den CCD-Chip ab. Der hier eingesetzte Nahfokus-MCP-Bildverstärker (Proxitronic BV 2561 BY 5N) ist seitens der Photokathode auf die Wellenlänge des SH-Signals und seitens des Phosphorschirms für die maximale spektrale Empfindlichkeit der auslesenden CCD-Kamera optimiert. Durch Schalten der Beschleunigungsspannung zwischen Photokathode und MCP ist der Bildverstärker bis in

den sub- μs -Bereich schaltbar, so dass schnelle Bildsequenzen detektierbar sind. Eine Bildverstärkung erkaufte man sich in der Regel mit einem verminderten Auflösungsvermögen. Das Auflösungsvermögen wird meist durch die Zahl der Linien pro Millimeter eines Rasters angegeben, welches im Bild eben noch erkannt werden kann. Es wird hierbei hauptsächlich durch den Diffusionslichthof der Alkalikristalle in der Photokathode und ihrer Körnigkeit begrenzt. Bei einem Strichraster mit hohem Kontrast misst man hier 37 Linien pro Millimeter.

Die hohe Empfindlichkeit der Bildverstärker machen sie auch sehr empfindlich in ihrer Handhabung. So reicht bereits eine längere Belichtungszeit bei Raumbeleuchtung, um in die Photokathodenschicht schwarze, irreparable Flecke einzubrennen.

5.3.3 Einstrahliger Messaufbau

Der experimentelle Aufbau der SHM an Cholesterinvesikeln wurde durch den Austausch des Mess-Photomultipliers gegen eine CCD-Kamera ohne Bildverstärkersystem in Kombination mit einem Zoom-Mikroskopobjektiv mit großem Arbeitsabstand (Euromex Microscopes) realisiert. Die Filterung der Fundamental- und der Argonionen-Laser-Beiträge erfolgte wie vorher mittels BG-39-Farbfilt und Interferenzfilter 411 nm. Ansonsten bleibt der Messaufbau aus Abbildung 5.5 unverändert.

5.3.4 Zweistrahliges Messaufbau

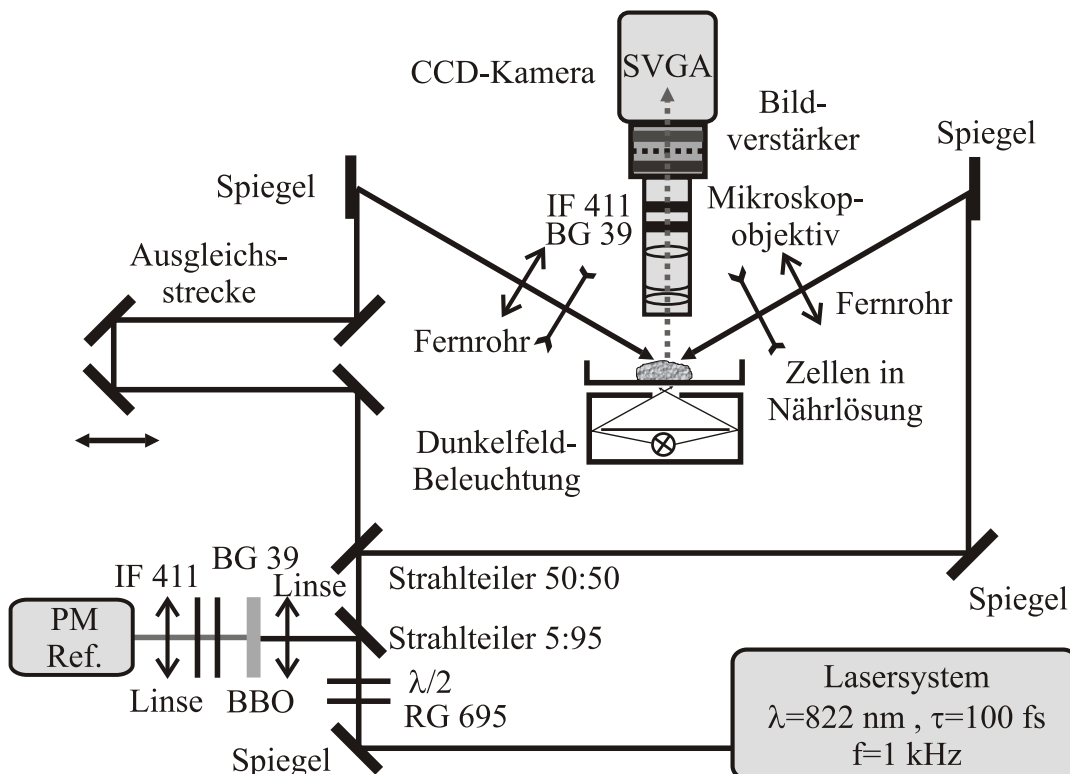


Abbildung 5.8: Messaufbau des SH-Mikroskopes.

Um Mikroskopie an lebenden Zellsystemen durchzuführen, ist ein zweistrahliges Messaufbau (siehe Kapitel 4.4) von Vorteil (siehe Abbildung 5.8). Die Strahlteilung erfolgt an einer variablen Strahlteilerplatte (Linos Photonics), an der das Teilungsverhältnis nahezu beliebig einstellbar ist. Im Experiment werden die verstärkten Titan:Saphir-Oszillatorpulse eingesetzt (siehe Kapitel 5.1.1). Der zweistrahlige Aufbau benötigt das gesamte Lasersystem (Oszillator mit regenerativem Verstärker).

Dieses Lasersystem hat eine Repetitionsrate von 1 kHz anstelle der als kontinuierlich anzusehenden 96 MHz des Titan:Saphir-Oszillators. Bei einer Pulsdauer von 100 fs , was einem Lichtweg von $30\text{ }\mu\text{m}$ entspricht, findet man für 1 kHz Repetitionsrate erst nach 300 km den nächsten Puls. Interferenzfähig mit detektierbarer Intensität sind die beiden Teilstrahlen somit nur, wenn die geteilten Pulse Wege durchlaufen, die weniger als $30\text{ }\mu\text{m}$ Längendifferenz aufweisen. Um eine Ausgleichsstrecke für einen der beiden Teilstrahlen zu erhalten, wurde für den zweistrahligen Aufbau ein Mikrometer-Positioniertisch mit einer Auflösung von $1\text{ }\mu\text{m}$ eingebaut, auf dem sich zwei Spiegel befinden. Dies führt aber auch dazu, dass die effektiv zu untersuchende Fläche ein Band von $30\text{ }\mu\text{m}$ Breite darstellt (siehe Abbildung 5.9). Um diese Fläche zu vergrößern, erhöht man die Pulsbreite, was die Justage vereinfacht, aber auch die Leistungsdichte pro Puls verringert. Der Titan:Saphir-Laserstrahl hat hinter dem Kompressor ein elliptisches Strahlprofil mit einem großen Durchmesser von $5 \cdot 10^{-3}\text{ m}$ horizontal und einem kleinen Durchmesser von $4 \cdot 10^{-3}\text{ m}$ vertikal. Somit ergibt sich eine Fläche von $16 \cdot 10^{-6}\text{ m}^2$ und bei einer Pulsleistung von 4 GW eine Pulsleistungsdichte von $3 \cdot 10^{14}\text{ W/m}^2$ (siehe Kapitel 5.1.2). Sie werden mittels zweier identischer Galileo-Fernrohre mit den Linsenbrennweiten $+100\text{ mm}$ und -30 mm auf ein Drittel ihres Durchmessers reduziert, so dass die ausgeleuchtete Fläche 10^{-6} m^2 beträgt, was eine Leistungsdichte von $3 \cdot 10^{15}\text{ W/m}^2$ ergibt. Die beiden Teilstrahlen haben, bevor sie auf die Proben unter einem Glanzwinkel von $\Omega = 27^\circ$ treffen, jeweils eine gemessene mittlere Leistung von 9 mW (siehe Abbildung 5.10). Das entspricht einer Pulsenergie von $9\text{ }\mu\text{J}$. Bedenkt man, dass hinter dem Kompressor des Lasersystems $400\text{ }\mu\text{J}$ zur Verfügung standen, so sind die Verluste durch Strahlteiler, Spiegel und Linsensysteme hoch. Damit ergibt sich eine Pulsleistungsdichte je Strahlarm auf der Probe zu $7 \cdot 10^{13}\text{ W/m}^2$.

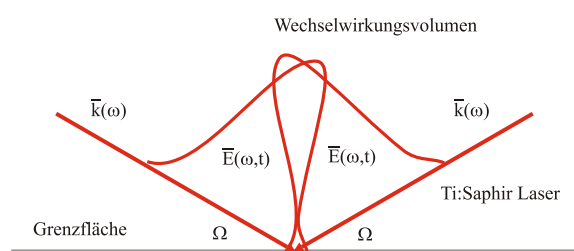


Abbildung 5.9:

Das Wechselwirkungsvolumen der beiden Fundamentalstrahlen ergibt sich aus dem Einfallswinkel Ω und der Pulslänge.

Zur Mikroskopie der Proben wird das CCD-Kamera-Bildverstärkersystem mit vorgeschaltetem Mikroskopobjektiv eingesetzt. Die Positionierung der Proben im Wechselwirkungsvolumen der Laserpulse erfolgt durch eine mechanische X,Y,Z-Positioniereinheit mit 50 nm Auflösung der differentiellen Mikrometerschraube (NanoMax-TS, Melles Griot). Die Justage der Probe im Laser erfolgt unter konventioneller Dunkelfeldbeleuchtung mit dem Mikroskop.

Alle Messungen finden in einer selbst hergestellten Küvette, die Wahlweise mit Rin-

gerlösung oder, nach umschalten eines Ventils, mit einer beliebigen K^+ -Lösung durchspült wird statt. Hierbei wurde gravitaktisch ein mittlerer Volumenstrom von etwa $Q \approx 5 \text{ ml/min}$ eingestellt. Die Lösungen wurden über eine Rollpumpe abgesaugt.

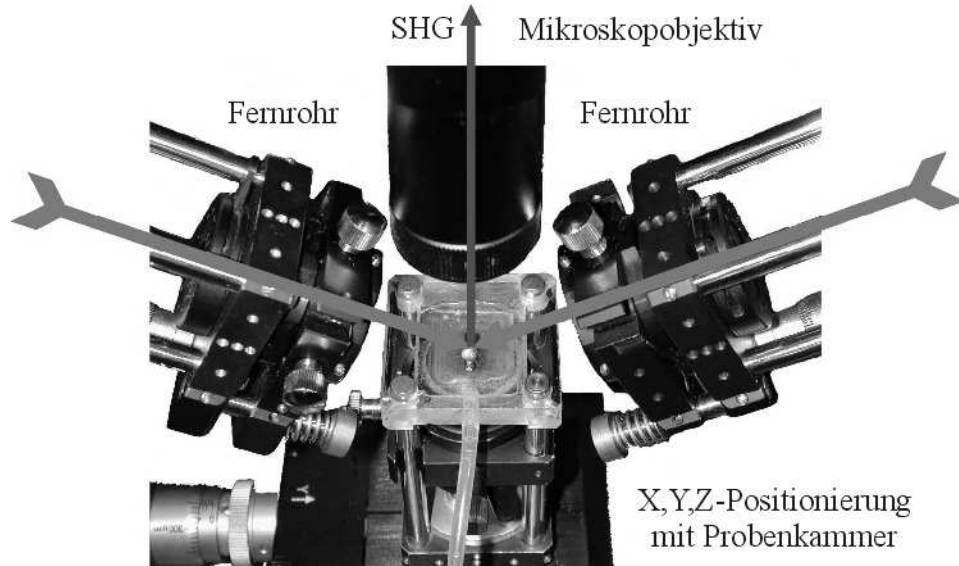


Abbildung 5.10: *Probenhalter und Beleuchtung des SH-Mikroskopes. Der Glanzswinkel beträgt $\Omega = 27^\circ$ bei einer mittleren Leistung von 9 mW pro Strahlarm.*

Das Küvettenvolumen beträgt für kleine Küvetten etwa $250 \mu\text{l}$ und für große etwa 1 ml . Zur Vermeidung von Füllhöheschwankungen ist die Küvette mit einem Deckglas abgedeckt. Der parallel detektierte Referenzzweig ist wie im einstrahligen Experiment ausgelegt.

Kapitel 6

Charakterisierung der Laserpulse

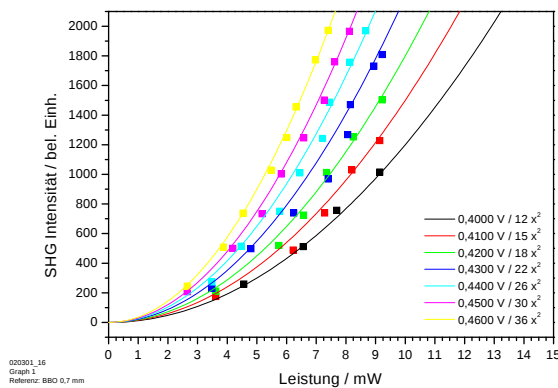


Abbildung 6.1:

Kalibrierungskurven des Referenzzweiges bei 1 V / 10 Hz Lock-In Eingangsempfindlichkeit. Den Photomultiplier-Spannungen von 0,4000 V bis 0,4600 V wurden jeweils quadratische Funktionen angepasst.

Bei späteren SH-Signalintensitätsmessungen werden sowohl vom Photomultiplier, als auch von der CCD-Kamera nur Spannungen proportional zur einfallenden Intensität an den aufzeichnenden PC ausgegeben. In Kenntnis der eingesetzten Leistung ist es möglich mittels zuvor aufgenommenen Kalibrierungen eine Aussage über die detektierte Signalintensität zu treffen. Die SH-Signale aus den Proben werden von einer 12 bit-

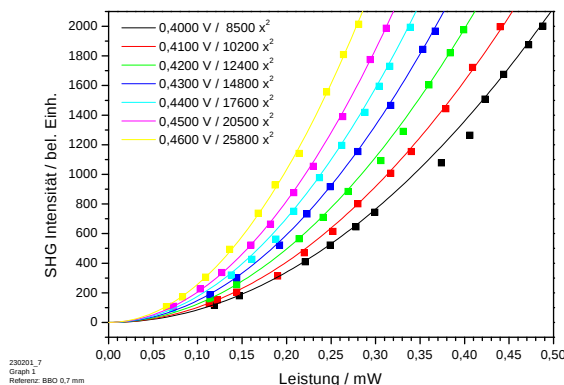


Abbildung 6.2:

Kalibrierungskurven des Messzweiges bei 3 mV / 3 Hz Lock-In Eingangsempfindlichkeit. Den Photomultiplier-Spannungen von 0,4000 V bis 0,4600 V wurden jeweils quadratische Funktionen angepasst.

AD/DA-Umsetzerkarte und einem PC aufgezeichnet. Daher erfolgt eine Darstellung

mit zweimal 2048 Punkten für $\pm 5\text{ V}$ Eingangssignal in der Messkarte. Das SH-Signal wurde mit einem BBO-Frequenzverdopplerkristall kalibriert. Dafür wurde die resultierende SH-Signalintensität, die der Photomultiplier über den auslesenden Lock-In-Verstärker an den PC ausgibt, bei verschiedenen Photomultiplier-Verstärkungsspannungen (0,4000 V bis 0,4600 V) aufgezeichnet. Der Lock-In-Verstärker wurde im Referenzzweig mit einer Eingangsempfindlichkeit von 1 V betrieben (siehe Abbildung 6.1). Zur Kalibrierung des Messzweiges (siehe Abbildung 5.5) wurde der BBO-Kristall

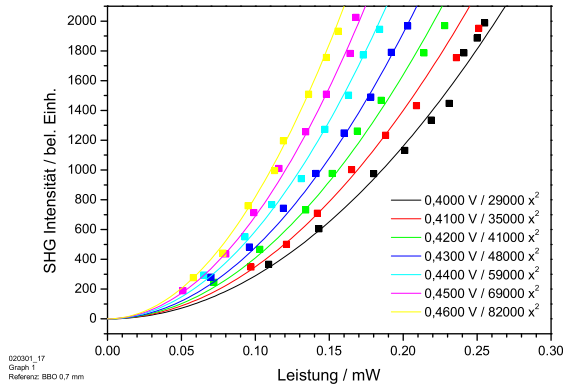


Abbildung 6.3:

Kalibrierungskurven des Messzweiges bei 1 mV / 3 Hz Lock-In Eingangsempfindlichkeit.

Den Photomultiplier-Spannungen von 0,4000 V bis 0,4600 V wurden jeweils quadratische Funktionen angepasst.

anstelle der Probenkammer montiert und mit dem Lock-In-Verstärker bei einer Eingangsempfindlichkeit von 1 mV und 3 mV im selben Photomultiplier-Verstärkungsspannungsbereich gemessen (siehe Abbildung 6.2 und 6.3). Die mittlere Laserleistung wurde vor jeder Messung mit einem geeichten Leistungsmesser (LaserMate-Q, Coherent) überprüft. Die Messungen liefern den zu erwartenden quadratischen Zusammenhang

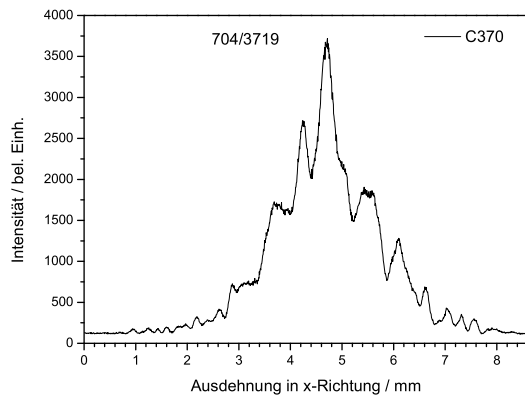


Abbildung 6.4:

Mikroskopie des Titan:Saphir-Oszillator-Strahls in horizontaler Richtung.

der eingebrachten Laserleistung mit der detektierten SH-Signalintensität. Aus dem quadratisch angepassten Verlauf lassen sich relative SH-Signalintensitäten bezogen auf die Konversion im BBO-Kristall in späteren Messungen bei verschiedenen Photomultiplierverstärkungsspannungen angeben.

Um die Leistungsdichte der Titan:Saphir-Oszillator-Pulse zu bestimmen, wurden SHM-Aufnahmen von Oszillator-Pulsen, die definiert mit Graufiltern abgeschwächt wurden,

gemacht. Dafür wurde der Messaufbau wie in Kapitel 5.3.3 verwendet. Aus Abbildung 6.4 und 6.5 erhält man für die Fleckgröße der Laser-Pulse in horizontaler Richtung $4,4\text{ mm}$ und in vertikaler Richtung $3,4\text{ mm}$. Diese Werte wurden aus der Pixelgröße des CCD-Kamera-Chips berechnet ($6,7\text{ }\mu\text{m}$ pro Pixel), da die Aufnahmen ohne jede zusätzliche abbildende Optiken aufgenommen wurden. Somit erhält man eine Oszillator-Pulsleistungsdichte von $4 \cdot 10^9\text{ W/m}^2$ bei einer Laserstrahlfläche von $12 \cdot 10^{-6}\text{ m}^2$.

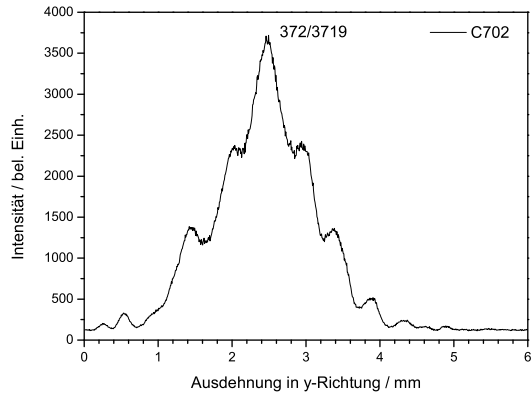


Abbildung 6.5:
Mikroskopie
des Titan:Saphir-Oszillator-Strahls
in vertikaler Richtung.

Kapitel 7

Einlagerung der Potentialsonden

7.1 Einlagerung in Cholesterinvesikel

Lagert man di-4-APEPPS-Farbstoffe in eine Membran aus oxidierten Cholesterin von außen ein, so erfolgt dies mit radialsymmetrischer Orientierung. Das zeigt die in Abbildung 7.1 dargestellte SHM-Aufnahme. Der Messaufbau ist in Kapitel 5.3.3 beschrieben. Die Membranoberfläche ist durch eine weiße Linie angedeutet. Durch Bestrahlung

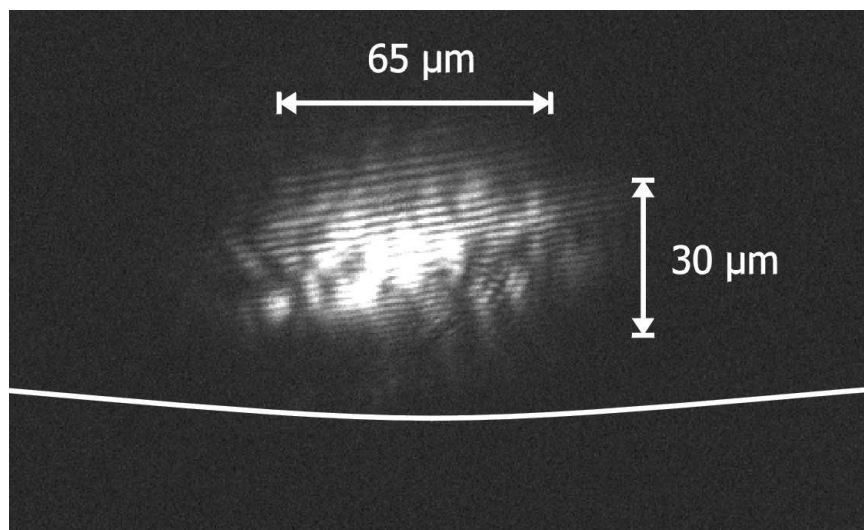


Abbildung 7.1: *SHM-Aufnahme einer Vesikel aus oxidierten Cholesterin mit eingelagerten di-4-APEPPS-Potentialsonden. Die Vesikeloberfläche ist durch eine weiße Linie angedeutet. Die Belichtungszeit betrug 1,5 s.*

der Membranoberfläche mit fokussierten Titan:Saphir-Oszillator-Pulsen vermitteln die eingelagerten Farbstoffmoleküle die Frequenzverdopplung. Die Vesikel wurde hier so bestrahlt, dass die SHG aus zwei Bereichen detektiert wurde. Diese Bereiche sind die Eintrittsstelle und die Austrittsstelle des Laserstrahls durch die Vesikel. Diese beiden SH-Signalbeiträge interferieren aufgrund der Vesikelgröße nicht miteinander. Die in Abbildung 7.1 sichtbaren Interferenzen ergeben sich aus Beiträgen von jeweils einer Membranseite, so dass die Abstände der Interferenzstreifen ein reziprokes Maß für die

Dicke der Vesikelmembran sind, die damit im nm-Bereich liegt. Ein Interferenzbild stellt die Fourier-Transformierte der räumlichen Verteilung der erzeugenden Komponenten dar. Nach dem Ähnlichkeitstheorem der Fourier-Transformation ist die Dicke der Membran umgekehrt proportional zum Abstand der Interferenzstreifen [148]. Das Shift-Theorem lässt die Farbstoffbewegung innerhalb der Membran zu, ohne dass die Intensitäten des Interferenzbildes beeinflusst werden, da sich eine Translation im Ortsraum nur in einer Phasenverschiebung im Frequenzraum bemerkbar macht. Die aus der Abbildung im Vergleich mit einer Mikroskopmikrometerskala ermittelte Fleckgröße beträgt horizontal $65\ \mu\text{m}$ und vertikal $30\ \mu\text{m}$, was man für den berechneten Fokus der Fundamentalen im Messzweig auch erwartet (siehe Kapitel 6). Die inhomogene Verteilung der SH-Signalintensität resultiert aus Inhomogenitäten der Membranstruktur und Unregelmäßigkeiten in der Verteilung der Potentialsonden innerhalb der Membran. Die Anzahl der Moleküle $N\Delta V$, die sich in einem mikroskopischen Volumenelement ΔV befinden, ist so groß, dass statistische Fluktuationen von Volumenelement zu Volumenelement vernachlässigbar sind. Dafür betrachtet man ein Volumenelement, dessen Dimension der halben Wellenlänge der einfallenden Strahlung entspricht. In der Membran mit ihrer zweidimensionalen Geometrie beträgt die Größe einer derartigen Einheitsfläche für die halbe Wellenlänge der Titan:Saphir-Laserstrahlung mit $400\ \text{nm}$ ca. $6,3 \cdot 10^{-7}\ \text{m}^2$. Für eine 1%-ige Beladung der Membran mit Farbstoffmolekülen, deren zylinderförmige Struktur einen Durchmesser von etwa $0,4\ \text{nm}$ hat, befinden sich in dieser Einheitsfläche im Mittel etwa 10^6 Moleküle. Dieses Ensemble vermittelt in der auftretenden Fundamentalen ein detektierbares SH-Signal.

Um sicher zu gehen, dass die detektierten Signale nur durch Frequenzverdopplung

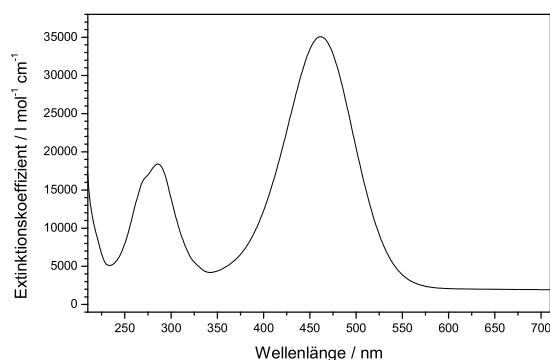


Abbildung 7.2:
Absorptionsspektrum von di-4-APEPPS gegen Wasser/Ethanol (1:1) [26].

entstanden sind, wurden testweise verschiedene Filter in den Detektionsarm gebracht und sowohl Polychromatorspektren als auch Photomultipliermessungen aufgenommen. Der Filtertest mit einem zweiten BG-39-Farbfiler vor dem Photomultiplier lieferte eine SH-Signalintensitätsabnahme von 20%, während der Interferenzfilter eine Intensitätsabnahme von ca. 40% verursachte. Das zeigten auch Polychromatorspektren von Cholesterinvesikeln mit eingelagerten di-4-APEPPS-Potentialsonden. Die beobachteten Intensitätsabnahmen können eindeutig mit der verminderten Transmission der Farb- und Interferenzfilter erklärt werden.

Das Emissionsspektrum der di-4-APEPPS-Potentialsonden, die in eine Cholesterin-

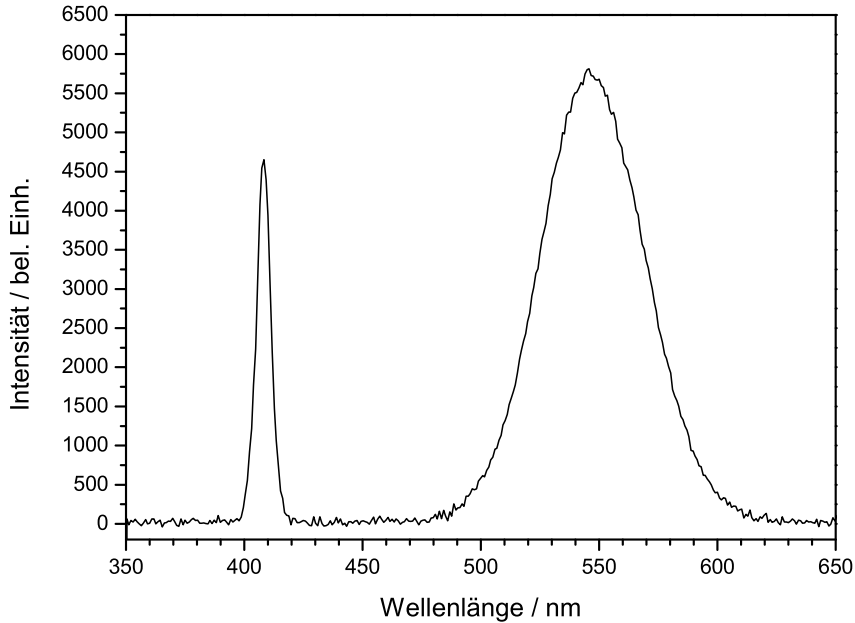


Abbildung 7.3: *Emissionsspektrum der in die Cholesterinvesikel eingelagerten di-4-APEPPS-Potentialsonden, das durch Anregung mit Titan:Saphir-Oszillator-Pulsen bei 822 nm erhalten wurde.*

vesikel eingelagert wurden, das mit Titan:Saphir-Oszillor-Pulsen bei $\lambda = 822\text{nm}$ angeregt wurde, ist in Abbildung 7.3 dargestellt. Der schmale Peak bei 411 nm wird dem frequenzverdoppelten Signal zugeordnet, während die breite Bande mit dem Maximum bei 547 nm sich aus einer Zwei-Photonen-Absorption mit Fluoreszenzrelaxation (TPEF) ergibt. Die Absorptionsbande des $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergangs hat ihr Maximum bei 460 nm (siehe Abbildung 7.2). Diesem Spektrum zufolge kann das SH-Signal spektral getrennt von dem Fluoreszenzspektrum aufgenommen werden. Damit ist eine effiziente Trennung beider Emissionen mit Interferenzfiltern möglich.

Für ein Gauß-förmiges Strahlprofil und einer spektralen Halbwertsbreite (FWHM) von 20 nm der Fundamentalen erhält man eine spektrale Halbwertsbreite (FWHM) des SH-Signals von $4,4\text{ nm}$. Die Halbwertsbreite des SH-Signals skaliert mit der Wurzel der Halbwertsbreite der Fundamentalen [50]. Das Emissionsspektrum zeigt eine Halbwertsbreite des SH-Signals von 8 nm . Diese größere Halbwertsbreite ist auf die nicht-Gaußförmigen Pulse des Titan:Saphir-Lasers zurückzuführen. Der Vergleich zwischen SH-Signal und TPEF zeigt den ausgezeichneten Einlagerungsmechanismus der potentialsensitiven di-4-APEPPS-Farbstoffmoleküle, der Voraussetzung für eine sensible und artefaktearme Potentialsensitivität ist. Die Spektren wurden mit einem Polychromator aufgenommen, der ein Gitter mit 400 Strichen/mm und eine CCD-Kamera (InstaSpec IV, Oriel) enthält (siehe Dissertation Bock [88]).

7.2 Einlagerung in Neuronen

Auch an Blutegel-Neuronen wurde der Filterttest sowohl für die Detektion mit einem Photomultiplier als auch mit Polychromatorspektren durchgeführt, wobei sich übereinstimmende Informationen ergaben.

Das Emissionsspektrum der di-4-APEPPS-Potentialsonden, die in Blutegel-Neuronen

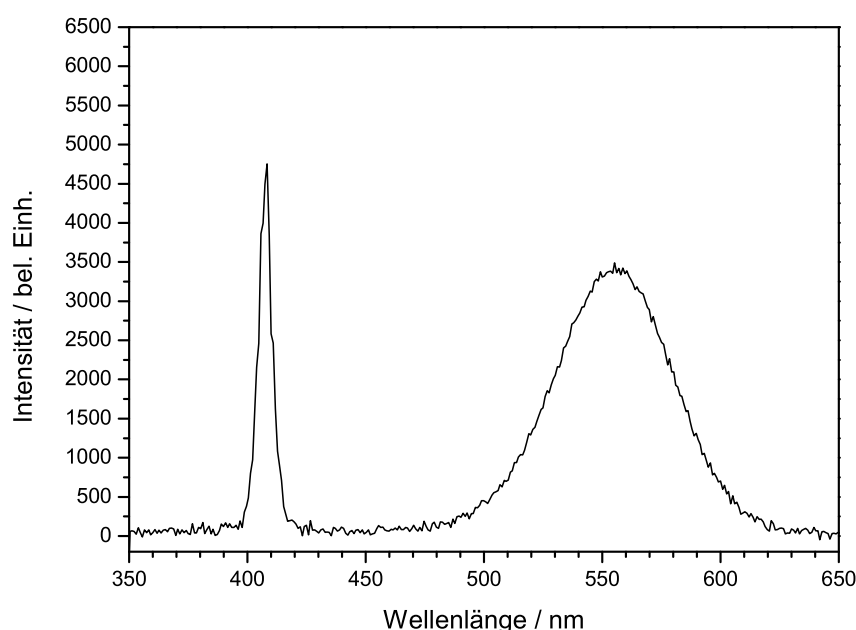


Abbildung 7.4: *Emissionsspektrum der in die Blutegel-Neuronenmembran eingelagerten di-4-APEPPS-Potentialsonden, das durch Anregung mit Titan:Saphir-Oszillator-Pulsen bei 822 nm erhalten wurde.*

eingelagert wurden, und mit Titan:Saphir-Oszillor-Pulsen bei $\lambda = 822\text{ nm}$ angeregt wurden ist in Abbildung 7.4 dargestellt. Hier erhält man dieselben spektralen Eigenschaften der Potentialsonden wie durch Einlagerung in eine Cholesterinvesikel (siehe Abbildung 7.3). Das Verhältnis der Intensitäten von SHG und TPEF ist in diesem Fall geringfügig günstiger für die SHG. Die Quantenausbeute der Fluoreszenz nimmt ab. Auch die Emissionsbande der TPEF ist hier um 8 nm rotverschoben (bei $\lambda = 555\text{ nm}$). Um den Fluoreszenzmechanismus zu klären, betrachtet man die exakte Einlagerung in die Membran und die an dieser Stelle existierenden elektrischen Felder (siehe Kapitel 2.3 und Abbildung 8.2). Fluoresziert das Farbstoffmolekül, so erfolgt ein Ladungstransfer aus der Pyridingruppe in die Anilingruppe (siehe Kapitel 4.2). Dieser Ladungstransfer wird durch das dort herrschende Dipolfeld der Membran unterstützt, was zu einer Rotverschiebung der Emissionsbande führt. Biomembranen beinhalten eine Vielzahl funktioneller Moleküle, deren Ladungen das Oberflächen- und Dipolpotential gegenüber einer reinen Modellmembran verändern. Im Gegensatz zur Cholesterinvesikel besitzt das Neuron ein Ruhemembranpotential. Das größere Dipolfeld

der Neuronenmembran führt zu einer stärkeren Rotverschiebung des Fluoreszenzspektrums im Vergleich zur Einlagerung in die Cholesterinmembran. Die Abnahme der Fluoreszenzquantenausbeute kann mit einer Umorientierung der Farbstoffmoleküle innerhalb der fluideren Neuronmembran im Vergleich zur rigiden Cholesterinmembran erklärt werden. Zusätzlich wird in der Neuronmembran die strahlungslose Deaktivierung in polarerer Regionen über TICT-Zustände¹ begünstigt [115]. Diese Effekte wurden von Fromherz systematisch für unterschiedlich polare Lösungsmittel und verschiedene Membrantypen untersucht [111]. In jedem Fall kann hier gezeigt werden, dass di-4-APEPPS sowohl für Cholesterinvesikel als auch für Neuronmembranen eine hervorragend geeignete Membranpotentialsonde darstellt.

¹Hierbei verdrehen sich der Anilin- und der Pyridinring um 90° gegeneinander, was zu einer Aufhebung der Konjugation führt.

Kapitel 8

Potentialabhängige Messungen an Membranen

8.1 Messungen an Cholesterinvesikeln

8.1.1 Elektrische Eigenschaften der Cholesterinvesikel

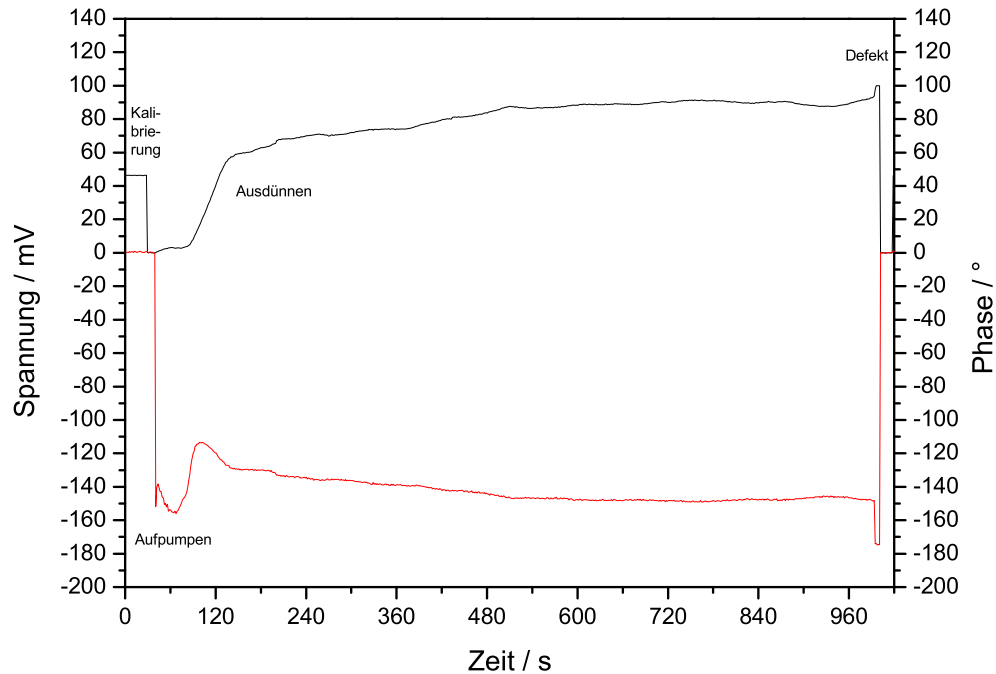


Abbildung 8.1: Elektrische Eigenschaften der Cholesterinvesikel während der Einlagerung von di-4-APEPPS mit anschließender Ausdünnphase. Die obere Kurve zeigt die gemessene Spannung und die untere Kurve die gemessene Phase.

Direkt nach der Erzeugung der Cholesterinvesikel liegt noch keine Doppelschichtmembran vor. Die Vesikel ist zu Beginn komplexen Dynamiken unterworfen, bevor sie eine stabile Matrix für die Einlagerung von Farbstoffmolekülen darstellt. Die elektrischen Eigenschaften der Vesikel hängen von der Dicke und Stabilität der Membran ab. Eine Messung des Ausdünnverhaltens über die Zeit ist in Abbildung 8.1 dargestellt. Die Messungen erfolgten durch Anlegen einer Wechselspannung von 130 mV_{SS} und $3,23\text{ kHz}$ mittels Signalgenerator. Sowohl die Spannungsamplitude als auch die Phase des Messsignals wurden mittels eines selbst erstellten Vorverstärkers über einen Lock-In-Verstärker aufgezeichnet, um Aussagen über den Membranwiderstand und die Membrankapazität tätigen zu können. Zu Beginn der Messung erfolgte eine Kalibrierung der Messapparatur gegen einen Widerstand von $R_{Mess} = 1,64\text{ k}\Omega$. Man erkennt nach erfolgter Kalibrierung das Eintauchen der Spritze in die Farbstoff-Leitsalzlösung als deutlichen Phasensprung. Anschließend wurde die Vesikel gegen die Lösung aufgepumpt, was zunächst einen Anstieg der Phase zur Folge hat. Ab einem Radius von etwa $2,5\text{ mm}$ wurde die Vesikel sich selbst überlassen, und es folgte die Ausdünnphase zur Cholesterin-Doppelschicht. Dies ist an einer Abnahme der Phase und einem Anstieg der Spannungsamplitude zu sehen. Nach etwa 1000 s ist die Vesikel defekt, so dass Phase und Amplitude den Kurzschlussfall wiedergeben. Nach etwa 120 s befindet sich die Vesikel in einem stabilen Zustand. In dieser Phase bietet die Vesikel den eingelagerten Farbstoffmolekülen eine stabile Matrix, die Voraussetzung für die SHG-Messungen ist.

8.1.2 SHG an Cholesterinvesikeln

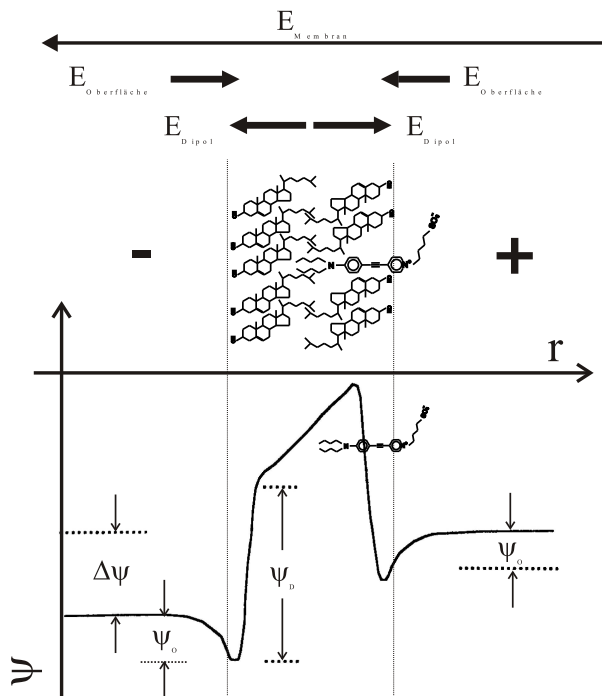


Abbildung 8.2:
Mikroskopischer Potentialverlauf über eine Membran aus oxidierten Cholesterin mit eingelagerten di-4-APEPPS-Potentialsonden

Die amphiphilen Potentialsonden in der Küvette lagern sich radialsymmetrisch, stabil orientiert in die äußere Schicht der Cholesterinmembran ein (siehe Abbildung 4.4). Man

erhält eine Grenzfläche mit einer nichtzentrosymmetrischen Struktur, wie sie für die Frequenzverdopplung notwendig ist. Die Wechselwirkung des di-4-APEPPS mit dem elektromagnetischen Feld des Titan:Saphir-Lasers induziert einen effektiven intramolekularen Ladungstransfer, der eine große Hyperpolarisierbarkeit zur Folge hat. Konsequenterweise besitzt die Frequenzverdopplung somit hohe Effizienz. Die inhärente Sensitivität der Farbstoffmoleküle gegenüber Membranpotentialänderungen resultiert aus der induzierten Änderung der Hyperpolarisierbarkeit, die die SH-Signalintensität entsprechend moduliert. Die stabförmige molekulare Struktur der Potentialsonden

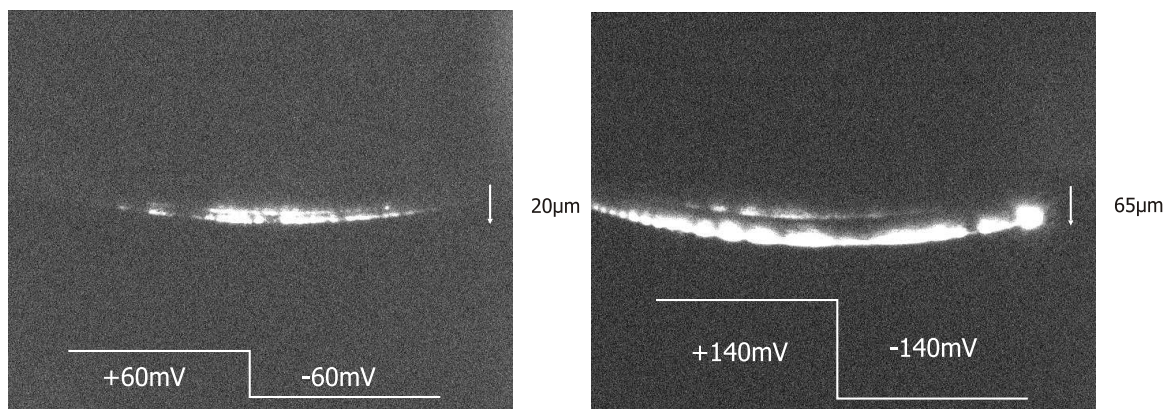


Abbildung 8.3: TPEF-Aufnahme einer Cholesterinvesikel mit eingelagertem di-4-APEPPS. Die Fluoreszenzbilder wurden für ein positives und negatives Membranpotential und anschließend einander überlagert dargestellt. Der Radiuszuwachs der Vesikel korreliert mit der angelegten Membranspannung. Die Aufnahmen erfolgten senkrecht zum anregenden Titan:Saphir-Laserstrahl.

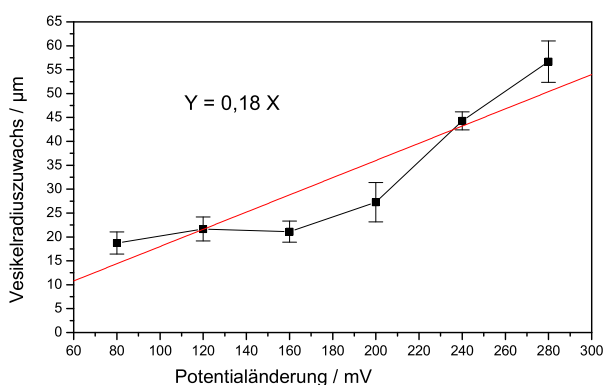


Abbildung 8.4:

Videomikroskopisch ermittelter Vesikelradiuszuwachs für Potentialänderungen von ± 40 mV bis ± 140 mV. Die Anpassungsgerade wurde durch den Ursprung gelegt. Eine quadratische Anpassung würde auch ohne Potentialänderung einen Radiuszuwachs liefern. Daher scheinen die geringen Radiusvergrößerungen einen systematischen Fehler zu enthalten.

ermöglicht eine nahezu ungestörte Einlagerung in die Membran. Diese erfolgt mit der molekularen Hauptachse parallel zur Membrannormalen. Dafür tauchen sie mit dem chromophoren System beinahe vollständig in die äußere Cholesterinschicht ein. In dieser Einbaulage sind sie besonders sensitiv gegenüber den Dipolpotentialbeiträgen der Membran (siehe Kapitel 2.3). Die Dipolpotentialbeiträge hängen konstant von der

Cholesterindoppelschicht ab, so dass der Dipolpotentialverlauf proportional durch ein Membranpotential beeinflusst wird (siehe Abbildung 8.2). Daher antworten die Potentialsonden auf Änderungen des Transmembranpotentials.

Um ein Membranpotential über die Cholesterindoppelschicht zu erzeugen, wird über die Elektroden und somit über die Leitsalzlösung eine Spannung angelegt (siehe Abbildung 5.6). Das Anlegen einer bipolaren Rechteckspannung von ± 60 mV über die

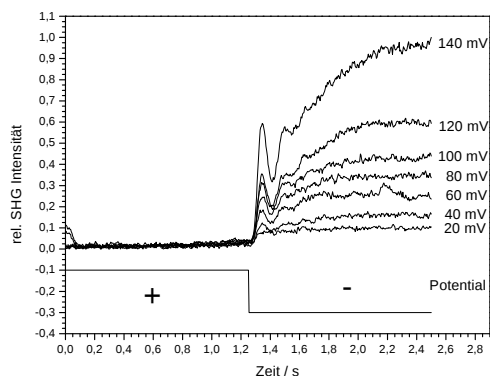


Abbildung 8.5:
SH-Signal bei Membranpotentialen von ± 20 mV bis ± 140 mV. Die angelegte Rechteckspannung gegenüber dem Vesikelinneren ist im unteren Teil des Bildes zu erkennen [26].

Vesikelmembran bewirkt einen Anstieg des SH- und des TPEF-Signals. Videosequenzen der Fluoreszenz zeigten eine Radiusvergrößerung der Vesikel von $20\text{ }\mu\text{m}$. Diese Radiusvergrößerung wurde durch Vergleichsbilder mit einer Mikroskopmikrometerskala ermittelt und beinhaltet einen abgeschätzten Fehler von $\pm 2\text{ }\mu\text{m}$. Die Reaktion der Membran auf die Umpolung des Membranpotentials erfolgt schneller als 1 s . Da die Belichtungsdauer pro Bild 1 s betrug, war eine zeitliche Auflösung nicht möglich. Eine Rechteckspannung von $\pm 140\text{ mV}$ bewirkt sogar einen Radiuszuwachs von $65\text{ }\mu\text{m}$ (siehe Abbildung 8.3 und 8.4). Das entspricht einem Volumenzuwachs von maximal 8%. Ändert sich das Vorzeichen der über die Vesikelmembran angelegten Spannung von Plus nach Minus bezüglich des Vesikelinneren, so vergrößert sich der Radius der Vesikel und die Membran taucht tiefer in den Laserstrahl ein. Somit ist die beleuchtete Fläche größer, und das SH- und TPEF-Signal steigen an. Die Potentialsonden sind sicher für die Vesikelbewegung verantwortlich, da mikroskopische Beobachtungen von ungefärbten Vesikeln keine Bewegung im Bereich der Beobachtungsgenauigkeit von $\pm 2\text{ }\mu\text{m}$ beim Umschalten des Membranpotentials zeigten. Vermutlich handelt es sich hierbei um eine Elektrostriktion der Farbstoff-beladenen Membran. Elektrostriktion ist eine mechanische Deformation der Membran aufgrund einer Kontraktion des umgebenden Volumens, d.h. des Lösungsmittelvolumens um die Membran herum. Es findet eine potentialgesteuerte Solvatationsänderung der geladenen Gruppen der Farbstoff- oder Membranmoleküle statt [138, 139]. Die geladenen Endgruppen der reinen Cholesterinvesikel scheinen diese Solvatationsänderungen nur in sehr geringem Maß zu erfahren. Erst die Einlagerung der amphiphilen Potentialsonden mit ihren stärker polaren Kopfgruppen und dem ausgeprägten π -Elektronensystem ermöglichen die beobachteten Elektrostriktions-Effekte. Der elektrostriktive Druck p berechnet sich

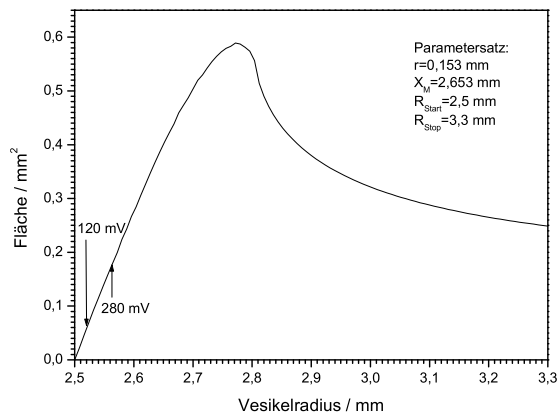


Abbildung 8.6:
Berechneter Flächenzuwachs bei Vesikelradiusvergrößerung gemäß Anhang A.

nach:

$$p = \frac{C_M E_M}{2 \Delta r} \quad (8.1)$$

mit C_M der spezifischen Membrankapazität pro Einheitsfläche, E_M dem Membranpotential und Δr der Vesikelradiusänderung [138]. So nachteilig dieser Effekt für die Messungen der Potentialsensitivität der Farbstoffmoleküle auch ist, so aussagekräftig ist er jedoch für die Einlagerung der Farbstoffe in die Membran. Denn nur eine stabile Einlagerung und Verankerung der Farbstoffe in die Membran kann eine derartig ausgeprägte Elektrostriktion bewirken. Die Vesikeloberflächenvergrößerung kann auch durch Detektion des SH-Signals beobachtet werden (siehe Abbildung 8.5). Um die elek-

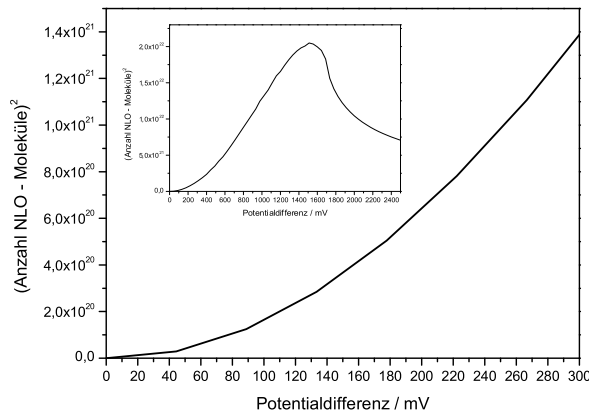


Abbildung 8.7:
Berechnete und quadrierte Anzahl der molekularen Potentialsonden im Laserfokus in Abhängigkeit von der Membranpotentialdifferenz über eine Cholesterinvesikel. Dafür wurde ein lateraler Molekülradius von $r = 0,4 \text{ nm}$ und eine 1%-ige Beladung der Membran angenommen.

trostriktiven Beiträge zum SH- und zum TPEF-Signal von den potentialinduzierten Änderungen der Hyperpolarisierbarkeit zu selektieren, wurde anhand der gemessenen Vesikelvergrößerung ein potentialabhängiger Flächenzuwachs unter Berücksichtigung des bekannten Vesikelradius und der Laserstrahltaile berechnet. Mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. Christoph Glowatz [1] war es möglich, eine Verallgemeinerung des Viviani-Fensters¹ zu betrachten und die Fläche, die abhängig von der Ein-

¹Vincenzo Viviani, Mathematiker, ★1622 in Florenz. Er berechnete die Schnittfläche eines Zylinders mit einer Kugel für $R_{Kugel} = 2r_{Zylinder}$, wobei der Zylinder die Kugel bei $1/2 R_{Kugel}$ schneidet.

tauchtiefe des Laserfokus in die Vesikelmembran ist, numerisch zu berechnen (siehe Anhang A). Für den Flächenzuwachs, der von der Eintauchtiefe des als zylinderförmig, mit homogenen Stufen-Strahlprofil angenommenen Laserstrahls abhängt, ergibt sich der in Abbildung 8.6 gezeigte Verlauf (der verwendete Parametersatz ist in der Abbildung aufgeführt). Hier wurde aufgrund der verwendeten langbrennweitigen Linse mit

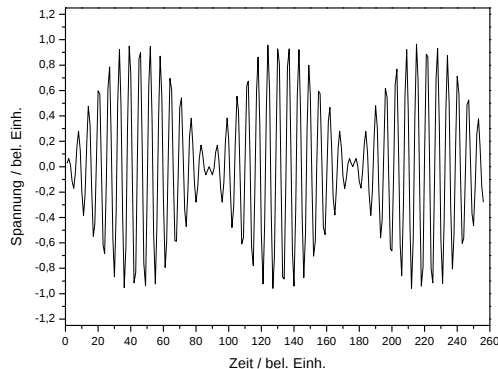


Abbildung 8.8:

Darstellung eines extern angelegten Membranpotentials über die Vesikel aus oxidierten Cholesterin. Die 3,23 kHz Sinusspannung wurde mit einer 4 Hz Sinusspannung moduliert.

$f = +180 \text{ mm}$ eine Laserstrahltaile von $153 \mu\text{m}$ und ein Vesikelradius von $2,5 \text{ mm}$ vorausgesetzt (siehe [26]). Untersucht man exemplarisch den Fall des Radiuszuwachs für eine Potentialänderung von 280 mV , so erfolgt aus der Berechnung ein Flächenzuwachs von $0,18 \text{ mm}^2$, da die Vesikel hier ihren Radius von $2,5 \text{ mm}$ auf $2,56 \text{ mm}$ vergrößert hat. Man befindet sich damit in Abbildung 8.6 am Anfang der aufsteigenden Flanke. Selbstverständlich ist eine weitere Radiuszunahme der Vesikel mit einer entsprechenden Flächenzunahme verbunden. Videoaufnahmen bestätigen jedoch die in Abbildung 8.4 gezeigten Radiuszunahmen als Maximalwerte. Daher sind die ersten 250 ms aus Abbildung 8.5 der Elektrostriktion zuzuschreiben.

Im Vergleich zu der linearen Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals von der Anzahl

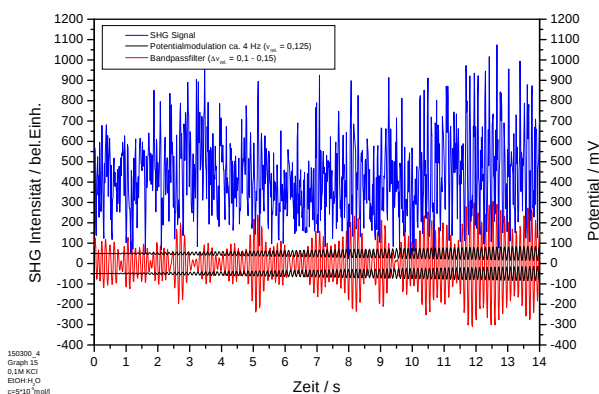


Abbildung 8.9:

Die obere Kurve zeigt die SH-Signalintensitätsänderung von di-4-APEPPS, die in eine Cholesterinvesikel eingelagert wurden, in Abhängigkeit vom angelegten Membranpotential. Die mittleren Kurven stellen das Bandpass-gefilterte SH-Signal und die Einhüllende der angelegten Spannung dar.

der signalgebenden Farbstoffmoleküle besitzt die SHG eine quadratische Abhängigkeit von der Anzahl der Farbstoffmoleküle (siehe Kapitel 4.3), die wiederum von der, auf der Membran ausgeleuchteten Fläche abhängt, also von der Größe der Vesikel. Die Quadrierung der potentialabhängigen Flächenzunahme ist direkt proportio-

nal zur resultierenden SH-Siganlintensität. Berücksichtigt man zusätzlich die aus Videoaufzeichnungen erhaltene potentialabhängige Vesikelradiuszunahme, die als linear abhängig von dem angelegten Membranpotential angesehen wird, so erhält man eine potentialabhängige SH-Signalintensität, die ausschließlich von der Vesikelvergrößerung abhängt und proportional zum Quadrat der Anzahl der Farbstoffmoleküle ist. Für eine 1%-ige Beladung der Membran mit Farbstoffmolekülen ist dieser Fall in Abbildung 8.7 dargestellt. Bis zu einer Potentialänderung von etwa 300 mV hängt die SH-Signalintensitätsänderung, im Rahmen der Messgenauigkeit² und der in der Betrachtung enthaltenen Fehler, linear von der Größe des Membranpotentials ab. Dieser qualitative Zusammenhang wurde bereits zuvor durch Auswertung des schnellen SH-Siganlanstiegs beobachtet [26]. Auf der Grundlage dieser Argumentation werden die schnellen Anstiege in Abbildung 8.5 durch Elektrostriktion der Membran erklärt, die durch die eingelagerten Farbstoffmoleküle bewirkt wird.

Die Auslenkung der Vesikeloberfläche in Abbildung 8.5 relaxiert in gedämpften Os-

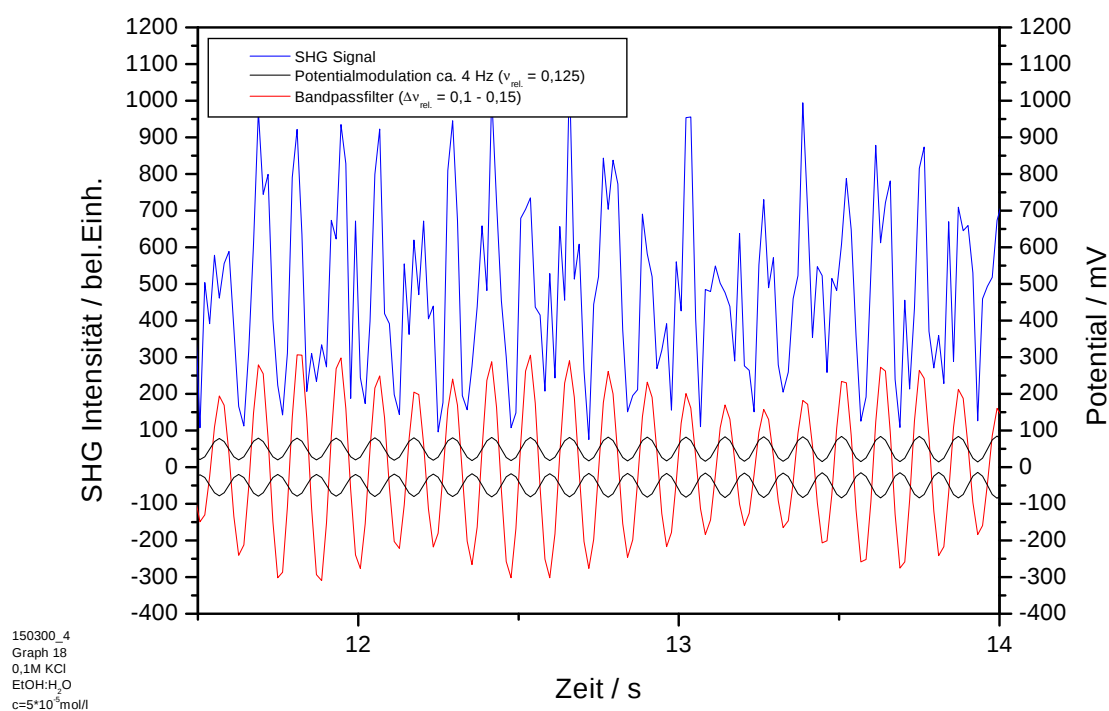


Abbildung 8.10: 2,5 s lange Ausschnittvergrößerung von Abbildung 8.9 [3]. Dargestellt sind wieder das SH-Signal, das gefilterte SH-Signal und die Einhüllende der angelegten Spannung.

zillationen mit einer Amplitude, die proportional zur angelegten Spannung verläuft. Die gedämpfte Oszillation hat eine Frequenz von 8 Hz (die erste Periode beginnt mit Anfangspeak in Abbildung 8.5). Auf einer Zeitskala von Sekunden erkennt man einen

²Vergleiche Abbildung 8.4.

weiteren SH-Signalanstieg. Der Elektrostriktion kann dies nicht zugeschrieben werden, da diese schneller als 1 s erfolgt, während der Maximalwert erst in Zeiten größer 1 s erreicht wird. Daher wird eine zusätzliche, potentialgetriebene Einlagerung der Potentialsonden in die äußere Vesikelmembran vermutet, die unabhängig von dem potentialinduzierten Radiuszuwachs ist. Weiterhin laufen thermisch induzierte Translations- und Rotationsbewegungen typischerweise auf dieser Zeitskala ab, so dass die Laserbestrahlung ebenfalls eine mögliche Ursache dafür sein könnte. Die SH-Signalintensität in den letzten 100 ms der Detektion hängt für jeden Wert des Membranpotentials quadratisch von der Amplitude der extern angelegten Spannung ab [26].

Um Elektrostriktion der Membran und potentialgetriebene Einlagerungen von Farbstoffmolekülen auf einer Sekunden bis Millisekunden Zeitskala zu vermeiden, wurde eine sinusförmige Spannung mit $3,23\text{ kHz}$ als Trägerfrequenz an die Vesikel angelegt. Diese Trägerfrequenz wurde mit einer 4 Hz Sinusspannung und $\pm 80\text{ mV}_{SS}$ moduliert (siehe Abbildung 8.8). Die Vesikel ist zu träge, um dieser hochfrequenten Wechselspannung der Trägerwelle durch elektrostriktive Einflüsse zu folgen. Das wurde mit Videosequenzen erwiesen. Die niederfrequente Modulationsspannung führt im Frequenzraum zu zwei schmalen Seitenbändern der Trägerfrequenz bei $3,23\text{ kHz} \pm 4\text{ Hz}$. Diese Seitenbänder der angelegten Spannung an die Vesikel werden mittels Lock-In-Verstärkern, die auf die Trägerfrequenz eingelockt waren, mit einer Zeitkonstanten von 4 ms gemessen. Eine typische SH-Antwort auf ein hochfrequentes, sinusförmiges elektrisches Feld

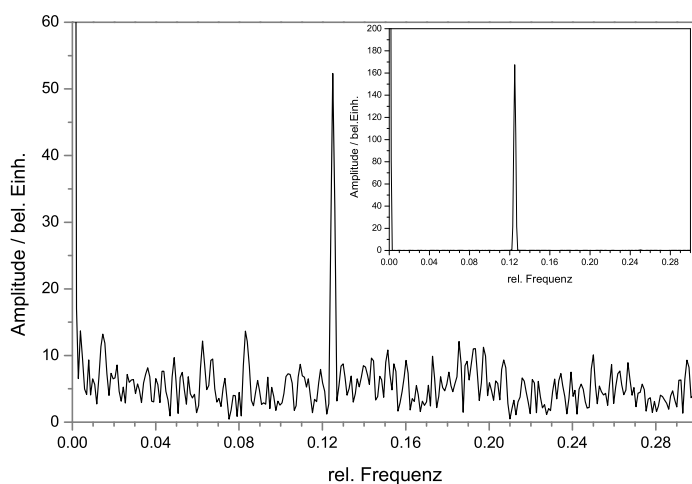


Abbildung 8.11:
FFT des
ungefilterten SH-Sig-
nals aus Abbildung
8.9 [3]. Das Inlet zeigt
die FFT der Modula-
tionsspannung.

über die Membran der Vesikel, das durch ein niederfrequentes Feld moduliert wird, ist in Abbildung 8.9 dargestellt. Die obere Kurve zeigt die SH-Signalintensitätsänderung der di-4-APEPPS-Farbstoffmoleküle, die in eine Vesikel aus oxidierten Cholesterin eingelagert wurden, in Abhängigkeit vom angelegten Membranpotential. Die mittleren Kurven zeigen die Einhüllende der angelegten Spannung von 4 Hz und $\pm 80\text{ mV}_{SS}$ mit einer überlagerten Spannungsrampe von 0 mV bis $\pm 100\text{ mV}$. Die hochfrequente Trägerfrequenz von $3,23\text{ kHz}$ und $\pm 120\text{ mV}$ wurde von der Software der AD/DA-Umsetzerkarte und dem PC nicht mehr erfasst und ist daher nicht sichtbar. Die untere Kurve zeigt das Bandpass-gefilterte SH-Messsignal. Offensichtlich folgt das SH-Signal

der Modulationsfrequenz von 4 Hz . Hier wurde das gefilterte Signal aus Gründen der Übersichtlichkeit nach unten verschoben. Eine Ausschnittvergrößerung über $2,5\text{ s}$ von Abbildung 8.9 ist in Abbildung 8.10 zu sehen. Eine Fast-Fourier-Transformation (FFT) zur Frequenzanalyse des ungefilterten SH-Signals liefert einen deutlichen Frequenzanteil des SH-Signals für eine relative Frequenz von $0,125$ (siehe Abbildung 8.11). Vergleicht man diese Frequenz mit der FFT der niederfrequenten Modulationsspannung, so stimmen diese perfekt überein (siehe Inlet in Abbildung 8.11). Die instantane Antwort des SH-Signals auf Membranpotentialänderungen ist von elektrochromer Natur. Die Zeitskala der SH-Antwort ist schneller als die Zeitauflösung des Experimentes, die bei 5 ms aufgrund der Software der AD/DA-Umsetzerkarte mittels PC, liegt. Auf dieser Zeitskala hängt das SH-Signal linear vom Membranpotential ab.

8.2 Messungen an Neuronen

8.2.1 Mikroelektroden-Messungen

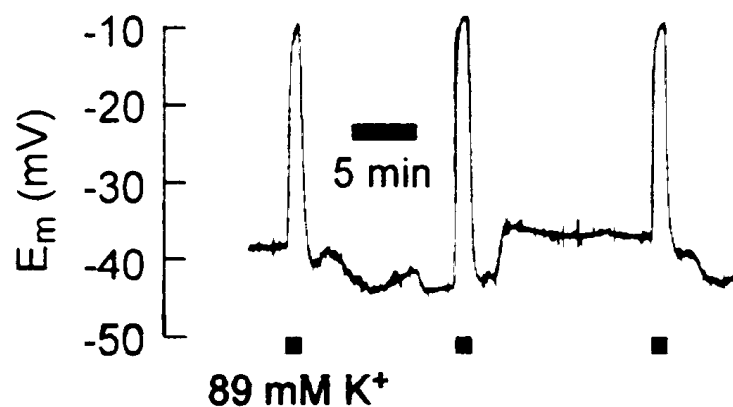


Abbildung 8.12: Membranpotentialverlauf eines *Retzius*-Neurons bei repetitiver einminütiger Depolarisation mit 89 mM K^+ -Lösung [2].

Da der medizinische Blutegel ein wohl untersuchtes System darstellt, kann man auf eine Vielzahl von Messungen zu Referenzzwecken zurückgreifen. Messungen des Membranpotentials von Neuronen dieser Tiere wurden überwiegend mittels Mikroelektroden durchgeführt. Das Membranruhepotential ist eine geeignete Größe, um Aussagen über eine Schädigung der Zelle und deren Vitalität zu treffen. Der Einstich einer Mikroelektrode führt jedoch schon zu messbaren Membranpotentialänderungen. Die Untersuchten Neuronen der Segmentalganglien wurden in den Laboratorien von Herrn Prof. Dr. W.-R. Schlue des Institutes für Neurobiologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf von Frau Dipl.-Biol. Petra Schulte aus Blutegeln herauspräpariert und in einer Nährlösung, einer sogenannten Ringerlösung³, gehalten. In dieser Lösung sind die

³Ringerlösung wird mit $pH = 7,4$ zur Simulation von physiologischen Umgebungsbedingungen eingesetzt. Sie enthält 85 mM NaCl , 4 mM KCl , 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 und 10 mM HEPES als Pufferlösung. Der pH-Wert wird mit 5 mM NaOH eingestellt.

Neuronen des Segmentalganglions etwa 10 *Stunden* ohne messbare Membranpotentialänderung überlebensfähig [2]. Zur Änderung des Ruhemembranpotentials der Neuronen, wurde eine einminütige Applikation von $89\text{ mM } K^+$ -Lösung⁴ durchgeführt, die eine Depolarisation eines Retzius-Neurons von -38 mV zu -10 mV (also um 28 mV) bewirkt (Abbildung 8.12). Nach Beendigung der Applikation findet eine Repolarisation, gefolgt von einer kurzen Hyperpolarisation, statt. Nach einer Minute stellt sich das Ruhepotential wieder ein. Die Polarisationszeiten und der Wert des Ruhepotentials werden von der einzelnen Zelle und deren Vitalität bestimmt⁵.

In Abbildung 8.13 ist die Depolarisation verschiedener Neuronen des Segmental-

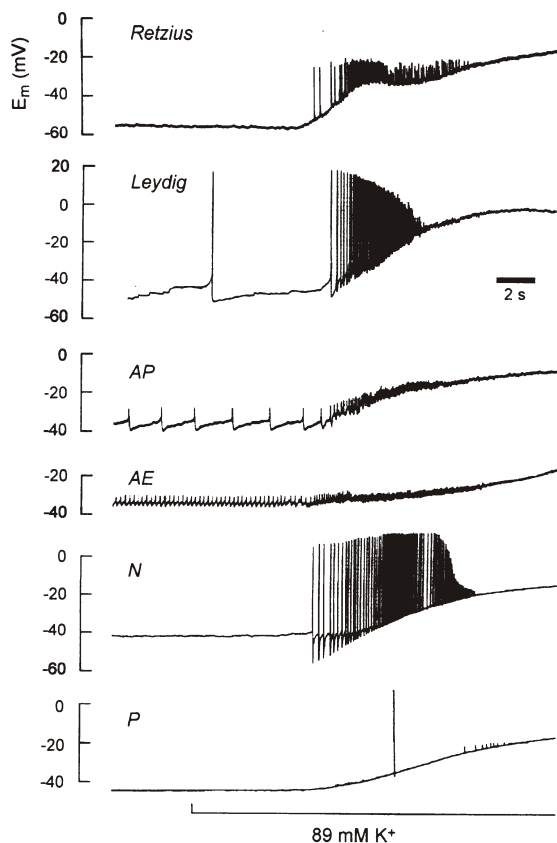


Abbildung 8.13:
Depolarisation verschiedener Neuronen im Segmentalganglion mittels einer $89\text{ mM } K^+$ -Applikation. Die Depolarisation ist häufig mit einer transienten Erhöhung der Aktionspotentialfrequenz verbunden [2].

ganglions auf einer kürzeren Zeitskala dargestellt. Es zeigt die Depolarisation eines Retzius-Neurons zu -20 mV , die von einem Ruhepotential mit -55 mV gestartet ist. Bei Zugabe von $89\text{ mM } K^+$ -Lösung tritt die Depolarisation des Retzius-Neurons erst 6 s nach Beginn der Applikation auf. Diese Depolarisation ist begleitet von zahlreichen Aktionspotentialen. Der schnelle Anstieg der Depolarisation erfolgt innerhalb von 3 s , während die gesamte Depolarisationsphase länger als 14 s dauert. Andere Neuronen des Segmentalganglions zeigen unterschiedlich starke Reaktionen mit unterschiedlichen Anstiegszeiten des Membranpotentials. Die K^+ -Lösungen sind isotonische Lösungen, und damit nicht osmotisch wirksam. Dennoch beeinflussen sie das Zellvolumen auf-

⁴Zur Herstellung der $89\text{ mM } K^+$ -Lösung wurde das NaCl in der Ringerlösung durch KCl ersetzt und der pH-Wert von 7,4 mit 5 mM KOH eingestellt, so dass effektiv eine $94\text{ mM } K^+$ -Lösung vorliegt.

⁵Daten zum Ruhepotential verschiedener Neuronen des Segmentalganglions findet man in [2].

grund induzierter Effekte, die einen Ein- oder Ausstrom von Wasser über die Zellmembran erzwingen⁶. So nimmt eine erhöhte extrazelluläre K^+ -Konzentration Einfluss auf die Ionentransportsysteme der Zellmembran. Die Zellen besitzen einen Regulationsmechanismus, um auf Änderungen ihres Zellvolumens, die durch ein Wasserein- oder -ausstrom induziert werden, zu reagieren. Als Sensoren der Volumenänderung einer Zelle dienen beispielsweise mechanosensitive Ionenkanäle, die mit dem Zytoskelett der Zelle verbunden sind. Erfolgt eine Volumenänderung zu schnell für die F-Actinfilamente des Zytoskelettes, so polymerisieren diese asynchron mit dem Volumenzuwachs, und es kann nach dem Schrumpfen zu einer vergrößerten Zelle im Ruhezustand kommen. Eine $30\text{ mM } K^+$ -Zugabe hat eine Zunahme des Zellvolumens um 40% innerhalb von 5 min ergeben. Für eine kugelförmige Zelle ergibt sich damit ein Radiuszuwachs von ca. 12%. Bemerkenswert ist, dass die Zelle erst eine Minute nach K^+ -Zugabe anfängt zu schwellen (siehe Abbildung 8.14). Das Membranpotential des Retzius-Neurons depolarisierte um ca. 15 mV . Als regulatorischer Mechanismus wurde hier ein zusätzlicher Na^+ - und Cl^- -Strom über die Zellmembran angenommen, der einer Volumenveränderung entgegenwirken kann. Der Ionenstrom erfolgt durch dehnungsaktivierte Ionenkanäle, die durch die Volumenänderung aktiviert werden [13]. Andere Arbeiten diskutieren einen Ca^{2+} -Strom über die Zellmembran als regulatorischen Mechanismus [2].

Eine Zellvolumenänderung der Retzius-Neuronen die durch die Zugabe einer hypo-

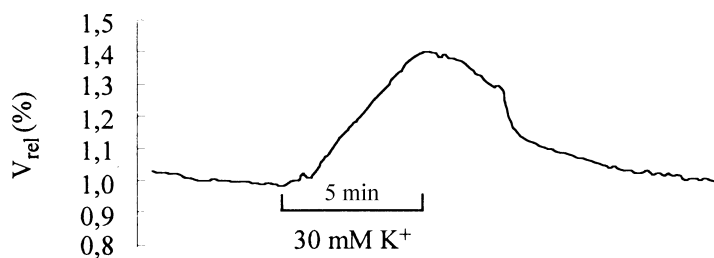


Abbildung 8.14:
Wirkung einer 30 mM extrazellulären K^+ -Konzentration auf das Zellvolumen eines Retzius-Neurons [13].

tonischen extrazellulären Lösung⁷ induziert wird, erreicht innerhalb von 6 min einen Wert von 70%. Die Schwellung blieb während der Applikationszeit konstant, so dass die Zelle eine Volumenregulation ausgeschlossen werden kann [140]. Derartige Volumenänderungen der Neuronen könnten ähnlich wie die Cholesterinvesikel die SH-Messergebnisse beeinflussen.

Eine mit freundlicher Unterstützung von Frau Dipl.-Biol. Petra Schulte durchgeführte Mikroelektroden-Messung an einem Retzius-Neuron, das 1, 25 h in einer di-4-APEPPS-Farbstoff-Ringerlösung⁸ gebadet wurde und nach einer Ruhephase in reiner Ringerlösung mit SH-Spektroskopie vermessen und mehrfach mit $89\text{ mM } K^+$ -Lösung depolarisiert wurde, ist in Abbildung 8.15 dargestellt. Nach dem Einstechen der Mikroelektrode misst man ein Ruhepotential von -40 mV . Die Applikation von $89\text{ mM } K^+$ -Lösung erzeugt eine Depolarisation auf -15 mV (also um 25 mV) mit einer Zeitkonstanten von 12 s . Die Dauer der Depolarisation beträgt damit ca. 60 s (Inlet in Abbildung 8.15),

⁶siehe Kapitel 2.2 für die Permeabilitäten über die Membran

⁷ $42,5\text{ mM NaCl}$ -Konzentration in der Ringerlösung

⁸ $c_{\text{Farbstoff}} = 10^{-4}\text{ mol/l}$ aus einer $c_{\text{Farbstoff}} = 10^{-3}\text{ mol/l}$ Wasser-Ethanol-Stammlösung (jeweils zu 50%) mit Ringerlösung herunterverdünnt

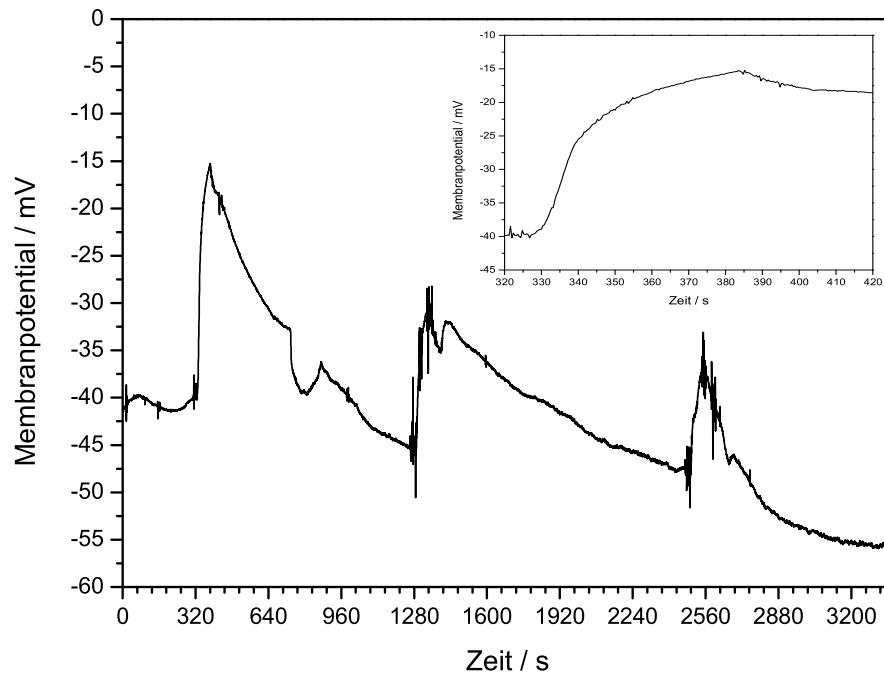


Abbildung 8.15: Mikroelektroden-Messung des Membranpotentials eines Retzius-Neurons. Das Neuron wurde zuvor einer SH-Messreihe unterzogen. Die SH-Messergebnisse sind in Abbildung 8.20 dargestellt. Das Inlet zeigt vergrößert die erste Depolarisationsphase.

während die anschließende Repolarisationsphase in Ringerlösung ca. 27 min andauert. Eine erneute Depolarisation mit 89 mM K^+ -Lösung bewirkt jetzt nur noch einen Anstieg um 16 mV⁹ und eine weitere Depolarisation um nur 11 mV. Ebenso verlängern sich die Anstiegszeiten von 60 s zu 70 s und in der letzten Depolarisationsphase sogar zu 84 s. Damit nehmen die Zeitkonstanten der Depolarisation offensichtlich zu. Das bedeutet eine zunehmende Schädigung des Neurons aufgrund der mehrfachen Depolarisation mit der 89 mM K^+ -Lösung. Ebenfalls auffällig sind die Membranpotentialabfälle kurz nach dem K^+ -Applikationsende, also am Anfang der Repolarisationsphase, die durch die Ringerlösung eingeleitet wird. Diese kurzen (bis zu 1 Minute dauernden) Abfälle um 2–6 mV sind nicht eindeutig zu erklären. Der Abfall in der ersten Repolarisationsphase wird mit einer Luftblase in der Strömung erklärt, die einen Massefehler verursacht haben könnte. Die Zellen bleiben nachweislich vital. Die SHG-Messreihe, die diesen Mikroelektroden-Messungen vorausgegangen ist, hatte aufgrund mehrfacher Depolarisation der Neuronen mit K^+ -Lösung die Vitalität der Zellen nachweisbar beeinträchtigt. Ein schädigender Einfluss der intensiven Laserstrahlung ist nicht nachweisbar. Das zeigt den Vorteil der SHG-Methode als minimal invasive Technik im Vergleich zur Mikroelektroden-Technik. Um die Reaktion der Neuronen auf die

⁹das System unterliegt einer Drift, die verrechnet werden muß

ethanolische Farbstofflösung zu testen, wurde eine weitere Mikroelektroden-Messung durchgeführt (siehe Abbildung 8.16). Etwa 11 *min* nach dem Anstechen des Retzius-Neurons wurde der di-4-APEPPS-Farbstoff in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-5} M$ zugegeben, was die starken Spannungsschwankungen in Abbildung 8.16 zeigen. Nach etwa 50 *min* ist sein Membranruhepotential um mehr als 20 *mV* depolarisiert. Das Neuron stirbt. Auch die anfänglichen Aktionspotentiale (Spikes) treten etwa 3 *min* nach Farbstoffzugabe nicht mehr auf. Das kann mit der zu hohen Alkoholkonzentration von 5% erklärt werden. Bemerkenswert ist, dass jedes Neuron eine andere Resistenz gegen Alkohol hat.

Zusammenfassend zeigen diese Messergebnisse, dass di-4-APEPPS sich hervorragend

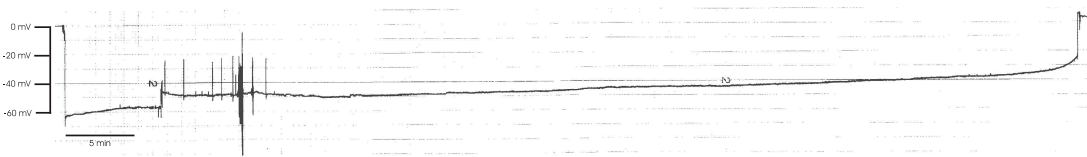


Abbildung 8.16: Mikroelektroden-Messung des Membranpotentials eines Retzius-Neurons während einer 53 *min* andauernden Farbstoffapplikation.

als Potentialsonden für die Retzius-Neuronenmembran eignet. Weiterhin ergeben sich durch die K^+ - und Ringerlösung-Zugaben Depolarisations- und Repolarisationszeiten, die durch die SHG-Messungen reproduziert werden konnten.

8.2.2 SHG-Messungen

Die Segmentalganglien sind in der Küvette auf einem Sylgaard-Boden (Fa. Dow Corning) mit Minutien-Nadeln an den Konnektiven festgesteckt. Die Ganglionkapsel wurde derart aufgeschnitten, dass die Zellkörper der beiden großen Retzius-Neuronen die Kapsel verlassen und damit frei zugänglich sind (siehe Abbildung 8.17). Die SHG-

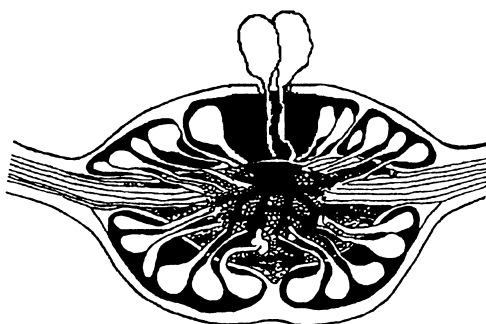


Abbildung 8.17:
Schematischer Querschnitt eines angeschnittenen
Segmentalganglions mit herausgequollenen Retzius-Neuronen [140].

Messungen werden mit dem experimentellen Aufbau aus Abbildung 5.5 durchgeführt. Die Küvette wurde durch eine X,Y,Z-Positioniereinheit mit Dunkelfeldbeleuchtung und selbstgefertigter Durchflussküvette ersetzt. Die Position des Laserfokus auf den Retzius-Neuronen wurde mikroskopisch bei Dunkelfeldbeleuchtung einjustiert. In Ab-

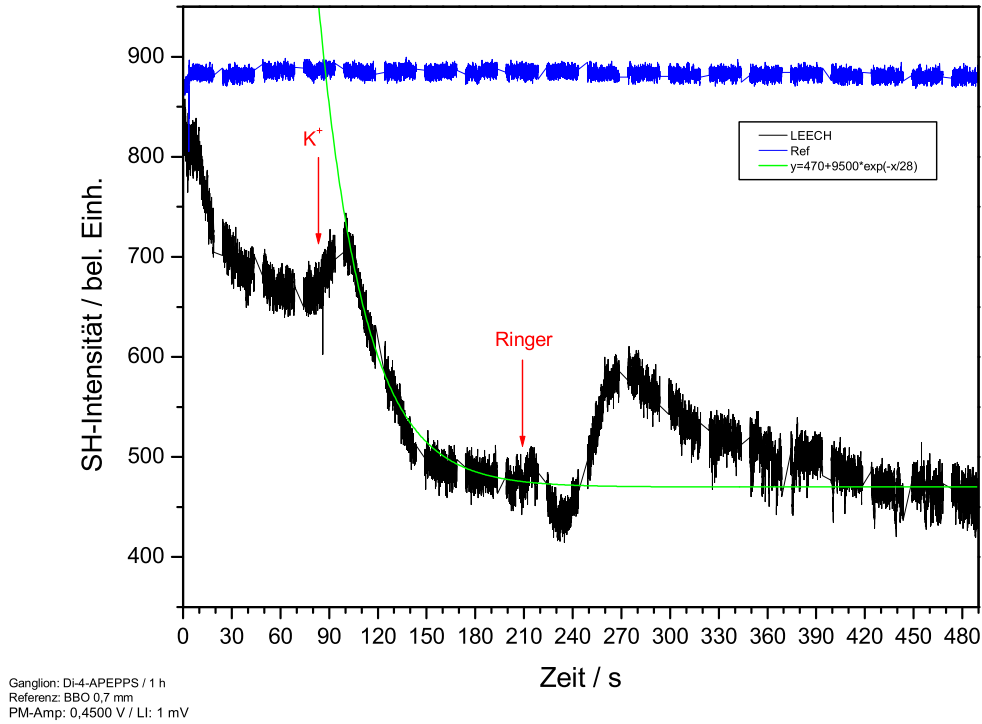


Abbildung 8.18: SHG von frischen Retzius-Neuronen nach einer einstündigen Einfärbung mit di-4-APEPPS. Die Depolarisation mit 89 mM K^+ -Lösung erfolgt in 129 s. Die gerade Linie zeigt das SH-Referenzsignal des BBO-Kristalls.

bildung 8.18 ist der Intensitätsverlauf des detektierten SH-Signals an frischen Retzius-Neuronen nach einer einstündigen Farbstoffapplikation¹⁰ und einer 129 s anhaltender Depolarisation mittels einer 89 mM K^+ -Lösung dargestellt. Nach der K^+ -Applikation erfolgt ein 15 s langer Signalanstieg um 7%, der anschließend mit einer exponentiell angepassten Zeitkonstanten von 28 s um 35% abnimmt. Nach Applikation der Ringerlösung erfolgt eine erneute SH-Signalintensitätsabnahme, diesmal um 3%, bis dass die SH-Signalintensität innerhalb von 41 s wieder auf etwa 88% des Ursprungswertes vor der K^+ Applikation zunimmt. Die Repolarisationsphase der Neuronen ist mit einer Zunahme der SH-Signalintensität verbunden. Allerdings wird nicht exakt der Ausgangswert erreicht, was auch an einer Drift der SH-Signalintensität über mehrere Minuten liegt. Diese könnte durch einen diskontinuierlichen Flüssigkeitsstrom, in dem sich die Retzius-Neuronen sehr stark bewegen, hervorgerufen werden. Die gerade, durchlaufende Messkurve liefert das SH-Referenzsignal des BBO-Kristalls (siehe Abbildung 8.18). Letzteres ermöglicht die SH-Signalintensität der Proben mit der SH-Signalintensität des BBO-Kristalls zu vergleichen, um somit quantitative Aussagen über die Abhängigkeit der Hyperpolarisierbarkeitsänderung vom Membranpotential zu treffen. Desweiteren zeigt die Referenzmessung, dass die Messkurven nicht durch

¹⁰ $c_{di-4-APEPPS} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ in Ringerlösung

Schwankungen der Laserintensität beeinflusst wurden.

Die in Abbildung 8.19 dargestellten Messkurven wurden von demselben Retzius-

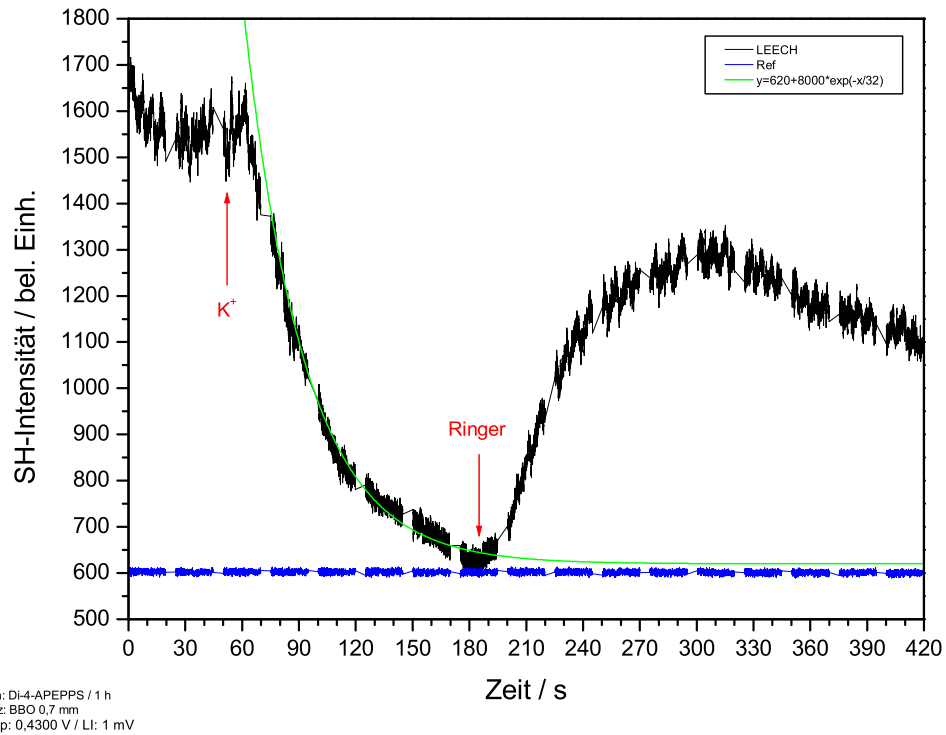


Abbildung 8.19: SHG von 85 min alten Retzius-Neuronen aus Abbildung 8.18, die in vorherigen Messungen bereits 5 mal depolarisiert wurden. Die erneute Depolarisation mit 89 mM K^+ -Lösung erfolgt über 132 s. Die gerade Linie zeigt das SH-Referenzsignal des BBO-Kristalls.

Neuron erhalten, dessen Messergebnisse in Abbildung 8.18 dargestellt sind. Dafür wurde der Laserstrahl 85 Minuten später in einer neuen Position auf die Neuronen fokussiert. Diese Messkurve zeigt ein ähnliches, jedoch nicht so ausgeprägtes Überschwingverhalten der SH-Signalintensität nach der K^+ -Zugabe. Nach K^+ -Applikation erfolgt eine 4,5%-ige SH-Signalintensitätszunahme innerhalb von 8 s. Die Depolarisationsphase wird von einer SH-Signalintensitätsabnahme um 60% innerhalb von 124 s bis zum Lösungswechsel zur Ringerlösung begleitet. Der SH-Signalintensitätsanstieg während der Repolarisation erfolgt innerhalb von 124 s auf nahezu 84% des Ausgangswertes. Die im Vergleich zu Abbildung 8.18 deutlich längeren Depolarisations- und Repolarisationszeiten resultieren vermutlich aus den vorangegangenen Schädigungen durch fünfmal wiederholte Depolarisation mit K^+ -Lösung. Dieses Verhalten ist auch in den Mikroelektroden-Messergebnissen wiederzufinden (siehe Abbildung 8.15). Die Zeitkonstanten der Depolarisation mit 89 mM K^+ -Lösung liegen zwischen 28 s und 32 s.

Die SH-Signale sind stark verrauscht, da hier viele Messungen mit großer zeitlicher Auflösung aneinander gereiht wurden, und die Abspeicherphasen der Messwerte durch Geraden verbunden wurden. In den folgenden Messungen wurde die mittlere Zeit pro Messpunkt von 18 ms auf 217 ms heraufgesetzt, da Aktionspotentiale im Bereich von $1\text{--}2\text{ ms}$ stattfinden und hier nicht aufgelöst werden sollen. Abbildung 8.20 zeigt die De-

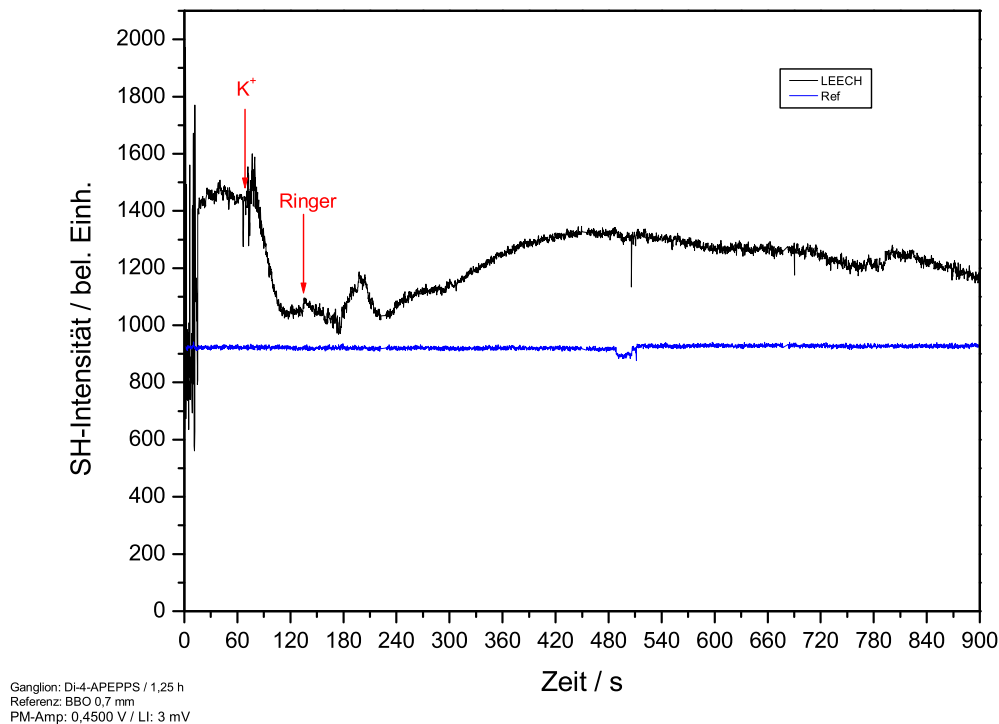


Abbildung 8.20: *SHG* von *Retzius*-Neuronen die zuvor 41 min mittels *SH*-Spektroskopie untersucht wurden. Dabei erfolgte 2 mal eine Depolarisation mit 89 mM K^+ -Lösung. Die jetzige Depolarisation mit 89 mM K^+ -Lösung dauerte 65 s . Die Einfärbung der Neuronen erfolgte vor den Untersuchungen und dauerte $1,25\text{ h}$ ($c_{\text{di-4-APEPPS}} = 10^{-4}$). Die gerade Linie zeigt das *SH*-Referenzsignal des *BBO*-Kristalls.

polarisationsantwort von nur 27% nach einer 65 s dauernden 89 mM K^+ -Applikation. Während der Repolarisationsphase wird hier jedoch erst nach 316 s das Ruhepotential mit 91% des Ausgangswertes erreicht. Dieses Verhalten ist aus den Mikroelektroden-Untersuchungen bekannt und deutet ebenso auf ein sterbendes Neuron hin (siehe Abbildung 8.15). Das Segmentalganglion wurde vorher $1,25\text{ h}$ mit di-4-APEPPS mit einer Konzentration von 10^{-4} M eingefärbt und anschließend zweimal mit einer 89 mM K^+ -Lösung depolarisiert. Offensichtlich hängt die Depolarisationszeit von der Vorbehandlung des Neurons durch die K^+ -Lösung ab. Die Depolarisationsamplitude hingegen wird vom tatsächlichen Wert der Depolarisation des Membranruhepotentials bestimmt und ist in dieser Messung aufgrund der hohen Farbstoffkonzentration und

der langen Farbstoffinkubationszeit stark vermindert. Die Analyse der Depolarisationsflanke ergibt eine Zeitkonstante von 16 s (siehe Abbildung 8.21). Der Abfall ist nicht mehr eindeutig exponentiell, da die Neuronen an Vitalität verlieren. Depolarisiert man frische Neuronen zunächst mit einer 30 mM K^+ -Lösung und nach einer ausreichenden Repolarisationsphase von etwa 12 min erneut mit einer 89 mM K^+ -Lösung, so erhält man den in Abbildung 8.22 dargestellten SH-Signalintensitätsverlauf. Man erkennt eine SH-Signalabnahme während einer 174 s langen Depolarisation, die durch die Zugabe mit einer 30 mM K^+ -Lösung induziert wurde, um 48% . Hingegen bewirkt die 266 s lange ausgeprägte Depolarisation durch eine 89 mM K^+ -Lösung eine SH-Signalintensitätsabnahme um 69% . Das Ergebnis aus der Analyse der

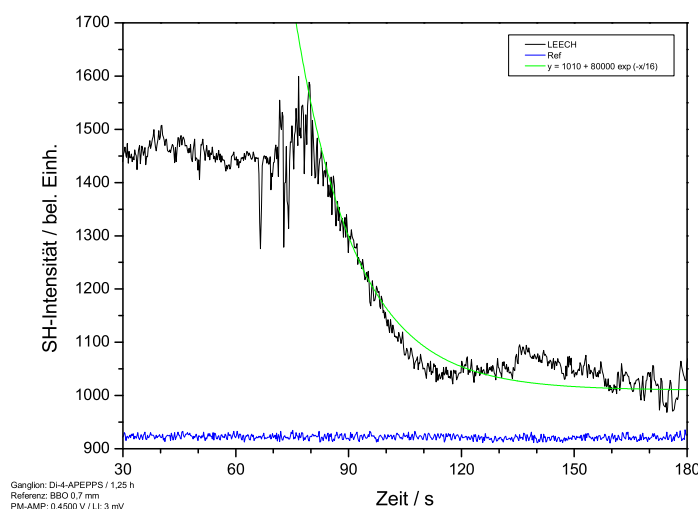


Abbildung 8.21:
Ausschnitt aus
Abbildung 8.20. Darge-
stellt ist die exponen-
tiell angepasste SH-Sig-
nalintensi-
tätsabnahme durch Zu-
gabe einer 89 mM K^+ -
Lösung. Die gerade Li-
nie zeigt das SH-Ref-
ferenzsignal des BBO-
Kristalls.

Depolarisationsphase ist in der Abbildung 8.23 und der Abbildung 8.24 dargestellt. Die Depolarisation mit einer 30 mM K^+ -Lösung wird von einem mindestens biexponentiellen Abfall der SH-Signalintensität beschrieben. Das biexponentielle Abklingen kann mit einer kurzen Zeitkonstanten von 11 s und einer langen Zeitkonstanten von 21 s beschrieben werden. Die Depolarisation mit einer 89 mM K^+ -Lösung liefert anfangs eine schnelle Zeitkonstante von 12 s und eine schlecht anzupassende langsamere Zeitkonstante (Abbildung 8.24). Außerdem enthalten alle Messkurven (mehr oder weniger ausgeprägt) eine Hyperpolarisation nach der K^+ -Lösungszugabe und ein kurz auftretender SH-Signalanstieg zu Beginn der Repolarisationsphase, die durch die Rin-
gerlösung eingeleitet wird. Die hier ermittelten langen Zeitkonstanten liegen zwischen 19 s und 32 s und die kurzen zwischen 11 s und 12 s .

Bedauerlicherweise war die Identifikation der Neuronen, die bestrahlt wurden, nicht eindeutig, da in manchen Präparaten auch T- oder N-Neuronen die Ganglionkapsel nach dem Anschneiden verlassen haben. Verschiedene Neuronen können unterschiedliches Verhalten nach der K^+ -Zugabe zeigen (siehe Abbildung 8.13). Befinden sich mehrere verschiedene Neuronen im Laserfokus, so tragen unterschiedliche Depolarisationsverhalten und Dynamiken zur zeitlichen Entwicklung des SH-Signals bei. Auch können zwei Neuronen vom gleichen Typ unterschiedliches Verhalten je nach individu-

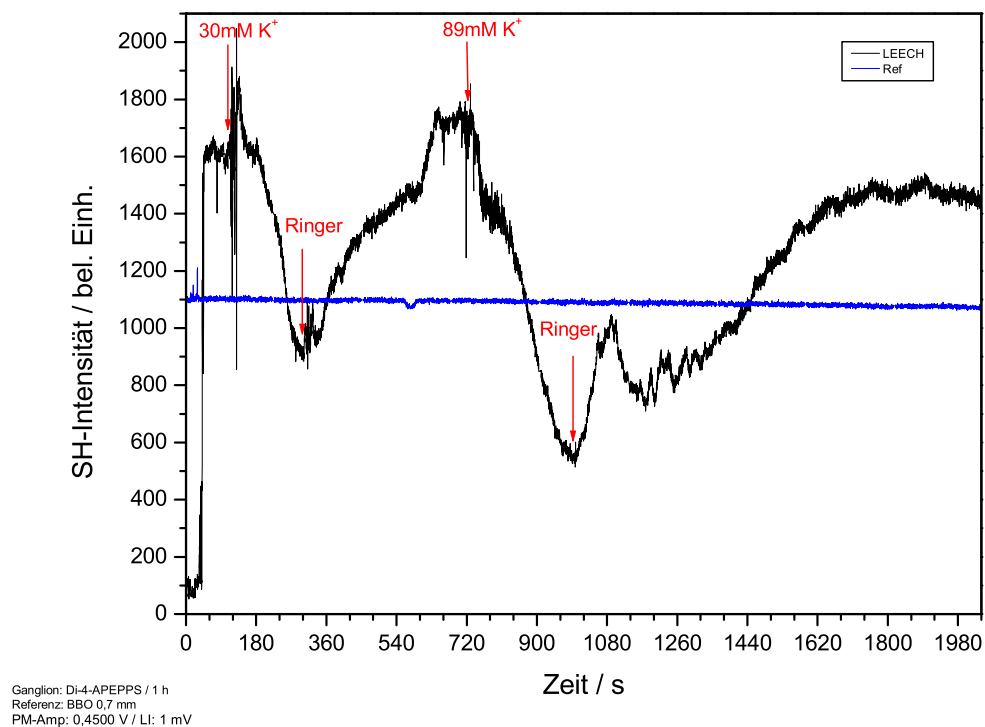


Abbildung 8.22: SHG von frischen Neuronen. Die Einfärbung der Neuronen erfolgte vor den Untersuchungen und dauerte 1 h. Eine erste Depolarisation mit 30 mM K^+ -Lösung dauerte 174 s. Eine zweite Depolarisation mit 89 mM K^+ -Lösung dauerte 266 s. Die gerade Linie zeigt das SH-Referenzsignal des BBO-Kristalls.

eller Vitalität zeigen. Das wird sich in der SH-Signalintensitätsabnahme, den Reaktionsgeschwindigkeiten und vermutlich auch in den nicht einfach-exponentiellen Depolarisationsdynamiken offenbaren. Analoge Messergebnisse wie die SH-Signalintensitätszunahmen durch K^+ -Lösungszugabe sind in Mikroelektroden-Messergebnissen nicht zu finden. Wir erklären diese Signalzunahmen mit Umorientierungen und Solvationsänderungen der Farbstoffmoleküle in fluiden Neuronenmembranen während der Depolarisationsphase. Ein weiteres typisches Ergebnis aus den SHG-Untersuchungen ist die zeitlich verzögerte Reaktion der Neuronen auf die veränderten extrazellulären Verhältnisse. Um diesen Effekt aufzuklären, wurden Leitfähigkeitsmessungen an der Probenkammer des experimentellen Aufbaus durchgeführt. Dafür wurde die Küvette mit Ringerlösung gefüllt und über einen Zufluss eine 89 mM K^+ -Lösung eingeleitet. Nach 4 s entspricht die K^+ -Küvettenkonzentration der 89 mM K^+ -Lösung, da die K^+ -Lösung erst durch die Zuleitung transportiert und eine Mischung der K^+ -Ionen mit dem Küvettenvolumen erfolgen muss (siehe Abbildung 8.25). Die Zuleitung hat ein Volumen von 2,5 ml und die Küvette eines von 250 μ l. Genau diese Volumenverhältnisse beeinflussen das zeitliche Verhalten der SH-Antworten (je größer das Küvettenvolumen, um so ausgeprägter ist die zeitliche Verzögerung) auf die Depolarisationen und

Repolarisationen der Neuronen.

Für die Untersuchung der SH-Signalintensitätsänderung aufgrund einer Änderung der

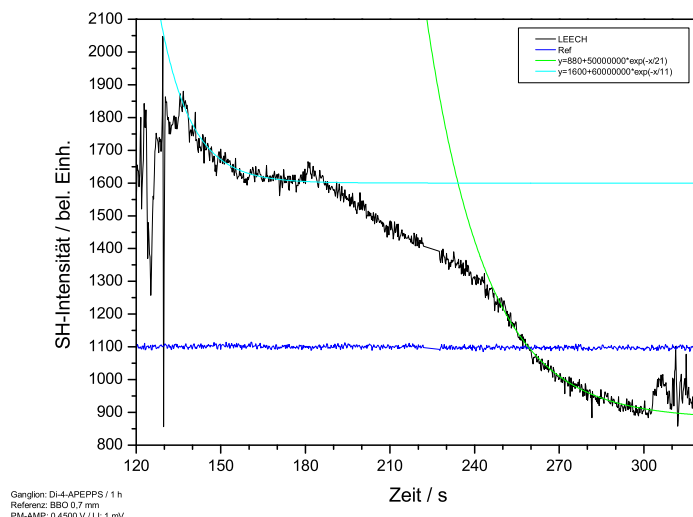


Abbildung 8.23:
 Ausschnitt aus
 Abbildung 8.22. Darge-
 stellt ist die exponen-
 tiell angepasste SH-Sig-
 nalsabnahme durch Zu-
 gabe einer 30 mM K^+ -
 -Lösung. Die gerade Li-
 nie zeigt das SH-Ref-
 erenzsignal des BBO-
 Kristalls.

beleuchteten Fläche der Neuronen, wurde die Osmolarität der extrazellulären Lösung verändert. Eine hypertonische Lösung führt zu einem Wasserverlust der Zelle, was eine Schrumpfung zur Folge hat, während eine hypotonische Lösung eine Wasseraufnahme und somit ein Schwellen zur Folge hat (Mikroelektroden-Messungen hierzu werden in Kapitel 8.2.1 beschrieben). Wie in Kapitel 8.1.2 am Modellsystem der Cholesterinvesikel beschrieben, führt eine Vergrößerung des Vesikel- oder Zellradius zu einer Vergrößerung der beleuchteten Fläche und somit zu einer erhöhten SH-Signalintensität. Um den Einfluss dieses Effektes auf die SH-Signalintensität an Neuronen zu untersuchen, wurde die extrazelluläre Lösung der Segmentalganglien durch entsprechende Änderung der $NaCl$ -Konzentration hypotonisch eingestellt. Eine Ringerlösung mit 26 mM statt 85 mM $NaCl$ soll am Retzius-Neuron eine Schwellung um 75 Vol% erzeugen, was einem Radiuszuwachs von 21% entspricht [4]. Die Zeitskala auf der derartige Schwellvorgänge ablaufen legten Neumann [13] und Buchholz [140] für K^+ -Zugabe und osmotisch induzierte Volumenänderungen zwischen 4 min und 6 min fest. Zusätzlich schwellen die Neuronen um eine Minute zeitlich verzögert nach einer K^+ -Zugabe (vergleiche Abbildung 8.14). SHG-Messungen ergaben keinen signifikanten Einfluss des Schwellverhaltens der Neuronen auf die SH-Signalintensität, da die Schwellzeiten deutlich über den hier gemessenen Dynamiken der SH-Signalintensitätsänderungen liegen. Wichtig sind auch die Größenverhältnisse von Laserfokus und Neuronen-Durchmesser. Die Strahltaile des Laserfokus hat einen Radius von $153\mu m$, während der Durchmesser der Retzius-Neuronen ca. $80\mu m$ beträgt. Damit ist der Volumenzuwachs der Zellen für die SHG vernachlässigbar.

Unsere Messergebnisse aus den SHG-Untersuchungen wurden von der Arbeitsgruppe von Loew bestätigt [38] (siehe Kapitel 4.5), die ebenfalls die Abnahme der SH-Signalintensität für die Zelldepolarisation beobachtet haben. Die hier mit SHG-Experimenten erhaltenen Ergebnisse sind konsistent mit den Ergebnissen aus den Mikroelektrodenmessungen.

So stimmen Depolarisations- und Repolarisationszeitkonstanten sehr gut mit denen aus den Mikroelektroden-Messungen überein. Aus den Mikroelektroden-Messungen ergaben sich durch Depolarisation mittels einer $89\text{ mM } K^+$ -Lösung Potentialzunahmen zwischen 35 mV und 11 mV , die abhängig vom Grad der vorausgegangenen Schädigung durch wiederholte Depolarisationsexperimente sind. Dieser Unterschied in den Depolarisationswerten entspricht einer Intensitätsabnahme von $69 - 27\%$ des SH-Signals. Auf eine $30\text{ mM } K^+$ -Lösung, die eine Depolarisation von 15 mV bewirkt [13], reagierte der potentialsensitive Farbstoff mit einer SH-Signalintensitätsabnahme von 48% . Diese Potentialantwort ist, verglichen mit der der Styrylfarbstoffe, mit 10% für 10 mV -Änderung, sehr hoch. Bedenkt man jedoch, dass Mikroelektroden-Messungen und nichtlinear optische Potentialmessungen zwei physikalisch vollständig unterschiedliche Methoden sind, so verwundert es nicht weiter, dass auch abweichende Bereiche des Messsignals auftreten. Eine solche Abweichung könnte der immer wiederkehrende Anstieg der SH-Signalintensität zu Anfang der Depolarisation nach der $89\text{ mM } K^+$ -Lösungszugabe sein. Dieser Anstieg wurde mit bis zu 8% detektiert. In Kapitel 2.3 wurde der gesamte Membranpotentialverlauf aufgrund intrinsischer elektrischer Feldbeiträge diskutiert. Mikroelektroden messen nur Transmembranpotentiale, während Potentialsondensignale aufgrund der Einlagerung in die Membran eine Ortsauflösung des Potentialverlaufes beinhalten. Aufgrund der Einlagerungstiefe der Potentialsonden

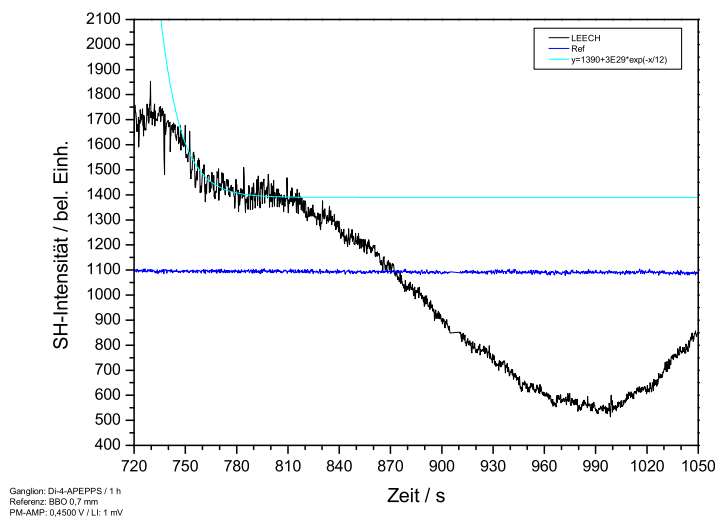


Abbildung 8.24:
Ausschnitt aus
Abbildung 8.22. Darge-
stellt ist die exponen-
tiell angepasste SH-Sig-
nalintensi-
tätsabnahme durch Zu-
gabe einer $89\text{ mM } K^+$ -
Lösung. Die gerade Lin-
ie zeigt das SH-Ref-
ferenzsignal des BBO-
Kristalls.

erhält man eine ausgeprägte Sensitivität gegenüber Oberflächen- und Dipolpotentialbeiträgen (siehe Abbildung 8.2). Diese sind für die Steuerung und Regulation der Membranfunktionen essentiell. Der hier gemessene Effekt erfolgt innerhalb von 10 s . Daher könnte es sich um Umorientierungsrelaxationen oder zusätzliche Einlagerungen von Farbstoffmolekülen im Bereich der äußeren Membranschicht handeln, die durch die erhöhte K^+ Konzentration induziert wurden. Einflüsse auf das Dipolpotential durch zusätzliche Einlagerung von amphiphilen Molekülen in eine Membran wurden schon beobachtet [144].

Bemerkenswert ist die geringe Abhängigkeit der SH-Signalintensität von Farbstoffmo-

leküleinflüssen. Ein Farbstofftransportmechanismus aus der Membran heraus, wie er in Kapitel 4.5 in Fluoreszenzmessungen beobachtet wurde, scheint hier keine Rolle zu spielen. In Abbildung 8.22 kehrt das SH-Signal nach 34 *min* intensiver Laserbestrahlung noch auf immerhin 94% seiner Ausgangsintensität zurück. Das bedeutet zum einen, dass die Farbstoffmoleküle während der Laserbestrahlung nur vernachlässigbar ausbleichen. Zum anderen bleibt die Farbstoffkonzentration innerhalb der Membran trotz Endozytose nahezu konstant. In Fluoreszenzmessungen erfolgt ein Ausbleichen der Farbstoffmoleküle schon signifikant nach wenigen Sekunden (siehe Kapitel 4.5). Zusammenfassend kann man festhalten, dass die Blutegel-Neuronen im Segmentalganglion auch nach einer intensiven Einfärbung von teilweise mehr als 1 *h* und wiederholten Depolarisationen mit einer 89 *mM* K^+ -Lösung während der SH-Spektroskopie immer noch ein Ruhepotential besitzen und in der Lage sind, erneut zu depolarisieren, was eindeutig auf Vitalität hinweist. Die Toxizität der hier untersuchten Potentialsonden kann daher bei kleinen Konzentrationen als vernachlässigbar angesehen werden. Somit

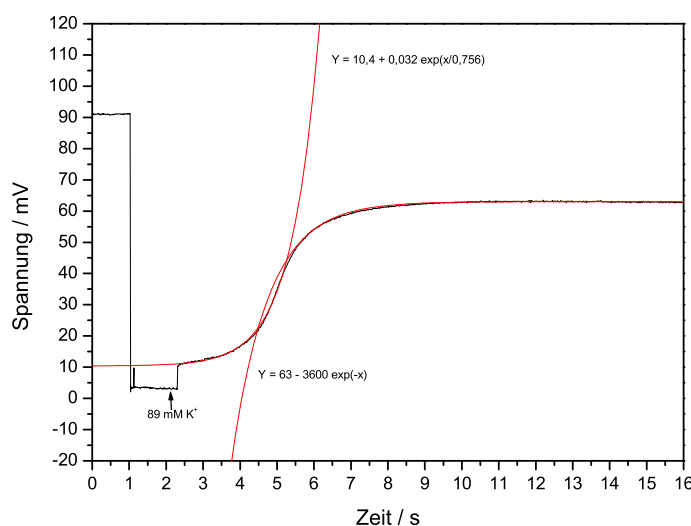


Abbildung 8.25:
Bestimmung der Leitfähigkeitsänderung in der Küvette (250 μ l Volumen) bei Zufluss einer 89 *mM* K^+ -Lösung.

konnte gezeigt werden, dass die SH-Spektroskopie eine minimalinvasive und hochgeradig sensitive Messmethode für Membranpotentialänderungen darstellt, die hervorragend mit konventionellen Messmethoden übereinstimmende Ergebnisse liefert. Zudem bietet sie den Vorteil der nahezu unbegrenzten Zugänglichkeit, da nach dem Einfärben der Zellmembran lediglich der Laserfokus auf die gewünschte Zellposition justiert werden muss. Das bedeutet im Gegensatz zur Mikroelektrode ein minimaler Raumbedarf. Dies zeigt die hervorragende Eignung dieser Technik für die Anwendung für Zellsuspensionen.

Aufgrund der Verwendung von langwelligem Licht kann man auch tief im Zellinneren gelegene Objekte minimalinvasiv untersuchen, wenn eine selektive Einfärbung beispielsweise über Transportvesikel gelingt.

8.2.3 SHG-Effizienz

Da in allen SHG-Messreihen das SH-Signal des BBO-Referenzkristalls detektiert wurde, steht im nachhinein eine Umrechnung der vormals relativen SH-Signalintensitäten in Eingangsleistungen bezüglich des BBO-Kristalls zur Verfügung. 5% der Laserlei-

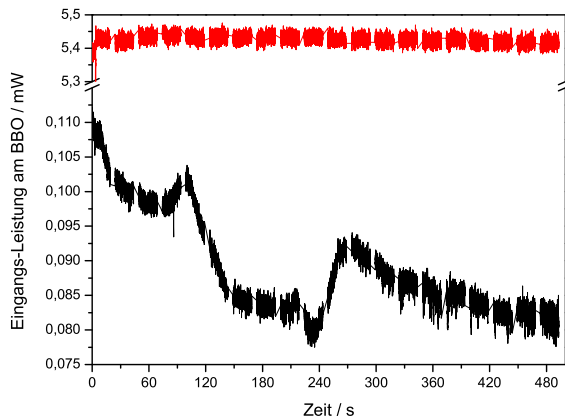


Abbildung 8.26:
*SH-Signalintensitätsverlauf aus
Abbildung 8.18, der auf
die Eingangsleistung am BBO-
Kristall umgerechnet wird.*

stung wurden auf den BBO-Kristall fokussiert. Das bedeutet, dass ca. 95% der Laserleistung im Messzweig des Experimentes zur Verfügung stehen. Aus den aufgenommenen Kalibrierungskurven (siehe Kapitel 6) können die beliebigen SH-Signalintensitäten durch einfache Umrechnung auf die BBO-Eingangsleistung bezogen werden. Für die Messreihe in Abbildung 8.18 ist dies in Abbildung 8.26 durchgeführt worden. Detektiert

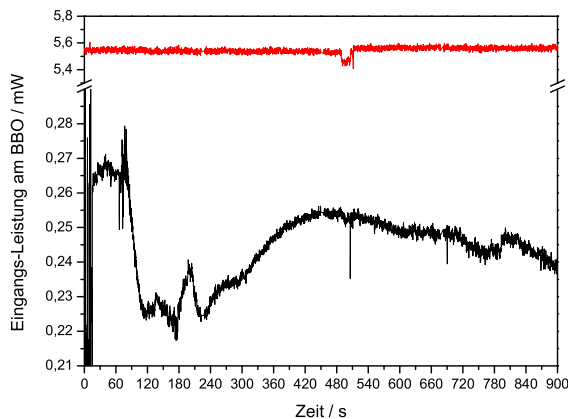


Abbildung 8.27:
*SH-Signalintensitätsverlauf aus
Abbildung 8.20, der auf
die Eingangsleistung am BBO-
Kristall umgerechnet wird.*

man nach Umrechnung eine Eingangsleistung am BBO-Kristall von 5,4 mW, so hat der Messzweig entsprechend 102 mW. Vergleicht man die gemessene SH-Signalintensität am Neuron (z.B. 800 Einheiten) mit der entsprechenden SH-Signalintensität am BBO-Kristall aus den Referenzmessungen über die angepasste Kurve, so erhält man die Eingangsleistung an einem BBO-Kristall, der eine identische SH-Signalintensität erzeugt hätte (hier 0,11 mW). Ein Vergleich dieser Leistung mit der tatsächlich anliegenden (in diesem Fall 102 mW) liefert eine Konversionseffizienz für die in die Neuronenmembran

eingelagerten Potentialsonden (1%), bezogen auf die Konversionseffizienz des BBO-Kristalls. Aufgrund der doppelt so hohen Farbstoffkonzentration beim Einfärben der Neuronen und deutlich längeren Inkubationszeiten erhält man für die Umrechnung der SH-Signalintensitäten aus Abbildung 8.20 für die SH-Signale aus den Neuronen deutlich höhere Werte als für die in Abbildung 8.26 dargestellten Ergebnisse (siehe Abbildung 8.27). Eine Abschätzung der Konversionseffizienz in diesem Fall liefert schon $2,6\%$ bezogen auf die Konversionseffizienz des BBO-Kristalls. Berücksichtigt man jedoch die Größe der Neuronen im Vergleich zum Laserfokus und die Anzahl der aufgrund des Kippwinkels zur Laserpolarisation effektiv beitragenden Farbstoffmoleküle, so liegt die Konversionseffizienz etwas höher. Hier nicht berücksichtigte Verluste durch Spiegel und Linsen im Messzweig mindern die Ausbeute wieder. Prinzipiell ist es ohne weiteres möglich, quantitative Messergebnisse von Neuronenmembranen zu erhalten.

Die bis hierher dargestellten Messergebnisse zeigen, dass man mit ausreichend hoher zeitlicher Auflösung Potentialänderungen detektieren kann. Von besonderem Interesse sind auch örtlich aufgelöste Membranpotentialänderungen, wie sie mittels SH-Mikroskopie detektierbar sind.

8.2.4 SHM

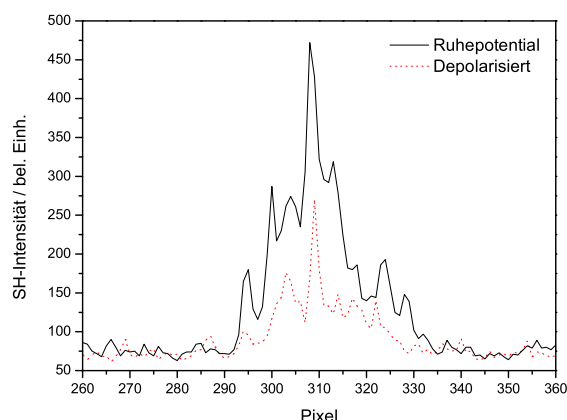


Abbildung 8.28:
SH-Intensitätsverlauf des horizontalen Schnittes durch die SHM der Abbildungen 8.29 und 8.30.

Die mikroskopischen Aufnahmen eines Blutegelganglions wurden mit einem experimentellen Aufbau, wie in Kapitel 5.3.4 beschrieben, durchgeführt. Da der Durchmesser eines Segmentalganglions etwa $600\ \mu\text{m}$ beträgt wurde die Titan:Saphir-Laserpulsbreite durch eine Dejustage der verstärkten Pulse im Kompressor auf 2 ps erhöht, damit das gesamte Segmentalganglion ausgeleuchtet werden kann. Eine SHM-Aufnahme eines Segmentalganglions in Ringerlösung ist in Abbildung 8.29 dargestellt. Hier sind die beiden Retzius-Neuronen und ein weiteres größeres Neuron (ein N- oder T-Neuron (siehe Abbildung 2.12)) neben einem Retzius-Neuron zu erkennen. Die beiden Neuronen können nicht getrennt aufgelöst werden. Die Zuordnung erfolgt aufgrund der Lage und Größe der Neuronen. Retzius-Neuronen sind mit einem Durchmesser von $80\ \mu\text{m}$ die größten Neuronen und liegen nebeneinander zentral in der Ganglionkapsel. Die nächst größeren Neuronen in nächster Nachbarschaft zu den Retzius-Neuronen

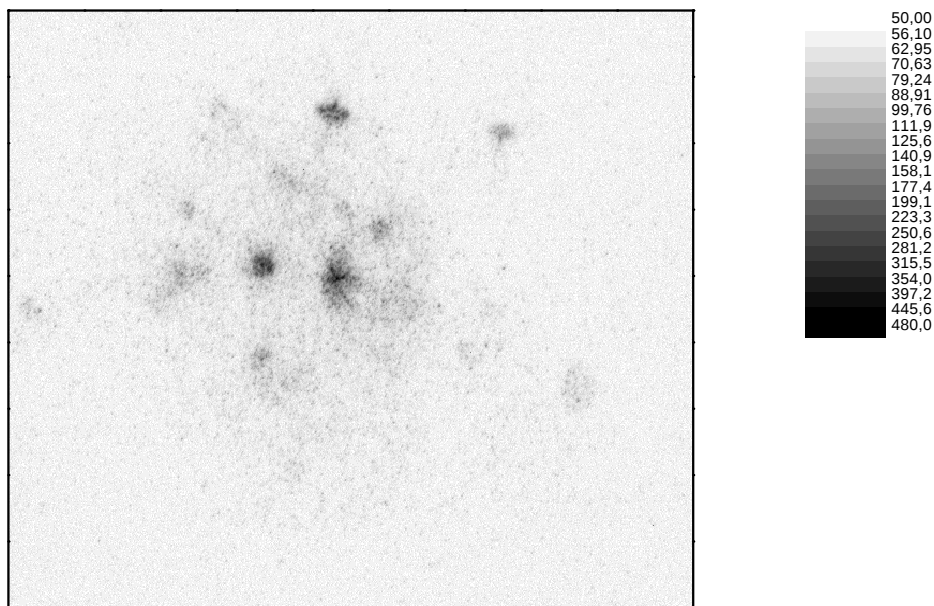


Abbildung 8.29: SHM der di-4-APEPPS Farbstoffe eines angeschnittenen Blutegel-Segmentalganglions in Ringerlösung. Die Intensitäten wurden invertiert. Die gesamte Abbildung misst $1,24\text{ mm} \times 0,98\text{ mm}$. Zur Aufnahme wurde ein 2×2 Binning der Pixel bei 5 s Belichtungszeit eingesetzt.

sind die N- und T-Neuronen. Eine Auswertung der Fleckgrößen ergibt für den linken Fleck einen Durchmesser von etwa $36\text{ }\mu\text{m}$, was einem einzelnen Retzius-Neuron zugeordnet wird. Für den elliptischen rechten Fleck erhält man einen kleinen Durchmesser in horizontaler Richtung von $65\text{ }\mu\text{m}$ und einen großen Durchmesser in vertikaler Richtung von $102\text{ }\mu\text{m}$. Das sind höchstwahrscheinlich mindestens zwei Neuronen, von denen eins das zweite Retzius-Neuron ist. Um die SH-Signale aus den Neuronen sichtbarer aufzulösen, wurden die Intensitäten invertiert, und damit das intensive SH-Signal dunkel dargestellt. Der geringe Hintergrundbeitrag wird der Ganglionkapsel zugeschrieben, in die ebenfalls Farbstoffmoleküle eingelagert sind. Ein Vergleich dieser Aufnahme mit der SHM aus Abbildung 4.9 zeigt die starke Abhängigkeit der SHG von der Orientierung der Signal-gebenden Moleküle. In Abbildung 4.9 erfolgte die Probenbeleuchtung und anschließende Detektion kollinear. Es tragen nur nichtlinear optische Moleküle zum SH-Signal bei, deren Hyperpolarisierbarkeitsachse eine parallele Komponente zur Laserpolarisation besitzt. Daher sind dort nur die Membranränder sichtbar. Die nichtkollineare SHM ermöglicht mit derselben Argumentation eine laterale Auflösung der Zelloberfläche (siehe Abbildung 8.29). Eine Depolarisation mit einer 89 mM K^+ -Lösung, wie sie in den SH-Spektroskopie-Experimenten durchgeführt

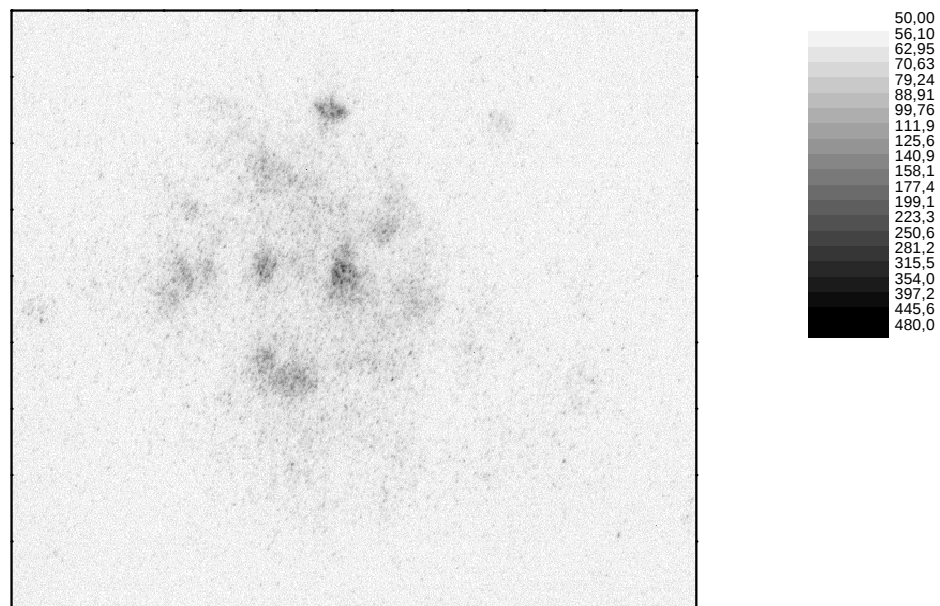


Abbildung 8.30: SHM der di-4-APEPPS Farbstoffe eines angeschnittenen Blutegel-Segmentalganglions in $89\text{ mM } K^+$ -Lösung. Die Intensitäten wurden invertiert. Die gesamte Abbildung misst $1,24\text{ mm} \times 0,98\text{ mm}$. Zur Aufnahme wurde ein 2×2 Binning der Pixel bei 5 s Belichtungszeit eingesetzt.

worden ist, verursacht eine deutliche Abnahme der SH-Signalintensität und zwar, wie in Abbildung 8.30 dargestellt ist, an den Stellen der zuvor intensivsten Signale. Diese Abnahme der SH-Signalintensität wurde in den SH-Spektroskopieuntersuchungen aus Kapitel 8.2.2 immer wieder bestätigt. Auch hier erkennt man eine Hintergrund-Intensität aus der Ganglionkapsel. Ein Indiz für derartige Beiträge aus der Ganglionkapsel ist die Konstanz der SH-Signalintensität während der Depolarisation der Neuronen. Die Auflösung wird hier durch den Bildverstärker bestimmt (siehe Kapitel 5.3.2) und liegt bei $10\text{ }\mu\text{m}$. Dieser Wert wurde relativ zu einer Mikroskopmikrometerskala festgelegt. Daher ist eine optische Trennung der einzelnen Neuronen, die einen Radius von maximal $40\text{ }\mu\text{m}$, haben nicht möglich. Detaillierter ist die Depolarisation in Abbildung 8.28 als horizontaler Schnitt durch die SHM-Bilder dargestellt. Man erhält eine SH-Signalintensitätsabnahme während der Depolarisation von 43% in der Neuronenansammlung auf der rechten Seite. Für das einzelne Retzius-Neuron, das auf der linken Seite der SHM-Bilder zu erkennen ist zeigt Abbildung 8.31 einen horizontalen Schnitt. Das zeigt eine SH-Signalintensitätsabnahme von 52% während der Depolarisation mit einer $89\text{ mM } K^+$ -Lösung. Diese Ergebnisse stimmen mit den Messergebnissen in Kapitel 8.2.2 überein. Vergleicht man die Breite der SH-Signale im Zustand des Ru-

hepotentials und bei Depolarisation, so ist auch hier kein signifikantes Schwellverhalten der Neuronen erkennbar. Weiterhin erkennt man auf den Neuronen ausgeprägte SH-Signalintensitätslokalisationen, die entweder aus einer lokal konzentrierten Farbstoffeinlagerung oder lokal starken Membranpotentialänderungen resultieren.

Zeitliche Schwankungen sollten hier gering sein, da bei Belichtungszeiten von 5 s die Spektroskopie im Rahmen der Messgenauigkeit konstante Intensitäten liefert. Die bis

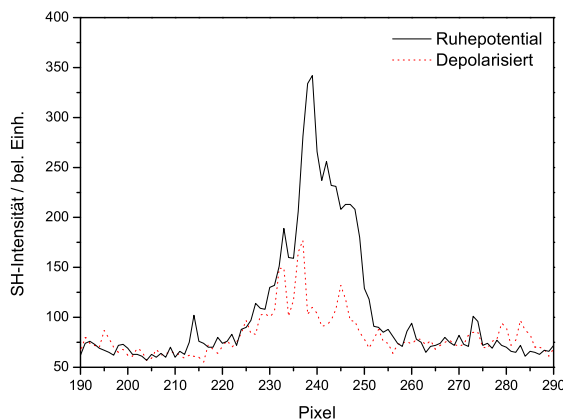


Abbildung 8.31:
SH-Intensitätsverlauf des horizontalen Schnittes durch die SHM der Abbildungen 8.29 und 8.30.

hier erhaltenen Erkenntnisse aus SHG-Experimenten an Cholesterinvesikeln als Modellmembranen und an Blutegel-Neuronen als Biomembranen sind äußerst vielversprechend. Ein aktuelles und hoch komplexes System stellt das Herz eines Säugetieres dar. Daher sind Potentialmessungen an Herzmuskelzellen von besonderem Interesse.

8.3 Messungen an Herzmuskelzellen

Bisher hat man Aktionspotentiale von Kardiomyozyten mittels der Patch-Clamp-Technik und Fluoreszenzspektroskopie detektiert. Dafür wurde unter anderem der inzwischen etablierte Fluoreszenzfarbstoff di-8-ANEPPS in der konfokalen Mikroskopie eingesetzt [143] und auch mit konventionellen Fluoreszenzmethoden mikroskopisch detektiert [145]. Mittels einer Spannungsklemme wurden die Zellen elektrisch stimuliert und die Fluoreszenzänderung optisch detektiert. Doch traten die in Kapitel 4 beschriebenen nachteiligen Effekte der Fluoreszenz-Technik auf. Schon nach 3 s war eine Fluoreszenzintensitätsabnahme um 25% erfolgt, die dem photoinduzierten Ausbleichen der Farbstoffe zugeschrieben worden. Somit waren aufwendige mathematische Korrekturen des Fluoreszenzsignals notwendig. Weiterhin wurde in den Herzmuskelzellen ein belichtungs- und konzentrationsabhängiger Zelltod festgestellt. Dem ging eine Verbreiterung des Aktionspotentials, gefolgt von einer spontanen Aktivierung und einer starken finalen Kontraktion, voraus. Wie in Kapitel 4 beschrieben, treten derartige Effekte in der nichtlinear optischen Detektionsmethode der SH-Spektroskopie nicht auf. Sie ist minimalinvasiv und hocheffizient.

Die hier untersuchte Zellsuspension adulter Kardiomyozyten der Ratte wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Thomas Stumpe vom Zentrum für Physiologie der Heinrich-

Heine-Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Hier handelte es sich überwiegend um Ventrikelmuskulatur, die eine Aktionspotentialdauer von etwa 170 ms haben. Die Kardiomyozyten wurden nicht elektrisch stimuliert, so dass die mittels der SH-Spektroskopie direkt detektierten Aktionspotentiale durch spontane Selbststimulation der Kardiomyozyten in unregelmäßigen Abständen erregt wurden (siehe Kapitel 2.7). Die Zellsuspension wurde zum Einfärben 35 min in einer Farbstoff-Nährlösung gebadet. Der di-4-APEPPS-Farbstoff wurde entgegen vorherigen Untersuchungen in DMSO¹¹ gelöst und mit einer Konzentration von $c = 5 \cdot 10^{-5}\text{ M}$ mit einem 1%-igen DMSO-Gehalt über die Zellen gespült. Der Messaufbau entspricht dem in Kapitel 5.2 dar-

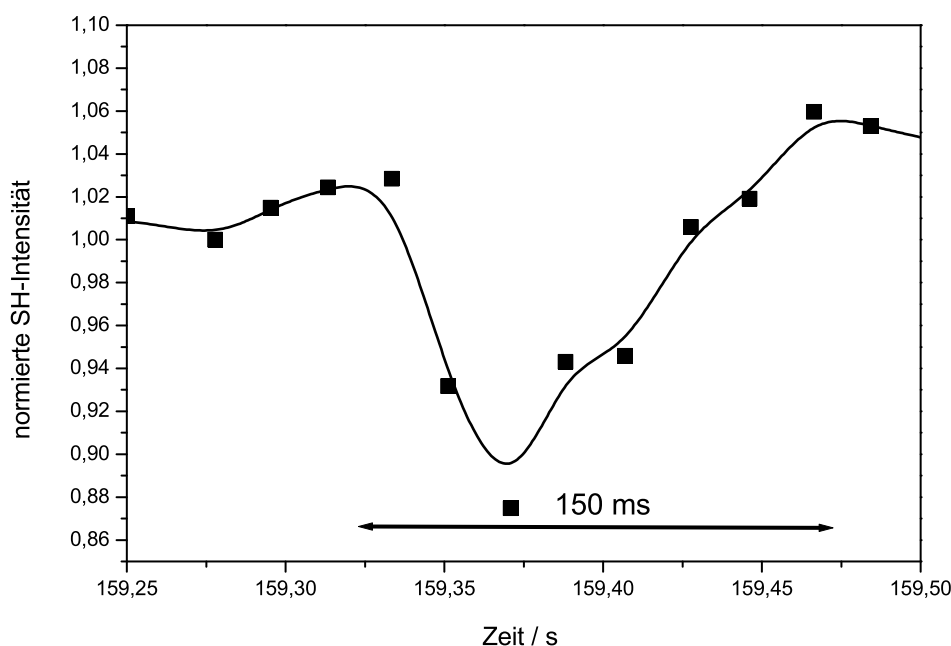


Abbildung 8.32: SH-Signalantwort der di-4-APEPPS-Farbstoffe, eingelagert in adulte Ratten-Kardiomyozyten, auf ein Aktionspotential. Die SH-Signalintensität wurde auf das Ruhepotential normiert.

gestellten Aufbau, wobei die Küvette der Vesikel durch eine Küvette mit X,Y,Z-Positioniereinheit und integrierter Dunkelfeldbeleuchtung ersetzt wurde (siehe Kapitel 5.3.4). Zusätzlich wurde die CCD-Kamera für die konventionelle mikroskopische Detektion eingesetzt. Die den Laserstrahl fokussierende Linse wurde gegen ein verkleinerndes Galilei-Fernrohr aus dem Zweistrahl-Experiment ersetzt, da hier die verstärkten Laserpulse als Fundamente verwendet wurden.

Ein detektiertes Aktionspotential ist in Abbildung 8.32 dargestellt. Hierbei wurde die SH-Signalintensität auf das Ruhepotential der Zelle normiert. Innerhalb des Laserstrahls befanden sich etwa 10 Kardiomyozyten, von denen sehr wahrscheinlich nur

¹¹Dimethylsulfoxid

eine spontan ein Aktionspotential ausgelöst hat. Die gemessene Aktionspotentialanstiegszeit beträgt 37 ms . Die Messpunkte wurden mit einer Spline-Funktion angepasst. Für ein Aktionspotential aus dem Myokard ist diese Anstiegszeit deutlich zu lang, da hier Zeiten um 1 ms erwartet werden. Die Anstiegszeiten von Zellen des Sinus- und AV-Knoten liegen hingegen in den hier gemessenen Bereichen. Auch die Kürze der Aktionspotentiale dieser Herzbereiche stimmt mit den hier gemachten Beobachtungen überein. Daher ist es nicht auszuschließen, dass derartige Zellen in der Zellsuspension vorhanden waren und mittels SHG detektiert wurden. Ein weiteres Argument dafür liefert die Autorhythmie, d.h. die Möglichkeit der Selbsterregung der Zellen. Zur Autorhythmie befähigt sind nur Zellen des Sinusknotens und des AV-Knotens (siehe Abbildung 2.13). Hier erfolgt eine selbstständige Depolarisation von negativsten Wert des Ruhepotentials (maximales diastolisches Potential) bis zum Schwellpotential, das ein Aktionspotential auslöst. Die Autorhythmie ist eine Folge einer erhöhten Ca^{2+} -Leitfähigkeit. Abweichungen des detektierten Potentialverlaufs zwischen elektrophysiologischen und optischen Messungen wurden von Rohr und Salzberg [145] gefunden. Die ansteigende Flanke des Aktionspotentials der Kardiomyozyten stimmt in den Messergebnissen, die mit beiden verschiedenen Messmethoden erhalten wurden, überein. Allerdings weicht das Zeitverhalten in den Repolarisationsphasen voneinander ab. Für zukünftige Messungen sind parallele Mikroelektroden-SH-Messungen notwendig, wobei die Kardiomyozyten bevorzugt elektrisch stimuliert werden sollten.

Kapitel 9

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die nichtlinear optische Messmethode der frequenzverdoppelnden Spektroskopie und Mikroskopie zur Detektion von Membranpotentialänderungen eingesetzt. Dafür wurden neuartige potentialsensitive Hemicyanin-Farbstoffe in Modellvesikel und lebende Zellen eingelagert. Die Einlagerung erfolgte dabei durch Diffusion in die äußere Schicht der Zellmembran des jeweiligen Testsystems. Sowohl spektroskopische als auch mikroskopische Untersuchungen an Modellvesikeln aus oxidierten Cholesterin haben gezeigt, dass sich die Hemicyanin-Farbstoffe als Membranpotentialsonden aufgrund ihrer amphiphilen Struktur stabil orientiert in die Membran einlagern.

Fluoreszenzspektren der in Blutegel-Neuronen eingelagerten Farbstoffe zeigten eine Rotverschiebung der Zwei-Photonen angeregten Fluoreszenz um 8 nm und eine Abnahme der Quantenausbeute gegenüber den Fluoreszenzspektren an Cholesterinvesikeln, die mit der größeren Polarität der Biomembran erklärt werden. Untersuchungen der elektrischen Eigenschaften der Cholesterinvesikel lieferten Erkenntnisse über die Membrandynamik und zeigten nach etwa 120 s eine stabile Matrix für die Frequenzverdopplung an Potentialsonden. Durch eine Verallgemeinerung des mathematischen Viviani-Fensters konnten elektrostriktive Einflüsse an Cholesterinvesikeln auf das SH-Signal geklärt werden. Derartige Einflüsse lassen sich durch geeignete Größenverhältnisse zwischen Probe und Laserstrahl minimieren. Zusätzliche, potentialgetriebene, Einlagerungsmechanismen, die auf der Sekundenskala erfolgten, werden beobachtet. Durch Anlegen eines modulierten hochfrequenten Wechselfeldes über die Cholesterinmembran war es möglich, elektrostriktive Effekte vollständig zu unterdrücken und ausschließlich potentialsensitive Beiträge der Farbstoffe zu messen. Das begründete den linearen Zusammenhang zwischen der angelegten Membranspannung und der nichtlinearen Antwort des Farbstoffmoleküls.

Spektroskopische Membranpotentialuntersuchungen an lebenden Biomembranen wurden an Retzius-Neuronen des medizinischen Blutegels und an hochspezialisierten Ratten-Herzmuskelzellen durchgeführt. Die Methode der frequenzverdoppelnden Spektroskopie reproduzierte die Mikroelektrodenmessungen an Blutegel-Neuronen in ihrer Zeit- und Amplitudenabhängigkeit perfekt. Dafür wurden bevorzugt die etwa $80\text{ }\mu\text{m}$ durchmessenden Retzius-Neuronen der Segmentalganglien mittels unterschiedlich konzentrierter KCl-Lösungen depolarisiert. Eine Zugabe von 30 mM KCl-Lösung bewirkte

eine Abnahme der frequenzverdoppelten Intensität von 48%, während die Depolarisation, die durch eine 89 *mM* KCl-Lösung induziert wird, eine SH-Signalintensitätsabnahme von 69% ergab. Mikroelektrodenmessungen lieferten entsprechende Depolarisationen um 15 *mV* und 35 *mV*. Die Messergebnisse der 89 *mM* KCl-Applikation zeigten eine ausgeprägte Membranpotentialabhängigkeit von der Vitalität des Neurons, so dass die gemessenen Werte zwischen 11 *mV* und 35 *mV* variierten. Zusätzliche Effekte, die mittels Mikroelektroden nicht messbar waren, werden durch die SHG-Experimente aufgrund der gezielten und wechselwirkungsarmen Einlagerung der Potentialsonden in die Membran aufgedeckt. Der Einfluss von Zellvolumenregulationsmechanismen lebender Blutegel-Neuronen wurde auf der Grundlage der Messergebnisse aus den analogen SHG-Untersuchungen der Cholesterinvesikel diskutiert. Aufgrund des großen Laserfokus und dem vergleichsweise kleinen Neuronendurchmesser führen Zellschwellungen zu keinerlei messbaren Artefakten. Phototoxizität und Photobleichen der Farbstoffe führten, ebenso wie die Möglichkeit der Endozytose in Biomembranen, während der potentialabhängigen Messungen über einen Zeitraum von 30 *min* zu maximalen Intensitätsabnahmen von 6%. Erst Farbstoffapplikationen in der Größenordnung von Stunden schädigen die Zelle letal.

Mit einer lateralen Ortsauflösung von 10 μm wurden Membranpotentialänderungen durch die frequenzverdoppelnde Mikroskopie detektiert. Die mikroskopischen Messungen bestätigten die spektroskopischen SHG-Untersuchungen vollständig. Durch Depolarisation mit einer 89 *mM* KCl-Lösung ergab sich eine SH-Signalintensitätsabnahme von 52%, die von der Vitalität der Neuronen abhängt.

Auf einer kürzeren Zeitskala wurden Aktionspotentiale von einzelnen Kardiomyozyten SH-spektroskopisch detektiert. Dabei handelte es sich um Myozyten des Sinus- oder atrioventrikulären Knotens, die aufgrund ihrer Aktionspotentialanstiegszeit von 37 *ms* und einer Erregungsdauer von 150 *ms* identifiziert wurden.

Sämtliche spektroskopischen Messungen wurden mittels eines Referenzsignals, dessen Parameter zuvor gemessen wurden, aufgezeichnet. Somit gelang eine Abschätzung der Konversion der in die Membranen eingelagerten Potentialsonden. Die abgeschätzte Konversionseffizienz lag bei etwa 1‰ relativ zur Konversion des BBO-Kristalls.

Die Methode der Frequenzverdopplung stellt aufgrund ihrer Grenzflächenselektivität und Potentialsensitivität eine minimal invasive, Störsignal-arme und schnelle Methode der Membranpotentialdetektion dar. Sie vereint die Vorteile der TPEF und vermeidet ihre Nachteile, wie Photobleichen und Phototoxizität. Für die Zellphysiologie ist insbesondere die SHM daher ein wirkungsvolles Instrument zur Untersuchung von elektrischen Membrantransienten.

Anhang A

Schnittfläche Zylinder-Kugel

Das verallgemeinerte Viviani-Problem geht der Frage nach, welche Fläche ein Zylinder aus einer Kugel, bei variablem Kugeldurchmesser, ausschneidet (siehe Abbildung A.1).

Sei der Zylinder oBdA parallel zur Z-Achse, dann charakterisieren die drei Größen

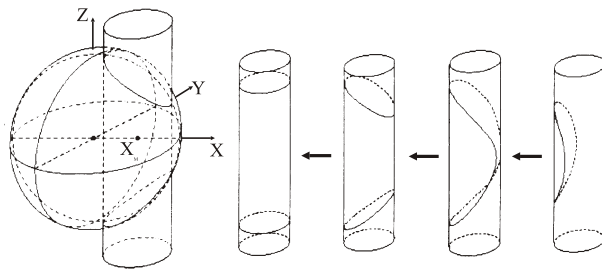


Abbildung A.1:
Schnittflächenänderung eines Zylinders mit einer Kugel bei Kugelradiuszuwachs.

R (Radius der Kugel), r (Radius des Zylinders) und X_M (Lage des Mittelpunktes des Zylinders auf der X-Achse) das Problem¹.

Die Gleichung

$$X^2 + Y^2 + Z^2 = R^2 \quad (\text{A.1})$$

beschreibt die im Ursprung zentrierte Kugel und

$$(X - X_M)^2 + Y^2 = r^2 \quad (\text{A.2})$$

den auf der X-Achse verschobenen Zylinder. Für ein Flächenelement ΔS einer krummen Fläche S die explizit durch die Gleichung $Z = \varphi(X, Y)$ wobei (X, Y) den Bereich B durchläuft gegeben ist, gilt nach Bronstein [137]:

$$\Delta S = \int \int_{(B)} \sqrt{1 + \varphi_X^2 + \varphi_Y^2} dX dY \quad (\text{A.3})$$

Dieses Integral liefert den Grenzwert der Summe über alle Flächenelemente der Fläche S , die aus den Projektionen der Flächenelemente auf die X, Y -Ebene gebildet wird. Aus der Kugelgleichung erhält man:

$$Z = \sqrt{R^2 - X^2 - Y^2} \quad (\text{A.4})$$

¹Für $r = R/2$ und $X_M = R/2$ erhält man das Viviani-Fenster.

und somit:

$$\begin{aligned}\frac{\partial Z}{\partial X} &= \frac{-X}{\sqrt{R^2 - X^2 - Y^2}} \\ \frac{\partial Z}{\partial Y} &= \frac{-Y}{\sqrt{R^2 - X^2 - Y^2}}\end{aligned}\quad (\text{A.5})$$

Daher erhält man für den Flächeninhalt der Fläche S :

$$\begin{aligned}S &= 2 \int \int_R \sqrt{1 + \left(\frac{\partial Z}{\partial X}\right)^2 + \left(\frac{\partial Z}{\partial Y}\right)^2} dX dY \\ &= 2 \int \int_R \sqrt{1 + \frac{X^2 + Y^2}{R^2 - X^2 - Y^2}} dX dY \\ &= 2 \int \int_R \frac{R}{\sqrt{R^2 - X^2 - Y^2}} dX dY\end{aligned}\quad (\text{A.6})$$

Die Integrationsgrenzen werden durch die Zylindergleichung (A.2) gegeben:

$$Y = \sqrt{r^2 - (X - X_M)^2} \quad (\text{A.7})$$

mit $X \in [X_M - r, X_M + r]$ und $Y \in [0, \sqrt{r^2 - (X - X_M)^2}]$. Somit gilt für den Flächeninhalt das Integral:

$$S = 4 \int_{X_M - r}^{X_M + r} \int_{Y=0}^{\sqrt{r^2 - (X - X_M)^2}} \frac{R}{\sqrt{R^2 - X^2 - Y^2}} dX dY \quad (\text{A.8})$$

Das innere Integral lässt sich mittels Variablen-Transformation mit $a^2 = R^2 - X^2$ gemäß Bronstein [137] mit

$$\int \frac{1}{\sqrt{a^2 - Y^2}} dY = \arcsin \frac{Y}{a} \quad (\text{A.9})$$

leicht ausführen:

$$\begin{aligned}S &= 4 R \int_{X_M - r}^{X_M + r} \arcsin \frac{Y}{\sqrt{R^2 - X^2}} \Big|_0^{\sqrt{r^2 - (X - X_M)^2}} dX \\ &= 4 R \int_{X_M - r}^{X_M + r} \arcsin \sqrt{\frac{r^2 - (X - X_M)^2}{R^2 - X^2}} dX\end{aligned}\quad (\text{A.10})$$

Für das Viviani-Problem mit $r = R/2$ und $X_M = R/2$ löst man das Integral zu $S = (2\pi - 4) R^2$.

Im vorliegenden allgemeineren Fall ist dies analytisch leider nicht möglich, so dass eine Lösung numerisch unter Delphi programmiert wurde.

Die Integration erfolgte hierbei durch Ober- und Untersummen-Bildung.

Literaturverzeichnis

- [1] Dr. Christoph Glowatz, Institut für Physik der kondensierten Materie, Lehrstuhl für Festkörperspektroskopie, Heinrich-Heine-Universität
- [2] P. Dierkes, Mikrofluorimetrische und elektrophysiologische Untersuchungen des Ca^{2+} -Einstroms durch Ca^{2+} -Kanäle und Neurotransmitter-Rezeptoren in Neuronen und Gliazellen im Zentralnervensystem des medizinischen Blutes, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität (1998)
- [3] Th. Wimmer, C. Fuchs, C. Krysch, H.-D. Martin, D. Schmid, J. Mol. Structure 563-564, 457-461 (2001)
- [4] P. Schulte, Diplom-Biologin, Institut für Neurobiologie, Heinrich-Heine-Universität (2001)
- [5] J. Nicholls, A. Martin, B. Wallace, Vom Neuron zum Gehirn, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1995)
- [6] W. Kilb, Effekte des extra- und intrazellulären pH-Wertes auf Membraneigenschaften und Neurotransmitter-Rezeptoren im Zentralnervensystem des medizinischen Blutes, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität (1998)
- [7] R. Sutherland, Handbook of nonlinear optics, Marcel Dekker Inc. New York (1996)
- [8] P. Fromherz, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 98, 128-131 (1994)
- [9] P. Fromherz, K. Dambacher, H. Ephardt, A. Lambacher, C. Müller, R. Neigl, H. Schaden, O. Schenk, T. Vetter, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 95, 1333-1345 (1991)
- [10] H. Kleinig, P. Sitte, Zellbiologie, Gustav Fischer Verlag Stuttgart (1992)
- [11] R. Klink, S. Silbernagel, Lehrbuch der Physiologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart (2000)
- [12] J. Troe, Bunsen-Magazin 4, 87 (2000)
- [13] S. Neumann, Potentiometrische Messungen zur Volumenregulation im Zentralnervensystem des medizinischen Blutes, Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität (2000)

- [14] A. Lehninger, D. Nelson, M. Cox, Prinzipien der Biochemie, Spektrum Verlag Heidelberg (1994)
- [15] E. Ott, Wissenswertes über CCD-Kameras, Produktinfo PCO (1997)
- [16] L. Strüder, C. v. Zanthier, Phys. Bl. 54, 519-523 (1998)
- [17] J. Ern, Untersuchung von photochromen molekularen Systemen mit fs-auflösender transientser Spektroskopie und quantenchemischen Rechnungen, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität (2000)
- [18] O. Bouevitch, A. Lewis, I. Pinevsky, J. Wuskell, L. Loew, Biophys. J. 65, 672-679 (1993)
- [19] Y. Shen, The principles of nonlinear optics, John Wiley&Sons New York (1984)
- [20] H. Tien, Bilayer Lipid Membranes, Marcel Dekker New York (1974), Chapter 11
- [21] M. Flörsheimer, D. Jundt, H. Looser, K. Sutter, M. Küpfer, P. Günter, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 98, 521-525 (1994)
- [22] M. Flörsheimer, C. Radüge, H. Salmen, M. Bösch, R. Trebrack, H. Fuchs, Thin Solid Films 284-285, 659-662 (1996)
- [23] M. Flörsheimer, M. Bösch, C. Brillert, M. Wierschem, H. Fuchs, Adv. Matter 13, 1061-1065 (1997)
- [24] P. Prasad, Introduction to nonlinear optical effects in molecules and polymeres, John Wiley&Sons New York (1991)
- [25] C. Fuchs, Potentialsensitive NLO-Farbstoffe als Sensoren zur Detektion von Membranpotentialen, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität (1999)
- [26] Th. Wimmer, Detektion von Lipiddoppelschichtmembranpotentialen mittels nichtlinear optischer Spektroskopie, Diplom-Arbeit, Heinrich-Heine-Universität (1997)
- [27] J. Oudar, D. Chemla, J. Chem. Phys. 66, 2664 (1977)
- [28] M. Schrader, S. Hell, J. Appl. Phys., 84, 4033-4042 (1998)
- [29] C. Sheppard, Bioimaging 4, 124-128 (1996)
- [30] I. Liakatas, M. Wong, C. Bosshard, M. Ehrensberger, P. Günter, Ferroelectrics 202, 299 (1997)
- [31] Y. Shen, Nature 337, 519-525 (1989)
- [32] K. Eisenthal, Chem. Rev. 96, 1343-1360 (1996)
- [33] R. Hellwarth, P. Christensen, Optics Commun. 12, 318-322 (1974)

- [34] C. Sheppard, R. Kompfner, J. Gannaway, D. Walsh, IEEE J. Quantum Electron. 13E, 100 (1977)
- [35] Y. Huang, A. Lewis, L. Loew, Biophys. J. 53, 665-670 (1988)
- [36] O. Bouevitch, A. Lewis, I. Pinevsky, J. Wuskell, L. Loew, Biophys. J. 65, 672-679 (1993)
- [37] I. Ben-Oren, G. Peleg, A. Lewis, B. Minke, L. Loew, Biophys. J. 71, 1616-1620 (1996)
- [38] G. Peleg, A. Lewis, M. Linial, L. Loew, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96, 6700-6704 (1999)
- [39] A. Lewis, A. Khatchatourians, M. Treinin, Z. Chen, G. Peleg, N. Friedman, O. Bouevitch, Z. Rothman, L. Loew, M. Sheves, Chem. Phys. 245, 133-144 (1999)
- [40] W. Denk, J. Strickler, W. Webb, Science 248, 73-76 (1990)
- [41] M. Maletic-Savatic, R. Malinow, K. Svoboda, Science 283, 1923-1927 (1999)
- [42] S. Potter, C. Wang, P. Garrity, S. Fraser, Gene 173, 25-31 (1996)
- [43] S. Maiti, J. Shear, R. Williams, W. Zipfel, W. Webb, Science 275, 530-532 (1997)
- [44] K. Niswender, S. Blackman, L. Rohde, M. Magnuson, D. Piston, J. Microsc. 180, 109-116 (1995)
- [45] G. Patterson, S. Knobel, W. Sharif, S. Kain, D. Piston, Biophys. J. 73, 2782-2790 (1997)
- [46] D. Kleinfeld, P. Mitra, F. Helmchen, W. Denk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 15741-15746 (1998)
- [47] D. Wokosin, V. Centonze, S. Crittenden, J. White, Bioimaging 4, 208-214 (1996)
- [48] M. Gu, C. Sheppard, J. Microsc. 177, 128-137 (1995)
- [49] T. Heinz, C. Chen, D. Ricard, Y. Shen, Phys. Rev. Lett. 48, 478-481 (1982)
- [50] P. Campagnola, M. Wei, A. Lewis, L. Loew, Biophys. J. 77, 3341-3349 (1999)
- [51] K. König, P. So, W. Mantulin, E. Gratton, Optics Lett. 22, 135-136 (1997)
- [52] K. König, T. Becker, P. Fischer, I. Riemann, K. Halhuber, Optics Lett. 22, 113-115 (1999)
- [53] L. Loew, Neuroprotocols 5, 72-79 (1994)
- [54] C. Yan, Y. Liu, K. Eisenthal, J. Phys. Chem. B. 102, 6331-6336 (1998)
- [55] V. Montana, D. Farkas, L. Loew, Biochemistry 28, 4536-4539 (1989)

- [56] J. Zhang, R. Davidson, M. Wei, L. Loew, *Biophys. J.* 74, 48-53 (1998)
- [57] L. Moreaux, O. Sandre, M. Blanchard-Desce, J. Mertz, *Opt. Lett.* 25, 320-322 (2000)
- [58] T. Verbiest, S. Elshocht, M. Kauranen, L. Hellmanns, J. Snauwaert, C. Nuckolls, T. Katz, A. Persoon, *Science* 282, 913-915 (1998)
- [59] S. Marder, J. Perry, W. Schaeffer, *Science* 245, 626-628 (1989)
- [60] C. Whitaker, E. Patterson, K. Kott, R. MacMahon, *J. Am. Chem. Soc.* 118, 9966-9973 (1996)
- [61] P. Kenis, O. Noordman, S. Houbrechts, G. van Hummel, S. Harkema, F. Veggel, K. Clays, J. Engbersen, A. Persoons, N. van Hulst, D. Reinhoudt, *J. Am. Chem. Soc.* 120, 7875-7883 (1998)
- [62] I. Albert, T. Marks, M. Ratner, *J. Am. Chem. Soc.* 120, 11174-11181 (1998)
- [63] R. Tykwinski, U. Gubler, R. Martin, F. Dietrich, C. Bosshard, P. Gunter, *J. Phys. Chem. B.* 102, 4451-4465 (1998)
- [64] Y. Guo, P. Ho, H. Savage, D. Harris, P. Sacks, S. Schantz, F. Lui, N. Zhadin, R. Alfano, *Optics. Lett.* 22, 1323-1325 (1997)
- [65] P. Franken, A. Hill, C. Peters, G. Weinreich, *Phys. Rev. Lett.* 7, 118-119 (1961)
- [66] I. Freund, M. Deutsch, *Opt. Lett.* 11, 94-96 (1986)
- [67] S. Roth, I. Freund, *Biopolymers* 20, 1271-1290 (1981)
- [68] I. Freund, M. Deutsch, A. Sprecher, *Biophys. J.* 50, 693-712 (1986)
- [69] R. Gauderon, P. Lukins, C. Sheppard, *Optics Lett.* 23, 1209-1211 (1998)
- [70] J. Gannaway, C. Sheppard, *Opt. Quant. Elect.* 10, 435-439 (1978)
- [71] N. Bloembergen, *Nonlinear Optics*, Addison-Wesley Publishing (1992)
- [72] D. Chemla, J. Zyss, *Nonlinear Optical Properties of Organic Molecules and Crystals*, Academic Press New York (1984)
- [73] S. Marder, D. Beratan, L. Cheng, *Science* 252, 103 (1991)
- [74] M. Blanchard-Desce, V. Alain, P. Bedworth, S. Marder, A. Fort, C. Runser, M. Barzoukas, S. Lebus, R. Wortmann, *Cem. Eur. J.* 3, 1091 (1997)
- [75] M. Kuzyk, C. Dirk, *Phys. Rev. A.* 41, 5098 (1990)
- [76] L. Moreaux, O. Sandre, S. Charpak, M. Blanchard-Desce, J. Mertz, *Biophys. J.* 80, 1568-1574 (2001)
- [77] C. Xu, W. Webb, *J. Opt. Soc. Am. B.* 13, 481-491 (1996)

- [78] C. Xu, W. Zipfel, J. Shear, R. Williams, W. Webb, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93, 10763-10768 (1996)
- [79] J. Diels, W. Rudolph, Ultrashort Laser Puls Phenomena, Academic Press San Diego (1996)
- [80] L. Loew, L. Simpson, Biophys. J. 34, 353 (1981)
- [81] E. Fluhler, V. Burnham, L. Loew, Biochemistry 24, 5749-5755 (1985)
- [82] A. Grinvald, R. Hildesheim, I. Farber, L. Anglister, Biophys. J. 39, 301-308 (1982)
- [83] A. Srivastava, K. Eissenthal, Chem. Phys. Lett. 292, 345-351 (1998)
- [84] T. Ackermann, Physikalische Biochemie, Springer Verlag Berlin (1992)
- [85] N. Bloembergen, P. Pershan, Phys. Rev. 128, 606 (1962)
- [86] G. Boyd, T. Rasing, R. Leite, Y. Shen, Phys. Rev. B. 30, 519-526 (1984)
- [87] C. Chen, T. Heinz, D. Ricard, Y. Shen, Phys. Rev. Lett. 46, 1010-1012 (1981)
- [88] A. Bock, Untersuchungen der Relaxations- und Transportdynamik von exzitoni-schen Zuständen in Polythiophen-Schichten mit Femtosekunden-auflösender tran-sienter Absorptionsspektroskopie, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität (1998)
- [89] J. Reintjes, Nonlinear Optical Parametric Processes in Liquids and Gases, Aca-demic Press Orlando (1984)
- [90] S. Akhmanov, V. Vysloukh, A. Chirkin, Optics of Femtosecond Laser Pulses, Academic Press San Diego (1996)
- [91] P. Butcher, D. Cotter, The Elements of Nonlinear Optics, Cambridge University Press New York (1990)
- [92] L. Zeigler, J. Morais, Y. Zhou, S. Constantine, M. Reed, M. Steiner-Shepaard, D. Lommel, IEEE J. Quantum Electron. 34, 1758-1764 (1998)
- [93] D. Spence, P. Kean, W. Sibbett, Opt. Lett. 16, 42-45 (1991)
- [94] F. Kraus, M. Fermann, T. Brabec, P. Curley, M. Hofer, M. Ober, C. Spielmann, E. Winter, A. Schmidt, IEEE J. Quantum Electron. 28, 2097-2122 (1992)
- [95] C. Spielmann, P. Curley, T. Brabec, F. Kraus, IEEE J. Quantum Electron. 30, 1100-1113 (1994)
- [96] J. Gordon, R. Fork, Opt. Lett. 9, 153-155 (1984)
- [97] R. Fork, O. Martinez, J. Gordon, Opt. Lett. 9, 150-152 (1984)
- [98] E. Hecht, Optik, Addison-Wesley Bonn (1989)
- [99] G. Baldwin, An Introduction to Nonlinear Optics, Plenum Press New York (1969)

- [100] D. Kleinmann, *Phy. Rev.* 126, 1977-1979 (1962)
- [101] J. Conboy, G. Richmond, *J. Phys. Chem. B.* 101, 983-990 (1997)
- [102] J. Zyss, *Molecular Nonlinear Optics*, Academic Press New York (1994)
- [103] G. He, S. Liu, *Physics of Nonlinear Optics*, World Scientific Publishing Singapore (1999)
- [104] M. Göppert-Mayer, *Ann. Physik* 9, 273 (1931)
- [105] W. Liptay, B. Dumbacher, H. Weisenberger, *Z. Naturforsch.* 23a, 1601 (1968)
- [106] W. Liptay, *Angew. Chem.* 6, 195 (1969)
- [107] P. Dragsten, W. Webb, *Biochem.* 17, 5228 (1978)
- [108] J. Smith, *Biochim. Biophys. Acta* 1016, 1 (1990)
- [109] L. Loew, G. Bonneville, J. Surow, *Biochem.* 17, 4065 (1978)
- [110] L. Loew, *J. Am. Chem. Soc.* 116, 151 (1994)
- [111] P. Fromherz, K. Dambacher, H. Ephardt, A. Lambacher, C. Müller, R. Neigel, H. Schaden, O. Schenk, T. Vetter, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 95, 1333 (1991)
- [112] P. Fromherz, A. Lambacher, *Biochim. Biophys. Acta* 1068, 149 (1991)
- [113] C. Frazier, M. Harrey, M. Cockerman, H. Hand, E. Chauchard, C. Lee, *J. Chem. Phys.* 90, 5703 (1986)
- [114] C. Dirk, R. Twieg, G. Wagniere, *J. Am. Chem. Soc.* 108, 5387 (1986)
- [115] C. Fuchs, Synthese von potentialsensitiven NLO-Farbstoffen von Phenylthiethylpyridinium-Typ, Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität (1996)
- [116] B. Levine, C. Betha, *J. Chem. Phys.* 63, 2666 (1975)
- [117] Lösungsmittel nach Maß, Reagenzien Merck
- [118] R. Boyd, *Nonlinear Optics*, Academic Press Boston (1987)
- [119] H. Christen, F. Vögelte, *Organische Chemie Band 3*, Salle & Sauerländer Verlag Frankfurt a.M. (1994)
- [120] G. Adam, P. Läger, G. Stark, *Physikalische Chemie und Biophysik*, Springer Verlag Berlin (1995)
- [121] T. Ackermann, *Physikalische Biochemie*, Springer Verlag Berlin (1992)
- [122] J. Dudel, R. Menzel, R. Schmidt, *Neurowissenschaft*, Springer Verlag Berlin (1996)

- [123] E. Kandel, J. Schwartz, T. Jessell, Neurowissenschaften, Spektrum Verlag Heidelberg (1996)
- [124] M. Birmes, Neuartige membranpotentialsensitive Fluoreszenzfarbstoffe mit Styrylpyridiniumchromophor, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität (1995)
- [125] L. Cohen, B. Salzberg, Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 83, 35-88 (1978)
- [126] A. Waggoner, J. Membr. Biol. 27, 317-334 (1976)
- [127] B. Salzberg, H. Davila, L. Cohen, Nature 246, 508-509 (1973)
- [128] L. Loew, Spectroscopic Membrane Probes Vol. 1, CRC Press Boca Raton (1988)
- [129] A. Grinvald, W. Ross, I. Faber, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 78, 3245-3249 (1981)
- [130] A. Waggoner, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 8, 47 (1979)
- [131] T. Malinski, F. Kiechle, Appl. Fluoresc. Technol. 3, 1 (1991)
- [132] I. Tasaki, A. Watanabe, R. Sandlin, L. Carney, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 61, 883 (1968)
- [133] L. Cohen, B. Salzberg, H. Davila, W. Ross, D. Landwone, A. Waggoner, C. Wang, J. Membr. Biol. 19, 1 (1974)
- [134] H. Ephardt, P. Fromherz, J. Phys. Chem. 93, 7717-7725 (1989)
- [135] V. Krauthamer, W. Ross, J. Neurosci. 4, 673 (1984)
- [136] W. Ross, H. Arechiga, J. Nicholls, Proc. Natl. Acad. Soc. USA. 85, 4075 (1988)
- [137] I. Bronstein, K. Semendjajew, Taschenbuch der Mathematik, Teubner Verlag Leipzig (1989)
- [138] T. Hianik, J. Dlugopolsky, V. Passechnik, D. Sargent, S. Ivanov, Colloids and Surfaces A 106, 109-118 (1996)
- [139] J. Rasaiah, J. Chem. Phys. 75, 4707-4718 (1981)
- [140] R. Buchholz, Elektrophysiologische Untersuchungen zur Volumenänderung identifizierter Neuronen im Zentralnervensystem des medizinischen Blutegels, Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität (1999)
- [141] J. Oudar, J. Chem. Phys. 67, 446-457 (1977)
- [142] P. Günter, Nonlinear Optical Effects and Materials, Springer Verlag Berlin (2000)
- [143] J. Hüser, P. Lipp, E. Niggli, Eur. J. Physiol. 433, 194-199 (1996)
- [144] E. Gross, R. Bedlack, L. Loew, Biophys. J. 67, 208-216 (1994)
- [145] S. Rohr, B. Salzberg, Biophys. J. 67, 1301-1315 (1994)

- [146] D. Dürrer, R. van Dam, G. Freud, M. Janse, F. Meijler, R. Artzbächer, Circulation 41, 899-912 (1970)
- [147] G. Oxford, J. Pooler, T. Narahashi, J. Membr. Biol. 36, 159-173 (1977)
- [148] J. Goodman, Introduction to Fourier Optics, McGraw-Hill Inc. New York (1996)
- [149] R. Bersohn, J. Chem. Phys. 45, 3184-3198 (1966)

Danksagung

Diese Arbeit wurde im Institut für Physik der kondensierten Materie, am Lehrstuhl für Festkörperspektroskopie angefertigt.

Herrn Prof. Dr. D. Schmid danke ich für die freundliche Aufnahme in das Institut und sein soziales Engagement.

Bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. C. Kryschi bedanke ich mich besonders für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit, sowie ihren permanenten Einsatz für ihre Mitarbeiter und unkomplizierte Art auch in lebhaften Phasen der Arbeit.

Herrn Dr. Christoph Glowatz, der bei mathematischen Fragen hochkompetent zur Seite stand, gilt ein herzliches Dankeschön, ebenso wie meinem Laborpartner Thomas Müdder, der das Lasersystem stetz im Griff hatte. Der ständige Informationsaustausch zwischen uns war stets förderlich und erheiternd.

Herrn D. Gherban gilt ein zusätzlicher Dank für seinen Einsatz bei elektronischen und messtechnischen Problemen. Seine ständige Diskussionsbereitschaft ermöglichte effektive Lösungsansätze.

Frau G. Vobis und Herrn M. Nebgen gilt mein Dank für ihre spontane Einsatzbereitschaft bei mechanischen Problemen.

Außerdem möchte ich allen, die zu einer angenehmen Atmosphäre am Institut in den letzten Jahren beigetragen haben danken. Hierzu zählen besonders die Ehemaligen, Herr Dr. Alexander Bock und Herr Dr. Jan Ern, die darüberhinaus eine gelungene Einführung in das Labor vermittelten.

Die ergiebige Zusammenarbeit mit Frau Dr. Ch. Fuchs, die für die Synthese der hier untersuchten Verbindungen verantwortlich war, muss besonders dankend hervorgehoben werden.

Ein besonderer Dank gilt Frau Petra Schulte für die Bereitstellung und Präparation der Blutegeganglien, sowie ihre geduldige interdisziplinäre Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. T. Stumpe danke ich für die Bereitstellung der untersuchten Kardiomyozyten.

Allen bisher nicht erwähnten MitarbeiterInnen der Heinrich-Heine-Universität, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben gilt ebenfalls mein Dank.

Nicht zuletzt möchte ich meinen aller liebsten Dank meiner gesamten Familie aussprechen, ohne deren gemeinsame Unterstützung der erfolgreiche Abschluß dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Dabei gilt mein besonders liebes Dankeschön meinen beiden Frauen Yvonne und Sonja, die mir die nötige Kraft und Motivation besonders in schwierigen Phasen der Arbeit gaben.

Düsseldorf, 30. April 2002

Thomas Wimmer