

Biophotonik: Einblicke in die Zelle

K.-H. Gericke

Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Technische Universität Braunschweig, Hans-Sommer-Str. 10, D-38106 Braunschweig

Wunsch und Möglichkeit

Nachdem das menschliche Genom entschlüsselt wurde, zielen viele Untersuchungen auf die Charakterisierung der Proteine und Enzyme ab, die als chemische Fabriken die molekularen Komponenten innerhalb einer Zelle liefern. Letztlich bestimmen die Prozesse dieser chemischen Substanzen das Verhalten einer Zelle. Daher ist es ein Wunschtraum der Bioanalytik Methoden zu entwickeln, die den Nachweis von biologisch relevanten (niedermolekularen) organischen Substanzen und ihren Wechselwirkungen mit anderen Komponenten des biologischen Systems ohne Eingriff in die natürliche Matrix biologischer Systeme erlauben. Besonders attraktiv wären Tests, bei denen die unmarkierten Biomoleküle oder niedermolekularen Substanzen und deren Interaktionen *in vivo* in mikroskopischen Bereichen intakter biologischer Organismen analysiert werden können. Wegen Ihrer hohen Sensitivität und der Möglichkeit in mikroskopischen Bereichen zu untersuchen, sind insbesondere optische Methoden für *in vivo* Untersuchungen geeignet. Daher sind in jüngster Zeit einige Versuche unternommen worden, optische Analysen auch markerfrei durchzuführen.

So ist es zum Beispiel möglich, routinemäßig den Sauerstoffpartialdruck bei Patienten nicht-invasiv über die spektrale Abhängigkeit des Häm vom Sauerstoffsättigungsgrad zu bestimmen. NADPH und Flavine sind andere niedermolekulare Co-Faktoren deren Fluoreszenzeigenschaften genutzt werden können, um wichtige Stoffwechselprozesse *in vivo* in mikroskopischen Bereichen zu untersuchen.¹ Auch die Primärprozesse der Photosynthese lassen sich sehr gut über die ausgeprägten spektralen Eigenschaften der Chlorophylle und Carotinoide erfassen.^{2,3}

Die konfokale Scanning-Mikroskopie hat hier sehr große Fortschritte gebracht. Bei dieser Technik wird ein Laserstrahl durch ein Mikroskopobjektiv fokussiert und das auftretende Fluoreszenzlicht wird vom selben Objektiv gesammelt und nach spektraler Abtrennung vom anregenden Licht von einem Detektor registriert. Verschiebt man nun rasterartig den Laserstrahl, dann erhält man ein zweidimensionales Bild der Probe. Durch geschicktes Einbringen von Blenden im abbildenden Okular kann auch in der Tiefe einer Probe ein Bild aufgenommen werden, so dass es schließlich möglich ist dreidimensionale Bilder zu erhalten. Begrenzt wird diese Methode durch den Wellencharakter des Lichtes, oder präziser durch Beugungserscheinungen. Danach sind die Grenzen der lateralen Auflösung grob durch die halbe Wellenlänge des Laserlichts gegeben. D.h. ein „grüner“ Laserstrahl um 500 nm ermöglicht die Erkennung von Strukturen bis hinab zu ca. 250 nm. Es wird zwar an sehr trickreichen Methoden gearbeitet, um diese so genannte Abbésche Grenze zu überwinden, jedoch ist eine wirklich praktikable Nachweisttechnik, die diese Limitierung zu kleineren Größen verschiebt, bisher nicht in Sicht.⁴

Wir nutzen zur Anregung von Molekülen ebenfalls Laserlicht, jedoch typischerweise um 800nm, also an der oberen Grenze zum sichtbaren Spektralbereich. Auch mit dieser langwelligen Strahlung können Moleküle, die eigentlich erst bei 400 nm absorbieren, angeregt werden, wenn gleichzeitig zwei Photonen vom Molekül absorbiert werden. Man

spricht in diesem Fall von einer Zweiphotonenanregung oder im Falle der Mikroskopie auch verkürzend von Zweiphotonenmikroskopie. Durch nichtlineare Anregung wird die Auflösung zwar prinzipiell gegenüber der klassischen Einphotonenanregung etwas besser, jedoch durch die längere Anregungswellenlänge dieser Vorteil wieder kompensiert.

Wer einmal die hochauflösenden (und eingefärbten) Bilder einer Elektronenmikroskopaufnahme gesehen hat, wird sich fragen, wozu man überhaupt mit Licht – sei es mit der Einphotonen- oder auch Zweiphotonenanregung - arbeitet und nicht gleich alles mit dem Elektronenmikroskop bei Auflösungen von wenigen Nanometern untersucht. Der Grund hierfür ist in den Beschränkungen zur Aufnahme mittels eines Elektronenmikroskops zu suchen; denn diese Methode ermöglicht nur die Aufnahme von Gewebeschnitten, d.h. die Probe muss aufwändig präpariert werden und Informationen können nur über Oberflächen-aufnahmen gewonnen werden. Aufnahmen aus der Tiefe des Gewebes oder gar *in vivo* Beobachtungen sind nicht möglich.

Die Zweiphotonenmikroskopie wird von unserer Arbeitsgruppe genutzt, um *innerhalb* von biologischen Proben bei einer hohen Eindringtiefe (von mehreren 100 µm) in Volumina von unter einem Femtoliter ($<10^{-15} \text{ dm}^3$) schonende dreidimensionale Untersuchungen durchzuführen.

Damit ein Molekül zwei Photonen gleichzeitig absorbieren kann, müssen die Leistungsdichten besonders hoch sein, d.h. es müssen möglichst viele Photonen pro Zeiteinheit und Fläche vorhanden sein. Viele Photonen bedeutet eine hohe Energie, aber eine zu hohe Energie hat die Zerstörung des zu untersuchenden Gewebes zur Folge. Um diesem Dilemma zu entgehen muss die Energie möglichst klein sein, aber die Zeit, in der die Photonen abgestrahlt werden, muss möglichst kurz sein. Hierzu setzt man einen Laserstrahl ein, der eine mittlere Leistung von nur 10 mW aufweist, was ca. der 10fachen Leistung kleiner handelsüblicher HeNe-Laser entspricht. Diese mittlere Leistung ist zu gering, um die Probe zu schädigen. Nun wird das Licht aber nicht kontinuierlich abgestrahlt, sondern 76 Millionen mal in der Sekunde. Jeder dieser Pulse hat daher nur eine Energie von $10 \cdot 10^{-3} / 76 \cdot 10^6 \text{ Watt Sekunde} = 1,3 \cdot 10^{-9} \text{ Joule} = 1,3 \text{ nJ}$, also grob ein milliardstel Joule. Die zeitliche Länge eines einzelnen Pulses ist aber mit ca. 100 Femtosekunden so kurz, dass jeder dieser 76 Millionen Pulse pro Sekunde eine Leistung (=Energie/Zeit) von $1,3 \cdot 10^{-9} / 100 \cdot 10^{-15} = 13 \cdot 10^3 \text{ Watt}$ oder 13 kW aufweist, also das 130 fache einer uns bekannten hellen Glühlampe von 100 Watt – allerdings nur für diese kurze Zeitspanne von 100 Femtosekunden.

Der Vorteil dieser aufwendigen Technik liegt gerade darin, dass nur im Fokus des Mikroskopobjektivs solch hohe Leistungsdichten auftreten, dass eine Anregung eines Moleküls stattfinden kann. D.h. wenn es zur Zerstörung des Gewebes kommen sollte, dann nur im Fokus des Laserstrahls aber nicht längs des Laserstrahls, also nicht in allen Tiefen des Gewebes. Vor allem detektiert man aber nur Licht von der Fokalregion und nicht außerhalb, wodurch eine intrinsische Tiefenauflösung gewährleistet ist, denn Licht aus höheren oder tieferen Gewebeschichten wird - im Gegensatz zur Einphotonenanregung – nicht emittiert. Die Abbildung 1 veranschaulicht dieses Phänomen. Im linken Bild sieht man die Fluoreszenz einer (schwach konzentrierten) Farbstofflösung in einer Küvette bei der Einphotonenanregung längs des Lichtweges, während im rechten Bild nur Licht aus dem Fokalbereich emittiert wird.

Dem komplexeren Lasermesssystem steht also eine gewebeschonendere Untersuchungsmethode mit sehr guter Tiefenauflösung gegenüber. Ein weiterer wesentlicher Vorteil ist die Verwendung von langwelligem Licht, denn dieses wird vom Gewebe kaum absorbiert, so dass hierdurch Moleküle in tieferen Gewebeschichten angeregt werden können. Aufgrund der Verwendung eines gepulsten Laserstrahls, werden zeitaufgelöste Messungen möglich, d.h. die Dynamik zellulärer Prozesse kann leichter analysiert werden. Im Folgenden sollen einige Resultate zu Prozessen in der Haut, die mit Hilfe dieser Untersuchungstechnik aufgeschlüsselt werden konnten, vorgestellt und diskutiert werden.

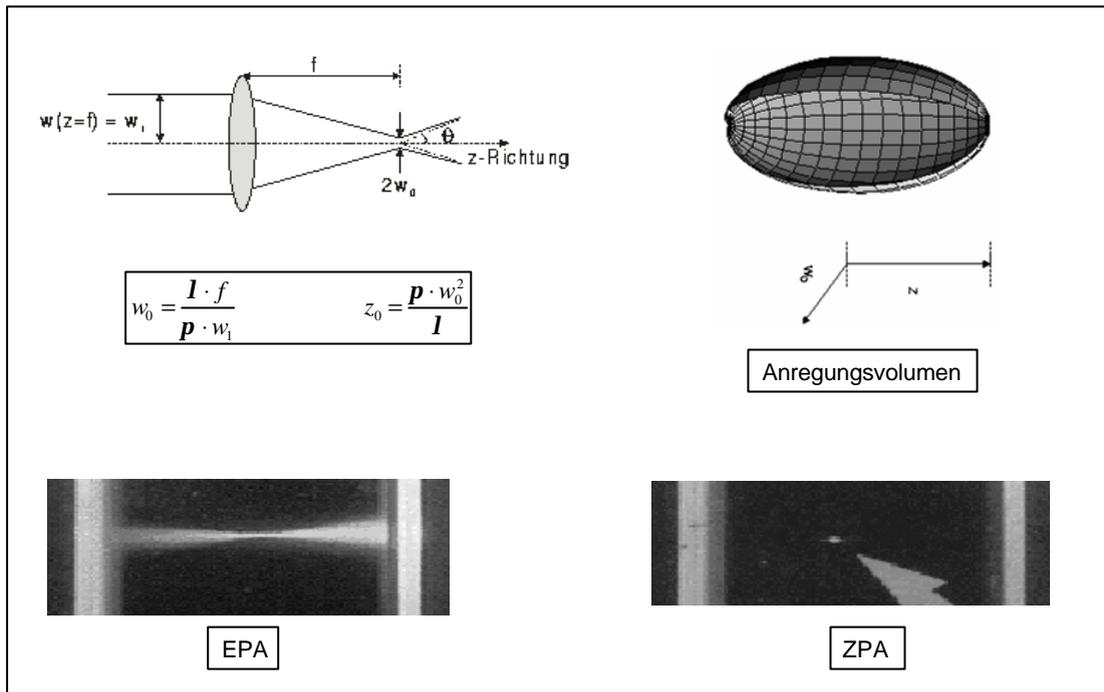


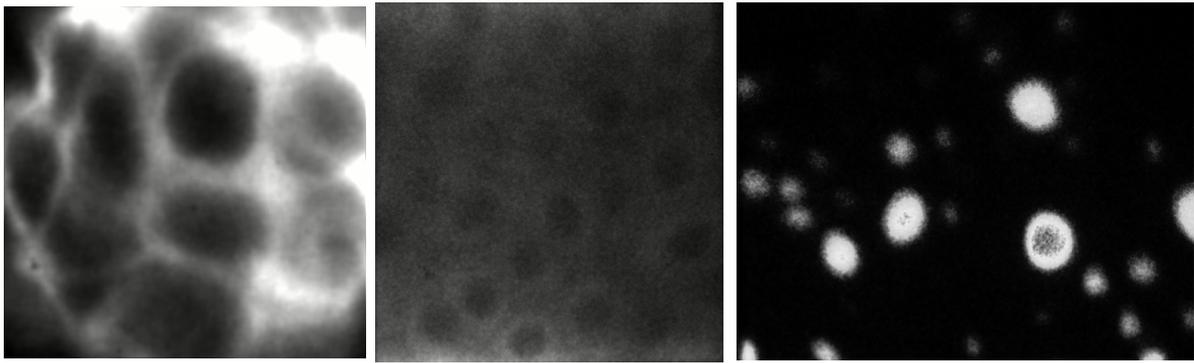
Abb.1: Der Strahldurchmesser im Fokus bestimmt die (laterale) Auflösung. Bei den besten Optiken liegt die Grenze bei ca. $\lambda/2$. Bei der Einphotonenanregung (EPA) werden alle Moleküle längs des Laserstrahls angeregt, während bei der Zweiphotonenanregung (ZPA) nur eine Absorption im Fokalbereich auftritt (s. Pfeil). Daher besitzt die ZPA eine intrinsisch gute Tiefenauflösung. Das Anregungs- und Beobachtungsvolumen entspricht dann einem Ellipsoid (s. oben rechts).

Charakterisierung von Hautkonstrukten mittels Zweiphotonenmikroskopie

Langwelliges Licht um 800 nm dringt besonders tief in das Gewebe ein, so dass hierdurch Untersuchungen im Inneren tiefer gelegener Zellschichten möglich sind. Die erzielbare Tiefe hängt von der gewünschten Auflösung ab. Um noch Auflösungen unterhalb eines Mikrometers zu erzielen, liegt die maximal mögliche Tiefe bei wenigen hundert Nanometern.

Die Abbildung 2 zeigt typische Beispiele von lasermikroskopischen Aufnahmen der menschlichen Haut (Dermis) in unterschiedlichen Tiefen. Im Bild links ist das Stratum corneum gezeigt. Mit zunehmender Tiefe erkennt man die jeweils typischen Strukturen, wie das Stratum granulosum (Abb. 2 Mitte) und das weiter unten liegende Stratum basale (Abb. 2 rechts).

In Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Frau Müller-Goymann (Institut für Pharmazeutische Technologie, TU Braunschweig) wurden Hautkonstrukte hinsichtlich ihrer Struktur analysiert, um detaillierte Einblicke für einen möglichen künstlichen Hautersatz zu erhalten. Der Abb. 3 ist zu entnehmen, dass diese Hautkonstrukte in der Tat einen vergleichbaren Aufbau zur natürlichen menschlichen Dermis besitzen. In den oberen Schichten der Epidermis erkennt man die Keratinocyten (Abb. 3 links), die mit zunehmender Tiefe immer klarer als intakte Zellen zu erkennen sind. In noch tieferen Schichten sind die länglichen Fibroblasten zu erkennen. Diese sind beliebig orientiert, so dass je nach Lage unterschiedliche Ausschnitte bei einer lasermikroskopischen Aufnahme gesehen werden.



Stratum corneum

Stratum granulosum

Stratum basale

Abb.2: Einige lasermikroskopische Aufnahmen der menschlichen Haut in unterschiedlichen Tiefen. Die Struktur der jeweiligen Schichten ermöglicht eine einfache Zuordnung.

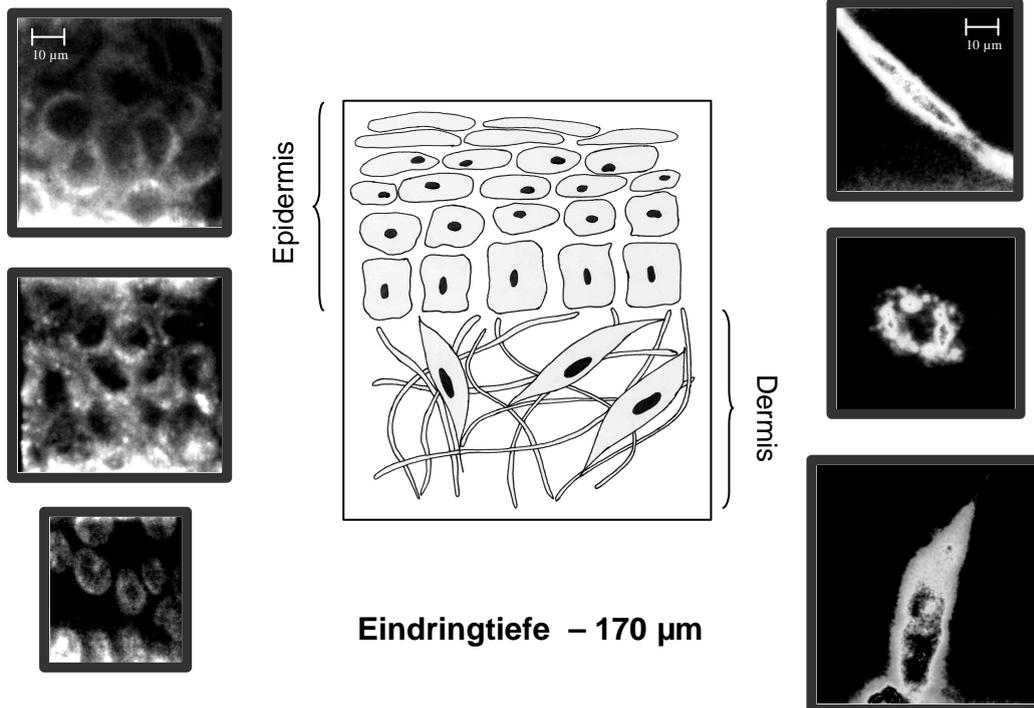


Abb.3: Die Hautkonstrukte zeigen einen vergleichbaren Aufbau wie die natürliche Haut. Auf der linken Seite sind die Keratinocyten zu sehen. Auf der rechten Seite sind Aufnahmen der tiefer liegenden länglichen Fibroblasten zu sehen, die in der Haut – im Gegensatz zur Zeichnung in der Mitte – sehr unterschiedlich orientiert sein können. So ist im mittleren Bild ein Querschnitt zu sehen, während im unteren rechten Bild eine Zelle (zufällig) im Längsschnitt zu beobachten ist.

Für diese Aufnahmen musste nur die Fluoreszenzintensität registriert werden. Im nachfolgenden Abschnitt sollen Beispiele aufgeführt werden, welche zusätzlichen Fortschritte erzielt werden können, wenn auch die Fluoreszenzdauer analysiert wird.

Fluoreszenzlebensdauer und Zellparameter

Die Fluoreszenzlebensdauer eines Chromophors hängt nicht nur vom Molekül, sondern auch von der molekularen Umgebung ab. Die typischen Fluoreszenzlebensdauern liegen im Bereich von einigen hundert bis wenigen tausend Pikosekunden (wenige Nanosekunden). Durch die molekulare Umgebung kann der angeregte elektronische Zustand im Molekül deaktiviert werden, so dass sich die Lebensdauer verkürzt. Es kann aber auch sein, dass beispielsweise die Lebensdauer des Moleküls durch interne Energierumlagerungen (typischerweise ein Übertrag der elektronischen Energie in vibronische Anregung) verkürzt wird. „Dockt“ ein solches Molekül an, dann wird diese interne Energieübertragung unter Umständen verringert und als Folge davon steigt die Fluoreszenzdauer an.

Um diese Effekte bei der Analyse von Zellparametern, wie Brechungsindex n , Viskosität η , pH-Wert, Ca^{2+} -Konzentration, auszunutzen, ist es wichtig, Farbstoffe auszuwählen, deren Fluoreszenzlebensdauer möglichst nur von einem dieser Parameter beeinflusst wird, während die anderen Parameter der molekularen Umgebung den Wert weitgehend unverändert belassen.

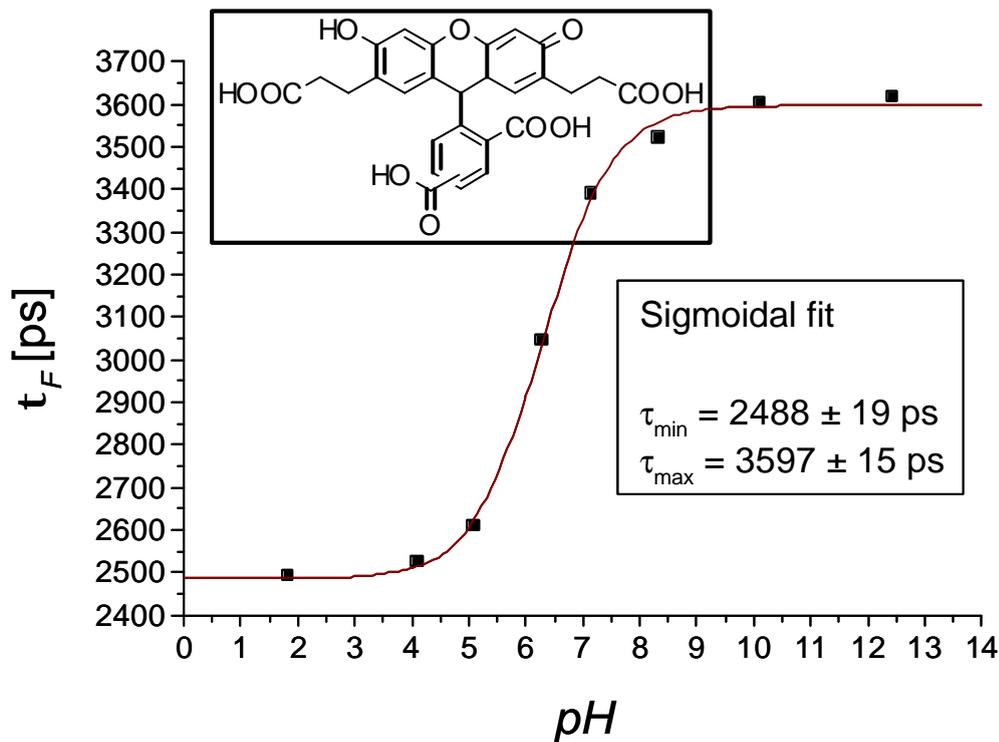


Abb. 4: Die Fluoreszenzlebensdauer des Farbstoffes BCECF (oben) hängt stark und nahezu ausschließlich vom pH-Wert im physiologisch interessanten Bereich um pH 7 ab. Eine Messung der Fluoreszenzlebensdauer ermöglicht daher eine Bestimmung des pH-Wertes mit einer Genauigkeit von ca. 0,01 und dies für jeden Pixel der Kamera, d.h. mit optischer Auflösung von einigen hundert Nanometern.

Ein Beispiel ist der Abb. 4 zu entnehmen. Der Fluorophor 2',7'-bis-(2-Carboxyethyl)-5/6-Carboxyfluorescein (BCECF), dessen Struktur ebenfalls der Abbildung zu entnehmen ist, hat eine Fluoreszenzlebensdauer von ca. 2500 ps bis 3600 ps, je nach pH-Wert. Gerade im physiologisch wichtigen Bereich zwischen pH 6 und pH 8 ändert sich dessen Lebensdauer sehr stark. Das eingesetzte Kamerasystem ist in der Lage, die Fluoreszenzintensität nur

innerhalb eines kurzen Zeitabschnitts von wenigen hundert Pikosekunden aufzunehmen. Verschiebt man nun zeitlich diesen Detektionszeitabschnitt vom unmittelbaren Beginn des anregenden Laserpulses zu späteren Zeiten, also einige tausend Pikosekunden, dann gelingt es, die Fluoreszenzintensität als Funktion der Zeit aufzunehmen. Im einfachsten Fall ergibt sich eine exponentielle Abnahme,

$$I_f = I_0 e^{-t/\tau},$$

aus der die Fluoreszenzlebensdauer τ extrahiert werden kann.⁵ Die erzielbare Genauigkeit ist besser als 20 ps, so dass daher der pH-Wert auf zwei Stellen hinter dem Komma gemessen werden kann.

Dabei ist es wichtig, dass dieser pH-Wert nicht etwa ein integraler Wert aus einem großen Volumen ist, sondern er ist örtlich so weit aufgelöst, wie es die optische Auflösung ermöglicht, d. h. besser als ein Femtoliter, so dass subzelluläre Messungen möglich sind.

Beispiel einer Zellparameter-Messung: 3D-Visualisierung des pH-Wertes

Für die 3D-Visualisierung des pH-Wertes in der Dermis eines künstlichen Hautkonstrukts wurde dieser wie oben ausgeführt mit BCECF angefärbt und dessen Fluoreszenzlebensdauer als idealer pH-Indikator genutzt, um den schützenden Säuremantel der künstlichen Dermis mit Hilfe von FLIM zu charakterisieren. Analog zur menschlichen Dermis ist der pH-Wert der obersten Schicht der künstlichen Dermis niedrig (5,9) nimmt aber in den tieferen Schichten bis zu einem pH-Wert von 7,15 zu. Die qualitative Abhängigkeit des pH-Wertes von der Position der vermessenen dermalen Schicht ist in Abbildung 5 zu erkennen.

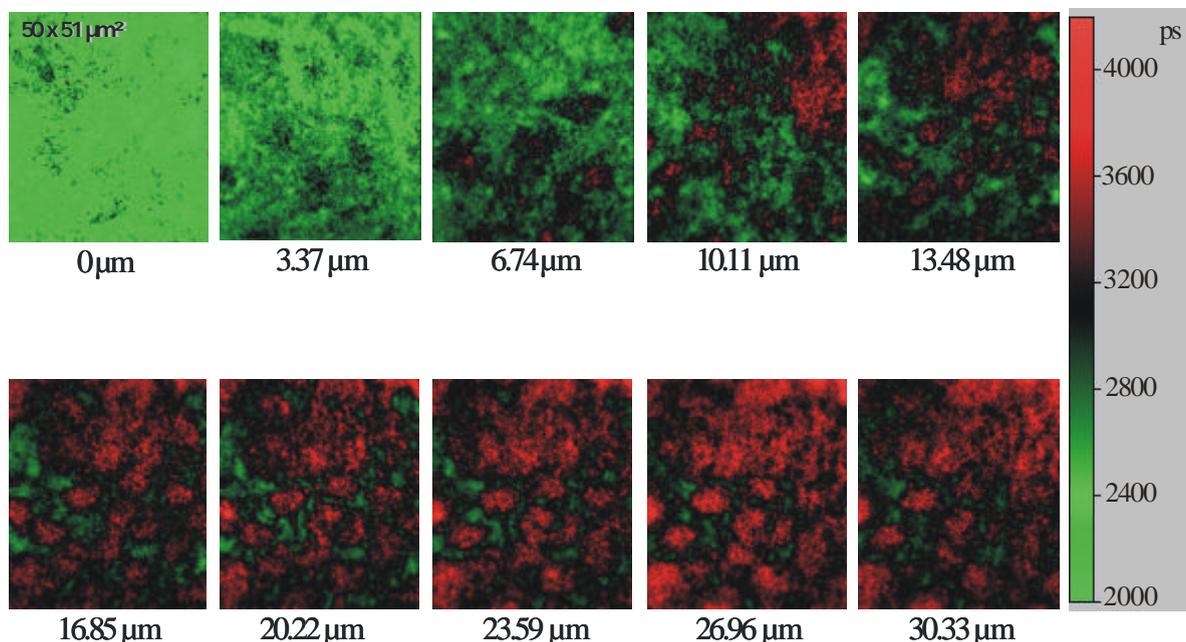


Abb 5: Fluoreszenzlebensdauer-Bilder eines mit BCECF abgefärbten Hautkonstrukts, die in verschiedenen Tiefen z (angegeben in μm) des Gewebes aufgenommen wurden. Die Fluoreszenzlebensdauer nimmt mit steigendem pH-Wert zu. Der pH-Wert in den Zellen erreicht eher, d.h. schon bei geringerer Tiefe, den Neutralwert als die extrazelluläre Matrix

Eine zusätzliche Erkenntnis der 3D-FLIM-Experimenten an mit BCECF angefärbte künstliche Dermis ist, dass die Zunahme des pH-Wertes mit der Tiefe z der dermalen Schicht unterschiedlich in Zellinneren bzw. in der extrazellulären Matrix ist. An der Oberfläche der Dermis

beträgt sowohl der pH-Wert der Zellen als auch der pH-Wert der extrazellulären Matrix ca. 5.9. Der pH-Wert steigt im Zellinneren nach 10 μm Tiefe bis zu einem Wert von 7,2 an und bleibt dann in den tieferen Schichten konstant, während der pH-Wert der extrazellulären Matrix noch stetig zunimmt, jedoch nicht über einen Wert von 6,6. Das Diagramm 6 stellt diese pH-Abhängigkeit quantitativ dar.

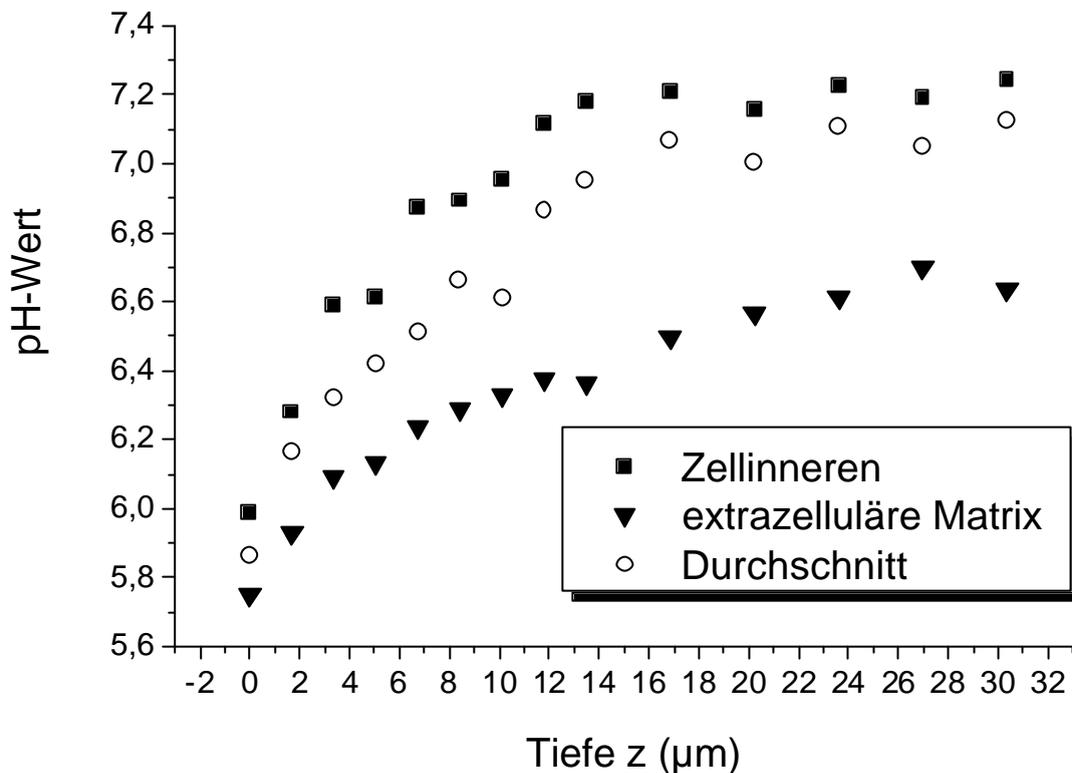


Abb. 6: Quantitative Abhängigkeit des pH-Wertes von der Tiefenposition z der dermalen Schicht.

Das Fluoreszenzlebensdauer-Imaging (FLIM) bietet also die Möglichkeit, Zellparameter, z.B. Brechungsindex, pH-Wert oder Ca^{2+} -Konzentration, mit subzellulärer Auflösung sowohl in Zellen als auch im intakten Gewebe zu messen. Ein wichtiger Vorteil der Fluoreszenzlebensdauerbestimmung ist auch, dass diese nicht vom Grad der Einfärbung abhängig ist, da die Dauer prinzipiell unabhängig von der Intensität gemäß obiger Formel ist.

NADH und NADPH Zellmetabolismus

Ein Einfärben der Zellen ist nicht immer notwendig. So kann die Eigenfluoreszenz bestimmter Moleküle, vor allem die von NADH, NADPH und ATP, genutzt werden, um den Zellmetabolismus näher aufzuklären. Als Beispiel sollen die für die Insulinproduktion verantwortlichen Langerhansschen Zellen analysiert werden. Die Abbildung 7 stellt die NADH und NADPH Eigenfluoreszenz von B-MIN6 Zellen (Langerhanssche Zellen = Pankreaszellen) nach Zwei-Photonen-Anregung bei 760 nm dar. Die Coenzyme NADH und NADPH (kurz NAD(P)H) sind wesentliche Bausteine des Energiehaushaltes der Zelle, die während eines metabolischen Prozesses an Enzymen koppeln und so als Elektronen-Carrier in biochemischen Redox-Reaktionen, z.B. reduktive Biosynthese von Makromolekülen oder ATP-Synthese, fungieren.

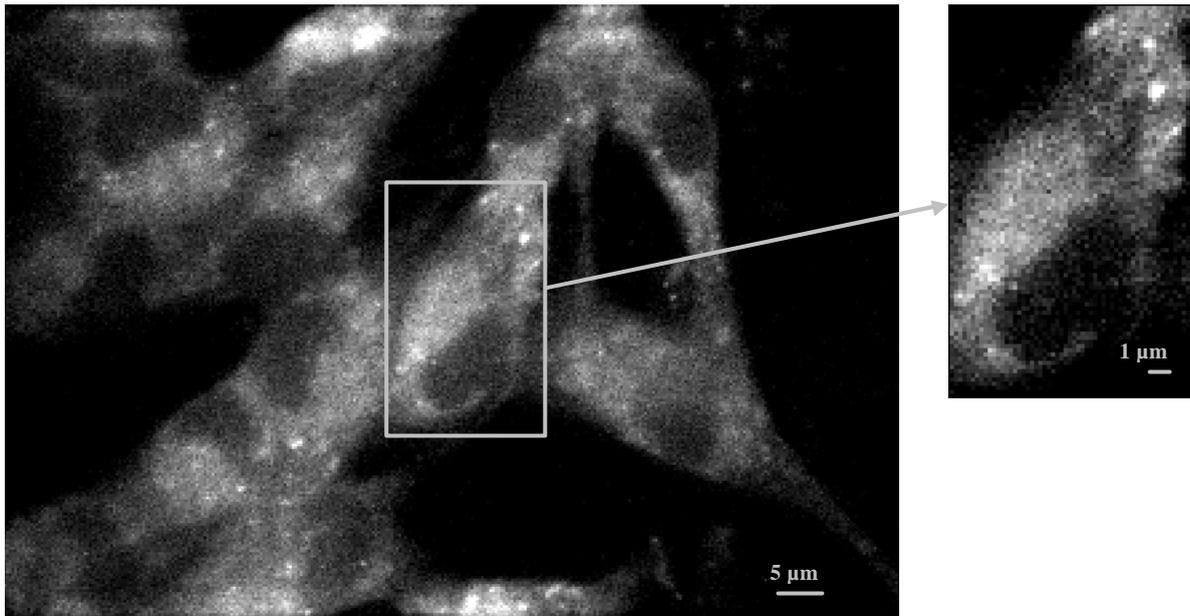


Abb. 7: NADH und NADPH Eigenfluoreszenz von B-MIN6 Zellen (Pankreaszellen) nach Zwei-Photonen-anregung.

Eine sehr hohe NAD(P)H-Fluoreszenzintensität ist in kleinen, punktförmigen Organellen zu beobachten, die den für die Energieproduktion der Zelle zuständigen Mitochondrien zu zuordnen sind, während der Zellkern mit einem sehr geringen NADH und NADPH Anteil dunkel erscheint. Das Cytosol zeigt eine mäßige NAD(P)H-Fluoreszenz.

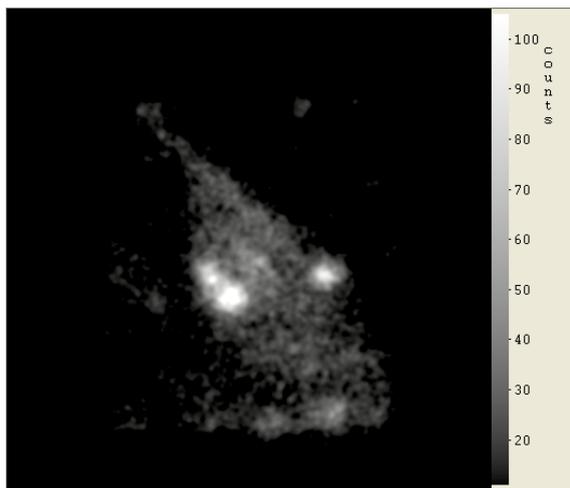
Die Gesamtintensität der NAD(P)H Eigenfluoreszenz gibt Auskunft über die Verteilung der zwei Coenzyme in der Zelle und über die damit verbundenen metabolischen Prozesse. Diese Information ist allerdings nur qualitativ. Eine quantitative Darstellung des NAD(P)H Redox-Metabolismus in der Zelle ist mit Hilfe des Fluoreszenzlebensdauer-Imagings (FLIM) möglich.

Die Fluoreszenzlebensdauer des freien, inaktiven NAD(P)H ($\tau \approx 400$ ps) unterscheidet sich nämlich stark von der Fluoreszenzlebensdauer des enzym-gebundenen NAD(P)H ($\tau \sim 2000$ ps), also jenem NAD(P)H, das sich zu einem metabolischen Prozess gerade beteiligt. Die zeitliche Veränderung der Fluoreszenz ist dann biexponentiell:

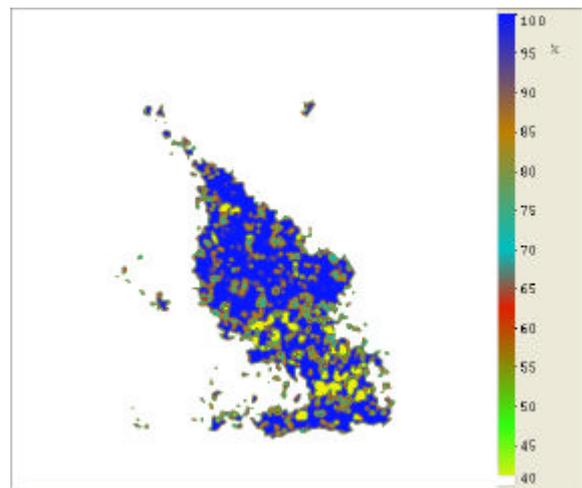
$$I_{fl} = I_{01} e^{-t/\tau_1} + I_{02} e^{-t/\tau_2}.$$

Die Zeiten τ_1 bzw. τ_2 charakterisieren dann das freie bzw. das gebundene NAD(P)H und mit Hilfe von I_{01} und I_{02} erhält man auch deren relativen Anteil. Somit erhält man neben den Fluoreszenzlebensdauer-Bildern des aktiven bzw. inaktiven NAD(P)H auch ein Bild, das den Redox-Zellmetabolismus mit subzellulärer Auflösung widerspiegelt.⁶

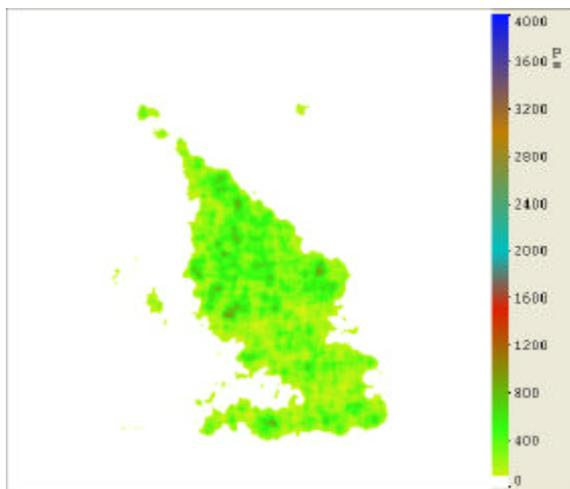
Die Abbildung 8 stellt das Ergebnis der biexponentiellen FLIM Auswertung des NAD(P)H-Eigenfluoreszenzbildes eines humanen dermalen Fibroblasten, der sich in 70 µm Tiefe in einem künstlichen 3D-Hautkonstrukt befindet. Wie erwartet, beträgt die Fluoreszenzlebensdauer des freien NAD(P)H ca. 400 ps, während die Fluoreszenzlebensdauer des enzym-gebundenen NAD(P)H im Durchschnitt bei 2200 ps liegt. Im Fluoreszenzlebensdauerbild des enzymgebundenen NAD(P)H ist eine weite Streuung (über 1000 ps) der Lebensdauerwerte um den Mittelwert zu erkennen, was auf die unterschiedlichen Enzym-NAD(P)H-Komplexe zurückzuführen ist.



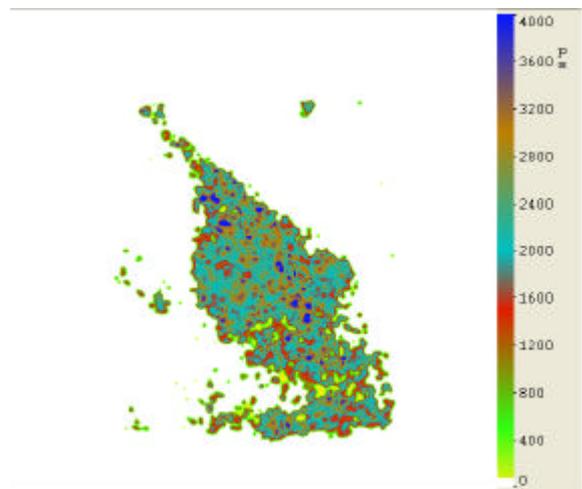
NAD(P)H Eigenfluoreszenz



Anteil des enzymgebunden NAD(P)H



Fluoreszenzlebensdauer des freien NAD(P)H



Fluoreszenzlebensdauer des gebunden NAD(P)H

Abb. 8: Ergebnis der biexponentiellen FLIM Auswertung des Eigenfluoreszenzbildes eines Fibroblasten in einem künstlichen Hautkonstrukt.

Das Bild 8, oben rechts, in dem der relative Anteil des enzymgebundenen NAD(P)H hoch aufgelöst dargestellt ist, spiegelt den NAD(P)H-Metabolismus der Zelle wider.

Die Unterschiede in der Fluoreszenzlebensdauer der NAD(P)H-Enzym-Komplexe, wie sie in wiederholten Experimenten mit verschiedenen Zelltypen beobachtet worden sind, können die Basis neuartiger Messmethoden für den in vivo Nachweis von NADH und NADPH Enzymen darstellen. Ein Beispiel dafür ist der Nachweis des Enzyms NADPH Oxidase (NOX2) aus Neutrophilen (Zellen des Immunsystems), das während der Phagozytose aktiviert wird und somit zur chemischen Zerstörung von Fremdkörper, z.B. Pilze, Bakterien und Viren, beiträgt. Die in Vergleich zu mitochondrialen NAD(P)H-Enzym-Komplexen sehr lange Fluoreszenzlebensdauer des NADPH-NOX2-Komplexes erlaubt eine dynamische und quantitative Beobachtung der Aktivierung von NOX2 mittels biexponentielles FLIM.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass nichtlineare optische Techniken Wesentliches und Neues zur Aufklärung biologischer Phänomene beitragen. So haben wir beispielsweise das Zwei-Photonen FLIM weiterentwickelt, um proteingebundenes NAD(P)H von freiem zu unterscheiden und dies mit subzellulärer Auflösung. Weiterhin können wir grundlegende biophysikalische Parameter von Zellen bestimmen, nicht nur - wie weiter oben gezeigt - den pH-Wert ($\Delta\text{pH} = \pm 0,01$), sondern auch die Ca^{2+} -Konzentration, die Viskosität ($\Delta\eta = \pm 0,002$),

oder den Brechungsindex ($\Delta n = \pm 0,005$), ebenfalls mit subzellulärer Auflösung innerhalb eines Gewebeverbundes.

¹ F.W.D Rost, „Fluorescence Microscopy“, vol II. Cambridge University. (1995) Press, New York, NY.

² Pullerits T. Sundstrom V. “Photosynthetic light-harvesting pigment-protein complexes - toward understanding how and why” [Review]; Accounts of Chemical Research. 29(8):381-389, 1996 Aug. A.

Wehling and P. J. Walla, "Timeresolved Two-Photon Spectroscopy of PS I determines hidden Energy Path Ways", Journal of Physical Chemistry B, 109(38); 24510-24516 (2005).

³ Wehling and P. J. Walla, "Timeresolved Two-Photon Spectroscopy of PS I determines hidden Energy Path Ways", J. of Phys. Chem. B, **109** (38) (2005), 24510-24516.

⁴ Thomas A. Klar, Stefan Jakobs, Marcus Dyba, Alexander Egner, and Stefan W. Hell, "Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission", PNAS 97(15) (2000) 8206-8210;

Kastrup, L., S. W. Hell, "Absolute optical cross section of individual fluorescent molecules." Angew. Chem. Int. Ed. **43** (2004) 6646-6649;

Egner, A., S. W. Hell, "Fluorescence microscopy with super-resolved optical sections." Trends Cell Biol. **15**(4) (2005) 207-215;

Kastrup, L., H. Blom, C. Eggeling, S. W. Hell, "Fluorescence Fluctuation Spectroscopy in Subdiffraction Focal Volumes." Phys. Rev. Lett. . **94**:1 (2005) 78104.

⁵ R. Niesner, W. Roth, and K.-H. Gericke, "Photophysical aspects of single molecule detection by two-photon excitation considering sequential pulsed illumination", Chem. Phys. Chem., **5** (2004) 678-687.

⁶ R. Niesner, B. Peker, P. Schlüsche and K.-H. Gericke, "Non-iterative biexponential fluorescence lifetime imaging in the investigation of cellular metabolism by means of NAD(P)H autofluorescence", Chem. Phys. Chem., **5** (2004) 1141-1149.