

2 Auswertung von FRAP-Experimenten

2.1 Auswertung nach Axelrod

Die Auswertung von FRAP-Experimenten nach AXELROD *et al.* [3] wird noch heute häufig verwendet, da sie relativ leicht durchzuführen ist. Im Folgenden werden die Grundzüge der theoretischen Beschreibung eines FRAP-Experiments nach AXELROD *et al.* dargestellt, dabei wird nur auf seine Überlegungen zur lateralen Diffusion in planaren Lipidmembranen eingegangen.

In der betrachteten Analyse wird von einer zweidimensionalen Membran ausgegangen, die zu einem gewissen Anteil fluoreszenzmarkierte Moleküle enthält. Mit einem starken Laser werden in einem kleinen Bereich – in etwa eine Fläche von $10 \mu\text{m}^2$ – der Membran fluoreszenzmarkierte Moleküle irreversibel gebleicht. Im Folgenden wird die Rückkehr der Fluoreszenzintensität in dem selben Bereich durch einen abgeschwächten Laser gemessen. Aus der Fluoreszenzintensität in der gewählten *Region of Interest* (ROI) als Funktion der Zeit können durch eine Anpassung mit einer geeigneten Funktion Parameter der Mobilität der betrachteten Membran bestimmt werden.

Dabei wird angenommen, dass das Bleichen des Farbstoffes in der Membran als eine irreversible Reaktion erster Ordnung beschrieben werden kann. Für die Konzentration an Fluoreszenzfarbstoffen $C(x, y, t)$ in der Membran gilt damit:

$$\frac{dC(x, y, t)}{dt} = -\alpha I(x, y)C(x, y, t) \quad (2.1)$$

Dabei ist α die Ratenkonstante der angenommenen Reaktion erster Ordnung und $I(x, y)$ das Intensitätsprofil des zum Bleichen verwendeten Lasers. In integrierter Form ergibt sich:

$$C(x, y, t = 0) = C_0 \exp(-\alpha T I(x, y)) \quad (2.2)$$

Dabei ist C_0 die Initialkonzentration an Fluoreszenzfarbstoff in der Membran, die idealerweise unabhängig von der Position auf der Membran ist. T ist die Bleichzeit. AXELROD *et*

al. führen an dieser Stelle einen Bleichparameter K ein, der die Stärke des durchgeführten Bleichens charakterisieren soll. Er ist definiert als:

$$K \equiv \alpha T I(0, 0) \quad (2.3)$$

Für das Intensitätsprofil der verwendeten Laser werden zwei Modelle verwendet: zum einen ein gaußsches Profil und zum anderen eine gleichförmige, kreisförmige Scheibe konstanter Intensität. Zusätzlich wird von zentrosymmetrischen Profilen ausgegangen, so dass die Gleichungen der Konzentrations- und Intensitätsprofile als Funktionen eines Radius r vom Mittelpunkt des Bleichprofils beschrieben werden können. Für ein gaußsches Profil gilt:

$$I(r)_{\text{Gauß}} = \frac{2P_0}{\pi w^2} \exp\left(\frac{-2r^2}{w^2}\right) \quad (2.4)$$

Wobei w die halbe Breite des Pulses bei einer relativen Höhe von e^{-2} und P_0 die initiale Intensität des Lasers ist. Damit ergibt sich aus Gleichung 2.2:

$$C(r, 0) = C_0 \exp\left(-\alpha T \frac{2P_0}{\pi w^2} \exp\left(\frac{-2r^2}{w^2}\right)\right) \quad (2.5)$$

Eine Auftragung gewählter initialer Bleichprofile für verschiedene Werte des Bleichparameters K ist in Abbildung 2.1 zu sehen. Die Entwicklung des Profils lässt sich nun durch das zweite FICKsche Gesetz beschreiben[15]. Die Randbedingungen sind gegeben durch Gleichung 2.5 und $C(\infty, t) = C_0$ Es gilt:

$$\frac{\partial C(r, t)}{\partial t} = D \nabla^2 C(r, t) \quad (2.6)$$

Dabei ist D der Diffusionskoeffizient. Hier wird davon ausgegangen, dass es nur eine diffusive, fluoreszenzmarkierte Spezies gibt und dass die Diffusion über die gesamte beobachtete Fläche isotrop ist.

Beobachtet wird nun das Integral der Fluoreszenz über der gesetzten *Region of Interest*, dabei soll deren Radius dem Parameter w des Modells entsprechen. Das Problem des relativ ungenau bestimmten Parameters w soll später näher untersucht werden. An dieser Stelle sei gesagt, dass dieser Parameter zwar theoretisch aus der Form des Laserprofils zusammen mit der Ratenkonstante des Bleichens und der Bleichzeit bestimmbar ist, in der Praxis allerdings bereits das genaue Laserprofil nicht bekannt ist. Die Wahl dieses Parameters hat großen Einfluss auf die Genauigkeit des am Ende bestimmten Diffusionskoeffizienten D . Eine Möglichkeit diesen Parameter genau zu bestimmen oder möglicherweise komplett zu eliminieren führt zu genaueren Werten für D .

Die beobachtete Fluoreszenz lässt sich beschreiben als:

$$F_K(t) = \frac{q}{V} \int_0^w r C_K(r, t) dr \int_0^{2\pi} d\theta \quad (2.7)$$

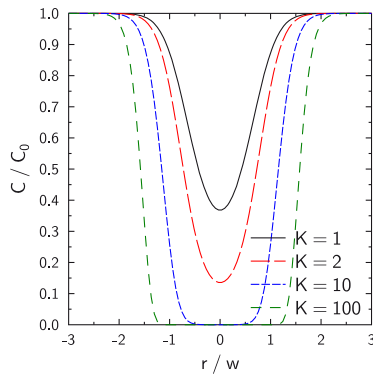


Abbildung 2.1: Auftragung von Bleichprofilen für vier verschiedene Werte des Bleichparameters K .

Dabei ist der Parameter q das Produkt der Quantenausbeuten von Absorption, Emission und Detektion von Licht und V ein Parameter, der die Abschwächung der Lichtintensität zwischen Bleichen und Detektion beschreibt. Für die Fluoreszenz kurz vor und gerade nach dem Bleichen gilt:

$$F_K(t < 0) = \frac{qP_0C_0}{V} \quad (2.8)$$

$$F_K(t = 0) = \frac{qP_0C_0}{V} e^{-K} \quad (2.9)$$

AXELROD *et al.* führen an dieser Stelle eine reduzierte Fluoreszenzregeneration ein, die wie folgt definiert ist:

$$f_K(t) \equiv \frac{F_K(t) - F_K(0)}{F_K(\infty) - F_K(0)} \quad (2.10)$$

Ohne auf die Ableitung genauer einzugehen, soll hier die Lösung der zeitabhängigen Fluoreszenzregeneration in Abhängigkeit des Bleichparameters K dargestellt werden, die als Anpassungsfunktion für experimentell bestimmte Fluoreszenzregenerationen verwendet werden kann um Diffusionskoeffizienten zu bestimmen.

Es gilt:

$$F_K(t) = \frac{qP_0C_0}{V} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-K)^n}{n!} \frac{1}{1 + n \left(1 + \frac{2t}{\tau_D}\right)} \quad (2.11)$$

$$\tau_D \equiv \frac{w^2}{4D} \quad (2.12)$$

Für eine gegebene Fluoreszenzregeneration lässt sich nun eine Anpassung mit einer Funktion wie in Gleichung 2.11 durchführen, aus der die Parameter K und D bestimmt werden

können. Eine andere Möglichkeit ist die Bestimmung der Zeit $\tau_{1/2}$, bei der die reduzierte Fluoreszenzregeneration den Wert 0.5 erreicht. Es gilt dann:

$$D = \frac{w^2}{4\tau_{1/2}} \gamma_D \quad (2.13)$$

Wobei γ_D eine von K abhängige Größe ist, die die Proportionalität zwischen der bestimmten Halbwertszeit und der charakteristischen Diffusionszeit τ_D beschreibt.

Die in Gleichung 2.11 gegebene Beziehung ist nur für die Annahme eines gaußschen Laserprofils bei komplettem Fehlen eines gleichförmigen Flusses in der Membran gültig. Für einen Fluss in der Membran oder bei Vorhandensein eines anderen Laserprofils sind andere Beziehungen nötig. AXELROD *et al.* leiten an dieser Stelle eine Beziehung für ein kreisförmig-gleichmäßiges Laserprofil her, dass später von SOUMPASIS *et al.*[4] entschieden verbessert wurde. Für gaußsche Profile haben YGUERABIDE *et al.*[5] eine Linearisierungsmethode zur Auswertung von FRAP-Experimenten vorgestellt, die es einfacher erlaubt, gleichmäßigen Fluss in der Membran miteinzubeziehen. Im Folgenden sollen aber nur gaußsche Profile betrachtet werden.

2.2 Probleme der Axelrod-Methode

Ein offensichtliches Problem der AXELRODSchen Auswertung ist die Verwendung einer Reihenentwicklung als Anpassungsfunktion, die, wie sich herausstellen wird, ungünstige Eigenschaften hat. Die Funktion aus Gleichung 2.11 besteht im Wesentlichen aus zwei Teilen: den Amplituden A_n und den Basisfunktionen $B_n(t)$:

$$A_n \equiv \frac{(-K)^n}{n!} \quad (2.14)$$

$$B_n(t) \equiv \frac{1}{1 + n \left(1 + \frac{2t}{\tau_D} \right)} \quad (2.15)$$

Die Basisfunktionen sind nicht von K abhängig und haben ein Maximum bei $t = 0$, für steigende Werte n werden die Basisfunktionen also immer kleiner. Wie in Abbildung 2.2 zu sehen ist, sind die Basisfunktionen für verschiedene n aber weder orthogonal zueinander, noch hinreichend unterschiedlich. Dies wirkt sich äußerst ungünstig auf die Konvergenz der unendlichen Reihe in Gleichung 2.11 aus.

Die Amplituden A_n alternieren im Vorzeichen. Sie zeigen im Betrag besonders für große Werte des Bleichparameters K zunächst sehr kleine Werte, steigen dann aber stark an, um anschließend wieder abzufallen. Dabei kann beispielsweise für $K = 20$ der Wert von A_n auf über 10^7 ansteigen. Der am Ende erhaltene Wert für F_K allerdings liegt zwischen 0 und 1. Dies führt zu erheblichen numerischen Problemen bei einer Anpassung gerade für große K .

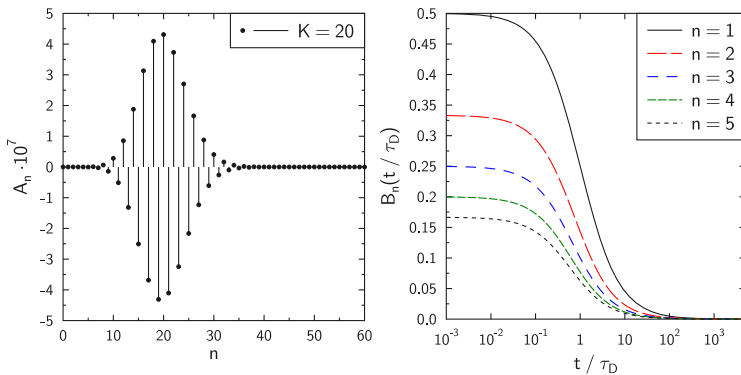


Abbildung 2.2: Links: Auftragung der Amplituden A in Abhängigkeit von n für $K = 20$. Deutlich sichtbar ist zum einen der exponentielle Anstieg der Werte und zum anderen die ungünstige Lage des Maximums bei einem Wert für n größer 0.

Rechts: Auftragung einiger Basisfunktionen gegen die normierte Zeit für verschiedene Werte von n . Die Funktionen sind sich sehr ähnlich und nicht orthogonal zueinander, haben aber ab $n = 1$ einen maximalen Wert bei $t = 0$.

Der für die Berechnung des Diffusionskoeffizienten benötigte Parameter w ist häufig nur durch einen Fit einer angemessenen Bleichprofilfunktion an das Profil sofort nach dem Bleichen bestimmbar oder muss geschätzt werden. Genauere Bestimmungen erfordern parallele Eichexperimente. Durch den quadratischen Eingang von w in die charakteristische Diffusionszeit τ_D führt jede Unsicherheit in w zu einem quadratischen Fehler im Diffusionskoeffizienten. Zusätzlich kann jeder Wert für w durch einen entsprechend gearteten Wert des Diffusionskoeffizienten ausgeglichen werden.¹ Eine erfolgreiche Anpassung der theoretischen Reihenentwicklung an experimentelle Daten ist also kein Garant für einen richtig gewählten Radius der *Region of Interest*.

Ein Ansatz zur Verbesserung der Auswertemethode ist also der Versuch einer genaueren Bestimmung des Radius w aus experimentellen Daten, beziehungsweise die Elimination von w aus den Modellgleichungen.

¹ w und D sind in der Analyse von AXELROD et al. keine getrennten Parameter, die aus dem Experiment in dieser Form bestimmt werden können. Einzig τ_D wird erhalten. Um daraus den Diffusionskoeffizienten zu berechnen, ist eine unabhängige Abschätzung der Pulsbreite w nötig. Ungenaue Werte für w führen damit zu falschen Werten für D , ohne die Güte der Anpassung zu beeinträchtigen.

2.3 FRAP-Auswertung mit vereinfachtem Bleichprofil

In ihrer Auswertung gehen AXELROD *et al.* von einem gaußschen Profil für die Laserintensität aus und modellieren die Fluoreszenzfarbstoffkonzentration nach dem Bleichen durch eine irreversible Reaktion erster Ordnung. Dies führt bei großen Laserintensitäten, großen Ratenkonstanten α oder langen Bleichzeiten zu einem resultierenden Profil, das stark von einer Gaußfunktion abweicht. Die Beschreibung der zeitlichen Entwicklung eines solchen Profils ist relativ schwierig und führt zu dem komplizierten Reihenausdruck für die Fluoreszenzregeneration in Gleichung 2.11. Geht man hingegen von kurzen Bleichzeiten und gleichzeitig von relativ kleinen Laserintensitäten aus, so bleibt bei einem Laser gaußscher Intensitätsverteilung auch das Bleichprofil annähernd gaußsch. Nach AXELROD gilt:

$$C(r, 0) = C_0 \exp \left(-\alpha T \frac{2P_0}{\pi w^2} \exp \left(\frac{-2r^2}{w^2} \right) \right) \quad (2.16)$$

Es gilt des Weiteren für kleine x :

$$\exp(-x) \approx 1 - x \quad (2.17)$$

Außerdem wird durch Diffusion jedes zentrosymmetrische Bleichprofil nach hinreichend langer Zeit näherungsweise gaußsch. Zur vereinfachten Analyse eines FRAP-Experiments soll daher nur noch von einem Bleichprofil ausgegangen werden, das die Form einer Gaußfunktion besitzt.

Zunächst wird nicht die Konzentration an Farbstoffmolekülen in der Membran betrachtet, sondern deren komplementäre Konzentration, die im Wesentlichen die Konzentration an gebleichten fluoreszenzmarkierten Molekülen – Konzentration an „Löchern“ – ist.

Es gilt zu jedem Zeitpunkt:

$$C_{\text{Hole}} + C_{\text{Dye}} = C_0 \quad (2.18)$$

Das anfängliche, gaußsche Bleichprofil lässt sich gedanklich aus der Diffusion eines δ -Impulses während einer Präparationszeit t_p erzeugen. Es gilt dann für das Bleichprofil:

$$C_{\text{Hole}}(r) = \frac{A}{4\pi D t_p} \exp \left(\frac{-r^2}{4D t_p} \right) \quad (2.19)$$

Wobei A die Gesamtfläche der Gaußfunktion und D der Diffusionskoeffizient ist. t_p ist eine zunächst nicht näher bestimmte "Präparationszeit", die unter einem gegebenen Diffusionskoeffizienten und einer gegebenen Gesamtfläche nötig ist, um aus einem δ -Impuls allein durch Diffusion nach dem zweiten FICKschen Gesetz das gewünschte Bleichprofil zu erhalten. Gleichung 2.19 ist dabei eine zweidimensionale Gaußfunktion der Standardabweichung $\sigma = \sqrt{2D t_p}$ und dem Mittelwert $\mu = 0$. Anschaulich ist dies in Abbildung 2.3 dargestellt.

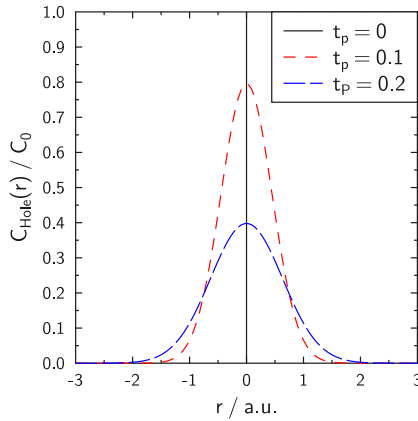


Abbildung 2.3: Auftragung von Gaußfunktionen nach Gleichung 2.19 für $D = 1$ und $A = 1$ ausgehend von einer δ -Funktion für verschiedene t_d .

Die zeitliche Entwicklung einer gaußschen Konzentrationverteilung gemäß dem zweiten FICKschen Gesetz ist leicht beschreibbar als:

$$C_{\text{Hole}}(r, t) = \frac{A}{4\pi D(t_p + t)} \exp\left(\frac{-r^2}{4D(t_p + t)}\right) \quad (2.20)$$

Für die komplementäre Konzentration gilt entsprechend Gleichung 2.18:

$$C_{\text{Dye}}(r, t) = C_0 - \frac{A}{4\pi D(t_p + t)} \exp\left(\frac{-r^2}{4D(t_p + t)}\right) \quad (2.21)$$

2.3.1 Analogie zur Axelrodschen Auswertung

Entsprechend der Prozedur in AXELRODS Auswertung wäre die zu berechnende Größe das Integral der Konzentration $C_{\text{Dye}}(r, t)$ bis zu einem bestimmten Radius w in einer *Region of Interest*. Dazu wäre zunächst zu bestimmen, wie groß der Parameter w ist. Aus

$$C_{\text{Dye}}(r = 0, t = 0) \cdot e^{-2} = C_{\text{Dye}}(r = w, t = 0)$$

erhält man:

$$w = \sqrt{8Dt_p} \quad (2.22)$$

Um einen Ausdruck für die Fluoreszenzregeneration mit dem vereinfachten Bleichprofil zu finden, wird dieses in Polarkoordinaten mit $r = 0$ im Zentrum des Bleichprofils integriert. Integriert wird dabei bis zu einem Radius r_B . Mit $d\vec{r} = r dr d\theta$ gilt:

$$F_K(t) = \iint_{|\vec{r}| \leq r_B} C_{Dye}(\vec{r}, t) d\vec{r} = \int_0^{r_B} r C_{Dye}(r, t) dr \int_0^{2\pi} d\theta \quad (2.23)$$

Für zentrosymmetrische Bleichprofile reduziert sich das zweite Integral auf 2π . Daher:

$$F_K(t) = 2\pi \int_0^{r_B} r C_0 dr - \frac{2A}{4D(t_p + t)} \int_0^{r_B} r \exp\left(\frac{-r^2}{4D(t_p + t)}\right) dr \quad (2.24)$$

Das erste Integral ist leicht lösbar, das zweite tabelliert.[16] Man erhält:

$$F_K(t) = 2\pi \left[\frac{1}{2} r^2 C_0 \right]_0^{r_B} - \frac{2A}{4D(t_p + t)} \left[-2D(t_p + t) \exp\left(\frac{-r^2}{4D(t_p + t)}\right) \right]_0^{r_B} \quad (2.25)$$

Und damit insgesamt:

$$F_K(t) = \pi r_B^2 C_0 + A \left[\exp\left(\frac{-r_B^2}{4D(t_p + t)}\right) - 1 \right] \quad (2.26)$$

Als Fluoreszenzabfall in komplementärer Konzentration erhält man:

$$\tilde{F}_K(t) = A - A \exp\left(\frac{-r_B^2}{4D(t_p + t)}\right) \quad (2.27)$$

Prinzipiell ließen sich Gleichungen 2.26 und 2.27 an experimentell erhaltene Fluoreszenzregenerationen bzw. -abfälle anpassen um Diffusionskoeffizienten und Präparationszeiten zu bestimmen. Gegenüber der bisherigen Auswertung nach AXELROD ist die numerisch äußerst ungünstige Reihenentwicklung entfernt, der Fit wird mit einer analytischen Funktion durchgeführt. Dies bringt numerische Vorteile, allerdings muss der Diffusionskoeffizient nach wie vor durch eine Anpassung der Daten an ein relativ schlecht passendes Modell bestimmt werden.

Ziel ist es jetzt, die Anpassungen an Kurvenprofile basierend auf Modellannahmen zu eliminieren und stattdessen charakteristische Parameter ohne Anpassung zu bestimmen.

2.3.2 Berechnung von Flächenmomenten zur Bestimmung charakteristischer Parameter

Der Erwartungswert ist ein Mittelwert einer Verteilungsdichte. Er ist definiert als[17]:

$$\langle g(X) \rangle \equiv \int_{-\infty}^{\infty} dx f(x) g(x) \quad (2.28)$$

Dabei ist $f(x)$ die Verteilungsdichte. Für $g(x) = x^n$ bezeichnet man die speziellen Erwartungswerte auch als Momente einer Verteilung.

Die Normalverteilung hat durch ihre Symmetrie die besondere Eigenschaft, dass alle ungeraden, zentrierten Momente, also jene Momente der Normalverteilung, die im Ursprung zentriert sind, verschwinden.[17] Die Normalverteilung selbst ist eindeutig durch zwei Momente definiert: Das erste Moment, das den Schwerpunkt der Verteilung liefert, und das zweite Moment, das die Standardabweichung der Verteilung liefert. Im Falle einer zentrierten Verteilung verschwindet das erste Moment. Alle anderen Momente, sofern sie nicht verschwinden, sind Funktionen der Standardabweichung.

Alle Kumulanten, eine weitere Kenngröße von Verteilungsdichten, ab der dritten Ordnung verschwinden für die Normalverteilung. Die Kumulanten erster und zweiter Ordnung entsprechen den Momenten erster und zweiter Ordnung.

Es stellt sich die Frage, ob die Berechnung von Momenten einer Konzentrationsverteilung von Farbstoffmolekülen, wie sie bei der Auswertung von FRAP-Experimenten auftauchen, interessante Informationen über Mobilitätsparameter liefern kann. Möglicherweise kann das Moment der Fluoreszenzkonzentrationsverteilung auch dazu dienen, die Breite eines Bleichprofils für jede Zeit t zu bestimmen.

Für eine allgemeine Verteilung $f(\vec{r})$ berechnet sich das n -te Moment als:

$$M_n = \iint_{-\infty}^{\infty} \vec{r}^n f(r) d\vec{r} \quad (2.29)$$

Für zentrosymmetrische Verteilungen erhält man:

$$M_n = 2\pi \int_0^{\infty} r^{n+1} f(r) dr \quad (2.30)$$

Es sollen an dieser Stelle zunächst die Momente der komplementären Konzentration der Farbstoffmoleküle berechnet werden, also der Konzentration der gebleichten Moleküle. Diese wird durch die in Gleichung 2.20 gegebene zweidimensionale Gaußfunktion beschrieben.

Alle zu lösenden Integrale sind von der Form[18]:

$$\int_0^{\infty} x^n e^{-ax^2} dx = \begin{cases} \frac{(2k-1)!!}{2^{k+1}a^k} \sqrt{\frac{\pi}{a}} & \text{wenn } n = 2k \\ \frac{k!}{2a^{k+1}} & \text{wenn } n = 2k+1 \end{cases} \quad (2.31)$$

Dabei ist $k!!$ das Produkt aller ungeraden Zahlen bis k und $k \in \mathbb{N}$.

Im Folgenden sind die ersten fünf Momente angegeben.

$$M_0 = A \quad (2.32)$$

$$M_1 = A\sqrt{\pi D(t_p + t)} \quad (2.33)$$

$$M_2 = 4AD(t_p + t) \quad (2.34)$$

$$M_3 = \frac{3}{4}\sqrt{\pi}A(\pi D(t_p + t))^{\frac{3}{2}} \quad (2.35)$$

$$M_4 = 32AD^2(t_p + t)^2 \quad (2.36)$$

Diese Rohmomente können durch das 0. Moment – die Gesamtfläche der Gaußfunktion – geteilt werden, um so normierte Momente zu erhalten, die nicht mehr von der Gesamtintensität der Gaußfunktion abhängen. Normierte Momente sind allein von der Form der Funktionen abhängig. Für die Auswertung von FRAP-Experimenten mit gaußschen Bleichprofilen bringt das den Vorteil der Unabhängigkeit von der Intensität des zum Bleichen verwendeten Lasers und somit der Tiefe des erzeugten Bleichprofiles. Die normierten Momente sind gegeben als:

$$\frac{M_n}{M_0} \equiv m_n \quad (2.37)$$

Für die ersten fünf normierten Momente gilt:

$$m_0 = 1 \quad (2.38)$$

$$m_1 = \sqrt{\pi D(t_p + t)} \quad (2.39)$$

$$m_2 = 4D(t_p + t) \quad (2.40)$$

$$m_3 = \frac{3}{4}\sqrt{\pi}(\pi D(t_p + t))^{\frac{3}{2}} \quad (2.41)$$

$$m_4 = 32D^2(t_p + t)^2 \quad (2.42)$$

Aus den Ausdrücken für die normierten Momente ergibt sich leicht sichtbar eine einfache Möglichkeit Diffusionskoeffizienten und t_p aus Achsenabschnitt und Steigung einer geeignet linearisierten Auftragung zu bestimmen. Das erste oder zweite normierte und zentrierte Moment einer zweidimensionalen Konzentrationsverteilung an fluoreszenzmarkierten Molekülen für verschiedene Zeiten wird bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Eine Anpassung an die theoretischen Gleichungen für ebenjene Momente gibt direkt den Diffusionskoeffizienten D und die Präparationszeit t_p , die beispielsweise im zweiten normierten Moment als Ordinatenabschnitt auftaucht. Die Steigung ist unabhängig von dem fiktiven Parameter t_p und allein vom Diffusionskoeffizienten D bestimmt. Es stellt sich an dieser Stelle jedoch die Frage, ob eine solche Form der Auswertung auch in der Praxis realisierbar ist.

Eine solche Auswertung hätte mehrere Vorteile gegenüber jener von AXELROD. Zum Einen ist der Zeitpunkt des Bleichens nicht mehr notwendigerweise genau zu bestimmen. Eine

Theorie und Design von FRAP-Experimenten auf
komplexen Geometrien

Savić, F.

2015, XII, 100 S. 46 Abb., Softcover

ISBN: 978-3-658-08946-7