

Hochempfindliche Schwingungsmikrospektroskopie

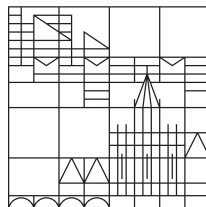
Aufbau eines anwendungsorientierten CARS
Experiments und Entwicklung eines Ansatzes zum
Erreichen der Einzelmolekülsensitivität

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Martin Josef Winterhalder

an der

Universität
Konstanz



Mathematisch-Naturwissenschaftliche Sektion
Fachbereich Chemie

Tag der mündlichen Prüfung: 19.09.2013

1. Referent: Herr Prof. Dr. A. Zumbusch

2. Referent: Herr Prof. Dr. U. E. Steiner

Vorsitzende der Prüfungskommission: Frau Prof. Dr. K. Hauser

Inhaltsverzeichnis

I. CARS Mikroskopie	1
1. Einleitung	3
1.1. Motivation	3
1.2. Stand der Forschung	7
1.3. Die Gliederung dieser Arbeit	10
2. Theoretische Grundlagen	13
2.1. Phänomenologische Beschreibung nichtlinear optischer Prozesse	13
2.2. Das CARS Signal	17
2.2.1. Phasenanpassung in der CARS Mikroskopie	18
2.2.2. Die Suszeptibilität dritter Ordnung $\chi_{\text{CARS}}^{(3)}$	18
3. Aufbau eines CARS Mikroskops und erste Anwendungen	23
3.1. Anregungsquellen	24
3.1.1. Der optisch parametrische Oszillator	24
3.1.2. Der Ti:Saphir Laser	27
3.2. Synchronisation und zeitliche Überlappung der Anregungsquellen	34
3.2.1. Der OPO und dessen Pumpquelle: Bestimmung der “Zeit Null”	34
3.2.2. Zeitliches Rauschen in modengekoppelten Lasern und Synchronisation solcher Systeme	36
3.3. Der Anregungsstrahlengang	39
3.4. Das Multiphotonen Mikroskop	43
3.5. CARS Experimente an Membranmodellen	46
3.6. CARS Experimente an Mikroorganismen	52
3.6.1. Spektrale Selektivität der CARS Mikroskopie am Beispiel deuterierter Escherichia coli	53
3.6.2. Abbildung der Organisation und des Verhaltens von Mykobakterien in Biofilmen	54

3.7.	CARS Mikroskopie zur Verfolgung von Bewegung in Zellen auf allen biologisch relevanten Zeitskalen	57
3.8.	CARS Mikroskopie an <i>Caenorhabditis elegans</i>	62
3.9.	CARS Experimente am Zentralen Nervensystem	66
3.9.1.	CARS Mikroskopie an murinen Hirngewebeschnitten	67
3.9.2.	Multimodale Mikroskopie von Rückenmarksverletzungen	73
4.	Weitfeld CARS Mikroskopie unter nicht-phasenangepasster Anregungsgeometrie	79
4.1.	Motivation und Ansatz für ein CARS Experiment mittels Totalreflexion .	79
4.1.1.	Der Aufbau zur Totalreflexionsmikroskopie	82
4.1.2.	Von TIR Experimenten zur Weitfeld CARS Mikroskopie	84
4.2.	Weitfeld CARS Mikroskopie	86
4.2.1.	Weitfeld CARS Mikroskopie - Stand der Forschung 2009	86
4.2.2.	Das Weitfeld CARS Mikroskop	87
4.2.3.	Untersuchungen zur nicht-phasenangepassten Weitfeld CARS Mikroskopie	88
4.3.	Zusammenfassung	92
II.	Neuer Ansatz zur Schwingungsmikrospektroskopie auf Einzelmolekülniveau	95
5.	Einleitung	97
5.1.	Stand der Forschung	97
5.2.	Die schwingungsselektive elektronische Anregung	101
6.	Theoretische Betrachtung des Experiments	103
6.1.	Die Idee zum Experiment	103
6.2.	Erzeugung der Schwingungspopulation	105
6.2.1.	Vergleich der Methoden zur selektiven Erzeugung einer Schwingungspopulation	105
6.2.2.	Theoretische Beschreibung der Wechselwirkung von Photon und Quantensystem	110
6.3.	Der Abfrage-Prozess	128
6.4.	Abschätzung des zu erwartenden Fluoreszenzsignals	130
6.5.	Hintergrundquellen	132
6.5.1.	CARS	132

6.5.2. Zwei-Photonen angeregte Fluoreszenz	133
6.5.3. Anti-Stokes Fluoreszenz	135
7. Experimentelle Umsetzung	137
7.1. Anregungsquellen	138
7.1.1. Anforderungen an die Anregungsquellen	138
7.1.2. Die Anregungsquellen	138
7.1.3. Der Anregungsstrahlengang	139
7.2. Das Mikroskop	142
7.2.1. Anforderungen an das Mikroskop	142
7.2.2. Der resultierende Aufbau	143
7.3. Die Fluorophore	146
7.3.1. Anforderungen an die Fluorophore	146
7.3.2. Pyrrolopyrrol-Cyanine: NIR-Fluorophore für die Einzelmolekül- spektroskopie	147
7.4. Nichtlineare Optik an Nanopartikeln	150
7.5. Erste Einzelmolekülexperimente	151
7.6. Reduzierung des spezifischen Hintergrunds	152
7.6.1. Hintergrund durch CARS	154
7.6.2. Hintergrund durch Fluoreszenz	154
7.7. Anti-Stokes Fluoreszenz auf Einzelmolekülniveau	158
7.8. Die Problematik beim weiteren Vorgehen und Diskussion des Ansatzes .	163
 Zusammenfassung	 169
8. Zusammenfassung	169
Literaturverzeichnis	194
Begutachtete Publikationen	195
Danksagungen	197

Teil I.
CARS Mikroskopie

Kapitel 1.

Einleitung

1.1. Motivation

Die optische Mikroskopie wird sowohl in den Bio- als auch Materialwissenschaften zur Bildgebung verwendet und ist sicher eines der wichtigsten Werkzeuge für Studien der mikroskopischen Welt. Hierbei kommt eine große Vielfalt an Verfahren zur Kontrasterzeugung zum Einsatz. Die 1904 von August Köhler erstmals verwendete Fluoreszenzmikroskopie sticht hierbei besonders hervor.^[1] Die Fluoreszenzmikroskopie bietet eine sehr hohe Sensitivität. Heutzutage werden selbst Einzelmolekülexperimente bei Raumtemperatur routinemäßig durchgeführt.^[2] Größtenteils werden fluoreszierende Marker, die zum Zwecke der Beobachtung in die Probe eingebracht werden, eingesetzt. Die Autofluoreszenz intrinsischer Fluorophore spielt nur eine geringe Rolle. Die Entwicklung der Fluoreszenzmarker reicht von klassischen, organischen Farbstoffmolekülen über Halbleiternanopartikel hin bis zu fluoreszierenden Proteinen.^[3-6] Für die Entdeckung und Weiterentwicklung letzterer wurden Shimomura, Chalfie und Tsien 2008 mit dem Chemienobelpreis gewürdigt.

Die Fluoreszenzmikroskopie bietet eine Vielzahl unterschiedlichster Methoden. So können beispielsweise mittels mehrfarbiger Experimente die Kollokalisierung oder durch FRET (Förster-Resonanz-Energie-Transfer) Abstände markierter Probenbestandteile ermittelt werden.^[7,8] Auch die Fluoreszenzkorrelationspektroskopie bietet u.a. die Möglichkeit des Nachweises der Wechselwirkung von Probenbestandteilen.^[9,10] Die mit der Fluoreszenz verknüpften spektralen Charakteristika einzelner Fluorophore wie Emissionswellenlänge, Fluoreszenzquantenausbeute und -lebensdauer können durch den Einfluss ihrer direkten Umgebung variiert werden. Veränderungen des pH-Werts, Ionenkonzentrationen und dergleichen können so *in vivo* nachgewiesen werden.^[11]

Auf der Seite der technischen Entwicklung sind sicher die konfokale Mikroskopie und die Multiphotonenanregung, durch welche vor allem die axiale Auflösung verbessert und somit eine 3-dimensionale Abbildung der Probe ermöglicht wurden, zu nennen.^[12-14] Letztere wurde wiederum erst durch neue Lichtquellen ermöglicht (s.u.). Während die räum-

liche Auflösung bei der konventionellen Lichtmikroskopie noch durch das Beugungslimit nach Ernst Abbe auf die Größenordnung der verwendeten Wellenlängen beschränkt ist, können mittels verschiedener Verfahren laterale Auflösungen von wenigen Nanometern erreicht werden. Hierfür können zum einen evaneszente Anregungsfelder genutzt werden, z.B. beim optischen Rasternahfeldmikroskop (scanning nearfield optical microscope, SNOM).^[15,16] Das nichtlinear optische Verhalten von Fluorophoren kann ebenfalls zur Erhöhung der räumlichen Auflösung verwendet werden. Unter dem Akronym RESOLFT (REversible Saturable OpticaL Fluorescence Transitions) sind entsprechende Techniken wie die STED (STimulated Emission Depletion) Mikroskopie und die GSM (Ground State Depletion) Mikroskopie zusammengefasst.^[17] Selbst offensichtliche Nachteile fluoreszenzbasierter Mikroskopiemethoden wie Photobleichen und der reversible Übergang in Dunkelzustände können für hochauflösende Methoden genutzt werden. Beispiele hierfür sind STORM (STochastic Optical Reconstruction Microscopy), PALM (PhotoActivated Localization Microscopy) und SOFI (Super-resolution Optical Fluctuation Imaging).^[18-20]

Für gewöhnlich stellt das Photobleichen allerdings einen großen Nachteil der Fluoreszenzmikroskopie dar, da hierdurch die maximal erreichbaren Beobachtungsdauern bei sinnvollen Markerkonzentrationen stark eingeschränkt werden. Zudem handelt es sich bei fluoreszenzbasierten Kontrastverfahren in der Regel um invasive Methoden, da meist ein Marker in das Probensystem eingebracht wird. Der Einfluss des Markers auf das zu untersuchende System kann nicht grundsätzlich vernachlässigt werden. Die Markierung kann mittels klassischer chemischer Synthese, physikalischer Methoden (bspw. Adsorption) oder aber moderner biochemischer Verfahren wie der Transfektion und anschließenden Expression von fluoreszierenden Fusionsproteinen erfolgen. Marker können das Probensystem schlicht durch ihre Größe, aber auch durch spezifische Wechselwirkungen beeinflussen. Bei zellbiologischen Experimenten sollte auch die Toxizität vieler Marker berücksichtigt werden.^[4]

Um diese Probleme zu umgehen und den nicht-invasiven Charakter der optischen Mikroskopie in vollem Maße zu nutzen sind daher für viele Fragestellungen markerfreie Kontrastverfahren wünschenswert. Hierbei kann man zwei Ansätze unterscheiden. Zum einen sind dies strukturbasierte Verfahren, welche beispielsweise auf Änderungen des Brechungsindex innerhalb der Probe oder den Symmetrieeigenschaften der zu untersuchenden Objekte beruhen. Bereits in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts entwickelte Zernike das Phasenkontrastverfahren.^[21] Hierfür und für die sich daraus ergebende Möglichkeit ungefärbte Zellen im Lichtmikroskop kontrastreich abzubilden erhielt er 1953 den Physiknobelpreis. Ebenfalls in den 50ern des 20. Jh. wurde von Nomarski der Differentielle Interferenzkontrast (DIC, differential interference contrast) für die Mikroskopie entwickelt.^[22] Beide Methoden beruhen auf unterschiedlichen Brechungs-

dizes und Wegstrecken des Lichts innerhalb der Probe. Hiermit können beispielsweise zelluläre Organellen visualisiert werden. Die molekulare Selektivität, wie sie sich bei fluoreszenzbasierten Methoden durch den spezifischen Markierungsschritt ergibt, fehlt diesen Methoden allerdings.

In der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts wurde durch die Entwicklung der ersten Laser und somit leistungsstarker Lichtquellen der Zugang zu einem neuen Forschungsgebiet, der nichtlinearen Optik, ermöglicht.^[23,24] Eines der ersten nichtlinear optischen Phänomene, die beschrieben wurden, war die Summenfrequenzerzeugung (second harmonic generation, SHG).^[25] Die erste Anwendung der SHG in der Mikroskopie erfolgte 1974 an ZnSe Kristallplättchen durch Hellwarth und Christensen.^[26] Inzwischen gibt es eine Reihe von nichtlinear optischen Verfahren zur strukturbasierten Abbildung in der Mikroskopie, die beispielsweise zur Verfolgung der Morphogenese von Embryonen kleiner Organismen genutzt werden konnten.^[27–29] Die intrinsische 3-dimensionale Auflösung und hohe Eindringtiefen durch die Verwendung von Laserlicht im Nahinfraroten(NIR)-Bereich sind klare Vorteile dieser Verfahren.

Im Gegensatz zu diesen strukturbasierten Kontrastverfahren bietet die Schwingungsspektroskopie einen intrinsisch chemisch-selektiven Kontrast. Die zwei klassischen Verfahren sind die Infrarot(IR)-und die Raman-Mikroskopie.^[30] Die IR-Mikroskopie beruht auf der Absorption sehr langwelliger Photonen. Durch die Verwendung von IR-Licht ergibt sich allerdings eine geringe räumliche Auflösung, zum einen durch das Beugungslimit, zum anderen durch die in diesem Spektralbereich benötigten reflektiven Objektive. Standard Glasoptiken können nicht verwendet werden. Zudem weist Wasser im IR-Bereich eine breite Absorption auf. Somit sind Experimente an lebenden Zellen nicht möglich.^[31] Bei der spontanen Raman-Streuung wird die Energie der eingestrahnten Photonen um Energiequanten molekülspezifischer Schwingungsmoden variiert. Aufgrund der geringen Streuquerschnitte ist die Sensitivität gering und es sind hohe Anregungsleistungen nötig. Zudem stellt in zellbiologischen Proben häufig Autofluoreszenz, die aufgrund der Stokes-Verschiebung im gleichen spektralen Bereich wie Licht der Stokes-Streuung liegt, ein Problem dar. In der Regel werden daher heutzutage Laser im NIR-Bereich als Lichtquellen verwendet. Mittels konfokaler Raman-Mikroskopie können so mit guter Auflösung Abbildungen mit schwingungsbasiertem Kontrast erzeugt werden.^[32] Die langen Aufnahmedauern von mehreren ms bis zu s pro Pixel und teilweise komplexe Schwingungsspektren verhindern allerdings bislang eine breite Anwendung der Methode, vor allem aber im Bereich der lebenden Proben.^[33]

Wünschenswert wäre somit ein Kontrastverfahren für die Mikroskopie, das folgende Merkmale aufweist:

- markerfreie, chemische Selektivität

- hohe Sensitivität und damit verbunden schnelle Aufnahmen mit Videogeschwindigkeit
- 3-dimensionale Auflösung (z.B. durch einen optisch nichtlinearen Prozess)
- Verwendung von Anregungslicht im NIR-Bereich (Eindringtiefe und Hintergrund)
- nahezu beliebige Aufnahmedauern (kein Photobleichen)
- keine Überlagerung des erwünschten Signals durch Autofluoreszenz

Aus den Vor- und Nachteilen der soweit vorgestellten Techniken ergibt sich, dass ein Kontrastmechanismus basierend auf einer nichtlinearen Schwingungsspektroskopie mit hohen Signalstärken wünschenswert wäre. Insbesondere für die Mikroskopie an lebenden Systemen hätte dies klare Vorteile. Seit ihrer erstmaligen Verwendung in den 1960ern durch Maker und Terhune bei der Ford Motor Company hat sich die kohärente anti-Stokes Raman Streuung (coherent anti-Stokes Raman scattering, CARS) zur meist genutzten nichtlinearen Ramanspektroskopie entwickelt.^[34–36] Sowohl zur klassischen CARS Spektroskopie als auch der daraus entwickelten CARS Mikroskopie gibt es eine Vielzahl von Übersichtsartikeln.^[36–40] Beim CARS Prozess wechselwirken ein sogenannter Pumpstrahl der Frequenz ω_p und ein Stokes-Strahl der Frequenz ω_{st} mit der Probe in einem Vier-Wellen-Mischprozess. Entspricht die Frequenz der Schwebung der Anregungsfelder $\omega_p - \omega_{st}$ der Frequenz einer Raman-aktiven Schwingungsmode, werden die Schwingungsszillatoren im Anregungsvolumen kohärent angeregt und ein starkes Signal bei der anti-Stokes Frequenz generiert. Die Vorteile dieses Kontrastverfahrens sind damit offensichtlich. Auch hier beruht der Kontrast auf dem Schwingungsspektrum der Probenmoleküle, ist somit intrinsisch und chemisch selektiv. Es sind keine angeregten elektronischen Zustände beteiligt und somit findet kein Photobleichen statt. Durch die kohärente Natur des Prozesses werden deutlich stärkere Signale als bei der linearen Raman-Streuung generiert. Autofluoreszenz durch Ein-Photonen-Anregung stellt kein Problem dar, da das anti-Stokes Signal blau von den Anregungswellenlängen verschoben ist. Da es sich bei CARS um einen nichtlinear optischen Prozess handelt, erreicht man eine mit der konfokalen Mikroskopie vergleichbare räumliche Auflösung in allen 3 Dimensionen. Weiter können Anregungswellenlängen im NIR-Bereich verwendet werden, wodurch hohe Eindringtiefen erzielt werden.

1982 wurde erstmals die Verwendung des CARS Prozesses als Kontrastverfahren in der Mikroskopie von Duncan et al. publiziert.^[41] Der Durchbruch für die CARS Mikroskopie erfolgte allerdings erst 1999, mit der Veröffentlichung eines vereinfachten experimentellen Ansatzes durch Zumbusch *et al.*^[42] Seitdem wurde die CARS Mikroskopie auf eine Vielzahl an Problemstellungen in den Bereichen Zellbiologie, Medizin aber auch Che-

mie angewandt. Auf die Entwicklungen im Bereich der CARS Mikroskopie werde ich im folgenden Abschnitt eingehen.

1.2. Stand der Forschung

Um die Entwicklungen in der CARS Mikroskopie darlegen zu können, werde ich zunächst die Probleme, die sich in Bezug auf die Nutzung von CARS als Kontrastverfahren ergeben, darstellen. Bei der Verwendung eines nichtlinear optischen Prozesses werden Polarisationskomponenten höherer Ordnung induziert. Hierfür sind allerdings starke Anregungsfelder nötig, die sich im Anregungsvolumen effizient addieren sollten. Für eine konstruktive Wechselwirkung der Felder muss zudem die sogenannte Phasenanpassungsbedingung erfüllt sein (s. Kapitel 2). Durch die Dispersion in der Probe ist dies allerdings im Regelfall nicht gegeben. Im Gegensatz zur Fluoreszenz ist CARS nicht hintergrundfrei. Rein elektronische Beiträge, die im Bereich von elektronischen 2-Photonenübergängen noch verstärkt werden, ergeben einen nichtresonanten Hintergrund aus dem Anregungsvolumen. Dieser Hintergrund reduziert den Kontrast und erschwert die spektrale Selektivität. Zudem kommt es durch den nichtresonanten Beitrag zu dispersiven Linienformen im CARS Spektrum. CARS Spektren sind folglich nicht mit Ramanspektren gleichzusetzen und oftmals schwer zu interpretieren.

Aufgrund dieser Herausforderungen lag der Fokus der Entwicklung der CARS Mikroskopie zunächst in einem detaillierten Verständnis und einer Optimierung der Technik bevor neue Anwendungsfelder aufgetan wurden. In der Arbeit von Zumbusch aus dem Jahr 1999 wurden zwei wegweisende experimentelle Ansätze eingeführt.^[42] Zum einen wurde gezeigt, dass bei Verwendung von Objektiven mit hoher numerischer Apertur auch unter kollinear Einkopplung der Anregungsstrahlen die Phasenanpassungsbedingung erfüllt werden kann. Die zuvor von der klassischen CARS Spektroskopie auf die Mikroskopie übertragene räumliche Trennung der Anregungsstrahlen, hatte zu einer schlechteren räumlichen Auflösung geführt, da lediglich ein Teil des verfügbaren Öffnungswinkels des Mikroskopobjektivs verwendet wurde. Zum anderen wurden anstelle von Farbstofflasern im sichtbaren Spektralbereich NIR-Laser als Anregungsquellen verwendet, was zu einer deutlichen Reduzierung des durch elektronische 2-Photonenresonanzen verstärkten Hintergrunds führte. Der Kontrast und somit die Empfindlichkeit der Methode wurden hierdurch stark verbessert. Angeregt durch diesen Fortschritt entstand in der Folge ein ganz neues Feld der nichtlinear optischen Mikroskopie. Innerhalb weniger Jahre durchlief die CARS Mikroskopie eine Entwicklung von einer stark chemisch-physikalisch orientierten, anspruchsvollen Spektroskopietechnik zu einem vielbeachteten Werkzeug in den Biowissenschaften.^[36, 43]

Auf Seiten der technischen Entwicklung sind zunächst die Fortschritte im Bereich der Lichtquellen zu nennen. Die in der nichtlinearen Optik (NLO) benötigten hohen Anregungsintensitäten werden durch gepulste Laser mit hohen Spitzenleistungen erhalten. Bei Pulslängen im Bereich von 100 fs bis zu mehreren Pikosekunden und Repetitionsraten im MHz-Bereich kann bei aktuellen Lasersystemen mit moderaten Durchschnittsleistungen im Bereich von wenigen mW auf der Probe gearbeitet werden. Wie bereits erwähnt sind Systeme im NIR-Bereich in Bezug auf Eindringtiefe und Hintergrundsignale ideal. Eine Pulslänge von 100 fs entspricht im NIR ungefähr einer spektralen Breite von 150 cm^{-1} . Bei typischen Linienbreiten der Schwingungsübergänge in kondensierter Phase von $10\text{--}20 \text{ cm}^{-1}$ boten die zunächst verwendeten fs-Systeme nur eine geringe spektrale Selektivität und weite Bereiche des Anregungsspektrums generierten lediglich nichtresonanten Hintergrund. Zudem bestand bei der Verwendung solcher kurzer Pulse ein verstärktes Risiko von Photoschäden durch Multiphotonenprozesse.^[44] Die Verwendung synchronisierter Ti:Sa-Laser mit Pulslängen im ps-Bereich war folglich der nächste Schritt.^[45] Ti:Sa-Laser bieten hohe Ausgangsleistungen und eine weite Durchstimbarkeit im NIR-Bereich. Die Synchronisation der Ti:Sa-Laser erfolgt elektronisch.^[46] Auch die inzwischen kommerziell erhältlichen Lösungen zur Synchronisation sind sehr empfindlich gegenüber Umwelteinflüssen. Idealerweise werden daher für die CARS Mikroskopie Systeme mit einer gemeinsamen, gepulsten Quelle verwendet, welche somit inhärent synchronisierte Pulszüge aufweisen. Ein weit verbreitetes System stellen Optisch Parametrische Oszillatoren dar.^[36] Die neueste, vielversprechende Entwicklung im Bereich der Lichtquellen sind Faserlaser basierte Systeme. Diese zeichnen sich gegenüber Frei-Strahl-Systemen durch kostengünstige Bauteile, aber auch kompakte Ausmaße und Robustheit aus, die aus der Einfachheit des Systems resultieren. Ytterbium basierte Systeme liefern hohe Leistungen und werden bisher als Pumpquellen für OPO-Systeme verwendet.^[47] Krauss *et al.* haben erstmalig ein komplett Faserlaser basiertes System für die CARS Mikroskopie demonstriert.^[48] Inzwischen sind hieraus entwickelte kommerzielle Laser-Systeme auf dem Markt. Bisher stellen die geringen Ausgangsleistungen des Stokes-Strahls dieser Systeme im Bereich von einigen mW allerdings noch einen Nachteil gegenüber Frei-Strahl-Systemen dar. Die Entwicklung der Anregungsquellen für die CARS Mikroskopie wird allerdings mit Sicherheit in Zukunft in Richtung faserlaserbasierter Systeme gehen. Weitere wichtige Entwicklungen auf der technischen Seite der NLO Mikroskopie sind für Multiphotonenanwendungen optimierte Mikroskope und Mikroskopobjektive. Das Design neuartiger, NIR-korrigierter Objektive durch Mikroskophersteller zeigt ebenfalls die Bedeutung, die die NLO Mikroskopie im letzten Jahrzehnt gewonnen hat.

Auf der wissenschaftlichen Seite wurden zunächst formale Beschreibungen der Bildgebung mittels CARS entwickelt. Die klassischen theoretischen Arbeiten zur CARS Spektroskopie setzten sich mit den hier gebräuchlichen Anregungsgeometrien und einem ho-

mogenen Probenmaterial auseinander.^[49,50] In der CARS Mikroskopie wechselwirkten hingegen stark fokussierte Laserstrahlen mit einer 3-dimensionalen, heterogenen Probe. Dies hatte eine ganze Reihe von Effekten zur Folge, für deren Verständnis und Beschreibung neue Formalismen notwendig waren. Potma *et al.* berechneten das in Transmission zu erwartende CARS Signal einer dicken, homogenen Probenscheibe, die mit fokussierte Laserstrahlen angeregt wird.^[51] Hashimoto und Araki entwickelten eine vereinfachte optische Transferfunktion für die CARS Mikroskopie.^[52] Ausgehend von einer exakteren Beschreibung des generierten CARS Feldes auf Basis kohärenter Hertzscher Dipole entwickelten Volkmer und Cheng einen allgemeinen Formalismus zur Beschreibung der kohärenten NLO Mikroskopie.^[38,53,54]

Ein weiterer Schwerpunkt in der Weiterentwicklung der CARS Mikroskopie lag in der Unterdrückung des nichtresonanten Hintergrunds. Hier wurde eine Vielzahl experimenteller Kniffe entwickelt. Der klassische Ansatz zur Unterdrückung des nichtresonanten Hintergrunds beruht auf den unterschiedlichen Abhängigkeiten des resonanten und nichtresonanten Signals in Bezug auf die Polarisierung.^[55-57] Mittels geeigneter Polarisierung der Anregungsfelder und unter Verwendung eines Analysators im Detektionsstrahlengang kann theoretisch der gesamte nichtresonante Hintergrund unterdrückt werden. Dies führt in der Regel allerdings zu einer starken Abschwächung des detektierten CARS-Signals. Zudem können die relativen Winkel der Polarisierungen von Schwingungsmode zu Schwingungsmode variieren und müssen in jedem konkreten Fall neu angepasst werden. Beide Punkte führten zu einer seltenen Verwendung dieser Methode in der Mikroskopie.^[40] Mittels Detektion des CARS Signals in Epi-Richtung wird der nichtresonante Hintergrund des Solvens und großer Objekte unterdrückt.^[53] Allerdings streuen nur Objekte in der Größenordnung kleiner gleich der Anregungswellenlänge effizient in Epi-Richtung. Zudem wird auch bei diesem Verfahren das detektierte Signal deutlich abgeschwächt. Mittels zeitaufgelöster Detektion des CARS-Signals kann ausgenutzt werden, dass der nichtresonante Hintergrund im Gegensatz zu resonanten Signalen instantan abklingt.^[58,59] Weitere Techniken zur Reduktion des nichtresonanten Hintergrunds beruhen auf heterodynem bzw. interferometrischen Ansätzen oder beispielsweise der Frequenzmodulation.^[60-62]

Die CARS Mikroskopie umfasst inzwischen einen sehr großen Anwendungsbereich. Der Hauptfokus liegt allerdings sicherlich im Bereich der Biowissenschaften. Hier wurden bereits eine ganze Reihe unterschiedlicher Schwingungsresonanzen zur Kontrasterzeugung genutzt. Hierzu zählen die Amid I Bande und Ringmoden des Phenylalanins zum Nachweis von Proteinen, die Phosphat Streckschwingung im DNA-Rückgrat und in Knochen, sowie die CH₂-Streckschwingung in Lipiden. Letztere ist mit Abstand die am häufigsten verwendete Schwingungsmode zur Kontrastgebung in der CARS Mikroskopie. Dies hat mehrere Gründe. Die Dichte an CH₂-Gruppen und somit an äquivalenten Schwin-

gungsmoden ist in Lipiden extrem hoch. Pro Lipidmolekül liegen häufig 10-100 spektral überlappende Schwingungsmoden vor, was aufgrund der kohärenten Natur des CARS Prozesses zu einer deutlichen Verstärkung des detektierten Signals führt. Zudem ist die Suszeptibilität dritter Ordnung für Lipide sehr hoch. Daher können selbst einzelne Lipiddoppelschichten mittels CARS Mikroskopie abgebildet werden.^[63,64] Lipide stellen sicher eine sehr interessante Stoffgruppe in der Biologie und Medizin dar. Als “Lipid Droplets” (LDs) bezeichnete Lipidvesikel sind komplexe Organellen, deren vielfältige Funktionen bisher nur unzureichend aufgeklärt sind. Eine Vielzahl menschlicher Erkrankungen wie beispielsweise Fettleibigkeit, Diabetes Typ II und Atherosklerose sind mit anomalen Anhäufungen von LDs verknüpft.^[65] Der Fettmetabolismus des Nematoden *C. elegans* stellt das Modellsystem für den humanen Stoffwechsel dar. Eine ganze Reihe von Studien zeigen den Nutzen der CARS Mikroskopie auf diesem Forschungsfeld.^[66,67] Lipide sind außerdem Bestandteil von Myelin, dem Hauptbestandteil der “weißen Substanz” des Zentralnervensystems, was in einer Vielzahl von CARS gestützten Experimenten genutzt wurde.^[65] Ein CARS Mikroskop bietet in der Regel direkt die Möglichkeit unterschiedliche NLO Kontrastverfahren einzusetzen. Bedeutende Beiträge zur sogenannten multimodalen NLO Mikroskopie wurden von der Arbeitsgruppe um Cheng geleistet (es sei auf einen aktuellen Übersichtsartikel verwiesen^[65]).

Im Bereich der Chemie und Materialwissenschaften sind sicherlich die Arbeiten in der Gruppe von Bonn herausragend. Hier wurde die CARS Mikroskopie erstmals zur Beobachtung von Reaktionskinetiken in mikrofluiden Kanälen und katalytischer Prozesse auf Zeolithen genutzt.^[68–70] Hierbei sind die hohe Aufnahmegeschwindigkeit und räumliche Auflösung der CARS Mikroskopie klar von Vorteil verglichen mit anderen Ansätzen. Daher stellt gerade auf diesen Gebieten die CARS Mikroskopie in Zukunft eine vielversprechende Ergänzung zu anderen Techniken dar.

1.3. Die Gliederung dieser Arbeit

Im Rahmen meiner Dissertation habe ich mich mit der schwingungsselektiven Mikrospektroskopie auseinandergesetzt. Hierfür wurde ein Labor für nichtlineare Optik aufgebaut. Die vorliegende Arbeit lässt sich in zwei Schwerpunkte unterteilen: die anwendungsorientierte CARS Mikroskopie und die Entwicklung eines neuen Ansatzes zur hochempfindlichen Schwingungsmikrospektroskopie. Die CARS Mikroskopie wurde bereits in der Einleitung motiviert. In Kapitel 2 werde ich eine kurze Einführung in die nichtlineare Optik und CARS im Speziellen geben. Anschließend beschreibe ich den Aufbau eines CARS Mikroskops und eine Auswahl an Experimenten, die wir hiermit bereits durchführen konnten. In Kapitel 4 stelle ich ein neues Konzept zur Weitfeld CARS Mikroskopie

vor, das im Rahmen dieser Arbeit entstand. Im zweiten Teil der Dissertationsschrift setze ich mich mit der Erhöhung der Empfindlichkeit der Schwingungsmikrospektroskopie auseinander. Ich zeige einen Ansatz zum Erreichen von Einzelmolekülsensitivität bei Raumtemperatur auf. Anhand der zeitabhängigen Störungstheorie gebe ich eine Beschreibung des Experiments und schätze die zu erwartende Signalintensität ab. In Kapitel 7 gehe ich auf die experimentelle Umsetzung dieses neuen Konzeptes ein. Ich begründe die Auswahl geeigneter Probensysteme und beschreibe sowohl den neuen Versuchsaufbau als auch erste Experimente an diesem. Schließlich vergleiche ich unseren Ansatz mit anderen Arbeiten zur kohärenten Spektroskopie an einzelnen Molekülen und gebe eine Zusammenfassung dieser Arbeit.

Kapitel 2.

Theoretische Grundlagen

In Kapitel 1 wurden bereits mehrere nichtlinear optische Prozesse wie die Summenfrequenzerzeugung (SFG) oder kohärente anti-Stokes Raman Streuung (CARS) erwähnt. Die theoretischen Grundlagen der nichtlinearen Optik sind sehr komplex. Daher möchte ich zunächst ein allgemein verständliches Beispiel für das Auftreten nichtlinearer Effekte geben: das Übersteuern eines Audiosystems. Wird der Verstärker durch zu hohe Eingangspegel oder zu hohe Verstärkung in Sättigung getrieben, kann dies zu Störungen führen. Die relativen Amplituden der Eingangsfrequenzen werden nicht mehr korrekt wiedergegeben, es kann zur Ausbildung von Obertönen (Harmonischen) und Kombinationen (Summen- und Differenzfrequenzen) der Eingangsfrequenzen (Fundamentalen) kommen. Ganz analog hierzu kann man Prozesse in der nichtlinearen Optik (NLO) verstehen. Bei moderaten Anregungsintensitäten verhält sich die Polarisation der Probe \mathbf{P} linear zum Anregungsfeld \mathbf{E} :

$$\mathbf{P}(t) = \epsilon_0 \chi^{(1)} \mathbf{E}(t) \quad (2.1)$$

Der Proportionalitätsfaktor $\chi^{(1)}$ wird als lineare Suszeptibilität bezeichnet, ϵ_0 ist die elektrische Feldkonstante (Permittivität des Vakuums). Werden die elektromagnetischen Anregungsfelder allerdings so hoch oder gar höher als die intrinsischen Felder des durchlaufenen Mediums, wird die Polarisation derart beeinflusst, dass die ursprünglichen Frequenzen des Anregungsfeldes variiert und neue Frequenzkomponenten generiert werden. Im Folgenden soll eine phänomenologische Beschreibung nichtlinear optischer Prozesse und der in dieser Arbeit verwendeten CARS im Speziellen aufgezeigt werden.

2.1. Phänomenologische Beschreibung nichtlinear optischer Prozesse

Bei der optischen Spektroskopie wechselwirkt das oszillierende elektromagnetische Feld des Anregungslichts mit der Probe durch induzierte (Übergangs-)Dipolmomente. In einem dielektrischen Medium ergeben diese eine Polarisation \mathbf{P} in Abhängigkeit vom An-

regungsfeld \mathbf{E} , wie durch Gleichung 2.1 beschrieben. Die elektrische Suszeptibilität χ , eine für das Medium spezifische Proportionalitätskonstante, stellt ein Maß für die Polarisierbarkeit dar. Dieser lineare Zusammenhang zwischen Polarisation und elektrischem Feld gilt nur so lange die elektrische Suszeptibilität keine Funktion des Anregungsfeldes ist. Bei ausreichend hohen Anregungsintensitäten werden die optischen Eigenschaften des Mediums durch die Anregungsfelder selbst verändert und man kann nichtlineare optische Phänomene beobachten. Die Polarisation wird hierfür oft durch eine Potenzreihe in Abhängigkeit des Anregungsfeldes dargestellt:^[24]

$$\begin{aligned}\mathbf{P}(t) &= \epsilon_0 [\chi^{(1)}\mathbf{E}(t) + \chi^{(2)}\mathbf{E}^2(t) + \chi^{(3)}\mathbf{E}^3(t) + \dots] \\ &\equiv \mathbf{P}^{(1)}(t) + \mathbf{P}^{(2)}(t) + \mathbf{P}^{(3)}(t) + \dots\end{aligned}\tag{2.2}$$

Der erste Term entspricht dem klassischen linearen Fall, die weiteren Terme sind nichtlineare Polarisationen (Polarisationen höherer Ordnung). $\chi^{(2)}$ und $\chi^{(3)}$ werden entsprechend als nichtlinear optische Suszeptibilitäten zweiter bzw. dritter Ordnung bezeichnet. Diese Terme sind im Vergleich zum linearen Fall sehr klein. Vernachlässigt man Resonanzeffekte erreichen sie erst bei Anregungsfeldern in der Größenordnung der atomaren Feldstärke $E_{\text{at}} = e_0/(4\pi\epsilon_0 a_0^2)$ eine vergleichbare Größe. E_{at} mit der Elementarladung e_0 und dem Bohrschen Radius a_0 dient hier zur Abschätzung des intrinsischen Feldes des Mediums. In kondensierter Materie ist $\chi^{(1)} \sim 1$ und somit $\chi^{(2)} \simeq \chi^{(1)}/E_{\text{at}} \sim 2 \times 10^{-12} \text{ m/V}$. Für die Suszeptibilität dritter Ordnung kann man analog die Größenordnung abschätzen $\chi^{(3)} \simeq \chi^{(1)}/E_{\text{at}}^2$. Diese Übersichtsrechnung demonstriert welche hohen Anregungsfelder zur Erzeugung nichtlinear optischer Effekte notwendig sind und dass folglich erst mit der Erfindung der Laser als Lichtquelle das Feld der NLO für die angewandte Physik zugänglich wurde.

In Gleichung 2.2 steckt noch eine Reihe von Vereinfachungen. In dieser Form werden unter anderem eine mögliche Dispersion und Absorption des Mediums nicht berücksichtigt. Die Polarisation folgt instantan dem Anregungsfeld. Für die Herleitung einer allgemein gültigen Beschreibung der Polarisation sei auf das Lehrbuch zur NLO von Boyd verwiesen.^[24] Er stellt hierin das vektorielle Anregungsfeld $\mathbf{E}(\mathbf{r}, t)$ als Summe über die einzelnen Frequenzkomponenten (positive und negative Frequenzen) dar:

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \sum_n \mathbf{E}(\omega_n) e^{-i\omega_n t}\tag{2.3}$$

Für die induzierte Polarisation folgt somit:

$$\mathbf{P}(\mathbf{r}, t) = \sum_n \mathbf{P}(\omega_n) e^{-i\omega_n t}\tag{2.4}$$

Bei den Suszeptibilitäten handelt es sich mathematisch um Tensoren der Ordnung entsprechender Stufe. Auf diese möchte ich erst in Abschnitt 2.2.2 näher eingehen. Für die nichtlineare optische Polarisation zweiter Ordnung $P^{(2)}$ ergibt sich:

$$P_i^{(2)}(\omega_n + \omega_m) = \epsilon_0 \sum_{jk} \sum_{(nm)} \chi_{ijk}^{(2)}(\omega_n + \omega_m, \omega_n, \omega_m) E_j(\omega_n) E_k(\omega_m) \quad (2.5)$$

Die Indizes i, j, k stehen für die einzelnen kartesischen Komponenten und die Indizes m, n für die Frequenzkomponenten. Diese müssen die Bedingung $\omega_n + \omega_m = \text{konst.}$ erfüllen, was durch die Klammer unter dem Summensymbol angedeutet werden soll. Mittels der allgemeinen Gleichung 2.5 für $P_i^{(2)}$ lassen sich eine Vielzahl nichtlinear optischer Prozesse beschreiben:

- Summenfrequenzerzeugung (engl. sum-frequency generation, SFG), $\chi_{ijk}^{(2)}(\omega_1 + \omega_2, \omega_1, \omega_2)$ und deren frequenzentartete Form, die
- Frequenzverdoppelung (engl. second harmonic generation, SHG), $\chi_{ijk}^{(2)}(2\omega_1, \omega_1, \omega_1)$
- Differenzfrequenzerzeugung (engl. difference-frequency generation, DFG), $\chi_{ijk}^{(2)}(\omega_1 - \omega_2, \omega_1, -\omega_2)$
- Pockels Effekt (linearer elektro-optischer Effekt), $\chi_{ijk}^{(2)}(\omega_1, 0, \omega_1)$, und dessen Umkehrung, die
- optische Rektifikation, $\chi_{ijk}^{(2)}(0, \omega_1, -\omega_1)$

In Abb. 2.1 sind die Energieschemata einiger $\chi_{ijk}^{(2)}$ -Prozesse dargestellt. Die Summen- und Differenzfrequenzerzeugung wird vielfach zur Verschiebung des spektralen Bereichs von Lasern verwendet. Die Pumplaser der Anregungslichtquellen für die hier beschriebenen Experimente nutzen die SHG zur Generierung von Licht bei 532 nm ausgehend von der Emission eines Festkörperlaser bei 1064 nm (vgl. 3.1). Mittels DFG an einem Kristall, der in einem optischen Resonator platziert wurde (dem sogenannten optisch parametrischen Oszillator, OPO), können mit hoher Effizienz ausgehend von Photonen bei 532 nm Photonen im NIR und IR generiert werden. Diese neu erzeugten Frequenzen können variiert werden, so lange die Bedingungen der Energie- und Impulserhaltung erfüllt sind. Die praktische Umsetzung eines solchen Systems ist in Abschnitt 3.1.1 beschrieben. Die Suszeptibilität zweiter Ordnung ist für Medien mit Inversionssymmetrie null. Hierzu zählen nicht nur entsprechende Kristalle sondern auch isotrope Medien wie Gase, Flüssigkeiten und amorphe Festkörper. Daher sind SHG und SFG speziell zur Untersuchung an Grenzflächen bzw. selektiven Abbildung von nicht zentrosymmetrischen Strukturen geeignet. In Abschnitt 3.9.2 ist eine entsprechende Anwendung aufgezeigt.

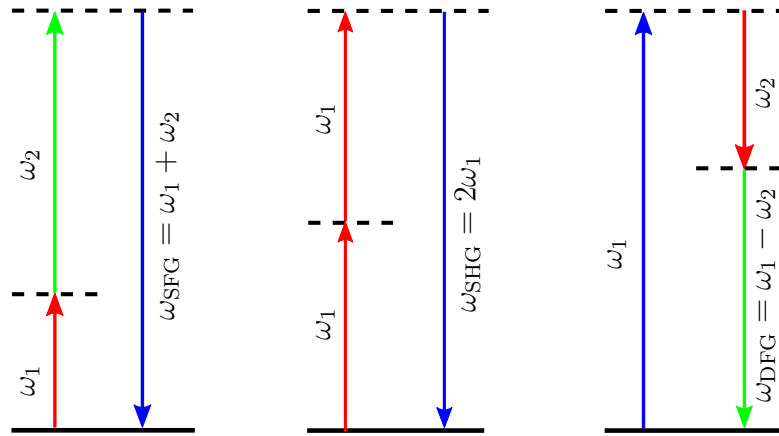


Abbildung 2.1.: Energieschemata der Summenfrequenzerzeugung (SFG), Frequenzverdoppelung (SHG) und Differenzfrequenzerzeugung (DFG). Die durchgezogene Linie entspricht dem elektronischen Grundzustand. Die Strichlinien stellen sogenannte “virtuelle Niveaus” dar.¹

Analog zu Gleichung 2.5 ergibt sich der Ausdruck für die nichtlinear optische Polarisation dritter Ordnung $P^{(3)}$:

$$P_i^{(3)}(\omega_o + \omega_n + \omega_m) = \epsilon_0 \sum_{jkl} \sum_{(mno)} \chi_{ijkl}^{(3)}(\omega_o + \omega_n + \omega_m, \omega_o, \omega_n, \omega_m) E_j(\omega_o) E_k(\omega_n) E_l(\omega_m) \quad (2.6)$$

Zu den nichtlinear optischen Phänomenen, die hierauf beruhen, zählen unter anderem:

- Frequenzverdreifung (engl. third harmonic generation, THG), $\chi_{ijkl}^{(3)}(3\omega_1, \omega_1, \omega_1, \omega_1)$
- optischer Kerr Effekt (nichtlinearer elektro-optischer Effekt), $\chi_{ijkl}^{(3)}(\omega_1, \omega_1, \omega_1, -\omega_1)$
- Vier-Wellen-Mischung (engl. four-wave mixing, FWM), $\chi_{ijkl}^{(3)}(\omega_4, \omega_1, \omega_2, \omega_3)$

Beim Kerr-Effekt handelt es sich um die intensitätsabhängige Variation des Brechungsindex eines optisch nichtlinear-aktiven Mediums. Auch hierauf gehe ich näher bei der Beschreibung der Anregungslichtquellen ein (s. 3.1.2). Beim CARS Prozess handelt es sich um eine Vier-Wellen-Mischung, bei der drei Anregungsfelder bei den Frequenzen ω_p , ω_{st} und $\omega_{p'}$ mit dem Medium wechselwirken und eine Polarisation dritter Ordnung

¹Virtuelle Niveaus sind keine energetischen Eigenzustände. Sie können als Summe der Energie eines energetischen Eigenzustands und der Energie eines oder mehrerer Photonen des Strahlungsfeldes betrachtet werden.

induzieren:

$$P_i^{(3)}(\omega_{CARS}) = \epsilon_0 \frac{6}{m!} \sum_{jkl} \chi_{ijkl}^{(3)}(-\omega_{CARS}, \omega_p, \omega_{p'}, -\omega_{St}) E_j(\omega_p) E_k(\omega_{p'}) E_l(\omega_{St}) \quad (2.7)$$

Diese Polarisation erzeugt ein kohärentes viertes Feld, dessen Strahlung der Frequenz ω_{CARS} als CARS Signal detektiert werden kann. Bevor ich näher auf dieses CARS Signal eingehe, möchte ich noch kurz den Zusammenhang zwischen der induzierten Polarisation $\mathbf{P}^{(3)}$ und dem emittierenden Feld $\mathbf{E}(\omega_{CARS})$ aufzeigen.

Von der nichtlinear optischen Polarisation zur emittierten Strahlung Die nicht-lineare Wellengleichung lässt sich aus den Maxwell'schen Gleichungen zur Beschreibung der klassischen Elektrodynamik ableiten (s. z.B.^[24]). Die nichtlineare Wellengleichung hat die Form einer inhomogenen Differentialgleichung:

$$\nabla^2 \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{\epsilon_0 c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \mathbf{P}^{(NL)}(\mathbf{r}, t) \quad (2.8)$$

Der inhomogene Teil auf der rechten Seite wirkt als Quellterm. Er beschreibt die Kopplung der an einem nichtlinear optischen Effekt beteiligten Anregungsfelder in Form der somit induzierten Polarisation $\mathbf{P}^{(NL)}$. Die zeitliche Variation der Polarisation $\mathbf{P}^{(NL)}$ erzeugt das emittierende Feld $\mathbf{E}(\mathbf{r}, t)$ und somit kohärente Strahlung einer entsprechenden Frequenz. Die Lösung der nichtlinearen Wellengleichung ist in der allgemeinen Form nicht trivial. Wie bereits in Abschnitt 1.2 beschrieben, wurden für die CARS Mikroskopie eine Reihe von Lösungsansätzen der nichtlinearen Wellengleichung für verschiedene Anregungsgeometrien und Strukturen innerhalb der Probe entwickelt. Ich möchte im Folgenden lediglich auf einen allgemeinen Ausdruck für die Intensität des CARS Signals $I_{CARS} \propto |\mathbf{P}^{(3)}(\omega_{CARS}, \mathbf{r})|^2$ eingehen und die Rolle der einzelnen Komponenten diskutieren.

2.2. Das CARS Signal

Die Anregungspulse für den CARS Prozess bei ω_p , ω_{St} und $\omega_{p'}$ werden als Pump-, Stokes- und Abfrage-Puls bezeichnet. Die Suszeptibilität dritter Ordnung $\chi^{(3)}$, die Anregungsintensitäten I_i und die Phasenanpassung über die Wechselwirkungsstrecke L sind die drei entscheidenden Komponenten für das CARS Signal:

$$\begin{aligned} I_{CARS} &\propto |E(\omega_{CARS}, L)|^2 \\ &\propto \left| \chi_{CARS}^{(3)} \right|^2 I_p I_{p'} I_{St} L^2 \left(\frac{\sin(\Delta k L / 2)}{\Delta k L / 2} \right)^2 \end{aligned} \quad (2.9)$$

Aus dieser Gleichung folgt die kubische Abhängigkeit des CARS Signals von der Anregungsintensität. Zumeist wird zur Vereinfachung des Experiments eine frequenzentartete Anregung mit lediglich zwei Laserstrahlen eingesetzt ($\omega_p = \omega_{p'}$). Das CARS Signal hängt folglich quadratisch von der Intensität des Pumplasers und linear von der Intensität des Stokes-Lasers ab.

2.2.1. Phasenanpassung in der CARS Mikroskopie

Erfüllen die Wellenvektoren \mathbf{k}_i der am CARS Prozess beteiligten Felder die Phasenanpassungsbedingung

$$\mathbf{k}_{CARS} = \mathbf{k}_p - \mathbf{k}_{St} + \mathbf{k}_{p'} \quad (2.10)$$

steigt das CARS Signal quadratisch mit der Wechselwirkungslänge L und erreicht maximale Intensität. Bei einer Phasenfehlanpassung

$$\Delta\mathbf{k} = \mathbf{k}_{CARS} - (\mathbf{k}_p - \mathbf{k}_{St} + \mathbf{k}_{p'}) \neq 0 \quad (2.11)$$

interferieren die Felder an verschiedenen Orten mit unterschiedlicher Phase. Es kommt zu einer periodischen Verstärkung und Löschung. Das CARS Signal zeigt somit ein oszillierendes Verhalten entlang der Wechselwirkungsstrecke L und keine fortwährende kohärente Verstärkung. Um trotz der Dispersion in kondensierter Materie die Phasenanpassung zu erreichen, wurde in der klassischen CARS Spektroskopie und dem ersten CARS Mikroskop von Duncan *et al.* die Ausrichtung der Wellenvektoren gezielt eingestellt.^[41, 71] Nachteil des sogenannten Box-CARS Schemas in der Mikroskopie ist die geringe optische Auflösung, da nicht die gesamte Apertur des Objektivs genutzt werden kann. Daher hat sich für die Mikroskopie eine andere Lösung zur Phasenanpassung durchgesetzt. Bei einer ausreichend kurzen Wechselwirkungsstrecke L können keine nennenswerten Phasenverschiebungen auftreten (vgl. Gleichung 2.9). Durch starke Fokussierung der Anregungslaser mittels Objektiven hoher numerischer Apertur wird die kritische Wechselwirkungslänge L stark verkürzt. So konnte mittels kollinearer Anregung ein starkes, vorwärts gerichtetes CARS Signal erzeugt und CARS Mikroskopie mit hoher räumlicher Auflösung verwirklicht werden.^[42]

2.2.2. Die Suszeptibilität dritter Ordnung $\chi_{CARS}^{(3)}$

Die nichtlinear optische Suszeptibilität $\chi_{CARS}^{(3)}$ stellt wohl die komplizierteste Größe in Gleichung 2.9 dar. Ich möchte im Folgenden aufzeigen, wie sie sich zusammensetzt und welchen Einfluss die einzelnen Beiträge auf das CARS Signal haben. Der Gesamtbetrag von $\chi_{CARS}^{(3)}$ setzt sich aus einem schwingungsresonanten (r) und nichtresonanten (nr, el)

Teilen zusammen:^[72]

$$\chi_{CARS}^{(3)} = \chi_r^{(3)} + \chi_{el}^{(3)} + \chi_{nr}^{(3)} \quad (2.12)$$

In Abb. 2.2 sind Energiediagramme für resonante und nichtresonante Erzeugung des CARS Signals dargestellt. Durch die Anregungsfelder wird eine Oszillation in der Elek-

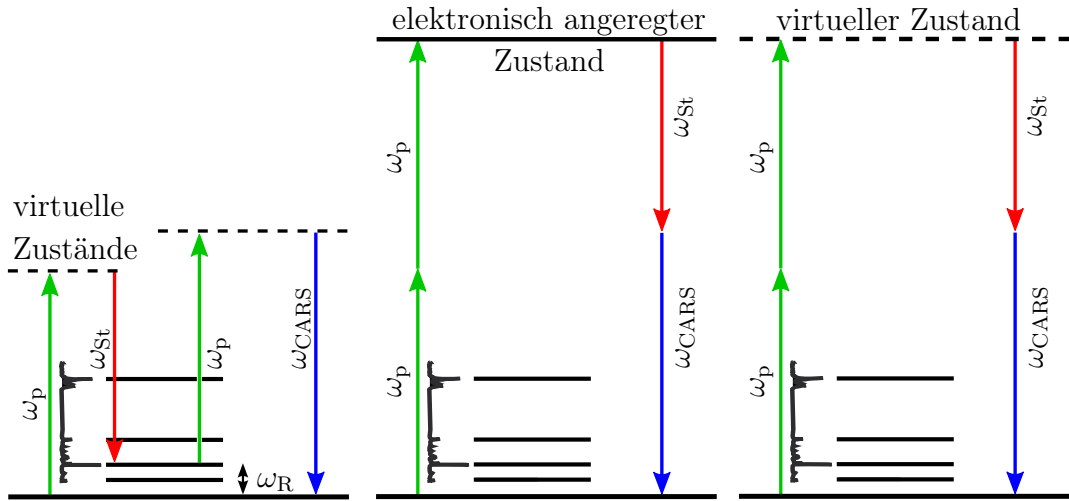


Abbildung 2.2.: Vergleich der Energieschemata für die verschiedenen Beiträge zur Suszeptibilität $\chi_{CARS}^{(3)}$. Links: der schwingungsresonante Beitrag $\chi_r^{(3)}$. Mitte: ein Beispielprozess für den elektronischen Beitrag $\chi_{el}^{(3)}$ durch elektronische Resonanzen. Rechts: Beispiel für den nichtresonanten elektronischen Beitrag $\chi_{nr}^{(3)}$.

tronenverteilung der Probenmoleküle induziert. Entspricht diese einer Raman-aktiven Schwingungsmode kommt es zu einer Resonanzverstärkung der induzierten Polarisation $\mathbf{P}^{(3)}$ bei $\omega_{CARS} = 2\omega_p - \omega_{St}$ und somit des CARS Signals. Ein Ausdruck für den resonanten Anteil der Suszeptibilität $\chi_r^{(3)}$ kann mittels zeitabhängiger Störungstheorie abgeleitet werden:^[38, 43, 72]

$$\chi_r^{(3)} = \frac{N}{V} \sum_R \frac{A_R}{\omega_R - (\omega_p - \omega_{St}) - i\Gamma_R} \quad (2.13)$$

$\chi_r^{(3)}$ ist proportional zur Konzentration N/V der Streuzentren. Die Summation erfolgt über alle beteiligten Raman Resonanzen R . A_R , ω_R und Γ_R entsprechen der Stärke, der Frequenz und der Abklingrate (und somit der Linienbreite) des jeweiligen Übergangs. Somit kann die Schwingungselektivität des CARS Prozesses begründet werden. $\chi_r^{(3)}$ besitzt einen Real- und einen Imaginärteil:

$$\chi_r^{(3)} = \chi_{r'}^{(3)} + i\chi_{r''}^{(3)} \quad (2.14)$$

Der Beitrag $\chi_{\text{el}}^{(3)}$ stammt von elektronischen Ein- oder Zwei-Photonen Übergängen. Wie in Abb. 2.2 dargestellt, tritt dieser bei Vorhandensein entsprechender Resonanzen auf. Bei der Verwendung von Anregungsquellen im NIR kann dieser Beitrag meist vernachlässigt werden ($\chi_{\text{el}}^{(3)} = 0$).^[38] Eine Polarisation der Probe durch die Anregungsfelder kann allerdings auch ohne Verstärkung durch elektronische und Raman-aktive Resonanzen erfolgen. Die Elektronenverteilung oszilliert auch dann bei der anti-Stokes Frequenz ω_{CARS} und erzeugt einen nichtresonanten elektronischen Beitrag zum CARS Signal. Dieser Beitrag ist auch beim Durchstimmen der Frequenzdifferenz $\omega_p - \omega_{\text{St}}$ näherungsweise konstant und kann in der Regel nicht vernachlässigt werden. Die zugehörige Suszeptibilität $\chi_{\text{nr}}^{(3)}$ ist eine reale Größe.

Aus dieser Diskussion ergibt sich für die Abhängigkeit des gesamten CARS Signals von der nichtlinear optischen Suszeptibilität:

$$I_{\text{CARS}} \propto |\chi_r^{(3)}|^2 + |\chi_{\text{nr}}^{(3)}|^2 + 2\chi_{\text{nr}}^{(3)} \text{Re}\{\chi_r^{(3)}\} \quad (2.15)$$

In Abbildung 2.3 sind die einzelnen Beiträge zum CARS Spektrum dargestellt. Der konstante, nichtresonante Hintergrund durch $|\chi_{\text{nr}}^{(3)}|^2$ verringert die Empfindlichkeit und stellt daher speziell bei geringen Konzentrationen der Moleküle von Interesse ein Problem dar. Der Beitrag des Mischterms im CARS Spektrum besitzt eine dispersive Linienform. Hierdurch wird zum einen das Maximum des CARS Signals spektral rot zur eigentlichen Raman-Resonanz verschoben, zum anderen ist der Beitrag am spektral blauen Ende der Resonanz negativ. Liegen mehrere Raman-Resonanzen nahe beisammen, kann dies zu einem verzerrten CARS Spektrum führen, das nur noch schwer interpretierbar ist.

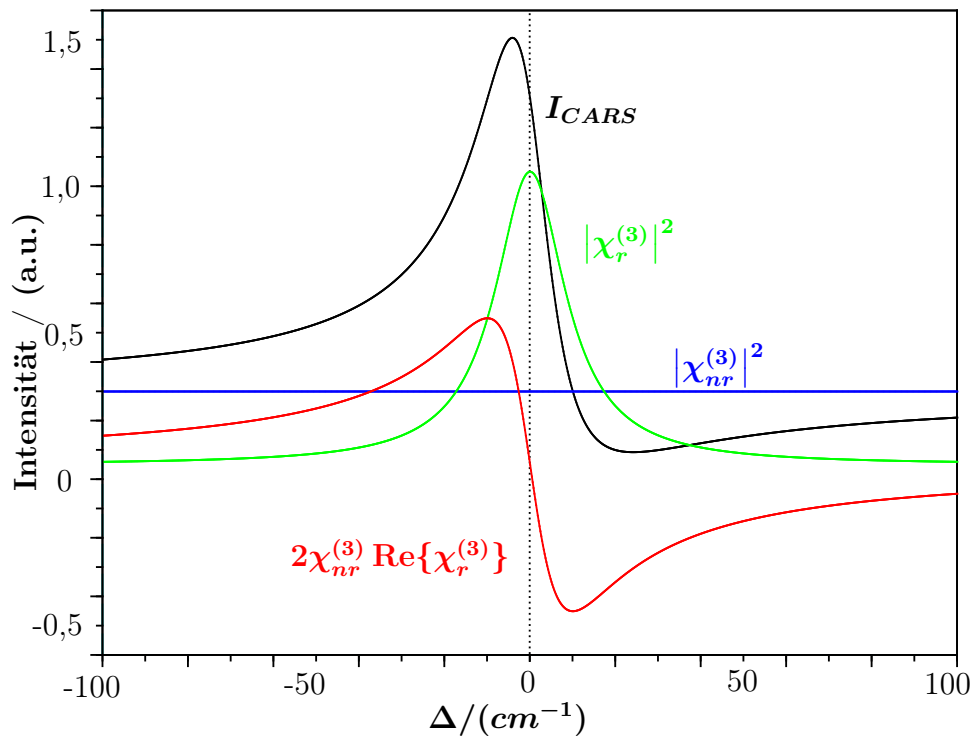


Abbildung 2.3.: Beiträge zur Intensität des CARS Signals I_{CARS} . Die einzelnen Beiträge und deren Summe I_{CARS} wurden in Abhängigkeit der Verschiebung $\Delta = (\omega_p - \omega_{St}) - \omega_R$ zu einer Raman Resonanz ω_R mit $\Gamma_R = 10 \text{ cm}^{-1}$ dargestellt.

Kapitel 3.

Aufbau eines CARS Mikroskops und erste Anwendungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein optisches Labor aufgebaut, welches für eine Vielzahl nichtlinear optischer Experimente genutzt wurde. Der experimentelle Aufbau sollte eine hohe Flexibilität aufweisen. Um die Komplexität des hieraus resultierenden Gesamtsystems klarer darstellen zu können, möchte ich analog zur Gliederung der gesamten Arbeit zunächst auf den Teil des Systems eingehen, der für die Anwendung der CARS Mikroskopie eingesetzt wurde. Wie bereits in Abschnitt 1.2 aufgezeigt wurde, gibt es eine Vielzahl von Forschungsfeldern in den Biowissenschaften, in denen die CARS Mikroskopie eingesetzt werden kann. Um eine möglichst breit einsetzbare Plattform zu bieten, stehen mehrere Anregungsquellen zur Verfügung. Diese sollen im ersten Abschnitt näher beschrieben werden. Eine Reihe von Optiken sind für die Kontrolle und Manipulation des Anregungslichtes notwendig. Der Strahlengang auf dem optischen Tisch bis zum Mikroskop wird daher in Abschnitt 3.1 erläutert. Anschließend möchte ich kurz auf das konfokale Mikroskop eingehen, das speziell auf die Anforderungen in der Zellbiologie und schnellen Mikroskopie ausgelegt ist. Zum Abschluss werde ich eine Auswahl an Experimenten beschreiben, die ich an diesem Aufbau durchgeführt habe. Diese sollen die Flexibilität der Technik und des Aufbaus demonstrieren. Die Proben reichen hierbei von einzelnen Lipiddoppelschichten im Nanometerbereich bis hin zu Gewebeschnitten aus dem Zentralnervensystem mit einer Größe von mehreren Millimetern. Auch auf der Zeitskala konnten wir einen großen Bereich abdecken, von Aufnahmen mit Videogeschwindigkeit bis hin zu Langzeitexperimenten über mehrere Tage. Ich werde jeweils eine kurze Einführung in die Fragestellung per se, eine Motivation für den Einsatz von CARS und eine Zusammenfassung der Ergebnisse geben.

3.1. Anregungsquellen

Wie aus den vorherigen Kapiteln hervorgeht, werden für die CARS Mikroskopie kurze Laserpulse bei mindestens zwei unterschiedlichen Wellenlängen benötigt. Zumindest eine dieser Wellenlängen sollte durchstimmbare sein, um unterschiedliche Schwingungsresonanzen ansprechen zu können. Zudem sind NIR-Quellen von Vorteil. Die verwendeten Pulszüge müssen synchronisiert sein. Hohe Repetitionsraten bieten bei relativ geringer, durchschnittlicher Anregungsleistung ausreichend Signalstärke für die schnelle Mikroskopie. Zum Zeitpunkt der Installation des Labors galten optisch parametrische Oszillatoren als ideale Anregungsquellen für die CARS Mikroskopie.^[36,62] In dieser Arbeit wurde ein kommerzielles System von A·P·E (Angewandte Physik & Elektronik GmbH, Berlin) verwendet. Das System besteht aus zwei Komponenten: dem eigentlichen optisch parametrischen Oszillator (OPO) und dessen Pumpquelle, einem frequenzverdoppelten Nd:YVO₄-Laser bei einer Wellenlänge von 532 nm. Diese werden in Abschnitt 3.1.1 beschrieben. Um eine größere Bandbreite an möglichen Anregungsfrequenzen zu erhalten wurde ein Ti:Saphir Lasersystem mit dem OPO System synchronisiert. Dieses basiert auf dem Mira-HP von Coherent (Coherent Deutschland GmbH, Dieburg). Das System von Coherent kann sowohl als Pikosekunden- als auch als Femtosekunden-Oszillator betrieben werden. In Abschnitt 3.1.2 werde ich dieses System genauer erläutern. Zuletzt werde ich auf die Synchronisation der Anregungsquellen eingehen.

3.1.1. Der optisch parametrische Oszillator

Der OPO Levante Emerald von A·P·E wird von einem diodengepumpten Nd:YVO₄-Festkörperlaser (picoTRAIN, HighQ Laser, Rankweil, Österreich) gepumpt. Es kann ein beliebiger Anteil der Fundamentalen bei 1064 nm frequenzverdoppelt werden. In der Regel wurde über 1 W der Fundamentalen ausgekoppelt und konnte als Stokes-Quelle für den CARS Prozess verwendet werden. Die restliche Leistung der Fundamentalen wurde zu 4,7 W bei 532 nm frequenzverdoppelt. Hiervon wurden mittels eines Glassubstrats ca. 10% für weitere Experimente ausgekoppelt. Der OPO wurde mit der verbliebenen Leistung gepumpt. Der OPO verwendet einen optisch nichtlinearen Kristall um in einem parametrischen Prozess eine Pumpwelle hoher Energie in zwei Wellen niedrigerer Energie umzuwandeln. Die resultierenden Wellen werden als Signal und Idler bezeichnet. Für den parametrischen Prozess gelten die Energie- und Impulserhaltung:

$$\omega_p = \omega_s + \omega_i \quad (3.1)$$

$$\mathbf{k}_p = \mathbf{k}_s + \mathbf{k}_i \quad (3.2)$$

Aus der Energieerhaltung ist eine unendliche Anzahl an möglichen Frequenzkombinationen erlaubt. Für eine effiziente Frequenzkonversion muss allerdings die Phasenanpassungsbedingung, die aus Gleichung 3.2 folgt, erfüllt sein (s.a. Kapitel 2). Bei einer gegebenen Pumpfrequenz können durch die Phasenanpassung die Signal- und Idlerwelle durchgestimmt werden. Hierfür gibt es eine ganze Reihe von Techniken, die auf den optischen Eigenschaften des jeweils verwendeten, doppelbrechenden Kristalls und der Orientierung des Kristalls zu den Lichtwellen beruhen. Anhand der Polarisierung der beteiligten Wellen werden beispielsweise Phasenanpassung des Typs I und II unterschieden. Bei Typ I besitzen Idler- und Signal-Welle die gleiche Polarisierung, senkrecht zur Polarisierung der Pumpwelle. Bei Typ II stehen Polarisierung von Signal und Idler senkrecht aufeinander. Von kollinear Phasenanpassung spricht man, wenn die Wellenvektoren aller beteiligten Strahlen die gleiche Richtung aufweisen. Entspricht diese Richtung einer der Hauptachsen des Kristalls spricht man von nichtkritischer Phasenanpassung. Bei der kritischen Phasenanpassung wird hingegen zumindest ein Wellenvektor und somit auch die Polarisierung von den Hauptachsen abgewinkelt. Die hiermit erzielte Änderung des Brechungsindex für diese Welle kann zur Phasenanpassung genutzt werden. Die nichtkritische Phasenanpassung nutzt hingegen die Temperaturabhängigkeit der Brechungsindizes des Kristalls (Vgl. Abb. 3.2). Die Bezeichnung nichtkritische Phasenanpassung bezieht sich auf die größere Toleranz gegenüber dem Eintrittswinkel der Strahlen in den Kristall und der somit vereinfachten Justage des Oszillators. Dank nichtkritischer Phasenanpassung wird zudem die Verwendung längerer Kristalle möglich und dadurch eine höhere Wirkungseffizienz erzielt. Der OPO ist ein optischer Resonator und wird als synchron gepumpt bezeichnet, wenn die Länge der optischen Kavität der Repetitionsrate des Pumpasers angepasst ist. Mittels dieser Resonanzbedingung wird die parametrische Verstärkung erst ermöglicht.

Der hier verwendete Levante Emerald ist solch ein synchron gepumptes System. In dem OPO kommt ein Lithiumtriborat (LBO) Kristall zum Einsatz. Neben einer hohen $\chi^{(2)}$ eignet er sich aufgrund seiner Transparenz im Bereich von 160-2600 nm und der hohen Zerstörschwelle für die Verwendung in OPOs.^[73] Die Phasenanpassung erfolgt kollinear, nach Typ I und nichtkritisch. Die Spiegel der Kavität besitzen eine hohe Reflektivität im Spektralbereich des Signalstrahls. Das System ist somit ein Signal-resonanter OPO. In Abb. 3.1 ist der Aufbau des Oszillators skizziert. Der Pumpstrahl wird mittels Linse L1 auf den Kristall C1 fokussiert. Der Kristall ist in einem Halter mit Heizelement fixiert. Die Temperatur wird selbst im Ruhemodus der Elektronik bei 100 °C gehalten. Der Kristall kann entlang der optischen Achse und in der Höhe ausgerichtet werden. Zudem stehen drei Rotationsachsen zur optimalen Orientierung des Kristalls zum Pumpstrahl (s.o.) zur Verfügung. Die Kavitätslänge wird über den Spiegel M2 mittels einer Kombination aus manuellem Verschiebtisch und Piezoaktor variiert. Der konkave Spiegel CM2

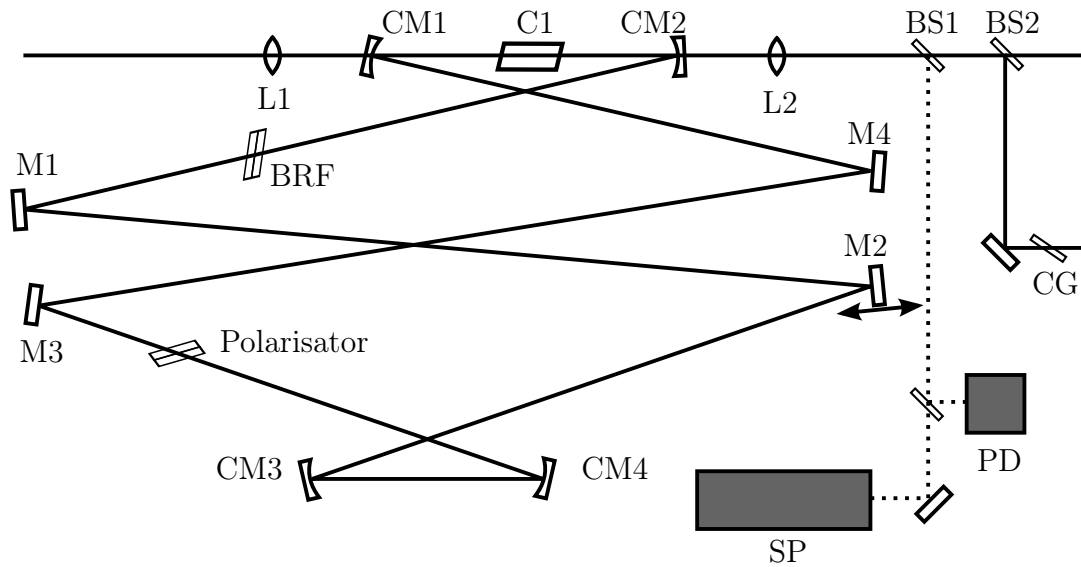


Abbildung 3.1.: Schematischer Aufbau des Optisch Parametrischen Oszillators. L1/L2 Linsen, CM1/CM2/CM3/CM4 Konkavspiegel, C1 LBO-Kristall, M1/M2/M3/M4 Spiegel, BRF doppelbrechender Kristall, BS1/BS2 Strahlteiler, CG Farbglas, PD Photodiode, SP Spektrometer.

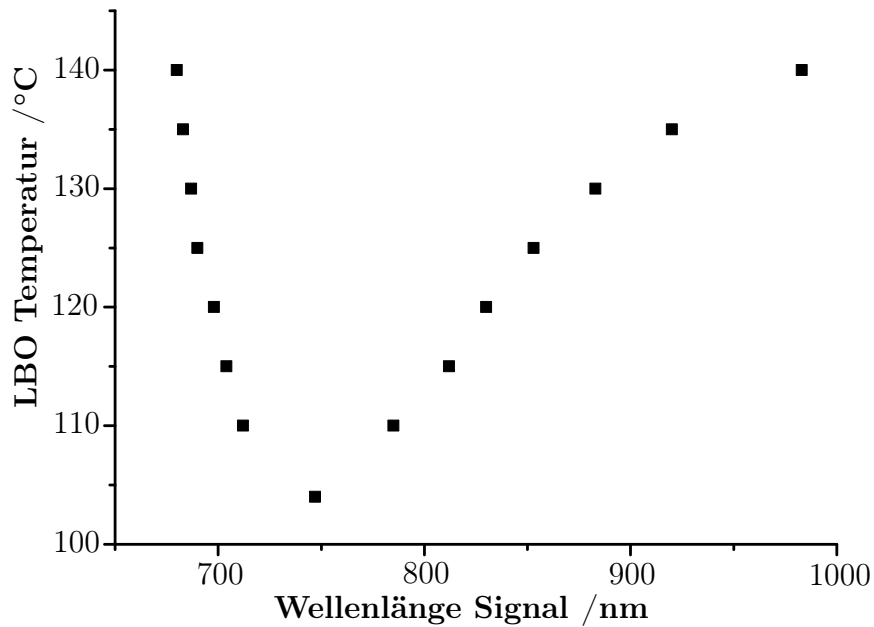


Abbildung 3.2.: Zusammenhang zwischen Wellenlänge des Signals und der Kristalltemperatur im LBO.

dient als Auskoppelspiegel des Resonators, Linse L2 als Kollimator. Der Strahlteiler BS1 reflektiert einen Teil des Signals zu Photodiode PD und dem Spektrometer SP. Der dichroitische Strahlteiler BS2 reflektiert den Signalstrahl und transmittiert den Idlerstrahl. Ein Farbglass CG dient zur Entfernung des übrigen Pumplichtes.

Mittels einer Kontrolleinheit können Pump- und Signalleistung sowie die Signal- und Idlerwellenlänge überwacht werden. Die Kontrolleinheit reguliert weiter die Kavitätslänge des Oszillators, die Temperatur des LBO Kristalls und den Winkel des Lyot-Filters. Diese drei Parameter beeinflussen die Wellenlänge des Signal und Idler. In Abb. 3.2 ist die Abhängigkeit der Signalwellenlänge von der Kristalltemperatur für das verwendete System gezeigt. Bei den Temperaturen die zwei Signalwellenlängen erlauben, kann mittels der Kavitätslänge der gewünschte Spektralbereich in Resonanz gebracht werden. Mittels eines Lyot-Filters ist die spektrale Feinabstimmung in einem durch Kavitätslänge und Kristalltemperatur vorbestimmten Bereich über ca. 10 nm möglich. Der Lyot-Filter besteht aus einem doppelbrechenden Kristall und einem anschließenden Polarisationsfilter. Die durch optische Doppelbrechung erzeugten Teilwellen erfahren beim Durchlaufen eines Kristalls der Länge L aufgrund der unterschiedlichen Brechungsindizes (n_o und n_a) für die jeweilige Polarisation einen Phasenunterschied δ :

$$\delta = (2\pi/\lambda)(n_o - n_a)L. \quad (3.3)$$

Bei einfallendem, linear polarisiertem Licht erhält man anschließend in der Regel elliptisch polarisiertes Licht. Nur für die Bedingung, dass der Phasenunterschied δ ein Vielfaches von 2π ist, erhält man linear polarisiertes Licht parallel zur ursprünglichen Polarisation und somit maximale Transmission. Die transmittierte Wellenlänge des Lyot-Filters lässt sich somit über eine Änderung der Kristalllänge L oder der Brechungsindizes (n_a bzw. n_o) bestimmen. Sowohl L als auch n_a können durch Drehung des Kristalls um die entsprechenden Achsen variiert werden.

3.1.2. Der Ti:Saphir Laser

Der Mira-HP von Coherent basiert auf einem ultraschnellen Ti:Saphir (Ti:Sa) Oszillator und wurde speziell zu hohen Durchschnittsleistungen von über 4 W bei ca. 800 nm (dem Maximum des Verstärkungsprofils) weiterentwickelt. Als Pumpquelle dient ein Verdi V18 (Coherent Deutschland GmbH, Dieburg), der mehr als 18 W cw bei 532 nm leistet. Der Verdi V18 ist ein diodengepumpter Nd:YVO₄-Laser, dessen Fundamentale zu 532 nm frequenzverdoppelt wird. Bevor ich auf den Aufbau des Mira-HP genauer eingehe, möchte ich auch hier einige Grundlagen erläutern. Der Ti:Sa-Kristall kann prinzipiell in einem Bereich von 680-1100 nm emittieren. Die Bandbreite des Ti:Sa-Lasers wird durch die verwendeten Optiken im Resonator und dessen Kavitätslänge L beschränkt. Die stehenden

Wellen (longitudinale Moden), die sich innerhalb des Resonators ausbilden, gehorchen der Bedingung

$$L = m\lambda/2 \quad (3.4)$$

Dies folgt aus der Tatsache, dass die Endpunkte der stehenden Wellen Knoten sind. Aus Gleichung 3.4 folgt der Frequenzabstand Δf der Moden m und $m+1$:

$$\Delta f = \frac{c}{2L} \quad (3.5)$$

Die Anzahl der theoretisch möglichen longitudinalen Moden eines Ti:Sa-Lasers ergibt sich somit aus der Bandbreite des Kristalls und der Kavitätslänge. Diese Moden oszillieren nun zunächst inkohärent/unabhängig in dem Resonator. Durch zufällige Überlagerung einzelner Moden kommt es zu Intensitätsfluktuationen. Je größer die Anzahl der Moden, desto größer sind die maximal erreichten Intensitäten. Um anstelle dieser zufällig fluktuierenden Intensitäten einen gepulsten Modus des Lasers zu erhalten, müssen die Moden eine feste Phasenbeziehung aufweisen. Diese Modenkopplung führt zu periodisch auftretender, konstruktiver Interferenz der Moden. Der zeitliche Abstand T der daraus resultierenden Pulse entspricht gerade einer Umlaufdauer des Pulses im Resonator, also

$$T = \frac{1}{\Delta f} \quad (3.6)$$

Die Modenkopplung kann auf verschiedene Arten erreicht werden. Bei aktiver Modenkopplung wird die Intensitätsfluktuation gezielt moduliert und hierdurch ein gemeinsames Anschwingen der Moden erzielt. Dies kann durch gepulste Anregung, Amplituden- oder Frequenzmodulation erreicht werden. Bei der passiven Modenkopplung ist kein externer Trigger notwendig. Zufällig auftretende Intensitätsfluktuationen werden durch einen geeigneten Mechanismus gezielt verstärkt und somit die Modenkopplung initiiert. Eine Möglichkeit dies zu erreichen ist der Einsatz eines sättigbaren Absorbers. Dieser absorbiert Licht bis zu einer gewissen Intensitätsschwelle und wird darüber transparent, so dass lediglich die hohen Intensitäten eines (zunächst spontan entstandenen) Laserpulses transmittiert werden. Im Mira-HP erfüllt eine Kerr-Linse, die den Strahldurchmesser in Abhängigkeit der Lichtintensität variiert, in Kombination mit einem Spalt, der die Transmission des Lichts in Abhängigkeit des Strahldurchmessers bestimmt, die Funktion des sättigbaren Absorbers. Die Fokussierung eines Laserstrahls durch eine gewöhnliche Linse beruht auf den unterschiedlichen Wegstrecken, die das Licht durch sie zurücklegt. Durch den Brechungsindex des Linsenmaterials wird die Phasengeschwindigkeit des Lichts reduziert: je größer die Wegstrecke, desto größer die Verlangsamung. Die Wellenfront wird somit gekrümmt und der kollimierte Laserstrahl durch eine bikonvexe Linse fokussiert. Anstelle der Variation der Wegstrecke bei konstantem Brechungsindex, kann man eine Linse auch durch Variation des Brechungsindex bei konstanter Wegstrecke erhalten

(Gradientenoptik). Die Kerr-Linse ist solch eine Gradientenlinse. Ihre Wirkungsweise beruht auf dem optischen Kerr-Effekt, einem nichtlinear optischen Effekt dritter Ordnung. Bei ausreichend hohen Intensitäten wird der Brechungsindex hierbei eine Funktion der Intensität:

$$n = n_1 + n_2 \cdot I \quad (3.7)$$

Geht man nun von einem gaußförmigen Intensitätsprofil des Laserstrahls aus, werden die Wellenfronten zum Rande hin weniger durch das Kerr-Medium verlangsamt, es kommt zur Fokussierung des Strahls (vgl. Abb. 3.3). Je höher die Intensität ist, desto stärker

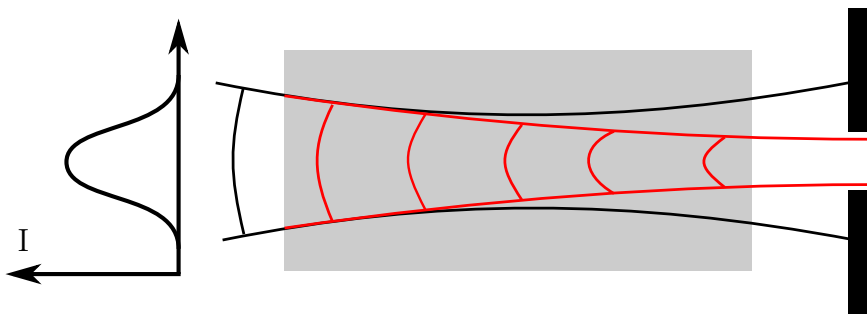


Abbildung 3.3.: Selbstfokussierung eines gepulsten Laserstrahls mit gaußförmigen Intensitätsprofil mittels einer Kerr-Linse (rot). Als Kerr-Medium dient der Ti:Sa-Kristall. Im kontinuierlichen Betrieb reicht die Laserleistung nicht zur Ausbildung der Kerr-Linse aus, der Spalt blockt einen Teil des kontinuierlichen Laserstrahls (schwarz).

wird der Strahl fokussiert. Im kontinuierlichen Betrieb reichen die Intensitäten nicht aus um eine Kerr-Linse auszubilden. Nur durch Modenkopplung und die resultierenden Laserpulse mit hohen Spitzenleistungen wird eine effektive Kerr-Linse erzeugt. Durch einen anschließenden Spalt kann somit eine Form von sättigbarem Absorber erhalten werden. Nur Laserpulse mit entsprechend hohen Intensitäten passieren den Spalt ohne Abschwächung, ein effizienter Rückkopplungsmechanismus für die Modenkopplung. Als Kerr-Medium dient im Mira der Ti:Sa-Kristall. Im Regelfall genügen die zufälligen Intensitätsfluktuationen nicht aus, um eine Kerr-Linse auszubilden. Es muss eine externe Störung erfolgen um spontan hohe Spitzenleistungen zu erzeugen. Durch gezielte Variation der Kavitätslänge können ausreichend starke Intensitätsfluktuationen erzeugt werden. Lassen mehrere Moden mit ausreichender Intensität, kann die Kerr-Linse ausgebildet werden und die Modenkopplung beginnt.

Die bisherigen Erläuterungen bezogen sich auf die Generierung kurzer Laserpulse. Spe-

ziell bei der Generierung ultrakurzer Pulse im Bereich weniger Pikosekunden oder kürzer, müssen zwei weitere Effekte für den Laserbetrieb berücksichtigt werden. Zum einen tritt die sogenannte Gruppengeschwindigkeitsdispersion (engl. group velocity dispersion, GVD) auf. In Abb. 3.4 ist eine typische Dispersionskurve eines transparenten Mediums dargestellt. Sie beschreibt die Abhängigkeit des Brechungsindex $n(\lambda)$ von der Wellenlänge λ . Wie bereits erwähnt ist die Phasengeschwindigkeit v_p durch den Brechungsindex

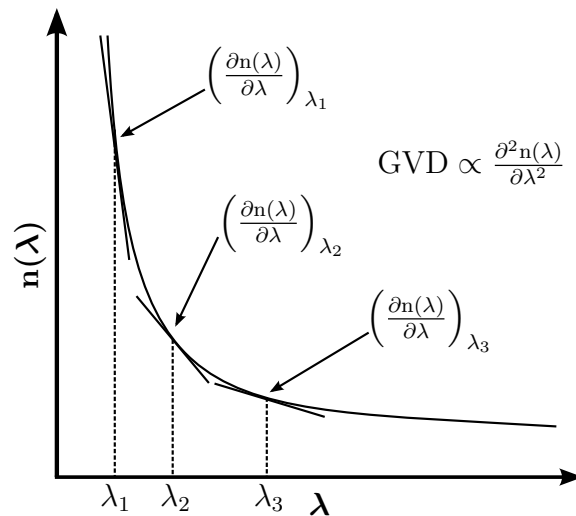


Abbildung 3.4.: Hypothetische Dispersionskurve eines transparenten Mediums. Die Gruppengeschwindigkeitsdispersion GVD wird durch die Krümmung der Dispersionskurve bestimmt.

$n(\lambda)$ gegeben. Die Gruppengeschwindigkeit v_g gibt die Rate an, mit der sich die Amplitudenänderung einer Welle fortbewegt, und wird durch die Steigung der Dispersionskurve bestimmt:

$$v_g = v_p \left(1 + \frac{\lambda}{n} \frac{\partial n}{\partial \lambda} \right) \quad (3.8)$$

Die Gruppengeschwindigkeitsdispersion ist proportional zur zweiten Ableitung der Dispersionskurve:

$$GVD \propto \frac{\partial^2 n}{\partial \lambda^2} \quad (3.9)$$

Da die spektrale Breite der Laserpulse invers proportional zur Pulsdauer ist, führt die Gruppengeschwindigkeitsdispersion besonders bei ultrakurzen Pulsen zu einem Laufzeitunterschied zwischen unterschiedlichen Frequenzen des Pulses. Im sichtbaren Spektralbereich besitzen transparente Materialien in der Regel eine positive Gruppengeschwindig-

keitsdispersion, d.h. die niederfrequenten (“roten”) Frequenzkomponenten bewegen sich schneller durch das Medium als die hochfrequenten (“blauen”) Frequenzkomponenten. Der Puls wird hierdurch verlängert und im zeitlichen Profil des Pulses erhält man einen Anstieg der Frequenz, man spricht hierbei von einem positiven “chirp” (der Ausdruck “chirp” leitet sich vom Zwitschern eines Vogels ab).

Ein weiterer Effekt in ultraschnellen Lasern ist die Selbstphasenmodulation (SPM). Wie bereits beschrieben, variiert der lokale Brechungsindex in einem Medium mit der Lichtintensität des Laserpulses, der durch das Medium wandert (optischer Kerr-Effekt). Somit erfolgt durch die hohe Intensität in der Mitte des zeitlichen Profils des Laserpulses eine größere Änderung des Brechungsindex verglichen zu den Bereichen der Anstiegsflanke und dem Abklingen des Pulses. Diese Variation des Brechungsindex beim Durchlaufen des Laserpulses führt zu einer weiteren Phasenverschiebung der verschiedenen Frequenzkomponenten, abhängig von der zeitlichen Lage innerhalb des Pulses. Es kommt zu einer spektralen Verbreiterung des Pulses, da neue Frequenzkomponenten generiert werden, und zu einem zusätzlichen, positiven “chirp”.

Durch die Oszillation in der Kavität führen selbst kleine “chirps” in der Summe zu einer Verbreiterung und Verzerrung der Laserpulse. Zur Kompensation des positiven “chirps” durch GVD und SPM in den dispersiven Elementen des Resonators wurden verschiedene Techniken entwickelt, die eine negative GVD einbringen. Eine variable, negative GVD kann durch unterschiedliche Wegstrecken für die unterschiedlichen Frequenzkomponenten erreicht werden. Die Verwendung eines Prismenkompressor ist eine gängige Methode hierfür. In Abb. 3.5 ist solch ein Aufbau skizziert. Das Prismenmaterial führt

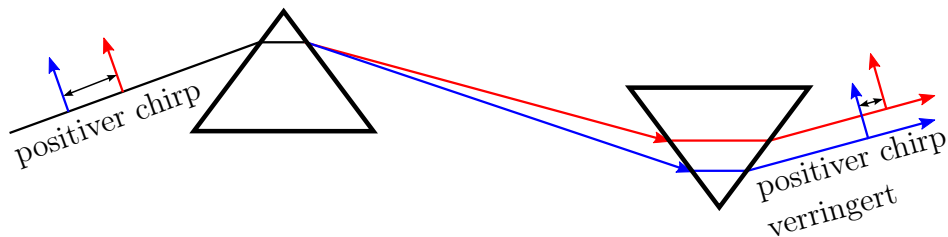


Abbildung 3.5.: Schematische Darstellung eines Prismenkompressors zur Einbringung einer negativen GVD.

ebenfalls zu einer positiven GVD, doch durch die kürzere Wegstrecke der kurzwelligen Frequenzkomponenten im Prismenmaterial wird brutto eine negative GVD erzielt. Eine Feinabstimmung der GVD erfolgt durch die Einbringung von mehr Prismenmaterial in den Strahlengang mittels Verschiebung eines Prismas. Diese Technik wird für den Femtosekunden-Oszillator des Mira verwendet.

Der Pikosekunden-Oszillator verwendet ein Gires-Tournouis-Interferometer (GTI) am

undurchlässigen Ende der Kavität. Hierbei handelt es sich um ein Etalon. Der Frontspiegel ist teildurchlässig, der zweite Spiegel hochreflektiv. Somit wird nahezu alles Licht in die Kavität reflektiert, allerdings mit einer frequenzabhängig modulierten Phasenänderung und somit Dispersion. Das GTI kann so konzipiert werden, dass eine negative GVD erhalten wird. Bei festem Abstand der Grenzflächen des GTI können so für diskrete Frequenzen bzw. Wellenlängen Pikosekunden-Pulse erhalten werden. Um über den gesamten Bereich des spektralen Verstärkungsprofils des Ti:Sa-Lasers die GVD korrigieren zu können, kann der Abstand im GTI mittels eines Piezoaktors angepasst werden. Gegenüber Prismen hat die Verwendung eines GTI den Vorteil geringerer, optischer Verluste. Allerdings ist es nur für Pulse geringer spektraler Bandbreite und somit längere Pulse ($\tau \gtrsim 100$ fs) geeignet.

In der Summe ist die Ausbildung der Laserpulse somit ein dynamischer Prozess, bei welchem unterschiedliche Phänomene teils gegenläufig agieren. Die Größe des Kerr-Effekts beispielsweise und somit auch die SPM variieren mit der Intensität, welche durch Verkürzung der Pulse ansteigt. Schließlich wird ein dynamisches Gleichgewicht der Prozesse erreicht, man spricht dann von einem Soliton. Durch diese Selbstregulation wird ein sehr stabiler Pulszug mit konstanter Amplitude und Breite erhalten.

Die Variation der Zentralwellenlänge (das "Durchstimmen") des Ti:Sa-Lasers erfolgt mit einem doppelbrechenden Wellenlängenfilter (engl. birefringent filter, BRF). Die Funktionsweise ist analog zum Lyot-Filter (s. 3.1.1), das Durchstimmen erfolgt mittels Rotation des doppelbrechenden Kristalls (Änderung des Einfallwinkels). Im Unterschied zum Lyot-Filter ist kein anschließender Polarisationsfilter vorhanden, die Verluste in der Transmission und der Verstärkung innerhalb des Laserresonators durch suboptimale Polarisation reichen als Filtereffekt aus.

In Abb. 3.6 ist der schematische Aufbau des Ti:Sa-Oszillators dargestellt. Der Ti:Sa-Kristall wird mittels Wasserkreislauf durch einen Thermostat gekühlt. Der Kristall dient neben seiner Funktion als Lasermedium auch als Kerr-Linse. Der Spalt befindet sich am Ende der Kavität vor dem Auskoppelspiegel M1. Die Öffnung des Spalts kann mittels Mikrometerschraube eingestellt werden. Die Verkleinerung des Spalts entspricht quasi einer Erhöhung der Sättigungsgrenze des sättigbaren Absorbers, was die Modenkopplung ermöglicht. Das als "butterfly" bezeichnete optische Element ist ein Glassubstrat, das zur Initiierung der Modenkopplung dient. Durch Änderung des Winkels des "butterfly" wird die Wegstrecke des Lichts durch das Glas variiert. Dies ist äquivalent zu einer Änderung der Kavitätslänge, da durch die Verzögerung des Lichts im Glas ebenfalls die Umlaufdauer T erhöht wird, und führt zu den benötigten Intensitätsfluktuationen.

Durch Einführen des Prismas BP1 in den Strahlengang wird der Strahl aus der Kavität des Pikosekunden-Oszillators mit GTI in die Kavität des Femtosekunden-Oszillators mit Prismenkompressor umgeleitet. Zudem müssen für den Umbau von Pikosekunde auf

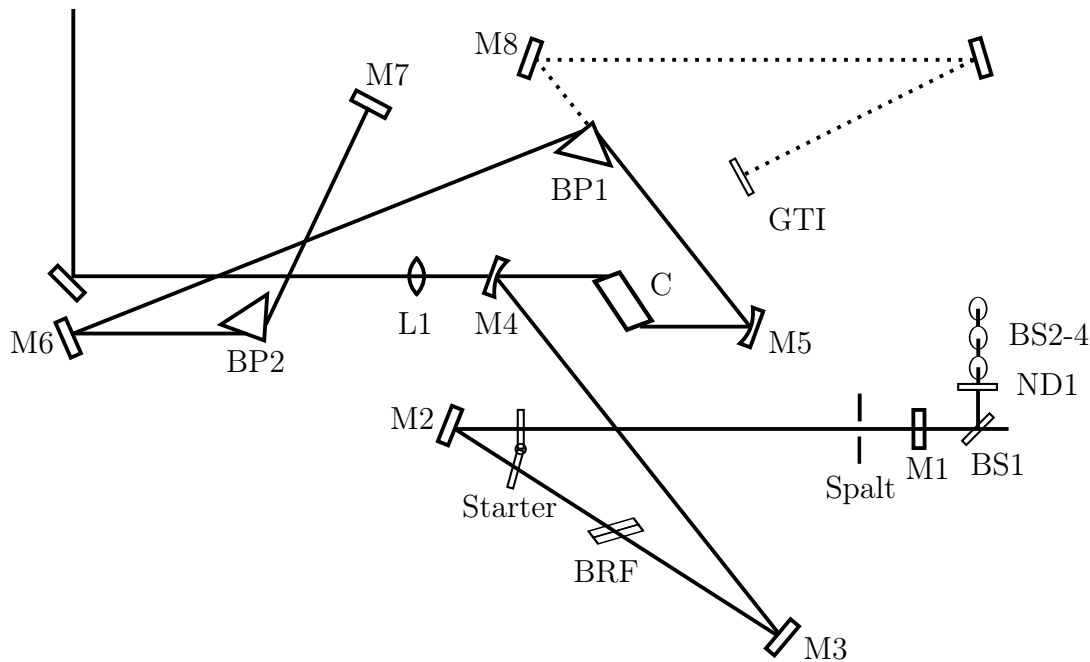


Abbildung 3.6.: Schematischer Aufbau des Ti:Sa-Oszillators. L1 Fokussierlinse, M4/M5 Konkavspiegel, M2/M3/M6/M8/M10 Spiegel, C Ti:Sa-Kristall, BP1/BP2 Prismen, M7 Endspiegel, GTI Gires-Tornouis-Interferometer, BRF doppelbrechender Kristall, M1 Auskoppelspiegel, BS1-BS4 Strahlteiler vor Photodioden PD1-PD3, ND1 Neutralsichtfilter.

Femtosekunde der doppelbrechende Wellenlängenfilter BRF und der Auskoppelspiegel M1 ausgetauscht werden. Der Prismenkompressor beinhaltet den Endspiegel M7, die Prismen werden somit zweimal durchlaufen. BP2 kann ebenfalls verschoben werden. Die Verschiebung von BP2 dient der Kompensation des chirps. Die GVD der gesamten Kavität kann mittels der Prismen von leicht negativen Werten bis zu größeren, negativen Werten variiert werden. Die kürzesten Pulse werden bei einer GVD nahe null erreicht. Beim Durchstimmen des Lasers verändern sich spektrale Breite und Pulslänge durch die Frequenzabhängigkeit der unterschiedlichen Prozesse. Besonders durch die Dispersion an den Prismen wird der Strahlengang im Prismenkompressor und somit auch die brutto GVD variiert. Ein Ausgleich mittels Verschiebung von BP2 ist daher notwendig. Der Strahlteiler BS1 versorgt die Detektoren PD1, PD2 und PD3 mit einem Teil des Laserlichts. Die langsame Photodiode PD1 dient der Kontrolle der Ausgangsleistung. Die schnelle Photodiode PD2 kann mittels Oszilloskop die Pulszüge anzeigen. PD3 dient als cw Detektor. Bei einem Anteil der cw Leistung von weniger als 1% der Gesamtleistung stoppt die Vibration des "butterfly". Im normalen gepulsten Betrieb beträgt das Verhältnis von restlicher cw Leistung zur gepulsten Durchschnittsleistung weniger als 10^{-4}

und somit zur Pulsspitzenleistung etwa 10^{-9} .

3.2. Synchronisation und zeitliche Überlappung der Anregungsquellen

Für die Effizienz der Anregung von NLO Prozessen mit zwei oder mehr Anregungsfrequenzen (SFG, CARS) ist die zeitliche Überlappung der Laserpulse entscheidend. Bei zeitlichen Abweichungen der einzelnen Pulse von einem perfekt periodischen Pulszug spricht man von einem "Jitter".¹ Dieser Jitter (das "Phasenrauschen") kann sich sowohl auf Abweichungen innerhalb eines Pulszuges, als auch auf relative Abweichungen zweier Pulszüge zueinander beziehen. Entscheidend für die oben angesprochene Anregungseffizienz ist, dass bei synchronisierten Lasersystemen die relative Phasenbeziehung der verwendeten Pulszüge konstant bleibt. Potma *et al.* haben den Einfluss des Jitters zweier synchronisierter Pikosekunden Ti:Sa-Laser bei der CARS Mikroskopie untersucht.^[75] Durch Minimierung des Jitters konnte das Rauschen des CARS-Signals drastisch reduziert werden. In CARS Aufnahmen konnten durch Fluktuationen und Drifts in der Phasenbeziehung der Laser verursachte dunkle Linienmuster komplett eliminiert werden. Um die zeitliche Überlappung zu erreichen müssen die Pulszüge der einzelnen Quellen nicht nur zeitlich synchronisiert sein, sondern auch die relative Verzögerung durch verschiedene Wegstrecken kompensiert werden, so dass die Pulse gleichzeitig auf die Probe treffen. Zunächst möchte ich anhand des OPO Systems auf die Ermittlung dieser "Zeit Null" eingehen. Im Rahmen dessen wird auch kurz auf den in dieser Arbeit verwendeten optischen Autokorrelator eingegangen. Anschließend folgt ein kurzer Einschub zum zeitlichen Rauschen in modengekoppelten Lasern. Basierend auf diesen Grundlagen werde ich dann das Verfahren zur Synchronisation des Ti:Sa-Lasers mit dem OPO erläutern. Hierfür wird eine kommerzielle Regeleinheit (SynchroLock, Coherent Deutschland GmbH, Dieburg) verwendet.

3.2.1. Der OPO und dessen Pumpquelle: Bestimmung der "Zeit Null"

Da es sich bei dem OPO um ein synchron gepumptes System handelt, sind die Pulszüge des Signals und Idlers mit dem ausgekoppelten Laseranteil bei 1064 nm der Pumpquelle

¹In Analogie zum Taktzittern in der Digitaltechnik wird diese Abweichung der Repetitionsperiode von einem festen Wert als Jitter oder auch Phasenrauschen bezüglich des Pulszugs bezeichnet.^[74] Der Begriff des Phasenrauschens wird hier lediglich in Bezug auf die Periodizität der Laserpulse im Pulszug verwendet und muss klar vom optischen Phasenrauschen eines Lasers getrennt werden.

synchronisiert. Lediglich durch Vibrationen der Komponenten der Freistrahloptik kommt es zu Unregelmäßigkeiten in der Phasenbeziehung der Pulszüge. Durch eine Verzögerungsstrecke (s. Abschnitt 3.3) kann der Wegunterschied der Pulszüge zeitlich ausgeglichen werden. Um "Zeit Null" zu finden, wurden zunächst die Pulszüge mittels einer schnellen Photodiode (PDA10A, Thorlabs GmbH, München) auf einem Oszilloskop (Wavesurfer 64Xs, LeCroy Europe GmbH, Heidelberg) dargestellt. Hiermit kann die Verzögerung auf ca. 300 ps bzw. 90 mm und somit die benötigte Ausgleichstrecke abgeschätzt werden.

Für die exakte Bestimmung von "Zeit Null" wurde ein Autokorrelator (pulseCheck, Angewandte Physik & Elektronik GmbH, Berlin) verwendet. In einem optischen Autokorrelator werden die Pulszüge mittels 50:50-Strahlteiler aufgetrennt. Diese zwei Pulszüge werden anschließend wieder überlagert und erzeugen in einem nichtlinear optischen Medium ein Signal, dessen Stärke von der zeitlichen Überlappung der Pulse abhängt. Der Aufbau des verwendeten Autokorrelators beruht auf einem Michelson-Interferometer mit NLO Kristall zur SHG (s. Abb. 3.7). Der pulseCheck besitzt einen Scanbereich von 50 ps.

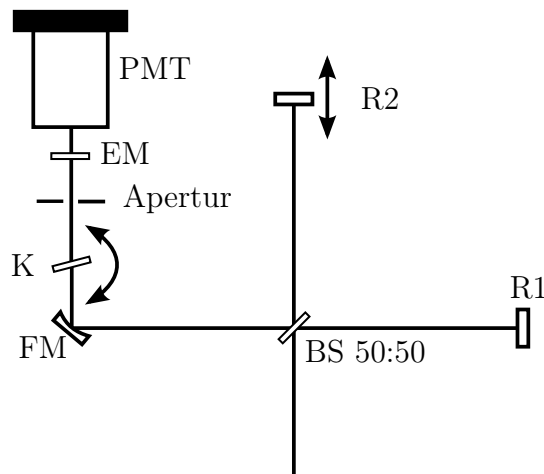


Abbildung 3.7.: Schematischer Aufbau des Autokorrelators pulseCheck. BS Strahlteiler, R1/R2 Retroreflektor, FM Konkavspiegel, K NLO Kristall, EM Emissionsfilter, PMT Detektor.

Ein Photoelektronenvervielfacher (engl. photomultiplier tube, PMT) dient als Detektor, die optischen Elemente wie Kristall und Filter sind auf den NIR-Bereich von 700-1100 nm ausgelegt. Der Kristall kann mittels Servomotor gedreht und somit für SHG bei unterschiedlichen Wellenlängen der Fundamentalen optimiert werden. Die SHG kann sowohl in kollinearer Geometrie als auch nicht-kollinear und somit hintergrundfrei erfolgen. Das zeitliche Ansprechverhalten des Detektors ist deutlich länger als die vermessenen Pulse.

Das Signal der SHG ist proportional zu $(E(t) + E(t - \tau))^2$, gemessen wird somit die interferometrische Autokorrelation:

$$I(\tau) = \int_{-N}^N |(E(t) + E(t - \tau))^2|^2 dt \quad (3.10)$$

Aus der Halbwertsbreite der Autokorrelation eines Pulses kann dessen Pulsdauer ermittelt werden. Zur Ermittlung von "Zeit Null" werden die Pulszüge der zwei zeitlich zu überlappenden Laser in den Autokorrelator eingekoppelt. Weisen die Pulszüge eine relative Verzögerung im Scanbereich des Autokorrelators auf, führt dies mittels SFG zu einer Kreuzkorrelation mit entsprechendem zeitlichen Versatz zur Autokorrelation. Durch Ausgleich der Verzögerung können die Autokorrelationen und Kreuzkorrelationen überlappt werden, man hat "Zeit Null" bestimmt.

3.2.2. Zeitliches Rauschen in modengekoppelten Lasern und Synchronisation solcher Systeme

Die Repetitionsrate Δf passiv modengekoppelter Laser ist durch deren Kavitätslänge L gegeben:

$$\Delta f = \frac{c}{2L} \quad (3.11)$$

Fluktuationen und Driften der Kavitätslänge können durch akustische und mechanische Vibrationen oder thermische Gradienten verursacht werden. Diese und Instabilitäten des Pumplasers führen folglich zu Änderungen der Repetitionsrate und somit zu einem Jitter. Eine erste umfassende Beschreibung des Rauschverhaltens modengekoppelter Laser erfolgte durch Linde.^[76] Diese Arbeit basierte auf Charakterisierung des Rauschverhaltens mittels der spektralen Leistungsdichte der Laserleistung. Allerdings ging er hierbei für die Erzeugung der Fluktuationen von einem stationären Prozess aus. Dieses Modell trifft für Systeme, die mittels stabiler, externer Referenz moduliert werden, zu. Für passiv modengekoppelte Systeme (beispielsweise über Kerr-Linsen Modenkopplung) verhalten sich Fluktuationen des Zeitintervalls zwischen den einzelnen Pulsen kumulativ. Die Modulation erfolgt intern, die zeitliche Position des n-ten Pulses hängt von Position des (n-1)-ten Pulses ab. Somit handelt es sich um nichtstationäre Prozesse, die einer komplexeren theoretischen Beschreibung bedürfen. Ein entsprechendes Modell wurde von Haus und Mecozzi für schnelle, sättigbare Absorber und solitonartige Pulserzeugung entwickelt.^[77] Paschotta veröffentlichte schließlich 2004 einen numerischen Ansatz zur Beschreibung des kompletten Rauschverhaltens passiv und aktiv modengekoppelter Laser und konnte die Beiträge einzelner Prozesse (Quantenrauschen, Spiegelvibrationen, Kopplung von Intensitäts- und Phasenrauschen) quantifizieren.^[78, 79] Für die Syn-

chronisation von Lasersystemen, die unabhängig voneinander Pulse erzeugen, spielt das Phasenrauschen und vor allem das kumulative Verhalten bei passiv modengekoppelten Lasern eine große Rolle. Ohne Synchronisation würden die Pulszüge bereits durch leichte Fluktuationen “auseinander laufen”. Die Synchronisation von Lasersystemen auf eine externe Referenz wurde erstmals durch Rodwell *et al.* demonstriert.^[74] In der Gruppe von Sibbett wurden erstmals passiv modengekoppelte Lasersysteme synchronisiert. Wie aus obiger Diskussion hervorgeht, ist dies deutlich anspruchsvoller, da bereits kleine Fluktuationen der Repetitionsperiode zu großen Phasenverschiebungen zwischen den Pulszügen führen können. Ein Meilenstein in der Entwicklung von Synchronisationsverfahren ist sicherlich die Arbeit von Spence in der ein Jitter nahe dem Quantenlimit erzielt wurde.^[80] Die Optimierung der Mechanik, die Verwendung eines Noise-Eater zur Minimierung des Amplitudenrauschens im Referenzsignal des Ti:Sa-Lasers und die Verwendung der 10ten Harmonischen des Referenzsignals waren hierfür die entscheidenden Punkte. Wie bereits von Linde gezeigt, bietet die Verwendung der höheren Harmonischen eine deutlich verbesserte Empfindlichkeit bezüglich des Phasenrauschens.^[46, 76]

Um die Synchronisation eines Lasers auf ein externes Referenzsignal zu bewerkstelligen, sind drei Dinge zu beachten. Das Phasenrauschen bezüglich des Pulszugs des Lasers sollte minimiert werden. Entsprechende Ansätze sind in der bereits erwähnten Literatur zum Rauschverhalten beschrieben. Für den Ausgleich von Phasenverschiebungen muss die Repetitionsrate angepasst werden. Dies geschieht über die Änderung der Kavitätslänge in der Regel mittels eines Piezoaktors, der die Position eines Spiegels variiert. Schließlich muss der Jitter zum Referenzsignal exakt bestimmt werden, so dass der Ausgleich entsprechend präzise erfolgen kann.

Funktionsweise des SynchroLocks Die Pulszüge des Lasers werden mittels einer schnellen Photodiode (2 GHz) detektiert. Dieses Signal wird mit dem Signal einer externen Referenz (gleicher Frequenz) gemischt. Die Frequenzkomponenten werden verglichen und die Differenzfrequenz der Photodiode und des Referenzsignals ausgegeben. Die Kavitätslänge wird nun zunächst grob mittels eines Verschiebetisches mit Schrittmotor, auf dem der Endspiegel M1 montiert ist, auf eine Frequenzdifferenz von ca. 20 Hz optimiert. Erst nach dieser ersten Optimierung wird eine Phasenregelschleife aktiviert. Mit dieser Schleife wird ein Piezoaktor an Spiegel M2 gesteuert und wiederum über Anpassung der Kavitätslänge der Laser nun tatsächlich auf die Phase der Referenz “gelocked”. Um auch über einen längeren Zeitraum eine Stabilität der Synchronisation zu gewährleisten wurde zusätzlich eine dritte Stellschraube für die Kavitätslänge implementiert. Der Starter im Laseroszillator ist ein über einen Galvoantrieb gedrehtes Glassubstrat (“butterfly”). Durch Verdrehung ändert sich Weglänge im Resonator deutlich. Eine zur Piezoansteuerung parallele Phasenregelschleife steuert diesen Galvoantrieb und ermöglicht so eine

Kompensation langsamer Frequenzdrifts.

Das durch die Photodiode detektierte Signal beinhaltet sowohl das Amplituden- als auch das Phasenrauschen des Lasers. Für die Synchronisation ist nur letzteres entscheidend. Die Detektion des Jitters auf Basis der Fundamentalenfrequenz der Repetitionsrate beinhaltet somit noch einen relativ großen Fehler. Der relative Anteil des Amplitudenrauschens am Fehler verringert sich bei der Verwendung höherer Harmonischer des Signals. Die Wahl des geeigneten Frequenzbereichs für die Harmonische stellt einen Kompromiss zwischen verbessertem Verhältnis der Rauschbeiträge, der Stärke des Photodiodensignals und der elektronischen Realisierbarkeit. Es werden daher bei stabiler Synchronisation auf Basis der Fundamentalen die neunten Harmonischen verglichen, die Phase angepasst, die Kontrollschleife der Harmonischen aktiviert und die Kontrollschleife der Fundamentalen aus der Phasenregelschleife genommen. Der Grund für die Verwendung der Fundamentalen trotz des hohen Amplitudenrauschens liegt in der Bestimmung der absoluten Phasenbeziehung zwischen Referenzoszillator und phasengekoppeltem Oszillator. Die Fundamentale dient zur (groben) Bestimmung der Phasenbeziehung über den gesamten Zeitbereich zwischen zwei aufeinander folgenden Pulsen, was unter reiner Verwendung der Harmonischen nicht möglich wäre. Man kann dies in Analogie zu einer differentiellen Mikrometerschraube sehen.^[81] Die Verwendung der Harmonischen ermöglicht die exakte Feinabstimmung in einem begrenzten Bereich.

Synchronisation der Systeme und Messung des Jitters Da der Ti:Sa-Laser ein unabhängiges System darstellt, müssen dessen durch Modenkopplung generierte Pulszüge mit den anderen Anregungsquellen synchronisiert werden. Er wird als “Slave” bezeichnet. Das OPO System dient hierbei als Referenzoszillator (“Master”). SynchroLock kann sowohl das elektronische Signal der Photodiode der Pumpquelle des OPOs als auch ein optisches Signal, die Pulse werden mittels Faser auf eine interne PD geleitet, als Master-Clock verwenden. Das Signal auf den Kanälen von Master und Slave sollte die gleiche Stärke besitzen. Das SynchroLock bietet sowohl eine automatisierte Routine zur Synchronisation als auch die Möglichkeit die Schritte einzeln manuell durchzuführen. Die relative Phasenbeziehung der Oszillatoren kann bei automatischer Synchronisation nach Aktivierung der Phasenregelschleife nicht mehr variiert werden (s.u.). Daher wurde stets die manuelle Variante verwendet. Zunächst muss ein stabiler Betrieb der Oszillatoren erreicht werden, so dass mittels Schrittmotor eine stabile Frequenzdifferenz von 20 Hz eingestellt werden kann. Nach erfolgreicher Aktivierung der fundamentalen Phasenregelschleife kann die relative Phase elektronisch über die gesamte Umlaufdauer von etwa 13 ns angepasst werden. Auf diese Weise kann ohne Verzögerungsstrecke “Zeit Null” analog zu Abschnitt 3.2.1 eingestellt werden. Das Signal der Kreuzkorrelation ist allerdings

aufgrund des hohen Jitters noch sehr verrauscht. Anschließend kann die Harmonische Phasenregelschleife zur Synchronisation verwendet werden. Diese erlaubt allerdings nur noch eine Variation der relativen Phase von ca. 100 ps.

Wie in^[75] gezeigt wurde, ist eine stabile und präzise Synchronisation entscheidend für die Qualität der CARS Aufnahmen. Der Jitter kann über Fluktuationen in der Kreuzkorrelation der synchronisierten Pulszüge gemessen werden.^[82–84] Coherent spezifiziert das SynchroLock System mit einem Jitter von <250 fs im Bereich von 0,02-160 Hz. Diese Spezifikation bezieht sich allerdings auf die Synchronisation zweier Mira Ti:Sa-Laser unter Laborbedingungen vergleichbar mit dem Entwicklungszentrum von Coherent. Lediglich mit dem optischen Signal als Referenz konnte der spezifizierte Jitter von 250 fs kurzzeitig erreicht werden. Hierfür musste allerdings ein relativ hoher loop gain für die Steuerung des Piezos verwendet werden. Dies führte zu einer Instabilität des Systems. Bereits auf akustische Störungen reagierte das System sehr empfindlich. Es kam zu einer Übersteuerung, Phasen- und Modenkopplung brachen zusammen. In der Regel musste daher mit einem Jitter >250 fs gearbeitet werden.

3.3. Der Anregungsstrahlengang

Für die NLO Mikroskopie sind Ansprüche an die Anregungsoptik deutlich höher als für klassische Mikroskopiemethoden. Die in 3.1 aufgezeigten Lichtquellen sind komplexe Systeme, die sowohl bei der Handhabung als auch im Raumannspruch nicht mit einfachen Diodenlasern vergleichbar sind. Andererseits ermöglichen die hohen Ausgangsleistungen und die Variabilität der Systeme eine Vielzahl an Experimenten. Der Anspruch den Gesamtaufbau möglichst flexibel zu gestalten erhöhte aber sowohl die Komplexität als auch den Raumannspruch des Aufbaus weiter. Die Lichtquellen belegen ein Ende eines L-förmigen, optischen Tisches. Am anderen Ende befinden sich zwei Mikroskope. Aufgabe war es die unterschiedlichen Strahlen bzw. Pulszüge räumlich und zeitlich im Fokus der Mikroskope zu überlappen. Für die NLO Mikroskopie sind hohe Anregungsleistungen und die Erfüllung der Phasenbedingung entscheidend. Um dies und das maximale Auflösungsvermögen zu erreichen, müssen "saubere" (zentrosymmetrische und gaußförmige) Strahlprofile hart fokussiert werden. Zur Fokussierung werden daher hochwertige Mikroskopobjektive hoher Numerischer Apertur (N.A.) verwendet. Im Verlauf dieser Arbeit wurde der Anregungsstrahlengang im Detail mannigfach variiert. Daher stellt die Skizze des Aufbaus in Abb. 3.8 nur eine mögliche Konfiguration dar, die allerdings die entscheidenden Komponenten enthält. Im Folgenden sollen hier deren Funktion erläutert werden.

Im Strahlengang der Fundamentalen des HighQ Lasersystems dient zunächst ein

Kepler-Teleskop (T1) zur Korrektur der vorhandenen, leichten Strahldivergenz. Die relativ lange Wegstrecke vom Lasersystem zu den verwendeten Mikroskopen erfordert eine gute Kollimation der verwendeten Strahlen. Zusätzlich kann mittels einer Lochblende (P50C, Thorlabs GmbH, München) im Fokus des Teleskops das Strahlprofil verbessert werden. Die Lochblende dient hierbei als Filter für unerwünschte Raumfrequenzen in der Fourierebene der Linsen. Man erhält somit einen Laserstrahl mit annähernd gaußförmigem Strahlprofil. Mittels einer Verzögerungsstrecke wird die zeitliche Überlappung der Fundamentalen bei 1064 nm und dem Signal des OPOs erreicht (s.a. 3.2.1). Zwei Spiegel dienen hierbei als Retroreflektor auf einem motorisierten Verschiebetisch (LNR50S/M, Thorlabs GmbH, München).

Ein weiteres Teleskop T3 dient zur Korrektur chromatischer Aberrationen des Mikroskopobjektivs im NIR-Bereich. In der Regel sind Mikroskopobjektive für den sichtbaren Bereich sehr gut chromatisch korrigiert, weisen aber dagegen im NIR-Bereich große chromatische Aberrationen auf. Daher werden zwei kollimierte Laserstrahlen unterschiedlicher Wellenlänge im NIR-Bereich nicht in der gleichen Ebene fokussiert. Um die zur CARS Mikroskopie verwendeten Pump- und Stokesstrahlen in z-Richtung zu überlappen, müssen diese divergent bzw. konvergent sein. Daher wurde für jeden verwendeten Strahl ein Teleskop vor der räumlichen Überlappung mit den anderen Strahlen eingebaut (T2, T3, T5). Die Justage der Teleskope und somit der Divergenz/Konvergenz der Strahlen stellte hierbei einen Kompromiss zwischen optimaler Überlappung der Foki in z-Richtung und Transmission des Scanners im kommerziellen Mikroskop TCS SP5 (s. 3.4) dar. In der Scaneinheit des Mikroskops erfolgte die Aufweitung des Strahls, um die rückseitige Apertur des Objektivs zu (über-)füllen und somit die gesamte N.A. zu nutzen. Der Strahldurchmesser beim Einkoppeln musste entsprechend gering sein, um Verluste durch Beschneidung des Strahles im Scankopf zu vermeiden. Die Wegstrecke zwischen den Teleskopen und dem Spiegel zur Einkopplung in das TCS SP5 betrug über 1,5 m. Die Divergenz/Konvergenz der Strahlen konnte folglich nur minimal variiert werden.

Im Strahlengang des Signals des OPOs befindet sich ein Glassubstrat. Der Reflex an diesem wird in eine Faser eingekoppelt, die zu einer Photodiode des SynchroLock führt und zur Synchronisation des Ti:Sa-Lasers genutzt wird (s. 3.2.2). Die Polarisation des Signalstrahls kann mittels einer $\lambda/2$ -Verzögerungsplatte gedreht werden. Somit sind Polarisations-CARS Experimente möglich, d.h. neben der Lage von Schwingungsresonanzen kann auch der Depolarisationsgrad von Schwingungen zur selektiven Abbildung genutzt werden.^[85] Der Signalstrahl des OPOs und die Fundamentale des HighQ Lasers werden mittels eines hochreflektiven Spiegels für 1064 nm überlappt.

Im Strahlengang nach dem Ti:Sa-Oszillator befindet sich ebenfalls zunächst ein Glassubstrat zum Abgreifen der Pulszüge für die Synchronisation. Das Teleskop T4 dient

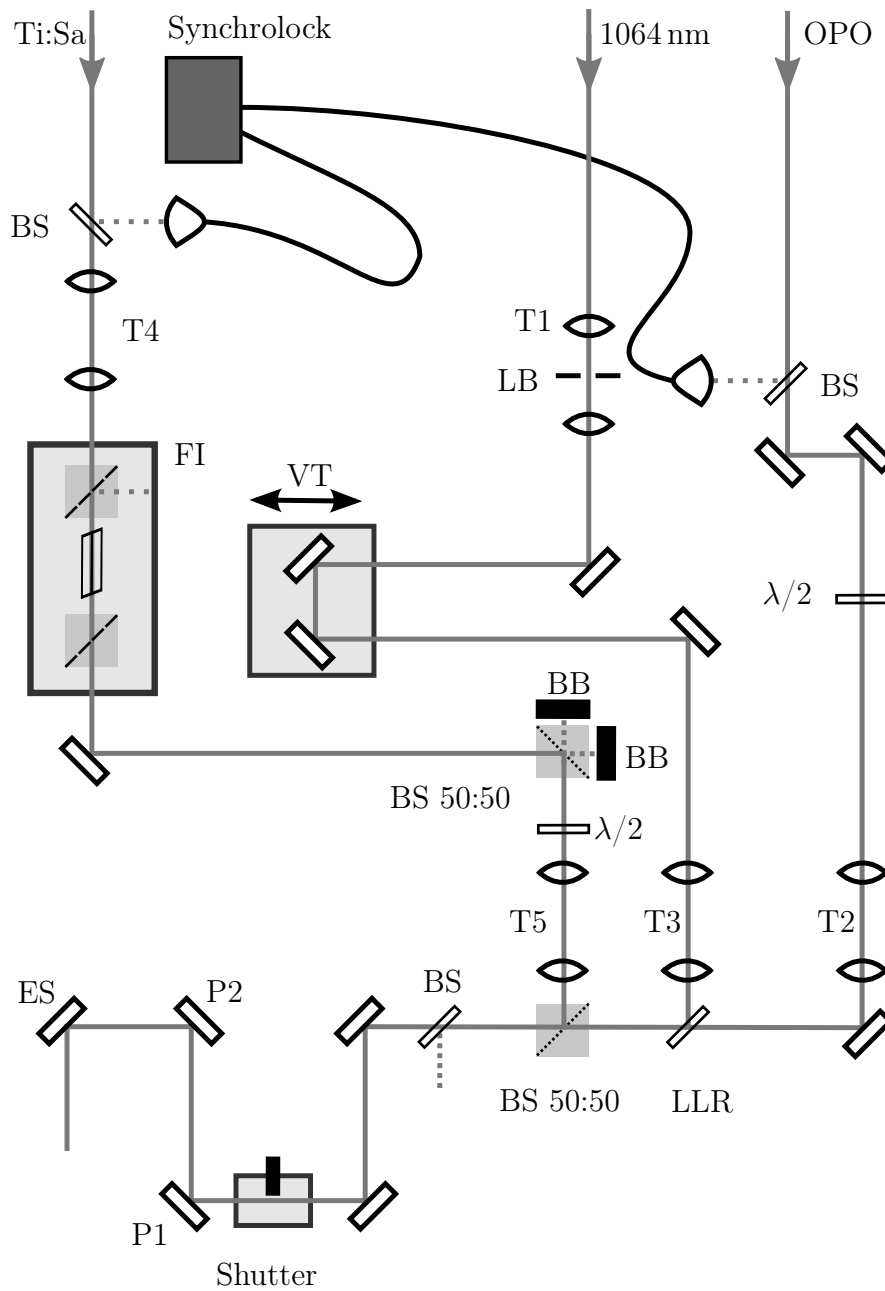


Abbildung 3.8.: Schematische Darstellung des Anregungsstrahlengangs. T1/T2/T3/T4/T5 Teleskope, LB Lochblende, BS Glassubstrate, $\lambda/2$ Verzögerungsplatte, LLR Laserlinien Reflektor 1064 nm, BS 50:50 Strahlteiler 50:50, FI Faraday Isolator, VT motorisierter Verschiebetisch, BB Strahlblock, P1/P2 Periskop, ES Einkoppelspiegel Multiphotoneneingang des Leica Mikroskops.

zur Kollimation des divergenten Laserstrahls. Rückreflexe aus dem Strahlengang störten die stabile Modenkopplung im Oszillator. Bei Fokussierung des Ti:Sa-Laserstrahls auf ein Deckglas mit dem Mikroskop brach die Modenkopplung komplett zusammen. Daher musste für den Ti:Sa-Oszillator im Gegensatz zum HighQ Laser und dem OPO ein optischer Isolator (ISO-05-800-BB-P, Newport Spectra-Physics GmbH, Darmstadt) verwendet werden, der Laserlicht lediglich in einer Richtung transmittiert. Die Funktionsweise des optischen Isolators beruht auf dem Faraday-Effekt. Die Polarisationssebene des Laserlichts wird durch ein konstantes Magnetfeld, das entlang der optischen Achse in einem transparenten Material angelegt ist, gedreht. Der Drehwinkel ist abhängig von der Wegstrecke d , der magnetischen Flussdichte B und einer Materialkonstanten V (Verdet-Konstante). Letztere bestimmt auch die Drehrichtung in Abhängigkeit von der Ausbreitungsrichtung des Lichtes. Bei einem optischen Isolator wird die Polarisation des Lichts beim Durchgang um 45° gedreht. Vor und nach dem magnetisierten Medium befinden sich Polarisatoren, deren Achsen 45° zueinander verdreht sind. Beim ersten Durchgang wird das Laserlicht somit komplett transmittiert. Die Polarisation eines Rückreflexes wird allerdings beim Durchgang erneut um 45° gedreht. Die gesamte Drehung beträgt nun 90° relativ zur ursprünglichen Polarisation und zur Achse des ersten Polarisators. Durch die Abhängigkeit der Drehrichtung von der Durchlaufrichtung des Lichts kann das Laserlicht folglich nur in einer Richtung transmittiert werden. Der in dieser Arbeit verwendete Faraday-Isolator besitzt einen Neodym-Eisen-Bor $\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$ Dauermagneten ($B > 10000$ Gauß), einen Terbium-Gallium-Granat $\text{Tb}_3\text{Ga}_5\text{O}_{12}$ Kristall als optisches Medium und Polarisationsstrahlteilerwürfel als Polarisatoren.

Die Strahlen des Ti:Sa-Lasers und des OPOs wurden mittels eines breitbandigen 50:50 Strahlteilerwürfels überlappt. Hierdurch konnten beide Systeme bei beliebigen Wellenlängen betrieben werden, ohne jeweils einen passenden Strahlkombinierer einzubauen. Aufgrund der hohen Ausgangsleistungen von jeweils über 1 W konnte problemlos auf die Hälfte des Lichts verzichtet werden. Das Glassubstrat BS diente zum Auskoppeln von etwa. 5% der Strahlintensitäten. Dieses Licht konnte für Messungen mit dem Autokorrelator (s. 3.2.2) oder zum Überwachen der Laserleistung verwendet werden. Vor Einkoppeln der Laserstrahlen in das jeweilige Mikroskop wurden sowohl zeitliche als auch räumliche Überlappung optimiert. Die räumliche Überlappung wurde auf einer Strecke von 4-7 m geprüft. Die Einkopplung in das Leica Mikroskop erfolgte mittels eines Periskops und des Einkoppelspiegels am Multiphotoneneingang zum Scankopf.

3.4. Das Multiphotonen Mikroskop

Für die Anwendung der CARS Technik auf relevante Fragestellungen in den Biowissenschaften ist die Verwendung eines kommerziellen Mikroskops mit entsprechender Ausstattung unabdingbar. Schnelle, hochauflösende Abbildung mittels unterschiedlicher Techniken und dies unter idealen Bedingungen für Zellen kann nur ein kommerzielles Produkt bieten. Zudem erleichtert die intuitive Bedienbarkeit die Verwendung als Arbeitsplattform für mehrere Nutzer. Als Basis diene hierfür das konfokale Mikroskop TCS SP5 von Leica. In Abb. 3.9 ist der schematische Aufbau des Mikroskops gezeigt. Für die konfokale Mikroskopie stehen zwei kontinuierliche Anregungsquellen zur Verfügung: ein Ar-Ionen Laser und ein Helium-Neon-Laser. Diese bieten verschiedene Anregungswellenlängen im sichtbaren Bereich (458 nm, 476 nm, 488 nm, 496 nm, 514 nm und 632 nm), die mittels eines akustooptischen Strahlteilers (engl. acousto optical beamsplitter, AOB) überlappt und abgeschwächt werden können.^[86] Die Aufnahmen werden mittels Abrastern der Probe mit fokussiertem Laserstrahl erzeugt. Da hierfür lediglich Spiegel verkippt werden müssen, können auf diese Weise deutlich höhere Aufnahmege-schwindigkeiten als durch Bewegung der Probe bei fixiertem Laserfokus erreicht werden. Das Leica Mikroskop verfügt über zwei Scanner (tandem confocal scanner, TCS). Beim klassischen Scanner kann die Scangeschwindigkeit (angegeben in der Frequenz des Abrasterns einer Linie) variiert werden. Ab einer Geschwindigkeit von 700 Hz steht allerdings nicht mehr das gesamte Scanfeld zur Verfügung. Bei der maximalen Geschwindigkeit von 1400 Hz wird ein 4× verkleinerter Bereich abgebildet. Für hochaufgelöste Aufnahmen mit Videogeschwindigkeit steht daher ein zweiter, resonanter Scanner zur Verfügung. Dieser bietet eine maximale Geschwindigkeit von 8000 Hz bei einem lediglich um den Faktor 1,7 verkleinerten Scanbereich. Um mehrere Millimeter große Bereiche einer Probe abzubilden, ist das Mikroskop zusätzlich mit einem motorisierten Verschiebetisch ausgestattet. Hiermit können mosaikartig mittels Laserabrastern erzeugte Einzelbilder zu einer Gesamtaufnahme zusammengesetzt werden ("tile scan" Funktion). Für die konfokale Detektion stehen zwei PMTs (Photoelektronenvervielfacher, engl. photomultiplier tube, PMT) zur Verfügung. Anstelle von Emissionsfiltern wird ein Spektrograph verwendet. Dessen Aufbau ist in Abb. 3.9 dargestellt. Das Emissionslicht wird mittels Prisma spektral aufgetrennt und auf den ersten PMT geleitet. Der Spalt vor diesem PMT dient nicht nur als spektraler Filter, dessen Lage und Breite variabel sind, sondern auch als Spiegel für die nicht detektierten Wellenlängen. Diese werden auf weitere PMTs mit zugehörigem Spalt reflektiert. Die Bezeichnung SP5 leitet sich von den so bis zu maximal 5 optionalen, spektralen Kanälen des konfokalen Mikroskops ab.

Die Anregungsquellen für die NLO Mikroskopie können mittels des MFP (engl. multi function port) eingekoppelt werden. Hierbei handelt es sich um einen Schieber mit

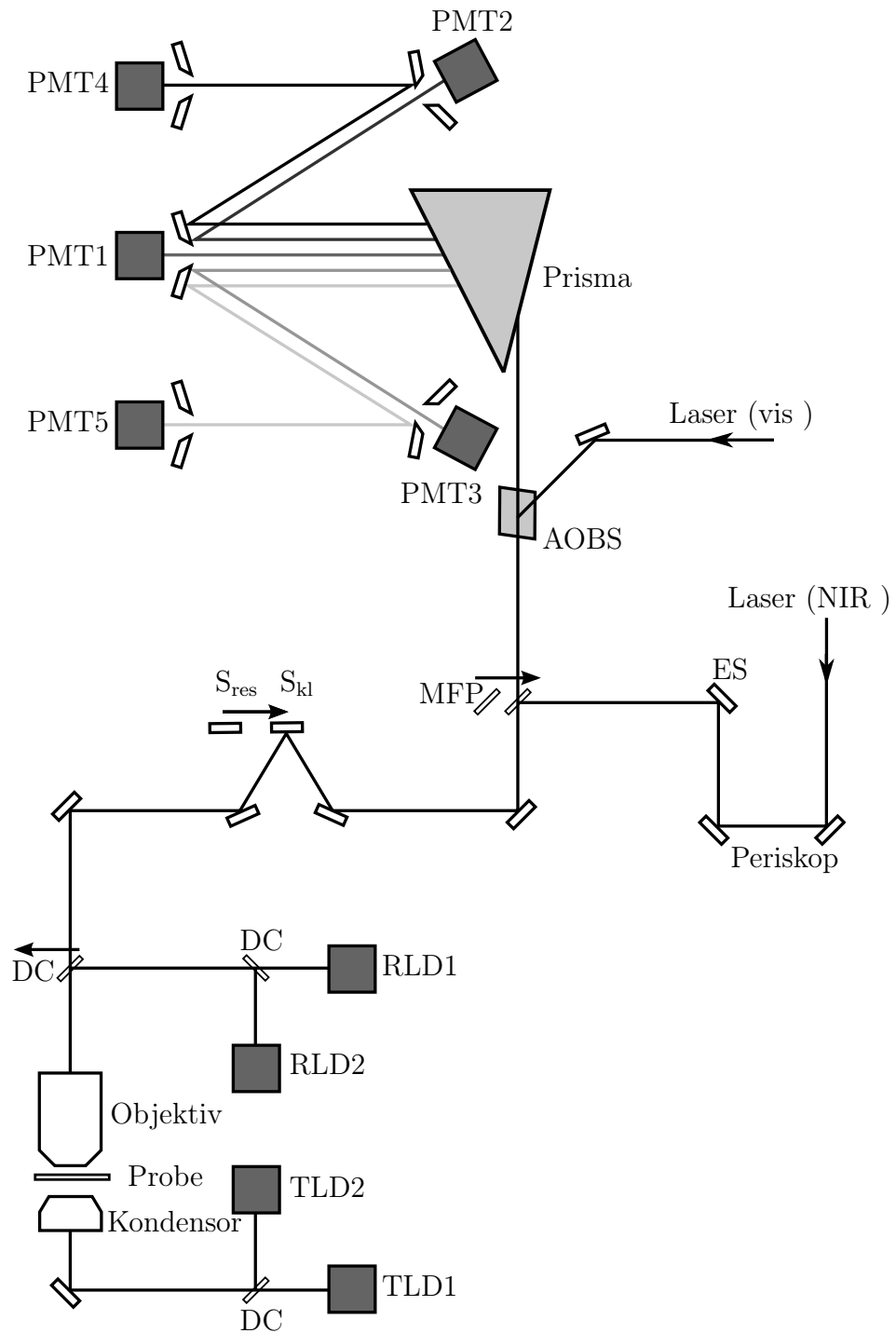


Abbildung 3.9.: Übersicht des konfokalen Mikroskops Leica TCS SP5. PMT1-5 interne, spektrale Detektoren. AOBS akustooptischer Strahlteiler, ES Einkoppelspiegel am Multiphotoneneingang, MFP Multifunktionsschieber, S_{res}/S_{kl} resonanter/klassischer Scanner, DC dichroitische Strahlteiler, RLD1/RLD2 PMTs in Epigeometrie, TLD1/TLD2 PMTs in Transmissionsgeometrie.

unterschiedlichen optischen Elementen. Für die NLO Mikroskopie wurde in der Regel ein Spiegel verwendet. Das Anregungslicht passiert innerhalb des TCS SP5 bis zur rückseitigen Apertur des Mikroskopobjektivs über zehn optische Elemente, was zu entsprechenden Verlusten an Anregungsleistung führt. Insbesondere die Transmission von unter 15% bei 1064 nm erfordert das Einkoppeln hoher Laserleistung in das Mikroskop. Zusätzlich zu den konfokalen Detektoren besitzt das Mikroskop sowohl in Transmissions- als auch Epigeometrie je zwei PMTs. Diese Detektoren werden als “non-descanned” (NDD) bezeichnet, da das Emissionslicht sie direkt und nicht über den Scanner und die Lochblende erreicht. Diese Detektoren wurden für die NLO Mikroskopie verwendet. Eine mit der konfokalen Mikroskopie vergleichbare räumliche Auflösung ist durch den nichtlinearen Charakter der Signalerzeugung gegeben.

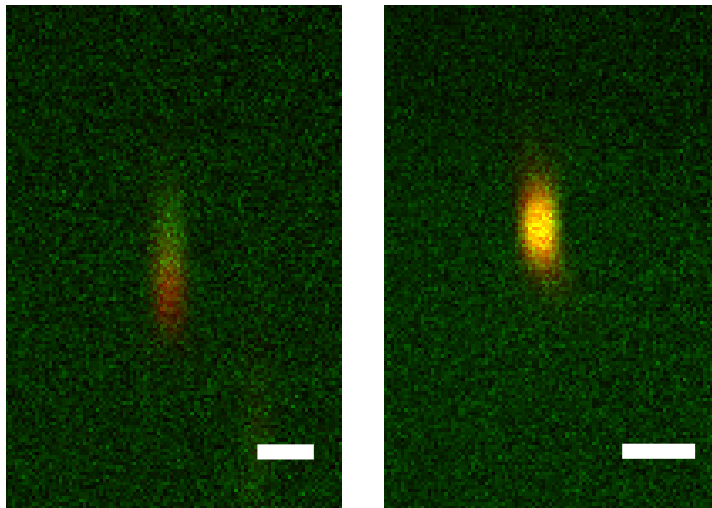


Abbildung 3.10.: Überlagerung zweier Aufnahmen fluoreszenzmarkierter Polymerkugeln in der xz -Ebene. Grün: Anregung mit dem Pumpstrahl bei 816,7 nm. Rot: Anregung mit dem Stokes-Strahl bei 1064 nm. Nach Optimierung des Strahlengangs auf das NIR-korrigierte Objektiv (rechts) überlappen die Foki von Pumpstrahl und Stokes-Strahl für das Standard Wasserimmersionsobjektiv nicht mehr (links). Maßstabsbalken 2 μm .

Es stand eine Reihe an Objektiven von Leica (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) zur Verfügung, die in Tabelle 3.1 aufgeführt sind. Bei dem NIR-korrigierten Wasserimmersionsobjektiv handelt es sich um einen Prototypen von Leica. Dieses Objektiv wurde speziell für Multiphotonenanregung entwickelt, besitzt eine erhöhte Transmission im NIR und eine optimierte Korrektur chromatischer Aberrationen für diesen Spektralbereich. In Abb. 3.10 ist der Einfluss letzterer dargestellt. Zur Justage wurden mehrfach fluo-

reszenzmarkierte Polymerkugeln (Tetraspeck, 1 μm , Life Technologies, Carlsbad, USA) verwendet. Diese konnten über Multiphotonenanregung sowohl mit dem Pump- als auch dem Stokes-Strahl abgebildet werden (in grün bzw. rot dargestellt). Auf diese Weise konnte die Überlappung der Foki beider Strahlen kontrolliert werden. Für jedes Objektiv musste die Überlappung in z-Richtung mittels der Teleskope im Anregungsstrahlengang optimiert werden (s. 3.3). Wurde der Strahlengang bspw. auf das NIR-korrigierte Objektiv optimiert (rechts in Abb. 3.10), wurden mit dem gewöhnlichen Wasserimmersionsobjektiv Pump- und Stokesstrahl in unterschiedlichen Ebenen fokussiert (links in Abb. 3.10). Nach der Beschreibung des CARS Aufbaus möchte ich nun eine Auswahl an Experimenten vorstellen, die wir hiermit durchführen konnten.

Tabelle 3.1.: Objektive, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

Objektiv Typ	Vergrößerung	N.A.	Immersion
HC PL Apo	10 \times	0,40	Luft
PL APO	20 \times	0,70	Luft
HCX Pl Apo CS	40 \times	0,85	Luft
HCX Pl Apo CS	63 \times	1,40-0,60	Öl
HCX Pl Apo CS	63 \times	1,20	Wasser
HCX Pl Apo CS NIR	63 \times	1,20	Wasser
Kondensor S28		0,90	Luft

3.5. CARS Experimente an Membranmodellen

Durch das Anlegen elektrischer Felder können Zellmembranen vorübergehend permeabel, d.h. durchlässig, werden.^[87] Auf diese Weise können Ionen und hydrophile Moleküle die Zellmembran passieren, was im intakten Zustand der Zellmembran nicht möglich wäre. Während für kleine Moleküle der Transport über Diffusion zu erfolgen scheint, spielen für größere Moleküle wie DNA komplexe Mechanismen wie die Elektrophorese eine Rolle.^[88] Die Elektropermeabilisation hat sich in den letzten 15 Jahren zu einem gängigen Verfahren zum Einschleusen großer Moleküle wie RNA, DNA, aber auch Medikamenten und Antikörpern entwickelt.^[89] Aufgrund seiner Effizienz etabliert sich dieses Verfahren im Bereich der Krebstherapie zunehmend und seine Kontrollierbarkeit verspricht speziell für die Gentherapie zukünftig große Erfolge.^[90-92] Bei der Elektropermeabilisation müssen grundsätzlich zwei Phasen unterschieden werden: die physikalischen Prozesse, die aufgrund des elektrischen Feldes stattfinden, und die Prozesse, die auf einer Wechselwirkung

der transportierten Moleküle mit der durch das elektrische Feld modifizierten Membran beruhen.^[93] Für die Studien letzterer ist die Verwendung von Zellen unabdingbar. Sowohl die komplexe Zusammensetzung der Membran (bspw. diverse Membranproteine) als auch die Beteiligung des Zytoskeletts sind entscheidend. In unserer Arbeitsgruppe beschäftigt sich Christelle Rosazza mit entsprechenden Experimenten.^[94,95] Für das Verständnis des rein physikalischen Aspekts der Prozesse sind Studien an Zellen nur sehr bedingt geeignet. Die Komplexität der Zusammensetzung der Membran und die mechanische Stabilisierung durch das Zytoskelett können durch theoretische Modelle und Simulationen noch nicht beschrieben werden. Für systematische Untersuchungen der physikalischen Grundlagen der Elektropermeabilisation werden daher meist synthetische Lipidvesikel verwendet. Während bereits früh Experimente an großen unilamellaren Lipidvesikeln (engl. large unilamellar vesicles, LUVs) mit einem Durchmesser von maximal 200 nm z.B. zum Elektrotransfer von DNA in Liposomen durchgeführt wurden, werden heute vorrangig sogenannte “giant unilamellar vesicles” (GUVs) mit einem Durchmesser von mehr als 10 μm verwendet.^[96–98] Ihre Größe und somit auch Krümmung entspricht der vieler Zelltypen. Zudem erlaubt sie die direkte visuelle Verfolgung der Reaktion der Membran auf externe elektrische Felder. Neben der Permeabilisation zählen hierzu die Elektrodeformation und Elektrofusion.^[98,99] Die chemische Zusammensetzung der GUVs kann gezielt variiert und somit der Einfluss molekularer Parameter wie Ladung oder Struktur untersucht werden.

Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Marie-Pierre Rols in Toulouse wurden CARS Aufnahmen von GUVs im Verlauf der Elektropermeabilisation erstellt. Ziel der Arbeiten war die nicht-invasive Verfolgung des Verhaltens von GUVs bei Variation eines externen elektrischen Feldes. Häufig werden bei Untersuchungen an GUVs lipophile Fluorophore oder fluoreszenzmarkierte Lipidanaloga eingesetzt.^[100] Deren Einfluss kann allerdings zur Ausbildung von Artefakten führen. Dies ist z.B. für die Phasentrennung verschiedener Lipide in GUVs bekannt.^[101,102] Daher bestand ein starkes Interesse an nicht-invasiven Mikroskopietechniken zur Stützung erster Ergebnisse aus der Fluoreszenzmikroskopie. Durch die Verwendung von Puffern mit verschiedenen Brechungsindizes inner- und außerhalb der GUVs können diese mittels Phasenkontrast-Verfahren abgebildet werden. Diese Methode wurde bereits zur Verfolgung der Deformation von GUVs und der Ausbildung von Makroporen in diesen verwendet.^[97] Potma hatte bereits 2003 gezeigt, dass einzelne Lipiddoppelschichten mittels der CARS Mikroskopie abgebildet werden können.^[63] Diese stellen sicherlich das Detektionslimit der CARS Mikroskopie dar. Es folgten Studien zur Phasentrennung in Lipidsystemen, unter anderem in GUVs.^[64,103] Somit bot sich die CARS Mikroskopie als weitere nicht-invasive Technik zur Visualisierung der Elektropermeabilisation an.

Probenpräparation Die Präparation der Proben erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Dr. Marie-Pierre Rols in Toulouse. Die GUVs wurden mittels Elektroformation generiert.^[104,105] Als Lipid wurde 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin (DOPC) verwendet. Als Puffer für die Elektroformation wurde 240 mM Saccharose in Wasser verwendet. Die Vesikel konnten im Puffer für ca. 1 Woche bei 4 °C aufbewahrt werden. Für die Experimente zur Elektropermeabilisation wurde eine Kammer mit Kupferelektroden verwendet. Hierfür wurden zwei Streifen selbstklebende Kupferfolie in 5 mm Abstand auf einem Objektträger befestigt, mit Parafilm bedeckt und diese Kammer mit einem Deckglas (# 1,5) verschlossen.^[93] Für die Mikroskopie wurden 5 μ L der Vesikellösung in die Kammer pipettiert und mit 1 mM NaCl in Wasser verdünnt.

Mikroskopie Für die CARS-Aufnahmen wurde das NIR-korrigierte 63 \times Objektiv verwendet. Es wurden CARS Aufnahmen in Transmissionsgeometrie erstellt. Das Anregungslaserlicht wurde durch geeignete Filter geblockt (TLD: ET680SP-2P8 und ET605/70-2P, Chroma Technology Corp., USA). Die Leistungen vor dem Shutter betragen 350 mW bei 816,7 nm für den OPO und 350 mW bei 1064 nm.

Ergebnisse und Diskussion In Abbildung 3.11 ist ein GUV bei der aliphatischen CH-Streckschwingung von Lipiden (2845 cm^{-1}) und außerhalb der Resonanz bei 2780 cm^{-1} abgebildet. Das Signal verringert sich und das GUV ist schwerer zu erkennen. Die Ab-

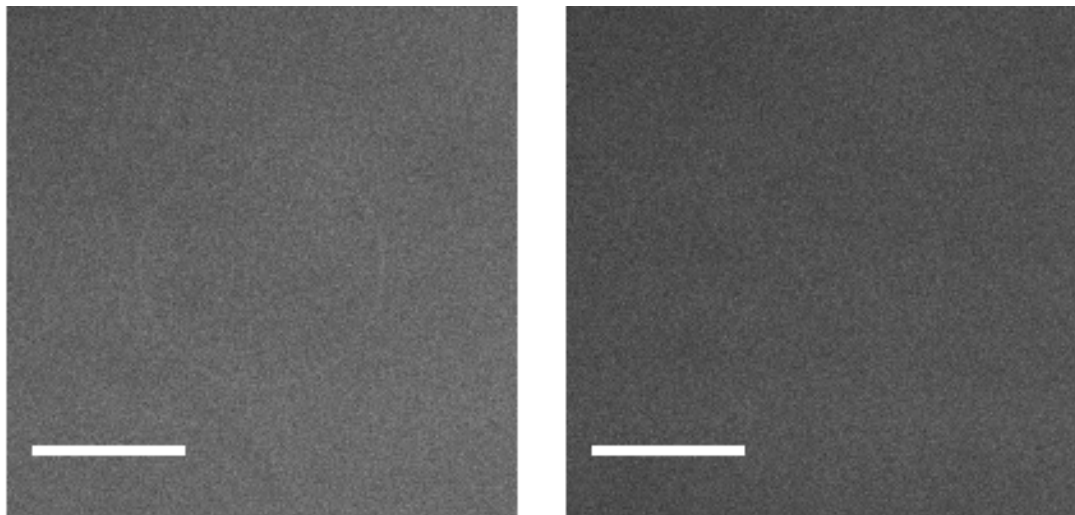


Abbildung 3.11.: CARS Aufnahme eines GUVs bei 2845 cm^{-1} (links) und 2780 cm^{-1} (rechts). Ausschnitt mit 200 \times 200 Pixeln, der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

nahme des gesamten Signalniveaus liegt an dem Zuckergehalt des Puffers, der einen

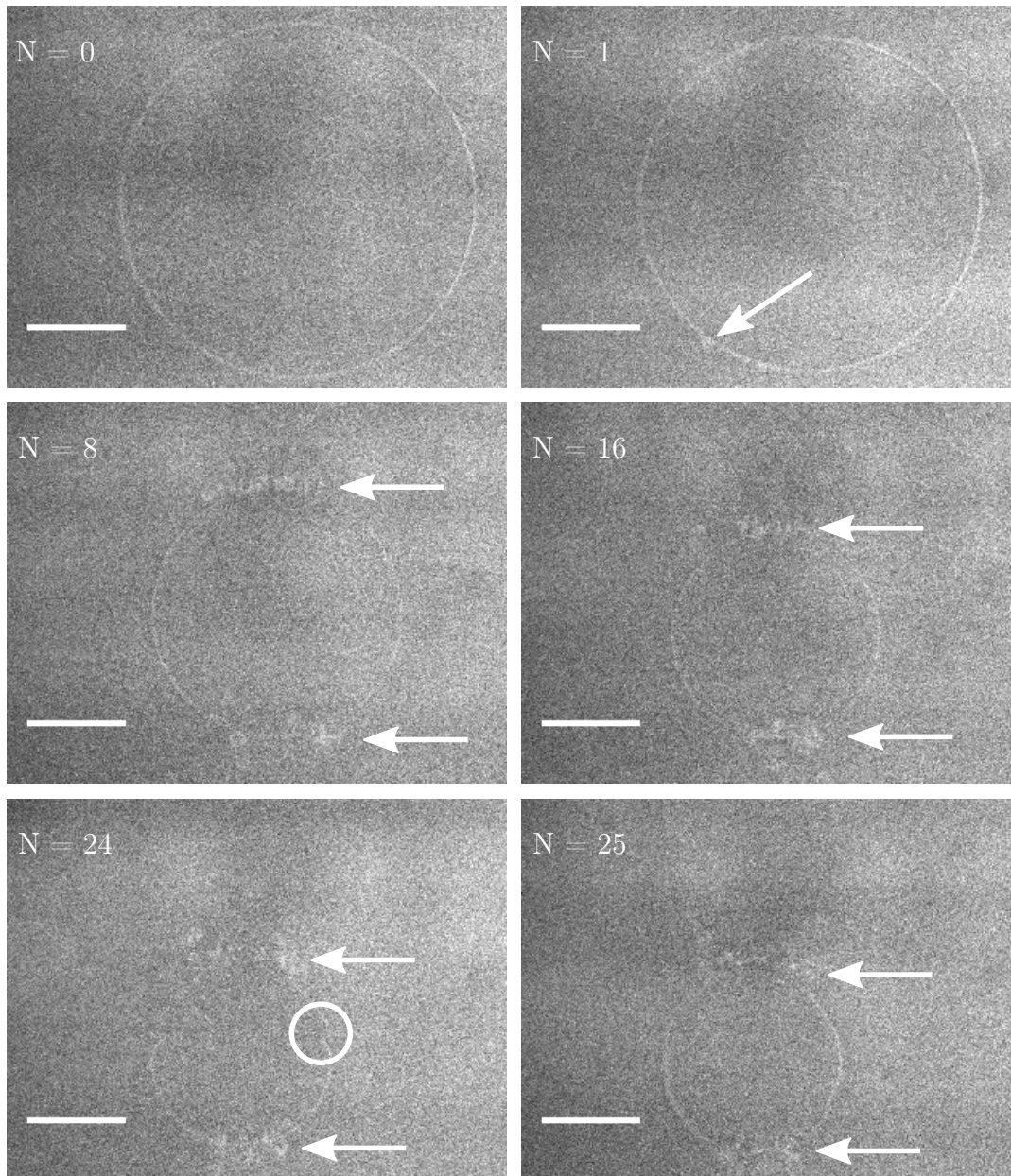


Abbildung 3.12.: CARS Aufnahmen der Elektropermeabilisation eines GUVs. Die Nummerierung entspricht der Abfolge einer Zeitserie von CARS Aufnahmen. Als Startpunkt der Nummerierung ($N=0$) wurde das letzte Bild ohne sichtbare Effekte der Permeabilisation gewählt. Die Pfeile markieren die Ausbildung kleiner Vesikel bzw. Tubuli. In Bild $N=24$ ist zudem eine Makropore eingekreist. Ausschnitte mit 340×260 Pixeln, der Maßstabsbalken entspricht $20 \mu\text{m}$.

resonanten CARS Hintergrund ergibt. Es konnte allerdings trotz des generell geringen Kontrasts eine Aufnahmerate von 1,3 Bildern/s bei 512×512 Pixeln verwendet werden. Dies war mit entscheidend für die Abbildung der Elektropermeabilisation der GUVs, da die beteiligten Prozesse eine schnelle Dynamik aufweisen. In Abb. 3.12 ist eine Auswahl an CARS Aufnahmen eines GUVs während der Elektropermeabilisation zu sehen. Die Ausrichtung des elektrischen Feldes verläuft vertikal. Es können mehrere Prozesse beobachtet werden. Die Größe des Vesikels nimmt im Verlauf der Elektropermeabilisation ab, es kommt somit zu einem Verlust an Lipiden. Die Ausbildung von kleineren Lipidvesikeln an den Polen des Vesikels, die zu den Elektroden hin zeigen, ist klar zu erkennen. In Bild $N = 24$ ist ein Aufreißen der Membran markiert. In der darauf folgenden Aufnahme hat sich die Membran wieder geschlossen.

Eine ausführliche Diskussion der Prozesse im Verlauf der Elektropermeabilisation ist in^[93] gegeben. Die Verkleinerung der GUVs ist auf einen Verlust an Lipiden zurück zu führen. Durch die externen Felder werden zunächst Defekte (bspw. Poren) in der Membran erzeugt. Sind nun solche Defekte vorhanden, kann erneut, begünstigt durch das externe elektrische Feld, ein Verlust an Lipiden erfolgen. Dieser Verlust an Lipiden beruht auf drei unterschiedlichen Mechanismen. Die Ausbildung von kleineren Vesikeln ist der häufigste Prozess. Wie in Abb. 3.11 zu erkennen ist, bleiben diese Vesikel teilweise an der Membran des GUVs assoziiert. Es kann weiter zur Ausbildung von Tubuli kommen. Aufgrund des geringen Kontrastes in den CARS Aufnahmen sind diese schwer von Anhäufungen kleiner Vesikeln zu unterscheiden. Solche Tubuli entstehen hauptsächlich am Pol in Richtung der Anode, bleiben mit der Membran verbunden und wachsen im Verlauf der Elektropermeabilisation wodurch der Durchmesser des GUVs verringert wird. Auch die Ausbildung von Makroporen kann zu einem Verlust an Lipiden führen.^[106] In Bild 24 ist solch eine Makropore markiert. Im Gegensatz zu den hauptsächlich auftretenden, kleinen Poren können diese Makroporen aufgrund ihrer Größe zwar abgebildet werden, allerdings liegen die Lebenszeiten von Makroporen in der Regel im Bereich von Millisekunden.^[98,107] Eine visuelle Verfolgung des Prozesses benötigt eine entsprechende zeitliche Auflösung und Makroporen werden daher selten beobachtet.

Die Ausbildung von Vesikeln und Tubuli war im Phasenkontrast nicht zu erkennen und konnte bisher nur mittels Fluoreszenzmikroskopie abgebildet werden.^[93] Erst mittels der CARS Aufnahmen konnte ein Artefakt durch die Verwendung von Fluoreszenzmarkern ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse aus den Fluoreszenzexperimenten konnten damit erstmals an einem reinen Lipidsystem verifiziert werden.

Ausblick Es stehen eine ganze Reihe weiterer CARS Experimente mit GUVs an. GUVs bilden nicht nur in Bezug auf die Auswirkung elektrischer Felder auf Zellen ein ideales Modellsystem. Natürliche Zellmembranen besitzen eine komplexe Zusammensetzung.

Neben den Phospholipiden, die den Hauptbestandteil der Membranen ausmachen, sind Glycolipide, Cholesterol (in Eukaryonten) und Membranproteine vorhanden. Welche Aufgabe die einzelnen Komponenten erfüllen und im Besonderen wie sie sie erfüllen ist größtenteils noch nicht aufgeklärt. Viele Mechanismen beruhen auf der Wechselwirkung unterschiedlicher Lipide oder Interaktion von Lipiden und Membranproteinen.^[108] Bereits reine Lipidsysteme können aufgrund thermodynamischer Parameter wie relativer Zusammensetzung oder Temperatur unterschiedliche Phasen ausbilden. Die Abbildung solch einer Phasentrennung in einem reinen Lipidsystems gelang erstmals Potma mittels der CARS Mikroskopie an GUVs.^[64] Auch die natürlichen Membranen weisen keine homogene Verteilung ihrer Komponenten und der Membranproteine auf. Sogenannte "Lipid Rafts", Mikrodomänen spezieller Zusammensetzung aus Lipiden und Cholesterol innerhalb der Membran, spielen eine bedeutende Rolle bei Prozessen wie der Signaltransduktion.^[109] Zur Klärung der Mechanismen einzelner biologischer Funktionen bedarf es klar definierter Modellsysteme, da in Zellmembranen zu viele Prozesse zugleich ablaufen. Auch hier haben sich GUVs bewährt.^[108] In diesen können verschiedene, klar definierte Lipiddomänen erzeugt und zudem Membranproteine eingeführt werden. Im Gegensatz zu den natürlichen Lipid Rafts, deren Durchmesser in der Regel unter 200 nm liegt, weisen die künstlichen Analoga Größen von mehreren Mikrometern auf, was die Mikroskopie deutlich vereinfacht.^[110]

Im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Dr. Christof Hauck soll die Lokalisation eines Proteins in bestimmten Phasen nachgewiesen und im Idealfall die Translokation des Proteins bei Wechselwirkung mit Antikörpern visuell verfolgt werden. Durch die CARS

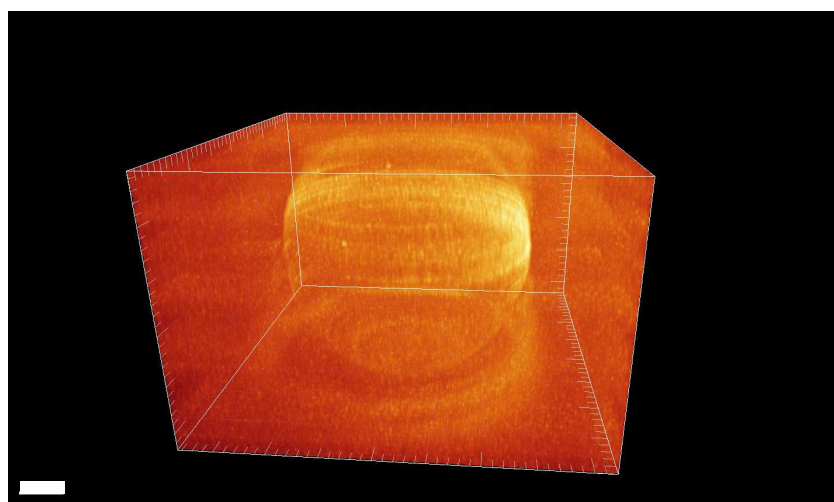


Abbildung 3.13.: CARS Aufnahme eines GUVs bei 2845 cm^{-1} , der Maßstabsbalken entspricht $5\text{ }\mu\text{m}$

Mikroskopie könnten hier erneut die Lipidphasen und somit die Domänen innerhalb der GUVs dargestellt werden. Hierfür muss eines der beteiligten Lipide in deuterierter Form, folglich “schwingungsspektroskopisch markiert”, eingesetzt werden (s.a. Abschnitt 3.6). Das System wird durch die Verwendung deuterierter Substanzen lediglich minimal beeinflusst. Bekannt ist eine geringe Erniedrigung der Phasenübergangstemperatur.^[103] Mittels paralleler Detektion der Multiphotonenfluoreszenz des GFP-markierten Proteins kann dessen Position auf dem GUV verfolgt und Kollokalisierung mit einer der Lipidspezies nachgewiesen werden. Erste Vorversuche wurden bereits gestartet. Im Verlauf einer Masterarbeit in der AG Hauck wurden von Svenja Schneider erste Vesikel unterschiedlicher Lipidzusammensetzung nach der Elektroformationsmethode (s.o.) präpariert. In Abb. 3.13 ist eine CARS Aufnahme solch eines GUVs gezeigt. Es wurde ein z-Stapel aufgenommen und mit der Analysesoftware für Mikroskopie Imaris (Bitplane, Zürich, Schweiz) 3-dimensional dargestellt.

3.6. CARS Experimente an Mikroorganismen

Nachdem ich im letzten Abschnitt mit der Abbildung einzelner Lipiddoppelschichten an Membranmodellen die untere Grenze der Sensitivität aufgezeigt habe, werde ich nun kurz auf zwei Experimente an Bakterien eingehen. Bakterien werden aufgrund des Aufbaus ihrer Membran in grampositive und gramnegative Spezies unterteilt. Diese Bezeichnung leitet sich von dem Ergebnis eines von Gram bereits im 19. Jhdt. entwickelten Färbeverfahrens zur Differenzierung von Bakterien ab.^[111] Grampositive Bakterien besitzen auf ihrer Plasmamembran eine im Vergleich zu gramnegativen Bakterien dickere Schicht aus Peptidoglykanen, die Mureinhülle. Diese verhindert eine Auswaschung des bei der Färbung erzeugten Farbstoffkomplexes mit Alkoholen, das Ergebnis wird als grampositiv bezeichnet. Gramnegative Bakterien besitzen eine zweite Lipidmembran über ihrer dünnen Mureinhülle. Diese wird durch den Alkohol gelöst, der Farbstoffkomplex kann ausgewaschen werden und das Ergebnis wird als gramnegativ bezeichnet. Die Membranen von Bakterien sind also zum einen deutlich komplexer aber auch aus mehr “Material” aufgebaut als die der zuvor beschriebenen GUVs. Für die CARS Mikroskopie ist die hierdurch größere Dichte an Streuzentren im Fokus und somit auch erhöhte Signalstärke von Vorteil. Im Folgenden möchte ich je ein Experiment am gramnegativen Bakterium *Escherichia coli* und dem grampositiven Mykobakterium zeigen. Die Unterscheidung von *Escherichia coli* Bakterien, die in unterschiedlichen Medien kultiviert wurden, möchte ich als Beispiel für die spektrale Selektivität des CARS Prozesses nutzen. In einem zweiten Experiment sollten als interessante Anwendung Biofilme mit Mykobakterien untersucht werden.

3.6.1. Spektrale Selektivität der CARS Mikroskopie am Beispiel deuterierter *Escherichia coli*

Wie bereits in Abschnitt 3.5 erwähnt, besteht auch für die Schwingungsspektroskopie die Möglichkeit spektrale Marker einzuführen. Die Verwendung deuterierter Substanzen hat gegenüber der Einführung von fluoreszierenden Markern den großen Vorteil, dass durch die Deuterierung das zu untersuchende System in seiner Funktion in der Regel nicht beeinflusst wird. Somit ist die CARS Mikroskopie trotz Markierung durch Deuterierung weiterhin eine nichtinvasive Methode. Die Verwendung solcher spektraler Marker in der CARS Mikroskopie kann in spektralen Regionen, in denen viele Resonanzen überlappen, sinnvoll sein. Wie in Kapitel 2 gezeigt, kann die hohe Dichte an Resonanzen die Zuordnung der CARS Signale einzelner Komponenten erschweren. Speziell der Bereich der aliphatischen CH-Streckschwingungen ist in biologischen Proben naturgemäß eine solche Region. Durch die Deuterierung des Moleküls von Interesse werden dessen entsprechende Resonanzen in die Region $2000\text{--}2150\text{ cm}^{-1}$ verschoben und können direkt mittels Abfragen dieser Resonanz nachgewiesen werden.^[112,113] Auf eine aufwendige Aufnahme und Analyse des Spektrums, sofern überhaupt möglich, kann verzichtet werden. Auch um den Stoffwechsel in Bezug auf einzelne Substanzen zu untersuchen, kann die Deuterierung eingesetzt werden. Als biologisch relevantes Beispiel für die spektrale Selektivität des CARS Prozesses möchte ich daher die Unterscheidung von gewöhnlichen und deuterierten *E. coli* demonstrieren.

Probenpräparation Die Kultivierung der *E. coli* Bakterien erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Elke Deuerling. Zur Deuterierung wurde eine Kultur über Nacht in deuteriertem Medium (E. Coli-OD2 D, Silantes GmbH, München) inkubiert. Die Vergleichskultur wurde in nichtmarkiertem Medium (Standard-E. Coli-OD2, Silantes GmbH, München) kultiviert. Für die Mikroskopie wurden Bakterien beider Kulturen vermischt, auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckglas (# 1,5) bedeckt.

Mikroskopie Für die CARS Aufnahmen wurde das $63\times$ Ölimmersionsobjektiv eingesetzt. Es wurden CARS Aufnahmen in Epi-Geometrie erstellt. Zur Anregung wurde der Ti:Sa-Oszillator im ps-Betrieb als Quelle für den Pumpstrahl und der OPO als Quelle für den Stokes-Strahl verwendet. Die Leistungen vor dem Shutter betragen 250 mW bei $720,0\text{ nm}$ und 300 mW bei $905,5\text{ nm}$ bzw. $846,8\text{ nm}$. Das Anregungslaserlicht wurde durch geeignete Filter geblockt (ET680SP-2P8 und ET605/70-2P, Chroma Technology

Corp., USA). Um den Einfluss des Jitters in der Synchronisation auf die Bildqualität zu verringern, wurden jeweils zwei Aufnahmen gemittelt.

Ergebnisse und Diskussion Eine der *E. coli* Kulturen wurde in komplett deuteriertem Medium kultiviert und besaß somit auch eine deuterierte Membran. Diese Bakterien wurden mit *E. coli* Bakterien aus normaler Kultur vermischt. In Abbildung 3.14 sind CARS Aufnahmen dieser Mischung bei 2845 cm^{-1} und 2080 cm^{-1} zu sehen.

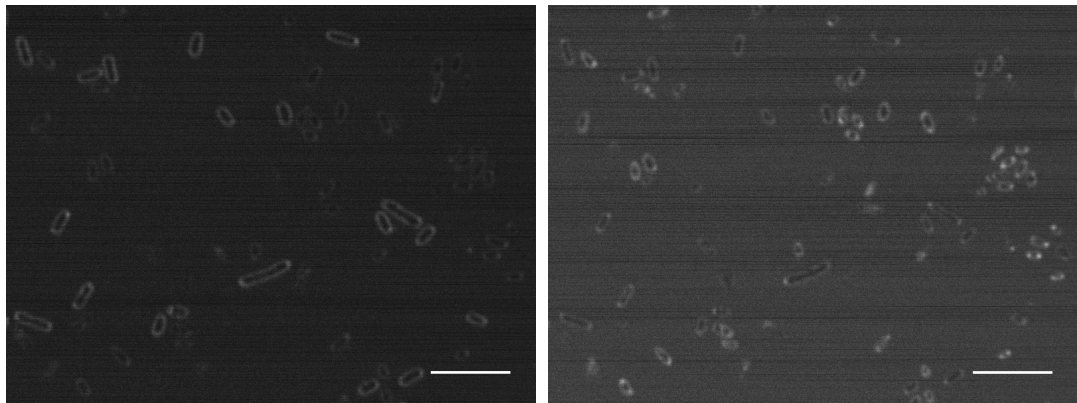


Abbildung 3.14.: CARS Aufnahme einer Mischung von *E. coli* bei 2845 cm^{-1} (links) und 2080 cm^{-1} (rechts). Deuterierte und nicht-deuterierte Bakterien können spektral unterschieden werden. Ausschnitte mit 800×600 Pixeln, der Maßstabsbalken entspricht jeweils $5\text{ }\mu\text{m}$.

Die Bakterien können aufgrund ihrer verschiedenen Schwingungsresonanzen unterschieden werden. Die deuterierten *E. coli* sind etwas unterentwickelt, was an ihrer geringeren Größe und runderen Form zu erkennen ist. Der Grund dafür ist uns nicht bekannt. Die Medien unterscheiden sich in der Zusammensetzung nicht. *E. coli* dienen als Nährmedium für *Caenorhabditis elegans* Fadenwürmer. Durch die Verwendung deuterierter *E. coli* könnte bspw. der Stoffwechsel der Fadenwürmer näher untersucht werden.

3.6.2. Abbildung der Organisation und des Verhaltens von Mykobakterien in Biofilmen

Unter einem Biofilm versteht man eine von einer Matrix umschlossene Anhäufung von Mikroorganismen an Grenzflächen. Durch die Ausbildung solcher schützender Biofilme können diese Mikroorganismen nicht nur in einer unwirtlichen Umgebung überleben sondern sich auch in neuen ökologischen Nischen verbreiten. Hall-Stoodley *et al.* zeigen in einem Übersichtsartikel auf, wie diese bereits vor Milliarden von Jahren entwickelten

Mechanismen funktionieren und welche Auswirkung sie auch in der heutigen, industrialisierten Welt noch auf den Menschen und seine Umwelt besitzen.^[114]

In diesem Kontext stand auch eine Anfrage von Dr. Thomas Neu vom Helmholtz Zentrum für Umweltforschung in Magdeburg. Er befasst sich mit der Mikrobiologie an Grenzflächen und hier speziell mit der Analytik von Biofilmen. Die konfokale Mikroskopie und spezielle Fluoreszenztechniken kommen hierbei zum Einsatz.^[115,116] Von Interesse sind u.a. die polymerartige, extra-zelluläre Matrix von Biofilmen, in welcher die Mikroorganismen eingebettet sind, aber auch die Motilität, d.h. die Fähigkeit zur aktiven Bewegung, solcher mikrobieller Kolonien.^[117,118] Da wir mittels der CARS Mikroskopie in der Lage sind einzelne Bakterien zu visualisieren, lag es nahe diese Technik in einem aktuellen Projekt von Dr. Neu einzusetzen. Bei den Mikroorganismen handelte es sich um einen Mykobakterien Stamm, der die Fähigkeit besitzt polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) zu verstoffwechseln.^[119] Herrn Neu interessierte dessen Biofilmformation auf Anthracen Partikeln in Fließgewässern. Hierzu sollten Bakterienkulturen in Durchflusszellen angeimpft und anschließend über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Im Idealfall könnten dank der CARS Mikroskopie auf präparativ aufwendige Fluoreszenzexperimente verzichtet und Kolonien ohne Photobleichen abgebildet werden.

Probenpräparation Die Probenpräparation erfolgte durch Dr. Neu (für Details siehe^[119,120]). Bei den verwendeten Kulturen handelte es sich um Flüssigkulturen, die in einem Minimalmedium mit Anthracen Partikeln als Kohlenstoffquelle bei Raumtemperatur kultiviert wurden. Kulturen, die in Durchflusszellen angeimpft wurden, kamen nicht zum Einsatz (s.u.). Für die Mikroskopie wurden Suspensionen der Biofilme auf Objektträger gegeben und mit einem Deckglas (# 1,5) bedeckt.

Mikroskopie Für die CARS-Aufnahmen wurde das $63\times$ Ölimmersionsobjektiv verwendet. Es wurden CARS Aufnahmen in Epi-Geometrie erstellt. Zur Anregung wurde der Ti:Sa-Oszillator im ps-Betrieb als Quelle für den Pumpstrahl und der OPO als Quelle für den Stokes-Strahl verwendet. Die Leistungen vor dem Shutter betragen 180 mW bei 720,0 nm und 150 mW für den OPO bei 905,5 nm bzw. 922,6 nm. Das Anregungslaserlicht wurde durch geeignete Filter geblockt (ET680SP-2P8 und ET605/70-2P, Chroma Technology Corp., USA). Um den Einfluss des Jitters in der Synchronisation auf die Bildqualität zu verringern, wurden jeweils zwei Aufnahmen gemittelt.

Ergebnisse und Diskussion Die Mykobakterien konnten mittels CARS Mikroskopie abgebildet werden (s. Abbildung 3.15). Ein Vergleich der Signalintensitäten bei 2845 cm^{-1} (A) und 3050 cm^{-1} (B) zeigt deutlich die schwingungsresonante Verstärkung

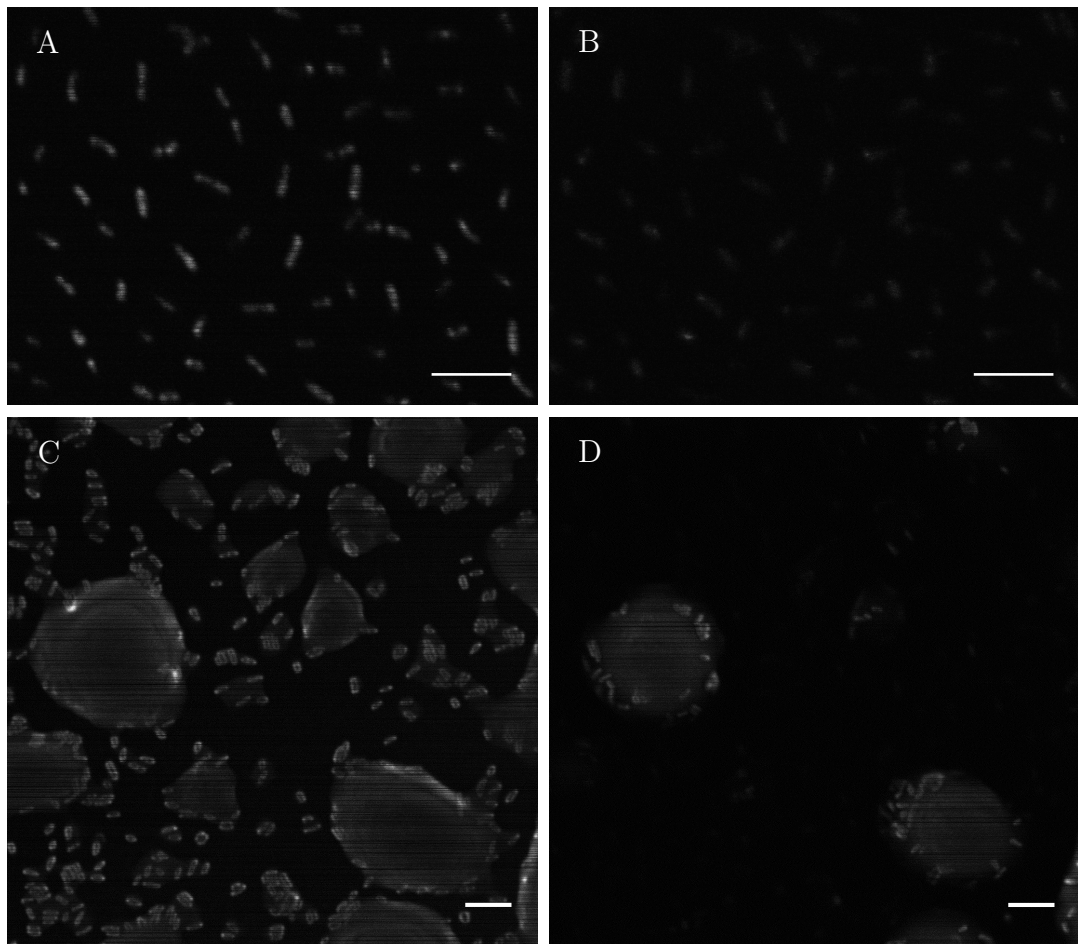


Abbildung 3.15.: CARS Aufnahmen von Mykobakterien. Vergleich der Signalstärke bei schwingungsresonanter (A, 2845 cm^{-1}) und nichtresonanter (B, 3050 cm^{-1}) Anregung. (C) und (D) sind Einzelaufnahmen eines z-Stapels aufgezeichnet bei 2845 cm^{-1} . Ausschnitte mit 800×600 Pixeln (A,B) bzw. 1064×1064 Pixeln (C,D), der Maßstabsbalken entspricht jeweils $5\text{ }\mu\text{m}$.

des CARS Prozesses im Bereich der aliphatischen CH_2 -Streckschwingung. Die Bakterien befinden sich an einer getrockneten Stelle. Die Abwesenheit des wässrigen Mediums und somit auch dessen nichtresonanten Hintergrunds erklärt den hohen Kontrast. Bei den Aufnahmen (C) und (D) handelt es sich um zwei Einzelaufnahmen eines z-Stapels im Abstand von $1,8\ \mu\text{m}$. Es sind noch restliche Tropfen des Mediums zu erkennen. Auch in diesen sind die Mykobakterien klar zu erkennen. Anthracen-Kristalle stellten sich als problematisch für die CARS Mikroskopie dar. Aufgrund elektronischer Resonanzen (Multiphotonenanregung) wurden diese bereits bei moderaten Anregungsleistungen zerstört. Der kürzerwellige Pumpstrahl war hierbei deutlich problematischer als der Stokes-Strahl. Zudem zeigte das Anthracen ein starkes Hintergrundsignal im spektralen Bereich des CARS Signals. Auch dieses kann durch elektronische Resonanzen, die in diesem Fall zu einer Verstärkung des CARS Prozesses beitragen, begründet werden (vgl. Abschnitt 2.2.2). Alternativ wurden Naphthalin-Kristalle als PAK in Betracht gezogen. Aufgrund der im Vergleich zu Anthracen bei Naphthalin zu höherer Energie verschobenen, elektronischen Resonanzen konnte das Hintergrundsignal tatsächlich vernachlässigt werden. Allerdings wurden bei den für die Abbildung der Mykobakterien in wässriger Umgebung benötigten Anregungsleistungen auch die Naphthalin-Kristalle zerstört. Somit war es zwar möglich Bakterienkulturen schwingungsresonant abzubilden, insgesamt erscheint die CARS Mikroskopie für Studien von Biofilmen auf PAK aber ungeeignet.

3.7. CARS Mikroskopie zur Verfolgung von Bewegung in Zellen auf allen biologisch relevanten Zeitskalen

Durch die Einbringung fluoreszierender Marker in ein zu untersuchendes System kann es zur Ausbildung von Artefakten kommen. In den Abschnitten 3.5 und 3.8 wird diese Problematik näher diskutiert. Ein weiteres Problem in der Fluoreszenzmikroskopie ist das Photobleichen der Chromophore. Typischerweise sind organische Fluoreszenzfarbstoffe in der Lage etwa 10^5 - 10^6 Fluoreszenzphotonen zu emittieren bevor sie irreversibel photobleichen.^[121] Somit sind trotz der enormen Sensitivität fluoreszenzbasierter Techniken der Anzahl an Aufnahmen Grenzen gesetzt. Diese Beschränkung stellt sowohl bei der Beobachtung sehr schneller als auch lang andauernder Prozesse ein Problem dar. In beiden Fällen ist eine Vielzahl aufeinander folgender Aufnahmen, wenn auch auf unterschiedlichen Zeitskalen, erwünscht. Die automatisierte Auswertung schneller Transportprozesse wird durch das Photobleichen ebenfalls erschwert, da durch die kontinuierliche Abnahme des Kontrastes auch die Lokalisierungsgenauigkeit sinkt. Auf langen Zeitskalen wiederum

kann zusätzlich zum Photobleichen eine Zersetzung des Farbstoffes durch biomolekulare Mechanismen erfolgen. Daher stellen für geeignete Proben markerfreie Kontrastverfahren eine interessante Alternative dar.

Sogenannte “Lipid droplets” (LDs) stellen komplexe Organellen dar, die häufig eine dynamische Rolle im Lipidmetabolismus einnehmen. Ihre Funktion geht hierbei weit über den reinen Speicheraspekt hinaus und ist noch unzureichend verstanden.^[122,123] Ein interessanter Aspekt ist hierbei der Transport dieser LDs innerhalb der Zelle.^[124,125] LDs sind für markerfreie Kontrastmechanismen ideal. Sie weisen einen vom Medium verschiedenen Brechungsindex und ein hohes $\chi^{(3)}$ auf.^[126] So wurden DIC, THG und CARS zur Verfolgung der Bewegung von LDs in Zellen verwendet.^[127–129] Allerdings weist hierunter lediglich die CARS Mikroskopie zusätzlich eine spektrale Selektivität auf. Dass die CARS Mikroskopie sowohl für Beobachtung schneller Transportprozesse als auch für Langzeitstudien geeignet ist, konnten wir an lebenden HeLa-Zellen demonstrieren.^[130]

Probenpräparation Die Präparation der Proben erfolgte durch Christian Jüngst. Eine detaillierte Beschreibung der Probenpräparation ist in^[130] gegeben. Es wurde die Zelllinie HeLa S3 verwendet. Für die schnelle Mikroskopie wurden die HeLa-Zellen in Kammerdeckgläsern (8 Wells, Lab-Tek, USA) ausgesät. So konnte parallel eine Färbung mit dem Lipidmarker Bodipy 493/503 (Life Technologies, USA) erfolgen. Für die Langzeitstudien wurden die Zellen in Petrischalen (35 mm mit Glasboden #1,5, ibidi GmbH, Martinsried) ausgesät.

Mikroskopie Für die CARS-Aufnahmen wurden das 40× Luftobjektiv für Langzeitstudien und das NIR-korrigierte 63× Wasserimmersionsobjektiv für die schnelle Mikroskopie verwendet. Es wurden CARS Aufnahmen in Transmissionsgeometrie erstellt. Das Anregungslaserlicht wurde durch geeignete Filter geblockt (641/75 und 775/SP, Semrock Inc., USA). Die Leistungen vor dem Shutter betragen 450 mW bei 816,7 nm für den OPO und 400 mW bei 1064 nm für die schnelle Mikroskopie. Für die Langzeitstudien wurde die Anregungsleistung verringert, um etwaige Photoschäden zu minimieren. Mittels einer Inkubationskammer für die Mikroskopie (Stage Top Incubator, Tokai Hit, Japan) konnten die Zellen tagelang unter idealen Bedingungen (5% CO₂ und 37 °C) beobachtet werden.

Ergebnisse und Diskussion Eine ausführliche Diskussion dieser Experimente ist in^[130] gegeben. Christian Jüngst beschäftigte sich in seiner Doktorarbeit überwiegend mit LDs, daher sei zudem auf dessen Dissertationsschrift verwiesen.^[131] In Abb. 3.16 ist die Verwendung der CARS Mikroskopie zur Verfolgung biologischer Bewegungen auf der Subsekunden-Zeitskala dargestellt. LDs, die in HeLa-Zellen einen Durchmesser im

Bereich der lateralen Auflösung aufweisen, können auch bei Videogeschwindigkeit klar abgebildet werden. Um die hohen Aufnahmegeschwindigkeiten zu erreichen, wurde der resonante Scanner des Mikroskops verwendet. Um ein ausreichendes CARS Signal zu erzeugen, haben wir sehr hohe Anregungsleistungen eingesetzt. Diese Photonenlast wurde allerdings durch die kurze Verweildauer auf einzelnen Stellen der Zellen wieder kompensiert. Auch die verbesserte Korrektur des Objektivs im NIR-Bereich trug zur benötigten hohen Anregungseffizienz bei. In der Vergrößerung sind eine Einzelaufnahme des markierten LDs und dessen Trajektorie abgebildet. Der hohe Kontrast erleichtert eine automatisierte Auswertung des Bewegungsmusters. In der zugehörigen Auftragung der Trajektorie sind zwei Phasen klar zu unterscheiden. Nach anfänglicher ungerichteter Diffusion (blau) findet ein gerichteter, schneller Transport (rot) statt. Eine Analyse der Bewegung erfolgte mittels Segmentierung aufgrund des mittleren Verschiebungsquadrats (engl. mean square displacement, MSD).^[130,132,133] Für Diffusion ergibt sich bei Auftragung des mittleren Verschiebungsquadrats gegen die Zeitdifferenz der zugehörigen Trajektorienpunkte eine lineare Abhängigkeit. Aktiver Transport weist hingegen eine quadratische Abhängigkeit auf. Für die Anfangsphase ergab sich ein Diffusionskoeffizient von $1,6 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Die anschließende Bewegung konnte als aktiver Transport mit einer Geschwindigkeit von $0,47 \mu\text{m s}^{-1}$ klassifiziert werden. Es ist bekannt, dass unterschiedliche Motorproteine an LDs assoziieren.^[134,135] Daten wie Geschwindigkeit und Richtung des Transports geben Hinweis auf die Beteiligung spezifischer Motorproteine. Die hohen Aufnahmegeschwindigkeiten ermöglichen eine detaillierte Analyse der Bewegungsmuster. Schnelle Wechsel zwischen Diffusion und Transportprozessen, sowie deren exakte Geschwindigkeiten können so ermittelt werden. Eine Analyse langsamerer Aufnahmen würde zur Mittelung bzw. Vermischung der tatsächlichen Prozesse führen. Auch deutlich langsamere Prozesse konnten wir mittels der CARS Mikroskopie an lebenden Zellen beobachten. Beispiele hierfür sind der Zellzyklus, welcher von dutzende Minuten bis mehrere Stunden andauern kann, oder aber auch der Fettaufbau und Fettabbau in Zellen, welcher über mehrere Tage erfolgen kann. Entsprechende Experimente hat Christian Jüngst in seiner Promotion mittels der CARS Mikroskopie sowohl an HeLa-Zellen als auch an Adipozyten verfolgt. In Abbildung 3.17 sind mehrere HeLa-Zellen zuerkennen, die über einen längeren Zeitraum mittels CARS abgebildet wurden. Eine der Zellen durchläuft während der Aufnahmen eine Zellteilung. Bei den Abbildungen handelt es sich um Maximumprojektionen von z-Stapeln. So können alle LDs in den Zellen in einem Bild dargestellt werden, allerdings verringert sich hierdurch dessen Kontrast (s.a. 3.9.1). Der Einsatz gepulster Laser und relativ hoher Anregungsleistungen kann phototoxisch auf lebende Systeme wirken. Es gibt eine Vielzahl an Studien zur Problematik der Phototoxizität von Multiphotonenexperimenten (vgl.^[44]). Auch speziell zu Photoschäden durch die CARS Mikroskopie wurden Studien in der Gruppe von

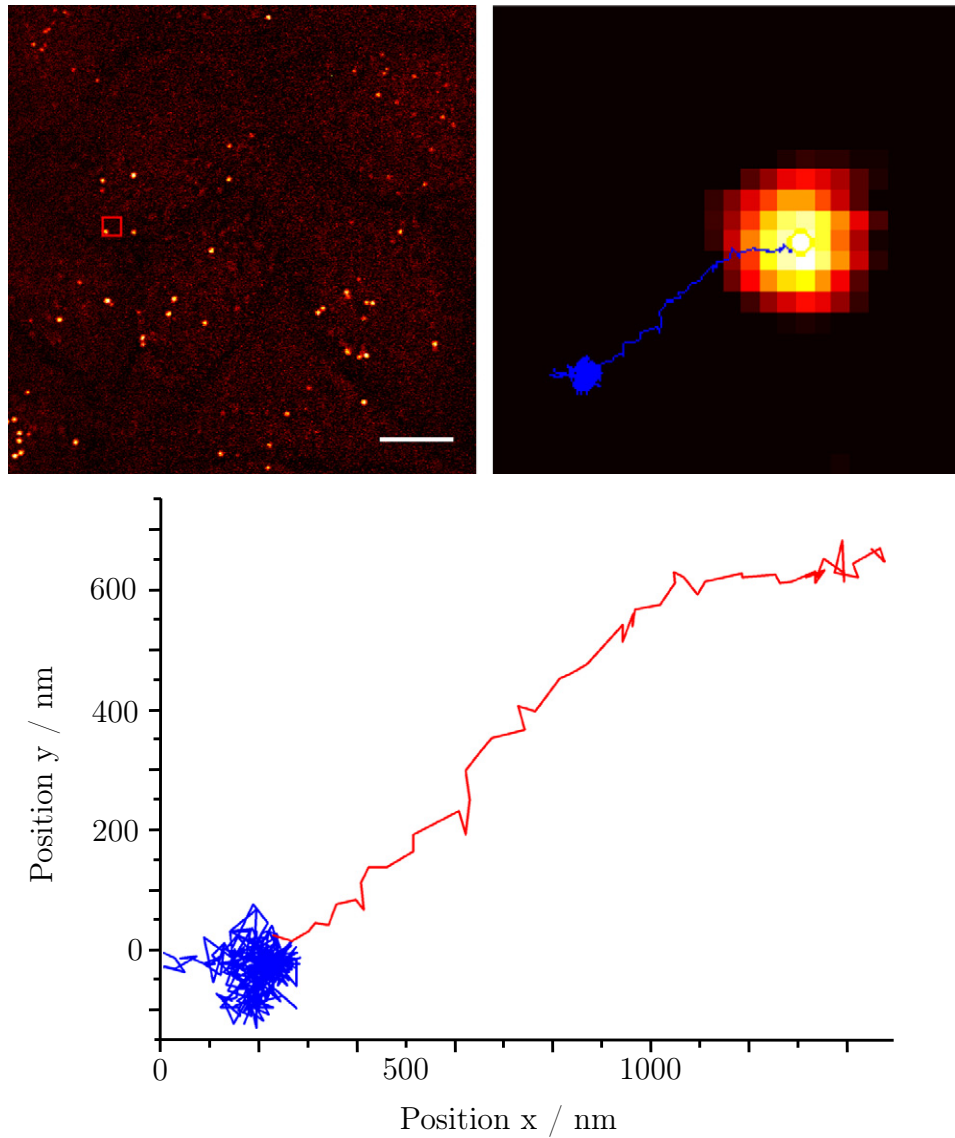


Abbildung 3.16.: Mittels CARS Aufnahmen von LDs in HeLa-Zellen mit Videogeswindigkeit können deren Bewegungsmuster analysiert werden. Links oben: Einzelne CARS Aufnahme mehrerer HeLa-Zellen bei 2845 cm^{-1} aus einer Bilderserie, die mit einer Bildrate von 20 Hz aufgezeichnet wurde. Maßstabsbalken $8\text{ }\mu\text{m}$. Rechts oben: Vergrößerte Darstellung des in der Aufnahme links markierten LDs am Ende der Bilderserie. In blau ist die Trajektorie des LDs dargestellt. Unten: Auftragung der Trajektorie des LDs (in blau Diffusion, in rot aktiver Transport, vgl. Diskussion). Entnommen aus^[138]

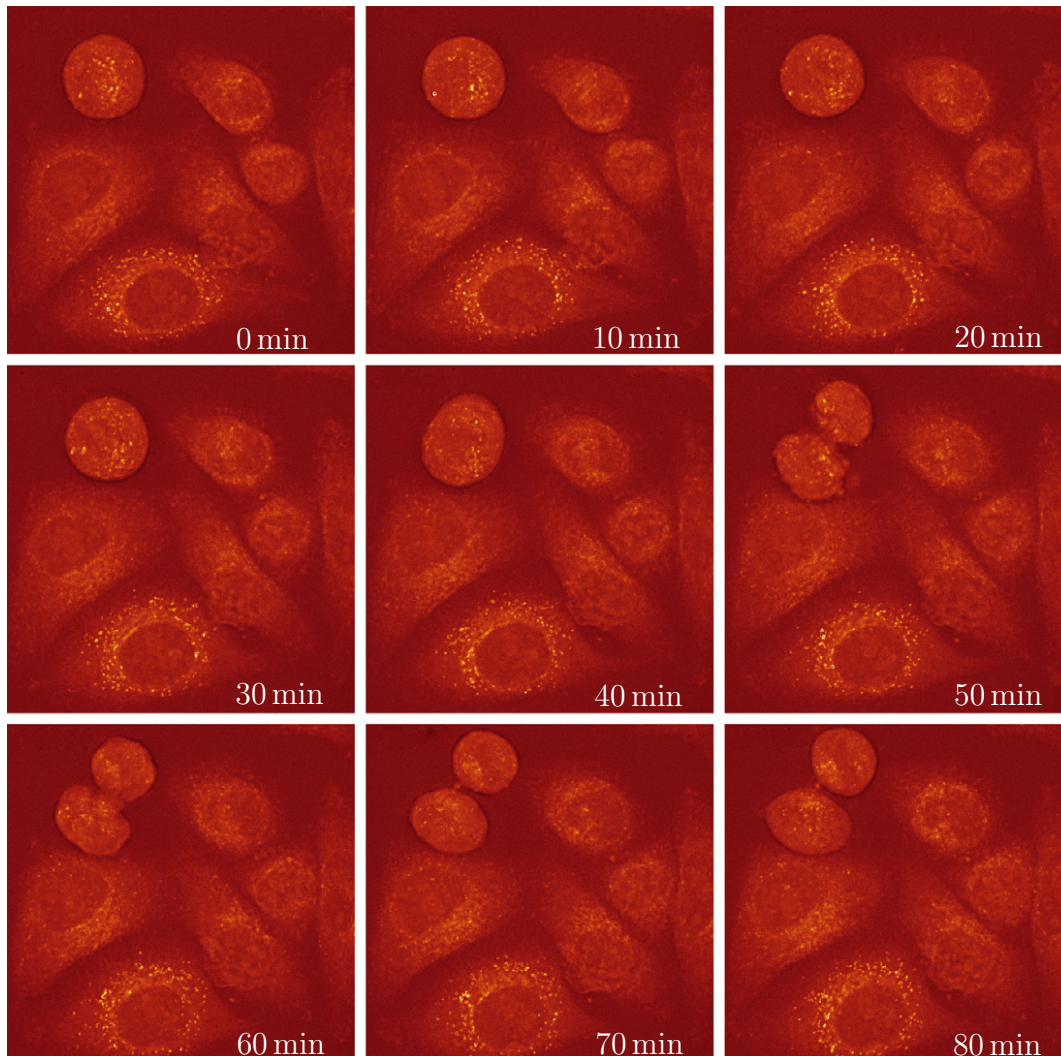


Abbildung 3.17.: Mittels CARS Aufnahmen können lebende Zellkulturen nichtinvasiv über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Hier sind einige Maximumprojektionen aus einer Serie von z-Stapeln, die über Stunden bei 2845 cm^{-1} aufgezeichnet wurden, dargestellt. Im Verlauf der Bilderserie kann die Teilung einer Zelle beobachtet werden. Entnommen aus^[138]

Cheng sowohl für Gewebeproben als auch Zellkulturen angefertigt.^[136] Untersuchungen zur Phototoxizität sind schwierig zu vergleichen. Dies beginnt bereits bei der Definition des Photoschadens von Zellen. Offensichtliche, drastische Effekte, wie die Bläschenbildung an der Plasmamembran, sind sicherlich kein sensitiver Marker für Phototoxizität. Allerdings konnten wir bereits Tumorzellen beobachten, die auch hiernach noch zur Zellteilung in der Lage waren und deren Überlebensfähigkeit somit nicht merklich verringert war. Neben der Definition eines Photoschadens sind die unterschiedlichen Parameter respektive Aufnahmebedingungen zu berücksichtigen. Pulslänge, Pulsenergie, Repetitionsrate usw. der Anregungsquellen variieren wie auch die Beleuchtungsfläche und -dauer. Je nach Mechanismus der Schädigung spielen diese eine unterschiedliche Rolle. Für thermische Effekte ist beispielsweise auf der Seite der Anregungsquellen die Durchschnittsleistung entscheidend. Eine Reduktion der Repetitionsrate kann diese Effekte deutlich reduzieren ohne die Anregungseffizienz nichtlinearer Prozesse, welche von der Pulsspitzenleistung abhängt, zu beeinträchtigen. So müssen für jedes Experiment die Bedingungen der jeweiligen Probe angepasst werden. Wir konnten zeigen, dass trotz der Bedenken bezüglich der Phototoxizität mit der CARS Mikroskopie auch Studien über einen längeren Beobachtungszeitraum möglich sind.

In einem aktuellen Beitrag stellen Wolinski et al. die Bedeutung der Visualisierung von LDs am Beispiel von Hefezellen dar.^[137] Hefezellen sind ein Modellsystem für den Lipidmetabolismus. Die schnelle, unter Einbeziehung der Zeit 4-dimensionale Abbildung der LDs sei ein wichtiges Werkzeug um Daten über die Dynamik der LDs selbst, aber auch die Dynamik in der Zusammensetzung der LDs zu erhalten. Die CARS Mikroskopie mit ihrer chemischen Selektivität und der in unseren Experimenten aufgezeigten Leistungsfähigkeit bei der Beobachtung von LDs auf allen für zellbiologische Prozesse relevanten Zeitskalen sollte in Zukunft wichtige Beiträge zu diesen Fragestellungen liefern können.

3.8. CARS Mikroskopie an *Caenorhabditis elegans*

Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* ist ein häufig verwendetes Modellsystem für den menschliche Lipidmetabolismus und hiermit verknüpfte Krankheiten. Die Regulierung des Lipidmetabolismus blieb im Verlauf der Evolution stark konserviert, so dass das Erbgut des Nematoden aber auch dessen Stoffwechselmechanismen viele Übereinstimmungen mit dem Menschen aufweisen.^[139,140] Schnelle Reproduktion, kurze Lebenszyklen, einfache Handhabung und die frühe, vollständige Entschlüsselung des Erbguts haben die Verwendung als Modellsystem weiter begünstigt. Der Lipidmetabolismus ist ein komplexer Prozess, der sowohl genetisch als auch physiologisch, z.B. durch Ernährungsbedingungen, reguliert wird. Daher sind Studien an Modellorganismen Studien an

Zellkulturen (in diesem Falle bspw. an Adipozyten) vorzuziehen.

Da der Nematode *C. elegans* transparent ist, bietet sich die optische Mikroskopie als Untersuchungsmethode an. Eine Motivation für den Einsatz der CARS Mikroskopie in Studien an *C. elegans* bieten neuere Vergleichsstudien unterschiedlicher Färbemethoden.^[141,142] Einige Färbemethoden (bspw. mit dem Farbstoff Sudan Black) beruhen auf der Fixierung der Proben und sind somit zeitintensiv und nicht für *in vivo* Experimente verwendbar. Zudem beruht die Selektivität vieler Lipidmarker lediglich auf ihrem lipophilen Charakter. Die Effizienz, mit welcher Lipide angefärbt werden, beruht somit sowohl auf deren Zugänglichkeit für den Marker als auch auf deren Wechselwirkung mit ihm. So konnten O'Rourke *et al.* zeigen, dass sowohl Nilrot als auch BODIPY-markierte Fettsäuren nicht die tatsächlichen Hauptspeicher für Lipide anfärben sondern Organellen, die in Beziehung zu Lysosomen stehen.^[143] Für eine verlässliche Aussage über Lipidgehalt bzw. Lipidverteilung sind somit stets weitere Verfahren bzw. Kontrollexperimente notwendig.

Die Eignung der CARS Mikroskopie hierfür konnten erstmals Hellerer *et al.* 2007 zeigen.^[66] Während im Wildtyp mittels Fluoreszenzmikroskopie nach Nilrot-Färbung und mittels CARS Mikroskopie eine vergleichbare Lipidverteilung beobachtet wurde, unterschied sie sich in Mutanten teilweise beträchtlich. Im Gegensatz zum Wildtyp speicherten die verwendeten Mutanten Lipide nicht nur hauptsächlich im Darm, sondern verstärkt auch in der Hypodermis. Diese hypodermalen Fettspeicher konnten mittels Nilrot-Färbung allerdings nicht markiert werden. Auch Morck *et al.* erhielten im direkten Vergleich von CARS und Fluoreszenzexperimenten unterschiedliche Ergebnisse.^[144] Weitere CARS Studien zu unterschiedlichen Lipidspeichern in *C. elegans* erfolgten in der Gruppe von Cheng.^[67]

Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Döring in Kiel beschäftigt sich unter anderem mit dem Einfluss der Ernährungsbedingungen auf den Lipidmetabolismus und die Verteilung der Lipide.^[145] Wie bereits beschrieben, stellt *C. elegans* für Experimente dieser Art ein hervorragendes Modellsystem dar. Im Rahmen einer Kooperation wurden erste Versuche hierzu unternommen und lebende Nematoden mittels der CARS Mikroskopie abgebildet.^[142]

Probenpräparation Die Präparation der Proben erfolgte durch Daniela Palgunow aus der Arbeitsgruppe von Prof. Döring. Eine detaillierte Beschreibung der Probenpräparation ist in^[142] gegeben. Es wurden Nematoden vom Wildstammtyp (Variation Bristol, N2) verwendet. Die Nematoden wurden auf mit *E. coli* OP50-Bakterien beimpften NGM-Agar-Platten (Nematode Growth Medium) kultiviert. Für die Mikroskopie wurden die Nematoden in M9-Puffer gewaschen, in 2 Gew.-% NaN₃ in M9-Puffer aufgenommen und auf einen Objektträger gegeben. Für die Mikroskopie wurden die Fadenwürmer mit ei-

nem Deckglas (# 1,5) abgedeckt.

Mikroskopie Für die CARS-Aufnahmen wurden das 40× Luftobjektiv und das 63× Ölimmersionsobjektiv verwendet. Es wurden CARS Aufnahmen in Transmissionsgeometrie erstellt. Zur Anregung wurde der Ti:Sa-Oszillator im ps-Betrieb als Quelle für den Pumpstrahl und der OPO als Quelle für den Stokes-Strahl verwendet. Die Leistungen vor dem Shutter betragen 70 mW bei 720 nm und 50 mW bei 905,5 nm. Das Anregungslaserlicht wurde durch geeignete Filter geblockt (ET680SP-2P8 und ET605/70-2P, Chroma Technology Corp., USA).

Ergebnisse und Diskussion In Abbildung 3.18 ist die Maximumsprojektion einer CARS Aufnahme des mittleren Bereichs eines Nematoden bei 2845 cm^{-1} dargestellt. Die Projektion erfolgte über 54 Einzelaufnahmen, die im Abstand von 300 nm erstellt

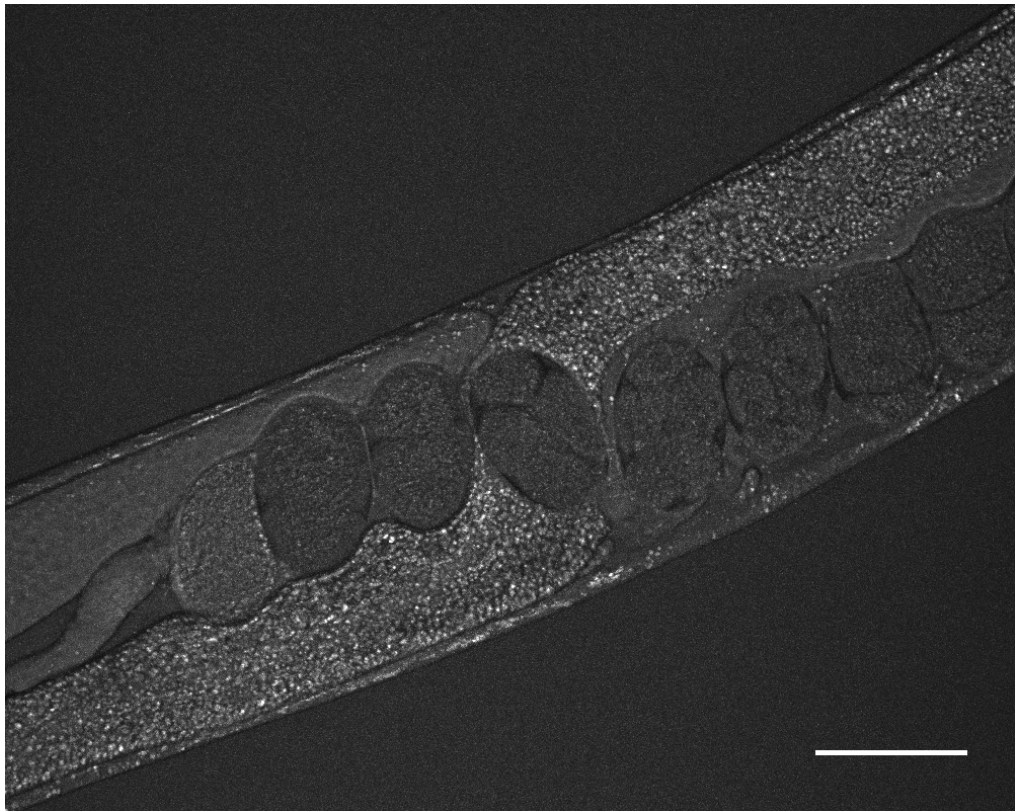


Abbildung 3.18.: Maximumsprojektion einer CARS Aufnahme mit dem 40× Luftobjektiv. Abgebildet ist der mittlere Bereich eines *C. elegans* Wurms. Gut zu erkennen sind der Darm als Hauptfettspeicher und befruchtete Eier in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Maßstabsbalken 50 μm .

wurden. Starke CARS Signale werden in lipidhaltigen Vesikeln generiert. Diese Vesikel sind hauptsächlich im Darm zu erkennen. Durch Variation der CARS Signale und des nichtresonanten Hintergrunds sind aber auch andere Bereiche des Nematoden klar zu erkennen, so z.B. befruchtete Eier in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Der Kopfbereich eines Nematoden ist in Abbildung 3.19 zu sehen. Die Abschnitte mit dem Pharynx

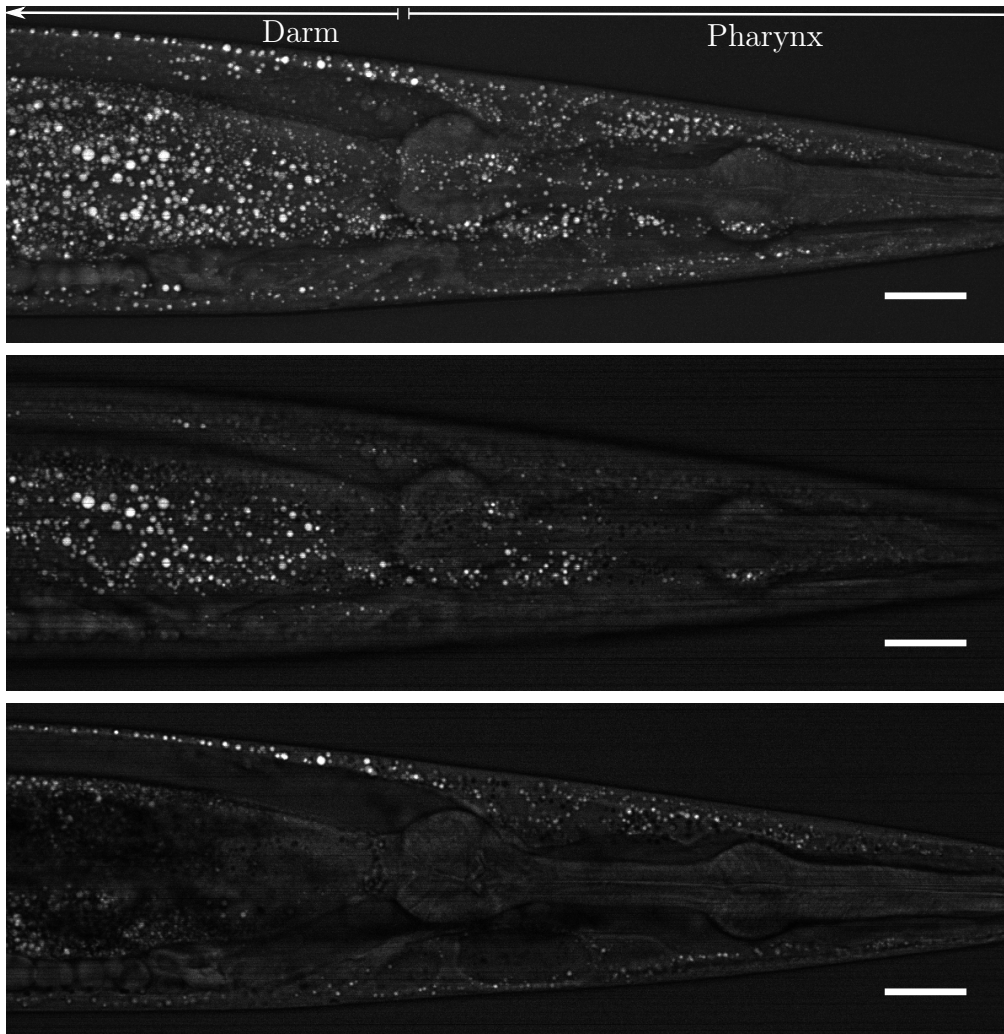


Abbildung 3.19.: CARS Aufnahme des Kopfbereichs eines Nematoden mit dem $63\times$ Ölimmersionsobjektiv. Oben: Maximumsprojektion eines z-Stapels von 25 Einzelaufnahmen mit $1,5\ \mu\text{m}$ Schrittweite. Mitte und unten: Einzelaufnahmen im Abstand von $12\ \mu\text{m}$. Maßstabsbalken $20\ \mu\text{m}$.

(Rachen) und dem Beginn des Darms sind in der Maximumsprojektion (oben) gekennzeichnet. Die Distanz zwischen den zwei Einzelaufnahmen (Mitte und unten) beträgt

12 μm . Alle Darstellungen weisen einen starken Kontrast aufgrund der Signalstärke der Vesikel auf und zeigen die Lipidspeicher im Darm (Mitte) und in der Hypodermis (unten). Mit dem Pharynx ist auch hier ein Bereich, der keinen Lipidspeicher darstellt, gut zu erkennen. Die in den Einzelaufnahmen teilweise zu erkennenden schwarzen Linien kommen aufgrund von Schwankungen in der Synchronisation des Ti:Sa-Oszillators auf den OPO zu Stande, sind somit technisch bedingte Artefakte. Im Vergleich der Einzelaufnahmen ist allerdings zuerkennen, dass es beim Fokussieren in tiefere Regionen der Probe auch zu Abschattungseffekten kommt. Aufgrund der starken Brechung und Streuung des Anregungslichts an den Lipidvesikeln, wird im darauffolgenden Bereich kein CARS Signal mehr generiert. Durch die Verschiebung der Anregungswellenlängen weiter in den IR-Bereich, bspw. durch Verwendung von Signal und Idler des OPO, könnten solche Artefakte verringert werden. Allerdings ist die Transmission des Mikroskops in diesem Spektralbereich deutlich geringer, was die Anregungsleistung auf der Probe wieder reduziert.

3.9. CARS Experimente am Zentralen Nervensystem

Neben dem Gehirn wird bei Mensch und Wirbeltieren das Rückenmark zum Zentralen Nervensystem (ZNS) gezählt. Das ZNS setzt sich aus der grauen und der weißen Substanz zusammen. Die Nervenzellkörper bilden die graue Substanz, deren Fortsätze werden als Axone bezeichnet. Diese Nervenfasern werden von der Myelinscheide umhüllt und werden aufgrund deren Färbung als weiße Substanz bezeichnet. Diese Biomembran dient der elektrischen Isolierung der Axone und weist einen sehr hohen Lipidgehalt von ca. 70 Gew.-% auf.^[146] Dies prädestiniert die CARS Mikroskopie für Studien an diesen Strukturen. In der Arbeitsgruppe von Cheng wurden 2005 so auch erstmals Myelinscheiden unter physiologischen Bedingungen mittels CARS mikroskopiert.^[147] Dank der inhärent hohen Auflösung konnten morphologische Details wie beispielsweise Ranvier-Schnürringe der Axone abgebildet werden.

Die Entmarkung der Nervenfasern (Demyelinisation) ist Kennzeichen zahlreicher Erkrankungen, z.B. der Multiplen Sklerose oder des Devic-Syndroms. Die grundlegenden molekularen Zusammenhänge sind allerdings noch nicht vollständig geklärt.^[146] Die CARS Mikroskopie kann bei der Verfolgung solcher Prozesse entscheidende Beiträge leisten. Die Kompatibilität der CARS Mikroskopie mit anderen NLO Methoden wurde bereits in einer Reihe von Untersuchungen an weißer Substanz genutzt. Fu et al. haben auf diese Weise mechanistische Studien zu unterschiedlichen Modellen der Demyelinisation durchgeführt.^[148, 149]

Im Rahmen einer Kooperation mit der TU Dresden wurde im Laufe dieser Arbeit be-

gonnen, die Anwendungsmöglichkeiten der CARS bzw. multimodalen Mikroskopie in der Neuropathologie und Neurochirurgie zu untersuchen. Im Folgenden möchte ich erste Erfolge am Beispiel von Gewebeschnitten des ZNS aufzeigen.

3.9.1. CARS Mikroskopie an murinen Hirngewebeschnitten

Bei der Behandlung von Hirntumoren stellt die operative Entfernung (Resektion) des tumorösen Gewebes nach wie vor die Therapiemethode der Wahl dar.^[150] Vor allem größere Tumore sind nicht mehr durch Radiochirurgie behandelbar und steigern aufgrund ihres Raumannspruchs den Hirndruck, bis hin zu lebensbedrohendem Grade. Die große Herausforderung bei der Resektion in der Neurochirurgie ist die komplette Entfernung des tumorösen Gewebes bei gleichzeitiger Schonung des normalen, funktionstragenden Hirngewebes. Probleme stellen hierbei sowohl die Orientierung in visuell strukturlosen Gehirnarealen als auch die Erkennung und somit sichere Abgrenzung des von infiltrierenden Tumorzellen durchsetzten Gewebes. Für ersteres gibt es bereits Ansätze wie die sogenannte Neuronavigation, d.h. die Orientierung während der Operation mittels zuvor aufgezeichneter 3-dimensionaler Abbildungen des zu behandelnden Bereichs.^[151] Gängige Techniken hierfür sind die Computertomographie und die Magnetresonanztomographie, welche allerdings nur eine begrenzte räumliche Auflösung bieten. Zudem wird das Gewebe durch die Operation bewegt und selbst bei zuvor klar dargestellten Grenzen des tumorösen Bereiches sind diese intraoperativ schwer nachvollziehbar. Für die pathologische Differenzierung stellt die histologische Untersuchung nach wie vor den Goldstandard dar.^[152] Bei der Histologie können allerdings nur einzelne, kleine Gewebeabschnitte untersucht werden. Die Notwendigkeit der Anfertigung der Gewebeschnitte und deren Einfärbung macht die Nutzung der Methode *in vivo* oder auch operationsbegleitend praktisch unmöglich. In die CARS Mikroskopie werden daher große Hoffnungen gesetzt. Sie sollte in der Lage sein, schnell auch über größere Bereiche sowohl morphologische als auch biochemische Merkmale (spektrale Signaturen) abzubilden.

Probenpräparation Die Präparation der Proben erfolgte in der Neuropathologie der TU Dresden in der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Kathrin Geiger. Die tierexperimentellen und neurochirurgischen Versuche wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Matthias Kirsch ebenfalls an der TU Dresden durchgeführt. Schnitte wurden möglichst unmittelbar nach Erhalt der Proben angefertigt. Optimale Ergebnisse bei Erhaltung der Probenmorphologie wurden durch Schneidetechnik bei einer Proben temperatur von -10 bis -12°C erreicht. Die Schnitt dicke betrug 10-20 µm. Da eine unmittelbare Untersuchung der Proben nicht möglich war, wurden Schnitte auf Objektträgern der Größe 76×26 mm mit Methanol/Aceton fixiert, gefroren transportiert und bei -80°C gelagert.

Dies führte zu einer verminderten Austrocknung der Proben, welche sich ungünstig auf die Morphologie der Proben ausgewirkt hätte (unveröffentlichte Daten, Zwischenbericht MediCARS).

Mikroskopie Die Gewebeschnitte wurden für die CARS Mikroskopie aufgetaut und mit einem Deckglas (# 1,5) bedeckt. Die Durchlichtaufnahmen zur Übersicht wurden mit einem Leica 10× Luftobjektiv (NA 0.4) erstellt. Die für die CARS-Aufnahmen verwendeten Objektive sind jeweils angegeben. Hierbei musste stets ein Kompromiss zwischen Anregungseffizienz und Auflösung und der Größe des abgebildeten Bereichs und somit der Geschwindigkeit der Aufnahmen getroffen werden. Die CARS Bilder wurden in Transmissionsgeometrie erstellt. Das Anregungslaserlicht wurde durch geeignete Filter geblockt (775/SP und 641/75, Semrock Inc., USA). Die Leistungen vor dem Shutter betragen 200-300 mW bei 816,7 nm für den OPO und 250-350 mW bei 1064 nm. Zur Abbildung ganzer Gewebeschnitte wurden die “Tile-Scan” Funktion des Leica Mikroskops verwendet und die Einzelbilder automatisiert zu einer Gesamtaufnahme zusammengesetzt.

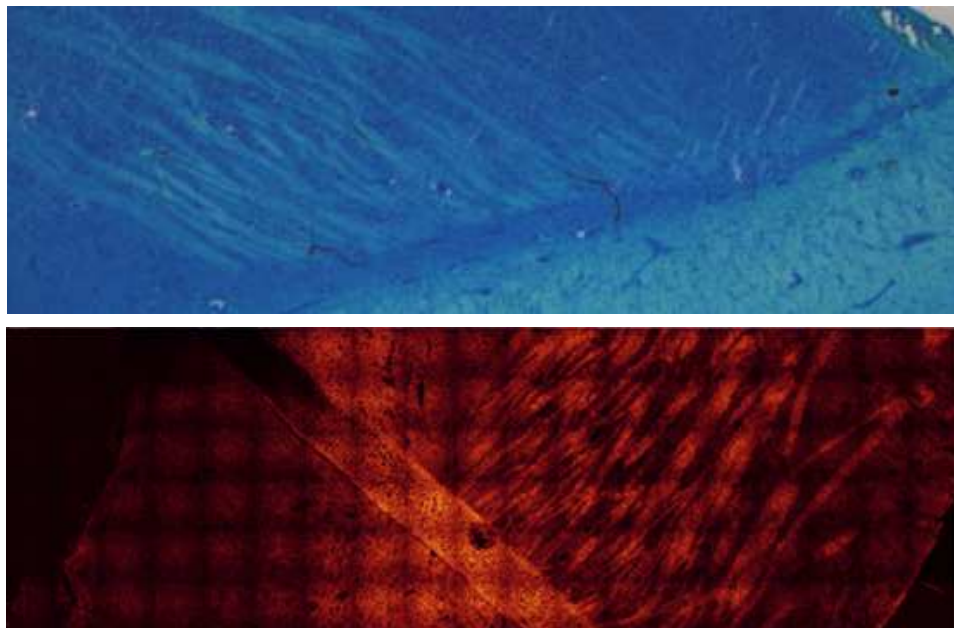


Abbildung 3.20.: Vergleich einer Methylenblaufärbung (oben) mit einer CARS Aufnahme bei 2845 cm^{-1} (unten) eines humanen Hirngewebeschnitts.

Ergebnisse und Diskussion Zunächst wurden Experimente an normalen, humanen Hirnschnitten durchgeführt. In Abb. 3.20 ist eine typische Methylenblaufärbung zur

Schnellschnittdiagnostik für intraoperative Fragestellungen im Vergleich mit einer CARS-Messung zu sehen. Die Methylenblaufärbung erfolgte an einem Parallelschnitt in Dresden. Morphologische Details des Wechsels von grauer und weißer Substanz an der Grenze von Amygdala und Stammganglien des Präparates sind deutlich zu erkennen.

In Abb. 3.21 sind Aufnahmen eines murinen Präparats mittels unterschiedlicher Kontrastverfahren dargestellt. Im Gegensatz zum Durchlichtbild sind in der CARS Aufnahme bereits ohne weitere Bearbeitung Faserbahnsysteme erkennbar. Der Kontrast ist vergleichbar mit dem mittels H&E-Färbung erreichbaren Resultat. Noch ist unklar, mit

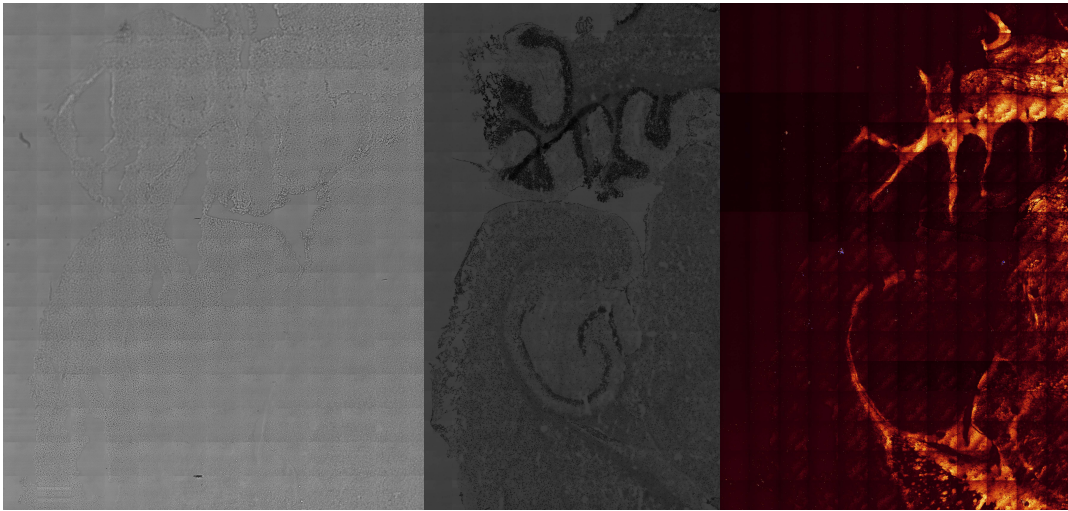


Abbildung 3.21.: Aufnahmen eines murinen Hirnschnitts, $20\times$ Luftobjektiv. Links: Durchlichtaufnahme des ungefärbten Präparats. Mitte: Durchlichtaufnahme nach HE-Färbung. Rechts: CARS Aufnahme des ungefärbten Präparats bei 2845 cm^{-1} .

welcher räumlichen Auflösung CARS Aufnahmen bei der Untersuchung neoplastischer Maushirne sinnvoll sind (s.u.). Daher wurden sowohl Übersichtsaufnahmen mit dem $20\times$ Luftobjektiv als auch höher aufgelöste Aufnahmen mit dem $40\times$ Luftobjektiv ganzer Gewebeschnitte erstellt. So konnte beispielsweise ein Cryoschnitt eines Maushirns mit dem $20\times$ Luftobjektiv in 27 min abgebildet werden. In Abb. 3.22 ist eine Maximumsprojektion der Aufnahme dargestellt. Das abgerasterte Volumen beträgt $8\text{ mm}\times 12\text{ mm}\times 48\text{ }\mu\text{m}$ und besteht aus 18183 Einzelbildern (551 Bildstapeln mit je $128\times 128\times 33$ Voxel). Zum Zeitpunkt der Messungen zeigte der SuperGalvo des TCS SP5 eine Fehlfunktion. Er vibrierte leicht, so dass leicht unscharfe Bilder mit Linienmuster entstanden. Durch 4-faches Mitteln ganzer Einzelbilder konnte die Abbildung verbessert werden, was allerdings zu unnötig verlängerten Aufnahmedauern führte. Zudem waren die Proben nicht eben, wie an dem einzelnen z-Schnitt in Abb. 3.22 klar zu erkennen ist. So musste bei

einem 10 μm starken Cryoschnitt ein z-Stapel von über 50 μm aufgenommen werden, was wiederum die Aufnahmedauer erhöhte. Ein weiteres Problem stellten die enormen Datenmengen dar. Die Datei im Leica-Format der Aufnahme aus Abb.3.22 hat eine Größe von 9,1 GB. Die Handhabung war entsprechend zeitaufwändig. Um einfacher handhab-

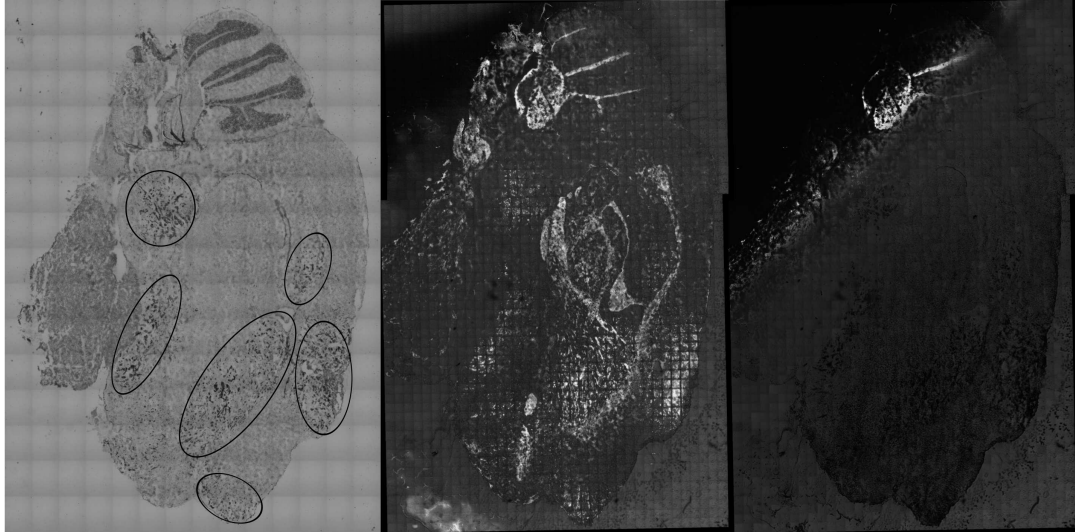


Abbildung 3.22.: Gewebeschnitt eines Maushirns mit mehreren Tumornestern. Links: Durchlichtaufnahme nach H&E-Färbung, die Tumornester sind eingekreist. Mitte: Maximusprojektion der CARS Aufnahme bei 2845 cm^{-1} . Rechts: Einzelner z-Schnitt der CARS Aufnahme bei 2845 cm^{-1} .

bare Abbildungen für einen schnellen Überblick zu erhalten, wurden die Daten mittels der kommerziellen Analysesoftware für Mikroskopie Imaris (Bitplane, Zürich, Schweiz) auf 2000 Pixel in x-Richtung “resampled”. Mittels ImageJ wurden aus diesen reduzierten Bildstapeln Maximumprojektionen erzeugt, d.h. es wurde jeweils der Pixel mit maximaler Intensität entlang der z-Achse in das resultierende Bild projiziert. Bei der Erstellung einer Maximumprojektion wird jedoch kein Bild mit maximalem Kontrast erzeugt, da auch der maximale Hintergrund projiziert wird. Bessere, d.h. kontrastreichere, Bilder sollten mittels des Verfahrens der Ausdehnung der Schärfentiefe möglich sein. Die Rekonstruktion eines scharfen Bildes aus einem Stapel Bilder, mit jeweils unterschiedlichen, scharfen Teilbereichen, stellt ein häufiges Problem in der Mikroskopie dar. In der Arbeitsgruppe von Prof. Unser an der EPFL wurde zur Lösung dieses Problems ein Algorithmus basierend auf komplexen Wavelet-Transformationen zur Ausdehnung der Schärfentiefe (engl. extended depth of field, kurz EDF) entwickelt.^[153] Die Anwendung des zugehörigen ImageJ-Plugins auf die z-Stapel der CARS-Aufnahmen brachte eine Erhöhung des Kontrastes. Aufgrund des hohen Rechenaufwandes konnte diese Methode bisher jedoch

lediglich auf die Bildstapel mit reduzierter Datentiefe angewandt werden. Wie in der Vergrößerung in Abb. 3.23 zu erkennen ist, kann es hierbei aber auch zur Ausbildung von Artefakten kommen. Im einzelnen z-Schnitt und der Maximumsprojektion sind klar

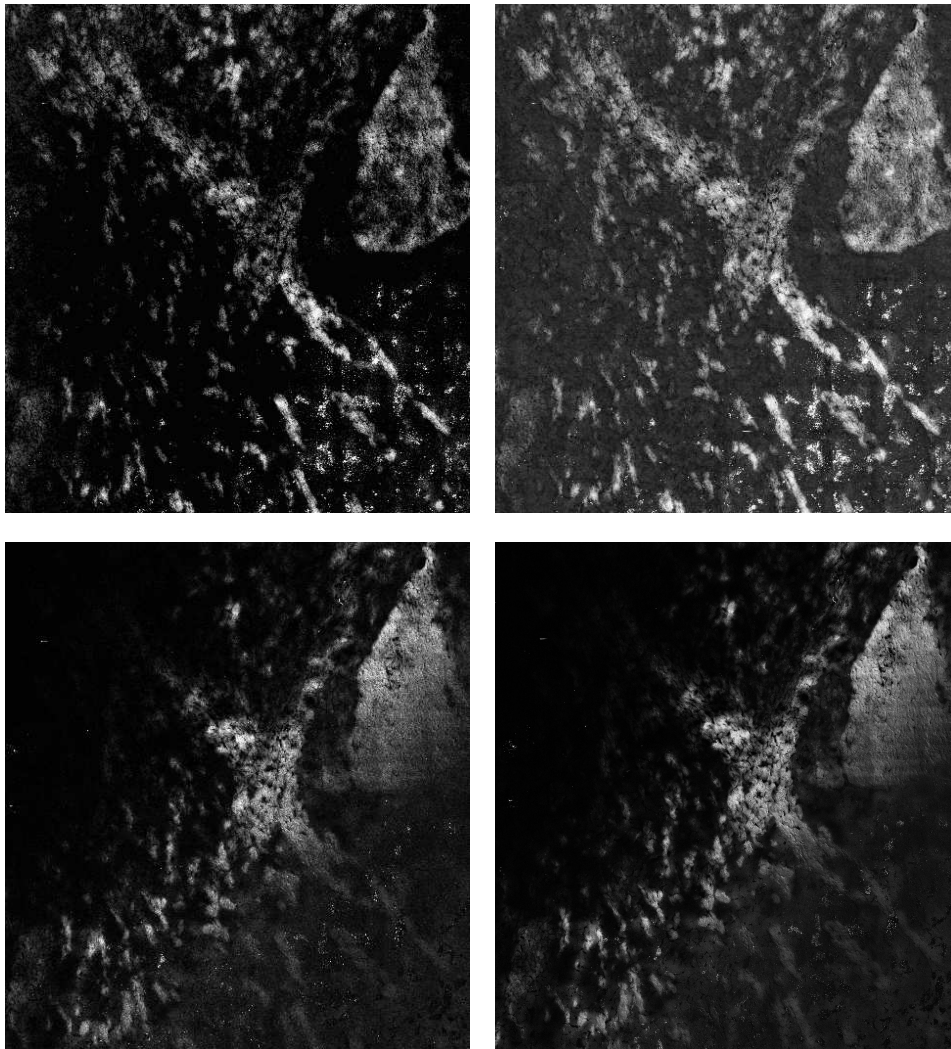


Abbildung 3.23.: Vergrößerte Darstellung der CARS Aufnahme des Hirnschnitts aus Abb. 3.22. Oben, links: Aufnahme nach Anwendung des EDF-Verfahrens auf den z-Stapel mit reduzierter Auflösung. Oben, rechts: Maximumsprojektion des z-Stapels mit reduzierter Auflösung. Unten, links: einzelner z-Schnitt mit reduzierter Auflösung. Unten, rechts: z-Schnitt in voller Auflösung.

die Faltungen des Gewebes zu erkennen. Nach Anwendung des ImageJ-Plugins gehen Bildinformationen in Regionen mit schwachen Signalstärken verloren. Zudem gehen be-

reits bei der Reduzierung der Auflösung auf 2000 Pixel Strukturinformationen verloren. Eine verlässliche Analyse der Daten ist somit lediglich unter Verwendung der einzelnen z-Bilder in voller Auflösung möglich. Um die Anzahl der auszuwertenden Bilder zu reduzieren, muss die Probenpräparation folglich in Bezug auf Ebenheit noch optimiert werden. Einzelne z-Schnitte wurden in voller Auflösung als TIFF-Dateien exportiert. Ein Ausschnitt eines solchen Schnitts ist in Abb. 3.23 abgebildet. Im Vergleich zur Maximumprojektion sind der deutlich höhere Kontrast und die daraus resultierende detailtreuere Abbildung der Probe klar zu erkennen. In der vergrößerten Darstellung wird auch die hohe morphologische Auflösung, die mittels der CARS Mikroskopie erreichbar ist, weiter deutlich: die Fasersysteme einzelner Faltungen der Hirnrinde werden sichtbar, einzelne Zellkerne sind als Aussparungen sichtbar. Derartige färbefreie Bilder des ZNS eröffnen neue Ansätze zur Erkennung verschiedener, zellspezifischer Pathologien.

Ein Problem stellen bisher Bereiche mit Melanomen (Tumoren der Pigmentzellen) dar, da diese das Anregungslicht stark absorbieren. Entsprechende Bereiche werden daher meist bei der CARS Mikroskopie "verbrannt" und ergeben eine Sättigung des Detektors. Melanome können allerdings in der Regel aufgrund ihrer Eigenfärbung bereits ohne weitere Färbetechnik in der Durchlichtmikroskopie erkannt werden.

Für die gezeigten CARS Abbildungen der Gewebeschnitte wurde bislang lediglich die CH-Streckschwingung von Lipiden zur Kontrastgenerierung genutzt. Wie in Abb. 3.22 zu erkennen ist, reicht die rein morphologische Abbildung auf Basis des unterschiedlichen Lipidgehalts nicht zum Nachweis von Tumornestern aus. Die in der H&E-Färbung eingezeichneten Tumoren sind in der CARS Aufnahme unauffällig.

Abschließend kann man somit die bisherigen Arbeiten als vielversprechend im Bereich der schnellen morphologischen Abbildung mit zellulärer Auflösung von Hirngewebe bewerten. Wie durch Gao *et al.* am Beispiel von Prostatastrüden gezeigt wurde, kann dies bereits ausreichen, um normales von tumorbehaftetem Gewebe zu unterscheiden.^[154] Hierbei wurde allerdings noch eine zeitaufwändige, semi-automatische Datenanalyse basierend auf der Erkennung von Zellkernen und der Bestimmung ihrer Abstände eingesetzt. Eine zelluläre Auflösung der Abbildung und somit auch zeitintensive Aufnahmen sind hierfür unabdingbar. Zum vorrangigen Ziel der schnellen Identifizierung tumorbehafteter Geweberegionen im Hirn ist eine spektrale Differenzierung daher sicherlich der näherliegende Ansatz. In der Arbeitsgruppe um Volkmer in Stuttgart wurden hierfür bereits im Rahmen dieses Kooperationsprojektes vielversprechende M-CARS Studien angefertigt (unveröffentlichte Daten). Aufgrund dieser sollte es möglich sein, durch die ratiometrische Auswertung weniger Resonanzen eine klare Identifizierung von malignem Gewebe zu erhalten. Im Idealfall kann somit durch die Abbildung von zwei Resonanzen auf zwei Kanälen mit einer CARS Aufnahme malignes Gewebe dargestellt werden.

3.9.2. Multimodale Mikroskopie von Rückenmarksverletzungen

Nach einer Verletzung des Rückenmarks erfolgt eine ganze Reihe von Prozessen, die schließlich zur Ausbildung des Narbengewebes führt. Dieses Narbengewebe isoliert einerseits die Läsion und verhindert so eine weitere Ausbreitung der Schädigung und Entzündung. Andererseits wird allerdings auch eine Regeneration der Axonen in diesem Bereich verhindert.^[155] In den vergangenen Jahren wurden große Anstrengungen unternommen, um diese Prozesse besser zu verstehen und neue Therapiemethoden zu entwickeln. Die visuelle Verfolgung der strukturellen aber auch biochemischen Veränderungen spielt hierbei eine große Rolle. Die Verwendung von Markern und die klassische Histologie stellen hierfür nach wie vor die gängigsten Methoden dar. Chemisch-selektive, markerfreie Techniken wären allerdings zu bevorzugen. Shi *et al.* haben mittels Multimodaler Mikroskopie polymerbasierte Therapieansätze nach Rückenmarksverletzungen untersucht.^[156] Die CARS Mikroskopie diente zur Darstellung der Morphologie der Myelinscheiden, mittels 2-PE Fluoreszenz wurde die Verteilung der Ca^{2+} -Ionen abgebildet. An der TU Dresden wurden als Grundlage für CARS Studien sowohl Raman- als auch FT-IR-Mikroskopie an Gewebeschnitten des Rattenrückenmarks durchgeführt. Die Schwingungsspektren wurden mittels Clusteranalyse im Fingerprintbereich ausgewertet.^[157] Hierbei werden die Spektren auf ähnliche Strukturen untersucht und auf Basis dieser Ähnlichkeiten neue Gruppen definiert, die sogenannten Cluster. In Abb. 3.24 sind die gemittelten Ramanspektren der erkannten Cluster und ein entsprechend farbcodiertes Bild des Rattenrückenmarks dargestellt. Die Clusterspektren wurden nach abnehmendem Lipidgehalt (Banden bei 700 cm^{-1} , 1063 cm^{-1} , 1300 cm^{-1} und 1440 cm^{-1}) sortiert. Im Bereich des normalen Gewebes ist ein hoher Lipidgehalt entsprechend der intakten Myelinscheiden zu erkennen (gelbe Codierung). Im Gegensatz hierzu nimmt die Intensität dieser Banden im Bereich der Läsion ab. Die Banden im Bereich von $830\text{--}850\text{ cm}^{-1}$ (O-P-O und C-O-C Gruppenbanden von Peptiden, Zuckern und Desoxyribonukleinsäuren) verhalten sich komplementär hierzu und markieren die Verletzung. Diese Informationen können als Basis für die Anwendung der CARS Mikroskopie dienen. Auf die weitere Zuordnung der Banden werde ich nicht eingehen, da sie für diese Arbeit keine Rolle spielten.

Probenpräparation Die tierexperimentellen und neurochirurgischen Versuche wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Matthias Kirsch an der TU Dresden durchgeführt. Als Versuchstiere wurden Wistar-Ratten verwendet. Eine detaillierte Beschreibung der Probenpräparation ist in^[157] gegeben. Im Bereich zwischen 8. und 10. Brustwirbel wurde den Versuchstieren eine Läsion zugefügt. Die Wunde wurde oberflächlich geschlossen. Es folgte keine weitere Therapie der Verletzung. Nach drei Wochen erfolgte zunächst

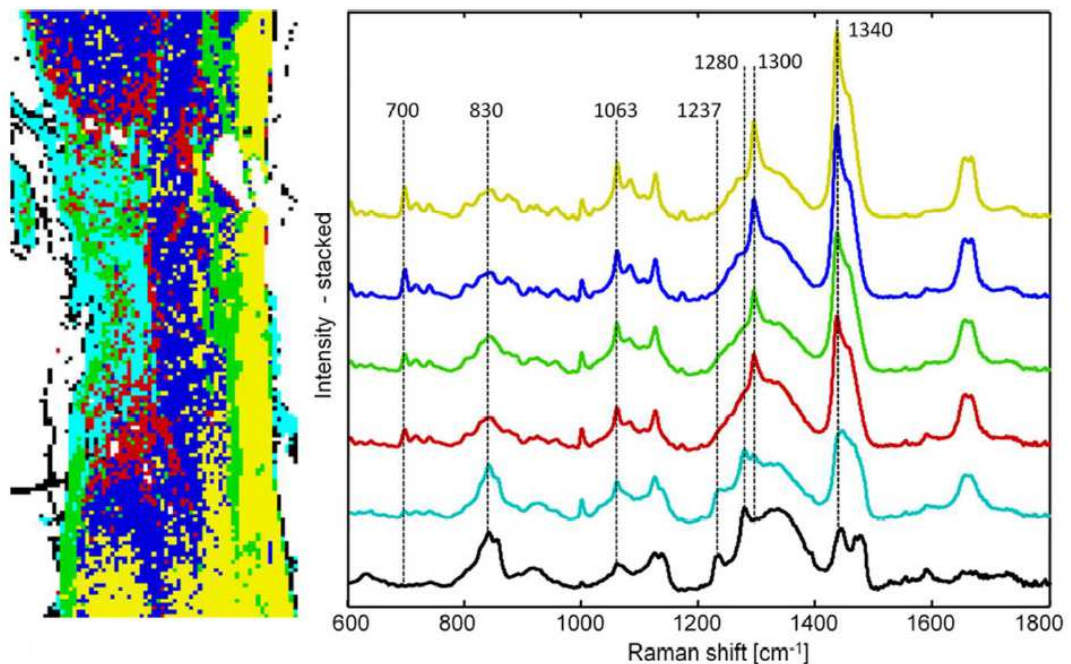


Abbildung 3.24.: Rattenrückenmark mit Läsion. Links: Spektrale Abbildung basierend auf einer Clusteranalyse der Ramandaten. Rechts: Ramanspektren der Cluster im Farbcode für die spektrale Abbildung. Entnommen aus^[157]

eine Perfusionfixierung der Tiere. Daraufhin wurde das Rückenmark entfernt und in Gefriermedium eingebettet. Für die Mikroskopie wurden Kryoschnitte einer Stärke von 20 μm erstellt und auf Objektträgern eingefroren. Da eine unmittelbare Untersuchung der Proben nicht möglich war, wurden die Schnitte gefroren transportiert und bei -80°C gelagert.

Mikroskopie Die Gewebeschnitte wurden für die CARS Mikroskopie aufgetaut und mit einem Deckglas (# 1,5) bedeckt. Die für die CARS-Aufnahmen verwendeten Objektive sind jeweils angegeben. Die CARS Bilder wurden in Transmissionsgeometrie erstellt. Das Anregungslaserlicht wurde durch geeignete Filter geblockt (ET680SP-2P8, Chroma Technology Corp., USA und BP641/75, Semrock Inc., USA). Die Leistungen vor dem Shutter betragen 170 mW bei 816,7 nm für den OPO und 250 mW bei 1064 nm. Bei der multimodalen Mikroskopie wurde CARS mit SHG bzw. SFG und 2-PE Fluoreszenz zur Kontrastgenerierung kombiniert. Zunächst wurden hierfür zusätzlich 250 fs-Pulse des Ti:Sa bei 941 nm (70 mW vor Shutter) eingekoppelt. Durch die kürzeren Pulsdauern war eine höhere Effizienz der $\chi^{(2)}$ Prozesse zu erwarten. Allerdings stellte sich heraus, dass bereits durch Pump- und Stokesstrahl ein ausreichendes SFG Signal erhalten wurde.

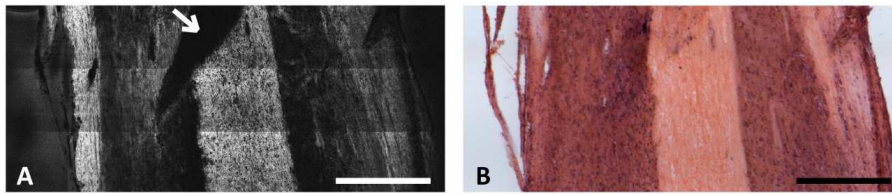


Abbildung 3.25.: Vergleich einer CARS Aufnahme ($20\times$ Luftobjektiv) bei 2845 cm^{-1} (links) mit einer H&E-Färbung (rechts) eines normalen Rückenmark-Gewebeschnitts einer Ratte. Der mit dem Pfeil markierte Lappen, wurde bei der Färbung entfernt. Maßstabsbalken $20\text{ }\mu\text{m}$. Entnommen aus^[157]

Somit konnte die zusätzlich Belastung der Probe durch die fs-Pulse des Ti:Sa-Lasers vermieden werden. Die SFG wurde ebenfalls in Transmission detektiert. Hierfür wurde ein dichroitischer Spiegel zur Abtrennung vom CARS Signal verwendet (RSP650, Semrock Inc., USA) und das Anregungslicht durch den Kurzpass Filter ET680SP-2P8 (Chroma Technology Corp., USA) und einen Bandpass Filter HC472/30 (Semrock Inc., USA) geblockt. Die Fluoreszenz wurde in Epi-Richtung detektiert. Ein dichroitischer Spiegel (670 DCXXR, Chroma Technology Corp., USA) trennte das Fluoreszenzsignal von rückgestreutem Anregungslicht und ein Bandpassfilter (BP525/50, Semrock Inc., USA) die Fluoreszenz von restlichem Anregungslicht und dem CARS Signal. Zur Abbildungen ganzer Gewebeschnitte wurden die “Tile-Scan” Funktion des Leica Mikroskops verwendet und die Einzelbilder automatisiert zu einer Gesamtaufnahme zusammengesetzt.

Ergebnisse und Diskussion Analog zu den CARS Aufnahmen der Gewebeschnitte am Maushirn konnten auch Lipidverteilungen in Gewebeschnitten des Rattenrückemarks dargestellt werden. Auch hier ist die lipidreichere weiße Substanz klar von der grauen Substanz zu unterscheiden (s. Abb. 3.25). Ein Vergleich der Aufnahmen von H&E-Färbung und CARS zeigt erneut den hohen Kontrast, der mittels CARS erzielt werden kann. Auch bei diesen Studien sind die hohen Aufnahmegeschwindigkeiten der NLO Mikroskopie von Vorteil. Nur hierdurch kann das gesamte Rückenmark in zellulärer Auflösung abgebildet werden. Zum Vergleich: Das Falschfarbenbild in Abb. 3.24 besteht aus 10902 Pixeln mit je $25\times 25\text{ }\mu\text{m}^2$ und einer Verweildauer pro Pixel von 1,5 s. Die Aufnahme dauerte somit ca. 4,5 Stunden. Eine typische Übersichtsaufnahme mittels CARS (Abb. 3.26) dauerte unter Verwendung eines $20\times$ Luftobjektivs 381 s. Es wurde hierfür ein z-Stapel mit 18 Schichten, die jeweils aus etwa $3,5\cdot 10^6$ Pixeln der Größe $6,4\times 6,4\text{ }\mu\text{m}^2$ bestehen, abgerastert und aufgrund der bereits erwähnten Störung des TCS SP5 4-fach

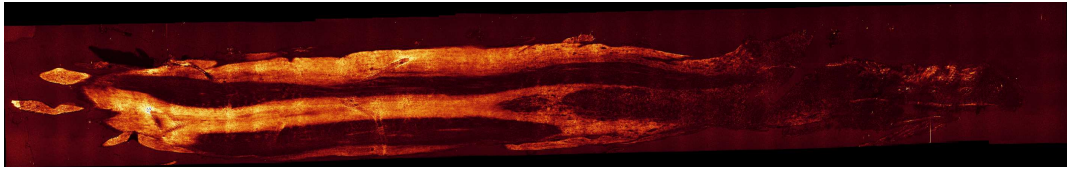


Abbildung 3.26.: Maximumprojektion einer CARS Übersichtsaufnahme mit dem $20\times$ Luftobjektiv. Dargestellt ist ein Gewebeschnitt eines Rattenrückemarks mit Läsion. Größe der Aufnahme $17,84\times 2,75\text{ mm}^2$.

gemittelt. Bei ebenen Proben und ohne Mittelung wären somit nochmals deutlich schnellere, hochaufgelöste Aufnahmen möglich.

Bei den Aufnahmen des Rattenrückemarks konnte zudem CARS mit SFG und 2-PE Fluoreszenz zur multimodalen Kontrastgenerierung kombiniert werden. So konnten die komplexen Prozesse nach der Verletzung des Rückenmarks detailliert verfolgt werden. In Abb. 3.27 ist eine multimodale Aufnahme mit dem $40\times$ Luftobjektiv des verletzten Rattenrückemarks nach 21 Tagen Überlebenszeit dargestellt. Die Komplementarität der Kontrastverfahren ist gut zu erkennen. Das CARS Signal (in Rot dargestellt) dominiert die unversehrten Bereiche der Aufnahme. Innerhalb der Läsion und an deren Randbereichen sind die Morphologie und die Zusammensetzung des Gewebes deutlich verändert. Die SFG weist klar die Verteilung des Kollagens nach.^[158] Das Kollagen tritt hauptsächlich im Bereich des Narbengewebes am Rande der Läsion auf. Die Autofluoreszenz tritt größtenteils innerhalb der Läsion auf. Die so dargestellten, rundlichen Strukturen entsprechen höchstwahrscheinlich aktivierten Mikroglia. Diese sind die residenten Makrophagen des ZNS und als solche zur Phagozytose, d.h. zur Aufnahme abgestorbener Zellreste und Fremdkörper, fähig. Kommt es zu einer Verletzung des ZNS reagieren die Mikroglia hierauf durch Zellvermehrung (Proliferation), Zellvergrößerung (Hypertrophie), Ansammlung am Ort der Läsion und Phagozytose. Bei der anschließenden intrazellulären Verdauung kommt es zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (engl.: Reactive Oxygen Species, ROS), dem sogenannten "Oxidativen Burst", bei welchem wiederum das reduzierte Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) beteiligt ist. NADPH zeigt eine Autofluoreszenz im kurzwelligen Bereich des sichtbaren Spektrums, die mit 2-PE nachweisbar ist.^[159,160] Auch die durch Hypertrophie erhaltene rundliche Form der Mikroglia ist gut zu erkennen.^[161] Somit können mittels multimodaler Mikroskopie drei der wichtigsten Prozesse nach erfolgter Rückenmarksverletzung abgebildet werden: Entmarkung der Nervenfasern, Entzündung und Narbenbildung. Die multimodale Mikroskopie sollte somit in zukünftigen Studien ein wichtiges Werkzeug zur Verfolgung des Regenerationsprozesses am Rückenmark bei unterschiedlichen Therapieansätzen dienen können. Die Neuausbildung funktionaler Nervenstränge

kann mittels CARS an der Myelinscheide gezeigt werden. Die Kollagenfasern des Narbengewebes sind eindeutig durch SFG bzw. SHG nachweisbar. Die Rolle von Makrophagen (bzw. Mikroglia im ZNS) im Heilungsprozess ist noch nicht endgültig geklärt. Die selektive und nicht-invasive Beobachtung der aktiven Mikroglia mittels 2-PE Autofluoreszenz stellt hierfür ein nützliches Hilfsmittel dar.

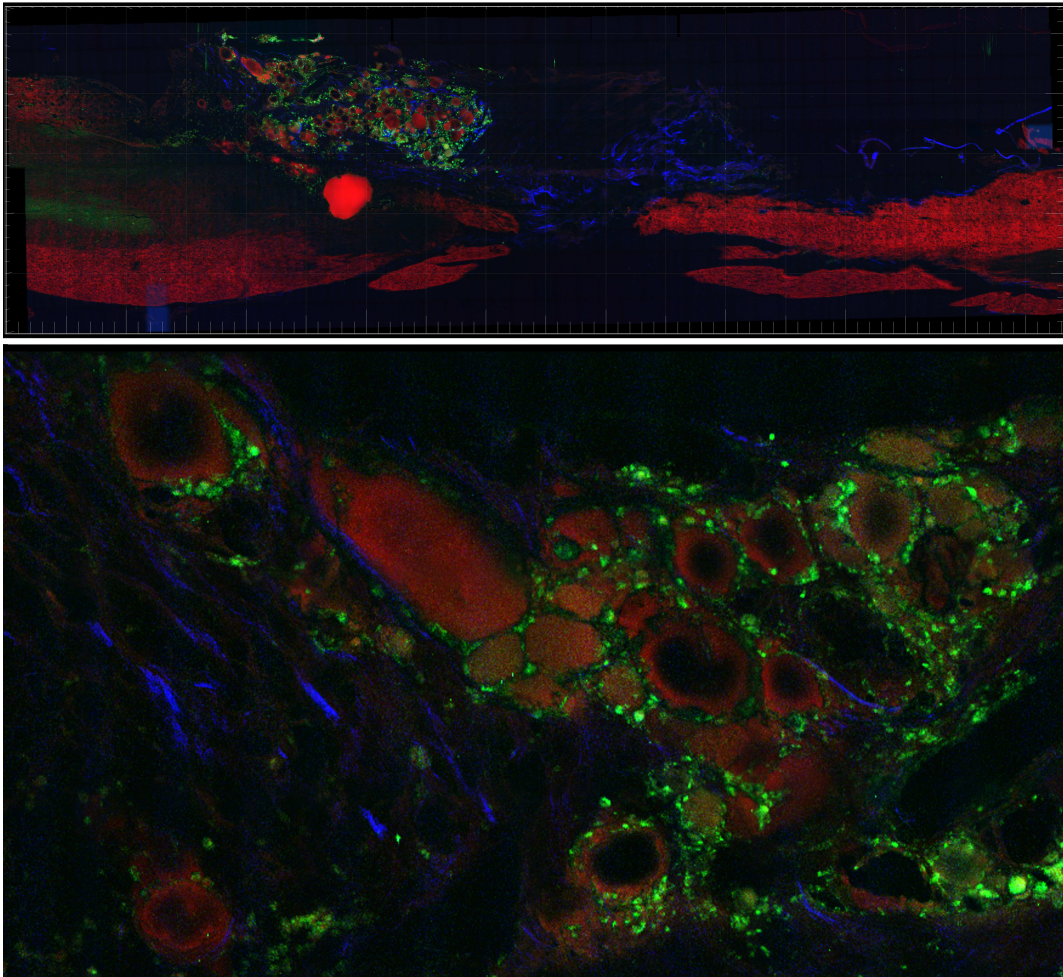


Abbildung 3.27.: Ein Gewebeschnitt eines Rattenrückenmarks mit Läsion und Fettimplantat nach 21 Tagen Überlebenszeit. Oben: Aufsicht eines multimodal aufgezeichneten z-Stapels. Unten: Vergrößerter Ausschnitt eines z-Schnittes. In Rot ist das CARS Signal bei 2845 cm^{-1} , in Blau die SFG und in Grün die Autofluoreszenz dargestellt.

Kapitel 4.

Weitfeld CARS Mikroskopie unter nicht-phasenangepasster Anregungsgeometrie

Die Arbeiten zur Weitfeld CARS Mikroskopie entstanden im Rahmen eines Versuches, ein CARS Experiment unter Totalreflexion zu realisieren. Daher möchte ich zunächst dieses motivieren und den Ansatz sowie die Probleme beschreiben, die letztendlich zu den systematischen Untersuchungen zur Weitfeld CARS Mikroskopie unter nicht-phasenangepasster Anregungsgeometrie führten.^[162]

4.1. Motivation und Ansatz für ein CARS Experiment mittels Totalreflexion

Das Phänomen der Totalreflexion (engl. total internal reflection, TIR) eines Lichtstrahls tritt an der Grenzfläche zweier Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes n_i auf, wenn der Einfallswinkel θ_e einen Grenzwert, den sogenannten kritischen Winkel θ_k , überschreitet (s. Abb. 4.1). Reflexions- und Brechungsgesetz beim Übergang elektromagnetischer Wellen von einem Medium in ein anderes lassen sich aus den Stetigkeitsbedingungen für die Felder \mathbf{E} und \mathbf{H} ableiten. Das Snelliussche Brechungsgesetz beschreibt die Ablenkung in Abhängigkeit der Brechungsindizes:

$$n_e \sin \theta_e = n_t \sin \theta_t \quad (4.1)$$

Beim Einfall vom optisch dichteren Medium ($n_e > n_t$) wird der Strahl vom Lot weggebrochen. Beim kritischen Winkel θ_k breitet sich das gebrochene Licht parallel zur Grenzfläche aus, und somit gilt $\sin \theta_t = 1$. Hieraus lässt sich der Winkel der Totalreflexion berechnen:

$$\theta_k = \arcsin \left(\frac{n_t}{n_e} \right) \quad (4.2)$$

Totalreflexion kann zur verlustfreien Ablenkung von Licht verwendet werden. Für die

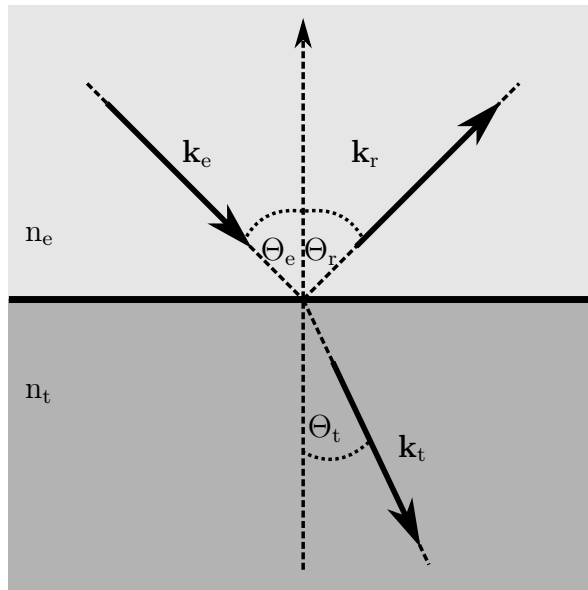


Abbildung 4.1.: Durchgang von Licht durch eine Grenzfläche, die einen Bereich mit Brechungsindex n_e (aus dem das Licht einfällt) von einem Bereich mit Brechungsindex n_t trennt. Dabei treten die Winkel θ_i zwischen den Wellenvektoren \mathbf{k}_i der Strahlen und der Normalen auf die Grenzfläche auf.

Mikroskopie spielt allerdings der Verlauf des Feldes auf der Rückseite der Grenzfläche, in der bei Totalreflexion keine Lichtstrahlung auftritt, die entscheidende Rolle. In Abbildung 4.2 wird eine ebene Welle an einer Grenzschicht total reflektiert. Die Überlagerung einfallender und reflektierter Welle führt zu einer Interferenz im Bereich des dichteren Mediums. Auf der Rückseite der Grenzfläche ist ebenfalls noch eine restliche Feldstärke vorhanden, die mit zunehmendem Abstand zur Grenzfläche abklingt. Die zugehörige Welle läuft entlang der Grenzschicht und wird als sogenannte evaneszente Welle oder Oberflächenwelle bezeichnet. Für eine vollständige theoretische Beschreibung im Zusammenhang mit diversen Anwendungen sei auf Arbeiten von Axelrod verwiesen.^[163–165] Das Abklingverhalten der Amplitude des elektrischen Feldes \mathbf{E} in Abhängigkeit der Eindringtiefe ist exponentiell. Die Intensität des evaneszenten Feldes $I(\mathbf{y}) = \mathbf{E}^*(\mathbf{y}) \cdot \mathbf{E}(\mathbf{y})$ wird entsprechend beschrieben durch:

$$I(y) = I(0)e^{-\frac{z}{d}} \quad (4.3)$$

Der Längenparameter d wird als Eindringtiefe des evaneszenten Feldes bezeichnet. Er lässt sich berechnen durch:

$$d = \frac{\lambda_0}{4\pi} (n_t^2 \sin^2 \theta_e - n_e^2) - \frac{1}{2} \quad (4.4)$$

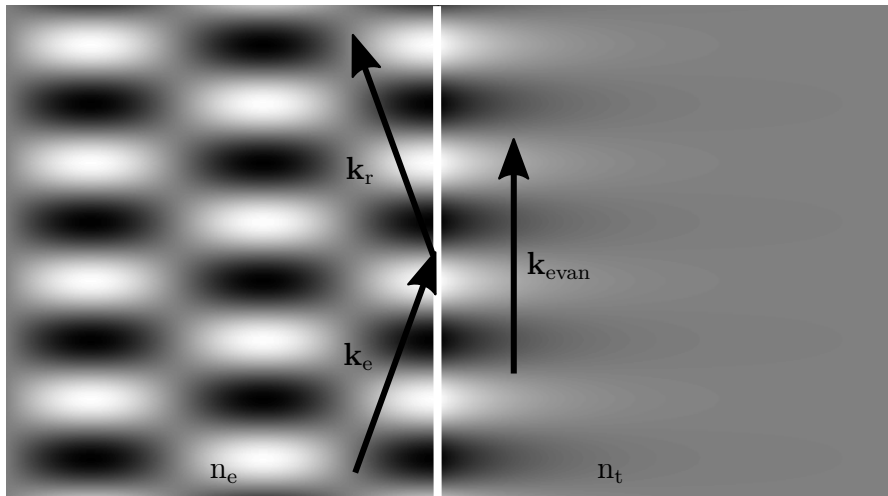


Abbildung 4.2.: Durchgang von Licht durch eine Grenzfläche, die einen Bereich mit Brechungsindex n_e (aus dem das Licht einfällt) von einem Bereich mit Brechungsindex n_t trennt. Dabei treten die Winkel θ_i zwischen den Wellenvektoren \mathbf{k}_i der Strahlen und der Normalen auf die Grenzfläche auf. Simulationsrechnung erstellt mit Scilab (Scilab Enterprises, Frankreich).

Die Intensität $I(0)$ an der Grenzfläche hängt in einer komplexen Funktion von der Intensität des eingestrahnten Strahls, dessen Polarisation und dem Einfallswinkel θ_e ab. Die Eindringtiefe liegt typischerweise im Bereich bis 100 nm und nimmt mit zunehmendem Einfallswinkel θ_e ab.

Die Vorteile der Verwendung eines evaneszenten Feldes zur Anregung in der Fluoreszenzmikroskopie sind offensichtlich. Es wird eine sehr hohe räumliche Auflösung entlang der optischen Achse erreicht, da lediglich Fluorophore nahe der Grenzfläche Deckglas/Probe angeregt werden. Dies wird speziell in der Zellbiologie zur Untersuchung von Prozessen in oder an der Zellmembran genutzt.^[166] Die Aufnahmen bieten einen sehr hohen Kontrast, da der Hintergrund aus dem Zellplasma stark vermindert ist. Die TIRF Mikroskopie ist daher auch für Einzelmolekülexperimente in der Zellbiologie ideal, da bei normaler Anregung die Autofluoreszenz oftmals gegenüber der Fluoreszenz der zu beobachtenden Moleküle überwiegt.^[167] Eine weitere Verbesserung der räumlichen Auflösung ist durch Verwendung nichtlinearer Anregungsprozesse zu erreichen. Oheim und Schapper beschreiben in einem Übersichtsartikel die theoretischen Grundlagen auf Basis der 2-PE Fluoreszenz und erste Ansätze dieser Technik.^[168] Während sich diese Form der 2-PE Fluoreszenzmikroskopie bis heute nicht weiter durchsetzen konnte, bestand für ein potentielles TIR CARS Experiment eine starke Motivation. Wie der Erfolg der TIRF Mikroskopie speziell im Bereich der Zellbiologie zeigt, bietet diese trotz der eingeschränk-

ten Möglichkeiten bei der Anregungsgeometrie (s. 4.1.1) ein nützliches Werkzeug für eine Vielzahl von Fragestellungen. In Kapitel 1 wurde bereits die Motivation für die CARS Mikroskopie, speziell im Vergleich zu anderen Kontrastverfahren, dargestellt. Der nicht-resonante CARS Hintergrund aus dem Probenvolumen wird durch die räumliche Begrenzung eines evaneszenten Anregungsfeldes stark reduziert. Das resonante CARS Signal kleiner Strukturen innerhalb des Anregungsfeldes hingegen bleibt relativ zum Hintergrundsignal aus diesem eingeschränkten Bereich konstant. Die Erhöhung der räumlichen Auflösung in z-Richtung, sollte somit auch in der CARS Mikroskopie zu einer Kontrasterhöhung und somit einer höheren Empfindlichkeit führen. Zudem erfolgt die Anregung selektiv in einem definierten Bereich. Die Realisierbarkeit eines nichtlinear optischen Experiments mittels TIR war durch die 2-PE Fluoreszenz bereits gezeigt worden.

4.1.1. Der Aufbau zur Totalreflexionsmikroskopie

Zunächst werde ich nun auf die Vorversuche zur TIR CARS Mikroskopie eingehen. Hierfür wurde das Leica Mikroskop verwendet. Es gibt zwei unterschiedliche experimentelle Ansätze zum Aufbau eines TIR Experiments, die in Abb. 4.3 dargestellt sind. Zum einen kann die Totalreflexion in einem Prisma erfolgen. Nachteil ist hierbei, dass die Abbildung durch die Probe hindurch erfolgt, da sich das Mikroskopobjektiv auf der dem Prisma entgegengesetzten Seite befindet. Bei der sogenannten Objektiv-basierten TIR erfolgen Beleuchtung und Detektion von der gleichen Seite durch das Mikroskopobjektiv. Wir haben diesen letzteren Ansatz verwendet. Das Mikroskopstativ besitzt einen rückseitigen Eingang zum Anschluss einer Quecksilberdampfampe mittels eines Flüssigkeitslichtleiters. Mittels Köhlerscher Beleuchtung ist somit Weitfeldfluoreszenzmikroskopie möglich. Die entsprechenden Optiken wurden entfernt und stattdessen der Strahlengang für die Totalreflexion im Deckglas der Probe integriert (s. Abb. 4.4). Bei der Objektiv-basierten TIR werden Objektive hoher N.A. verwendet. Eine Überschlagsrechnung zeigt den Grund hierfür. Eine typische zellbiologische Probe besteht aus dem Medium Deckglas und einem wässrigen Zellmedium, d.h. typischen Brechungsindizes von $n_1 \sim 1,50$ und $n_2 \sim 1,35$. Hierfür ergibt sich ein kritischer Winkel Θ_k von $64,2^\circ$. Um bei der Beleuchtung diesen Winkel zu überschreiten muss das Objektiv zunächst eine N.A. $> 1,35$ besitzen. Der Winkel, unter dem der Lichtstrahl das Objektiv verlässt, hängt lediglich von der Position des Lichtstrahls relativ zur optischen Achse in der rückseitigen Fokusebene (engl. back focal plane, kurz BFP) des Objektivs ab.^[169] Strahlen, die im gleichen Abstand zur optischen Achse diese Ebene durchlaufen werden das Objektiv parallel verlassen. Der Winkel der Strahlen in dieser Ebene beeinflusst lediglich die Position, an der sie das Objektiv verlassen. Es gibt mehrere Möglichkeiten die TIR zu gewährleisten. Zum einen kann ein Laserstrahl auf den äußeren Bereich der rückseiti-

gen Objektiv Apertur fokussiert werden. Dies führt allerdings zu einseitiger Beleuchtung bzw. Abschattungseffekten der Probe.^[169,170] Durch ringförmige Beleuchtung des äußeren Bereichs der BFP werden solche Artefakte vermieden. Klassische TIRF Mikroskope nutzen hierfür häufig eine opake Scheibe im Anregungsstrahlengang um einen Schatten in der Mitte der BFP zu erzeugen. Hierdurch wird allerdings ein Großteil der Anregungsleistung verloren. Wir verwendeten hingegen ein Glasaxikon in Kombination mit einer

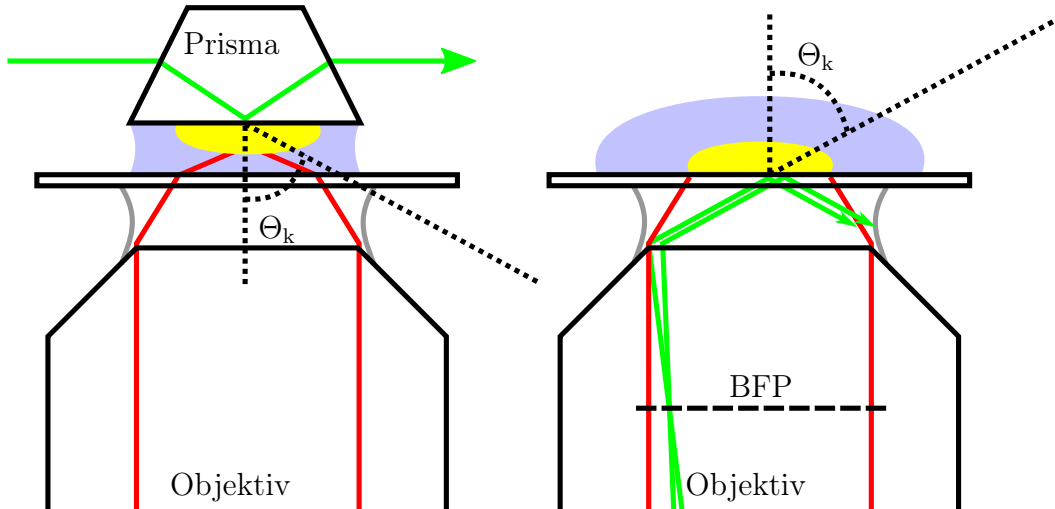


Abbildung 4.3.: Schematische Darstellung der zwei möglichen Ansätze zur TIRF Mikroskopie. Links: Unter Verwendung eines Prismas. Rechts: Objektivbasierte TIR Anregung. In grün ist der Strahlengang des Anregungslasers, in rot das generierte Signal dargestellt. Der gelbe Bereich entspricht dem Anregungsvolumen. BFP: rückseitige Fokusebene des Objektivs, Θ_k : kritischer Winkel.

Linse. Dies ermöglicht die Erzeugung eines ringförmigen Strahlprofils aus einem gaußschen Strahlprofil (s. Abb. 4.4).^[171] Die Problematik möglicher Interferenzstreifen spielte für diese Vorversuche keine Rolle. Entscheidend war die so erreichbare hohe Transmission und somit hohe Anregungsleistung. Der Radius R_0 des Ringfokus wird beeinflusst durch die Brennweite der Linse f , sowie den Öffnungswinkel α und den Brechungsindex des Axikons:^[171]

$$R_0 = (n - 1)\alpha f \quad (4.5)$$

Der Strahldurchmesser des Lasers vor dem Axikon $2a$ beeinflusst wiederum die Weite des Ringfokus Δ und konnte durch das Teleskop T1 beeinflusst werden. Als Lichtquellen standen neben dem Ti:Sa-Laser und dem OPO auch etwa 500 mW bei 532nm aus dem HighQ Laser zur Verfügung. Ein dichroitischer Spiegel diente zum Einkoppeln in

den Strahlengang des Leica Mikroskops. Die Detektion erfolgte in Epi-Richtung. Die Bildebene am Seitenausgang des Leica Mikroskops wurde mittels Fotoobjektiv (Nikor, 50mm, f/1.8, Nikon GmbH, Düsseldorf) auf eine CCD-Kamera (Andor iXonEM+, Andor Technology PLC, Großbritannien) abgebildet. Ein Kurzpass- und ein Bandpassfilter (ET680SP-2P8 und ET605/70-2P, Chroma Technology Corp., USA) blockten die Anregungswellenlängen.

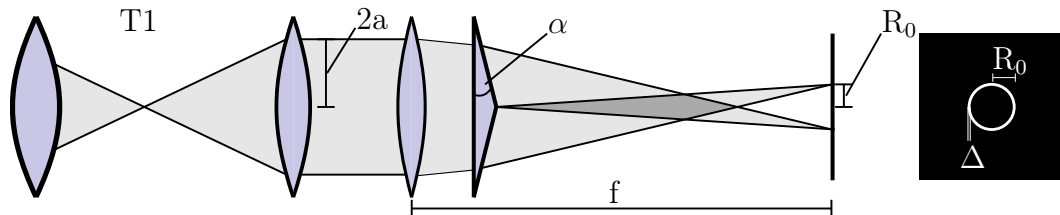


Abbildung 4.4.: Experimenteller Aufbau zur Implementierung eines TIR Anregungsstrahlengangs am Leica TCS SP5. Mittels Axikon wurde ein Ringfokus in der rückseitigen Fokusebene des Objektivs erzeugt (vgl. Abb. 4.3).

4.1.2. Von TIR Experimenten zur Weitfeld CARS Mikroskopie

Die Funktionalität des Aufbaus zur Generierung der TIR konnte mittels der Abbildung fluoreszierender Partikel überprüft werden. Sowohl TIRF mittels Ein-Photonen-Absorption des Lichtes bei 532 nm als auch mittels Zwei-Photonen-Absorption bei 720 nm waren möglich. Sorgfältige Justage der Abstände der einzelnen Optiken war unabdingbar, um eine möglichst homogene Ausleuchtung und die Totalreflexion des Anregungslichtes sicher zu stellen. Größe und Tiefe des Anregungsfeldes konnten mittels der Optiken variiert werden. Ein fließender Übergang zur Weitfeldbeleuchtung war ebenso möglich. Ein TIR CARS Experiment konnte allerdings nicht realisiert werden. Für die CARS Experimente diente der Ti:Sa-Oszillator als Pump-, der OPO als Stokes-Quelle. Als Proben wurden sowohl Polymerkugeln (Polystyrol, PS, 6 μm , 1 μm und 200 nm) als auch dünne Polymerfilme (Polybutylmethacrylat, PBMA) mit eingeritzten Strukturen verwendet. Es gelang mehrfach durch Variation des Anregungsstrahlengangs ein Weitfeld CARS Experiment zu realisieren, ein TIR CARS Bild der Probe konnte nicht erzeugt werden. Unter TIR Bedingungen wurde lediglich ein starkes, nicht-resonantes CARS Signal erzeugt, dessen Intensitätsverteilung der Verteilung der Anregungsintensität nicht aber den Strukturen der Probe entsprach. So konnte beispielsweise auch ein Ringfokus an der Grenzfläche Deckglas zu Probe erzeugt werden, wobei das Anregungslicht komplett reflektiert wurde. Dies ergab ein ringförmiges CARS Bild entsprechend der Verteilung

der Anregungsintensität. Die Polymerkugeln der Probe waren allerdings nicht zu erkennen, das CARS Signal war nicht-resonant (s. Abb. 4.5).

Ein TIR CARS Experiment ist mit Standardproben nicht durchzuführen. Das An-

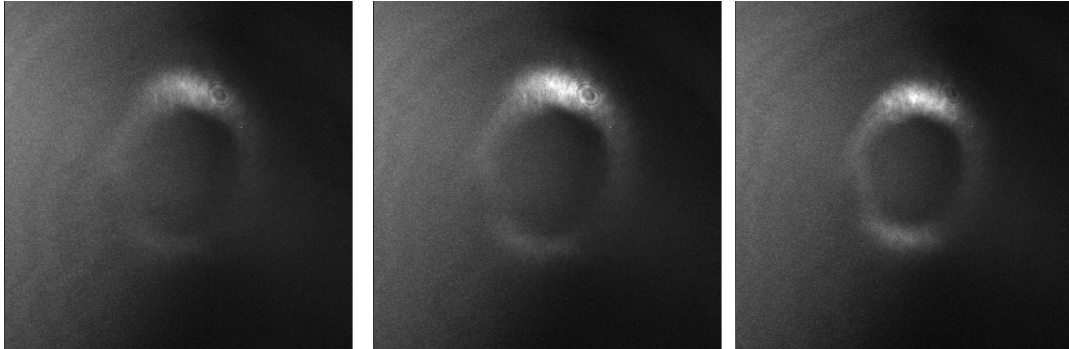


Abbildung 4.5.: Vergleich von TIR CARS Aufnahmen von PS-Kugeln (200 nm) in Luft mit der Aufnahme eines leeren Deckglases. Es wurde das $100\times$ Öl-Immersionsobjektiv verwendet. Die PS-Kugeln sind nicht zu erkennen. Es wird immer nur ein nichtresonantes CARS-Signal im Deckglas erzeugt. Links: Anregung bei der Resonanz der Kugeln, 3050 cm^{-1} , Aufnahmedauer 2 s, Verstärkung 20. Mitte: nichtresonante Anregung der Kugeln, 3100 cm^{-1} , Aufnahmedauer 2 s, Verstärkung 20. Rechts: leeres Deckglas, 3100 cm^{-1} , Aufnahmedauer 2 s, Verstärkung 20.

regungsfeld ist bei einem TIR Experiment naturgemäß im Deckglas bzw. Prisma am höchsten. Die Intensität des evaneszenten Feldes ist deutlich geringer, das hiermit angeregte Volumen ebenfalls. Für Kontrastmechanismen wie die Fluoreszenz führt dies zu einem deutlich geringeren Hintergrund aus der Probe, im Deckglas bzw. Prisma wird kein Hintergrund erzeugt. Beim CARS Prozess hingegen wird in jedem Medium, somit auch in Glas, ein nicht-resonanter Beitrag zum Signal generiert (vgl. Kapitel 2). Die erhoffte Steigerung des Verhältnisses von resonantem zu nicht-resonantem CARS Signal durch Verringerung des Anregungsvolumens in der Probe wurde leider mehr als kompensiert durch das verstärkte, nicht-resonante CARS Signal vom Deckglas. Das Signal aus dem Deckglas wird in einer Schicht von mehreren Mikrometern generiert, das Signal aus der Probe lediglich über die angrenzenden Dutzende von Nanometern. Das starke, nicht-resonante Signal aus dem Deckglas wurde zudem teilweise durch den Brechungsindexunterschied an der Grenzfläche zur Probe in Epi-Richtung reflektiert. Es lässt sich weder unterdrücken noch räumlich filtern, wie etwa bei der konfokalen Mikroskopie durch Verwendung einer Lochblende. Das TIR CARS Experiment war somit gescheitert. Aus den Vorversuchen zur TIR CARS Mikroskopie ergaben sich aber neue Erkenntnisse zur

Weitfeld CARS Mikroskopie. Es schien relativ einfach zu sein, einen CARS Prozess in einem großflächigen Bereich zu erhalten. Zudem konnte dies auch bei unterschiedlichsten Anregungsgeometrien erfolgen. Durch Entfernen des Axikons und Verringern des Abstandes von der Linse nach dem Teleskop zur BFP des Objektivs konnten die Anregungsfläche vergrößert und die Effizienz erhöht werden. Eine solche Weitfeldaufnahme ist in Abb. 4.6 gezeigt. Bei gleicher Anregungsleistung konnten PS-Kugeln sowohl an Luft, als auch in Wasser eingebettet abgebildet werden. Dass es sich um ein CARS Signal handelt, konnte sowohl durch Variation der zeitlichen Überlappung mittels SynchroLock als auch durch Überprüfung der Resonanzverstärkung durch die aromatische CH-Streckschwingung bei 3050 cm^{-1} bewiesen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse ergab

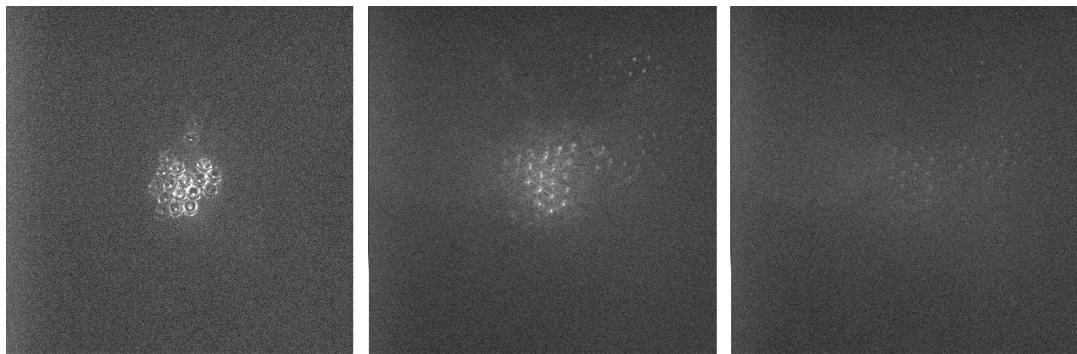


Abbildung 4.6.: Erste Weitfeld CARS Aufnahmen von PS-Kugeln ($6\text{ }\mu\text{m}$) mit dem $100\times$ Öl-Immersionsobjektiv, Kamera ohne Verstärkung, Pixelgröße 280 nm , 66 mW Pumpleistung, 30 mW Stokes-Leistung. Links: Kugeln in Luft, 3050 cm^{-1} , Aufnahmedauer 1 s . Mitte: Kugeln in Wasser, 3050 cm^{-1} , Aufnahmedauer 5 s . Rechts: Kugeln in Wasser, gleiche Position wie mittlere Abbildung, 3100 cm^{-1} , Aufnahmedauer 5 s .

sich eine Reihe von Fragen zur Phasen Anpassung und der experimentellen Umsetzung in der Weitfeld CARS Mikroskopie. Auf diese und unsere systematischen Untersuchungen hierzu werde ich in Abschnitt 4.2.3 eingehen. Zuvor werde ich allerdings kurz den Stand der Forschung auf diesem Feld darstellen.

4.2. Weitfeld CARS Mikroskopie

4.2.1. Weitfeld CARS Mikroskopie - Stand der Forschung 2009

Zum Zeitpunkt unserer TIR CARS Experimente gab es bereits zwei Ansätze zur Realisierung der Weitfeld CARS Mikroskopie. Das erste Weitfeld CARS Mikroskop wurde 2004

von Heinrich *et al.* als komplementärer Ansatz zur abrasternden CARS Mikroskopie vorgestellt.^[172,173] Dieses Mikroskop bestand aus einer Kombination eines Dunkelfeld- und eines Epifluoreszenz-Mikroskops. Der Pumpstrahl wird mittels eines Dunkelfeldkondensors mit hoher N.A. auf die Probe gesandt. Die zugehörigen Wellenvektoren weisen in der Probe einen entsprechend flachen Winkel auf. Der Stokes-Strahl wird durch das gegenüberliegende Objektiv eingekoppelt. Die Anregungsgeometrie ist somit im Gegensatz zur abrasternden CARS Mikroskopie nicht kollinear. Allerdings wird die Phasenanpassungsbedingung im Beleuchtungsfeld des Dunkelfeldkondensors erfüllt und das CARS Signal in entgegengesetzter Richtung zum Stokes-Strahl erzeugt. Auf diese Weise kann eine große Fläche simultan abgebildet werden. Selbst Aufnahmen mittels einzelner ns-Anregungspulse konnten gezeigt werden, was die Möglichkeit der Beobachtung schneller, dynamischer Prozesse mittels der CARS Mikroskopie eröffnete.^[174] In der Gruppe von Palanker wurden diverse Beleuchtungsgeometrien zur Weitfeld CARS Mikroskopie ohne Berücksichtigung der Phasenanpassung verwendet.^[175,176] Die Phasenanpassung wurde mittels Streuung aufgrund von Variationen des Brechungsindex innerhalb der Probe begründet. Durch die Streuung werden eine Vielzahl von Wellenvektoren von Pump- und Stokes-Strahl erzeugt, so dass es in der Nähe von Streuzentren teilweise zur Erfüllung der Phasenanpassungsbedingung und somit zur CARS kommt. Ein Nachweis für diesen Mechanismus wurde nicht erbracht.

Beide bisherigen Ansätze zur Weitfeld CARS Mikroskopie waren technisch anspruchsvoll. So wurden Nd:YAG Laser mit Güteschaltung^[172-174,177] oder regenerative Verstärker^[175,176] mit niedrigen Repetitionsraten und entsprechend hohen Pulsenergien verwendet. Der Einsatz spezieller Optiken wie einem Dunkelfeldkondensor,^[172-174,177] einem Cassegrain-Objektiv,^[176] einer variablen Maske zur Kontrolle der Einstrahlwinkel des Stokes-Strahls und einem dichroitischen Spiegel auf der Probe^[175] erschwerten die Experimente zusätzlich. Verglichen mit diesen Experimenten erhielten wir neben unseren TIR Versuchen bereits mit geringem Aufwand auch Weitfeld CARS Bilder. Um dies systematisch zu betrachten, bauten wir ein einfaches CARS Mikroskop für Weitfeld Experimente auf und konnten hiermit selbst Aufnahmegeschwindigkeiten von 33 Bildern pro Sekunde erreichen.^[162] Auf diese Experimente werde ich in den nächsten Abschnitten eingehen.

4.2.2. Das Weitfeld CARS Mikroskop

Der Aufbau des Weitfeld CARS Mikroskops ist in Abb. 4.7 skizziert. Es wurde ein Eigenbau anstelle des Leica Mikroskops aus den Vorversuchen verwendet. Das Experiment konnte so flexibler gestaltet werden und Detektion in Vorwärtsrichtung war möglich. Der Ti:Sa-Oszillator lieferte den Pumpstrahl, der OPO den Stokes-Strahl (s.a. Kapitel 3). Die Anregung erfolgte kollinear durch Objektiv 1. Hierfür wurden ein 10× Luftobjektiv

mit niedriger N.A. (HC PL Apo, N.A. 0.4, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) oder ein Kondensator hoher N.A. (Pol 0.9 S1, N.A. 0.9, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) verwendet. Die Strahlen wurden ober- oder unterhalb der Probenebene fokussiert, so dass in der Probenebene eine Fläche mit einem Durchmesser von ca. 150 μm beleuchtet wurde. Lediglich der mittlere Bereich der beleuchteten Fläche wurde abgebildet, um den zentralen, flachen Bereich der gaußförmigen Intensitätsverteilung zu nutzen und dadurch die Variation der Anregungsleistung unter 20% zu halten. Das CARS Signal wurde mit einem 40 \times Luftobjektiv (HCX PL Apo, N.A. 0.85, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) eingesammelt. Zur Abbildung wurden wiederum das Nikkor Fotoobjektiv und die EM-CCD-Kamera verwendet. Das Anregungslicht wurde von einem Kurzpass und zwei Bandpassfiltern (ET680SP-2P8, ET605/70-2P, Chroma Technology Corp., USA, HC593/40, Semrock Inc., USA) vor dem Fotoobjektiv geblockt.

4.2.3. Untersuchungen zur nicht-phasenangepassten Weitfeld CARS Mikroskopie

Mit dem Eigenbau CARS Mikroskop wurden zunächst Polymerkugeln (Polystyrol, PS, 6 μm und Polymethylmethacrylat, PMMA, 1-10 μm) betrachtet. In Abb. 4.8 ist eine Mischung der PS- und PMMA-Kugeln abgebildet. Dass es sich hierbei um ein mittels CARS erzeugtes Bild handelt, konnte sowohl über die Variation der zeitlichen Überlappung der Anregungspulszüge als auch über die Schwingungsresonanz gezeigt werden. Wurden die Pump- und Stokes-Pulse zeitlich verzögert, verschwand das Signal. Wie in Abb. 4.8 zu erkennen ist, war das CARS Signal resonanten Ursprungs. Die PMMA- und PS-Partikel konnten anhand ihrer charakteristischen Raman-Banden unterschieden werden.

Im Gegensatz zur abstrahierenden CARS Mikroskopie gilt das Argument der Relaxation der Phasenbedingung im Fokus bei unserer Anregungsgeometrie nicht (vgl. Kapitel 2). Die Wechselwirkungslänge der Anregungsstrahlen ist nicht mehr in dem Maße eingeschränkt, wie bei starker Fokussierung. Zum Nachweis, dass die Fokussierung keine Rolle für die Anregungseffizienz bei unserem Weitfeldansatz spielte, wurden Objektive unterschiedlicher N.A. zur Anregung verwendet. Sowohl mit dem 10 \times Luftobjektiv mit einer N.A. von 0.4 als auch mit dem Kondensator einer N.A. von 0.9 wurden vergleichbare Signalintensitäten erhalten. Dies deutet auf einen Anregungsmechanismus hin, der auch im Gegensatz zu den Ansätzen in der Arbeitsgruppe Ritsch-Marte nicht auf direkter Phasenanpassung beruht. Auch war es möglich, ober- oder unterhalb der Probe zu fokussieren. Die Signalintensität bei gleicher Beleuchtungsfläche blieb vergleichbar. Bei Annäherung des Fokus an die Probenebene wurde allerdings ein sehr starkes Hintergrundsignal aus dem Probenmedium bzw. dem Deckglas erhalten. Dieses nichtresonante CARS Signal war deutlich stärker als das erwünschte Signal aus der Probe, da im Fokus

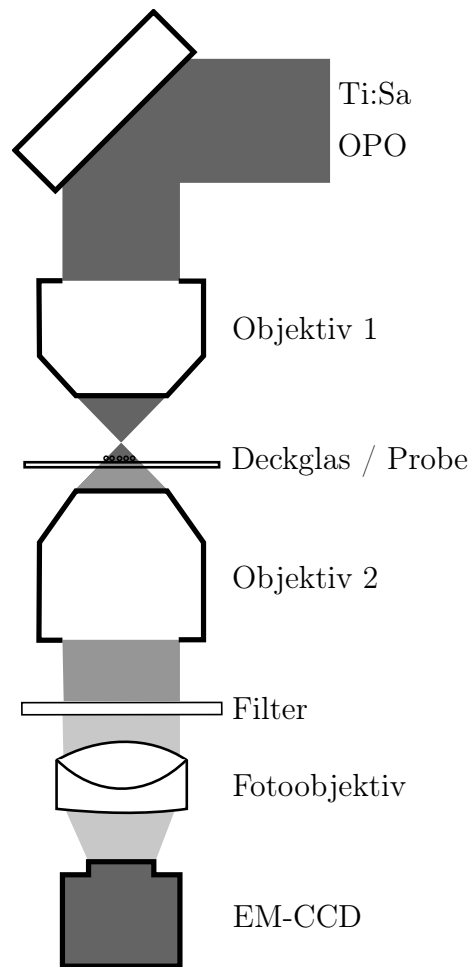


Abbildung 4.7.: Skizze des verwendeten Weitfeld CARS Mikroskops. Das Anregungslicht wurde ober- oder unterhalb der Probenebene fokussiert, so dass ein Bereich von etwa $150\ \mu\text{m}$ Durchmesser beleuchtet wurde.

zum einen die Anregungsleistung pro Fläche deutlich höher war und zum anderen die Phasenanpassung erzielt wurde. Mit dem Kondensator erwies sich ein Abstand von ca. $200\ \mu\text{m}$ von Probenebene zu Fokus als optimaler Kompromiss zwischen Beleuchtungsfläche, Anregungseffizienz und räumlicher Abtrennung des Hintergrunds aus dem Fokus. Die bisherigen Ergebnisse stützen die Hypothese der Arbeitsgruppe Palanker, dass es möglich ist durch Brechung und Streuung der Anregungsstrahlen in der Probe lokal eine Phasenanpassung zu erhalten.^[175,176] Um diesen Erklärungsansatz weiter zu stützen, wurden die Polymerkugeln in Medien unterschiedlicher Brechungsindizes gebettet. PS besitzt einen Brechungsindex von 1,55. Als Medium dienten neben Luft ($n_{\text{Luft}} = 1,00$) Wasser ($n_{\text{H}_2\text{O}} = 1,33$) und Immersionsöl ($n_{\text{Öl}} = 1,52$). Das Verhältnis von CARS Si-

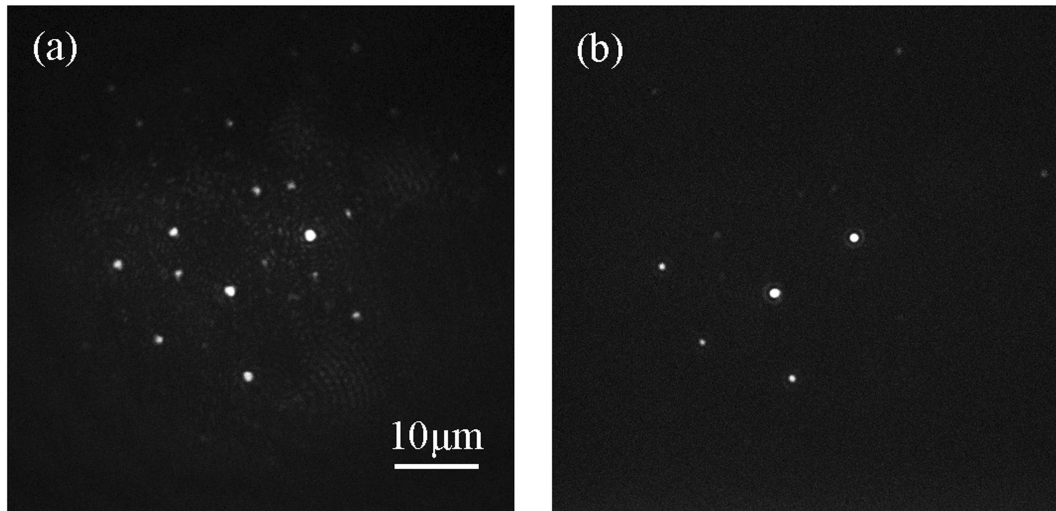


Abbildung 4.8.: Weitfeld CARS Bilder einer Mischung aus PS- und PMMA-Kugeln. Links: Abbildung bei 2940 cm^{-1} , der aliphatischen CH_3 -Streckschwingung. Rechts: Abbildung bei 3050 cm^{-1} , der aromatischen CH -Streckschwingung. Die PMMA-Kugeln sind nur bei Anregung der aliphatischen Streckschwingung zu sehen. Es handelt sich somit um resonante CARS Bilder. Entnommen aus^[162]

gnal zu Hintergrund stieg mit zunehmender Differenz der Brechungsindizes von 3:1 über 6:1 auf 10:1. Somit konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Brechung der Anregungsstrahlen in der Probe das CARS Signal ansteigt und folglich diese für die Phasen Anpassung innerhalb der Probe verantwortlich ist. Bei Proben mit Objekten der Größenordnung der Anregungswellenlänge und kleiner werden auch Streuprozesse zur Phasen Anpassung beitragen.

Vergleicht man die Anregungsleistungen der unterschiedlichen Anregungsgeometrien, besitzen die Weitfeldexperimente gegenüber dem Abrastern mittels fokussierten Laserstrahlen erstaunlicherweise einen klaren Vorteil. Zur Abbildung mittels des Leica TCS SP5 in Videogeschwindigkeit werden typischerweise bei Repetitionsraten im MHz-Bereich Pulsenergien von wenigen nJ im Fokus verwendet (s. 3.7). Dies entspricht selbst bei konservativer Annahme eines Strahldurchmessers von $1\text{ }\mu\text{m}$ im Fokus einer Energiedichte von über $30\text{ mJ}/\text{cm}^2$. Unser Weitfeldexperiment verwendet wenige $\mu\text{J}/\text{cm}^2$, also eine Reduzierung um mehr als 1000-fache. Bei den Weitfeldexperimenten in der Arbeitsgruppe Palanker werden kHz-Lasersysteme und entsprechend höhere Pulsenergien verwendet. Die Durchschnittsleistung ist allerdings in der gleichen Größenordnung wie für unser MHz System. Analoges gilt für die Experimente in der Arbeitsgruppe Ritsch-

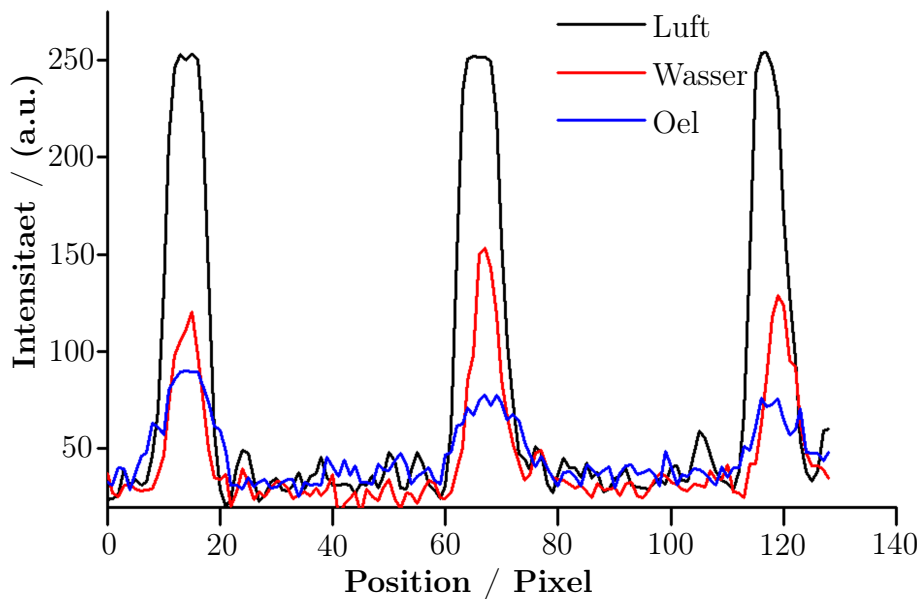


Abbildung 4.9.: Intensitätsprofile von PS-Kugeln bei 3050 cm^{-1} in den Medien Luft, Wasser und Immersionsöl. Die Aufnahmedauer betrug $0,1\text{ s}$. Der Kontrast verringert sich mit der Abnahme des Brechungsindexunterschieds zwischen PS und Medium. Entnommen aus^[162]

Marte, welche mit einem 10 Hz -System und ns -Pulsen erfolgen. Der Einsatz dieser hohen Pulsenergien durch letztere ist überraschend, da aufgrund der Berücksichtigung der Phasen Anpassung eine höhere Anregungseffizienz zu erwarten wäre.

Die Weitfeld CARS Mikroskopie besitzt gegenüber dem rasternden Verfahren auch einen Vorteil bezüglich der Aufnahmegeschwindigkeiten. Auch mit unserer einfachen Umsetzung eines Weitfeld CARS Mikroskops waren wir in der Lage, Videoaufnahmen mit einer Bildrate von $33\text{ Bildern pro Sekunde}$ zu erstellen (s. Abb. 4.10). Die Probe bestand wiederum aus PS-Kugel in Wasser und wurde von Hand verschoben. Ein Nachteil dieses Weitfeld CARS Mikroskops ist der Verlust der intrinsischen, räumlichen Auflösung des NLO Kontrastmechanismus. Die Anregungsleistung reicht über eine größere Strecke entlang der optischen Achse aus, um bei effizienter Brechung oder Streuung ein CARS-Signal zu erzeugen. Die räumliche Auflösung wird somit allein durch das einsammelnde Objektiv bestimmt und liegt damit bei über $10\text{ }\mu\text{m}$. Im Vergleich hierzu erhält man bei rasternden Verfahren bis zu $1,5\text{ }\mu\text{m}$ Auflösung in z -Richtung und auch der Weitfeldansatz unter Verwendung eines Dunkelfeldkondensors erreicht ca. $5\text{ }\mu\text{m}$.^[173]

Wie in Abbildung 4.9 zu erkennen ist, erzeugt unser Anregungsansatz kaum nichtresonanten CARS Hintergrund. Bei CARS Experimenten unter Berücksichtigung der Phasen Anpassung wird auch im Medium (zumindest in kondensierter Phase) ein CARS Si-

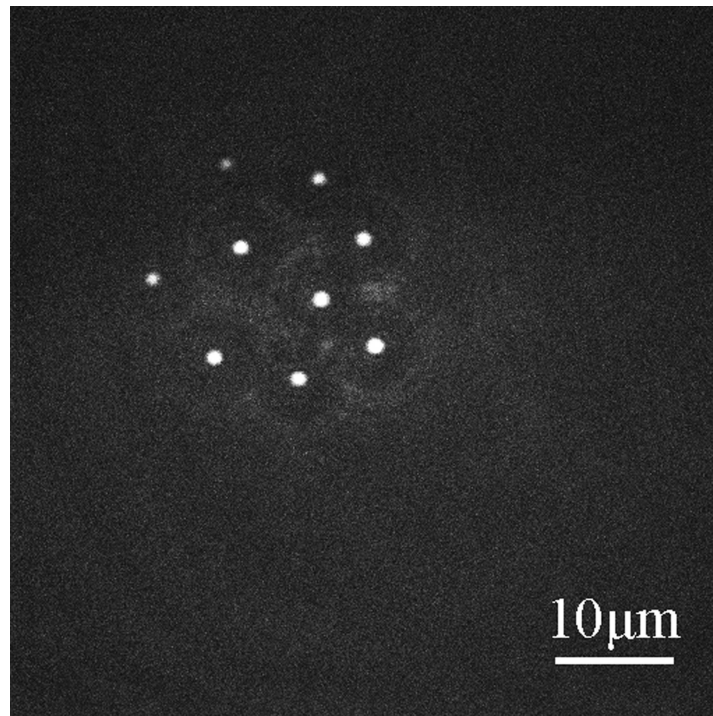


Abbildung 4.10.: Standbild einer Weitfeld CARS Videoaufnahme von PS-Kugeln bei 3050 cm^{-1} in Wasser. Die Aufnahmedauer pro Bild betrug lediglich 0,03 s. Entnommen aus^[162]

gnal generiert. Beruht die Phasenanpassung wie in unserem Fall auf der Brechung und Streuung an Grenzflächen in der heterogenen Probe, wird nur in unmittelbarer Umgebung dieser Grenzflächen ein CARS Signal generiert. Entsprechen diese Strukturen der zu untersuchenden Probe, erhält man ein nahezu hintergrundfreies CARS Bild. Dieser Vorteil wird zum Nachteil, wenn die Probe oder auch nur Bereiche von Interesse homogen sind. In diesem Falle können wir kein Signal erwarten, da der Anregungsmechanismus nicht wirken kann. Brechung bzw. Streuung an den Strukturen von Interesse sind für unseren Weitfeldansatz zwingend erforderlich.

4.3. Zusammenfassung

Wir konnten somit einen im Vergleich zu bisherigen Weitfeld CARS Mikroskopen experimentell deutlich vereinfachten Aufbau demonstrieren. Mit unserem Ansatz sind CARS Aufnahmen mit Videogeschwindigkeit möglich. Dies kann unter Anregungsleistungen erzielt werden, die verglichen mit der abrasternden CARS Mikroskopie deutlich verrin-

gert sind. Es war uns möglich experimentell nachzuweisen, dass die Signalerzeugung durch eine lokale Phasen Anpassung mittels Brechung bzw. Streuung erfolgt. Auch wenn aufgrund dieses Anregungsmechanismus nicht jede Probe für unser Weitfeld CARS Mikroskop geeignet ist, sollten der stark verringerte nichtresonante CARS Hintergrund und das mit geringen Anregungsleistungen demonstrierte Videopotential im Besonderen für zellbiologische Experimente von Vorteil sein.

Teil II.

Neuer Ansatz zur Schwingungsmikrospektroskopie auf Einzelmolekülniveau

Kapitel 5.

Einleitung

Im ersten Teil dieser Arbeit habe ich die CARS Mikrospektroskopie und die Vielzahl ihrer Anwendungen in der Biologie aufgezeigt. In Kapitel 1 hatte ich auch allgemein die Vorteile schwingungsselektiver Kontrastmethoden dargestellt. Woran es allen bisherigen schwingungsbasierten Verfahren in der Mikrospektroskopie allerdings mangelt, ist Empfindlichkeit in Kombination mit hoher räumlicher Auflösung. Im zweiten Teil werde ich nun ein Experiment vorstellen, mit welchem die Sensitivität der Schwingungsspektroskopie auf Einzelmolekülniveau erhöht werden soll. Unser Ansatz bietet die Möglichkeit selektiv Schwingungsmoden eines einzelnen Moleküls zu charakterisieren. Erstmals könnte auf Einzelmolekülniveau die Dynamik von Schwingungen spektral und zeitaufgelöst bei Raumtemperatur und im Fernfeld verfolgt werden. Schwingungsübergänge mit einer Auflösung im Bereich von wenigen Wellenzahlen und die Lebensdauern der Schwingungszustände sind nicht nur aus Sicht der photophysikalischen Grundlagenforschung interessant. Sie bieten auch Informationen über die lokale Umgebung des Chromophors, deren Struktur und Dynamik. Die Wechselwirkung der Umgebung mit dem Chromophor findet sowohl in Form mechanischen Widerstands als auch durch schwache quantenmechanische Kopplung bis hin zu Energietransfer statt. Entsprechende Informationen sind nicht nur aus der Lage der Linien sondern auch aus deren Breite, Aufspaltung und relativen Intensität zu gewinnen.^[178] Die Schwingungsspektroskopie auf Einzelmolekülniveau würde nicht nur zu schmaleren und somit besser zu charakterisierenden Linien führen(s.u.), sie bietet auch eine hohe räumliche Auflösung. Im Folgenden werde ich zunächst einen Überblick über bisherige Ansätze zur hochempfindlichen Schwingungsspektroskopie aufzeigen und hierauf basierend die Idee zu einem neuen Verfahren entwickeln.

5.1. Stand der Forschung

Möchte man einen Überblick zur hochempfindlichen Schwingungsspektroskopie geben, bietet es sich an mit der oberflächenverstärkten Raman Streuung (Surface-enhanced Raman

Scattering, SERS) zu beginnen. Ein Vergleich der Übersichtsartikel von Kneipp *et al.* und Le Ru und Etchegoin aus dem Jahre 1999 bzw. 2012 zeigt die schwierige Entwicklung der SERS Spektroskopie.^[179,180] Der SERS-Effekt, eine Verstärkung der Raman Streuung auf metallischen Nanostrukturen um einen Faktor von bis zu $> 10^{10}$, wurde bereits in den 70ern entdeckt. Es folgte allerdings eine anhaltende Debatte über die Interpretation der beobachteten Effekte und die zugrunde liegenden Verstärkungsmechanismen. Einzelmolekülexperimente auf Basis der SERS wurden schließlich erstmals 1997 berichtet.^[181,182] Auch hierauf folgten wiederum kontroverse Diskussionen und es gab zahlreiche Fehlinterpretationen der Ergebnisse. Inzwischen hat sich die SERS Spektroskopie jedoch als Einzelmolekültechnik etabliert.^[180] Die SERS Spektroskopie auf Einzelmolekül-Niveau (SM-SERS) kommt bisher hauptsächlich in zwei Bereichen zur Anwendung. Dies sind zum einen Studien zum spektroskopischen Verständnis von Oberflächeneffekten und zum anderen Studien mit Fokus auf die Schwingungscharakteristika der einzelnen Moleküle selbst. Wie in^[180] dargestellt, stellt die SM-SERS allerdings weiterhin große Anforderungen an Probenpräparation und Interpretation der Ergebnisse. Zudem muss beachtet werden, dass lediglich Studien auf metallischen Nanostrukturen möglich sind. Diese können die zu untersuchenden Systeme stark beeinflussen. Es können beispielsweise “elektronische” Effekte wie dipolare Wechselwirkungen oder auch Oberflächeneffekte durch Adsorption auftreten. Eine Technik zur schwingungsspektroskopischen Charakterisierung einzelner Moleküle in ihrer natürlichen Umgebung wäre daher wünschenswert. Die dominierende Technik zur Detektion und Spektroskopie einzelner Molekülen ist die Fluoreszenzspektroskopie.^[2,183] Welchen Nutzen hat die Fluoreszenz allerdings bei der schwingungsspektroskopischen Charakterisierung eines Moleküls? Fluoreszenzspektren weisen oftmals Schwingungsbanden auf, diese sind aber sehr breit und selten klar aufgelöst. Dies liegt in den relativ langen Fluoreszenzlebensdauern begründet. Zum einen bewirken schnelle Prozesse wie inelastische Stöße eine homogene Linienverbreiterung. Elastische Stöße können zudem zu einer Linienverschiebung führen. Zum anderen befindet sich das Molekül ausreichend lange im angeregten Zustand, dass sich die direkte Umgebung verändern kann. Es kommt daher zur Wechselwirkung mit einer Vielzahl von Zuständen der jeweiligen Umgebung. Das Fluoreszenzspektrum stellt eine Überlagerung all dieser verbreiterten Linien dar, die schwingungsspektrale Information geht verloren. Um hochaufgelöste Fluoreszenzspektren und somit Schwingungsinformationen zu erhalten müssen die Verbreiterungsmechanismen unterdrückt werden. Klassisch gibt es hierfür zwei Ansätze: die Shpol’skii Spektroskopie und die Fluorescence Line-Narrowing Spectroscopy (FLNS).^[184] Bei beiden Techniken werden die Fluoreszenzspektren bei tiefen Temperaturen gemessen. Bei der Shpol’skii Spektroskopie nehmen die Fluorophore wohldefinierte Positionen in der Matrix ein. Alle Fluorophore besitzen somit die gleiche und dank der tiefen Temperatur konstante Umgebung. Die inhomogene Linienverbrei-

terung ist somit unterdrückt und die homogene Linienverbreiterung zumindest durch Minimierung der Stoßprozesse reduziert. Die FLNS ist flexibler in Bezug auf Substrat und Matrix und kann auch für amorphe bzw. glasartige Matrizen eingesetzt werden. Durch den amorphen Charakter der Matrix existieren zwar eine Vielzahl unterschiedlicher Umgebungen (und somit Einflüsse auf die ein einzelnen Fluorophore), allerdings sind diese bei den tiefen Temperaturen auf der Zeitskala der Fluoreszenzlebensdauer konstant. Die Reduzierung der inhomogenen Linienverbreiterung beruht auf einer selektiven Anregung einer Subpopulation der Fluorophore, der sogenannten Isochromate mit vergleichbaren spektralen Merkmalen, mit einer schmalen Laserlinie. Das Emissionsspektrum ist deutlich klarer definiert, daher der Begriff der Linienverschmälerung. Somit ist es möglich, Schwingungscharakteristika in hoher Auflösung zu erhalten. Die FLNS hat sich daher zu einem interessanten Analyseverfahren bei der Untersuchung von Wechselwirkungen der Substrate mit ihrer lokalen Umgebung entwickelt.^[185]

Der nächste Schritt, ausgehend von den Isochromaten bei der FLNS, ist die hochaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie an einzelnen Molekülen. Durch die Gruppe von Moerner wurden erste hochaufgelöste Emissionsspektren einzelner Moleküle bei tiefer Temperatur gemessen.^[186,187] In den Fluoreszenzspektren konnten einzelne Schwingungsbanden des elektronischen Grundzustands klar identifiziert werden. Die Möglichkeit vibronische Merkmale auf Einzelmolekülniveau zu detektieren ermöglicht sowohl ein tieferes Verständnis grundlegender photophysikalischer Prozesse im Fluorophor als auch der Wechselwirkung von Fluorophor und Matrix. Die Eignung der einzelnen Fluorophormoleküle als Sonden ihrer Umgebung wurde bereits betont.^[186] So konnte beispielsweise aufgrund unterschiedlicher Spektren auf die Kristallinität der direkten Umgebung einzelner Fluorophore geschlossen werden.

Ein weiterer fluoreszenzbasierter Ansatz, Schwingungsspektren einzelner Moleküle zu erhalten, wurde von Nonn und Plakhotnik demonstriert. Sie konnten schwingungsaufgelöste Fluoreszenzanregungsspektren einzelner Moleküle messen.^[188,189] Insbesondere Schwingungsbanden niedriger Frequenz waren erstmals zugänglich. Hierfür wurden mittels eines Pumplasers einzelne Moleküle gezielt bis zur Sättigung angeregt. Fluoreszenzanregungsspektren wurden mit und ohne zusätzlichen Pumplaser aufgezeichnet. Aus den Differenzspektren konnten einzelne Schwingungsfrequenzen und deren homogene Linienbreiten bestimmt werden. Im Gegensatz zu den Arbeiten in Moerners Arbeitsgruppe erhält man aus den Anregungsspektren Schwingungsbanden des ersten elektronisch angeregten Zustands. Weiter gilt zu beachten, dass all die bisher beschriebenen Fluoreszenztechniken auf tiefe Temperaturen angewiesen sind. Hier stellt sich analog zur Metalloberfläche bei der SERS Spektroskopie wieder die Frage nach der Beeinflussung des Systems bzw. wie natürlich das zu charakterisierende System bei der Messung noch vorliegt.

Nicht nur die Lage, Breite und Intensität der Banden liefern wichtige Informationen über das zu untersuchende System. Über die Bestimmung der Zeitkonstanten der Schwingungsübergänge lassen sich Phänomene wie die Relaxation oder inter- und intramolekularer Energietransfer untersuchen. Die Relaxationszeiten lassen sich zwar aus der natürlichen Linienbreite bestimmen, doch die Vielzahl an Parametern, die in die Linienbreite eingeht, erschwert eine direkte und zuverlässige Ermittlung der Zeitkonstanten. Ihre direkte Bestimmung durch zeitaufgelöste Techniken ist daher vorzuziehen. Ende der 60er Jahre wurde zunächst zeitaufgelöste Schwingungsspektroskopie an Gasen bei tiefen Temperaturen durchgeführt. Die Zeitkonstanten lagen hierbei noch im Bereich von Nanosekunden. Bei Raumtemperatur in kondensierter Phase verlaufen die Prozesse auf der Pikosekundenskala. Mit der raschen Entwicklung der technischen Möglichkeiten im Bereich der Laserspektroskopie wurde auch diese Zeitskala zugänglich. Laubereau und Kaiser haben in einem ersten umfassenden Übersichtsartikel sowohl die theoretischen Grundlagen als auch experimentellen Techniken zur zeitaufgelösten Schwingungsspektroskopie unter Verwendung von Pikosekunden Laserpulsen zusammengefasst.^[190] In der Regel wird ein Pump-Abfrage-Verfahren verwendet. In Abbildung 5.1 sind entsprechende Ansätze und die jeweils gewonnenen Informationen dargestellt. Nach selektiver Anre-

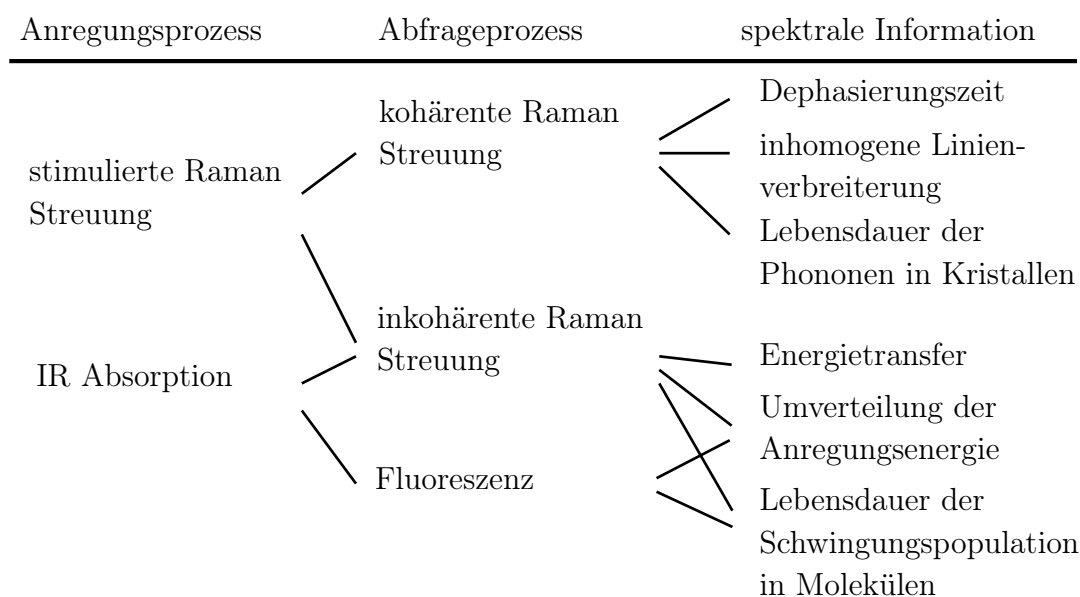


Abbildung 5.1.: Verfahren zur zeitaufgelösten Schwingungsspektroskopie nach dem Pump-Abfrage-Prinzip. Die Ansätze unterscheiden sich sowohl im Anregungs- als auch Abfragemechanismus. Aus den Zeitkonstanten kann eine Vielzahl an Informationen erhalten werden. Die Auflistung erfolgte analog des Übersichtsartikels von Laubereau und Kaiser.^[190]

gung einer Schwingungsmode folgt ein Abfragepuls, der über unterschiedliche Prozesse den Schwingungszustand des Systems wiedergeben kann. Die Zeitauflösung wird durch Verzögerung des Abfrageprozesses erreicht und hängt somit von den Pulslängen der Laserquellen ab. Anwendungsbeispiele sind in^[190–192] gegeben.

Einen nicht optischen Ansatz zur Schwingungsspektroskopie auf Einzelmolekülniveau bietet das inelastische Tunneln von Elektronen bei der Rastertunnelmikroskopie (inelastic electron tunneling spectroscopy, IETS).^[193,194] Die IETS ermöglicht es Schwingungsmoden von auf Metalloxiden adsorbierten Molekülen zu charakterisieren. Durch Kombination dieser Technik mit der Rastertunnelmikroskopie (scanning tunneling microscopy, STM) erhält man ein Schwingungsspektrum mit sehr hoher räumlicher Auflösung und Empfindlichkeit. So konnten Schwingungsmoden in einem einzelnen Molekül abgebildet werden.^[195,196] Die energetische Lage der Schwingungsübergänge kann sowohl klassisch über Messung des Stromflusses in Abhängigkeit der angelegten Spannung^[196] als auch aus der schwingungsaufgelösten Emission eines Fluorophors nach Anregung durch ein tunnelndes Elektron bestimmt werden.^[195] Trotz des Vorteils der extremen räumlichen Auflösung für die Aufklärung grundlegender theoretischer Fragestellungen müssen auch hier wieder die spezielle Umgebungsbedingung durch die methodische Notwendigkeit tiefer Temperaturen und zudem eines Hochvakuums als Nachteil angeführt werden.

5.2. Die schwingungsselektive elektronische Anregung

Bereits in ihren Arbeiten zur schnellen Schwingungsspektroskopie wiesen Laubereau und Kaiser auf die hohe Empfindlichkeit hin, die durch das Abfragen mittels Fluoreszenz erreicht werden kann.^[190] Da durch Anregung in den ersten elektronischen Zustand und Detektion der spontanen Fluoreszenz die Sensitivität im Vergleich zum Abfragen mittels Raman Streuung um mehrere Größenordnungen erhöht werden konnte, war eine Untersuchung von stark verdünnten Lösungen möglich. Unser Ansatz beruht auf der gleichen Idee. Fluoreszenzexperimente bei Raumtemperatur werden heute routinemäßig auf Einzelmolekülniveau durchgeführt. Daher sollte dieser Abfrageprozess, nach erfolgter Schwingungspopulation, die entsprechende Sensitivität bieten. Für die Erzeugung einer Schwingungspopulation kann man sich mehrere Verfahren vorstellen. Die Anregung von Schwingungsmoden kann z.B. thermisch erfolgen. Das Laser-induzierte Temperatursprungverfahren ermöglicht es eine Probe räumlich begrenzt zu erhitzen und wird beispielsweise zur Untersuchung von biomolekularen Dynamiken eingesetzt.^[197,198] Hierbei können mittels MIR-Anregungsquellen Schwingungsmoden direkt angeregt oder aber durch Laserpulse im sichtbaren Bereich Farbstoffe elektronisch angeregt werden.

Im letzteren Fall werden Schwingungsmoden dann durch strahlungslose Relaxation angeregt und die Farbstoffe "heizen" ihre Umgebung. Mit diesem Verfahren kann zwar eine zeitliche Auflösung im Bereich von Pikosekunden erreicht werden, aber es besitzt keine spektrale Selektivität. Im Gegensatz zur thermischen Anregung ist die direkte Anregung einer Schwingungsmode über Absorption von Laserpulsen im MIR eine sehr effiziente Methode, starke Schwingungspopulationen spektral selektiv zu erzeugen. Alternativ können Raman Methoden zur selektiven Anregung verwendet werden. Insbesondere nichtlinear optische Techniken wie die stimulierte Raman Streuung bieten trotz geringerer Effizienz bei der Erzeugung einer Schwingungspopulation eine Reihe von Vorteilen gegenüber der IR-Anregung. Im nächsten Abschnitt werde ich Vor- und Nachteile beider Verfahren erläutern und unseren Ansatz motivieren. Ausgehend hiervon folgt eine rein theoretische Betrachtung des Experiments.

Kapitel 6.

Theoretische Betrachtung des Experiments

In diesem Kapitel werde ich zunächst die grundlegende Idee des Experiments und die Möglichkeiten, die sich hieraus ergeben, vorstellen. In Abschnitt 6.2 behandle ich die selektive Erzeugung einer Schwingungspopulation. Hierzu wäge ich zwei Ansätze gegeneinander ab und begründe unsere Entscheidung zur Verwendung eines nichtlinear optischen Prozesses. Eine ausführliche theoretische Beschreibung dieses Prozesses folgt in 6.2.2. In 6.3 beschreibe ich den Abfrageprozess. Nach einer Abschätzung der zu erwartenden Signalstärke für ein Einzelmolekülexperiment nach unserem Ansatz folgt schließlich eine Diskussion der Hintergrund- bzw. Konkurrenzprozesse.

6.1. Die Idee zum Experiment

Wie in der Einleitung erläutert, wollen wir ein neues Anregungsschema mit einer Kombination von Schwingungsanregung und Abfrageprozess mittels Fluoreszenz verwirklichen. In Abbildung 6.1 sind links Energiediagramme der optischen, spektral selektiven Anregungsvarianten dargestellt. Der direkte Ansatz zur Erzeugung der Schwingungspopulation p_v wäre die Anregung mittels IR-Absorption bei der Frequenz ω_{IR} . Alternativ ist eine nichtlinear optische Anregung analog zum CARS Prozess möglich. Hierfür werden zwei simultane Anregungspulse der Frequenzen ω_1 und ω_2 verwendet. Die Überlagerung der zwei Frequenzen regt eine Schwingungsmode bei $\omega_v = \omega_1 - \omega_2$ an. Die Schwingungspopulation wird durch einen Abfragepuls der Frequenz ω_3 in den ersten, elektronisch angeregten Zustand $|e\rangle$ überführt. Detektiert wird die Fluoreszenz aus diesem Zustand. Bei geeigneter Wahl der Frequenz ω_3 tragen lediglich Schwingungsmoden der Frequenz $\omega > \omega_v$ zu dem Fluoreszenzsignal bei. Bei Raumtemperatur ist der Schwingungsgrundzustand zu nahezu 100% besetzt und somit resultiert das Fluoreszenzsignal bis auf einen geringen thermischen Hintergrund aus der selektiven Anregung einer Schwingungs-

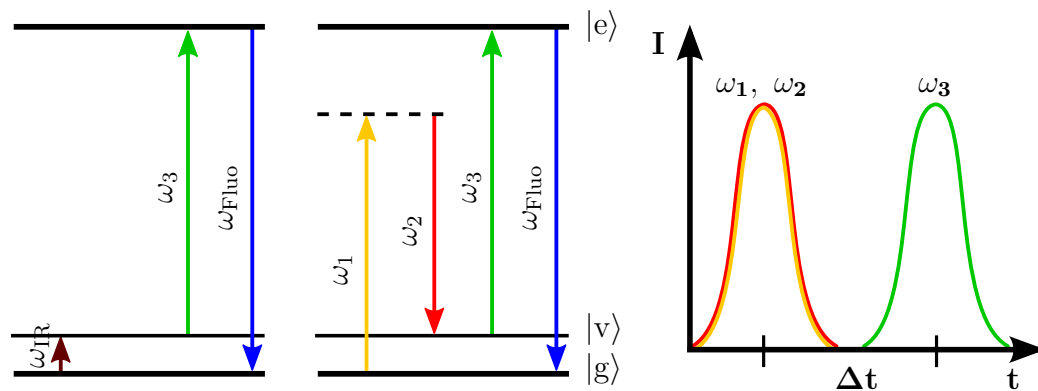


Abbildung 6.1.: Anregungsschemata für die schwingungselektive elektronische Anregung eines Fluorophors. Die selektive Erzeugung einer Schwingungspopulation kann durch IR-Absorption (links) oder einen nichtlinear optischen Prozess (Mitte) erfolgen. Durch Abfragen mit ω_3 wird die Schwingungspopulation in den elektronisch angeregten Zustand überführt. Die Trennung des Anregungsprozesses in Erzeugung der Schwingungspopulation und deren Abfrage ermöglicht zeitaufgelöste Schwingungsspektroskopie (rechts).

de. Die Auftrennung des Anregungsprozesses in Erzeugung einer Schwingungspopulation und deren gezieltes Abfragen ermöglicht mehrere Experimente. Durch Variation der IR-Frequenz ω_{IR} bzw. der Differenzfrequenz $\omega_1 - \omega_2$ erhält man ein Fluoreszenzanregungsspektrum, das die aktiven Schwingungsmoden enthält (s.u.). Doch nicht nur die Frequenz der Schwingungsmoden kann durch dieses Verfahren ermittelt werden. Auch die zeitliche Entwicklung der Schwingungspopulationen kann in einem zeitaufgelösten Experiment verfolgt werden. Hierzu wird der Abfragepuls bei ω_3 relativ zur Anregung der Schwingung zeitlich verzögert (s. Abb. 6.1, rechts).

Neben der hochsensitiven Schwingungsspektroskopie könnte dieses Anregungsschema auch Anwendung in der Nanophotonik finden. Die Miniaturisierung elektronischer Bauteile schreitet immer weiter fort. Im Bereich der Halbleiter-basierten Bausteine ist heutzutage die Grenze des Machbaren nahezu erreicht. Molekulare Bausteine stellen daher den nächsten Schritt und zugleich das ultimative Ziel der Miniaturisierung dar. Hierbei bieten sich photonische Ansätze als Alternative zum klassischen Mechanismus via Ladungstransport an. Die Verwendung von Licht schafft eine neue Flexibilität durch variable Parameter wie die Wellenlänge oder Polarisation. Die schnellen Reaktionszeiten optischer Prozesse im Bereich von Pikosekunden und das Auftreten von Quanteneffekten bei Raumtemperatur eröffnen ebenfalls neue Ansätze für Quantencomputer. Die hohe Geschwindigkeit der optischen Datenübertragung wird heute schon routinemäßig

genutzt. Die ersten molekularen photonischen Drähte wurden von Wagner und Lindsey 1994 vorgestellt.^[199] Analog zu Lichtsammelkomplexen in der Natur wird anstelle von Ladungsträgern die Anregungsenergie nach Absorption eines Photons transportiert. Bis heute wurden diverse Ansätze zur Verwirklichung dieser Drähte vorgestellt.^[200–202] Ein Ansatz auf Einzelmolekülniveau beruht auf dem Aufbau einer Kette von Fluorophoren die jeweils als Paar für Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) fungieren. Der erste Chromophor wird durch Absorption eines Photons angeregt und dient als Donor, d.h. er überträgt seine Anregungsenergie mittels FRET auf den benachbarten Akzeptor. Dieser stellt nun wiederum den Donor gegenüber dem nächsten Fluorophor in der Kette dar. Ein solcher molekularer, photonischer Draht ist in Abbildung 6.2 dargestellt. Durch Einbau eines Fluorophors in der FRET-Kette, dessen Anregungsenergie nicht ausreicht den nachfolgenden Akzeptor anzuregen, könnte ein optischer Schalter verwirklicht werden. Die Anregungsenergie des Donors entspräche der Frequenz ω_3 unseres Abfragepulses. Durch zusätzliche Einstrahlung eines IR-Pulses bzw. der Anregungspulse bei ω_1 und ω_2 könnte im Akzeptor eine Schwingungsmode angeregt werden, so dass die Anregungsenergie des Donors ausreichen würde, den Akzeptor elektronisch anzuregen. Die FRET-Kette wäre geschlossen.

6.2. Erzeugung der Schwingungspopulation

Wie zuvor erwähnt wurde in der Gruppe von Kaiser bereits seit mehr als 40 Jahren schnelle Schwingungsspektroskopie in Lösung betrieben. In einem Übersichtsartikel vergleichen Laubereau und Kaiser stimulierte Raman Streuung und direkte IR-Absorption als Prozess zur Erzeugung der Schwingungspopulation sowie unterschiedliche Abfrageprozesse.^[190] Ich möchte einige Argumente dieser Diskussion aufgreifen und die Motivation für unseren Ansatz aufzeigen. Hierbei gehe ich allerdings im Gegensatz zu Laubereau und Kaiser auch auf Symmetrieargumente und rein technische Aspekte des Experiments ein.

6.2.1. Vergleich der Methoden zur selektiven Erzeugung einer Schwingungspopulation

Die IR-Anregung beruht auf einer resonanten Kopplung des Übergangsdipolmoments mit dem Anregungsfeld. Diese Wechselwirkung ist um mehrere Größenordnungen größer als die des Raman Prozesses. Daher ist auch die Effizienz der Erzeugung einer Schwingungspopulation mittels IR-Anregung deutlich höher. Es kann mit deutlich geringeren "Pumpleistungen" für die Schwingungsanregung gearbeitet werden. Bei diesen modera-

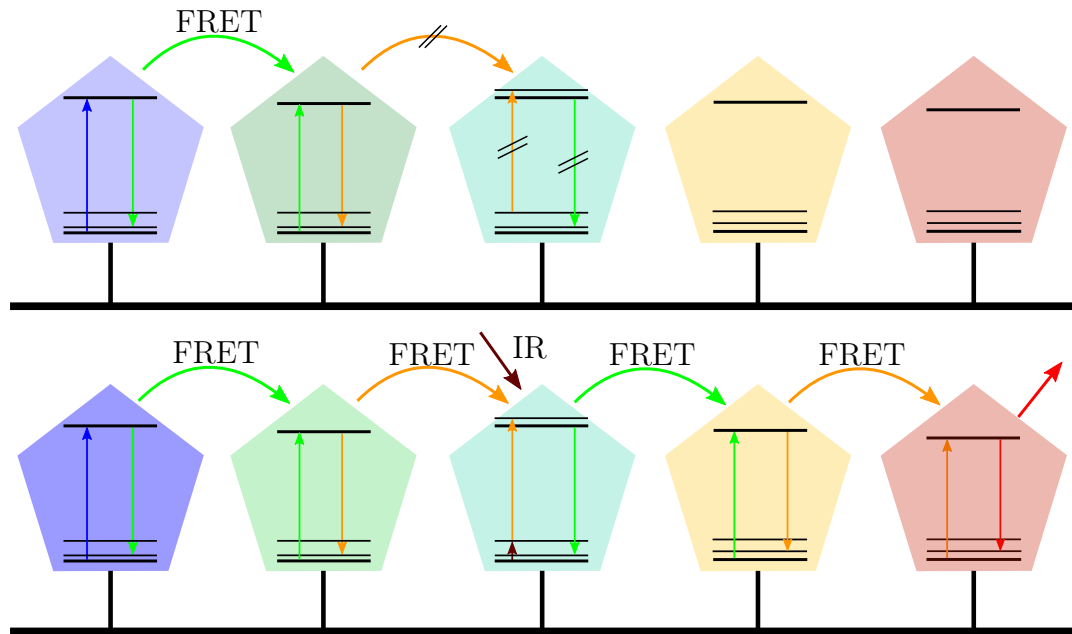


Abbildung 6.2.: Funktionsweise eines photonischen Drahtes und Konzept eines optischen Schalters. Anregungsenergie wird durch FRET übertragen. Am Schalter reicht die Energie des Donors nicht aus, den Akzeptor anzuregen. Durch zusätzlich Einstrahlung von IR-Licht wird eine Schwingungspopulation im Akzeptor erzeugt und die Anregungsenergie des Donors reicht aus, den Akzeptor elektronisch anzuregen.

ten Anregungsintensitäten handelt es sich um einen linearen Prozess. Dies vereinfacht sowohl die Durchführung als auch Interpretation des Experiments. Durch die geringen Intensitäten und die spektrale Lage der Pumpimpulse ω_{IR} treten auch keine nichtlinearen Konkurrenzprozesse wie Multi-Photonen Absorption oder CARS auf, die zu einem Hintergrundsignal führen können (vgl. 6.5). Bei der IR-Anregung mittels kurzer Pulse (Pulsdauer $\tau \leq 1$ ps) zeigt die Wechselwirkung mit der Probe allerdings ein deutlich komplexeres Verhalten als bei der klassischen IR-Spektroskopie und Kohärenzeffekte spielen zunehmend eine Rolle.^[190] Auf der technischen Seite sind ebenfalls mehrere Aspekte zu berücksichtigen. Für die Anregung werden Pikosekunden Pulse im IR-Bereich benötigt. Um mit den vorhandenen Anregungsquellen zu arbeiten, müsste hierfür die Differenzfrequenzerzeugung (DFG) genutzt werden (vgl. 2). So könnten in einem geeigneten Kristall mit zwei Pumpimpulsen der Frequenzen ω_1 und ω_2 IR-Licht erzeugt werden. Die Fundamentele der Pumpquelle und der Signal des OPO wären hierfür aufgrund der inhärenten Synchronisation und schmalen Linienbreite die naheliegende Wahl. Die Frequenz ω_{DFG} könnte über Durchstimmen des Signals variiert werden.

Für die Mikrospektroskopie ergeben sich durch die Verwendung von Anregungslicht im IR-Bereich mehrere Nachteile. Es müssen reflektive Optiken verwendet werden, Glasoptiken sind für IR-Licht nicht geeignet. Insbesondere die Verwendung eines reflektiven Objektivs (Cassegrain-Objektiv) ist problematisch. Diese besitzen eine geringere maximale Numerische Apertur (N.A.) verglichen zu hochwertigen Mikroskopobjektiven mit Glasoptiken. Die räumliche Auflösung in der Mikroskopie ist nach Abbe gegeben durch:^[203]

$$d = 0,5 \frac{\lambda}{N.A.} \quad (6.1)$$

Die Auflösung ist somit bei kleinerer N.A. deutlich geringer. Wie aus Gleichung 6.1 ersichtlich, verringert sich die räumliche Auflösung auch mit zunehmender Wellenlänge. Die IR-Mikroskopie ist auch hier im Nachteil gegenüber nichtlinearen Verfahren mit Anregungsquellen im NIR.

Bei der Anregung mittels zweier Felder der Frequenzen ω_1 und ω_2 handelt es sich um einen nichtlinearen, kohärenten Prozess. Eine Verstärkung der induzierten Polarisation beruht somit auf dem Vorhandensein vieler Schwingungsmoden gleicher Frequenz. Für Experimente bei kleiner Konzentration oder gar auf Einzelmolekülniveau fällt diese Verstärkung weg. Die Erzeugung der Schwingungspopulation erfolgt folglich mit geringerer Effizienz als bei der direkten IR-Absorption. Man muss für dieses Schema auch die für die CARS Mikroskopie beschriebenen experimentellen Anforderungen an nicht-linear optische Experimente erfüllen. Die Anregungsfelder müssen deutlich höher sein als bei linearen Verfahren. Dies stellt allerdings bei den verfügbaren Anregungsquellen kein Problem dar. Die Fundamente des Pumplasers und Signal bzw. Idler des OPOs können direkt als Anregungspulse der Frequenzen ω_1 und ω_2 verwendet werden. Im Gegensatz zur IR-Anregung müssen hier nichtlineare Konkurrenzprozesse berücksichtigt werden (vgl. Abschnitt 6.5). Von Vorteil gegenüber der IR-Mikroskopie ist die spektrale Lage der Anregungspulse im NIR. Es können Standardoptiken und Immersionsobjektive hoher N.A. eingesetzt werden. Die hohe N.A. ermöglicht hartes Fokussieren, was entscheidend für die Phasen Anpassung und somit Effizienz des Anregungsprozesses ist (vgl. Abschnitt 2.2). Die hohe N.A. der verwendeten Objektive und der nichtlineare Charakter der kohärenten Anregung resultieren zudem in einer hohen räumlichen Auflösung. Für die Mikrospektroskopie bietet sich daher letzterer Ansatz an. Ein entscheidendes Argument für die kohärente Anregung folgt des Weiteren aus einer Symmetriebetrachtung des Prozesses zur Abschätzung der Anregungseffizienz des Gesamtprozesses.

Abschätzung der Anregungseffizienz durch Symmetrieargumente Bei der klassischen elektronischen Anregung findet der Übergang aus dem nahezu ausschließlich besetzten Schwingungsgrundzustand statt. In Abhängigkeit von der Geometrie des elektro-

nisch angeregten Zustands und somit von dessen Potentialfunktion erfolgt der Übergang in einen angeregten Schwingungszustand. Im Gegensatz hierzu wird im geplanten Experiment zunächst eine Schwingungsmode angeregt und der elektronische Übergang erfolgt aus diesem Schwingungszustand in den Schwingungsgrundzustand des ersten angeregten elektronischen Zustands. Die Anregungswahrscheinlichkeit bzw. Übergangsrate einer vibronischen Anregung $|\Psi_i\rangle \rightarrow |\Psi_f\rangle$, d.h. einer elektronischen Anregung unter Beteiligung von Schwingungsmoden, kann über das zugehörige Integral M abgeschätzt werden:

$$M_{mn,kl} = \langle \phi_m; \chi_k | \mathbf{d}_{ges} | \phi_n; \chi_l \rangle \quad (6.2)$$

Hier wurde Gleichung 6.57 mit den rein elektronischen Zuständen $|\phi_i\rangle$, den reinen Schwingungszuständen $|\chi_i\rangle$ und dem Gesamtdipoloperator \mathbf{d}_{ges} vorweggenommen. Eine detaillierte Behandlung der Theorie ist in Abschnitt 6.2.2 gegeben. Basierend auf Gleichung 6.2 kann beurteilt werden, ob ein Übergang erlaubt ist. Hierfür darf das Integral nicht null ergeben. Mittels Symmetriebetrachtung kann man abschätzen, wann die Integrale $\langle \Psi_i | \mathbf{O}_{exc} | \Psi_f \rangle$ für den jeweiligen Operator \mathbf{O}_{exc} null werden. Nur durch Integration über eine totalsymmetrische Funktion kann ein von null verschiedenes Ergebnis erhalten werden. Für diese Symmetrieauswahlregel genügt es, die Produktdarstellung $\Gamma = \Gamma_{\Psi_i} \times \Gamma_{\mathbf{O}_{exc}} \times \Gamma_{\Psi_f}$ auszuwerten. Diese muss einen totalsymmetrischen Anteil enthalten, nur dann ist der Übergang symmetriebedingt erlaubt.

Der von uns verwendete Fluorophor besitzt Inversionssymmetrie und kann näherungsweise der Punktgruppe C_{2h} zugeordnet werden (vgl. 7.3). Bei der folgenden Argumentation gehe ich daher vom Vorhandensein eines Inversionszentrums aus. Besitzt ein Molekül nur abgeschlossene (vollbesetzte) Schalen ist die Wellenfunktion des elektronischen Grundzustands $|\phi_m\rangle$ totalsymmetrisch und transformiert sich somit gerade (g). Die Wellenfunktion des ersten elektronisch angeregten Zustands $|\phi_n\rangle$ hingegen transformiert sich ungerade (u). Die irreduziblen Darstellungen der Komponenten d_x , d_y und d_z des Dipolmomentoperators sind identisch mit den jeweiligen Komponenten des Ortsvektors. Sie transformieren sich somit wie diese ungerade. Die elektronische Anregung erfolgt in den Schwingungsgrundzustand $|\chi_1\rangle$, welcher totalsymmetrisch ist. Für die Produktdarstellung ergibt sich somit:

$$\Gamma = \Gamma_{\phi_m} \times \Gamma_{\chi_k} \times \Gamma_d \times \Gamma_{\phi_n} \times \Gamma_{\chi_l} = g \times \Gamma_{\chi_k} \times u \times u \times g \quad (6.3)$$

Aus diesem Ansatz folgt, dass die Schwingungsmode, aus der die elektronische Anregung erfolgt, eine gerade Symmetrierasse besitzen muss. Ansonsten ergibt das Integral in Gleichung 6.2 null und der gesamte Anregungsprozess ist verboten. Welches der Anregungsverfahren geeignet ist, kann mittels der Auswahlregeln für die Schwingungsanregung entschieden werden, da die Symmetrierasse Γ_{χ_k} einer Schwingungsmode daraus

folgt.

Die Auswahlregel für IR-Anregung besagt, dass lediglich Übergänge für Schwingungsmoden, bei denen eine Änderung des Dipolmoments \mathbf{d} auftritt, stattfinden:

$$\left(\frac{\partial \mathbf{d}}{\partial Q_i}\right) \neq 0 \quad \text{mit} \quad Q_i : \text{ Normalkoordinate der Schwingungsmode} \quad (6.4)$$

Die Intensität einer IR-Bande ist gegeben durch:

$$I \propto |\langle \chi_0(Q_i) | \mathbf{d}(Q) | \chi_k(Q_i) \rangle|^2 \quad (6.5)$$

Für die Beurteilung, ob eine Schwingungsmode Raman-aktiv ist, ist der Polarisierbarkeitstensor α_{ij} entscheidend. Auch hier muss eine Änderung auftreten und es gilt analog zu 6.4:

$$\left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q_i}\right) \neq 0 \quad (6.6)$$

bzw. für die Intensität der Raman Bande:

$$I \propto |\langle \chi_0(Q_i) | \boldsymbol{\alpha}_{ij} | \chi_k(Q_i) \rangle|^2 \quad (6.7)$$

Bei einem Molekül mit Inversionssymmetrie greift das sogenannte Alternativverbot, d.h. eine Schwingungsmode ist entweder IR- oder aber Raman-aktiv. Bei Raumtemperatur kann man von einer nahezu vollständigen Population des Grundzustands ausgehen. Die Wellenfunktion des Grundzustands $|\chi_0(Q_i)\rangle$ ist stets totalsymmetrisch, transformiert sich somit gerade, der Dipolmomentoperator ungerade. Das Integral aus Gleichung 6.5 kann nur dann von null verschieden sein, wenn das Produkt der irreduziblen Darstellungen der Komponenten des Integrals einen totalsymmetrischen Anteil beinhaltet. Folglich muss eine IR-aktive Schwingungsmode eine ungerade Symmetrierasse besitzen. In diesem Fall ist allerdings wie bereits mittels Gleichung 6.3 dargelegt der gesamte Anregungsprozess symmetriebedingt verboten. IR-aktive Schwingungsmoden koppeln nicht (bzw. kaum) an die elektronische Anregung. Die mittels IR-Pulsen erzeugte Schwingungspopulation könnte somit nicht effizient abgefragt werden. Aufgrund der Inversionssymmetrie verhält es sich für einen Raman Prozess komplementär hierzu. Die Raman-aktiven Schwingungsmoden sollten sich gerade transformieren. Um dies zu zeigen, kann man analog zur Argumentation für die IR-Anregung vorgehen. Die Polarisierbarkeit α_{ij} transformiert sich wie die quadratischen Komponenten (beispielsweise x^2 oder xy). Die Schwingungsmoden unseres Chromophors, die besonders intensive Raman Banden zeigen, besitzen die Symmetrierasse a_g (vgl. 7.3). Ein Blick in die Charaktertafel für die Punktgruppe C_{2h} zeigt, dass x^2 , y^2 , z^2 und xy und somit auch die Polarisierbarkeit

ebenfalls die Symmetrierasse A_g besitzen. Die Raman-aktiven Schwingungsmoden transformieren sich somit gerade. Die zugehörigen Schwingungspopulationen können effizient über eine elektronische Anregung abgefragt werden. Zwar konnten Laubereau *et al.* mit IR-Pulsen erzeugte Schwingungspopulation in verdünnten Lösungen über Fluoreszenz nachweisen, dies geschah jedoch unter Einsatz von kHz-Lasersystemen mit hohen Pulsleistungen.^[204] Für ein Experiment auf Einzelmolekülniveau ist die starke Kopplung der Schwingungsmode an den elektronischen Übergang ein entscheidender Vorteil. Dementsprechend beruht unser Ansatz auf der kohärenten Anregung mit zwei Laserpulsen der Frequenzen ω_1 und ω_2 .

6.2.2. Theoretische Beschreibung der Wechselwirkung von Photon und Quantensystem

Optische Spektroskopie ist die Durchführung einer Messung mit elektromagnetischer Strahlung an einem Atom, Molekül oder anderen Quantensystem. Ein solches Quantenteilchen wird in der Quantenmechanik durch eine Wellenfunktion $\psi(\mathbf{r}, t)$ beschrieben. Die Funktion $\psi(\mathbf{r}, t)$ selbst kann als komplexe Wahrscheinlichkeitsamplitude betrachtet werden. Sie kann zudem auch als definierter Zustand eines Quantensystems in einem "Zustandsraum" interpretiert werden. Hierfür bietet sich die Notation nach Dirac mit dem Zustandsvektor $|\psi(\mathbf{r}, t)\rangle$ im Hilbertraum an. Jeder physikalischen Messgröße (Observablen) wird in der Quantenmechanik ein Operator A zugeordnet. Der sogenannte Erwartungswert $\langle A \rangle$ stellt den Durchschnittswert der Ergebnisse einer Messreihe der Observablen A am Quantensystem mit der Wellenfunktion $\psi(\mathbf{r}, t)$ dar:

$$\langle A \rangle \equiv \langle \psi | A | \psi \rangle \quad (6.8)$$

Ist $\psi(\mathbf{r}, t)$ eine Eigenfunktion des Operators A erhält man bei jeder Messung das gleiche Ergebnis, den Eigenwert a . Befindet sich das System in einem Zustand $\psi(\mathbf{r}, t)$, der keine Eigenfunktion des Operators ist, können unterschiedliche Messergebnisse erhalten werden. Wenn dieser Zustand $\psi(\mathbf{r}, t)$ als Linearkombination von Eigenfunktionen $\psi_n(\mathbf{r}, t)$ des Operators A dargestellt werden kann

$$\psi(\mathbf{r}, t) = \sum_n c_n \psi_n(\mathbf{r}, t) \quad (6.9)$$

folgt für den Erwartungswert

$$\langle A \rangle = \sum_n c_n c_n^* a_n \quad (6.10)$$

Der Hamiltonoperator H bestimmt die Gesamtenergie des Quantensystems. Da in der Spektroskopie in der Regel Energieunterschiede gemessen werden, ist H der entscheidende Operator für die Beschreibung der Experimente. Mit dessen Hilfe konnte Schrödinger

die Bewegungsgleichung für ein Quantensystem, d.h. die zeitliche Entwicklung seiner Wellenfunktion, aufstellen:

$$i\hbar \frac{\partial}{\partial t} |\psi(\mathbf{r}, t)\rangle = H |\psi(\mathbf{r}, t)\rangle \quad (6.11)$$

Der Hamiltonoperator wirkt auf die Wellenfunktion, welche hierdurch zeitlich variiert. Hierauf gehe ich später nochmals genauer ein. Die theoretische Beschreibung eines Experiments durch diesen Formalismus ist oftmals nicht möglich. So kann beispielsweise ein Ensemble von Quantensystemen wie Atomen oder Molekülen im thermischen Gleichgewicht nicht durch eine Wellenfunktion beschrieben werden. Die Quantensysteme liegen entsprechend der Boltzmann-Verteilung in unterschiedlichen Zuständen vor, die klare Zuordnung eines einzelnen Quantensystems zu einem Zustand ist nicht möglich. Es können lediglich Wahrscheinlichkeiten für die Besetzung der Zustände angegeben werden. Man spricht von einem Zustandsgemisch. Der Dichtematrix-Formalismus bietet eine Beschreibung solcher statistischer Verteilungen. Bevor ich allerdings auf Zustandsgemische eingehe, möchte ich zunächst den Dichteoperator anhand eines reinen Zustands definieren.

Der Dichteoperator für reine Zustände Ein reiner Zustand liegt vor, wenn dieser mittels eines Zustandsvektors $|\psi\rangle$ vollständig beschrieben werden kann. Der reine Zustand kann hierbei durchaus eine kohärente Überlagerung der Zustände $|\psi_n\rangle$ sein. Hierbei bilden einzelne Zustände des Systems $|n\rangle$ die Basis des Vektorraums und der Zustandsvektor ergibt sich als Linearkombination dieser (äquivalent zu Gleichung 6.9):

$$|\psi\rangle \equiv \sum_n c_n |n\rangle \quad (6.12)$$

Die Wahrscheinlichkeit P das Quantensystem in diesem Zustand $|\psi\rangle$ aufzufinden ist 1. Der Dichteoperator ρ eines reinen Zustands ist definiert als:

$$\rho \equiv |\psi\rangle \langle\psi| \quad (6.13)$$

In der orthonormalen Basis $\{|n\rangle\}$ kann der Dichteoperator ρ formal als Dichtematrix dargestellt werden

$$\rho = \sum_{n,m} c_n c_m^* |n\rangle \langle m| \quad (6.14)$$

Die Diagonalelemente der Dichtematrix ρ_{nm} ergeben somit die Wahrscheinlichkeit für den Zustand $|n\rangle$. Mit der Definition des Erwartungswerts aus Gleichung 6.10 erhält man im Dichtematrixformalismus:

$$\langle A \rangle = Tr\{\rho A\} \quad (6.15)$$

Der Erwartungswert lässt sich somit mittels der Diagonalelemente der Dichtematrix berechnen.

Der Dichteoperator für gemischte Zustände und deren zeitliche Entwicklung

Für reine Zustände bietet der Dichtematrixformalismus keinen Vorteil gegenüber der Beschreibung mittels einer Wellenfunktion, die Darstellungen sind äquivalent. Ein Zustandsgemisch kann allerdings wie bereits erwähnt nicht durch eine Wellenfunktion vollständig beschrieben werden. Die Dichtematrix hierfür ist definiert als:

$$\rho = \sum_i P_i |\psi_i\rangle \langle \psi_i| \quad (6.16)$$

P_i ist die Wahrscheinlichkeit ein beliebiges, einzelnes Quantensystem aus einem Ensemble im Zustand $|\psi_i\rangle$ vorzufinden. Auch hier gilt Gleichung 6.15. Somit kann auch für ein Ensemble von Quantensystemen der zu erwartende, durchschnittliche Messwert aus der Spur der Dichtematrix berechnet werden.

Die zeitliche Entwicklung eines Quantensystems kann wie in Gleichung 6.11 gezeigt, durch die Schrödingergleichung beschrieben werden:

$$\frac{d}{dt} |\psi\rangle = -\frac{i}{\hbar} H |\psi\rangle \quad \text{bzw.} \quad \frac{d}{dt} \langle \psi| = \frac{i}{\hbar} H \langle \psi| \quad (6.17)$$

Mit der Definition des Dichteoperators

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} \rho &= \frac{d}{dt} \left[\sum_i P_i |\psi_i\rangle \langle \psi_i| \right] \\ &= \sum_i P_i \left[\left(\frac{d}{dt} |\psi_i\rangle \right) \cdot \langle \psi_i| + |\psi_i\rangle \cdot \left(\frac{d}{dt} \langle \psi_i| \right) \right] \end{aligned} \quad (6.18)$$

lässt sich die Bewegungsgleichung des Dichteoperators, die sogenannte Liouville-Von Neumann Gleichung, ableiten:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} \rho &= -\frac{i}{\hbar} H \rho + \frac{i}{\hbar} \rho H \\ &= -\frac{i}{\hbar} [H, \rho] \end{aligned} \quad (6.19)$$

Bevor ich weiter auf die Liouville-Von Neumann Gleichung eingehe, möchte ich zunächst noch einige formale Grundlagen erläutern.

Darstellungsformen der Bewegungsgleichung Die bisher verwendete Darstellung der Bewegungsgleichungen wird als Schrödinger Darstellung bezeichnet. Hierbei beruht die Zeitabhängigkeit auf den Wellenfunktionen, während die Operatoren zeitunabhängig sind. Die zeitliche Entwicklung der Wellenfunktion von Zeitpunkt t_0 nach t kann durch den unitären Zeitentwicklungsoperator $U(t, t_0)$ beschrieben werden:

$$|\psi(t)\rangle = U(t, t_0) |\psi(t_0)\rangle \quad \text{und} \quad \langle \psi(t)| = \langle \psi(t_0)| U^\dagger(t, t_0) \quad (6.20)$$

Mit dem in der Schrödinger Darstellung zeitunabhängigen Hamiltonoperator erhält man durch Integration der Schrödinger Gleichung:

$$U(t, t_0) = e^{-iH(t-t_0)/\hbar} \quad \text{und} \quad U^\dagger(t, t_0) = e^{iH(t-t_0)/\hbar} \quad (6.21)$$

Ist der Hamiltonoperator zeitabhängig, ist eine direkte, analytische Lösung der Schrödinger Gleichung nicht möglich. Allerdings erhält man durch Integration der Schrödinger Gleichung von $U(t, t_0)$ einen Integralausdruck:

$$i\hbar \frac{\partial}{\partial t} U(t, t_0) = H(t)U(t, t_0) \quad (6.22)$$

$$U(t, t_0) = 1 - \frac{i}{\hbar} \int_{t_0}^t H(t')U(t', t_0)dt' \quad (6.23)$$

Diese Integralgleichung kann nun mittels eines iterativen Ansatzes angenähert werden, in dem $U(t, t_0)$ als sogenannte Dyson-Reihe entwickelt wird:

$$U(t, t_0) = 1 - \frac{i}{\hbar} \int_{t_0}^t H(t')dt' + \left(\frac{-i}{\hbar}\right)^2 \int_{t_0}^t dt_1 \int_{t_0}^{t_1} dt_2 H(t_1)H(t_2) + \dots \quad (6.24)$$

Dieses Verfahren kann allgemein zur Lösung von Bewegungsgleichungen mit zeitabhängigem Hamilton Operator verwendet werden.

Die Heisenberg Darstellung bietet eine weitere Möglichkeit eine Bewegungsgleichung zu beschreiben. Hierin sind im Gegensatz zur Schrödinger Darstellung die Operatoren zeitabhängig und die Wellenfunktion zeitunabhängig. Diese Heisenberg Wellenfunktion $|\psi_H\rangle$ kann über die Schrödinger Wellengleichung $|\psi(t)\rangle$ definiert werden:

$$|\psi_H\rangle = U^\dagger(t, t_0) |\psi(t)\rangle \quad \text{und} \quad \frac{\partial}{\partial t} |\psi_H\rangle = 0 \quad (6.25)$$

Den Heisenberg Operator $A_H(t)$ erhält man durch eine unitäre Transformation des Operators A in Schrödinger Darstellung:

$$A_H(t) = U^\dagger(t, t_0)AU(t, t_0) \quad (6.26)$$

Die zeitliche Entwicklung des Heisenberg Operators kann aus den Gleichungen 6.26 und 6.22 hergeleitet werden:

$$\begin{aligned} i\hbar \frac{\partial}{\partial t} A_H(t) &= i\hbar \frac{\partial}{\partial t} [U^\dagger(t, t_0)AU(t, t_0)] \\ &= -U^\dagger(t, t_0)HAU(t, t_0) + U^\dagger(t, t_0)AHU(t, t_0) \\ &= [A_H(t), H_H(t)] \end{aligned} \quad (6.27)$$

Kann man den Hamilton Operator H in einen zeitabhängigen und einen zeitunabhängigen Anteil $V(t) + H_0$ zerlegen, bietet sich die Wechselwirkungsdarstellung zur Lösung der Schrödinger Gleichung an. Hierbei wird für H_0 die Heisenberg Darstellung und für $V(t)$ die Schrödinger Darstellung verwendet. Somit ergibt sich für die Wellenfunktion bzw. einen Operator in der Wechselwirkungsdarstellung (gekennzeichnet mit dem Index I):

$$|\psi_I(t)\rangle = e^{iH_0(t-t_0)/\hbar} |\psi(t)\rangle \quad (6.28)$$

$$A_I(t) = e^{iH_0(t-t_0)/\hbar} A e^{-iH_0(t-t_0)/\hbar} \quad (6.29)$$

Es kann gezeigt werden, dass lediglich der Operator $V_I(t)$ die zeitliche Entwicklung der Wellenfunktion $|\psi_I(t)\rangle$ verantwortlich ist. Einsetzen in die zeitabhängige Schrödinger Gleichung liefert somit:

$$i\hbar \frac{\partial}{\partial t} |\psi_I(t)\rangle = V_I(t) |\psi_I(t)\rangle \quad (6.30)$$

Analog erhält man für den Operator die Heisenberg Gleichung:

$$i\hbar \frac{\partial}{\partial t} A_I(t) = [A_I(t), H_0] \quad (6.31)$$

Hier wirkt lediglich der zeitunabhängige Teil H_0 des Hamilton Operators auf den Operator $A_I(t)$.

Die Lösung der Liouville-Von Neumann Gleichung Was folgt nun aus diesen formalen Grundlagen für die Liouville-Von Neumann Gleichung? Auch diese Bewegungsgleichung kann in integraler Form dargestellt werden:

$$\rho(t) = \rho(t_0) - \frac{i}{\hbar} \int_{t_0}^t [H(t'), \rho(t')] dt' \quad (6.32)$$

Analog zur Entwicklung der Dyson-Reihe (vgl. 6.24) kann auch die Liouville-Von Neumann Gleichung iterativ gelöst werden:

$$\rho(t) = \rho^{(0)}(t) + \rho^{(1)}(t) + \rho^{(2)}(t) + \dots \quad (6.33)$$

Kann man nun wiederum den Hamilton Operator in der Form $H(t) = H_0 + V(t)$ darstellen, wirkt lediglich der zeitabhängige Teil $V(t)$ im Kommutator. So bietet sich erneut die Wechselwirkungsdarstellung an und für die Reihenglieder folgt:

$$\rho_I^{(0)}(t) = \rho(t_0) \quad (6.34)$$

$$\rho_I^{(k)}(t) = \left(-\frac{i}{\hbar}\right)^k \int_{t_0}^t dt_1 \int_{t_0}^{t_1} dt_2 \dots \int_{t_0}^{t_{k-1}} dt_k \cdot [V_I(t_1), [V_I(t_2), \dots, [V_I(t_k), \rho(t_0)] \dots]] \quad (6.35)$$

Die zeitliche Abfolge ist hierbei $t > t_1 > t_2 > \dots > t_0$.

Der zeitabhängige Störungsansatz Für die Beschreibung eines Quantensystems und der Wechselwirkung zwischen Quantensystem und Anregungsfeldern eignet sich ein zeitabhängiger Störungsansatz. Hier zeigt sich nun der Vorteil der Wechselwirkungsdarstellung. Man kann das ungestörte System und somit die Ausgangssituation getrennt von der folgenden Interaktion mit dem Anregungslicht behandeln. Der Hamiltonoperator wird in den freien, zeitunabhängigen Hamilton Operator H_0 und den Wechselwirkungs- bzw. Störungsoperator $V(t)$ zerlegt:

$$H(t) = H_0 + V(t) \quad (6.36)$$

Ausgehend von einem zunächst ungestörten System mit dem Hamilton Operator H_0 , das sich im thermischen Gleichgewicht befindet, ergibt sich die Besetzungswahrscheinlichkeit P_i des Zustands $|\psi_i\rangle$ nach der Boltzmannverteilung:

$$P_i = \frac{1}{Z} e^{-\frac{E_i}{k_B T}} \quad (6.37)$$

Die kanonische Zustandssumme Z wird hierin über alle möglichen Zustände $|\psi_i\rangle$ gebildet:

$$Z = \sum_i e^{-\frac{E_i}{k_B T}} \quad (6.38)$$

Somit ergibt sich für die Dichtematrix der Ausgangssituation vor Einsetzen der Störung $V(t)$, d.h. im thermischen Gleichgewicht:

$$\rho(t_0) = \rho(-\infty) = \rho_0 = \frac{1}{Z} \sum_i e^{-\frac{E_i}{k_B T}} |\psi_i\rangle \langle \psi_i| \quad (6.39)$$

Die Energien E_i sind Eigenwerte von H_0 . Für einen geschlossenen Basissatz, d.h. $\sum_i |\psi_i\rangle \langle \psi_i| = 1$, ergibt sich für die Dichtematrix ρ_0 :

$$\rho_0 = \frac{1}{Z} e^{-\frac{H_0}{k_B T}} \quad (6.40)$$

Die Wechselwirkung von Anregungsfeld und der Probe wird durch den Störoperator $V(t)$ semiklassisch beschrieben. In der Dipolnäherung entspricht die Störung der Wechselwirkung des Dipoloperators $\mathbf{d} = -e \sum_j \mathbf{r}_j$ des Quantensystems mit dem klassischen Anregungsfeld $\mathbf{E}(t)$:

$$V(t) = -\mathbf{d} \cdot \mathbf{E}(t) \quad (6.41)$$

mit

$$\mathbf{E}(t) = \mathbf{e} E_0 \cos(\omega t - \mathbf{kx}) = \frac{1}{2} \mathbf{e} E_0 (e^{-i\omega t + \mathbf{kx}} + e^{i\omega t - \mathbf{kx}}) \quad (6.42)$$

Die räumliche Abhängigkeit der Anregungsfelder in Form der Wellenvektoren \mathbf{k} spielt für die Phasen Anpassung eine Rolle (vgl. 2) und soll für diese Diskussion nicht berücksichtigt werden. Die Polarisation des Anregungsfeldes ist durch den Vektor \mathbf{e} gegeben. Aus Paritätsgründen sind die Diagonalelemente in der Matrixdarstellung des Dipoloperators \mathbf{d} und somit auch des Störoperators $V(t)$ null. Für das Matrixelement V_{mn} ergibt sich:

$$V_{mn} = E_0 \mu_{mn} \cos(\omega t) \quad (6.43)$$

Hierbei wurde direkt das sogenannte Übergangsdipolmoment μ_{mn} verwendet, dessen Matrixelemente μ_{mn} aus den Nebendiagonalelementen des Dipolmomentoperators \mathbf{d} und den beteiligten Zuständen $|\psi_m\rangle$ und $|\psi_n\rangle$ erhalten werden:

$$\mu_{mn} = \langle \psi_m | -\mathbf{d} \cdot \mathbf{e} | \psi_n \rangle \quad (6.44)$$

Die skalaren Komponenten werden häufig als Rabi-Frequenz zusammengefasst:

$$\Omega = \frac{\mu_{mn} \cdot E_0}{\hbar} \quad (6.45)$$

Mit der so erhaltenen Beschreibung der Wechselwirkung $V(t)$ ist es nun möglich die Dichtematrix im Störungsfall aufzustellen. Zur vereinfachten Darstellung werden eine Reihe von Definitionen verwendet.

$$\langle m | \rho^{(k)}(t) | n \rangle \equiv \rho_{mn}^{(k)} \quad (6.46)$$

Und es gilt im Besonderen:

$$\langle m | \rho^{(0)}(t) | n \rangle = \rho_{mn}^{(0)} \delta_{mn} \quad (6.47)$$

Für Eigenfunktionen $|m\rangle$ und $|n\rangle$ von H_0 mit den Eigenwerten E_m und E_n ergibt sich nach Gleichung 6.29:

$$\langle m | A_I(t) | n \rangle = \langle m | A(t) | n \rangle e^{i(E_m - E_n)(t - t_0)/\hbar} \quad (6.48)$$

mit

$$E_m - E_n = \hbar \omega_{mn} \quad (6.49)$$

Für ein System, das sich zum Zeitpunkt t_0 im thermischen Gleichgewicht befindet ergibt sich somit aus Gleichung 6.35 als Lösung erster bzw. zweiter Ordnung:

$$\rho_{I,mn}^{(1)} = -\frac{i}{\hbar} \int_{t_0}^t dt_1 V_{mn}(t_1) [\rho_{nn}^{(0)} - \rho_{mm}^{(0)}] e^{i\omega_{mn}t_1} \quad (6.50)$$

$$\begin{aligned} \rho_{I,mn}^{(2)} = & \left(-\frac{i}{\hbar}\right)^2 \int_{t_0}^t dt_1 \int_{t_0}^{t_1} dt_2 \sum_r \left[[\rho_{nn}^{(0)} - \rho_{rr}^{(0)}] V_{mr}(t_1) V_{rn}(t_2) e^{i\omega_{mr}t_1} e^{i\omega_{rn}t_2} \right. \\ & \left. - [\rho_{rr}^{(0)} - \rho_{mm}^{(0)}] V_{mr}(t_2) V_{rn}(t_1) e^{i\omega_{mr}t_2} e^{i\omega_{rn}t_1} \right] \end{aligned} \quad (6.51)$$

Auf der rechten Seite der obigen Gleichungen wurde bereits der Störoperator $V_I(t)$ in die Schrödingerdarstellung $V(t)$ überführt. Es ist offensichtlich, dass sich für die Lösungen höherer Ordnung eine Vielzahl von Termen ergeben. Daher möchte ich bevor ich auf die Lösung der Dichtematrix für unser Experiment eingehe, eine diagrammbasierte Technik zur Ermittlung der entscheidenden Terme vorstellen.

Doppelseitige Feynman Diagramme Feynman Diagramme bieten die Möglichkeit die Dyson-Reihe der zeitabhängigen Störungsrechnung grafisch darzustellen. Yee und Gustafson haben eine entsprechende Methode für die theoretische Beschreibung nichtlinear optischer Prozesse mittels Dichtematrizen vorgestellt.^[205,206] Im Folgenden möchte ich die Regeln zur Erstellung solch eines Diagramms und der Ableitung des zugehörigen Terms erläutern. In der Literatur werden häufig unterschiedliche Notationen verwendet, was beim Vergleichen von Diagrammen stets beachtet werden muss.

In Abb. 6.3 ist ein exemplarisches Feynman Diagramm gezeigt. Der Dichteoperator als Produkt von Ket und Bra wird in Form zweier vertikaler Linien dargestellt. Die linke Linie beschreibt die zeitliche Entwicklung des Ket, die rechte Linie die des Bra. Die zeitliche Entwicklung des Systems verläuft von unten nach oben. Wechselwirkungen mit dem Anregungsfeld werden als Pfeile an Knotenpunkten (Vertices) entlang der vertikalen Linien dargestellt. Die hierdurch erfolgten Übergänge sind durch Änderung des Ket bzw. Bra dargestellt. Insgesamt ergibt sich somit aus einem doppelseitigen Feynman Diagramm ein Term der zeitlichen Entwicklung des Dichtematrixelements $\rho_{mn}^{(k)}$. Wie ist nun solch ein Diagramm zu lesen bzw. welche Faktoren folgen aus der grafischen Darstellung für den zu ermittelnden Term?

Für die mathematische Beschreibung der Ausgangssituation in Abb. 6.3 erhält man einen Faktor $\rho_{gg}^{(0)}$. Bei den Wechselwirkungen mit dem Anregungsfeld muss beachtet werden, von welcher Seite der Störoperator wirkt. Pfeile, die nach rechts weisen, beschreiben ein Feld mit negativer Frequenzkomponente bzw. einem positiven Wellenvektor ($e^{-i\omega t + i\mathbf{k}\mathbf{x}}$) und Pfeile, die nach links weisen, dementsprechend ein Feld proportional zu ($e^{i\omega t - i\mathbf{k}\mathbf{x}}$). Pfeile, die in das Diagramm hinein weisen, bedeuten eine Absorption, Pfeile die aus dem Diagramm heraus weisen eine Emission. Für den Störoperator $V(t)$ von Absorptions- bzw. Emissionsprozessen ergeben sich damit die in Abb. 6.3 dargestellten Ausdrücke. Jede Wechselwirkung von Anregungsfeld und Quantensystem am Vertex überführt einen Zustand $|a\rangle$ nach $|b\rangle$ (bzw. $\langle a|$ nach $\langle b|$) und ergibt das zugehörige Matrixelement V_{ab} des Störoperators als weiteren Faktor.

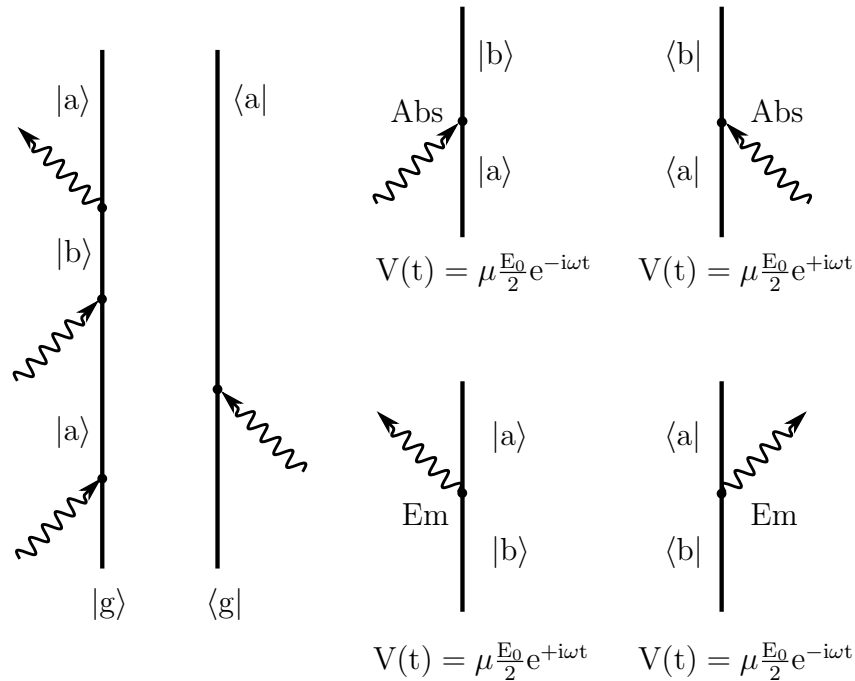


Abbildung 6.3.: Beschreibung nichtlinear optischer Prozesse mittels eines Diagramms. Links: Ein möglicher Liouvillepfad für den Übergang von $|g\rangle$ nach $|a\rangle$. Rechts: Wechselwirkungsdiagramme für Absorption und Emissionsprozesse und der jeweils zugehörige Störoperator $V(t)$. Näheres s. Text.

Die zeitliche Entwicklung des Quantensystems zwischen den Vertices wird durch einen sogenannten Propagator G_j beschrieben.¹ Für die Propagation von t_j nach t_{j+1} gilt $G_j = \pm \left[i \left(\sum_{i=1}^j \omega_i - \omega_{mn} \right) \right]^{-1}$.^[206] Auch hier müssen für die Frequenzkomponenten ω_i die Vorzeichen entsprechend der Ausrichtung der Pfeile berücksichtigt werden. Absorptionen ergeben daher positive Beiträge zur Summe, Emissionen negative (vgl.^[205]). Die Frequenz $\omega_{mn} = \omega_m - \omega_n$ folgt aus Ket $|m\rangle$ und Bra $\langle n|$ im jeweiligen Zeitintervall. Das Vorzeichen des jeweiligen Propagators resultiert aus der Unterscheidung, wo die letzte Wechselwirkung stattfand. Wechselwirkungen auf der Ket-Seite ergeben einen positiven Propagator, Wechselwirkungen auf der Bra-Seite einen negativen. Schließlich muss für jede Wechselwirkung auf der rechten Seite ein Faktor i/\hbar und für Wechselwirkungen

¹Der Propagator stellt in der Quantenfeldtheorie, aus welcher die Feynman Diagramme stammen, eine Wahrscheinlichkeitsamplitude für die Bewegung eines Systems vom Zeitpunkt t_0 zum Zeitpunkt t dar. Der hier aufgezeigte Propagator leitet sich aus dem Zeitentwicklungsoperator $U(t, t_0)$ ab bzw. folgt aus dessen Integration.

auf der linken Seite ein Faktor $-i/\hbar$ berücksichtigt werden. Am Ende befindet sich das System im Zustand beschrieben durch den Dichteoperator $|a\rangle\langle a|$.

Vergleicht man nun dieses schaubildliche Vorgehen mit Gleichung 6.51 wird der Zusammenhang klar. Das Produkt der aufgezählten Faktoren ergibt einen Term, welcher die Entwicklung des Quantensystems über eine definierte Abfolge von Zwischenzuständen beschreibt. Ein Feynman Diagramm entspricht so exakt einem Term der Entwicklung der Dichtematrix. Aus den Kommutatoren in der Beschreibung von $\rho_{l,mn}^{(k)}$ ergeben sich $2^{(k)}$ Terme und zugehörige Diagramme. Die zeitliche Abfolge der Integrationen in $\rho_{l,mn}^{(k)}$ kann direkt abgelesen werden. Für die möglichen Permutationen der zeitlichen Abfolge ergibt sich ein weiterer Faktor $(k!)$ für die Anzahl unterschiedlicher Diagramme. Erst die Summation über alle möglichen Kombinationen an Zuständen $|r\rangle$ ergibt folglich den Gesamtausdruck für die entsprechende Dichtematrix.

Die Feynman Diagramme bieten aber nicht nur eine grafische Darstellung von Prozessen. Sie ermöglichen auch eine Abschätzung der Relevanz einzelner Beiträge zur Dichtematrix. So kann beispielsweise mittels der “Rotating Wave Approximation” (RWA) die Anzahl relevanter Terme reduziert werden. Die RWA ist zulässig, wenn die Frequenzen der Anregungsfelder ω_i nahe der Resonanzen des Systems sind. Hierdurch wird der Propagator eines resonanten Übergangs, z.B. einer Anregung des Systems durch Absorption eines Photons ($G = (\omega_i - \omega_{mn})^{-1}$), sehr klein und der zugehörige Term liefert einen entscheidenden Beitrag bei der Entwicklung der Dichtematrix. Wenn hingegen beispielsweise ein Photon emittiert wird, das System hierdurch allerdings laut Diagramm angeregt würde, ergibt sich ein Propagator mit nahezu der doppelten Frequenz des Anregungsfeldes (z.B. $G = (-\omega_i - \omega_{mn})^{-1} \approx (-2\omega_i)^{-1}$). Der zugehörige Term oszilliert sehr schnell, sein Beitrag ist daher sehr gering. In der RWA werden solche Terme vernachlässigt und die Anzahl zu berechnender Terme reduziert sich entsprechend. Nach Aufstellung der Feynman Diagramme können somit mittels klar definierter Regeln direkt die relevanten Terme der Dichtematrix eines nichtlinear optischen Prozesses aufgestellt werden.

Kohärente Anregung eines Schwingungszustandes Zunächst soll vereinfacht ein Drei-Niveau-System mit elektronischem Grundzustand $|g\rangle$, elektronisch angeregtem Zustand $|e\rangle$ und dem zu populierenden Schwingungszustand $|v\rangle$ betrachtet werden. Die Wechselwirkung mit einem Anregungsfeld mit den Frequenzen ω_1 und ω_2 führt zu einer Kohärenz $\rho_{vg}^{(2)}$, die durch eine Dichtematrix nach Gleichung 6.51 berechnet werden kann. Die Summation sollte über alle möglichen Zustände erfolgen. Allerdings können wie im vorherigen Abschnitt dargelegt durch rationale Abschätzung ihres Beitrags einige Terme vernachlässigt werden. In diesem Fall ist davon auszugehen, dass die Beiträge von Termen, die virtuelle Niveaus (vgl. Kapitel 2) berücksichtigen, im Vergleich zum Beitrag unter Beteiligung des Zustands $|e\rangle$ (bzw. eines virtuellen Niveaus Nahe dieser Resonanz)

verschwindend gering sind. Somit ergeben sich lediglich zwei Diagramme für den Anregungsprozess, die in Abb. 6.4 dargestellt sind. Das rechte Diagramm kann in der RWA

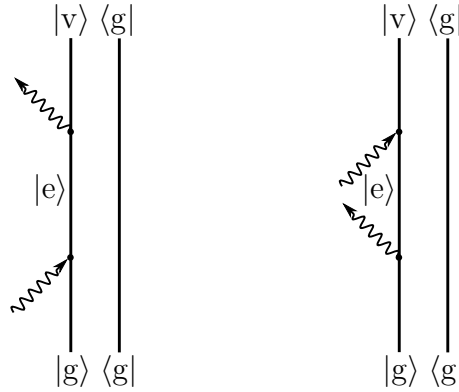


Abbildung 6.4.: Zwei mögliche Liouvillepfade für die Kohärenz $\rho_{vg}^{(2)}$.

ebenfalls vernachlässigt werden (es würde eine stimulierte Emission aus dem Grundzustand voraussetzen). Somit erhält man lediglich einen definierten Anregungspfad. Aus dem Diagramm kann nun für die Kohärenz $\rho_{vg}^{(2)}$ der relevante Term ermittelt werden. Das Anregungsfeld $\mathbf{E}(t)$ hat die Form:

$$\mathbf{E}(t) = \mathbf{E}(\omega_1)e^{-i\omega_1 t} + \mathbf{E}(\omega_2)e^{+i\omega_2 t} \quad (6.52)$$

Mittels Absorption eines Photons der Frequenz ω_1 erfolgt die Anregung von $|g\rangle$ nach $|e\rangle$. Die stimulierte Emission erfolgt aufgrund der Wechselwirkung bei ω_2 . Für $\rho_{vg}^{(2)}$ folgt damit:

$$\rho_{vg}^{(2)} = p_g \frac{\Omega_1 \Omega_2 e^{-i(\omega_1 - \omega_2)t}}{(\omega_1 - \omega_2 - \omega_{vg})(\omega_1 - \omega_{eg})} \quad (6.53)$$

Hier wurden bereits nach Gleichung 6.45 die Rabi Frequenzen Ω_1 und Ω_2 für die Feldkomponenten $\mathbf{E}(\omega_1)$ und $\mathbf{E}(\omega_2)$ eingesetzt. Die Anregung erfolgt ausgehend von der Grundzustandspopulation $p_g = \rho_{gg}^{(0)}$. Zudem gilt $\omega_{vg} = \omega_{ve} + \omega_{eg}$.

Analog zu den Regeln für Erstellung der Terme aus einem doppelseitigen Feynman Diagramm kann auch Gleichung 6.51 für den entscheidenden Liouvillepfad gelöst werden, um das Ergebnis in 6.53 zu erhalten. Da $V(t) = 0$ für $t \leq t_0$ können die Integrale berechnet werden, indem $t_0 = -\infty$ gesetzt wird.^[24] Für den relevanten Anregungspfad ist zudem die formale zeitliche Reihenfolge der Interaktionen zu beachten. Es gilt $t > t_1 > t_2 > t_0$

und somit für die Integration:

$$\begin{aligned}
 & \int_{t_0}^t dt_1 \int_{t_0}^{t_1} dt_2 e^{i(\omega_{ve}+\omega_2)t_1} e^{i(\omega_{eg}-\omega_1)t_2} \\
 &= \int_{t_0}^t dt_1 \frac{e^{i(\omega_{eg}-\omega_1)t_1} e^{i(\omega_{ve}+\omega_2)t_1}}{i(\omega_{eg}-\omega_1)} \\
 & \quad \frac{e^{i(\omega_{eg}+\omega_{ve}-\omega_1+\omega_2)t}}{e^{i(\omega_{eg}+\omega_{ve}-\omega_1+\omega_2)t}} \\
 &= \frac{i(\omega_{eg}-\omega_1) i(\omega_{eg}+\omega_{ve}-\omega_1+\omega_2)}{e^{i(\omega_{vg}-\omega_1+\omega_2)t}} \\
 &= \frac{i(\omega_{eg}-\omega_1) i(\omega_{vg}-\omega_1+\omega_2)}{e^{i(\omega_{vg}-\omega_1+\omega_2)t}}
 \end{aligned} \tag{6.54}$$

Hiermit und nach Transformation des Matrixelements $\rho_{l,mn}^{(2)}$ von der Wechselwirkungsdarstellung in die Schrödinger Darstellung (wodurch der Faktor $e^{i\omega_{vg}t}$ gekürzt wird) erhält man Gleichung 6.53.

Erweiterung auf ein 4-Niveau-System und Berücksichtigung des Franck-Condon Prinzips Das 3-Niveau-System, das im vorherigen Abschnitt verwendet wurde, berücksichtigt nicht den Einfluss der Molekülschwingungen auf den Anregungsprozess. Im Folgenden soll daher ein 4-Niveau-System betrachtet werden, das zusätzlich einen angeregten Schwingungszustand $|w\rangle$ im elektronisch angeregten Zustand enthält. Auch dieses Bild stellt noch eine starke Vereinfachung eines Moleküls dar, hilft aber den Anregungsprozess besser zu verstehen. Zunächst möchte ich wiederum einige theoretische Grundlagen hierzu erläutern bevor ich dann einen Ausdruck für die Kohärenz des 4-Niveausystems unter Berücksichtigung der Molekülschwingungen ableite.

In der Born-Oppenheimer Näherung wird die Schrödingergleichung in zwei Teilprobleme, eines für die Elektronen und eines für die Kerne aufgetrennt.^[207] Hierfür kann man den Zustand des Systems als Produkt der rein elektronischen Zustände $|\phi\rangle$ und Vibrationszustände $|\chi\rangle$ darstellen:

$$\psi = \phi\chi \quad \text{bzw.} \quad |\psi\rangle = |\phi; \chi\rangle \tag{6.55}$$

Dieser Ansatz ist auch Grundlage des Franck-Condon Prinzips.^[208,209] Der Gesamtdipoloperator \mathbf{d}_{ges} setzt sich aus den Beiträgen der Elektronen und der Kerne zusammen:

$$\mathbf{d}_{ges} = \mathbf{d}_{el} + \mathbf{d}_v \tag{6.56}$$

Mit dem Ausgangszustand $|\phi_m; \chi_k\rangle$ und dem Endzustand $|\phi_n; \chi_l\rangle$ ergibt sich somit in einer ersten Näherung:^[210]

$$\langle \phi_m; \chi_k | \mathbf{d}_{ges} | \phi_n; \chi_l \rangle = \langle \phi_m; \chi_k | \mathbf{d}_{el} | \phi_n; \chi_l \rangle + \langle \phi_m; \chi_k | \mathbf{d}_v | \phi_n; \chi_l \rangle \tag{6.57}$$

In dieser Näherung ist das Übergangsdipolmoment unabhängig von der Position der Kerne, was bei geringer Auslenkung der Kerne und im Vergleich zur elektronischen Anregung langsamer Bewegung der Kerne zulässig ist. Die strikte Trennung der Behandlung von Elektronen und Kernen ermöglicht es, die Terme wiederum als Produkt darzustellen. Für den ersten Term erhält man:

$$\langle \phi_m | \mathbf{d}_{el} | \phi_n \rangle \langle \chi_k | \chi_l \rangle \quad (6.58)$$

Das Überlappungsintegral der Schwingungsfunktionen wird als Franck-Condon Amplitude bezeichnet und ist ein Maß für die Kopplung der Schwingungszustände an den elektronischen Übergang $m \rightarrow n$. Das Quadrat des Überlappungsintegrals wird als Franck-Condon Faktor bezeichnet und ist proportional zur Intensität des jeweiligen Übergangs. Der zweite Term enthält den Faktor $\langle \phi_m | \phi_n \rangle$, welcher aufgrund der Orthogonalität der elektronischen Wellenfunktion null ist. Um die Beteiligung der Schwingungszustände (k,l) an den möglichen Übergängen im 4-Niveau-System zu berücksichtigen, sollten somit bei der Berechnung der Übergangsdipolmomente die zugehörigen Franck-Condon Amplituden bestimmt werden:

$$\langle g; k | \boldsymbol{\mu} | e; l \rangle = \boldsymbol{\mu}_{eg} \langle k | l \rangle \quad (6.59)$$

Es wurde eine Vielzahl an theoretischen Arbeiten zur Bestimmung der Kopplung der Schwingungen an elektronische Übergänge veröffentlicht (eine Auswahl ist in^[211-215] gegeben). Ich möchte hier das vereinfachte Modell einer linearen Kopplung verwenden. Hierbei wird die Potentialfläche des angeregten Zustands durch eine Verschiebung des Potentials des Grundzustands entlang der Normalkoordinate Q angenähert und die Frequenzen ω_k und ω_l der beteiligten Schwingungsmoden entsprechend gleich gesetzt. Die explizite Herleitung des Modells wurde durch Cederbaum und Domcke gezeigt, hier soll lediglich die Idee aufgezeigt werden. Die Notation erfolgt nach diesen Originalarbeiten.^[212, 216, 217] Unter Verwendung der Erzeugungs- und Vernichtungsoperatoren b_s^\dagger und b_s ergibt sich der Hamiltonoperator \tilde{H}_0 für die Schwingung im angeregten elektronischen Zustand:^[212]

$$\begin{aligned} \tilde{H}_0 = & \sum_{s=1}^M \omega_s \left(b_s^\dagger b_s + \frac{1}{2} \right) + \sum_{s=1}^M \kappa_s (b_s + b_s^\dagger) \\ & + \sum_{s,s'=1}^M \gamma_{s,s'} (b_s + b_s^\dagger) (b_{s'} + b_{s'}^\dagger) + \sum_{s,s'=1}^M \tau_{s,s'} (b_s - b_s^\dagger) (b_{s'} - b_{s'}^\dagger) \end{aligned} \quad (6.60)$$

Die Operatoren lassen sich aus der dimensionslosen Normalkoordinate $\mathbf{Q}_s = \sqrt{m_{\text{red}} \omega / \hbar} \mathbf{R}$ ableiten:

$$Q_s = \frac{1}{\sqrt{2}} (b_s + b_s^\dagger) \quad (6.61)$$

$\gamma_{ss'}$ und $\tau_{ss'}$ sind Kopplungskonstanten zweiter Ordnung und werden im Weiteren nicht berücksichtigt. Die lineare Kopplungskonstante κ_s erhält man aus der Steigung der Potentialkurve $V(Q)$:

$$\kappa_s = \frac{1}{\sqrt{2}} \left(\frac{\partial V}{\partial Q_s} \right) \quad (6.62)$$

Durch diese lineare Kopplung kommt es zur Verschiebung der Potentialfläche des angeregten Zustands. Berechnet man nun die Übergangswahrscheinlichkeit basierend auf diesem Ansatz ergibt sich für das Überlappungsintegral $\langle k | U | l \rangle$ zwischen den verschobenen Oszillatorfunktionen $|k\rangle$ und $|l\rangle$:^[216,218]

$$\langle k | U | l \rangle = \prod_{s=1}^M e^{-a_s^2/2} \left(\frac{k_s!}{l_s!} \right)^{1/2} a_s^{l_s-k_s} L_{l_s}^{l_s-k_s}(a_s^2) \quad \text{für } l_s \geq k_s \quad (6.63)$$

U stellt hierbei einen Transformationsoperator für die Verschiebung der Potentialkurven und $L_k^{l-k}(a_s^2)$ ein zugeordnetes Laguerre-Polynom dar. Der Parameter $a_s = (\kappa_s/\omega_s)$ ist dimensionslos und proportional zur Verschiebung der Potentialkurven d (in der Dimension von \mathbf{R}):

$$\frac{\kappa_s}{\omega_s} = d \left(\frac{m_{red} \omega}{2\hbar} \right)^{1/2} \quad (6.64)$$

$(\kappa_s/\omega_s)^2$ ist der sogenannte Huang-Rhys Faktor S_{HR} , aus welchem sich die Franck-Condon Faktoren für die Übergänge aus dem Schwingungsgrundzustand berechnen lassen:

$$|\langle 0 | n \rangle|^2 = \frac{S_{HR}^n}{n!} e^{-S_{HR}} \quad (6.65)$$

Für die Berechnung der Franck-Condon Amplituden nach Gleichung 6.63 sollen nun die vier Zustände $|g\rangle = |g; 0\rangle$, $|v\rangle = |g; 1\rangle$, $|e\rangle = |e; 0\rangle$ und $|w\rangle = |e; 1\rangle$ berücksichtigt werden. Mit den zugeordneten Laguerre Polynomen $L_0^j(a^2) = 1$ und $L_1^j(a^2) = -a^2 + j + 1$ ergibt sich für die Franck-Condon Amplituden:

$$\begin{aligned} \langle 0 | U | 0 \rangle &= e^{-a^2/2} \approx 1 \\ \langle 1 | U | 1 \rangle &= e^{-a^2/2} (1 - a^2) \approx 1 \\ \langle 0 | U | 1 \rangle &= -\langle 1 | U | 0 \rangle = e^{-a^2/2} a \approx a \end{aligned} \quad (6.66)$$

Ergänzt man nun wie in Gleichung 6.59 das jeweilige Übergangsdipolmoment mit der zugehörigen Franck-Condon Amplitude erhält man analog zu Gleichung 6.53 für die (v,g) Kohärenz im 4-Niveau-System:

$$\rho_{vg}^{(2)} \approx p_g \frac{\Omega_1 \Omega'_2 e^{-i(\omega_1 - \omega_2)t}}{(\omega_1 - \omega_2 - \omega_{vg})} \left[\frac{a}{(\omega_1 - \omega_{eg})} - \frac{a}{(\omega_1 - \omega_{wg})} \right] \quad (6.67)$$

Hier wurden wiederum bereits die Rabi Frequenzen Ω_1 und Ω'_2 für die elektronische Anregung bzw. die stimulierte Emission eingesetzt:

$$\begin{aligned}\Omega_1 &= \frac{|\boldsymbol{\mu}_{eg} \cdot \mathbf{E}(\omega_1)|}{\hbar} \\ \Omega'_2 &= \frac{|\boldsymbol{\mu}_{eg} \cdot \mathbf{E}(\omega_2)|}{\hbar} \\ &= \frac{\Omega_2}{a}\end{aligned}\tag{6.68}$$

Die Beiträge der zwei Anregungspfade $g \rightarrow e \rightarrow v$ und $g \rightarrow w \rightarrow v$ unterscheiden sich lediglich im Vorzeichen und durch eine geringe Energiedifferenz im Nenner. Sie heben sich daher nahezu auf. Die Kohärenz $\rho_{vg}^{(2)}$ beruht lediglich auf diesem geringen Unterschied im Nenner.

Für das geplante Experiment ist die Erzeugung der Schwingungspopulation in $|v\rangle$ durch den kohärenten Anregungsprozess von Interesse, d.h. der Übergang von $|g\rangle$ nach $|v\rangle$. Für diese Anregung kann man sich eine deutlich vereinfachte Beschreibung vorstellen. Hierbei werden lediglich der Anfangs- und der Endzustand sowie ein Gesamtanregungsfeld mit den Frequenzkomponenten ω_1 und $-\omega_2$ berücksichtigt. Der Ausdruck für die Kohärenz $\rho_{vg}^{(2)}$ vereinfacht sich somit zu dem eines Zwei-Niveau-Systems:

$$\rho_{vg}^{(2)} \approx p_g \frac{\Omega_{eff} e^{-i(\omega_1 - \omega_2)t}}{(\omega_1 - \omega_2 - \omega_{vg})}\tag{6.69}$$

Aus der Kopplung mit dem Gesamtanregungsfeld ergibt sich eine effektive Rabi Frequenz Ω_{eff} . Vergleicht man den vereinfachten Ausdruck in 6.69 mit der kompletten Beschreibung für das Vier-Niveau-System in 6.67 lässt sich die effektive Rabi Frequenz unter Berücksichtigung aller im Anregungsprozess beteiligten Zustände aufstellen:

$$\Omega_{eff} = \frac{-\omega_v \Omega_1 \Omega'_2 a}{(\omega_1 - \omega_{eg})(\omega_1 - \omega_{wg})} \quad \text{mit} \quad -\omega_w = \omega_{eg} - \omega_{wg} \approx -\omega_v\tag{6.70}$$

Somit kann der gesamte Anregungsprozess mit der vereinfachten Gleichung 6.69 für ein Zwei-Niveau-System beschrieben werden. Dies werde ich im nächsten Abschnitt zur Berechnung der aus kohärenter Anregung zu erwartenden Schwingungspopulation in $|v\rangle$ nutzen.

Die zu erwartende Schwingungspopulation aus kohärenter Anregung unter Berücksichtigung der Dämpfung des Systems Ein dynamisches Quantensystem liegt im Realfall nicht isoliert vor, sondern nimmt seine Umgebung wahr. Bisher wurde die Wechselwirkung des Quantensystems mit der Umgebung lediglich in Form einer Störung

durch das Anregungsfeld behandelt. Dämpfung des Systems durch Wechselwirkung mit der Umgebung wurde noch nicht berücksichtigt. Im Folgenden möchte ich nun aufzeigen, welchen Einfluss diese auf die Populationen und Kohärenzen eines Systems hat. Anschließend werde ich einen Ausdruck für die aus unserem Anregungsverfahren zu erwartende Schwingungspopulation herleiten.

Die Umgebung wird oftmals als ein thermisches Reservoir (Wärmebad) behandelt. Auch diese Wechselwirkung kann mittels eines Störansatzes beschrieben werden. Der Hamiltonoperator setzt sich dann aus drei Komponenten zusammen:

$$H(t) = H_0 + V(t) + H_R \quad (6.71)$$

Der zusätzliche Operator H_R beschreibt die Wechselwirkung mit dem thermischen Reservoir. Für die Bewegungsgleichung des Dichteoperators erhält man hieraus:^[219]

$$\frac{\partial \rho(t)}{\partial t} = \dot{\rho} = -\frac{i}{\hbar} [H_0 + V(t), \rho] + \left(\frac{\partial \rho}{\partial t} \right)_{Relax} \quad (6.72)$$

Bei reiner Wechselwirkung des Quantensystems mit dem thermischen Reservoir wird das System in das thermische Gleichgewicht nach Boltzmann überführt. Solch ein Übergang zwischen Zuständen aufgrund von H_R wird als Relaxation einer Population bezeichnet. Die Population eines Zustands $|m\rangle$ folgt aus den Diagonalelementen $\langle m | \rho | m \rangle$ und somit ergibt sich die zeitliche Entwicklung eines angeregten Zustands $|m\rangle$:

$$\left(\frac{\partial \rho_{mm}}{\partial t} \right)_{Relax} = \sum_n [W_{mn} \rho_{nn} - W_{nm} \rho_{mm}] \quad (6.73)$$

Die Übergangsraten $W_{ij} \equiv W(j \rightarrow i)$ entsprechen den Wahrscheinlichkeiten des zugehörigen Übergangs pro Zeit und tragen entsprechend ihrer Vorzeichen zu einem Zuwachs oder einer Verringerung der Population in den Zuständen bei. Aus den Übergangsraten ergeben sich die korrespondierenden Lebenszeiten T_1 der Zustände.

Auch für die Nebendiagonalelemente lässt sich eine Relaxation beobachten. Die Kohärenz klingt aufgrund der Wechselwirkung mit dem thermischen Reservoir ab, man spricht hierbei von einer Phasenrelaxation oder Dephasierung mit der Zeitkonstanten $T_2 = 1/\Gamma_{mn}$:

$$\left(\frac{\partial \rho_{mn}}{\partial t} \right)_{Relax} = -\Gamma_{mn} \rho_{mn} \quad (6.74)$$

Die Wechselwirkung mit dem thermischen Reservoir treibt das System durch Dephasierung und Populationsrelaxation entgegen dem Anregungsprozess in Richtung des thermischen Gleichgewichts. Für uns ist der Nettoanstieg an Population des angeregten Schwingungszustands $|v\rangle$ von Interesse. Wie ich anhand von Gleichung 6.69 gezeigt

habe, kann man den Gesamtprozess der Erzeugung der Schwingungspopulation p_v in Näherung als Anregung in einem Zwei-Niveau-System betrachten. Die entscheidenden Bewegungsgleichungen für ein Zwei-Niveau-System unter Einfluss von H_0 , $V(t)$ und der Dämpfung und somit den Anregungsprozess von $|g\rangle$ nach $|v\rangle$ sind gegeben durch (vgl. Gleichung 6.72):^[219]

$$i\hbar\dot{\rho}_{vv} = V_{vg}\rho_{gv} - V_{gv}\rho_{vg} + \rho_{gg}W_{vg} - \rho_{vv}W_{gv} \quad (6.75)$$

und

$$i\hbar\dot{\rho}_{vg} = \hbar\omega_{gv}\rho_{vg} - V_{vg}\rho_{gg} + V_{gv}\rho_{vv} - i\hbar\frac{\rho_{vg}}{T_2} \quad (6.76)$$

Hierbei wurde bereits die Energie des ungestörten Systems eingesetzt:

$$[H_0, \rho^{(1)}]_{vg} = (E_v - E_g) \langle v | \rho^{(1)} | g \rangle = \hbar\omega_{vg}\rho_{gv} \quad (6.77)$$

Für die Lösung der Bewegungsgleichungen können eine Reihe von Vereinfachungen verwendet werden. Zum einen kann man davon ausgehen, dass bei Raumtemperatur der Grundzustand nahezu vollständig besetzt ist. Vor Einsetzen der Störung $V(t)$ gilt somit $\rho_{gg} \approx 1$ und $\rho_{vv} \approx 0$. Die Lösung der Bewegungsgleichung für ein ungestörtes System ohne Dämpfung ($V(t)=0$ und $\Gamma_{vg} = 0$) lautet $\rho_{vg}(t) = \rho_{vg}^{(stat)} e^{-i\omega_{vg}t}$. Hieraus lässt sich bereits erkennen, dass es sinnvoll ist, das Gleichungssystem in ein rotierendes Bezugssystem zu überführen. Unter Annahme dass $\omega_{vg} \approx \omega_1 - \omega_2$ (Resonanzbedingung) ist die RWA zulässig und man verwendet folgende Lösung:

$$\begin{aligned} \rho_{vg}(t) &= \rho_{vg}^{(stat)} e^{-i(\omega_1 - \omega_2)t} \\ \text{und} & \\ \dot{\rho}_{vg}(t) &= -i(\omega_1 - \omega_2) \rho_{vg}^{(stat)} e^{-i(\omega_1 - \omega_2)t} \end{aligned} \quad (6.78)$$

Die Amplitude $\rho_{vg}^{(stat)}$ der Oszillation bezieht sich auf den stationären Zustand in der RWA. Ich gehe hierbei analog zur Lösung für die Wechselwirkung eines Quantensystems mit lediglich einem monochromatischen Feld, wie bspw. in^[219,220] beschrieben, vor. Allerdings ist bei unserem Anregungsprozess ein Anregungsfeld mit den Frequenzen ω_1 und $-\omega_2$ beteiligt. Mit der Substitution aus 6.78 erhält man somit für die Bewegungsgleichung 6.76:

$$\begin{aligned} -i(\omega_1 - \omega_2) \rho_{vg}^{(stat)} e^{-i(\omega_1 - \omega_2)t} &= -i\omega_{vg}\rho_{vg}^{(stat)} e^{-i(\omega_1 - \omega_2)t} \\ &+ i\frac{\mu E_0}{2\hbar} (e^{-i(\omega_1 - \omega_2)t} + e^{i(\omega_1 - \omega_2)t}) (\rho_{vv} - \rho_{gg}) \\ &- \rho_{vg}^{(stat)} e^{-i(\omega_1 - \omega_2)t} \Gamma_{vg} \end{aligned} \quad (6.79)$$

Wiederum unter Verwendung der RWA ergibt sich hieraus für das Matrixelement:

$$\rho_{vg}(t) = (\rho_{gg} - \rho_{vv}) \frac{\Omega e^{-i(\omega_1 - \omega_2)t}}{(\omega_1 - \omega_2 - \tilde{\omega}_{vg})} \quad \text{mit} \quad \tilde{\omega}_{vg} \equiv \omega_{vg} - i\Gamma_{vg} \quad (6.80)$$

Man erhält somit Gleichung 6.69 ergänzt durch einen Dämpfungsterm im Nenner. Der Nenner wird somit auch im Resonanzfall nicht null (der Übergang besitzt eine gewisse Linienbreite). Setzt man nun die Lösung für die (v,g) Kohärenz (6.80) in die Bewegungsgleichung der Schwingungspopulation (6.75) ein und vernachlässigt die Populationsrelaxation ($W_{ab} = 0$), erhält man in der RWA:

$$\begin{aligned} i\hbar\dot{\rho}_{vv} &= \frac{\mu E_0}{2} (e^{-i(\omega_1 - \omega_2)t} + e^{i(\omega_1 - \omega_2)t}) (\rho_{gg} - \rho_{vv}) \frac{\Omega e^{-i(\omega_1 - \omega_2)t}}{(\omega_1 - \omega_2 - \tilde{\omega}_{vg})} - c.c. \\ \dot{\rho}_{vv} &= 2(\rho_{gg} - \rho_{vv}) \Omega^2 \frac{\Gamma_{vg}}{(\omega_1 - \omega_2 - \omega_{vg})^2 + \Gamma_{vg}^2} \\ &= 2(\rho_{gg} - \rho_{vv}) \Omega^2 \frac{T_2}{1 + (\omega_1 - \omega_2 - \omega_{vg})^2 T_2^2} \end{aligned} \quad (6.81)$$

Ich möchte nun nochmals den hier entwickelten Ansatz zur Beschreibung der zeitlichen Entwicklung der Schwingungspopulation p_v zusammenfassen. Im vorherigen Abschnitt konnte ich einen Ausdruck für die (v,g) Kohärenz im 4-Niveau-System herleiten. Diese Beschreibung konnte mittels einer effektiven Rabi Frequenz Ω_{eff} für den gesamten Anregungsprozess von $|g\rangle$ nach $|v\rangle$ auch in Analogie zu einem Zwei-Niveau System dargestellt werden. Um den Einfluss des thermischen Reservoirs zu berücksichtigen, wurden anschließend die Bewegungsgleichungen in der Zwei-Niveau Darstellung gelöst. Hierbei wurden eine Reihe von Bedingungen und Näherungen eingesetzt. Ich habe eine resonante Anregung vorausgesetzt ($\omega_{vg} \approx \omega_1 - \omega_2$), was die Überführung in ein rotierendes Koordinatensystem ermöglichte (RWA). Die Phasenrelaxationszeit $T_2 = 1/\Gamma_{vg}$ einer Schwingungsmode liegt in kondensierter Phase und bei Raumtemperatur in der Regel deutlich unter einer Pikosekunde. Wie sich auch bei der Berechnung in Abschnitt 6.4 zeigen wird, gilt daher $\Gamma_{vg} \gg \Omega$. Geht man weiter von sehr kleinen Populationen des angeregten Schwingungszustands aus ($p_v \equiv \rho_{vv} \ll \rho_{gg}$), lässt sich deren zeitlich Entwicklung unter Vernachlässigung der Populationsrelaxation beschreiben durch:

$$\dot{\rho}_{vv} = 2\Omega^2 T_2 \quad (6.82)$$

In unserem Experiment werden Pikosekundenpulse eingesetzt. Durch diese Anregungspulse der Dauer Δt ($\Delta t \gg T_2$) erhält man für die Schwingungspopulation p_v folglich:

$$p_v = 2\Omega^2 T_2 \Delta t \quad (6.83)$$

Diese Beschreibung ist lediglich unter den genannten Voraussetzungen gültig. Die Schwingungspopulation p_v steigt nicht beliebig mit der Dauer der Anregungspulse. Auch für deutlich kürzere Anregungspulse ($\Delta t \leq T_2$) trifft Gleichung 6.83 nicht mehr zu.^[221]

6.3. Der Abfrage-Prozess

Der Abfrage-Prozess der Schwingungspopulation über eine elektronische Anregung ist der entscheidende Schritt zur Einzelmolekülsensitivität. Die Emission aus dem ersten elektronisch angeregten Zustand $|S_1\rangle \equiv |e\rangle$ nach Anregung aus einem angeregten Schwingungszustand wird als anti-Stokes Fluoreszenz bezeichnet.^[222] Die Fluoreszenz ist um die Schwingungsresonanz ω_v kürzerwellig zur Anregungswellenlänge ω_3 verschoben. Hier möchte ich auf die Effizienz dieses Prozess und die zu erwartende Stärke des Fluoreszenzsignals nach Abfragen einer kohärent erzeugten Schwingungsmode eingehen. Auf die anti-Stokes Fluoreszenz aus der thermischen Population der Schwingungszustände gehe ich in den Abschnitten 6.5 und 7.7 ein.

Theoretische Beschreibung Laubereau und Kaiser geben in^[190] eine Beschreibung des Abfrageprozesses einer durch IR-Anregung erzeugten Schwingungspopulation. Auf Basis von Bewegungsgleichungen für ein 4-Niveau-System beschreiben sie die Fluoreszenzintensität F in Abhängigkeit der zeitlichen Verzögerung t_d des Abfragepulses. Ihr Modell beruht allerdings auf einer Reihe von Voraussetzungen, die wir in unserem Experiment so nicht erfüllen. Sie gehen von einem Abfragepuls geringer Intensität und somit einer sehr geringen Population im angeregten Zustand aus ($p_{w,e} \ll p_v$). Wir setzen einen Abfragepuls relativ hoher Intensität ein, um nahe der Sättigungsbedingung zu gelangen. Die Intensität des Fluoreszenzsignals hängt von der Population der Schwingungsmode von Interesse ab. Bei einer Verzögerung des Abfragepulses relativ zur Anregung der Schwingungsmode spiegelt das Fluoreszenzsignal die zeitliche Entwicklung dieser Population wider. Der Beitrag der Population anderer Schwingungsmoden durch Energietransfer kann bei uns im Gegensatz zu Experimenten mit IR-Anregung vernachlässigt werden. Allerdings muss die unterschiedliche Abfrageeffizienz aufgrund der jeweiligen Franck-Condon Faktoren der Schwingungsmoden berücksichtigt werden (s.u.). Die Interpretation dieser Experimente ist somit nicht trivial. Um Zeitkonstanten der einzelnen Prozesse wie Relaxation und Energietransfer aber auch die Beiträge einzelner Schwingungsmoden ermitteln zu können, sind mehrere Experimente notwendig. Auch sind für eine korrekte Berechnung die zeitlichen Profile der Anregungspulse und des Abfragepulses zu berücksichtigen.

Ich werde hier eine Beschreibung der zu erwartenden Fluoreszenzintensität auf Basis der Schwingungspopulation p_v und der klassisch quantenmechanischen Beschreibung einer vibronischen Anregung geben. Für die Wahrscheinlichkeit P_{QM} eines Übergangs von m nach n pro Zeiteinheit erhält man mittels eines Störungsansatzes für die zeitabhängige

Schrödingergleichung (vgl. Abschnitt 6.2.2):^[219]

$$P_{QM} = \frac{|c_n(t)|^2}{t} = \frac{2\pi}{\hbar} |V_{mn}|^2 \delta(E_n - E_m) \quad (6.84)$$

Dieser Ausdruck wird häufig als ‘‘Goldene Regel der Quantenmechanik’’ oder ‘‘Fermis Goldene Regel’’ bezeichnet. Die δ -Funktion beschreibt die Zustandsdichte auf der Energieskala an der Stelle der Resonanz. Die Übergangsrate ist proportional zur Schwächung der Intensität des Anregungslichts I_0 beim Durchgang durch die Probe. Für eine näherungsweise monochromatische Anregung wie in unserem Fall kann die Intensität I_0 als Intergral über die Energiedichte $\rho(\omega)$ im relevanten Spektralbereich betrachtet werden:^[223]

$$I_0 = \int c \cdot \rho(\omega) d\omega = \int I(\omega) d\omega \quad (6.85)$$

Die Intensitätsabnahme dI_0 des Anregungsfeldes entlang der Wegstrecke x durch Absorption ist gegeben durch:

$$dI_0 = -\frac{1}{3} P_{QM} p_v c dx = -\sigma_0 p_v c I_0 dx \quad (6.86)$$

Der Faktor $1/3$ resultiert aus der Polarisationsabhängigkeit des Übergangsdipolmoments μ_{mn} . Die Intensitätsabnahme ist proportional zur Konzentration c der Probe. Der Parameter σ_0 stellt den über den gesamten Frequenzbereich integrierten Wechselwirkungsquerschnitt $\sigma_a(\omega)$ für die Absorption dar:^[223]

$$\sigma_0 = \int \sigma_a(\omega) d\omega \quad (6.87)$$

Die Übergangsrate P_{QM} der Anregung und folglich auch die zu erwartende Fluoreszenzintensität F hängt somit von der Anregungsintensität und dem Wechselwirkungsquerschnitt ab:

$$\frac{1}{3} P_{QM} = \sigma_0 I_0 \quad (6.88)$$

Nicht die gesamte Population aller angeregten Schwingungsmoden trägt zum Fluoreszenzsignal bei. Lediglich die Population p_v der Schwingungsmoden, die ausreichend Energie besitzen, um mittels Abfragepuls in den $|S_1\rangle$ Zustand überführt zu werden, muss berücksichtigt werden. Um den entsprechenden Wechselwirkungsquerschnitt dieser Übergänge aus dem Absorptionsspektrum zu berechnen, kann wiederum das Franck-Condon Prinzip und der daraus resultierende Franck-Condon Faktor FC verwendet werden (s. 6.2.2). Für die Schwingungsmode v ergibt sich:

$$\sigma_{a,v}(\omega) = \int_{\text{um } v} \sigma_a(\omega) d\omega = FC_v \cdot \sigma_0 \quad (6.89)$$

Ferner ist das Spektrum der Anregungsquelle zu berücksichtigen. Bei sehr schmalbandigen Anregungsquellen ($\text{FWHM}_{\text{exc}} < \text{FWHM}_v$) muss der Integrationsbereich entsprechend stärker eingeschränkt werden. Hiermit kann man nun für ein einzelnes Molekül die zu erwartende, zusätzliche Fluoreszenzintensität F aus unserem Anregungsprozess abschätzen. Vernachlässigt man die Relaxation der Population p_v ergibt sich:

$$F = \sigma_{a,v} p_v \phi_f I_3 \Delta t_3 \quad (6.90)$$

Die weiteren Faktoren sind die Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_f sowie die Intensität I_3 und Dauer t_3 des Abfragepulses.

6.4. Abschätzung des zu erwartenden Fluoreszenzsignals

Anhand der gezeigten theoretischen Beschreibung des Experiments kann man die Stärke des zu erwartenden Fluoreszenzsignals F abschätzen. Dafür möchte ich die spektralen Charakteristika des Fluorophors und der Anregungsquellen, auf welche ich in Kapitel 7 näher eingehen werde, verwenden.

Für die Anregung der Schwingungspopulation werden Pulse mit etwa $\Delta t = 6$ ps Dauer und einer Repetitionsrate von 76 MHz verwendet. Als Durchschnittsleistung P setze ich 10 mW pro Anregungsquelle auf der Probe an. Die Pulsspitzenleistung $P_{\text{Puls}} = P / (76 \text{ MHz} \cdot \Delta t)$ beträgt somit 22 W. Bei einem Fokus mit dem Radius $r = 500$ nm erhält man die Anregungsintensität $I = P_{\text{Puls}} / (\pi r^2) = 2,8 \cdot 10^{13} \text{ W/m}^2$. Die Stärke der Anregungsfelder für die Schwingungspopulation lässt sich aus der Intensität der Anregungspulse berechnen:

$$E_i = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{2I}{c\epsilon_0}} = 73 \cdot 10^6 \text{ V/m} \quad (6.91)$$

Der Faktor $1/2$ rührt daher, dass bei der Herleitung lediglich die positiven Frequenzkomponenten berücksichtigt wurden. Das Übergangsdipolmoment μ_{eg} lässt sich aus der natürlichen Fluoreszenzlebensdauer τ_n und der Lage des Übergangs $e \rightarrow g$ berechnen:^[223]

$$|\mu_{eg}|^2 = 3 \frac{\pi \epsilon_0 \hbar}{\tau_n} \left(\frac{\lambda_{eg}}{2\pi} \right)^3 \quad (6.92)$$

Aus der gemessenen Fluoreszenzlebensdauer τ_f und der Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_f ergibt sich die benötigte natürliche Fluoreszenzlebensdauer τ_n :

$$\tau_n = \tau_f / \phi_f = 4,26 \text{ ns} / 0,59 = 7,2 \text{ ns} \quad (6.93)$$

Die Lage des rein elektronischen Übergangs lässt sich durch den Schnittpunkt des Absorptions- und Emissionsspektrums abschätzen ($\lambda_{eg} = 761 \text{ nm}$, $\omega_{eg} = 2,5 \cdot 10^{15} \text{ rad/s}$).^[224] Hiermit erhält man ein Übergangsdipolmoment μ_{eg} von $4,7 \cdot 10^{-29} \text{ C m}$. Daraus ergeben sich die Rabi-Frequenzen der Anregungsfelder $\Omega = \Omega_1 = \Omega_2 = \mu_{eg} E_i / \hbar = 3,3 \cdot 10^{13} \text{ rad/s}$. Die Frequenz des ersten Pumpimpulses $\omega_1 = 2,0 \cdot 10^{15} \text{ rad/s}$ ($\lambda_1 = 928 \text{ nm}$) folgt aus der betrachteten Schwingungsresonanz ω_v ($\tilde{\nu}_v = 1380 \text{ cm}^{-1}$, $\omega_v = 2,6 \cdot 10^{14} \text{ rad/s}$) und der aufgrund der Anregungsquelle fixierten Frequenz $\omega_2 = 1,8 \cdot 10^{15} \text{ rad/s}$ ($\lambda_2 = 1064 \text{ nm}$). Die Effizienz der Anregung hängt von der Lage des virtuellen Niveaus ab. Befindet sich dieses nahe einem elektronischen Zustand (hier dem Zustand $|e\rangle$), erfolgt eine resonante Verstärkung. Der entscheidende Parameter hierfür ist die Differenzfrequenz $\delta\omega = \omega_1 - \omega_{eg} \approx \omega_1 - \omega_{wg} = 0,45 \cdot 10^{15} \text{ rad/s}$. Die Intensität des Übergangs und somit der Franck-Condon Faktor wird auf etwa 0,04 abgeschätzt. Der Parameter a beträgt somit 0,2 und die effektive Rabi-Frequenz Ω_{eff} ergibt:

$$\Omega_{eff} = \frac{\omega_v \Omega^2 a}{(\delta\omega)^2} = 2,7 \cdot 10^{11} \text{ rad/s} \quad (6.94)$$

Es zeigt sich im Vergleich zu der Beispielrechnung in unserer Publikation,^[221] dass die Verwendung eines Fluorophors im NIR ($\lambda_{eg} = 761 \text{ nm}$) in Kombination mit einer Schwingungsanregung mittels Frequenzen im NIR von entscheidendem Vorteil ist. Bei einem elektronischen Übergang im Sichtbaren ($\lambda_{eg} = 500 \text{ nm}$) und gleicher Anregungsfrequenz ω_1 ist die Differenzfrequenz um einen Faktor 4 größer, die effektive Rabi-Frequenz somit um einen Faktor 16 geringer.

Um nun die Schwingungspopulation p_v aus kohärenter Anregung berechnen zu können, benötigt man noch die Phasenrelaxationszeit T_2 . Diese kann bei Raumtemperatur und in kondensierter Phase deutlich unter einer Pikosekunde liegen. Nimmt man einen Wert von $T_2 = 0,1 \text{ ps}$ an, bekommt man eine Populationswahrscheinlichkeit $p_v = 2 \Omega_{eff}^2 \Delta t T_2$ von $8,7 \cdot 10^{-2}$ pro Anregungspuls bzw. $6,6 \cdot 10^6$ Anregungen pro Sekunde.

Für die Berechnung der zu erwartenden Emission werden nun noch der Wechselwirkungsquerschnitt $\sigma_{a,v}(\lambda_3)$ der elektronischen Anregung aus der populierte Schwingungsmode und die Anregungsintensität des Abfragepulses (in der Einheit $[\text{Photonen s}^{-1} \text{ m}^{-2}]$) benötigt. Der Wechselwirkungsquerschnitt lässt sich aus dem Absorptionsspektrum ermitteln:

$$\sigma_{a,v}(\lambda_3) = \epsilon (\lambda = 2 \pi c (\omega_{eg} + \omega_v)^{-1}) \cdot \ln 10 \cdot N_A^{-1} = 1,7 \cdot 10^{-20} \text{ m}^2 \quad (6.95)$$

Bei der Verwendung von Pikosekundenpulsen kann deren spektrale Bandbreite vernachlässigt werden. Für Einzelmolekülexperimente verwendet man in der Regel Anregungsleistungen von wenigen μW . Um die geringe Population von $|v\rangle$ im Vergleich zum Grundzustand auszugleichen, wird eine höhere Anregungsleistung von $100 \mu\text{W}$ eingesetzt. Bei

$\lambda_3 = 850 \text{ nm}$ ($\omega_3 = \omega_{\text{eg}} - \omega_{\text{v}}$) entspricht dies $4,3 \cdot 10^{14}$ Photonen/s und somit einer Intensität von $I_3 = 5,5 \cdot 10^{26}$ Photonen $\text{s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ bzw. $7,2 \cdot 10^{18}$ Photonen m^{-2} pro Anregungspuls. Für eine Quantenausbeute von 0,59 erhält man aus Gleichung 6.90 eine Emissionsrate $F \approx 5 \cdot 10^5$ Photonen/s. Bei einer Detektionseffizienz im Prozentbereich sollte somit noch ein Fluoreszenzsignal gemessen werden können.

6.5. Hintergrundquellen

Ultimatives Ziel dieses Projekts ist die Durchführung des Experiments an einzelnen Molekülen. Obgleich die Fluoreszenzspektroskopie auf Einzelmolekülniveau inzwischen routinemäßig in einer Vielzahl von Arbeitsgruppen durchgeführt wird, darf man nicht vergessen, dass hierbei lediglich das Emissionsfeld eines einzelnen Moleküls detektiert wird. Auf den experimentellen Ansatz zur Detektion einzelner Moleküle, mit dem die notwendige Sensitivität und auch Selektivität erreicht werden kann, werde ich in Abschnitt 7.2 eingehen. Hier werde ich zunächst nur auf die möglichen Hintergrund- bzw. Konkurrenzprozesse zu unserem Anregungsverfahren eingehen, die auch für Experimente an wenigen Molekülen eine Rolle spielen. Die zugehörigen Experimente werde ich in Abschnitt 7.6 beschreiben.

6.5.1. CARS

Unser Anregungsschema entspricht einem elektronisch resonanzverstärkten CARS Experiment am zu untersuchenden Fluorophor (vgl. $\chi_{\text{el}}^{(3)}$ in Abschnitt 2.2.2). Mittels der elektronisch resonanzverstärkten CARS Spektroskopie können deutlich höhere Sensitivitäten erreicht werden. Entsprechende Experimente wurden bereits in den 1970ern durchgeführt.^[225] Allerdings konnten bis heute auch unter Verwendung aktueller technischer Ansätze wie dem “pulse shaping” zur dreifach resonanten CARS Spektroskopie die Sensitivität lediglich auf wenige hundert Moleküle erhöht werden.^[226] Die in der CARS Spektroskopie entscheidende kohärente Verstärkung des Feldes bei ω_{CARS} benötigt eine Mindestzahl an Streuzentren. Für sehr geringe Konzentrationen bzw. auf Einzelmolekülniveau kann somit auch das elektronisch resonanzverstärkte CARS Signal des Fluorophors vernachlässigt werden.

Für die geplanten Experimente befinden sich die Fluorophore in Lösung oder in einer Matrix eingebettet. Dementsprechend befinden sich eine Vielzahl an Lösungsmittel- bzw. Matrixmolekülen im Anregungsvolumen und die obige Argumentation greift nicht mehr. Wie ich in Abschnitt 2.2 aufgezeigt habe, kann der CARS Prozess auch nichtresonant erfolgen. Durch die Wahl des Lösungsmittels bzw. der Matrix kann die Stärke des CARS

Signals daher verringert, aber nicht komplett unterdrückt werden. Für die Diskussion des CARS Hintergrunds möchte ich nochmals Gleichung 2.9 zur Intensität des CARS Signals wiedergeben:

$$I_{CARS} \propto \left| \chi_{CARS}^{(3)} \right|^2 I_p I_{p'} I_{st} L^2 \left(\frac{\sin(\Delta k L / 2)}{\Delta k L / 2} \right)^2 \quad (6.96)$$

Um einen nichtlinearen Prozess anzutreiben, sind hohe Anregungsintensitäten I_p , $I_{p'}$ und I_{st} notwendig. Die Intensität des Abfragepulses $I_{p'} \propto |\mathbf{E}(\omega_3)|^2$ kann sehr gering gewählt werden, da für den gewünschten Prozess eine elektronisch resonante Anregung erfolgt. Das CARS Signal wird dadurch hingegen stark verringert. In der si-Funktion zeigt sich die Abhängigkeit von der Phasenanpassung. Für eine im gesamten Anregungsvolumen homogene Probe, wie das Lösungsmittel oder eine dicke Polymermatrix, wird das CARS Signal hauptsächlich nach vorne gerichtet sein.^[38] Für das Fluoreszenzexperiment wird eine Detektion in Epi-Geometrie verwendet und somit nur ein sehr geringer Anteil des erzeugten CARS Signals eingesammelt. Sollte trotz all dieser Argumente der CARS Prozess dennoch ein Problem für das Experiment darstellen, könnte das CARS Signal auch mittels zeitaufgelöster Detektion herausgefiltert werden. Das nichtresonante CARS Signal klingt instantan (< 1 ps) ab, das Fluoreszenzsignal dagegen entsprechend der Fluoreszenzlebensdauer (oft > 1 ns).

6.5.2. Zwei-Photonen angeregte Fluoreszenz

Eine weitere nichtlinear optische Hintergrundquelle ist Fluoreszenz nach Zwei-Photonen Anregung (2PA). Wie in Abb. 6.5 dargestellt, kann der Fluorophor durch zwei Photonen der Pumpulse bei ω_1 bzw. ω_2 elektronisch angeregt werden. Hierbei kann die Anregung sowohl "rein" als auch "gemischt" erfolgen. Aufgrund des nichtlinearen Charakters der Anregung kann auch hier der Beitrag durch den Abfragepuls bei ω_3 vernachlässigt werden. Bei dem von uns verwendeten Fluorophor handelt es sich um ein (zumindest nahezu) zentrosymmetrisches Molekül (s. Abschnitt 7.3). Wie beispielsweise in einem Übersichtsartikel von Denning, Anderson *et al.* dargestellt, hängt der Wechselwirkungsquerschnitt δ der 2PA oftmals nur von der Wechselwirkung des Anregungsfeldes mit drei Zuständen ab.^[227] Das Maximum des Wechselwirkungsquerschnitts lässt sich für dieses vereinfachte Zustandsmodell abschätzen:^[227]

$$\delta_{max} = C \left[\frac{\langle \boldsymbol{\mu}_{ge} \boldsymbol{\mu}_{ef} \rangle}{E_{ge} - h\nu} \right]^2 \quad (6.97)$$

C ist ein konstanter Faktor. Für die Übergangsdipolmomente μ_{ge} und μ_{ef} muss über deren mögliche Orientierungen gemittelt werden. In Abb. 6.5 ist das zugehörige Energieniveaudiagramm dargestellt. Der Grundzustand $|g\rangle$ und Endzustand $|f\rangle$ sind gerade,

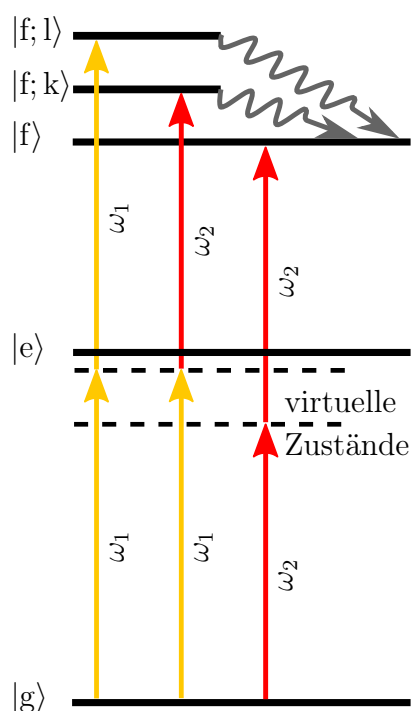


Abbildung 6.5.: Anregungsschema für die Fluoreszenz nach Zwei-Photonen Anregung zentrosymmetrischer Chromophore. Die Anregung kann durch beide Pumpulse erfolgen und ist hinsichtlich des Übergangsdipolmoments erlaubt.

der Zwischenzustand $|e\rangle$ ungerade. Die Ein-Photonen Übergänge $g \leftrightarrow e$ und $e \leftrightarrow f$ sind somit nach der Laporte-Regel erlaubt, der Ein-Photonen Übergang $g \leftrightarrow f$ ist hingegen paritätsverboten. Die 2PA erfolgt allerdings über einen virtuellen Zustand (vgl. 2.1). Für die Eigenschaften dieses virtuellen Zustands ist der Zwischenzustand $|e\rangle$ maßgeblich.^[228, 229] Dies führt zu einer Umkehr der Auswahlregel für die 2PA bei zentrosymmetrischen Molekülen, der Übergang $g \rightarrow f$ ist für 2PA erlaubt. Der Hintergrund durch 2PA Fluoreszenz muss daher getrennt ermittelt (Anregung nur mit ω_1 oder ω_2 , sowie mit ω_1 und ω_2) und von dem Gesamtsignal bei Anregung mit allen Anregungsfeldern abgezogen werden. Um den Hintergrund durch 2PA Fluoreszenz zu minimieren, können je nach spektralen Eigenschaften des Fluorophors die Anregungsfelder $\mathbf{E}(\omega_1)$ und $\mathbf{E}(\omega_2)$ spektral so verschoben werden, dass entweder die Anregungsenergie für das Erreichen von $|f\rangle$ nicht mehr ausreicht oder aber die Resonanzverstärkung, die aus dem Nenner in Gleichung 6.97 hervorgeht, minimiert wird.

6.5.3. Anti-Stokes Fluoreszenz

Der in Abschnitt 6.3 beschriebene Abfrageprozess für die Schwingungspopulation ergibt ein Fluoreszenz Signal proportional zur gesamten Schwingungspopulation $p_{v,ges}$. Diese beinhaltet neben dem kohärent erzeugten Anteil p_v auch einen thermischen Anteil, für welchen die Diskussion aus 6.3 ebenso zutrifft. Letzter stellt eine weitere Hintergrundquelle dar. Die thermische Besetzung der Schwingungszustände im thermischen Gleichgewicht kann nach Boltzmann berechnet werden:

$$\frac{N_1}{N_2} = e^{-\frac{E_{12}}{k_B T}} \quad (6.98)$$

N_1 und N_2 sind Teilchenzahlen und E_{12} der Energieunterschied der Zustände. Bei einer Raumtemperatur von $T = 293 \text{ K}$ ergibt sich mit der Boltzmann-Konstanten k_B und in Wellenzahlen ausgedrückt eine thermische Energie von:

$$\tilde{\nu} = \frac{k_B T}{hc} \approx 200 \text{ cm}^{-1} \quad (6.99)$$

Für die interessierende Schwingungsbande bei ca. 1360 cm^{-1} erhält man somit für das Verhältnis $N_v/N_g \approx 0,001$. Alle Schwingungszustände, deren Energie ausreicht um mittels des Abfragepulses in den ersten elektronisch angeregten Zustand transferiert zu werden, tragen entsprechend ihrer thermischen Besetzung und der Kopplung an den elektronischen Übergang zur anti-Stokes Fluoreszenz bei. Die anti-Stokes Fluoreszenz stellt das stärkste Hintergrundsignal dar. Wie ich später zeigen werde, reicht die thermische Population der Schwingungszustände aus, ein nachweisbares anti-Stokes Fluoreszenzsignal einzelner Moleküle zu erzeugen.

Kapitel 7.

Experimentelle Umsetzung

Nach der theoretischen Beschreibung und Diskussion der schwingungsselektiven anti-Stokes Fluoreszenzanregung werde ich nun auf die experimentelle Umsetzung dieses Experiments eingehen. Die Ansprüche an den Versuchsaufbau sind hierbei sehr hoch. Zum einen handelt es sich um ein nichtlinear optisches Experiment. Dies spielt vor allem in Bezug auf die Anregungsquellen und den Anregungsstrahlengang eine Rolle. In Abschnitt 7.1 gehe ich hierauf genauer ein. Auf der anderen Seite wollen wir am Ende Messungen an einzelnen Molekülen durchführen. Dies muss bei der Planung des Mikroskops und der Detektion berücksichtigt werden. In Abschnitt 7.2 beschreibe ich das von mir aufgebaute, einzelmolekülempfindliche Mikroskop. Auch die Auswahl geeigneter Fluorophore möchte ich in diesem Kapitel diskutieren und die verwendeten Pyrrolopyrrol-Cyanine vorstellen.

Anschließend möchte ich erste Vorarbeiten für das eigentliche Experiment vorstellen. Die Eignung des experimentellen Aufbaus für nichtlinear optische Experimente wurde mittels Zinkoxid Nanopartikeln nachgewiesen. Auch Einzelmolekülsensitivität konnte mit dem Zielmolekül erreicht werden. Weiter wurden erste Experimente in verdünnter Lösung durchgeführt, um die Beiträge, der in Abschnitt 6.5 bereits diskutierten Hintergrundprozesse abschätzen zu können. Es wurden Ansätze zur Minimierung der Beiträge durch Fluoreszenz nach Zwei-Photonen Anregung als auch den thermischen Hintergrund der anti-Stokes Fluoreszenz gefunden. Als bedeutenden Schritt in Bezug auf die Realisierbarkeit des Projektes kann die Durchführung von Einzelmolekülexperimenten mittels anti-Stokes Fluoreszenz bezeichnet werden. Bereits aufgrund der rein thermischen Population konnte ein nachweisbares anti-Stokes Fluoreszenzsignal einzelner Moleküle generiert werden.

7.1. Anregungsquellen

In diesem Abschnitt werde ich zunächst die Anforderungen an die Anregungsquellen auflisten und dann die Umsetzung im Experiment zeigen. Im Zuge dessen gehe ich sowohl auf den Strahlengang als auch die Verwendung zweier Rauschkompensatoren (“Noise-Eater”) zur Unterdrückung von Intensitätsfluktuationen der Anregungsquellen ein.

7.1.1. Anforderungen an die Anregungsquellen

Für das geplante Experiment werden gepulste Anregungsquellen bei den drei Frequenzen ω_1 , ω_2 und ω_3 benötigt. Die Anforderungen an die Lichtquellen sind mit denen aus der CARS Mikroskopie vergleichbar (s. 3.1). Die Pulszüge müssen synchronisiert sein. Zunächst sind Pulse mit Dauern von 1-10 ps von Vorteil. Diese sind einerseits noch ausreichend kurz, um zeitaufgelöste Experimente zu ermöglichen. In kondensierter Phase wurden meist Relaxationszeiten von mehreren Pikosekunden beobachtet.^[190] Andererseits sind sie auch spektral genügend schmal ($\leq 10 \text{ cm}^{-1}$), um einzelne Schwingungsbanden aufzulösen. Eine der Pumpfrequenzen $\omega_{1,2}$ und der Abfragepuls bei ω_3 sollten durchstimmbare sein. Die Variation von $\omega_v = \omega_1 - \omega_2$ ermöglicht die Aufnahme eines Schwingungsspektrums. Die absoluten Werte der Frequenzen ω_1 und ω_2 sind nicht zwingend vorgegeben. Analog zur Argumentation bei der CARS Mikroskopie bietet sich der NIR-Bereich an. Die Frequenz ω_3 muss entsprechend der Energielücke des Farbstoffs und der Schwingungsmode gewählt werden. In unserem Fall lag sie ebenfalls im NIR. Für zeitaufgelöste Experimente sollten sowohl die Pumpimpulse bei ω_1 und ω_2 gegeneinander verzögert werden können, als auch der Abfragepuls gegenüber diesen. So sind sowohl Kontrollexperimente, wie die Überprüfung der zugrunde liegenden Prozesse für die diversen Beiträge zum Fluoreszenzsignal, als auch die Verfolgung der zeitlichen Entwicklung der Schwingungspopulation möglich.

7.1.2. Die Anregungsquellen

Die bereits in Abschnitt 3.1 beschriebenen Anregungsquellen erfüllen die aufgeführten Anforderungen. Die Fundamentale des Pumplasers von High Q kann in Kombination mit dem OPO für die Schwingungsanregung eingesetzt werden. Es kann sowohl der Signalstrahl des OPO als ω_1 als auch der Idler als ω_2 eingesetzt werden. Die Optiken des OPOs sind auf den Signalstrahl optimiert (Signal-resonanter OPO). So sind beispielsweise Kollimation und Strahlprofil des Idlers deutlich schlechter als für den Signalstrahl. Daher wurde zunächst auch der Signalstrahl in Kombination mit der Fundamentalen des Pumplasers verwendet. Im Zuge der Experimente stellte sich die größere Wellenlänge des Idlers allerdings als wichtiger Vorteil in Bezug auf den Hintergrund heraus (vgl. 7.6).

Daher wurde auch dieser in das Experiment integriert.

Der Ti:Sa-Laser liefert den Abfragepuls bei ω_3 . Mittels des SynchroLock kann dessen Pulszug relativ zu dem des OPOs verzögert werden. Ein etwaiger Vorteil im Pumpprozess durch die Verwendung der kürzeren Pulse des Ti:Sa-Lasers bei ω_1 ist nicht gegeben, da sich dadurch auch die Wechselwirkungszeit mit dem Puls bei ω_2 verkürzt.

7.1.3. Der Anregungsstrahlengang

In Abb. 7.1 ist der Strahlengang von den Anregungsquellen bis zum Mikroskop aufgezeigt. Da es sich um ein nichtlinear optisches Experiment handelt, greifen die Argumente aus 3.1 erneut. Der Strahlengang für 1064 nm, Ti:Sa und Signal des OPOs stimmt mit dem aus Abbildung 3.8 bis nach dem 50:50-Strahlteiler überein. Die überlappten Strahlen werden mittels Teleskop T6 auf geweitet, so dass die rückseitige Apertur des Objektivs überfüllt und dessen maximale N.A. genutzt wird. Für den Idler wurde ebenfalls ein motorisierter Verschiebetisch in der Verzögerungsstrecke eingesetzt, so dass der zeitliche Überlapp der Pulszüge variiert werden konnte. Kollimation und Aufweitung des Idler Strahls erfolgte in Teleskop T7. Der Idler wurde mittels eines dichroitischen Spiegels mit den anderen Frequenzen überlappt. Über das Periskop P3/P4 und den Spiegel ES2 wurde das Anregungslicht in das Mikroskop eingekoppelt.

Stabilisierung der Anregungsintensitäten Aus den theoretischen Vorüberlegungen erwarten wir eine deutliche Signalerhöhung durch die kohärente Schwingungsanregung verglichen zu dem rein thermischen Fluoreszenzsignal. Wie in 8 beschrieben, erfolgen erste Vorversuche in verdünnter Lösung und die tatsächliche Signalstärke aus unserem Prozess verglichen zum Hintergrund kann zunächst noch relativ gering ausfallen. Wir hoffen basierend auf ersten Erfahrungen den Einfluss der experimentellen Parameter besser einschätzen zu können. Die verwendeten Lichtquellen zeigen auch unter guten Voraussetzungen eine Intensitätsfluktuation im Bereich von $\pm 1\%$ auf einer Minutenzeitskala. Im Verlauf der Arbeit verschlechterten sich die Arbeitsbedingungen allerdings zunehmend und wir konnten Intensitätsfluktuationen im Bereich von mehreren Prozent beobachten. In der CARS Mikroskopie ergab sich aus diesen Instabilitäten teilweise eine Variation der Signalintensitäten, die in den Aufnahmen als helle bzw. dunklere Streifen auftraten. Durch Mitteln mehrerer Aufnahmen konnte dies allerdings problemlos ausgeglichen werden. Für das Fluoreszenzexperiment waren diese unregelmäßigen Intensitätsfluktuationen sehr viel problematischer. Wir wollen eine unter Umständen zunächst geringe Signalvariation in einer Fluoreszenztrajektorie detektieren. Fluktuationen der Anregungsleistung sollten daher nach Möglichkeit minimiert werden. Um dies zu bewerkstelligen wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von Stefan Schütter ein Noise-Eater

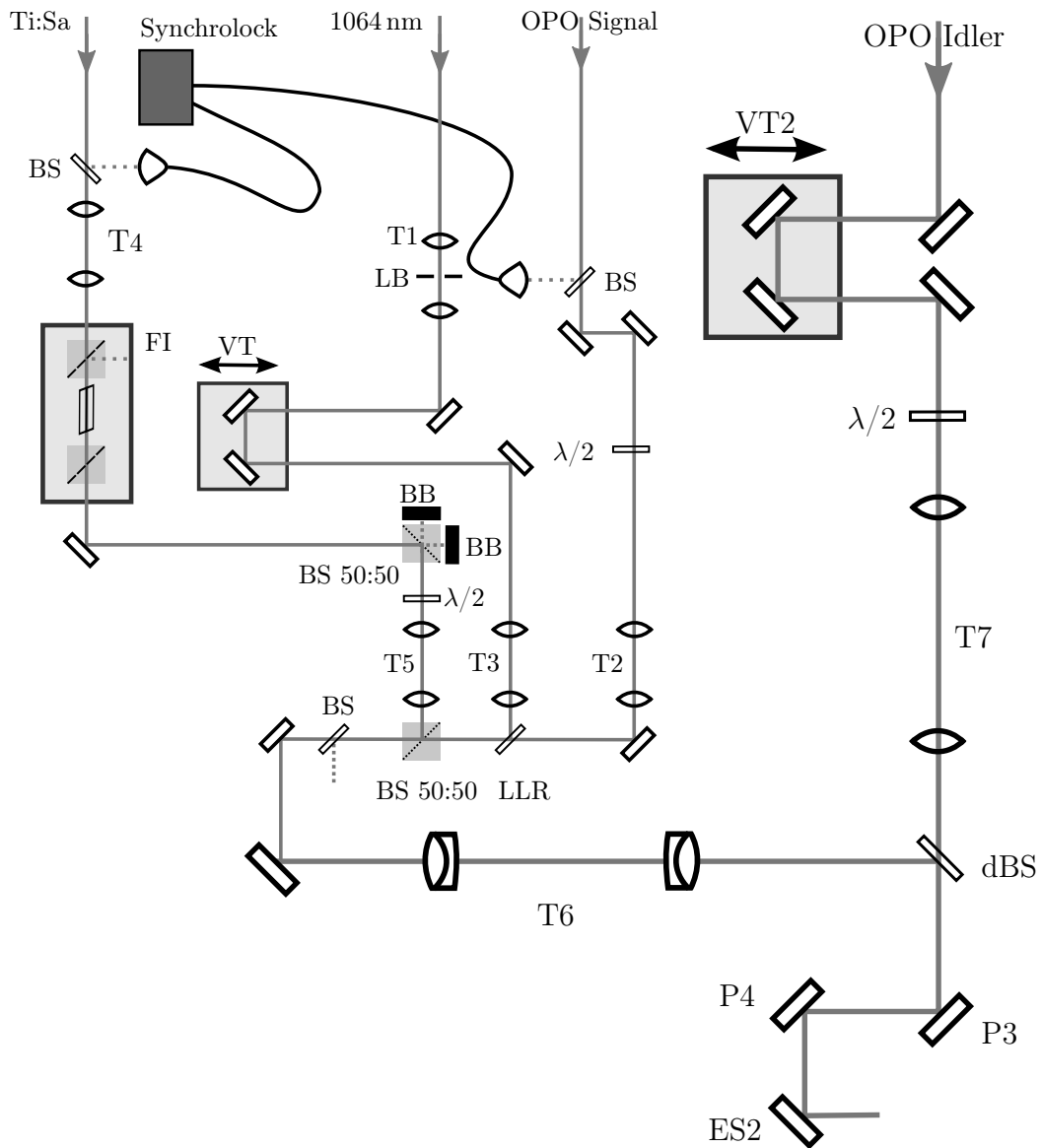


Abbildung 7.1.: Schematische Darstellung des Anregungsstrahlengangs. T1/T2/T3/T4/T5/T6/T7 Teleskope, LB Lochblende, BS Glassubstrate, $\lambda/2$ Verzögerungsplatten, LLR Laserlinien Reflektor 1064 nm, BS 50:50 Strahlteiler 50:50, FI Faraday Isolator, VT/VT2 motorisierte Verschiebetische, BB Strahlblock, dBS dichroitischer Strahlteiler, P3/P4 Periskop, ES2 Einkoppelspiegel Mikroskop.

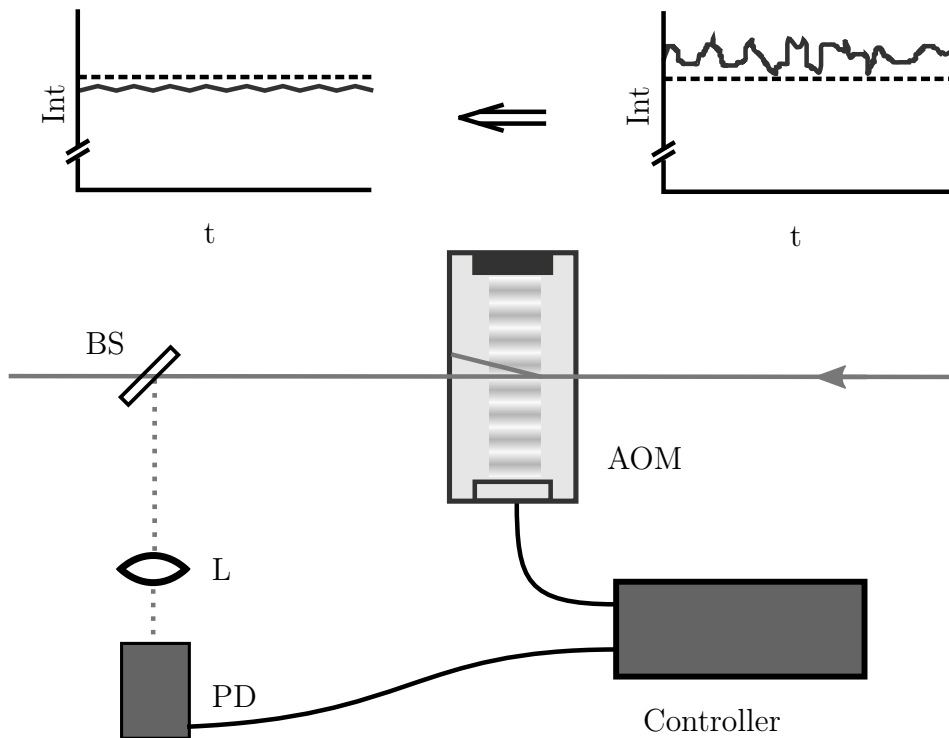


Abbildung 7.2.: Aufbau zur Stabilisierung der Anregungsintensitäten mittels eines Noise-Eater Systems. Die Laserleistung wird mittels Photodiode kontrolliert und Intensitätsfluktuationen durch die Transmission eines akustooptischen Modulators ausgeglichen. AOM Akustooptischer Modulator, BS Strahlteiler, L Linse, PD Photodiode, Controller Steuereinheit des Noise-Eater Systems und Treiber des AOMs.

System in die Strahlengänge der Fundamentalen des HighQ Lasers und des Ti:Sa-Lasers integriert.^[230] Hierbei handelt es sich um ein System, welches die Leistung der Anregungsquelle mittels einer Photodiode überwacht und durch Anpassung der Transmission einer optischen Komponente Intensitätsfluktuationen ausgleicht.

In Abb. 7.2 sind Aufbau und Funktion des Noise-Eater Systems dargestellt. Ein Akustooptischer Modulator (AOM) wird zum Ausgleich der Intensitätsfluktuationen eingesetzt. Die Funktionsweise eines AOMs beruht auf der Erzeugung eines optischen Gitters in einem Kristall und der dadurch erfolgten Beugung des durchlaufenden Lichts. Hierfür wird mittels eines piezoelektrischen Wandlers ein Radio-Frequenz-Signal in eine akustische Welle umgewandelt. Diese generiert periodische Dichteunterschiede und somit eine Modulation des Brechungsindex im Kristall. Die Beugungseffizienz kann über die Intensität der Schallwelle gesteuert werden. Für den Einsatz im Noise-Eater System wird lediglich ein geringer Anteil des Laserlichts abgelenkt. Intensitätsfluktuationen der An-

regungsquelle werden durch Variation der Beugungseffizienz und somit Transmission des AOMs ausgeglichen.

Für Details zum Einbau des Noise-Eater System und der Stabilisierung der Intensitäten möchte ich auf die Bachelorarbeit von Schütter verweisen.^[230] Hier möchte ich nur qualitativ auf die Stabilisierung der Anregungsleistung eingehen. Ohne AOM und Noise Eater System sind deutlich Intensitätsfluktuationen zu erkennen gewesen. Durch den AOM kommt es zu einer Modulation der Intensität von etwa 1% bei 500 kHz. Diese hochfrequente Modulation hat keinerlei Einfluss auf unsere Messung, da sie eine konstante Amplitude aufweist und auf der Zeitskala unserer Messungen gemittelt wird. Die störenden zufälligen Intensitätsfluktuationen auf einer Sekunden- bis Minutenzeitskala werden durch den Noise-Eater auf $\leq 0,4\%$ bei 1064 nm und auf $< 0,25\%$ für den Ti:Sa-Laser verringert. Da der Ti:Sa-Laser als Quelle für den Abfragepuls dient und somit über die thermische anti-Stokes Fluoreszenz den größten Hintergrundbeitrag liefert, ist diese Stabilisierung ein wichtiger Fortschritt in der Erhöhung der Sensitivität unseres Experiments.

7.2. Das Mikroskop

7.2.1. Anforderungen an das Mikroskop

Für die Einzelmolekülspektroskopie müssen technisch zwei Voraussetzungen erfüllt sein. Zum einen benötigt man eine hohe Effizienz in der Detektion der Photonen. Aus diesem Grund werden Objektive hoher numerischer Apertur und somit hoher Sammeleffizienz, sowie hochsensitive Detektoren eingesetzt. Auch die Anzahl an optischen Komponenten (und damit verbundenen Verlusten) wird möglichst gering gehalten. Zum anderen erfordern Fluoreszenzexperimente an einzelnen Molekülen eine starke Unterdrückung des Hintergrunds. Neben den bereits in Abschnitt 6.5 diskutierten Hintergrundquellen, die spezifisch für das geplante Experiment sind, muss natürlich auch der Hintergrund, der bei Experimenten klassischer Einzelmolekülfluoreszenz auftritt, berücksichtigt werden. Entsprechende Beiträge kommen durch Rayleigh-Streuung und Raman-Streuung des Lösungsmittels bzw. der Matrix, sowie Fluoreszenz von Verunreinigungen zustande. Auch Beiträge der apparativer Artefakte zum detektierten Signal sind zu berücksichtigen. Die Intensität der Streuprozesse ist aufgrund der hohen Zahl an Streuzentren im Vergleich zu dem einzelnen Fluorophor nicht zu vernachlässigen. Von Vorteil ist eine Durchführung des Experiments im NIR-Bereich wegen der damit einhergehenden Verringerung der Streuquerschnitte. Die Rayleigh-Streuung kann durch geeignete Emissionsfilter weitestgehend geblockt werden. Durch die Detektion der anti-Stokes Fluoreszenz ist der Beitrag der Raman Streuung im Vergleich zu gewöhnlichen Fluoreszenzexperimenten

weiter verringert. Für Einzelmolekülexperimente wird, wenn möglich, das detektierte Volumen eingeschränkt, um die Anzahl an Matrix- bzw. Lösungsmittelmolekülen (potentiellen Hintergrundquellen) zu verringern. Dies kann mittels Nahfeldtechniken oder der konfokalen Mikroskopie erfolgen. Wir wollen oberflächenunabhängig Messungen bei Raumtemperatur durchführen können. Die konfokale Mikroskopie ist somit die Technik der Wahl zur Einschränkung des Probenvolumens. Durch die Verwendung der Lochblende wird allerdings auch stets ein gewisser Anteil an erwünschtem Fluoreszenzsignal geblockt. Aufgrund des vergleichsweise geringen Beitrags der Raman-Streuung im anti-Stokes Bereich wurde daher zunächst auf eine zusätzliche Einschränkung des Probenvolumens mittels Lochblende verzichtet.

7.2.2. Der resultierende Aufbau

Zusammenfassend benötigen wir somit ein Mikroskop, mit welchem wir die unterschiedlichen Anregungsquellen verwenden können, das eine hohe Detektionseffizienz besitzt und hohe Flexibilität im Aufbau aufweist. Hohe Geschwindigkeiten und Einsetzbarkeit für biologische Fragestellungen, wie es bei der CARS Mikroskopie im ersten Teil der Arbeit erforderlich war, müssen nicht gegeben sein. Es wurde daher ein Eigenbau-Mikroskop entworfen. Die Detektion erfolgte in Epi-Geometrie. Abbildungen werden mittels Abrastern der Probe durch einen Piezo-Scanner erzeugt. Als Detektoren stehen sowohl eine Einzelphotonen-sensitive Avalanche Photodiode (SPAD, single photon avalanche diode) als auch eine CCD-Kamera mit Spektrograph zur Verfügung. Das Signal der SPAD wird durch zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen (TCSPC, time correlated single photon counting) registriert, das gängigste Verfahren zur Ermittlung von Fluoreszenzlebenszeiten in der Zeit-Domäne oder zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit konnte ich bereits erste Erfahrungen beim Aufbau eines Experiments mit Einzelmolekülsensitivität sammeln. Hierbei wurden die gleichen Techniken verwendet. Ich möchte daher hier auf eine detaillierte Beschreibung dieser verzichten und auf meine Diplomarbeit mit dem Titel "Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie an Ensembles und einzelnen Molekülen: Aufbau eines Experiments und Messungen an neuen NIR-Fluorophoren" verweisen.^[231]

In Abb. 7.3 ist der resultierende Aufbau skizziert. Das Anregungslicht wird mittels Periskop eingekoppelt. Der Stahlteiler (T825dcxrxt, Chroma Technology Corp., USA) transmittiert die Anregungswellenlänge und reflektiert die kürzeren Wellenlängen. Die Fokussierung erfolgt mittels eines manuellen Verschiebetisches, der über eine differentielle Mikrometerschraube verfügt. Die Positionierung konnte über einen Bereich von 25 mm mit einer Genauigkeit von 0,1 μm erfolgen. Mittels des Piezo-Tisches konnte die Fokussierung zusätzlich optimiert werden. Es stehen die in Tabelle 3.1 aufgelisteten Objektive

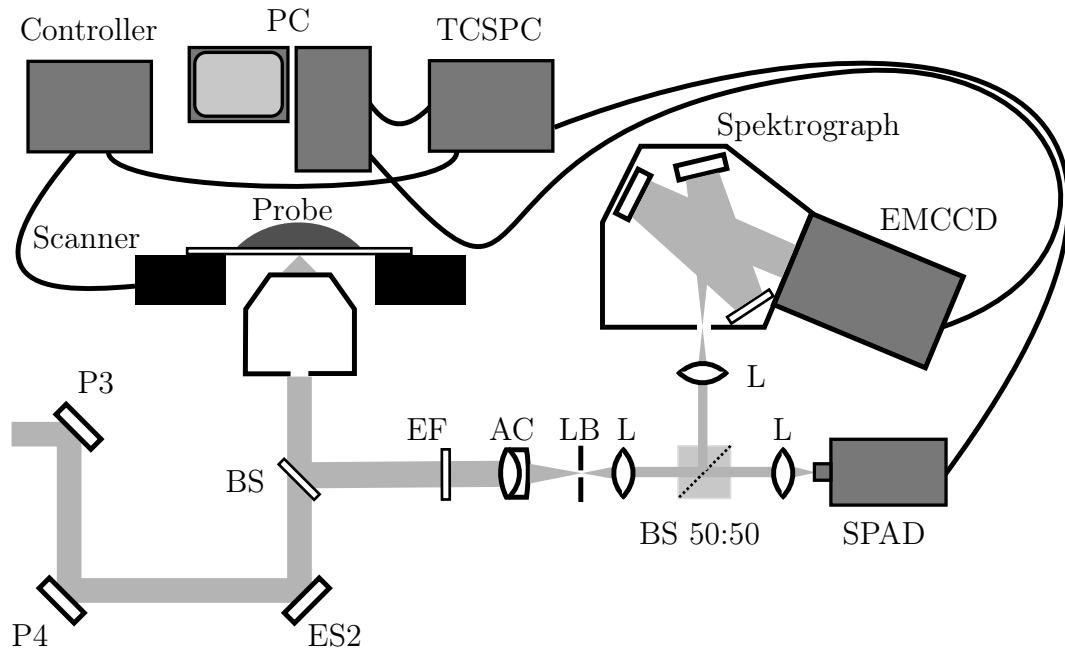


Abbildung 7.3.: Schematische Darstellung des Mikroskops. P3/P4 Periskop, ES2 Einokkelspiegel, LB Lochblende, BS Strahlteiler, EF Emissionsfilter, AC achromatische Linse, L Linse, BS 50:50 Strahlteilerwürfel 50:50, SPAD Avalanche Photodiode, TCSPC TCSPC-Elektronik, Scanner Piezotisch.

zur Verfügung. Für die optimale Fokussierung der unterschiedlichen Wellenlängen im NIR bot sich erneut das HCX Pl Apo CS NIR an. Zur Erstellung von Abbildungen wurde die Probe mittels eines Piezo-Tisches (P-561.3CD, Physik Instrumente (PI) GmbH & Co. KG) bewegt. Der maximale Rasterbereich betrug $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$. Es wurden stets zumindest zwei Emissionsfilter zur Unterdrückung des Anregungslichts und weiterer unerwünschter Komponenten eingesetzt. Für anti-Stokes Fluoreszenzexperimente auf Einzelmolekülniveau (vgl. Abschnitt 7.7) wurden die Komponenten Tubuslinse, Lochblende und Kollimationslinse zusätzlich eingebaut.

Zeitaufgelöste Detektion erfolgte mittels einer SPAD (PDM Serie, Micro Photon Devices, Italien) und eines TCSPC-Moduls von PicoQuant (PicoHarp 300, PicoQuant GmbH, Berlin). Die Ausgangssignale der SPAD wurden mittels des Routers PHR800 von PicoQuant zum TCSPC-Modul geleitet. Somit war eine Erweiterung auf zwei SPADs stets möglich (vgl.^[231]). Die verwendete SPAD besitzt bei 800 nm eine vergleichsweise geringe Quantenausbeute von etwa 15%. Allerdings kann sie hohen Intensitäten standhalten und ist somit auch für Ensemble Messungen geeignet. Die maximal verwendbare Photonennrate ist durch die TCSPC-Elektronik auf etwa 10^6 Photonen/s beschränkt, nicht durch die SPAD. Die SPAD zeichnet sich zudem durch eine hohe zeitliche Auflösung und eine

geringe Dunkelzählrate (<150 Hz) aus. Das kürzeste Zeitprofil, das durch ein TCSPC-Experiment gemessen werden kann, wird als Instrument Response Function (IRF) bezeichnet. Die Breite dieser Funktion hängt unter anderem von der Breite der Anregungspulse und den Verzögerungen in der Detektionselektronik ab. Es konnten IRFs von 48 ps erhalten werden (vgl. Abb. 7.4). Als Quelle des Synchronisationssignals für das zeitkorrelierte Einzelphotonenzählen wurde die interne Photodiode des HighQ Pumpasers verwendet. Die TCSPC-Elektronik benötigt negative Signalspannungen, idealerweise im Bereich von -100 mV bis -500 mV und Anstiegs- bzw. Abfallzeiten von maximal 2 ns. Das Ausgangssignal der Photodiode ist positiv und liegt bei etwa 100 mV. Daher wurde ein passiver Signalwandler (SI 100, PicoQuant) eingesetzt. Die korrekte zeitliche Lage des Synchronisationssignals (Definition des Startpunkts der Messung) wurde über Variation der Kabellängen zwischen den Signalgebern und der TCSPC-Elektronik eingestellt.

Zur parallelen spektralen Detektion konnte ein 50:50-Strahlteilerwürfel (BS017, Thorl-

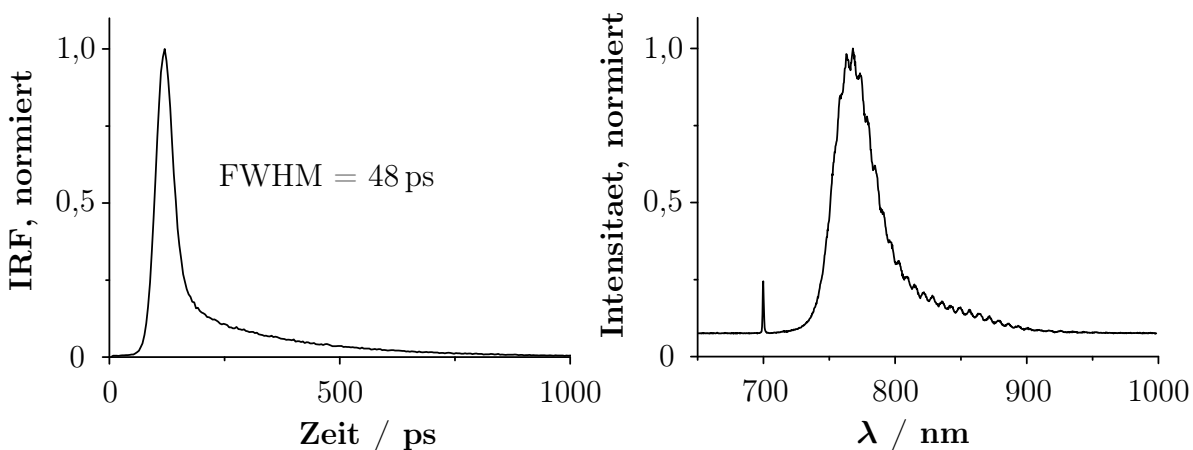


Abbildung 7.4.: Zeitaufgelöste und spektrale Detektion am Eigenbau-Mikroskop. Links: IRF des verwendeten TCSPC Systems bei Anregung mit dem OPO. Rechts: Interferenzen im Spektrum des PPCy durch Etaloneffekte. Anregung erfolgte bei 705 nm.

abs GmbH, Dachau) eingesetzt und eine CCD Kamera mit Gitterspektrograph verwendet werden (DU970N-BV und Shamrock SR-163, Andor Technology plc., UK). Da lediglich Fluoreszenzspektren bzw. die Lage der unterschiedlichen nichtlinear optischen Beiträge zum Gesamtsignal (vgl. Abschnitt 7.6) überprüft werden sollten, konnten Gitter mit 300 Linien/mm und somit geringer spektraler Auflösung verwendet werden (Blaze-Wellenlänge 500 nm und 760 nm, Andor Technology plc., UK). Für den Spektrographen stehen zwei Festspalte ($10 \mu\text{m}$ und $50 \mu\text{m}$) zur Verfügung. Bei der Kamera handelt es

sich um eine Elektronen-vervielfältigende CCD (EMCCD, electron multiplying charge-coupled device). Durch die zusätzliche Verstärkerkomponente und das Design als Back Illuminated CCD wird eine sehr hohe Empfindlichkeit erreicht. Problematisch ist allerdings die Verwendung dieser Kamera im NIR, da hier Etaloneffekte (sog. “Etaloning”) auftreten kann. Durch mehrfach Reflektion in dem sehr dünnen Back-Illuminated-Sensor kommt es zur Ausbildung von Interferenzmustern im Bild bzw. dem Spektrum. In Abb. 7.4 ist das mit dem Eigenbau aufgezeichnete Fluoreszenzspektrum des verwendeten Farbstoffes gezeigt. Das Interferenzmuster durch Etaloning ist klar zu erkennen. Da die spektrale Detektion lediglich für Kontrollexperimente genutzt wurde, spielte dieser Effekt keine Rolle.

7.3. Die Fluorophore

Im Folgenden möchte ich zunächst auf die Kriterien bei der Auswahl geeigneter Fluorophore für das Experiment eingehen und anschließend die verwendeten Fluorophore vorstellen.

7.3.1. Anforderungen an die Fluorophore

Die Fluoreszenzspektroskopie auf Einzelmolekülniveau erfordert starke Emission der Fluoreszenzfarbstoffe, so dass eine Detektion des Fluoreszenzsignals einzelner Farbstoffmoleküle trotz Hintergrund und apparativem Detektionslimit des Experiments möglich ist. Die Fluoreszenzrate ist proportional zum molaren dekadischen Absorptionskoeffizienten ϵ und der Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_f . Eine hohe Fluoreszenzrate ist allerdings noch nicht ausreichend, auch die Photostabilität der Fluorophore und somit die Gesamtzahl emittierter Photonen spielt eine wichtige Rolle. Diese ergibt sich aus der Anzahl durchlaufener Anregungszyklen vor dem Photobleichen des Fluorophors und liegt für einen guten Fluorophor im Bereich von 10^5 - 10^6 . Die Anzahl emittierter Photonen ist nicht nur entscheidend für ein gutes Verhältnis von Signal zu Hintergrund und Rauschen. Besonders für unser Experiment sind hohe Photostabilitäten unabdingbar. Um an einem einzelnen Fluorophor ein Schwingungsspektrum durch Variation der Differenzfrequenz $\omega_v = \omega_1 - \omega_2$ zu erhalten, müssen wir in der Lage sein, für jeden Messpunkt ω_v ein Fluoreszenzsignal zu detektieren. Die gleiche Anforderung gilt für jede Verzögerung Δt bei einem zeitaufgelösten Experiment. Für Einzelmolekülexperimente besitzen Fluorophore mit elektronischem Übergang im NIR-Bereich einen klaren Vorteil. Zum einen verringert sich der Hintergrund durch Streuung im NIR-Bereich deutlich, da sich die Streueffizienz proportional zur vierten Potenz der Frequenz des eingestrahlt Lichts

verhält. Zum anderen verbessert sich die Auflösung der verwendeten Interferenzfilter mit zunehmender Wellenlänge. Aufgrund des reziproken Zusammenhangs von Wellenlänge und Energie eines Übergangs sind mit zunehmender Wellenlänge Fluoreszenz und Anregungslicht mit Interferenzfiltern besser zu trennen.

Bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit habe ich neuartige NIR-Fluorophore für Einzelmolekülexperimente verwendet, welche die aufgelisteten Anforderungen erfüllen.^[231] Im nächsten Abschnitt werde ich diese Pyrrolopyrrol-Cyanine (PPCy) kurz vorstellen.

7.3.2. Pyrrolopyrrol-Cyanine: NIR-Fluorophore für die Einzelmolekülspektroskopie

Georg Fischer hat in seiner Diplomarbeit und Dissertation neue NIR-Fluorophore, die Pyrrolopyrrol-Cyanine (PPCy), synthetisiert.^[232–235] PPCy werden durch Kondensation von Diarylketopyrrolopyrrolen mit Heteroarylacetonitrilen und anschließender Versteifung des Chromphors durch die Bildung von Bor-Chelaten dargestellt (vgl. Abb. 7.5). Durch diese Versteifung werden die Torsionsschwingungen der heteroaromatischen

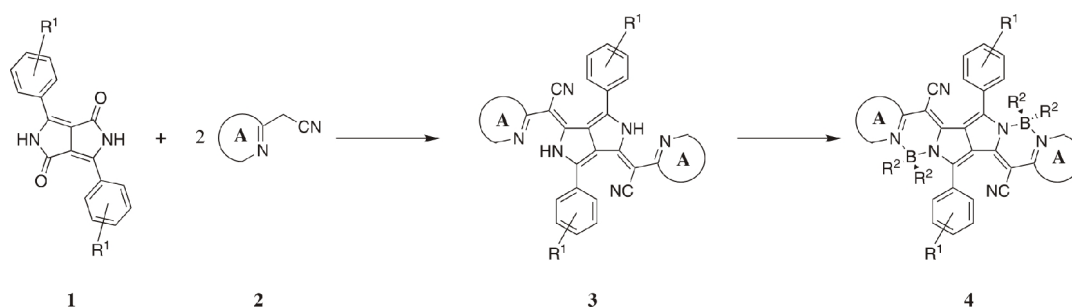


Abbildung 7.5.: Synthese der PPCy. Die Bildung der Bor-Chelate **4** versteift das Chromophorengerüst und ermöglicht die Fluoreszenz bei Raumtemperatur.

Strukturen stark eingeschränkt. Die zuvor aufgrund der großen innermolekularen Beweglichkeit hohe strahlungslose Relaxationsrate verringert sich und die Fluoreszenzquantenausbeute erhöht sich auf bis zu > 50%, während die H-Chelate **3** bei Raumtemperatur in Lösung keine Fluoreszenz zeigen. Des Weiteren verringert sich die Halbwertsbreite der Schwingungsbanden im Absorptions- und Fluoreszenzspektrum, die molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten ϵ und Oszillatorstärken nehmen zu und die Franck-Condon Faktoren verschieben sich zugunsten des 00-Übergangs. All dies sind Vorteile für Fluoreszenzexperimente, speziell auch auf Einzelmolekülniveau. Zudem zeichnen sich die PPCy Farbstoffe durch eine hohe Photostabilität aus. Dies konnte sowohl bei breitbandiger Anregung in Lösung im Vergleich mit Indocyaningrün, einem NIR-Fluorophor der häufig in der Medizin eingesetzt wird, als auch auf Einzelmolekülniveau im Vergleich zu

Terrylendiimid, dem bisherigen Goldstandard für Photostabilität in der Einzelmolekülspektroskopie, gezeigt werden.^[234] Bislang ist die Fluorophorklasse der PPCy somit allen andern NIR-Fluorophoren überlegen. Durch gezielte Variation des Substitutionsmusters kann zudem die Lage des elektronischen Übergangs eingestellt werden. Beispielsweise kann somit für die BF₂-Chelate das Absorptionsmaximum von 684 nm bis 802 nm verschoben werden.

Für unser Experiment wurde der BF₂-Komplex eines Chinolinderivats verwendet. In Abb. 7.6 sind Absorptions- und Fluoreszenzspektrum sowie Struktur des PPCys dargestellt. Die spektroskopischen Daten sind in Tabelle 7.1 aufgeführt.

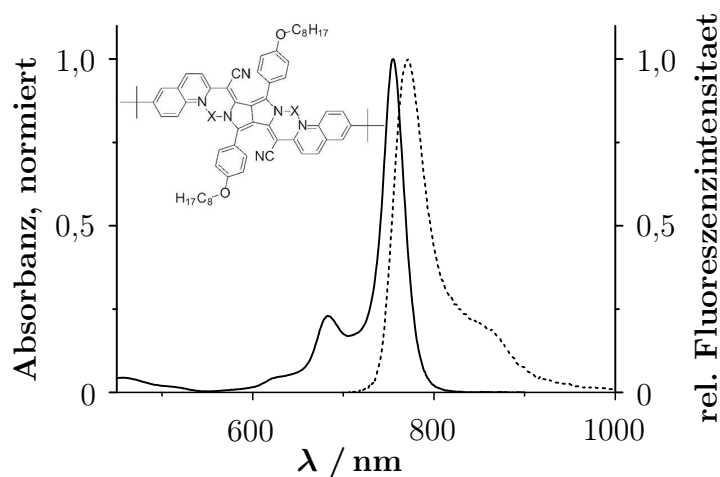


Abbildung 7.6.: Normiertes Absorptions- (durchgezogene Linie) und Fluoreszenzspektrum (gestrichelte Linie) des verwendeten PPCy Fluorophors.

Tabelle 7.1.: Spektroskopische Daten des ersten elektronischen Übergangs des verwendeten PPCys bei Raumtemperatur in CHCl₃. $\tilde{\nu}_{00}^A$, λ_{00}^A Absorptionsmaximum; $\tilde{\nu}_{00}^F$, λ_{00}^F Fluoreszenzmaximum; ϵ molarer dekadischer Extinktionskoeffizient; f Oszillatorstärke^[233]

$\tilde{\nu}_{00}^A$	λ_{00}^A	$\tilde{\nu}_{00}^F$	λ_{00}^F	ϵ	ϕ_f	f
/cm ⁻¹	/nm	/cm ⁻¹	/nm	/M ⁻¹ cm ⁻¹		
13250	754	13000	773	205000	0,59	0,83

Die Schwingungsübergänge des verwendeten PPCy Die Kristallstruktur des verwendeten PPCy Fluorophors ist bekannt.^[234] Das chromophore System ist näherungsweise planar, die Phenylsubstituenten an den Atomen C2 und C2' sind aus der Ebene heraus gedreht und haben daher kaum Einfluss auf die spektralen Eigenschaften des Fluorophors. Er besitzt ein Inversionszentrum. Für die Abschätzung der spektralen Eigenschaften mittels der Gruppentheorie kann der PPCy entweder in die Punktgruppe C_i oder unter Vernachlässigung der Phenylreste in die Punktgruppe C_{2h} eingeordnet werden (analog zu Diketopyrrolopyrrolen, vgl.^[236]). Lunak *et al.* haben Raman Spektren von Diketopyrrolopyrrolen gemessen und mittels Dichtefunktionaltheorie Grundzustandsgeometrien, Schwingungsfrequenzen und Intensitäten der Raman Banden berechnet.^[237] Sie sind hierfür ebenfalls von einer C_{2h} Symmetrie ausgegangen. Die so erhaltenen Ergebnisse können daher zur Einschätzung des zu erwartenden Verhaltens des PPCy Fluorophors verwendet werden. Aufgrund der Inversionssymmetrie sind die Schwingungsmoden entweder Raman oder IR aktiv. Die C=C- und C-C-Bindungen, die am konjugierten System des Chromophors beteiligt sind, können besonders leicht polarisiert werden. Für die entsprechenden Streckschwingungen sind daher die intensivsten Übergänge zu erwarten. Die Schwingungsmoden besitzen die Symmetrierasse A_g auf, sind somit Raman aktiv (vgl. 6.2). Die Ramanbanden der C=C- und C-C-Streckschwingungen liegen im Bereich von 1600 cm^{-1} bzw. 1350 cm^{-1} . Dr. Ralf Köppe von der Universität Karlsruhe hat Raman Spektren des PPCys gemessen. In Abb. 7.7 ist der relevante Ausschnitt des Spektrums dargestellt. Aufgrund der Fluoreszenz im NIR ist ein starker Hintergrund vorhanden.

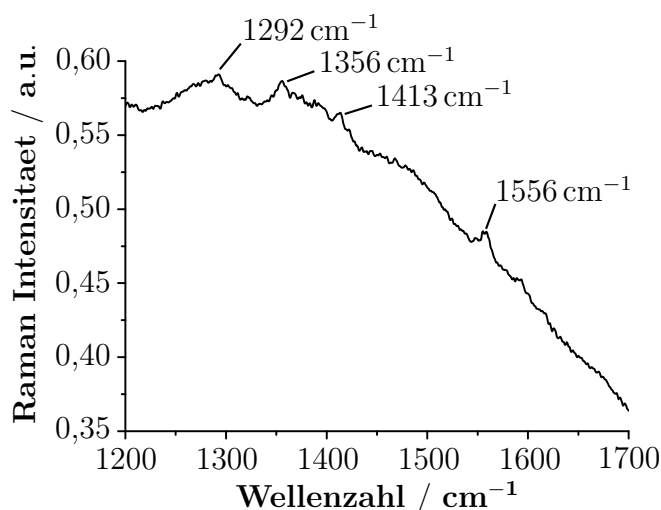


Abbildung 7.7.: Raman Spektrum des verwendeten PPCy. Dargestellt ist der relevante Bereich der C=C- und C-C-Streckschwingungen auf starkem Fluoreszenzhintergrund. Die Messung erfolgte am KIT durch Dr. Ralf Köppe.

Dennoch sind bei etwa 1560 cm^{-1} und 1360 cm^{-1} die erwarteten Raman Banden zu erkennen. Die C-C-Schwingungsmode ist auch im Absorptions- und im Fluoreszenzspektrum des PPCys zu erkennen ($\approx 1390\text{ cm}^{-1}$). Aufgrund der geringen Geometrieänderung des elektronisch angeregten Zustands im Vergleich zum elektronischen Grundzustand unterscheiden sich die entsprechenden Schwingungsfrequenzen kaum.

7.4. Nichtlineare Optik an Nanopartikeln

Zunächst wurde das Mikroskop auf die Eignung für nichtlinear optische Experimente geprüft. Hierfür bieten sich Nanopartikel auf der Basis von Metalloxiden an, die häufig ein ausgeprägtes NLO Verhalten zeigen.^[238] Ich habe hierfür Zinkoxidpartikel verwendet. Diese wurden beispielsweise von Kachynski *et al.* als Marker für die Biomedizin vorgeschlagen.^[239] In dieser Arbeit wurden die unterschiedlichen NLO Prozesse in den Nanopartikeln nach Anregung mit einem vergleichbaren Lasersystem untersucht. Es konnten sowohl $\chi_{ijk}^{(2)}$ -Prozesse wie Frequenzverdoppelung (SHG) und Summenfrequenzerzeugung (SFG) als auch $\chi_{ijkl}^{(3)}$ -Prozesse wie die Vier-Wellen-Mischung (FWM) beobachtet werden.

Probenpräparation ZnO Nanopartikel (ZnO nanopowder, < 100 nm, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) wurden in Wasser dispergiert und auf ein Deckglas gegeben. Die Nanopartikel setzten sich im Verlaufe des Experiments zunehmend auf der Glasoberfläche ab. Die Nanopartikel wurden durch Absorption aufgeheizt, was bei eingetrockneten Proben schnell zur thermischen Zerstörung führen konnte. Durch das Wasser wurde dies verhindert.

Nichtlineare Mikrospektroskopie Die Nanopartikel bzw. Anhäufungen von diesen wurden mittels Abrastern der Probe lokalisiert und anschließend Spektren bei unterschiedlichen Kombinationen der Anregungsquellen aufgenommen. Ein exemplarisches Spektrum unterschiedlicher NLO Prozesse an ZnO Nanopartikeln ist in Abb. 7.8 gezeigt. Die Anregung erfolgte hierbei mit dem OPO bei 843 nm und der Fundamentalen des HighQ Lasers bei 1064 nm. Im Anregungsstrahlengang wurde ein Langpass-Filter (Farbglas RG830, Chroma Technology Corp., USA) eingesetzt, um etwaige parametrische Fluoreszenz des OPOs zu blocken, im Detektionsstrahlengang befanden sich zwei Kurzpass-Filter (E835sp-2p, Chroma Technology Corp., USA). Die prominenteste Linie bei 532 nm entspricht der SHG des HighQ Lasers. Bei 470 nm ist die SFG der beiden Anregungsquellen zu erkennen. Da der Spektrograph die höheren Beugungsordnungen nicht herausfiltert, wird die SFG ebenfalls bei 940 nm detektiert. Durch Vier-Wellen-Mischung bzw. CARS erhält man eine Linie bei 698 nm. Die Linie bei 843 nm resultiert aus der

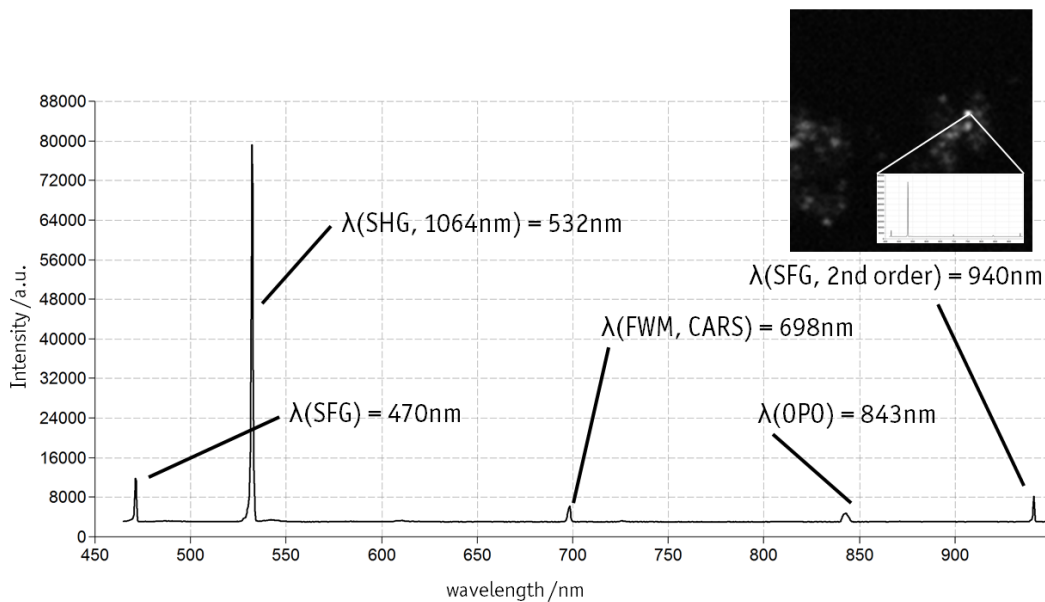


Abbildung 7.8.: Spektrum in Wasser dispergierter ZnO Nanopartikel bei NLO Anregung mit 843 nm und 1064 nm. Näheres s. Text.

Beugung zweiter Ordnung der SHG des OPOs. Der zeitliche Überlapp der Anregungsquellen konnte anhand der Intensität der Mischprozesse (SFG und FWM) optimiert werden. Der räumliche Überlapp in der Probenebene (x,y) konnte so ebenfalls verbessert werden. Ein perfekter räumlicher Überlapp der Anregungswellenlängen entlang der optischen Achse (z-Richtung) konnte nicht erzielt werden. Wie bereits bei der Justage des CARS Mikroskops, befinden sich die Teleskope zur Variation der Divergenz/Konvergenz der einzelnen Anregungsstrahlen zu weit vom Objektiv entfernt. Um die chromatischen Aberrationen auszugleichen, müsste der Strahlverlauf derart stark von einem kollimierten Strahl abweichen, dass die Verluste in der Anregungsleistung durch Überfüllen der Optiken im Strahlengang die verbesserte Anregungseffizienz durch optimierten Überlapp in z-Richtung mehr als ausgleichen. Dennoch konnte die Eignung des Aufbaus für NLO Experimente gezeigt werden.

7.5. Erste Einzelmolekülexperimente

Nach Justage und Optimierung des Anregungsstrahlengangs, sollte die Sensitivität des Aufbaus überprüft werden. Im Gegensatz zu meiner Diplomarbeit weisen die hier verwendeten SPADs eine geringere Quanteneffizienz im NIR auf. Auch das Strahlprofil des Anregungslichts und die verwendeten Objektive unterscheiden sich vom zuvor verwen-

deten Einzelmolekülexperiment. Daher wurden zunächst die Eignung des Aufbaus durch Experimente an einzelnen Molekülen unter gewöhnlicher Anregung mit dem PPCy in einer Polystyrolmatrix durchgeführt.

Probenpräparation Der PPCy Fluorophor wurde in Chloroform (Uvasol, Merck KGaA, Darmstadt) gelöst. Es wurde eine 3-Gew.% Polystyrol(PS)-Lösung (PS, M.W. 250000 g/mol, Acros Organics, Belgien) in Toluol (Uvasol, Merck KGaA, Darmstadt) hergestellt. Farbstofflösung und PS-Lösung wurden vermischt, so dass die Endkonzentration des PPCy ~ 50 pM betrug. Ein Polymerfilm mit einzeln abbildbaren Fluorophoren wurde durch Schleuderbeschichtung eines Deckglases erhalten (Vgl.^[240]).

Mikrospektroskopie an einzelnen Molekülen Zur Anregung wurde der OPO bei 705 nm betrieben. Als Emissionsfilter wurden ein Langpass- und ein Bandpassfilter eingesetzt (HQ710LP und HQ785/60m-2p, Chroma, USA). Der Aufbau war geeignet für Einzelmolekülexperimente. Abb. 7.9 zeigt eine Aufnahme einzelner Fluorophore. Die optische Auflösung des Aufbaus kann aus der räumlichen Intensitätsverteilung eines Moleküls ermittelt werden. Die Intensitätsverteilung wird mittels einer Gauß-Verteilung angenähert. Deren Halbwertsbreite betrug für diese Experimente 470 nm. Nach der Bestimmung der Position der Moleküle konnten diese einzeln angefahren und Zeitspuren ihrer Fluoreszenzintensität aufgezeichnet werden. Zwei exemplarische Trajektorien sind in Abb. 7.9 dargestellt. Die Trajektorien zeigen die typischen Charakteristika einzelner Moleküle wie Blinken durch Übergang in Dunkelzustände und digitales Bleichverhalten. Die Probe war sehr dicht mit einzelnen Molekülen bedeckt. Es befand sich bei den gezeigten Trajektorien zumindest ein weiteres Molekül in der Nähe, daher fallen die Photonenzählraten nicht auf Hintergrundniveau (< 1 kHz) ab.

7.6. Reduzierung des spezifischen Hintergrunds

Beim Aufbau wurden bereits eine Reihe von Maßnahmen zur Reduktion des Hintergrunds getroffen (s. Abschnitte 7.2 und 7.5). Die bereits in Abschnitt 6.5 theoretisch diskutierten für das geplante Experiment spezifischen Hintergrundprozesse wie CARS, Fluoreszenz nach Zwei-Photonen Anregung und der thermische Anteil der anti-Stokes Fluoreszenz wurden ebenfalls untersucht. Hierzu habe ich Vorversuche in Lösung durchgeführt, um den Beitrag der unterschiedlichen Prozesse abschätzen und wenn möglich reduzieren zu können. Die Verwendung von Lösungen des Farbstoffs für die Mikrospektroskopie hat mehrere Vorteile. Das Verhältnis von Anregungsvolumen (< 1 fl) zum Gesamtvolumen beträgt etwa $1 : 3 \cdot 10^{11}$. Durch Diffusion wird das Anregungsvolumen stetig

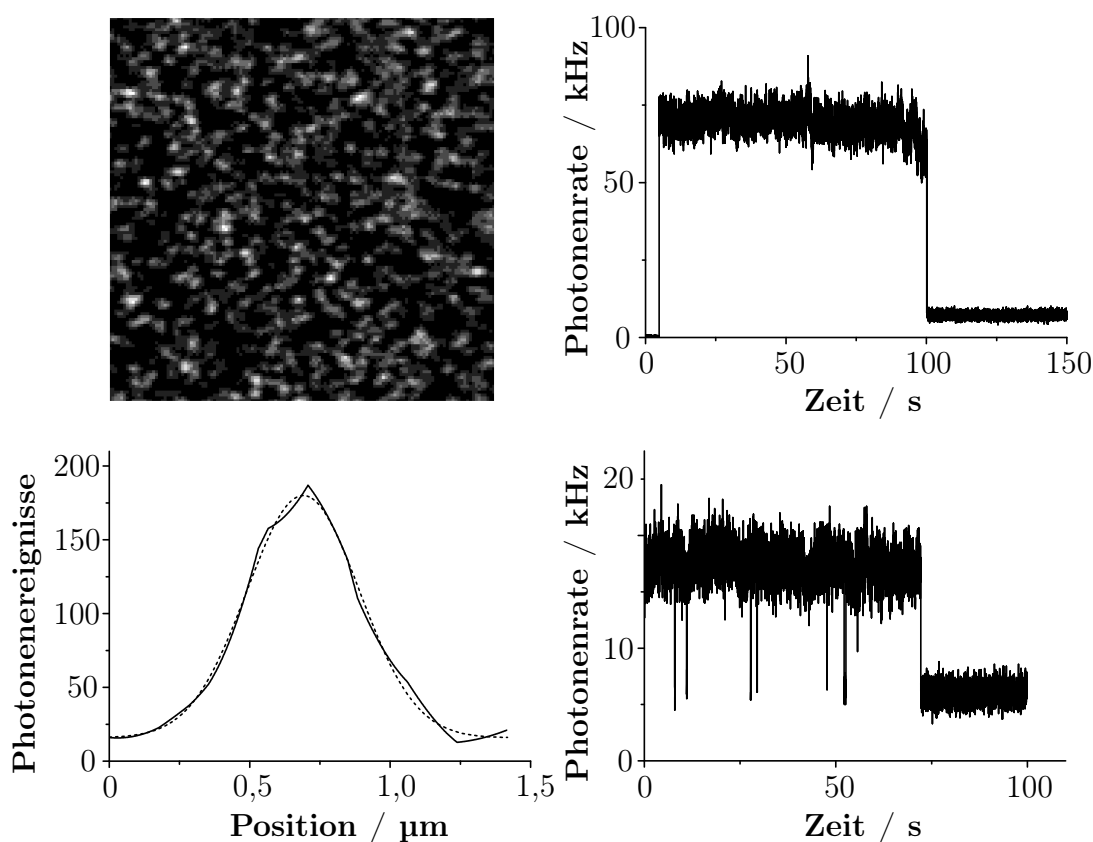


Abbildung 7.9.: Einzelmolekülspektroskopie an einzelnen PPCy. Links, oben: Aufnahme eines PS-Films mit PPCy Molekülen. Scanbereich $20 \times 20 \mu\text{m}^2$, Pixelgröße 150 nm , 1 ms Verweildauer pro Pixel. Links, unten: Räumliches Intensitätsprofil eines PPCy Moleküls (durchgezogene Linie). Es wurde eine Gauß-Verteilung angenähert (gestrichelte Linie). Rechts: Trajektorien der Fluoreszenzintensität einzelner PPCy.

ausgetauscht und Bleicheffekte können vernachlässigt werden. Die Konzentration kann über einen großen Bereich variiert werden, so sind selbst einzelmoleküläquivalente Experimente wie bei der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie möglich. Bei Konzentrationen $< 0,5 \text{ nM}$ befindet sich durchschnittlich maximal ein einzelnes Molekül im Anregungsvolumen.

Probenpräparation und Mikrospektroskopie Es wurden verschließbare Probenkammern aus Glas verwendet, so dass auch Lösungsmittel wie Chloroform eingesetzt werden konnten. Präparatgläsern wurde hierfür der Boden entfernt und stattdessen ein Deck-

glas mit Wasserglas (Natronwasserglas, Otto Fischar GmbH, Saarbrücken) angeklebt. Der Fluorophor wurde in Toluol oder Chloroform gelöst. Die spektralen Eigenschaften in diesen Lösungsmitteln sind nahezu identisch (^[235]). Die Konzentration für die Vorversuche betrug etwa 3 μM . Die Anzahl Moleküle im Anregungsvolumen lag somit im Bereich von 10^3 .

7.6.1. Hintergrund durch CARS

Bei der Anregung nach dem geplanten Schema liegt ein etwaiges CARS-Signal (resonant oder auch nichtresonant) exakt im spektralen Detektionsfenster. Wie bereits in Abschnitt diskutiert, ist durch die geringe Intensität des Abfragepulses kein nennenswerter Beitrag dieses Prozesses zu erwarten. Zumal das CARS-Signal in Lösung durch die Phasenanpassungsbedingung stark nach vorne gerichtet wäre, die Detektion allerdings in Epi-Richtung erfolgt. Ein entsprechendes Signal kann mittels zeitaufgelöster Anregung und spektraler Detektion mit dem Spektrometer nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum breiten Fluoreszenzspektrum ergibt das CARS-Signal bei Anregung mit ps-Pulsen eine schmale Bande. Die Anregung erfolgt lediglich bei zeitlichem Überlapp der Anregungspulse. Ein CARS-Signal konnte in den Vorversuchen selbst bei hohen Anregungsleistungen ($> 20 \text{ mW}$ pro Anregungsstrahl) wie erwartet nicht detektiert werden. Der CARS-Prozess spielt somit als Hintergrundquelle keine Rolle für das Experiment.

7.6.2. Hintergrund durch Fluoreszenz

Fluoreszenz kann im geplanten Experiment durch mehrere Anregungsmechanismen erzeugt werden. Wie in Abschnitt 6.5.2 diskutiert, kann durch ω_1 bzw. ω_2 eine 2PA erfolgen. Zudem kann die thermische Population geeigneter Schwingungen sowohl durch den Abfragepuls bei ω_3 als auch durch den Pumpimpuls bei ω_1 in den $|S_1\rangle$ überführt werden. Dass Fluoreszenz aus anti-Stokes Anregung detektiert werden kann, ist in Abbildung 7.10 dargestellt. In den Diagrammen ist die Abhängigkeit der detektierten Photonennrate von der Anregungsleistung P_{exc} aufgetragen. Der NIR-Fluorophor wurde mit dem Ti:Sa-Oszillator bei 843 nm (was ω_3 entspricht) angeregt. Die Fluoreszenz wurde kurzzeitig hiervon detektiert. Die Leistungsabhängigkeit des Signals F wurde mit einem Monom angenähert:

$$F = a \cdot P_{exc}^b \quad (7.1)$$

Eine lineare Leistungsabhängigkeit (Exponent $b=0,99$) ist klar gegeben, die Anregung erfolgt somit aus thermisch angeregten Schwingungszuständen durch Absorption eines Photons. Diese anti-Stokes Fluoreszenz konnte auch auf Einzelmolekülniveau nachgewiesen werden (s.u.). Für 2PA ist eine quadratische Abhängigkeit zu erwarten. Als Vergleich

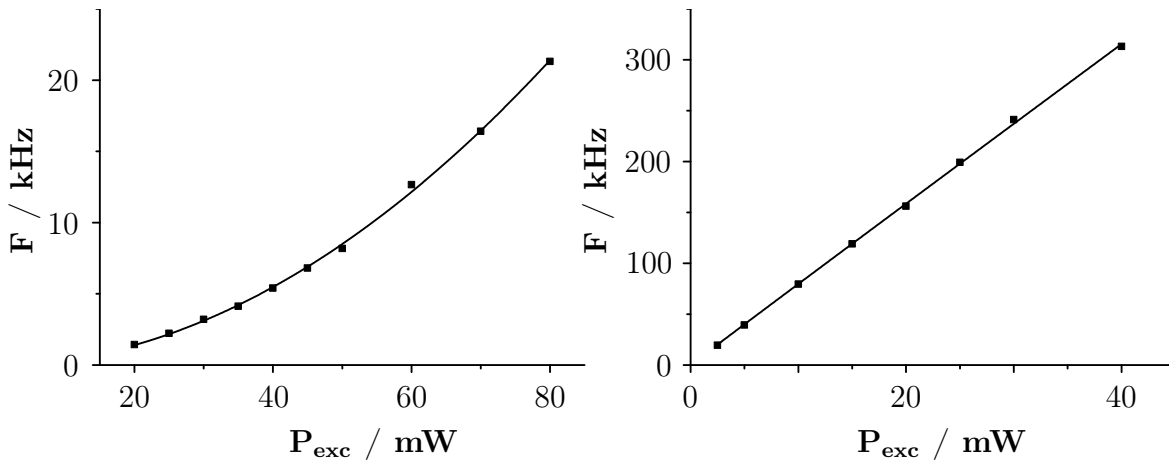


Abbildung 7.10.: Fluoreszenz zweier Farbstoffe in Lösungen nach gepulster Anregung bei 843 nm. Aufgetragen ist die detektierte Photonenzahl in Abhängigkeit von der Anregungsleistung (Quadrate). Die Annäherung (durchgezogene Linie) erfolgte mit der Funktion $F = a \cdot P_{exc}^b$. Links: Rhodamin B in Wasser. Für den Exponenten b ergab sich ein Wert von 1,97 mit einem Korrelationsmaß $R^2 = 0,999$. Rechts: PPCy in Chloroform. Für den Exponenten b ergab sich ein Wert von 0,99 mit einem Korrelationsmaß $R^2 = 0,992$.

ist das Fluoreszenzsignal von Rhodamin B ebenfalls bei Anregung durch den Ti:Sa-Oszillator (845 nm) dargestellt. Hier zeigt sich eine quadratische Leistungsabhängigkeit ($b=1,97$), die Fluoreszenz folgt somit aus Zwei-Photonen Anregung.

Auch der zu untersuchende PPCy Farbstoff zeigt Zwei-Photonen Anregung. Bei den Vorversuchen ergaben sich in Abhängigkeit von der Wellenlänge und Leistung der Lichtquellen unterschiedlich starke Beiträge der möglichen Anregungspfade. Ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 7.11 dargestellt. Der PPCy wurde mit dem Ti:Sa-Oszillator bei 932 nm ($\hat{=} \omega_1$) angeregt. Der Oszillator wurde sowohl im kontinuierlichen als auch gepulsten Modus eingesetzt. Im gepulsten Betrieb werden bei gleicher Durchschnittsleistung auf der Probe sehr viel höhere Anregungsleistungen erreicht. 1 mW Durchschnittsleistung entspricht bei Pulslängen von 2 ps und einer Repetitionsrate von 76 MHz einer Spitzenleistung von 6,6 W. Diese hohen Leistungsdichten ermöglichen die nichtlineare Anregung (hier 2PA). Im kontinuierlichen Betrieb erfolgt die Anregung rein linear, man detektiert die thermische anti-Stokes Fluoreszenz. Die Leistungsabhängigkeit wurde für das Experiment mit gepulster Anregung durch Polynome angenähert:

$$F = c \cdot P_{exc} + d \cdot P_{exc}^2 \quad (7.2)$$

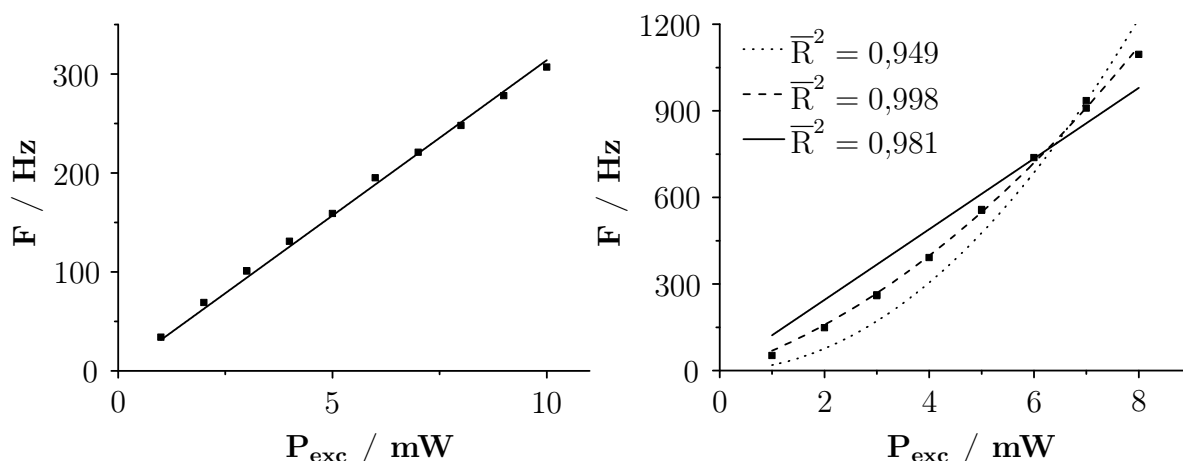


Abbildung 7.11.: Fluoreszenz des PPCy in Toluol nach Anregung bei 843 nm. Aufgetragen ist die detektierte Photonenzahl in Abhängigkeit von der Anregungsleistung (Quadrat). Links: Anregung durch den Ti:Sa-Oszillator im cw-Betrieb. Die Annäherung (durchgezogene Linie) erfolgte mit einer linearen Funktion $F = c \cdot P_{\text{exc}}$. Für das korrigierte Korrelationsmaß ergab sich ein Wert von $\bar{R}^2 = 0,999$. Rechts: Anregung durch den Ti:Sa-Oszillator im gepulsten Betrieb. Zum Vergleich wurden mehrere Modelle zur Beschreibung der Leistungsabhängigkeit verwendet: linear ($F = c \cdot P_{\text{exc}}$, durchgezogene Linie), quadratisch ($F = d \cdot P_{\text{exc}}^2$, gepunktete Linie) und als Kombination beider Modelle ($F = c \cdot P_{\text{exc}} + d \cdot P_{\text{exc}}^2$, gestrichelte Linie). Die Werte für das korrigierte Korrelationsmaß \bar{R}^2 und somit die Güte des Modells sind angegeben.

Während bei kontinuierlicher Anregung sich eine klar lineare Leistungsabhängigkeit ergibt, wird die gepulste Anregung am besten durch eine Kombination aus linearer anti-Stokes- und Zwei-Photonen-Anregung beschrieben (kleinster Wert für das korrigierte Korrelationsmaß der Modellfunktion).

Fluoreszenz durch Zwei-Photonen-Anregung Zunächst wurde der Signalstrahl des OPOs als Quelle für ω_1 und die Fundamente des HighQ für ω_2 verwendet. Durch Anregung mit $2\omega_1$ wurden allerdings bei einer Konzentration von etwa $3 \mu\text{M}$ und einer Anregungsleistung von etwa 20 mW Photonenzahlen von 0,32 MHz detektiert. Die Photonenzahl durch Anregung mit 20 mW bei 1064 nm betrug lediglich 3% hiervon. Der gemischte Beitrag durch Anregung mit $\omega_1 + \omega_2$ betrug etwa 46 kHz. Der Hintergrund durch 2PA kann in Lösung vor dem eigentlichen Experiment ermittelt und anschließend abgezogen werden. Für Einzelmolekülexperimente ist eine Reduktion dieses Beitrags zur

Fluoreszenzintensität hingegen zu minimieren. Daher wurde zusätzlich ein Strahlengang für den Idler des OPOs als Anregungsquelle für das Eigenbaumikroskop aufgebaut. Der gesamte Beitrag an Fluoreszenz durch 2PA konnte unter Verwendung des Idlers um etwa 98% reduziert werden. Auf ein Einzelmolekülexperiment übertragen ergeben sich somit etwa 10 Photonen/s, ein vernachlässigbarer Beitrag. 2PA durch den Abfragepuls findet bei der geringen Leistung, die hier eingesetzt wird, nicht statt.

Thermische anti-Stokes Fluoreszenz Die anti-Stokes Fluoreszenz durch Abfragen der thermischen Population liefert den größten Beitrag zum Hintergrund. Bei den Versuchen wurde für eine Anregungsintensität von 160 μW bei 845 nm Photonenzählraten von 0,8 MHz gemessen. Dieser Beitrag ist unvermeidbar und selbst auf Einzelmolekülniveau nachweisbar (s. Abschnitt 7.7). Ein Verfahren zur direkten Bestimmung dieses Beitrags ist daher erwünscht. Die zeitaufgelöste Detektion der Fluoreszenz mittels TCSPC bietet hierfür einen Ansatz, der auch auf Einzelmolekülniveau verwendet werden kann. Die Repetitionsrate des Abfragepulses wird verdoppelt (s. Abb. 7.12). Hierfür wird der Abfragestrahl über einen 50:50 Strahlteiler analog zum Aufbau eines Michelson-Interferometer auf zwei Strecken aufgeteilt. Am Ende dieser Strecken sitzt jeweils ein Spiegel, die Strecken unterscheiden sich in diesem Fall gerade um ein Viertel der Umlaufstrecke des Oszillators. Die reflektierten Pulszüge werden wieder überlappt und der resultierende Pulszug besitzt nun die doppelte Repetitionsrate. Somit erfolgt abwechselnd eine Anregung bei $\omega_1 + \omega_2 + \omega_3$ und ausschließlich bei ω_3 . Im TCSPC Histogramm erhält man die zwei zugehörigen Abklingkurven im Abstand der Repetitionsrate⁻¹ von ω_3 . Auf diese Weise kann der Beitrag aus der thermischen Population zum Gesamtsignal parallel zum eigentlichen Experiment ermittelt werden. In Abb. 7.12 ist eine Simulation des zu erwartenden TCSPC Histogramms gegeben. Die Zeitachse des Histogramms wird durch die Repetitionsrate der Anregungsquellen auf 13,16 ns begrenzt. Die Fluoreszenzlebensdauer τ_f des Fluorophors in Chloroform beträgt 4,26 ns. Wie im Histogrammen zu erkennen ist, klingt das Signal nicht bis zur erneuten Anregung durch ω_3 komplett ab. Dies ergibt einen konstanten Beitrag zu den Abklingkurven, der herausgerechnet werden kann.

Ein alternatives Verfahren zur Eliminierung der unterschiedlichen Hintergrundsignale wäre ein Experiment mit Lock-In Verstärkung.^[221, 241, 242] Durch alternierende Kombination der Anregungsquellen und phasengekoppelte Detektion kann das erwünschte Signal direkt herausgefiltert werden. Das Lock-In Verfahren wird allerdings in der Regel eingesetzt, um geringe Unterschiede in starken Signalen zu detektieren. Zudem arbeiten Lock-In Verstärker für gewöhnlich mit analogen Modulationen. In unserem Fall sind die Signale schwach und die Detektion erfolgt im Geiger-Modus. Für Experimente nahe dem Schrotrauschen konnten Braun und Libchaber ein digitales Lock-In Verfahren

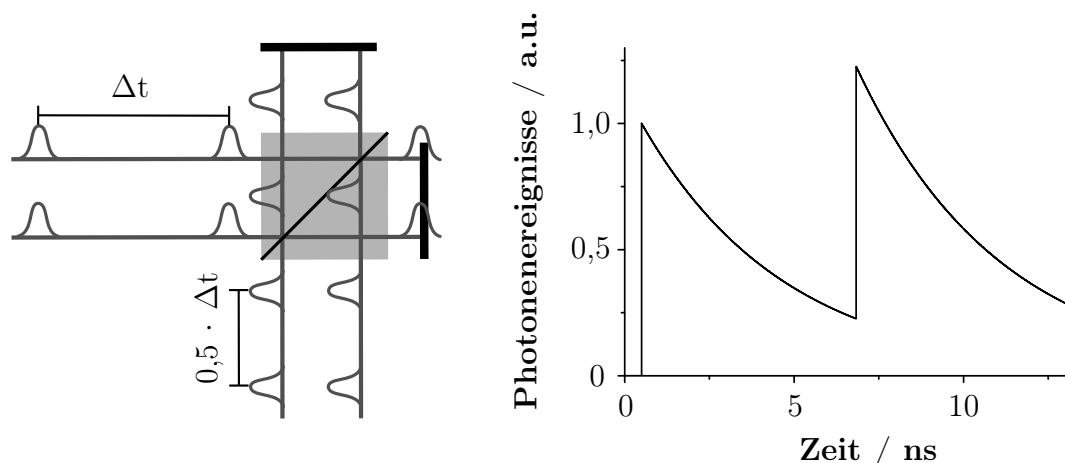


Abbildung 7.12.: Parallele Ermittlung der thermischen anti-Stokes Fluoreszenz. Links: Mittels 50:50 Strahlteiler und zweier Spiegel wird die Repetitionsrate des Abfragepulses verdoppelt. Rechts: Zu erwartendes TCSPC Histogramm bei doppelter Repetitionsrate des Abfragepulses.

unter Einsatz von einzelphotonenempfindlichen Detektoren demonstrieren.^[243] Hierfür müssten allerdings zwei der drei Anregungsquellen synchronisiert moduliert werden. Der von mir aufgezeigte Ansatz kann hingegen direkt ohne weitere Modifikation des Aufbaus eingesetzt werden.

7.7. Anti-Stokes Fluoreszenz auf Einzelmolekülniveau

Wie ich im letzten Abschnitt zeigen konnte, kann von PPCys ein starkes anti-Stokes Fluoreszenzsignal detektiert werden. Bisher wurde dieser Prozess lediglich als Hintergrundquelle diskutiert. Nun möchte ich auf zwei weitere Aspekte eingehen. Zum einen stellt sich die Frage, wo die Nachweisgrenze der anti-Stokes Fluoreszenz liegt. Dies ist ein entscheidender Schritt auf dem Weg zur Verwirklichung des geplanten Experiments. Welche Konzentration an PPCy kann noch mit der rein thermischen Population von etwa 1‰ für die Schwingungsmode von Interesse über anti-Stokes Fluoreszenz detektiert werden? Zum anderen möchte ich auf das Anwendungspotential der anti-Stokes Fluoreszenz eingehen. Im Kontext bisheriger Arbeiten hierzu möchte ich unsere Erkenntnisse diskutieren.

Probenpräparation Der PPCy Fluorophor wurde in Chloroform (Uvasol, Merck KGaA, Darmstadt) gelöst. Es wurde eine 3-Gew.% Polystyrol(PS)-Lösung (PS, M.W. 250000 g/mol, Acros Organics, Belgien) in Toluol (Uvasol, Merck KGaA, Darm-

stadt) hergestellt. Farbstofflösung und PS-Lösung wurden vermischt, so dass die Endkonzentration des PPCy ~ 50 pM betrug. Ein Polymerfilm mit einzeln abbildbaren Fluorophoren wurde durch Schleuderbeschichtung eines Deckglases bei 2000 rpm erhalten (Vgl.^[240]).

Mikrospektroskopie an einzelnen Molekülen Zur Anregung wurde der OPO bei 844 nm betrieben. Im Anregungsstrahlengang wurde ein Langpassfilter eingesetzt (RG830, Chroma, USA). Als Emissionsfilter dienten zwei Kurzpass- und ein Bandpassfilter (HC842/SP, Semrock, USA und HQ785/60m-2p, Chroma, USA). Mit dem bisherigen Aufbau konnten bereits einzelne PPCy Moleküle über anti-Stokes Fluoreszenz abgebildet werden. Allerdings wiesen die Daten noch ein schlechtes Verhältnis von Signal zu Hintergrund auf. Die deutlich geringere Anregungseffizienz verglichen zur klassischen Einzelmolekülspektroskopie wurde so deutlich. Der Aufbau wurde daraufhin weiter optimiert. Zur Unterdrückung des Hintergrunds wurde eine Lochblende eingesetzt, um das Detektionsvolumen zu beschränken (s. Abb. 7.3). Die SPAD wurde durch ein Modell von PerkinElmer ersetzt, dessen Quanteneffizienz im NIR um den Faktor drei höher ist (SPCM-AQR-14, PerkinElmer, USA). Auch die Dunkelzählrate ist mit < 100 Hz geringer. Allerdings besitzt diese SPAD eine deutlich schlechtere zeitliche Auflösung und geringere Dynamik. Für den Nachweis einzelner Moleküle mittels anti-Stokes Fluoreszenz waren diese Parameter nicht von Bedeutung. Da die Anregung nur bei einer Frequenz erfolgte, konnte zudem das Ölimmersionsobjektiv verwendet werden. Dieses besitzt eine höhere N.A. und somit Einsammeleffizienz. Auf diese Weise konnten mit einer Anregungsleistung von lediglich $150 \mu\text{W}$ (gemessen vor dem Periskop) Abbildungen mit gutem Kontrast erzeugt werden. In Abb. 7.13 sind anti-Stokes Fluoreszenzaufnahmen einzelner PPCy Moleküle gezeigt. Die Intensitätsverteilung wurde auch hier mit einer Gauß-Funktion angenähert. Deren Halbwertsbreite ergab 470 nm. Die Trajektorie rechts unten zeigt eine sprunghafte Erhöhung der detektierten Fluoreszenzintensität. Dass es sich um lediglich ein Molekül im Fokus handelt, zeigen die Signalsprünge zwischen Hintergrundniveau und maximalem Signal. Die sprunghafte Änderung der Fluoreszenzintensität eines einzelnen Fluorophors ist bei den PPCys öfter zu beobachten und wurde von Sebastian Scheinhardt in seiner Diplomarbeit näher untersucht.^[244] Durch eine spektrale Verschiebung des ersten elektronischen Übergangs wird der Absorptionskoeffizient bei der Anregungswellenlänge in diesem Fall erhöht und somit das Molekül effizienter angeregt.

Diskussion der hochempfindlichen anti-Stokes Fluoreszenz und deren Anwendungspotential Die hier vorgestellten Ergebnisse sind die ersten anti-Stokes Fluoreszenz Experimente auf Einzelmolekülniveau. Mir ist bislang nur eine Veröffentlichung zur

hohempfindlichen Detektion von anti-Stokes Fluoreszenz bekannt. Saito *et al.* konnten an einem auf Einzelmolekülsensitivität optimierten TIRF Mikroskop > 100 Moleküle im Anregungsvolumen abbilden.^[245] Die hohe Empfindlichkeit unseres anti-Stokes Fluoreszenz Experiments beruht auf mehreren Faktoren. Apparativ sind sicherlich die Steilheit der Filterkanten im NIR und die hohe Quanteneffizienz des Detektors vorteilhaft.

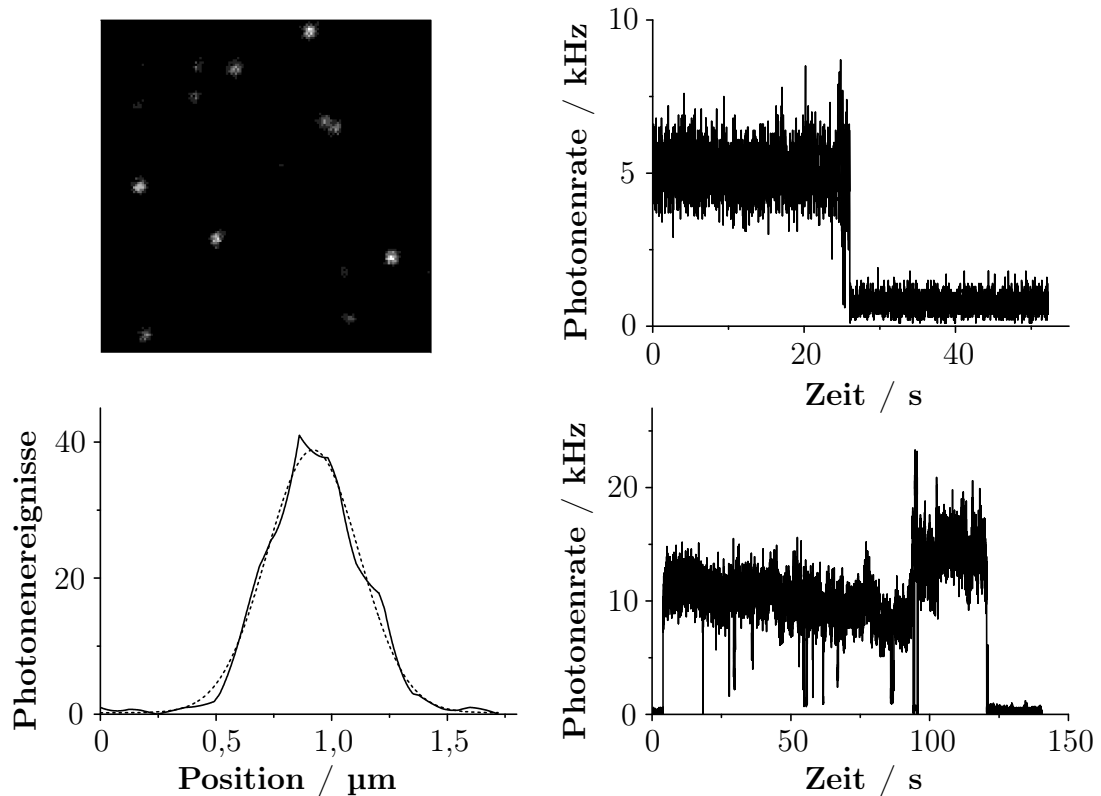


Abbildung 7.13.: Einzelmolekülspektroskopie an einzelnen PPCy unter anti-Stokes Anregung. Links, oben: Aufnahme eines PS-Films mit PPCy Molekülen. Scanbereich $15 \times 15 \mu\text{m}^2$, Pixelgröße 100 nm, 1 ms Verweildauer pro Pixel. Links, unten: Räumliches Intensitätsprofil eines PPCy Moleküls (durchgezogene Linie). Es wurde eine Gauß-Verteilung angenähert (gestrichelte Linie). Rechts: Trajektorien der anti-Stokes Fluoreszenz einzelner PPCy Moleküle.

Insbesondere aber die spektralen Merkmale des PPCy (s. Abschnitt 7.3) kommen der Detektion der anti-Stokes Fluoreszenz zugute. Die spektrale Lage im NIR wirkt sich wie bereits mehrmals angesprochen günstig auf Differenzen in der Einheit Wellenlänge im Vergleich zu den korrespondierenden Energieunterschieden aus. Hinzu kommen die

schmale Bandenform des Absorptions- sowie Emissionsspektrums und die geringe Stokes-Verschiebung. So ist die Detektion von etwa 80% des Fluoreszenzspektrums möglich, da Anregungswellenlänge und Detektionsfenster entsprechend gut getrennt werden können. Aufgrund des Bandpassfilters nutzen wir bislang lediglich 63%. Auch hier zeigt sich die gute Eignung der Farbstoffklasse für das Experiment.

Welches Anwendungspotential besitzt die effiziente Anregung und Detektion der anti-Stokes Fluoreszenz? In der Arbeit von Saito *et al.* wurden Motorproteine Myosin-Familie und das Strukturprotein Aktin mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren markiert. Durch geeignete Auswahl der Fluorophore konnten mit lediglich einer Anregungswellenlänge beide Fluorophore zugleich angeregt (Stokes und anti-Stokes) und spektral getrennt detektiert werden. Die Stokes Fluoreszenz des einen Farbstoffs war auf Einzelmolekülniveau nachweisbar, das anti-Stokes Signal stammte von > 100 Fluorophoren. Für diese Art von Experimenten ist eine weitere Erniedrigung der Fluorophorkonzentration bzw. Markerdichte uninteressant. Auch ist der Vorteil der Reduzierung der Anregungsquellen begrenzt. Mehrfarbenexperimente sind mit Stokes-Anregung Routine in der Fluoreszenzmikroskopie. Zudem wären die PPCys für diese Anwendung nur von begrenztem Nutzen. Zwar bieten sie eine Reihe möglicher Paare zur parallelen Stokes und anti-Stokes Anregung, aber die Klasse der PPCys ist bisher nur sehr beschränkt in wässriger Umgebung einsetzbar.^[235]

Das große Potential der anti-Stokes Fluoreszenz liegt in ihrer Temperaturabhängigkeit. Der Zusammenhang von Temperatur und anti-Stokes Fluoreszenz wurde bereits in den 20er Jahren des letzten Jahrhunderts diskutiert. Hier ist die Publikation von Pringsheim von 1929 zu nennen, der erstmals diesen Zusammenhang in Bezug auf den 2. Hauptsatz zur Thermodynamik korrekt beschrieben hat.^[222] Landau vertiefte die thermodynamische Betrachtung in Bezug auf die Eigenschaften des Anregungs- und Emissionslichts.^[246] Beide Arbeiten konzentrierten sich auf den Kühleffekt, der mittels anti-Stokes Fluoreszenz (oder allgemeiner Lumineszenz) erreicht werden kann. Durch Depopulation der Schwingungszustände des $|S_0\rangle$ über anti-Stokes Lumineszenz wird dem System Wärmeenergie entzogen. Entscheidend für das Kühlen der Probe sind hierbei die spektralen Merkmale des Farbstoffs. So muss beispielsweise die Lumineszenzquantenausbeute nahe eins liegen, ansonsten überwiegt der Heizeffekt durch strahlungslose Relaxation aus dem $|S_1\rangle$.^[247] Die anti-Stokes Fluoreszenz fand bislang auch hauptsächlich beim sogenannten Laser Cooling, d.h. die Anregung erfolgte mittels Laser, Anwendung.^[248] Mit 65 K wurde in Gläsern, die mit Ionen Seltener Erden dotiert waren, der bisher stärkste Kühleffekt erreicht.^[249]

Für die hochempfindliche Mikrospektroskopie der anti-Stokes Fluoreszenz ist die Temperaturmessung sicherlich das interessanteste Einsatzfeld. Die nach Boltzmann exponentielle Abhängigkeit der anti-Stokes Fluoreszenz von der Temperatur (vgl. 6.5) stellt ein

sensitives Thermometer zur Verfügung. Dies wurde bereits in den Arbeiten zum Laser Cooling von Farbstofflösungen betont.^[224,247] Hier wurde eine Auflösung von 0,2 K erreicht. Erstmals eingesetzt zur 3D Mikroskopie der Temperaturverteilung in einer Probe wurde die anti-Stokes Fluoreszenz in der Gruppe von Prasad.^[250] Hierbei sind mehrere Dinge zu beachten. Sollen absolute Temperaturen und nicht nur relative Temperaturunterschiede bestimmt werden, muss eine Kalibrierung erfolgen. Der hierfür zu ermittelnde Energieunterschied E_{12} aus Gleichung 6.98 hängt von den beteiligten Schwingungsmoden ab. Auch die Variation der Fluoreszenzquantenausbeute mit der Temperatur, durch welche in der Regel mit ansteigenden Temperaturen die Fluoreszenzintensität abnimmt, ist zu berücksichtigen. Für Details hierzu sei auf die Arbeiten von Clark *et al.* verwiesen.^[224,247] Ein Faktor, der bei der Mikroskopie zusätzlich beachtet werden muss, ist die lokale Konzentration der Fluorophore. Bleichen und räumliche Verteilung der Fluorophore sind daher parallel zu ermitteln. Dies erfolgt durch Stokes Anregung der Fluoreszenz. Sowohl 1PA^[251] als auch 2PA^[250] sind hierfür geeignet.

Da die Temperatur einer der häufigst gemessenen Parameter ist, gibt es somit eine Vielzahl von Anwendungsfeldern für die anti-Stokes Fluoreszenz Mikrospektroskopie. Ein aktueller Artikel von Feng *et al.* zeigt, dass an der Temperaturmessung mit optischen Methoden ein großes Interesse besteht.^[252] So können optisch auch große Flächen mit hoher räumlicher Auflösung vermessen werden und so Temperaturgradienten bestimmt werden. Dies ist beispielsweise für viele technische Fragestellungen im Maschinenbau von Nutzen. Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Mikro- und Nanotechnologie. Hier spielt die lokale Hitzeentwicklung und der Temperaturtransport eine große Rolle bei der Leistung aber auch Stabilität von Komponenten. Aus der Vielzahl an Messmethoden zur Temperaturbestimmung ragen die optischen Verfahren durch ihren nicht- bzw. minimalinvasiven Charakter hervor. Eine Übersicht zu Methoden der Temperaturmessung wurde durch Childs *et al.* gegeben.^[253] Die Methode der Wahl ergibt sich aus der Art der Probe und Faktoren wie dem zu messenden Temperaturbereich und der benötigten Auflösung in Bezug auf Ort und Temperatur. Als Alternativen zur Intensität der anti-Stokes Fluoreszenz stellen die Fluoreszenzquantenausbeute (indirekt ermittelt über die Fluoreszenzlebensdauer oder die Intensität) und die spektrale Verschiebung der Emission ein Maß für die Temperatur dar.^[252] Den fluoreszenzbasierten Verfahren ist die hohe räumliche Auflösung gemein. Es werden allerdings jeweils geeignete Chromophore (s.o.) benötigt, die in die Probe eingebracht werden müssen. Infrarot und Raman Mikrospektroskopie sind auch bei der Temperaturmessung Konkurrenzverfahren zur Fluoreszenzmikroskopie. Neben der bereits erfolgten Argumentation zu Vor- und Nachteilen der jeweiligen Techniken weisen bezogen auf Temperaturmessungen die fluoreszenzbasierten Verfahren eine höhere Genauigkeit auf.^[251,252] Allerdings sind die zugänglichen Messbereiche auf etwa 150 K um Raumtemperatur beschränkt.^[247,252] Die hohe Nachweisempfindlichkeit der PPCys

ist ideal um eine hohe räumliche Auflösung und Aufnahmegeschwindigkeit bei geringer lokaler Konzentration zu erreichen. Durch die geringe Konzentration kann zur Temperaturmessung paralleles Heizen über Schwingungsrelaxation vermieden werden. Zur Kalibrierung wird allerdings eine Mindestanzahl an Fluorophoren im Detektionsvolumen benötigt, da diese auf einer statistischen Beschreibung der Schwingungspopulationen beruht.

7.8. Die Problematik beim weiteren Vorgehen und Diskussion des Ansatzes

Was sind die nächsten Schritte bei der Umsetzung der Schwingungsspektroskopie an einzelnen Molekülen nach unserem Ansatz? Zunächst sollte der Nachweis erfolgen, dass solch ein Anregungsschema zu einem schwingungsabhängigen Fluoreszenzsignal führt. Hierzu liegt es nahe mit Experimenten in Lösung zu beginnen. Wie bereits im Rahmen der Vorversuche diskutiert sind die entscheidenden Vorteile solch eines Experiments die Umgehung des Photobleichens durch stetigen Austausch der Probenmoleküle und die einfache Variation der Molekülzahl, an denen das Experiment durchgeführt wird. Bei erfolgreicher Demonstration des Anregungsprozesses in Lösung und einer etwaigen Optimierung der Anregungs- und Detektionsbedingungen, sollte der Versuch an einzelnen Fluorophoren in einer Polymermatrix direkt durchführbar sein. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es nicht mehr möglich, diese Pläne umzusetzen.

Wie bereits mehrfach erwähnt, wurde der Betrieb des Labors im Verlauf der Dissertation zunehmend problematisch. Die Anregungsquellen sollten unter geeigneten Laborbedingungen betrieben werden. Hierzu zählen nicht nur stabile Stromversorgung und konstante Umgebungstemperaturen (maximal ± 1 K), sondern auch der Schutz vor Verschmutzungen der optischen Komponenten. Die Luft innerhalb des Gebäudes weist eine relative hohe Verschmutzung auf. Sowohl die Partikelzahl ("Staub") als auch Inhaltstoffe, wie sie im chemisch-technischen Umfeld auftreten (bspw. Silikonöle oder Ammoniumchlorid), führten zu einer steigenden Kontamination der optischen Elemente. Zunächst konnte noch mittels regelmäßiger Reinigung der zugänglichen Optiken der Betrieb -wenn auch eingeschränkt- aufrecht erhalten werden. Um die zunehmenden Intensitätsfluktuationen auszugleichen wurde das Noise-Eater System installiert (vgl. Abschnitt 7.1). Zudem musste die Strahlposition immer häufiger im Verlauf des Tages nachjustiert werden. Beginnend von den Anregungsquellen mussten hierfür alle Komponenten im Strahlengang geprüft werden. Schließlich gelang es auch aufgrund der Instabilitäten nicht mehr das SynchroLock Modul zu betreiben, die Anregungsquellen konnten nicht länger synchronisiert werden. Somit war letztlich die Durchführung des geplanten Experiments nicht

möglich.

Einschätzung des Ansatzes im Vergleich zu anderen Arbeiten zur kohärenten Spektroskopie an einzelnen Molekülen Ich möchte hier allerdings zumindest noch kurz unser Konzept im Kontext anderer Arbeiten auf dem Gebiet der kohärenten Spektroskopie an einzelnen Molekülen einordnen. Das ultimative Ziel des Projektes ist die Schwingungsspektroskopie an einzelnen Molekülen in deren “natürlicher Umgebung”, was in der Regel bei Raumtemperatur und nicht in Kontakt zu einer metallischen Oberfläche bedeutet. Wir möchten dies mit einer Kombination aus kohärenter Schwingungsanregung und Abfragen mittels Fluoreszenzanregung erreichen. Die Fluoreszenzspektroskopie wird heutzutage routinemäßig bei Raumtemperatur auf Einzelmolekülniveau betrieben. Dass kohärente Phänomene auf Einzelmolekülniveau beobachtet und sogar kontrolliert werden können, ist in den letzten Jahren experimentell demonstriert worden.^[254–257] In der Gruppe von Sandoghdar wurden kohärente Zustände in einem einzelnen Molekül generiert. Durch Anregung mittels Nanosekunden Laserpulsen wurde eine kohärente Überlagerung des elektronischen Grundzustands und des ersten elektronischen Zustands des Fluorophors erzielt.^[257] Rabi Oszillationen konnten direkt über die Variation der Fluoreszenzintensität verfolgt werden. Neben der Möglichkeit Kohärenzeffekte auf Einzelmolekülniveau zu untersuchen wurde als weitere Anwendung die präzise Lokalisation eines Emitters aufgezeigt.^[258] Näher an unserem Experiment sind die beeindruckenden Arbeiten zur kohärenten Kontrolle einzelner Moleküle in der Gruppe von van Hulst.^[259] Bereits 2005 gelang es van Dijk *et al.* ein auf der Femtoskudenskala zeitaufgelöstes Pump-Abfrage-Verfahren auf Einzelmolekülniveau zu verwirklichen.^[255,260] Die Einzelmolekülsensitivität wurde ebenfalls durch Verwendung der Fluoreszenz als zu detektierendem Signal erreicht. Bis dato hatte die lange Verweildauer im $|S_1\rangle$ die Verwendung der spontanen (und somit inkohärenten) Fluoreszenzemission bei der Untersuchung kohärenter, ultrakurzer Prozesse verhindert. Die Problematik der geringen Zeitauflösung der Fluoreszenzspektroskopie wurde nun durch eine gezielte Verschiebung des Gleichgewichts von Absorption und stimulierter Emission umgangen. Zwei Anregungspulse mit Sättigungsintensität wurden mit variablem Zeitabstand eingestrahlt. Die Fluoreszenzintensität wurde als Funktion der Verzögerung der zwei Anregungspulse gemessen. Für einen Anregungspuls mit Sättigungsintensität erwartet man mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% die Emission eines Photons. Durch Relaxationsprozesse im $|S_1\rangle$ findet eine Umverteilung der Anregungsenergie statt. Die Wahrscheinlichkeit der stimulierten Emission eines Photons nimmt daher ab, während Absorption weiter stattfinden kann. Insgesamt erhöht dies die Besetzung des $|S_1\rangle$ und somit auch die Wahrscheinlichkeit spontane Fluoreszenz zu detektieren. Bei gegebener Anregungsintensität und Pulsdauer folgt somit aus der Variation der Emissionswahrscheinlichkeit mit dem Abstand der An-

regungspulse die Zeitkonstante der Schwingungsrelaxationsprozesse im $|S_1\rangle$ des Moleküls. Erstmals konnten solch schnelle Prozesse bei Raumtemperatur auf Einzelmolekülniveau verfolgt werden. Die ermittelten Zeitkonstanten unterschieden sich teilweise beträchtlich für einzelne Fluorophore. Dies kann höchstwahrscheinlich auf Unterschiede in der Konformation und/oder den Einfluss der direkten Umgebung des jeweiligen Moleküls zurückgeführt werden. Es folgten eine Reihe weiterer Experimente, die auf dem gleichen experimentellen Ansatz beruhten. Zunächst fand die Technik Anwendung bei der Untersuchung von Excitonen in Komplexen bzw. Aggregaten aus mehreren Chromophoren.^[261] Ein großer Fortschritt wurde durch den Einsatz einer breitbandigen Anregungsquelle in Kombination mit einem Pulsformer erreicht.^[254, 256, 262] Hierdurch konnte nicht nur die zeitliche Verzögerung der zwei Pulse, sondern auch deren spektrale Phase und Amplitude variiert werden. Der erste Puls generierte in Abhängigkeit seiner spektralen Zusammensetzung gezielt Schwingungswellenpakete im $|S_1\rangle$. Die Fluoreszenzintensität nach Abfragen mit dem zweiten Puls hängt von dessen Verzögerung und Phasenbeziehung zum ersten Puls ab. Die Wellenpakete und deren Interferenzen konnten somit auf Einzelmolekülniveau verfolgt werden. Im Gegensatz zu den ersten Experimenten war es nicht mehr notwendig unter Sättigungsbedingungen zu arbeiten. Das Photobleichen wurde so deutlich reduziert, die maximale Anzahl emittierter Photonen pro Molekül entsprechend erhöht. Mittels Fourier Analyse der Interferenzen der Wellenpakete können die Frequenzkomponenten des Schwingungsspektrums erhalten werden. Allerdings wird hierfür eine ausreichende Datenmenge und somit Vielzahl an Photonen benötigt. Bisher war dies nur mit außergewöhnlich stabilen Chromophoren möglich.^[259]

Inwiefern verhält sich unser Experiment zu diesen Arbeiten? Auch wir wollen Schwingungsspektroskopie auf Einzelmolekülniveau bei Raumtemperatur betreiben und verwenden hierfür einen fluoreszenzbasierten Ansatz. Allerdings erfolgt bei uns eine Charakterisierung der Schwingungsmoden des elektronischen Grundzustands $|S_0\rangle$. Wir regen jeweils nur eine Schwingungsmode gezielt an. Durch Variation der Anregungswellenlänge können aktive Schwingungsbanden direkt identifiziert werden. Das zeitliche Verhalten der Schwingungspopulation kann durch Verzögerung des Abfragepulses untersucht werden. Unsere theoretische Abschätzung sowie die ersten Vorversuche zeigen, dass die Signalstärke kein Problem darstellen wird. Den größten Beitrag zum Hintergrund liefert die thermische anti-Stokes Fluoreszenz. Wie in Kapitel 6 gezeigt übertrifft die Schwingungspopulation aus kohärenter Anregung die thermische um mehr als eine Größenordnung. Die Detektion einzelner Moleküle mittels thermischer anti-Stokes Fluoreszenz, die ich in Abschnitt 7.7 demonstrieren konnte, spricht daher für die Realisierbarkeit des Ansatzes. Allerdings benötigen auch wir ausreichend photostabile Fluorophore, um die benötigten Variationen in der Anregung zur Ermittlung der spektralen Merkmale an einem Molekül durchführen zu können.

Zusammenfassung

Kapitel 8.

Zusammenfassung

Für die optische Mikroskopie steht eine Vielzahl von Kontrastmechanismen zur Verfügung. Die Fluoreszenzmikroskopie bietet hierunter sicherlich die größte Anwendungsbreite. Die erreichbaren Signalstärken ermöglichen hochempfindliche und schnelle Mikroskopie. Über Jahrzehnte wurden selektive Markierungsverfahren entwickelt, um Fluorophore in die zu untersuchenden Systeme einzubringen. Die Kombination mit der Spektroskopie ermöglicht es nicht nur gezielt Strukturen abzubilden sondern auch Systeme zu charakterisieren, indem spektrale Merkmale der Fluorophore als Sonden für deren Umgebung dienen. Dennoch besitzt die Fluoreszenzmikroskopie auch inhärente Nachteile. Hierzu zählt der (wenn auch minimal-) invasive Charakter, in der Regel muss ein Marker eingebracht werden. Der Einfluss dieser Modifikation des zu untersuchenden Systems ist häufig Gegenstand kontroverser Diskussion. Weiter beeinträchtigt das Photobleichen der Farbstoffe sowohl Beobachtungsgeschwindigkeit als auch Beobachtungsdauer. Intrinsische Kontrastmechanismen stellen daher eine interessante Alternative dar. Schwingungsbasierte Verfahren bieten hierbei die höchste Selektivität. Unter diesen hat sich die CARS Mikroskopie in den letzten zehn Jahren zu einer sehr attraktiven Methode entwickelt. Vor allem in den Biowissenschaften und der Medizin stieß sie auf starkes Interesse. In der vorliegenden Arbeit habe ich mich mit der Schwingungsmikrospektroskopie beschäftigt. Es sollte ein Labor für nichtlinear optische Experimente aufgebaut werden. Die CARS Mikroskopie sollte hierbei in Konstanz etabliert werden. Zudem sollte ein neuer, fluoreszenzbasierter Ansatz zur hochempfindlichen Schwingungsmikrospektroskopie entwickelt werden.

Im ersten Teil der Arbeit konnte ich den Aufbau eines anwendungsorientierten CARS Mikroskops mit hoher Flexibilität verwirklichen. Damit konnte ich das Potenzial der Technik in einer Vielzahl von Experimenten demonstrieren. Die Abbildung einzelner Lipiddoppelschichten stellt aktuell wohl das Detektionslimit der CARS Mikroskopie dar. Mit dem hier gezeigten Aufbau konnten unilamellare Lipidvesikel mikroskopiert werden und erstmals markerfrei, und chemisch selektiv, die Elektropermeabilisation am Membranmodell verfolgt werden.^[105] Weiter wurde eine ganze Reihe von Modellorganismen

erfolgreich abgebildet. Anfängen von Mikroorganismen, wie dem Bakterium *Escherichia coli*, über Zellkulturen bis hin zum Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* konnte der Kontrast mittels CARS auf einer Längenskala von kleiner einem Mikrometer bis zu mehreren Millimetern demonstriert werden. Die methodischen Anforderungen, beispielsweise in Bezug auf räumliche und zeitliche Auflösung, aber auch Photosensitivität, unterschieden sich hierbei teilweise beträchtlich. Die erzielten Signalintensitäten ermöglichen schnelle Aufnahmen. So konnte die Bewegung von "Lipid droplets" (LDs) in Zellen mit Videogeschwindigkeit verfolgt werden. Erst durch diese hohe Aufnahmegeschwindigkeit wurde auch die Abbildung großflächiger Proben, wie kompletter Fadenwürmer oder ganzer Gewebeschnitte muriner Gehirne, möglich. Durch den optisch nichtlinearen Charakter des CARS Prozesses besitzen die Aufnahmen zudem eine hohe 3-dimensionale räumliche Auflösung. Der schwingungsbasierte Kontrast bietet nicht nur chemische Selektivität, sondern umgeht auch die Problematik des Photobleichens. Die maximale Anzahl an Aufnahmen und somit sowohl Geschwindigkeit als auch Dauer der Beobachtung sind nicht durch einen nachlassenden Kontrast begrenzt. Dies wurde genutzt, um Zellen erstmals chemisch selektiv auf einer Zeitskala von Subsekunden bis Stunden zu beobachten.^[130] Die unter Einbezug der Zeitdimension 4-dimensionale CARS Mikroskopie besitzt ein hohes Anwendungspotential für Studien zum Lipidmetabolismus.^[137] Schließlich konnte die Eignung des Aufbaus zur multimodalen Mikroskopie demonstriert werden. Die Anregungsquellen bieten direkt die Möglichkeit weitere nichtlinear optische Kontrastmechanismen zu nutzen. Als Beispiel hierfür wurde das Rückenmark von Ratten parallel mittels CARS, SFG und Zwei-Photonen angeregter Fluoreszenz mikroskopiert.^[157] Während das CARS Signal bei einer Resonanz von 2845 cm^{-1} hauptsächlich die Lipidverteilung wiedergibt, konnten mittels SFG Kollagenfasern des Narbengewebes selektiv abgebildet werden. Die Autofluoreszenz aus Zwei-Photonen Anregung zeigt vermutlich aktivierte Mikroglia. Die Kombination der Kontrastverfahren ermöglicht es auch komplexe Prozesse, wie in diesem Falle die Regeneration des Rückenmarks nach einer Läsion, in hoher räumlicher Auflösung abzubilden.

In der vorliegenden Arbeit wurde des Weiteren ein vereinfachter Aufbau zur Weitfeld CARS Mikroskopie vorgestellt. Anhand systematischer Untersuchungen konnte der Mechanismus der Signalerzeugung unter nicht-phasenangepasster Anregungsgeometrie geklärt werden.^[162] Die Phasenanpassung erfolgt lokal durch Brechung bzw. Streuung an Grenzflächen heterogener Proben. Im Vergleich zur CARS Mikroskopie unter Berücksichtigung der Phasenanpassung ist der nichtresonante Hintergrund stark verringert. Mittels dieser Technik waren CARS Aufnahmen mit Videogeschwindigkeit möglich. Zudem waren die benötigten Anregungsleistungen unter Berücksichtigung der Beleuchtungsfläche deutlich geringer als bei der konventionellen CARS Mikroskopie.

Im Zuge der vielfältigen Experimente stellten sich aber auch die Grenzen der CARS

Mikroskopie dar. CARS ist ein kohärenter Prozess, dessen Effizienz auf einer Verstärkung durch konstruktive Interferenz der Felder vieler Streuzentren beruht. Lipide stellen aufgrund ihrer hohen lokalen Dichte an äquivalenten Streuzentren (C-H Bindungen) und einer hohen Suszeptibilität dritter Ordnung $\chi^{(3)}$ die ideale Probe für die CARS Mikroskopie dar. Andere Verbindungsklassen sind hingegen deutlich schwerer nachzuweisen. Neben unseren Erfahrungen zeigt auch ein Blick in die Veröffentlichungen der letzten Jahre, dass die zunächst aufgrund des schwingungsselektiven Mechanismus erhoffte Bandbreite an Zielmolekülen nicht erreicht wurde. Die CARS Mikroskopie findet nahezu ausschließlich in Fragestellungen Anwendung, die sich auf Lipide beziehen.^[263] Der Sensitivität der CARS Mikrospektroskopie sind durch den kohärenten Charakter der Signalerzeugung Grenzen gesetzt. Für die gezeigten anwendungsorientierten Fragestellungen im Bereich der Biologie und Medizin reichen die bisherigen Methoden wie CARS aber auch SRS aus. Um noch offene Fragen im Bereich photophysikalischer Prozesse zu klären oder aber beispielsweise die lokale Umgebung eines Sondenmoleküls zu charakterisieren, ist dagegen eine hochempfindliche mikroskopische Schwingungsspektroskopie von Interesse.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde ein Ansatz zur schwingungsselektiven Mikrospektroskopie an einzelnen Molekülen vorgestellt. Das Konzept beruht auf der gezielten Anregung einer Schwingung und anschließender Überführung dieser Schwingungspopulation in den ersten elektronisch angeregten Zustand $|S_1\rangle$. Der Nachweis der Schwingungspopulation erfolgt mittels Detektion der Fluoreszenz. Unterschiedliche Verfahren zur Schwingungsanregung wurden diskutiert und die Wahl eines kohärenten Ansatzes begründet. Mittels zweier Anregungspulse der Frequenzen ω_1 und ω_2 wird eine Schwingungsmode der Frequenz $\omega_v = \omega_1 - \omega_2$ angeregt. Dies kann in Analogie zum CARS Prozess betrachtet werden. Der entscheidende Schritt zur Erhöhung der Sensitivität liegt im Abfragen via elektronischer Anregung. Im Gegensatz zur CARS, deren Signalstärke aus der Wechselwirkung der emittierenden Felder vieler Streuzentren resultiert, kann das Fluoreszenzsignal einzelner Moleküle nachgewiesen werden. Schwingungsspektren können durch die Veränderung der Fluoreszenzintensität bei Variation der Differenzfrequenz $\omega_1 - \omega_2$ der Anregungsfelder erhalten werden. Die Stärke des Fluoreszenzsignals hängt dabei allerdings nicht nur vom Vorhandensein einer Schwingungsmode ab, sondern auch von deren Kopplung an den elektronischen Übergang des Abfrageprozesses. Auch zeitaufgelöste Experimente sind durch Verzögerung des Abfragepulses möglich. Eine theoretische Beschreibung des Experiments erfolgte auf Basis der zeitabhängigen Störungstheorie. Die Effizienz der Erzeugung einer Schwingungspopulation und das zu erwartende Fluoreszenzsignal wurden anhand der spektralen Merkmale eines exemplarischen Fluorophors und der Daten des in dieser Arbeit verwirklichten Aufbaus berechnet. Im Gegensatz zur rein thermischen Population einer C-C-Streckschwingung

von etwa 1‰ wird durch den kohärenten Anregungsprozess eine Schwingungspopulation von etwa 9% pro Anregungspuls erzielt. Diese Abschätzung ergab für ein einzelnes Molekül eine Photonenrate von etwa 500 kHz an zusätzlicher Fluoreszenz aus unserem Anregungsverfahren.

Für die nichtlinear optische Mikrospektroskopie wurde ein neuer Aufbau mit Einzelmolekülsensitivität realisiert. Die Eignung dieses Mikroskops für die NLO wurde an Zinkoxid Nanopartikeln demonstriert. Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie einzelner Moleküle konnte ebenfalls erfolgreich an dem Aufbau gezeigt werden. Mögliche Hintergrundquellen des geplanten Experiments wie Fluoreszenz aus Zwei-Photonen Anregung oder thermische anti-Stokes Fluoreszenz wurden diskutiert und deren Beiträge in Vorversuchen ermittelt. Durch Anpassung der Anregungsbedingungen konnte der Fluoreszenz Hintergrund aus Zwei-Photonen Anregung um 98% reduziert werden. Zudem wurde ein Verfahren zur parallelen Bestimmung des thermischen Beitrags zur anti-Stokes Fluoreszenz vorgeschlagen. Schließlich konnte erstmals anti-Stokes Fluoreszenz auf Einzelmolekülniveau nachgewiesen werden. Dies ist zum einen ein bedeutender Schritt bei der Umsetzung des geplanten Experiments. Wie die theoretischen Vorarbeiten zeigten, liegt die erwartete Schwingungspopulation aus kohärenter Anregung für die C-C Streck-schwingung ($\approx 1370 \text{ cm}^{-1}$) um mehr als eine Größenordnung über der rein thermischen Population dieser Schwingungsmode. Ein entsprechend starkes Fluoreszenzsignal darf somit für unser Experiment selbst auf Einzelmolekülniveau erwartet werden. Zum anderen eröffnet die hochempfindliche anti-Stokes Fluoreszenz Mikroskopie die Möglichkeit mit hoher räumlicher Auflösung Temperaturen zu messen. Die thermische Population von Schwingungszuständen folgt aus der Boltzmann-Statistik. Die Intensität der anti-Stokes Fluoreszenz zeigt daher eine exponentielle Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur des Fluorophors und stellt ein hervorragendes Maß hierfür dar. Clark *et al.* konnten bereits eine Auflösung von $<1 \text{ K}$ demonstrieren.^[224] Während für die Temperaturmessung mittels Fluoreszenz bisher stets hohe Farbstoffkonzentrationen eingesetzt wurden, erhalten wir bereits mit sehr geringen Konzentrationen ein ausreichendes Fluoreszenzsignal.^[251] Zur absoluten Temperaturmessung muss allerdings eine statisch ausreichende Anzahl an Molekülen im Detektionsvolumen vorliegen, um die Temperatur über die Boltzmann-Verteilung ermitteln zu können.

Das eigentliche Experiment zur Schwingungsspektroskopie an einzelnen Molekülen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit leider nicht mehr durchgeführt werden. Unter den gegebenen Laborbedingungen hat sich die Durchführung des experimentell anspruchsvollen Ansatzes als unmöglich erwiesen, da die Anregungsquellen nicht mit ausreichender Stabilität betrieben werden konnten.

Literaturverzeichnis

- [1] KÖHLER, A.: Mikrophotographische Untersuchungen mit ultraviolettem Licht. In: *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und für mikroskopische Technik* 21 (1904), S. 129–165 und 273–304
- [2] MOERNER, W. E.; ORRIT, M.: Illuminating single molecules in condensed matter. In: *Science* 283 (1999), Nr. 5408, S. 1670–1676
- [3] HAUGLAND, Richard P.: *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*. Eugene, OR : Molecular Probes, 1996
- [4] RESCH-GENGER, U.; GRABOLLE, M.; CAVALIERE-JARICOT, S.; NITSCHKE, R. ; NANN, T.: Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. In: *Nature Methods* 5 (2008), Nr. 9, S. 763–775
- [5] MARKS, K. M.; NOLAN, G. P.: Chemical labeling strategies for cell biology. In: *Nature Methods* 3 (2006), Nr. 8, S. 591–596
- [6] KAIN, S.R.: Methods and Protocols. In: CHALFIE, M. (Hrsg.); KAIN, S.R. (Hrsg.): *Green Fluorescent Protein*. New York : John Wiley & Sons, Inc., 2005
- [7] MANDERS, E. M. M.; VERBEEK, F. J. ; ATEN, J. A.: Measurement of colocalization of objects in dual-color confocal images. In: *Journal of Microscopy-Oxford* 169 (1993), S. 375–382
- [8] STRYER, L.: Fluorescence energy-transfer as a spectroscopic ruler. In: *Annual Review of Biochemistry* 47 (1978), S. 819–846
- [9] MAGDE, D.; WEBB, W. W. ; ELSON, E.: Thermodynamic fluctuations in a reacting system - Measurement by fluorescence correlation spectroscopy. In: *Physical Review Letters* 29 (1972), Nr. 11, S. 705–708
- [10] RIES, J.; SCHWILLE, P.: Fluorescence correlation spectroscopy. In: *Bioessays* 34 (2012), Nr. 5, S. 361–368
- [11] SWANSON, S. J.; CHOI, W. G.; CHANOCA, A. ; GILROY, S.: In vivo imaging of Ca²⁺, pH, and reactive oxygen species using fluorescent probes in plants. In: *Annual Review of Plant Biology* 62 (2011), S. 273–297

- [12] MINSKY, M.: Memoir on inventing the confocal scanning microscope. In: *Scanning* 10 (1988), Nr. 4, S. 128–138
- [13] PAWLEY, James B.: *Handbook of biological confocal microscopy*. New York : Plenum Press, 1995
- [14] DENK, W.; STRICKLER, J. H. ; WEBB, W. W.: 2-Photon laser scanning fluorescence microscopy. In: *Science* 248 (1990), Nr. 4951, S. 73–76
- [15] BETZIG, E.; LEWIS, A.; HAROOTUNIAN, A.; ISAACSON, M. ; KRATSCHEMER, E.: Near-field scanning optical microscopy (Nsm) - Development and biophysical applications. In: *Biophysical Journal* 49 (1986), Nr. 1, S. 269–279
- [16] HAROOTUNIAN, A.; BETZIG, E.; ISAACSON, M. ; LEWIS, A.: Superresolution fluorescence near-field scanning optical microscopy. In: *Applied Physics Letters* 49 (1986), Nr. 11, S. 674–676
- [17] HELL, S. W.: Microscopy and its focal switch. In: *Nature Methods* 6 (2009), Nr. 1, S. 24–32
- [18] RUST, M. J.; BATES, M. ; ZHUANG, X. W.: Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). In: *Nature Methods* 3 (2006), Nr. 10, S. 793–795
- [19] BETZIG, E.; PATTERSON, G. H.; SOUGRAT, R.; LINDWASSER, O. W.; OLENYCH, S.; BONIFACINO, J. S.; DAVIDSON, M. W.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. ; HESS, H. F.: Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. In: *Science* 313 (2006), Nr. 5793, S. 1642–1645
- [20] DERTINGER, T.; COLYER, R.; IYER, G.; WEISS, S. ; ENDERLEIN, J.: Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI). In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (2009), Nr. 52, S. 22287–22292
- [21] ZERNIKE, F.: Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects. In: *Physica* 9 (1942), S. 686–698
- [22] NOMARSKI, G.: From phase contrast to contrast by interference. In: *Revue d'hematologie* 12 (1957), Nr. 4, S. 439–442
- [23] MAIMAN, T. H.: Stimulated optical radiation in ruby. In: *Nature* 187 (1960), Nr. 4736, S. 493–494
- [24] BOYD, Robert W.: *Nonlinear optics*. Burlington, MA : Academic Press, 2008
- [25] FRANKEN, P. A.; WEINREICH, G.; PETERS, C. W. ; HILL, A. E.: Generation of optical harmonics. In: *Physical Review Letters* 7 (1961), Nr. 4, S. 118–119

- [26] HELLWART, R.; CHRISTEN, P.: Nonlinear optical microscopic examination of structure in polycrystalline ZnSe. In: *Optics Communications* 12 (1974), Nr. 3, S. 318–322
- [27] BARAD, Y.; EISENBERG, H.; HOROWITZ, M. ; SILBERBERG, Y.: Nonlinear scanning laser microscopy by third harmonic generation. In: *Applied Physics Letters* 70 (1997), Nr. 8, S. 922–924
- [28] FLORSHEIMER, M.; BRILLERT, C. ; FUCHS, H.: Chemical imaging of interfaces by sum frequency microscopy. In: *Langmuir* 15 (1999), Nr. 17, S. 5437–5439
- [29] OLIVIER, N.; LUENGO-OROZ, M. A.; DULOQUIN, L.; FAURE, E.; SAVY, T.; VEILLEUX, I.; SOLINAS, X.; DEBARRE, D.; BOURGINE, P.; SANTOS, A.; PEYRIERAS, N. ; BEAUREPAIRE, E.: Cell lineage reconstruction of early Zebrafish embryos using label-free nonlinear microscopy. In: *Science* 329 (2010), Nr. 5994, S. 967–971
- [30] SALZER, R.: *Infrared and raman spectroscopic imaging*. Weinheim : Wiley-VCH, 2009
- [31] LEVIN, I. W.; BHARGAVA, R.: Fourier transform infrared vibrational spectroscopic imaging: Integrating microscopy and molecular recognition. In: *Annual Review of Physical Chemistry* 56 (2005), S. 429–474
- [32] DIEING, T.: *Confocal Raman microscopy*. Heidelberg : Springer, 2011 (Springer series in optical sciences)
- [33] SAGE, L.: Raman Microscopes. In: *Analytical Chemistry* 81 (2009), Nr. 9, S. 3222–3226
- [34] MAKER, P. D.; TERHUNE, R. W.: Study of optical effects due to an induced polarization third order in electric field strength. In: *Physical Review* 137 (1965), Nr. 3A, S. A801–A818
- [35] BEGLEY, R. F.; HARVEY, A. B. ; BYER, R. L.: Coherent anti-Stokes Raman spectroscopy. In: *Applied Physics Letters* 25 (1974), Nr. 7, S. 387–390
- [36] EVANS, C. L.; XIE, X. S.: Coherent anti-stokes Raman scattering microscopy: chemical imaging for biology and medicine. In: *Annual Review of Analytical Chemistry* 1 (2008), S. 883–909
- [37] TOLLES, W. M.; NIBLER, J. W.; MCDONALD, J. R. ; HARVEY, A. B.: Review of theory and application of coherent anti-Stokes Raman-spectroscopy (CARS). In: *Applied Spectroscopy* 31 (1977), Nr. 4, S. 253–271
- [38] CHENG, J. X.; VOLKMER, A. ; XIE, X. S.: Theoretical and experimental characterization of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. In: *Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics* 19 (2002), Nr. 6, S. 1363–1375

- [39] VOLKMER, A.: Vibrational imaging and microspectroscopies based on coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. In: *Journal of Physics D-Applied Physics* 38 (2005), Nr. 5, S. R59–R81
- [40] MÜLLER, M.; ZUMBUSCH, A.: Coherent anti-stokes Raman scattering microscopy. In: *ChemPhysChem* 8 (2007), Nr. 15, S. 2156–2170
- [41] DUNCAN, M. D.; REINTJES, J. ; MANUCCIA, T. J.: Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope. In: *Optics Letters* 7 (1982), Nr. 8, S. 350–352
- [42] ZUMBUSCH, A.; HOLTOM, G. R. ; XIE, X. S.: Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-Stokes Raman scattering. In: *Physical Review Letters* 82 (1999), Nr. 20, S. 4142–4145
- [43] MASTERS, Barry R.: *Handbook of biomedical nonlinear optical microscopy*. New York : Oxford University Press, 2008
- [44] KÖNIG, K.: Multiphoton microscopy in life sciences. In: *Journal of Microscopy-Oxford* 200 (2000), S. 83–104
- [45] CHENG, J. X.; VOLKMER, A.; BOOK, L. D. ; XIE, X. S.: An epi-detected coherent anti-stokes raman scattering (E-CARS) microscope with high spectral resolution and high sensitivity. In: *Journal of Physical Chemistry B* 105 (2001), Nr. 7, S. 1277–1280
- [46] SPENCE, D. E.; SLEAT, W. E.; EVANS, J. M.; SIBBETT, W. ; KAFKA, J. D.: Time synchronization measurements between 2 self-modelocked Ti-Sapphire lasers. In: *Optics Communications* 101 (1993), Nr. 3-4, S. 286–296
- [47] KIEU, K.; SAAR, B. G.; HOLTOM, G. R.; XIE, X. S. ; WISE, F. W.: High-power picosecond fiber source for coherent Raman microscopy. In: *Optics Letters* 34 (2009), Nr. 13, S. 2051–2053
- [48] KRAUSS, G.; HANKE, T.; SELL, A.; TRAUTLEIN, D.; LEITENSTORFER, A.; SELM, R.; WINTERHALDER, M. ; ZUMBUSCH, A.: Compact coherent anti-Stokes Raman scattering microscope based on a picosecond two-color Er: fiber laser system. In: *Optics Letters* 34 (2009), Nr. 18, S. 2847–2849
- [49] BJORKLUND, G. C.: Effects of focusing on 3rd-order nonlinear processes in isotropic media. In: *Ieee Journal of Quantum Electronics* Qe11 (1975), Nr. 6, S. 287–296
- [50] GUHA, S.; FALK, J.: The effects of focusing on the efficiency of coherent anti-Stokes Raman-scattering. In: *Journal of Chemical Physics* 75 (1981), Nr. 6, S. 2599–2602

-
- [51] POTMA, E. O.; BOEIJ, W. P. ; WIERSMA, D. A.: Nonlinear coherent four-wave mixing in optical microscopy. In: *Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics* 17 (2000), Nr. 10, S. 1678–1684
- [52] HASHIMOTO, M.; ARAKI, T.: Three-dimensional transfer functions of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. In: *Journal of the Optical Society of America A-Optics Image Science and Vision* 18 (2001), Nr. 4, S. 771–776
- [53] VOLKMER, A.; CHENG, J. X. ; XIE, X. S.: Vibrational imaging with high sensitivity via epidetected coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. In: *Physical Review Letters* 87 (2001), Nr. 2
- [54] CHENG, J. X.; XIE, X. S.: Green's function formulation for third-harmonic generation microscopy. In: *Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics* 19 (2002), Nr. 7, S. 1604–1610
- [55] AKHMANOV, S. A.; GORDIENKO, V. M.; MIKHEENKO, A. V. ; PANCHENKO, V. Y.: Dependence of rate of vibrational-translational relaxation in SF₆ on intensity of selective laser excitation. In: *JETP Letters* 26 (1977), Nr. 8, S. 453–456
- [56] AKHMANOV, S. A.; BUNKIN, A. F.; IVANOV, S. G. ; KOROTEEV, N. I.: Polarization coherent active Raman-spectroscopy and coherent Raman ellipsometry. In: *Zhurnal Eksperimentalnoi I Teoreticheskoi Fiziki* 74 (1978), Nr. 4, S. 1272–1294
- [57] LEVENSON, M. D.: Polarization techniques in coherent Raman-spectroscopy. In: *Journal of Raman Spectroscopy* 10 (1981), Nr. 1, S. 9–23
- [58] VOLKMER, A.; BOOK, L. D. ; XIE, X. S.: Time-resolved coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: Imaging based on Raman free induction decay. In: *Applied Physics Letters* 80 (2002), Nr. 9, S. 1505–1507
- [59] SELM, R.; WINTERHALDER, M.; ZUMBUSCH, A.; KRAUSS, G.; HANKE, T.; SELL, A. ; LEITENSTORFER, A.: Ultrabroadband background-free coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy based on a compact Er: fiber laser system. In: *Optics Letters* 35 (2010), Nr. 19, S. 3282–3284
- [60] POTMA, E. O.; EVANS, C. L. ; XIE, X. S.: Heterodyne coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) imaging. In: *Optics Letters* 31 (2006), Nr. 2, S. 241–243
- [61] JURNA, M.; KORTERIK, J. P.; OTTO, C.; HEREK, J. L. ; OFFERHAUS, H. L.: Vibrational phase contrast microscopy by use of coherent anti-Stokes Raman scattering. In: *Physical Review Letters* 103, Nr. 4, S. 043905
- [62] GANIKHANOV, F.; CARRASCO, S.; SUNNEY XIE, X.; KATZ, M.; SEITZ, W. ; KOPF, D.: Broadly tunable dual-wavelength light source for coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. In: *Optics Letters* 31 (2006), Nr. 9, S. 1292–1294

- [63] POTMA, E. O.; XIE, X. S.: Detection of single lipid bilayers with coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy. In: *Journal of Raman Spectroscopy* 34 (2003), Nr. 9, S. 642–650
- [64] POTMA, E. O.; XIE, X. S.: Direct visualization of lipid phase segregation in single lipid bilayers with coherent anti-stokes Raman scattering microscopy. In: *ChemPhysChem* 6 (2005), Nr. 1, S. 77–79
- [65] YUE, S.; SLIPCHENKO, M. N. ; CHENG, J. X.: Multimodal nonlinear optical microscopy. In: *Laser & Photonics Reviews* 5 (2011), Nr. 4, S. 496–512
- [66] HELLERER, T.; AXANG, C.; BRACKMANN, C.; HILLERTZ, P.; PILON, M. ; ENEJDER, A.: Monitoring of lipid storage in *Caenorhabditis elegans* using coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (2007), Nr. 37, S. 14658–14663
- [67] LE, T. T.; DUREN, H. M.; SLIPCHENKO, M. N.; HU, C. D. ; CHENG, J. X.: Label-free quantitative analysis of lipid metabolism in living *Caenorhabditis elegans*. In: *Journal of Lipid Research* 51 (2010), Nr. 3, S. 672–677
- [68] SCHAFFER, D.; SQUIER, J. A.; MAARSEVEEN, J. van; BONN, D.; BONN, M. ; MULLER, M.: In situ quantitative measurement of concentration profiles in a microreactor with submicron resolution using multiplex CARS microscopy. In: *Journal of the American Chemical Society* 130 (2008), Nr. 35, S. 11592–11593
- [69] KOX, M. H. F.; DOMKE, K. F.; DAY, J. P. R.; RAGO, G.; STAVITSKI, E.; BONN, M. ; WECKHUYSSEN, B. M.: Label-free chemical imaging of catalytic solids by coherent anti-Stokes Raman scattering and synchrotron-based infrared microscopy. In: *Angewandte Chemie Int. Ed.* 48 (2009), Nr. 47, S. 8990–8994
- [70] DOMKE, K. F.; RIEMER, T. A.; RAGO, G.; PARVULESCU, A. N.; BRUIJNINCX, P. C. A.; ENEJDER, A.; WECKHUYSSEN, B. M. ; BONN, M.: Tracing catalytic conversion on single zeolite crystals in 3D with nonlinear spectromicroscopy. In: *Journal of the American Chemical Society* 134 (2012), Nr. 2, S. 1124–1129
- [71] ECKBRETH, A. C.: Boxcars - Crossed-beam phase-matched CARS generation in gases. In: *Applied Physics Letters* 32 (1978), Nr. 7, S. 421–423
- [72] LOTEM, H.; LYNCH, R. T. ; BLOEMBERGEN, N.: Interference between Raman resonances in 4-wave difference mixing. In: *Physical Review A* 14 (1976), Nr. 5, S. 1748–1755
- [73] KAFKA, J. D.; WATTS, M. L. ; PIETERSE, J. W.: Synchronously pumped optical

- parametric oscillators with LiB3O5. In: *Journal of the Optical Society of America B- Optical Physics* 12 (1995), Nr. 11, S. 2147–2157
- [74] RODWELL, M. J. W.; BLOOM, D. M. ; WEINGARTEN, K. J.: Subpicosecond laser timing stabilization. In: *Ieee Journal of Quantum Electronics* 25 (1989), Nr. 4, S. 817–827
- [75] POTMA, E. O.; JONES, D. J.; CHENG, J. X.; XIE, X. S. ; YE, J.: High-sensitivity coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy with two tightly synchronized picosecond lasers. In: *Optics Letters* 27 (2002), Nr. 13, S. 1168–1170
- [76] LINDE, D. Von d.: Characterization of the noise in continuously operating mode-locked lasers. In: *Applied Physics B* 39 (1986), Nr. 4, S. 201–217
- [77] HAUS, H. A.; MECOZZI, A.: Noise of mode-locked lasers. In: *Ieee Journal of Quantum Electronics* 29 (1993), Nr. 3, S. 983–996
- [78] PASCHOTTA, R.: Noise of mode-locked lasers (Part I): numerical model. In: *Applied Physics B-Lasers and Optics* 79 (2004), Nr. 2, S. 153–162
- [79] PASCHOTTA, R.: Noise of mode-locked lasers (Part II): timing jitter and other fluctuations. In: *Applied Physics B-Lasers and Optics* 79 (2004), Nr. 2, S. 163–173
- [80] SPENCE, D. E.; DUDLEY, J. M.; LAMB, K.; SLEAT, W. E. ; SIBBETT, W.: Nearly quantum-limited timing jitter in a self-mode-locked Ti-Sapphire laser. In: *Optics Letters* 19 (1994), Nr. 7, S. 481–483
- [81] MA, L. S.; SHELTON, R. K.; KAPTEYN, H. C.; MURNANE, M. M. ; YE, J.: Sub-10-femtosecond active synchronization of two passively mode-locked Ti : sapphire oscillators. In: *Physical Review A* 64 (2001), Nr. 2, S. 021802
- [82] JIANG, L. A.; WONG, S. T.; GREIN, M. E.; IPPEN, E. P. ; HAUS, H. A.: Measuring timing jitter with optical cross correlations. In: *Ieee Journal of Quantum Electronics* 38 (2002), Nr. 8, S. 1047–1052
- [83] SHELTON, R. K.; FOREMAN, S. M.; MA, L. S.; HALL, J. L.; KAPTEYN, H. C.; MURNANE, M. M.; NOTCUTT, M. ; YE, J.: Subfemtosecond timing jitter between two independent, actively synchronized, mode-locked lasers. In: *Optics Letters* 27 (2002), Nr. 5, S. 312–314
- [84] MIURA, T.; NAGAOKA, H.; TAKASAGO, K.; KOBAYASHI, K.; ENDO, A.; TORIZUKA, K.; WASHIO, M. ; KANNARI, F.: Active synchronization of two mode-locked lasers with optical cross correlation. In: *Applied Physics B-Lasers and Optics* 75 (2002), Nr. 1, S. 19–23
- [85] CHENG, J. X.; BOOK, L. D. ; XIE, X. S.: Polarization coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. In: *Optics Letters* 26 (2001), Nr. 17, S. 1341–1343

- [86] BORLINGHAUS, R.: Really confocal - True optical sectioning at all speeds. In: *Imaging and Microscopy* 7 (2005), Nr. 4, S. 34–35
- [87] NEUMANN, E.; ROSENHEC.K: Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. In: *Journal of Membrane Biology* 10 (1972), Nr. 3-4, S. 279–290
- [88] TEISSIE, J.; GOLZIO, M. ; ROLS, M. P.: Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: A minireview of our present (lack of ?) knowledge. In: *Biochimica Et Biophysica Acta* 1724 (2005), Nr. 3, S. 270–280
- [89] ROLS, M. P.: Electropermeabilization, a physical method for the delivery of therapeutic molecules into cells. In: *Biochimica Et Biophysica Acta - Biomembranes* 1758 (2006), Nr. 3, S. 423–428
- [90] GOTHELF, A.; MIR, L. M. ; GEHL, J.: Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. In: *Cancer Treatment Reviews* 29 (2003), Nr. 5, S. 371–387
- [91] FAVARD, C.; DEAN, D. S. ; ROLS, M. P.: Electrotransfer as a non viral method of gene delivery. In: *Current Gene Therapy* 7 (2007), Nr. 1, S. 67–77
- [92] SERSA, G.; MIKLAVCIC, D.; CEMAZAR, M.; RUDOLF, Z.; PUCIHAR, G. ; SNOJ, M.: Electrochemotherapy in treatment of tumours. In: *Eur J Surg Oncol* 34 (2008), Nr. 2, S. 232–240
- [93] PORTET, T.; FEBRER, F. Camps i.; ESCOFFRE, J. M.; FAVARD, C.; ROLS, M. P. ; DEAN, D. S.: Visualization of membrane loss during the shrinkage of giant vesicles under electropulsation. In: *Biophysical Journal* 96 (2009), Nr. 10, S. 4109–4121
- [94] ROSAZZA, C.; ESCOFFRE, J. M.; ZUMBUSCH, A. ; ROLS, M. P.: The actin cytoskeleton has an active role in the electrotransfer of plasmid DNA in mammalian cells. In: *Molecular therapy* 19 (2011), Nr. 5, S. 913–921
- [95] ROSAZZA, C.; PHEZ, E.; ESCOFFRE, J. M.; CEZANNE, L.; ZUMBUSCH, A. ; ROLS, M. P.: Cholesterol implications in plasmid DNA electrotransfer: Evidence for the involvement of endocytotic pathways. In: *International journal of pharmaceutics* 423 (2012), Nr. 1, S. 134–143
- [96] CHERNOMORDIK, L. V.; SOKOLOV, A. V. ; BUDKER, V. G.: Electrostimulated uptake of DNA by liposomes. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1024 (1990), Nr. 1, S. 179–183
- [97] RISKE, K. A.; DIMOVA, R.: Electro-deformation and poration of giant vesicles viewed with high temporal resolution. In: *Biophysical Journal* 88 (2005), Nr. 2, S. 1143–1155

-
- [98] DIMOVA, R.; RISKE, K. A.; ARANDA, S.; BEZLYEPKINA, N.; KNORR, R. L. ; LIPOWSKY, R.: Giant vesicles in electric fields. In: *Soft Matter* 3 (2007), Nr. 7, S. 817–827
- [99] PORTET, T.; MAUROY, C.; DEMERY, V.; HOULES, T.; ESCOFFRE, J. M.; DEAN, D. S. ; ROLS, M. P.: Destabilizing giant vesicles with electric fields: an overview of current applications. In: *The Journal of Membrane Biology* 245 (2012), Nr. 9, S. 555–564
- [100] BAGATOLLI, L. A.: To see or not to see: Lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. In: *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1758 (2006), Nr. 10, S. 1541–1556
- [101] JUHASZ, J.; DAVIS, J. H. ; SHAROM, F. J.: Fluorescent probe partitioning in giant unilamellar vesicles of 'lipid raft' mixtures. In: *The Biochemical Journal* 430 (2010), Nr. 3, S. 415–423
- [102] SEZGIN, E.; LEVENTAL, I.; GRZYBEK, M.; SCHWARZMANN, G.; MUELLER, V.; HONIGMANN, A.; BELOV, V. N.; EGGELING, C.; COSKUN, U.; SIMONS, K. ; SCHWILLE, P.: Partitioning, diffusion, and ligand binding of raft lipid analogs in model and cellular plasma membranes. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1818 (2012), Nr. 7, S. 1777–1784
- [103] LI, L.; WANG, H. F. ; CHENG, J. X.: Quantitative coherent anti-Stokes Raman scattering imaging of lipid distribution in coexisting domains. In: *Biophysical Journal* 89 (2005), Nr. 5, S. 3480–3490
- [104] ANGELOVA, M. I.; DIMITROV, D. S.: Liposome electroformation. In: *Faraday Discussions* 81 (1986), S. 303–311
- [105] MAUROY, C.; PORTET, T.; WINTERHALDER, M.; BELLARD, E.; BLACHE, M. C.; TEISSIE, J.; ZUMBUSCH, A. ; ROLS, M. P.: Giant lipid vesicles under electric field pulses assessed by non invasive imaging. In: *Bioelectrochemistry* 87 (2012), S. 253–259
- [106] RODRIGUEZ, N.; CRIBIER, S. ; PINCET, F.: Transition from long- to short-lived transient pores in giant vesicles in an aqueous medium. In: *Physical review. E* 74 (2006), Nr. 6 Teil 1, S. 061902
- [107] TEKLE, E.; ASTUMIAN, R. D.; FRIAUF, W. A. ; CHOCK, P. B.: Asymmetric pore distribution and loss of membrane lipid in electroporated DOPC vesicles. In: *Biophysical Journal* 81 (2001), Nr. 2, S. 960–968
- [108] KAHYA, N.: Protein-protein and protein-lipid interactions in domain-assembly:

- lessons from giant unilamellar vesicles. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1798 (2010), Nr. 7, S. 1392–1398
- [109] SIMONS, K.; IKONEN, E.: Functional rafts in cell membranes. In: *Nature* 387 (1997), Nr. 6633, S. 569–572
- [110] DIETRICH, C.; BAGATOLLI, L. A.; VOLOVYK, Z. N.; THOMPSON, N. L.; LEVI, M.; JACOBSON, K. ; GRATTON, E.: Lipid rafts reconstituted in model membranes. In: *Biophysical Journal* 80 (2001), Nr. 3, S. 1417–1428
- [111] GRAM, H.C.: Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. In: *Fortschritte der Medizin* 2 (1884), S. 185–189
- [112] HOLTOM, G. R.; THRALL, B. D.; CHIN, B. Y.; WILEY, H. S. ; COLSON, S. D.: Achieving molecular selectivity in imaging using multiphoton Raman spectroscopy techniques. In: *Traffic* 2 (2001), Nr. 11, S. 781–788
- [113] BERGNER, G.; ALBERT, C. R.; SCHILLER, M.; BRINGMANN, G.; SCHIRMEISTER, T.; DIETZEK, B.; NIEBLING, S.; SCHLÜCKER, S. ; POPP, J.: Quantitative detection of C-deuterated drugs by CARS microscopy and Raman microspectroscopy. In: *Analyst* 136 (2011), Nr. 18, S. 3686–3693
- [114] HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W. ; STOODLEY, P.: Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. In: *Nature reviews Microbiology* 2 (2004), Nr. 2, S. 95–108
- [115] LAWRENCE, J. R.; NEU, T. R.: Confocal laser scanning microscopy for analysis of microbial biofilms. In: *Methods in Enzymology* 310 (1999), S. 131–44
- [116] NEU, T. R.; LAWRENCE, J. R.: Lectin-binding analysis in biofilm systems. In: *Methods in Enzymology* 310 (1999), S. 145–152
- [117] LAWRENCE, J. R.; SWERHONE, G. D.; KUHLCHE, U. ; NEU, T. R.: In situ evidence for microdomains in the polymer matrix of bacterial microcolonies. In: *Canadian Journal of Microbiology* 53 (2007), Nr. 3, S. 450–458
- [118] FREDSLUND, L.; SNEGOWSKI, K.; WICK, L. Y.; JACOBSEN, C. S.; DE MOT, R. ; SPRINGAEL, D.: Surface motility of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading mycobacteria. In: *Research in Microbiology* 159 (2008), Nr. 4, S. 255–262
- [119] WICK, L. Y.; MUNAIN, A. Ruiz d.; SPRINGAEL, D.; HARMS, H. ; DE, M. A.: Responses of Mycobacterium sp. LB501T to the low bioavailability of solid anthracene. In: *Applied microbiology and biotechnology* 58 (2002), Nr. 3, S. 378–385
- [120] NEU, T. R.; LAWRENCE, J. R.: Examination of Microbial Communities on Hydrocarbons by Means of Laser Scanning Microscopy. In: TIMMIS, K.N. (Hrsg.):

- Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.* Berlin Heidelberg : Springer, 2010
- [121] LAKOWICZ, Joseph R.: *Principles of fluorescence spectroscopy.* New York : Springer, 2006
- [122] MURPHY, D. J.: The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. In: *Progress in Lipid Research* 40 (2001), Nr. 5, S. 325–438
- [123] BELLER, M.; THIEL, K.; THUL, P. J. ; JACKLE, H.: Lipid droplets: a dynamic organelle moves into focus. In: *FEBS Letters* 584 (2010), Nr. 11, S. 2176–2182
- [124] WELTE, M. A.: Fat on the move: intracellular motion of lipid droplets. In: *Biochemical Society transactions* 37 (2009), Nr. 5, S. 991–996
- [125] DIGEL, M.; EHEHALT, R. ; FULLEKRUG, J.: Lipid droplets lighting up: insights from live microscopy. In: *FEBS Letters* 584 (2010), Nr. 11, S. 2168–2175
- [126] DEBARRE, D.; BEAUREPAIRE, E.: Quantitative characterization of biological liquids for third-harmonic generation microscopy. In: *Biophysical Journal* 92 (2007), Nr. 2, S. 603–612
- [127] DEBARRE, D.; SUPATTO, W.; PENA, A. M.; FABRE, A.; TORDJMAN, T.; COMBETTES, L.; SCHANNE-KLEIN, M. C. ; BEAUREPAIRE, E.: Imaging lipid bodies in cells and tissues using third-harmonic generation microscopy. In: *Nature Methods* 3 (2006), Nr. 1, S. 47–53
- [128] LYN, R. K.; KENNEDY, D. C.; STOLOW, A.; RIDSDALE, A. ; PEZACKI, J. P.: Dynamics of lipid droplets induced by the hepatitis C virus core protein. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 399 (2010), Nr. 4, S. 518–524
- [129] NAN, X.; POTMA, E. O. ; XIE, X. S.: Nonperturbative chemical imaging of organelle transport in living cells with coherent anti-stokes Raman scattering microscopy. In: *Biophysical Journal* 91 (2006), Nr. 2, S. 728–735
- [130] JÜNGST, C.; WINTERHALDER, M. J. ; ZUMBUSCH, A.: Fast and long term lipid droplet tracking with CARS microscopy. In: *Journal of Biophotonics* 4 (2011), Nr. 6, S. 435–441
- [131] JÜNGST, C., Dissertation, 2013
- [132] CASPI, A.; GRANER, R. ; ELBAUM, M.: Diffusion and directed motion in cellular transport. In: *Physical Review E* 66 (2002), Nr. 1, S. 011916
- [133] BAUSINGER, R., Dissertation, 2009

- [134] SHUBEITA, G. T.; TRAN, S. L.; XU, J.; VERSHININ, M.; CERMELLI, S.; COTTON, S. L.; WELTE, M. A. ; GROSS, S. P.: Consequences of motor copy number on the intracellular transport of kinesin-1-driven lipid droplets. In: *Cell* 135 (2008), Nr. 6, S. 1098–1107
- [135] GROSS, S. P.; WELTE, M. A.; BLOCK, S. M. ; WIESCHAUS, E. F.: Dynein-mediated cargo transport in vivo. A switch controls travel distance. In: *The Journal of Cell Biology* 148 (2000), Nr. 5, S. 945–956
- [136] FU, Y.; WANG, H. F.; SHI, R. Y. ; CHENG, J. X.: Characterization of photodamage in coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. In: *Optics Express* 14 (2006), Nr. 9, S. 3942–3951
- [137] WOLINSKI, H.; BREDIES, K. ; KOHLWEIN, S. D.: Quantitative imaging of lipid metabolism in yeast: from 4D analysis to high content screens of mutant libraries. In: *Methods in Cell Biology* 108 (2012), S. 345–65
- [138] JÜNGST, C.; SELM, R.; WINTERHALDER, M.J. ; ZUMBUSCH, A.: CARS Microscopy. In: SCHWILLE, P. (Hrsg.): *Comprehensive Biophysics: Biophysical Techniques for Characterization of Cells* Bd. 2. Burlington : Elsevier B.V., 2012
- [139] ASHRAFI, K.; CHANG, F. Y.; WATTS, J. L.; FRASER, A. G.; KAMATH, R. S.; AHRINGER, J. ; RUVKUN, G.: Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. In: *Nature* 421 (2003), Nr. 6920, S. 268–272
- [140] MULLANEY, B. C.; ASHRAFI, K.: *C. elegans* fat storage and metabolic regulation. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1791 (2009), Nr. 6, S. 474–478
- [141] ELLE, I. C.; OLSEN, L. C.; PULTZ, D.; RODKAER, S. V. ; FAERGEMAN, N. J.: Something worth dyeing for: molecular tools for the dissection of lipid metabolism in *Caenorhabditis elegans*. In: *FEBS Letters* 584 (2010), Nr. 11, S. 2183–2193
- [142] KLAPPER, M.; EHMKE, M.; PALGUNOW, D.; BOHME, M.; MATTHAUS, C.; BERGNER, G.; DIETZEK, B.; POPP, J. ; DORING, F.: Fluorescence-based fixative and vital staining of lipid droplets in *Caenorhabditis elegans* reveal fat stores using microscopy and flow cytometry approaches. In: *Journal of Lipid Research* 52 (2011), Nr. 6, S. 1281–1293
- [143] O’ROURKE, E. J.; SOUKAS, A. A.; CARR, C. E. ; RUVKUN, G.: *C. elegans* major fats are stored in vesicles distinct from lysosome-related organelles. In: *Cell Metabolism* 10 (2009), Nr. 5, S. 430–435
- [144] MORCK, C.; OLSEN, L.; KURTH, C.; PERSSON, A.; STORM, N. J.; SVENSSON, E.; JANSSON, J. O.; HELLQVIST, M.; ENEJDER, A.; FAERGEMAN, N. J. ; PILON, M.: Statins inhibit protein lipidation and induce the unfolded protein response in

- the non-sterol producing nematode *Caenorhabditis elegans*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (2009), Nr. 43, S. 18285–18290
- [145] PALGUNOW, D.; KLAPPER, M. ; DORING, F.: Dietary restriction during development enlarges intestinal and hypodermal lipid droplets in *Caenorhabditis elegans*. In: *PLoS One* 7 (2012), Nr. 11, S. e46198
- [146] LAZZARINI, Robert A.: *Myelin biology and disorders*. Amsterdam : Elsevier Academic Press, 2004
- [147] WANG, H.; FU, Y.; ZICKMUND, P.; SHI, R. ; CHENG, J. X.: Coherent anti-stokes Raman scattering imaging of axonal myelin in live spinal tissues. In: *Biophysical Journal* 89 (2005), Nr. 1, S. 581–591
- [148] FU, Y.; WANG, H.; HUFF, T. B.; SHI, R. ; CHENG, J. X.: Coherent anti-Stokes Raman scattering imaging of myelin degradation reveals a calcium-dependent pathway in lyso-PtdCho-induced demyelination. In: *Journal of Neuroscience Research* 85 (2007), Nr. 13, S. 2870–2881
- [149] FU, Y.; SUN, W.; SHI, Y.; SHI, R. ; CHENG, J. X.: Glutamate excitotoxicity inflicts paranodal myelin splitting and retraction. In: *PLoS One* 4 (2009), Nr. 8, S. e6705
- [150] BINDAL, A. K.; BINDAL, R. K.; HESS, K. R.; SHIU, A.; HASSENBUSCH, S. J.; SHI, W. M. ; SAWAYA, R.: Surgery versus radiosurgery in the treatment of brain metastasis. In: *Journal of Neurosurgery* 84 (1996), Nr. 5, S. 748–754
- [151] UPADHYAY, U. M.; GOLBY, A. J.: Role of pre- and intraoperative imaging and neuronavigation in neurosurgery. In: *Expert review of medical devices* 5 (2008), Nr. 1, S. 65–73
- [152] CASTILLO, M. S.; DAVIS, F. G.; SURAWICZ, T.; BRUNER, J. M.; BIGNER, S.; COONS, S. ; BIGNER, D. D.: Consistency of primary brain tumor diagnoses and codes in cancer surveillance systems. In: *Neuroepidemiology* 23 (2004), Nr. 1-2, S. 85–93
- [153] FORSTER, B.; VAN DE VILLE, D.; BERENT, J.; SAGE, D. ; UNSER, M.: Complex wavelets for extended depth-of-field: a new method for the fusion of multichannel microscopy images. In: *Microscopy Research and Technique* 65 (2004), Nr. 1-2, S. 33–42
- [154] GAO, L.; ZHOU, H.; THRALL, M. J.; LI, F.; YANG, Y.; WANG, Z.; LUO, P.; WONG, K. K.; PALAPATTU, G. S. ; WONG, S. T.: Label-free high-resolution imaging of prostate glands and cavernous nerves using coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. In: *Biomedical Optics Express* 2 (2011), Nr. 4, S. 915–926

- [155] VERMA, P.; GARCIA-ALIAS, G. ; FAWCETT, J. W.: Spinal cord repair: bridging the divide. In: *Neurorehabilitation and Neural Repair* 22 (2008), Nr. 5, S. 429–437
- [156] SHI, Y.; KIM, S.; HUFF, T. B.; BORGES, R. B.; PARK, K.; SHI, R. ; CHENG, J. X.: Effective repair of traumatically injured spinal cord by nanoscale block copolymer micelles. In: *Nature Nanotechnology* 5 (2010), Nr. 1, S. 80–87
- [157] GALLI, R.; UCKERMANN, O.; WINTERHALDER, M. J.; SITOCI-FICICI, K. H.; GEIGER, K. D.; KOCH, E.; SCHACKERT, G.; ZUMBUSCH, A.; STEINER, G. ; KIRSCH, M.: Vibrational spectroscopic imaging and multiphoton microscopy of spinal cord injury. In: *Analytical Chemistry* 84 (2012), Nr. 20, S. 8707–8714
- [158] FU, Y.; WANG, H.; SHI, R. ; CHENG, J. X.: Second harmonic and sum frequency generation imaging of fibrous astroglial filaments in ex vivo spinal tissues. In: *Biophysical Journal* 92 (2007), Nr. 9, S. 3251–3259
- [159] HUANG, S.; HEIKAL, A. A. ; WEBB, W. W.: Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein. In: *Biophysical Journal* 82 (2002), Nr. 5, S. 2811–2825
- [160] HEIKAL, A. A.: Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies. In: *Biomarkers in Medicine* 4 (2010), Nr. 2, S. 241–263
- [161] HAUSMANN, O. N.: Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. In: *Spinal Cord* 41 (2003), Nr. 7, S. 369–378
- [162] LEI, M.; WINTERHALDER, M.; SELM, R. ; ZUMBUSCH, A.: Video-rate wide-field coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy with collinear nonphase-matching illumination. In: *Journal of Biomedical Optics* 16 (2011), Nr. 2, S. 021104
- [163] AXELROD, D.: Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. In: *J Cell Biol* 89 (1981), Nr. 1, S. 141–145
- [164] AXELROD, D.; BURGHARDT, T. P. ; THOMPSON, N. L.: Total internal reflection fluorescence. In: *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* 13 (1984), S. 247–268
- [165] AXELROD, D.: Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. In: *Biophotonics* 361 (2003), S. 1–33
- [166] MATTHEYSES, A. L.; SIMON, S. M. ; RAPPOPORT, J. Z.: Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist. In: *Journal of Cell Science* 123 (2010), Nr. 21, S. 3621–3628

-
- [167] RECK-PETERSON, S. L.; DERR, N. D. ; STURMAN, N.: Imaging single molecules using total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM). In: *Cold Spring Harbor protocols* 2010 (2010), Nr. 3, S. 73
- [168] OHEIM, M.; SCHAPPER, F.: Non-linear evanescent-field imaging. In: *Journal of Physics D-Applied Physics* 38 (2005), Nr. 10, S. R185–R197
- [169] STOUT, A. L.; AXELROD, D.: Evanescent field excitation of fluorescence by epi-illumination microscopy. In: *Applied Optics* 28 (1989), Nr. 24, S. 5237–5242
- [170] LEI, M.; ZUMBUSCH, A.: Total-internal-reflection fluorescence microscopy with W-shaped axicon mirrors. In: *Optics Letters* 35 (2010), Nr. 23, S. 4057–4059
- [171] RIOUX, M.; TREMBLAY, R. ; BELANGER, P. A.: Linear, annular, and radial focusing with axicons and applications to laser machining. In: *Applied Optics* 17 (1978), Nr. 10, S. 1532–1536
- [172] HEINRICH, C.; BERNET, S. ; RITSCH-MARTE, M.: Wide-field coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. In: *Applied Physics Letters* 84 (2004), Nr. 5, S. 816–818
- [173] HEINRICH, C.; MEUSBURGER, C.; BERNET, S. ; RITSCH-MARTE, M.: CARS microscopy in a wide-field geometry with nanosecond pulses. In: *Journal of Raman Spectroscopy* 37 (2006), Nr. 6, S. 675–679
- [174] HEINRICH, C.; BERNET, S. ; RITSCH-MARTE, M.: Nanosecond microscopy with spectroscopic resolution. In: *New Journal of Physics* 8 (2006)
- [175] TOYTMAN, I.; COHN, K.; SMITH, T.; SIMANOVSKII, D. ; PALANKER, D.: Wide-field coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy with non-phase-matching illumination. In: *Optics Letters* 32 (2007), Nr. 13, S. 1941–1943
- [176] TOYTMAN, I.; SIMANOVSKII, D. ; PALANKER, D.: On illumination schemes for wide-field CARS microscopy. In: *Optics Express* 17 (2009), Nr. 9, S. 7339–7347
- [177] HEINRICH, C.; HOFER, A.; BERNET, S. ; RITSCH-MARTE, M.: Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy with dynamic speckle illumination. In: *New Journal of Physics* 10 (2008)
- [178] DEMTRÖDER, Wolfgang: *Laserspektroskopie Grundlagen und Techniken*. Berlin : Springer, 2007
- [179] KNEIPP, K.; KNEIPP, H.; ITZKAN, I.; DASARI, R. R. ; FELD, M. S.: Ultrasensitive chemical analysis by Raman spectroscopy. In: *Chemical Reviews* 99 (1999), Nr. 10, S. 2957–2976

- [180] LE RU, E. C.; ETCHEGOIN, P. G.: Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy. In: *Annual Review of Physical Chemistry* 63 (2012), S. 65–87
- [181] KNEIPP, K.; WANG, Y.; KNEIPP, H.; PERELMAN, L. T.; ITZKAN, I.; DASARI, R. ; FELD, M. S.: Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS). In: *Physical Review Letters* 78 (1997), Nr. 9, S. 1667–1670
- [182] NIE, S.; EMORY, S. R.: Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering. In: *Science* 275 (1997), Nr. 5303, S. 1102–1106
- [183] KULZER, F.; ORRIT, M.: Single-molecule optics. In: *Annual Review of Physical Chemistry* 55 (2004), S. 585–611
- [184] GOOIJER, Cees: *Shpol'skii spectroscopy and other site-selection methods applications in environmental analysis, bioanalytical chemistry, and chemical physics*. New York : John Wiley & Sons, 2000 (Chemical analysis)
- [185] ARIESE, F.; BADER, A. N. ; GOOIJER, C.: Fluorescence line-narrowing spectroscopy for probing purposes in bioanalytical and environmental chemistry. In: *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 27 (2008), Nr. 2, S. 127–138
- [186] TCHENIO, P.; MYERS, A. B. ; MOERNER, W. E.: Vibrational analysis of the dispersed fluorescence from single molecules of terylene in polyethylene. In: *Chemical Physics Letters* 213 (1993), Nr. 3-4, S. 325–332
- [187] TCHENIO, P.; MYERS, A. B. ; MOERNER, W. E.: Dispersed fluorescence-spectra of single molecules of pentacene in p-terphenyl. In: *Journal of Physical Chemistry* 97 (1993), Nr. 11, S. 2491–2493
- [188] NONN, T.; PLAKHOTNIK, T.: Fluorescence excitation spectroscopy of vibronic transitions in single molecules. In: *Chemical Physics Letters* 336 (2001), Nr. 1-2, S. 97–104
- [189] PLAKHOTNIK, T.; NONN, T. ; PALM, V.: Saturation spectroscopy of vibronic transitions in single molecules. In: *Chemical Physics Letters* 357 (2002), Nr. 5-6, S. 397–402
- [190] LAUBEREAU, A.; KAISER, W.: Vibrational dynamics of liquids and solids investigated by picosecond light-pulses. In: *Reviews of Modern Physics* 50 (1978), Nr. 3, S. 607–665
- [191] ELSAESSER, T.; KAISER, W.: Vibrational and vibronic relaxation of large polyatomic-molecules in liquids. In: *Annual Review of Physical Chemistry* 42 (1991), S. 83–107

- [192] BAIER, J.; POSCH, P.; JUNGSMANN, G.; SCHMIDT, H. W. ; SEILMEIER, A.: Intermolecular energy transfer after vibrational excitation of a perylene dye in solution, in polymer binder, and in a side-chain copolymer. In: *Journal of Chemical Physics* 114 (2001), Nr. 15, S. 6739–6743
- [193] CHALMERS, John M.: *Handbook of vibrational spectroscopy*. New York : Wiley-VCH, 2002
- [194] STIPE, B. C.; REZAEI, M. A. ; HO, W.: Single-molecule vibrational spectroscopy and microscopy. In: *Science* 280 (1998), Nr. 5370, S. 1732–1735
- [195] QIU, X. H.; NAZIN, G. V. ; HO, W.: Vibrationally resolved fluorescence excited with submolecular precision. In: *Science* 299 (2003), Nr. 5606, S. 542–546
- [196] LIU, N.; SILIEN, C.; HO, W.; MADDOX, J. B.; MUKAMEL, S.; LIU, B. ; BAZAN, G. C.: Chemical imaging of single 4,7,12,15-tetrakis[2.2]paracyclophane by spatially resolved vibrational spectroscopy. In: *Journal of Chemical Physics* 127 (2007), Nr. 24, S. 244711
- [197] STAERK, H.; CZERLINS.G: Nanosecond heating of aqueous systems by giant laser pulses. In: *Nature* 205 (1965), Nr. 4966, S. 63–64
- [198] KUBELKA, J.: Time-resolved methods in biophysics. 9. Laser temperature-jump methods for investigating biomolecular dynamics. In: *Photochemical & Photobiological Sciences* 8 (2009), Nr. 4, S. 499–512
- [199] WAGNER, R. W.; LINDSEY, J. S.: A molecular photonic wire. In: *Journal of the American Chemical Society* 116 (1994), Nr. 21, S. 9759–9760
- [200] HEILEMANN, M.; TINNEFELD, P.; SANCHEZ MOSTEIRO, G.; GARCIA PARAJO, M.; VAN HULST, N. F. ; SAUER, M.: Multistep energy transfer in single molecular photonic wires. In: *Journal of the American Chemical Society* 126 (2004), Nr. 21, S. 6514–6515
- [201] TINNEFELD, P.; HEILEMANN, M. ; SAUER, M.: Design of molecular photonic wires based on multistep electronic excitation transfer. In: *ChemPhysChem* 6 (2005), Nr. 2, S. 217–222
- [202] GARCIA-PARAJO, M. F.; HERNANDO, J.; MOSTEIRO, G. S.; HOOGENBOOM, J. P.; DIJK, E. M. H. P. ; HULST, N. F.: Energy transfer in single-molecule photonic wires. In: *ChemPhysChem* 6 (2005), Nr. 5, S. 819–827
- [203] ABBE, E.: Beiträge zur Theorie der Mikroskopie und der Mikroskopischen Wahrnehmung. In: *Archiv für Mikroskopische Anatomie* 9 (1873), S. 413–468

- [204] LAUBEREAU, A.; SEILMEIER, A. ; KAISER, W.: New technique to measure ultrashort vibrational-relaxation times in liquid-systems. In: *Chemical Physics Letters* 36 (1975), Nr. 2, S. 232–237
- [205] YEE, T. K.; GUSTAFSON, T. K.: Diagrammatic analysis of density operator for non-linear optical calculations - pulsed and cw responses. In: *Physical Review A* 18 (1978), Nr. 4, S. 1597–1617
- [206] SHEN, Y.-R.: *The principles of nonlinear optics*. New York : Wiley, 1984
- [207] BORN, M.; OPPENHEIMER, R.: Quantum theory of molecules. In: *Annalen der Physik* 84 (1927), Nr. 20, S. 0457–0484
- [208] FRANCK, J.: Elementary processes of photochemical reactions. In: *Transactions of the Faraday Society* 21 (1926), Nr. 3, S. 0536–0542
- [209] CONDON, E. U.: Nuclear motions associated with electron transitions in diatomic molecules. In: *Physical Review* 32 (1928), Nr. 6, S. 0858–0872
- [210] ATKINS, P.; FRIEDMAN, R.: *Molecular quantum mechanics*. New York : Oxford University Press, 2005
- [211] DOKTOROV, E. V.; MALKIN, I. A. ; MANKO, V. I.: Dynamical symmetry of vibronic transitions in polyatomic-molecules and Franck-Condon principle. In: *Journal of Molecular Spectroscopy* 56 (1975), Nr. 1, S. 1–20
- [212] CEDERBAUM, L. S.; DOMCKE, W.: Many-Body approach to vibrational structure in molecular electronic-spectra. 1. Theory. In: *Journal of Chemical Physics* 64 (1976), Nr. 2, S. 603–611
- [213] HUTCHISSON, E.: Band spectrum intensities for symmetrical diatomic molecules. II. In: *Physical Review* 37 (1931), Nr. 1, S. 45–50
- [214] HUTCHISSON, E.: Band spectra intensities for symmetrical diatomic molecules. In: *Physical Review* 36 (1930), Nr. 3, S. 0410–0420
- [215] MANNEBACK, C.: Computation of the intensities of vibrational spectra of electronic bands in diatomic molecules. In: *Physica* 17 (1951), Nr. 11-1, S. 1001–1010
- [216] CEDERBAUM, L. S.; DOMCKE, W.: Vibrational structure in photoelectron-spectra by method of Greens functions. In: *Journal of Chemical Physics* 60 (1974), Nr. 7, S. 2878–2889
- [217] DOMCKE, W.; CEDERBAUM, L. S.: Many-body approach to vibrational structure in molecular electronic-spectra .2. application to nitrogen, carbon-monoxide, and formaldehyde. In: *Journal of Chemical Physics* 64 (1976), Nr. 2, S. 612–625

-
- [218] DOMCKE, W.; CEDERBAUM, L. S.: Theory of vibrational structure of resonances in electron-molecule scattering. In: *Physical Review A* 16 (1977), Nr. 4, S. 1465–1482
- [219] WEISSBLUTH, M.: *Photon-atom interactions*. Boston : Academic Press, 1989
- [220] YARIV, A.: *Quantum electronics*. New York : Wiley, 1975
- [221] WINTERHALDER, M. J.; ZUMBUSCH, A.; LIPPITZ, M. ; ORRIT, M.: Toward far-field vibrational spectroscopy of single molecules at room temperature. In: *Journal of Physical Chemistry B* 115 (2011), Nr. 18, S. 5425–5430
- [222] PRINGSHEIM, P.: Two observations about the difference between luminescence and thermal radiation. In: *Zeitschrift für Physik* 57 (1929), Nr. 11-12, S. 739–746
- [223] HILBORN, R. C.: Einstein coefficients, cross-sections, f values, dipole-moments, and all that. In: *American Journal of Physics* 50 (1982), Nr. 11, S. 982–986
- [224] CLARK, J. L.; MILLER, P. F. ; RUMBLES, G.: Red edge photophysics of ethanolic rhodamine 101 and the observation of laser cooling in the condensed phase. In: *Journal of Physical Chemistry A* 102 (1998), Nr. 24, S. 4428–4437
- [225] HUDSON, B.; HETHERINGTON, 3rd W.; CRAMER, S.; CHABAY, I. ; KLAUMINZER, G. K.: Resonance enhanced coherent anti-Stokes Raman scattering. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (1976), Nr. 11, S. 3798–3802
- [226] MIN, W.; LU, S.; HOLTOM, G. R. ; XIE, X. S.: Triple-resonance coherent anti-stokes Raman scattering microspectroscopy. In: *ChemPhysChem* 10 (2009), Nr. 2, S. 344–347
- [227] PAWLICKI, M.; COLLINS, H. A.; DENNING, R. G. ; ANDERSON, H. L.: Two-photon absorption and the design of two-photon dyes. In: *Angewandte Chemie Int. Ed.* 48 (2009), Nr. 18, S. 3244–3266
- [228] BIRGE, R. R.; PIERCE, B. M.: A theoretical analysis of the two-photon properties of linear polyenes and the visual chromophores. In: *Journal of Chemical Physics* 70 (1979), Nr. 1, S. 165–178
- [229] BIRGE, R. R.; PIERCE, B. M.: Semiclassical time-dependent theory of two-photon spectroscopy. The effect of dephasing in the virtual level on the two-photon excitation spectrum of isotachysterol. In: *International Journal of Quantum Chemistry* 29 (1986), Nr. 4, S. 639–656
- [230] SCHÜTTER, S., Bachelorarbeit, 2011
- [231] WINTERHALDER, M.J., Diplomarbeit, 2007
- [232] FISCHER, G. M., Diplomarbeit, 2006

- [233] FISCHER, G. M.; EHLERS, A. P.; ZUMBUSCH, A. ; DALTROZZO, E.: Near-infrared dyes and fluorophores based on diketopyrrolopyrroles.
- [234] FISCHER, G. M.; ISOMAKI-KRONDAHL, M.; GOTTKER-SCHNETMANN, I.; DALTROZZO, E. ; ZUMBUSCH, A.: Pyrrolopyrrole cyanine dyes: a new class of near-infrared dyes and fluorophores. In: *Chemistry* 15 (2009), Nr. 19, S. 4857–4864
- [235] FISCHER, G. M., Dissertation, 2010
- [236] LUNAK, S.; HAVEL, L.; VYNUCHAL, J.; HORAKOVA, P.; KUCERIK, J.; WEITER, M. ; HRDINA, R.: The geometry and absorption of diketo-pyrrolo-pyrroles substituted with various aryls. In: *Dyes and Pigments* 85 (2010), Nr. 1-2, S. 27–36
- [237] LUNAK, S.; FRUMAROVA, B.; VYNUCHAL, J. ; HRDINA, R.: Geometry and Raman spectra of PR 255 and its furo-furanone analogue. In: *Chemical Physics* 359 (2009), Nr. 1-3, S. 45–52
- [238] ZHENG, Y. G.; HOLTOM, G. ; COLSON, S.: Multichannel multiphoton imaging of metal oxides nanoparticles in biological system. In: *Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences IV* 5323 (2004), S. 390–399
- [239] KACHYNSKI, A. V.; KUZMIN, A. N.; NYK, M.; ROY, I. ; PRASAD, P. N.: Zinc oxide nanocrystals for non-resonant nonlinear optical microscopy in biology and medicine. In: *The journal of physical chemistry C* 112 (2008), Nr. 29, S. 10721–10724
- [240] FLIER, B.M.I., Dissertation, 2012
- [241] MICHELS, W. C.; CURTIS, N. L.: A pentode lock-in amplifier of high frequency selectivity. In: *Review of Scientific Instruments* 12 (1941), Nr. 9, S. 444–447
- [242] BHAGYAJYOTI; J, Immanuel; SUDHEER, L. S.; BHASKAR, P. ; C. S, Parvathi: Review on lock-in amplifier. In: *International Journal of Science, Engineering and Technology Research* 1 (2012), Nr. 5, S. 40–45
- [243] BRAUN, D.; LIBCHABER, A.: Computer-based photon-counting lock-in for phase detection at the shot-noise limit. In: *Optics Letters* 27 (2002), Nr. 16, S. 1418–1420
- [244] SCHEINHARDT, S., Diplomarbeit, 2009
- [245] SAITO, K.; TOKUNAGA, M.; IWANE, A. H. ; YANAGIDA, T.: Dual-colour microscopy of single fluorophores bound to myosin interacting with fluorescently labelled actin using anti-Stokes fluorescence. In: *Journal of Microscopy-Oxford* 188 (1997), S. 255–263
- [246] LANDAU, L.: On the thermodynamics of photoluminescence. In: *J. Phys. (Moscow)* 10 (1946), S. 503

- [247] CLARK, J. L.; RUMBLES, G.: Laser cooling in the condensed phase by frequency up-conversion. In: *Physical Review Letters* 76 (1996), Nr. 12, S. 2037–2040
- [248] MUNGAN, C. E.; GOSNELL, T. R.: Laser Cooling of Solids. In: GOOIJER, C. (Hrsg.); ARIESE, F. (Hrsg.) ; HOFSTRAAT, J.W. (Hrsg.): *Advances In Atomic, Molecular, and Optical Physics* Bd. 40. Amsterdam : Academic Press - Elsevier, 1999
- [249] GOSNELL, T. R.: Laser cooling of a solid by 65K starting from room temperature. In: *Optics Letters* 24 (1999), Nr. 15, S. 1041–1043
- [250] KACHYNSKI, A. V.; KUZMIN, A. N.; PUDAVAR, H. E. ; PRASAD, P. N.: Three-dimensional confocal thermal imaging using anti-Stokes luminescence. In: *Applied Physics Letters* 87, Nr. 2, S. 023901
- [251] KUZMIN, A. N.; BAEV, A.; KACHYNSKI, A. V.; FISHER, T. S.; SHAKOURI, A. ; PRASAD, P. N.: Anti-Stokes fluorescence imaging of microscale thermal fields in thin films. In: *Journal of Applied Physics* 110 (2011), Nr. 3, S. 033512
- [252] FENG, J.; TIAN, K. J.; HU, D. H.; WANG, S. Q.; LI, S. Y.; ZENG, Y.; LI, Y. ; YANG, G. Q.: A Triarylboron-based fluorescent thermometer: Sensitive over a wide temperature range. In: *Angewandte Chemie Int. Ed.* 50 (2011), Nr. 35, S. 8072–8076
- [253] CHILDS, P. R. N.; GREENWOOD, J. R. ; LONG, C. A.: Review of temperature measurement. In: *Review of Scientific Instruments* 71 (2000), Nr. 8, S. 2959–2978
- [254] BRINKS, D.; STEFANI, F. D.; KULZER, F.; HILDNER, R.; TAMINIAU, T. H.; AVLA-SEVICH, Y.; MULLEN, K. ; HULST, N. F.: Visualizing and controlling vibrational wave packets of single molecules. In: *Nature* 465 (2010), Nr. 7300, S. 905–908
- [255] DIJK, E. M.; HERNANDO, J.; GARCIA-LOPEZ, J. J.; CREGO-CALAMA, M.; REINHOUTD, D. N.; KUIPERS, L.; GARCIA-PARAJO, M. F. ; HULST, N. F.: Single-molecule pump-probe detection resolves ultrafast pathways in individual and coupled quantum systems. In: *Physical review letters* 94 (2005), Nr. 7, S. 078302
- [256] HILDNER, R.; BRINKS, D. ; HULST, N. F.: Femtosecond coherence and quantum control of single molecules at room temperature. In: *Nature Physics* 7 (2011), Nr. 2, S. 172–177
- [257] GERHARDT, I.; WRIGGE, G.; ZUMOFEN, G.; HWANG, J.; RENN, A. ; SANDOGHDAR, V.: Coherent state preparation and observation of Rabi oscillations in a single molecule. In: *Physical Review A* 79 (2009), Nr. 1
- [258] GERHARDT, I.; WRIGGE, G.; HWANG, J.; ZUMOFEN, G. ; SANDOGHDAR, V.:

- Coherent nonlinear single-molecule microscopy. In: *Physical Review A* 82 (2010), Nr. 6
- [259] BRINKS, D.; HILDNER, R.; STEFANI, F. D. ; HULST, N. F.: Coherent control of single molecules at room temperature. In: *Faraday Discussions* 153 (2011), S. 51–60
- [260] DIJK, E. M.; HERNANDO, J.; GARCIA-PARAJO, M. F. ; HULST, N. F.: Single-molecule pump-probe experiments reveal variations in ultrafast energy redistribution. In: *Journal of Chemical Physics* 123 (2005), Nr. 6, S. 64703
- [261] HERNANDO, J.; DIJK, E. M.; HOOGENBOOM, J. P.; GARCIA-LOPEZ, J. J.; REINHOUTD, D. N.; CREGO-CALAMA, M.; GARCIA-PARAJO, M. F. ; HULST, N. F.: Effect of disorder on ultrafast exciton dynamics probed by single molecule spectroscopy. In: *Physical Review Letters* 97 (2006), Nr. 21, S. 216403
- [262] HILDNER, R.; BRINKS, D.; STEFANI, F. D. ; HULST, N. F.: Electronic coherences and vibrational wave-packets in single molecules studied with femtosecond phase-controlled spectroscopy. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 13 (2011), Nr. 5, S. 1888–1894
- [263] WANG, H. W.; FU, Y.; HUFF, T. B.; LE, T. T.; WANG, H. ; CHENG, J. X.: Chasing lipids in health and diseases by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. In: *Vibrational Spectroscopy* 50 (2009), Nr. 1, S. 160–167

Begutachtete Publikationen

- DAN, D.; LEI, M.; YAO, B.; WANG, W.; WINTERHALDER, M.; ZUMBUSCH, A.; QI, Y.; XIA, L.; YAN, S.; YANG, Y.; GAO, P.; YE, T.; ZHAO, W.: DMD-based LED-illumination super-resolution and optical sectioning microscopy. In: *Scientific reports* 3 (2013), Art.Nr. 1116
- GALLI, R.; UCKERMANN, O.; WINTERHALDER, M.J.; SITOCI-FICICI, K.H.; GEIGER, K.D.; KOCH, E.; SCHACKERT, G.; ZUMBUSCH, A.; STEINER, G.; KIRSCH, M.: Vibrational spectroscopy imaging and multiphoton microscopy of spinal cord injury. In: *Analytical Chemistry* 84 (2012), Nr. 20, S. 8707-8714
- STEMPFLE, B.; DILL, M.; WINTERHALDER, M.J.; MÜLLEN, K.; WÖLL, D.: Single molecule diffusion and its heterogeneity during the bulk radical polymerization of styrene and methyl methacrylate. In: *Polymer Chemistry* 3 (2012), Nr. 9, S. 2456-2463
- MAUROY, C.; PORTET, T.; WINTERHALDER, M.; ESCOFFRE, J.-M.; BELLARD, E.; BLACHE, M.-C.; TEISSÉ, J.; ZUMBUSCH, A.; ROLS, M.-P.: Giant lipid vesicles under electric field pulses assessed by noninvasive imaging. In: *Bioelectrochemistry* 87 (2012), S. 253-259
- WIKTOROWSKI, S.; FISCHER, G.M.; WINTERHALDER, M.J.; DALTROZZO, E.; ZUMBUSCH, A.: Photophysics of aminophenyl substituted pyrrolopyrrole cyanines. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 14 (2012), Nr. 8, S. 2921-2928
- JÜNGST, C.; WINTERHALDER, M.; ZUMBUSCH, A.: Fast and long term lipid droplet tracking with CARS microscopy. In: *Journal of Biophotonics* 4 (2011), Nr. 6, S. 435-441
- WINTERHALDER, M.J.; ZUMBUSCH, A.; LIPPITZ, M.; ORRIT, M.: Towards far-field vibrational spectroscopy of single molecules at room temperature. In: *Journal of Physical Chemistry B* 115 (2011), Nr. 18, S. 5425-5430

- LEI, M.; WINTERHALDER, M.; SELM, R.; ZUMBUSCH, A.: Video-rate wide-field CARS microscopy with collinear non-phase-matching illumination. In: *Journal of Biomedical Optics* 16 (2011), Nr. 2, Art.Nr. 021104
- PECHER, J.; HUBER, J.; WINTERHALDER, M.; ZUMBUSCH, A.; MECKING, S.: Tailor-made conjugated polymer nanoparticles for multicolor and multiphoton cell imaging. In: *Biomacromolecules* 11 (2010), Nr. 10, S. 2776-2780
- SELM, R.; WINTERHALDER, M.; ZUMBUSCH, A.; KRAUSS, G.; HANKE, T.; SELL, A.; LEITENSTORFER, A.: Ultrabroadband background-free Coherent anti-Stokes Raman Scattering microscopy based on a compact Er:fiber laser system. In: *Optics Letters* 35 (2010), Nr. 19, S. 3282-3284
- KRAUSS, G.; HANKE, T.; SELL, A.; TRÄUTLEIN, D.; LEITENSTORFER, A.; SELM, R.; WINTERHALDER, M.; ZUMBUSCH, A.: A compact coherent anti-Stokes Raman scattering microscope based on a picosecond two-color Er:fiber laser system. In: *Optics Letters* 34 (2009), Nr. 18, S.2847-2849

Danksagungen

Diese Arbeit wurde zwischen November 2007 und August 2013 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Andreas Zumbusch angefertigt.

Mein Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. Andreas Zumbusch für die vielen spannenden Aufgaben, die großartigen Möglichkeiten und das große Vertrauen, das er in mich gesetzt hat.
- Herrn Prof. Dr. Ulrich E. Steiner für die Übernahme des Zweitgutachtens. Ich möchte mich auch besonders für die hilfreichen Diskussionen zu meiner Doktorarbeit bedanken.
- Frau Prof. Dr. Karin Hauser für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.
- Dem Land Baden-Württemberg für die finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Promotionsstipendiums.
- Meinen Kooperationspartnern in und außerhalb von Konstanz: der AG von Dr. Marie-Pierre Rols; Svenja Schneider und Prof. Dr. Christof Hauck; Dr. Thomas Neu; Dr. Heimo Wolinski und Prof. Dr. Sepp D. Kohlwein; Dr. Daniela Palgunow und Prof. Dr. Frank Döring; Dr. Roberta Galli, Prof. Matthias Kirsch und Dr. Kathrin Geiger; Dr. Johannes Pecher und Prof. Dr. Stefan Mecking.
- Meinen ehemaligen Kollegen Dr. Romedi Selm und Christian Jüngst für die gute Zusammenarbeit und zahlreichen Diskussionen im Labor.
- Den ehemaligen Postdocs Dr. Ming Lei und Dr. Andrea Nagy, mit denen ich zusammen gearbeitet habe.
- All den Studenten, mit denen ich zusammenarbeiten durfte. Insbesondere Stefan Schütter möchte ich hier hervorheben, der sowohl bei seiner Bachelorarbeit als auch als HiWi sehr motiviert und interessiert war.
- Dr. Georg Fischer für die Bereitstellung der PPCy Farbstoffe.

- Dr. Romedi Selm und Annette Buntz für das Korrekturlesen des Manuskripts.
- Allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Zumbusch und Wöll, für die gute Zusammenarbeit.

PS Ich bin nun seit Dezember 2006 in der AG Zumbusch aktiv. Da hätte ich eine Menge zu erzählen gehabt: Von den großartigen Möglichkeiten und der Freiheit, die ich hatte, den vielen Dingen, die ich dazu gelernt habe (technisch, wissenschaftlich und für's Leben), den vielen Menschen, mit denen ich zu tun hatte. Insbesondere denjenigen, mit denen ich so schöne Zeiten auch außerhalb des Laboralltags erleben durfte. Eine erste Version der Danksagungen geriet daher zu lang und zu persönlich. Daher nur die obige, trockene Variante. Ich hoffe die "Betroffenen", denen jetzt zu wenig oder gar nicht gedankt wurde, wissen trotzdem wie dankbar ich ihnen bin!