

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

CARS-Mikroskopie  
und  
Aufbau sowie Charakterisierung einer  
Apparatur zur dreidimensionalen  
Verfolgung von Einzelobjekten in Echtzeit

Dissertation

vorgelegt von

Ondrej Burkacky

aus

Prag

angefertigt an der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

2007

## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. C. Bräuchle betreut.

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 26. März 2007

Ondrej Burkacky

Dissertation eingereicht am	27.3. 2007
1. Gutachter:	Prof. Dr. C. Bräuchle
2. Gutachter:	Prof. Dr. A. Hartschuh
Mündliche Prüfung am	24.4. 2007

*Für meine Eltern und Julia.*



# Vorwort

Die vorliegende Arbeit ist in zwei unabhängige Teile gegliedert. Der erste Teil befasst sich mit der CARS-Mikroskopie. Die Einführung zu diesem Teil ist in Kapitel 1 (Seite 3) zu finden. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse beinhaltet Kapitel 5 (Seite 69).

Der zweite Teil befasst sich mit dem Aufbau sowie der Charakterisierung einer Apparatur zur dreidimensionalen Verfolgung von Einzelobjekten in Echtzeit. Die Einführung hierzu befindet sich in Kapitel 7 (Seite 77). Kapitel 13 (Seite 123) beinhaltet die Zusammenfassung der Ergebnisse.



# Inhaltsverzeichnis

<b>I. CARS-Mikroskopie</b>	<b>1</b>
<b>1. Einführung</b>	<b>3</b>
<b>2. Theorie</b>	<b>5</b>
2.1. Streuung . . . . .	5
2.2. Raman-Effekt . . . . .	6
2.3. CARS . . . . .	10
2.3.1. Intensität des CARS Signals . . . . .	11
2.3.2. Eigenschaften eines CARS-Mikroskops . . . . .	12
2.4. Unterdrückung des nicht-resonanten Hintergrunds . . . . .	15
2.4.1. Pikosekunden-Lasersystem bei einer CARS-Wellenlänge . . . . .	15
2.4.2. Detektion eines CARS-Spektrums . . . . .	16
2.4.3. Mischung von drei Anregungsstrahlen . . . . .	18
2.5. Chirpen von Laserpulsen . . . . .	20
2.5.1. Phasen- und Gruppengeschwindigkeit . . . . .	20
2.5.2. Gruppengeschwindigkeitsdispersion . . . . .	21
2.5.3. Chirpfaktor . . . . .	23
2.5.4. Anregung mit zwei gechirpten Laserpulsen . . . . .	24
2.6. CARS mit Zweifachanregung (dual-pump CARS) . . . . .	28
<b>3. Aufbau des Experiments</b>	<b>31</b>
3.1. Lasersystem und Aufbau zur spektral fokussierten CARS-Mikroskopie	32
3.1.1. Femtosekunden-Oszillator Mira . . . . .	32
3.1.2. Verstärker RegA . . . . .	35
3.1.3. Optisch parametrischer Verstärker (OPA) . . . . .	37
3.1.4. Kompressor . . . . .	38
3.1.5. Strahlteiler . . . . .	39
3.1.6. Verzögerungsstrecke . . . . .	40

3.1.7. Mikroskop . . . . .	40
3.2. Lasersystem und Aufbau zur CARS-Mikroskopie mit Zweifachanregung	43
3.3. Vergleich der beiden Aufbauten . . . . .	45
<b>4. Experimente</b>	<b>47</b>
4.1. Spektral fokussierte CARS-Mikroskopie . . . . .	47
4.1.1. Kreuzkorrelation . . . . .	47
4.1.2. Spektrale Selektivität . . . . .	49
4.1.3. Hintergrundunterdrückung . . . . .	51
4.1.4. Einstellung der spektralen Auflösung . . . . .	53
4.1.5. Empfindlichkeitsmessung . . . . .	55
4.1.6. Messungen in lebenden Zellen . . . . .	56
4.1.6.1. Detektion von Lipiden in lebenden Zellen . . . . .	56
4.1.6.2. Detektion von Glutathion in lebenden Zellen . . . . .	57
4.1.7. Dual-timeshift CARS . . . . .	60
4.2. Dual-pump CARS . . . . .	63
4.2.1. Gleichzeitige Aufnahme von zwei Schwingungen . . . . .	63
4.2.2. Unterdrückung des nicht-resonanten Signals . . . . .	64
<b>5. Zusammenfassung der Ergebnisse</b>	<b>69</b>
5.1. Spektral fokussierte CARS-Mikroskopie . . . . .	69
5.2. Dual-pump CARS . . . . .	69
5.2.1. Unterdrückung des nicht-resonanten Hintergrunds . . . . .	70
5.2.2. Gleichzeitige Detektion von zwei Schwingungen . . . . .	70
<b>6. Ausblick</b>	<b>73</b>
<b>II. Aufbau sowie Charakterisierung einer Apparatur zur dreidimensionalen Verfolgung von Einzelobjekten in Echtzeit</b>	<b>75</b>
<b>7. Einführung</b>	<b>77</b>
<b>8. Theorie für ein konfokales und ein Weitfeld-Mikroskop</b>	<b>81</b>
8.1. Optische Grundlagen . . . . .	81
8.1.1. Verteilungsfunktion . . . . .	81
8.1.2. Auflösungsvermögen . . . . .	84
8.2. Konfokale Mikroskopie . . . . .	85
8.2.1. Bestandteile des konfokalen Mikroskops . . . . .	85
8.2.2. Auflösungsvermögen . . . . .	86



8.2.3. Signalstärke . . . . .	88
8.2.4. Detektionseffizienz . . . . .	89
8.3. Bestimmung der Position eines Partikels . . . . .	90
8.3.1. Bestimmung der x,y Position . . . . .	90
8.3.2. Bestimmung der z Position . . . . .	92
8.4. Verfolgen von Partikeln . . . . .	92
8.5. Weitfeld-Mikroskopie . . . . .	93
8.5.1. Köhler-Beleuchtung . . . . .	93
8.5.2. Vergrößerung und Digitalisierung . . . . .	94
<b>9. Experimenteller Aufbau des kombinierten konfokalen und Weitfeld-</b>	
<b>Mikroskops</b>	<b>97</b>
9.1. Konfokale Detektion . . . . .	99
9.2. Weitfeld-Detektion . . . . .	101
9.3. Positionierung der Probe . . . . .	104
<b>10. Charakterisierung des konfokalen Systems zur Verfolgung von Einzelob-</b>	
<b>jekten</b>	<b>105</b>
10.1. Auflösungsvermögen . . . . .	105
10.2. Detektionseffizienz . . . . .	106
10.3. Latenzzeiten der Apparatur . . . . .	108
10.4. Maximale Aufnahme-geschwindigkeit . . . . .	109
10.5. Maximale detektierbare Geschwindigkeit der Partikel . . . . .	110
10.6. Positionsgenauigkeit . . . . .	111
10.6.1. Positionsgenauigkeit in der x,y Ebene . . . . .	111
10.6.2. Positionsgenauigkeit in der z Ebene . . . . .	113
<b>11. Erste Testergebnisse</b>	<b>115</b>
11.1. Definition eines Standards . . . . .	115
11.2. Verfolgung von einzelnen Partikeln in lebenden Zellen . . . . .	117
<b>12. Vergleich mit anderen Verfahren</b>	<b>121</b>
<b>13. Zusammenfassung der Ergebnisse</b>	<b>123</b>
<b>14. Ausblick</b>	<b>125</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>126</b>



**Teil I.**

**CARS-Mikroskopie**



# 1. Einführung

Das Verfolgen von biologischen Vorgängen direkt am lebenden Organismus ist eine der faszinierendsten Herausforderungen der modernen Wissenschaft. Eine herausragende Bedeutung auf diesem Gebiet hat die Fluoreszenz-Spektroskopie. Das zu untersuchende Objekt wird hierbei mit einem Farbstoff markiert (englisch: labeln). Dadurch kann die Position von diesem Objekt im Mikroskop beobachtet werden. Durch die Verwendung von verschiedenen Fluorophoren lassen sich unterschiedliche Strukturen selektiv anfärben. Somit können verschiedene Objekte und deren Bewegung gleichzeitig beobachtet werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit wird näher auf die Verfolgung von einzelnen gefärbten Teilchen in einer Zelle eingegangen.

So vielfältig die Einsatzmöglichkeiten der Fluoreszenzmikroskopie erscheinen, sie bringt auch einige Schwierigkeiten mit sich. Das wohl größte Problem besteht darin, dass die Fluorophore chemischen Reaktionen unterliegen und dadurch an Leuchtkraft verlieren (bleichen). Eine weitere Schwierigkeit ist die Toxizität vieler Farbstoffe für biologische Systeme. Zusätzlich kann das Anlagern eines Farbstoffes an ein Molekül dessen Wirkung verändern und somit physiologisch relevante Aussagen unmöglich machen. Letztlich kann eine starke Eigenfluoreszenz der Probe die Detektion der gewünschten Strukturen beeinflussen.

Wegen dieser Probleme ist eine Ergänzung zur Fluoreszenzmikroskopie wünschenswert. Eine Möglichkeit stellt die Mehr-Photonenmikroskopie dar. Hierbei handelt es sich insbesondere um die Zwei-Photonenmikroskopie. Jene Methode ermöglicht es, als Anregungswellenlänge Licht im IR Bereich zu verwenden. Dieses ist weniger schädlich für biologische Proben. Zusätzlich erfolgt die Detektion blauverschoben (höhere Energie), was die Eigenfluoreszenz der Probe leicht abtrennbar macht.

Dennoch ist es auch bei dieser Methode vonnöten, die Probe vorher mit Farbstoffen anzufärben. Auch das Problem des Bleichens besteht weiterhin. Wenn man auf den Einsatz von Farbstoffen verzichten möchte, kann man auf die Schwingungsmikroskopie zurückgreifen. Hierbei werden statt Fluorophoren die intrinsischen Schwingungen des Moleküls ausgenutzt, um den nötigen Kontrast zu erreichen. Dadurch kann die Probe nicht bleichen und Messungen über einen sehr langen Zeitraum sind möglich.

Die Schwingungsmikroskopie basiert entweder auf der Absorption im infraroten Bereich oder auf der Raman-Streuung. Erstere hat den Nachteil, dass sie wegen der großen Wellenlänge eine sehr niedrige räumliche Auflösung aufweist. Des Weiteren bereitet die breite Absorption von Wasser in diesem spektralen Bereich vor allem in biologisch relevanten Proben große Probleme.

Die Raman-Streuung hingegen weist jene Probleme nicht auf, da die Anregungswellenlänge wesentlich kürzer ist, und Wasser kein nennenswertes Signal im gewöhnlich verwendeten Detektionsbereich zeigt. Ein Problem ist allerdings die geringe Intensität des Raman-Signals. Der Wirkungsquerschnitt ist bei Raman um mehrere Größenordnungen kleiner als Fluoreszenzquerschnitte. Für ein gutes Signal-zu-Rauschen-Verhältnis benötigt man eine hohe Anregungsleistung und lange Aufnahmezeiten. Zusätzlich wird das Signal oft durch die Eigenfluoreszenz der Probe überlagert. Eine Lösung des Problems stellt die CARS-Mikroskopie dar, in der durch kohärente Anregung eine signifikante Signalverstärkung erreicht wird. Die Intensität des CARS-Signals ist um den Faktor  $10^4$ - $10^5$  höher als das entsprechende Raman-Signal. Allerdings ist CARS nicht frei von Hintergrund. Dieser nicht-resonante Hintergrund weist keine chemische Selektivität auf und führt zu einem schlechten Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis.

Die CARS-Mikroskopie ist 1982 von der Gruppe um J. Reintjes begründet worden [1]. Allerdings gab es damals noch viele technische Schwierigkeiten und erst 1999 wurde von A. Zumbusch eine praktisch verwendbare Methode vorgestellt [2]. Seitdem rückt die CARS-Mikroskopie immer mehr ins Blickfeld der Wissenschaftler. Dies lässt sich besonders gut an dem Anstieg der Anzahl an Publikationen und am Interesse an diesem Thema in den letzten Jahren erkennen. So ist die Veröffentlichung von A. Zumbusch bereits über 185 mal zitiert worden. Insbesondere die Gruppe um X. S. Xie bemüht sich, biologisch-medizinisch relevante Anwendungen zu finden [3, 4, 5].

Auch diese Arbeit versucht, die CARS-Mikroskopie näher an die praktische Anwendung zu bringen. Dies wird vor allem im experimentellen Teil deutlich, wo Messungen an lebenden Systemen vorgestellt werden. Zunächst musste aber das Problem des nicht-resonanten Hintergrunds bewältigt werden. Das primäre Ziel dieser Arbeit ist es, eine experimentelle Anordnung zur effektiven Unterdrückung des nicht-resonanten Hintergrunds zu entwickeln. Sie sollte eine hintergrundfreie Detektion ohne Intensitätsverlust des eigentlichen Signals ermöglichen. Des Weiteren sollte keine Verschlechterung der zeitlichen Auflösung erfolgen.

Nachfolgend werden zwei experimentelle Aufbauten vorgestellt, die diesen Ansprüchen genügen. Um deren Funktionsweise verstehen zu können, bedarf es zunächst des Verständnisses der Methode selbst. Diese Arbeit beginnt somit mit einer theoretischen Einführung.

## 2. Theorie

### 2.1. Streuung

Wenn Licht auf Materie (Moleküle) trifft, so kann es entweder absorbiert oder gestreut werden oder keine Wechselwirkung eingehen. Entspricht die Energie der eingestrahnten Photonen der Energiedifferenz zwischen dem Grundzustand des Moleküls und einem angeregten Zustand, wird das Photon mit einer hohen Wahrscheinlichkeit absorbiert und das Molekül in den angeregten Energiezustand überführt. Dieser Vorgang wird in der Absorptionsspektroskopie als Verlust von Energie der einfallenden Strahlung beobachtet.

Bei der Streuung bedarf es nicht der gleichen Energie wie der Differenz zweier Zustände im Molekül. Die gestreuten Photonen können in einem beliebigen Winkel zum eingestrahnten Licht beobachtet werden. Besitzen die gestreuten Photonen die gleiche Energie wie das eingestrahlte Licht, so spricht man von elastischer Streuung. Betrachtet man Licht verschiedener Wellenlängen, so lässt sich feststellen, dass energiereiches (blaues) Licht stärker gestreut wird als energieärmeres (rotes) Licht. Dieser Sachverhalt lässt sich dadurch erklären, dass alle Moleküle elektronische Resonanzen im UV-Bereich besitzen. Je näher die eingestrahlte Frequenz einer Resonanzfrequenz kommt, desto stärker interagiert das Molekül mit dem eingestrahnten Licht. Dieser Effekt ist auch für die blaue Färbung des Himmels verantwortlich. Eine quantitative Betrachtung lieferte Lord Rayleigh 1871. Er setzte die Intensität des Streulichts indirekt proportional zur eingestrahnten Wellenlänge hoch 4.

$$I_{\text{Streuung}} \propto \frac{1}{\lambda^4} \quad (2.1)$$

## 2.2. Raman-Effekt

Setzt man ein Molekül einem elektrischen Feld  $E$  aus, so kommt es zu einer Verzerrung der Elektronenhülle, wobei durch die Verschiebung der Ladung ein Dipolmoment  $\mu_{\text{ind}}$  induziert wird. Die Stärke der Verzerrung wird durch die Polarisierbarkeit  $\alpha$  ausgedrückt. Es gilt:

$$\mu_{\text{ind}} = \alpha E. \quad (2.2)$$

Besitzt das Molekül bereits vor der Einwirkung des elektrischen Feldes ein permanentes Dipolmoment  $\mu$ , so gilt für das Gesamtdipolmoment, das als Polarisation  $P$  bezeichnet wird:

$$P = \mu + \mu_{\text{ind}} = \mu + \alpha E. \quad (2.3)$$

Trifft Licht auf das Molekül, so führt das sich periodisch mit der Kreisfrequenz  $\omega_L$  ändernde elektrische Feld  $E$  zu einem mit der Kreisfrequenz  $\omega_L$  oszillierenden induzierten Dipolmoment  $\mu_{\text{ind}}$ . Letzteres führt wiederum zur Emission elektromagnetischer Strahlung der gleichen Kreisfrequenz  $\omega_L$  in überwiegend senkrechter Richtung zum Feld des eingestrahnten Lichtes:

$$P = \mu + \alpha E = \mu + \alpha E_0 \cos(\omega_L t). \quad (2.4)$$

Diese so genannte Rayleigh-Streuung des Lichtes an Materie ist frequenzabhängig, wobei die Intensität der Streuung wie in Gleichung 2.1 erwähnt proportional zur 4. Potenz der Frequenz der einfallenden Strahlung ist. In einem  $N$ -atomigen Molekül sind Polarisierbarkeit  $\alpha$  sowie dynamisches Dipolmoment  $\mu$  Funktionen der  $3N-6$  ( $3N-5$  im linearen Fall) Schwingungsfreiheitsgrade des Moleküls. Sie lassen sich durch eine Taylorentwicklung annähern, wobei nur die linearen Terme berücksichtigt werden:

$$\mu = \mu(0) + \sum_{i=1}^{3N-6} \left( \frac{\partial \mu}{\partial Q_i} \right) Q_i \quad (2.5)$$

$$\alpha = \alpha(0) + \sum_{i=1}^{3N-6} \left( \frac{\partial \alpha}{\partial Q_i} \right) Q_i, \quad (2.6)$$

$\mu(0)$  und  $\alpha(0)$  sind dabei jeweils Dipolmoment und Polarisierbarkeit im Gleichgewichtszustand. Betrachtet man nun die Polarisation des Moleküls in Abhängigkeit des eingestrahnten Lichtes sowie der Normalkoordinaten  $Q_i$ , so ergibt sich:

$$\begin{aligned} P &= \mu + \alpha E_0 \cos(\omega_L t) \\ &= \mu(0) + \sum_{i=1}^{3N-6} \left( \frac{\partial \mu}{\partial Q_i} \right) Q_i + \left( \alpha(0) + \sum_{i=1}^{3N-6} \left( \frac{\partial \alpha}{\partial Q_i} \right) Q_i \right) E_0 \cos(\omega_L t). \end{aligned}$$



Für kleine Auslenkungen kann  $Q_i$  durch  $Q_i = Q_i^0 \cos(\omega_n t)$  angenähert werden.  $\omega_n$  ist die Schwingungsfrequenz des Moleküls.

$$P = \mu(0) + \sum_{i=1}^{3N-6} \left( \frac{\partial \mu}{\partial Q_i} \right) Q_i^0 \cos(\omega_n t) \\ + \alpha(0) E_0 \cos(\omega_L t) + \sum_{i=1}^{3N-6} \left( \frac{\partial \alpha}{\partial Q_i} \right) Q_i^0 E_0 \cos(\omega_L t) \cos(\omega_n t)$$

Der zweite Term steht für die Änderung des Dipolmoments durch Normalschwingungen, was in der Infrarotspektroskopie ausgenutzt wird. Der dritte Term beschreibt die bereits besprochene Rayleigh-Streuung. Der vierte Term ist eine Funktion des eingestrahlten Lichtes und der Normalkoordinaten. Er lässt sich umschreiben in:

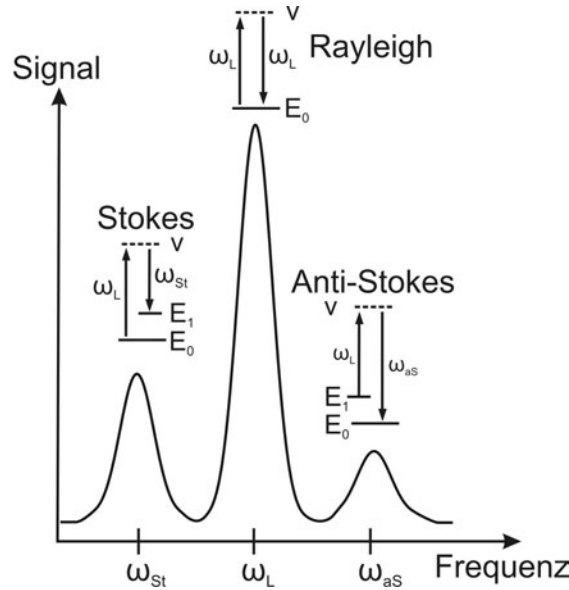
$$P_{\text{Raman}} = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^{3N-6} \left( \frac{\partial \alpha}{\partial Q_i} \right) Q_i^0 E_0 (\cos((\omega_L - \omega_n) t) + \cos((\omega_L + \omega_n) t)). \quad (2.7)$$

Regt man Moleküle mit einem monochromatischen Lichtstrahl der Frequenz  $\omega_L$  an, sind die Frequenzen  $\omega_L - \omega_n$  und  $\omega_L + \omega_n$  neben der Rayleigh-Streustrahlung detektierbar und enthalten Informationen über die Schwingungszustände der bestrahlten Probe (siehe Abbildung 2.1). Dieser Effekt wird nach dem Entdecker, dem indischen Physiker C.V. Raman, Raman-Effekt genannt. Die Komponenten  $\omega_L - \omega_n$  werden als Stokes'sche Linien  $\omega_{\text{St}}$  und die Komponenten  $\omega_L + \omega_n$  als Anti-Stokes'sche Linien  $\omega_{\text{AS}}$  bezeichnet. Voraussetzung für das Auftreten der Raman-Streuung ist ein von Null verschiedenes Differential  $\frac{\partial \alpha}{\partial Q_i}$  d. h. die Polarisierbarkeit muss sich während der Normalschwingung ändern. Die entsprechenden Normalschwingungen werden als Raman-aktiv bezeichnet.

Besitzt das Molekül ein Inversionszentrum, so sind die Raman-aktiven Schwingungen von den infrarot-aktiven verschieden. Daher ergibt sich aus dem Raman-Spektrum eine komplementäre Information zum Infrarot-Spektrum.

Um die Intensität der beobachtbaren Linien korrekt wiedergeben zu können, muss der Raman-Effekt quantenmechanisch beschrieben werden. Der monochromatische Lichtstrahl wird hierbei als ein Strom von Photonen der Energie  $\hbar\omega_L$  angesehen, wobei nur ein geringer Teil der Photonen mit den bestrahlten Probenmolekülen wechselwirkt.

Die häufigste Wechselwirkung ist die elastische Streuung der Photonen, die Rayleigh-Streuung. Die eingestrahlte Energie überführt das System vom Grundzustand  $E_0$  in einen so genannten virtuellen Zustand  $v$  (siehe Abbildung 2.1). Jener stimmt normalerweise nicht mit einem realen erlaubten Energieniveau des Moleküls überein. Der virtuelle Zustand zerfällt, und es kommt zur Emission eines Photons gleicher



**Abbildung 2.1.:** Das theoretische Spektrum bei einem Streuexperiment zeigt neben der Rayleigh-Bande  $\omega_L$  auch energetisch verschoben die Stokes-  $\omega_{St}$  und Anti-Stokes-Bande  $\omega_{aS}$ . Oberhalb der jeweiligen Bande ist das dazugehörige Energiediagramm bestehend aus zwei reellen Niveaus (durchgezogene Linie) und einem virtuellen Niveau (gestrichelte Linie) dargestellt.

Energie. Viel seltener kommt es dazu, dass das Molekül in einen angeregten Zustand relaxiert und das gestreute Photon eine um den Betrag  $\Delta E$  geringere Energie aufweist (Stokes-Linien).  $\Delta E$  ist hierbei die Energiedifferenz zwischen dem Grundzustand des Moleküls und dem angeregten Zustand, der ein Schwingungs-, Rotations- oder elektronischer Zustand sein kann. Umgekehrt können auch angeregte Zustände durch die Photonen in einen virtuellen Zustand überführt werden und nach der Emission eines Photons mit einer um  $\Delta E$  erhöhten Energie in den Grundzustand übergehen (Anti-Stokes-Linien).

Die Intensität der Lichtstreuung hängt von der Anzahl der Moleküle pro Volumen  $N$ , der eingestrahnten Wellenlänge  $\lambda$ , dem Brechungsindex der Teilchen  $n$  und der eingestrahnten Intensität  $I_e$  ab [6, 7].

$$I_{\text{Streuung}} = \frac{24\pi^3}{\lambda^4 N^2} \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} I_e \quad (2.8)$$

Das Verhältnis  $\frac{I_{\text{Streuung}}}{I_e}$  wird auch als Streuquerschnitt  $\sigma_S$  bezeichnet.

Der Rayleigh-Streuprozess ist etwa um den Faktor  $10^3$  wahrscheinlicher als die Raman-Streuung [6]. Deshalb ist die Rayleigh-Streuung entsprechend intensiver als die Stokes- und Anti-Stokes-Linien. Da gemäß der Boltzmann-Verteilung bei Raumtemperatur bevorzugt der Schwingungsgrundzustand  $E_0$  besetzt ist, sind bei der Schwingungs-Raman-Spektroskopie die Stokes-Linien intensiver als die Anti-Stokes-Linien.

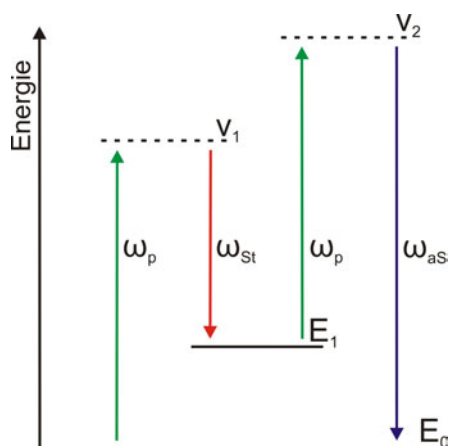
Die Intensität der Raman-Streuung steigt wie die der Rayleigh-Streuung mit der vierten Potenz der Frequenz des eingestrahlteten Lichtes an. Somit wird zur Aufnahme von Raman-Spektren Erregerlicht möglichst hoher Frequenz benutzt. Da nur eines von etwa  $10^8$  Anregungsphotonen in ein Raman-Photon konvertiert wird [8], benötigt man extrem intensive und monochromatische Lichtquellen. In der Praxis benutzt man daher in der Raman-Spektroskopie einen Laser als Lichtquelle. Um höhere momentane Intensitäten zu erreichen, empfiehlt sich der Einsatz eines gepulsten Lasers. Bei einem solchen Laser wird im Gegensatz zum Dauerbetrieb (continuous wave Laser oder cw-Laser) nur für eine kurze Zeit (ca. 0,001 % der Gesamtzeit) ein energiereicher Puls ausgekoppelt. Im zeitlichen Mittel ist die Intensität und somit die thermische Belastung der Probe durch den gepulsten Laser mit der durch einen cw-Laser verursachten Belastung vergleichbar. Für eine kurze Zeit erreicht man allerdings sehr hohe Anregungsintensitäten und damit ein hohes Signal. Ein Problem stellt die Absorption und die damit verbundene Fluoreszenz einer Probe dar. Die Fluoreszenzintensität ist im Allgemeinen deutlich höher als die Intensität der Raman-Streuung. Somit werden bei einer fluoreszierenden Probe die Raman-Signale überdeckt.

Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen bietet die CARS-Spektroskopie. Auf diesen Sachverhalt wird im nächsten Abschnitt eingegangen.

## 2.3. CARS

CARS steht für Coherent Anti-Stokes Raman Scattering, also die kohärente Anti-Stokes-Raman-Streuung. Zum ersten Mal berichteten 1965 P. D. Maker und R. W. Terhune [9] von diesem Prozess. Er wurde später von R. F. Begley und Mitarbeitern [10] CARS genannt.

Insgesamt kann der CARS-Prozess als eine Mischung von vier Wellen angesehen werden. Zunächst wird das Probenmolekül mit einem so genannten Pumplaser (Frequenz  $\omega_p$ ) in einen virtuellen Zustand angeregt. Anstatt wie bei der Raman-Streuung auf eine spontane Emission zu warten, wird gleichzeitig ein Puls mit der Frequenz  $\omega_{st}$  eingestrahlt. Dadurch geht das Molekül mittels stimulierter Emission in den angeregten Zustand über. Mit einem dritten Puls (meistens wird hierfür ein zweites Photon der Frequenz  $\omega_p$  verwendet) wird das Molekül in einen weiteren virtuellen Zustand angeregt. Schließlich relaxiert das Molekül unter Emission eines Photons der Frequenz  $\omega_{aS}$  wieder in den Grundzustand. Wie in Abbildung 2.2 ersichtlich,



**Abbildung 2.2.:** Der CARS-Prozess. Ausgehend vom Grundzustand  $E_0$  wird das Molekül mit einem Pump-Photon der Frequenz  $\omega_p$  in einen virtuellen Zustand  $v_1$  angeregt. Daraufhin erfolgt eine stimulierte Emission durch ein Stokes-Photon der Frequenz  $\omega_{St}$  in einen angeregten Zustand  $E_1$ . Nach einer Anregung in einen weiteren virtuellen Zustand  $v_2$  durch ein zweites Pump-Photon relaxiert das Molekül in den Grundzustand unter Emission eines Anti-Stokes-Photons der Frequenz  $\omega_{aS}$

ist der Energieerhaltungssatz  $\omega_p + \omega_p - \omega_{St} - \omega_{aS} = 0$  erfüllt. Im Vergleich zur (spontanen) Raman-Spektroskopie ist das Anti-Stokes-Signal bei CARS dank der Verwendung von drei Anregungsphotonen und des damit verbundenen Pumpens des angeregten Zustandes sowie der orientierten Abstrahlung (siehe nächstes Kapitel) um den Faktor  $10^4$ - $10^5$  größer [11]. Des Weiteren ist die detektierte Frequenz  $\omega_{aS}$  höher als jede der eingestrahlteten Frequenzen, wodurch sich mit einem geeigneten Filter die Fluoreszenz der Probe wirksam unterdrücken lässt.

Der CARS Prozess ist genau dann sehr effizient, wenn die Energiedifferenz  $\hbar(\omega_p - \omega_{\text{St}})$  genau einem Übergang  $\Delta E$  im Molekül entspricht. Darauf wird im nächsten Abschnitt näher eingegangen.

### 2.3.1. Intensität des CARS Signals

Die Intensität des CARS Signals ist proportional zu

$$I_{\text{CARS}} \propto |\chi^{(3)}|^2 I_p^2 I_{\text{St}}. \quad (2.9)$$

$\chi^{(3)}$  ist die nichtlineare Suszeptibilität dritter Ordnung,  $I_p$  die Intensität des Pump-Lasers und  $I_{\text{St}}$  die Intensität des Stokes-Lasers.

Die nichtlineare Suszeptibilität besteht aus einem resonanten (r) und einem nicht-resonanten (nr) Anteil.

$$\chi^{(3)} = \chi_r^{(3)} + \chi_{\text{nr}}^{(3)} \quad (2.10)$$

Der elektronische Beitrag  $\chi_{\text{nr}}^{(3)}$  entspricht einem nicht-resonanten Hintergrund, der keine spektrale Abhängigkeit zeigt. Der Wert von  $\chi_{\text{nr}}^{(3)}$  ist eine reelle Zahl.  $\chi_r^{(3)}$  hingegen besitzt sowohl einen reellen als auch einen imaginären Anteil. Setzt man dies in Gleichung 2.10 ein, so erhält man:

$$I_{\text{CARS}} \propto (\chi_{\text{nr}}^{(3)})^2 + 2\chi_{\text{nr}}^{(3)} \text{Re}(\chi_r) + \text{Re}(\chi_r)^2 + \text{Im}(\chi_r)^2. \quad (2.11)$$

Betrachtet man eine Raman-Schwingung, so kann man  $\chi_r^{(3)}$  schreiben als [12, 13]

$$\chi_r^{(3)} = \frac{nA_R}{\delta - i\Gamma}. \quad (2.12)$$

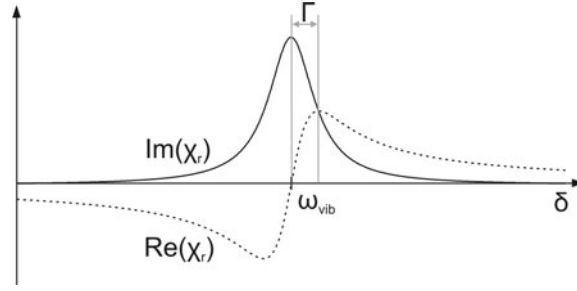
$A_R$  repräsentiert die Stärke der Raman-Streuung,  $n$  die Anzahl der Streuer,  $\Gamma$  die Halbwertsbreite der Raman-Linie und  $\delta$  die Frequenzverschiebung vom Mittelpunkt einer Schwingung  $\omega_{\text{vib}}$  ( $\delta = \omega_{\text{vib}} - \omega_p + \omega_{\text{St}}$ ).

Durch Erweitern der Gleichung 2.12 um den Faktor  $\delta - i\Gamma$  kann der reelle und der imaginäre Teil von  $\chi_r^{(3)}$  abgeleitet werden. Der reelle Anteil von  $\chi_r^{(3)}$  lässt sich dann schreiben als

$$\text{Re}(\chi_r) = \frac{nA_R\delta}{\delta^2 + \Gamma^2} \quad (2.13)$$

und der imaginäre Anteil als

$$\text{Im}(\chi_r) = \frac{nA_R\Gamma}{\delta^2 + \Gamma^2}. \quad (2.14)$$



**Abbildung 2.3.:** Der Real- und Imaginärteil von  $\chi_r$  in Abhängigkeit von der Frequenzverschiebung  $\delta$ .  $\Gamma$  ist die Halbwertsbreite der Raman-Linie und  $\omega_{\text{vib}}$  deren Mittelpunkt.

Setzt man diese Ergebnisse in Gleichung 2.11 ein, so ergibt sich für die Intensität:

$$I_{\text{CARS}} \propto \frac{n^2 A_R^2}{\delta^2 + \Gamma^2} + (\chi_{\text{nr}}^{(3)})^2 + 2 \frac{n A_R \delta}{\delta^2 + \Gamma^2} \chi_{\text{nr}}^{(3)}. \quad (2.15)$$

Es ist ersichtlich, dass die detektierte Intensität stark von der Höhe des nicht-resonanten Signals abhängt. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn die Anzahl der Streuer  $n$  klein ist und der letzte Term in Gleichung 2.15 an Bedeutung gewinnt. Um ein besseres Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis zu erhalten, ist es somit unerlässlich sich mit der Unterdrückung des nicht-resonanten Hintergrunds zu befassen. Zunächst wird aber noch kurz auf die Eigenschaften eines CARS-Mikroskops eingegangen.

### 2.3.2. Eigenschaften eines CARS-Mikroskops

In Abschnitt 2.3 wurde gezeigt, dass sich ein Molekül am Anfang und am Ende des CARS Prozesses im Grundzustand befindet. Durch die Beziehung  $\omega_p + \omega_p - \omega_{\text{St}} - \omega_{\text{aS}} = 0$  ist auch der Energieerhaltungssatz erfüllt. Zusätzlich zur Energieerhaltung muss auch die Impulserhaltung gelten. Laut L.-V. de Broglie (1892-1987) gilt für den Impuls  $p$

$$p = \frac{h}{\lambda} = \hbar \frac{2\pi}{\lambda} = \hbar k \quad (2.16)$$

bzw. in Vektorschreibweise

$$\vec{p} = \hbar \vec{k}. \quad (2.17)$$

$\vec{k}$  ist der Wellenvektor mit dem Betrag  $k$ . Somit kann man die Impulserhaltung schreiben als

$$2\vec{k}_p = \vec{k}_{\text{St}} + \vec{k}_{\text{aS}}, \quad (2.18)$$

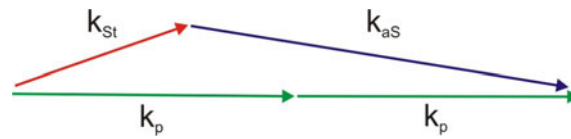


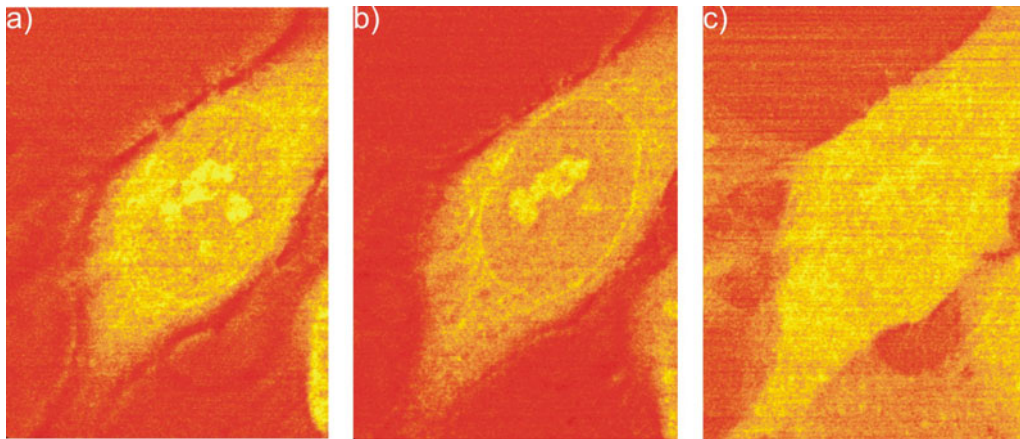
Abbildung 2.4.: Impulserhaltung beim CARS Prozess.

wobei  $\vec{k}$  die jeweiligen Wellenvektoren sind. Graphisch ist diese Beziehung in Abbildung 2.4 dargestellt. Sie wird auch als Phasenanpassung bezeichnet. Um dieser Bedingung gerecht zu werden, müsste man die Anregungsstrahlen unter unterschiedlichen Winkeln einstrahlen. Diese Anordnung ist in der Mikroskopie experimentell schwer zu realisieren. Aus diesem Grund ist man dazu übergegangen [2], Objektive mit einem großen Öffnungswinkel (d.h. hoher numerischer Apertur (NA), siehe Gleichung 8.1 und den dazugehörigen Abschnitt) zu verwenden. Leuchtet man ein solches Objektiv mit jedem Anregungsstrahl voll aus, dann gibt es im Fokus für jede Richtung des Pump-Strahls den für die Phasenanpassung nötigen Stokes-Strahl. Da diese Bedingung nur im Fokus erfüllt ist, findet der CARS-Prozess nur in einem sehr kleinen Volumen statt. Im Vergleich zum konfokalen Mikroskop (siehe Abschnitt 8.2) kann somit auf eine Lochblende in der Detektion verzichtet werden.

Um das Auflösungsvermögen eines CARS-Mikroskops quantitativ abzuleiten, sind erweiterte Betrachtungen nötig [14, 15]. Diese zeigen, dass das Auflösungsvermögen nicht nur von dem verwendeten Objektiv und Lichtwellenlänge abhängt, sondern auch von der Größe und der geometrischen Form des untersuchten Objektes und wie gut die Phasenanpassung eingehalten wird.

Benutzt man Objektive mit einer hohen NA, so kann die Auflösungsgrenze ungefähr aus der Überlagerung der Intensitätsverteilungsfunktionen (englisch point spread function, PSF) beider Anregungsstrahlen abgeleitet werden (experimentelle Messungen siehe [16]). Dies entspricht beim konfokalen Mikroskop der Überlagerung der Verteilungsfunktion der Anregung und der der Lochblende (siehe Abschnitt 8.2.2). Quantitativ beträgt die Auflösung in der Detektionsebene (laterale Auflösung) ca. 300 nm und senkrecht dazu (longitudinale Auflösung) ca. 1  $\mu\text{m}$ .

Als Beweis für das hohe Auflösungsvermögen sind in Abbildung 2.5 verschiedene axiale Querschnitte einer He-La Zelle (siehe auch Abschnitt 4.1.6.1) abgebildet. Man kann klar unterschiedliche Strukturen in den einzelnen Bildern erkennen. Somit muss die Auflösungsgrenze niedriger sein als der Abstand zwischen den Schichten (hier 2  $\mu\text{m}$ ).



**Abbildung 2.5.:** Abbildung einer He-La-Zelle bei der CH<sub>2</sub> Streckschwingung und in unterschiedlichen z-Ebenen. a)  $z=0\ \mu\text{m}$ , b)  $z=2\ \mu\text{m}$ , c)  $z=4\ \mu\text{m}$ . Bildgröße:  $30 \times 45,6\ \mu\text{m}^2$  (200 x 304 Pixel). Integration über 2000 Laserpulse pro Pixel.



## 2.4. Unterdrückung des nicht-resonanten Hintergrunds

Seit der Wiederbelebung der CARS-Mikroskopie durch A. Zumbusch 1999 [2] sind viele verschiedene Ansätze entwickelt worden, um den nicht-resonanten Hintergrund zu unterdrücken. Der naheliegendste Ansatz wäre, die Wellenlängendifferenz zwischen den Lasern zu verändern und dann das nicht-resonante Signal außerhalb der Schwingungsbande zu detektieren. Da das nicht-resonante Signal über einen sehr breiten Wellenlängenbereich konstant ist, kann man auf das nicht-resonante Signal bei der Schwingungsbande schließen und es abziehen. Leider scheitert dieser Ansatz bei einem Standardsystem an der Durchführbarkeit. So ist es meistens nicht möglich innerhalb einer kurzen Zeit die Wellenlänge von einem der Anregungslaser zu ändern. Des Weiteren ist es schwierig die Laserintensität bei verschiedenen Wellenlängen konstant zu halten.

Die meisten durchgeführten Ansätze lassen sich einer von drei Gruppen zuordnen. Bei der ersten Gruppe wird mittels eines ps Lasersystems bei einer CARS-Wellenlänge gearbeitet und das nicht-resonante Signal möglichst unterdrückt. Bei der zweiten Gruppe wird mit einem reinen fs-Lasersystem oder einem kombinierten fs- und ps-Lasersystem möglichst gleichzeitig ein breites CARS Spektrum erhalten und so das nicht-resonante Signal bestimmt. Bei der dritten Gruppe schließlich wird mit drei Anregungspulsen gearbeitet und somit das CARS-Signal an zwei verschiedenen spektralen Positionen erhalten. Durch den Vergleich dieser beiden Positionen kann das nicht-resonante Signal bestimmt und abgezogen werden.

Im Folgenden werden die einzelnen Methoden näher beschrieben.

### 2.4.1. Pikosekunden-Lasersystem bei einer CARS-Wellenlänge

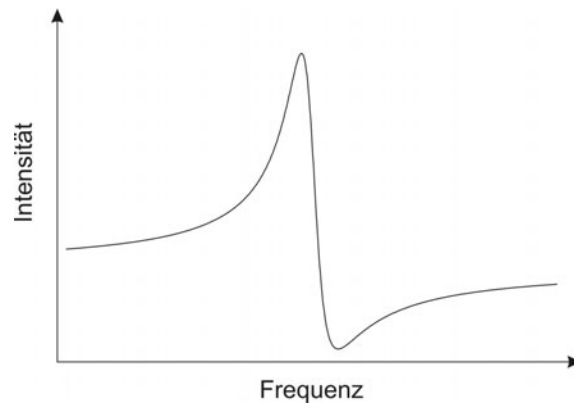
Im Jahr 2001 sind von der Gruppe um X. S. Xie zwei Verfahren zur Unterdrückung des nicht-resonanten Signals vorgestellt worden. Bei dem ersten Verfahren werden die beiden Anregungstrahlen unterschiedlich polarisiert [17]. Dieses Verfahren wurde schon früher in der CARS-Spektroskopie verwendet [18]. Es erfordert weiterhin, dass im Detektions-Strahlengang ein Analysator eingeführt wird. Da sich die Polarisation zwischen dem resonanten und dem nicht-resonanten Signal unterscheidet, kann der Analysator so eingestellt werden, dass das nicht-resonante Signal maximal unterdrückt wird. Als problematisch erweisen sich die benötigten Optiken, die durch Doppelbrechung die Polarisation verändern. Des Weiteren führt der Einsatz des Analysators zu einer Schwächung des detektierten Signals.

Das zweite Verfahren beruht auf einer geänderten Detektionsgeometrie. Normaler-

weise wird das CARS-Signal in Propagationsrichtung („vorwärts“) detektiert. Bei der so genannten epi-Detektion wird das Signal mit dem gleichen Objektiv, das für die Anregung benutzt wird, eingesammelt und somit entgegen der Propagationsrichtung („rückwärts“) detektiert [19]. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass das nicht-resonante Signal bevorzugt nach vorne propagiert und somit rückwärts ein besseres Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis erzielt werden kann. Der Nachteil liegt in dem allgemein niedrigen Signal, denn im Gegensatz zur Vorwärts-Detektion wird das Signal nicht durch konstruktive Interferenz verstärkt. Somit eignet sich diese Methode nur für Strukturen, die ungefähr die Größenordnung der Anregungswellenlänge besitzen. Zusätzlich ist diese Methode sinnvoll, wenn es die Beschaffenheit der Probe nicht zulässt, dass in Vorwärtsrichtung detektiert wird.

### 2.4.2. Detektion eines CARS-Spektrums

Der Verlauf eines CARS-Spektrums einer nicht-resonanten Probe (d.h. einer Probe, die keine Resonanzen in dem betreffenden spektralen Bereich aufweist) ist nur von der Intensität der eingestrahlten Laser abhängig. Tritt eine Resonanz auf, so wird das Signal verstärkt und man erhält einen Peak. Der typische Verlauf eines solchen Spektrums ist in Abbildung 2.6 dargestellt.

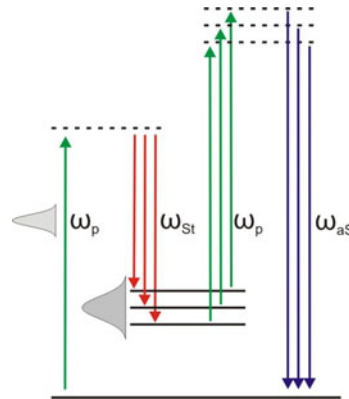


**Abbildung 2.6.:** Beispiel eines CARS-Spektrums. Dargestellt ist  $|\chi^{(3)}|^2$ .  $I_p$  und  $I_{St}$  werden als konstant angenommen.

Für eine solche Aufnahme benötigt man eine Anregung bei verschiedenen Wellenlängen, was mit zwei standardmäßigen ps- bzw. zwei fs-Lasern wie bereits oben erwähnt nicht praktikabel ist.

Eine Lösung dieses Problems ist die gleichzeitige Verwendung eines ps-Lasers und eines fs-Lasers. Diese Methode wird auch als Multiplex-CARS bezeichnet [20, 21]. Im

Detail wird als Pumplaser ein ps-Laser und als Stokes-Laser ein fs-Laser verwendet. Die spektrale Auflösung des erhaltenen CARS-Signals wird durch den Pumplaser definiert und die erhaltene Bandbreite durch den Stokes-Laser. Durch die wellenlängenselektive Detektion mittels eines Spektrometers und einer CCD-Kamera erhält man ein CARS-Spektrum, welches typischerweise  $300 \text{ cm}^{-1}$  breit ist und eine Auflösung von wenigen Wellenzahlen besitzt.



**Abbildung 2.7.:** Energieschema bei Multiplex-CARS. Die Anregung erfolgt mit einem spektral schmalen ps-Puls  $\omega_p$  und einem spektral breiten fs-Puls  $\omega_{St}$ . Das detektierte Signal  $\omega_{aS}$  beinhaltet dann mehrere spektrale Komponenten.

Ein Problem bei dieser Art von Anregung stellt die Synchronisation von den beiden Anregungslasern dar. Gibt es eine variable zeitliche Verschiebung zwischen den beiden Pulsen, so schwankt die detektierte Intensität und das Spektrum wird verfälscht. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass für eine einzelne CARS-Wellenlänge sehr wenig Intensität bei der Anregung zur Verfügung steht. Dadurch wird das detektierte Signal relativ schwach und man benötigt deutlich längere Integrationszeiten. Somit ist diese Methode für die Beobachtung von schnellen Vorgängen nicht geeignet.

Eine experimentelle Erweiterung stellt die Verwendung einer speziellen Faser (photonic crystal fiber) für die Erzeugung der spektral breiten Laserpulse dar [22, 23]. In die Glasfaser wird der gleiche Laser eingekoppelt, der später für die schmalbandige Anregung benutzt wird. Somit entfallen die Probleme mit der Synchronisation. Es können Bandbreiten von bis zu  $2500 \text{ cm}^{-1}$  Wellenzahlen erreicht werden. Allerdings ist das Spektrum der Faser nicht konstant und die erhaltene Intensität pro Wellenlänge recht niedrig.

Eine elegante Variante ist das Chirpen von Laserpulsen. Hierbei wird durch zeitliche Verschiebung zweier gechirpter Anregungspulse ein Spektrum abgefragt. Diese Vorgehensweise wird auch als spektral fokussierte CARS-Mikroskopie bezeichnet. Die Theorie zu dieser von unserer Gruppe entwickelten Methode [24, 25] wird in

Kapitel 2.5 näher erläutert.

### 2.4.3. Mischung von drei Anregungsstrahlen

Ein weiterer Ansatz besteht darin, außerhalb der Probe ein Referenzsignal zu generieren und mit dem eigentlichen Signal zu mischen. Diese Methode wird auch als Heterodyne-CARS („überlagertes“ CARS) bezeichnet [26, 27]. Das Referenzsignal  $E_{\text{LO}}$  wird außerhalb von der eigentlichen Probe in einer nicht-resonanten Substanz (eine Substanz, die bei der gegebenen Wellenlänge keine Resonanzen aufweist) erzeugt. Es ist vollkommen nicht-resonant und besitzt die gleiche Wellenlänge wie das in der Probe generierte anti-Stokes-Signal  $E_{\text{as}}$ . Mischt man nun dieses Signal mit dem in der eigentlichen Probe erzeugten Signal, so erhält man für das gesamte CARS-Signal  $S$  die folgende Gleichung.

$$S = |E_{\text{LO}}|^2 + |E_{\text{as}}|^2 + 2E_{\text{LO}}E_p^2E_{\text{St}} [(\chi_{nr}^{(3)} + \text{Re}(\chi_r^{(3)})) \cos \Phi + (\text{Im}(\chi_r^{(3)})) \sin \Phi]$$

$\Phi$  ist der Phasenunterschied zwischen  $E_{\text{LO}}$  und  $E_{\text{as}}$ . Der reelle und der imaginäre Teil des Signals besitzen unterschiedliche Abhängigkeiten von  $\Phi$ . Somit kann man durch Variation von  $\Phi$  entweder den reellen Teil ( $\Phi = 0$ ) oder den imaginären Teil ( $\Phi = 90$ ) detektieren. Jeweils vorausgesetzt, dass die beiden homodynen Terme  $|E_{\text{LO}}|^2$  und  $|E_{\text{as}}|^2$  vernachlässigbar klein sind. Da nur resonante Signale zum Term  $\text{Im}(\chi_r^{(3)}) \sin \Phi$  beitragen, kann bei  $\Phi = 90$  ein hintergrundfreies Signal detektiert werden. Des Weiteren kann von  $\text{Im}(\chi_r^{(3)})$  gemäß Gleichung 2.14 unter Vergleich mit der spontanen Raman-Spektroskopie auf die Anzahl der Streuer und somit auf lokale Konzentrationen geschlossen werden. Der Nachteil der Methode liegt darin, dass die Phase  $\Phi$  mittels eines Phasenmodulators eingestellt werden muss. Für die Detektion muss das Signal demoduliert werden. Dies führt zu längeren Aufnahmezeiten. Zusätzlich führen unterschiedliche Brechungsindices innerhalb verschiedener Regionen der Probe zu Bildartefakten in der Aufnahme [28].

Um diese Probleme zu umgehen, kann man das nicht-resonante Signal auch innerhalb der Probe erzeugen. Hierzu benötigt man zwei Pumpstrahlen  $\omega_{\text{p1}}$  und  $\omega_{\text{p2}}$ , die zusammen mit dem Stokes-Strahl  $\omega_{\text{St}}$  kombiniert werden. Die Energiedifferenz  $\omega_{\text{p1}} - \omega_{\text{St}}$  wird auf eine Resonanz eingestellt. Die Differenz  $\omega_{\text{p2}} - \omega_{\text{St}}$  wird in einen Bereich ohne Resonanzen eingestellt. Somit wird einerseits die Mischung aus dem resonanten und dem nicht-resonanten Signal,  $\omega_{\text{as1}}$  und andererseits das nicht-resonante Signal alleine,  $\omega_{\text{as2}}$  detektiert. Anschließend kann das nicht-resonante Signal abgezogen werden und man erhält ein vollkommen resonantes Signal.

Für die experimentelle Durchführung in der Mikroskopie gibt es zwei Ansätze. Einerseits das so genannte FM-CARS (Frequenz-Modulation-CARS) [28] und das von

unserer Gruppe vorgestellte dual-frequency CARS. Beim FM-CARS werden zwei verschiedene Laser benutzt, um die beiden Pumpstrahlen zu erzeugen. Diese werden unterschiedlich polarisiert und anschließend wird durch eine Pockels-Zelle entweder der eine oder der andere Strahl durchgelassen. Daraufhin wird dieser Strahl mit dem Stokes-Strahl kombiniert und auf die Probe fokussiert. Der Detektor zeichnet in Abhängigkeit von der Position der Pockels-Zelle  $\omega_{aS1}$  oder  $\omega_{aS2}$  auf. Der große Nachteil dieser Methode besteht darin, dass zwei verschiedene Laser zur Anregung benutzt werden. Diese müssen synchronisiert werden. Zusätzlich führen Schwankungen in der Intensität von einem Laser zur Verfälschung des Ergebnisses. Ein weiterer Nachteil ist, dass die beiden Signale nicht gleichzeitig detektiert werden können und die Aufnahme somit länger benötigt.

Diese Probleme werden durch unseren Ansatz vermieden. In Kapitel 2.6 wird näher auf die Theorie unserer Methode eingegangen.

## 2.5. Chirpen von Laserpulsen

### 2.5.1. Phasen- und Gruppengeschwindigkeit

Für das Verständnis des spektralen Fokussierens ist es notwendig, sich mit der Dispersion von Laserpulsen zu befassen. Hierzu geht man am besten ins Jahr 1853 zurück als J. B. L. Foucault feststellte, dass sich Licht in Wasser langsamer bewegt als die Lichtgeschwindigkeit. Dieser Versuch wurde lange Zeit als Beweis für die Welleneigenschaften des Lichtes angesehen. Als man später den Versuch von Foucault allerdings genau analysierte, stellte man fest, dass das Verhältnis der Lichtgeschwindigkeit  $c$  zur Fortpflanzungsgeschwindigkeit  $v$  nicht wie erwartet genau der Brechzahl  $n$  (häufig auch als Brechungsindex bezeichnet) entspricht. Der Unterschied zwischen der Brechzahlbestimmung und dem Versuch von Foucault besteht darin, dass bei letzterem mit einer Folge von Lichtpulsen gearbeitet wird und nicht mit kontinuierlicher Strahlung. Im Folgenden wird gezeigt, dass Lichtimpulse eine andere Ausbreitungsgeschwindigkeit besitzen als unendlich ausgedehnte Wellen.

Bei einem Lichtimpuls hat die Lichtwelle als elektromagnetische Welle einen Anfang und ein Ende. Sie stellt eine Wellengruppe dar, die sich mit der so genannten Gruppengeschwindigkeit  $v_g$  fortpflanzt. Bei einer unendlich langen Welle hingegen wird die Geschwindigkeit als Phasengeschwindigkeit  $v_p$  bezeichnet. Sie ist gegeben durch

$$v_p = \frac{c}{n}. \quad (2.19)$$

Die Gruppengeschwindigkeit wird als

$$v_g = \frac{\partial \omega}{\partial k} \quad (2.20)$$

definiert. Hierbei ist  $\omega$  die Kreisfrequenz  $\omega = 2\pi\nu$  und  $k$  der Betrag des Wellenvektors  $\vec{k}$ .  $k$  wird auch als Kreiswellenzahl bezeichnet und hängt von der Wellenlänge ab  $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ .

Um eine Beziehung zwischen  $v_p$  und  $v_g$  herzustellen, drückt man  $v_p$  als  $v_p = \frac{\omega}{k}$  aus, löst nach  $\omega$  auf und setzt in die Gleichung 2.20 ein. Es ergibt sich dann

$$v_g = v_p k \frac{\partial}{\partial k} = v_p + k \frac{\partial v_p}{\partial k}.$$

Unter Anwendung der Kettenregel

$$\frac{\partial}{\partial k} = \frac{\partial}{\partial \lambda} \frac{\partial \lambda}{\partial k} = \frac{\partial}{\partial \lambda} \frac{\partial \frac{2\pi}{k}}{\partial k} = \frac{\partial}{\partial \lambda} \frac{-2\pi}{k^2}$$

erhält man die fundamentale Beziehung (Lord Rayleigh 1881)

$$v_g = v_p - \lambda \frac{\partial v_p}{\partial \lambda}. \quad (2.21)$$

Aus dieser Gleichung lässt sich ableiten, dass die beiden Geschwindigkeiten dann verschieden sind, wenn die Fortpflanzungsgeschwindigkeit der Welle von der Wellenlänge abhängig ist ( $\frac{\partial v_p}{\partial \lambda} \neq 0$ ).

Dies ist außerhalb des Vakuums immer der Fall und führt somit in einem Medium zu einer Verzögerung der Pulslaufzeit  $t_g$  proportional zur Laufstrecke  $z$ .

$$t_g = \frac{z}{v_g} \quad (2.22)$$

Die Gruppengeschwindigkeit stellt also die Geschwindigkeit dar, mit der Energie bzw. Information in Form von Lichtpulsen durch den Raum transportiert wird.

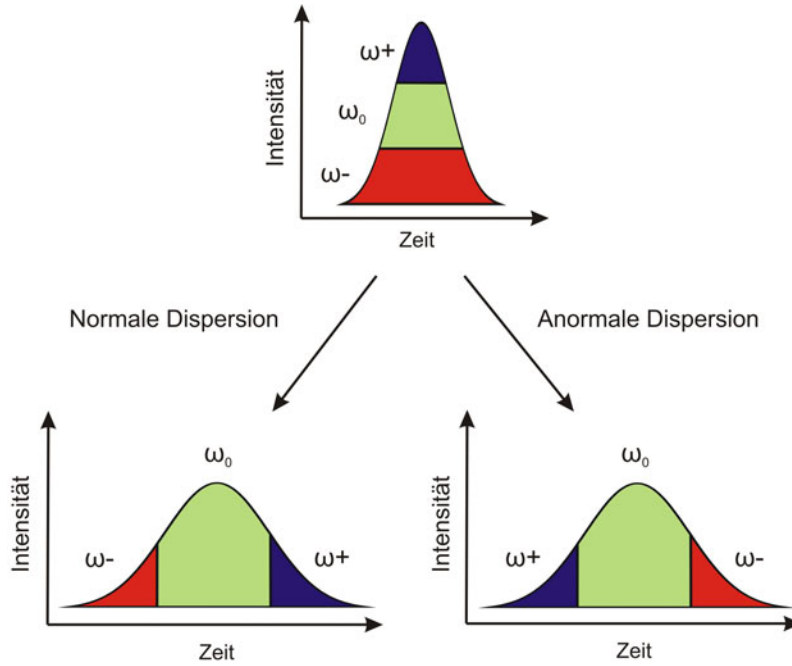
Zusätzlich beeinflusst bei kurzen Pulsen die Frequenzabhängigkeit der Gruppengeschwindigkeit die Pulsausbreitung entscheidend, da diese eine große spektrale Bandbreite (siehe unten) aufweisen. Die Pulsausbreitung wird - ausgehend von Gleichung 2.22 - als Änderung der Pulslaufzeit pro Strecke in Abhängigkeit von der Frequenz spezifiziert.

$$D_\nu(\omega) = \frac{\partial}{\partial \omega} \left( \frac{1}{v_g} \right) = \frac{\partial^2 k}{\partial \omega^2} \quad (2.23)$$

$D_\nu(\omega)$  wird als die Gruppengeschwindigkeitsdispersion (GVD) bezeichnet. Ihre Bedeutung wird nun näher erläutert.

### 2.5.2. Gruppengeschwindigkeitsdispersion

Betrachtet man einen Laserpuls, so besteht er aus verschiedenen Frequenzkomponenten mit jeweils eigenen Phasengeschwindigkeiten. Normalerweise bezieht man in einem solchen Fall die Phasengeschwindigkeit auf die Zentralfrequenz. Die Gruppengeschwindigkeit beschreibt die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Einhüllenden. Außerhalb des Vakuums ist diese aber abhängig von der Wellenlänge. Bei normaler Dispersion gilt  $\frac{\partial v_p}{\partial \lambda} > 0$  und die hohen Frequenzanteile sind langsamer als die niedrigen. Bei einer anormalen Dispersion ( $\frac{\partial v_p}{\partial \lambda} < 0$ ) gilt das Gegenteil. Fasst man nun benachbarte Frequenzen zu Gruppen zusammen, dann besitzt jede dieser Gruppen eine eigene Gruppengeschwindigkeit und wird unterschiedlich stark verzögert. Dies führt zu einer Verbreiterung des Laserpulses, deren Maß durch die GVD beschrieben wird. Dieser Sachverhalt wird in Abbildung 2.8 verdeutlicht. Dort besitzt der ursprüngliche Puls keine Dispersion, hat also die kürzeste Pulsdauer  $\tau_0$ , die er für seine spektrale Breite erreichen kann. Man nennt einen solchen Puls (Fourier-)transformlimitiert. In Folge der Dispersion bewegen sich die unterschiedlichen Frequenzkomponenten mit einer jeweils anderen Geschwindigkeit. Dies führt nach einer Strecke  $z$  zu einer



**Abbildung 2.8.:** Auswirkung der Dispersion. Oben ist ein transformlimitierter Laserpuls dargestellt. Alle Frequenzkomponenten sind gleichzeitig vorhanden. Bei einer normalen Dispersion laufen die hohen Frequenzen den niedrigen hinterher (links unten). Bei einer anomalen Dispersion ist es umgekehrt (rechts unten).

Verlängerung des Pulses. Diese Verlängerung kann mit Hilfe von

$$\tau(z) = \tau_0 \sqrt{1 + \frac{D_\nu^2 z^2 (4 \ln 2)^2}{\tau_0^4}} \quad (2.24)$$

berechnet werden [29]. Betrachtet man nun die Laufstrecke, die benötigt wird, damit der Puls um den Faktor  $\sqrt{2}$  verlängert wird (diese Strecke wird auch als Dispersionslänge  $L_D$  bezeichnet), so ergibt sich aus Gleichung 2.24

$$\tau(z) = \tau_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z}{L_D}\right)^2}. \quad (2.25)$$

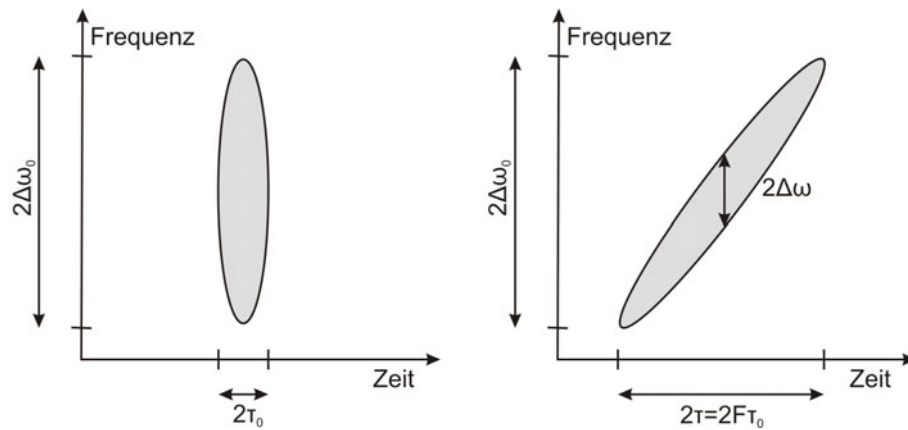
Der Ausdruck  $\sqrt{1 + \left(\frac{z}{L_D}\right)^2}$  wird zur Abkürzung als Streckungsfaktor  $F$  definiert. Um sich die Auswirkungen der GVD besser veranschaulichen zu können, betrachten wir einen GaAs-Diodenlaser (Pulslänge 10 ps) und einen Ti-Saphir-Laser (Pulslänge 100 fs) jeweils bei einer Wellenlänge von 850 nm. Lässt man beide Laser durch BK7-Glas laufen, so werden die Pulse dispergiert. Zum Vergleich betrachtet man die Dispersionslänge  $L_D$ . Für den GaAs-Diodenlaser ergibt sich  $L_D = 1$  m und für den



Ti-Saphir-Laser  $L_D = 100 \mu\text{m}$  [29]. Es zeigt sich somit deutlich, dass ein zeitlich kurzer Puls mit entsprechend großer Bandbreite im Vergleich zu einem zeitlich langen Puls innerhalb einer kurzen Strecke sehr stark dispergiert.

### 2.5.3. Chirpfaktor

Eine Möglichkeit der Darstellung von Laserpulsen ist das so genannte Spektrogramm (Abbildung 2.9). Hierbei wird auf der x-Achse die Zeit und auf der y-Achse die Frequenz aufgetragen. Zur besseren Veranschaulichung wird die Intensität des Laserpulses konstant gesetzt. Der Laserpuls entspricht dann in der Darstellung einer Ellipse.



**Abbildung 2.9.:** Das Spektrogramm eines Laserpulses. Links ein transformlimitierter Laserpuls und rechts ein gechirpter Laserpuls.  $\Delta\omega_0$ ,  $\tau_0$ : spektrale Bandbreite bzw. Pulsdauer des transformlimitierten Pulses; F: Streckungsfaktor;  $\Delta\omega$ : momentane Bandbreite.

Die spektrale Bandbreite des transformlimitierten Laserpulses wird als die Halbwertsbreite der Intensität in Abhängigkeit von der Kreisfrequenz definiert und mit  $\Delta\omega_0$  bezeichnet. Die Pulsdauer des transformlimitierten Pulses wird als die Halbwertsbreite der Intensität in Abhängigkeit von der Zeit definiert und mit  $\tau_0$  bezeichnet. Es gilt dann die folgende Beziehung [30]

$$\Delta\omega_0 = \frac{4 \ln 2}{\tau_0} \quad (2.26)$$

beziehungsweise für die Frequenz  $f = \frac{\omega}{2\pi}$

$$\Delta f_0 = \left( \frac{2 \ln 2}{\pi} \right) \frac{1}{\tau_0}. \quad (2.27)$$

Erfährt der Laserpuls eine GVD, so variiert die Frequenz mit der Zeit im linearen Fall gemäß  $\omega(t) = \omega_0 + k_{\text{Chirp}}t$ .  $k_{\text{Chirp}}$  wird als Chirpfaktor bezeichnet. Diese Bezeichnung leitet sich aus der Akustik ab, genauer vom englischen Wort *chirp* für zwitschern (Anstieg der Frequenz mit der Zeit). Üblich ist auch die Bezeichnung *gechirpter Laserpuls* für einen Laserpuls, der eine GVD erfahren hat. Man unterscheidet zwischen einem positiven Chirp ( $k_{\text{Chirp}} > 0$  bzw. ansteigende Frequenz) und einem negativen Chirp ( $k_{\text{Chirp}} < 0$  bzw. fallende Frequenz).

Betrachtet man das rechte Spektrogramm in Abbildung 2.9 genauer, so stellt man fest, dass zu einem bestimmten Zeitpunkt  $t$  die momentane Bandbreite  $\Delta\omega$  um vieles geringer ist als im fouriertransformierten Fall. Man kann herleiten, dass die Verschmälerung der momentanen Bandbreite genauso skaliert wie die Verlängerung der Pulsdauer [30].

$$\Delta\omega = \frac{\Delta\omega_0}{F} \Leftrightarrow \tau = F\tau_0 \quad (2.28)$$

Aus Gleichung 2.26 und Gleichung 2.28 ergibt sich für die absolute momentane Bandbreite

$$\Delta\omega = \frac{4 \ln 2}{\tau}. \quad (2.29)$$

Dieses Ergebnis bedeutet, dass es für den *Absolutwert* der momentanen Bandbreite unerheblich ist, wie stark der Puls gestreckt wurde bzw. welche Bandbreite er davor besaß. Es herrschen die gleichen Beziehungen zwischen (momentaner) Bandbreite und Pulsdauer wie bei einem transformlimitierten Puls.

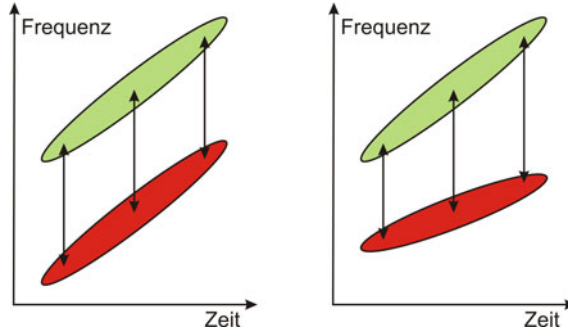
#### 2.5.4. Anregung mit zwei gechirpten Laserpulsen

Überlappt man zwei Laserpulse mit der zentralen Wellenlänge  $\omega_1$  bzw.  $\omega_2$  und mit der Bandbreite  $\Delta\omega_1$  bzw.  $\Delta\omega_2$  zeitlich und räumlich, so haben diese für eine zwei-Photonen-Anregung die spektrale Auflösung

$$\Delta\omega = \sqrt{\Delta\omega_1^2 + \Delta\omega_2^2}. \quad (2.30)$$

Verwendet man zwei gechirpte Laserpulse, so haben diese eine momentane Bandbreite von  $\Delta\omega_{\text{Chirp},1} = \frac{\Delta\omega_1}{F_1}$  bzw.  $\Delta\omega_{\text{Chirp},2} = \frac{\Delta\omega_2}{F_2}$ . Für die spektrale Auflösung ergibt sich dann

$$\Delta\omega_{\text{Chirp}} = \sqrt{\Delta\omega_{\text{Chirp},1}^2 + \Delta\omega_{\text{Chirp},2}^2} = \sqrt{\left(\frac{\Delta\omega_1}{F_1}\right)^2 + \left(\frac{\Delta\omega_2}{F_2}\right)^2}. \quad (2.31)$$



**Abbildung 2.10.:** Differenz der Anregungswellenlängen in Abhängigkeit von der Zeit. Links bei gleichen Chirpparametern, rechts bei unterschiedlichen Chirpparametern.

Nimmt man  $F_1 = F_2 = F$  an, so ergibt sich die relative Vergrößerung der Auflösung zu  $\Delta\omega_{\text{Chirp}} = \frac{\Delta\omega}{F}$ .

Die bisherige Betrachtung gilt nur für einen einzelnen Zeitpunkt. Um die Informationen für alle Zeitpunkte zu erhalten, muss man den Chirpparameter  $k_{\text{Chirp}}$  näher betrachten. Ist dieser für beide Laserpulse nicht gleich, so ist die Differenz der beiden momentanen Wellenlängen zu jedem Zeitpunkt  $t$  unterschiedlich  $\omega_1(t) - \omega_2(t) = \omega_{0,1} - \omega_{0,2} + t(k_{\text{Chirp},1} - k_{\text{Chirp},2})$ . Dies führt zu einem breiteren Anregungsprofil und ist nicht erwünscht (siehe Abbildung 2.10).

Es ist daher von großer Bedeutung, dass beide Chirpparameter gleich sind, denn dann gilt  $\omega_1(t) - \omega_2(t) = \omega_{0,1} - \omega_{0,2}$  und die Differenz der momentanen Frequenzen ist über die gesamte Pulsdauer konstant.

Für die Berechnung des Chirpparameters bedarf es einer erweiterten Herleitung [29], auf die hier verzichtet wird. Das Ergebnis der Herleitung lautet

$$k_{\text{Chirp}} = \frac{z}{L_D} \frac{1}{1 + \frac{z^2}{L_D^2}} \frac{2}{\tau_0^2} \quad (2.32)$$

Um diese Gleichung zu vereinfachen, wird der Streckungsfaktor  $F$  eingesetzt.

$$k_{\text{Chirp}} = 2 \frac{\sqrt{F^2 - 1}}{\tau_0^2 F^2}$$

Für große Streckungsfaktoren kann diese Gleichung weiter vereinfacht werden.

$$k_{\text{Chirp}} \approx \frac{2}{\tau_0^2 F} = \frac{2}{\tau_0 \tau} \quad (2.33)$$

Soll nun  $k_{\text{Chirp},1} = k_{\text{Chirp},2}$  gelten, so muss die folgende Relation erfüllt sein:

$$\frac{\tau_1}{\tau_2} = \frac{\tau_{0,2}}{\tau_{0,1}} \quad (2.34)$$

Ist diese Relation erfüllt, dann ist die Differenz der beiden Wellenlängen über die gesamte Pulsbreite konstant und man erhält ein schmales Anregungsprofil. Des Weiteren ist die spektrale Auflösung größer als die der ungechirpten Pulse.

Bis jetzt ist immer davon ausgegangen worden, dass beide Pulse zu dem gleichen Zeitpunkt eintreffen. Somit entspricht die Frequenzdifferenz der Differenz der beiden Zentralwellenlängen.

$$\omega_{\text{Diff}} = \omega_1 - \omega_2$$

Verschiebt man die Pulse um die Zeit  $\Delta t$  zeitlich auseinander, so ändert sich die Frequenzdifferenz.

$$\omega_{\text{Diff}} = \omega_1 - \omega_2 + k_{\text{Chirp}} \Delta t \quad (2.35)$$

Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 2.11 veranschaulicht.

Eine zeitliche Verschiebung der beiden Laserpulse ist der Aufnahme eines Spektrums von  $\omega_{\text{Diff}}$  gleichzusetzen. Dies wird auch als Kreuzkorrelation bezeichnet. Gemäß Gleichung 2.35 gibt es eine lineare Beziehung zwischen  $\omega_{\text{Diff}}$  und der zeitlichen Verschiebung  $\Delta t$ . Möchte man die zeitliche Verschiebung in eine Frequenz umrechnen, so benötigt man den Chirpparameter  $k_{\text{Chirp}}$  oder mindestens ein bekanntes Wertepaar  $(\omega_{\text{Diff}}, \Delta t)$ . Wie später gezeigt wird, kann letzteres durch Messung eines Stoffes mit einem bekannten Spektrum ermittelt werden.

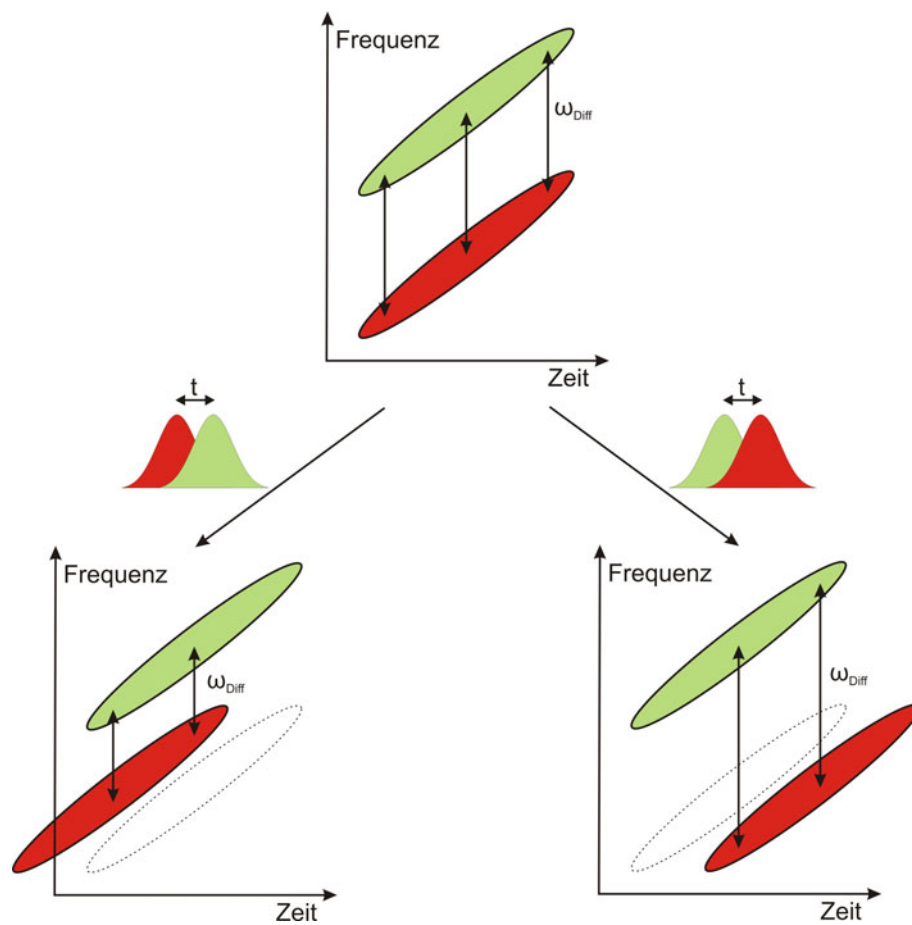


Abbildung 2.11.: Eine zeitliche Verschiebung  $\Delta t$  der Laserpulse verursacht eine Veränderung der Frequenzdifferenz  $\omega_{\text{Diff}}$ .

## 2.6. CARS mit Zweifachanregung (dual-pump CARS)

Wie bereits in Abschnitt 2.4.3 erwähnt, benötigt man für dual-pump CARS zwei verschiedene Pumpstrahlen  $\omega_{p1}$  und  $\omega_{p2}$ . Die Differenz  $\omega_{p1} - \omega_{St}$  wird genau auf die Resonanzfrequenz  $\omega_{vib}$  eingestellt. Ist diese Bedingung erfüllt, gilt für die Verschiebung  $\delta = \omega_{vib} - (\omega_{p1} - \omega_{St}) = 0$  und folglich gemäß Gleichung 2.13  $\text{Re}(\chi_r) = 0$ . Gleichung 2.11 vereinfacht sich dann zu

$$I_{\text{CARS},\delta=0}(\omega_{aS1}) \propto (\chi_{nr}^{(3)})^2 + \text{Im}(\chi_r)^2. \quad (2.36)$$

$\omega_{aS1}$  ist die Wellenlänge des detektierten Anti-Stokes-Signals  $\omega_{aS1} = 2\omega_{p1} - \omega_{St}$ . Der Mischterm aus  $\text{Re}(\chi_r)$  und  $\chi_{nr}^{(3)}$  kann somit vernachlässigt werden.

Die Differenz  $\omega_{p2} - \omega_{St}$  wird so eingestellt, dass sie einem Bereich ohne resonante Schwingungen entspricht. Die Intensität bei der Wellenlänge  $\omega_{aS2} = 2\omega_{p2} - \omega_{St}$  ist dann direkt proportional zum Quadrat der nicht-resonanten Suszeptibilität.

$$I_{\text{CARS},nr}(\omega_{aS2}) \propto (\chi_{nr}^{(3)})^2 \quad (2.37)$$

Um ein vollständig resonantes Signal zu erhalten, muss man nun die beiden Intensitäten voneinander abziehen.

$$I_{\text{CARS},\text{resonant}} = I_{\text{CARS},\delta=0}(\omega_{aS1}) - I_{\text{CARS},nr}(\omega_{aS2}) \propto \text{Im}(\chi_r)^2 \quad (2.38)$$

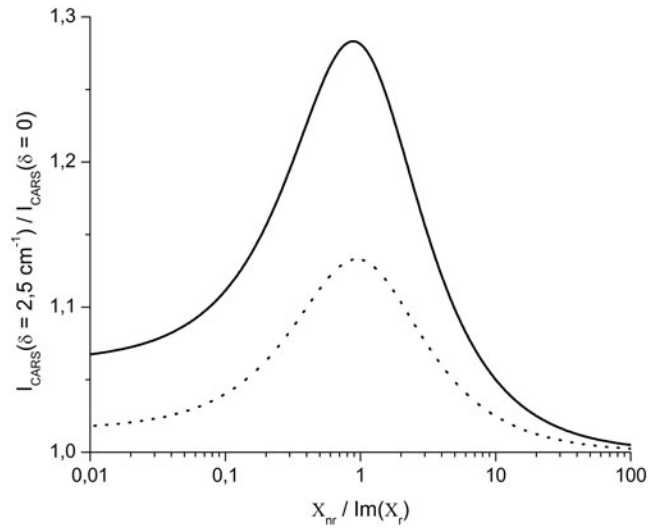
Die obige Herleitung ist strikt gesehen nur dann gültig, wenn die Differenz  $\omega_{p1} - \omega_{St}$  genau auf die Resonanzfrequenz  $\omega_{vib}$  eingestellt wird. Um zu untersuchen, was passiert, wenn dies nicht der Fall ist, muss man von Gleichung 2.11 ausgehen und die Ausdrücke für den Real- und Imaginärteil berücksichtigen.

$$\begin{aligned} I_{\text{CARS}} &\propto (\chi_{nr}^{(3)})^2 + 2\chi_{nr}^{(3)}\text{Re}(\chi_r) + \text{Re}(\chi_r)^2 + \text{Im}(\chi_r)^2 \\ \text{Re}(\chi_r) &= \frac{nA_R\delta}{\delta^2 + \Gamma^2} \\ \text{Im}(\chi_r) &= \frac{nA_R\Gamma}{\delta^2 + \Gamma^2} \end{aligned}$$

Genau bei der Resonanzfrequenz beträgt die Verschiebung  $\delta$  Null. Der Realteil verschwindet und es gilt die obige Ableitung. Wenn  $\delta$  ungleich Null ist, beträgt das Verhältnis zwischen Real- und Imaginärteil:

$$\frac{\text{Re}(\chi_r)}{\text{Im}(\chi_r)} = \frac{\delta}{\Gamma}. \quad (2.39)$$

Für  $\delta$  kann man einen Wert von ungefähr  $2,5 \text{ cm}^{-1}$  annehmen (dies entspricht ungefähr einer Ungenauigkeit in der Bestimmung der jeweiligen Anregungswellenlänge



**Abbildung 2.12.:** Das Verhältnis zwischen der CARS-Intensität  $I_{\text{CARS}, \delta=2,5 \text{ cm}^{-1}}$  und  $I_{\text{CARS}, \delta=0}$  in Abhängigkeit vom Verhältnis zwischen  $\chi_{\text{nr}}^{(3)}$  und  $\text{Im}(\chi_r)$ .  $\Gamma = 10 \text{ cm}^{-1}$  (durchgezogene Linie) und  $\Gamma = 20 \text{ cm}^{-1}$  (gestrichelte Linie). Die x-Achse ist logarithmisch skaliert.

von 0,1 nm). Betrachtet wird nun das Verhältnis zwischen der CARS-Intensität  $I_{\text{CARS}, \delta=2,5 \text{ cm}^{-1}}$  und  $I_{\text{CARS}, \delta=0}$  in Abhängigkeit vom Verhältnis zwischen  $\chi_{\text{nr}}^{(3)}$  und  $\text{Im}(\chi_r)$ . Diese Beziehung ist für verschiedene  $\Gamma$  in Abbildung 2.12 dargestellt. Die Abweichung beträgt maximal 28 % bzw. 13%. Somit kann in guter Näherung Gleichung 2.38 verwendet werden.





## 3. Aufbau des Experiments

Wie in Abschnitt 2.3 erwähnt, werden für die Durchführung des CARS Experiments Laserstrahlen zweier verschiedener Wellenlängen  $\omega_p$  und  $\omega_{st}$  benötigt. Zusätzlich ist es wünschenswert, dass die Differenz  $\omega_p - \omega_{st}$  variiert werden kann und somit verschiedene Bereiche des Spektrums abgefragt werden können. Möchte man eine zweifache Anregung (Abschnitt 2.6) erreichen, benötigt man einen zusätzlichen Laserstrahl der Wellenlänge  $\omega_{p2}$ . Für das aus Abschnitt 2.5 bekannte Chirpen von Laserpulsen wird ein anderer Aufbau benötigt. Um Proben untersuchen zu können, wird ein Mikroskop verwendet. Das resultierende CARS Signal  $\omega_{aS}$  wird mittels Detektoren erfasst und in Form von elektrischem Strom an den Computer weitergeleitet. Dort entsteht dann das eigentliche Abbild der Probe. Die dazu nötigen einzelnen Komponenten des Aufbaus werden in den folgenden Unterabschnitten beschrieben. Hierbei wird zwischen einem Aufbau zur spektral fokussierten CARS-Mikroskopie und einem Aufbau zur CARS-Mikroskopie mit Zweifachanregung (dual-pump CARS) unterschieden. In einem weiteren Abschnitt werden die Unterschiede zwischen den beiden Aufbauten zusammengefasst.

### 3.1. Lasersystem und Aufbau zur spektral fokussierten CARS-Mikroskopie

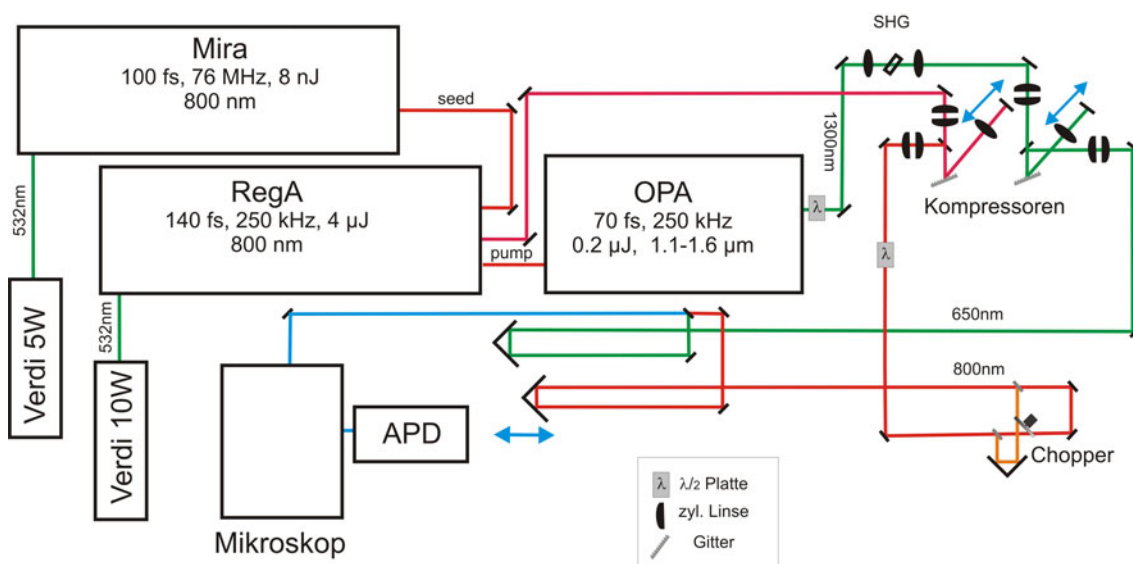
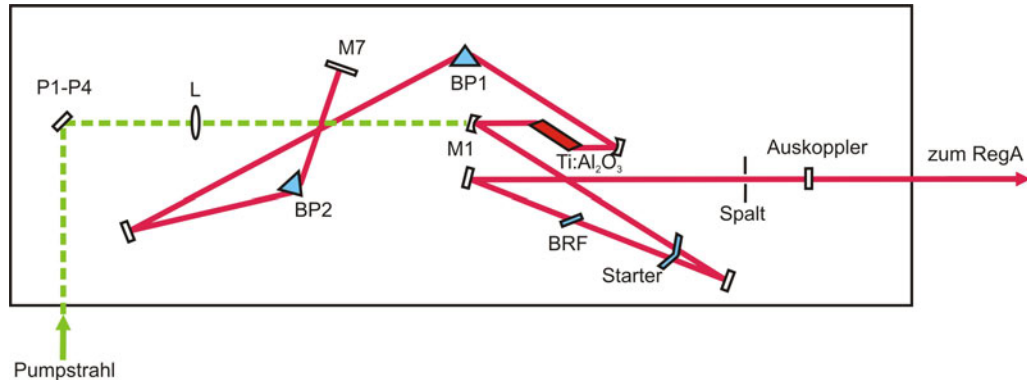


Abbildung 3.1.: Schematische Darstellung des Aufbaus zur spektral fokussierten CARS-Mikroskopie.

#### 3.1.1. Femtosekunden-Oszillator Mira

Zur Erzeugung der benötigten Femtosekunden-Laserpulse wird der Ti-Saphir-Oszillator *Mira Model 900-F* der Firma Coherent verwendet. Das Kernstück des Lasers, auch als Lasermedium bezeichnet, ist ein Titan dotierter Aluminiumoxid-Kristall ( $\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$ ). Diese Verbindung wird auch als Titan-Saphir bezeichnet. Sie besteht aus dem Wirtskristall Korund ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), bei dem durch Dotierung einige hundertstel bis zehntel Gewichtsprozent der  $\text{Al}^{3+}$ -Ionen durch  $\text{Ti}^{3+}$ -Ionen ersetzt worden sind. Durch die Dotierung erhält man ein laseraktives Festkörpermateriale mit einer sehr breiten Fluoreszenzbande (Verstärkungsbereich) von 670 bis 1070 nm bei einem Maximum um 800 nm und einem großen Absorptionsquerschnitt mit einem Maximum bei 490 nm. Zudem besitzt Titan-Saphir eine hohe Wärmeleitfähigkeit, die eine Fokussierung des Pumpstrahls auf einen sehr kleinen Bereich ermöglicht, ohne den Kristall dabei zu zerstören.

Als Pumpquelle dient ein Festkörper-Laser (Coherent Verdi V5), der als Lasermedium einen Neodym-Yttriumvanadat-Kristall ( $\text{Nd:YVO}_4$ ) besitzt. Das emittierte Laserlicht besitzt eine Wellenlänge von 1064 nm. Durch „Intra-cavity“-Frequenzverdopplung in einem LBO (Lithiumtriborat,  $\text{LiB}_3\text{O}_5$ ) Kristall erhält man

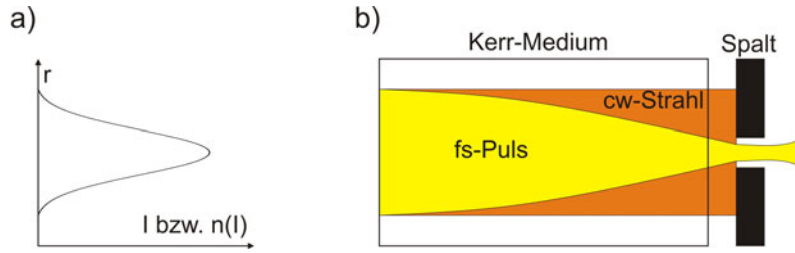


**Abbildung 3.2.:** Schematische Darstellung des Femtosekundenoszillators Mira. BP1, BP2: Prismen; BRF: Birefringent Filter; M1, M7: Spiegel; P1-P4: Periskopspiegel.

grünes Laserlicht von 532 nm Wellenlänge bei einer Leistung von 5 W. Dieser Laser wird seinerseits von einem Diodenlaser gepumpt, der aus mehreren einzelnen Dioden besteht.

Der grüne Pumpstrahl wird über ein Spiegelperiskop, bestehend aus vier Spiegeln (P1-P4) umgelenkt. Danach wird er durch eine Linse (L) in den Titan-Saphir-Kristall fokussiert. Zuvor passiert er einen für grünes Licht durchlässigen Spiegel (M1). Das im Titan-Saphir erzeugte Laserlicht kann nun in zwei Richtungen - die zwei Äste des Lasers - laufen. Auf einem Ast befindet sich die Prismenkompressionsstrecke. Diese besteht aus zwei in den Strahlengang eingesetzte Prismen (BP1, BP2), gefolgt vom Endspiegel (M7). Weil Licht kleiner Wellenlänge einen höheren Brechungsindex und damit eine kleinere Ausbreitungsgeschwindigkeit hat als Licht großer Wellenlänge (siehe Abschnitt 2.5.2), erfährt es beim mehrfachen Durchlaufen des Lasermediums einen Zeitversatz. Es entsteht ein positiver Chirp ( $k_{\text{Chirp}} > 0$ , siehe Abschnitt 2.5.3): blaues Licht kommt zeitlich versetzt nach rotem Licht. Zugleich verbreitert sich der Puls von 100 fs auf bis zu 1 ps. In der Prismenkompressionsstrecke wird dem entgegengewirkt, indem rotes Licht eine längere Wegstrecke zurücklegen muss als blaues und somit der Zeitversatz kompensiert und der Laserpuls zeitlich kurz gehalten wird. Zur optimalen Kompensation kann eines der Prismen (BP2) im Strahlengang verschoben werden. Durch den Endspiegel (M7) werden die beiden Prismen verdoppelt, so dass die Prismenkompressionsstrecke letztendlich vier Prismen enthält. Dies dient dazu, dass nicht nur der zeitliche Versatz, sondern auch der räumliche Versatz des Lichts ausgeglichen wird. Der Endspiegel (M7) ist ebenfalls horizontal und vertikal verstellbar. Mit ihm kann der Durchtritt des Laserstrahls durch das Lasermedium justiert werden.

Der andere Ast des Lasers enthält zunächst den so genannten *Starter*. Dies sind zwei auf einem Vibrationsmotor angebrachte Glasscheiben, durch die der Laser-



**Abbildung 3.3.:** a) Die Intensität  $I$  bzw. der Brechungsindex  $n$  eines gaußförmigen Laserstrahls in Abhängigkeit vom Strahldurchmesser  $r$ . b) Durchgang durch ein Kerr-Medium. Der gepulste Laserstrahl (gelb) wird fokussiert. Der cw-Laserstrahl (orange) wird nicht fokussiert und somit vom nachfolgenden Spalt blockiert.

strahl zweimal hindurchläuft. Registriert die Elektronik einen zu hohen Anteil an cw-Laserlicht, so wird durch Einschalten eines Vibrationsmotors eine Intensitätsschwankung (Fluktuation) erzeugt und dadurch die Modenkopplung induziert. Nach dem Starter befindet sich im Strahlengang der so genannte *Birefringent filter* (BRF). Er dient zum Herausfiltern eines Frequenzbandes aus dem zur Verfügung stehenden Verstärkungsbereich des Lasermediums. Der Effekt beruht auf Interferenz des Lichts im Etalon. Durch Kippen des Etalons im Strahlengang verändert sich die Laufstrecke des Lichts und dadurch der Frequenzbereich. Die Breite des Frequenzbandes bleibt dabei weitestgehend konstant. Als weiteres Element befindet sich der Spalt im Strahlengang. Er dient zur Unterdrückung der cw-Mode. Dies erfolgt über den so genannten optischen Kerr-Effekt (1875 von dem schottischen Physiker J. Kerr (1824-1907) entdeckt [31]). Dieser besagt, dass der Brechungsindex von der Intensität abhängt.

$$n(I) = n_1 + n_2 I \quad (3.1)$$

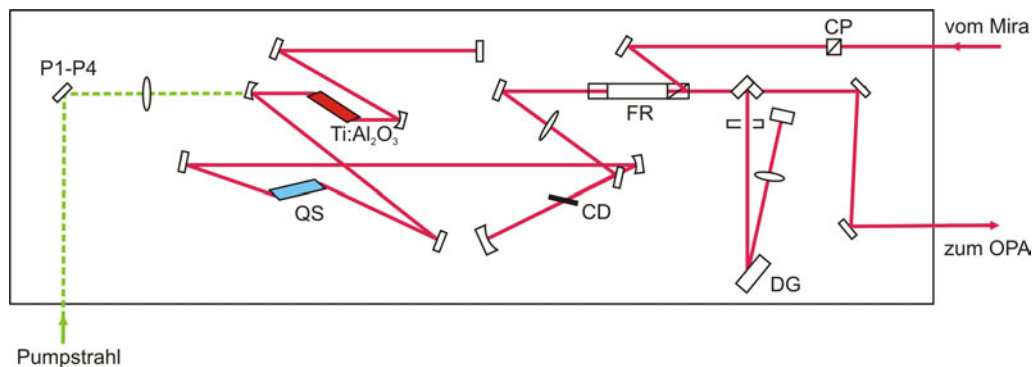
Typische Werte für  $n_2$  sind zwar niedrig (ca.  $10^{-15} \text{ cm}^2/\text{W}$  in Glas [29]), aber bei hohen Leistungsdichten ist der Effekt deutlich zu beobachten. Bei gaußförmigen Laserpulsen ist die Intensität im Zentrum des Laserstrahls am stärksten (siehe Abbildung 3.3 a). Beim Durchlaufen eines Mediums mit  $n_2 > 0$  (in diesem Fall der Titan-Saphir-Kristall) werden die intensitätsschwächeren Laserstrahlen zum Zentrum hin gebrochen und der Laserpuls erfährt eine Selbstfokussierung [32]. Dieser Effekt tritt beim cw-Licht wegen der niedrigeren Intensität nicht signifikant in Erscheinung. Das cw-Licht wird nicht fokussiert. Durch einen Spalt lässt es sich somit effizient unterdrücken (siehe Abbildung 3.3 b).

Das letzte Element dieses Astes ist der zweite Endspiegel („Output coupler“). Er ist nicht zu 100% verspiegelt und dient zum Auskoppeln des erzeugten Laserlichts. Pro Durchgang wird hier etwa 1% Licht ausgekoppelt. Die gesamte Resonator-Länge  $L$  von Endspiegel zu Endspiegel beträgt etwa 2 m. Daraus ergibt sich gemäß  $R = c/2L$

eine Repetitionsrate  $R$  von 76 MHz bei einer mittleren Wellenlänge von  $800 \pm 6$  nm. Die spektrale Breite des ausgekoppelten Laserpulses beträgt 5,6 THz bzw.  $187 \text{ cm}^{-1}$  und die Ausgangsleistung etwa 600 mW.

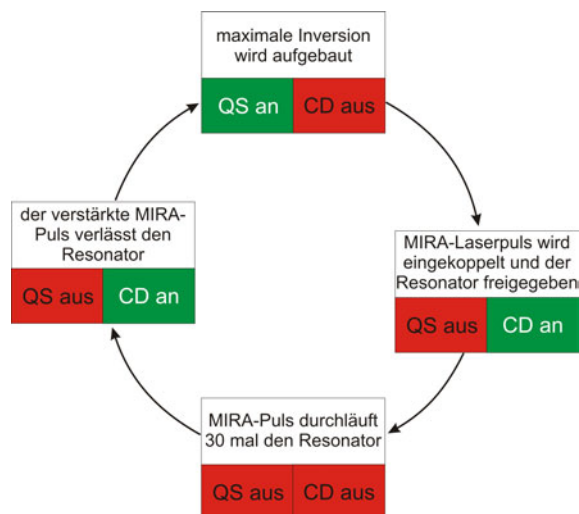
Die Energie der aus dem Mira ausgekoppelten Pulse liegt jeweils bei nur wenigen Nanojoule ( $\sim 8 \text{ nJ}$ ) pro Puls. Um allerdings eine Wellenlängenkonvertierung im nachfolgenden optisch parametrischen Verstärker (OPA) durchführen zu können, braucht man höhere Energien. Deswegen wird der aus dem MIRA ausgekoppelte Laserstrahl zur Nachverstärkung in den Verstärker *RegA* der Firma Coherent eingekoppelt. Dadurch wird zwar die Anzahl der Pulse pro Sekunde gesenkt (von 76 MHz auf 250 kHz), aber ihre Energie steigt auf  $4,4 \mu\text{J}$  pro Puls.

### 3.1.2. Verstärker RegA



**Abbildung 3.4.:** Schematische Darstellung des Verstärkers RegA. CD: Cavity Dumper; CP: Polarisator; DG: Beugungsgitter; FR: Faraday Rotator; P1-P4: Periskopspiegel; QS: Q-Switch.

Der RegA besitzt als Lasermedium ebenfalls einen Titan-Saphir-Kristall, welcher von einem 10 W Nd:YVO<sub>4</sub> Laser gepumpt wird. Im Resonator befindet sich ein akusto-optischer Modulator, der als Q-Switch (QS) bezeichnet wird. Dieser besteht aus einem Piezokristall, auf dem ein TeO<sub>2</sub> Kristall befestigt ist. Wird am Piezokristall eine hochfrequente Wechselspannung angelegt, wird dieser in Schwingung versetzt und dadurch Schallwellen im TeO<sub>2</sub> Kristall erzeugt. Im Kristall bauen die Schallwellen ein Beugungsgitter auf (Braggmedium). Somit werden im eingeschalteten Zustand Lichtstrahlen gebeugt und es kann sich keine oszillierende Welle im Resonator aufbauen. Dieser Umstand dient dazu, zunächst die maximale Inversion aufzubauen. Erst dann wird der QS ausgeschaltet und der eingekoppelte MIRA Puls kann verstärkt werden. Sobald der verstärkte Puls ausgekoppelt ist, wird der Q-Switch wieder eingeschaltet und erneut die Inversion aufgebaut. Die zweite Aufgabe des QS besteht darin, dass dessen TeO<sub>2</sub> Kristall eine hohe GVD aufweist und



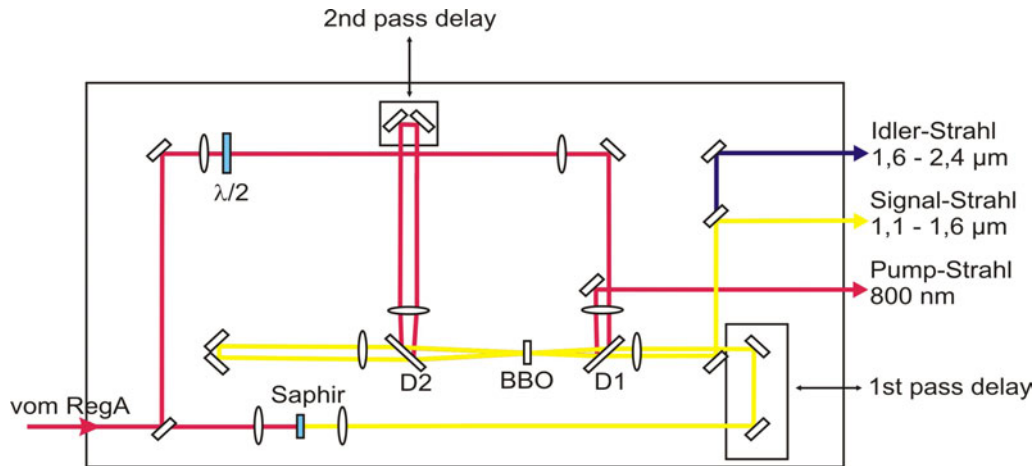
**Abbildung 3.5.:** Ablauf der einzelnen Prozesse im RegA.

somit der durchlaufende Puls zeitlich gestreckt wird. Ein ungestreckter Puls würde nach mehreren Umläufen eine zu hohe Spitzenintensität aufweisen und könnte den Titan-Saphir-Kristall zerstören.

Für das Ein- und Auskoppeln des MIRA-Pulses ist der so genannten *Cavity Dumper* (CD) zuständig. Er ist ähnlich aufgebaut wie der Q-Switch. Bei angelegter Spannung wird der Endspiegel des Resonators umgangen und ein Laserstrahl kann entweder ein- oder ausgekoppelt werden. Bei jedem 304. Puls, der vom Mira kommt, wird der CD eingeschaltet. Jener Laserpuls wird dann gebeugt und auf den CD zurückreflektiert. Dort wird er durch konstruktive Interferenz mit dem ungebeugten Strahl verstärkt. Über einen Spiegel gelangt er daraufhin in den Resonator. Nachdem der Laserstrahl 30 Umläufe im Resonator zurückgelegt hat, wird der CD erneut eingeschaltet und der Laserpuls verlässt den Resonator auf dem gleichen Weg, wie er eingekoppelt wurde.

Um den eingekoppelten von dem ausgekoppelten Strahl zu trennen, passieren beiden den Faraday-Rotator (FD). Dieser fungiert wie eine optische Diode. Die Polarisation des durchgehenden Strahls wird um  $+45^\circ$  gedreht. Der ausgekoppelte Strahl durchläuft den FD insgesamt zweimal und ist somit senkrecht zum eingekoppelten Strahl polarisiert. Er passiert dann einen Polarisator, an welchem der eingekoppelte Strahl reflektiert wird. Um den zeitlich breiten Puls (ca. 30 ps) wieder schmaler zu machen, wird der Laserstrahl vor dem Verlassen des RegA durch einen Pulskompressor (DG) geleitet (Funktionsweise eines Kompressors siehe Seite 38). Danach erhält man eine Pulsdauer von 180 fs und eine Leistung von circa 1 W. Vor dem Einkoppeln in den OPA werden 5 % des Laserstrahls abgetrennt und später als Stokes-Puls benutzt.

### 3.1.3. Optisch parametrischer Verstärker (OPA)

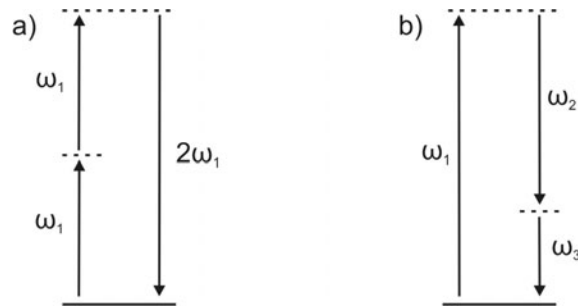


**Abbildung 3.6.:** Schematische Darstellung des optisch parametrischen Verstärkers (OPA). D1, D2: dichroitische Spiegel;  $\lambda/2$ :  $\lambda/2$ -Platte; BBO:  $\beta$ -Bariumborat-Kristall.

Aus dem RegA gelangt der horizontal (p) polarisierte Laserstrahl in den OPA. Dort werden zunächst 75 % des Laserstrahls durch einen Strahlteiler abgetrennt. Diese werden durch einen Spiegel auf eine  $\lambda_{1/2}$  Platte umgelenkt. Damit wird die Polarisation auf vertikal gedreht. Die restlichen 25 % werden in einem Saphir-Kristall zu Weißlicht umgewandelt. Das Weißlicht wird dann durch zwei Spiegel umgelenkt. Diese werden auch als „first pass delay“ bezeichnet. Man kann mit diesen eine zeitliche Verzögerung einstellen damit später die beiden vorher abgetrennten Laserstrahlen gleichzeitig auf den Kristall auftreffen.

Das Weißlicht trifft dann zusammen mit dem Anregungslicht über einen dichroitischen Spiegel (D1) auf den BBO-Kristall ( $\beta$ -Bariumborat). Dort wird gemäß der Differenzfrequenzerzeugung (DFG, siehe Abbildung 3.7 b) aus den zwei Strahlen  $\omega_1$  (Anregungsstrahl) und  $\omega_2$  (Idler) ein dritter gebildet, der der Frequenz  $\omega_3 = \omega_1 - \omega_2$  (Signal) entspricht. Durch das Verkippen des Kristalls wird die Phasematching-Bedingung für jeweils eine bestimmte Frequenz  $\omega_3$  erfüllt. Sie kann somit auf den gewünschten Wert eingestellt werden. Das Weißlicht wird benutzt, um immer eine passende Frequenz  $\omega_2$  für den Prozess bereitzustellen.

Um die Ausbeute an der gewünschten Frequenz  $\omega_3$  zu erhöhen, wird der Laserstrahl noch einmal durch den Kristall geschickt. Zunächst wird aber durch einen Dichroitischen (D2) der Anregungs-Laserstrahl abgetrennt und in einen eigenen Strahlengang reflektiert (second pass delay). Dies dient dazu, die zeitliche Bewegung des Strahls zu verändern, weil er sich langsamer (kleinere Gruppengeschwindigkeit) als das Signal bzw. der Idler im Kristall bewegt. Die beiden anderen Laserstrahlen werden durch zwei Spiegel wieder zurück auf den Kristall reflektiert. Dort treffen sie erneut



**Abbildung 3.7.:** a) Energiediagramm der Erzeugung der zweiten Harmonischen (SHG). Aus zwei Photonen  $\omega_1$  entsteht ein Photon mit der Frequenz  $2\omega_1$ . b) Energiediagramm der Differenzfrequenzerzeugung (DFG). Aus einem Photon der Frequenz  $\omega_1$  entstehen zwei Photonen der Frequenz  $\omega_2$  und  $\omega_3$ . Es gilt  $\omega_3 = \omega_1 - \omega_2$ .

mit dem ebenfalls durch zwei Spiegel zurückreflektierten Anregungsstrahl zusammen. Wiederum wird am Kristall DFG durchgeführt. Der zweite Prozess ist viel effektiver und erhöht die Intensität von Licht der Frequenz  $\omega_3$  am meisten.

Nach dem zweiten Durchgang durch den Kristall wird der Anregungsstrahl durch einen dichroitischen Spiegel (D1) abgetrennt. Die anderen beiden Strahlen passieren den dichroitischen Spiegel, werden an einem Spiegel umgelenkt und durch einen weiteren dichroitischen Spiegel getrennt. Das Signal wird als einziger Strahl weiter verwendet.

Der Signal-Strahl wird mittels einer Linse auf einen Verdopplerkristall fokussiert. Dort verdoppelt sich gemäß der Erzeugung der zweiten Harmonischen (SHG, siehe Abbildung 3.7 a) seine Frequenz zu  $2\omega_3$ .

### 3.1.4. Kompressor

Als nächstes gelangen die Laserstrahlen in je einen Kompressor, der die Aufgabe hat, den Chirpfaktor der beiden Laserstrahlen einzustellen.

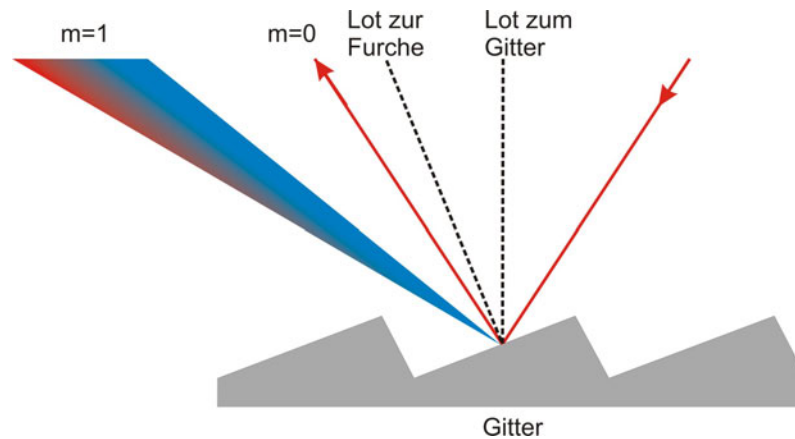
Der Kompressor besteht aus einem Gitter, welches das einfallende Licht je nach Frequenz in einem anderen Winkel zurückreflektiert (Reflexionsgitter). Trifft der Laserstrahl auf das Gitter auf, so wird sein Blauanteil (Licht höherer Frequenz) stärker gebeugt als sein Rotanteil (Licht niedrigerer Frequenz). Dies leitet sich aus der Gittergleichung

$$a(\sin \theta_a - \sin \theta_e) = m\lambda \quad (3.2)$$

ab. Hierbei ist  $a$  der Abstand zweier Punkte auf dem Gitter,  $\theta_e$  der Einfallswinkel,  $\theta_a$  der Ausfallwinkel und  $m$  die Beugungsordnung. Gilt  $m = 0$  spricht man von der Beugung nullter Ordnung und man erhält keine Aufspaltung der verschiedenen



Wellenlängen. Das Ziel ist es also möglichst viel Energie in der ersten Beugungsordnung zu erhalten. Hierzu werden speziell geformte Rillen auf die Gitteroberfläche aufgebracht, was 1910 von R. W. Wood vorgeschlagen wurde (siehe Abbildung 3.8).



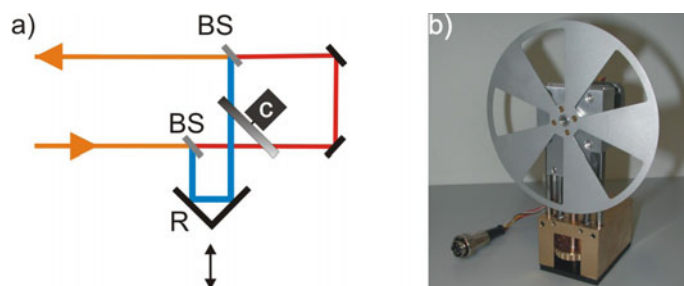
**Abbildung 3.8.:** Schematische Darstellung der Funktionsweise eines „Blaze“-Gitters. Bei der nullten Beugungsordnung ( $m=0$ ) ist der Ein- gleich dem Ausfallwinkel (die Winkel werden immer auf das Lot zum Gitter gemessen). Die maximale Intensität wird aber erreicht, wenn der reflektierte Strahl den gleichen Ein- und Ausfallwinkel zum Lot der Furchen hat (denn dann wird er von der Oberfläche spiegelnd reflektiert). Dies ist in diesem Beispiel für die erste Beugungsordnung ( $m=1$ ) der Fall.

Somit gelingt es, die spektralen Komponenten des Lasers räumlich aufzutrennen. Der spektral aufgespaltene Strahl wird durch eine Linse auf einen Spiegel fokussiert. Über den Spiegel wird der Strahl wieder zurück auf das Gitter reflektiert. Damit wird die räumliche Auftrennung wieder aufgehoben und alle Wellenlängenkomponenten haben den gleichen Weg zurückgelegt. Der Laserstrahl verlässt nun über einen weiteren Spiegel den Kompressor. Seine Pulsdauer hat sich nicht verändert.

Verändert man den Abstand zwischen Gitter und Linse (der Abstand zwischen Linse und Spiegel bleibt bestehen), so durchlaufen die unterschiedlichen Wellenlängenkomponenten nicht mehr die gleiche Weglänge. Dies führt zu einer Dispersion des Laserpulses. Der Chirpparameter  $k_{\text{Chirp}}$  kann durch die Entfernung zwischen Gitter und Linse eingestellt werden. Für beide Laserstrahlen wird der Abstand der beiden optischen Komponenten so gewählt, dass sie beide den gleichen Chirpparameter besitzen.

### 3.1.5. Strahlteiler

Nach Verlassen des Kompressors wird der Stokes-Strahl durch einen 50:50 Strahlteiler aufgeteilt (BS in Abbildung 3.9 a). Einer der beiden Laserstrahlen wird über



**Abbildung 3.9.:** a) Schematische Darstellung des Strahlteiler-Aufbaus. C: Chopper; R: Retroreflektor; BS: Strahlteiler. b) Foto des verwendeten Choppers.

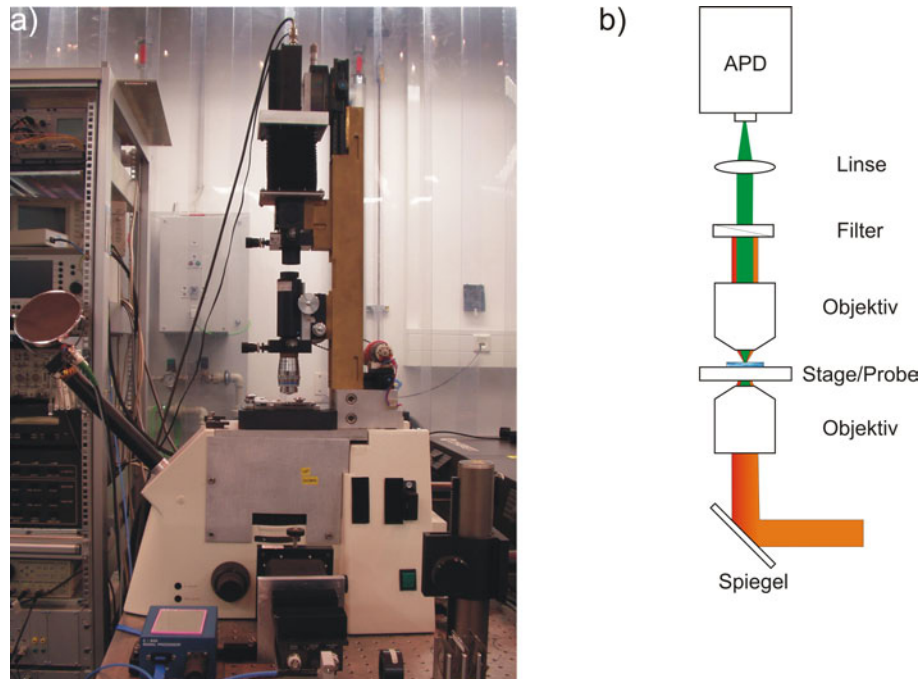
einen Retroreflektor (R in Abbildung 3.9 a) geführt. Dieser ist auf einer verschiebbaren Schiene befestigt. Dadurch kann eine zeitliche Verzögerung zwischen den beiden aufgeteilten Laserstrahlen eingestellt werden. Damit jeweils nur einer der Strahlen weiterläuft, wird ein Chopper (C in Abbildung 3.9 a) in den Strahlengang gestellt. Dieser ist so konstruiert, dass er innerhalb von 150 ms zwischen den zwei verschiedenen Strahlen hin und her schalten kann. Durch einen Schrittmotor wird sichergestellt, dass immer der richtige Kanal freigeschaltet ist und es zu keiner Überlappung kommt. Der Chopper wird über einen Schaltkreis mit dem Photonenzähler SR 400 (siehe Kapitel 3.1.7) synchronisiert.

#### 3.1.6. Verzögerungsstrecke

Beide Strahlen (Pump-Strahl und einer der Stokes-Strahlen) besitzen einen eigenen Retroreflektor für die zeitliche Synchronisation. Der Retroreflektor vom Stokes-Strahl kann nur grob eingestellt werden. Der Retroreflektor vom Pump-Strahl kann über einen Schrittmotor auf  $0,1 \mu\text{m}$  genau verfahren werden. Somit kann die zeitliche Verzögerung gegenüber dem Signal-Strahl exakt eingestellt werden. Dies ist besonders wichtig, um zu gewährleisten, dass die gepulsten Laserstrahlen gleichzeitig auf der Probe eintreffen. Die optimale Position des Retroreflektors wird anhand der Intensität des CARS-Signals ermittelt. Schließlich werden die beiden Laserstrahlen durch ein Spiegelsystem und einen dichroitischen Spiegel räumlich überlappt.

#### 3.1.7. Mikroskop

Die beiden Anregungsstrahlen werden mittels eines Periskops bestehend aus zwei Spiegeln in das Mikroskop eingekoppelt. Bei dem Mikroskop handelt es sich um ein Zeiss Axiovert 200. Im Mikroskop werden die Laserstrahlen zunächst mit Hilfe eines dichroitischen Spiegels senkrecht nach oben reflektiert. Danach gelangen sie in das



**Abbildung 3.10.:** a) Mikroskop und b) die schematische Darstellung des Strahlenganges im Mikroskop.

Objektiv (Nikon Plan APO NA 1,2, Wasserimmersion) und werden auf die Probe fokussiert. Dort wird das CARS Signal erzeugt. Dieses wird von einem weiteren Objektiv, das sich exakt über dem ersten befindet, eingesammelt und gelangt durch Bandpassfilter auf eine Linse, die es auf die APD fokussiert.

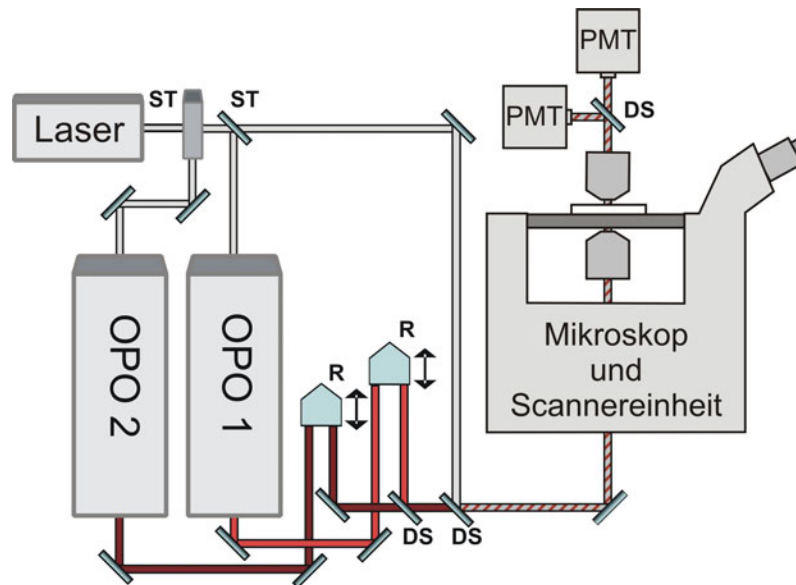
Um die Probe bewegen zu können, bedient man sich eines Piezo-Translationstisches. In diesem ist ein Piezo-Kristall eingebaut, der beim Anlegen einer Spannung eine Bewegung von bis zu  $100 \mu\text{m}$  in Richtung x- bzw. y-Achse und  $20 \mu\text{m}$  in Richtung z-Achse ermöglicht. Um den gesamten Aufbau vor Streulicht zu schützen, wurde ein Kasten um das Mikroskop gebaut.

Um das obere Objektiv bewegen zu können, ohne dabei den Kasten zu öffnen, wurde ein Schrittmotor eingebaut, der manuell oder über den Computer gesteuert werden kann. Um den Fokus des unteren Objektivs einstellen zu können, wurde am Mikroskop eine CCD-Kamera angebracht. Durch Umlegen eines Schalters am Mikroskop wird die Probe auf die Kamera abgebildet.

Die detektierten Photonen werden von der APD in elektrische Pulse umgewandelt. Die Impulse gelangen dann über ein BNC Kabel zum Single-Photon-Counter (SR-400) und werden dort über eine frei wählbare Anzahl an Laserpulsen aufsummiert. Der SR-400 wird vom Lasersystem getriggert, d.h. er zählt nur dann die Photonen, wenn ein Laserpuls auf die Probe trifft. Dies dient dazu, die gemessene Dun-

kelzählrate der APD zu minimieren. Die Anzahl der Photonen pro Zahl an Laserpulsen wird vom SR-400 in eine Spannung umgerechnet und über ein BNC Kabel an den Computer weitergeleitet. Dort werden die Daten mit Hilfe eines am Lehrstuhl entwickelten LabView Programmes [30] mit der aktuellen Position des Piezo-Translationstisches kombiniert. Durch Abfahren eines rechteckigen Bereiches mit Hilfe des Piezo-Translationstisches kann somit ein Bild der Probe aufgenommen werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Position konstant zu halten und die Intensität des Signals in Abhängigkeit von der Zeit aufzunehmen (Timetrace).

### 3.2. Lasersystem und Aufbau zur CARS-Mikroskopie mit Zweifachanregung

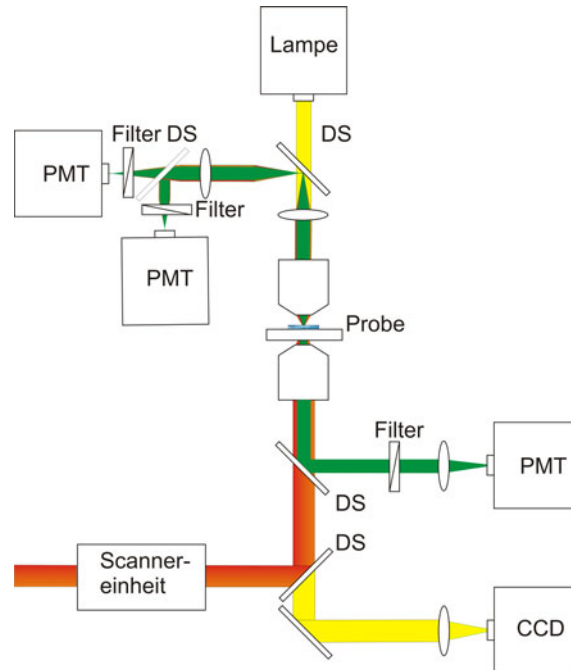


**Abbildung 3.11.:** Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus zur CARS-Mikroskopie mit Zweifachanregung. ST, Strahlteiler; DS, dichroitischer Spiegel; PMT, Photomultiplier; R: Retroreflektor.

Der Aufbau zur CARS-Mikroskopie mit Zweifachanregung (dual-pump CARS) basiert auf einem Nd:VO<sub>4</sub> Laser der Firma HighQ. Dieser liefert ungefähr 7 ps lange Pulse bei einer Repetitionsrate von 76 MHz und einer mittleren Leistung von ca. 10 W. Der Laserstrahl wird zuerst in zwei Strahlen aufgeteilt und zum Pumpen von zwei optisch parametrischen Oszillatoren (OPOs) der Firma APE (Modell Levante) verwendet. Zusätzlich wird ein Teil des 1064 nm Strahls ausgekoppelt und direkt für die Anregung verwendet. Die resultierende Wellenlänge der beiden OPOs kann individuell im Bereich von 786-845 nm bzw. 852-920 nm mittels Temperatur der Kristalle (DFG und SHG Kristalle, siehe Abschnitt 3.1.3) eingestellt werden. Nach dem Durchlaufen der OPOs werden die Strahlen jeweils mit einem Retroreflektor analog zum im Abschnitt 3.1.6 beschriebenen Aufbau zeitlich synchronisiert und an einem dichroitischen Spiegel vereinigt. Mittels eines weiteren dichroitischen Spiegels wird der 1064 nm Strahl eingekoppelt. Alle drei Strahlen ( $\omega_{p1}$ ,  $\omega_{p2}$  und  $\omega_{st}$ ) gelangen über zwei Spiegel in die Scannereinheit des Mikroskops und werden schließlich mittels eines in z-Richtung beweglichen Objektivs (Nikon APO 60x, N.A. 1,2) auf die Probe fokussiert. Die Scannereinheit dient dazu, die Strahlen über die Probe zu verfahren und somit einen Bildausschnitt punktweise abzufahren. Die Probe wird auf einem in x und y Richtung fahrbaren Mikroskopiertisch befestigt.

### 3. Aufbau des Experiments

---



**Abbildung 3.12.:** Schematische Darstellung des Strahlenganges im Mikroskop. DS: dichroitische Spiegel; CCD: Kamera; PMT: Photomultiplier.

Das CARS-Signal, bestehend aus den drei Anteilen  $\omega_{aS1} = 2\omega_{p1} - \omega_{St}$ ,  $\omega_{aS2} = 2\omega_{p2} - \omega_{St}$  und dem Mischterm  $\omega_{aS,mix} = \omega_{p1} + \omega_{p2} - \omega_{St}$ , wird mit einer asphärischen Linse eingesammelt. Mittels eines dichroitischen Spiegels werden die Signale in zwei Teile aufgespalten ( $\omega_{aS1}$  und  $\omega_{aS1}$ ) und mit einer Linse auf jeweils einen Detektor (Single Photon Counting Photomultiplier der Firma Hamamatsu, Japan) fokussiert. Das Mischsignal und die Anregungsstrahlen werden durch geeignete Filter vor den Detektoren blockiert.

Das Mikroskop (Modell TE2000 der Firma Nikon, Japan) ist über eine digitale Schnittstelle mit dem Computer verbunden. Mittels mitgelieferter Software kann das Mikroskop gesteuert werden. Insbesondere kann die Scannereinheit zu verschiedenen Punkten auf der Probe verfahren und die Position des Objektivs eingestellt werden.

Die Detektoren sind an eine Schnittstellenkarte der Firma Beckel und Hickl angeschlossen, die sich im Computer befindet. Über eine mitgelieferte Software können die Detektoren ausgelesen werden. In Kombination mit der Mikroskop-Software können so Bilder von der Probe aufgenommen werden. Hierzu wird, wie oben erwähnt, ein rechteckiger Ausschnitt der Probe punktweise abgefahren und die jeweilige Intensität detektiert.

### 3.3. Vergleich der beiden Aufbauten

Die in den vorigen Abschnitten beschriebenen Aufbauten unterscheiden sich vor allem in der Wahl des Lasersystems. Das ps-Lasersystem bietet den Vorteil, dass es spektral schmale Pulse mit einer hohen Repetitionsrate liefern kann. Das fs-Lasersystem kann mit einer größeren Spitzenenergie pro Puls aufwarten. Des Weiteren kann durch das spektrale Fokussieren nacheinander die gesamte Bandbreite der fs-Laserpulse (ungefähr  $250\text{ cm}^{-1}$ ) für die Anregung benutzt werden, ohne dass Veränderungen an der Wellenlänge des Lasersystems vorgenommen werden müssen. Die beim dual-pump CARS verwendeten OPOs sind moderner als der OPA. Durch den mehrmaligen Durchlauf der Kavität ist die Lichtausbeute deutlich größer. Die einfache Einstellung der Wellenlänge durch Änderung der Temperatur ermöglicht einen einfachen Wechsel der Wellenlänge. Beim OPA kann zwar die Wellenlänge in einem kleinen Bereich durch Verkipfung des Kristalls verändert werden, für größere Veränderungen bedarf es jedoch stets einer Neujustage des gesamten Systems. Die Scannereinheit im Nikon Mikroskop kann viel schneller einzelne Bildpunkte ansteuern als sie von dem Piezo-Translationstisch angefahren werden können. Dadurch kann im Vergleich zum Piezo-Translationstisch innerhalb einer kurzen Zeit eine Aufnahme erfolgen.





# 4. Experimente

## 4.1. Spektral fokussierte CARS-Mikroskopie

### 4.1.1. Kreuzkorrelation

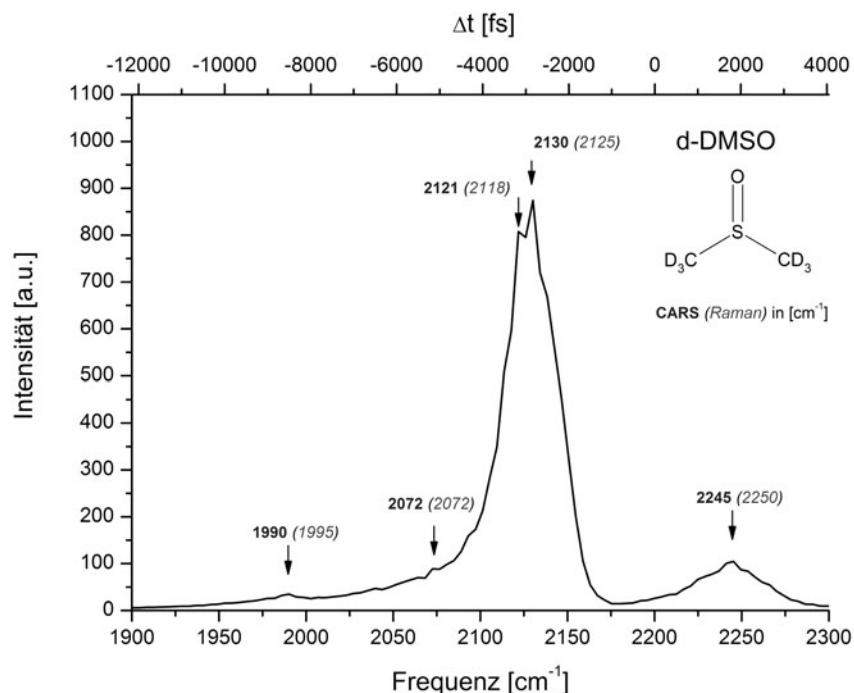
Wie in Abschnitt 2.5.4 theoretisch abgeleitet wurde, kann bei der spektral fokussierten CARS-Mikroskopie durch eine zeitliche Verschiebung zwischen den Anregungslaserpulsen die detektierte Schwingungsfrequenz variiert werden. Die Aufnahme eines solchen Spektrums wird im Folgenden als Kreuzkorrelation bezeichnet. Hierbei wird der zeitliche Abstand zwischen den Stokes- und den Pump-Pulsen mit Hilfe der Verschiebung eines Retroreflektors verändert und die Intensität detektiert. Der Retroreflektor ist auf einem Schrittmotor montiert und kann somit über den Computer gesteuert mikrometergenau verfahren werden.

Zunächst muss aber sichergestellt werden, dass die beiden Anregungsstrahlen über die gesamte zeitliche Verschiebung ein gleichmäßig spektral schmales Anregungsprofil haben. Hierzu nimmt man eine nicht-resonante Probe (zum Beispiel Deckglas) auf und erhält eine gaußförmige Kurve, deren Halbwertsbreite  $\tau_{\text{CARS}}$  von der Pulsdauer des Pump- ( $\tau_p$ ) bzw. Stokes-Lasers ( $\tau_{\text{St}}$ ) abhängig ist.

$$\tau_{\text{CARS}} = \sqrt{\frac{1}{2}\tau_p^2 + \tau_{\text{St}}^2} \quad (4.1)$$

Belässt man einen der Anregungsstrahlen ungechirped, so kann dessen Beitrag zu  $\tau_{\text{CARS}}$  vernachlässigt werden. Aus  $\tau_{\text{CARS}}$  lässt sich folglich die Halbwertsbreite des anderen Anregungsstrahls näherungsweise bestimmen. Sie kann zusammen mit der Pulsdauer des ungechirpten Laserpulses herangezogen werden, um nach Gleichung 2.33 den Chirp-Parameter  $k_{\text{Chirp}}$  zu bestimmen.  $k_{\text{Chirp}}$  muss für beide Anregungsstrahlen gleich sein, damit man ein gleichmäßig spektral schmales Anregungsprofil erhält (siehe auch Abschnitt 2.5.4).

Als nächstes wird eine Probe mit Schwingungsbanden im detektierten Bereich aufgenommen. Tritt bei einer bestimmten Frequenz eine aktive Schwingung in der Probe auf, so führt diese zu einer resonanten Verstärkung im Signal. Sie kann als ein Peak in der Kreuzkorrelation beobachtet werden. Um die Position eines solchen Peaks

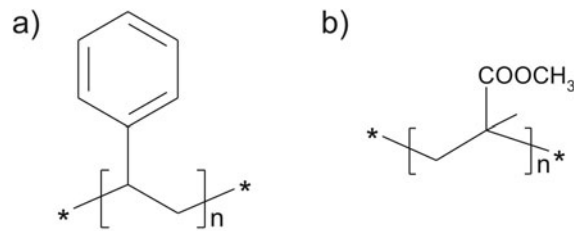


**Abbildung 4.1.:** Kreuzkorrelation von d-DMSO und der Vergleich zwischen den Raman-Frequenzen (in Klammern, entnommen aus [33]) und den ermittelten CARS-Frequenzen. Auf der unteren x-Achse sind die umgerechneten Frequenzen aufgetragen, auf der oberen  $\Delta t$ , die zeitliche Verschiebung zwischen den Anregungspulsen.

einer Schwingungsfrequenz zuordnen zu können, muss die gemessene zeitliche Verschiebung in eine spektrale Verschiebung umgerechnet werden. Hierzu bedarf es einer Eichprobe mit einem bekannten Schwingungsspektrum. Mittels einer linearen Regression zwischen der bekannten Frequenz der Schwingungsbanden und der zeitlichen Verschiebung können die zeitlichen Verschiebungen in Frequenzen umgerechnet werden. Dies wird anhand einer Probe mit deuteriertem Dimethylsulfoxid (d-DMSO) gezeigt. Hier wurde zunächst eine Kreuzkorrelation aufgenommen (siehe Abbildung 4.1, obere x-Achse) und dann die ermittelten Positionen der Schwingungsbanden mit entsprechenden Ramanbanden aus der Literatur [33] verglichen. Führt man nun die Umrechnung durch, so erhält man die in Abbildung 4.1 dargestellte Skalierung (untere x-Achse). Vergleicht man die Position der gemessenen Signale mit den Ramanbanden aus der Literatur, so sind nur geringe Unterschiede auszumachen.

### 4.1.2. Spektrale Selektivität

Dieses Experiment soll die erreichbare spektrale Selektivität mit Hilfe der spektral fokussierten CARS-Mikroskopie verdeutlichen. Als Probe wurde eine Mischung aus Polystyrol-Kugeln (Durchmesser 6  $\mu\text{m}$ ) und Polymethylmethacrylat-(PMMA)-Kugeln (Durchmesser 3  $\mu\text{m}$ ) ausgewählt. Spektroskopisch gesehen unterscheiden sich

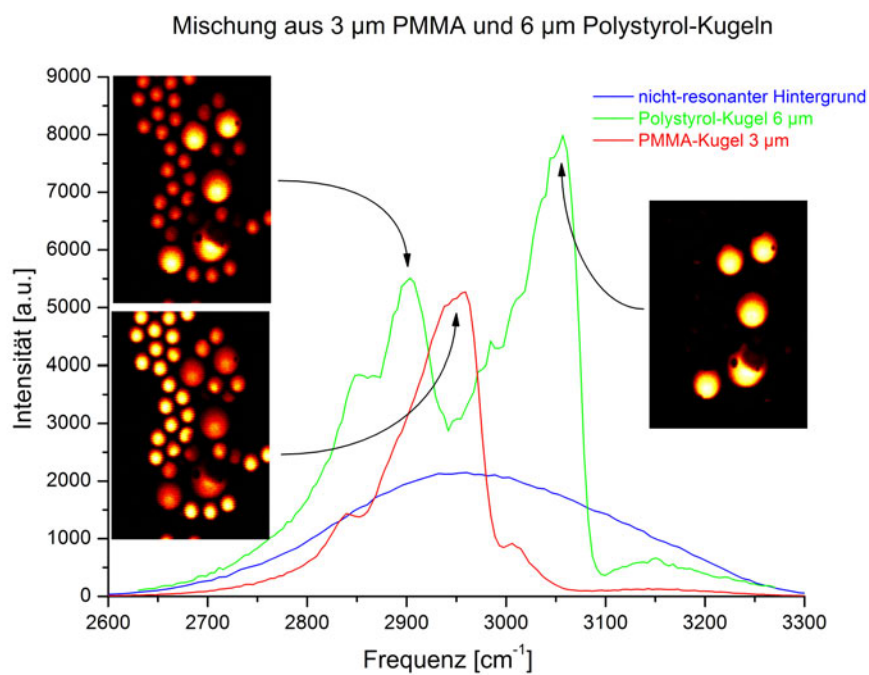


**Abbildung 4.2.:** Die Strukturformeln von Polystyrol (a) und von Polymethylmethacrylat (b).

PMMA und Polystyrol insbesondere durch die bei PMMA fehlende aromatische C-H Schwingung (siehe Abbildung 4.2), die bei ungefähr  $3050\text{ cm}^{-1}$  beobachtet wird. Beide Stoffe haben eine aliphatische C-H Schwingungsbande bei  $2910\text{ cm}^{-1}$  (Polystyrol) bzw. bei  $2950\text{ cm}^{-1}$  (PMMA). Für das Experiment wurden Kugeln verschiedener Größe verwendet, um eine einfache visuelle Unterscheidung zu ermöglichen. Auf diese Weise können die erhaltenen CARS-Bilder leicht überprüft werden.

Zunächst wurde für jeden der beiden Stoffe eine Kreuzkorrelation in der Mitte einer Kugel aufgenommen. Diese ermöglichte es, die genaue Lage der Banden zu bestimmen. Der vollständig nicht-resonante Hintergrund wurde im Deckglas aufgenommen. Schließlich wurden Bilder einer Mischung aus den beiden Stoffen bei verschiedenen zeitlichen (und somit auch spektralen) Einstellungen aufgenommen. Die dabei erhaltenen Bilder einschließlich der dazu gehörigen Kreuzkorrelation sind in Abbildung 4.3 zu sehen. Die Frequenzen, bei denen das jeweilige Bild aufgenommen wurde, sind mit Pfeilen markiert.

Betrachtet man das Bild, welches bei  $3050\text{ cm}^{-1}$  (aromatische C-H Schwingung) aufgenommen wurde (rechtes Bild in Abbildung 4.3), so sieht man ausschließlich Polystyrol-Kugeln. Bei den anderen beiden Bildern sind jeweils beide Kugelsorten sichtbar, allerdings mit wechselnder Intensität. Somit konnte gezeigt werden, dass mit der spektral fokussierten CARS-Mikroskopie zwei Substanzen parallel detektiert werden können. Weiterhin können die einzelnen Substanzen unabhängig voneinander abgebildet werden, sofern sich deren Schwingungsbanden nicht überlagern.



**Abbildung 4.3.:** Kreuzkorrelation von Polystyrol- und PMMA-Kugeln und die bei der jeweiligen Frequenz (mit Pfeilen gekennzeichnet) aufgenommenen Bilder. Bilgröße jeweils  $24,6 \times 35,4 \mu\text{m}^2$  ( $123 \times 177$  Pixel). Integration über 3000 Laserpulse pro Pixel.

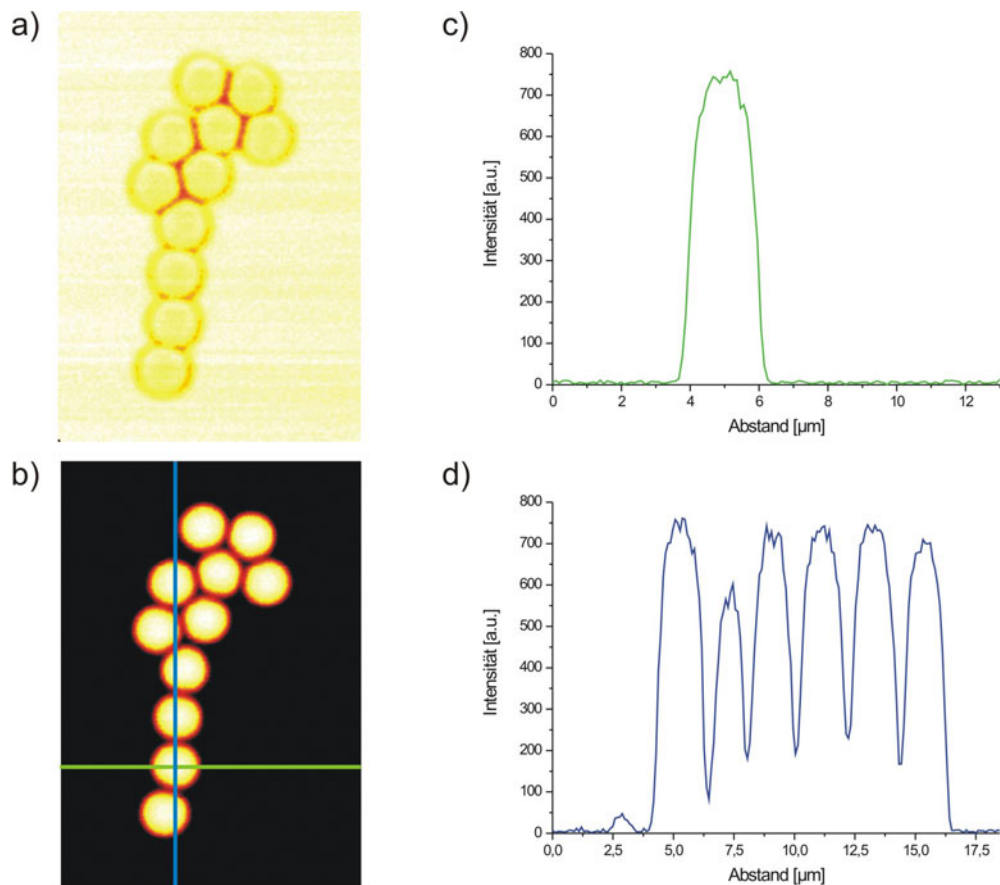
### 4.1.3. Hintergrundunterdrückung

Normalerweise werden biologisch interessante Experimente in Lösung durchgeführt. Deshalb ist es von besonderem Interesse, den Einfluss des gewählten Lösungsmittels auf die Detektion der Probe zu bestimmen.

Um diesen Einfluss für die spektral fokussierte CARS-Mikroskopie zu ermitteln, wurde eine Probe bestehend aus Polystyrol-Kugeln (2  $\mu\text{m}$  Durchmesser) und Hexadecan, als Lösungsmittel, ausgewählt. Analog zum vorherigen Experiment unterscheiden sich Polystyrol und Hexadecan spektral vor allem durch die aromatische C-H Schwingung. Hexadecan ist nicht aromatisch und weist somit im Gegensatz zu Polystyrol keine Schwingungsbande bei  $3050\text{ cm}^{-1}$  auf.

Es wurde jeweils eine Kreuzkorrelation mittig in einer Kugel und im Lösungsmittel aufgenommen, um den spektralen Sachverhalt zu verdeutlichen und die richtigen spektralen Aufnahmepositionen für die Bilder zu finden. Der nicht-resonante Hintergrund wurde im Deckglas detektiert. Die aufgenommenen Bilder zeigt Abbildung 4.4.

Aus den Profilschnitten in Abbildung 4.4 c und d ist klar ersichtlich, dass bei der aromatischen C-H Bande ( $3050\text{ cm}^{-1}$ ) der Einfluss des Lösungsmittels vernachlässigbar ist. Das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis liegt bei ungefähr 100:1. Somit ist experimentell bestätigt worden, dass eine zweite Substanz mit einer intensiven benachbarten Schwingungsbande die eigentliche Messung nicht beeinflusst. Dies kann vor allem dann ausgenutzt werden, wenn eine Substanz mit einer geringen Konzentration neben einer anderen, hochkonzentrierten Substanz detektiert werden soll.

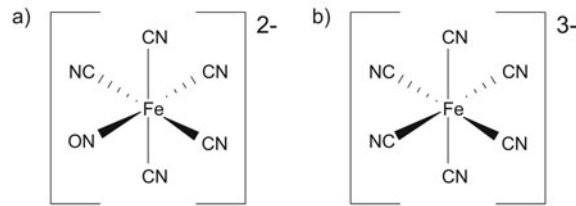


**Abbildung 4.4.:** Polystyrol-Kugeln (Durchmesser 2  $\mu\text{m}$ ) in einer Hexadecan Lösung. a) Bild bei  $3050\text{ cm}^{-1}$  (aromatische C-H Schwingung), b) Bild bei  $2910\text{ cm}^{-1}$  (aliphatische C-H Schwingung). In c) und d) sind der erhaltene Kontrast und die Auflösung im Profilschnitt dargestellt. Die Lage der Profilschnitte ist in Bild b) eingezeichnet. Bildgröße:  $13,2 \times 18,8\ \mu\text{m}^2$  ( $132 \times 188$  Pixel). Integration über 2000 Laserpulse pro Pixel.

#### 4.1.4. Einstellung der spektralen Auflösung

Ziel dieses Versuches war die experimentelle Bestätigung des theoretischen Sachverhaltes, dass die spektrale Auflösung bei der spektral fokussierten CARS-Mikroskopie allein durch die Pulsbreite bestimmt wird.

Als Proben wurden Nitroprussid ( $K_2[Fe^{III}NO(CN)_5]$ ) und Hexacyanoferrat(III) ( $K_3[Fe^{III}(CN)_6]$ ) ausgewählt.



**Abbildung 4.5.:** Strukturformeln von Nitroprussid (a) und Hexacyanoferrat(III) (b).

Beide Stoffe besitzen in Lösung jeweils eine Cyanid-Bande, die nur wenige Wellenzahlen voneinander entfernt sind (Hexacyanoferrat(III)  $2129\text{ cm}^{-1}$  und Nitroprussid  $2155\text{ cm}^{-1}$ ). Es wurden Messungen bei zwei verschiedenen Auflösungen durchgeführt. Für eine Auflösung von  $\Delta\tilde{\nu} = 5\text{ cm}^{-1}$  wurde die Pulsdauer des Stokes-Laser  $\tau_{St}$  ausgehend von Gleichung 2.29 gemäß der folgenden Rechnung auf ca. 3 ps eingestellt.

$$\tau_{St} = \frac{4 \ln 2}{\Delta\omega} = \frac{2 \ln 2}{\Delta\tilde{\nu}\pi c} = \frac{2 \ln 2}{5\text{ cm}^{-1}\pi c} = 2940\text{ fs}$$

Nach Messung der Pulsdauern des ungechirpten (fouriertransformierten) Stokes- ( $\tau_{0,St}$ ) und Pump-Lasers ( $\tau_{0,p}$ ), lässt sich gemäß Gleichung 2.34 die entsprechende Pulsdauer  $\tau_p$  für den Pump-Laser bestimmen. Damit haben beide Laserstrahlen den gleichen Chirpparameter. Die spektrale Auflösung ändert sich während der Aufnahme einer Kreuzkorrelation somit nicht.

$$\tau_p = \frac{\tau_{0,St}}{\tau_{0,p}} \tau_{St} = \frac{246\text{ fs}}{100\text{ fs}} 2940\text{ fs} = 7232\text{ fs}$$

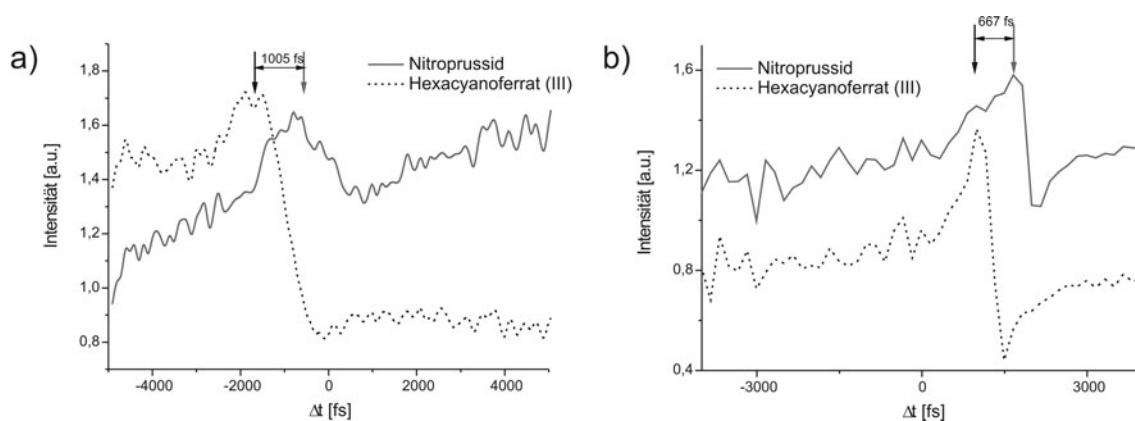
Zur Einstellung der zweiten ausgewählten Auflösung,  $3\text{ cm}^{-1}$  wird analog verfahren.

$$\tau_{St} = \frac{2 \ln 2}{3\text{ cm}^{-1}\pi c} = 4900\text{ fs}$$

$$\tau_p = \frac{246 \text{ fs}}{100 \text{ fs}} 4900 \text{ fs} = 12054 \text{ fs}$$

Hierbei ist zu beachten, dass die Pulsdauern des ungechirpten (fouriertransformierten) Stokes- ( $\tau_{0,\text{St}}$ ) und Pump-Lasers ( $\tau_{0,\text{p}}$ ) für beide Auflösungen identisch sind. Allein die Pulsdauern des gechirpten Stokes ( $\tau_{\text{St}}$ ) und Pump-Lasers ( $\tau_p$ ) sind unterschiedlich.

Die Kreuzkorrelationen der je 0,1 molaren Lösungen von Hexacyanoferrat(III) und Nitroprussid wurden bei beiden Auflösungen ( $3 \text{ cm}^{-1}$  und  $5 \text{ cm}^{-1}$ ) aufgenommen. Das Ergebnis der Messungen ist in Abbildung 4.6 dargestellt.



**Abbildung 4.6.:** Kreuzkorrelationen von einer jeweils 100 millimolaren Lösung Hexacyanoferrat(III) und Nitroprussid bei einer Auflösung von  $3 \text{ cm}^{-1}$  (a) bzw.  $5 \text{ cm}^{-1}$  (b). Die Cyanidbande von Hexacyanoferrat liegt bei  $2129,1 \text{ cm}^{-1}$ , die von Nitroprussid bei  $2155,2 \text{ cm}^{-1}$ .

Der spektrale Unterschied zwischen den jeweiligen Cyanidbanden der beiden Stoffe lag bei der Auflösung von  $3 \text{ cm}^{-1}$  bei 1005 fs und bei der Auflösung von  $5 \text{ cm}^{-1}$  bei 667 fs. Das entspricht einem Verhältnis von 1,51. Theoretisch würde man anhand des Verhältnisses zwischen den Auflösungen  $\frac{5 \text{ cm}^{-1}}{3 \text{ cm}^{-1}}$  einen Wert von 1,67 erwarten. Der ermittelte Wert stimmt gut mit dem theoretischen überein. Die theoretische Annahme, dass die spektrale Auflösung nur von der Pulsbreite der gechirpten Laserpulse abhängig ist, wurde somit experimentell bestätigt. Dies bedeutet, dass die Auflösung leicht an das jeweilige Experiment angepasst werden kann. Zum Beispiel wird eine optimale Anregung von breiten Schwingungsbanden bei geringer Auflösung ermöglicht, da dann die gesamte Breite der Bande gleichzeitig angeregt wird. Für die Unterscheidung von dicht benachbarten Schwingungsbanden hingegen kann eine hohe Auflösung eingestellt werden.



### 4.1.5. Empfindlichkeitsmessung

Einer der größten Nachteile der CARS-Mikroskopie ist die geringe Empfindlichkeit. Es bedarf einer großen Anzahl an Molekülen im Fokus um ein ausreichend großes Signal zu erzeugen. Für die Planung biologisch relevanter Messungen ist es somit von großem Interesse, die minimal detektierbare Konzentration herauszufinden. Diese ist stoffspezifisch (die Wahrscheinlichkeit, dass ein Photon gestreut wird, hängt unter anderem vom Durchmesser des Partikels und dessen Dichte ab, siehe Gleichung 2.8), aber es kann ein Richtwert ermittelt werden.

Für dieses Experiment wurden eine 0,1 molare Lösung von Hexacyanoferrat(III) in Wasser hergestellt. Anschließend wurden jeweils Kreuzkorrelationen um die C-N Schwingungsbande ( $2129\text{ cm}^{-1}$ ) aufgenommen. Die Lösung wurde solange verdünnt, bis gerade noch eine Bande erkennbar war. Dies war bei einer 1 millimolaren Konzentration gerade noch möglich. Unter der Annahme, dass das fokale Volumen näherungsweise  $9 \cdot 10^{-17}$  Liter ( $0,3 \times 0,3 \times 1\ \mu\text{m}^3$ ) beträgt, entspricht dies 54 000 Molekülen im Fokus. Mit Wasser als Lösungsmittel kann man die Detektionsgrenze für Hexacyanoferrat(III) somit als 18 ppm annehmen. Berücksichtigt man den Umstand, dass ein Molekül Hexacyanoferrat(III) 6 CN-Moleküle besitzt, ergibt sich die Detektionsgrenze zu 108 ppm CN-Molekülen in Wasser. Dieser Zahlenwert kann für eine Abschätzung herangezogen werden, ob die Detektion einer bestimmten Konzentration einer Substanz mit dem vorhandenen Aufbau möglich ist oder nicht.

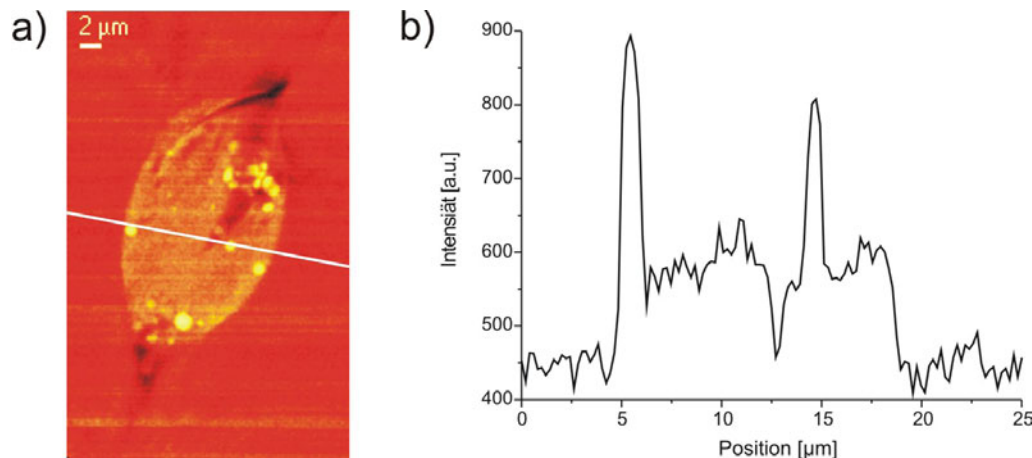
### 4.1.6. Messungen in lebenden Zellen

In diesem Abschnitt sind Ergebnisse der Messungen an lebenden Zellen zusammengefasst. Es wurden zwei Ziele verfolgt. Zum einen die Abbildung von Lipiden und zum anderen die Detektion von Glutathion.

#### 4.1.6.1. Detektion von Lipiden in lebenden Zellen

Lipide (Fette) erfüllen wichtige Aufgaben als Komponenten biologischer Membranen, als Energiespeicher in Reservedepots und als Botenstoffe der zellulären Kommunikation. Zusätzlich dienen sie als eine Art Schutzkissen für den Körper und beugen somit Verletzungen von wichtigen Organen wie Herz, Leber und Nieren vor.

Die Detektion von Lipiden in lebenden Organismen ist bis jetzt das am meisten ausgeprägte Anwendungsfeld der CARS-Mikroskopie [3]. Hierbei gibt es Untersuchungen zur Orientierung der Lipide [34], quantitative Messungen [12, 35] und Messungen an einzelnen Doppelmembranen [36]. Unser Ziel war die Abbildung von einzelnen Lipidvesikeln innerhalb einer einzelnen lebenden Zelle mit Hilfe der spektral fokussierten CARS-Mikroskopie.



**Abbildung 4.7.:** Abbildung einer He-La-Zelle bei der CH<sub>2</sub> Streckschwingung (2845 cm<sup>-1</sup>) (a) und das Intensitätsprofil entlang der weißen Linie (b). Bildgröße: 26 x 41,2 µm<sup>2</sup> (260 x 412 Pixel). Integration über 2000 Laserpulse pro Pixel.

Hierzu wurde die symmetrischen CH<sub>2</sub> Streckschwingung der Kohlenwasserstoffketten der Lipide bei 2845 cm<sup>-1</sup> detektiert. Als Probe wurden He-La-Zellen ausgewählt. Es handelt sich hierbei um menschliche Gebärmutterhals-Krebszellen [37]. Sie sind gut zu kultivieren und wachsen in einer langgestreckten Form am Deckglas auf.

In Abbildung 4.7 a ist eine Zelle, die bei einer Schwingungsfrequenz von 2845 cm<sup>-1</sup>

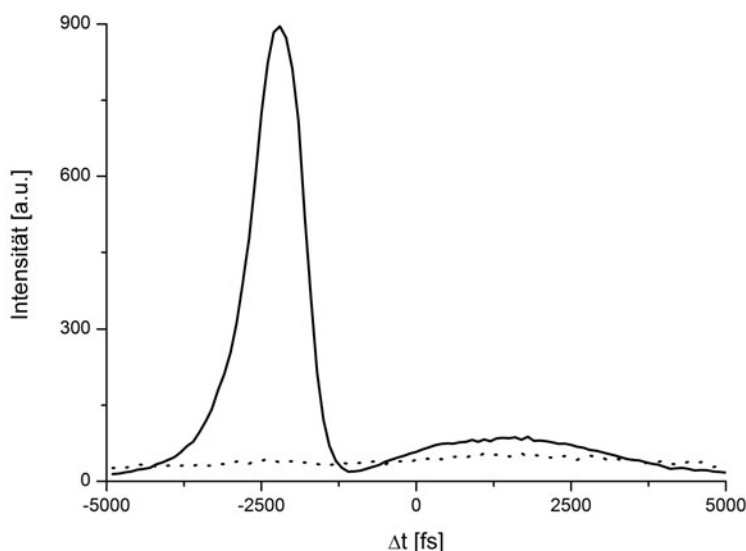
detektiert wurde, dargestellt. Man kann gut die hellen Lipid Vesikel erkennen. Das entsprechende Profil (Abbildung 4.7 b) verdeutlicht dieses.

#### 4.1.6.2. Detektion von Glutathion in lebenden Zellen

Das Tripeptid Glutathion (GSH, L-Glutamyl-L-Cysteinglycin) ist in allen lebenden Zellen in relativ hohen Konzentrationen (0,5 bis 10 mM) vorhanden und ist damit das am meisten verbreitete intrazelluläre Thiol. Glutathion ist ein multifunktionales Protein und hat direkt oder indirekt Einfluss auf viele wichtige biologische Vorgänge. So wird es im Zusammenhang mit Enzymaktivität und -regulation, Endokrinologie, Zellstoffwechsel sowie Biosynthese von Makromolekülen, Kompensation von Strahlungsschäden und oxidativem Stress, Metabolismus von Medikamenten und Umwelttoxinen, sowie Entstehung und Behandlung von Krebs erforscht [38]. Eine der wichtigsten biologischen Funktionen von GSH ist die Verhinderung oxidativer Schäden in Zellen und Geweben [39]. Solche Schäden können beispielsweise zu Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer führen [40, 41].

Glutathion inaktiviert toxischen Singulett-Sauerstoff und sehr reaktive Hydroxylradikale. Im Zytosol reduziert es über eine Glutathionperoxidase-katalysierte Reaktion Wasserstoffperoxid, Lipidhydroperoxide und diverse organische Hydroperoxide. Dabei wird Glutathion zum zytotoxischen Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert. GSSG wird entweder in einem NADPH/H<sup>+</sup> verbrauchenden Prozess von dem Enzym Glutathionreduktase wieder zu GSH reduziert oder aus der Zelle exportiert. Des Weiteren spielt GSH eine Rolle bei reduktiven Prozessen, die essentiell für die Synthese und Degradation von Proteinen sind, sowie für die Bildung von Desoxyribonukleotid-Vorläufern der DNA. In vielen Enzymreaktionen fungiert GSH als Coenzym, wie z.B. in Glyoxylase-katalysierten Reaktionen. Und nicht zuletzt hat Glutathion eine Schutzfunktion vor Krebsentstehung. Die letztendlich reaktiven Formen vieler chemischer Karzinogene sind Elektrophile, die durch das GSH-abhängige Enzym GSH-S-Transferase entgiftet werden können. In einigen Krebsarten (Darmkrebs, Leberkrebs, Hautkrebs) wurden ungewöhnlich hohe Mengen solcher Transferasen gefunden [42]. Hohe Dosen von oral verabreichtem GSH konnten im Tierversuch eine durch Aflatoxine induzierte Karzinogenese signifikant reduzieren [38].

Es wurde eine Vielzahl an Methoden entwickelt, um Glutathion in Zellen zu bestimmen. Diese Methoden sind jedoch immer mit einer mehr oder weniger empfindlichen bzw. aufwendigen Aufarbeitung von Zellhomogenaten verbunden. Eine unerwünschte Oxidation von GSH zu GSSG bereitet dabei oft Schwierigkeiten. Glutathion in einzelnen, lebenden Zellen zu detektieren und gar die Dynamik genügend großer GSH-Konzentrationen in einem Mikroskop zu verfolgen ist bisher



**Abbildung 4.8.:** Kreuzkorrelation auf einem GSH Kristall (durchgezogene Linie) und außerhalb des Kristalls (gepunktete Linie).

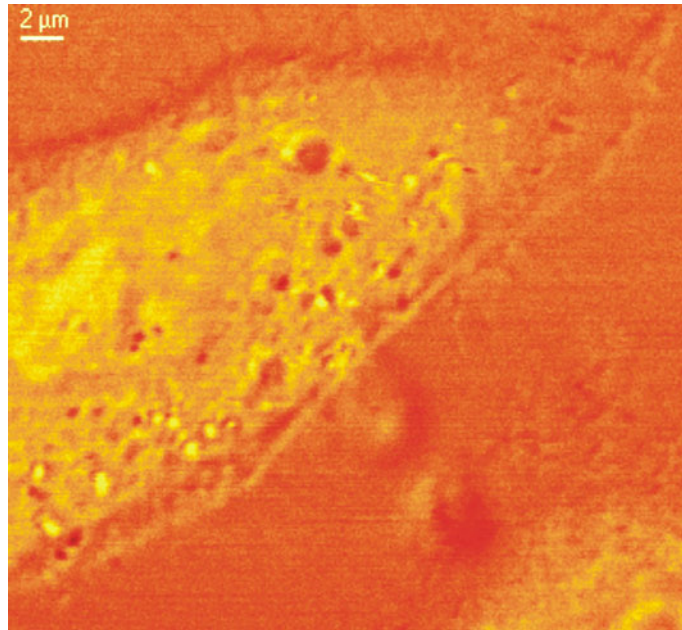
nicht möglich. Für eine Fluoreszenz-Markierung ist das GSH-Molekül zu klein.

In der CARS-Mikroskopie sollte es durch Messung der spezifischen S-H Schwingungsbande in Wasser bei  $2582\text{ cm}^{-1}$  [43] aber möglich sein, ein Bild einer Zelle zu gewinnen, welches die Konzentrationsverteilung von freiem, intrazellulärem GSH widerspiegelt.

Als erster Test wurden GSH Kristalle vermessen, um die prinzipielle Möglichkeit zu belegen, dass GSH mit spektral fokussierter CARS Mikroskopie detektiert werden kann. Diese sollten ein starkes Signal bei der S-H Schwingung bei  $2526\text{ cm}^{-1}$  zeigen [43]. Eine Aufnahme der Kreuzkorrelation bei dieser Wellenlänge hat diese Annahme bestätigt (Abbildung 4.8).

Für eine Messung an einem lebenden Objekt wurden He-La-Zellen ausgewählt. Diese wurden bei  $2582\text{ cm}^{-1}$  detektiert (siehe Abbildung 4.9). Diese Frequenz entspricht der S-H Streckschwingung in Wasser. Die Aufnahmen zeigen deutlich Vesikel, welche ein signifikant höheres Signal aufweisen als die Umgebung. Es könnte sich hierbei um Vesikel mit einem hohen GSH Anteil handeln. Andere Strukturen wie zum Beispiel Membranen oder Mitochondrien haben einen geringen Anteil an GSH (bzw. dessen Bestandteil Cystein) und erscheinen somit im Bild dunkel.

Schwieriger gestaltet sich die Aufnahme einer Kreuzkorrelation innerhalb einer Zelle. Erstens erhält man aufgrund der niedrigeren Konzentration weniger Signal und zweitens ist das Hintergrundsignal durch die Umgebung recht hoch und ver-



**Abbildung 4.9.:** He-La-Zelle bei der S-H Streckschwingung ( $2582\text{ cm}^{-1}$ ). Bildgröße:  $32 \times 29,5\ \mu\text{m}^2$  ( $320 \times 295$  Pixel). Integration über 2000 Laserpulse pro Pixel.

schlechtert somit das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis. Die Dynamik in der Zelle verursacht zusätzlich eine Bewegung der Vesikel. Durch die lange Aufnahmedauer der Kreuzkorrelation konnte diese nicht gemessen werden, ohne dass sich das Vesikel aus dem Fokus heraus bewegt hat.

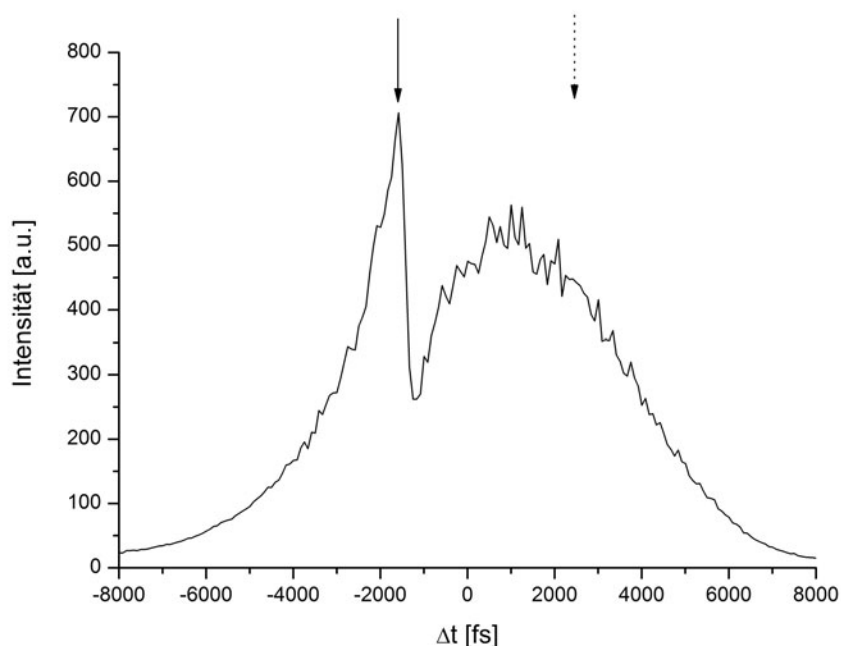
Für beide dargestellten biologischen Experimente konnte gezeigt werden, dass die spektral fokussierte CARS-Mikroskopie auch in lebenden Systemen anwendbar ist. Vor allem die Möglichkeit verschiedene Schwingungsbanden und somit verschiedene chemische Substanzen zu detektieren ohne die Probe verändern zu müssen, ermutigt zum Lösen zahlreicher bis jetzt offener Problemstellungen. Allerdings sollten dabei auch die Grenzen der Methode - wie am Beispiel von Glutathion demonstriert - beachtet werden.

### 4.1.7. Dual-timeshift CARS

Bei allen bisherigen Versuchen war die Aufnahme einer Kreuzkorrelation der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Für eine vollständige Kreuzkorrelation benötigte man bei dem hier verwendeten Aufbau etwas mehr als 5 Minuten.

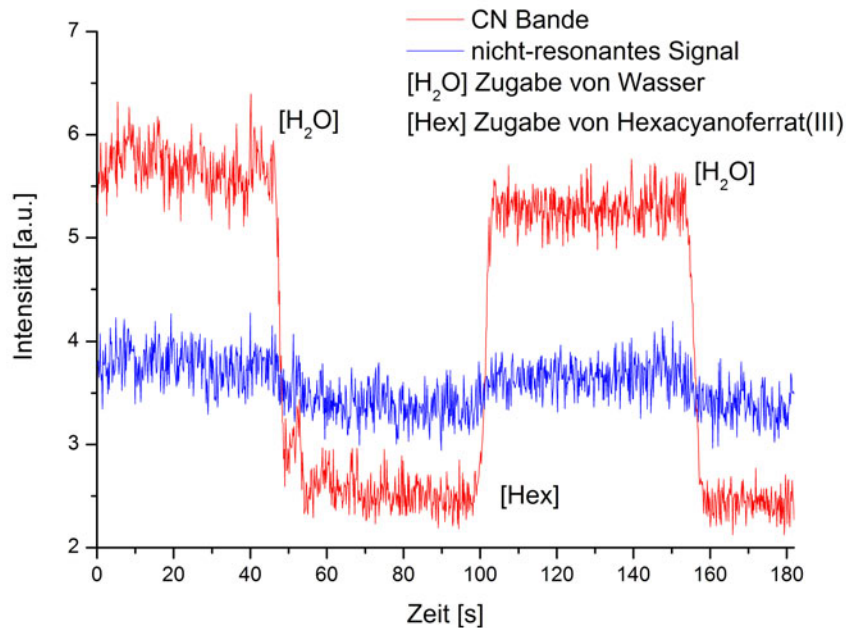
Als Lösung für dieses Problem wurde eine Methode entwickelt, die zwei spektrale Positionen nahezu gleichzeitig abfragen kann. Hierzu wird der Stokes-Anregungsstrahl mittels eines Strahlteilers in zwei einzelne Strahlen aufgetrennt (siehe 3.1.5). Hierauf wird einer der beiden Strahlen zeitlich verzögert. Die Einstellung wird so vorgenommen, dass einer der Strahlen der Resonanz in der Probe entspricht und der andere außerhalb der Resonanz eingestellt wird. Somit wird der nicht-resonante Hintergrund separat detektiert und kann später von dem eigentlichen Signal abgezogen werden.

Als Probe wurde in eine Flusskammer eine 0,1 molare Hexacyanoferrat(III)-Lösung in Wasser eingeleitet. Die Intensität der Cyanidbande bei  $2130\text{ cm}^{-1}$  und Intensität in einem vollständig nicht-resonanten Teil des Spektrums wurden aufgenommen (siehe Abbildung 4.10).



**Abbildung 4.10.:** Kreuzkorrelation einer 0,1 molaren Hexacyanoferrat(III) Lösung. Für die dual-timeshift CARS Messung wurde die Intensität der Cyanidbande bei  $2130\text{ cm}^{-1}$  (durchgezogener Pfeil) und die Intensität des nicht-resonanten Hintergrunds (gestrichelter Pfeil) gemessen.

Nun wurde reines Wasser in die Flusskammer eingeleitet. Die Hexacyanoferrat(III)-

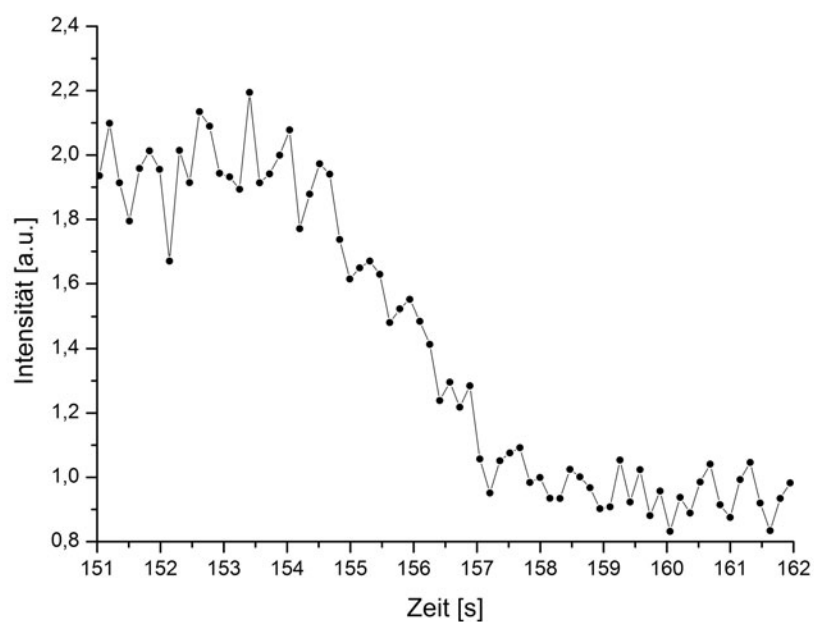


**Abbildung 4.11.:** Dual-timeshift CARS Messung in einer Flusskammer. Es wurde abwechselnd eine 0,1 molare Lösung Hexacyanoferrat(III) und Wasser durchgeleitet. Das resonante Signal wurde bei der C-N Schwingungsbande ( $2129\text{ cm}^{-1}$ ) aufgenommen. Das nicht-resonante Signal außerhalb der Bande.

Lösung wurde dadurch aus der Flusskammer herausgespült und ein deutlicher Intensitätsabfall des Cyanidsignals konnte beobachtet werden. Auch im nicht-resonanten Signal war ein kleinerer Abfall aufgrund der unterschiedlichen Dichte der Lösung zu beobachten. Nach erneutem Befüllen der Kammer mit der Hexacyanoferrat(III)-Lösung konnte ein Anstieg der Intensität bei der Cyanidbande detektiert werden. Dieser Vorgang wurde mehrere Male mit reproduzierbarem Ergebnis wiederholt.

Eine Messung ist exemplarisch in Abbildung 4.11 dargestellt. Dividiert man das Signal der C-N Schwingungsbande durch das nicht-resonante Signal, so erhält man ein vollständig resonantes Signal. Dieses Signal ist für ein Zeitfenster zwischen 151 und 162 Sekunden in Abbildung 4.12 dargestellt. In dieser Abbildung ist auch die hohe zeitliche Auflösung erkennbar.

Anhand dieses Beispiels konnte die Stärke der dual-timeshift CARS Mikroskopie demonstriert werden. Die Möglichkeit einer schnellen Detektion einer Schwingungsbande frei vom nicht-resonanten Hintergrund eröffnet vielfältige Anwendungsbereiche. So sind zum Beispiel quantitative Konzentrationsmessungen innerhalb von verschiedenen Systemen wie etwa lebenden Zellen denkbar.



**Abbildung 4.12.:** Detailausschnitt aus Abbildung 4.11 während der Zugabe von Wasser (Zeitfenster zwischen 151 und 162 Sekunden). Die Intensität des vollständig resonanten Signals bei der C-N Schwingungsbande ist gegen die Zeit aufgetragen. Die Intensität fällt ab, da sich immer weniger Hexacyanoferrat(III)-Moleküle im Fokus befinden.

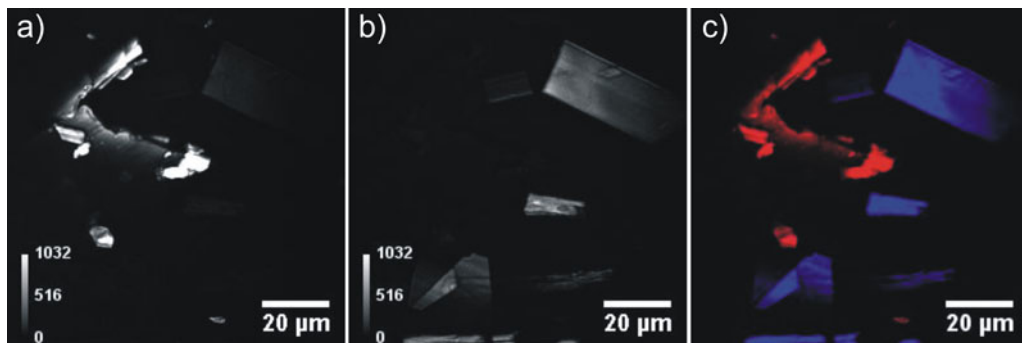


## 4.2. Dual-pump CARS

Die Vorzüge der dual-pump CARS-Methode werden anhand der Mischung von zwei verschiedenen Kristallen und anhand von *Caenorhabditis elegans* Nematoden gezeigt.

### 4.2.1. Gleichzeitige Aufnahme von zwei Schwingungen

Bei dem ersten Experiment wurde eine Mischung aus deuterierten und nicht-deuterierten Tripalmitin-Kristallen hergestellt. Es wurden Bilder gleichzeitig in zwei Kanälen aufgenommen (siehe 3.2), wobei im ersten Kanal die symmetrischen  $\text{CH}_2$  Streckschwingung bei  $2845\text{ cm}^{-1}$  detektiert wurde und im zweiten Kanal die C-D Schwingung bei  $2115\text{ cm}^{-1}$ . Dies entsprach einer Wellenlänge vom CARS Signal von  $663\text{ nm}$  im ersten Kanal und  $734\text{ nm}$  im zweiten Kanal.



**Abbildung 4.13.:** Dual-pump CARS Bild einer Mischung aus deuteriertem und nicht-deuteriertem Tripalmitin. a) Bild bei der  $\text{CH}_2$  Streckschwingung ( $2845\text{ cm}^{-1}$ ), b) Bild bei der C-D Schwingung ( $2115\text{ cm}^{-1}$ ), c) Überlagerung der beiden Bilder (Daten aus Bild a) rot, Daten aus Bild b) blau). Bildgröße  $100 \times 100\ \mu\text{m}^2$ . Aufnahmezeit: 60 s pro Bild.

Das Ergebnis der Messung ist in Abbildung 4.13 dargestellt. Man kann klar erkennen, dass es keine Mischsignale zwischen den beiden Kanälen gibt. Das heißt, dass die C-H Strukturen keinen Beitrag in der Detektion der C-D Schwingung leisten und umgekehrt. Zur besseren Veranschaulichung der Probe ist ein zweifarbiges Overlay-Bild dargestellt.

Analog zur dual-timeshift CARS-Mikroskopie kann somit eine Probe bei zwei verschiedenen Frequenzen detektiert werden. Der Vorteil der dual-pump CARS-Methode liegt darin, dass die Detektion gleichzeitig erfolgt. Bei der dual-timeshift

CARS-Mikroskopie hingegen können nacheinander verschiedene Banden in einem Bereich von ungefähr  $250\text{ cm}^{-1}$  (Bandbreite der fs-Anregungspulse) abgefragt werden, ohne dass eine Veränderung am Lasersystem vorgenommen werden muss.

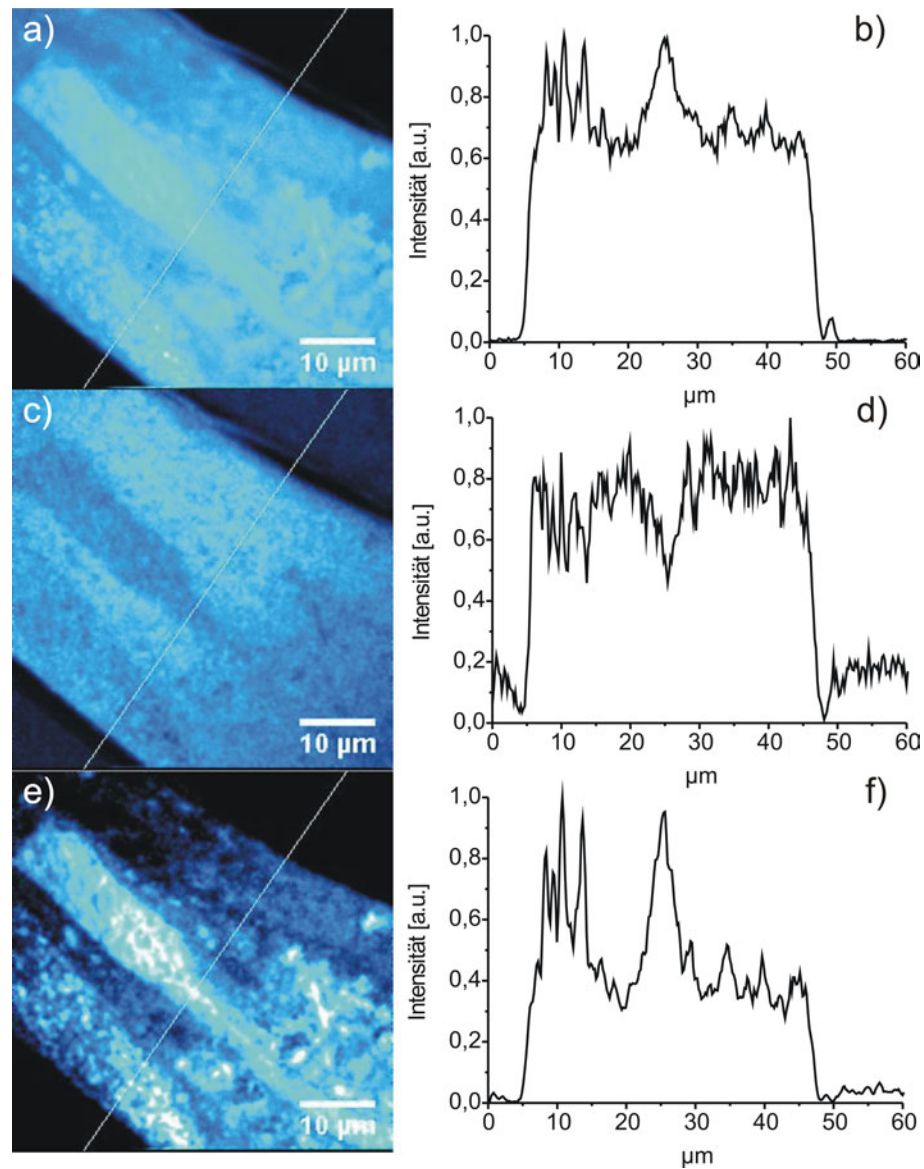
### 4.2.2. Unterdrückung des nicht-resonanten Signals

Bei dem zweiten Experiment wurde ein lebender *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), eine Nematode (Fadenwurm) untersucht. Dieser litt an Nahrungsmangel und hatte somit nur wenige Fettreserven angereichert. Um diesen Sachverhalt zu verdeutlichen, wurden Aufnahmen vor allem in der Nähe des Magen-Darm-Traktes vorgenommen, wo sich normalerweise die meisten Fettreserven befinden [44, 45].

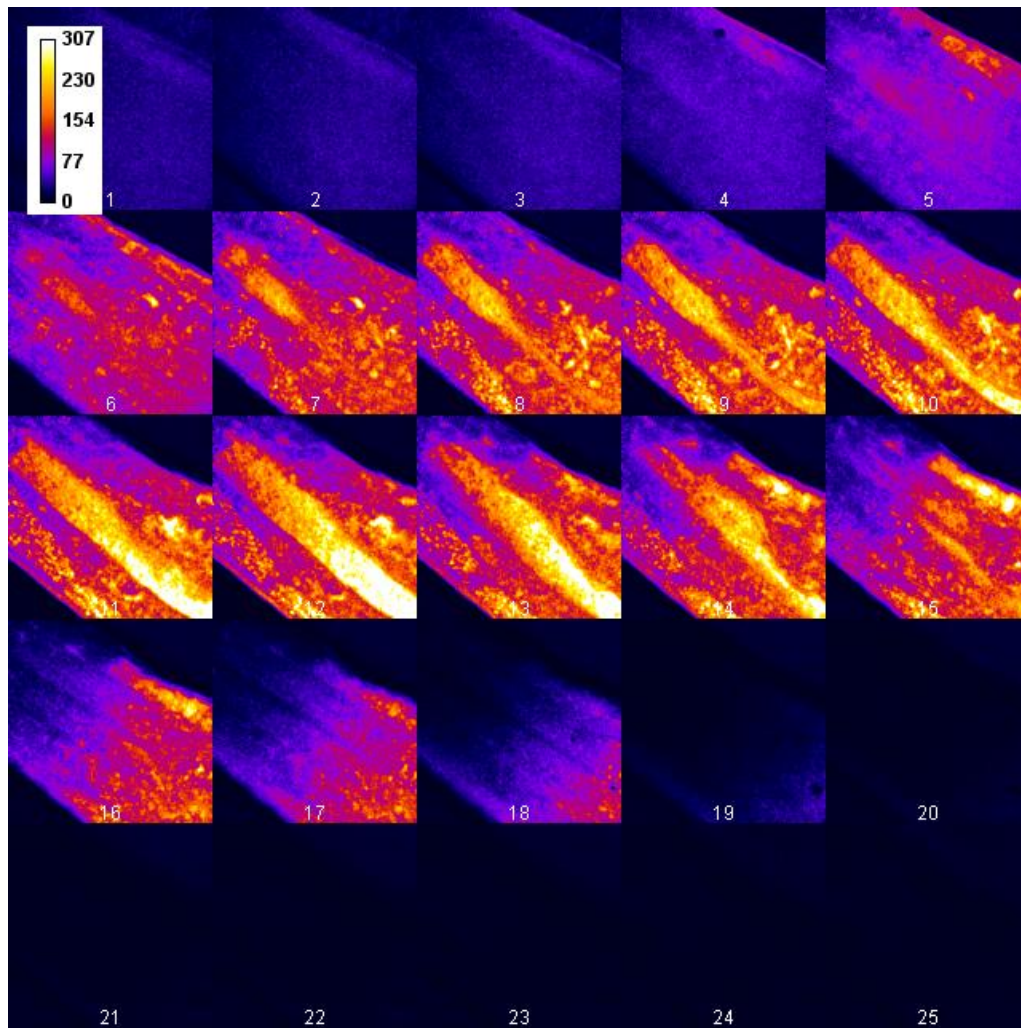
Es wurden Bilder gleichzeitig in zwei Kanälen aufgenommen. Im ersten Kanal wurde die symmetrische  $\text{CH}_2$  Streckschwingung bei  $2845\text{ cm}^{-1}$  detektiert und im zweiten Kanal die C-D Schwingung bei  $2115\text{ cm}^{-1}$ . Nachdem in der *C. elegans* Nematode keine deuterierten Verbindungen vorkommen, ist das Signal im zweiten Kanal als ein rein nicht-resonantes Signal zu deuten. Eventuelle Strukturen im nicht-resonanten Bild sind ein Ergebnis der unterschiedlichen Dichte in der Probe.

Mittels einer Umrechnung (siehe 2.6) kann das nicht-resonante Signal im ersten Kanal ermittelt und abgezogen werden. Das vollständig resonante Bild ist in Abbildung 4.14 e dargestellt. Man kann deutlich die wenigen Fettspeicher und den Magen-Darm-Trakt erkennen. Vergleicht man die Intensität im Kanal 1 (Abbildung 4.14 b) und im vollständig resonanten Bild (Abbildung 4.14 f), so stellt man eine Verbesserung im Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis um den Faktor 3 fest.

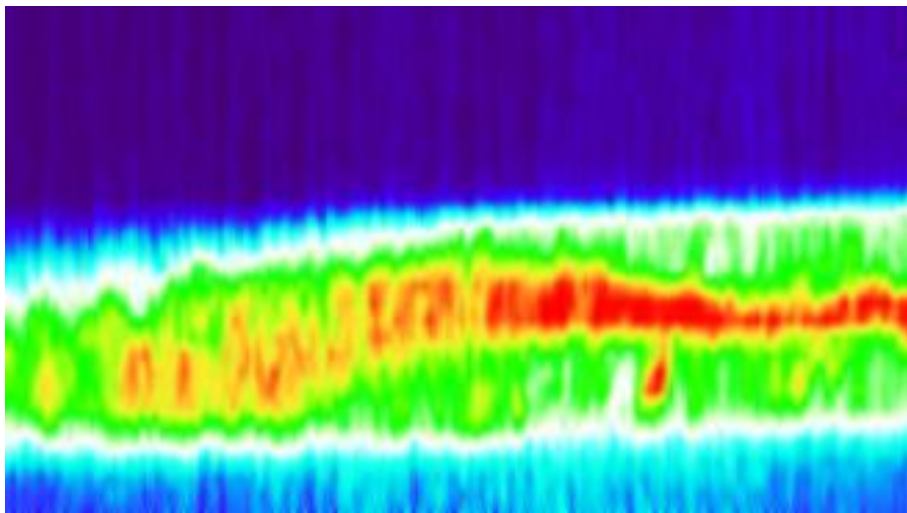
Zusätzlich wurde auch eine Bildersequenz entlang der z-Achse im Abstand von  $1\text{ }\mu\text{m}$  aufgenommen (Abbildung 4.15). Die Bilder entsprechen einem Höhenprofil, welches zusätzlich eine chemische Selektivität aufweist. Analog zu den Einzelaufnahmen erscheinen auch im Höhenprofil Strukturen sehr intensiv, wenn sie viele C-H Bindungen aufweisen. Dies ist vor allem für Lipide der Fall. Somit kann man in Abbildung 4.16 deutlich den Magen-Darm-Trakt als hellen Streifen in der Wurmmitte erkennen.



**Abbildung 4.14.:** Dual-pump CARS Bild einer lebenden *C.elegans* Nematode. a) Bild bei der  $\text{CH}_2$  Streckschwingung ( $2845\text{ cm}^{-1}$ ), c) Bild bei der C-D Schwingung ( $2115\text{ cm}^{-1}$ , nicht-resonant), e) vollständig resonantes Bild. Die jeweiligen Profile entlang der eingezeichneten Linie sind jeweils rechts zu finden. Bildgröße  $50 \times 50\ \mu\text{m}^2$ . Aufnahmezeit: 20 s pro Bild.



**Abbildung 4.15.:** Vollständig resonantes dual-pump CARS-Bild einer lebenden *C.elegans* Nematode. Jedes Bild ist in einer anderen Ebene aufgenommen worden. Ausgehend von Bild 1 liegen alle darauf folgenden Bilder jeweils um  $1\ \mu\text{m}$  höher. Bildgröße jeweils  $50 \times 50\ \mu\text{m}^2$ . Aufnahmezeit: 20 s pro Bild.



**Abbildung 4.16.:** Vollständig resonantes dual-pump CARS-Bild einer lebenden *C.elegans* Nematode. Intensität entlang der  $xz$  Achse (Längsschnitt durch die Mitte der Nematode), zusammengesetzt aus 30 Schnitten entlang der  $z$ -Achse. Bildgröße  $50 \times 30 \mu\text{m}^2$ . Aufnahmezeit: 20 s pro Schnitt.



# 5. Zusammenfassung der Ergebnisse

## 5.1. Spektral fokussierte CARS-Mikroskopie

Die im vorigen Abschnitt dargestellten Messungen belegen die vielfältigen Möglichkeiten zur Anwendung der spektral fokussierten CARS-Mikroskopie. Insbesondere kann man mit einem fs-System eine hohe spektrale Auflösung und somit auch chemische Selektivität erreichen, ohne die Vorteile der kurzen Laserpulse aufgeben zu müssen. Zu solchen Vorteilen zählt vor allem das breite Spektrum, welches mit einer einstellbaren Genauigkeit innerhalb einer relativ kurzen Zeit abgefragt werden kann. Die Einführung von dual-timeshift CARS ermöglicht eine sehr effektive Unterdrückung des nicht-resonanten Hintergrunds oder die Detektion von zwei Schwingungen nahezu gleichzeitig.

Eine Unterscheidung zweier verschiedener Polymere konnte am Beispiel von Polystyrol und PMMA sehr eindrucksvoll demonstriert werden. Dies eröffnet breite Anwendungsmöglichkeiten in der Materialforschung.

Erste Möglichkeiten der biologischen Anwendung konnten anhand der Messungen an Glutathion gezeigt werden, ein Nachweis, welcher bis jetzt mit keiner anderen Methode zufriedenstellend durchgeführt werden konnte. Dieses Experiment belegt aber auch, dass es noch Erweiterungsmöglichkeiten der Methode gibt.

Die Untersuchung von Lipiden ist die bis jetzt am weitesten fortgeschrittene Anwendung der CARS-Mikroskopie. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die spektral fokussierte CARS-Mikroskopie durchaus Potential hat. So können nicht nur die Strukturen abgebildet werden, es ist auch die Unterscheidung einzelner Lipide durch deren CARS-Spektrum denkbar [46].

## 5.2. Dual-pump CARS

Dual-pump CARS eröffnet eine weitere Möglichkeit, ein vollständig resonantes Signal einer Probe zu erhalten. Der große Vorteil liegt darin, dass die Daten gleichzeitig aufgenommen werden können und es keiner komplizierten Auswertung bedarf.

Zusätzlich können gleichzeitig Bilder bei zwei verschiedenen Schwingungsfrequenzen aufgenommen werden.

### 5.2.1. Unterdrückung des nicht-resonanten Hintergrunds

Das nicht-resonante Signal ist in vielen biologischen Proben sehr hoch. Somit gestaltet sich die Untersuchung kleiner Details sehr schwierig. Mitunter ist es sogar unmöglich zu unterscheiden, ob eine Struktur nur aufgrund ihrer im Vergleich zur Umgebung unterschiedlichen Dichte oder aufgrund von Resonanzen eine hohe Intensität aufweist. Eine Unterdrückung des nicht-resonanten Signals ist somit unumgänglich.

Insbesondere bei biologischen Proben ist es wichtig, dass die Bilder schnell aufgenommen werden können. Denn die Strukturen in der Zelle (z.B. Vesikel) unterliegen einer kontinuierlichen Bewegung. Würde man das resonante Signal zu einem anderen Zeitpunkt aufnehmen als das nicht-resonante, könnte man nicht mehr mit Sicherheit sagen, dass es von den gleichen Strukturen stammt. Genau dieser Punkt ist das wichtigste Argument für die dual-pump CARS-Methode, denn hier werden das resonante Signal und der nicht-resonante Hintergrund gleichzeitig aufgenommen. Zusätzlich können durch die Verwendung eines einzelnen Lasers mögliche Schwankungen in der Laserleistung vernachlässigt werden, denn sie wirken sich gleichermaßen in beiden Detektionskanälen aus.

Die Messungen an den *C.elegans* Nematoden zeigen eindrucksvoll, wie durch Verwendung von dual-pump CARS selbst kleine Details in einem lebenden Organismus aufgelöst werden können. Zusammen mit der guten zeitlichen Auflösung sind somit Antworten auf verschiedene biologisch-medizinische Fragestellungen denkbar. So kann zum Beispiel die Verteilung von Lipiden untersucht und somit eines der größten gesundheitlichen Probleme der Industrienationen, das Übergewicht besser verstanden werden.

### 5.2.2. Gleichzeitige Detektion von zwei Schwingungen

Wie schon im vorigen Abschnitt erwähnt, spielt die gleichzeitige Detektion des Signals bei einer resonanten Schwingung und außerhalb dieser eine wichtige Rolle. Häufig wäre es aber wünschenswert, zwei Schwingungen gleichzeitig zu beobachten. Zum Beispiel dann, wenn eine Reaktion abläuft und man währenddessen das Verhältnis zwischen den Edukten und den Produkten ermitteln möchte. Oder falls man an der Verteilung von zwei Stoffen interessiert ist. In beiden Fällen ist es wichtig,



spektral selektive und schnelle Informationen zu erhalten. Genau diese Anforderungen kann die dual-pump CARS Mikroskopie erfüllen, denn hier kann man gleichzeitig das Signal bei zwei verschiedenen Frequenzen detektieren und vergleichen. Dies könnte vor allem in der Materialforschung (beispielsweise bei der Untersuchung der Verteilung von Kopolymeren in einer Substanz) eine Anwendung finden, ist aber auch vom biologischen Standpunkt her interessant.



## 6. Ausblick

Seit der Entwicklung der modernen CARS-Mikroskopie war die größte Herausforderung die praktikable Unterdrückung des nicht-resonanten Hintergrunds. In letzter Zeit wurden mehrere Methoden entwickelt, die diese Herausforderung meistern können. Zwei davon sind in dieser Arbeit vorgestellt worden (spektrales Fokussieren und dual-pump CARS).

Die Entwicklung dieser Methoden eröffnet neue Möglichkeiten in der Anwendung der CARS-Mikroskopie. Die ersten Experimente konzentrieren sich hauptsächlich auf die Beobachtung der Verteilung von Lipiden in Organismen. Als Beispiele hierfür können auch die in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtungen an He-La-Zellen und an *C. elegans* Nematoden angeführt werden.

Es werden aber sicherlich bald auch weitere Messungen an anderen zellulären Strukturen durchgeführt werden. Einen ersten Ausblick auf weitere zukünftige Anwendungen konnte mit der Detektion von Glutathion erbracht werden.

Der CARS-Mikroskopie kommt zu Gute, dass es immer mehr geeignete kommerzielle Geräte gibt. Somit ist die Verbreitung der Methode nicht mehr auf wenige spezialisierte Gruppen weltweit beschränkt und könnte in naher Zukunft als eine Standardmethode in der Diagnostik etabliert werden.

Darüberhinaus sollte das Potential der CARS-Mikroskopie für die Materialforschung nicht außer Acht gelassen werden. Mehrere in dieser Arbeit vorgestellte Messungen lassen das klar erkennen. Insbesondere in der Polymerforschung ist die CARS-Mikroskopie eine der wenigen verfügbaren Methoden, um Polymere chemisch selektiv abzubilden, ohne dass der Herstellungsprozess dadurch beeinflusst wird.



## **Teil II.**

**Aufbau sowie Charakterisierung einer  
Apparatur zur dreidimensionalen  
Verfolgung von Einzelobjekten in  
Echtzeit**



## 7. Einführung

Im vorangegangenen Abschnitt wurde detailliert auf die Möglichkeiten der CARS-Mikroskopie eingegangen. Trotz vielfältiger Einsatzmöglichkeiten ist jene Methode vor allem durch die hohe benötigte Konzentration des detektierten Stoffes und die Aufnahmegeschwindigkeit (wegen der Signalintensität) limitiert. Wenn es - wie im Folgenden beschrieben - um die Verfolgung von einzelnen kleinen Partikeln in Echtzeit geht, ist die Fluoreszenzmikroskopie die bessere Wahl.

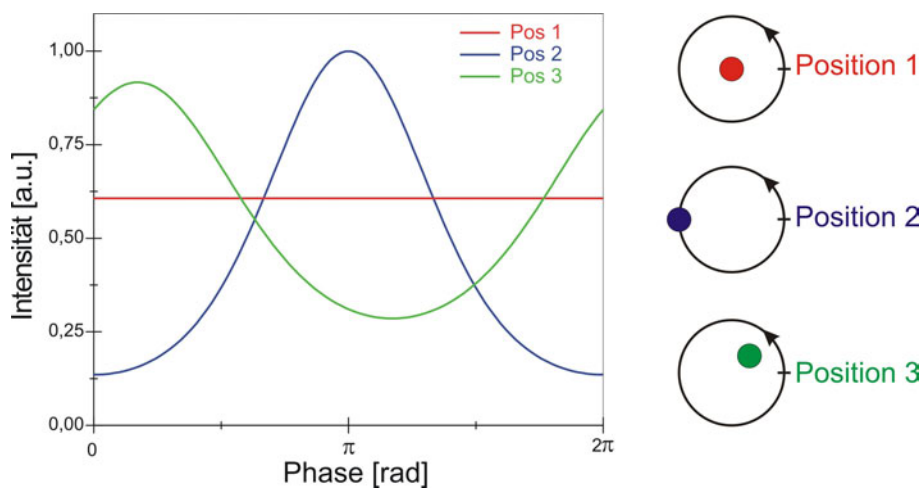
Was benötigt man aber nun, um einzelne Partikel in lebenden Organismen verfolgen zu können? Zunächst ist für die Echtzeit-Beobachtung entscheidend, dass die Position des Partikels schnell bestimmt werden kann und auch schnell auf seine Bewegung reagiert werden kann. Zudem ist es wichtig, gleichzeitig Informationen über die Umgebung zu erhalten, um die Trajektorie des Partikels besser nachvollziehen zu können.

Die Standardmethode zum Verfolgen von Partikeln ist bis jetzt die Weitfeld-Mikroskopie [47, 48, 49, 50]. Sie liefert in einer relativ kurzen Zeit (unter hundert Millisekunden) ein Bild des Partikels und dessen Umgebung. Problematisch ist hierbei, dass diese Information nur zweidimensional ist. Zusätzlich ist die axiale Auflösung schlechter als bei einem konfokalen Mikroskop. Man kann somit oft nicht unterscheiden, ob sich ein Partikel beim Membrandurchtritt innerhalb oder außerhalb einer Zelle befindet. Sobald auch die Bewegung entlang der optischen Achse verfolgt werden soll, ist es notwendig, jeweils mehrere Ebenen aufzunehmen [51, 52]. Die zur Positionsbestimmung benötigte Zeit steigt erheblich. Des Weiteren verzichtet man bei dieser Methode normalerweise auf eine Bestimmung der Partikelposition in Echtzeit. Man analysiert die Daten erst im Nachhinein. Von Vorteil ist, dass mehrere Partikel gleichzeitig beobachtet werden können und sich somit bessere statistische Aussagen treffen lassen können.

Für die Echtzeit-Verfolgung von einzelnen Partikeln, wurde zwar auch die Weitfeld-Mikroskopie angewendet [53], allerdings mit einer niedrigen zeitlichen Auflösung (mehrere 100 ms). Ein interessanterer Ansatz ist das zirkuläre Abfahren der Probe mit dem Laser [54, 55] in einem konfokalen Aufbau. Dieser Ansatz wird auch in der hier vorgestellten Arbeit verfolgt und wird nun näher erläutert.

Um die dreidimensionale Position eines fluoreszenten Partikels zu bestimmen, wird

zunächst seine Position in der  $x,y$ -Ebene bestimmt. Hierzu könnte man die Probe zeilenweise Abrastern und dann aus der detektierten Intensität die Position des Partikels ableiten. Allerdings ist diese Vorgehensweise verhältnismäßig langsam. Eine schnellere Methode stellt das Verfahren dar, bei dem der Anregungslaser um das Partikel in einem Kreis gefahren wird. Genauer gesagt, bewegt man hierbei den Anregungslaser so in einem Kreis um das Partikel herum, dass er das Partikel dabei noch anregt, und detektiert die Fluoreszenz-Intensität in Abhängigkeit von der Phase. Der Intensitätsverlauf ist dann von der Position des Partikels (siehe Abbildung 7.1) abhängig.



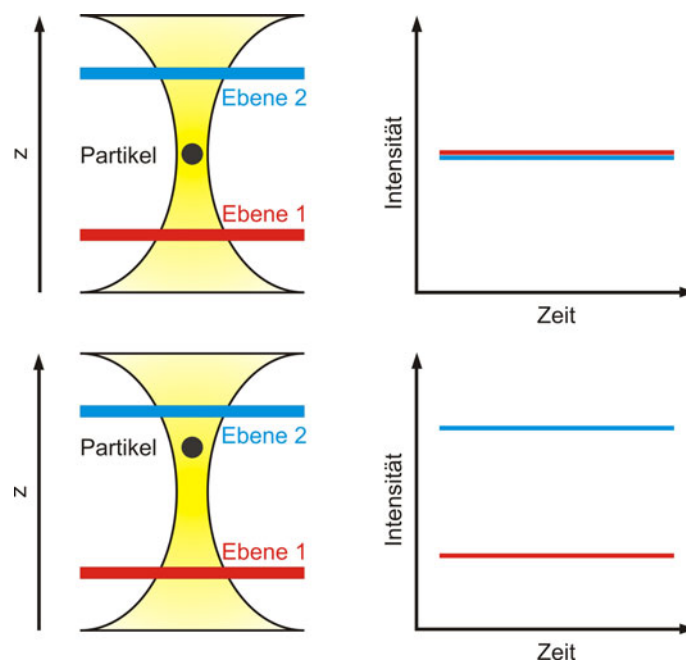
**Abbildung 7.1.:** Darstellung der Fluoreszenz-Intensitätsverteilung eines Partikels während des Abfahrens eines Kreises in der  $x,y$ -Ebene für verschiedene Partikelpositionen. Befindet sich das Partikel genau in der Mitte vom abgefahrenen Kreis (Position 1, rote Kurve), so ist die detektierte Intensität über den gesamten Kreis hin konstant. Liegt das Partikel genau auf dem abgefahrenen Kreis (Position 2, blaue Linie), wird bei der entsprechenden Phase (in diesem Fall  $180^\circ$  bzw.  $\pi$  rad) ein Maximum in der Intensität detektiert. Bei einer Position des Partikels zwischen diesen beiden Extremen (Position 3, grüne Linie) wird ein kleineres Maximum in der Intensität detektiert.

Befindet sich das Partikel genau in der Mitte vom abgefahrenen Kreis, ist die detektierte Intensität konstant. Bei einer anderen Position ist ein Maximum in der detektierten Intensität zu beobachten. Die Lage dieses Maximums entspricht der Phase, bei der das Partikel dem abgefahrenen Kreis am nächsten ist. Befindet sich das Partikel direkt auf dem abgefahrenen Kreis, so erreicht die detektierte Intensität einen maximalen Wert. Bei einer Lage des Partikels innerhalb des Kreises wird eine niedrigere Intensität detektiert.

Eine genau Herleitung, wie die detektierte Intensität von der Position des Partikels abhängt, ist in Kapitel 8.3 zu finden. Zunächst genügt die Erkenntnis, dass sich aus der detektierten Intensität beim Abfahren eines Kreises die Position vom Partikel in der  $x,y$ -Ebene bestimmen lässt.



Zusätzlich zu der Position in der x,y-Ebene benötigt man noch die z-Position, um die Lage des Partikels vollständig beschreiben zu können. Betrachtet man den Anregungsfokus entlang der z-Achse (siehe Abbildung 7.2), so werden mehrere z-Ebenen beleuchtet. Bei einem konfokalen Mikroskop kann mit Hilfe einer Lochblende (genaue Funktionsweise siehe Kapitel 8.2) eine dieser Ebenen detektiert werden. Möchte man mehrere Ebenen detektieren, so kann man entweder das Objektiv verfahren [56] oder die Position der Lochblende verändern. Detektiert man die Fluoreszenz-Intensität in jeweils einer Ebene unter- und oberhalb des Partikels, so kann auf dessen z-Position geschlossen werden. Dieser Sachverhalt wird in Abbildung 7.2 verdeutlicht.



**Abbildung 7.2.:** Die detektierte Fluoreszenz-Intensität in zwei verschiedenen z-Ebenen in Abhängigkeit von der Position des fluoreszenten Partikels. Der Anregungsfokus ist in gelb dargestellt. Oben: das Partikel befindet sich genau zwischen den beiden Ebenen (Ebene 1, rote Linie und Ebene 2, blaue Linie). Die detektierte Intensität ist in beiden Ebenen gleich. Unten: das Partikel befindet sich näher an der Ebene 2. Die detektierte Intensität in Ebene 2 ist höher als in Ebene 1.

Befindet sich das Partikel genau zwischen den beiden Ebenen, so wird in beiden Ebenen die gleiche Intensität gemessen (siehe Abbildung 7.2 oben). Befindet sich das Partikel näher an einer der beiden Detektionsebenen, so wird in dieser Ebene eine höhere Intensität detektiert (siehe Abbildung 7.2 unten).

Zusammenfassend kann somit die Position eines fluoreszenten Partikels in allen drei Dimensionen durch Abfahren eines Kreises mit den Anregungslaser um das Partikel und der Detektion der Fluoreszenz-Intensität in zwei verschiedenen z-Ebenen bestimmt werden.

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode, die die Positionsbestimmung eines fluoreszenten Partikels in allen drei Dimensionen ohne Bewegung des Objektivs ermöglicht. Zusätzlich zum konfokalen Aufbau zur Partikelverfolgung sollte ein Weitfeld-Aufbau in dasselbe Mikroskop integriert werden. Jener ermöglicht es, gleichzeitig mit der Bewegung der Partikel auch die Umgebung zu detektieren. Um die Besonderheiten eines solchen Aufbaus besser nachvollziehen zu können, wird nun zunächst auf einige theoretische Grundlagen der konfokalen und Weitfeld-Mikroskopie eingegangen. Anschließend werden der experimentelle Aufbau und die Routine beschrieben, die zur Ermittlung der Position des Partikels verwendet wird. Im Abschnitt 10 werden die ersten Experimente, die vorwiegend das System charakterisieren, beschrieben. Einen kurzen Ausblick, welche Möglichkeiten diese Methode für die Beobachtung biologischer Proben eröffnet, liefert Abschnitt 11, wo die ersten Testergebnisse vorgestellt werden. Einen Vergleich zu anderen bisher veröffentlichten Verfahren liefert Abschnitt 12. Die vorliegende Arbeit wird mit einer kurzen Zusammenfassung der Ergebnisse (Abschnitt 13) und einem Ausblick (Abschnitt 14) abgeschlossen.

# 8. Theorie für ein konfokales und ein Weitfeld-Mikroskop

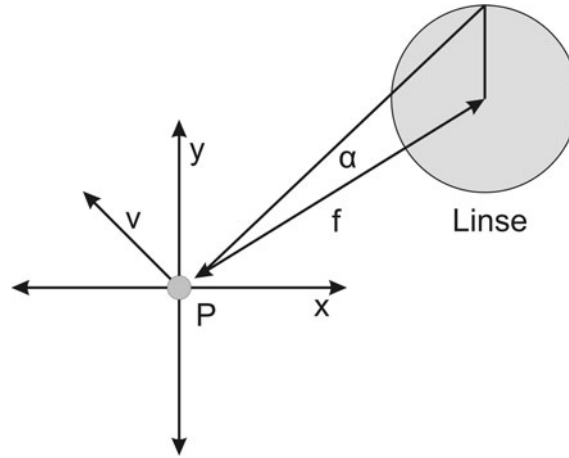
Um die Einschränkungen, denen sowohl das konfokale als auch das Weitfeld-Mikroskop unterliegen, nachvollziehen zu können, wird zunächst auf zwei grundlegende Aspekte eingegangen. Zum einen ist es die Verteilung der Lichtintensität ausgehend von einem Punkt (Abschnitt 8.1.1) und zum anderen die daraus resultierenden Grenzen für die Auflösung eines Mikroskops (Abschnitt 8.1.2). Daraufhin erfolgt die ausführliche Beschreibung eines konfokalen Mikroskops (Abschnitt 8.2). Das konfokale Mikroskop wird in dieser Arbeit zur Verfolgung von Einzelobjekten verwendet. Die Theorie zur Verfolgung ist in Abschnitt 8.3 beschrieben. Der theoretische Teil dieser Arbeit schließt mit einer Beschreibung eines Weitfeld-Mikroskops (Abschnitt 8.5) ab.

## 8.1. Optische Grundlagen

### 8.1.1. Verteilungsfunktion

Geht man von der Abbildung eines infinitesimal kleinen, fluoreszierenden Punktes aus, so strahlt dieser Licht gleichmässig in alle Raumrichtungen ab. Eine Linse kann aber nur einen bestimmten Bereich des Lichtes einsammeln (siehe Abbildung 8.1). Zusätzlich kommt es an den Kanten der Linse zu Beugungseffekten, welche zu einer Unschärfe im Bild führen. Die resultierende räumliche Intensitätsverteilung im Bild wird Verteilungsfunktion oder abgeleitet vom Englischen point-spread-function (PSF) genannt. Für eine ideale Linse (keine sphärische Abberation) hängt die Verteilungsfunktion nur von der Wellenlänge des Lichtes  $\lambda$ , von der numerischen Apertur der Linse  $NA$  und von der Beugung ab. Die numerische Apertur wird über die Beziehung

$$NA = n \sin \alpha \tag{8.1}$$



**Abbildung 8.1.:** Einsamelleffizienz einer Linse. Licht von einem Punkt P wird von einer Linse in einem Abstand  $f$  (Brennweite) unterhalb des Maximalwinkels  $2\alpha$  eingesammelt.  $v$  ist die laterale Koordinate.

in Abhängigkeit vom Brechungsindex des Mediums  $n$  und des halben Maximalwinkels des kegelförmigen Lichtbündels  $\alpha$ , das durch die Linse aufgenommen wird, ausgedrückt.

Um die Verteilungsfunktion abzuleiten, werden einige Näherungen eingeführt. Zunächst wird angenommen, dass das optische Feld in der Blende gleich dem optischen Feld unmittelbar vor der Blende ist (Kirchhoff'sche Näherung, nach G. R. Kirchhoff (1824-1887) benannt). Zusätzlich wird die Beugung an den Kanten der Blende vernachlässigt (Debye'sche Näherung, nach P. Debye (1884-1966) benannt). Als letzte wird die paraxiale Näherung  $\sin \alpha \cong \alpha$  angewendet. Bei einem optischen System mit zylindrischer Symmetrie ist es zusätzlich von Vorteil, die dimensionslosen optischen Koordinaten zu verwenden. Die laterale (lat) Koordinate  $v$  wird dann definiert als

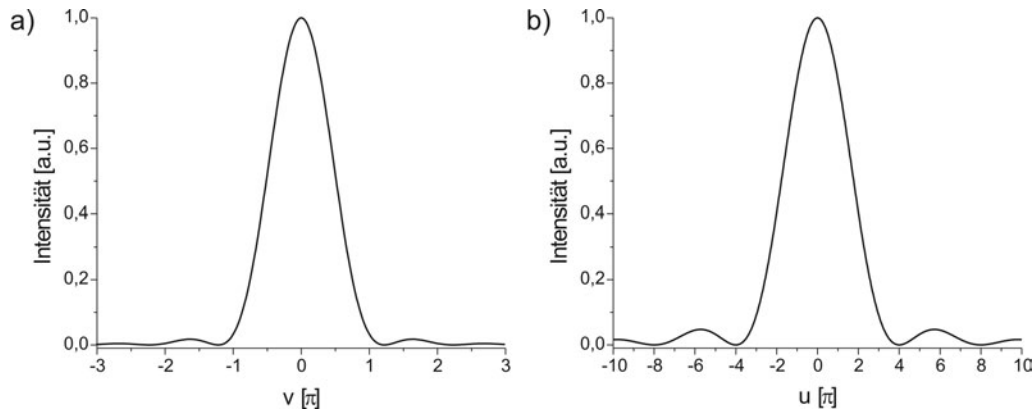
$$v = r \frac{2n\pi}{\lambda} \sin \alpha = r \frac{2\pi}{\lambda} NA, \quad (8.2)$$

wobei  $r$  der Abstand relativ zur optischen Achse ist. Die axiale (ax) Koordinate  $u$  ist als

$$u = z \frac{2n\pi}{\lambda} \sin^2 \alpha = z \frac{2\pi}{\lambda} \frac{NA^2}{n} \quad (8.3)$$

definiert, wobei  $z$  der axiale Abstand zum Brennpunkt ist.

Bei einem optischen Feld mit konstanter Amplitude entlang der Wellenfront ist das



**Abbildung 8.2.:** a) Die laterale Verteilungsfunktion in Abhängigkeit von der lateralen Koordinate  $v$ . b) Die axiale Verteilungsfunktion in Abhängigkeit von der axialen Koordinate  $u$ .

Ergebnis der Verteilungsfunktion

$$I(\text{lat}, v) \propto \left| \frac{2J_1(v)}{v} \right|^2 \quad (8.4)$$

$$I(\text{ax}, u) \propto \left( \frac{4 \sin\left(\frac{u}{4}\right)}{u} \right)^2. \quad (8.5)$$

Hierbei ist  $J_1(v)$  die Bessel-Funktion erster Ordnung. Allgemein lautet die Bessel-Funktion  $m$ -ter Ordnung

$$J_m(v) = \frac{i^{-m}}{2\pi} \int_0^{2\pi} e^{i(m\phi + v \cos \phi)} d\phi.$$

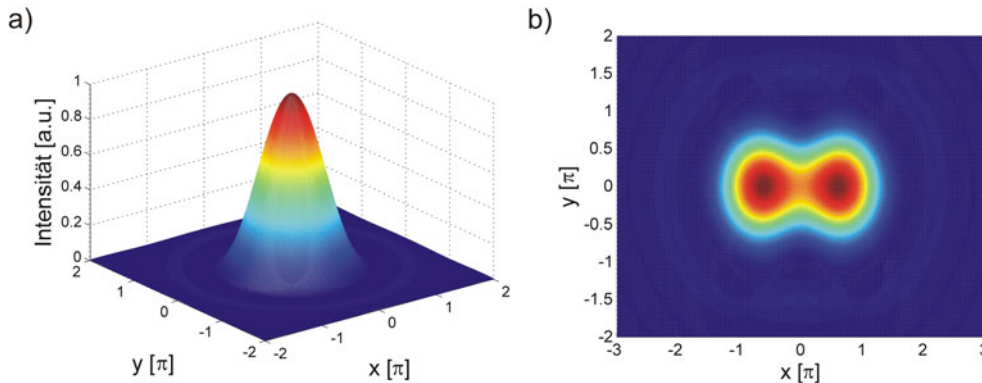
Es gibt allerdings mathematische Tabellenwerke, in denen Lösungen für verschiedene  $v$  zu finden sind. Der Verlauf der beiden Funktionen 8.4 und 8.5 ist in Abbildung 8.2 dargestellt.

Eine dreidimensionale Darstellung der lateralen Funktion wird in Abbildung 8.3 a gezeigt. Der helle Kreis in der Mitte wird auch als Airy-Scheibe bezeichnet (nach Sir George Biddel Airy (1801-1892) benannt). Bei der lateralen Verteilungsfunktion ist das erste Minimum bei  $v_0 = 1,22\pi$  zu finden (siehe Abbildung 8.2 a). Dies entspricht dem folgenden Ausdruck von  $r$ :

$$r_0 = \frac{0,61\lambda}{NA}. \quad (8.6)$$

Analog kann das erste Minimum bei der axialen Verteilungsfunktion bei  $u_0 = 4\pi$  gefunden werden (siehe Abbildung 8.2 b). Dies entspricht einem  $z$  von

$$z_0 = \frac{2n\lambda}{(NA)^2}. \quad (8.7)$$



**Abbildung 8.3.:** a) Die laterale Verteilungsfunktion in Abhängigkeit von  $v = \sqrt{x^2 + y^2}$ . b) Zwei punktförmige Objekte im Abstand von  $\Delta v_{\min} = 1,22\pi$ .

Es muss allerdings in Betracht gezogen werden, dass all diese Ergebnisse mit Hilfe der weiter oben erwähnten Näherungen erhalten wurden. So ist zwar die Kirchhoff'sche Näherung weitestgehend gültig, die Debye'sche Näherung gilt allerdings nur für hohe NA's und für Linsen mit großen Brennweiten [7]. Die paraxiale Näherung ( $\sin \alpha \cong \alpha$ ) gilt hingegen nur für kleine NA's. Somit liefert die klassische Theorie eine gute Beschreibung, allerdings weichen die numerischen Ergebnisse zum Teil stark von der Realität ab. So ergibt sich zum Beispiel für ein Öl-Immersionsobjektiv ( $n=1,518$ ;  $NA=1,3$ ) gemäß der klassischen Theorie  $r_0 = 0,47\lambda$  und  $z_0 = 1,80\lambda$ . In Wirklichkeit betragen die Werte  $r_0 = 0,43\lambda$  und  $z_0 = 1,37\lambda$ .

### 8.1.2. Auflösungsvermögen

Am häufigsten wird für die Auflösungsgrenze das so genannte Rayleigh-Kriterium verwendet. Dieses besagt, dass zwei Strukturen mit der gleichen Intensität genau dann gerade aufgelöst werden, wenn das Hauptintensitätsmaximum der einen Struktur mit dem ersten Intensitätsminimum der zweiten Struktur zusammenfällt. Betrachtet man nun die in Abbildung 8.2 a dargestellte laterale Verteilungsfunktion, so sind zwei Bildpunkte genau dann noch aufgelöst, wenn das Intensitätsmaximum des zweiten Punktes auf das erste Minimum des ersten Punktes fällt. Jenes Minimum hat gemäß Gleichung 8.6 den Abstand zum Mittelpunkt von  $r_0 = \frac{0,61\lambda}{NA}$  bzw.  $v = 1,22\pi$ . Somit definiert Gleichung 8.6 auch die Auflösungsgrenze. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 8.3 b dargestellt. Es sind zwei punktförmige Objekte im Abstand von  $\Delta v_{\min} = 1,22\pi$  abgebildet. Sie gelten als gerade noch gut aufgelöst.

Das häufig verwendete Auflösungsvermögen eines optischen Systems ist als der Re-

ziprokwert von  $r_0$  definiert:

$$\frac{1}{r_0} = \frac{NA}{0,61\lambda}. \quad (8.8)$$

Um es zu steigern, muss man eine kürzere Wellenlänge wählen oder eine Linse mit einer höheren NA verwenden.

Einen anderen Ansatz verfolgen Arbeiten von S. W. Hell [57]. Die Verwendung eines zweiten Strahls räumlich versetzt zu dem eigentlichen Anregungsstrahl führt zur stimulierten Emission am Rand der Verteilungsfunktion. Somit werden dort die angeregten Zustände entleert und es kann keine Fluoreszenz stattfinden. Das detektierte Fluoreszenzlicht beschränkt sich auf ein kleines Volumen in der Mitte der Anregung. Dadurch lässt sich die Auflösung bis auf einen Wert von  $\lambda/50$  steigern [58].

## 8.2. Konfokale Mikroskopie

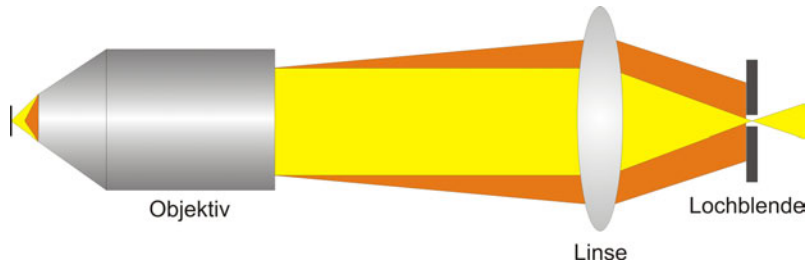
Seit dem Patent von M. Minsky im Jahr 1957 entwickelte sich das konfokale Mikroskop von einem Instrument, welches nur von einem Spezialisten bedient werden konnte zu einem Standardinstrument in der biologischen Forschung. Insbesondere die hohe dreidimensionale Auflösung und die immer schnellere Aufnahme von Bildern zeichnen es aus.

### 8.2.1. Bestandteile des konfokalen Mikroskops

Die hohe dreidimensionale Auflösung wird durch Unterdrückung der außerhalb des Fokus entstandenen Signale erreicht. Dies geschieht durch die Verwendung einer Lochblende. Sie lässt Signale aus dem Fokus durch, blockiert aber alle anderen Beiträge. Die genaue Funktionsweise ist in Abbildung 8.4 dargestellt.

Bei der sehr häufig eingesetzten konfokalen Fluoreszenzmikroskopie benötigt man eine Lichtquelle, die die verwendeten Fluorophore anregt. Das Licht wird zunächst durch eine Lochblende beschnitten und dann auf die Probe fokussiert. Dies führte bei divergenten Lichtquellen zu einer geringen Anregungsintensität und somit zu Problemen in der Detektion. Erst mit der Einführung von Lasern konnte eine genügend hohe Intensität in einem kleinen Volumen in der Probe erreicht werden.

Der Laserstrahl gelangt über einen dichroitischen Spiegel parallel in das Objektiv. Dort wird der Strahl fokussiert. Die Anregung der Fluorophore erfolgt im fokalen Volumen. Die Fluorophore emittieren Licht einer rotverschobenen (größeren)



**Abbildung 8.4.:** Schematische Darstellung der Funktionsweise einer Lochblende. Licht von Ebenen außerhalb des Fokus (orange) wird durch die Lochblende abgeblockt. Das Licht aus der Fokalebene (gelb) kann die Lochblende passieren.

Wellenlänge in alle Richtungen. Bei einer Detektion in Rückwärtsrichtung (Epi-Fluoreszenz) wird ein Teil des Lichts wiederum vom Objektiv eingesammelt. Der dichroitische Spiegel ist für größere Wellenlängen durchlässig und trennt somit die Fluoreszenz vom Anregungslicht ab. Das Fluoreszenzlicht verlässt das Mikroskop und wird auf die (Detektions-)Lochblende fokussiert. Anschließend wird das Pinhole auf einen Detektor abgebildet und das Signal detektiert. Als Detektor kann sowohl eine CCD-Kamera (optional mit einem vorgeschalteten Spektrometer), eine APD oder ein PMT dienen.

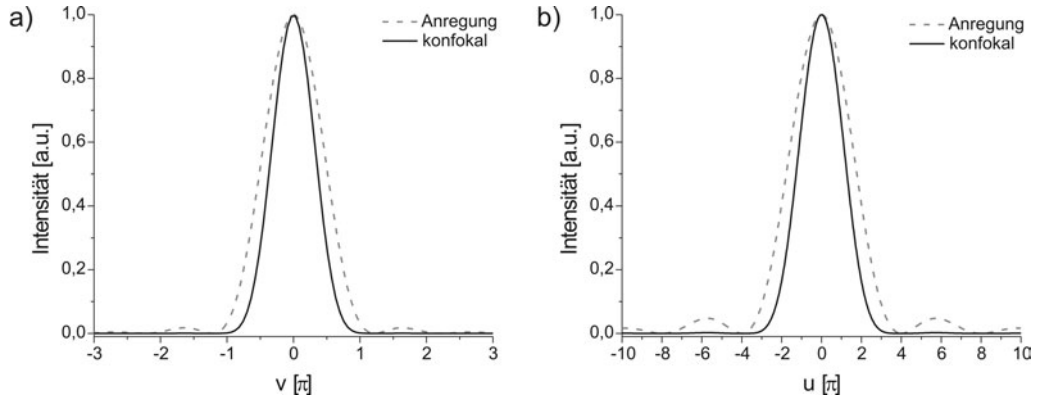
### 8.2.2. Auflösungsvermögen

Der bildgebende Prozess in einem konfokalen Mikroskop kann in zwei Teile aufgetrennt werden. In einem wird Licht auf die Probe fokussiert und es entsteht eine Intensitätsverteilung gemäß der Verteilungsfunktion  $PSF_{An}(x,y,z)$ . Im zweiten Teil wird Licht eingesammelt und gemäß  $PSF_{Det}(x,y,z)$  auf eine Lochblende abgebildet. Betrachtet man den gesamten Prozess, so wird im zweiten Teil nicht mehr Licht einer punktförmigen Lichtquelle, sondern die Intensitätsverteilung der Anregung abgebildet. Somit ergibt sich für die konfokale Verteilungsfunktion  $PSF_{konf}$ :

$$PSF_{konf} = PSF_{An} \cdot PSF_{Det}. \quad (8.9)$$

Vergleicht man die konfokale Verteilungsfunktion mit der der Detektion oder Anregung, so zeigt diese eine kleinere Breite und weniger starke Nebenmaxima (siehe Abbildung 8.5). Nimmt man an, dass die Anregungswellenlänge gleich der Detektionswellenlänge ist, vereinfacht sich Gleichung 8.9 zu  $PSF_{konf} = (PSF_{An})^2$ . Hierbei ist es schwierig eine Änderung des Auflösungsvermögens (Gleichung 8.8 und 8.6) zu bestimmen, weil sich die Lage der Minima durch Quadrieren nicht ändert. Als Aushilfe benutzt man die Halbwertsbreite (FWHM) der radialen Intensität und nimmt





**Abbildung 8.5.:** a) Die äquatoriale konfokale Verteilungsfunktion in Abhängigkeit von  $v$ . b) Die axiale konfokale Verteilungsfunktion in Abhängigkeit von  $u$ . Zum Vergleich sind jeweils die Verteilungsfunktionen der Anregung abgebildet. Es wurde angenommen, dass die Anregungswellenlänge gleich der Detektionswellenlänge ist.

an, diese sei annähernd so groß wie  $r_0$ . Man kann zeigen, dass dann gilt:

$$FWHM_{\text{konf}} = \frac{1}{\sqrt{2}} FWHM_{\text{An}}. \quad (8.10)$$

Somit ergeben sich ausgehend von Gleichung 8.6 bzw. 8.7 folgende Auflösungsgrenzen:

$$r_0 = \frac{0,61\lambda}{\sqrt{2} NA} \quad (8.11)$$

$$z_0 = \frac{2n\lambda}{\sqrt{2} (NA)^2}. \quad (8.12)$$

Bis jetzt sind die Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{An}}$  und die Detektionswellenlänge  $\lambda_{\text{Det}}$  gleichgesetzt worden. Normalerweise gilt aber  $\lambda_{\text{An}} < \lambda_{\text{Det}}$ . Definiert man  $\beta$  als  $\beta = \frac{\lambda_{\text{An}}}{\lambda_{\text{Det}}}$ , so können die Auflösungsgrenzen für das konfokale Mikroskop geschrieben werden als:

$$r_0 = \frac{0,61\lambda_{\text{An}}}{\sqrt{1 + \beta^2} NA} \quad (8.13)$$

$$z_0 = \frac{2n\lambda_{\text{An}}}{\sqrt{1 + \beta^2} (NA)^2}. \quad (8.14)$$

Nimmt man als Beispiel den Farbstoff Cy5 ( $\lambda_{\text{Det}} = 670 \text{ nm}$ ) in einer wässrigen Lösung ( $n=1,3312$ ), regt diesen bei  $\lambda_{\text{An}} = 633 \text{ nm}$  an und verwendet ein Wasserimmersionsobjektiv ( $NA=1,2$ ), so ist die laterale Auflösungsgrenze eines konfokalen Mikroskops  $234 \text{ nm}$  und die axiale  $851 \text{ nm}$ . Im Vergleich dazu ist die Auflösungsgrenze bei einem Weitfeld-Mikroskop  $341 \text{ nm}$  bzw.  $1239 \text{ nm}$ .

Bei allen bisherigen Betrachtungen wurde der Durchmesser der Lochblende außer Acht gelassen. T. Wilson untersuchte den Effekt von verschiedenen Lochblendendurchmessern [59]. Er kam zu dem Schluss, dass sich das axiale Auflösungsvermögen bis zu einem Lochblendendurchmesser  $d_{LB}$  von

$$d_{LB} < \frac{2,5 \lambda M}{\pi NA} \quad (8.15)$$

nicht signifikant ändert ( $M$  ist der Vergrößerungsfaktor des Mikroskops). Betrachtet man dieses Ergebnis nun im Verhältnis zur lateralen Ausdehnung, so entspricht dies ungefähr 65 % des Durchmessers der Anregungs-Airy-Scheibe (Gleichung 8.6).

Vergleicht man analog hierzu die Intensitäten, so lässt eine Lochblende mit dem Durchmesser  $d_{LB}$  ungefähr 75 % der Gesamtintensität durch.

### 8.2.3. Signalstärke

Im vorigen Kapitel ist man von der Betrachtung eines kleinen Objektes mit einer homogenen Intensitätsverteilung ausgegangen. Des Weiteren wurde der Einfluss des Hintergrundes vernachlässigt. Bei einer realen Messung treffen diese beiden Annahmen meistens nicht zu. Um ein besseres Modell zu erhalten, sollte man das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis in die Betrachtung mit einbeziehen.

Bei einer fluoreszenten Probe resultiert der Hintergrund hauptsächlich von der Autofluoreszenz der Umgebung. Ausgehend von einer infinitesimal kleinen Lochblende nimmt das Signal beim Vergrößern der Blende kontinuierlich zu. Allerdings verschlechtert sich allmählich auch die axiale Auflösung, was zu einer Zunahme des Hintergrundsignals führt. Betrachtet man nun das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis in Abhängigkeit von der Größe der Lochblende, so stellt man fest [60], dass der optimale Radius bei ungefähr 63 % des Radius der Airy-Scheibe liegt. Dies ist in guter Übereinstimmung mit dem oben erwähnten Wert.

Spielt der Hintergrund keine Rolle, so kann eine größere Lochblende verwendet werden. Man kann hierdurch eine höhere Lichtausbeute erzielen. Allerdings nimmt das Signal ab einem Durchmesser der Lochblende, der größer als der Durchmesser der Airy-Scheibe ist, nicht mehr signifikant zu. Nimmt man den Durchmesser der Airy-Scheibe als den Durchmesser der Lochblende  $d'_{LB}$ , so ergibt sich  $d'_{LB} = \frac{1,22\lambda}{NA}$ . Das Intensitätsverhältnis zwischen  $d'_{LB}$  und  $d_{LB}$  liegt bei 1,14. Das Signalniveau liegt bei ungefähr 85 % des Gesamtsignals.

Die größere Lochblende führt allerdings zu einer Verschlechterung der axialen Auflösung um etwa den Faktor 1,2 [59]. Zusätzlich beeinflusst der Durchmesser der Lochblende die laterale Auflösung. Die Verbesserung der Auflösung gegenüber dem Weitfeld-Mikroskop um den Faktor  $\sqrt{1 + \beta^2}$  gilt somit nur für eine infinitesimal

kleine Lochblende. Wählt man  $d'_{\text{LB}}$  als Durchmesser der Lochblende, so ist nur eine Verbesserung auf 90 % der lateralen Auflösungsgrenze eines Weitfeld-Mikroskops festzustellen [61].

#### 8.2.4. Detektionseffizienz

Die Detektionseffizienz wird hauptsächlich vom Objektiv bestimmt. So strahlt ein fluoreszierender Körper Licht in alle Richtungen ab, aber nur ein kleiner Teil davon kann vom Objektiv eingesammelt werden.

Dieser Teil entspricht der Fläche einer Kugelkalotte  $A_{\text{KK}}$ . Jene ist definiert als:

$$A_{\text{KK}} = 2r^2\pi(1 - \cos \alpha). \quad (8.16)$$

Hierbei ist  $r$  der Radius der Kugel und  $\alpha$  der halbe Öffnungswinkel. Die gesamte Kugeloberfläche  $A_K$  beträgt  $4\pi r^2$ . Somit entspricht das Verhältnis  $A_{\text{KK}}/A_K$  der Einsammeleffizienz  $E_{\text{Obj}}$ .

$$E_{\text{Obj}} = \frac{A_{\text{KK}}}{A_K} = \frac{2r^2\pi(1 - \cos \alpha)}{4r^2\pi} = \frac{1}{2}(1 - \cos \alpha) \quad (8.17)$$

Im Inneren des Objektivs treten weitere Verluste auf. Normalerweise betragen diese ca. 10 % der Lichtintensität.

Zusätzlich zum Objektiv müssen die Verluste an den weiteren verwendeten Optiken berücksichtigt werden. So verursachen zum Beispiel Spiegel normalerweise einen Verlust von ca. 5 %. Abhängig von der Größe der Lochblende tritt hier ein weiterer Intensitätsverlust auf, da ein Teil der Strahlung abgeblockt wird.

Nachdem die Funktionsweise eines konfokalen Mikroskops genauer erläutert wurde, wird näher auf dessen Verwendung in dieser Arbeit, dem Verfolgen von einzelnen Partikeln eingegangen.

### 8.3. Bestimmung der Position eines Partikels

Wie bereits in der Einführung (Abschnitt 7) beschrieben wurde, wird in dieser Arbeit ein Kreis um ein Partikel abgefahren, um dessen Position in der x,y-Ebene zu bestimmen (siehe Abbildung 7.1). Um seine z-Position zu ermitteln, wird die Fluoreszenz-Intensität in zwei Ebenen detektiert (siehe Abbildung 7.2). Bis jetzt ist die Veränderung der detektierten Intensität in Abhängigkeit von der Position des Partikels nur qualitativ betrachtet worden. Eine quantitative Beschreibung wird nun hergeleitet.

Betrachtet man ein einzelnes Partikel und verändert die Position des Anregungslasers, so gilt für die detektierte Intensität  $F(t)$  die folgende Formel [55, 62]:

$$F(t) = \frac{I_0}{\left(1 + \frac{\lambda^2(z_p - z_s(t))^2}{w_0^2\pi^2}\right)^2} \exp\left[\frac{-4[(x_p - x_s(t))^2 + (y_p - y_s(t))^2]}{w_0^2}\right] + B. \quad (8.18)$$

Hierbei ist  $w_0$  der Strahldurchmesser des Lasers,  $\lambda$  die Wellenlänge, B die Intensität des Hintergrunds,  $I_0$  die maximale Intensität (wenn das Partikel genau in der Mitte ist),  $x_p, y_p, z_p$  die Koordinaten des Partikels und  $x_s(t), y_s(t), z_s(t)$  die Position des Lasers.

#### 8.3.1. Bestimmung der x,y Position

Rastert man die Probe mit dem Anregungslaser ab, so kann aus den detektierten Intensitäten die Position des Partikels durch Regression an die Gleichung 8.18 bestimmt werden.

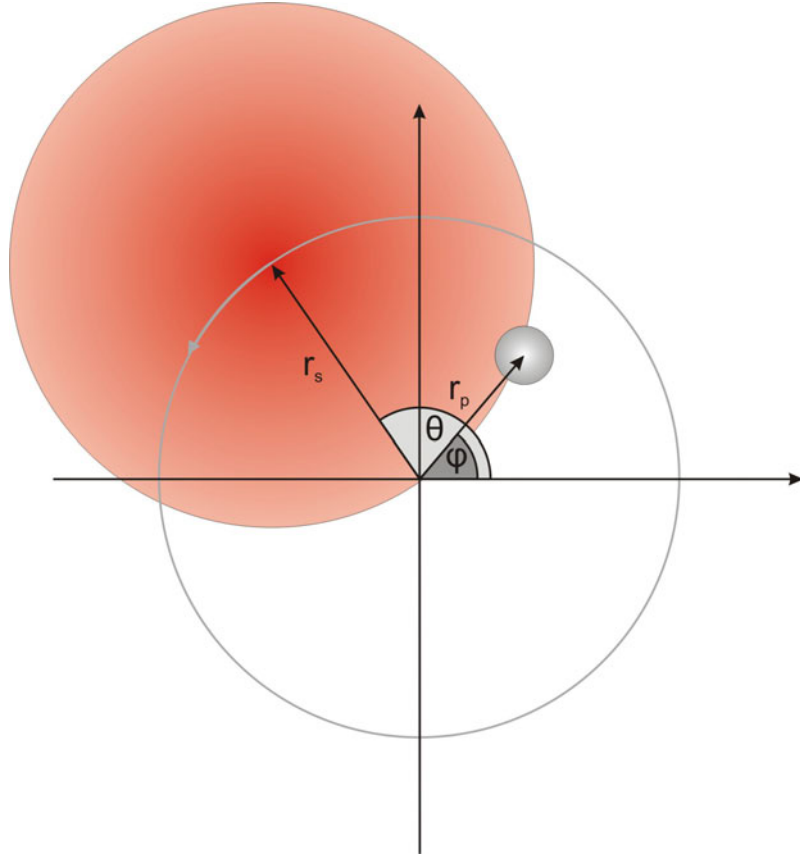
Eine andere Methode besteht darin, den konfokalen Laserfokus so im Kreis zu bewegen, dass sich das Partikel innerhalb dieses Kreises befindet.

Für weitere Betrachtungen ist es von Vorteil, radiale Koordinaten einzuführen (siehe Abbildung 8.6). Bezeichnet man den Radius des abgefahrenen Kreises mit  $r_s$  und die Frequenz mit  $f$ , so ergibt sich für die Laserposition:

$$x_s = r_s \cos(2\pi ft) = r_s \cos(\theta) \quad (8.19)$$

$$y_s = r_s \sin(2\pi ft) = r_s \sin(\theta), \quad (8.20)$$

$\theta$  wird als Phasenwinkel der Anregung bezeichnet. Die Angabe von  $r_s$  und  $\theta$  genügt zur Bestimmung der Position. Auch die Position des Partikels kann in Radialkoor-



**Abbildung 8.6.:** Schematische Darstellung der Positionsbestimmung des Partikels. Der Anregungslaser wird im Kreis mit dem Radius  $r_s$  bewegt. Die Position des Anregungslasers kann mit Hilfe von  $r_s$  und  $\theta$  bestimmt werden. Die Position des Partikels ist durch  $r_p$  und  $\varphi$  definiert.

dinaten beschrieben werden:

$$r_p^2 = x_p^2 + y_p^2 \quad (8.21)$$

$$x_p = r_p \cos(\varphi) \quad (8.22)$$

$$y_p = r_p \sin(\varphi). \quad (8.23)$$

Hierbei ist  $r_p$  der Abstand des Partikels zum Mittelpunkt des abgefahrenen Kreises und  $\phi$  der Phasenwinkel des Partikels.

Der Abstand  $d$  zwischen der Position des Lasers und des Partikels kann somit geschrieben werden als:

$$d^2 = (x_p - x_s)^2 + (y_p - y_s)^2 = r_s^2 + r_p^2 - 2r_s r_p \cos(\theta - \varphi). \quad (8.24)$$

Setzt man diese Ergebnisse in Gleichung 8.18 ein, so erhält man:

$$F(\theta) = I_0 \exp \left[ \frac{-4}{w_0^2} (r_s^2 + r_p^2 - 2r_s r_p \cos(\theta - \varphi)) \right] + B. \quad (8.25)$$

Durch Regression der gemessenen Intensität an diese Formel kann die Position des Partikels bestimmt werden. Die Auswertung der obigen Gleichung ist allerdings zeitintensiv und somit für eine Positionsbestimmung in Echtzeit ungeeignet.

Hierfür eignet sich die schnelle Fourier-Transformation besser. Die Phase der ersten Harmonischen (Frequenz des Kreisabfahrens) entspricht direkt  $\varphi$  und aus dem Verhältnis zwischen der ersten Harmonischen und dem 0-ten Term lässt sich der Abstand  $r$  bestimmen [55].

### 8.3.2. Bestimmung der z Position

Für die Bestimmung der z-Position des Partikels benötigt man die Informationen der Ebene oberhalb und unterhalb des Partikels. Durch Vergleich der beiden Intensitäten, kann die z-Position berechnet werden.

Die Detektion der beiden Ebenen kann durch Verfahren des Objektivs erfolgen. Allerdings verdoppelt sich dann im Vergleich zur Positionsbestimmung in der x,y Ebene die für eine Position benötigte Zeit. Des Weiteren oszilliert das Objektiv zwischen zwei Ebenen. Das führt zu einer Bewegung im optischen Medium und verfälscht die tatsächliche z-Position der Probe. Letztlich ist auch zu beachten, dass die Probe dann nie im Fokus ist, was einen Vergleich mit einem gleichzeitig aufgenommenen Weitfeld-Bild erschwert.

Ein anderer Ansatz besteht darin, nicht das Objektiv, sondern die Lochblenden zu verfahren. Verfährt man eine Lochblende, so wird eine andere z-Ebene detektiert. Verwendet man - wie in unserem Aufbau - zwei Detektionskanäle, so kann die eine Lochblende so eingestellt werden, dass eine Ebene oberhalb des Fokus detektiert wird und die andere Lochblende so, dass eine Ebene unterhalb des Fokus detektiert wird. Der Vorteil liegt darin, dass beide Ebenen gleichzeitig detektiert werden können und das Objektiv nur dann bewegt werden muss, wenn sich auch das verfolgte Partikel bewegt. Ein Nachteil ist sicherlich, dass jeweils nur die Hälfte des Signals detektiert wird. Allerdings kann für die Bestimmung der x,y Position das Signal aufsummiert und somit dieser Nachteil minimiert werden.

Zusammenfassend kann somit die Position des Partikels durch Abfahren eines Kreises und der Detektion in zwei Ebenen dreidimensional bestimmt werden.

## 8.4. Verfolgen von Partikeln

Hat man die Position des Partikels - wie im vorigen Abschnitt beschrieben - bestimmt, kann der Mittelpunkt des Anregungslasers neu gesetzt werden. Dieser wird

gleich der berechneten Position des Partikels gesetzt. Nun wird wiederum die Position des Partikels ermittelt, die neue Position festgehalten und der Anregungslaser verfahren. Am Schluss erhält man die Positionen des Partikels in Abhängigkeit von der Zeit. Diese können dann in einer Trajektorie (siehe zum Beispiel Abbildung 11.2 a und b) dargestellt werden.

Die limitierenden Faktoren bei dieser Vorgehensweise sind einerseits die Geschwindigkeit des Systems und andererseits die Intensität des Signals. Bewegt sich das Partikel innerhalb der Detektionszeit aus dem Anregungsbereich hinaus, so kann seine Position nicht bestimmt werden und es kann auch nicht verfolgt werden. Ist die Intensität des Partikels im Vergleich zum Hintergrund sehr klein, kann seine Position nicht genau genug bestimmt werden und auch die Verfolgung ist schwerer möglich.

Das Verfolgen von mehreren Partikeln kann durch alternierende Detektion realisiert werden. Hierzu wird immer die Position eines Partikels ermittelt und der Scanner dann zu einem anderen Partikel bewegt. Diese Vorgehensweise ist allerdings nur dann möglich, wenn sich die Partikel langsamer als die maximale Detektionsgeschwindigkeit geteilt durch die Anzahl der verfolgten Partikel bewegen. Falls sich ein oder mehrere Partikel schneller bewegen, können sie beim erneuten Anfahren ihrer Position nicht mehr lokalisiert werden und sind für eine weitere Verfolgung verloren.

Um den Anregungslaser in die richtige Position verfahren zu können, muss die Beziehung zwischen dem Koordinatensystem in der Detektion und dem tatsächlichen (Labor-)Koordinatensystem ermittelt werden. Die Drehung dieser beiden Koordinatensysteme relativ zueinander kann in die Software eingegeben werden und wird automatisch berücksichtigt.

## 8.5. Weitfeld-Mikroskopie

Das Weitfeld-Mikroskop wird in dieser Arbeit benutzt, um eine Information über die Umgebung des verfolgten Partikels zu erhalten. Dies ermöglicht ein besseres Verständnis seiner Bewegung.

### 8.5.1. Köhler-Beleuchtung

Bei einer Weitfeld-Anordnung wird nicht wie beim konfokalen Mikroskop (siehe oben) nur ein Punkt auf der Probe beleuchtet, sondern ein großer Bereich. Allerdings ist der beobachtete Ausschnitt durch das Objektiv und das Okular begrenzt.

Es ergibt sich das Problem, dass Licht, welches von außerhalb dieses Bildausschnittes in das Objektiv gelangt, den Kontrast des Bildes beeinträchtigt [63]. Zusätzlich werden bei fluoreszierenden Proben auch Ausschnitte der Probe gebleicht, die gar nicht beobachtet werden.

Um diese Probleme zu umgehen, müsste man die Beleuchtung auf den beobachteten Bildausschnitt begrenzen. Eine Lösung hierfür wäre theoretisch eine Blende, allerdings müsste diese sehr nahe an die Probe herangebracht werden und einen sehr kleinen Durchmesser haben. Dies ist technisch sehr schwierig und nicht praktikabel. Ein anderer Ansatz ist von August Köhler im Jahr 1893 entwickelt worden [64]. Hierbei wird nicht eine reale Blende, sondern das Bild einer Blende in die Objektebene projiziert (siehe Abbildung 8.7).

Genauer gesagt wird bei der Köhler-Beleuchtung zunächst das Licht einer Lichtquelle mit der Kollektorlinse in der Ebene einer Blende (Aperturblende) abgebildet. Die Aperturblende steht in der Brennebene einer weiteren Linse, der so genannten Kondensorlinse. Durch diese Linse werden die von einem Punkt in der Aperturblende ausgehenden Strahlen parallelisiert. Somit beleuchtet jeder einzelne Punkt der Lichtquelle die gesamte Fläche des sichtbaren Objekts.

Um die zu beleuchtende Fläche einstellen zu können, wird knapp hinter die Kollektorlinse eine weitere Blende gestellt, die so genannte Leuchtfeldblende. Das zu untersuchende Objekt wird dann so positioniert, dass die Leuchtfeldblende in der Objektebene scharf abgebildet wird. Somit wird immer nur der Ausschnitt vom Objekt beleuchtet, der sich innerhalb der Leuchtfeldblende befindet.

Das überlagerte Bild der Leuchtfeldblende und des beobachtenden Objekts wird bei einem unendlichen Strahlengang mit Hilfe des Objektivs und der Tubuslinse in der Zwischenbildebene abgebildet.

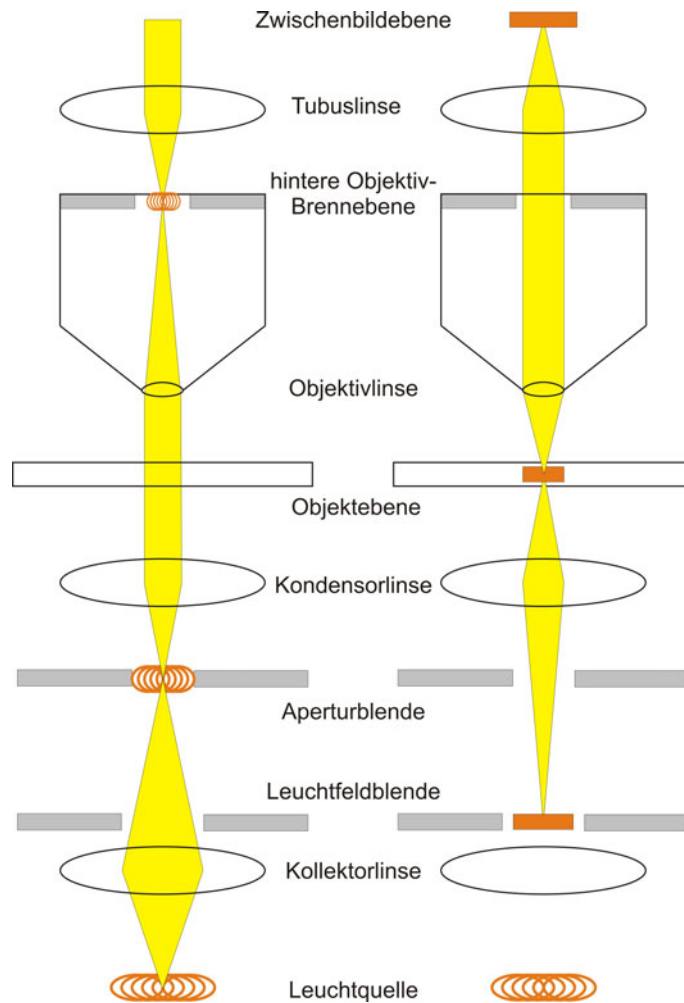
### 8.5.2. Vergrößerung und Digitalisierung

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Objektiv wird das Bild der Probe im Unendlichen dargestellt. Um ein reelles Bild der Probe zu erhalten, wird der Strahl mit Hilfe einer so genannten Tubuslinse fokussiert. In der Brennebene der Tubuslinse wird dann das Bild der Probe beobachtet.

Diese Anordnung ist ähnlich der eines Fernrohrs. Somit berechnet sich die Vergrößerung  $V$  aus dem Quotienten der Brennweiten des Objektivs  $f_{\text{Objektiv}}$  und der Tubuslinse  $f_{\text{Tubuslinse}}$

$$V = \frac{f_{\text{Tubuslinse}}}{f_{\text{Objektiv}}}. \quad (8.26)$$





**Abbildung 8.7.:** Schematische Zeichnung des Strahlenganges bei einer Köhler-Beleuchtung. Beide Strahlengänge liegen gleichzeitig vor, die Auftrennung erfolgt ausschließlich wegen der Übersichtlichkeit. Der linke Teil wird auch als Pupillenstrahlengang und der rechte als Lukenstrahlengang bezeichnet. Das Bild der Leuchtquelle wird in die Ebene der Aperturblende und der hinteren Objektiv-Brennebene abgebildet (im Pupillenstrahlengang dargestellt). Das Bild der Leuchtfeldblende wird in die Objektebene und in die Zwischenbildebene abgebildet. Dort entsteht auch das Bild der Probe.

Um die optimale Vergrößerung bestimmen zu können, muss man zusätzlich die Größe eines Pixel der verwendeten CCD-Kamera berücksichtigen. Einen Zusammenhang zwischen den auflösbaren Strukturen der Probe und der Pixelgröße stellt das so genannte Nyquist Kriterium (nach H. Nyquist (1889-1976) benannt) her. Es besagt vereinfacht, dass die Aufnahme mit mindestens der doppelten Auflösung des optischen Systems erfolgen muss.

Die Auflösung des Weitfeld-Mikroskops ist durch Gleichung 8.6 in  $x,y$  und durch

Gleichung 8.7 in  $z$  definiert. Um das Nyquist Kriterium zu erfüllen, muss also der laterale Abstand zwischen zwei Pixeln maximal  $\frac{0,305\lambda}{NA}$  betragen. Bei einer Aufnahme von mehreren  $z$ -Ebenen sollte der Abstand zwischen den zwei benachbarten Ebenen höchstens  $\frac{n\lambda}{(NA)^2}$  sein.

## 9. Experimenteller Aufbau des kombinierten konfokalen und Weitfeld-Mikroskops

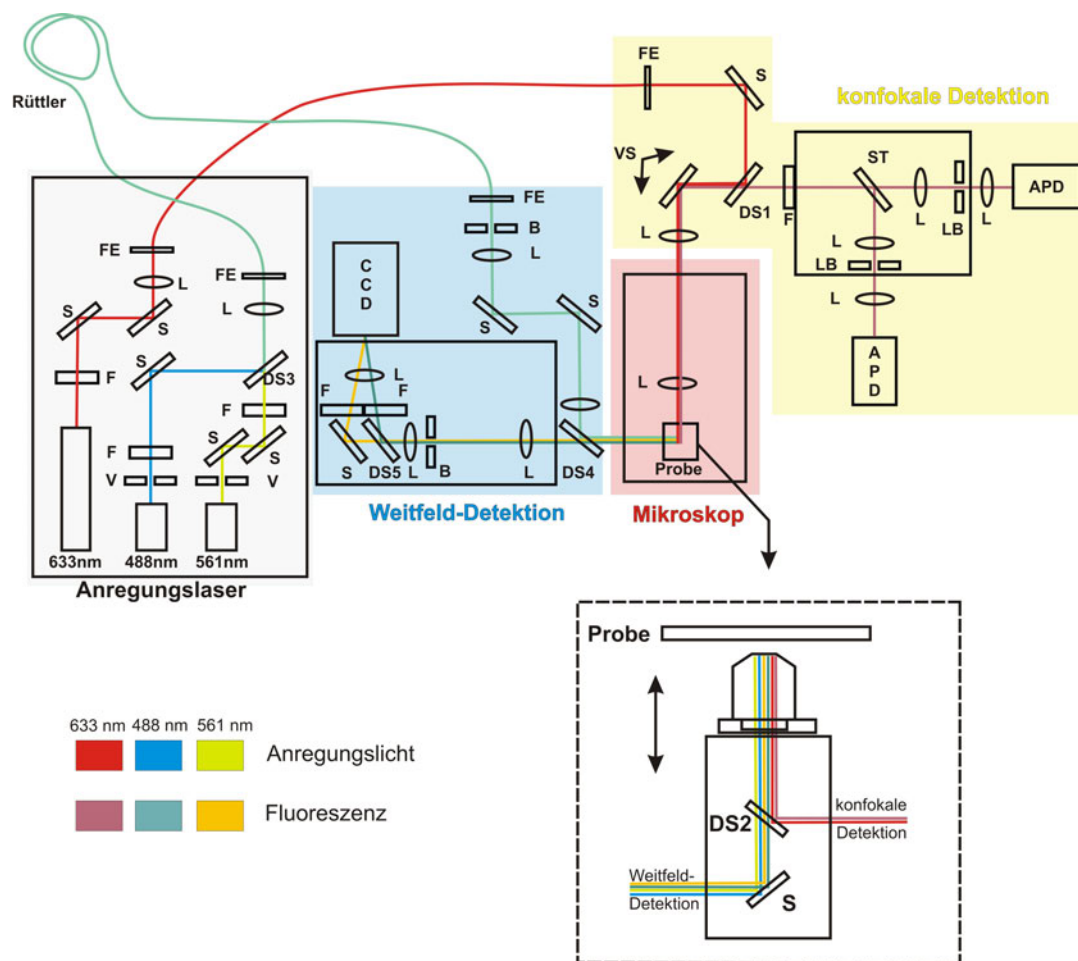
In diesem Kapitel wird der experimentelle Aufbau des kombinierten konfokalen und Weitfeld-Mikroskops beschrieben.

Die konfokale Detektion wird benutzt, um ein fluoreszentes Partikel in drei Dimensionen zu verfolgen. Wie in den Abschnitten 7 und 8.3 erläutert wurde, muss hierzu der Anregungslaser kreisförmig um das Partikel bewegt werden (siehe Abbildung 7.1 und 8.6). Zusätzlich muss für die Bestimmung der z-Position des Partikels die Fluoreszenz-Intensität in zwei verschiedenen z-Ebenen aufgenommen werden (siehe Abschnitt 8.3.2 und Abbildung 7.2).

Um Bewegung des Partikels besser nachvollziehen zu können, wird in der Weitfeld-Detektion ein Bild der Umgebung aufgenommen. Um die Umgebung detailreicher abzubilden, können zwei Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig detektiert werden.

Abbildung 9.1 zeigt die gesamte Apparatur. Zu einer besseren Orientierung sind die einzelnen Aufbauten farblich hinterlegt. Eine detaillierte Darstellung des Strahlenganges im Mikroskop ist rechts unten dargestellt. Der dichroitische Spiegel DS2 dient zur Abtrennung der konfokalen von der Weitfeld-Anregung bzw. Detektion. Auf die Details der einzelnen Aufbauten wird in den folgenden Abschnitten eingegangen.

9. Experimenteller Aufbau des kombinierten konfokalen und Weitfeld-Mikroskops

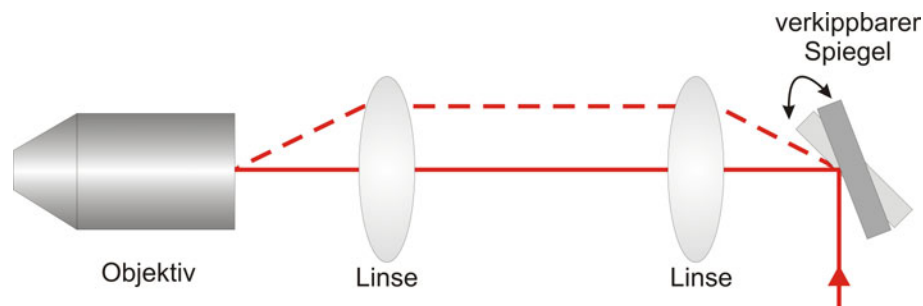


**Abbildung 9.1.:** Schematische Darstellung der gesamten Apparatur. Rechts unten ist ein Querschnitt durch das Mikroskop dargestellt. Die jeweiligen Untereinheiten sind farblich hervorgehoben. Verwendete Abkürzungen: S, Spiegel; V, Verschießer (Shutter); F, Filter; DS1-DS5, dichroitischer Spiegel; L, Linse; FE, Faserende; B, Blende; LB, Lochblende; ST, Strahlteiler; VS, verkipbarer Spiegel.

## 9.1. Konfokale Detektion

Der Aufbau zur konfokalen Detektion ist in Abbildung 9.1 gelb hinterlegt. Für die Anregung wird ein 633 nm Helium-Neon (HeNe) Laser verwendet. Der Laserstrahl wird zunächst durch eine Glasfaser geleitet, um einen möglichst homogenen Strahl zu erhalten. Danach wird er über einen Spiegel und einen dichroitischen Spiegel (DS1) umgelenkt. Über einen verkippbaren Spiegel (VS) gelangt er dann in das Mikroskop. Der verkippbare Spiegel kann über einen Controller gesteuert werden und funktioniert mit Hilfe von Piezo-Kristallen. Er dient später dazu, den Strahl über die Probe zu bewegen.

Damit der Strahl beim Auslenken von dem verkippbaren Spiegel nicht nach außerhalb der rückwärtigen Fokalebene gelenkt wird, passiert er ein Teleskop, bestehend aus zwei Linsen. Diese bilden die Ebene der Spiegeloberfläche genau in die rückwärtige Fokalebene ab. Somit ist beim Verkippen des Spiegels der Einfallswinkel in das Objektiv unterschiedlich, die Position aber immer gleich (siehe Abbildung 9.2).



**Abbildung 9.2.:** Schematische Darstellung des Strahlenganges zwischen dem verkippbaren Spiegel und dem Objektiv. Je nach Verkipfung ändert sich der Einfallswinkel in die hintere Brennebene des Objektivs. Die Position bleibt hingegen gleich. Der dichroitische Spiegel DS2 wurde zur Vereinfachung ausgelassen.

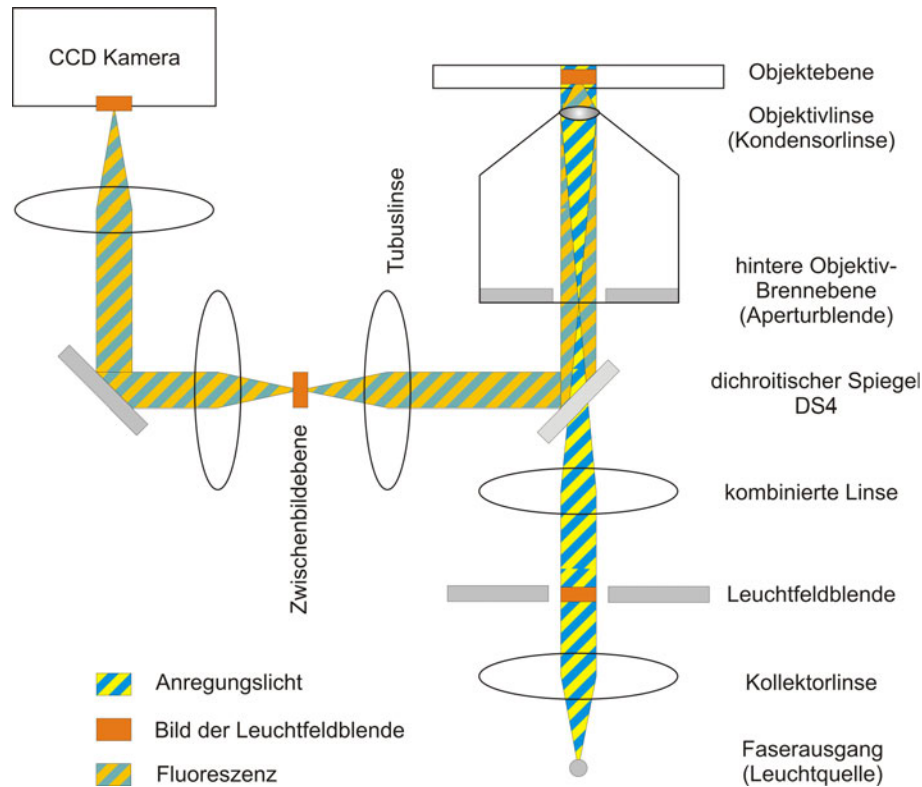
Das Objektiv fokussiert den Strahl auf einen Punkt auf der Probe. Die Position dieses Punktes auf der Probe lässt sich durch die Verkipfung des Spiegels verändern. Somit dient der verkippbare Spiegel zum Abrastern der Probe. Legt man an die x-Achse des Spiegels eine kosinusförmige und an die y-Achse eine sinusförmige Spannung an, so wird mit dem Strahl ein Kreis aus der Probe abgefahren. Dies dient dazu, die Position eines fluoreszenten Partikels in der x,y-Ebene zu bestimmen (siehe Abschnitt 8.3 und Abbildung 7.1 bzw. 8.6).

Regt der Laser ein Molekül zum Fluoreszieren an, wird ein Teil dieses Fluoreszenzsignals vom Objektiv eingesammelt. Das Signal gelangt dann wiederum über den dichroitischen Spiegel DS2 und durch die beiden Linsen auf den verkippbaren Spiegel

und wird dort umgelenkt. Da es den gleichen optischen Weg wie der Anregungsstrahl zurückgelegt hat, verläuft es genauso wie der Anregungsstrahl nur entgegengesetzt. An dem dichroitischen Spiegel DS1 wird das Fluoreszenzsignal transmittiert. Nach zusätzlicher spektraler Abtrennung der verbliebenen Anregungsphotonen durch einen Filter, wird das Signal durch einen 50:50 Strahlteiler in zwei Strahlen aufgespalten. Sie werden jeweils mit einer Linse auf jeweils eine Lochblende fokussiert. Dahinter wird das verbliebene Signal mit jeweils einer weiteren Linse eingesammelt. Jene Linse fokussiert zusätzlich den Strahl auf jeweils eine Avalanche Photodiode (APD, PerkinElmer SPCM-AQR-14). Dort werden die auftreffenden Photonen gezählt und an den Computer zum Auswerten geleitet. Somit erhält man die Information über die Intensität in zwei verschiedenen z-Ebenen. Diese Daten werden dazu verwendet, um die Position des fluoreszenten Partikels entlang der z-Achse zu bestimmen (siehe Abschnitt 8.3.2 und Abbildung 7.2).

Zur Auswertung wird die Software SimFCS von E. Gratton benutzt. Diese berechnet gemäß der theoretischen Beschreibung in Abschnitt 8.3 aus der detektierten Intensität in zwei Ebenen die dreidimensionale Position des Partikels. Anschließend stellt sie, wie in Abschnitt 8.4 beschrieben, den Mittelpunkt des abgerasterten Kreises genau auf die detektierte Position ein. Aus den so ermittelten Positionen des Partikels in Abhängigkeit von der Zeit kann eine Trajektorie dargestellt werden. Einige Beispiele hierfür sind in Abschnitt 11 abgebildet.

## 9.2. Weitfeld-Detektion

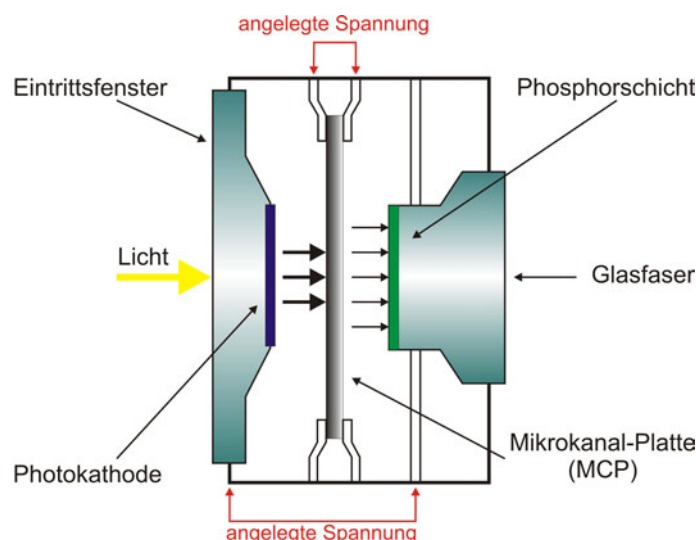


**Abbildung 9.3.:** Schematische Darstellung des Weitfeld-Strahlenganges. In den Klammern finden sich die Entsprechungen zur in Abbildung 8.7 dargestellten Köhler-Beleuchtung. Der Strahlengang vor der CCD-Kamera ist vereinfacht abgebildet. Der tatsächliche Verlauf ist in Abbildung 9.5 dargestellt.

Der Aufbau zur Weitfeld-Detektion ist in Abbildung 9.1 blau hinterlegt. Für die Weitfeld-Aufnahmen werden zwei unterschiedliche Laser verwendet. Zum einen ein blauer 488 nm Laser (Coherent Sapphire) und zum anderen ein gelber 561 nm Laser (Cobolt Jive). Der blaue Laser kann zum Beispiel verwendet werden, um das grün fluoreszierende Protein (GFP) anzuregen. Mit dem gelben Laser kann zum Beispiel das rot fluoreszierende Protein (RFP) angeregt werden. Die beiden Laserstrahlen werden über einen dichroitischen Spiegel (DS3) in eine Multi-Mode-Faser eingekoppelt und somit räumlich überlagert. Für eine homogenere Ausleuchtung wird die Faser gerüttelt.

Der weitere Aufbau erfolgt gemäß Abschnitt 8.5.1 und ist in Abbildung 9.3 dargestellt.

Der Faserausgang befindet sich genau in der fokalen Ebene einer Linse. Diese stellt zusammen mit der nachfolgenden Linse die Kollektorlinse dar. Das Bild der Licht-



**Abbildung 9.4.:** Funktionsweise einer verstärkten CCD-Kamera (ICCD). Wenn ein Photon durch das Eintrittsfenster auf die beschichtete Photokathode auftrifft, wird ein Elektron losgelöst. Dieses wird durch das angelegte elektrische Feld in Richtung einer Mikrokanal-Platte (MCP) angezogen. Die MCP besteht aus aneinandergrenzenden Glaskanälen. Durch die an die MCP angelegte Hochspannung wird das Elektron durch einen der Kanäle beschleunigt. Dabei schlägt es weitere Elektronen aus der Glaswand heraus. Insgesamt verlassen je nach eingestellter Verstärkung bis zu 10 000 Elektronen den Kanal. Sie treffen auf eine Phosphorschicht auf, was zu einer Emission von Photonen führt. Die emittierten Photonen werden in eine Glasfaser eingekoppelt. Aus der Glasfaser gelangen sie dann auf den CCD-Chip der Kamera. Dort werden dann statt dem ursprünglichen Photon mehrere 1000 Photonen registriert.

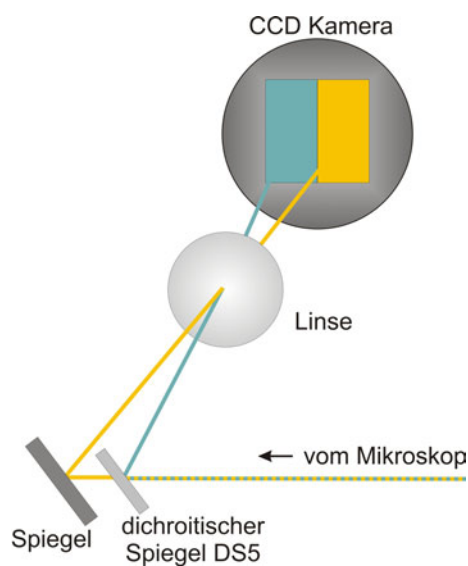
quelle wird in die hintere Brennebene des Objektivs (Nikon Plan Apo, 60x, NA 1,2 Wasserimmersion) abgebildet (diese stellt zusammen mit dem Öffnungswinkel der Faser die Aperturblende dar). Zwischen den beiden Linsen und in der Brennebene der zweiten Linse ist eine rechteckige Blende angebracht (Leuchtfeldblende). Die zweite Linse und das Objektiv bilden diese Blende in die Objektebene ab. Die Größe der Blende wird so eingestellt, dass nur genau die Fläche auf der Probe bestrahlt wird, die später auch detektiert wird.

Das gleiche Objektiv sammelt das emittierte Fluoreszenzlicht ein. Letzteres wird vom Anregungslicht durch einen dichroitischen Spiegel (DS4) abgetrennt und mit einer Linse (Tubuslinse) fokussiert. Die Brennweite dieser Linse beträgt in unserem Aufbau 200 mm. Dies entspricht der zu dem verwendeten Objektiv gehörigen Tubuslinse. Somit ergibt sich die Vergrößerung  $V = 60$  (siehe Gleichung 8.26).

Da die Auflösung des hier verwendeten Weitfeld-Mikroskops nach Gleichung 8.6 248 nm beträgt (für 488 nm Anregung), sollte der Abstand zwischen zwei Pixeln auf der CCD-Kamera maximal 124 nm auf der Probe entsprechen. Die effektive Größe eines Pixels beträgt bei der verwendeten ICCD-Kamera (Roper Scientific



I-PentaMAX, Funktionsweise siehe Abbildung 9.4)  $22,5\ \mu\text{m}$  (Pixelgröße  $15\ \mu\text{m}$  mit einer 1,5fachen Vergrößerung). Damit ergibt sich die ideale Vergrößerung zu 180fach. Um diese zu erreichen, wird das von der Tubuslinse abgebildete reelle Bild (60fache Vergrößerung) über zwei weitere Linsen auf das Dreifache vergrößert (180fache Vergrößerung) und auf die CCD-Kamera abgebildet. Zunächst wird aber durch einen dichroitischen Spiegel (DS5) die blaue Fluoreszenz von der gelben abgetrennt und so umgelenkt, dass die beiden Abbildungen der Probe nebeneinander auf der CCD Kamera detektiert werden (siehe Abbildung 9.5).



**Abbildung 9.5.:** Schematische Darstellung des Strahlenganges vor der CCD-Kamera. Die Probe wird in zwei verschiedenen Farbkanälen abgebildet.

Diese Anordnung ermöglicht es, gleichzeitig zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe zu beobachten. Da es sich bei den beiden Abbildungen um den gleichen Bildausschnitt der Probe handelt, können bei der späteren Auswertung beide Bilder überlagert werden. Die Intensitätsinformationen sind dann in jeweils einem der Farbkanäle des Bildes gespeichert. So entspricht dann beispielsweise im Bild die blaue Fluoreszenz einer blauen Farbe und die gelbe Fluoreszenz einer grünen Farbe. Der noch ungenutzte rote Farbkanal kann dann für die Darstellung der konfokalen Daten verwendet werden.

Um unerwünschtes Streulicht auszublenden, befindet sich in der Bildebene der Tubuslinse eine rechteckige Blende, die so eingestellt wird, dass der Bildausschnitt auf der CCD-Kamera gerade nicht beschnitten wird.

### 9.3. Positionierung der Probe

Das Objektiv ist auf einem Aufsatz montiert, der es ermöglicht, das Objektiv in der Höhe zu verfahren. Die genaue Einstellung kann über den Computer oder eine Steuerungseinheit im Bereich zwischen 0 und 100  $\mu\text{m}$  in 10 nm Schritten vorgenommen werden. Somit können in z-Richtung verschiedene Ebenen der Probe untersucht werden. Dieser Vorgang kann automatisiert werden, um ein dreidimensionales Bild der Probe zu erhalten.

Um die Probe in drei Dimensionen verfahren zu können, ist diese auf einer verfahrbaren Plattform montiert. Die Plattform kann über den Computer oder eine Steuereinheit im Bereich zwischen 0 und 100  $\mu\text{m}$  (x,y) bzw. 20  $\mu\text{m}$  (z) in 10 nm Schritten verfahren werden. Für eine grobe Positionierung in der x und y Richtung ist diese Plattform zusätzlich auf einem manuell verstellbaren Tisch montiert.

# 10. Charakterisierung des konfokalen Systems zur Verfolgung von Einzelobjekten

Nachdem im vorigen Kapitel der Aufbau des Mikroskops ausführlich beschrieben wurde, folgen nun einige Tests, um die genauen Parameter des Systems zu bestimmen. Solche Parameter sind zum Beispiel das Auflösungsvermögen oder die Genauigkeit der Positionsbestimmung des verfolgten Partikels.

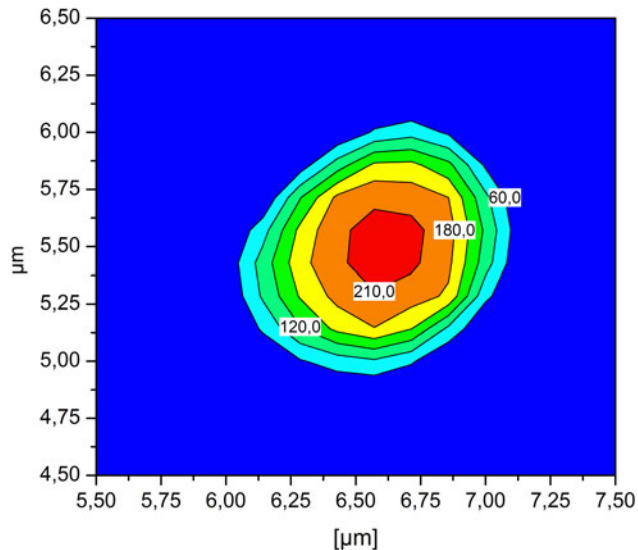
## 10.1. Auflösungsvermögen

Ausgehend von Gleichung 8.13 kann man die maximale Auflösung des konfokalen Mikroskops berechnen. Im Abschnitt 8.2.2 wurde das theoretische Limit für die laterale Auflösungsgrenze als 234 nm und für die axiale als 851 nm ermittelt. Dies gilt allerdings nur für eine infinitesimal kleine Lochblende. Die axiale Auflösung wäre ausgehend von Gleichung 8.15 bis zu einer Größe der Lochblende von

$$d_{\text{LB}} = \frac{2,5\lambda M}{\pi NA} = \frac{2,5 \cdot 633 \text{ nm} \cdot 18}{\pi \cdot 1,2} = 7,6 \mu\text{m} \quad (10.1)$$

annähernd optimal [60]. Die 18fache Vergrößerung ergibt sich, weil für die Abbildung auf die Lochblende eine Linse mit einer Brennweite von einer 60 mm verwendet wird. Diese Linse kann den Strahl nicht auf einen so kleinen Punkt fokussieren und man würde bei einer Lochblende mit dem Durchmesser  $d_{\text{LB}}$  viel Intensität verlieren. Deswegen wurde in diesem Versuch eine Lochblende mit einem Durchmesser von 50  $\mu\text{m}$  (4,3 mal größer als der Airy-Durchmesser) verwendet. Dadurch verschlechtert sich die axiale Auflösung ungefähr um den Faktor 2, d. h. auf ungefähr 1,7  $\mu\text{m}$  [60]. Die laterale Auflösung nähert sich der eines Weitfeld-Mikroskops (322 nm) an [65]. Um die tatsächlichen Werte zu ermitteln, wurde als Probe eine 20 nm große Kugel ausgewählt, die mit Farbstoff gefüllt war. Diese ist deutlich kleiner als die

Halbwertsbreite der lateralen und axialen Verteilungsfunktion. Die gemessene Intensitätsverteilung spiegelt somit direkt die Auflösung des konfokalen Mikroskops wider. Das Bild der Kugel ist in Abbildung 10.1 dargestellt.



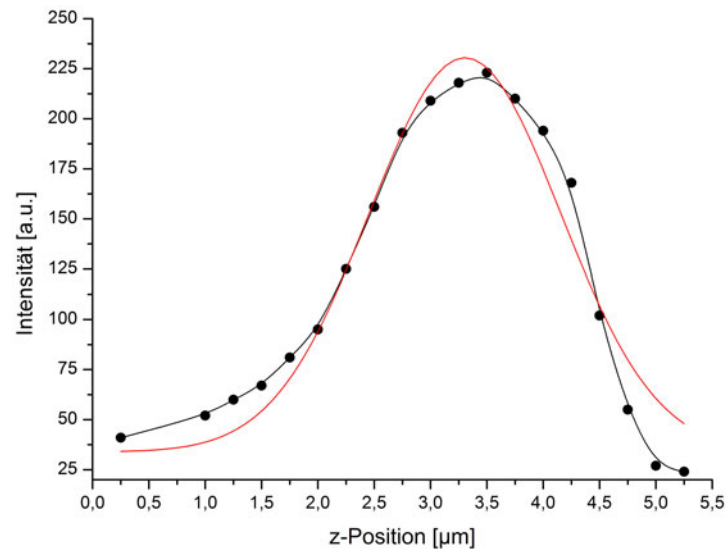
**Abbildung 10.1.:** Aufnahme einer 20 nm großen fluoreszierenden Kugel in der fokalen Ebene zur Bestimmung der Auflösung.

Für die Bestimmung der lateralen Ausmaße der Kugel wurde eine Regression der Daten unter Verwendung einer zweidimensionalen Gaußfunktion durchgeführt. Die Halbwertsbreite dieser Funktion liefert direkt die Auflösung in x und y. Sie beträgt 573 nm und weicht somit um den Faktor 1,8 vom theoretischen Wert ab.

Für die Bestimmung der Auflösung in z wurden Bilder bei verschiedenen z-Positionen aufgenommen. Die jeweiligen Intensitätsmaxima der Ebenen wurden bestimmt und in Abhängigkeit von der z-Position aufgetragen (siehe Abbildung 10.2). Eine Regression der Daten unter Verwendung einer Gaußfunktion ergibt die Halbwertsbreite und somit die axiale Auflösung zu 2 µm. Dies entspricht einer Abweichung um den Faktor 1,2.

## 10.2. Detektionseffizienz

Wie in Abschnitt 8.2.4 erwähnt, trägt das Objektiv maßgeblich zur Detektionseffizienz bei. Gemäß Gleichung 8.1 und 8.17 beträgt die Einsammeleffizienz eines Wasserimmersionsobjektivs ( $NA=1,2$ ;  $n=1,33$ ) 28,4 %. Bei einer Transmission von



**Abbildung 10.2.:** Bestimmung der z-Auflösung. Die maximale Intensität der jeweiligen Ebene ist gegen die z-Position aufgetragen. Die Auflösung ergibt sich aus ist die Halbwertsbreite der Gaußfunktion (rot), die durch Regression der Daten bestimmt wurde.

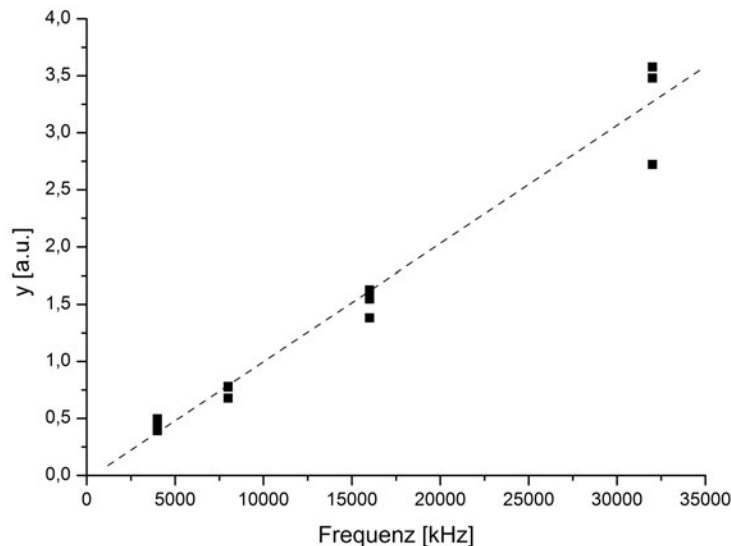
90 % passieren also 25,6 % der emittierten Photonen das Objektiv.

Anschließend wird das Licht über verschiedene optische Elemente umgelenkt, die alle unterschiedliche Transmissioneigenschaften haben. Im Detail handelt es sich hierbei um einen Spiegel (Transmission 90 %), drei Linsen (Transmission jeweils 95 %) und drei dichroitische Filter (Transmission 80 %, 70 % bzw. 80 %). In Summe haben diese optischen Elemente eine Transmission von ungefähr 35%. Zusammen mit dem Objektiv beträgt die Einsammeleffizienz somit ungefähr 9%. Der 50:50 Strahlteiler trennt 50 % des Lichts ab. Als nächstes optisches Element befindet sich eine Lochblende im Strahlengang. Diese hat eine Transmission von ungefähr 90 %. Das Licht wird letztendlich über eine Linse (Transmission 95 %) auf den Detektor fokussiert. Insgesamt treffen letztendlich 3,8 % der emittierten Photonen auf einen Detektor auf. Der Detektor hat eine Quanteneffizienz (d. h. wie viel Prozent der einfallenden Photonen werden auch tatsächlich detektiert) von näherungsweise 70 %. Es werden somit pro Detektor 2,7 % der von der Probe emittierten Photonen detektiert.

### 10.3. Latenzzeiten der Apparatur

Um eine neue Position anzufahren, benötigt der verkippbare Spiegel (Scanner) eine bestimmte Zeit. Wird während dieser Zeit ein Signal detektiert, so entspricht es nicht der Endposition sondern einer Mischung aller Positionen bis zum Endpunkt. Wenn schnell hintereinander Punkte angefahren werden, kann es passieren, dass der Scanner den gewünschten Punkt noch nicht erreicht hat, und schon der nächste Punkt vorgegeben wird. In einem solchen Fall wird der Punkt nie erreicht.

Beim Abfahren eines Kreises verursacht die Latenzzeit des Scanners (die Zeit, die er braucht, um eine neue Position anzufahren) eine verringerte Amplitude und eine Verschiebung in der Phase.



**Abbildung 10.3.:** Bestimmung der Latenzzeit  $\tau$  durch Auftragen von  $y = \sqrt{\left(\frac{A_0}{A}\right)^2 - 1}$  gegen  $f = \frac{\omega}{2\pi}$ . Die gestrichelte Linie entspricht der linearen Regression.

Um dieses zu berücksichtigen, muss durch die Software eine Korrektur vorgenommen werden. Diese ist abhängig von der Latenzzeit  $\tau$  und der Frequenz  $\omega$  mit welcher der Kreis abefahren wird. Für die Korrektur ergeben sich folgende Formeln:

$$A = A_0 \frac{1}{\sqrt{1 + \omega^2 \tau^2}} \quad (10.2)$$

$$\Phi = \Phi_0 + \arctan(\omega\tau), \quad (10.3)$$

$A$  ist die korrigierte Amplitude,  $A_0$  die gewünschte Amplitude,  $\Phi$  die korrigierte Phase und  $\Phi_0$  die gewünschte Phase.

$\omega$  wird durch eine Einstellung in der Software vorgegeben.

Durch Umformen der obigen Gleichung erhält man:

$$\omega\tau = \sqrt{\left(\frac{A_0}{A}\right)^2 - 1}, \quad (10.4)$$

$\tau$  entspricht dann der Steigung der linearen Regression in einem Graphen von  $\sqrt{\left(\frac{A_0}{A}\right)^2 - 1}$  gegen  $\omega$  und kann durch eine Messung von  $A$  und  $A_0$  für verschiedene  $\omega$  bestimmt werden. Die experimentellen Ergebnisse sind in Abbildung 10.3 dargestellt. Für  $\tau$  ergeben sich  $16,5\ \mu\text{s}$ . Bei 128 Punkten pro Kreis beträgt  $\tau$  pro Kreis ungefähr  $2,1\ \text{ms}$ .

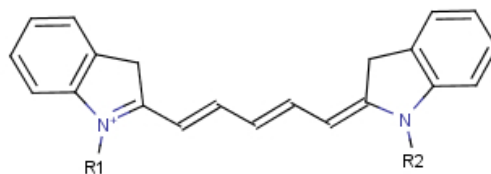
Um diese Latenzzeit des Scanners auszugleichen, werden die gewünschte Amplitude und Phase von der Software um den berechneten Betrag erhöht und ausgegeben.

## 10.4. Maximale Aufnahme­geschwindigkeit

Die Aufnahme­geschwindigkeit wird einerseits von der Geschwindigkeit des Scanners und andererseits von der Anzahl der detektierbaren Photonen bestimmt.

Die maximale Scannergeschwindigkeit ist von dem Hersteller (Physik Instrumente) als 300 Zeilen pro Sekunde angegeben. Bei einem hier verwendeten Bildausschnitt von  $256 \times 256$  Bildpunkten ergibt sich eine maximale Geschwindigkeit von  $13\ \mu\text{s}$  pro Bildpunkt (Pixel).

Für die Berechnung der benötigten Zahl von Photonen pro Pixel geht man von einem Hintergrundrauschen von 100 Photonen pro Sekunde aus (ausgehend von der hier verwendeten APD, Angabe aus dem Datenblatt des Herstellers). Möchte man ein Signal-zu-Rauschen-Verhältnis von mindestens 10 haben, so müssen mindestens 1000 Photonen pro Sekunde detektiert werden. Bei der oben bestimmten Detektionseffizienz von 2,7% entspricht dies ungefähr 37 000 aus der Probe emittierter Photonen pro Sekunde.



**Abbildung 10.4.:** Chemische Strukturformel des Farbstoffes Cy5.

Als Probe wird eine Kugel betrachtet, die einen Durchmesser vom 20 nm hat und mit dem Farbstoff Cy5 gefüllt ist. Laut Angaben des Herstellers (Molecular Probes)

beträgt die Anzahl der Farbstoffmoleküle pro Kugel ungefähr 180. Die Zeit, die ein Fluorophor im angeregten Zustand verbringt, bevor ein Photon emittiert wird und das Fluorophor in den Grundzustand zurückkehrt, wird als (Fluoreszenz)-Lebenszeit bezeichnet. Sie beträgt für ein Molekül Cy5 ungefähr 1 ns. Somit kann ein Molekül Cy5 maximal  $10^9$  Photonen pro Sekunde emittieren. Wie viele davon bei einer Anregung tatsächlich emittiert werden, hängt von der Fluoreszenzquanteneffizienz ab. Diese beschreibt das Verhältnis zwischen der Anzahl der emittierten Photonen und der Anzahl der Anregungsphotonen. Für Cy5 beträgt die Fluoreszenzquanteneffizienz 0,1 [66].

Folglich werden bei 180 Cy5 Molekülen ungefähr  $1,8 \cdot 10^{10}$  Photonen pro Sekunde bei einer maximalen Anregungsrate emittiert. Das ist deutlich mehr als die benötigten 37 000 Photonen pro Sekunde. Das bedeutet, dass bei einer ausreichend hohen Anregungsintensität die maximale Aufnahmegeschwindigkeit vom Scanner abhängt. Während der Messungen hat sich zusätzlich gezeigt, dass die maximale Scangeschwindigkeit (13  $\mu$ s pro Bildpunkt) nicht erreicht werden kann. Die maximal mögliche Geschwindigkeit betrug nur ungefähr ein Drittel der angegebenen. Daher konnte maximal ein Punkt pro 40  $\mu$ s angefahren werden.

Die maximale Aufnahmegeschwindigkeit beträgt somit 40  $\mu$ s pro Punkt.

## 10.5. Maximale detektierbare Geschwindigkeit der Partikel

Um eine möglichst hohe Genauigkeit bei der Positionsbestimmung erzielen zu können, wird ein umfahrener Kreis in 128 einzelne Punkte zerlegt, die nacheinander angefahren werden (128 ist das Maximum, welches in der Software eingestellt werden kann). Da der Scanner pro Punkt mindestens 40  $\mu$ s benötigt, braucht man für einen Kreis mindestens 5,12 ms. Nach mehreren Tests wurden 8 ms pro Kreis ausgewählt.

Die Software bietet die Möglichkeit, über mehrere Kreise zu mitteln bevor eine neue Position bestimmt wird. Jeder zusätzliche Kreis erhöht die Genauigkeit der Positionsbestimmung für ein ruhendes Partikel. Für bewegte Partikel erwartet man hingegen keinen starken Anstieg in der Genauigkeit und des Weiteren verliert man sich bewegende Partikel bei zu langer Dauer der Positionsbestimmung.

Um einen guten Wert zu ermitteln, haben wir eine Software entwickelt, die das Partikel mittels des 3D-Piezo-Tisches in der x,y Ebene im Kreis bewegen kann. Die Geschwindigkeit der Bewegung konnte frei eingestellt werden. Als Richtgeschwindigkeit haben wir 5  $\mu$ m/s ausgewählt, was der Bewegung von Viren innerhalb von Zellen



entspricht. Während der Messung hat sich herausgestellt, dass bei einer Integration über 4 Kreise ein 20 nm großes fluoreszentes Partikel problemlos und zusätzlich über viele Zyklen verfolgt werden kann. Für kleinere und größere Werte ging das Partikel öfter verloren, weil die Positionsbestimmung entweder zu ungenau war und der Scanner in die falsche Richtung bewegt wurde oder weil die Positionsbestimmung zu lange dauerte und das Partikel sich währenddessen aus dem Detektionsbereich herausbewegt hat.

Für eine theoretische Schätzung der Maximalgeschwindigkeit des Partikels wurde angenommen, dass das Partikel gerade dann noch verfolgt werden kann, wenn es während der Positionsbestimmung maximal den doppelten Scanradius zurücklegt. Bei vier Kreisen pro Position und 8 ms pro Kreis werden 32 ms pro Positionsbestimmung benötigt. Bei einem Radius von 2 Pixeln und 154 nm pro Pixel entspricht dies 19,25  $\mu\text{m/s}$ . Für die oben erwähnte Messanordnung konnte mit einem 20 nm großen fluoreszenten Partikel eine tatsächliche maximale Geschwindigkeit von 10  $\mu\text{m/s}$  in der x,y Ebene ermittelt werden.

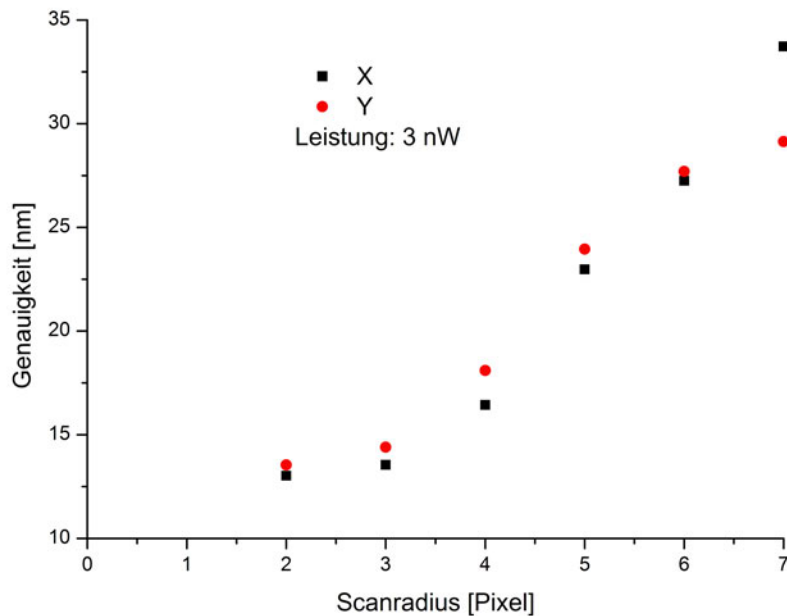
Um die Geschwindigkeit in z-Richtung zu bestimmen, wurde der 3D-Piezo-Tisch in der z-Achse periodisch nach oben und unten verfahren. Als Probe wurde wiederum ein 20 nm großes fluoreszentes Partikel ausgewählt. Als maximale Geschwindigkeit in der z-Ebene konnten experimentell 7  $\mu\text{m/s}$  ermittelt werden.

## 10.6. Positionsgenauigkeit

### 10.6.1. Positionsgenauigkeit in der x,y Ebene

Um eine Angabe über die Genauigkeit der berechneten Position machen zu können, müssen mehrere Versuche durchgeführt werden. Zum einen hängt die Genauigkeit in x,y von den Parametern des Scanners (genauer vom Radius und der Scangeschwindigkeit) und zum anderen von der eingesetzten Anregungsintensität ab. Als Probe wurden 20 nm große Partikel, die mit dem Farbstoff Cy5 gefüllt waren, eingesetzt. Für die eigentlichen Messungen wurden die Partikel fixiert und die Probe nicht weiter bewegt. Zu erwarten wäre somit eine konstante Position des Partikels. Durch die limitierte Genauigkeit der Positionsbestimmung schwankte jedoch die ermittelte Position. Die Schwankung konnte in zwei Beiträge zerlegt werden. Zum einen die eigentliche Ungenauigkeit der Positionsbestimmung und zum anderen die Bewegung des Mikroskops. Letztere ist näherungsweise linear von der Zeit abhängig und kann aus den gemessenen Daten ermittelt werden.

Als Parameter wurde in der ersten Messung der Radius verändert. Die Ergebnisse



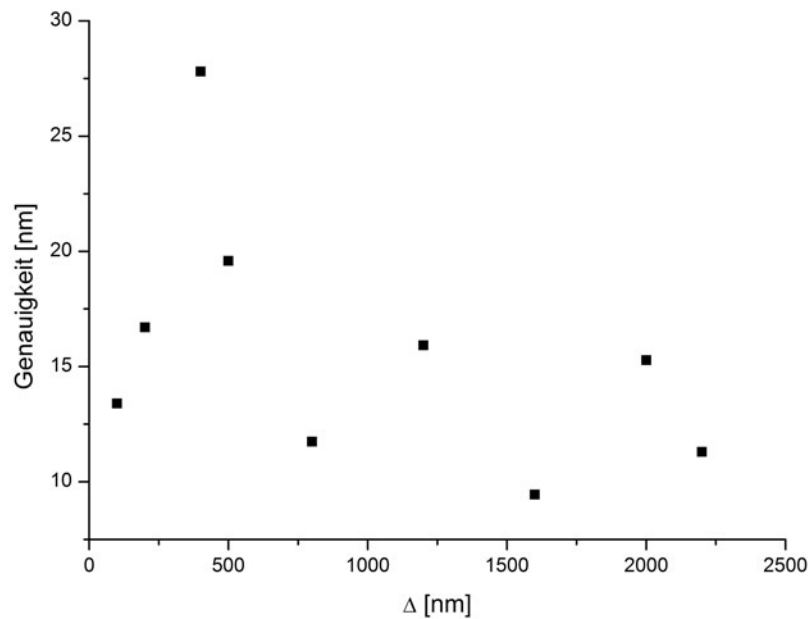
**Abbildung 10.5.:** Messung der Positionsgenauigkeit in Abhängigkeit vom Scanradius. Als Probe wurde eine 20 nm große fluoreszierende Kugel verwendet, die auf einem Deckglas fixiert wurde. Bei einem Scanradius von 1 Pixel ist ein deutliches Bleichen des Partikels festgestellt worden und somit wurde dieser Wert nicht berücksichtigt. Ein Pixel entspricht 154 nm. Es wurde über drei Messungen gemittelt.

der Messung sind in Abbildung 10.5 dargestellt. Man kann deutlich erkennen, dass sich die Positionsgenauigkeit mit zunehmendem Radius verschlechtert. Das hängt vor allem damit zusammen, dass die Intensität mit dem Abstand zum Partikel abnimmt und somit das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis immer schlechter wird. Der optimale Radius für ein Partikel, welches kleiner als das Auflösungsvermögen ist, ist somit 2 Pixel, also 308 nm. Die Positionsgenauigkeit in der x,y Ebene beträgt dann ungefähr 13 nm.

Die Intensität des Anregungslasers bei der obigen Messung betrug in etwa 3 nW auf der Probe. Es konnten ungefähr 13000 Photonen pro Sekunde detektiert werden. Bei einer Erhöhung der Intensität des Anregungslasers um den Faktor 10 auf 30 nW auf der Probe konnten ungefähr 150000 Photonen pro Sekunde detektiert werden. Die Positionsgenauigkeit bei einem Radius von 2 Pixeln (308 nm) lag bei ungefähr 8,5 nm. Es war aber auch ein leichtes Bleichen der Partikel nach mehreren Sekunden festzustellen. Bei einer Intensität des Anregungslasers von 0,3 nW konnte das Partikel nicht mehr über einen langen Zeitraum verfolgt werden. Die Messung wurde verworfen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei einer Zählrate von ungefähr 13 000 Photonen pro Sekunde die Position eines Partikels in  $x,y$  auf ungefähr 13 nm genau bestimmt werden kann, ohne dass es bleicht.

### 10.6.2. Positionsgenauigkeit in der $z$ Ebene

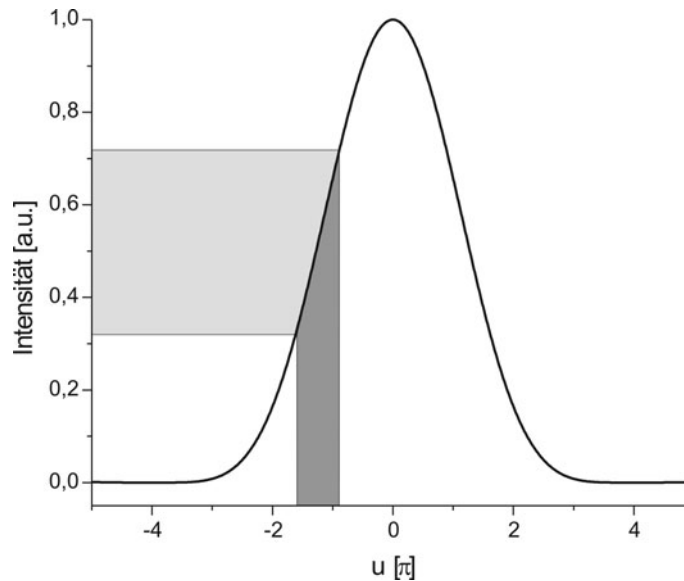


**Abbildung 10.6.:** Messung der Positionsgenauigkeit in Abhängigkeit vom Abstand zwischen den detektierten  $z$ -Ebenen. Als Probe wurde eine 20 nm große fluoreszierende Kugel verwendet, die auf einem Deckglas fixiert wurde.

Für die Messung in der  $z$ -Ebene wurde die gleiche Probe verwendet wie für die Messung in der  $x,y$  Ebene. Allerdings wurde jetzt der Abstand  $\Delta$  zwischen den detektierten  $z$ -Ebenen variiert. Hierfür wurde die Position der beiden Lochblenden verändert und somit für jeden Kanal eine andere  $z$ -Ebene für die Detektion ausgewählt. Die Position wurde derart verändert, dass sich der Mittelpunkt des Partikels immer in der Mitte zwischen den beiden detektierten  $z$ -Ebenen befand. Die Ergebnisse der Messung sind in Abbildung 10.6 dargestellt.

Die Genauigkeit der  $z$ -Position des Partikels schwankt leider zu stark, um eine genaue Aussage machen zu können. Dies liegt vor allem daran, dass sich durch Verschieben der Lochblenden auch deren Position in  $x$  und  $y$  leicht ändert. Dies führt zu einer Schwankung in der Detektionsintensität, die sich dann auf die Genauigkeit

auswirkt. Zu erwarten wäre ein Minimum bei der Halbwertsbreite der axialen Verteilungsfunktion (ungefähr  $2\ \mu\text{m}$ , siehe Abschnitt 10.1). Genau an diesen Stellen hat die Verteilungsfunktion ihren Wendepunkt, d.h. dass sich dort eine Positionsänderung am meisten in einer Intensitätsveränderung widerspiegelt (siehe Abbildung 10.7). Ungefähr in diesem Bereich wurde auch in Abbildung 10.6 eine hohe Genauigkeit erzielt.



**Abbildung 10.7.:** Funktionsverlauf der konfokalen axialen Verteilungsfunktion. Am Wendepunkt verursacht eine kleine Änderung in der Position (dunkelgrau) eine relativ große Änderung in der Intensität (hellgrau).

# 11. Erste Testergebnisse

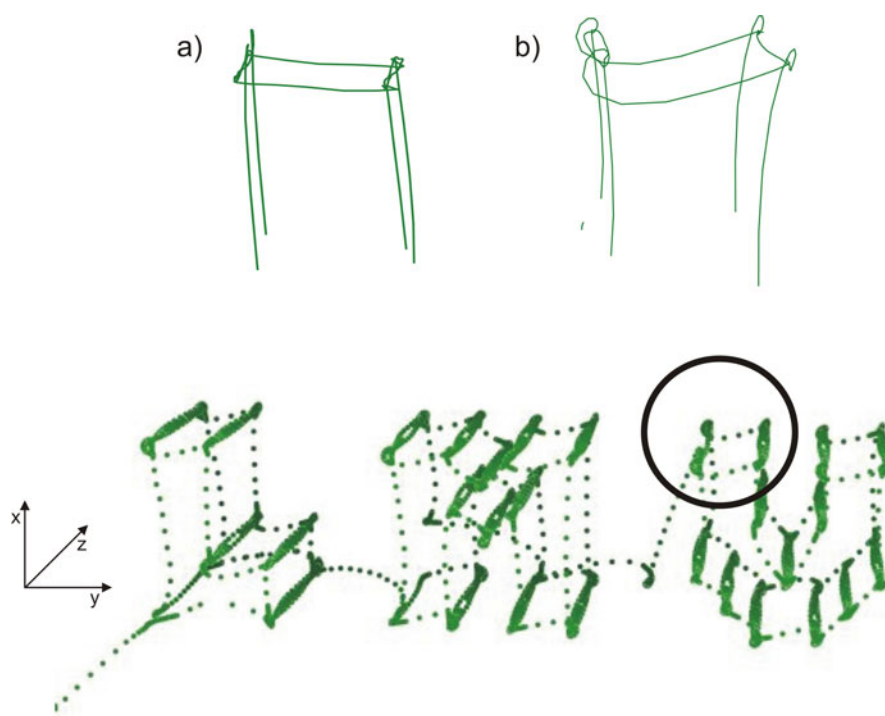
## 11.1. Definition eines Standards

Um die Ergebnisse verschiedener Einstellungen der Apparatur und der Software vergleichen zu können, haben wir einen internen Standard definiert.

Der interne Standard entspricht der dreidimensionalen Darstellung des LMU-Schriftzugs. Wir haben eine Software entwickelt, die den 3D-Piezo-Tisch so steuert, dass er diesen Schriftzug abfährt. Als Parameter kann die Geschwindigkeit und die Schrittweite variiert werden. Damit kann eine Art Rampe gefahren werden, was allzu große Sprünge beim Fahren verhindern sollte. Die Reihenfolge der Punkte wurde so gewählt, dass möglichst wenige 180° Wendungen beinhaltet sind.

Als Probe wird eine 20 nm große fluoreszierende Kugel verwendet. Sie ist auf der Deckglasoberfläche immobilisiert. Sobald die Software die Verfolgung des Partikels aufgenommen hat, wird der 3D-Piezo-Tisch in Bewegung gesetzt und die Trajektorie des Partikels aufgezeichnet (siehe Abbildung 11.1 unten). Insbesondere die Einstellung des Winkels zwischen dem Koordinatensystem in der Detektion und dem tatsächlichen Labor-Koordinatensystem spielt bei der Detektion des LMU-Schriftzugs eine entscheidende Rolle. Ist dieser Wert nicht richtig eingestellt, werden die Linien des Schriftzuges nicht richtig abgefahren. Statt einer geraden Linie ist dann eine spiralförmige Bahn zu beobachten (siehe Abbildung 11.1 b). Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Software die Bewegung des Partikels zunächst in der falschen Richtung vermutet und diese dann korrigieren muss.

Als ein ausreichender Wert für die Geschwindigkeit haben sich 5  $\mu\text{m/s}$  herausgestellt. Als Schrittweite wurden hierbei 0,1  $\mu\text{m}$  ausgewählt. Wird der obige Geschwindigkeitswert erreicht oder überboten, ist das System gut justiert.



**Abbildung 11.1.:** Verfolgung einer 20 nm großen fluoreszierenden Kugel entlang des dreidimensionalen LMU-Schriftzugs. Unten ist die erhaltene Trajektorie dargestellt. a) Ausschnitt (schwarzer Kreis) aus der unteren Trajektorie bei einem korrekt eingestellten Winkel zwischen dem Koordinatensystem in der Detektion und dem tatsächlichen Labor-Koordinatensystem. b) Derselbe Ausschnitt bei einem falschen Winkel. Statt gerader Linien werden spiralförmige Bahnen detektiert. Eine Filmsequenz der Trajektorie ist im Internet unter der Adresse <http://www.burkacky.com/diss> zu finden.

## 11.2. Verfolgung von einzelnen Partikeln in lebenden Zellen

Für diese Messung wurden menschliche Hepatomzellen (HUH-7, Lebertumor) ausgewählt, die mit künstlichen Viren versetzt werden. Die Viren wurden aus einer Mischung von Polyethylenimin (PEI) und DNA hergestellt [67]. Sie bieten gegenüber natürlichen Viren den Vorteil, dass die Größe variierbar ist, keine Gefahr der Mutation droht und die Struktur chemisch kontrolliert werden kann. Als Farbstoff ist eine Mischung aus Cy-3 und Cy-5 ausgewählt worden, damit die Partikel sowohl im Weitfeld als auch im konfokalen Bild beobachtet werden können. Die HUH-7 Zellen wurden derart modifiziert, dass deren Aktin-Fasern das grün fluoreszierende Protein eGFP exprimieren. Somit können im Weitfeld-Bild im blauen Kanal (Anregung mit 488 nm) die Aktin-Fasern visualisiert werden und im grünen Kanal (Anregung mit 561 nm) die künstlichen Viren. Zusätzlich werden die Viren in der konfokalen Detektion verfolgt. Das Objektiv wird dann von der Software automatisch so eingestellt, dass sich das verfolgte Virus im Fokus befindet. Die dazugehörige z-Ebene wird in der Weitfeld-Detektion aufgenommen.

Zur Auswertung der Daten werden die Bilder aus dem blauen und dem grünen Detektionskanal überlagert. Zusätzlich kann das verfolgte Partikel markiert werden. Die Bewegung des Partikels kann weiterhin in einer dreidimensionalen Trajektorie dargestellt werden. Die Ergebnisse einer solchen Messung sind in Abbildung 11.2 zu finden.

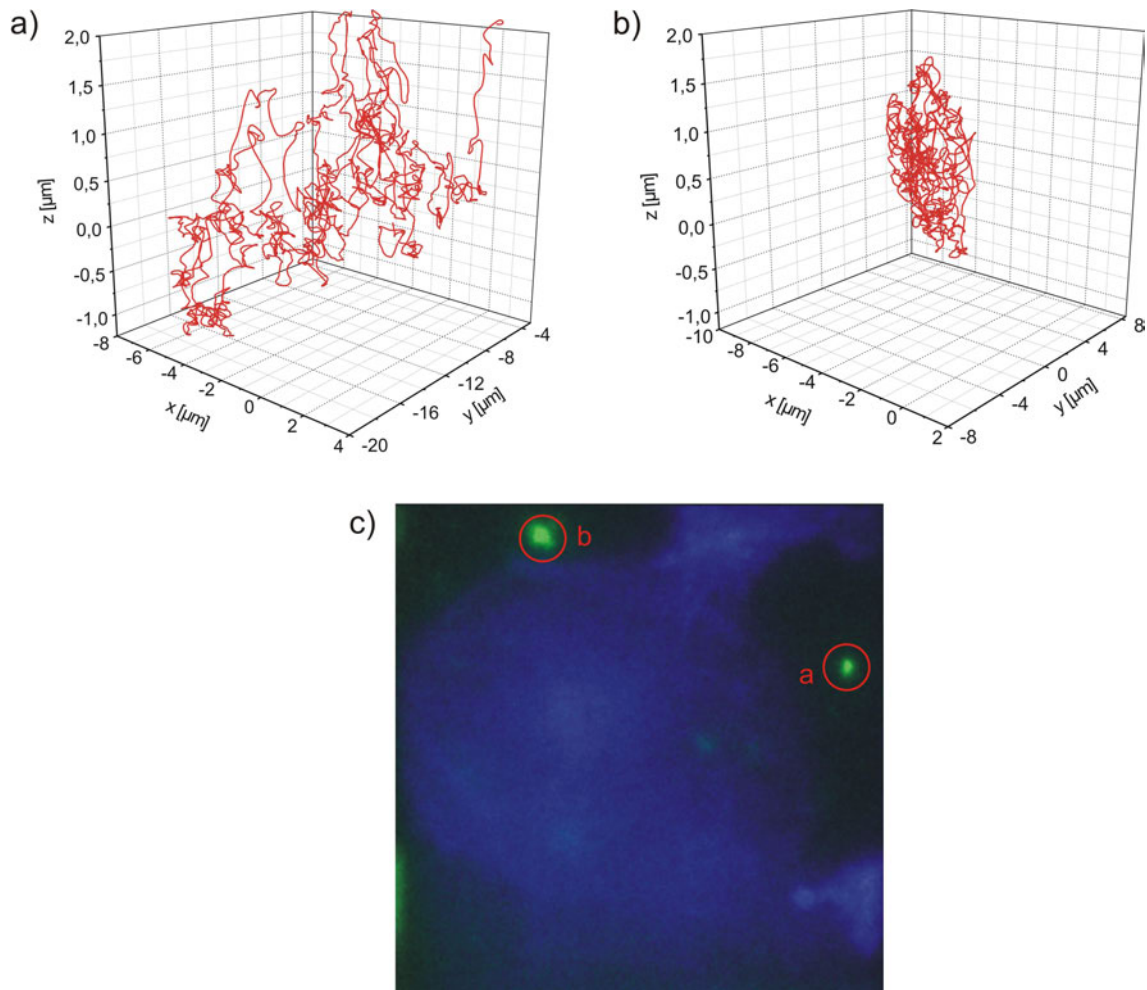
Betrachtet man das Bild in Abbildung 11.2 c, so befindet sich das Virus a außerhalb der Zelle. Das Virus b hingegen ist an der Zelloberfläche angelagert und bewegt sich nur wenig. Dieser Sachverhalt wird auch durch die entsprechenden Trajektorien bestätigt. Um dies weiter zu verdeutlichen, wird eine Analyse der Trajektorien durchgeführt. Hierbei betrachtet man für jeden Punkt  $P_i$  der Trajektorie den Abstand  $A_i$ , den das Virus nach einer bestimmten Anzahl an Schritten  $n$  zurückgelegt hat:

$$A_i(n) = P_{i+n} - P_i. \quad (11.1)$$

$\langle r^2 \rangle$  ist das mittlere Verschiebungswadrat (englisch: mean-square displacement) für jedes  $n$ :

$$\langle r^2 \rangle = \frac{1}{N-n} \sum_{i=1}^{N-n} A_i^2, \quad (11.2)$$

wobei  $N$  die Anzahl der Punkte in einer Trajektorie ist. Da der zeitliche Abstand zwischen den Punkten der Trajektorie konstant ist, kann  $n$  in eine Zeit  $t$  umgerechnet



**Abbildung 11.2.:** Trajektorien von künstlichen Viren in einer Umgebung von lebenden HUH-7 Zellen. Das Virus in Abbildung a bewegt sich außerhalb der Zelle. Die Trajektorie besteht aus 3400 Punkten. In Abbildung b ist ein Virus dargestellt, welches sich an der Zelloberfläche angelagert hat. Es bewegt sich nur sehr wenig. Die Trajektorie besteht aus 2120 Punkten. In Abbildung c ist das auf die jeweilige Partikelposition fokussierte Weitfeld-Bild dargestellt. Hier sind die Viren grün und die Aktin-Fasern der Zelle blau dargestellt. Die zu den Trajektorien gehörigen Viren sind mit einem roten Kreis markiert. Die Daten sind auch als Filme im Internet unter der Adresse <http://www.burkacky.com/diss> zu finden.

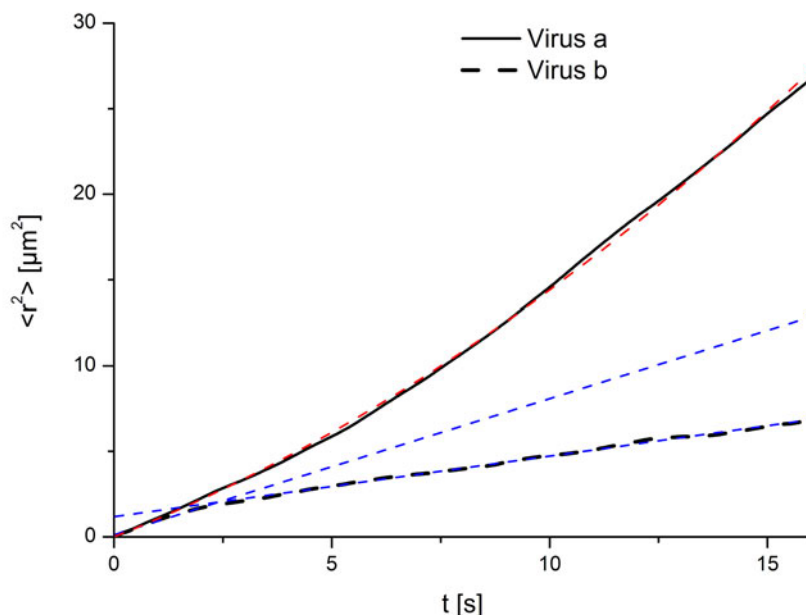
werden:

$$t = n \cdot 32 \text{ ms} \quad (11.3)$$

Trägt man  $\langle r^2 \rangle$  gegen  $t$  auf, so erhält man für die obige Messung den in Abbildung 11.3 dargestellten Graphen.

Aus dem Graphen kann man erkennen, dass bei Virus a  $\langle r^2 \rangle$  steiler als linear mit  $t$  ansteigt. Ein solcher Kurvenverlauf kann für ein Partikel außerhalb der Zelle als





**Abbildung 11.3.:** Auftragung des mittleren Verschiebungsquadrats  $\langle r^2 \rangle$  gegen die Zeit  $t$  für die in Abbildung 11.2 a und b dargestellten Trajektorien. 16 Sekunden entsprechen 500 Punkten in der Trajektorie. Die rote unterbrochene Linie entspricht einer Regression der Formel  $\langle r^2 \rangle = 6Dt + V^2t^2$  an die Daten von Virus a. Die beiden unterbrochenen blauen Linien sind die jeweiligen Regressionen der Gleichung  $\langle r^2 \rangle = 6Dt$  an die Daten von Virus b bei  $t < 2$  s bzw.  $t > 2$  s.

eine Kombination aus Diffusion und einem Fluss in der Lösung interpretiert werden [68]. Die Kurve kann angenähert werden mit:

$$\langle r^2 \rangle = 6Dt + V^2t^2, \quad (11.4)$$

wobei  $D$  der Diffusionskoeffizient und  $V$  die Geschwindigkeit des Flusses ist. Für Virus a ergeben sich ein  $D=0,17 \mu\text{m}^2/\text{s}$  und ein  $V=0,21 \mu\text{m}/\text{s}$  (rote unterbrochene Kurve in Abbildung 11.3).

Bei Virus b besteht die Kurve aus zwei verschiedenen Diffusionsbereichen. Diese können jeweils anhand der normalen Diffusion

$$\langle r^2 \rangle = 6Dt \quad (11.5)$$

angenähert werden (blaue unterbrochene Kurven in Abbildung 11.3). Im ersten Bereich ( $t < 2$  s) bewegt sich das Virus schneller  $D=0,13 \mu\text{m}^2/\text{s}$  und im zweiten Bereich ( $t > 2$  s) langsamer ( $D=0,06 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ). Dies lässt darauf schließen, dass sich das Virus

in einem kleinen Bereich relativ ungehindert bewegen kann. Seine Bewegung über eine längere Distanz ist allerdings durch die Zellmembran eingeschränkt.

## 12. Vergleich mit anderen Verfahren

Im den letzten beiden Abschnitten ist der in dieser Arbeit vorgestellte Aufbau charakterisiert worden und es wurde eine erste Messung in lebenden Zellen gezeigt. Die gemessenen Daten zeigen deutlich die Leistungsfähigkeit des Aufbaus. Aber wie sieht die Leistungsfähigkeit im Vergleich mit anderen Systemen aus?

Die bis jetzt häufigste Methode zur Charakterisierung von Partikelbewegungen ist die Weitfeld-Mikroskopie. Diese ermöglicht unter besten Bedingungen eine bis auf 1 nm genaue Bestimmung der Partikel-Position in der x,y-Ebene [69]. Allerdings bei einer Zeitauflösung von 500 ms und ohne jegliche Information über die genaue z-Position. Erst durch die Aufnahme von Bildern in mehreren z-Ebenen kann auch die axiale Position des Partikels auf mehrere Nanometer genau bestimmt werden [51, 52]. Gleichzeitig verschlechtert sich aber die zeitliche Auflösung auf mehrere Sekunden, da bei jeder Positionsbestimmung mehrere Bilder aufgenommen werden müssen. Dies verhindert die Beobachtung vieler sich schnell bewegender biologischer Systeme. Eine weitere Möglichkeit stellt die Auswertung von Beugungsmustern der Partikel dar [70, 71]. Anhand derer kann der axiale Abstand des Partikels von der detektierten Ebene berechnet werden. Allerdings ist hierbei der maximale axiale Abstand der Partikel auf 3  $\mu\text{m}$  limitiert und man benötigt für eine genaue Positionsbestimmung ungefähr 100 ms Aufnahmezeit. Dadurch wird die Anzahl der beobachtbaren diffundierenden Partikel stark eingeschränkt.

Bei allen bislang besprochenen Verfahren erfolgt die Auswertung der Trajektorien im Nachhinein, was keinen direkten Einfluss auf die Dynamik in der Probe zulässt. Partikel, die sich während einer solchen Aufnahme aus dem Detektionsvolumen heraus bewegen, sind für die Auswertung verloren.

Im Gegensatz hierzu können bei der in dieser Arbeit vorgestellten Methode Partikel über einen großen Bereich ( $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$ ) in Echtzeit beobachtet werden, ohne verloren zu gehen. Die dreidimensionale Position des Partikels kann innerhalb von 32 ms genauer als 15 nm bestimmt werden. Eine vergleichbare Geschwindigkeit bei einem vergleichbar großen Detektionsbereich konnte bis jetzt mit keiner anderen Methode erreicht werden. Das eröffnet die Möglichkeit selbst schnelle Partikel in Echtzeit in drei Dimensionen über einen großen Bereich zu verfolgen.

Zusätzlich verhindert das Abfahren eines Kreises um das Partikel herum ein schnel-

les Bleichen des Partikels. Dies ermöglicht das Verfolgen der Partikel über mehrere Stunden mit einer gleichbleibend hohen Zeitauflösung. Zusätzlich werden Regionen außerhalb vom Partikel nicht gebleicht.

Weiterhin können mehrere Partikel gleichzeitig verfolgt werden, falls sie sich nicht zu schnell bewegen. Eine zusätzliche Weitfeld-Detektion in zwei Farben ermöglicht es, parallel die Umgebung zu erfassen und Aussagen über die Verteilung zweier unterschiedlicher Chromophore zu liefern.

Ein Problem stellen benachbarte Partikel dar. So kann nicht immer klar unterschieden werden, ob das gleiche Partikel weiterhin verfolgt wird oder ein Wechsel zu einem benachbarten Partikel erfolgt ist. Des Weiteren können sehr helle Strukturen in der Nähe eines Partikels dessen Verfolgung erschweren.

## 13. Zusammenfassung der Ergebnisse

Wie in den vorigen Kapiteln gezeigt wurde, verfügt das hier beschriebene kombinierte konfokale und Weitfeld-Mikroskop über die Möglichkeit, ein Partikel in drei Dimensionen in Echtzeit zu verfolgen und gleichzeitig Bilder von der Umgebung aufzunehmen.

Insbesondere die Verfolgung der Partikel geschieht mit einer großen Genauigkeit in der Positionsbestimmung (besser als 15 nm in allen drei Dimensionen, siehe Abschnitt 10.6). Auch sich schnell bewegende Partikel (Geschwindigkeit ca. 10  $\mu\text{m/s}$ ) stellen kein Problem dar und können, ohne das Partikel zu verlieren, verfolgt werden (siehe Abschnitt 10.5). Erwähnenswert ist auch die Tatsache, dass für die Anregung nur eine geringe Leistung verwendet werden muss (ca. 3 nW) und somit das Ausbleichen der Partikel effektiv vermieden wird. Durch die Aufteilung in zwei Detektionskanäle können zwei z-Ebenen gleichzeitig aufgenommen und somit die z-Position bestimmt werden (siehe Abschnitt 8.3.2 und Abbildung 7.2). Dadurch wird einerseits die Aufnahmezeit verringert und andererseits muss das Objektiv für die z-Positionsbestimmung nicht verfahren werden. Die Probe wird somit immer im Fokus belassen, was vor allem für das Weitfeld-Bild von großer Bedeutung ist.

Die Weitfeld-Aufnahmen können in zwei Kanälen durchgeführt werden. Das erlaubt die Markierung mit zwei verschiedenen Farbstoffen (zum Beispiel GFP und RFP, siehe Abschnitt 9.2). Es lassen sich daher gleichzeitig zwei biologisch relevante Strukturen unabhängig voneinander untersuchen.



## 14. Ausblick

Die dreidimensionale Verfolgung von einzelnen Partikeln innerhalb von lebenden Organismen in Echtzeit stellt einen neuen Meilenstein in der Beobachtung von biologischen Vorgängen dar. Allerdings sind die Anforderungen an ein entsprechendes optisches System sehr hoch. Die Position des Partikels sollte auf wenige Nanometer genau bestimmt werden können. Die dafür benötigte Zeit sollte möglichst kurz sein, um auch sich schnell bewegende Partikel detektieren zu können.

Die Positiongenauigkeit des hier vorgestellten Systems ist besser als 15 nm in allen drei Dimensionen. Für eine Positionsbestimmung werden lediglich 32 ms benötigt. Selbst bei einer geringen Anregungsintensität (3 nW) können einzelne Partikel in lebenden Zellen in Echtzeit verfolgt werden. Das Volumen, in dem ein Partikel verfolgt werden kann, ist nur durch die Reichweite des verkipptbaren Spiegels und des Objektiv-Positionierers auf  $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$  beschränkt.

Ein Vergleich mit anderen Methoden (siehe Abschnitt 12) zeigt, dass bis jetzt keine andere Methode in einem genügend großen Detektionsvolumen sowohl eine so gute zeitliche als auch räumliche Auflösung liefern kann. Dies eröffnet die Möglichkeit zur Durchführung von zahlreichen neuen Experimenten mit verschiedenen Fragestellungen. So ist es bereits gelungen, einzelne Viren in lebender Zelle in Echtzeit zu verfolgen (siehe Abschnitt 11). Die Überlagerung der daraus resultierenden dreidimensionalen Trajektorien ermöglichen es, die Bewegung der Viren genau zu analysieren. Anhand dessen lassen sich die Möglichkeiten besser einschätzen, wie Infektionswege unterbunden werden können.

Zusätzlich kann zum Beispiel der Transport von verschiedenen Stoffen in einer Zelle oder zwischen zwei Zellen beobachtet werden. An einer Quantifizierung eines solchen Transports von mRNA von der Mutter- in die Tochterzelle bei Hefe wird zur Zeit in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Jansen gearbeitet.





# Literaturverzeichnis

- [1] DUNCAN, M. D. ; REINTJES, J. ; MANUCCIA, T. J.: Scanning Coherent Anti-Stokes Raman Microscope. In: *Optics Letters* 7 (1982), Nr. 8, S. 350–352
- [2] 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
- [3] EVANS, C. L. ; POTMA, E. O. ; PUORIS’HAAG, M. ; CÔTÉ, D. ; LIN, C. P. ; XIE, X. S.: Chemical imaging of tissue in vivo with video-rate coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (2005), Nr. 46, S. 16807–16812
- [4] 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), S. 728–735
- [5] EVANS, C. L. ; LÉGARÉ, F. ; GANIKHANOV, F. ; XIE, X. S.: Towards CARS Endoscopy. In: *Optics Express* 14 (2006), S. 1292–1294
- [6] MILLES, R. B. ; LEMPERT, W. R. ; FORKEY, J. N.: Laser Rayleigh scattering. In: *Meas. Sci. Technol.* 12 (2001), S. R33–R51
- [7] BORN, M. ; WOLF, E.: *Principles of Optics*. Cambridge University Press, 1999
- [8] PETRY, R. ; SCHMITT, M. ; POPP, J.: Raman Spectroscopy - A Prospective Tool in the Life Sciences. In: *ChemPhysChem* 4 (2003), S. 14–30
- [9] MAKER, P. D. ; TERHUNE, R. W.: Study of optical effects due to an induced polarisation third order in the electric field strenght. In: *Phys. Rev. A.* 137 (1965), S. 801–818
- [10] BEGLEY, R.F. ; HARVEY, A.B. ; BYER, R.L.: Coherent anti-Stokes Raman scattering. In: *Appl. Phys. Lett.* 25 (1974), S. 387–390

- [11] DEMTRÖDER, W.: *Laser Spectroscopy*. Springer, 2003
- [12] LI, L. ; WANG, H. ; CHENG, J.-X.: Quantitative coherent anti-Stokes Raman scattering imaging of lipid distribution in coexisting domains. In: *Biophys. J.* 89 (2005), S. 3480–3490
- [13] LOTEM, H. ; LYNCH, R. T. ; BLOEMBERGEN, N.: Interference between Raman Resonances in 4-Wave Difference Mixing. In: *Phys. Rev. A* 14 (1976), S. 1748–1755
- [14] POTMA, Eric O. ; BOEIJ, Wim P. ; WIERSMA, Douwe A.: Nonlinear coherent four-wave mixing in optical microscopy. In: *J. Opt. Soc. Am. B.* 17 (2000), S. 1678–1684
- [15] YUAN, J. ; XIAO, F. ; CHENG, C. ; WANG, G. ; XU, Z.: The intensity distributions of collected signals in coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. In: *Colloids and Surfaces A* 257-258 (2005), S. 525–534
- [16] CHENG, J.-X. ; VOLKMER, A. ; XIE, X. S.: Theoretical and experimental characterization of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. In: *J. opt. Soc. Am. B.* 19 (2002), S. 1363–1375
- [17] CHENG, Ji-Xin ; BOOK, Lewis D. ; XIE, X. S.: Polarization coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. In: *Optics Letters* 26 (2001), Nr. 17, S. 1341–1343
- [18] AKHMANOV, S. A. ; BUNKIN, A. F. ; IVANOV, S. G. ; KOROTEEV, N. I.: Coherent Ellipsometry of Raman-Scattering of Light. In: *JETP Lett.* 25 (1977), S. 416–420
- [19] 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* 8702 (2001), Nr. 2, S. 023901
- [20] MÜLLER, M. ; SCHINS, J. M.: Imaging the thermodynamic state of lipid membranes with multiplex CARS microscopy. In: *Journal of Physical Chemistry B* 106 (2002), Nr. 14, S. 3715–3723
- [21] CHENG, J.-X. ; VOLKMER, A. ; BOOK, L. D. ; XIE, X. S.: Multiplex Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microspectroscopy and Study of Lipid Vesicles. In: *J. Phys. Chem.* 106 (2002), S. 8493–8489

- 
- [22] KANO, H. ; HAMAGUCHI, H.: Ultrabroadband (2500 cm<sup>-1</sup>) multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy using a supercontinuum generated from a photonic crystal fiber. In: *Applied Physics Letters* 86 (2005), Nr. 12, S. 121113
- [23] KANO, H. ; HAMAGUCHI, H.: Vibrationally resonant imaging of a single living cell by supercontinuum-based multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy. In: *Optics Express* 13 (2005), Nr. 4, S. 1322–1327
- [24] HELLERER, T. ; ENEJDER, A. M. K. ; ZUMBUSCH, A.: Spectral focusing: High spectral resolution spectroscopy with broad-bandwidth laser pulses. In: *Applied Physics Letters* 85 (2004), Nr. 1, S. 25–27
- [25] HELLERER, T. ; ENEJDER, A. M. K. ; BURKACKY, O. ; ZUMBUSCH, A.: Spectral focusing: High resolution CARS microscopy with broad-band pulses. In: *Proc. of SPIE* 5323 (2004), S. 223–229
- [26] 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
- [27] EVANS, C. L. ; POTMA, E. O. ; XIE, X. S.: Coherent anti-Stokes Raman scattering spectral interferometry: determination of the real and imaginary components of nonlinear susceptibility  $\chi^{(3)}$  for vibrational microscopy. In: *Optics Letters* 29 (2004), S. 2923–2925
- [28] GANIKHANOV, F. ; EVANS, C. L. ; SAAR, B. G. ; XIE, X. S.: High-sensitivity vibrational imaging with frequency modulation coherent anti-Stokes Raman scattering (FM CARS) microscopy. In: *Optics Letters* 31 (2006), Nr. 12, S. 1872–1874
- [29] MESCHEDÉ: *Optik, Licht und Laser*. Teubner, 1999
- [30] HELLERER, Th.: *CARS Mikroskopie: Entwicklung und Anwendung*, LMU München, Diss., 2004
- [31] HECHT, E.: *Optik*. Oldenbourg Verlag, 2005
- [32] RULLIERE, C. (Hrsg.): *Femtosecond Laser Pulses*. Springer, 1998
- [33] MARTENS, W. N. ; FROST, R. L. ; KRISTOF, J. ; KLOPROGGE, J. T.: Raman spectroscopy of dimethyl sulphoxide and deuterated dimethyl sulphoxide at 298 and 77 K. In: *Journal of Raman Spectroscopy* 33 (2002), S. 84–91

- [34] WURPEL, G. W. H. ; RINIA, H. A. ; MULLER, M.: Imaging orientational order and lipid density in multilamellar vesicles with multiplex CARS microscopy. In: *Journal of Microscopy* 218 (2005), S. 37–45
- [35] NAN, X. ; TONARY, A. M. ; STOLOW, A. ; XIE, X.S. ; PEZACKI, J.P.: Intracellular Imaging of HCV RNA and Cellular Lipids by Using Simultaneous Two-Photon Fluorescence and Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopies. In: *ChemBioChem* 7 (2006), S. 1895–1897
- [36] 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), S. 642–650
- [37] ENGEL, L.W. ; YOUNG, N.A.: Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review. In: *Cancer research* 38 (1978), S. 4327–4339
- [38] MEISTER, A. M. E. A.: Glutathione. In: *Ann. Rev. Biochem.* 52 (1983), S. 711–760
- [39] MÜLLER-ESTERL, W.: *Biochemie*. Elsevier, 2004
- [40] BARNHAM, Kevin J. ; MASTERS, Colin L. ; BUSH, Asley I.: Neurodegenerative diseases and oxidative stress. In: *Nature Reviews Drug Discovery* 3 (2004), S. 205–214
- [41] TEMPLE, Mark D. ; PERRONE, Gabriel G. ; DAWES, Ian W.: Complex cellular responses to reactive oxygen species. In: *Trends in Cell biology* 15 (2005), S. 319–326
- [42] HAYES, John D. ; FLANAGAN, Jack U. ; R., Jowsey I.: Glutathione Transferases. In: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45 (2005), S. 51–88
- [43] PIQUART, Michel ; GRAJCAR, Lydie ; BARON, Marie H. ; ABEDINZADEH, Zohreh: Vibrational Spectroscopic Study of Glutathione Complexation in Aqueous Solutions. In: *Biospectroscopy* 5 (1999), S. 328–337
- [44] MCKAY, R.M. ; MCKAY, J.P. ; AVERY, L. ; GRAFF, J.M.: C-elegans: A model for exploring the genetics of fat storage. In: *Developmental Cell* 4 (2003), S. 131–142
- [45] *Kapitel Feeding and Defecation*. In: AVERY, L. ; THOMAS, J.H.: *The Nematode C. elegans II*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997, S. 679–716

- 
- [46] RINIA, H. A. ; BONN, M. ; MÜLLER, M. ; VARTIAINEN, E. M.: Quantitative CARS Spectroscopy Using the Maximum Entropy Method: The Main Lipid Phase Transition. In: *ChemPhysChem* 8 (2007), Nr. 2, S. 279–287
- [47] SEISENBERGER, G. ; RIED, M. U. ; ENDRESS, T. ; BUNING, H. ; HALLEK, M. ; BRÄUCHLE, C.: Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. In: *Science* 294 (2001), S. 1929–1932
- [48] BAUSINGER, R. ; GERSDORFF, K. von ; BRAECKMANS, K. ; OGRIS, M. ; WAGNER, E. ; BRÄUCHLE, C. ; ZUMBUSCH, A.: The transport of nanosized gene carriers unraveled by live-cell imaging. In: *Angewandte Chemie-International Edition* 45 (2006), S. 1568–1572
- [49] KUBITSCHKE, U. ; KUCKMANN, O. ; KUES, T. ; PETERS, R.: Imaging and tracking of single GFP molecules in solution. In: *Biophysical Journal* 78 (2000), Apr, Nr. 4, S. 2170–2179
- [50] GOULIAN, M. ; SIMON, S. M.: Tracking single proteins within cells. In: *Biophysical Journal* 79 (2000), Oct, Nr. 4, S. 2188–2198
- [51] LI, D. D. ; XIONG, J. ; QU, A. L. ; XU, T.: Three-dimensional tracking of single secretory granules in live PC12 cells. In: *Biophysical Journal* 87 (2004), Sep, Nr. 3, S. 1991–2001
- [52] BORNFLETH, H. ; EDELMANN, P. ; ZINK, D. ; CREMER, T. ; CREMER, C.: Quantitative motion analysis of subchromosomal foci in living cells using four-dimensional microscopy. In: *Biophysical Journal* 77 (1999), Nr. 5, S. 2871–2886
- [53] KAO, H. P. ; VERKMAN, A. S.: Tracking of Single Fluorescent Particles in 3 Dimensions - Use of Cylindrical Optics to Encode Particle Position. In: *Biophysical Journal* 67 (1994), Sep, Nr. 3, S. 1291–1300
- [54] ENDERLEIN, J.: Tracking of fluorescent molecules diffusing within membranes. In: *Applied Physics B-Lasers and Optics* 71 (2000), Nr. 5, S. 773–777
- [55] KIS-PETIKOVA, K. ; GRATTON, E.: Distance measurement by circular scanning of the excitation beam in the two-photon microscope. In: *Microscopy Research and Technique* 63 (2004), Jan 1, Nr. 1, S. 34–49
- [56] LEVI, V. ; RUAN, Q. Q. ; GRATTON, E.: 3-D particle tracking in a two-photon microscope: Application to the study of molecular dynamics in cells. In: *Biophysical Journal* 88 (2005), Apr, Nr. 4, S. 2919–2928

- [57] HELL, Stefan W. ; WICHMANN, Jan: Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. In: *Optics Letters* 19 (1994), Nr. 11, S. 780–782
- [58] WESTPHAL, Volker ; HELL, Stefan W.: Nanoscale Resolution in the Focal Plane of an Optical Microscope. In: *Phys. Rev. Lett.* 94 (2005), S. 143903
- [59] WILSON, T. ; PAWLEY, J.B. (Hrsg.): *The role of the pinhole in confocal imaging systems, in Handbook of Biological Confocal Microscopy.* Plenum Press: New York, 1995
- [60] *Kapitel Signal-to-Noise Ratio in Confocal Microscopes.* In: SHEPPARD, C. J. R. ; X., Gan ; GU, M. ; ROY, M.: *Handbook of Biological Confocal Microscopy.* Springer, 2006, S. 442–452
- [61] CENTONZE, V. ; PAWLEY, J. ; PAWLEY, J. (Hrsg.): *Tutorial on practical confocal microscopy and use of the confocal test specimen, in Handbook of Biological Confocal Microscopy.* Plenum Press: New York, 1995
- [62] BERLAND, K. M. ; SO, P. T. C. ; GRATTON, E.: 2-Photon Fluorescence Correlation Spectroscopy - Method and Application to the Intracellular Environment. In: *Biophysical Journal* 68 (1995), Feb, Nr. 2, S. 694–701
- [63] LINKELFELD, Christian: Technische Grundlagen der Köhlerschen Beleuchtung. In: *www.mikroskopie.de* (2002)
- [64] KÖHLER, A.: Ein neues Beleuchtungsverfahren für mikrophotographische Zwecke. In: *Z. Wiss. Mikr.* 10 (1893), S. 443–440
- [65] MÜLLER, M.: *Confocal Fluorescence Microscopy.* SPIE, 2006
- [66] LAKOWICZ, Joseph R. (Hrsg.): *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* Springer, 2006
- [67] BOECKLE, S. ; GERSDORFF, K. von ; PIEPEN, S. van d. ; CULMSEE, C. ; WAGNER, E. ; OGRIS, M.: Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer. In: *Journal of Gene Medicine* 6 (2004), Nr. 10, S. 1102–1111
- [68] SAXTON, M. J. ; JACOBSEN, K.: Single-Particle Tracking: Application to Membrane Dynamics. In: *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26 (1997), S. 373–399
- [69] YILDIZ, A. ; FORKEY, J. N. ; MCKINNEY, S. A. ; HA, T. ; GOLDMAN, Y. E. ; SELVIN, P. R.: Myosin V walks hand-over-hand: Single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. In: *Science* 300 (2003), Jun 27, Nr. 5628, S. 2061–2065

- [70] SPEIDEL, M. ; JONAS, A. ; FLORIN, E. L.: Three-dimensional tracking of fluorescent nanoparticles with subnanometer precision by use of off-focus imaging. In: *Optics Letters* 28 (2003), Nr. 2, S. 69–71
- [71] WU, M. M. ; ROBERTS, J. W. ; BUCKLEY, M.: Three-dimensional fluorescent particle tracking at micron-scale using a single camera. In: *Experiments in Fluids* 38 (2005), S. 461–465





# Veröffentlichungen

## Zeitschriften

1. Th. Hellerer, A. M. K. Enejder, O. Burkacky, A. Zumbusch  
*Highly efficient coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS)-microscopy of biological samples*  
Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng. **5323** (2004) 223-229
2. C. Krinninger, C. Högg, H. Nöth, J.C. Galvez Ruiz, P. Mayer, O. Burkacky, A. Zumbusch, I.-P. Lorenz  
*New dichroic, dinuclear  $\mu_2$  -( $\eta^2$ -NO)-nitrosoaniline-bridged complexes of rhenium of the type  $[(CO)_3ReX_2ONC_6H_4NR_2]$  ( $X = Cl, Br, I$ ;  $R = Me, Et$ )*  
Chem. Eur. J. **11** (2005) 7228-7236
3. A. Zumbusch, O. Burkacky  
*Chemische Selektivität ohne Anfärben: CARS Mikroskopie*  
Nachr. Chem. **54** (2006) 38
4. O. Burkacky, C. Brackmann, A. Zumbusch, A. M. K. Enejder  
*Dual-pump coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy*  
Optics Letters **31** (2006) 3656-3658.
5. O. Burkacky, Y. Katayama, E. Gratton, D. C. Lamb, C. Bräuchle  
*A novel microscope for 3-D particle tracking with simultaneous wide-field imaging*  
in Vorbereitung.

## Bücher

1. O. Burkacky, A. Zumbusch  
Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) microscopy  
in *Modern Concepts in Biomedical Vibrational Spectroscopy*  
Blackwell, in Vorbereitung

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Ondrej Burkacky  
Geburtsdatum: 07.02.1980  
Geburtsort: Prag  
Anschrift: Hinterbärenbadstrasse 2, 81373 München  
Familienstand: ledig  
Nationalität: tschechisch

## Hochschulreife

9/1990 - 6/1998 Akademisches Gymnasium Linz, Österreich  
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

## Studium

11/1998 - 07/2003 Studium der Chemie (LMU München)  
Abschluß: Diplom  
seit 10/2003 wissenschaftlicher Mitarbeiter am LS Prof. Bräuchle,  
Institut für Physikalische Chemie der LMU München,  
Bearbeitung des vorliegenden Themas  
seit 10/2004 Mitglied im internationalen Doktorantenkolleg NanoBioTechnology  
des Elitenetzwerks Bayern

## Danksagung

Ich möchte mich insbesondere bei Prof. Dr. Christoph Bräuchle für die Schirmherrschaft über meine Dissertation und das stets in mich gesetzte Vertrauen bedanken. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Mein Dank geht auch an Prof. Dr. Andreas Zumbusch, Prof. Dr. Annika Enejder und Dr. Don Lamb für die ausgezeichnete und sehr persönliche Betreuung.

Dr. Thomas Hellerer danke ich für die vielen Antworten auf meine physikalischen Fragen, die so ausformuliert waren, dass sogar ich als Chemiker sie verstehen konnte. Yoshihiko Katayama danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit und vor allem für den Spaß, den wir dabei hatten.

Bei meinen schwedischen Kollegen Dr. Christian Brackmann und Per Hillertz möchte ich mich an dieser Stelle entschuldigen, dass ich deren Arbeitszeiten während meines Aufenthaltes in Göteborg stark erweitert habe. Es war aber nur deswegen, weil mir die Arbeit dort mit ihnen so viel Spaß gemacht hat.

Dem gesamten AK Bräuchle danke ich für die wertvollen Diskussionen und die zahlreichen außeruniversitären Aktivitäten. Es war mir eine große Ehre mit so vielen so sympathischen Leuten zusammengearbeitet zu haben.

Mein Dank geht auch an Dr. Moritz Ehrl, der stets bemüht war, eine Lösung für alle meine Probleme zu finden.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Praktikanten Markus Kowalewski, Susanne Braunmüller, Christof Högg und Veronika Zinth bedanken. Ohne deren unermüdlichen Einsatz wäre diese Arbeit nie so erfolgreich zustande gekommen.

Monika Franke danke ich für die jederzeit freundliche Hilfestellung bei der Vorbereitung der biologischen Proben.

Allen Mitarbeitern der Feinmechanik- und der Elektronikwerkstatt (insbesondere Peter Straube, Robert Leeb, Ralf Hiermaier und Axel Gersdorf) danke ich für die freundliche Unterstützung und für die praktische Umsetzung meiner zum Teil sehr außergewöhnlichen Ideen.

Mein größter Dank geht an meine Eltern, die immer alles getan haben, damit ich ein erfolgreiches Leben führen kann.

Meiner Freundin Julia danke ich für ihre unerschöpfliche Liebe und vorab dafür, dass sie mich auch in Zukunft ertragen wird.