

Charakterisierung lichtempfindlicher Systeme  
mit 2-Photonen-Absorption und breitbandiger,  
zeitaufgelöster Spektroskopie

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
David Urmann  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt 2017  
(D30)

vom Fachbereich 14 der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Michael Karas

Gutachter: Prof. Dr. Josef Wachtveitl  
Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Datum der Disputation:

*„Ein Ziel ohne Plan ist nur ein Wunsch“*

Antoine de Saint-Exupéry



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theorie</b>	<b>5</b>
2.1	Spektroskopie . . . . .	5
2.1.1	Einführung . . . . .	5
2.1.2	Spektroskopie der elektronischen Übergänge . .	8
2.1.3	Schwingungsspektroskopie . . . . .	13
2.2	Nicht-lineare Optik . . . . .	23
2.2.1	Einführung . . . . .	23
2.2.2	Summen- und Differenzfrequenzerzeugung . .	24
2.2.3	Phasenanpassung in optisch anisotropen Kris- tallen . . . . .	27
2.2.4	Optischer Kerr-Effekt . . . . .	29
2.2.5	Weißlichterzeugung . . . . .	31
2.2.6	Kohärente Anti-Stokes Raman-Spektroskopie .	33
2.2.7	2-Photonen-Absorption . . . . .	40
2.2.8	Optisch Parametrische Verstärkung . . . . .	42
2.3	Ultrakurze Laserpulse . . . . .	44
2.3.1	Einführung . . . . .	44
2.3.2	Güteschaltung . . . . .	45
2.3.3	Modenkopplung . . . . .	46
2.3.4	Gruppengeschwindigkeitsdispersion und Chirp	48
2.3.5	Verstärkung gechirpter Laserpulse . . . . .	50
2.4	Mikroskopie . . . . .	51
2.4.1	Einführung . . . . .	51
2.4.2	Auflösung . . . . .	51
2.4.3	Multiphotonen-Mikroskopie . . . . .	54
<b>3</b>	<b>Experimentelle Systeme für zeitaufgelöste Spektroskopie</b>	<b>59</b>
3.1	Anreg-Abtast-Experiment . . . . .	59
3.2	Blitzlichtphotolyse . . . . .	60
3.3	Datenauswertung - Globale Fitanalyse . . . . .	61

<b>4</b>	<b>Aufbau eines Multiphotonen-Mikroskops</b>	<b>65</b>
4.1	Einführung . . . . .	65
4.2	Tsunami-Lasersystem . . . . .	67
4.3	GuideStar II Strahlstabilisierung . . . . .	71
4.4	Pulskompression . . . . .	72
4.5	Astigmatismus-Korrektur . . . . .	74
4.6	Optische Verzögerungsstrecke . . . . .	76
4.7	Photonische Kristallfaser . . . . .	78
4.8	Frequenzverdopplung . . . . .	83
4.9	Laserscanner . . . . .	84
4.9.1	(Thorlabs VCM101H-635) . . . . .	84
4.9.2	Cambridge Technology Laser-Scanner . . . . .	85
4.10	Olympus IX81 Mikroskop . . . . .	89
4.11	Detektion . . . . .	93
4.11.1	Hamamatsu R955 . . . . .	93
4.11.2	Hamamatsu H7421-50 . . . . .	94
4.11.3	Hamamatsu C11208-02 . . . . .	95
4.12	Mikroskopie-Software ImSpector . . . . .	96
4.13	Spektroskopie . . . . .	97
<b>5</b>	<b>DFHBI-bindendes RNA-Aptamer</b>	<b>101</b>
5.1	Einführung . . . . .	101
5.2	Probenpräparation . . . . .	107
5.3	Ergebnisse der Untersuchung zum Fluoreszenzbleichen	109
5.3.1	Frei diffundierende Spinach-Komplexe . . . . .	109
5.3.2	Immobilisierte Spinach-Komplexe . . . . .	113
5.4	Zusammenfassung . . . . .	119
<b>6</b>	<b>Chrimson</b>	<b>121</b>
6.1	Einführung . . . . .	121
6.2	Probenpräparation . . . . .	126
6.3	Primärreaktion . . . . .	127
6.4	Photozyklus . . . . .	141
6.5	Zusammenfassung . . . . .	149
	<b>Zusammenfassung</b>	<b>153</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>157</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>159</b>

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>161</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>163</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>165</b>
<b>Literatur</b>	<b>169</b>
<b>A Chrimson: 3D-Fluoreszenzspektren</b>	<b>177</b>





# Kapitel 1

## Einleitung

Ob in Form von Naturschauspielen oder im wissenschaftlichen Alltag – Licht begeistert wie kein zweites physikalisches Phänomen seit jeher die Menschen. Dabei ist Licht weit mehr, als eine ästhetische Erscheinungsform von Energie. Licht gewährt Einblicke in Welten, die dem Menschen sonst verborgen bleiben, sei es, weil sie zu klein, zu dunkel oder schlicht zu schnelllebig sind. „Licht“ ist dabei längst zur Metapher für den Erkenntnisgewinn geworden und so mancher Forscher, der im „Dunkeln“ tappt, wünscht sich nichts sehnlicher, als endlich etwas von ebenjenem „Licht“ in die Sache zu bringen.

Licht ist auch das zentrale und in erster Linie buchstäblich verstandene Motiv dieser Dissertationsschrift. Die Natur des Lichtes ist mittlerweile hinreichend genau verstanden, um es mithilfe verschiedener physikalischer Effekte gezielt für die Forschung aufzubereiten und so Einblicke in besondere Wissensgebiete erlangen zu können. Die Generierung kurzer Laserpulse mit nur wenigen Femtosekunden temporaler Breite, sowie der Energietransfer zwischen Lichtfeldern sind dabei nur zwei beispielhafte Prozesse, welche in Kapitel 2, zusammen mit den Grundlagen der optischen Spektroskopie behandelt werden. Die instrumentelle Umsetzung wird in den zwei nachfolgenden Kapiteln 3 und 4 beschrieben.

Einblicke in kleine Welten gewährt dabei insbesondere das in Kapitel 4 beschriebene Multiphotonen-Mikroskop. Dieses bildgebende Verfahren erfreut sich wachsender Beliebtheit, seit es im Jahre 1990 erstmals eingeführt wurde [1]. Die Stärke der Multiphotonen-Mikroskopie beruht dabei im Wesentlichen auf einer höheren Eindringtiefe in biologisches Gewebe und einer geringeren Induktion von

Strahlenschäden im Vergleich zu Mikroskopie-Verfahren, die auf 1-Photonen-Absorption beruhen. Unter Einbezug der Schwingungsspektroskopie ermöglicht die Multiphotonen-Mikroskopie sogar die Kartographie der Signaturen einzelner Molekülschwingungen über die Probe hinweg, wie dies beispielsweise bei der CARS-Mikroskopie der Fall ist. Für den so erhaltenen „chemischen Bildkontrast“ ist dabei keine vorangehende, aufwändige Vorbereitung bzw. Fluoreszenzmarkierung der Probe notwendig. Der Aufbau eines Multiphotonen-Mikroskops war ein Teilaspekt dieser Dissertation.

Einblicke in dunkle Welten gewährt die in Kapitel 5 beschriebene Studie an „Spinach“, wobei „dunkel“ hier nicht wörtlich und somit an der Natur dieses Fluorophors vorbei zu verstehen ist. Vielmehr wurde Spinach als elegantes Hilfsmittel entwickelt, RNA fluoreszent zu markieren und somit „Licht ins Dunkel“ zu bringen [2] – eine Aufgabe, die anderweitig mit hohem Aufwand verbunden ist [3]. So kann der Werdegang der markierten RNA in lebenden Zellen nachvollzogen werden, was oftmals die ersten Anhaltspunkte zum Schluss auf deren Funktion liefert. Spinach imitiert dafür die Funktionsweise seines natürlichen Vorbilds: das grün fluoreszierende Protein der Quallenart *Aequorea victoria* [4, 5], indem es ein synthetisches Analogon des Chromophors im grün fluoreszierenden Protein enthält, welches von einem RNA-Aptamer durch spezifische Wechselwirkungen gebunden wird [2]. Beiden Systemen gemeinsam ist, dass ihr jeweiliger Chromophor in isolierter Form praktisch nicht-fluoreszent ist und seine Leuchtkraft erst durch Einbettung in das jeweilige Trägersystem erhält – im Fall von Spinach beispielsweise durch Bindung an das RNA-Aptamer. Spinach überrascht dabei mit der Fähigkeit, seine initial durch Belichtung schnell gebleichte Fluoreszenz während einer Dunkelphase wieder regenerieren zu können. Dieser Vorzug kommt bei 1-Photonen-Absorption jedoch nur bei Anwendung bestimmter Beleuchtungsschemata zum Tragen [6, 7]. Ein Teilaspekt dieser Dissertationsschrift ist daher die Fragestellung, ob eine effiziente Nutzung von Spinach in der 2-Photonen-Mikroskopie auch ohne ein besonderes Beleuchtungsschema möglich ist. Hierfür kam das in Kapitel 4 beschriebene Multiphotonen-Mikroskops zum Einsatz.

Einblicke in schnelllebige Welten gewährt die in Kapitel 6 beschriebene Studie an „Chrimson“, einem 2014 erstmals beschriebenen Membranprotein aus der Familie der Kanalrhodopsine [8]. Diese lichtempfindlichen Proteine öffnen bei optischer Anregung kurzzeitig einen Ionen-leitfähigen Kanal in der ansonsten für Ionen nicht-permeablen Zellmembran, wobei einige wichtige Schritte dieses Prozesses auf Zeitskalen deutlich unterhalb einer milliardstel Sekunde ablaufen. Kanalrhodopsine haben in den vergangenen Jahren große Aufmerksamkeit erfahren, weil sie eine vergleichsweise einfache Kontrolle über das Membranpotential und somit die Aktivität einer, mit Kanalrhodopsinen modifizierten Nervenzelle ermöglichen [9–11]. Für die Optogenetik, einem Teilbereich der Neurowissenschaften, sind Kanalrhodopsine mittlerweile zu unverzichtbaren Werkzeugen geworden [12, 13]. Die tendenziell eher im blauen Spektralbereich liegende Absorption vieler Kanalrhodopsine limitiert jedoch ihre Anwendung im biologischen Bereich. Umso auffälliger ist daher die Farbgebung von Chrimson, dessen Bezeichnung sich vom englischen Begriff für Karminrot (*engl. crimson*) ableitet. Chrimson absorbiert im roten Spektralbereich und hält diesbezüglich den derzeitigen Rekord für die am weitesten rot-verschobene Absorption. Dieses Kanalrhodopsin ist somit nicht nur für die Optogenetik von Interesse, deren Instrumentarium es erweitert, sondern auch aus mechanistischer Hinsicht. Der abschließende Teilaspekt dieser Dissertationsschrift ist die Präsentation der Ergebnisse einer zeitaufgelösten, spektroskopischen Charakterisierung von Chrimson.



# Kapitel 2

## Theorie

### 2.1 Spektroskopie

#### 2.1.1 Einführung

Strahlung stellt unzweifelhaft eine der wichtigsten und ergiebigsten, zugänglichen Informationsquellen dar. Sowohl elektromagnetische Strahlung, wie auch Teilchenstrahlung ist charakterisiert durch eine Vielzahl von Parametern, wie z.B. Wellenlänge und Intensität, welche wiederum maßgeblich von der Strahlungsquelle abhängen. Strahlung trägt somit bereits Informationen über die Strahlungsquelle selbst. In vielen Fällen weit wichtiger jedoch ist die Beobachtung, dass Wechselwirkung von Strahlung mit Materie oder elektrischen bzw. magnetischen Feldern eine Veränderung dieser Parameter zur Folge haben kann. Der Informationsgehalt der Strahlung wird dadurch moduliert und quasi um Informationen über den Wechselwirkungspartner erweitert. So kann, um nur ein Beispiel anzuführen, das Durchqueren eines Kristalls mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit eine Veränderung des Impulses eines Röntgenphotons zur Folge haben, wodurch sich die Ausbreitungsrichtung des Photons ändert. Wie für dieses, als „Beugung“ bezeichnete Phänomen mittlerweile aufgeklärt wurde, hängt die Wahrscheinlichkeit einer Richtungsänderung der passierenden Photonen mit der atomaren Struktur des Kristalls zusammen. Informationen über die Kristallstruktur werden auf diese Weise in der Impulsänderung der gebeugten Photonen kodiert, sodass umgekehrt aus einer Statistik über Anzahl und Richtung der gebeugten Photonen Rückschlüsse auf die atomare Struktur des Kristalls gezogen werden können – ein Umstand, der im Rahmen der Kristallstrukturanalyse maßgeblich zur Aufklärung von Proteinstrukturen beigetragen hat.

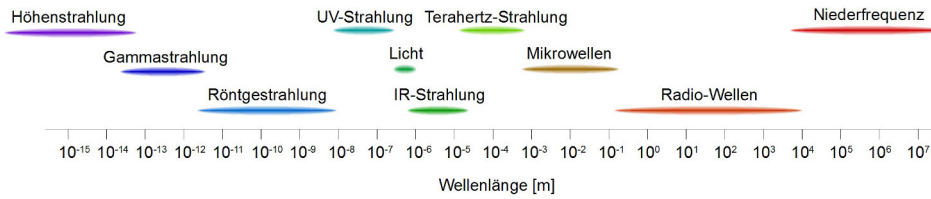


Abbildung 2.1: Darstellung des elektromagnetischen Spektrums.

Wie in Abbildung 2.1 skizziert, stellt die hier beispielhaft angeführte Röntgenstrahlung nur einen kleinen Ausschnitt des verfügbaren elektromagnetischen Spektrums dar. Dieses erstreckt sich von der extrem hochfrequenten ( $\sim 10^{23} \text{ Hz}$ ) Höhenstrahlung mit Wellenlängen der Größenordnung  $10^{-15} \text{ m}$  bzw.  $1 \text{ fm}$ , bis hin zu den niederfrequenten ( $\sim 10 \text{ Hz}$ ) Wechselströmen mit Wellenlängen der Größenordnung  $10^7 \text{ m}$  bzw.  $10.000 \text{ km}$ . Aus praktischen Gründen und teils auch historisch bedingt, wird das elektromagnetische Spektrum in einzelne Frequenzbänder unterteilt. Ein Großteil dieser Frequenzbänder ist für die Untersuchung von Materie und Prozessen in Materie von hohem Interesse – zum einen aufgrund spezifischer Wechselwirkungen zwischen dieser Strahlung und bestimmten Materialeigenschaften, zum anderen aufgrund einer bestehenden Zugänglichkeit dieser Strahlung in hoher Qualität und Intensität, beispielsweise in Form von Lasern.

Zu den wichtigsten Wechselwirkungen zwischen Strahlung und Materie gehört der Prozess der Absorption, bei welchem ein Energieübertrag vom Strahlungsfeld auf die Materie stattfindet. Im Photonenbild betrachtet stellt sich der Prozess jedoch als deutlich komplexer, denn als einfache Abschwächung heraus. Photonen besitzen einen bestimmten Energiegehalt  $E(\nu)$ . Dieser ist über das Plancksche Wirkungsquantum  $h$  bzw. der Lichtgeschwindigkeit  $c_0$  linear proportional zur Frequenz  $\nu$  und Wellenzahl  $\tilde{\nu}$  bzw. antiproportional zur Wellenlänge  $\lambda$  (Gl. 2.1).

$$E(\nu) = h\nu = \frac{hc_0}{\lambda} = hc_0\tilde{\nu} \quad (2.1)$$

Bei einer Absorption des Photons wird sein gesamter Energiegehalt  $E(\nu)$  vollständig auf die absorbierende Materie, typischerweise

ein Molekül übertragen, welches daraufhin in einen energetisch höheren Zustand übergeht. Das Photon selbst wird hierbei vernichtet. Voraussetzung für eine erfolgreiche Absorption ist die Einhaltung der Bohr'schen Frequenzbeziehung (Gl. 2.2), welche formal besagt, dass nur solche Photonen absorbiert werden können, deren Energiegehalt  $E(\nu)$  exakt der Energiedifferenz zweier Zustände  $E_m$  und  $E_n$  der absorbierenden Materie entspricht, wobei  $m > n$  gelte.

$$E(\nu) = h\nu := \Delta E = E_m - E_n \quad (2.2)$$

Das Ausmaß der Absorption lässt sich mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes (Gl. 2.3) beschreiben. Dieses definiert die Absorbanz  $A(\lambda)$  als den negativen dekadischen Logarithmus des Verhältnisses aus einfallender ( $I_0$ ) und austretender ( $I$ ) Strahlungsintensität und setzt diese über den molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon(\lambda)$  ins Verhältnis zur Konzentration  $c$  des absorbierenden Materials (im Folgenden einfach Analyt bzw. Molekül genannt), sowie dessen Schichtdicke  $d$ . Das Produkt der drei letztgenannten Größen wird gelegentlich auch als „Optische Dichte“ ( $OD$ ) bezeichnet.

$$A(\lambda) = -\log \frac{I}{I_0} = \epsilon(\lambda)cd \quad (2.3)$$

Es gilt zu beachten, dass das Lambert-Beersche Gesetz nur unter gewissen einschränkenden Bedingungen gültig ist. So ist der Extinktionskoeffizient  $\epsilon(\lambda)$  beispielsweise von der Wellenlänge des einfallenden Lichtes abhängig, was eine Messung mit monochromatischem Licht voraussetzt bzw. den gültigen Messbereich auf eine vernachlässigbare Variation von  $\epsilon(\lambda)$  über den beobachteten Spektralbereich beschränkt. Auch sollte der Analyt in nur geringer Konzentration ( $c < 0,01 \text{ mol/L}$ ) und über die Schichtdicke  $d$  homogen verteilt vorliegen. Abweichungen hiervon können die optischen Eigenschaften des Analyten beeinflussen. Insbesondere hohe Konzentration können zum Auftreten von Analyt-Aggregaten mit teilweise abweichenden optischen Eigenschaften führen.

Die Art des Prozesses, welcher durch Absorption eines Photons im Analyten initiiert wird, hängt maßgeblich vom Frequenzband ab, dem das Photon entstammt. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich

in erster Linie auf den Ausschnitt des elektromagnetischen Spektrums von etwa  $330 - 30.000 \text{ nm}$ . Dieser enthält die Frequenzbänder der nahen Ultraviolettstrahlung (UV-A bzw.  $300 - 380 \text{ nm}$ ) und des sichtbaren Lichtes (Vis bzw.  $380 - 780 \text{ nm}$ ), welche hauptsächlich elektronische Übergänge im Analyten verursachen, sowie Teile der mittleren Infrarotstrahlung (MIR bzw.  $3.000 - 50.000 \text{ nm}$ ), welche in erster Linie Schwingungsübergänge anregen. Der nahen Infrarotstrahlung (NIR bzw.  $780 - 3.000 \text{ nm}$ ) kommt im Zusammenhang mit nicht-linear optischen Prozessen, sowie der Raman-Spektroskopie eine bedeutende Rolle zu.

### 2.1.2 Spektroskopie der elektronischen Übergänge

Elektronische Übergänge werden typischerweise von Photonen mit Energiegehalten von  $1,7 - 5,0 \text{ eV}$  (entsprechend  $250 - 750 \text{ nm}$ ) angeregt. Diese Energiemengen sind ausreichend, um Elektronen, genauer gesagt Valenzelektronen auf höhere Niveaus (Orbitale) zu heben, was für ein betroffenes Molekül eine erhebliche Veränderung bedeutet. Durch den Übergang eines Elektrons in ein anderes Orbital kommt es zu einer Verformung der die Kerne umgebenden Elektronenwolke, wodurch sich auch die Ruheposition der Atomkerne verändert. Ein elektronischer Übergang zieht demnach auch die Verschiebung der Atomkernpositionen im Molekül nach sich. Beide Prozesse – Verformung der Elektronenwolke infolge der Absorption elektromagnetischer Strahlung und Reorientierung der Atomkerne – können trotz starker elektrostatischer Wechselwirkung zwischen Elektronen und Atomkernen jedoch in guter Näherung unabhängig voneinander betrachtet werden, da sie auf verschiedenen Zeitskalen ablaufen. Elektronische Übergänge geschehen innerhalb weniger Femtosekunden ( $10^{-15} \text{ s}$ ), während Atomkerne aufgrund ihrer deutlich größeren Maße sehr viel träger sind und Schwingungsperioden im Bereich von Pikosekunden ( $10^{-12} \text{ s}$ ) aufzeigen. Dieses, nach den Physikern James Franck und Edward Condon benannte Franck-Condon-Prinzip vereinfacht die Betrachtung elektronischer Übergänge erheblich.

Zwingende Voraussetzung für einen elektronischen Übergang ist ein von Null verschiedenes Übergangsdipolmoment  $\mu_{EA}$  (Gl. 2.4),



mit  $\mu$  als elektrischem Dipoloperator, sowie den Wellenfunktionen des Anfang- und Endzustandes  $\Psi_A$  und  $\Psi_E$ .

$$\mu_{EA} = \int \Psi_E^* \mu \Psi_A d\tau \quad (2.4)$$

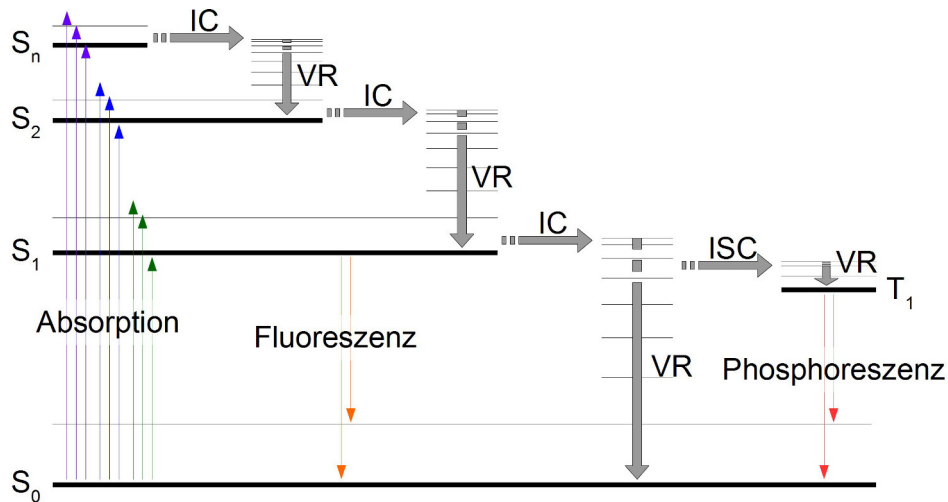
Das Übergangsdipolmoment kann als Maß für die Stärke der Kopplung zwischen dem elektronischen Übergang und der elektromagnetischen Strahlung betrachtet werden. Die auch als Oszillatorstärke bekannte Übergangswahrscheinlichkeit ist dabei proportional zum Betragsquadrat des Übergangsdipolmoments  $|\mu_{EA}|^2$ . Weil das Übergangsdipolmoment eine vektorielle Größe ist, spielt an dieser Stelle auch die Polarisation der elektromagnetischen Welle eine bedeutende Rolle. Im einfachsten Fall, bei linear polarisiertem Licht, wird die Übergangswahrscheinlichkeit maximal, wenn sowohl das Übergangsdipolmoment, als auch der elektrische Feldvektor parallel zueinander ausgerichtet sind.

Zusätzlich unterliegen elektronische Übergänge bestimmten Einschränkungen. Das Laporte-Verbot beispielsweise verbietet elektronische Übergänge zwischen Zuständen gleicher Parität, d.h. Zustände, deren Wellenfunktionen bei Spiegelung am Symmetriezentrum beide ihr Vorzeichen ändern (ungerade Parität) bzw. nicht ändern (gerade Parität). Es gilt insbesondere für Moleküle mit Symmetrie- bzw. Inversionszentrum. Das Spin-Verbot verbietet Übergänge infolge derer sich die Multiplizität  $M = 2S + 1$  mit  $S$  als Spinquanzenzahl ändert — Übergänge zwischen Singulett-Zuständen ( $S = 0$ ,  $M = 1$ ) und beispielsweise Triplett-Zuständen ( $S = 1$ ,  $M = 3$ ) sind daher untersagt. Das Überlappungs-Verbot wiederum besagt, dass keine Übergänge zwischen Zuständen bzw. Orbitalen mit ungenügender räumlicher Überlagerung stattfinden können. Mit Blick auf diese Übergangs-Verbote bzw. Auswahlregeln kommt man um die Feststellung nicht herum, dass ein Verbot elektronischer Übergänge eher die Regel, denn die Ausnahme ist und nur wenige der kombinatorisch denkbaren Übergänge tatsächlich erlaubt sind. Allerdings muss in diesem Zusammenhang ebenso erwähnt werden, dass Verbote elektronischer Übergänge lediglich in der Theorie streng gelten. In der Praxis dagegen können verschiedene Effekte zur (kurzzeitigen) Schwächung oder sogar Aufhebung eines Übergangs-Verbotes

führen. Beispielsweise können Molekülschwingungen durch Verformung des Moleküls ein Symmetriezentrum vorübergehend aufheben, wodurch eigentlich verbotene Übergänge kurzzeitig erlaubt sind. Verbotene Übergänge können daher oftmals beobachtet werden, wenn auch gewöhnlich um Größenordnungen schwächer, verglichen mit erlaubten Übergängen.

Die Klassifizierung elektronischer Übergänge erfolgt typischerweise nach den beteiligten Molekülorbitalen, welche sich wiederum in bindende  $\sigma$ - und  $\pi$ -, nichtbindende  $n$ -, sowie antibindende  $\sigma^*$ - und  $\pi^*$ -Orbitale unterteilen. Entsprechend unterscheidet man  $\sigma^* \leftarrow \sigma$ -,  $\sigma^* \leftarrow n$ -,  $\pi^* \leftarrow \pi$ - und  $\pi^* \leftarrow n$ -Übergänge. Dabei spielen  $\sigma^* \leftarrow \sigma$ - und  $\sigma^* \leftarrow n$ -Übergänge für die UV/Vis-Spektroskopie meist eine untergeordnete Rolle, da ihre Anregungsenergien vornehmlich oberhalb von 6 eV liegen und die korrespondierende spektrale Absorption im experimentell schwierig zugänglichen Vakuum-UV-Bereich angesiedelt ist. Die Lage der Absorption von  $\pi^* \leftarrow \pi$ - und  $\pi^* \leftarrow n$ -Übergängen dagegen befindet sich überwiegend im sichtbaren, sowie nahen UV-Spektralbereich. Chemische Gruppen, deren Molekülorbitale in diesem Spektralbereich absorbieren, werden oftmals auch als Chromophore bezeichnet (abgeleitet von altgriechisch *chrōma* ‚Farbe‘ und *phorós* ‚tragend‘) und sind vielfach für die, mit dem Auge wahrnehmbare Farbigkeit von Substanzen verantwortlich. Die spektrale Lage und Intensität der Chromophorabsorption ist dabei recht charakteristisch für die beteiligte chemische Gruppe, wobei die exakte Position verschiedenen Einflüsse unterworfen ist. Insbesondere die Umgebung des Chromophors (Lösungsmittel, Proteingerüst) übt einen starken Einfluss auf seine spektralen Eigenschaften aus. Ähnliches wird in Chromophoren mit delokalisiertem  $\pi$ -Elektronensystem auch durch Substituenten bzw. deren induktiven und mesomeren Effekten erreicht. Als hypsochrom wird dabei eine Verschiebung hin zu kürzeren Wellenlängen (Blau-Verschiebung) bezeichnet, zu längeren Wellenlängen (Rot-Verschiebung) dagegen als bathochrom. Erhöht sich die Intensität einer Absorptionsbande, so wird dies als hyperchrom bezeichnet, eine Verringerung der Intensität dagegen als hypochrom.

Die Anregung eines Chromophors bzw. Moleküls geschieht in



**Abbildung 2.2:** Schematische Darstellung möglicher intramolekularer Prozesse nach einer Photoanregung in Form eines Jablonski-Diagramms. Übergänge mit Beteiligung von Strahlung sind farbig dargestellt, strahlungslose Übergänge dagegen grau. IC: Interne Konversion, ISC: Interkombinationsübergang, VR: Schwingungsrelaxation

den meisten Fällen aus dessen Singulett-Grundzustand  $S_0$  heraus. Das Molekül wird durch Absorption eines Photons in einen angeregten Zustand  $S_n$  (mit  $n = 1, 2, 3, \dots$ ) versetzt. Verschiedene Prozesse (siehe Abbildung 2.2) führen im Anschluss zum Verlassen dieses angeregten Zustandes, wodurch das Molekül früher oder später wieder in den Grundzustand zurückkehrt. Zu den schnellsten Prozessen dieser Art gehört die innere Umwandlung (IC, engl. *internal conversion*). Sie tritt auf, wenn sich die Potentialkurven zweier Zustände an einem Punkt einander annähern und erlaubt es dem Molekül, auf die Potentialfläche eines niedrigeren Zustands zu wechseln. Nach einem Wechsel des Zustands (z.B. einer inneren Umwandlung oder einer Anregung durch Absorption von Photonen), befindet sich das Molekül meistens in einem der vielen schwingungsangeregten Zustände, in die jeder elektronische Zustand unterteilt ist. Durch Schwingungsrelaxation (VR, engl. *vibrational relaxation*) erreicht es den Schwingungsgrundzustand des jeweiligen elektronischen Zustands. Die dabei freiwerdende Energie wird an die Umgebung in Form von Wärme abgegeben, weshalb der Prozess der Schwingungsrelaxation in kondensierter Materie besonders schnell abläuft.

Da die energetischen Abstände der angeregten Zustände meistens klein sind im Vergleich zum energetischen Abstand zwischen

$S_0$ - und  $S_1$ -Zustand, relaxieren angeregte Moleküle gewöhnlich sehr schnell in den  $S_1$ -Zustand, sodass die etwas langsameren, strahlenden Übergänge (Fluoreszenz bzw. Phosphoreszenz) zumeist aus diesem Zustand heraus erfolgen. Diese Beobachtung ist, leicht umformuliert, auch als Kashas Regel bekannt [14]. Letztere besagt, dass aufgrund der zuvor beschriebenen sehr schnellen Relaxation eines angeregten Moleküls in den niedrigsten angeregten Zustand, die Emission von Photonen in nennenswerten Quantenausbeuten nur aus diesem heraus auftritt. Damit liefert Kashas Regel eine Begründung für die Beobachtung, dass Fluoreszenzspektren in der Regel unabhängig von der Anregungswellenlänge sind. Zudem sind Fluoreszenzspektren um den sogenannten Stokes-Shift rot-verschoben zum Absorptionsspektrum, da nach Anregung des Moleküls ein Teil der Anregungsenergie durch nicht-strahlende Prozesse (IC und VR) als Wärme an die Umgebung abgegeben wird. Für die Emission von Fluoreszenzphotonen steht somit nur ein verminderter Energiebeitrag zur Verfügung, was gleichbedeutend mit einer höheren Wellenlänge ist.

Der niedrigste angeregte Zustand ist im Fall der Fluoreszenz gewöhnlich der  $S_1$ -Zustand. Fluoreszenzphotonen werden infolge eines (spin-erlaubten)  $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergangs des angeregten Moleküls emittiert. Unter bestimmten Umständen kann es jedoch vorkommen, dass ein Molekül durch einen strahlungslosen Interkombinationsübergang (ISC, *engl. intersystem crossing*) einen Triplett-Zustand erreicht. Singulett-Triplett-Übergänge sind zwar spin-verboten, können jedoch insbesondere in Anwesenheit schwerer Atomkerne durch Spin-Bahn-Kopplung dennoch auftreten. In diesem Fall relaxiert das Molekül erneut weiter, bis es den niedrigsten angeregten Triplett-Zustand, typischerweise den  $T_1$ -Zustand erreicht hat. Bei Rückkehr in den  $S_0$ -Zustand emittiert das Molekül in Folge ein Phosphoreszenzphoton. Der  $S_0 \leftarrow T_1$ -Übergang ist dabei ebenfalls spinverboten. Im Gegensatz zu  $S_1$ -Zuständen haben  $T_1$ -Zustände daher sehr lange Lebensdauern, was sich ebenso in der Beobachtung niederschlägt, dass Fluoreszenzen gewöhnlich auf Zeitskalen von Nanosekunden ( $10^{-9}$  s) abklingen, während dies bei Phosphoreszenzen im Extremfall Minuten in Anspruch nehmen kann.

**Tabelle 2.1:** Unterteilung des Infrarotspektralbereichs und wissenschaftliche Bedeutung.

Bezeichnung	Spektralbereich	Observable
Nahes Infrarot (NIR)	$0,78 - 3 \mu m$ $12800 - 3333 \text{ cm}^{-1}$	Oberton- und Kombinationsschwingungen
Mittleres Infrarot (MIR)	$3 - 50 \mu m$ $3333 - 200 \text{ cm}^{-1}$	Molekülschwingungen
Fernes Infrarot (FIR)	$50 - 1000 \mu m$ $200 - 10 \text{ cm}^{-1}$	Molekülrotation und Gerüstschwingungen

Zusätzlich zu den bereits erwähnten Prozessen, kann die Energie eines angeregten Moleküls auch an Nachbarmoleküle transferiert werden, beispielsweise durch Stöße, Ladungstransfer oder strahlungslosen Transfer (z.B. Förster-Resonanz-Energie-Transfer).

### 2.1.3 Schwingungsspektroskopie

Verglichen mit elektronischen Übergängen lassen sich die Übergänge zwischen verschiedenen Schwingungszuständen eines Moleküls durch weitaus geringere Energiebeträge anregen – typischerweise  $0,04 - 0,4 \text{ eV}$ . Dies entspricht dem Energiegehalt von Photonen im spektralen Bereich von etwa  $3 - 33 \mu m$  bzw. dem mittleren Infrarot. Auch mit den energetisch darüber bzw. darunter liegenden Frequenzbändern des nahen bzw. fernen Infrarot lässt sich Spektroskopie betreiben (siehe Tabelle 2.1). Die Bedeutung dieser Teilbereiche der Infrarotspektroskopie ist jedoch geringer, verglichen mit der (klassischen) Schwingungsspektroskopie im mittleren Infrarot – der Begriff Infrarotspektroskopie wird daher oftmals synonym mit Schwingungsspektroskopie gebraucht.

Anstelle der Wellenlänge  $\lambda$  ist in der Schwingungsspektroskopie gewöhnlich die Einheit Wellenzahl  $\tilde{\nu}$  in Gebrauch.

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{n}{l} = \frac{\nu}{c_0} \quad (2.5)$$

Die Wellenzahl entspricht dem Kehrwert der Wellenlänge — ihre SI-Einheit ist  $m^{-1}$ , wobei die Einheit  $cm^{-1}$  in der Spektroskopie deutlich häufiger verwendet wird. Die Wellenzahl beschreibt, etwas anschaulicher definiert, die Anzahl der Schwingungen  $n$  pro Wegabschnitt  $l$ , was gleichbedeutend mit dem Quotienten aus der Frequenz  $\nu$  und

der Vakuumlichtgeschwindigkeit  $c_0$  ist.

Molekülschwingungen lassen sich stark vereinfacht mit dem Modell des harmonischen Oszillators beschreiben. Ein zweiatomiges Molekül wird dabei durch zwei, mit einer mechanischen Feder verbundenen Massen  $m_1$  und  $m_2$  repräsentiert. Infolge einer (geringfügigen) Auslenkung  $x$  der Massen aus ihrer Gleichgewichtslage stellt sich entsprechend dem Hookeschen Gesetz eine Rückstellkraft  $F$  ein, die linear proportional zur Auslenkung ist.

$$F = -kx \quad (2.6)$$

Gleichzeitig besteht zwischen der Rückstellkraft  $F$  und der potentiellen Energie  $V$  des Oszillators der Zusammenhang  $F = -\frac{dV}{dx}$ , woraus dessen parabolisches Potential resultiert.

$$V = \frac{1}{2}kx^2 \quad (2.7)$$

Kombiniert man Gleichung 2.6 mit dem zweiten Newtonschen Gesetz  $F = ma = m\frac{d^2x}{dt^2}$ , resultiert daraus eine Differentialgleichung.

$$\mu\frac{d^2x}{dt^2} = -kx \quad (2.8)$$

Die reduzierte Masse  $\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$  ersetzt hierbei die Masse  $m$ . Die Lösung dieser Differentialgleichung ergibt sich zu

$$x = A \sin(\omega t) \text{ mit } \omega = 2\pi\nu = \sqrt{\frac{k}{\mu}}. \quad (2.9)$$

Die quantisierten Energieniveaus des harmonischen Oszillators erhält man durch Einsetzen von Gleichung 2.7 in die Schrödinger-Gleichung

$$-\frac{\hbar^2}{2\mu} \frac{d^2\psi}{dx^2} + \frac{1}{2}kx^2\psi = E\psi, \quad (2.10)$$

deren Lösung sich zu

$$E = \left(v + \frac{1}{2}\right) h\nu \quad (2.11)$$

ergibt, wobei  $v$  die Schwingungsquantenzahl ( $v = 0, 1, 2, \dots$ ) ist. Da

die harmonische Näherung lediglich Übergänge mit  $\Delta v = \pm 1$  zulässt und die Energieniveaus hier gemäß Gleichung 2.11 äquidistant liegen, ergibt sich die Energiedifferenz  $\Delta E$  für jeden beliebigen Übergang zu

$$\Delta E = h\nu = \hbar \sqrt{\frac{k}{\mu}}, \quad (2.12)$$

wobei  $\nu$  hier, entsprechend Gleichung 2.9 im rechten Teil der Gleichung ersetzt wurde.

Es wird deutlich, dass die spektrale Lage eines solchen Schwingungsübergangs empfindlich sowohl von der Kraftkonstante  $k$  abhängt – deren reale Entsprechung die Stärke der beteiligten chemischen Bindung ist –, als auch von der Masse der beteiligten Atome. Ersteres spiegelt sich beispielsweise im Schwingungsverhalten von Kohlenstoffbindungen wider. Während die Streckschwingung von C–C-Bindungen im Bereich von etwa  $1000 \text{ cm}^{-1}$  beobachtet wird, treten die Streckschwingungen der stärkeren C=C- und C≡C-Bindungen bei etwa 1600 bzw. 2200  $\text{cm}^{-1}$  auf. Letzteres dagegen wird in der absorptions-basierten IR-Spektroskopie praktisch genutzt, indem bei Bedarf schweres Wasser ( $\text{D}_2\text{O}$ ) anstelle des gewöhnlichen Wassers ( $\text{H}_2\text{O}$ ) als Lösungsmittel eingesetzt wird. Dadurch lässt sich die störende Absorption von  $\text{H}_2\text{O}$  im Bereich der Amid-Banden spektral zu geringeren Frequenzen bzw. Wellenzahlen verschieben.

Die bis hierher genutzte Beschreibung des Schwingungsverhaltens chemischer Bindungen mittels eines linearen harmonischen Oszillators stellt eine praktikable, jedoch nur grobe Näherung des realen Verhaltens dar. Eine bessere Beschreibung gelingt beispielsweise mithilfe des anharmonischen Oszillators. Dieser berücksichtigt die abstoßenden Kräfte zwischen den Atomen ebenso, wie eine mögliche Dissoziation der chemischen Bindung. Das Potential eines anharmonischen Oszillators kann in guter Näherung mithilfe einer Morsefunktion dargestellt werden:

$$V(r) = D_e [1 - e^{a(r_e-r)}]^2 \quad \text{mit } a = \sqrt{\frac{k_e}{2D_e}} \quad (2.13)$$

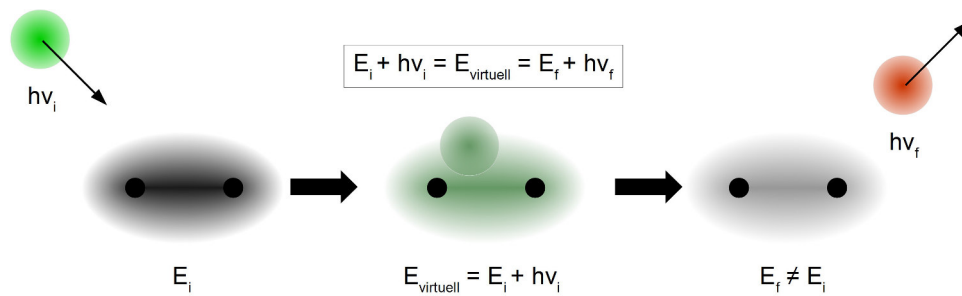
wobei  $D_e$  der zur Dissoziation der chemischen Bindung nötigen

Energie und  $r_e$  dem Gleichgewichtsabstand entspricht. Die Konstante  $a$  selbst ergibt sich aus der Kraftkonstante  $k_e$  im Minimum des Morsepotentials und  $D_e$ . Eine wichtige Konsequenz der anharmonischen Näherung ist, dass auch Übergänge mit  $\Delta v = \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$  erlaubt sind, entsprechend der Beobachtung, dass reale Moleküle zusätzliche Absorption durch Schwingungsanregung von Obertönen aufweisen können. Andere ebenfalls geeignete Potentiale sind beispielsweise das Lennard-Jones- und das RKR-Potential.

Die Spektroskopie von Schwingungszuständen geschieht typischerweise analog zur UV/Vis-Spektroskopie durch Messung der Absorption einer Probe im MIR. Dispersive Messverfahren wurden dabei weitestgehend von Fourier-Transformations-Infrarot-Spektrometern (FTIR-Spektrometer) verdrängt, die sich vor allem durch einen hohen Geschwindigkeitsvorteil und ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis auszeichnen. Weiterhin problematisch ist jedoch die sehr hohe Absorption von Wasser im MIR, weshalb die Schichtdicke biologischer Proben oftmals nur wenige Mikrometer betragen darf. Bedingt durch seine langen Wellenlängen und einer damit einhergehenden optischen Auflösung im Mikrometerbereich eignet sich MIR-Licht nur in Ausnahmefällen für die Mikroskopie. Daher ist es lohnend, auf eine weitere Methode der Schwingungsspektroskopie zurückzugreifen: die Raman-Spektroskopie.

Im Gegensatz zur IR-Spektroskopie basiert die **Raman-Spektroskopie** nicht auf der Absorption von Strahlung im MIR, sondern auf der inelastischen Streuung von Photonen an einem Molekül. Wie in Abbildung 2.3 skizziert, wechselwirkt ein einfallendes Photon  $h\nu_i$  mit einem Molekül im Zustand  $M (E_i)$ . Für einen sehr kurzen Zeitabschnitt befindet sich das System (Molekül inklusive Photon) in einem, formal als „virtuell“ bezeichneten Zustand  $E_v = h\nu_i + E_i$ , dessen geringe Stabilität lediglich Lebensdauern von wenigen Femtosekunden erlaubt. In diesem Zustand findet ein Energieaustausch zwischen Photon und Molekül statt – bei Raumtemperatur gewöhnlich vom Photon auf das Molekül, selten umgekehrt –, wobei die Gesamtenergie des Systems konstant bleibt. Anschließend verlässt das Photon mit verändertem Energiegehalt  $h\nu_f$  und veränderter





**Abbildung 2.3:** Darstellung des Raman-Streuprozesses. Das einfallende Photon (grün) wechselwirkt mit der Elektronenwolke eines zweiatomigen Moleküls (grau). Während der Lebensdauer des daraus resultierenden virtuellen Zustandes kommt es zum Energieaustausch zwischen dem Photon und dem Molekül, wodurch sich sowohl die Wellenlänge, wie auch die Ausbreitungsrichtung des Photons (rot) ändert.

Ausbreitungsrichtung das ebenfalls in einem anderen Energiezustand  $M(E_f)$  vorliegende Molekül. Die transferierte Energiemenge  $\Delta E = h\nu_f - h\nu_i = E_f - E_i$  entspricht dabei exakt dem, für einen Rotations- oder Schwingungsübergang im Molekül benötigten Energiequantum, wobei im Folgenden lediglich Schwingungsübergänge berücksichtigt werden.

Die klassische Beschreibung des Raman-Effektes basiert auf der Annahme einer Wechselwirkung zwischen dem elektrischen Feld eines Photons und der Elektronenwolke eines Moleküls. Letzteres reagiert auf ein elektrisches Feld durch Verzerrung seiner Struktur, indem die Atomkerne der attraktiven Wechselwirkung mit dem negativen elektrischen Pol folgen und umgekehrt die Elektronen des Moleküls zum positiven elektrischen Pol gezogen werden. Die räumliche Position der Ladungsschwerpunkte von Atomkernen und Elektronen wird in Folge auseinandergezogen. Dies führt zur Ausbildung eines induzierten Dipolmoments  $\mu_{\text{ind}}$ , welches als Produkt aus der Polarisierbarkeit  $\alpha$  des Moleküls und der auf das Molekül wirkenden elektrischen Feldstärke  $E$  dargestellt werden kann:

$$\mu_{\text{ind}} = \alpha \cdot E \quad (2.14)$$

Das induzierte Dipolmoment überlagert dabei mit einem eventuell bereits vorhandenen permanenten Dipolmoment  $\mu_{\text{perm}}$  zu einem Gesamtdipolmoment  $\mu_{\text{ges}}$ :

$$\mu_{ges} = \mu_{perm} + \mu_{ind} = \mu_{perm} + \alpha \cdot E \quad (2.15)$$

Die Stärke des elektrischen Feldes  $E$  des Photons ist dabei nicht konstant, sondern oszilliert mit einer bestimmten Frequenz  $\nu_0$ :

$$E = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (2.16)$$

Das im Molekül erzeugte induzierte Dipolmoment  $\mu$  oszilliert daher ebenfalls:

$$\mu_{ges} = \mu_{perm} + \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (2.17)$$

Die Polarisierbarkeit  $\alpha$  eines Moleküls lässt sich durch einen Tensor 2. Stufe  $\alpha_{ij}$  ausdrücken. Die einzelnen Komponenten des Tensors hängen stark von der Symmetrie des Moleküls ab. Eine detaillierte Betrachtung der Tensorkomponenten ist für das Verständnis des Raman-Effekts vorerst nicht notwendig. Wichtig dagegen ist die Feststellung, dass die Polarisierbarkeit und damit auch das Dipolmoment eines Moleküls Funktionen der Kern- und Elektronen-Koordinaten sind. Unter der Einschränkung, dass die Frequenz des einfallenden Photons  $\nu_0$  nicht in Resonanz mit einem elektronischen oder vibronischen Übergang des Moleküls steht, reduziert sich jene Abhängigkeit in guter Näherung auf nur noch die Kernkoordinaten. Die Auslenkung der Kerne aus ihrer Gleichgewichtslage ist unter diesen Bedingungen hinreichend gering, dass die Elektronen der Kernbewegung quasi instantan folgen. Entwickelt man nun sowohl das permanente, wie auch das induzierte Dipolmoment in einer Taylorreihe nach den Kernkoordinaten um deren Gleichgewichtslage, bricht nach dem linearen Term ab und formuliert die Auslenkung als Summe über alle  $3Q - f$  (mit  $f = 5$  für lineare und  $f = 6$  für nichtlineare Moleküle) möglichen Normalmoden  $q_n$  eines Moleküls mit  $Q$  Atomen, so erhält man:

$$\mu_{perm}(q) = \mu_{perm}(0) + \sum_{n=1}^{3Q-f} \left( \frac{\partial \mu}{\partial q_n} \right)_0 q_n \quad (2.18)$$

$$\alpha_{ij}(q) = \alpha_{ij}(0) + \sum_{n=1}^{3Q-f} \left( \frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial q_n} \right)_0 q_n \quad (2.19)$$

Hierbei sind  $\mu_{perm}(0)$  und  $\alpha_{ij}(0)$  das permanente Dipolmoment bzw.

die Polarisierbarkeit des Moleküls in seiner Gleichgewichtslage, d.h. keiner der Atomkerne wurde aus seiner Gleichgewichtsposition ausgelenkt ( $q_n = 0$ ). Unter der bereits zuvor formulierten Bedingung einer nur geringen Auslenkungen der Atomkerne aus ihrer Gleichgewichtsposition, lässt sich die zeitliche Entwicklung der Normalmoden  $q_n$  als einfache harmonische Schwingung ausdrücken:

$$q_n(t) = q_{n,0} \cos(2\pi\nu_n t) \quad (2.20)$$

mit  $q_{n,0}$  und  $\nu_n$  als Amplitude bzw. Frequenz der n-ten Normalmode.

Werden nun Gleichung 2.18, 2.19 und 2.20 in Gleichung 2.17 eingesetzt, so erhält man einen Ausdruck für zeitabhängige Gesamtdipolmoment  $\mu_{ges}(t)$  eines Moleküls:

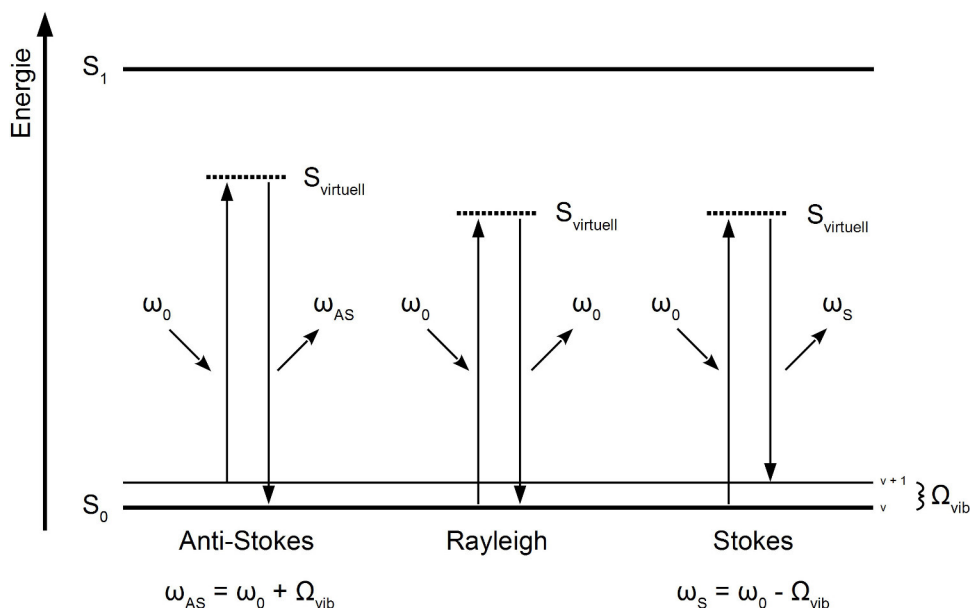
$$\begin{aligned} \mu_{ges} &= \mu_{perm}(0) \\ &+ \sum_{n=1}^{3Q-f} \left( \frac{\partial \mu}{\partial q_n} \right)_0 q_{n,0} \cos(2\pi\nu_n t) \\ &+ \alpha_{ij}(0) E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \\ &+ E_0 \sum_{n=1}^{3Q-f} \left( \frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial q_n} \right)_0 q_{n,0} \cos(2\pi\nu_0 t) \cos(2\pi\nu_n t) \end{aligned} \quad (2.21)$$

Unter Berücksichtigung des trigonometrischen Zusammenhangs

$$\cos(x) \cos(y) = \frac{1}{2} [\cos(x-y) + \cos(x+y)] \quad (2.22)$$

erhält man schließlich den Ausdruck:

$$\begin{aligned} \mu_{ges} &= \mu_{perm}(0) \\ &+ \sum_{n=1}^{3Q-f} \left( \frac{\partial \mu}{\partial q_n} \right)_0 q_{n,0} \cos(2\pi\nu_n t) \\ &+ \alpha_{ij}(0) E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \\ &+ \frac{E_0}{2} \sum_{n=1}^{3Q-f} \left( \frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial q_n} \right)_0 q_{n,0} [\cos(2\pi(\nu_0 - \nu_n)t) + \cos(2\pi(\nu_0 + \nu_n)t)] \end{aligned} \quad (2.23)$$



**Abbildung 2.4:** Darstellung von Raman- und Rayleigh-Streuung im Energiediagramm.

Die ersten beiden Terme in Gleichung 2.23 beschreiben das permanente Dipolmoment des Moleküls. Der statische Anteil der Atomkerne in Gleichgewichtslage findet dabei im ersten Term seine Entsprechung, während der zweite Term den veränderlichen Anteil der schwingenden Atomkerne berücksichtigt und somit auch für das IR-Spektrum des Moleküls verantwortlich ist. Der dritte Term besitzt eine Abhängigkeit von der Polarisierbarkeit des Moleküls. Er beschreibt ein, durch einfallende Photonen induziertes Dipolmoment, welches mit der Ursprungsfrequenz  $\nu_0$  der einfallenden Photonen oszilliert und folglich Photonen der gleichen Frequenz  $\nu_0$  erzeugt. Der dritte Term stellt folglich die Rayleigh-Streuung von Photonen an Molekülen dar. Der vierte Term beschreibt ähnlich dem dritten Term ein, durch einfallende Photonen induziertes, oszillierendes Dipolmoment. Die Frequenz des Dipols stellt sich dabei als Mischung der Frequenz des einfallenden Photons  $\nu_0$  und der Frequenz einer Schwingungsmode  $\nu_n$  dar. Der vierte Term beschreibt somit den Raman-Effekt, welcher die Energie eines Photons um ein Energiequantum  $\Omega_{\text{vib}}$  einer Molekülschwingung vermindert (Stokes-Signal bzw.  $\nu_0 - \nu_n$ ) oder erhöht (Anti-Stokes-Signal bzw.  $\nu_0 + \nu_n$ ). Abbildung 2.4 stellt die beiden Raman-Prozesse im Energiediagramm anschaulich der Rayleigh-Streuung gegenüber.

Aus Gleichung 2.23 lassen sich zwei wichtige Beobachtungen für den Raman-Effekt ableiten. Zunächst fällt auf, dass Raman-Spektren zwei Zweige besitzen (Stokes- und Anti-Stokes-Zweig), die beide den gleichen Informationsgehalt bezüglich der Raman-aktiven Moden des Moleküls enthalten. Allerdings weist der Stokes-Zweig (bei Raumtemperatur) eine deutlich höhere Intensität gegenüber dem Anti-Stokes-Zweig auf, sodass in Experimenten typischerweise nur ersterer berücksichtigt wird. Die Erklärung für diesen Unterschied liegt in der molekularen Besetzungsverteilung der Schwingungszustände, welche einer Boltzmann-Verteilung folgt. Bei Raumtemperatur befinden sich nahezu alle Moleküle im Schwingungsgrundzustand, was lediglich die Erzeugung eines Stokes-Signals zulässt. Für Anti-Stokes-Signale dagegen sind Moleküle im schwingungsangeregten Zustand erforderlich, welche jedoch erst bei höheren Temperaturen in genügender Anzahl vorliegen.

Schließlich lässt sich Gleichung 2.23 entnehmen, dass IR- und Raman-Spektroskopie zwar vergleichbare Informationen liefern, jedoch auf völlig unterschiedlichen Prinzipien beruhen. Während die Änderung des molekularen Dipolmoments bei Auslenkung der Kerne aus ihrer Gleichgewichtslage ( $\frac{\partial \mu}{\partial q_n} \neq 0$ ) einer Schwingungsmode ihre IR-Aktivität verleiht, zeigen Raman-aktive Schwingungsmoden eine Änderung der Polarisierbarkeit bei Auslenkung der Kerne aus ihrer Gleichgewichtslage ( $\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial q_n} \neq 0$ ). In der Praxis entscheidet in erster Linie die Symmetrie eines Moleküls über die Raman- und IR-Aktivität einer Schwingungsmode. Während Schwingungsmoden in niedersymmetrischen Molekülen sowohl Raman-, als auch IR-aktiv sein können, gilt in hochsymmetrischen Molekülen (solche mit Inversionszentrum) ein Ausschlussverbot, sodass Schwingungsmoden hier entweder Raman- oder IR-aktiv ist. Die Schwingungsmoden homonuklearer zweiatomiger Moleküle sind immer ausschließlich Raman-aktiv, da sie kein permanentes Dipolmoment aufweisen.

Einer der größten Vorzüge des Raman-Effekts ist seine (prinzipielle) Unabhängigkeit von der Frequenz (Wellenlänge) der einfallenden Photonen. Die Wellenlänge der Anregungsstrahlung lässt sich daher den experimentellen Bedingungen anpassen, wobei folgende Punkte bedacht werden sollten:

- **Sensitivität:** Die Intensität des Raman-Effektes skaliert mit der negativen vierten Potenz der Anregungswellenlänge ( $I_{Raman} \sim \lambda^{-4}$ ). Kürze Anregungswellenlängen (z.B. UV-Licht) erzeugen daher sehr viel intensivere Raman-Signale. Auch weisen die oftmals zur Detektion eingesetzten Photoelektronenvervielfacher (*engl. photomultiplier tube*, PMT) ihr Empfindlichkeitsmaximum gewöhnlich im Spektralbereich der kurzen Wellenlängen auf.
- **Fluoreszenz:** Insbesondere Anregungswellenlängen im sichtbaren Spektralbereich können Fluoreszenz erzeugen, deren Intensität die des Raman-Signals leicht um mehrere Größenordnungen übersteigt und spektral mit demselben überlappt. Anregungswellenlängen im roten Spektralbereich oder NIR minimieren das Auftreten von Fluoreszenz. Dem gegenüber verhindern Anregungswellenlängen im UV zwar nicht das Auftreten von Fluoreszenz, jedoch können Raman- und Fluoreszenzsignal hierbei aufgrund der für Fluoreszenz höheren Stokes-Verschiebung oftmals spektral getrennt detektiert werden.
- **Resonanz:** Wird die Anregungswellenlänge nahe (präresonant) oder identisch (resonant) zur Wellenlänge eines elektronischen Übergangs gewählt, so führt dies zur Verstärkung der Raman-Signale um mehrere Größenordnungen. Verstärkt werden jedoch nur Raman-Signale von Schwingungsmoden des Chromophors, dessen elektronischer Übergang induziert wird. (Prä-)Resonanz-Raman-Spektren zeigen daher nur einen Ausschnitt des gesamten Raman-Spektrums des Analyten. Gerade für Proteine muss dies jedoch keinen Nachteil darstellen, da ihre (nicht-resonanten) Raman-Spektren durch eine Vielzahl von Signalen des Proteinrückgrats ohnehin nur schwer interpretierbar sind. Insbesondere die Resonanz-Raman-Spektroskopie setzt besondere Vorsicht voraus, um die Probe nicht durch zu intensive Strahlenbelastung zu schädigen. Eine Kühlung oder der permanente Austausch bzw. eine Umwälzung der Probe können dabei Abhilfe schaffen.
- **Strahlenschäden:** Da der Raman-Effekt nur sehr schwach ist, werden hohe Intensitäten der Anregungsstrahlung benötigt, um in überschaubarer Zeit genügend Signal zu detektieren.

Kurze Anregungswellenlängen erhöhen dabei die Gefahr einer Photodegradation der Probe.

- **Ortsauflösung:** Im Fall von Raman-Mikroskopie sollte bedacht werden, dass die Auflösung des Mikroskops unter Anderem maßgeblich von der Wellenlänge der eingesetzten Anregungsstrahlung abhängt (siehe auch Kapitel 2.4.2).

## 2.2 Nicht-lineare Optik

### 2.2.1 Einführung

Die nicht-lineare Optik ist ein Teilbereich der Optik, welcher sich vornehmlich mit der Wechselwirkung von intensivem Licht mit Materie befasst. Sie umfasst Phänomene, die im gewöhnlichen Alltag nicht beobachtet werden, da die hier auftretenden Lichtintensitäten (einschließlich der von Sonnenlicht) vergleichsweise gering sind. Unter diesen milden Umständen ist die Annahme eines linearen Zusammenhangs zwischen der Polarisation der molekularen Elektronenwolke  $\vec{P}$  und der elektrischen Feldstärke eines Strahlungsfeldes  $\vec{E}$  durchaus gerechtfertigt, sodass sie als

$$\vec{P} = \epsilon_0 \cdot \chi^{(1)} \cdot \vec{E} \quad (2.24)$$

formuliert werden kann, mit  $\epsilon_0$  als Dielektrizitätskonstante des Vakuums und  $\chi^{(1)}$  als dielektrischem Suszeptibilitätstensor 1. Ordnung (nicht zu verwechseln mit der Tensorstufe). Die Suszeptibilität bzw. der Suszeptibilitätstensor kann hierbei als ein Maß für die, vom ausgelenkten Elektron verspürte Rückstellkraft interpretiert werden. Ähnlich dem Hookeschen Gesetz, welches als Näherung ebenfalls für nur geringe Auslenkungen aus der Ruhelage gilt, impliziert Gleichung 2.24 eine harmonische Oszillationen der Elektronen. Unter diesen Umständen verändert sich die Frequenz bzw. Wellenlänge von Strahlung bei Wechselwirkung mit Materie nicht und es gilt das Prinzip der Superposition, sodass zwei Strahlungsfelder untereinander wechselwirkungsfrei bleiben, während sie mit der gleichen Materie wechselwirken.

Bereits die Beobachtung, dass Atome ionisierbar sind – Elektronen also aus der Atomhülle entfernt werden können –, widerspricht der allgemeinen Gültigkeit von Gleichung 2.24. Elektronen können offensichtlich nicht beliebig weit weg vom Atomkern ausgelenkt werden und dennoch harmonische Oszillationen um denselben ausführen. Mit zunehmender elektrischer Feldstärke des Strahlungsfeldes  $\vec{E}$  muss auch die anharmonische Antwort der Polarisation  $\vec{P}$  anwachsen. Dieses nicht-lineare Verhalten wird typischerweise durch eine Taylor-Entwicklung der Polarisation beschrieben:

$$\vec{P} = \epsilon_0 \left[ \chi^{(1)} \vec{E} + \left( \chi^{(2)} \vec{E} \right) \vec{E} + \left( \left( \chi^{(3)} \vec{E} \right) \vec{E} \right) \vec{E} + \dots \right] \quad (2.25)$$

Man erkennt leicht, dass Gleichung 2.24 lediglich ein Spezialfall von Gleichung 2.25 ist – für kleine Feldstärken  $\vec{E}$  geht Gleichung 2.25 in guter Näherung in Gleichung 2.24 über, zumal die Suszeptibilitäten höherer Ordnung gegenüber der Suszeptibilität erster Ordnung um Größenordnungen geringer ausfallen ( $\chi^{(1)} \approx 1$ ,  $\chi^{(2)} \approx 10^{-12} \text{ mV}^{-1}$ ,  $\chi^{(3)} \approx 10^{-17} \text{ m}^2 \text{ V}^{-2}$ ). Die mit Hochleistungslasern erreichbaren elektrischen Feldstärken des Strahlungsfeldes sind dagegen zu hoch, als dass die Polarisationsterme höherer Ordnung vernachlässigt werden dürfen. Dies gilt insbesondere für so genannte nicht-lineare Materialien (z.B. Beta-Bariumborat, BBO), deren Suszeptibilitäten höherer Ordnung beachtliche Werte erreichen können. Die anharmonischen Beiträge der Polarisation führen zu einer bemerkenswerten Konsequenz: die induzierten Dipole können mit verschiedenen Frequenzen oszillieren – auch solchen, die im Spektrum der Anregungsstrahlung nicht enthalten sind. Das Superpositionsprinzip ist hierbei nicht mehr länger gültig, sodass verschiedene Strahlungsfelder miteinander wechselwirken können. Einige der sehr nützlichen Konsequenzen daraus werden im Folgenden näher betrachtet.

### 2.2.2 Summen- und Differenzfrequenzerzeugung

Die anharmonische Antwort der Polarisation  $\vec{P}$  auf die elektrische Feldstärke  $\vec{E}$  erlaubt es, die Frequenzen sich räumlich überlagernder Strahlungsfelder zu mischen und so neue Strahlungsfelder anderer Frequenzen zu erzeugen. Werden nur Polarisationsterme bis



zur zweiten Ordnung berücksichtigt

$$\vec{P} = \epsilon_0 \left[ \chi^{(1)} \vec{E} + \left( \chi^{(2)} \vec{E} \right) \vec{E} \right] \quad (2.26)$$

und zwei sich in z-Richtung ausbreitende, überlagernde Strahlungsfelder als ebene Wellen beschrieben

$$\vec{E} = \vec{E}_1 \cos \left( \omega_1 t + \vec{k}_1 \vec{z} \right) + \vec{E}_2 \cos \left( \omega_2 t + \vec{k}_2 \vec{z} \right) \quad (2.27)$$

so erzielt Einsetzen von Gleichung 2.27 in Gleichung 2.26 folgenden Ausdruck für die induzierte Gesamtpolarisation:

$$\begin{aligned} \vec{P} = & \epsilon_0 \chi^{(1)} \left[ \vec{E}_1 \cos \left( \omega_1 t + \vec{k}_1 \vec{z} \right) + \vec{E}_2 \cos \left( \omega_2 t + \vec{k}_2 \vec{z} \right) \right] \\ & + \epsilon_0 \chi^{(2)} \left[ \vec{E}_1^2 \cos^2 \left( \omega_1 t + \vec{k}_1 \vec{z} \right) + \vec{E}_2^2 \cos^2 \left( \omega_2 t + \vec{k}_2 \vec{z} \right) \right] \\ & + \epsilon_0 \chi^{(2)} \left[ 2 \vec{E}_1 \vec{E}_2 \cos \left( \omega_1 t + \vec{k}_1 \vec{z} \right) \cos \left( \omega_2 t + \vec{k}_2 \vec{z} \right) \right] \end{aligned} \quad (2.28)$$

Werden nur die Polarisationssterme zweiter Ordnung betrachtet – die Auswirkung des Polarisationssterms erster Ordnung wurde bereits in Kapitel 2.1.3 erläutert –, sowie die trigonometrischen Zusammenhänge

$$\cos^2(x) = \frac{1}{2} (1 + \cos(2x)) \quad (2.29)$$

und

$$\cos(x) \cdot \cos(y) = \frac{1}{2} [\cos(x+y) + \cos(x-y)] \quad (2.30)$$

berücksichtigt, so ergibt sich für die nicht-lineare Polarisierung zweiter Ordnung folgender Ausdruck:

$$\begin{aligned} P^{(2)} = & \epsilon_0 \chi^{(2)} \left[ \frac{1}{2} \vec{E}_1^2 + \frac{1}{2} \vec{E}_2^2 \right] \\ & + \epsilon_0 \chi^{(2)} \left[ \frac{1}{2} \vec{E}_1^2 \cos \left( 2\omega_1 t + 2\vec{k}_1 \vec{z} \right) + \frac{1}{2} \vec{E}_2^2 \cos \left( 2\omega_2 t + 2\vec{k}_2 \vec{z} \right) \right] \\ & + \epsilon_0 \chi^{(2)} \left[ \vec{E}_1 \vec{E}_2 \cos \left( (\omega_1 + \omega_2) t + (\vec{k}_1 + \vec{k}_2) \vec{z} \right) \right] \\ & + \epsilon_0 \chi^{(2)} \left[ \vec{E}_1 \vec{E}_2 \cos \left( (\omega_1 - \omega_2) t + (\vec{k}_1 - \vec{k}_2) \vec{z} \right) \right] \end{aligned} \quad (2.31)$$

Der frequenzunabhängige erste Term in Gleichung 2.31 wird als optische Gleichrichtung bezeichnet und erzeugt ein statisches elektrisches Feld im nicht-linearen Material. Der Effekt wird in umgekehrter Weise zur Realisierung von Pockelszellen verwendet, indem ein extern erzeugtes elektrisches Feld die Polarisation des Mediums verändert und es so doppelbrechend werden lässt. Die folgenden zwei Terme (zweiter und dritter Term der Gleichung 2.31) beschreiben den Effekt der Frequenzaddition. Dabei ist sowohl eine Addition der Frequenzen beider Strahlungsfelder möglich ( $\omega_1 + \omega_2$ ), was durch den dritten Term ausgedrückt und typischerweise als Summenfrequenzerzeugung (SFG, engl. *sum frequency generation*) bezeichnet wird, als auch die Frequenzaddition innerhalb desselben Strahlungsfeldes ( $2\omega_1 = \omega_1 + \omega_1$  und  $2\omega_2 = \omega_2 + \omega_2$ ), was durch den zweiten Term ausgedrückt und typischerweise als Frequenzverdopplung (SHG, engl. *second harmonic generation*) bezeichnet wird. Der vierte Term in Gleichung 2.31 schließlich beschreibt die Frequenzsubtraktion ( $\omega_1 - \omega_2$ ), welche gewöhnlich als Differenzfrequenzerzeugung bezeichnet wird (DFG, engl. *difference frequency generation*). Da an allen vier Prozessen jeweils drei Strahlungsfelder beteiligt sind (im Fall der SHG zählt das ursprüngliche Strahlungsfeld zweifach), werden diese Prozesse auch allgemein als Drei-Wellen-Mischung bezeichnet.

Die nicht-lineare Wechselwirkung zweier Strahlungsfelder erzeugt nach Gleichung 2.31 bis zu vier weitere Strahlungsfelder. Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass die erwähnten Prozesse prinzipiell auch rückwärts ablaufen können. Über die Wahl der experimentellen Parameter lässt sich beeinflussen, welcher dieser Drei-Wellen-Mischungsprozesse in welche Richtung besonders effizient abläuft. Neben der Energieerhaltung spielt hierbei (wie allgemein bei allen nicht-linear optischen Prozessen) vor allem die Impulserhaltung eine bedeutende Rolle. Mit  $\omega_3 = \omega_1 + \omega_2$  und  $\vec{p} = \hbar\vec{k}$  ergibt sich:

$$\hbar\omega_3 = \hbar\omega_1 + \hbar\omega_2 \quad (2.32)$$

$$\hbar\vec{k}_3 = \hbar\vec{k}_1 + \hbar\vec{k}_2 + \hbar\Delta\vec{k} \quad (2.33)$$

Der Fehlerterm  $\Delta\vec{k}$  kann dabei als Impulsunschärfe im Sinne der Orts-Impuls-Unschärfe ( $\Delta x \cdot \Delta p \geq \hbar/2$ ) verstanden werden.

Eine Möglichkeit Gleichung 2.33 zu erfüllen besteht darin, sehr dünne, optisch nicht-lineare Materialien zu verwenden. Dies führt zu einer scharfen Lokalisation des Konversionsprozesses ( $\Delta x \rightarrow 0$ ), wodurch die Unschärfe von  $\hbar \vec{k}_3$  genügend erhöht wird, um Gleichung 2.33 zu erfüllen. Die Effizienz des Konversionsprozesses fällt unter diesen Umständen jedoch minimal aus, da sie quadratisch mit der Weglänge des Strahls durch das nicht-lineare Material skaliert. Auf diese technische Lösung wird daher nur in Ausnahmefällen zurückgegriffen. Höhere Konversionseffizienzen erhält man beispielsweise durch Phasenanpassung in optisch anisotropen Kristallen, wie sie im folgenden Kapitel beschrieben wird.

### 2.2.3 Phasenanpassung in optisch anisotropen Kristallen

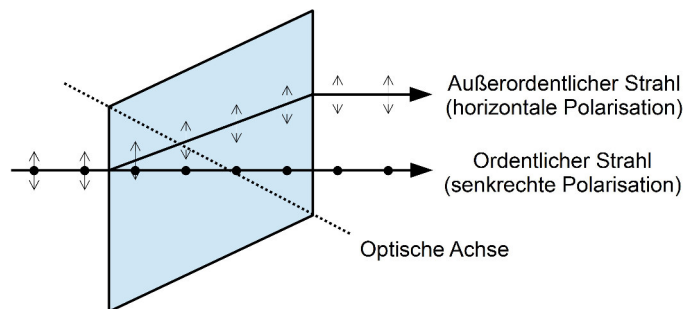
Die Effizienz nicht-linear optischer Effekte wächst mit der kohärenten Interaktionslänge der Strahlungsfelder im nicht-linear optischen Material, sofern erzeugende und resultierende Wellen eine phasen- bzw. geschwindigkeitsgleiche Ausbreitung zeigen. Die Erfüllung dieser Voraussetzung ist jedoch keinesfalls selbstverständlich, wie eine Erweiterung von Gleichung 2.33 um die Definition des Wellenvektors  $\vec{k} = \frac{\omega}{c_0} n(\omega)$  verdeutlicht. Mit  $n(\omega)$  als wellenlängenabhängigem Brechungsindex verändert sich die Impulserhaltungsbedingung zu

$$\hbar \frac{\omega_3}{c_0} n(\omega_3) = \hbar \frac{\omega_1}{c_0} n(\omega_1) + \hbar \frac{\omega_2}{c_0} n(\omega_2) + \hbar \Delta \vec{k}. \quad (2.34)$$

Aus der Forderung einer vernachlässigbar geringen Phasenfehlanpassung ( $\Delta \vec{k} \rightarrow 0$ ) folgt nach Vereinfachung des Ausdrucks schließlich mit

$$\omega_3 n(\omega_3) = \omega_1 n(\omega_1) + \omega_2 n(\omega_2) \quad \text{mit } \omega_3 > \omega_2 \geq \omega_1 \quad (2.35)$$

eine Bedingung, welche zeitgleich mit der Energieerhaltung (siehe Gleichung 2.32) und normalem Dispersionsverhalten ( $\frac{dn}{d\omega} > 0$ ) in optisch isotropen Materialien nicht eingehalten werden kann. Eine Ausnahme bilden Bereiche elektromagnetischer Übergänge aufgrund der hier auftretenden anomalen Dispersion. In der Praxis



**Abbildung 2.5:** Darstellung der Auswirkung optischer Anisotropie auf einen transmittierten Lichtstrahl.

kommt dieser Möglichkeit jedoch keine nennenswerte Bedeutung zu, da sie mit der unerwünschten Absorption von erzeugenden bzw. resultierenden Wellen gekoppelt ist. In der Praxis weisen erzeugende und resultierende Wellen in isotropen Materialien daher unterschiedliche Ausbreitungsgeschwindigkeiten auf, sodass es durch Interferenz zur Auslöschung der resultierenden Welle kommt.

Dieses Dilemma kann durch den Einsatz optisch anisotroper (doppelbrechender) Kristalle umgangen werden. Ermöglicht wird dies durch einen hier gegebenen tensoriellen Zusammenhang (anstatt eines skalaren, wie im optisch isotropen Fall) zwischen dem elektrischen Feld der elektro-magnetischen Strahlung und der im Kristall induzierten Polarisation. Als Konsequenz zeigen optisch anisotrope Kristalle entlang ihrer Kristallhauptachsen unterschiedliche Brechungsindices. Für diese Kristalle lassen sich optische Achsen definieren, entlang derer die Transmission elektromagnetischer Strahlung unabhängig von ihrer Polarisation verläuft. Entsprechend der Anzahl dieser Achsen wird zwischen uniaxialen (1 optische Achse,  $n_x = n_y \neq n_z$ ) und biaxialen (2 optische Achsen,  $n_x \neq n_y \neq n_z \neq n_x$ ) Kristallen unterschieden. Uniaxialen Kristallen kommt hierbei die größere Bedeutung zu, sodass biaxiale Kristalle in der weiteren Betrachtung nicht berücksichtigt werden.

Sofern die Transmission nicht entlang der optischen Achse erfolgt, führt die doppelbrechende Eigenschaft des Kristall zu einem polarisations-abhängigem Transmissionsverhalten, wie es in Abbildung 2.5 dargestellt ist. Entscheidend ist dabei die Polarisation der elektro-magnetischen Welle relativ zu einer Ebene, welche von der optischen Achse und der Ausbreitungsrichtung der Welle im Kristall

selbst aufgespannt wird. Die senkrecht zu dieser Ebene polarisierte Komponente der Welle wird als ordentlicher (engl. *ordinary*) Strahl bezeichnet. Er folgt dem Snellius-Brechungsgesetz und erfährt unabhängig vom Transmissionswinkel  $\theta$  zwischen der Ausbreitungsrichtung der Welle und der optischen Achse des Kristalls den ordentlichen Brechungsindex  $n_o$ .

Die parallel zu jener Ebene polarisierte Komponente der Welle wird als außerordentlicher (engl. *extraordinary*) Strahl bezeichnet. Er folgt nicht dem Snellius-Brechungsgesetz und erfährt während der Transmission einen, vom Transmissionswinkel  $\theta$  abhängigen Brechungsindex  $n(\theta)$ , welcher sich in Form einer Ellipsengleichung als gewichtete Summe des ordentlichen und außerordentlichen Brechungsindex darstellt:

$$\frac{1}{n^2(\theta)} = \frac{\cos^2(\theta)}{n_o^2} + \frac{\sin^2(\theta)}{n_e^2}. \quad (2.36)$$

Ein Verkippen des Kristalls (gleichbedeutend mit einer Änderung der Transmissionswinkels  $\theta$  der Welle im Kristall) erlaubt es folglich, den Brechungsindex des außerordentlichen Strahles  $n(\theta)$  beliebig zwischen den Werten für den ordentlichen bzw. außerordentlichen Brechungsindex  $n_o$  bzw.  $n_e$  zu variieren. Unter der besonderen Voraussetzung, dass der  $\chi^{(2)}$ -Tensor des doppelbrechenden Kristalls eine senkrecht zur Polarisation der erzeugenden Wellen orientierte Antwort der nicht-linearen Polarisation des Kristalls erzeugt, kann durch geeignete Wahl von  $\theta$  die Phasenanpassungsbedingung (siehe Gleichung 2.35) erfüllt werden.

## 2.2.4 Optischer Kerr-Effekt

Der optische Kerr-Effekt ist ein Sonderfall des Kerr-Effektes und beschreibt die Materialantwort infolge des intensiven elektrischen Feldes eines Laserpulses in Form einer Variation des Brechungsindex. Er ist von entscheidender Bedeutung für die passive Modenkopplung in Festkörper-Lasern (siehe Kapitel 2.3.3) und spielt auch bei der Weißlichterzeugung (siehe Kapitel 2.2.5) eine wichtige Rolle.

Die Auswirkung des Kerr-Effektes auf den Brechungsindex wird oftmals als Taylor-Reihen-Entwicklung des Brechungsindex  $n$  dargestellt, mit  $I$  als Intensität der einfallenden elektromagnetischen Strahlung. Für den optischen Kerr-Effekt als Sonderfall des Kerr-Effektes sind dabei nur die Terme nullter und zweiter Ordnung von Interesse:

$$n = n_0 + n_2 I . \quad (2.37)$$

Hintergrund dieser Formulierung ist die Abhängigkeit des Brechungsindex von der Suzeptibilität des Mediums:

$$n = \sqrt{1 + \chi} \quad (2.38)$$

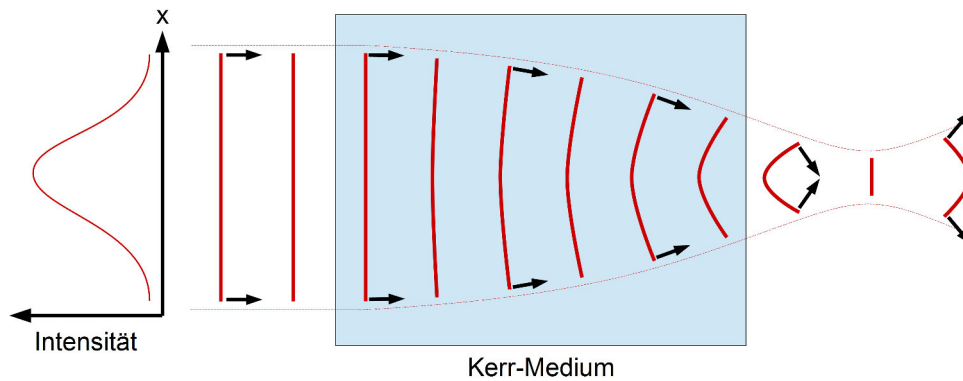
Angelehnt an Gleichung 2.25 lässt sich die Suzeptibilität  $\chi$  des Mediums als Summe des linearen Beitrags  $\chi_L$  und eines zusammengefassten, nicht-linearen Beitrags  $\chi_{NL}$  ausdrücken, wobei letzterer eine Abhängigkeit von der elektrischen Feldstärke  $\vec{E}$  der elektromagnetischen Strahlung zeigt. Da das betrachtete Medium als optisch isotrop angenommen wird, entfallen aus Symmetriegründen alle Polarisationssterme geradzahligter Ordnung:

$$\begin{aligned} \vec{P} &= \epsilon_0 \left[ \chi^{(1)} \vec{E} + \left( \left( \chi^{(3)} \vec{E} \right) \vec{E} \right) \vec{E} \right] \\ &= \epsilon_0 \left[ \chi_L + \chi_{NL}(\vec{E}) \right] \vec{E} \\ &= \epsilon_0 \chi(\vec{E}) \vec{E} . \end{aligned} \quad (2.39)$$

Die Kombination der Gleichungen 2.37 und 2.39 zeigt, dass die Annahme eines konstanten Brechungsindex im Fall hoher Lichtintensitäten nicht mehr länger gültig ist:

$$n = \sqrt{1 + \chi_L + \chi_{NL}(\vec{E})} . \quad (2.40)$$

Typischerweise nimmt der Brechungsindex des Mediums mit steigender Intensität der elektromagnetischen Strahlung zu. Laserpulse, deren laterales (senkrecht zur Ausbreitungsrichtung) Intensitätsprofil gewöhnlich einer Gauss- oder  $\text{sech}^2$ -Verteilung entspricht,



**Abbildung 2.6:** Darstellung der Auswirkung des Kerr-Effektes auf die Wellenfront eines Laserpulses.

erfahren daher im Zentrum, dem Punkt größter Intensität, einen höheren Brechungsindex des Mediums, als an den vergleichsweise intensitätsschwachen Flanken (vergleichbar der Wirkung einer Gradientenlinse). Das Zentrum des Laserpulses bewegt sich daher langsamer durch das Medium, als es für dessen Flanken der Fall ist. Wie in Abbildung 2.6 skizziert, bewirkt die daraus resultierende Krümmung der Wellenfront eine Fokussierung des Laserstrahls, weshalb in diesem Zusammenhang oftmals von einer Kerr-Linse gesprochen wird.

Kerr-Linsen finden häufig Anwendung in Femtosekunden-Festkörperlasern, in welchen sie die passive Modenkopplung initiieren. Da cw-Strahlung im Gegensatz zu Laserpulsen zu schwach ist, um eine Kerr-Linse zu induzieren, erfährt erstere bei geeigneter Resonatoranordnung keine ausreichende Verstärkung, sodass sich der Pulsbetrieb des Lasers gegenüber dem cw-Betrieb durchzusetzen vermag.

### 2.2.5 Weißlichterzeugung

Für die transiente Absorptionsspektroskopie sind kurze, spektral sehr breite Weißlichtpulse zur Abtastung molekularer Zustände von Vorteil. Sie erlauben die Registrierung eines gesamten Spektrums pro Durchgang, was sich verkürzend auf die Messdauer und die Strahlenbelastung der Probe auswirkt. Bisher sind nur Femtosekunden-Laser technisch in der Lage derart kurze Lichtpulse zur Verfügung zu stellen. Die von ihnen erzeugten Pulse gelten zwar mit etwa 10 nm als spektral sehr breit – in Relation zu den extrem schmalbandigen

( $\ll 0,01$  nm) cw-Einzelmodenlasern der Raman-Spektroskopie eine durchaus zutreffende Beschreibung –, sind jedoch immer noch zu schmalbandig, um das etwa 600 nm breite Spektrum der UV/Vis-Spektroskopie (200-800 nm) auch nur näherungsweise abzudecken. Die gezielte spektrale Verbreiterung von Femtosekunden-Laserpulsen spielt daher für die transiente Absorptionsspektroskopie eine bedeutende Rolle.

Das als Weißlichterzeugung (teilweise auch Superkontinuumgenerierung genannt) bekannte Verfahren basiert im Wesentlichen auf dem Effekt der Selbstphasenmodulation [15, 16]. Die Phase  $\Phi(t)$  eines in z-Richtung propagierenden Laserpulses ist gegeben durch:

$$\Phi(t) = \omega_0 t - kz = \omega_0 t - \frac{2\pi z}{\lambda_0} n(I) . \quad (2.41)$$

Die Momentanfrequenz  $\omega(t)$  ergibt sich aus der zeitlichen Ableitung der Phase des Laserpulses:

$$\omega(t) = \frac{d\Phi(t)}{dt} = \omega_0 - \frac{2\pi z}{\lambda_0} \frac{dn(I)}{dt} . \quad (2.42)$$

Wie in Kapitel 2.2.4 bereits beschrieben, zeigt der Brechungsindex ein, von der Intensität des Lichtpulses abhängiges Verhalten. Die Propagation eines Laserpulses durch ein Medium erzeugt somit an einem bestimmten Punkt eine zeitliche Modulation des Brechungsindex, indem dieser gemäß Gleichung 2.37 dem Intensitätsverlauf des Pulses folgend zunächst ansteigt und danach wieder abfällt. Unter der Annahme eines Gauss-förmigen Intensitätsverlaufes des Pulses mit der Zeit

$$I(t) = I_0 e^{\left(-\frac{t^2}{\tau^2}\right)} \quad (2.43)$$

ergibt sich für die zeitliche Änderung des Brechungsindex unter Kombination von Gleichung 2.37 und 2.43

$$\frac{dn(I)}{dt} = n_2 \frac{dI(t)}{dt} = -\frac{2n_2 I_0 t}{\tau^2} e^{\left(-\frac{t^2}{\tau^2}\right)} \quad (2.44)$$

Die Kombination von Gleichung 2.42 und 2.44 liefert schließlich einen Ausdruck für die Auswirkung der Selbstphasenmodulation:



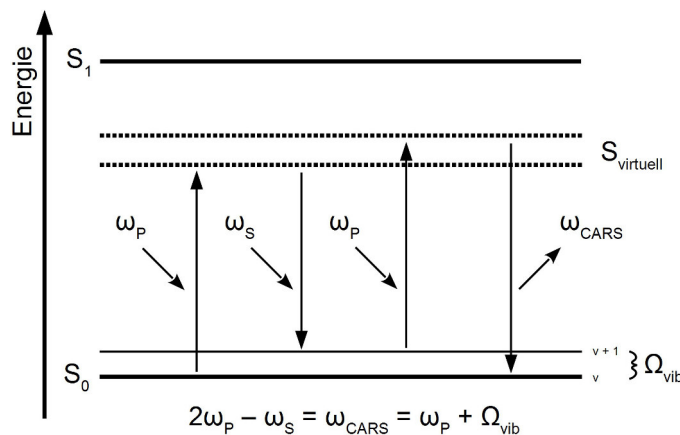
$$\omega(t) = \omega_0 + \frac{2\pi z}{\lambda_0} \frac{2n_2 I_0 t}{\tau^2} e^{-\frac{t^2}{\tau^2}} \quad (2.45)$$

Das Intensitätsmaximum des Laserpulses ist nach Gleichung 2.43 auf  $t = 0$  zentriert. Für diesen Zeitpunkt gilt nach Gleichung 2.45  $\omega(t) = \omega_0$ . Die spektrale Verbreiterung des Pulses erfolgt vor allem an den Pulsflanken. Für die ansteigende Flanke ( $t < 0$ ) wird der zweite Term in Gleichung 2.45 negativ, sodass hier  $\omega(t) < \omega_0$  gilt. An der ansteigenden Pulsflanke werden somit neue, zur Ursprungsfrequenz geringere bzw. rotverschobene Frequenzen erzeugt. In gleicher Weise entstehen an der abfallenden Flanke ( $t > 0$ ) neue, zur Ursprungsfrequenz höhere bzw. blauverschobene Frequenzen, entsprechend  $\omega(t) > \omega_0$ . Mit zunehmender Propagationslänge durch ein Medium führt die Selbstphasenmodulation so zu einer spektralen Verbreiterung des Laserpulses über teilweise mehrere hundert Nanometer Bandbreite.

Es soll an dieser Stelle nicht verschwiegen werden, dass die Weißlichterzeugung zwar hauptsächlich auf Selbstphasenmodulation beruht, jedoch erst durch das Mitwirken anderer Prozesse ausreichend effizient ablaufen kann. Hierbei sei vor allem der in Kapitel 2.2.4 bereits vorgestellte optische Kerr-Effekt erwähnt, welcher analog einer Linse zur Fokussierung des propagierenden Laserpulses führt und die Intensität im Pulszentrum somit erhöht. Überschreitet die Intensität einen gewissen Schwellenwert, so kommt es zu einem dielektrischen Durchbruch und ein Plasma entsteht, welches defokussierend auf den Laserpuls wirkt – die so genannte Plasmadefokussierung. Beide Effekte – optischer Kerr-Effekt und Plasmadefokussierung – stehen im Gleichgewicht und erlauben eine Propagation des Laserpulses durch das Medium über weite Strecken bei nahezu konstantem Strahldurchmesser.

## 2.2.6 Kohärente Anti-Stokes Raman-Spektroskopie

Die Kohärente Anti-Stokes Raman-Spektroskopie (CARS, *engl. Coherent anti-Stokes Raman-Spectroscopy*) basiert grundlegend auf dem, in Kapitel 2.1.3 beschriebenen Raman-Effekt und zeigt sich daher für die gleichen molekularen Vibrationssignaturen empfindlich, wie sie



**Abbildung 2.7:** Darstellung des CARS-Prozesses im Energiediagramm. Sobald die Frequenzdifferenz von Pump- und Stokes-Puls in Resonanz mit einer raman-aktiven Schwingung des Moleküls ist ( $\omega_P - \omega_S = \Omega_{\text{vib}}$ ), wird das Anti-Stokes- bzw. CARS-Signal generiert.

auch in der Raman-Spektroskopie detektiert werden. Die Erzeugung des CARS-Signals erfolgt durch kohärente Wechselwirkung dreier eingestrahler Lichtfelder, welche gewöhnlich als Pump- ( $\omega_p$ ), Stokes- ( $\omega_s$ ) und Abtast-Strahl ( $\omega_{pr}$  von engl. *probe*) bezeichnet werden. Da prinzipiell keine Notwendigkeit besteht Pump- und Abtast-Strahl als separate Felder einzustrahlen, findet häufig das technisch leichter beherrschbare degenerierte CARS-Schema Anwendung, in welchem Pump- und Abtast-Strahl identisch sind ( $\omega_p = \omega_{pr}$ ). CARS ist somit eine Form der Vier-Wellen-Mischung und basiert auf nicht-linear optischen Effekten dritter Ordnung. Sofern die Differenzfrequenz aus Pump- und Stokes-Strahl in Resonanz mit einer molekularen Schwingung ist, führt dies zu einer Verstärkung des CARS- bzw. Anti-Stokes-Signals um teilweise mehrere Größenordnungen. Da das CARS-Signal blau-verschoben zur Anregungswellenlänge erscheint, kann es spektral separiert von eventuell auftretender Fluoreszenz detektiert werden.

Die Erzeugung des CARS-Signals wird vielfach sehr anschaulich als Folge zweier Raman-Streuungsprozesse beschrieben, wie es in Abbildung 2.7 dargestellt ist. Durch Einstrahlen des Pump-Strahls wird ein Stokes-Strahl erzeugt. Dieser Prozess wird durch externe Einstrahlung des Stokes-Strahls verstärkt, indem der Übergang des Moleküls vom virtuellen Niveau in den schwingungsangeregten Grundzustand stimuliert wird. Die Einstrahlung des Abtast-Strahls

schließlich führt in Verbindung mit dem Molekül im schwingungsangeregten Zustand zur Erzeugung eines Anti-Stokes- bzw. CARS-Signals. Diese Beschreibung des CARS-Prozesses ist zwar anschaulich, wie zuvor bereits angemerkt, jedoch formal unzutreffend, was insbesondere anhand des unterschiedlichen Charakters von Raman- und CARS-Signal deutlich wird. Während die Raman-Streuung ein spontaner, nicht-parametrischer Prozess ist, dessen inkohärentes Signal in eine zufällige Richtung abgestrahlt wird, handelt es sich bei CARS um einen parametrischen Prozess, welcher der Energie- und Impulserhaltung unterliegt und dessen kohärentes Signal daher in eine definierte Richtung abgestrahlt wird.

Eine treffendere Beschreibung des CARS-Prozesses wäre daher eine Frequenzmischung, wie sie in Kapitel 2.2.2 beschrieben wurde. Für eine ausführliche Beschreibung der Theorie hinter dem CARS-Prozess sei an dieser Stelle auf einschlägige Literatur verwiesen, beispielsweise „Cheng & Xie – Coherent Raman Scattering Microscopy“ [17]. Zusammengefasst erzeugt die Einstrahlung des Pump- und Stokes-Strahlungsfeldes eine nicht-lineare Polarisation  $P^{NL}$  in der Probe:

$$P^{NL} = \epsilon_0 \chi^{(3)} E_p^2 E_s^* \quad (2.46)$$

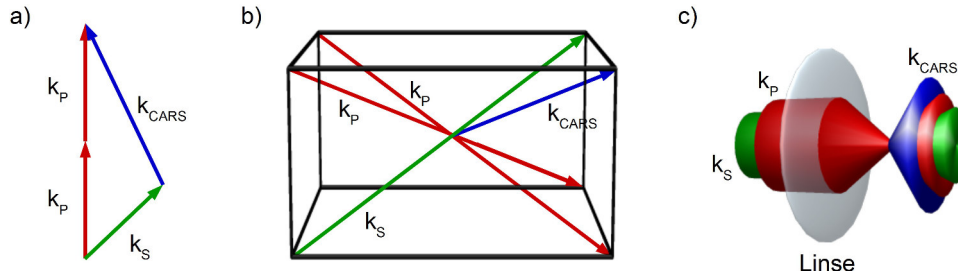
mit  $\chi^{(3)}$  als nicht-lineare Suszeptibilität dritter Ordnung, sowie  $E_p$  und  $E_s$  als elektrische Feldstärken des Pump- bzw. Stokes-Strahlungsfeldes. Die quadratische Abhängigkeit der nicht-linearen Polarisation  $P^{NL}$  von  $E_p$  ist auf das zuvor eingeführte degenerierte CARS-Schema zurückzuführen. CARS ist somit eine Form der Vier-Wellenmischung. Die messbare Intensität des CARS-Signals entspricht dabei dem Betragsquadrat der Amplitude des CARS-Strahlungsfeldes. Unter der Annahme einer zutreffenden Beschreibung des Pump- und Stokes-Feldes als ebene Welle, ergibt für die messbare Intensität des CARS-Signals  $I_{CARS}$  der Ausdruck:

$$I_{CARS} \propto |E_{CARS}|^2 = |\chi^{(3)}|^2 I_p^2 I_s si^2 \left( \frac{\Delta k z}{2} \right) \quad (2.47)$$

mit  $si(x) = \frac{\sin(x)}{x}$ , sowie  $\Delta k = k_{CARS} - (2k_p - k_s)$  als Wellenvektor- bzw. Phasen-Fehlanpassung und  $z$  als Dicke der Probe.

In Gleichung 2.47 spiegeln sich gleich mehrere Eigenheiten des CARS-Signals wider. So beschreibt der letzte Term in Gleichung 2.47 in Form der Kardinalsinusfunktion  $si^2\left(\frac{\Delta kz}{2}\right)$  die Notwendigkeit einer Phasenanpassung ( $\Delta k \rightarrow 0$ ), wie sie auch in Abbildung 2.8a skizziert ist. Da die mittels CARS untersuchten Proben jedoch zu meist nicht doppelbrechend sind, kommt eine Phasenanpassung, wie sie in Kapitel 2.2.3 vorgestellt wurde nicht in Frage. Stattdessen wird die Phasenanpassung wahlweise über eine von zwei möglichen Einstrahlungsgeometrien realisiert. In der älteren, nicht-kollinearen BOXCARS-Geometrie (nicht zu verwechseln mit der BOXCAR-Mittelung) erfolgt die Einstrahlung von Pump- und Stokes-Strahl separat unter einem definierten Winkel auf die Probe, sodass die Phasenanpassungsbedingung erfüllt ist (siehe auch Abbildung 2.8b). Entsprechend verlässt auch der CARS-Strahl die Probe unter einem definierten Winkel. In der BOXCARS-Geometrie kann der CARS-Strahl daher ohne weitere spektrale Aufreinigung durch Filter oder dispersive Elemente detektiert werden. Trotz dieses Vorteils erweist sich die BOXCARS-Geometrie für die Mikroskopie als eher unattraktiv, da die nötige Strahlführung vergleichsweise kompliziert ist und die hohe Interaktionslänge der Strahlen im Fokus zu einer geringen Ortsauflösung führt. Alternativ ist eine Phasenanpassung auch über eine kollineare Einstrahlung möglich, wie sie in Abbildung 2.8c skizziert ist. Voraussetzung hierfür ist eine Fokussierung von Pump- und Stokes-Strahl mittels Linsen hoher numerischer Apertur (typischerweise  $NA \geq 1$ ) [18]. In diesem Fall wird die strenge Gültigkeit der Phasenanpassungsbedingung aufgeweicht und die Kardinalsinusfunktion in Gleichung 2.47 nähert sich mit steigender numerischer Apertur der Linse ihrem Maximum an. Die simplere Strahlführung und höhere Ortsauflösung macht die kollineare Strahlführung zur Methode der Wahl für die CARS-Mikroskopie. Da sich das CARS-Signal jedoch kollinear zu Pump- und Stokes-Strahl ausbreitet, muss es vor einer Detektion spektral abgetrennt werden.

Weiterhin fällt auf, dass das CARS-Signal proportional zum Betragsquadrat der nicht-linearen Suszeptibilität ist ( $I_{CARS} \propto |\chi^{(3)}|^2$ ), was weitreichende Konsequenzen für die Erscheinungsform und die Konzentrationsabhängigkeit des CARS-Signals hat. Als eine Sonderform der Vier-Wellen-Mischung kann der CARS-Prozess sowohl



**Abbildung 2.8:** a) Phasenanpassungsbedingung für CARS (in Vorwärts-Richtung), mit  $k_p$ ,  $k_s$  und  $k_{CARS}$  als Wellenvektor des jeweiligen Pump-Stokes- und CARS-Pulses. b) In der BOXCARS-Geometrie wird die Phasenanpassung durch Einstrahlen von Pump- und Stokes-Strahl in definierten Richtungen erfüllt. c) In der kollinearen Geometrie führt die starke Fokussierung zur Aufweichung der Phasenanpassungsbedingung.

resonant mit einer Molekülschwingung, wie auch nicht-resonant durch rein elektronische Antwort der Probe bzw. des Mediums erfolgen. Die nicht-lineare Suszeptibilität  $\chi^{(3)}$  kann daher als Summe aus resonanter ( $\chi_R^{(3)}$ ) und nicht-resonanter Suszeptibilität ( $\chi_{NR}^{(3)}$ ) formuliert werden:

$$\chi^{(3)} = \frac{\chi_R^{(3)}}{\Delta - i\Gamma} + \chi_{NR}^{(3)} \quad (2.48)$$

Der Ausdruck  $\Delta - i\Gamma$  mit  $\Delta = \omega_p - \omega_s - \Omega_R$  trägt dabei der Tatsache Rechnung, dass die resonante Suszeptibilität  $\chi_R^{(3)}$  nur relevante Beiträge liefert, sofern die Frequenzdifferenz von Pump- und Stokes-Strahl in Resonanz mit der Frequenzverschiebung  $\Omega_R$  einer Raman-Bande der Linienbreite  $\Gamma$  ist. Die Intensität des CARS-Signals lässt sich daher auch umformulieren als:

$$I_{CARS} \propto |E_{CARS}|^2 = |\chi_R^{(3)}(\Delta)|^2 + |\chi_{NR}^{(3)}|^2 + 2Re \chi_R^{(3)}(\Delta) \chi_{NR}^{(3)} \quad (2.49)$$

mit  $Re \chi_R^{(3)}(\Delta)$  als Realteil der resonanten Suszeptibilität. Der erste Term in Gleichung 2.49 enthält rein resonante Anteile und stellt im Fall hoher Analytkonzentrationen oder starker Raman-Banden den dominierenden Beitrag dar. In diesem Fall skaliert die Intensität des CARS-Signals (nahezu) quadratisch mit der Konzentration des Analyten. Der zweite Term in Gleichung 2.49 liefert einen ausschließlich nicht-resonanten Beitrag und zeigt keinerlei Abhängigkeit von eventuell vorhandenen Raman-Verschiebungen. Er wird daher als

nicht-resonanter Untergrund (*engl. non-resonant background*) bezeichnet. Der dritte Term in Gleichung 2.49 stellt sich als Mischterm aus resonanten und nicht-resonanten Beiträgen dar. Er ist für die eher lineare Abhängigkeit des CARS-Signals im Fall sehr geringer Analytkonzentrationen bzw. schwacher Raman-Banden verantwortlich. Weiterhin sorgt der Beitrag dieses Terms für eine Rotverschiebung des Maximums einer CARS-Bande gegenüber der korrespondierenden Raman-Bande. Im direkten Vergleich mit Raman-Spektren erweisen sich CARS-Spektren daher deutlich komplexer in ihrem Aufbau und der Interpretation. Ein direkter Vergleich zwischen CARS- und Raman-Spektren ist meist nur schwer möglich.

Eine besondere Herausforderung stellt der zuvor bereits erwähnte nicht-resonante Untergrund dar. Diese Begleiterscheinung wirkt sich durch Interferenz mit dem CARS-Signal negativ auf das Signal-zu-Rausch-Verhältnis aus und kann insbesondere im Fall von Einzelband-CARS-Mikroskopie nicht-vorhandene CARS-Signale vortäuschen. Die Unterdrückung des nicht-resonanten Untergrundes ist aktuell Gegenstand intensiver Forschung. Die bislang vorgeschlagenen Ansätze umfassen Methoden, wie beispielsweise interferometrische [19] bzw. polarisations-sensitive Detektion [20], EPI-CARS (Detektion in rückwärtiger Richtung) [21] oder Frequenz-Modulation [22]. Ein allgemeingültiger Ansatz zu Unterdrückung des nicht-resonanten Untergrundes existiert bislang jedoch nicht.

Die in der Literatur beschriebenen technischen Konzepte zur Realisierung eines CARS-Mikroskops lassen sich trotz ihrer Vielfalt grob in zwei Kategorien einteilen:

- **Einzelband-CARS:** Viele in der Literatur bereits beschriebene Konzepte gehören in die Kategorie des Einzelband-CARS. Pump- und Stokes-Strahl werden hier gewöhnlich durch zwei

separate Laser bzw. durch Frequenzkonversion eines gemeinsamen Pump-Lasers erzeugt. Die Bezeichnung als Einzelband-CARS leitet sich von dem Umstand ab, während einer Messung (technisch bedingt) nur eine einzelne Raman- bzw. CARS-Bande beobachten zu können. Das Konzept des Einzelband-CARS ist gegenüber der unten beschriebenen CARS-Mikrospektroskopie technisch weniger aufwändig und bietet die höheren Bildwiederholraten bis hinauf zum Echtzeit-Niveau [23]. Die Feinabstimmung der Differenzfrequenz auf eine Raman-Bande nimmt jedoch viel Zeit in Anspruch, sodass ein schneller Wechsel zwischen verschiedenen CARS-Signalen bzw. Raman-Banden kaum möglich ist. Typischerweise beschränkt sich der Einsatz von Einzelband-CARS daher auf einige wenige, sehr spezifische Raman-Banden mit hohem Streuquerschnitt, wie beispielsweise die  $\text{CH}_2$ -Streckschwingung, deren Intensitätsverteilung über die Probe hinweg gemessen wird [24].

- **CARS-Mikrospektroskopie:** Die CARS-Mikrospektroskopie verfolgt das Ziel, für jedes Pixel ein ausschnittweises oder sogar vollständiges CARS-Spektrum aufzunehmen. Die Differenzfrequenz aus Pump- und Stokes-Strahl muss somit in der Lage sein, eine Vielzahl an Raman-Moden anzuregen, was technisch sehr aufwändig ist. Hierzu wird überwiegend auf das Konzept des Breitband- bzw. Multiplex-CARS zurückgegriffen, in welchem ein spektral eher schmaler Pump-Puls mit einem spektral sehr breiten Stokes-Puls überlagert wird [25]. Für die Detektion wird das CARS-Signal zunächst an einem dispersiven Element bzw. in einem Spektrographen spektral aufgetrennt und anschließend von einem Zeilendetektor, beispielsweise einer CCD-Kamera registriert. Alternativ ist auch der Einsatz eines schnellen Ein-Kanal-Detektor, beispielsweise einer PMT denkbar. Die Anregung der einzelnen Raman-Moden erfolgt in diesem Fall sequentiell, indem beispielsweise der zeitliche Versatz zwischen einem kurzen Pump-Puls und einem stark gechirpten, langen Stokes-Puls variiert wird. Einen anderen Ansatz verfolgt die so genannte „spektrale Fokussierung“. Hier werden spektral sehr breite Pump- und Stokes-Pulse überlagert. Da beide Pulse zwar unterschiedliche Zentralwellenlängen, jedoch einen idealerweise identischen Chirp

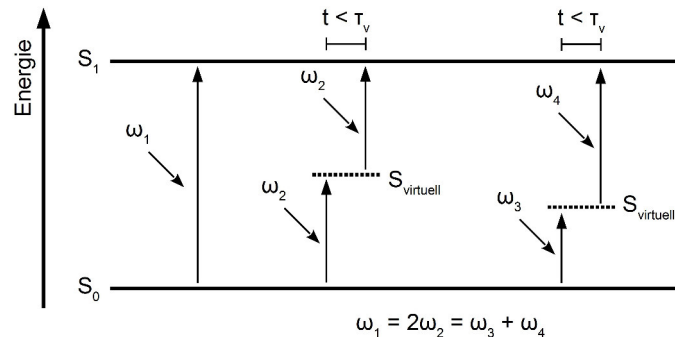
aufweisen, bleibt ihre instantane Differenzfrequenz während der gesamten Kreuzkorrelationsdauer konstant. Eine Veränderung der Differenzfrequenz ist dabei über eine Änderung des zeitlichen Versatzes beider Pulse relativ zueinander möglich [26].

### 2.2.7 2-Photonen-Absorption

Die 2-Photonen-Absorption (2PA) wird zu den nicht-linear optischen Prozessen dritter Ordnung gerechnet [27]. Sie bezeichnet die elektronische Anregung eines Moleküls bzw. Chromophors durch simultane Absorption zweier niederenergetischer Photonen, deren Energiegehalte separat betrachtet zu gering sind, um einen elektronischen Übergang induzieren, in Summe bzw. bei zeitgleicher Absorption dies jedoch vermögen. Die Möglichkeit einer 2PA wurde bereits 1931 von M. Göppert-Mayer theoretisch hergeleitet [28]. Der experimentelle Nachweis gelang jedoch erst 30 Jahre später durch W. Kaiser und C. G. B. Garret an einem Europium-dotierten Calciumfluorid-Kristall [29]. Mittlerweile hat die 2PA in der Mikroskopie als so genannte „2-Photonen-Mikroskopie“ (siehe auch Kapitel 2.4.3) große Bedeutung erlangt, was nicht zuletzt der höheren Eindringtiefe von NIR- gegenüber Vis-Strahlung zuzuschreiben ist.

Zum Verständnis des 2PA-Prozesses kann auf das Konzept der virtuellen Zustände zurückgegriffen werden, welches in Zusammenhang mit der Raman- und der Rayleigh-Streuung bereits in Kapitel 2.1.3 vorgestellt wurde. Virtuelle Zustände stellen keine tatsächlich existierenden (Eigen-)Zustände des Moleküls (oder Atoms) dar, sondern sind vielmehr das kurzlebige Produkt ( $\tau_v \approx 10^{-15} - 10^{-16} \text{ s}$ ) einer Wechselwirkung zwischen einem Molekül und dem einfallenden Photon. Kommt es während  $\tau_v$  zu einer zweiten Wechselwirkung zwischen einem Molekül im virtuellen Zustand und einem weiteren Photon, so kann unter bestimmten Bedingungen eine 2PA die Folge sein. Von dieser „echten“ 2PA zu unterscheiden ist die so genannte „sequenzielle 2PA“. Letztere beinhaltet zwar ebenfalls die Absorption zweier Photonen, stellt sich jedoch als konsequente 1-Photonen-Absorption (1PA) dar. Im Gegensatz zur „echten“ 2PA verläuft die sequenzielle 2PA über einen real existierenden,





**Abbildung 2.9:** Vergleichende Darstellung von 1PA (links), sowie „echter“ 2PA in den Varianten der degenerierten 2PA (mitte) und der 2-Farb-2PA (rechts) in der Variante  $\omega_3 < \omega_4$ . Auf die Darstellung der äquivalenten Zwei-Farb-2PA mit  $\omega_3 > \omega_4$  wurde hier verzichtet. Die sehr kurze Lebensdauer  $\tau_v$  des virtuellen Zustandes erfordert eine praktisch zeitgleiche Absorption beider Photonen.

(meta-)stabilen (Zwischen- bzw. Eigen-)Zustand mit endlicher Lebensdauer.

Ähnlich einer 1PA kann auch die 2PA nur unter der grundlegenden Bedingung stattfinden, dass die Summe der Energien beider Photonen mit dem energetischen Abstand zweier (realer) Zustände des Moleküles übereinstimmt (siehe auch Abbildung 2.9). Dabei spielt es zunächst keine Rolle, ob beide Photonen denselben Energiegehalt bzw. dieselbe Wellenlänge aufweisen (degenerierte 2PA) oder sich diesbezüglich unterscheiden (2-Farb-2PA). Die Auswahlregeln der 2PA weichen dabei von denen der 1PA (siehe auch Kapitel 2.1.2) ab. Insbesondere für zentrosymmetrische Moleküle gilt das Laporte-Verbot streng, hier jedoch gegensätzlich zur 1PA als Übergangsverbot zwischen Zuständen unterschiedlicher Parität. Mittels 2PA können somit in zentrosymmetrischen Molekülen praktisch ausschließlich Zustände populiert werden, welche über 1PA unzugänglich sind. In nicht-zentrosymmetrischen Molekülen gilt das Laporte-Verbot im Hinblick auf die 2PA jedoch nicht streng, sodass hier auch Laporte-verbotene Übergänge mittels 2PA angeregt werden können [30]. In welcher Intensität eine 2PA auftreten kann, hängt in diesem Fall in erster Linie von der Symmetrie des angestrebten Zustandes, sowie der Polarisation des zur Anregung verwendeten Strahlungsfeldes ab, welche die jeweils zutreffenden Komponenten des 2PA-Tensors festlegen [31].

Die Intensität der (degenerierten) 2PA lässt sich ähnlich dem für 1-Photonen-Übergänge formulierten Lambert-Beer-Gesetz (siehe Kapitel 2.1.1) quantifizieren:

$$\frac{dn_p}{dt} = \sigma_2(\omega) N \phi^2 \quad (2.50)$$

mit  $\frac{dn_p}{dt}$  als Anzahl der durch 2PA absorbierten Photonen der Frequenz  $\omega$  pro Zeiteinheit,  $N$  als Dichte der absorbierenden Moleküle,  $\phi = \frac{I}{\hbar\omega}$  als Photonenflussrate und  $\sigma_2$  als 2-Photonen-Absorptionsquerschnitt. Letzterer verknüpft die Intensität einer 2PA mit dem Suszeptibilitätstensor dritter Ordnung:

$$\sigma_2(\omega) = \frac{4\pi^2\hbar\omega^2}{n^2c_0^2} \text{Im} \chi^{(3)} \quad (2.51)$$

mit  $n$  als Brechungsindex. Üblicherweise wird der 2-Photonen-Absorptionsquerschnitt in der (Nicht-SI-)Einheit Göppert-Mayer angegeben, um unhandliche Zahlen zu vermeiden, wobei gilt:

$$[\sigma_2] = 1 \text{ GM} = \frac{10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s}}{\text{Photon Molekül}} \quad (2.52)$$

Verglichen mit der 1PA ist die 2PA ein sehr seltener Prozess. So absorbiert beispielsweise der Farbstoff Rhodamin-B bei hellem Sonnenlicht im Mittel etwa 1 Photon pro Sekunde und Molekül. Obwohl Rhodamin-B als ausgezeichneter Farbstoff für eine 2PA gilt, findet diese unter gleichen Bedingungen im Mittel nur etwa einmal alle 10 Millionen Jahre statt [32]. Die Seltenheit der 2PA ist dabei keineswegs als Nachteil aufzufassen, wie in Kapitel 2.4.3 weiter erläutert wird.

### 2.2.8 Optisch Parametrische Verstärkung

Die optisch parametrische Verstärkung (OPA) ist eine übliche Methode zur Frequenzkonversion von Laserpulsen. Ihr weitläufiger Einsatz ist auf die derzeitige Situation einer spektral nicht bzw. nur unzureichend veränderlichen Zentralwellenlänge aktueller Femtosekundenlaser zurückzuführen. Demgegenüber erfordern viele Experimente, beispielsweise die transiente Absorptionsspektroskopie einen spektral frei einstellbaren Laserpuls. Abhängig von der technischen Realisierung und dem eingesetzten, nicht-linear optischen Material, kann die Wellenlänge eines Laserpulses mithilfe der optisch

parametrischen Verstärkung nahezu beliebig im sichtbaren Spektralbereich, bis hinein in den nah-infraroten Spektralbereich eingestellt werden.

Das Prinzip der optisch parametrischen Verstärkung basiert auf nicht-linear optischen Prozessen zweiter Ordnung. Unter Vernichtung eines energiereichen Photons  $\omega_p$  (gewöhnlich nach der englischen Bezeichnung „Pump-Photon“ genannt) werden zwei neue Photonen geringerer Energie parametrisch erzeugt, analog einer umgekehrt ablaufenden Summenfrequenzerzeugung (siehe Kapitel 2.2.2).

$$\omega_p \rightarrow \omega_s + \omega_i \quad (2.53)$$

Konventionsgemäß wird das kurzwelligere der beiden erzeugten Photonen  $\omega_s$  nach seiner englischen Bezeichnungen „Signal-Photon“ genannt, das langwelligere  $\omega_i$  dagegen „Idler-Photon“.

Die Energieverteilung zwischen den paarweise erzeugten Signal- und Idler-Photonen wird ohne weitere Einflüsse zunächst rein vom Quantenrauschen bestimmt und trägt zum Auftreten eines „Parametrische Fluoreszenz“ genannten Phänomens bei. Durch zusätzliches Einstrahlen von Photonen einer bestimmten Wellenlänge (nach ihrer englischen Bezeichnung „Seed-Photonen“ genannt), kann der zuvor beschriebene Photonenzerfall gezielt zugunsten einer Verstärkung der Intensität der eingestrahlt Wellenlänge um mehrere Größenordnungen beeinflusst werden. Ein gechirpter Weißlichtpuls als Seed-Strahl ermöglicht dabei ein nahezu kontinuierliches Durchstimmen der Signal- bzw. Idler-Wellenlänge. Die Wahl der Wellenlänge geschieht hierbei durch Manipulation des zeitlichen Überlapps von Pump- und Seed-Strahl, sowie der Wahl eines, zur Phasenanpassung geeigneten Winkels des nicht-linearen Kristalls (siehe auch Kapitel 2.2.3).

Bezüglich der Einstrahlgeometrie von Pump- und Seed-Strahl werden zwei Fälle unterschieden. In der kollinearen Geometrie erreichen beide Strahlen das nicht-lineare Medium derselben Ausbreitungsrichtung folgend. Die so erzielte maximale Interaktionslänge beider Strahlen im nicht-linearen Medium maximiert die Effizienz der ablaufenden nicht-linear optischen Prozesse. Da sich Pump-

und Seed-Strahl jedoch mit unterschiedlicher Gruppengeschwindigkeit fortbewegen, kommt es zwangsläufig zu einer oftmals unerwünschten zeitlichen Verbreiterung der resultierenden Signal- bzw. Idler-Pulse. Dieses Problem wird mittels nicht-kollinearer Geometrie vermieden (auch als NOPA bekannt, von *engl. noncollinear optical parametric amplification*). Pump- und Seed-Strahl werden hierbei so eingestrahlt, dass unterschiedliche Ausbreitungsgeschwindigkeiten der beiden Strahlen durch jeweils angepasste Wegstrecken im nicht-linear optischen Medium gerade kompensiert werden. Dieser Vorteil wird jedoch auf Kosten der Effizienz der ablaufenden nicht-linear optischen Prozesse erkaufte. Da für die nicht-kollineare Geometrie die Wellenvektoren aller beteiligten Strahlen in jeweils unterschiedliche Richtungen zeigen, verkleinert sich das Interaktionsvolumen.

## 2.3 Ultrakurze Laserpulse

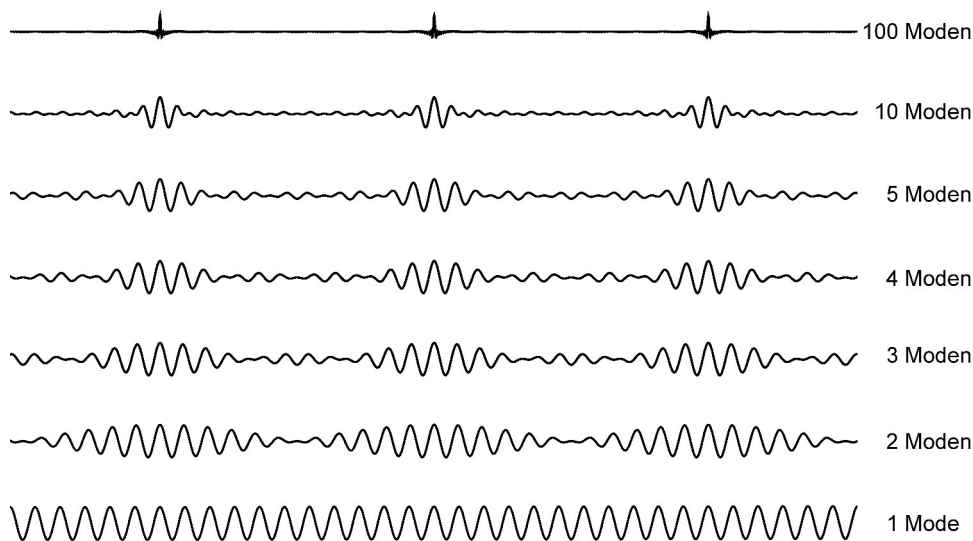
### 2.3.1 Einführung

Die Erzeugung ultrakurzer Laserpulse, wie sie beispielsweise in zeitaufgelösten Experimenten im Nanosekunden-Bereich benötigt werden, stellt in zweifacher Hinsicht eine besondere technische Herausforderung dar. Zum einen unterschreiten die gewünschten Pulsdauern mit nur wenigen Pico- oder sogar Femtosekunden deutlich die Reaktionszeit mechanischer und selbst die vieler elektronischer Bauteile, sodass alternative Lösungswege zur zeitaufgelösten Detektion erdacht werden müssen. Zum anderen können Ultrakurzpulslaser prinzipiell auch als Dauerstrich-Laser (oftmals auch als cw-Laser abgekürzt, von *engl. continuous-wave laser*) mit kontinuierlicher Emission betrieben werden, sodass im laufenden Betrieb stets ein mehr oder minder ausgeprägter Konkurrenzkampf zwischen beiden Betriebsarten (gepulst bzw. Dauerstrich) stattfindet, den es zu beherrschen gilt. Im Folgenden werden mit der Güteschaltung und der Modenkopplung zwei spezielle technische Maßnahmen zur Erzeugung ultrakurzer Laserpulse vorgestellt.

### 2.3.2 Güteschaltung

Für den Dauerstrich-Betrieb wird ein Resonator mit konstant hoher Güte bzw. niedrigen Verlusten benötigt. Im Gegensatz dazu benötigt der Puls-Betrieb lediglich zu bestimmten, meist periodisch wiederkehrenden Zeitpunkten einen Resonator hoher Güte, während die Güte zwischen zwei solcher Zeitpunkte problemlos niedrige Werte annehmen kann. Eine gezielte Manipulation der Resonatorgüte kann daher einen Pulsbetrieb des Laser erzwingen. Zu diesem Zweck werden Güteschalter (auch als „Q-Switch“ bezeichnet) eingesetzt. Sie setzen die Resonatorgüte zunächst so weit herab, dass ein Anschwingen des Laserprozesses generell unterdrückt wird. In dieser Zeit erreicht das laser-aktive Medium eine maximale Besetzungsinversion. Innerhalb eines sehr kurzen Zeitfensters erhöht der Güteschalter schlagartig die Resonatorgüte, sodass der Laserprozess kurzzeitig anschwingt und die gesamte, im laser-aktiven Medium gespeicherte Energie zur Verstärkung eines kurzen Pulses dient. Anschließend regelt der Güteschalter die Resonatorgüte wieder auf ein niedriges Niveau herunter, um einen sonst ablaufenden Dauerstrich-Betrieb zu unterdrücken und das laser-aktive Medium erneut maximal aufzuladen. Auf diese Weise lassen sich intensive Laserpulse mit Pulsdauern im Nanosekunden-Bereich realisieren. Die technische Umsetzung des Güteschalters kann dabei sowohl als aktives, wie auch als passives Bauteil geschehen.

Aktive Güteschalter werden meist in Form elektro-optischer Bauelemente realisiert, welche auf Befehl innerhalb kürzester Zeit ihre Transparenz verändern (z.B. Pockelszellen in Kombination mit Polarisatoren) oder Licht aus dem Resonator herausleiten (z.B. akustooptische Modulatoren [33]) können. Passive Güteschalter werden gewöhnlich durch sorgfältig erstellte, im Resonator platzierte Lösungen spezieller Farbstoffe realisiert [34]. Das Absorptionsmaximum dieser Farbstoffe liegt typischerweise nahe der Zentralwellenlänge der Laseremission. Als so genannte „sättigbare Absorber“ unterdrücken sie den Dauerstrich-Betrieb durch Absorption der kontinuierlichen auftretenden spontanen Emission des laser-aktiven Medium, werden jedoch kurzzeitig nahezu transparent, sobald die Lichtintensität (z.B. infolge eines Laserpulses) einen bestimmten Schwellenwert überschreitet.



**Abbildung 2.10:** Intensitätsnormierte Darstellung periodischer Pulszüge durch Addition einer bestimmten Anzahl an Oszillationen bzw. Moden mit leicht unterschiedlicher Frequenz und fester Phasenbeziehung, sowie gleicher Amplitude.

### 2.3.3 Modenkopplung

Der Begriff Modenkopplung wird mitunter sehr umfassend verwendet und beinhaltet eine Vielzahl Techniken (einschließlich der in Kapitel 2.3.2 vorgestellten Güteschaltung) zur Erzeugung ultrakurzer Laserpulse. In seiner ursprünglichen Bedeutung bezeichnet „Modenkopplung“ jedoch das Herbeiführen einer festen Phasenbeziehung zwischen den Lasermoden bzw. den Linien im Emissionsspektrum des Lasers, was durch Interferenz zur Ausbildung von Laserpulsen führt. Die erzielbare Pulsdauer hängt dabei wesentlich von der Anzahl der beteiligten Lasermoden ab, wie aus Abbildung 2.10 ersichtlich ist. Analog der Heisenbergschen Unschärferelation formuliert das Zeit-Bandbreite-Produkt einen Zusammenhang zwischen der Pulsdauer  $\Delta t$  und der spektralen Breite der Laseremission im Frequenzraum  $\Delta f$ :

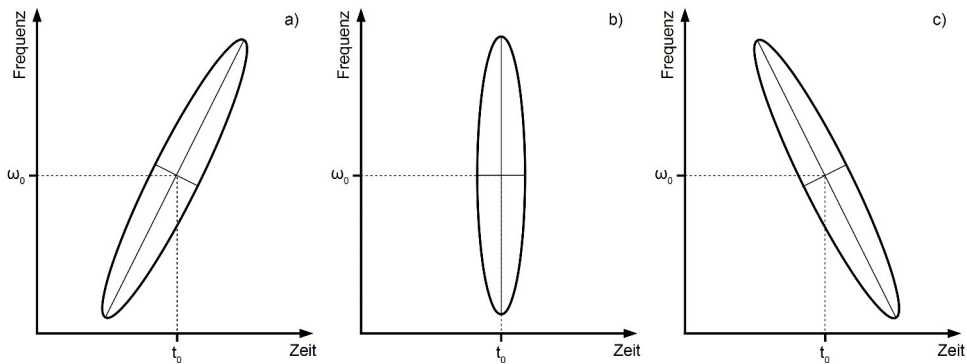
$$\Delta t \cdot \Delta f \geq k \quad (2.54)$$

Die Größe  $k$  ist eine Konstante und hängt von der Intensitätsverteilung der Laseremission über den Frequenzraum ab. Für eine gaußförmige Verteilung ist  $k \approx 0,44$ , während für die sehr ähnliche sech<sup>2</sup>-Verteilung  $k \approx 0,315$  gilt. Wie sich Gleichung 2.54 entnehmen lässt, bedingt ein zeitlich sehr kurzer Puls ( $\Delta t \rightarrow 0$ ) eine spektral sehr breitbandige Emission des Lasers. Als laser-aktives Medium werden daher Materialien mit spektral besonders breitbandiger Fluoreszenz verwendet, z.B. Titan-dotierter Saphir (Ti:Sa). Weiterhin muss die Bauform des Resonators ein Anschwingen möglichst vieler Lasermoden zulassen, um die geforderte Unschärfe  $\Delta f$  zu erzielen. Über den Zusammenhang

$$n_{\text{Moden}} = \Delta f \frac{2L}{c_0} \quad (2.55)$$

lässt sich die Anzahl anschwingender Moden  $n_{\text{Moden}}$  abschätzen. Es wird deutlich, dass  $n_{\text{Moden}}$  proportional zur Länge des Resonators  $L$  skaliert. Ultrakurzpulslaser verfügen mit 1-2 m gewöhnlich über einen sehr langen Resonator, welcher in Kombination mit der breitbandigen Fluoreszenz des laser-aktiven Mediums das Anschwingen vieler Tausend Moden zulässt. Umgekehrt können schmalbandige Laser, beispielsweise für die Raman-Spektroskopie über einen sehr kleinen Resonator realisiert werden, welcher im Idealfall lediglich einer einzelnen Mode das Anschwingen erlaubt.

Analog zur Güteschaltung (siehe Kapitel 2.3.2) stehen auch bei der Modenkopplung aktive und passive Verfahren zur Ausbildung einer festen Phasenbeziehung der Lasermoden zur Verfügung. Aktive Verfahren beruhen meist auf Güteschaltern, deren Betrieb mit der Umlaufzeit der Pulse im Resonator exakt synchronisiert ist – ein phasenungleiches Anschwingen von Lasermoden wird dadurch unterdrückt. Passive Verfahren nutzen sättigbare Absorber oder, wie im Fall des Ti:Sa-Lasers den Kerr-Linsen-Effekt (siehe auch Kapitel 2.2.4). Beide Verfahren basieren letztlich auf dem Prinzip, die Intensitätsverluste im Resonator (bis zu einem gewissen Grad) antiproportional zur Intensität des Lasers skalieren zu lassen. Kurze und daher intensive Laserpulse erfahren im Resonator deshalb deutlich geringere Verluste als die vergleichsweise schwache cw-Strahlung.



**Abbildung 2.11:** Darstellung des gleichen Laserpulses in der Frequenz-Zeit-Domäne, jeweils mit Rot-Chirp (a) bzw. Blau-Chirp (c), sowie Fourier-limitiert (b).

### 2.3.4 Gruppengeschwindigkeitsdispersion und Chirp

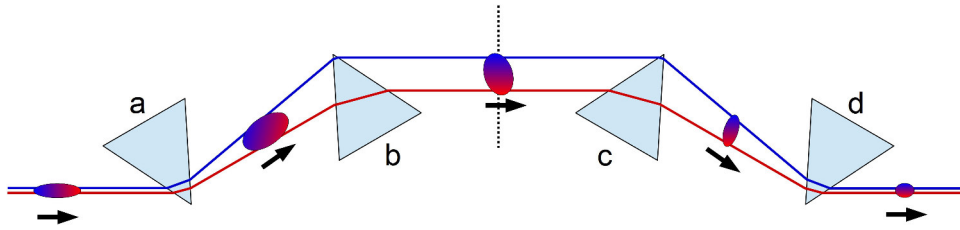
Laserpulse tendieren aufgrund der Gruppengeschwindigkeitsdispersion zur zeitlichen Verbreiterung. Ursächlich für dieses Phänomen ist die wellenlängenabhängige Ausbreitungsgeschwindigkeit von elektromagnetischer Strahlung in Materie  $c_M(\lambda)$ . Der Brechungsindex  $n(\lambda)$ , welcher das Verhältnis der Vakuumlichtgeschwindigkeit  $c_0$  zur Ausbreitungsgeschwindigkeit des Lichts in einem Medium  $c_M$  angibt, ist daher ebenfalls wellenlängenabhängig:

$$n(\lambda) = \frac{c_0}{c_M(\lambda)} \quad (2.56)$$

In den meisten Fällen liegt „normale Dispersion“ ( $(\frac{\partial n}{\partial \lambda}) < 0$ ) vor, sodass Strahlung langer Wellenlängen schneller durch das Medium propagiert, als solche kurzer Wellenlänge. Nur in Ausnahmefällen (beispielsweise in der Nähe starker Absorption) kann auch „anomale Dispersion“ ( $(\frac{\partial n}{\partial \lambda}) > 0$ ) auftreten, infolge derer Strahlung kurzer Wellenlängen schneller durch das Medium propagiert, als solche langer Wellenlänge.

Beide Dispersionsarten führen für sich genommen letztlich zu einer zeitlichen Verbreiterung des Laserpulses, da die (bildlich gesprochen) auf gleicher Höhe gestartete Gruppe verschiedener Wellenlängen (entsprechend einem fourier-limitierten Laserpuls) mit zunehmender Wegstrecke immer weiter auseinanderläuft. Der räumliche bzw. zeitliche Versatz der einzelnen Wellenlängen eines Pulses wird dabei auch als „Chirp“ bezeichnet. Wie in Abbildung 2.11 dargestellt, wird je nach Versatz zwischen einem Rot-Chirp (lange Wellenlängen





**Abbildung 2.12:** Darstellung eines Prismenkompressors. Die Prismen a und d dienen der Erzeugung bzw. Kompensation einer Separation einzelner Frequenzkomponenten des Laserpulses lateral zu dessen Ausbreitungsrichtung (räumlicher Chirp). Die Prismen b und c kompensieren den zeitlichen Chirp des Laserpulses, indem dessen niederfrequente Anteile (lange Wellenlänge) einen längeren Weg durch das Prismenmaterial zurücklegen müssen, als dessen hochfrequente Anteile. Anstelle eines symmetrischen Aufbaus kann an der gestrichelten Linie auch ein Spiegel eingefügt werden. Der rückläufige Strahl wird dann hinter Prisma a mit leichtem Höhenversatz ausgekoppelt.

bzw. niedrige Frequenzen laufen den kurzen Wellenlängen bzw. hohen Frequenzen voraus, daher auch Up-Chirp genannt) und einem Blau-Chirp (kurze Wellenlängen bzw. hohe Frequenzen laufen den langen Wellenlängen bzw. niedrigen Frequenzen voraus, daher auch Down-Chirp genannt) unterschieden.

Mithilfe so genannter Pulskompressoren kann der Chirp eines Laserpulses gezielt beeinflusst werden. Falls gewünscht, kann der Chirp eines Laserpulses mithilfe eines Pulskompressors sogar überkompensiert werden, sodass der herbeigeführte Blau-Chirp die bis zum Zielpunkt bzw. dem Probenort auftretende Gruppengeschwindigkeitsdispersion kompensiert. In vielen Fällen kommen Prismenkompressoren zum Einsatz, deren Funktion in Abbildung 2.12 skizziert ist. Trotz einer, absolut betrachtet kürzeren Weglänge der langwelligeren Anteile des Laserpulses durch den Prismenkompressor, benötigen diese zur Passage desselben mehr Zeit, da ihr Transmissionsweg durch die Prismen deutlich länger ausfällt, verglichen mit den kurzwelligeren Anteilen des Laserpulses. Ein prinzipiell ähnlicher Aufbau kann auch mittels Beugungsgittern realisiert werden, wobei die komprimierende Wirkung in diesem Fall auf einer absolut längeren Weglänge der langwelligeren Komponenten des Laserpulses gegenüber den kurzwelligeren Anteilen beruht. Gitterkompressoren

weisen typischerweise eine höhere Zerstörschwelle als Prismenkompressoren auf. Letztere dagegen zeichnen sich vor allem durch geringe Intensitätsverluste aus. In besonderen Fällen, beispielsweise bei besonders hohen Anforderungen an die Kompaktheit des Aufbaus, wird mitunter auf so genannte „gechirpte Spiegel“ zurückgegriffen. Diese sehr kostspieligen Optikkomponenten beeinflussen den Chirp des an ihnen reflektierten Laserpulses durch eine wellenlängenabhängige Eindringtiefe für Licht in die aufgebrauchte dielektrische Schicht.

### 2.3.5 Verstärkung gechirpter Laserpulse

Die von einem Ultrakurzpulslaser direkt emittierten Laserpulse weisen einen vergleichsweise geringen Energiegehalt von meist nur wenigen Nanojoule pro Laserpuls auf. Dies ist einerseits dadurch begründet, dass generell nur etwa 1% der im Resonator befindlichen Intensität als nutzbare Laserstrahlung ausgekoppelt wird, um einen stabilen Betrieb des Laser zu ermöglichen. Andererseits limitiert die Zerstörschwelle der im Resonator verbauten Materialien die Spitzenintensität der erzeugten (fourier-limitierten) Laserpulse.

Oftmals findet daher ein nachgeschalteter, als „Verstärkung gechirpter Pulse“ (von *engl. chirped pulse amplification, CPA*) bezeichneter Prozess Anwendung [35]. Die noch unverstärkten, fourier-limitierten Laserpulse werden zunächst gechirpt (siehe dazu Kapitel 2.3.4), wodurch ihre Spitzenintensität stark abnimmt. Anschließend erfolgt die Verstärkung dieser Laserpulse in einen zweiten Resonator nach bekanntem Laser-Prinzip. Obwohl der Energiegehalt der Laserpulse dabei teilweise um sechs Größenordnungen und mehr anwächst, wird die Zerstörschwelle des Resonators nicht überschritten, da die Spitzenintensitäten der Laserpulse aufgrund des Chirps vergleichsweise gering ausfallen. In einem nachfolgenden Gitterkompressor wird der verstärkte Laserpuls zeitlich wieder komprimiert und steht als intensiver, fourier-limitierter Laserpuls für das Experiment zur Verfügung.

## 2.4 Mikroskopie

### 2.4.1 Einführung

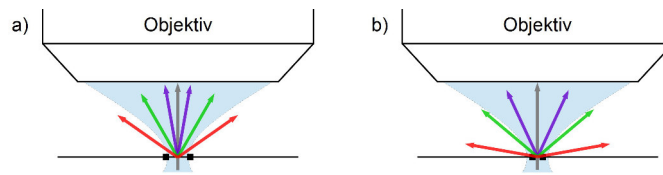
Abgeleitet von den griechischen Wörtern für „klein“ (*griech. mikrós*) und „betrachten“ (*griech. skopeín*) umfasst der Begriff Mikroskopie ein breites Spektrum verschiedenster Techniken, um kleinste, mit dem Auge nicht auflösbare Strukturen zu vergrößern und somit für den Betrachter sichtbar zu machen. Das Prinzip der Vergrößerung durch linsenförmige Optiken ist zwar bereits seit dem Altertum bekannt, doch beachtliche Fortschritte auf diesem Gebiet wurden erst ab dem späten 16. Jahrhundert erzielt. Als Erfinder des mehr-komponentigen Mikroskops, wie es heute gebräuchlich ist, gelten dabei die niederländischen Brillenschleifer Hans und Zacharias Janssen. Auch Christian Huygens und Antoni van Leeuwenhoek seien an dieser Stelle erwähnt, deren Erkenntnisse zur Minimierung chromatischer Aberration bzw. Bearbeitung von Linsen maßgeblich zur Entwicklung dieser Technologie beigetragen haben. Mittlerweile umfasst die Mikroskopie nicht mehr nur die optische Komponente. Rasterkraft- und Elektronen-Mikroskope unterbieten das Auflösungsvermögen von Lichtmikroskopen und erlauben sogar die Beobachtung einzelner Moleküle und Atome. In vielen Bereichen der Forschung haben sich Mikroskope bereits als unverzichtbare Werkzeuge fest etabliert.

### 2.4.2 Auflösung

Eines der wesentlichen Charakteristika eines Mikroskops ist dessen Auflösungsvermögen bzw. Fähigkeit, kleinste Strukturunterschiede sichtbar zu machen. In diesem Zusammenhang wird gewöhnlich auf das, nach seinem Entdecker benannte Abbe-Limit verwiesen:

$$d = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin(\alpha)} = \frac{\lambda}{2NA} \quad (2.57)$$

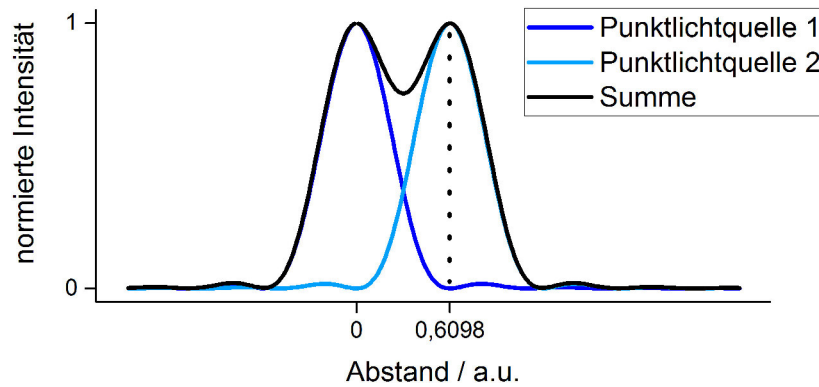
In dieser bekanntesten Formulierung gilt es für den Fall einer konischen Beleuchtung der Probe mithilfe eines Kondensors, dessen Numerische Apertur (NA) (annähernd) gleich der des Objektivs ist, wie es auf höherwertige Mikroskope gewöhnlich auch zutrifft. Die Auflösung  $d$  eines Lichtmikroskops wird somit wesentlich von der Wellenlänge  $\lambda$  des zur Beleuchtung der Probe eingesetzten Lichtes



**Abbildung 2.13:** a) Zur Auflösung einer Struktur muss das Objektiv mindestens die 1. Beugungsordnung erfassen. Im skizzierten Fall gelingt dies für die lange Wellenlänge (rot) nicht mehr, da langwelliges Licht stärker gebeugt wird, als kurzwelliges. b) Mit abnehmender Strukturgröße steigt der Beugungswinkel. Die höchste Auflösung wird daher nur mit kurzwelligem Licht (blau) erreicht.

bestimmt, sowie vom Akzeptanzwinkel  $\alpha$  des Objektivs. Zusätzlich hat auch der Brechungsindex  $n$  des Mediums zwischen Probe und Objektiv einen Einfluss. Medien mit höherem Brechungsindex, wie sie in der Immersionsmikroskopie eingesetzt werden, erhöhen durch Lichtbrechung effektiv die Fähigkeit des Objektivs Licht zu sammeln und verbessern somit die Auflösung.

Das Abbe-Limit selbst beruht auf der Beobachtung, dass an den mikroskopisch kleinen Strukturen einer Probe Beugungseffekte auftreten, analog der Lichtbeugung an Spalten und Gittern. In Abbildung 2.13 sind die beteiligten Effekte zusammengefasst dargestellt. Da die Strukturinformationen der Probe lediglich in den höheren Beugungsordnungen kodiert sind, nicht jedoch in der transmittierten 0. Ordnung (analog der Röntgenbeugung an Kristallen – siehe auch 2.1.1), kann die Struktur nur aufgelöst werden, wenn das Objektiv mindestens die 1. Beugungsordnung erfasst. Der Abstand  $d$  zweier Strukturmerkmale, sowie die Wellenlänge  $\lambda$  des zur Beleuchtung eingesetzten Lichtes bestimmen dabei maßgeblich, unter welchem Winkel die höheren Beugungsordnungen relativ zur 0. Beugungsordnungen abgestrahlt werden. Grundsätzlich fällt dieser Beugungswinkel genannte Größe umso höher aus, je näher sich beide Strukturmerkmale zueinander befinden und je höher die Wellenlänge des zur Beleuchtung eingesetzten Lichtes ist. Überschreitet der Beugungswinkel den technisch bedingten Akzeptanzwinkel  $\alpha$  des Objektivs, so werden die höheren Beugungsordnungen nicht mehr erfasst und die zugehörigen Strukturmerkmale können nicht aufgelöst werden.



**Abbildung 2.14:** Darstellung des Intensitätsverlaufs bzw. Beugungsmusters zweier Punktlichtquellen, deren Abstand gemäß dem Rayleigh-Kriterium gerade noch ihre optische Auflösung erlaubt.

Die Gültigkeit des Abbe-Limits ist auf beleuchtete Strukturen begrenzt. Selbstleuchtende Strukturen, beispielsweise Fluorophore unterliegen anderen Gesetzmäßigkeiten, wobei in diesem Zusammenhang oftmals auf das Rayleigh-Kriterium verwiesen wird:

$$d = 0,6098 \frac{\lambda}{NA} \approx \frac{1,22}{2} \frac{\lambda}{NA} \quad (2.58)$$

Es beruht auf der Beobachtung, dass begrenzende Faktoren, wie beispielsweise die endliche Aperturgröße eines Objektivs Beugungseffekte zur Folge haben. Punktlichtquellen werden daher nicht als leuchtende Punkte detektiert, sondern als Beugungsmuster, deren Erscheinungsbild mithilfe der so genannten Punktspreizfunktion beschrieben wird, welche sich im einfachsten Fall mathematisch mit einer Besselfunktion erster Art nachbilden lässt. Gemäß dem Rayleigh-Kriterium lassen sich zwei Punktlichtquellen gerade noch unterscheiden, wenn die Position des globalen Intensitätsmaximums des Beugungsbildes der einen Punktlichtquelle mit der Position des 1. Beugungsminimums im Beugungsbild der zweiten Punktlichtquelle zusammenfällt, wie dies in Abbildung 2.14 skizziert ist. Dies führt zum mathematischen Ausdruck in Formel 2.58.

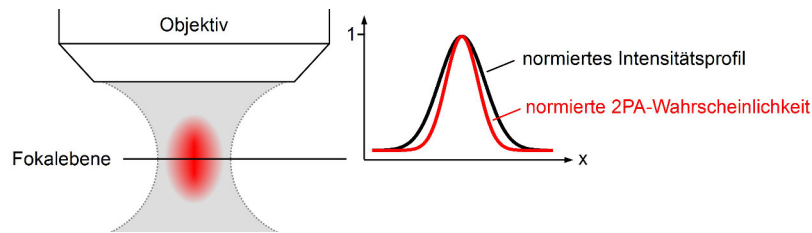
Im Gegensatz zum Abbe-Limit definiert das Rayleigh-Kriterium jedoch keine feste physikalische Grenze, sondern ist lediglich eine Konvention. Geübte Beobachter und hochentwickelte Bildverarbeitungssoftware können durchaus in der Lage sein, Strukturen auch unterhalb des Rayleigh-Kriteriums noch zu unterscheiden. Gerade auf dem Gebiet selbstleuchtender Proben kann die Auflösung durch

geschickte Führung des Experimentes sehr vorteilhaft beeinflusst werden. In diesem Zusammenhang sei beispielhaft die 1994 vorgestellte STED-Technik (von *engl. stimulated emission depletion*) [36, 37] erwähnt. Sie beruht auf einer starken Verkleinerung des effektive Anregungsvolumens für Fluorophore, durch gezielte Fluoreszenzunterdrückung in den Randbereichen. Dass die STED-Technik das Abbe-Limit nicht unterschreitet, wie oftmals fälschlich behauptet wird, ist dieser eindrucksvollen Methoden keineswegs abträglich. Während die (laterale) Auflösung von Lichtmikroskopen selbst unter optimalen Bedingungen die Marke von 200 nm nur schwer zu unterbieten vermag, konnte mit STED-Mikroskopen bereits eine Auflösung von  $<3$  nm demonstriert werden [38].

### 2.4.3 Multiphotonen-Mikroskopie

Die Multiphotonen-Mikroskopie ist ein Teilbereich der optischen Mikroskopie, der sich die in Kapitel 2.2 vorgestellten nicht-linear optischen Effekte zur Bildgebung zu Nutze macht. Dabei sind die Frequenzverdopplung (siehe Kapitel 2.2.2) und die 2-Photonen-Fluoreszenz (siehe Kapitel 2.2.7) die mit Abstand am häufigsten eingesetzten Verfahren. Die technischen Voraussetzungen sind für beide Verfahren nahezu gleich, sodass Multiphotonen-Mikroskope nicht selten beide Techniken beherrschen und teilweise auch synchron anwenden können. Andere nicht-linear optische Effekte, wie beispielsweise die Differenzfrequenzerzeugung und Frequenzverdreifung, sowie CARS (siehe Kapitel 2.2.6) finden ebenso Anwendung, wenn auch deutlich seltener.

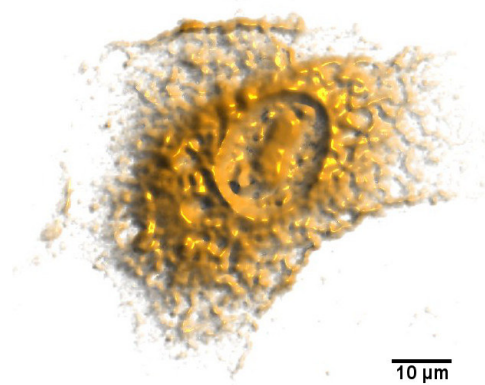
Wie gegen Ende von Kapitel 2.2.7 bereits angedeutet wurde, sind Multiphotonen-Prozesse unter Alltagsbedingungen extrem seltene Ereignisse – die Wahrscheinlichkeit für eine Drei-Photonen-Absorption beispielsweise ist, unter normalen Lichtverhältnissen nahezu Null, sodass sie in endlicher Zeit praktisch nicht beobachtbar ist [32]. Um die Wahrscheinlichkeit für einen Mehr-Photonen-Prozess auf einen praxis-relevanten Wert zu erhöhen, werden daher typischerweise Nahinfrarot-Femtosekunden-Laser eingesetzt, welche Lichtpulse mit hoher Photonendichte erzeugen können. Für



**Abbildung 2.15:** Das Intensitätsprofil eines Femtosekunden-Lasers entspricht typischerweise einer Gauss- bzw.  $\text{sech}^2$ -Verteilung und die Wahrscheinlichkeit einer 2PA skaliert mit dem Quadrat dieser Verteilung.

die Multiphotonen-Mikroskopie wäre der Einsatz eines Weitfeld-Belichtungskonzepts zwar denkbar, würde sich jedoch aufgrund der geringen Photonenflussdichte gegenüber einem Raster-Scan-Verfahren als ineffizient erweisen. Als Grund hierfür ist die exponentielle Abhängigkeit der Wahrscheinlichkeit eines Multiphotonen-Prozesses von der Intensität des Anregungslichtes zu nennen, wobei die Anzahl der am Multiphotonen-Prozess beteiligten Photonen direkt in die Potenz der Abhängigkeit mit eingeht. Analog einem Laser-Scan-Mikroskop wird der Fokus des Laserstrahls daher mithilfe elektronisch beweglicher Spiegel über die Probe geführt und diese so Punkt für Punkt abgerastert. Die hohen Repetitionsrate des Lasers (typischerweise 80-100 MHz) stellt dabei sicher, dass auch bei nur sehr kurzen Belichtungszeiten ( $< 0,1$  ms / Pixel) eine genügend hohe Zahl an Laserpulsen pro Bildpunkt eingestrahlt wird. Die Detektion der Signalphotonen erfolgt gewöhnlich in rückwärtiger Richtung zum Anregungslicht durch dasselbe Objektiv. Ein dichroitischer Strahlteiler koppelt das generierte Signal aus dem Laserstrahlengang aus und leitet es zu einem hochsensitiven Detektor – gewöhnlich eine APD oder PMT. Erst nach erfolgter Signalverarbeitung in einem Computer entsteht so ein fertiges Bild. Die erreichbare Auflösung ist dabei trotz höherer Wellenlänge der Anregungsstrahlung mit der Konfokalmikroskopie im Vis-Bereich vergleichbar, da die Intensitätsabhängigkeit von Multiphotonen-Prozessen den effektiven Fokusradius unter das Abbe-Limit begrenzt (siehe auch Abbildung 2.15).

Die technische Umsetzung der Multiphotonen-Mikroskopie ist gegenüber linear optischen Mikroskopie-Verfahren nicht nur aufwändiger, sondern auch kostspieliger. Den Großteil der Investitionskosten stellt meist ein geeigneter Femtosekundenlaser dar, welcher



**Abbildung 2.16:** 3D-Rekonstruktion der GFP-Verteilung in einer GFP-markiertes Nukleoporin-43 exprimierenden U2OS-Zelle. Die Aufnahme der Einzelbilder erfolgte in ImSpector. Die Rekonstruktion der 3D-Struktur wurde in FIJI [39] durchgeführt. Zur Demonstration der intrinsischen Ortsauflösung der Multiphotonen-Mikroskopie wurde die obere Hälfte des 3D-Models entfernt, sodass der Blick ins Zellinnere freigegeben ist. ( $I_{\text{exc}} = 1 \text{ mW}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 800 \text{ nm}$ ,  $t_{\text{acq}} = 1 \text{ ms/pixel}$ ,  $512 \times 512 \text{ pixel}$ )

als Lichtquelle unverzichtbar ist. Dafür bietet die Multiphotonen-Mikroskopie gegenüber anderen Verfahren teils einzigartige Vorteile:

- **Höhere Eindringtiefe:** Das nah-infrarote Anregungslicht der Multiphotonen-Mikroskopie unterliegt einer weit geringeren Rayleigh-Streuung (etwa 5-10fach geringer), als beispielsweise sichtbares Licht und kann daher längere Strecken durch die Probe zurücklegen, ohne zu sehr an Intensität zu verlieren. Das sonst übliche Tiefenlimit von etwa  $100 \mu\text{m}$  kann so unter optimalen Bedingungen auf nahezu 1 mm erweitert werden [40].
- **Intrinsische räumliche Auflösung:** Die Photonenflussdichte erreicht in der Multiphotonen-Mikroskopie nur in einem kleinen Fokalvolumen von wenigen Femtolitern ein Niveau, welches das Auftreten nicht-linear optischer Effekte effektiv beobachtbar macht. Die Signalerzeugung wird so auf das Fokalvolumen begrenzt und verleiht der Methode eine intrinsische räumliche Auflösung, wie es in Abbildung 2.15 skizziert ist. Ein Beispiel für diese Eigenschaft ist in Abbildung 2.16 zu sehen. Eine Blende (*engl. pinhole*), wie sie in der Konfokalmikroskopie für die Tiefenschärfe essentiell ist, wird im Fall der Multiphotonen-Mikroskopie nicht benötigt. Die Detektion



kann so näher zur Probe durchgeführt werden, wodurch effektiv mehr Signal erfasst wird.

- **Verminderte Phototoxizität:** Die Absorbanz von Zell- und Gewebeproben weist im Wellenlängenbereich des NIR ein Minimum auf. Zusammen mit der intrinsischen Ortsauflösung (siehe oben) führt dies zu einer minimierten Phototoxizität, indem das Auftreten lichtinduzierter Prozesse auf den Fokus reduziert ist. Dies trifft auch auf das Bleichen von Fluorophoren zu. Ferner ermöglicht die Mehr-Photonen-Absorption eine Anregung elektronischer Übergänge im UV-Bereich mittels NIR-Anregungslicht.



# Kapitel 3

## Experimentelle Systeme für zeitaufgelöste Spektroskopie

### 3.1 Anreg-Abtast-Experiment

Das Anreg-Abtast-Experiment (*engl. pump-probe*) ist derzeit die Methode der Wahl, um ultraschnelle molekulare Prozesse zu untersuchen. Dazu wird die Probe zunächst mit einem kurzen Laserpuls angeregt und zeitverzögert mit einem Weißlichtpuls (siehe 2.2.5) ein Absorptionsspektrum der Probe aufgenommen. Durch Wiederholung dieses Vorgehens mit jeweils veränderten Verzögerungszeiten können so Dynamiken der Probe im Zeitbereich von  $\sim 100$  fs bis  $\sim 2$  ns mit einer Zeitauflösung von typischerweise  $\sim 100$  fs verfolgt werden.

Der verwendete Anreg-Abtast-Aufbau ist in Abbildung 3.1 schematisch skizziert. Intensive Femtosekunden-Laserpulse mit 775 nm Zentralwellenlänge und  $\sim 150$  fs Pulsdauer wurden mithilfe eines Festkörperlaser des Modells Clark MXR CPA2001 bzw. 2110 bei einer Repetitionsrate von 1 kHz erzeugt. An einem Strahlteiler erfolgte zunächst die Aufteilung in einen Anreg- und einen Abtast-Puls. Die Frequenzkonversion des Anreg-Pulses wurde mithilfe eines NOPA (siehe 2.2.8) durchgeführt und ein nachgeschalteter Prismenkompressor verbesserte die Zeitauflösung des Experiments auf typischerweise 90 fs. Zur Einstellung einer definierten Zeitverzögerung zwischen Anreg- und Abtast-Puls, wurde ersterer über eine variable Verzögerungsstrecke geleitet. Der Abtastpuls wurde zur Weißlichterzeugung (siehe auch 2.2.5) in ein Saphirkristallplättchen eingekoppelt, wodurch eine spektrale Verbreiterung auf  $\sim 450$ -700 nm

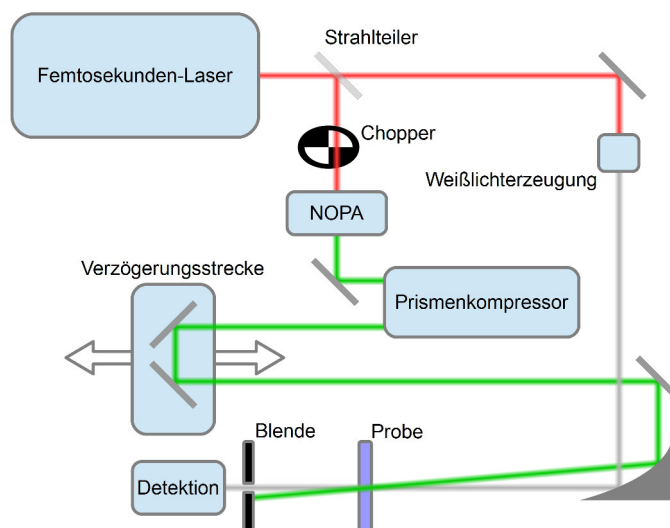


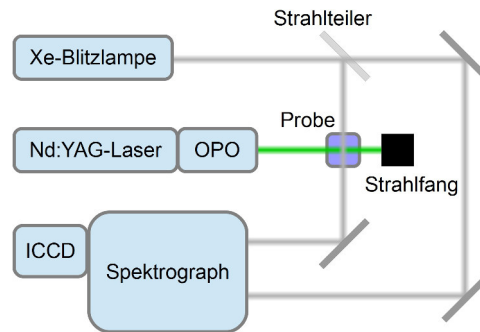
Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau des Anreg-Abtast-Experiments.

erreicht werden konnte. Die Foki von Anreg- und Abtast-Puls wurden anschließend mittels eines Off-Axis Parabolspiegels in der Probe zum Überlapp gebracht. Eine Blende hinderte den Anreg-Puls am Erreichen der Multikanal-Photodiode zur Detektion des Abtast-Pulses. Da die Repetitionsrate des Anreg-Pulses mit einem Chopper heruntergetaktet wurde, konnten in fester Sequenz jeweils Proben- und Referenzspektren gemessen werden.

## 3.2 Blitzlichtphotolyse

Die 1949 von Norrish und Porter eingeführte Blitzlichtphotolyse [41] ist nach wie vor eine der beliebtesten Methoden, Kinetiken im  $\mu\text{s}$ - bis  $\text{s}$ -Zeitbereich zu verfolgen. Das Messprinzip ist dabei dem Anreg-Abtast-Experiment vergleichbar – die Probe wird zunächst mit einem kurzen Laserpuls angeregt, um anschließend die induzierten Absorptionsänderungen zu verfolgen.

Aktuell sind zwei Formen der Blitzlichtphotolyse gebräuchlich, die sich hauptsächlich in der Art der Abfrage bzw. der Detektion unterscheiden. Die Detektion mittels einer Photodiode bietet in Kombination mit einem schnellem Speicheroszilloskops den Vorteil, dass mit jedem Messzyklus eine vollständige Transiente aufgenommen werden kann, was zunächst eine klare Zeitersparnis gegenüber breitbandiger Detektion darstellt. Anstatt eines Abtast-„Pulses“ kommt



**Abbildung 3.2:** Schematischer Aufbau des Blitzlichtphotolyse-Experiments.

hierbei eine kontinuierliche Belichtung der Probe zum Einsatz, sowie Monochromatoren zur spektralen Separierung des Signals. Gegenüber einer breitbandigen Detektion wirkt der Umstand beschränkend, dass die Detektion hier auf wenige Kanäle, meist sogar nur einen Kanal beschränkt ist.

Im Gegensatz zur zuvor beschriebenen Variante basiert die für diese Arbeit verwendete Blitzlichtphotolyse, wie sie auch in Abbildung 3.2 skizziert ist, auf einer breitbandigen Detektion mittels Spektrograph (SP2150, Acton) und einer ICCD-Kamera (PI-MAX 3, Princeton Instruments). Die als Sekundärelektronen-Vervielfacher wirkende Mikrokanalplatte der ICCD-Kamera kann dabei innerhalb weniger Nanosekunden aktiviert bzw. deaktiviert werden, woraus Aufnahmezeiten der ICCD-Kamera bis hinab zu  $\sim 100$  ns erreichbar sind. Anreg-Pulse werden von einem Nd:YAG-Laser (Spitlight 600, Innolas Laser GmbH) erzeugt und mittels eines OPO (preciScan, GWU-Lasertechnik) frequenz-konvertiert. Als Abfrage-Pulse dienen die Lichtblitze einer Xenon-Blitzlampe (L7685, Hamamatsu). Die Synchronisierung aller Bauteile wird von einem Pulsverzögerungsgenerator (9200 Sapphire, Quantum Composers) übernommen.

### 3.3 Datenauswertung - Globale Fitanalyse

Für die Auswertung der transienten Daten aus Anreg-Abtast- und Blitzlichtphotolyse-Experimenten wurde auf die Methode der Globalen Fitanalyse zurückgegriffen. Grundlage dieser Methode ist die Annahme einer hinreichend genauen Beschreibung der Probenkinetik mittels eines Ratenmodells. Es wird davon ausgegangen, dass die

Probe nach Photoanregung eine feste Sequenz unterscheidbarer Zustände durchläuft, wobei die Besetzungszahl jedes Zustands zeitabhängig ist. Dies ermöglicht eine Beschreibung der transienten Absorptionsänderung  $\Delta A$  über eine Summe von Exponentialfunktionen der Form:

$$\Delta A(t, \lambda_{pump}, \lambda_{probe}) = \sum_{i=1}^N a_i(\lambda_{probe}) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right). \quad (3.1)$$

Hierbei repräsentiert  $N$  eine endliche Anzahl an Komponenten zur Beschreibung der gemessenen, transienten Absorptionsänderung, wobei typischerweise weniger als sechs Komponenten für eine zufriedenstellende Beschreibung ausreichend sind. Ferner ist  $t$  die Zeit,  $\lambda_{pump}$  die Wellenlänge des Anreg-Pulses und  $\lambda_{probe}$  die Wellenlänge des Abtast-Pulses bzw. die Wellenlänge der Detektion, sowie  $\tau_i$  die  $i$ -te Zeitkonstante.

Die Instrumenten-Antwort-Funktion (*engl. instrument response function, IRF*) der eingesetzten Detektion wird durch Faltung des oben beschriebenen Modells mit der Fehlerfunktion  $erf(x)$  (*engl. error function*) in der Form

$$erf(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_{-\infty}^x \exp(-t^2) dt. \quad (3.2)$$

beschrieben. Die ermittelte Breite der IRF ermöglicht dabei Rückschlüsse auf die Zeitauflösung des Experimentes.

Das kohärente Artefakt, ein zum Zeit-Nullpunkt aus der Überlagerung von Anreg- und Abtast-Puls in der Probe resultierendes Signal, wird durch zusätzliche Gauss-Funktionen beschrieben.

Besondere Bedeutung kommt dem Gewichtungsfaktor  $a_i$  zu. Die graphische Auftragung des jeweiligen Gewichtungsfaktors gegen die Wellenlänge ergibt ein so genanntes zerfallsassoziertes Spektrum (DAS), welches Rückschlüsse darauf erlaubt, in welchem Umfang eine beobachtete Kinetik von der betreffenden Exponentialfunktion bzw. Zeitkonstante beschrieben wird. Ein DAS gehört somit zu den wichtigsten Hilfsmitteln für die Interpretation der Messwerte.

Alle in dieser Arbeit angeführten transienten Messungen wurden mit dem Programm Optimus ausgewertet [42].





# Kapitel 4

## Aufbau eines Multiphotonen-Mikroskops

### 4.1 Einführung

Das vorliegende Kapitel befasst sich mit dem Aufbau des Multiphotonen-Mikroskops, sowie aller zugehörigen Komponenten, wie beispielsweise der Laserlichtquelle. Eine Übersicht des gesamten experimentellen Aufbaus, inklusive Strahlführung ist in Abbildung 4.1 skizziert. Bis auf wenige Ausnahmen erfolgt die Strahlführung streng entlang der Lochreihen des optischen Tisches auf einer Standardhöhe von 14,5 cm. Der Aufbau folgt dabei grundsätzlich dem Prinzip, vor jeder optischen Komponente eine Lochblende zu platzieren. Dies erleichtert die Justage des Systems, indem von jeder optischen Komponente aus die Lochblende der jeweils folgenden Komponente angepeilt werden kann. Von einer Veränderung der platzierten Lochblenden sollte daher, wann immer möglich, abgesehen werden.

Der besseren Übersicht halber werden die einzelnen Bestandteile (z.B. Galvoscaner, Treiber, Teleskop und Scanlinse) im Folgenden nicht separat behandelt, sondern sinnhaft zu Modulen (z.B. Laserscan-Einheit) zusammengefasst. Neben einer allgemeinen Beschreibung der einzelnen Komponenten wird, soweit möglich, auch Anleitung zur Benutzung und Justage derselben gegeben, sowie auf typische Fehlerquellen und deren Beseitigung eingegangen, sofern diese Informationen nicht in Handbüchern verfügbar sind.

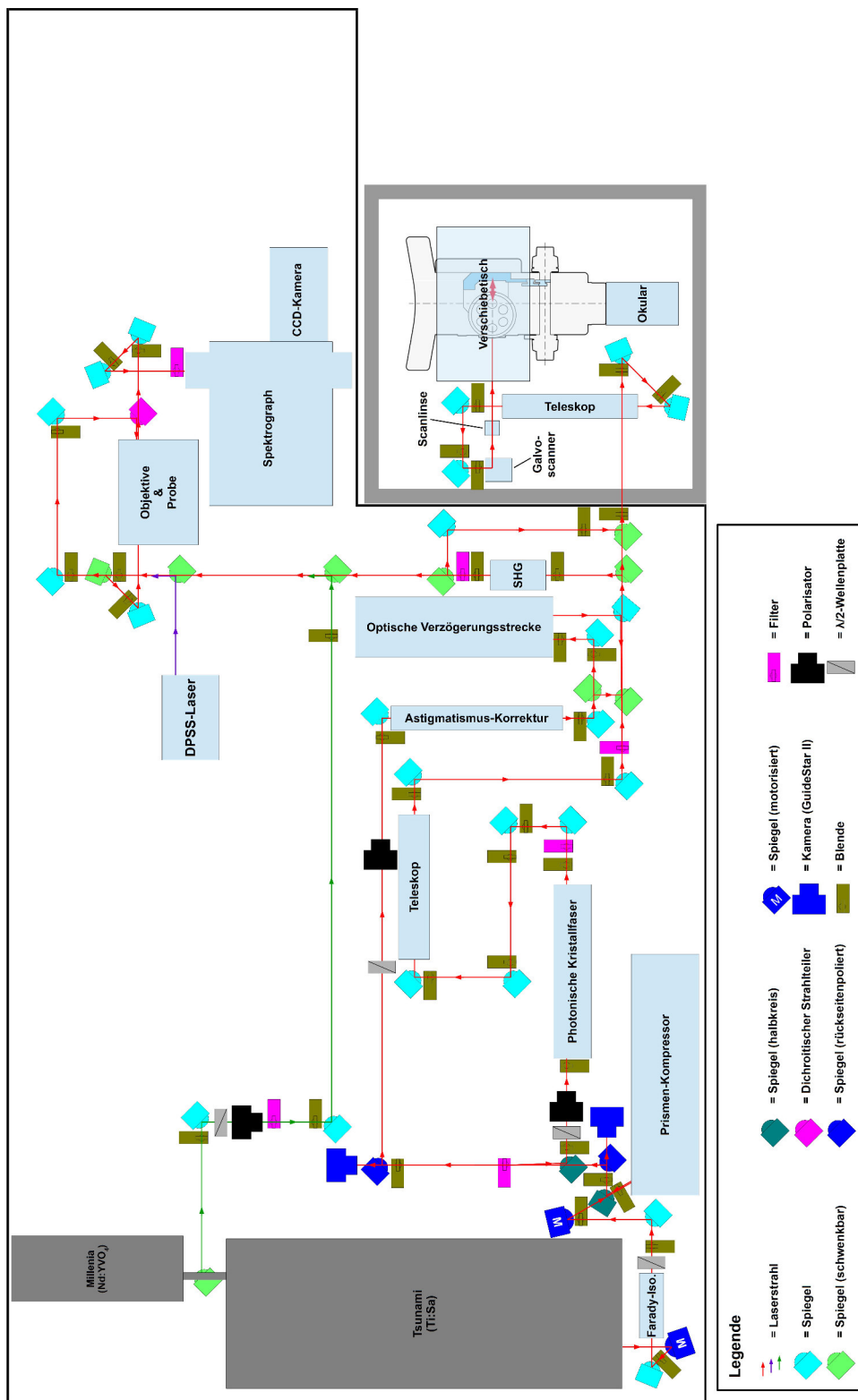


Abbildung 4.1: Skizze des experimentellen Aufbaus für Multiphotonen-Mikroskopie und -Spektroskopie.

## 4.2 Tsunami-Lasersystem

Die zentrale Strahlungsquelle des Multiphotonenmikroskops ist ein Tsunami-Lasersystem des Herstellers Spectra-Physics. Es besteht aus einer Kaskade von drei Hauptkomponenten: einem Diodenlaser, einem frequenzverdoppelten Nd:YVO<sub>4</sub>-Laser (Millenia Pro 15sJ), sowie einem Ti:Sa-Laser (Tsunami 3941C-15HP). Der luftgekühlte Diodenlaser befindet sich separat in einem 19-Zoll-Rack montiert. Seine Emissionsleistung von bis zu 80 W bei 809 nm dient dem optischen Pumpen des Nd:YVO<sub>4</sub>-Lasers und wird zu diesem Zweck über zwei fest verbaute Multimode-Glasfaserbündel direkt in dessen Resonator geleitet – eine benutzerseitige Justagemöglichkeit besteht nicht.

Der Nd:YVO<sub>4</sub>-Laser ist auf dem optischen Tisch (PTQ52514/NJ-S11, Thorlabs) fixiert und dient dem optischen Pumpen des Ti:Sa-Lasers. Aus Gründen der Sicherheit wird der Strahl des Nd:YVO<sub>4</sub>-Lasers in einer Röhre zum Ti:Sa-Laser geführt. Die eigentlich unsichtbare Emission des Nd:YVO<sub>4</sub>-Lasermediums wird intern an einem LBO-Kristall von 1064 nm auf 532 nm frequenzverdoppelt und erscheint daher intensiv grün. Die gewünschte bzw. aktuelle Emissionsleistung (532 nm) des Nd:YVO<sub>4</sub>-Lasers kann über die kabelgebundene Konsole eingestellt bzw. verfolgt werden. Nach Einstellen der Emissionsleistung sollten ~15 min zur Stabilisierung des Nd:YVO<sub>4</sub>-Lasers eingeplant werden.

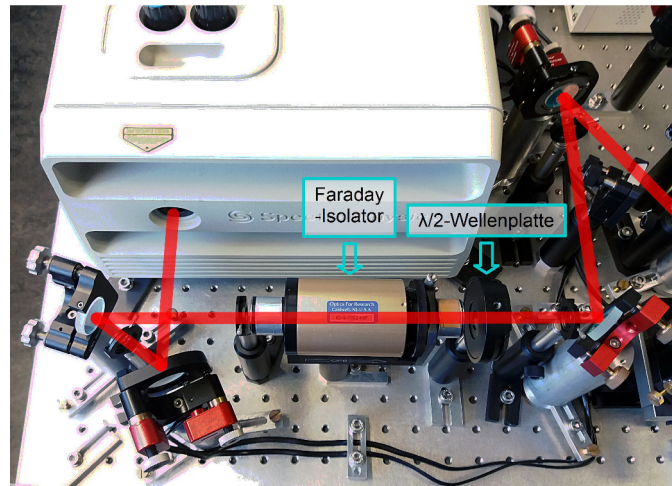
Der Ti:Sa-Laser ist direkt dem Nd:YVO<sub>4</sub>-Laser folgend montiert und wird von diesem optisch gepumpt. Die internen Optiken des Ti:Sa-Lasers sind für einen spektral breitbandigen Betrieb ausgelegt und erlauben ein Durchstimmen der Zentralwellenlänge zwischen ca. 700-1050 nm. Die Emission der Laserpulse erfolgt mit einer Repetitionsrate 80 MHz. Über einen internen Prismenkompressor kann die spektrale Bandbreite bzw. Pulsdauer zwischen ca. 40-100 fs angepasst werden. Zum Anklingen des Laser-Prozesses im Ti:Sa-Laser ist eine minimale Pumpleistung (Emissionsleistung des Nd:YVO<sub>4</sub>-Lasers) von ~6 W erforderlich. Ein stabiler Pulsbetrieb desselben bei 808 m Zentralwellenlänge erfordert typischerweise ~10 W Pumpleistung und resultiert in ~2,3 W Emissionsleistung, was auch für die aufwändige CARS-Mikroskopie ausreichend ist. Für einen stabilen

Pulsbetrieb des Ti:Sa-Lasers bei höheren Zentralwellenlängen sind teilweise höhere Pumpleistungen erforderlich. Die maximale Pumpleistung von 15 W resultiert in einer Emissionsleistung von  $\sim 3,5$  W bei 808 nm Zentralwellenlänge.

Nach Erreichen der gewünschten Pumpleistung sollte eine ca. 60-minütige Aufwärmphase eingeplant werden, innerhalb derer die Zentralwellenlänge und spektrale Pulsbreite eingestellt, sowie eine stabile Modenkopplung (Pulsbetrieb) hergestellt wird. Der Ti:Sa-Laser kann die Modenkopplung dabei grundsätzlich passiv erreichen (siehe auch 2.3.3). Es empfiehlt sich jedoch, über die Steuer elektronik (Model 3955) die regenerative Modenkopplung des Ti:Sa-Laser zu aktivieren. Sollte die Modenkopplung nicht spontan erreicht werden oder während der nachfolgend beschriebenen Arbeiten verloren gehen, so hat es sich bewährt, die spektrale Pulsbreite zunächst zu erhöhen, gegebenenfalls auch die Zentralwellenlänge blau zu verschieben. Hierzu stehen dem Benutzer zwei senkrecht aus dem Resonatorgehäuse ragende Mikrometerschrauben zur Verfügung. Die in Strahlrichtung mehr rechts positionierte Schraube erlaubt ein Verstellen der Zentralwellenlänge im Bereich von  $\sim 700$ - $1050$  nm, während die andere Schraube eine Anpassung der spektralen Pulsbreite ermöglicht. Für ein Schieben der Zentralwellenlänge sollten beide Schrauben zeitgleich und gleichsinnig betätigt werden, da es sonst zum Verlust der Modenkopplung kommen kann. Zum Einstellen der Pulsbreite, genügt es, die entsprechende Schraube zu bedienen und gegebenenfalls kleine Korrekturen der Zentralwellenlänge vorzunehmen. Das spektrale Emissionsprofil sollte dabei einer  $\text{sech}^2$ -Verteilung (vergleichbar einer Gauss-Verteilung) entsprechen. Einem mitunter auftretendem cw-Durchbruch – erkennbar an einer steil aus dem  $\text{sech}^2$ -Profil herausragenden Intensitätsspitze – kann durch Variation der Pumpleistung entgegengewirkt werden, wobei eine Verminderung derselben gewöhnlich zum Erfolg führt. Insbesondere am Anfang der Aufwärmphase kann es zum Driften der Zentralwellenlänge, sowie einer Änderung der spektralen bzw. temporalen Pulsbreite kommen. Alle Parameter sollten daher sowohl während der Aufwärmphase, wie auch unmittelbar vor dem Experiment kontrolliert und nötigenfalls angepasst werden.

Die typische Zentralwellenlänge für den CARS-Betrieb des Aufbaus beträgt 808 nm. Alle optischen Komponenten des Aufbaus, insbesondere der 808 nm-Laserlinienfilter und die Photonische Kristallfaser (siehe Kapitel 4.7) sind auf diese Wellenlänge abgestimmt. Der Multiphotonen-Fluoreszenz-Betrieb mag dagegen andere Zentralwellenlängen erfordern. Das Einjustieren einer abweichenden Zentralwellenlänge ist für gewöhnlich problemlos möglich, jedoch sollten folgende zwei Punkte beachtet werden: 1.) Die im Aufbau verwendeten dielektrischen Spiegel (BB07-E03, Thorlabs) sind für einen Wellenlängenbereich zwischen 750-1100 nm zertifiziert und weisen in diesem Bereich eine durchschnittliche Reflektivität von >99% auf. Sie decken damit nahezu die gesamte spektrale Bandbreite der einstellbaren Zentralwellenlänge des Ti:Sa-Lasers ab. Lediglich an der blauen Flanke (< 750 nm) kommt es zu leicht erhöhten Reflexionsverlusten. 2.) Wasserdampf und Sauerstoff weisen eine Absorptionsbande im Bereich von ca. 920-970 nm auf. Das Einstellen einer Zentralwellenlänge bzw. ein stabiler Pulsbetrieb des Ti:Sa-Lasers in diesem Spektralbereich kann daher Schwierigkeiten bereiten. In der Praxis hat sich eine erhöhte Pumpleistungen des Nd:YVO<sub>4</sub>-Lasers von ca. 12 W in Kombination mit einer vorsichtigen Rotverschiebung der Zentralwellenlänge in den kritischen Spektralbereich hinein als praktikabel erwiesen. Simultan zum Rotschieben der Zentralwellenlänge ist eine Anpassung der spektrale Halbwertsbreite des Laserpulses notwendig, wobei der Pulsbetrieb unterhalb einer Halbwertsbreite von ca. 8 nm gewöhnlich zusammenbricht. Alternativ besteht die Möglichkeit, den Resonator des Ti:Sa-Lasers mit Stickstoff zu fluten. Dafür steht das Bauteil *Model 3910* zur Verfügung. Der verwendete Stickstoff sollte hochrein und trocken sein. Ein mit Flüssigstickstoff betriebener Verdampfer ist als Stickstoffquelle ungeeignet. Ferner kann das Fluten des Laserresonators mit Stickstoff eine Justage des Resonators nötig machen.

Der Strahl des Ti:Sa-Lasers verlässt den Resonator s-polarisiert und auf einer Höhe von 14,2 cm. Dies entspricht nicht den Standards des Aufbaus, welche eine p-Polarisation des Laserstrahls zur Minimierung von Reflexionsverlusten, sowie eine Höhe von 14,5 cm über der Fläche des optisches Tisches voraussetzen. Der Laserstrahl wird daher nach Verlassen des Resonators zunächst über zwei Spiegel



**Abbildung 4.2:** Fotografie des Moduls Tsunami-Laseraufbau mit Fokus auf dem Ti:Sa-Laser und eingezeichnetem Strahlengang.

gelenkt und so auf Standardhöhe gebracht. Abweichend zur Aussage im vorigen Absatz handelt sich bei diesen beiden Spiegeln nicht um das Modell BB07-E03 (Thorlabs), sondern um das Modell 10Q20UF.35S (Newport), welche sich durch eine Optimierung der Reflektivität für s-polarisiertes Licht auszeichnen und  $>99\%$  Reflektivität im Spektralbereich von 680-1060 nm bieten. Im Anschluss passiert der Laserstrahl einen Farady-Isolator (IO-5-TIS2-HP, OFR) welcher das störende Eindringen von Rückreflexen in den Resonator des Ti:Sa-Lasers verhindert (siehe auch Abbildung 4.2). Als Folge der Passage durch den Faraday-Isolator dreht sich die Polarisation des Laserstrahls auf  $45^\circ$  relativ zur Normalen des optischen Tisches. Eine nachfolgende  $\lambda/2$ -Wellenplatte (10RP52-2, Newport) dreht die Polarisation des Laserstrahls schließlich in die gewünschte p-Polarisation.

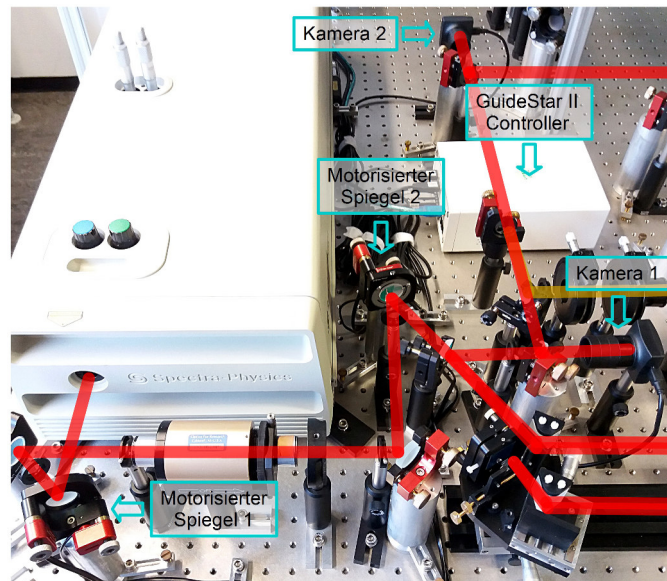
Sofern nicht aktiv genutzt, empfiehlt es sich, das Tsunami-Lasersystem im Bereitschaftsmodus (*engl. standby*) zu betreiben. Insbesondere die Steuerelektronik und Wasserkühlung sollten idealerweise permanent in Betrieb bleiben. Dies zum einen, da die Aufwärm- und Stabilisierungsphase der Steuerelektronik nach einem Wiederanfahren etwa 60 min zusätzlicher Zeit in Anspruch nimmt, zum anderen, um die Temperierung sowohl des Ti:Sa-, wie auch des Nd:YVO<sub>4</sub>-Lasers zu bewahren. Letzteres trifft insbesondere auf den Nd:YVO<sub>4</sub>-Laser zu, dessen LBO-Kristall zur Frequenzverdopplung

mittels einer Kombination aus Wasserkühlung und internem Heizelement temperiert wird. Sofern das Lasersystem über einen längeren Zeitraum (> 2 Wochen) nicht aktiv genutzt wird oder andere Gründe vorliegen, kann es heruntergefahren werden. Wird das Lasersystem wieder hochgefahren, so ist zusätzlich zu den bereits genannten Punkten eine Aufwärmphase des Diodenlaser von etwa 60 min einzuplanen.

## 4.3 GuideStar II Strahlstabilisierung

Der Aufbau verfügt über ein optional zuschaltbares, automatisiertes Strahlstabilisierungs-System des Modells GuideStar II (Newport). Dieses besteht aus zwei motorisierten Spiegelhaltern (8816-6, Newport), zwei CCD-Kameras (8784, Newport), sowie einer Steuereinheit (8783, Newport), wie sie in Abbildung 4.3 kenntlich gemacht sind. Das zugrunde liegende Prinzip sieht vor, dass der Strahl zunächst über beide motorisierte Spiegel geleitet und anschließend an zwei weiteren Spiegeln mit polierter Rückseite (BB1-E03P, Thorlabs) reflektiert wird. Die CCD-Kameras sind jeweils hinter den rückseiten-polierten Spiegeln platziert und nutzen die wenigen Promille transmittierter Strahlintensität zur Bestimmung der Strahlposition. Sollte diese außerhalb eines (einstellbaren) Toleranzbereiches um den definierten Zielpunkt liegen, justiert das System die Strahlposition selbsttätig nach. Analog einer Raumgeraden, die durch zwei Punkte exakt festgelegt ist, stellt die Detektion mittels zweier CCD-Kameras sicher, dass sowohl Strahlposition, wie -ausrichtung stets reproduziert werden.

Die Motorisierung der Spiegelhalter besteht zwar aus Piezoelementen, allerdings sind diese nicht direkt an der Bewegung des Spiegels beteiligt. Stattdessen wird der Spiegel über eine Stellschraube bewegt, die auch manuell verstellt werden kann. Die Piezoelemente wiederum werden genutzt, um die Stellschraube über ein Wechselspiel von Gleit- und Haftreibung zu bewegen. Im Vergleich zu einer direkten Ansteuerung des Spiegels mittels Piezoelement bietet diese indirekte Methode den Vorteil, dass die Spiegel absolut still stehen, sofern keine Justage der Strahlposition notwendig ist, sodass keine



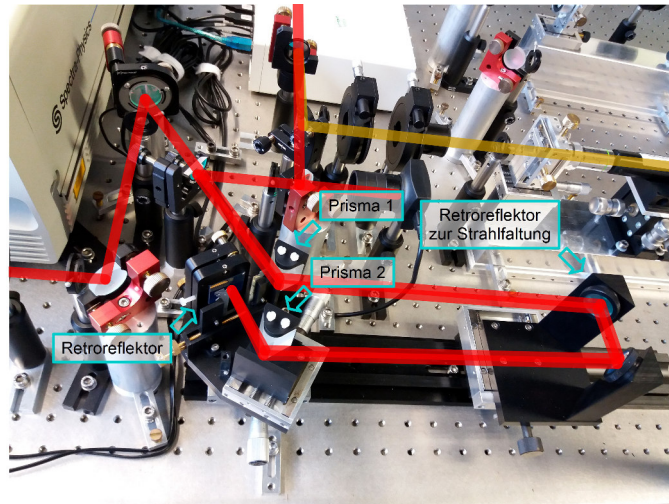
**Abbildung 4.3:** Fotografie der integrierten GuideStar II Strahlstabilisierung mit eingezeichnetem Strahlengang.

zusätzliche Schwankung der Strahlposition erzeugt wird. In gewisser Weise nachteilig ist die Trägheit dieses Designs, welches eine aktive Kompensation schneller Strahlpositions-Schwankungen nicht erlaubt. Dennoch hat sich das System als sehr praktikabel erwiesen, insbesondere um die Strahlposition über mehrere Tage hinweg zu reproduzieren. Darüber hinaus bietet das System diverse Möglichkeiten zur Strahlanalyse, wie beispielsweise die Messung des Strahlprofils oder eine Aufzeichnung der Strahlposition zur Dokumentation der Stabilität.

## 4.4 Pulskompression

Die Laserpulse des Ti:Sa-Lasers verlassen den Resonator fourierlimitiert mit einer typischen Pulsdauer von ca. 60-80 fs, jedoch führt die (positive) Gruppengeschwindigkeitsdispersion zu einer hier zunächst unerwünschten, zeitlichen Streckung der Pulslänge (siehe Kapitel 2.3.4). Dies geht mit einer Abnahme der Spitzenintensität des Pulses und damit einer verringerten Wahrscheinlichkeit einher, nichtlinear optische Effekte zu erzeugen. Alle transmittierenden Optik-Komponenten, insbesondere jedoch Mikroskop-Objektive, die ein kompaktes System einer ganzen Anzahl von Linsen beinhalten, tragen zu diesem Effekt bei.





**Abbildung 4.4:** Fotografie des Moduls Prismenkompressor mit eingezeichnetem Strahlengang.

Der Laserpuls wird daher relativ zügig nach Verlassen des Resonators über einen Prismenkompressor geleitet (siehe auch Abbildung 4.4), wo er negative Gruppengeschwindigkeitsdispersion erfährt bzw. einen Blau-Chirp erhält (siehe Kapitel 2.3.4). Der Blau-Chirp ist dabei so bemessen, die positive Gruppengeschwindigkeitsdispersion des Pulses an einem definierten Punkt im Aufbau vollständig zu kompensieren, sodass erneut ein fourier-limitierter Puls vorhanden ist. Typische Punkte im Aufbau, an denen fourier-limitierte Pulse sinnvoll sind, stellen der Eintritt in die Photonische Kristallfaser (siehe Kapitel 4.7) bzw. der Austritt aus dem Objektiv des Mikroskops (siehe Kapitel 4.10) dar. Während sich die Pulslänge vor Eintritt in die Photonische Kristallfaser gut mit einem Autokorrektor bestimmen lässt, gestaltet sich dieses Vorgehen am Mikroskop deutlich aufwändiger. Hier hat sich das Vorgehen bewährt, einige Tropfen eines Farbstoffes (z.B. Rhodamin-B-Lösung in Methanol) auf einen dünnen (ca.  $100\ \mu\text{m}$ ) Objektträger aus Glas aufzubringen und durch Justage des Prismenkompressors die Intensität der gemessenen 2PF zu maximieren.

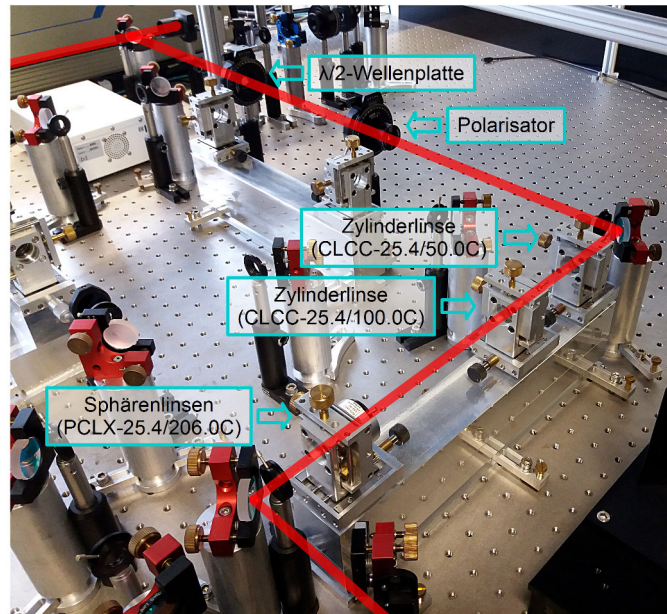
Die zentrale Komponente des Prismenkompressors ist eine stufenlos drehbar gelagerte (CR1/M, Thorlabs) Plattform. Auf dieser

befinden sich zwei Prismen (10SF10, Newport) aus SF10-Glas montiert, welche im Brewsterwinkel geschnitten und für einen Spektralbereich von 370-2000 nm zertifiziert sind. Die Drehachse der Plattform wurde so platziert, dass sie durch die Kante der beiden optisch polierten Flächen des, in Einstrahlrichtung gesehen, ersten Prismas verläuft. Diese Anordnung ermöglicht ein einfaches Anpassen des wellenlängen-abhängigen Brewsterwinkels. Das zweite Prisma befindet sich beweglich auf einem Linearverschiebetisch gelagert. Die nicht-polierten Rückseiten beider Prismen sind dabei parallel angeordnet. Ein breitbandig beschichteter dielektrischer Spiegel (10SD520BD.2, Newport) in 2f-Position dient als Reflektor, sodass eintreffender und reflektierter Strahl leicht höhenversetzt demselben Pfad folgt. Hierdurch halbiert sich die Zahl der nötigen Prismen von sonst 4 auf nur 2. Mithilfe mechanischer Blenden vor dem Reflektorspiegel können die spektralen Eigenschaften des Pulses angepasst werden.

Ein zusätzlich eingebrachter Retroreflektor, bestehend aus zwei rechtwinklig angeordneten Spiegeln (BB1-E03, Thorlabs) faltet den Strahlweg und trägt zur Kompaktheit des Prismenkompressors bei. Der Retroreflektor ist auf einer Schiene in Einstrahlrichtung beweglich gelagert. Ein Linearverschiebetisch ermöglicht eine Justage des Retroreflektors senkrecht zur Einstrahlrichtung in Tischebene. Je größer die Distanz zwischen dem Retroreflektor und der zuvor erwähnten Plattform ausfällt, desto mehr negative Gruppengeschwindigkeitsdispersion bzw. Blau-Chirp erfährt der Laserpuls. Kompensierend hierzu wird durch Einfahren des zweiten Prismas in den Strahlweg zusätzliche (positive) Gruppengeschwindigkeitsdispersion erzeugt, wodurch eine Feinabstimmung des erzeugten Chirps möglich ist. Nach Verlassen des Prismenkompressors wird der Puls mittels eines dielektrischen Spiegels (BBD1-E03, Thorlabs) ausgekoppelt und über einen zweiten Spiegel geleitet wieder auf Standardhöhe gebracht.

### 4.5 Astigmatismus-Korrektur

Der Laserstrahl des Tsunami-Lasers weist bauartbedingt eine nahezu doppelt so hohen Divergenz in vertikaler Richtung verglichen



**Abbildung 4.5:** Fotografie des Moduls Astigmatismuskorrektur mit eingezeichnetem (Pump-)Strahlengang.

mit der horizontalen Richtung auf. Dieser Astigmatismus wirkt sich negativ auf die Fokussierung des Laserstrahles, beispielsweise an Mikroskop-Objektiven aus, deren rückwärtige Apertur möglichst gleichmäßig ausgeleuchtet bzw. sogar leicht überstrahlt werden sollte. Zur Korrektur des Astigmatismus wird ein Galilei-Teleskop, bestehend aus drei Linsen eingesetzt. Wie in Abbildung 4.5 gezeigt, passiert der Laserstrahl dabei zunächst zwei plankonkave Zylinderlinsen (CLCC-25.4/50.0C und CLCC-25.4/100.0C, Laser Components), welche den Astigmatismus ausgleichen. Im Anschluss erfolgt die Passage durch eine plankonvexe Sphärenlinse (PCLX-25.4/206.0C, Laser Components) zur Rekollimation des Strahles. Alle drei Linsen sind aus N-BK7-Glas gefertigt und weisen eine Anti-reflexbeschichtung auf, die für 808 nm optimiert wurde.

Zur leichteren Justage der Astigmatismus-Korrektur können die Linsen mitsamt ihrer Fassung entfernt werden. Anschließend wird der Laserstrahl anhand der vorhandenen Blenden justiert. Beim Einsetzen der Linsen empfiehlt es sich, eine, der Strahlrichtung entgegengesetzte Reihenfolge einzuhalten. Beginnend mit der plankonvexen Sphärenlinse (PCLX-25.4/206.0C), wird jede Linse zunächst mithilfe der integrierten Blende vollständig einjustiert, bevor die jeweils folgende Linse eingesetzt wird. Im Fall der beiden Zylinderlinsen ist

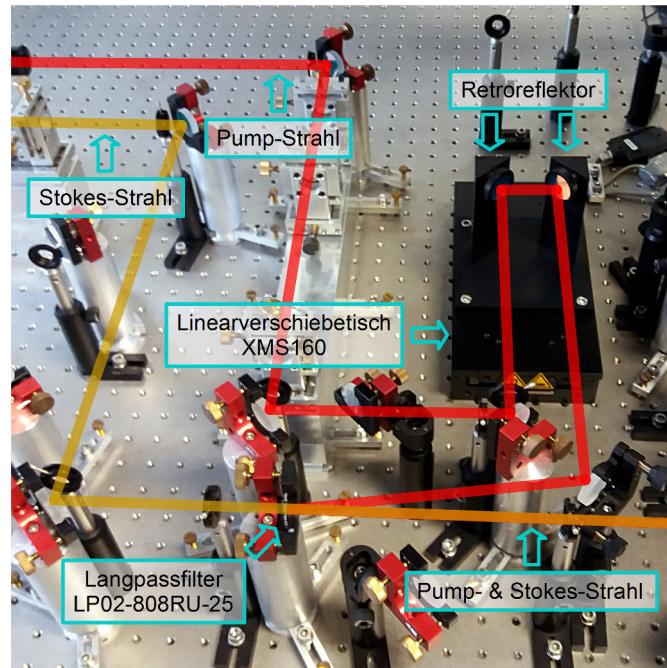
zusätzliche auch eine Justage der optischen Achse notwendig. Durch Rotation der mittleren Linse (CLCC-25.4/100.0C) wird der Astigmatismus zunächst maximiert und anschließend durch Einsetzen, Justage und Rotation der verbliebenen Zylinderlinse (CLCC-25.4/50.0C) minimiert.

Die Astigmatismus-Korrektur ist so in den Aufbau integriert, dass sie im CARS-Betrieb des Mikroskops auf den Pump-Strahl wirkt bzw. auf den Anregungsstrahl im Fluoreszenzbetrieb. Sie folgt dabei einer kleinen Untereinheit zur Intensitätskontrolle des Pumpstrahles und besteht aus einer  $\lambda/2$ -Wellenplatte (AHWP05M-950, Thorlabs), sowie einem Polarisator (GL10-B, Thorlabs). Der Stokes-Strahl benötigt keine Astigmatismus-Korrektur, da der Astigmatismus während der Passage des Stokes-Strahles durch die Photonische Kristallfaser (siehe Kapitel 4.7) verloren geht.

### 4.6 Optische Verzögerungsstrecke

Die optische Verzögerungsstrecke dient der relativen Verzögerung von Pump- und Stokes-Pulsen im CARS-Betrieb der Anlage. Sie ist in den Pump-Strahlengang integriert und folgt direkt auf die Astigmatismus-Korrektur (siehe auch Abbildung 4.6). Kernstück der optischen Verzögerungsstrecke ist ein elektrisch verstellbarer Linearverschiebetisch (XMS160, Newport), dessen Schlitten über eine Strecke von 160 mm – entsprechend einer Zeitverzögerung von ca. 0,5 ns – beweglich ist, bei einer Genauigkeit von 0,5  $\mu\text{m}$ . Auf dem Schlitten des Linearverschiebetisch ist ein Retroreflektor montiert, dessen Design und Spiegelbestückung (BB1-E03, Thorlabs) mit dem des Prismenkompressors identisch ist.

Die Kontrolleinheit (XPS-C2, Newport) des Linearverschiebetisches ist in das lokale Netzwerk eingebunden. Der Aufruf der Steueroberfläche erfolgt durch Eingabe von „CRSXPS“ in die Adresszeile eines Webbrowsers. Unter dem Menüreiter „Front Panel“ finden sich unter anderem die wichtigen Einträge „Move“ und „Jog“. Mittels „Move“ kann der Schlitten an eine definierte Position gebracht werden. Es werden Positionsangaben im Bereich  $\pm 80$  mm akzeptiert.

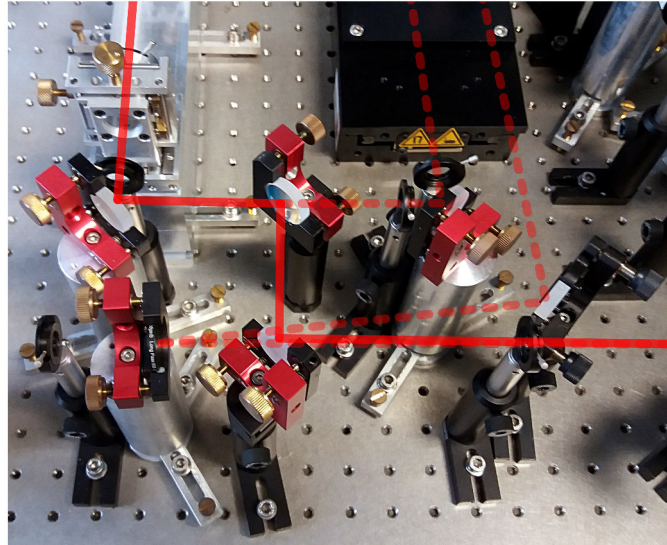


**Abbildung 4.6:** Fotografie des Moduls Optische Verzögerungsstrecke mit eingezeichnetem Strahlengang.

Der Befehl „Jog“ dient dem Verfahren des Schlittens mit kontinuierlicher Geschwindigkeit. Weitere Details zur Bedienung können der Betriebsanleitung entnommen werden.

Bei der Justage des Pump-Strahlengangs ist unbedingt darauf zu achten, dass der, auf den Retroreflektor des Linearverschiebetisches einfallende Strahl exakt parallel zur Verschieberichtung des Schlittens verläuft. Andernfalls hat eine Verschiebung des Schlittens einen schleichenden Versatz des Pump-Strahls zur Folge, welcher die Beobachtung des CARS-Signals deutlich erschwert oder sogar verhindert. Zu Justagezwecken befindet sich hinter dem Linearverschiebetisch eine zusätzliche Blende, auf welche der Pumpstrahl nach Entfernen des Retroreflektors justiert werden kann. Nach Passage des Retroreflektors wird der Pump-Strahl über einen weiteren Spiegel (BB1-E03, Thorlabs) auf einen dielektrischen Langpass-Filter (LP02-808RU-25, Semrock) geleitet. Hier erfolgt die räumliche Überlagerung von Pump- und Stokes-Puls, indem ersterer am Langpassfilter reflektiert, letzterer jedoch transmittiert wird.

Die optische Verzögerungsstrecke ist für den Fluoreszenz-Betrieb nicht notwendig. Sie kann daher über zwei schwenkbar montierte



**Abbildung 4.7:** Fotografie des Moduls Optische Verzögerungsstrecke mit eingezeichnetem, alternativem Strahlengang.

(FM90/M, Thorlabs) Spiegel (BB1-E03, Thorlabs) abgekürzt werden, wie in Abbildung 4.7 gezeigt.

## 4.7 Photonische Kristallfaser

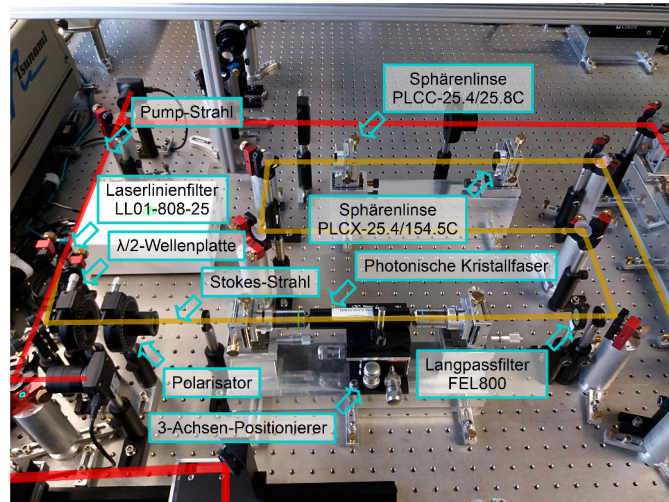
Entgegen der Bezeichnung handelt es sich bei einer photonischen Kristallfaser (PCF) nicht um einen Kristall im eigentlichen Sinne, sondern um einen Lichtwellenleiter mit integrierter Mikrostruktur – vereinzelt ist daher auch die Bezeichnung „mikrostrukturierte Faser“ anzutreffen. Die Mikrostruktur einer PCF besteht typischerweise aus längsseitig verlaufenden, typischerweise mit Luft gefüllten Röhren, welche eine periodische Modulation des Brechungsindex bewirken. Sowohl die Form, wie auch die Anordnung der Röhren beeinflussen die optischen Eigenschaften der PCF, welche dadurch speziell an die jeweiligen Anforderungen angepasst werden können.

Die im Aufbau integrierte PCF (FemtoWhite 800, Crystal Fibre) wurde darauf optimiert, fs-Pulse eines Ti:Sa-Lasers spektral zu einem Superkontinuum zu verbreitern, welches im CARS-Betrieb des Aufbaus als Stokes-Strahl dient. Im Vergleich zu anderen Verfahren der spektralen Pulsverbreiterung, beispielsweise der Weißlichterzeugung in Saphir-Kristallen, setzt der erwünschte Verbreiterungsprozess in der PCF bereits bei sehr niedrigen Pulsenergien von

nur wenigen Nanojoule pro Puls ein. Dies ist wichtig, da die Pulsenergie des genutzten Ti:Sa-Lasers aufgrund der hohen Repetitionsrate von 80 MHz bzw. in Abwesenheit eines nachgeschalteten Verstärkers (siehe Kapitel 2.3.5) lediglich im zweistelligen Nanojoule-Bereich liegt.

Wie in Abbildung 4.8 gezeigt, sieht der Aufbau vor, die Aufteilung in Pump- und Stokes-Strahl direkt im Anschluss an die Pulskompression im Prismenkompressor erfolgen zu lassen. Statt eines gewöhnlichen Strahlteilers kommt ein 808 nm-Laserlinienfilter (LL01-808-25, Semrock) zum Einsatz. Dieser transmittiert bei einer Zentralwellenlänge von 808 nm einen lediglich 3 nm breiten Laserpuls, welcher im CARS-Betrieb des Aufbaus als Pump-Puls genutzt wird. Der Laserlinienfilter ist auf einer verkippbaren Spiegelhalterung (FM90/M, Thorlabs) montiert, sodass er bei Nichtgebrauch leicht aus dem Strahlengang entfernt werden kann. Die am Laserlinienfilter reflektierten Anteile der Ti:Sa-Pulse werden anschließend über eine Untereinheit geleitet, bestehend aus einer  $\lambda/2$ -Wellenplatte (AHWP05M-950, Thorlabs), sowie einem Polarisator (GL10-B, Thorlabs), welche dem Einstellen der Intensität dienen. Die Ein- und Auskopplung des Stokes-Strahles aus der PCF erfolgt mittels Mikroskop-Objektiven (Einkopplung: Plan N 20x, Auskopplung: Plan N 40x, Olympus), welche über Linearverschiebetische frei im Raum ( $x$ -,  $y$ - und  $z$ -Achse) beweglich sind. Die Auskopplung des Stokes-Strahls aus der PCF über ein stärker fokussierendes Mikroskop-Objektiv verkleinert dessen Strahldurchmesser, sodass nachfolgend eine Einkopplung in andere optische Bauteile, beispielsweise eine Pockels-Zelle erleichtert wird. Sofern die Auskopplung über ein Mikroskop-Objektiv anderer Spezifikation erfolgen soll, muss auch das weiter unten beschriebene Teleskop an die neuen Bedingungen angepasst werden.

Die im Aufbau integrierte PCF ist aus praktischen Gründen in einem stabilen Gehäuse untergebracht. Die Enden der PCF sind jeweils mit einer Quarz-Ferrule gefasst, welche die Mikrostruktur vor Beschädigungen oder der Aufnahme von Flüssigkeiten über den Kapillareffekt schützt, beispielsweise während des Reinigens.



**Abbildung 4.8:** Fotografie des Moduls Photonische Kristallfaser mit eingezeichnetem Strahlengang.

Zur leichteren Einkopplung des Laserstrahls in die PCF – der Kerndurchmesser beträgt lediglich  $1,8 \mu\text{m}$  – sind die Enden der PCF mit einer integrierten Optik zur Strahlaufweitung versehen, welche den Strahldurchmesser in etwa um den Faktor 10 vergrößert bzw. verkleinert. Dennoch verlangt die Justage der PCF ein hohes Maß an Präzision, denn der Durchmesser des zu treffenden Ziels liegt noch immer deutlich unter dem typischen Durchmesser eines menschlichen Haares. Aus diesem Grund ist die PCF auf einem V-Block (NB-1, Newport) montiert – sollte sie aus dem Aufbau entfernt werden müssen, ist eine rudimentäre Repositionierung so relativ einfach möglich. Die Justage der PCF-Position erfolgt über einen 3-Achsen-Positionierer (MBT616/M, Thorlabs). Dieser erlaubt die Justage der PCF-Position entlang der drei Translations-Achsen mit einer Genauigkeit von  $50 \text{ nm}$ . Dieses hohe Maß an Präzision wird durch die Verwendung von Differentialgewinden ermöglicht. Die Justageschrauben des 3-Achsen-Positionierers besitzen daher zwei Einstellmöglichkeiten. Der vordere Stellring ermöglicht ein Verfahren der Position um bis zu  $4 \text{ mm}$  und dient lediglich der Grobjustage. Die Feinjustage erfolgt über den abschließende Stellring, welcher einen Verfahrensweg von bis zu  $300 \mu\text{m}$  erlaubt, bei einer Genauigkeit von  $50 \text{ nm}$ .

Bei einer Zentralwellenlänge des Pump-Strahles von  $808 \text{ nm}$  sind

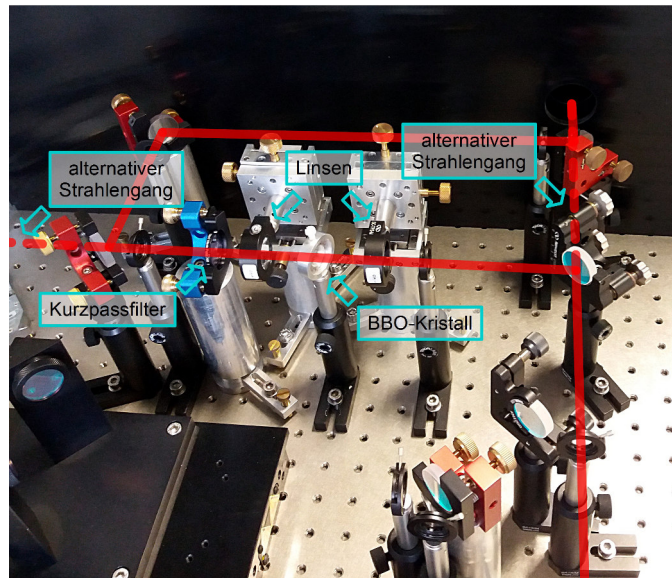


im Stokes-Strahl lediglich die spektralen Anteile  $>808$  nm für die Erzeugung des CARS-Signals relevant. Nach Auskoppeln des Stokes-Strahles aus der PCF mittels des Mikroskop-Objektivs passiert dieser daher einen 800 nm-Langpassfilter (FEL800, Thorlabs). Im Anschluss erfolgt eine Angleichung des Strahldurchmessers an den Pump-Strahl in einem Galilei-Teleskop. Die Antireflexbeschichtung der verwendeten Linsen (PLCC-25.4/25.8C und PLCX-25.4/154.5C, Laser Components) ist breitbandig für den Bereich 633-1064 nm ausgelegt. Zur leichteren Zentrierung der Linsen verfügt jede Linsenhalterung über eine integrierte Blende.

In den meisten Fällen wird ein geeignetes Superkontinuum bereits durch Zentrierung des einfallenden Stokes-Strahls auf die PCF anhand der installierten Blenden erhalten, gefolgt von einer geringfügigen Feinjustage der PCF mithilfe des 3-Achsen-Positionierers. Sollte dennoch eine vollwertige Justage der PCF nötig sein, so kann das nachfolgend beschriebene Schema als Orientierungshilfe genutzt werden. Zunächst werden die PCF, die Mikroskop-Objektive, sowie der nachgeschaltete 800 nm-Langpassfilter aus dem Strahlengang entfernt. Der einfallende Stokes-Strahl wird nun anhand der installierten Blenden zentriert, sodass sein Einfall auf die PCF exakt senkrecht erfolgt. Anschließend werden die Halterungen der Mikroskop-Objektive mithilfe der integrierten Blenden auf den Stokes-Strahl zentriert. Die Mikroskop-Objektive werden nun wieder installiert. Die Zentrierung des, den Stokes-Strahl in die PCF einkoppelnden Mikroskop-Objektivs ist dabei anhand des Fokusverlaufs zu kontrollieren. Vor dem weiteren Vorgehen wird Intensität des Stokes-Strahles auf etwa 10 mW reduziert, um eine Beschädigungen der PCF durch mangelhafte Fokussierung zu vermeiden. Die PCF wird wieder installiert, wobei das hintere Ende der PCF mit der Kante des V-Blocks einen Abschluss bildet. Die Polarisationsrichtung der PCF ist als weiße Linie auf den beiden Endflächen des Gehäuses markiert und muss mit der Polarisation des eingekoppelten Stokes-Strahles übereinstimmen. Mittels der Grobjustage-Stellringe wird die PCF nach Augenmaß so positioniert, dass der Fokus des Stokes-Strahl das Zentrum der Quarz-Ferrule trifft. Das auskoppelnde Mikroskop-Objektiv wird bis auf etwa 2 mm an die Ferrule der PCF herangefahren. Die PCF ist nun rudimentär justiert.

Für die folgende Grob- und Feinjustage werden ein NIR-Sichtgerät und eine Papierkarte benötigt. Letztere wird hinter dem auskoppelnden Mikroskop-Objektiv platziert. Mithilfe der Grobjustage-Stellringe des 3-Achsen-Positionierers wird die PCF weiter auf den einfallenden Stokes-Strahl zentriert, bis mit dem NIR-Sichtgerät auf der Papierkarte ein schwacher Lichtpunkt erkennbar ist. Der Fokus des einfallenden Stokes-Strahles befindet sich nun im lichtleitenden Bereich der PCF. Um die nachfolgende Justage zu erleichtern, kann die Intensität des eingekoppelten Stokes-Strahls jetzt auf ca. 50 mW erhöht werden. Durch wechselweisen Einsatz von Grob- und Feinjustage-Stellringen wird der eingekoppelte Stokes-Strahl weiter in Richtung des mikrostrukturierten Bereichs der PCF zentriert. Periodische Intensitätsschwankungen des ausgekoppelten Stokes-Strahles während gleichmäßig ausgeführter Drehung eines Feinjustage-Stellrings deuten dabei auf ein Wandern des eingekoppelten Stokes-Strahls über den mikrostrukturierten Bereich der PCF hin – der Fokus des eingekoppelten Stokes-Strahls befindet sich nun bereits sehr nahe dem Kern der PCF. Sobald der eingekoppelte Stokes-Strahl den Kern der PCF trifft, nimmt die Intensität des ausgekoppelten Stokes-Strahles sprunghaft zu. Bei annähernd korrekter Fokussierung der Mikroskop-Objektive kann das Superkontinuum hier bereits mit bloßem Auge als rot-orangener Lichtpunkt auf der Papierkarte wahrgenommen werden. Für die nun folgende Feinjustage kann die Intensität des, in die PCF eingekoppelten Stokes-Strahles auf ca. 100 mW erhöht werden. Die Position der PCF wird nun ausschließlich mithilfe der Feinjustage-Stellringe des 3-Achsen-Positionierers auf das Intensitätsmaximum des ausgekoppelten Stokes-Strahls bzw. des Superkontinuums optimiert. Hierbei ist neben der lateralen Justage der PCF auch die axiale Justage (parallel zum Stokes-Strahl) zu beachten, welche die Fokussierung des eingekoppelnden Mikroskop-Objektivs sicherstellt. Für exakte Ergebnisse kann ein Leistungsmessgerät verwendet werden. Mittels Fokussierung des auskoppelnden Mikroskop-Objektivs wird die Kollinearität des Stokes-Strahles wiederhergestellt und daran anschließend der zu Beginn entfernte 800 nm-Langpassfilter wieder installiert.

Die abschließende Optimierung des erzeugten Superkontinuums



**Abbildung 4.9:** Fotografie des Moduls Frequenzverdopplung mit eingezeichnetem Strahlengang.

erfolgt ausschließlich über Variation der Intensität des eingekoppelten Stokes-Strahles. Hierzu muss das Superkontinuum mittels eines Spektrometers beobachtet werden. Bei einer Wellenlänge des Pump-Strahles von 808 nm muss der Stokes-Strahl die spektrale Bandbreite von etwa 810-1100 nm abdecken, um alle Raman-Resonanzen anregen zu können. Auf die Optimierung dieses Spektralbereiches des Superkontinuums sollte daher besonderer Wert gelegt werden. Die Intensität des eingekoppelten Stokes-Strahles beträgt typischerweise 150-200 mW. Höhere Intensitäten sind möglich, steigern jedoch das Risiko einer Beschädigung der PCF.

## 4.8 Frequenzverdopplung

Der Aufbau verfügt über ein kleines Modul zur Frequenzverdopplung (siehe Abbildung 4.9). Dieses ist nachfolgend auf Wiedervereinigung von Pump- und Stokes-Strahl am dielektrischen Langpass-Filter (LP02-808RU-25, Semrock) angeordnet. Als nichtlinear optisches Medium dient ein 0,5 mm starker BBO-Kristall im Schnittwinkel von  $29^\circ$ . Die Fokussierung in den Kristall bzw. Rekollimation erfolgt über einfache Sphären-Linsen mit einer Brennweite von 40 mm. Ein nachfolgend montierter Spiegelhalter kann zur Aufnahme eines Filters genutzt werden, um Fundamentalstrahlung zu unterdrücken.

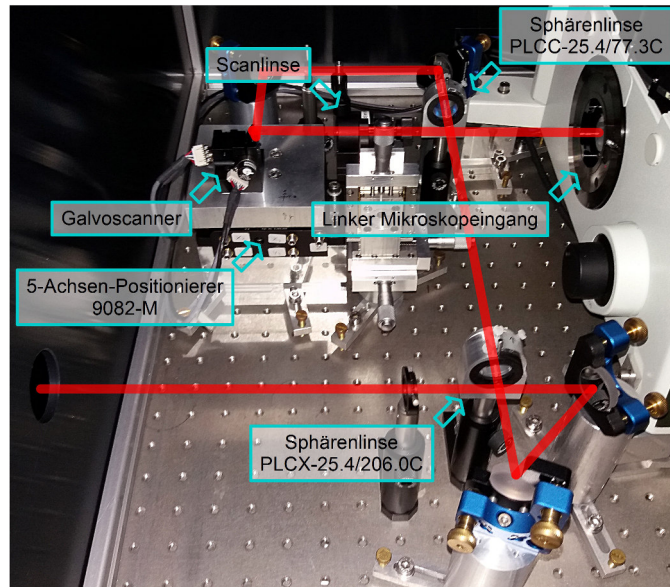
Je nach Anwendung (Mikroskopie- oder Spektroskopie-Betrieb) kann die Strahlführung in diesem Modul durch Ein- bzw. Ausfahren von Spiegeln auf verkippbaren Halterungen (FM90/M, Thorlabs) angepasst werden. Sofern im Spektroskopie-Betrieb keine Frequenzverdopplung gewünscht ist, können Kristall und Linsen aus dem Strahlengang entfernt werden. Ein nützliche Anwendung dieses Moduls im CARS-Betrieb besteht in der Erzeugung der Differenzfrequenz aus frequenz-verdoppeltem Pump-Strahl und dem Stokes-Strahl. Dieser Effekt ist leichter nachweisbar, als das CARS-Signal selbst und kann zur Justage der räumlichen, wie auch zeitlichen Überlappung beider Strahlen genutzt werden.

## **4.9 Laserscanner**

### **4.9.1 (Thorlabs VCM101H-635)**

Der VCM101H-635 des Herstellers Thorlabs ist ein vormontierter xy-Laserscanner, welcher sich durch hohe Bildaufnahmeraten auszeichnet. Der Einsatz eines resonanten Scanners (8 kHz) für die Abtastung der Bildzeilen ermöglicht hier die Aufnahme von bis zu 16.000 Bildzeilen pro Sekunde bzw.  $\sim 30$  Bildern pro Sekunde, bei einer typischen Auflösung von  $512 \times 512$  Pixeln.

Der VCM-101H-635 kam in der frühen Phase des Aufbaus des Multiphotonen-Mikroskops zum Einsatz. Wie sich schrittweise herausstellte, entsprach dieser Scanner den Anforderungen für nichtlinear optische Mikroskopie nur in unzureichender Weise. Insbesondere die geringe Integrationszeit von nur  $\sim 120$  ns pro Pixel (bei  $512 \times 512$  Pixeln Auflösung) erschwerte die Beobachtung der vergleichsweise selten auftretenden, nichtlinear optischen Ereignisse. Die feste Resonanzfrequenz des Scanners ließ dabei keine Veränderung der Integrationszeit zu. Eine softwareseitige Mittelung über hohe Aufnahmezahlen hinweg erwies sich als undurchführbar und provozierte regelmäßig Abstürze des Steuerprogramms. Auch der Scanner selbst zeigte sich unzuverlässig, was sich in spontanen Ausfällen des (langsamen) Galvoscanners äußerte, sowie in Kollisionen beider Scannerspiegel, die in einem Fall zum Zerschlagen des Galvospiegels, in einem weiteren Fall zum Defekt des Galvoscanners



**Abbildung 4.10:** Fotografie des Moduls Laserscanner mit eingezeichnetem Strahlengang.

fürten. Der VCM101H-635 wurde daher später durch einen Laserscanner von Cambridge Technology ersetzt (siehe Kapitel 4.9.2).

#### 4.9.2 Cambridge Technology Laser-Scanner

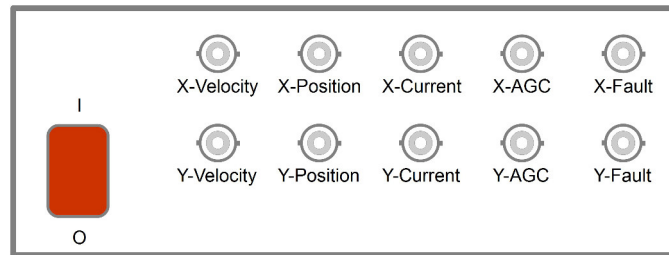
Der Laserscanner von Cambridge Technology ersetzt den zuvor genutzten VCM101H-635 (Thorlabs) (siehe auch Kapitel 4.9.1). Es handelt sich um einen eigens konfigurierten xy-Laserscanner in Ausführung eines Galvo-Galvo-Systems. Zum Einsatz kommen dabei zwei identische Galvanometer-Scanner des Typs 6210HSM40, deren Reaktionszeit (Erreichen einer  $0,1^\circ$  entfernten Position mit 99% Genauigkeit) bei  $\sim 100 \mu\text{s}$  liegt. Beide sind mit einem breitbandig reflektierenden Silberspiegel mit 6 mm freier Apertur bestückt. Die Montage der Galvo-Scanner erfolgte herstellerseitig in einer geeigneten Halterung. Eine 2 cm starke Aluminiumplatte dient sowohl als Wärmeableiter, wie auch als Adapterplatte für die Montage auf einer 5-achsig ( $X, Y, Z, \theta_X, \theta_Y$ ) verstellbaren Plattform (9082-M, Newport). Der gesamte Aufbau des Moduls kann Abbildung 4.10 entnommen werden.

Die Ausführung des Laserscanners als Galvo-Galvo-System bietet gegenüber dem Resonant-Galvo-System des VCM101H-635 den

Vorteil einer höheren Freiheit bezüglich der Führung des Laserstrahls. So können der Bildausschnitt und die Integrationszeit pro Pixel hier nahezu frei gewählt werden. Die deutlich langsamere Bildaufnahmerate eines Galvo-Galvo-Systems gegenüber der resonanten Variante spielt hier praktisch keine Rolle, da in der nichtlinear optischen Mikroskopie aufgrund der vergleichsweise niedrigen Signalintensitäten ohnehin erhöhte Integrationszeiten von ca. 1-100 ms pro Pixel üblich sind.

Als Treiber für die Galvoscaner dient das Modul MicroMax 673 (Cambridge Technology). Es ist zusammen mit den benötigten Netzteilen zur Spannungsversorgung in einem Computergehäuse untergebracht, wobei jeder Galvoscaner von einem eigenen Netzteil versorgt wird. Das Treibermodul übersetzt die via BNC-Anschluss auf der Rückseite des Gehäuses eintreffenden, analogen Spannungssignale (Kommando-Eingabe) in Steuersignale (Kommando-Ausgabe) und leitet diese über spezielle Kabel an den betreffenden Galvoscaner weiter. Von einer Manipulation dieser Kabel muss unbedingt abgesehen werden, da sie vom Hersteller eigens auf das System abgestimmt wurden.

Nach Einschalten der Stromversorgung (siehe dazu Abbildung 4.11) durchläuft das Treibermodul einen  $\sim 2$  s dauernden Selbsttest. Während dieser Zeit werden weder Kommando-Eingaben verarbeitet, noch Kommando-Ausgaben erzeugt. Sollte der Selbsttest einen Fehler ergeben, so wird das Treibermodul den betreffenden Kanal deaktivieren. Gleichzeitig wird das Potential des zugehörigen Fehlerkanals (X- bzw. Y-Fault) geerdet bzw. auf 0 V gesetzt (abrufbar an der Vorderseite des Gehäuses – siehe auch Abbildung 4.11). Nach fehlerfreiem Selbsttest wird innerhalb der folgenden Sekunden der Nullpunkt beider Galvoscaner kalibriert. Zu diesem Zweck werden die Kommando-Eingabe-Kanäle geöffnet und das jeweils anliegende Potential als Nullpunkt interpretiert. Für eine fehlerfreie Kalibrierung sollten während dieser Phase keine Kommando-Eingaben an den Treiber gesendet werden, da dies einen Versatz des Nullpunktes bewirken kann. Falls dennoch geschehen, kann der Treiber durch Unterbrechen der Stromversorgung jederzeit zurückgesetzt



**Abbildung 4.11:** Frontansicht des Scannertreibergehäuses, bestehend aus dem Netzschalter (rot), sowie diversen Diagnosekanälen.

werden. Sofern die Galvoscanner in dieser Phase Geräusche verursachen, beispielsweise Pfeif-, Brumm- oder Quietschlaute erzeugen, sollte das Scannersystem zur Schadensvermeidung schnellstmöglich durch Betätigung des Netzschalters deaktiviert werden. Eine typische Fehlerursache mag in diesem Fall mangelnde elektromagnetische Abschirmung der Signal-übertragenden Kabel bzw. ein induktiver Einfang von 50 Hz-Wechselspannung sein.

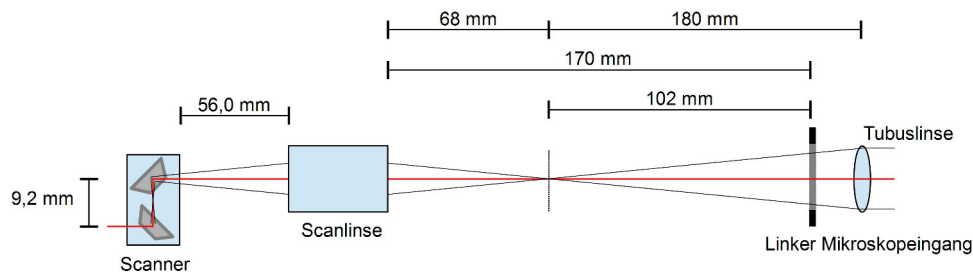
Nach erfolgreicher Kalibrierung ist das Scannersystem nun einsatzbereit und folgt den Kommando-Eingaben. Die maximal akzeptierten Potentiale an den Kommando-Eingabe-Kanälen betragen jeweils  $\pm 10$  V, welche zu einer größtmöglichen Auslenkung der Galvoscanner-Spiegel von  $\pm 20^\circ$  führen. Ein Überschreiten dieser Maximalwerte löst einen internen Schutzmechanismus aus, welcher zur vorübergehenden Deaktivierung des Scannersystems und nach Rückkehr in den akzeptierten Wertebereich zur Reaktivierung desselben führt. Ereignisse dieser Art sollten möglichst vermieden werden, um das System nicht unnötig zu belasten. Falls nötig, können an der Frontseite des Scannertreiber-Gehäuses diverse Parameter im laufenden Betrieb als proportionales Spannungssignal z.B. mithilfe eines Oszilloskops überwacht werden (siehe auch Abbildung 4.11). Dazu gehören die Beschleunigungs- und Positionswerte beider Spiegel (X/Y-Velocity und -Position), die fließende Stromstärke in den Spulen der Galvoscanner (X/Y-Current), die Spannung der automatischen Verstärkerkontrolle im Positionsdetektor des Galvoscanners (X/Y-AGC), sowie die bereits erwähnten Fehlerindikatoren (X/Y-Fault).

Zur Einkopplung des Laserstrahls in den Scanner bzw. in das

Mikroskop muss zunächst die Höhe der Strahlführung von standardmäßig 14,5 cm über der Fläche des optischen Tisches verlassen und auf 13,6 cm abgesenkt werden. Dies gleicht den technisch bedingten Höhenversatz im Scanner zwischen ein- und ausgehendem Laserstrahl aus und ermöglicht die Einkopplung des Laserstrahles in das Mikroskop auf Standardhöhe. Während des Übergangs zwischen den Modulen „Optische Verzögerungsstrecke“ (siehe Kapitel 4.6) bzw. „Frequenzverdopplung“ (siehe Kapitel 4.8) und „Laserscanner“ erfolgt die Strahlführung daher leicht abschüssig. Anschließend wird der Laserstrahl über zwei breitbandig reflektierende Silberspiegel (PF10-03-P01, Thorlabs) in ein Galilei-Teleskop zur Strahlverkleinerung eingekoppelt. Beide Linsen (PLCX-25.4/206.0C und PLCC-25.4/77.3C, Laser Components) sind aus N-BK7-Glas gefertigt und verfügen über eine breitbandige (633-1064 nm) Antireflexbeschichtung. Die erzielte Verringerung des Strahldurchmessers von ca. 9,2 cm auf ca. 3,4 cm kompensiert die Strahl-aufweitende Wirkung des später folgenden Systems aus Scan- und Tubus-Linse. Das beschriebene Galilei-Teleskop verfügt ferner über zwei Blenden, welche vor jeweils einer der Linsen zentriert angebracht sind. Mithilfe der zuvor erwähnten Silberspiegel ist der Laserstrahl an diesen Blenden sehr sorgfältig zu justieren. Eine sehr aufwändige und daher nicht ratsame Justage aller nachfolgenden Komponenten kann so vermieden werden.

Die nachfolgende Strahlführung sieht vor, den Laserstrahl über zwei weitere Silberspiegel (PF10-03-P01, Thorlabs) in den Laserscanner einzukoppeln. Nach Passage des Laserscanners verläuft der Strahl wieder auf einer Standardhöhe von 14,5 cm über der Oberfläche des optischen Tisches. Bevor der Laserstrahl das Mikroskop (siehe Kapitel 4.10) erreicht, trifft er zunächst auf einen integralen, als „Scanlinse“ bezeichneten Bestandteil des Scannersystems. Die eigentlich aus einer zusammengefassten Anordnung mehrerer Linsen bestehende Scanlinse ermöglicht dem fokussierten Laserstrahl das Abrastern einer ebenen, nicht-sphärischen Abbildung durch Variation des Einfallswinkels auf die Scanlinse. Dieses sehr kostenintensive Bauteil wurde dem zuvor eingesetzten VCM101H-635 des Herstellers Thorlabs entnommen. Die Scanlinse ist auf einer Kombination aus Linearverschiebetischen, sowie einem kinematisch gelagerten





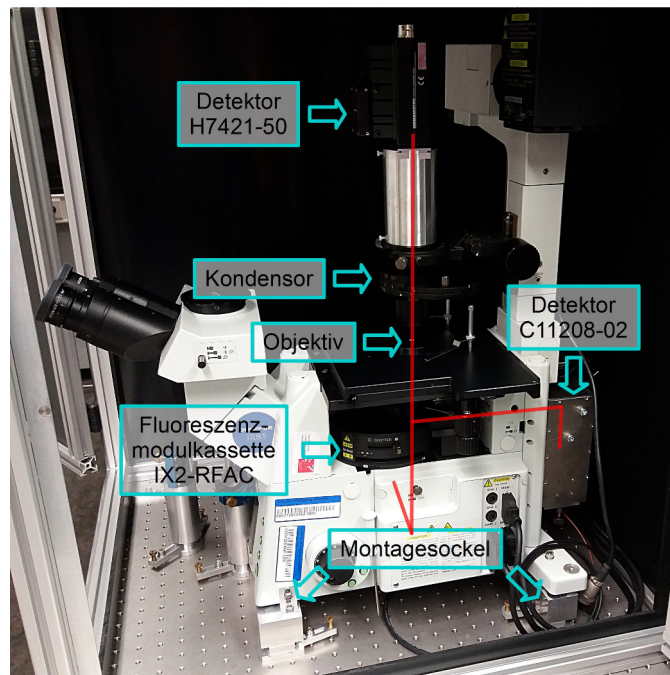
**Abbildung 4.12:** Scan- und Tubuslinse bilden zusammen ein Teleskop. Der rückwärtige Fokus der Scanlinse muss zwischen beiden Spiegeln des Scanners positioniert werden, um Abbildungsfehler zu minimieren.

V-Block montiert, wodurch völlige Justagefreiheit entlang der drei Raumachsen, sowie ein Verkippfen der Scanlinse entlang des Laserstrahls möglich ist.

Die Justage der Scanlinse erfolgt zentriert auf den Laserstrahl. Wie in Abbildung 4.12 skizziert, bildet die Scanlinse zusammen mit der Tubuslinse des Mikroskops ein Teleskop, sodass die Foki beider Komponenten in einem Punkt zusammenfallen müssen. Die Brennweiten der einzelnen Komponenten können Abbildung 4.12 entnommen werden. Bedingt durch die Positionierung der Tubuslinse im Mikroskop befindet sich deren rückwärtiger Fokus 102 mm vom optischen Seiteneingang des Mikroskops entfernt. Zur Minimierung von Abbildungsfehlern ist der rückwärtige Fokus der Scanlinse zwischen den beiden Galvo-Spiegeln des Laserscanners zu platzieren. Dies wird bei einem Abstand der einander zugewandten Endflächen von Galvoscanter-Halterung und Scanlinse von 56,0 mm erreicht.

## 4.10 Olympus IX81 Mikroskop

Das Mikroskop IX81 des Herstellers Olympus dient als Plattform für die Untersuchung von Proben. Es zeichnet sich durch vielfältige Möglichkeiten aus, an seitlich und rückwärtig befindlichen Anschlüssen zusätzliche Komponenten aufzunehmen, sowie Licht ein- bzw. auszukoppeln. Insbesondere der Kompatibilität der Anschlüsse mit IR-Strahlung kommt große Bedeutung zu, da die Anregung von Multiphotonen-Prozessen, wie CARS und 2PF gewöhnlich im NIR erfolgt. Ferner verfügt das IX81 über einen motorisierten Fokusantrieb mit einer Schrittweite von 10 nm, sowie die Möglichkeit, diesen



**Abbildung 4.13:** Fotografie des Moduls Olympus IX81 Mikroskop. Der Übersicht halber wurde der Strahlengang nur ab dem linken Mikroskopeingang (siehe auch Abbildung 4.10) eingezeichnet.

und andere motorisierte Komponenten über einen Computer fernzusteuern. Ermöglicht wird dies über die Kontrolleinheit IX2-UCB (Olympus) des IX81, welche über einen RS232-Anschluss (COM-Port) mit einem Computer bzw. der darauf installierten Treibersoftware IX2-BSW (Olympus) kommuniziert. Zum Schutz vor Umgebungslight ist das IX81 mitsamt dem Laserscanner und den Detektoren in einem lichtdichten Gehäuse untergebracht. Eine Fotografie des Moduls mit eingezeichnetem Strahlengang ist in Abbildung 4.13 dargestellt.

Die Montage des IX81 auf dem optischen Tisch ist über eigens angefertigte Aluminium-Sockel realisiert, welche ihrerseits sowohl mit dem IX81, als auch mit dem optischen Tisch fest verschraubt sind. Diese Maßnahme ist notwendig, um den linken Anschluss des IX81 auf die Standardhöhe des Aufbaus von 14,5 cm anzuheben, über den letztlich die Einkopplung des Laserstrahles erfolgt. Die Wahl des linken Anschlusses zur Einkopplung des Laserstrahls ist dabei auch unter sicherheitstechnischen Aspekten sinnvoll. In seiner ursprünglichen Konzeption bietet das IX81 als invertiertes Mikroskop die Möglichkeit, durch die Probe transmittiertes Licht wahlweise

über das Okular oder den linken Anschluss zu beobachten. (Auch andere Anschlüsse stehen hierfür zur Verfügung, was jedoch unter dem vorliegenden Aspekt nicht von Bedeutung ist.) Die Aktivierung des linken Anschlusses bedingt eine Deaktivierung des Okulars – ein zeitgleiche Aktivierung von Okular und linkem Anschluss ist nicht möglich, wodurch eine Verletzung der Augen durch rückgestreutes Laserlicht bei Blick durch das Okular verhindert wird.

Nach Einkopplung des Laserstrahls in den linken optischen Seiteneingang des Mikroskops passiert dieser zunächst die so genannte Fluoreszenzmodulkassette (IX2-RFAC, Olympus). In diesem Bauteil können bis zu sechs so genannte Fluoreszenzwürfel installiert und rotatorisch in den Strahlengang eingefahren werden. Hauptaufgabe der Fluoreszenzwürfel ist das Tragen eines dichroitischen Strahlteilers, sowie gegebenenfalls eines Sperr- und Anregungsfilters, wobei letztere im vorliegenden Aufbau nicht benötigt werden. Der Aufbau des Multiphotonen-Mikroskops sieht vor, dass die Fluoreszenzwürfel jeweils das Anregungslicht transmittieren und rückwärtig gesammelte Signalphotonen aus dem Strahlengang der Anregung auskoppeln, sowie ein Durchdringen der Anregungsstrahlung zum Detektor mittels Sperrfilter verhindern.

Das IX81 verfügt über einen motorisierten Revolver für bis zu sechs Objektive, welche den eingekoppelten Laserstrahl auf die Probe fokussieren. Die Steuerung des Objektiv-Revolvers erfolgt dabei ausschließlich ferngesteuert über die Software IX2-BSW (siehe unten). Zu Justage-Zwecken ist eine Objektiv-Fassung mit einem Diffusor (DG10-120-B, Thorlabs) belegt. Mit dem UPlanSApo 60x 1.2 W CARS (Olympus) steht ein speziell für die Multiphotonen-Mikroskopie entwickeltes Objektiv zur Verfügung. In Verbindung mit dem Laserscanner (siehe Kapitel 4.9) ermöglicht es das Abrastern eines  $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$  großen Feldes bei einer lateralen bzw. axialen (theoretischen) Auflösung von ca. 260 nm bzw. ca. 670 nm. Als Wasserimmersions-Objektiv erfordert es einen Tropfen reinen Wassers zwischen Objektiv und Objektträger. Letzterer muss sehr dünn sein, da der Arbeitsabstand des Objektivs mit 0,28 mm zu gering für gewöhnliche Objektträger ist. Es empfiehlt sich daher die Verwendung eines Deckglases als Objektträger, nicht zuletzt auch aufgrund

der geringeren Gruppengeschwindigkeitsdispersion. Das UPlanS-Apo 60x 1.2 W CARS verfügt über eine Deckglaskorrektur (0,13-0,21 mm), welche über den, am Objektiv drehbar gelagerten Ring auf die jeweilige Stärke des Deckglases eingestellt werden muss.

Die Detektion der Signalphotonen kann über zwei Wege geschehen. Für CARS, welches typischerweise in Ausbreitungsrichtung des Anregungsstrahls detektiert wird (Forward-CARS), bietet sich die Nutzung des Kondensors (IX-LWUCD, Olympus) an, um Signalphotonen auf eine darüber befindliche PMT (siehe auch 4.11.2) zu lenken. Zur Unterdrückung des Anregungslichtes steht ein Adapter zur Aufnahme eines dielektrischen Filters zur Verfügung, welcher zwischen die Linsen des Kondensors eingebracht wird. Zu beachten ist, dass die optimale Wirkung dielektrischer Filter nur für kollimiertes Licht gegeben ist, weshalb die korrekte Fokussierung des Kondensors essentiell ist. Für 2PF geschieht die Detektion üblicherweise in rückwärtiger Richtung (Epi-Detektion), sodass Belichtung der Probe und Erfassen der Signalphotonen durch dasselbe Objektiv geschehen. Die Auskopplung der Signalphotonen aus dem Anregungsstrahlengang geschieht hier anhand der zuvor beschriebenen Fluoreszenzwürfel. Der Aufbau des Multiphotonen-Mikroskops sieht dabei vor, dass die Auskopplung der Signalphotonen vor Passage des Laserscanners geschieht, was auch als „nicht-entscannt“ (*engl. non-descanned*) bezeichnet wird. Diese Anordnung birgt die Problematik eines nicht-statischen Signal-Strahlengangs während des Abrasterns der Probe mit dem Anregungsstrahl. Jedoch überwiegt im Fall der Multiphotonen-Mikroskopie der Vorteil einer kürzestmöglichen Distanz zwischen Probe und Detektor, sowie einer minimalen Anzahl optischer Komponenten im Signalstrahlengang, wodurch Signalverluste, sowie der Einfluss von Streustrahlung minimiert werden. Die Auswirkung eines nicht-statischen Signalstrahlengangs kann durch sorgfältige Justage und Fokussierung desselben auf den Detektor minimiert werden.

## 4.11 Detektion

Die Beobachtung von Multiphotonen-Prozessen, wie CARS und 2PF stellt besondere Anforderungen an die verwendeten Detektoren. Verglichen mit gewöhnlicher Fluoreszenz durch 1PA, gehören CARS und 2PF zu den eher seltenen und damit intensitätsschwachen Vorgängen. Zudem beträgt die Intensität der Anregungsstrahlung im Fokus typischerweise  $<10$  mW und damit weniger als 0,2 nJ pro Puls, um die Strahlenbelastung der Probe zu begrenzen. Dass ein Anregungspuls unter diesen Umständen nicht ein einziges Signal-Photon in der Probe erzeugt, ist daher eher die Regel, denn die Ausnahme. Die spektrale Empfindlichkeit bzw. Quanteneffizienz des Detektors muss daher ausreichend sein, um auch einzelne Photonen sicher registrieren bzw. zählen zu können. Im Folgenden wird auf Detektoren eingegangen, welche während der Entwicklung des Multiphotonen-Mikroskops von Bedeutung waren.

### 4.11.1 Hamamatsu R955

Der R955 ist ein Photoelektronenvervielfacher (*engl. photomultiplier tube, PMT*) des Herstellers Hamamatsu, welcher in der Frühphase der Konstruktion des Multiphotonen-Mikroskops zum Einsatz kam. Die spektrale Empfindlichkeit des R955 deckt den Bereich 160-900 nm ab, wobei die Quanteneffizienz im 2PF-relevanten Bereich bei ca. 10%, im CARS-relevanten Bereich bei 3-7% liegt. Zum Schutz vor Umgebungs- bzw. Streulicht ist der R955 in einem eigens angefertigten, lichtdichtem Gehäuse aus eloxiertem Aluminium untergebracht. Die Montage des Gehäuses erfolgt direkt auf dem Kondensator des Mikroskops. Die Hochspannungs-Versorgung des R955 erfolgt über ein spezielles Hochspannungs-BNC-Kabel, während Messsignale über ein reguläres BNC-Kabel ausgeschleift werden – Verwechslungen bzw. fehlerhafte Verkabelung sind ausgeschlossen, da beide Anschluss-Typen miteinander inkompatibel sind. Wie für PMT's üblich, gibt auch der R955 Messsignale in Form von (schwachen) Strompulsen aus. Diese wurden im Anschluss von einem schnellen Verstärker (VT120, ORTEC) hochverstärkt und an einem nachgeschalteten, selbstgebauten Transimpedanz-Wandler in

Spannungspulse umgewandelt, welche von einer NI-Karte (NI PCI-6731, National Instruments) als Ereignisse gezählt werden sollten.

Der R955 wurde im späteren Verlauf des Aufbaus durch andere Detektoren ersetzt, da es wiederholt zu Problemen mit der Erfassbarkeit der ausgegebenen Messsignale kam. Zudem konnte nicht sichergestellt werden, dass der verwendete R955 unbeschädigt war bzw. aufgrund seines hohen Alters keine Degradationserscheinungen zeigte. Er wurde daher durch die Modelle H7421-50 bzw. C11208-02 (siehe Kapitel 4.11.2 bzw. 4.11.3) ersetzt.

#### **4.11.2 Hamamatsu H7421-50**

Die H7421-50 (Hamamatsu) ist eine PMT, welche vorrangig der Aufnahme von CARS-Signalen dient. Zu diesem Zweck ist die Photokathode dieser PMT aus dem Halbleitermaterial Galliumarsenid (GaAs) und nicht wie sonst üblich aus einer Legierung verschiedener Alkalimetalle (Multi-Alkali) gefertigt. Diese Maßnahme verschiebt die spektrale Empfindlichkeit der Photokathode überwiegend in den roten und nah-infraroten Spektralbereich, in welchem Multi-Alkali-Photokathoden, wie beispielsweise die R955 (siehe Kapitel 4.11.1), tendenziell eher geringe Sensitivität aufweisen. Die spektrale Empfindlichkeit der H7421-50 deckt dabei den Bereich 380-890 nm ab und erreicht bei ca. 800 nm ihr Maximum. Im CARS-relevanten Bereich beträgt die Quanteneffizienz ca. 12%. Durch thermoelektrische Kühlung kann der Dunkelstrom auf deutlich unter 400 Ereignisse pro Sekunde reduziert werden, was die H7421-50 in die Lage versetzt, auch extrem geringe Lichtintensitäten noch erfassen zu können. Die Ausgabe der Signale zur Photonenzählung erfolgt nach Verarbeitung durch die interne Elektronik als TTL-Puls.

Die Photokathode der H7421-50 ist extrem empfindlich gegenüber hohen Lichtintensitäten und bereits normales Umgebungslicht kann zu irreversiblen Beschädigungen führen. Die Vorderseite der H7421-50 wurde daher mit einer Blende aus Eigenbau versehen, welche zum Überführen der PMT zwischen verschiedenen Einsatzorten lichtdicht geschlossen werden kann. Die Blende dient gleichzeitig

als Einschub, sodass die H7421-50 über ebenfalls angefertigte Adapter sowohl auf dem Kondensator des Mikroskops installiert werden kann (siehe dazu auch Abbildung 4.13), wie es für reguläre CARS-Messungen der Fall ist, als auch am rückwärtigen Ausgang des Mikroskops, wie es beispielsweise zur Aufnahme von Epi-CARS-Signalen nötig ist.

### 4.11.3 Hamamatsu C11208-02

Der C11208-02 (Hamamatsu) ist ein Silizium-Photoelektronenvervielfacher (*engl. silicon-photomultiplier tube, SiPMT*) und stellt somit das Halbleiteräquivalent zur gewöhnlichen PMT dar. Als Sensor dient dem C11208-02 eine Matrix aus insgesamt 400 Avalanche-Photodioden (APD). Die spektrale Empfindlichkeit des C11208-02 deckt mit 320-900 nm den gesamten sichtbaren Spektralbereich ab, sowie Teile der angrenzenden UV- und NIR-Bereiche. Die höchste Sensitivität wird bei 440 nm erreicht. Im 2PF-relevanten Bereich beträgt die Quanteneffizienz ca. 20-40%, im CARS-relevanten Bereich ca. 8-15%. Der C11208-02 verfügt über eine integrierte Elektronik zur Signalaufbereitung. Diese verstärkt die Strompulse, welche von einzelnen Photonen ausgelöst werden und wandelt sie anschließend mittels Transimpedanz-Wandlung in Spannungspulse um. Sofern die Spannungspulse einen gewissen Schwellenwert überschreiten, löst ein nachgeschalteter Komparator einen TTL-Puls aus, welcher der Einzelphotonen-Zählung dient. Der Schwellenwert des Komparators kann softwareseitig in 9 Stufen eingestellt werden. Die Spannungsversorgung geschieht, ebenso wie die Kommunikation mit einem Computer über USB.

Im Vergleich zum H7421-50 (siehe 4.11.2) weist der C11208-02 insbesondere im 2PF-relevanten Bereich eine deutlich höhere Quanteneffizienz auf. Auch die Zähl-Linearität fällt mit ca.  $5 \cdot 10^6$  Ereignissen pro Sekunde etwas höher aus, im Vergleich zu einem Wert von  $1,5 \cdot 10^6$  für die H7421-50. Zudem erweist sich der C11208-02 durch seine Realisierung in Halbleiter-Bauweise als äußerst robust gegenüber hohen Lichtintensitäten. Wird der Sensor der C11208-02

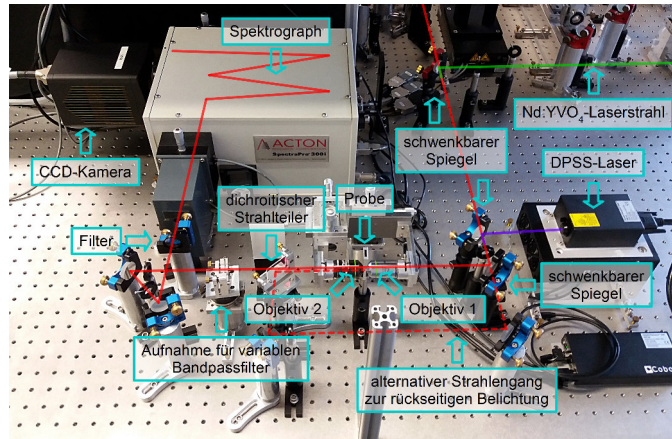
im aktivierten Zustand einer zu hohen Lichtintensität ausgesetzt, unterbricht die interne Elektronik die Spannungsversorgung des Sensors und schaltet diesen aus, bevor es zur Beschädigung des Sensors kommt. Nachteilig ist der, für SiPMT's typische, hohe Dunkelstrom des C11208-02, welcher trotz thermoelektrischer Kühlung des Sensors auf  $-10^{\circ}\text{C}$  laut Hersteller etwa 30.000 Ereignisse pro Sekunde beträgt, bei niedrigstem Schwellenwert des Komparators. (Vergleichend hierzu beträgt der Dunkelstrom der H7421-50, wie sie in Kapitel 4.11.2 beschrieben wird, laut Hersteller typischerweise nur etwa 125 Ereignisse pro Sekunde.)

Der C11208-02 dient daher vorrangig als Detektor für den 2PF-Betrieb des Mikroskops in der Epi-Geometrie (siehe dazu auch Abbildung 4.13). Dabei wird das zurückgestreute Fluoreszenzlicht mithilfe des zur Anregung eingesetzten Objektivs kollimiert. Noch bevor das Fluoreszenzlicht den Laserscanner erreicht, wird es von einem dielektrischen Strahlteiler ausgekoppelt und auf den hinteren Ausgang des Mikroskops gelenkt. Aus Platzgründen erfolgt hier eine Umlenkung des Fluoreszenzlichts an einem Silberspiegel (PF10-03-P01, Thorlabs) auf den Detektor. Die aktive Detektorfläche beträgt lediglich  $1\text{ mm}^2$ , sodass eine Fokussierung des Fluoreszenzlichts auf den Detektor mittels einer gewöhnlichen Sphärenlinse ( $f = 20\text{ mm}$ , Quarzglas) unumgänglich ist. In dieser „nicht-entscanned Detektion“ (engl. *non-descanned detection*) genannten Anordnung wird der Verlust von Signal-Photonen minimiert, indem die Registrierung derselben so nah wie möglich am Probenort geschieht, wobei die Anzahl der optischen Komponenten zwischen Probenort und Detektor auf ein Minimum reduziert ist.

### 4.12 Mikroskopie-Software ImSpector

Die Mikroskopie-Software ImSpector (Abberior Instruments) dient vorrangig der Ansteuerung des Galvoscanners, sowie der Datenakquise und Bildverarbeitung. Die Kommunikation mit den einzelnen Komponenten verläuft über eine NI-Karte (NI PCI-6731, National Instruments).



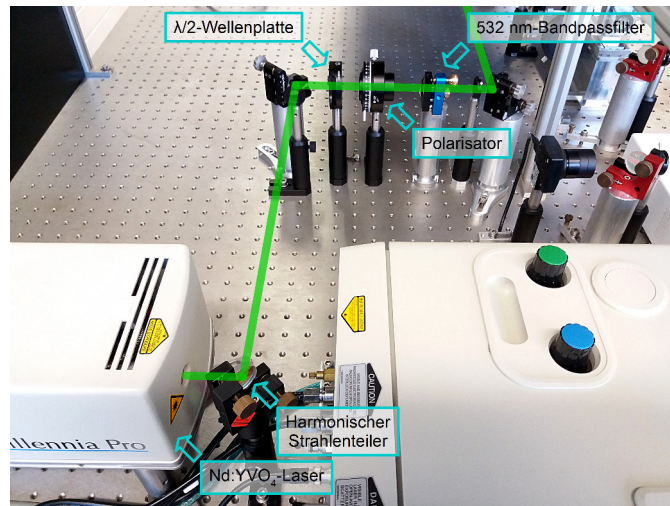


**Abbildung 4.14:** Fotografie des Moduls Spektroskopie mit eingezeichneten Strahlengängen.

Für zeitaufgelöste Messungen von Bedeutung ist, dass ImSpector neben Einzelaufnahmen auch Serienaufnahmen unterstützt. Letztere sowohl in Endlosschleife, wobei die jeweils aktuelle Aufnahme die Daten der vorherigen Aufnahme überschreibt, als auch zeitlich gesteuert. Über die Option „Timer“ wird die zeitlich gesteuerte Aufnahme aktiviert, wobei Zeitintervall und Anzahl der Bilder frei gewählt werden können. Zusätzlich besteht die Möglichkeit ein Aufnahme-Schema mit veränderlichen Intervallen zu definieren.

## 4.13 Spektroskopie

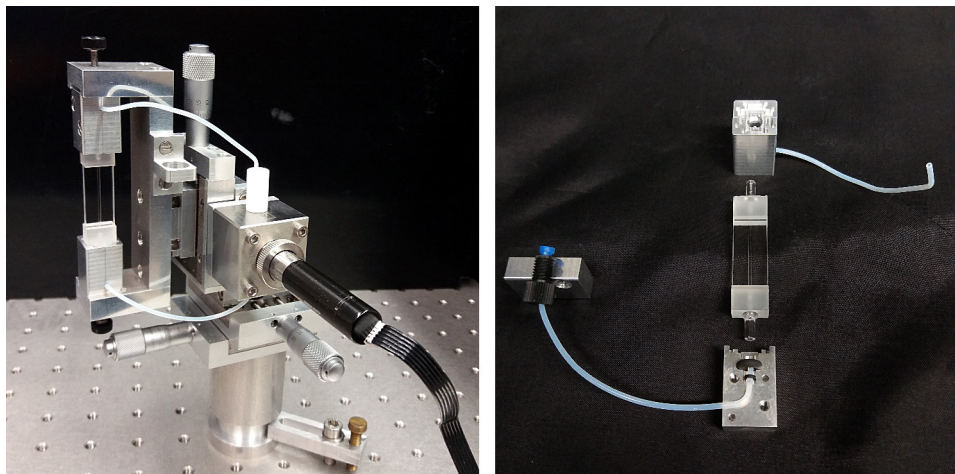
Das Modul Spektroskopie umfasst einen Aufbau, welcher zusätzlich zur Multiphotonen-Mikroskopie auch die Durchführung diverser Spektroskopie-Varianten ermöglicht, allen voran CARS-, 2PF- und Raman-Spektroskopie. Um diesem Anspruch gerecht zu werden, wurde das Modul möglichst variabel in der Strahlführung gestaltet. Über schwenkbar gelagerte Spiegel besteht die Möglichkeit, anstelle des (sofern erforderlich frequenzverdoppelten) Ti:Sa-Lasers die Emission des Nd:YVO<sub>4</sub>-Lasers mit einer Wellenlänge von 532 nm einzukoppeln. Alternativ kann auch ein DPSS-Laser (Zouk (355 nm), Flamenco (660 nm), Cobolt) eingekoppelt werden, wie dies in Abbildung 4.14 dargestellt ist.



**Abbildung 4.15:** Fotografie des Moduls Tsunami-Lasersystem mit Fokus auf den Nd:YVO<sub>4</sub>-Laser und eingezeichnetem Strahlengang. Der Strahl des Nd:YVO<sub>4</sub>-Lasers wird hier durch den schwenkbar gelagerten, harmonischen Strahlenteiler in Richtung des Moduls Spektroskopie ausgekoppelt. Das Ausschwenken des harmonischen Strahlenteilers aus dem Strahlengang koppelt den Nd:YVO<sub>4</sub>-Laser in den Ti:Sa-Laser ein.

Zur Einkopplung des Nd:YVO<sub>4</sub>-Lasers in das Modul Spektroskopie muss dessen Strahlengang wie in Abbildung 4.15 gezeigt abgeändert werden: durch Einschwenken des harmonischen Strahlenteilers (SIG-098-0280, Laser2000) wird der Strahlengang des Nd:YVO<sub>4</sub>-Lasers aus dem Pump-Betrieb des Ti:Sa-Lasers ausgelenkt. Nach Passage einer Kombination aus einer  $\lambda/2$ -Wellenplatte und einem Polarisator zur Intensitätskontrolle, sowie einem Bandpassfilter zur spektralen Aufreinigung, wird der Strahl des Nd:YVO<sub>4</sub>-Lasers an das Modul Spektroskopie weitergeleitet.

Nach Einkopplung des gewünschten Laserstrahls erlaubt ein weiterer schwenkbar gelagerter Spiegel die Wahl zwischen vorder- und rückseitiger Belichtung der Probe. Für CARS empfiehlt sich dabei die vorderseitige Belichtung – eine rückseitige Belichtung (Epi-CARS) ist nur im Fall von mikrostrukturierten Proben sinnvoll –, während in allen anderen Fällen die Wahl der Belichtungs-Geometrie den Anforderungen des Experimentes entsprechend getroffen werden kann. Im Fall der rückseitigen Belichtung erfolgt die Einkopplung des Anregungsstrahles bzw. die Auskopplung des Signals über einen dichroitischen Strahlenteiler.



**Abbildung 4.16:** Fotografie des Durchflussküvettensystems (links) und des Adapters zur Aufnahme der Küvette (rechts). Der untere Adapter wurde geöffnet, sodass der Blick in sein Inneres frei liegt.

Die Probenfassung ist für Küvetten ausgelegt, deren Außenmaße  $45 \times 12,5 \times 3,5$  mm (H×B×T) betragen, bei einer Schichtdicke von 1 mm (z.B. 100-1-40, Hellma Analytics). Ein Austausch gegen andere Fassungen ist prinzipiell möglich. Dabei muss der Arbeitsabstand (*engl. working distance*) der Mikroskop-Objektive berücksichtigt werden, welcher je nach Modell nur 1-2 mm beträgt. Sollte ein kontinuierlicher Probenaustausch notwendig sein, so steht alternativ eine eigens entworfene Fassung für Durchflussküvetten (130.199-QS, Hellma Analytics) zur Verfügung, wie sie Abbildung 4.16 zu sehen ist. Die Umwälzung der Probe wird hier von einer Mikro Zahnringpumpe (mzr-2921, HNP Mikrosysteme) durchgeführt. Das Durchflussküvettensystem ermöglicht einen stabilen (bläschen-freien) Umwälz-Betrieb bis hinab zu lediglich  $350 \mu\text{l}$  Probenvolumen, sofern die in Abbildung 4.16 dargestellte Konfiguration angewendet wird. Die Probe wird dabei von der Mikro Zahnringpumpe direkt aus dem aufgeschraubten Vorratsbehälter aus Teflon-Kunststoff angesaugt, um entgegen der Schwerkraft durch die Durchflussküvette gepumpt zu werden. Eventuell mitgenommene Luftbläschen werden so schnell aus dem Fokus der Anregungsstrahlung entfernt.

Die Fokussierung auf die Probe geschieht durch Mikroskopobjektive. Diese sind mittels Linearverschiebetischen in alle drei Raumrichtungen frei positionierbar. Die Positionierung von Objektiv 2 erfolgt dabei über einen Satz von Linearverschiebetischen relativ zu

Objektiv 1, während beide Objektive über einen weiteren Satz von Linearverschiebetischen relativ zum Anregungsstrahl bewegt werden können. Diese Anordnung erlaubt beispielsweise bei Experimenten mit Mehrphotonen-Anregung die Verschiebung des Fokus innerhalb der Probe, bei gleichzeitiger Beibehaltung der Objektiv-Anordnung relativ zueinander. Zur Justage der Objektive empfiehlt es sich, die Objektive in der Reihenfolge ihrer Nummerierung zu justieren. Im Fall rückwärtiger Belichtungsgeometrie, beispielsweise bei Raman-Spektroskopie, muss lediglich Objektiv 2 justiert werden.

Der Signalstrahl wird schlussendlich über zwei Spiegel in den Spektrographen (SpectraPro 300i, Acton Research Corporation) eingekoppelt, wodurch völlige Justagefreiheit gewährleistet ist. Zusätzlich in den Strahlengang eingebrachte Filter unterdrücken dabei die intensive Anregungsstrahlung und bewahren die thermoelektrisch gekühlte CCD-Kamera (EEV 400×1340F, Roper Scientific) so vor Strahlungsschäden. Die Fokussierung des Signalstrahls auf den Eintrittsspalt des Spektrographen geschieht durch eine Quarz-Linse, deren Fokallänge von  $f = 20$  mm genügend Divergenz erzeugt, um das optische Gitter im Spektrographen vollständig auszuleuchten. Die Öffnung des Eintrittsspalts kann mittels einer Mikrometerschraube angepasst werden. Da der Spektrograph eine 1:1-Abbildung des eintretenden Lichtes auf den Detektor projiziert, empfiehlt es sich, die Öffnung des Eintrittsspalts entsprechend der Pixelbreite der CCD-Kamera von  $20 \mu\text{m}$  zu wählen. Geringere Spaltbreiten verschlechtern das Signal-zu-Rausch-Verhältnis und können zu Problemen durch auftretende Beugungseffekte führen, während höhere Spaltbreiten das Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf Kosten der spektralen Auflösung erhöhen. Die Bauweise des Spektrographen entspricht einer Czerny-Turner-Geometrie, wobei anstelle eines einzelnen, fest verbauten Gitters eine Aufnahme für bis zu drei optische Gitter tritt. Für Raman-Spektroskopie im UV-Bereich eignet sich insbesondere das optische Gitter mit einer Liniendichte von 2400 Linien/mm. Weiterhin stehen Gitter mit Liniendichten von 300 und 600 Linien/mm zur Auswahl. Die Ansteuerung des Spektrographen, sowie der CCD-Kamera geschieht über die Software WinSpec (Princeton Instruments).

# Kapitel 5

## DFHBI-bindendes RNA-Aptamer

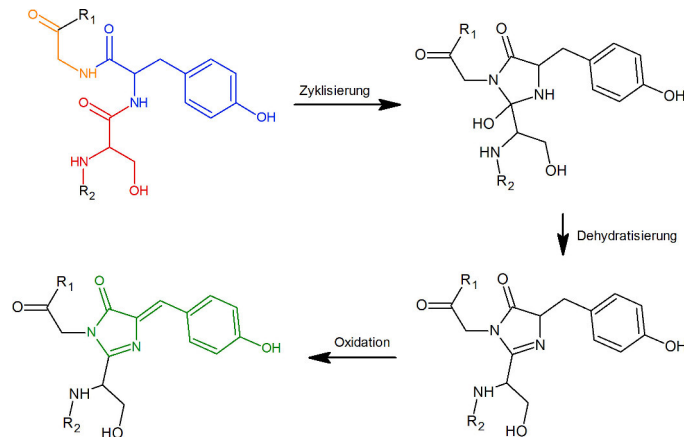
### 5.1 Einführung

Die Forschung an Ribonukleinsäure (RNA, *engl. ribonucleic acid*) und insbesondere deren Funktion im Organismus stellt eine besondere Herausforderung dar. Im Fall von Boten-RNA (mRNA, *engl. messenger ribonucleic acid*) mag eine Sequenzanalyse noch genügend Informationen liefern, um daraus auf das codierte Protein und eventuell auch dessen Funktion schließen zu können. Der größte Teil des Genoms eines Organismus (ca. 98%) codiert jedoch „nichtcodierende“ RNA (ncRNA, *engl. non-coding ribonucleic acid*), welche nicht in Proteine übersetzt wird und deren Sequenz kaum Rückschlüsse auf ihre Funktion zulässt [3]. Ein wichtiger Schritt hin zum Verständnis der Rolle einer bestimmten ncRNA besteht daher in der Visualisierung ihrer Verteilung innerhalb der Zelle, um so wertvolle Hinweise auf ihre Funktion zu erhalten.

Üblicherweise ist die Fluoreszenzmikroskopie die Methode der Wahl, um die Verteilung von RNA in Zellen zu studieren. Dies setzt jedoch eine spezifische Fluoreszenz der Ziel-RNA voraus, welche zunächst realisiert werden muss. Die naheliegendste Möglichkeit dafür besteht in der chemischen Markierung der Ziel-RNA mit einem Fluorophor [43] bzw. einem „Molecular Beacon“, dessen fluorophorgekoppelte RNA-Sequenz komplementär zur Ziel-RNA ist [44]. Die

Komplexität der damit verbundenen Präparationsverfahren, welche teilweise auf Expression der Ziel-RNA *in vitro* und anschließender Mikroinjektion in die Zelle basieren, wirkt sich jedoch limitierend auf die Anwendbarkeit dieser Methoden aus [3]. Die Expression fluoreszenter Ziel-RNA direkt in der Zelle stattfinden zu lassen, wie es das Konzept der genetisch codierten RNA-Marker vorsieht, stellt daher eine wesentliche Vereinfachung dar. Ein prominentes Beispiel hierfür ist das GFP-MS2-System, in welchem ein GFP-MS2-Fusionsprotein an eine MS2-bindende Stelle am 3'-Ende der (modifizierten) Ziel-RNA bindet [45]. Problematisch ist jedoch die Untergrund-Fluoreszenz durch ungebundenes GFP-MS2, welche sich negativ auf das erzielbare Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) auswirkt. Zur Unterdrückung der Untergrund-Fluoreszenz existieren diverse erweiterte Konzepte, beispielsweise „Split GFP“, welches die Aufteilung des GFP-Fluorophors in zwei nicht-fluoreszente Fragmente vorsieht. Erst nach erfolgter Bindung an die Ziel-RNA bilden beide Fragmente zusammen einen GFP-Fluorophor [46]. Die Fusion der Fragmente nimmt dabei etwa 30 min in Anspruch [47] – zusätzlich zur vorangegangenen Expression von Ziel-RNA und den Fluorophor-Fragmenten –, wodurch die Beobachtung erst kürzlich exprimierter RNA kaum möglich ist. Weil GFP auch ohne angehängte RNA fluoreszent ist und es durch Degradation der markierten Ziel-RNA zu einer Anreicherung von freiem GFP in der Zelle kommen kann, besteht die Gefahr einer Verfälschung der Messergebnisse. Eine andere Limitierung entsteht durch das photoinduzierte Bleichverhalten von GFP, welches verglichen mit synthetischen Fluorophoren relativ schnell und überwiegend irreversibel verläuft.

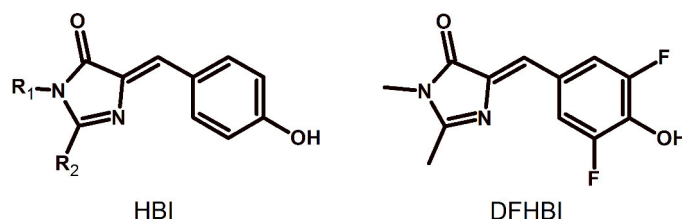
Einen Ansatz, welcher die vorhergehenden Problematiken weitestgehend vermeidet, stellen RNA-Aptamere dar, welche die Fluoreszenz eines, in freier Form praktisch nicht fluoreszenten Moleküls durch Bindung desselben deutlich steigern. Das Aptamer (von lateinisch *aptus*, ‚passen‘ und altgriechisch *meros*, ‚Gebiet‘) ist dabei ein einzelsträngiges Oligonukleotid (DNA oder RNA) bzw. Peptid, welches ein Ziel-Molekül spezifisch über seine 3D-Struktur binden kann – vergleichbar einem Antikörper, wenn auch mit wesentlich geringerem Molekulargewicht. Die Flexibilität von Oligonukleotiden in Bezug auf ihre räumliche Gestalt und die schier endlose Vielfalt



**Abbildung 5.1:** Der GFP-Chromophor (grün) bildet sich infolge einer autokatalytischen Zyklisierungsreaktion aus den benachbarten Aminosäuren Serin<sub>65</sub> (rot), Tyrosin<sub>66</sub> (blau) und Glycin<sub>67</sub> (orange).

an möglichen Sequenzen erlaubt es, Aptamere gegen praktisch alle denkbaren Zielverbindungen zu finden. Das „Training“ eines Aptamers gegen eine Zielverbindung geschieht dabei über ein „Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung“ (SELEX) genanntes Verfahren [48, 49]. Die Entwicklung eines RNA-Aptamers [50], welches die Fluoreszenz von Malachitgrün, einem Triphenylmethanfarbstoff durch Bindung desselben um drei Größenordnungen erhöht, war ein erster Schritt in Richtung dieser neuen Methode zur Fluoreszenzmarkierung von RNA. Eine Anwendung *in vivo* scheiterte jedoch vorerst an den cytotoxischen Eigenschaften von Malachitgrün, welches nach Photoanregung zur Radikalbildung neigt [51].

Der Durchbruch gelang schließlich nach Orientierung am Vorbild Natur. Soweit bekannt, umfasst der Reifeprozess des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) unter Anderem eine autokatalytische Zyklisierungsreaktion der drei Aminosäuren Serin<sub>65</sub>, Tyrosin<sub>66</sub> und Glycin<sub>67</sub> [52], wie sie in Abbildung 5.1 dargestellt ist. Der resultierende GFP-Chromophor 4-(p-Hydroxybenzylidene)imidazolidin-5-on (HBI) ist dabei in seiner intakten Proteinumgebung fluoreszent, nicht jedoch in denaturiertem GFP sowie in seiner isolierten Form. Dies deutet auf spezifische Wechselwirkungen zwischen



**Abbildung 5.2:** Strukturvergleich zwischen dem GFP-Chromophor HBI (links) und seinem synthetischen Gegenstück DFHBI (rechts).

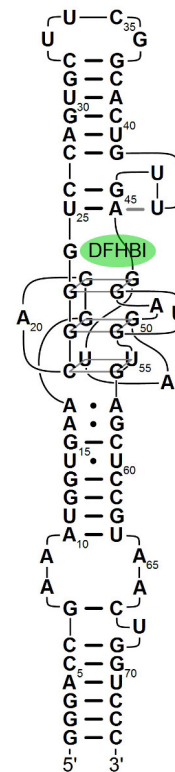
HBI und der Tertiärstruktur des GFP's hin, welche die Fluoreszenz von HBI als Energieabgabepfad nach Photoanregung gegenüber der sonst vorherrschenden strahlungslosen Deaktivierung favorisieren [53, 54]. In einer 2011 publizierten Studie wurden diverse HBI-Derivate synthetisiert, um anschließend mittels SELEX passende RNA-Aptamere zu erhalten [2]. Gute Ergebnisse bezüglich der Fluoreszenz-Aktivierung wurden unter Anderem mit 4-(3,5-Difluoro-4-hydroxybenzyliden)-1,2-dimethyl-imidazolidin-5-on (DFHBI) erzielt (siehe auch Abbildung 5.2). Experimente mit DFHBI *in vivo* zeigten keine cyto- oder phototoxischen Eigenschaften dieser Substanz. Zudem erwies sich DFHBI als membrangängig, wodurch es nicht gezielt in die Zelle eingebracht werden muss. Aufgrund seiner grünen Fluoreszenz erhielt der DFHBI-Aptamer-Komplex den Spitznamen eines grünen Gemüses: „Spinach“ (dt. Spinat). Spinach ist dabei praktisch frei von unerwünschter Hintergrundfluoreszenz und wurde bereits erfolgreich zur Beobachtung ribosomaler RNA in HEK-293T-Zellen [2], sowie in *Escherichia coli* zur intrazellulären Lokalisation von Metaboliten [55] und der Visualisierung von Proteinexpression [56] eingesetzt.

Studien zur Kristallstruktur von Spinach [57, 58] legen nahe, dass die Aktivierung der Fluoreszenz von DFHBI im Wesentlichen auf dessen Fixierung in eine planare Konformation beruht. Wie in Abbildung 5.3 skizziert, bildet das Aptamer eine Doppellage aus zwei G-Quadruplexen aus, welche dem DFHBI-Liganden über hydrophobe Wechselwirkung als planare Auflagefläche dienen. Zusätzliche Wechselwirkungen mit Nukleotiden in der unmittelbaren Umgebung des Liganden, beispielsweise eine G<sub>24</sub>-vermittelte Wasserstoffbrückenbindung zum Keto-Sauerstoff des DFHBI-Liganden, stabilisieren dessen planare Konformation und schränken seine Beweglichkeit ein. Die Aktivierung der Fluoreszenz in Spinach ähnelt

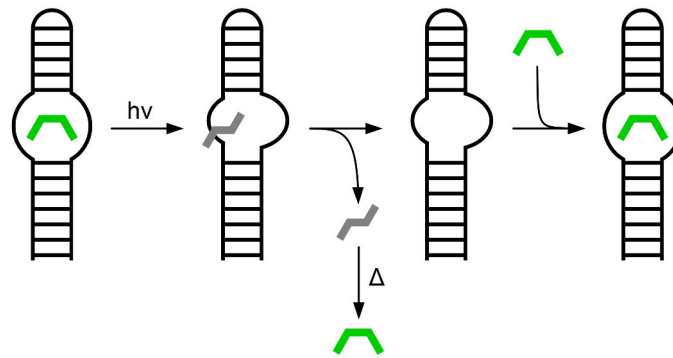


daher prinzipiell derjenigen in GFP. In beiden Systemen ist die planare Konformation des Chromophors von entscheidender Bedeutung [59, 60]. Abweichend zu Spinach erzielt GFP die planare Konformation seines Chromophors jedoch nicht über  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen planaren Heterozyklen, sondern durch Van-der-Waals-Kontakte des Chromophors mit aliphatischen Gruppen des Proteingerüsts.

Die photophysikalischen Eigenschaften von Spinach sind teilweise vergleichbar mit GFP. Hierzu zählen vor allem die Fluoreszenzspektren beider Spezies, sowie die Intensität der Fluoreszenz, welche für Spinach 80% relativ zu GFP beträgt und die Fluoreszenz-Quantenausbeute, welche im Fall von Spinach zu 72%, im Fall von GFP zu 79% bestimmt wurde [2]. Deutliche Unterschiede zwischen beiden Systemen zeigen sich in deren (1-Photonen-induziertem) Bleichverhalten. Im direkten Vergleich bleicht die Fluoreszenz von Spinach bei kontinuierlicher Belichtung bedeutend schneller, als die von GFP. Während das photoinduzierte Bleichen der Fluoreszenz für GFP jedoch einen irreversiblen Prozess darstellt, offenbart Spinach eine gewisse Resistenz gegenüber einem endgültigen Ausbleichen [2], indem sich dessen Fluoreszenzintensität während einer Dunkelphase und in Anwesenheit eines Überschusses an freiem DFHBI wieder auf nahezu den Ausgangswert erholt [6, 7]. Als zugrunde liegender Mechanismus, wie er auch in Abbildung 5.4 skizziert ist, wird eine photoinduzierte *cis-trans*-Isomerisation des gebundenen DFHBI-Liganden diskutiert. Die Quantenausbeute der Photoisomerisation wurde zu 2,5% bestimmt [7]. Für den daraus resultierenden *trans*-DFHBI-Aptamer-Komplex wurde eine stark verminderte Intensität der Fluoreszenz, sowie eine



**Abbildung 5.3:** Sequenz des Aptamers, wie es im vorliegenden Projekt zum Einsatz kam.



**Abbildung 5.4:** Darstellung des diskutierten Mechanismus der Fluoreszenz-Regenerierung von Spinach bei Vorlage eines Überschusses an *cis*-DFHBI (grün). Die Rückisomerisierung von *trans*-DFHBI (grau) nach *cis*-DFHBI erfolgt dabei thermisch.

geringere Stabilität berichtet [7]. Letzteres deckt sich mit den Ergebnissen der Kristallstrukturanalyse von Spinach, welche sterische Konflikte, sowie eine verminderte Zahl an Wasserstoffbrückenbindungen zwischen *trans*-DFHBI und der Chromophor-Bindetasche des Aptamers vorhersagen [58]. Zudem konnte in Fluoreszenz-Lebensdauer-Analysen keine Akkumulation eines nur schwach fluoreszenten Spinach-Komplexes beobachtet werden [6]. Der diskutierte Mechanismus der Fluoreszenz-Regenerierung von gebleichtem Spinach sieht daher eine schnelle Dissoziation des *trans*-DFHBI-Aptamer-Komplexes vor. Dieser Prozess wird möglicherweise zusätzlich durch eine Deformation der DFHBI-Bindetasche im RNA-Aptamer getrieben [6]. Infolge des Überschusses an freiem *cis*-DFHBI geht das nun unbeladene DFHBI-Aptamer durch Aufnahme eines neuen Chromophors zügig in einen wieder fluoreszenten Zustand über. Für das abgestoßene *trans*-DFHBI wird eine thermisch getriebene Rückisomerisation zum *cis*-Isomer diskutiert, sodass eine Akkumulation von *trans*-DFHBI ausbleibt [6, 7].

Für die Fluoreszenzmikroskopie, welche in der Regel auf eine cw-Belichtung der Probe ausgerichtet ist, stellt das außergewöhnliche Bleichverhalten von Spinach eine besondere Herausforderung dar. Infolge der cw-Belichtung erreicht die Intensität der Spinach-Fluoreszenz sehr schnell (teilweise  $<1$  s [6]) einen photostationären Zustand geringer Gesamthelligkeit, mit entsprechend negativen Folgen für das erzielbare SNR. Eine deutliche Verbesserung diesbezüglich konnte durch Anregung von Spinach mit nur 50 ms dauernden

Lichtblitzen in Kombination mit mehrere Sekunden andauernden Dunkelphasen erzielt werden. Im Vergleich zur cw-Belichtung fiel die im gleichen Zeitraum erfasste Gesamtintensität dabei um ein Vielfaches höher aus. Dieser Fortschritt musste jedoch auf Kosten der Bildwiederholrate erkauft werden, welche nur mehr bei 0,2 Hz lag. Zudem erhöhte sich der technische Aufwand zur Aufnahme der Bildsequenzen am Mikroskop, sowie deren Auswertung.

Allen bisherigen Studien gemein ist die Anregung von Spinach mittels 1PA. Das vorliegende Projekt dagegen widmet sich der Anregung von Spinach über 2PA. Es wird insbesondere die Fragestellung verfolgt, inwiefern sich das Bleichverhalten von Spinach bei 2PA gegenüber der zuvor behandelten 1PA verändert. Der wesentliche Unterschied zwischen 1PA und 2PA in Form einer Reduktion des Anregungsvolumens auf nur wenige Femtoliter, sowie die technische Notwendigkeit einer konsekutiven Abtastung jedes einzelnen Pixels anstelle einer Weitfeldbelichtung werden in diesem Zusammenhang als vorteilhaft angesehen, da sie ohne zusätzliche Maßnahmen genügend Dunkelzeit zur Erholung der Spinach-Komplexe gewährleisten.

## 5.2 Probenpräparation

DFHBI-bindendes RNA-Aptamer (im Folgenden „das Aptamer“ genannt) wurde freundlicherweise von Dr. Elke Duchardt-Ferner (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Jens Wöhnert, Goethe-Universität Frankfurt) zur Verfügung gestellt. Die Synthese und Bereitstellung des DFHBI-Chromophors erfolgte freundlicherweise durch Isam Elamri (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Harald Schwalbe, Goethe-Universität Frankfurt). Sofern nicht anders angegeben erfolgte die Handhabung beider Komponenten jeweils gelöst in RNase-freiem Puffer (40 mM HEPES, 125 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4).

Die Immobilisierung des Aptamers wurde durch Streptavidin-beschichtete Silica-Kügelchen (ProActive® Microspheres, Streptavidin Silica 5,06 µm, Polysciences Europe GmbH) realisiert. Ein Biotin-Splint vermittelte dabei die nötige Wechselwirkung zwischen dem Aptamer und der Streptavidin-Beschichtung der Silica-Kügelchen.

Zur Entfernung des Konservierungsmittels Natriumazid wurden die Silica-Kügelchen gewaschen, indem diese insgesamt drei Mal in einer Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415 R) bei  $12.000 \text{ min}^{-1}$  für 15 min zuerst pelletiert und nach Abdekantieren des Überstandes in  $200 \mu\text{l}$  RNase-freiem Puffer (siehe oben) resuspendiert wurden. Noch vorhandene RNase wurde durch Zugabe von Diethyldicarbonat (DEPC) im Volumenverhältnis 1:100 und Inkubation über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  deaktiviert. Zur Immobilisierung des Aptamers an den Streptavidin-beschichteten Silica-Kügelchen wurden die Aptamer-Lösung und die Silica-Kügelchen-Dispersion zu gleichen Teilen vermischt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde überschüssiges Aptamer durch dreimaliges Zentrifugieren ( $10 \text{ s}$  bei  $12.000 \text{ min}^{-1}$ ), Abdekantieren des Überstandes und anschließender Resuspension des Pellets in  $300 \mu\text{l}$  RNase-freiem Puffer (siehe oben) entfernt. Der im letzten Waschschrift zur Resuspension genutzte RNase-freie Puffer enthielt dabei bereits die gewünschte DFHBI-Konzentration.

Die Präparation von GFP-beladenen Silica-Kügelchen geschah ähnlich der zuvor beschriebenen Prozedur für immobilisiertes Spinach, wobei ein RNase-freies Arbeiten hierbei nicht erforderlich war. Das erstmalige Waschen der Silica-Kügelchen erfolgte wie oben beschrieben, jedoch abweichend mit PBS-Puffer. Auf eine Zugabe von DEPC wurde verzichtet. Anschließend erfolgte die Zugabe von biotin-gekoppelten GFP-Antikörpern (MA5-15256-BTIN, Thermo Fischer Scientific) im Volumenverhältnis 1:100, sowie Inkubation über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$ . Überschüssige Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen entfernt. Nach Zugabe von GFP (13105S07E5, Thermo Fischer Scientific) im Volumenverhältnis 1:100 und erneuter Inkubation bei  $4^\circ\text{C}$  für 30 min wurde überschüssiges GFP durch dreimaliges Waschen entfernt.

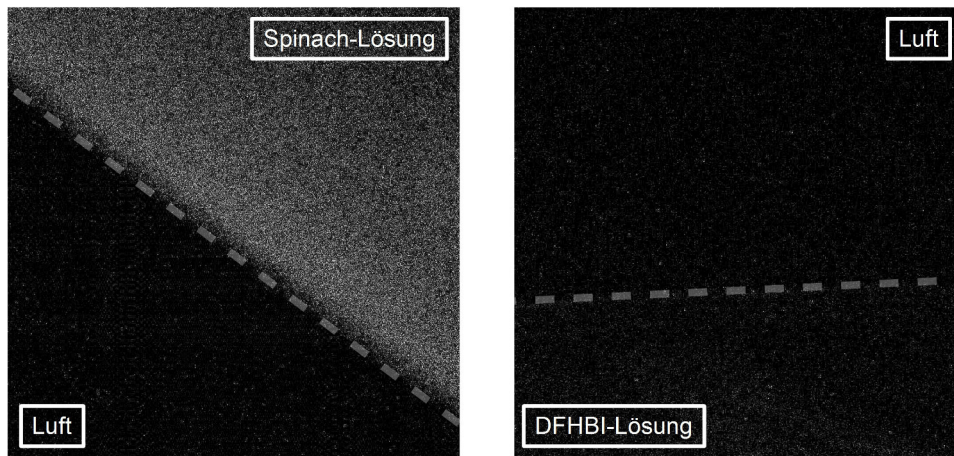
## 5.3 Ergebnisse der Untersuchung zum Fluoreszenzbleichen

### 5.3.1 Frei diffundierende Spinach-Komplexe

Mitentscheidend für den erfolgreichen Einsatz von Spinach in der 2PF-Mikroskopie ist die Intensität der Hintergrundfluoreszenz von gelöstem DFHBI in Relation zur Fluoreszenz-Intensität von Spinach. Wie die 2PF-Mikroskopie-Aufnahmen in Abbildung 5.5 zeigen, bewegt sich die Fluoreszenz-Intensität von gelöstem DFHBI mit einem SNR von  $<1,1$  auf einem schwer nachweisbaren Niveau. Demgegenüber wird die 2PF der Spinach-Lösung bei gleicher Intensität der Anregungsstrahlung (12 mW im Fokus) mit einem SNR von 4,3 klar detektiert – als Detektor diente hier die PMT R955 (siehe auch Kapitel 4.11.1), welche durch einen Kurzpassfilter (FF01-790/SP-25, Semrock) vor der Anregungsstrahlung geschützt wurde.

Ein Blick auf die experimentellen Bedingungen verleiht dem Befund einer Verstärkung der 2PF von DFHBI durch Bindung an das Aptamer noch mehr Bedeutung, denn mit 840 nm anstatt 900 nm war die Zentralwellenlänge der Anregung eher auf eine Anregung von frei in Lösung befindlichem DFHBI, denn von Spinach ausgerichtet. Zudem betrug die Konzentration von DFHBI im Fall der Spinach-Lösung  $5,4 \mu\text{M}$ , während sie im Fall der reinen DFHBI-Lösung mit  $82,6 \mu\text{M}$  um mehr als das 15-fache erhöht war. Aus diesen Beobachtungen resultiert die grundlegende Schlussfolgerung, dass auch im Fall der 2PA die Verstärkung der Fluoreszenz-Intensität des DFHBI-Chromophors durch Bindung an das entsprechende Aptamer hoch genug ausfällt, um sicher die 2PF der Spinach-Komplexe vor der schwachen Hintergrund-Fluoreszenz des ungebundenen DFHBI's detektieren zu können.

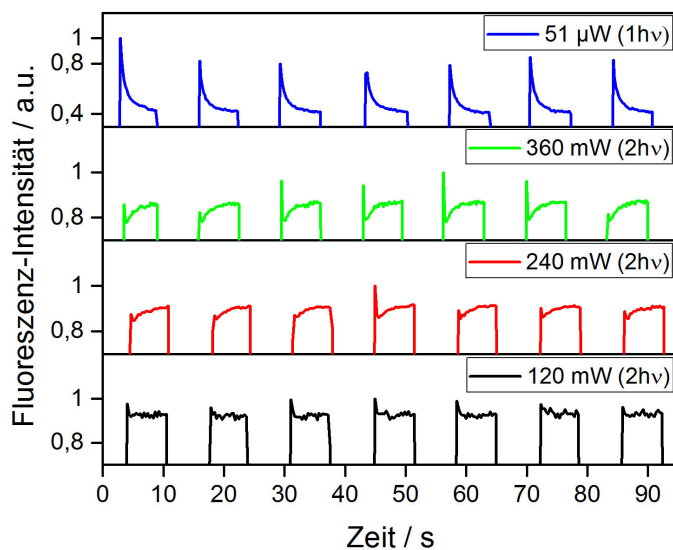
In einem weiteren Schritt wurde das durch 2PA induzierte Bleichverhalten von frei in Lösung befindlichem Spinach untersucht. Dafür wurde der Intensitätsverlauf der Fluoreszenz einer Spinach-Lösung



**Abbildung 5.5:** 2PF-Aufnahmen einer Spinach-Lösung (links) und einer DFHBI-Lösung (rechts). Die Phasengrenzen sind zur besseren Orientierung als weiß-gestrichelte Linien eingezeichnet. Trotz 15,3-facher DFHBI-Konzentration wird die 2PF der DFHBI-Lösung gegenüber der 2PF der Spinach-Lösung kaum erfasst.

(5  $\mu\text{M}$  Aptamer, 5  $\mu\text{M}$  DFHBI in RNase-freiem Puffer, pH 6,5) aufgenommen. Die Anregung erfolgte jeweils mit 900 nm bei einer Halbwertsbreite des Pulses von 17 nm. Es wurden periodische Dunkelphasen realisiert, indem die Anregung alle 7 s für jeweils 7 s unterbrochen wurde. Zu Vergleichszwecken wurde auch das Bleichverhalten einer verdünnten Spinach-Lösung (0,5  $\mu\text{M}$  Aptamer, 0,5  $\mu\text{M}$  DFHBI in RNase-freiem Puffer, pH 6,5) bei 1PA gemessen. Hierfür wurde das in Kapitel 4.8 beschriebene Modul benutzt, um eine Frequenzverdopplung von 900 nm auf 450 nm zu erzielen. Der residuale NIR-Anteil nach Frequenzverdopplung wurde durch einen Kurzpassfilter (FF01-680SP-25, Semrock) unterdrückt.

Wie in Abbildung 5.6 zu sehen, zeigt die gemessene Spinach-Lösung im Fall der 1PA (blaue Kurve) das bereits in der Literatur beschriebene [6], schnelle Ausbleichen der Fluoreszenz, welche sich während einer Dunkelphase auf nahezu den Ausgangswert erholt. Innerhalb der Belichtungszeit wird hier kein vollständiges Ausbleichen der Fluoreszenz erreicht. Stattdessen lässt der Verlauf der Fluoreszenz-Intensität darauf schließen, dass ein photostationäres Gleichgewicht mit einer Fluoreszenz-Intensität von etwa 40% des Ausgangswertes angestrebt wird.



**Abbildung 5.6:** Vergleich zwischen dem 1PA- und 2PA-induzierten Bleichverhalten einer Spinach-Lösung.

Beim Übergang zur 2PA zeigt sich, dass die grundlegenden Charakteristika der Fluoreszenz-Dynamik von Spinach beibehalten werden: nach einem schnellen, initialen Bleichen der Fluoreszenz kommt es zur Ausbildung eines photostationären Zustands. Nach Ablauf einer Dunkelphase ist die Fluoreszenz-Intensität der Spinach-Lösung auf nahezu den Ausgangswert zurückgekehrt, wie dies insbesondere anhand der schwarzen Messkurve in Abbildung 5.6 mit 120 mW Anregungsintensität erkennbar ist. Das angestrebte photostationäre Gleichgewicht liegt im Fall der 2PA deutlich über dem Niveau des photostationären Gleichgewichts bei 1PA. Selbst bei einer Intensität von 360 mW im Fokus (grüne Kurve in Abbildung 5.6) erreicht die Fluoreszenz-Intensität im photostationären Gleichgewicht etwa 85% des Ausgangswertes, während es bei 120 mW (schwarze Kurve in Abbildung 5.6) sogar 93% sind. Diese Werte sind umso bemerkenswerter, als dass 120 mW etwa der 10-fachen Anregungs-Intensität eines gewöhnlichen 2PF-Experimentes an Zellen entspricht und die Fluoreszenz-Intensität der Spinach-Lösung unter diesen Bedingungen nur wenig und noch dazu reversibel bleicht. Weiterhin wird im Fall der 2PA beobachtet, dass die Fluoreszenz-Intensität der Spinach-Lösung bei sehr hoher Anregungsintensität zunächst unter das Niveau des photostationären Gleichgewichts abfällt – bei 360 mW Anregungsintensität beispielsweise auf etwa 80% –, um sich anschließend letzterem „von unten“ anzunähern.

Die genannten Beobachtungen können auf Basis zweier Umstände verstanden werden. Erstens sind die Spinach-Komplexe nicht ortsfest gebunden, sondern befinden sich in Lösung und sind somit frei beweglich. Zweitens findet die 1PA praktisch innerhalb des gesamten, vom Anregungsstrahl ausgeleuchteten Probenvolumens statt, während das Auftreten der 2PA lediglich auf einen wenige Femtoliter umfassenden Raum im Fokus der Anregungsstrahlung begrenzt ist. In beiden Fällen – 1PA und 2PA – kommt es zum Ausbleichen der Fluoreszenz-Intensität der Spinach-Lösung infolge der Anregungsstrahlung. Diesem Prozess wirkt sowohl die Erholung gebleichter Spinach-Komplexe durch Austausch des isomerisierten Chromophors, wie auch das Eindiffundieren fluoreszenter Spinach-Komplexe in das Anregungsvolumen entgegen. Verglichen mit der 1PA ist das Anregungsvolumen der 2PA sehr klein, sodass nur wenige Spinach-Komplexe gebleicht werden, die durch die zuvor genannten Mechanismen zudem schnell ersetzt werden können.

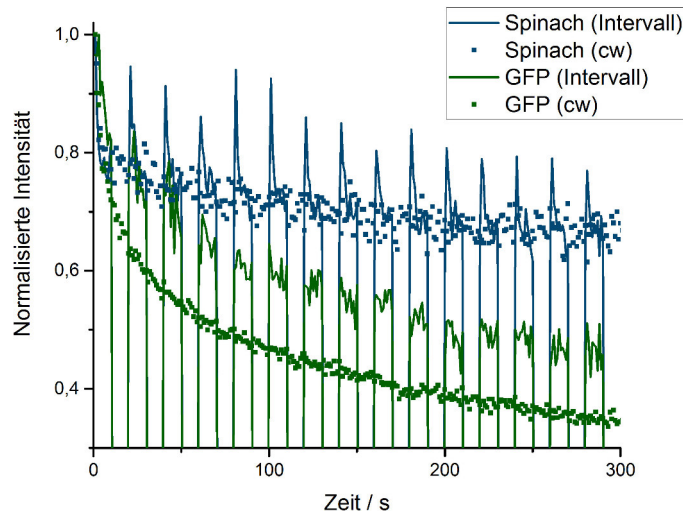
Die bis hierher diskutierten Ergebnisse sind ein erster Hinweis auf das Potential von Spinach in Verbindung mit der 2PF-Mikroskopie als praktisch bleich-resistenter Marker für die Visualisierung von RNA *in vivo*. Die Bewertung der Ergebnisse in diese Richtung muss jedoch mit einer gewissen Vorsicht geschehen bzw. die unterschiedlichen Versuchsbedingungen berücksichtigen. In den bis hierher diskutierten Experimenten wurde ein nur geringer Anteil des Gesamtprobenvolumens von jeweils etwa 100  $\mu\text{l}$  belichtet. Außerhalb des Anregungsvolumens stand demgegenüber ein vergleichsweise unerschöpflicher Vorrat an unbelichteten und somit fluoreszenten Spinach-Komplexen zur Verfügung, welche durch Diffusion in das Anregungsvolumen eingebracht werden. Typische Zellvolumina sind demgegenüber mit etwa 10 fl-100 pl sehr viel kleiner und werden im Verlaufe des Experimentes typischerweise vollständig ausgeleuchtet. Aus diesem Grund wurden Experimente mit immobilisierten Spinach-Komplexen durchgeführt, wodurch der Eintrag fluoreszenter Komplexe aus unbelichteten Bereichen der Probe unterbunden wird. Die Ergebnisse dieser Experimente werden im folgenden Kapitel behandelt.



### 5.3.2 Immobilisierte Spinach-Komplexe

Die Messung der Fluoreszenz von Spinach-Lösungen unter 2PA lieferte bereits wertvolle Hinweise auf den Nutzen dieser Kombination zur Studie von RNA. Die Messung von immobilisierten Spinach-Komplexen stellt dabei die nächste Iterationsstufe hin zu *in vivo*-Messbedingungen dar. Als Träger für die Spinach-Komplexe dienten Streptavidin-beschichtete Silica-Kügelchen. Deren Durchmesser von  $5\ \mu\text{m}$  liegt dabei in der Größenordnung bekannter Zellen. Die Präparation der immobilisierten Spinach-Komplexe wurde in Kapitel 5.2 beschrieben. Zur Messung der immobilisierten Spinach-Komplexe wurde deren Suspension in Kammern eingefüllt, welche durch Einbringen eines dünnen Polymerfilms (Parafilm, Pechiney Plastic Packaging) zwischen einem Glas-Objekträger, sowie einem Deckglas realisiert wurden. Das Fassungsvermögen einer Kammer betrug dabei im Mittel  $30\text{-}40\ \mu\text{l}$ . Eine Dekontaminierung der Kammer von eventuell präsenzter RNase geschah jeweils durch mehrstündige Behandlung mit 10%iger Formamid-Lösung, sowie darauffolgender Konditionierung der Kammer mit RNase-freier Pufferlösung. Die Suspension aus beladenen Silica-Kügelchen und Puffer wurde beim Befüllen der Kammer durch Kapillarkräfte selbsttätig in diese gezogen. Die mitgerissenen Silica-Kügelchen verteilten sich dabei in Monolagen über die Oberfläche des Deckglases bzw. Objekträgers und lagen überwiegend separiert voneinander, selten aggregiert vor.

Abbildung 5.7 zeigt die normalisierten Intensitätsverläufe der 2PF von einzelnen Spinach- bzw. GFP-beladenen Silica-Kügelchen. Die DFHBI-Konzentration im Puffer der Spinach-beladenen Silica-Kügelchen betrug  $8\ \mu\text{M}$ . Die Anregung der 2PF geschah mit einer Zentralwellenlänge von  $900\ \text{nm}$  im Fall von Spinach bzw.  $800\ \text{nm}$  im Fall von GFP. Die spektrale Halbwertsbreite der Anregungsstrahlung betrug jeweils  $10\ \text{nm}$  und deren Intensität im Fokus wurde auf  $1\ \text{mW}$  eingestellt. Die Abtrennung des 2PF-Signals bzw. Unterdrückung der Anregungsstrahlung geschah durch einen dichroitischen Strahlteiler (F43-649, AHF Analysentechnik) bzw. einen Kurzpassfilter (FF01-680SP-25, Semrock). Zur Aufnahme der 2PF wurde jeweils die Äquatorregion eines Silica-Kügelchens fokussiert, das Silica-Kügelchen zentriert und anschließend ein  $7\times 7\ \mu\text{m}$  messendes Fenster mit einer Auflösung von  $8\times 8$  Pixeln abgerastert, mit



**Abbildung 5.7:** Vergleich des Bleichverhaltens immobilisierter Spinach-Komplexe (blau) und GFP (grün) bei Intervall- und cw-Belichtung (durchgezogene Linie bzw. Punkte).

einer Belichtungszeit von 2 ms/Pixel und einer Bildaufnahmerate von 1 fps (von engl. *frames per second*, Bilder pro Sekunde). Intervall- und cw-Messungen unterscheiden sich dahingehend, dass in Intervallmessungen auf 10 Bildaufnahmen jeweils eine Dunkelphase von 10 s folgt, während cw-Messungen keine Dunkelphasen beinhalten. Die Bildauflösung wurde bewusst niedrig gewählt, um sowohl die benötigte Aufnahmegeschwindigkeit zu ermöglichen, als auch sicherzustellen, dass kein Überlapp zwischen den belichteten bzw. gebleichten Regionen benachbarter Pixel zustande kommt. Zur Auswertung wurde jeweils die Gesamtzahl der erfassten Ereignisse pro Bildaufnahme ermittelt und um den Untergrund korrigiert.

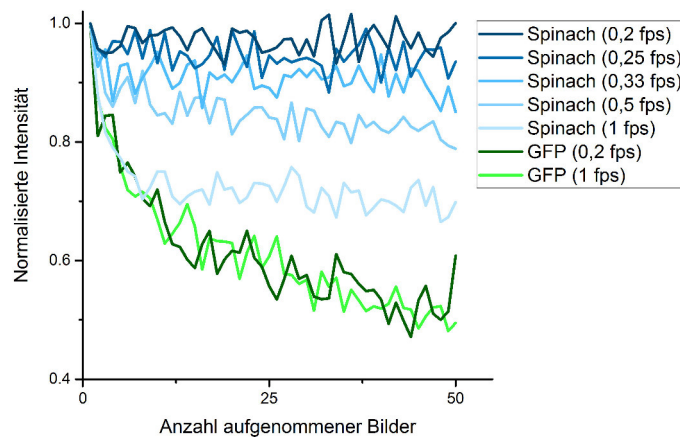
Für Spinach wird im Fall der Intervallbelichtung ein schnelles, initiales Bleichen der 2PF auf etwa 80% des Ausgangswertes beobachtet. Während der Dunkelphasen der Messung erholt sich die Intensität der 2PF wieder. Innerhalb der ersten sechs Zyklen erreicht die 2PF nach vorangegangener Dunkelphase nahezu durchweg >90% des Ausgangswertes. Dabei nimmt der Grad der Erholung mit jedem folgenden Zyklus tendenziell ab, sodass zu Beginn des 15. Zyklus noch 76% der ursprünglichen Fluoreszenz erreicht werden. Ein Vergleich zwischen der Intervall- und cw-Anregung von Spinach zeigt eine gute Übereinstimmung beider Messkurven. Unterschiede ergeben sich lediglich durch die fehlenden Dunkelphase während der cw-Belichtung. Gegen Ende des 15. Zyklus ( $t = 300$  s) beträgt die

Intensität der 2PF für beide Anregungs-Szenarien etwa 65% des Ursprungswertes.

Die Intervallbelichtung von GFP zeigt – wie erwartet – keine Erholung der 2PF während der Dunkelphase. Nach Ablauf der Dunkelphase setzt sich der Verlauf der 2PF auf dem Schluss-Niveau des vorangegangenen Zyklus fort. Gegen Ende des 15. Zyklus ( $t = 300$  s) beträgt die Intensität der 2PF nur noch 46% des Ausgangswertes. Im Fall der cw-Belichtung von GFP erfolgt die Intensitätsabnahme der 2PF deutlich schneller, sodass gegen Ende des 15. Zyklus bereits ein Wert von nur noch 34% des Ausgangswertes erreicht ist.

Die beschriebenen Beobachtungen sind in mehrfacher Hinsicht bemerkenswert. Zunächst fällt auf, dass Spinach gegenüber GFP deutlich resistenter bezüglich eines Ausbleichens der 2PF ist. Selbst bei kontinuierlicher Belichtung (cw) erreicht die Intensität der 2PF von Spinach gegen Ende des 15. Zyklus nahezu den doppelten Wert verglichen mit GFP. Weiterhin fallen die unterschiedlichen Dynamiken beider Spezies auf. Für GFP wird ein irreversibles Bleichen der 2PF beobachtet, erkennbar an der ausbleibenden Regenerierung der Fluoreszenz-Intensität in den Dunkelphasen der Intervallmessung. Durch cw-Belichtung wird die Bleich-Dynamik von GFP gegenüber einer Intervall-Belichtung beschleunigt. Für den nicht-exponentiellen Verlauf der Intensitätskurve mögen photo-induzierte Prozesse höherer Ordnung verantwortlich sein, welche im Fall von Mehr-Photonen-Anregung aufgrund der sehr hohen Photonenflussdichte auftreten [61].

Im Fall von Spinach zeigen sowohl die Intervallbelichtung, wie auch die cw-Belichtung einen praktisch deckungsgleichen Verlauf der Fluoreszenz-Intensität. Der wesentliche Unterschied im Intensitätsverlauf der 2PF beider Messungen besteht in der stattfindenden Regenerierung der Fluoreszenz-Intensität während der Dunkelphasen der Intervallbelichtung. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist ein dynamisches Gleichgewicht zwischen den mit DFHBI beladenen Aptameren und der unbeladenen Spezies. Eine



**Abbildung 5.8:** Vergleich des Bleichverhaltens immobilisierter Spinach-Komplexe (blau) und GFP (grün) bei unterschiedlichen Bildaufnahmezeiten.

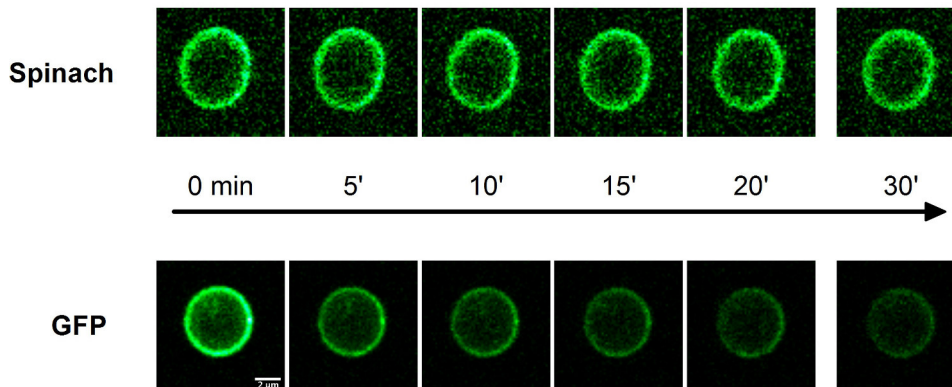
Anregung des DFHBI-beladenen Aptamers kann anstelle der gewünschten Fluoreszenz zur Isomerisation des gebundenen DFHBI-Chromophors führen – im Fall der 1PA wurde die Photoisomerisations-Quantenausbeute auf einen Wert von 2,5% bestimmt [7] – und resultiert letztlich in einem schnellen Ausbleichen der initialen Fluoreszenzintensität eines Ensembles DFHBI-beladener Aptamere im Fokalvolumen. Weil das Aptamer eine höhere Affinität zum *cis*-Isomer des DFHBI-Chromophors aufweist, wird der photoisomerisierte *trans*-DFHBI-Chromophor relativ zügig aus der Binde-tasche entlassen. Hierdurch erhöht sich die Zahl unbeladener Aptamere und folglich auch der „Druck“ die ursprüngliche Lage des Gleichgewichts wieder zu erreichen. Die in Abbildung 5.7 gezeigten Intensitätsverläufe der Spinach-2PF weisen somit auf das Erreichen eines photostationären Zustandes bei cw-Belichtung hin. Im Fall der Intervallbelichtung wird diese Dynamik von der Regenerierung der Fluoreszenz-Intensität während der kurzzeitigen Dunkelphasen überlagert. Nach einsetzender Belichtung wird das Niveau des photostationären Zustands auch hier schnell wieder erreicht. Die nachfolgend beschriebenen Experimente stützen diesen Gedanken.

In Abbildung 5.8 sind die normalisierten Intensitätsverläufe der 2PF von einzelnen Spinach-bzw. GFP-beladenen Silica-Kügelchen

bei verschiedenen Bildaufnahme­raten abgebildet. Die experimen­tel­len Bedingun­gen sind dabei identisch mit den zuvor in Zusam­men­hang mit Abbildung 5.7 beschriebenen. Für jede Messreihe wur­den insgesam­ 50 Bilder aufgenom­men, wobei die Bildaufnah­merate zwischen 0,2-1,0 fps variiert wurde. Im Fall geringer Bildaufnah­meraten stand so zwischen den Belich­ tungszeitpunkten eines Pixels mehr Dunkelzeit zur Verfüg­ung. Zur Auswertung wurde jeweils die Gesamtzahl der erfassten Ereig­nisse pro Bildaufnahme ermittelt und um den Untergrund korrigiert.

Wie sich Abbildung 5.8 entnehmen lässt, zeigt die Intensität der 2PF von Spinach eine Abhängigkeit von der Bildaufnahme­rate. Bei 0,2 fps steht den Spinach-Komplexen eine Dunkelzeit von 5 s zwischen zwei Aufnahmen zur Regeneration der Fluoreszenz-Intensität zur Verfüg­ung. Dieser Zeitraum ist ausreichend, um ein photostationäres Gleichgewicht bei etwa 97% der ursprünglichen Fluoreszenz-Intensität zu erreichen. Das Niveau des photostationären Gleichgewichts nimmt dabei ab, sobald die Bildaufnahme­rate erhöht wird. Während für 0,25 fps noch 94% der initialen Fluoreszenz-Intensität erreicht werden, sinkt dieser Wert bei 0,33 fps auf 90% und für 0,5 fps auf 83%. Bei 1 fps erreicht das photostationäre Gleichgewicht 70% der initialen Fluoreszenz-Intensität. Für GFP wird eine solche Abhängigkeit der Intensität der 2PF von der Bildaufnahme­rate nicht beobachtet – die Intensität der 2PF bleicht sowohl bei 1 fps, wie auch bei 0,2 fps mit gleicher Geschwindigkeit.

Die in Abbildung 5.8 gezeigten Messungen unterstreichen ein­drucksvoll das unterschiedliche Bleichverhalten der beiden Systeme GFP und Spinach. Ersteres bleicht irreversibel, erkennbar am ausbleibenden Effekt auf den Intensitätsverlauf der 2PF infolge der Variation der Bildaufnahme­rate. Spinach dagegen bleicht reversibel, sodass die Intensität der 2PF bei regelmäßiger Belichtung ein photostationäres Gleichgewicht erreicht, entsprechend der zuvor bereits diskutierten Dynamik. Sowohl die in Abbildung 5.8, wie auch die in Abbildung 5.7 gezeigten Messreihen zu Spinach deuten an, dass die bislang diskutierte Dynamik eines reversiblen Bleichens der Spinach-2PF von einer schwachen, jedoch irreversiblen Komponente überlagert ist. Doch selbst damit steht Spinach immer noch besser



**Abbildung 5.9:** Vergleich des Bleichverhaltens von immobilisiertem Spinach bzw. GFP bei 2PA. Die dargestellte Bildsequenz der exemplarisch aus insgesamt 180 Aufnahmen herausgegriffenen Bilder vermittelt einen Eindruck von der Bleich-Resistenz von Spinach gegenüber der von GFP.

da, als sein natürliches Vorbild GFP. Wie Abbildung 5.8 zeigt, nimmt die Intensität der GFP-Fluoreszenz im gleichen Zeitraum auf nur noch 52% des Ausgangswertes ab.

Um dem schnellen Ausbleichen der Fluoreszenz-Intensität von Spinach bei 1PA zu begegnen, wurde eine Anregung der Spinach-Komplexe in Intervallen [6], sowie eine „Optical lock-in detection“ genannte Methode der Signalaufbereitung vorgeschlagen [7]. Für eine effiziente Detektion der Spinach-Fluoreszenz sind bei 2PA dagegen keine weiteren Maßnahmen nötig – die Abtastung der Probe geschieht aus Gründen der Effizienz pixel-weise, sodass zwischen der Belichtung zweier Pixel bzw. Bildpunkte genügend Zeit zur Regenerierung der gebleichten Spinach-Komplexe zur Verfügung steht. Wie Abbildung 5.9 zeigt, kann Spinach in Verbindung mit der 2PA seine Stärke eines reversiblen Bleichverhaltens ausspielen und selbst über viele Aufnahmen hinweg ein nahezu gleichbleibendes Fluoreszenzsignal liefern.

Die in Abbildung 5.9 exemplarisch gezeigten Einzelbilder entstammen einer insgesamt 180 Bilder umfassenden Messreihe. Der Zeitraum der Aufnahme erstreckt sich über 30 min, entsprechend einer (technisch limitierten) Bildaufnahmerate von 0,1 fps, bei einer Belichtungszeit von 1 ms/Pixel. Zur Anregung der 2PF wurde die Zentralwellenlänge auf 900 nm für Spinach bzw. 800 nm für GFP eingestellt, mit einer spektralen Halbwertsbreite von 10 nm und

einer Intensität von 1 mW im Fokus der Anregung. Die DFHBI-Konzentration betrug 8  $\mu$ M.

Die Konstanz der 2PF-Intensität ist für die Spinach-beladenen Silica-Kügelchen bemerkenswert. Ausgehend von einem initialen SNR von 5,5 für die erste Aufnahme ist dessen Wert nach 180 Aufnahmen auf 5,0 gesunken. Dies entspricht einem Leuchtkraftverlust von nur 9%. Demgegenüber büßt GFP im gleichen Zeitraum 70% seiner initialen Leuchtkraft ein. Obwohl die absolute Leuchtkraft von Spinach in den durchgeführten Experimenten nicht an die von GFP heranreicht, mag Spinach in vielen Experimenten die bessere Wahl sein. Hierzu zählen insbesondere Experimente über einen langen Zeitraum hinweg und solche, in welchen eine möglichst konstante Intensität der 2PF gefordert ist.

## 5.4 Zusammenfassung

Spinach ist ein fluoreszenter Komplex, bestehend aus einem RNA-Aptamer, welches an DFHBI, einem synthetischen Imitat des natürlichen GFP-Chromophors HBI bindet. In Experimenten mit 1PA konnte bereits gezeigt werden, dass die Fluoreszenz erst durch Bindung von DFHBI an das RNA-Aptamer zustandekommt – weder das Aptamer, noch DFHBI alleine zeigen eine nennenswerte Fluoreszenz [2]. Spinach bleicht bei Belichtung zwar reversibel, jedoch insgesamt sehr schnell aus, weshalb ein aufwändigeres Belichtungsschema, sowie eine nachträgliche Datenfilterung vorgeschlagen wurde [6, 7].

In dieser Arbeit wurde das Verhalten von Spinach bei 2PA untersucht. Dafür wurden Versuche sowohl an frei in Lösung befindlichem Spinach, wie auch an der immobilisierten Spezies durchgeführt. Ähnlich der 1PA wird auch bei 2PA ein starker Anstieg der Fluoreszenz des DFHBI-Chromophors beobachtet, sobald dieser an das Aptamer bindet. Reine DFHBI-Lösungen dagegen erzeugten selbst bei hoher Konzentration keine nennenswerte 2PF, sodass deren Hintergrundfluoreszenz gegenüber der 2PF von Spinach vernachlässigbar ist. Im Gegensatz zur 1PA zeigen frei in Lösung befindliche Spinach-Komplexe bei 2PA erst bei außerordentlich hohen Intensitäten der Anregungsstrahlung ein merkliches Ausbleichen der

Fluoreszenz. Dies ist größtenteils auf das Eindiffundieren fluoreszenter Spinach-Komplexe in das sehr kleine Fokalvolumen der 2PA zurückzuführen.

Für immobilisierte Spinach-Komplexe konnte gezeigt werden, dass eine kontinuierliche Bildaufnahme gegenüber einer Bildaufnahme in Intervallen mit jeweils zusätzlichen Dunkelphasen zur Erholung des reversiblen 2PF-Bleichens, sowie der generelle Verzicht auf spezielle Belichtungsschemata und Methoden der Datenakquise mit keinen besonderen Nachteilen verbunden ist, wie dies für die 1PA von Spinach berichtet wurde [6]. Bei einer Bildaufnahme von 1 fps erreicht die 2PF-Intensität der Spinach-Komplexe ein photostationäres Gleichgewicht bei etwa 70% der ursprünglichen Intensität. Längere Aufnahmeintervalle steigern die Lage des Gleichgewichts bis auf annähernd den Ursprungswert ab einer Bildaufnahme von 0,2 fps. Für Spinach wurde bei 2PA eine bemerkenswert hohe Resistenz gegenüber irreversiblen Bleichen der 2PF gefunden.



# Kapitel 6

## Chrimson

### 6.1 Einführung

Die reine Zellmembran, beispielsweise eines Bakteriums erweist sich im Normalfall gegenüber einer Vielzahl von Substanzen als undurchlässig, insbesondere gegenüber polaren Substanzen. Für eine Zelle ist dieser Sachverhalt Vor- und Nachteil zugleich, denn einerseits erfährt der intrazelluläre Raum so einen gewissen Schutz vor der Umgebung, andererseits ist ein lebenswichtiger Stoffaustausch mit der Umgebung kaum möglich. Um einen kontrollierten Stoffaustausch zwischen intra- und extrazellulärem Raum zu ermöglichen, beherbergt eine Zellmembran daher typischerweise eine große Anzahl an speziellen Proteinen. Eine unter vielen Familien dieser „Membranproteine“ sind die mikrobiellen Rhodopsine. Der Aufbau aller bisher gefundenen Vertreter dieser Familie folgt dem stets gleichen Schema, wonach insgesamt sieben Transmembran- $\alpha$ -Helices (TMH's) einen Ionen-leitfähigen Kanal innerhalb der Zellmembran bilden. In einigen mikrobiellen Rhodopsinen, beispielsweise in Bacterio-, Proteo- und Halorhodopsin dient dieser Kanal dem aktiven Transport von Ionen, gegebenenfalls sogar entgegen einem Gradienten, weshalb in diesen Fällen auch von „Ionenpumpen“ gesprochen wird. Dem gegenüber steht die Gruppe der Kanalrhodopsine (von *engl. Channelrhodopsin*, ChR), welche vorrangig einen eher unspezifischen Ionenfluss entlang eines Gradienten ermöglichen.

Eine Besonderheit der mikrobiellen Rhodopsine ist ihre Sensitivität für Licht, welche ihnen von einem Retinal-Chromophor verliehen wird. Dieser ist über eine Schiff'sche Base kovalent mit einem Lysin-Rest der siebten Transmembran- $\alpha$ -Helix (TMH G) verbunden

(K299 für Chrimson). Die Anregung des Retinal-Chromophors führt innerhalb weniger Pikosekunden zur Isomerisierung desselben, ausgehend von der all-*trans*- in die 13-*cis*-Konfiguration. Dieser Vorgang triggert den nachfolgenden Durchlauf verschiedener Zustände (Intermediate) des Rhodopsin-Moleküls, welcher typischerweise auf einer Zeitskala von Millisekunden bis Sekunden in einer abschließenden Rückisomerisierung des Retinal-Chromophors in die all-*trans*-Konfiguration bzw. den Ausgangszustand mündet. Der gesamte Prozess ist somit ein licht-aktivierter Kreislauf und wird daher als Photozyklus bezeichnet. Trotz großer struktureller und funktioneller Gemeinsamkeiten beider Gruppen, soll der Fokus nachfolgend vor allem auf den ChR liegen.

Während des Durchlaufens des Photozyklus wird für ChR ein impulsartiger Anstieg der Ionenleitfähigkeit des Kanals beobachtet [62, 63]. Dies erlaubt licht-gesteuert eine rasche und dennoch kontrollierte Depolarisation des Membranpotentials der Zelle [9, 11, 64]. Übertragen auf Nervenzellen, deren Funktionalität im Wesentlichen von einem Membranpotential abhängt, ermöglichen ChR eine gewisse Kontrolle der neuronalen Aktivität, weshalb ChR im Allgemeinen, vor allem aber dem Channelrhodopsin-2 der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (CrChR-2) auf dem Gebiet der Neurowissenschaft als so genanntes „optogenetisches Werkzeug“ große Bedeutung zukommt [12, 65]. Ungeachtet der Tatsache, dass sich der Einsatz von CrChR-2 in der Optogenetik schnell etabliert hatte, blieb die Nachfrage nach neuen ChR-Varianten mit vorzugsweise verbesserten Eigenschaften bestehen. Denn mit einer maximalen Sensitivität bei ca. 470 nm erfolgt die Anregung von CrChR-2 mit vergleichsweise kurzweiligem Licht. Wünschenswert hingegen ist eine Anregung mit langwelliger Strahlung im roten oder sogar nah-infraroten Spektralbereich, da langwellige Strahlung erfahrungsgemäß weniger Zellschäden verursacht und dabei tiefer in Gewebe vorzudringen vermag [66]. Als bedeutende Fortschritte auf diesem Gebiet gelten beispielsweise die Entdeckung des Channelrhodopsin-1 der Grünalge *Volvox carteri*, dessen spektrale Eigenschaften selbst bei 590 nm noch eine Anregung zulassen [67], sowie die Entwicklung verschiedener ChR-Varianten, deren Sensitivität sich teils noch weiter in den roten Spektralbereich erstreckt [68–70].

In diesem Zusammenhang fällt die Aufmerksamkeit auf eine 2014 veröffentlichte *de novo* Sequenzierung von 127 Algentranskriptomen, welche zur Entdeckung einer Vielzahl neuer ChR führte [8]. Da man sich nur auf neuartige Opsine mit außergewöhnlichen Eigenschaften konzentrieren wollte, rückten zwei ChR in den Vordergrund der Studie: ein blau-absorbierendes ChR, das aufgrund seiner besonders schnellen Kinetik den Spitznamen „Chronos“ (*griech. ‚Zeit‘*) erhielt, sowie ein langsames ChR, dem bezugnehmend auf seine rot-verschobene Absorption und in Anlehnung an die Farbe Karminrot (*engl. Crimson*) der Beiname „Chrimson“ verliehen wurde. Mit Verweis auf die Herkunft aus der Grünalge *Chlamydomonas noctigama*, findet sich für Chrimson gelegentlich auch die Bezeichnung CnChR-1. In Titrationsexperimenten\* wurde für, in Detergenz solubilisiertes Chrimson bei physiologischem pH ein Maximum der Absorption im UV/Vis-Spektralbereich bei 560 nm gefunden. Das Maximum des Aktionsspektrums (Kanalaktivität vs. Anregungswellenlänge, gemessen in HEK293-Zellen) ist demgegenüber mit 590 nm um 30 nm weiter rot-verschoben. In Voltage-Clamp-Messungen an Chrimson-exprimierenden Nervenzellen wurde selbst bei Anregung mit 660 nm noch Photoströme gemessen. Damit beansprucht Chrimson aktuell den Spitzenwert der Rotverschiebung unter den bekannten, natürlichen ChR [8]. Gleichzeitig ist Chrimson nur wenig sensitiv für blaues Licht, sodass in Kombination mit einem blau-absorbierenden ChR bereits eine unabhängige und nahezu wechselwirkungs-freie Anregung zweier unterschiedlicher Nervenzell-Populationen demonstriert werden konnte [8, 71].

Das Interesse an Chrimson ist dabei nicht bloß rein technischer Natur, um beispielsweise der Optogenetik neue Werkzeuge zugänglich zu machen. Chrimson spielt eine wichtige Rolle bei der Aufklärung eines „Farbabstimmung“ (*engl. color tuning*) genannten Mechanismus, welcher letztlich für das unterschiedliche Absorptionsverhalten des ansonsten identischen Chromophors in verschiedenen mikrobiellen Rhodopsinen verantwortlich ist. Die Zusammenhänge sind hierbei keineswegs trivial. So besteht beispielsweise 46% Sequenzhomologie zwischen Chrimson und C1C2, einer Chimäre

---

\*Christian Bamann / Max-Planck-Institut für Biophysik (Frankfurt)

bekannter Kristallstruktur [72], zusammengesetzt aus den beiden *Chlamydomonas reinhardtii*-Rhodopsinen ChR-1 und -2 (CrChR-1 und CrChR-2). Trotz dieser Ähnlichkeit weisen Chrimson und C1C2 eine unterschiedliche Opsin-Verschiebung (*engl. opsin shift*) bzw. voneinander abweichende Absorptionseigenschaften auf. Dass es sich hierbei nicht bloß um einen Einzelfall handelt, offenbart ein Vergleich von Bacteriorhodopsin (BR) und Sensorrhodopsin-II (SRII). Obgleich sich die Retinal-Bindetasche beider Spezies nur in feinen Details unterscheidet, zeigt BR mit 570 nm ein deutlich weiter rotverschobenes Absorptionsmaximum, als SRII mit 495 nm [73–75]. Im Fall von grün- und blau-absorbierendem Proteorhodopsin genügt bereits die Mutation eines einzelnen Aminosäurerestes (L105Q bzw. Q105L), um beide Phänotypen ineinander zu überführen [76, 77].

Grundsätzlich zeigt bereits die rot-verschobene Absorption mikrobieller Rhodopsine gegenüber frei in Lösung befindlichem Retinal, dass der Retinal-Chromophor empfindlich auf seine Umgebung reagiert. Die zuvor erwähnten Beispiele legen nahe, dass die Opsin-Verschiebung ein Zusammenspiel vieler Faktoren ist, was durch diverse andere Studien belegt wird. So konnte beispielsweise anhand von Archaerhodopsin-3 die Bedeutung der Konformation des Retinal-Chromophors - hier insbesondere der Planarität desselben, sowie dessen Torsionswinkel entlang der C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub>-Bindung - für die Absorptionseigenschaften demonstriert werden [78]. Zusätzlich übt auch die elektrostatische Umgebung des Retinal-Chromophors großen Einfluss auf dessen spektrale Eigenschaften und Isomerisationsdynamik aus, wenn auch keine mechanistische Verbindung zwischen den beiden letztgenannten besteht [79]. Während der Photoanregung des Retinal-Chromophors kommt zu einer Verschiebung positiver Partialladung von der Retinal-Schiff-Base (RSB) hin zum  $\beta$ -Iononring [80]. Elektrostatische Einflüsse in diesen Regionen der Bindetasche, vornehmlich resultierend aus ionischen Aminosäureresten, wirken sich daher (de-)stabilisierend auf die einzelnen Energieniveaus des Retinal-Chromophors aus und beeinflussen somit dessen Absorptionseigenschaften zusätzlich. Ein weiterer wichtiger Faktor ist das Gegenion der RSB, welches die positive Ladung RSB

kompensiert. Typischerweise beobachtet man in mikrobiellen Rhodopsinen ein ganzes Netzwerk aus verschiedenen Aminosäureresten und Wassermolekülen, welche zusammen ein komplexes Gegenion für die positive Ladung der RSB bilden. Im Fall von BR, wo die Aminosäure D85 sowohl Bestandteil des komplexen Gegenions, als auch der primäre Protonenakzeptor während des Photozyklus ist, führt eine Neutralisation der Ladung des komplexen Gegenions durch Absenken des pH-Wertes oder Mutation sowohl zu einer Rotverschiebung der Chromophor-Absorption [81], als auch zum Verlust der Protonenpump-Fähigkeit [82]. Zusätzlich zeigen Studien an anderen mikrobiellen Rhodopsinen, dass Wechselwirkungen zwischen der jeweiligen D85-homologen Aminosäure, sowie weiteren Aminosäureresten bestehen, welche den pKs-Wert der D85-homologen Aminosäure modulieren und somit ebenfalls Einfluss auf die Absorptionseigenschaften des Retinal-Chromophors ausüben [83–87].

Beim Ziehen von Vergleichen zwischen Chrimson bzw. ChR im Allgemeinen und licht-getriebenen Protonenpumpen wie BR müssen gewisse relativierende Umstände bzw. Unterschiede berücksichtigt werden. Beispielsweise besteht noch Unsicherheit bezüglich der exakten Form der Retinalbindetasche in ChR, inklusive der daraus resultierenden Wechselwirkungen und es ist aktuell Gegenstand der Forschung, inwiefern die Ladungsstabilisierung der protonierten RSB bei ChR über direkte Wasserstoffbrückenbindungen mit nahe gelegenen Aminosäureresten geschieht oder durch Wassermoleküle in der Bindetasche vermittelt wird [88–90]. Da für Chrimson bislang keine Proteinstruktur veröffentlicht wurde, können sämtliche strukturbezogene Aussagen lediglich auf Basis eines vorläufigen Modells getroffen werden, welches anhand der Sequenzhomologie zwischen Chrimson und C1C2 [72] erstellt wurde. Demnach ist das Homologe von D85 aus BR in Chrimson mit E165 abweichend ein Glutamat, während die zweite anionische Gruppe mit D212 in BR bzw. D295 in Chrimson konserviert ist. Eine ähnliche Situation wird auch für CrChR-2 mit E123 bzw. D292 als D85- bzw. D212-Homologe vorgefunden. Während diese Abweichung klein erscheint, zeichnet sich doch ab, dass den D85-Homologen der ChR's eine andere Aufgabe zufällt. Ladungs-neutralisierende Mutationsexperimente an E123 in CrChR-2 [91], sowie Experimente an CaChR-1 [92] und CrChR-1

[93] bei hohem pH-Wert ergaben keine Beeinträchtigung der Kanal-funktion, während die Protonenpump-Fähigkeit bei vergleichbaren Experimten an BR stark beeinträchtigt wurde [82]. Inwiefern auch ChR wie Chrimson eine Protonenpump-Aktivität zeigen, ist nicht abschließend geklärt. Interessanterweise wurde für CrChR-2 eine, wenn auch recht ineffiziente, auswärts gerichtete Pumpaktivität für H<sup>+</sup>-Ionen berichtet [94]. Es liegt nahe, für Chrimson ein ähnliches Verhalten zu erwarten, wobei explizite Messungen zu diesem Sachverhalt bislang noch ausstehen. Ionenspezifische Patch-Clamp-Messungen an Chrimson-exprimierenden HEK-Zellen ergaben eine, dem Kationenkanal CrChR-2 vergleichbare Selektivität des Kanals für Protonen, sowie Natrium- und Calcium-Ionen - lediglich die Selektivität für Kaliumionen ist leicht erhöht [8].

Für Chrimson wurde ein großer Einfluss des pH-Wertes auf die Lage der Absorptionsbande beobachtet. Bei pH 7,4 absorbiert Chrimson bei 560 nm, wobei die Gestalt der Absorptionsbande auf die Anwesenheit mehrerer Spezies hindeutet. Für pH 9,5 wurde eine Blau-Verschiebung des Absorptionsmaximums hin zu 537 nm beobachtet, während eine Absenkung auf pH 6,0 eine Rot-Verschiebung der Absorption auf 585 nm zur Folge hat. In dieser Studie stand die zeitaufgelöste, spektroskopische Charakterisierung von Chrimson im Vordergrund. Untersucht wurde sowohl die Primärreaktion, wie auch der sich daran anschließende Photozyklus im sichtbaren Spektralbereich, wie auch deren Abhängigkeit vom pH-Wert bzw. Protonierungszustand des Gegenions E165. Die Ergebnisse dieser Studie sind Bestandteil folgender Publikation:

D. Urmann, C. Lorenz, S. M. Linker, M. Braun, J. Wachtveitl und C. Bamann, Photochemical Properties of the Red-shifted Channelrhodopsin Chrimson, *Photochem. Photobiol.* **2017**, 93, 782-795

## 6.2 Probenpräparation

Chrimson-Proben wurden freundlicherweise von Dr. Christian Bamann (Arbeitskreis Prof. Dr. Ernst Bamberg, Max-Planck-Institut für Biophysik (Frankfurt)) zur Verfügung gestellt. Der Übersicht halber

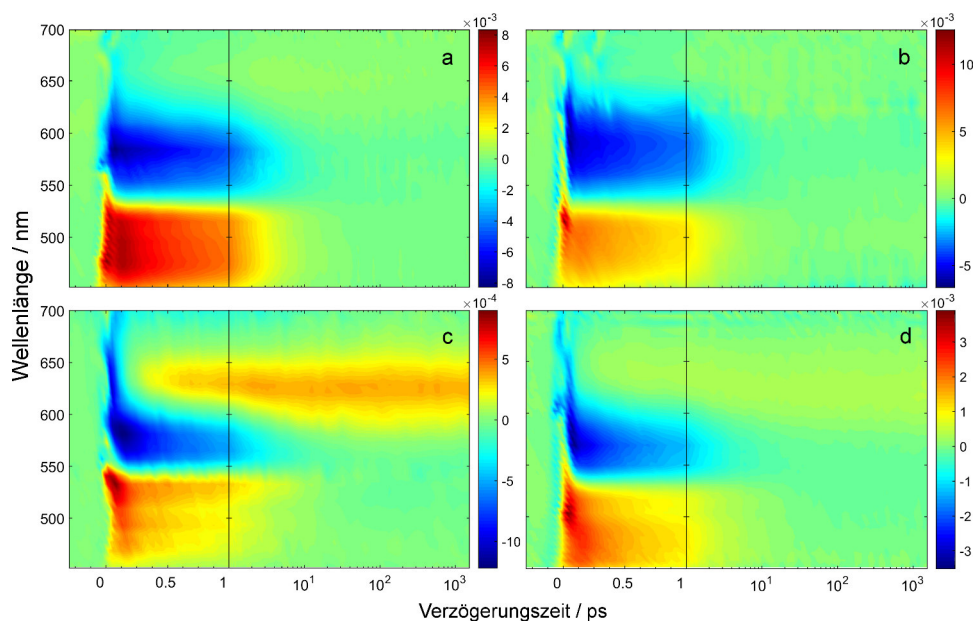
soll die Herstellung der Chrimson-Proben nachfolgend zusammenfassend beschrieben werden.

Für die Expression von Chrimson wurde das, die Aminosäuren 1-350 kodierende Chrimson-Gen in das *Pichia Pastoris* kodierende Plasmid pPIC9K (Thermo Fisher Scientific) geklont, gefolgt von einem His<sub>9</sub>-Tag. Die Zell-Kultivierung und Probenaufreinigung geschahen analog dem Protokoll für CrChR-2 [13]. Geerntetes Chrimson-Protein wurde mittels Ni-Affinitätschromatographie und anschließender Gel-Filtration (Superdex 200, GE Healthcare) aufgereinigt und abschließend in Pufferlösung gelagert (100 mM NaCl, 0,05% n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (DDM), 20 mM MES (pH 6,0) bzw. 20 mM Borat (pH 9,5)).

### 6.3 Primärreaktion

Die Untersuchung der Primärreaktion von Chrimson im sichtbaren Spektralbereich wurde mit der Ultrakurzzeit-Messanlage durchgeführt, wie sie in Abschnitt 3.1 beschrieben wurde. Die Probe wurde während der Messung in einer Quarzglasküvette der Schichtdicke 1 mm kontinuierlich lateral zum Abtaststrahl bewegt, um einen regelmäßigen Probenaustausch zu gewährleisten.

Eine Übersicht der gemessenen transienten Absorptionsänderungen kann Abbildung 6.1 entnommen werden. Die gewählte Farbkodierung weist positiven Absorptionsänderungen (Zunahme der Absorbanz) jeweils rote Farbtöne zu, negativen Absorptionsänderungen (Abnahme der Absorbanz) dagegen blaue Farbtöne. Bereiche ohne Änderung der Absorbanz werden in Grüntönen dargestellt. Die Skalierung der Verzögerungszeit-Achse wechselt ab der ersten Pikosekunde nach Photoanregung von einer linearen zu einer logarithmischen Skalierung. Ergänzend hierzu sind in Abbildung 6.2 ausgewählte Transienten dargestellt. Sie beinhalten jeweils die Entstehung des Photoprodukts (a und d), sowie Erscheinen und Rückbildung des Grundzustandsbleichens (b und e) und der Absorption des angeregten Zustands (c und f). Zur besseren Vergleichbarkeit

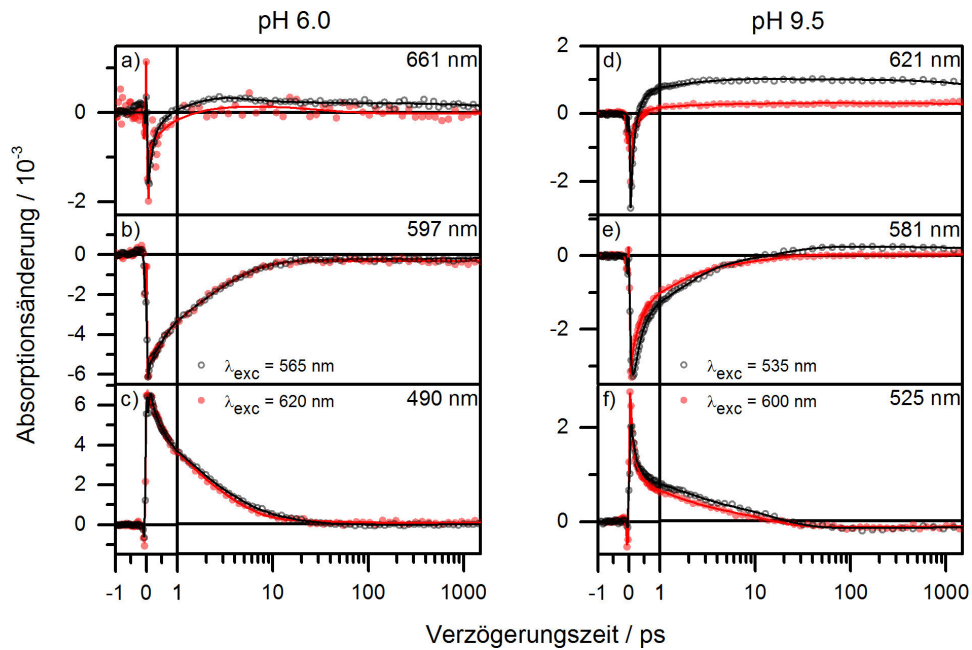


**Abbildung 6.1:** Transiente Absorptionsänderung von Chrimson bei pH 6,0 (oben) mit Anregung bei 565 nm in das Maximum der Grundzustands-Absorption (a) und rot-verschoben dazu bei 620 nm (b), sowie pH 9,5 (unten) mit Anregung bei 535 nm in das Maximum der Grundzustands-Absorption (c) und rot-verschoben dazu bei 600 nm (d).

wurden die Amplituden der, für das Grundzustandsbleichen repräsentativen Transienten des jeweiligen pH-Wertes aufeinander skaliert (b bzw. e). Der gleiche Skalierungsfaktor wurde auch auf die verbleibenden Transienten derselben Messung angewandt.

Ogleich alle vier Datensätze bei verschiedenen pH-Werten bzw. mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen gemessen wurden, weisen sie doch gewisse grundlegende Gemeinsamkeiten auf. So erscheint unterhalb von 540 nm jeweils unmittelbar nach Photoanregung die positive Signatur einer Absorption des angeregten Zustands (ESA, von engl. *excited-state absorption*). Wie Abbildung 6.2c bzw. f entnommen werden kann, ist das Signal der ESA bis etwa 30 ps nach Photoanregung sichtbar, klingt dabei jedoch größtenteils innerhalb der ersten Pikosekunden nach Photoanregung ab. Zeitgleich mit Erscheinen der ESA ist auch das Signal des Grundzustandsbleichens (GSB, von engl. *ground-state bleach*) zwischen 530 und 650 nm sichtbar. Die Dynamiken von GSB und ESA verhalten sich zunächst ähnlich, erkennbar an der überwiegenden Rückbildung des GSB-Signals innerhalb der ersten Pikosekunden nach Photoanregung (siehe Abbildung 6.2b bzw. e). Während die ESA





**Abbildung 6.2:** Transiente Absorptionsänderungen von Chrimson bei ausgewählten Detektionswellenlängen für pH 6,0 (a-c) und pH 9,5 (d-f), jeweils mit der Anregungswellenlänge resonant zum Absorptionsmaximum des Grundzustands (schwarze Kreise) und rot-verschoben dazu (rote Punkte). Die durchgezogenen Linien repräsentieren jeweils das Ergebnis der Globalen Fitanalyse.

jedoch zu späteren Verzögerungszeiten völlig abklingt, wird in Bezug auf den GSB auch bei maximaler Verzögerungszeit von 1,5 ns in den betroffenen Detektionskanälen ein schwach negatives Signal registriert. In diesem Zusammenhang fällt ein, zentriert auf 660 nm (pH 6,0) bzw. 630 nm (pH 9,5) liegendes, positives Absorptionssignal auf. Es tritt mit einer Verzögerung zur Photoanregung von etwa 1 ps (pH 6,0) bzw. 300 fs (pH 9,5) in Erscheinung und deutet auf die Bildung eines Photoproduktes hin. In Abbildung 6.1 erscheint die Amplitude dieser Photoproduktabsorption (PA) für pH 6,0 deutlich schwächer ausgeprägt, als für pH 9,5. Diese Beobachtung kann hauptsächlich auf einen Überlapp mit dem negativen Signal des GSB zurückgeführt werden, wobei die daraus resultierende Kompensation der Signal-Amplituden bei pH 6,0 aufgrund der rot-verschobenen Grundzustands-Absorption deutlich stärker ausgeprägt ist. Vergleicht man die Datensätze identischen pH-Wertes, jedoch unterschiedlicher Anregungswellenlänge, so fällt sofort die höhere PA bei kurzweiliger Anregung ins Auge. An den roten Flanken

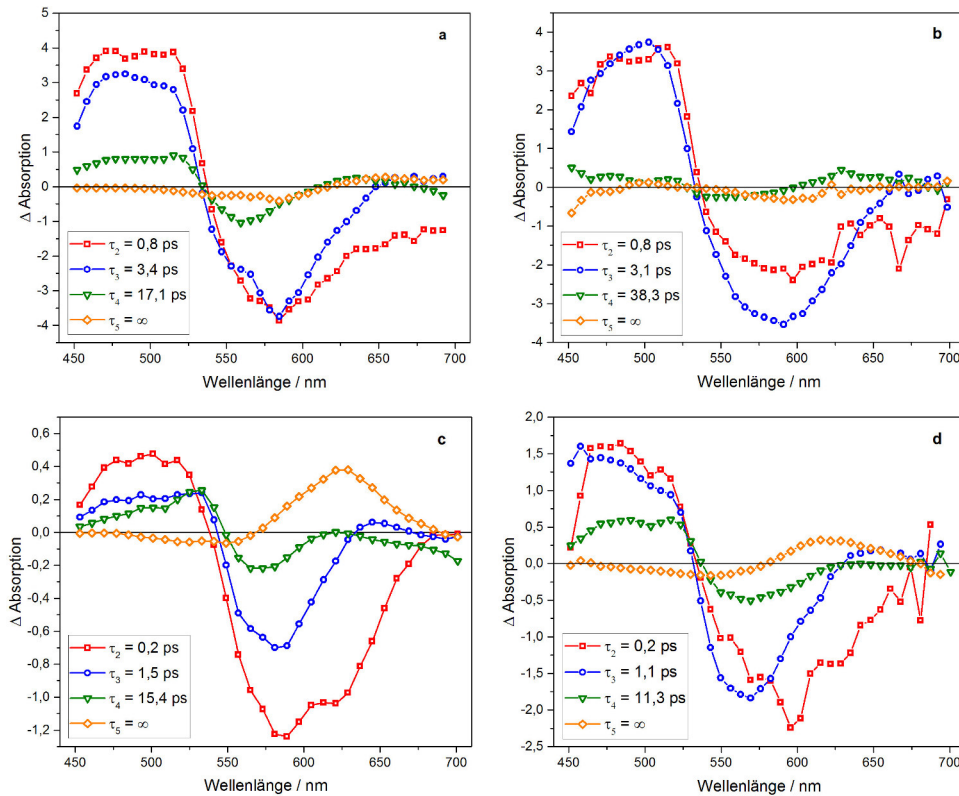
**Tabelle 6.1:** Übersicht der ermittelten Zeitkonstanten aus der globalen Fitanalyse der transienten Absorptionsdaten. Die Anpassung der Zeitkonstanten geschah, wann immer möglich, frei jeglicher Grenzbedingungen. Ausgenommen davon ist die Zeitkonstante  $\tau_1$ , welche teilweise auf den Wert der Zeitauflösung des Experimentes festgesetzt werden musste, um ein Abdriften in Richtung unrealistisch niedriger Werte zu verhindern - entsprechende Fälle sind in der Tabelle mit (\*) markiert.

pH	$\lambda_{exc}$ / nm	Zeitkonstanten / ps				
		$\tau_1$	$\tau_2$	$\tau_3$	$\tau_4$	$\tau_5$
6,0	565 nm	0,1*	0,8	3,4	17,1	$\infty$
	625 nm	0,07*	0,8	3,1	38,3	$\infty$
9,5	535 nm	0,06	0,2	1,5	15,4	$\infty$
	600 nm	0,07*	0,2	1,1	11,3	$\infty$

des abgetasteten Spektralbereiches sind, insbesondere bei pH 9,5 jeweils schwach negative Beiträge erkennbar. Diese können stimulierter Emission (SE) zugerechnet werden und stimmen in ihrer spektralen Position gut mit den aufgenommenen 3D-Fluoreszenzspektren überein (siehe Abbildung A.1).

Es hat den Anschein, dass die spektrale Position der transienten Signale unterhalb von 600 nm vom pH-Wert unbeeinflusst bleibt. Dieser Effekt ist rein kompensatorischer Art. Wird der pH-Wert von 6,0 auf 9,5 erhöht, so verzeichnet das negative Signal des GSB eine Verschiebung hin zu kürzeren Wellenlänge, während das positive Signal der ESA entgegengesetzt in Richtung längerer Wellenlängen schiebt. Dies wird sichtbar, wenn die Beiträge des GSB aus den gemessenen Transienten herauskorrigiert werden. In diesem Fall wird ebenfalls deutlich, dass das transiente Spektrum bei maximaler Verzögerungszeit von 1,5 ns bereits sehr ähnlich den frühen transienten Spektren der Blitzlicht-Photolyse ist.

Die Auswertung der transienten Daten geschah mit der, in Kapitel 3.3 beschriebenen Methode der Globalen Fitanalyse (GFA). Alle vier Datensätze konnten zufriedenstellend mit insgesamt fünf Zeitkonstanten beschrieben werden. Eine Übersicht der erhaltenen Zeitkonstanten ist in Tabelle 6.1 gegeben. Die zugehörigen zerfallsassoziierten Spektren (DAS von engl. *decay associated spectra*) sind in Abbildung 6.3 dargestellt. Auf die Darstellung der DAS der frühestens Zeitkonstante  $\tau_1$  wurde verzichtet, da sie durch Residuen des



**Abbildung 6.3:** Darstellung der zerfallsassoziierten Spektren aus der Globalen Fitanalyse der transienten Datensätze bei pH 6,0 (oben) mit Anregung bei 565 nm in das Maximum der Grundzustands-Absorption (a) und rot-verschoben dazu bei 620 nm (b), sowie pH 9,5 (unten) mit Anregung bei 535 nm in das Maximum der Grundzustands-Absorption (c) und rot-verschoben dazu bei 600 nm (d). Auf die Darstellung der DAS der frühestens Zeitkonstante  $\tau_1$  wird verzichtet, da sie durch Residuen des kohärenten Artefakts gestört wird, was ihre Interpretierbarkeit stark einschränkt.

kohärente Artefakts beeinträchtigt ist, was ihre Interpretierbarkeit stark einschränkt - sie wird daher nicht weiter diskutiert. Im Folgenden wird der Fokus zunächst auf den Ergebnissen der Messreihen mit der Anregung resonant zum Absorptionsmaximum der Chrimson-Probe liegen. Die Betrachtung der Ergebnisse mit rot-verschobener Anregung folgt im Anschluss.

Für die zweite Zeitkonstante  $\tau_2$  wurden in der GFA Werte von 0,8 ps für pH 6,0 und 0,2 ps für pH 9,5 gefunden. Trotz unterschiedlicher Werte für die Zeitkonstanten ähneln sich die zugehörigen DAS. Beide weisen Beiträge in zwei spektralen Bereichen auf. In der Region  $<535$  nm wird eine positive Amplitude vorgefunden, welche dem Zerfall des Signals der ESA zugeordnet werden kann. Dagegen wird im Bereich  $>535$  nm eine negative Amplitude angezeigt, welche sich

neben einer teilweisen Repopulierung des initialen Zustandes bzw. Rückbildung des GSB auch dem Anstieg einer Photoproduktabsorption und dem Abklingen des Signals der SE zuordnen lässt.

Die dritte Zeitkonstante  $\tau_3$  wurde in der GFA zu 3,4 ps für pH 6,0 bzw. 1,5 ps für pH 9,5 bestimmt. Mit Blick auf die zugehörigen DAS fällt auf, dass auch für  $\tau_3$  eine prinzipiell ähnliche Situation wie für  $\tau_2$  eintritt, indem trotz pH-abhängiger Unterschiede im Wert für  $\tau_3$  ähnliche DAS erhalten werden. Letztere weisen Beiträge in insgesamt drei spektralen Regionen auf. Im Bereich  $<535$  nm wird eine positive Amplitude vorgefunden, was für eine Beteiligung am Abbau des Signals der ESA spricht. Zwischen 535-650 nm (pH 6,0) bzw. 535-620 nm (pH 9,5) deutet die negative Amplitude auf einen teilweisen Rückgang des Signals des GSB hin. Im Unterschied zur DAS von  $\tau_2$  weist die DAS von  $\tau_3$  jedoch keinen ausgeprägt negativen Beitrag im Bereich 600-650 nm auf, sondern zeigt hier vielmehr eine schwach positive Amplitude, welche indikativ für das Abklingen eines Absorptionssignals ist. Von dieser Abweichung abgesehen fällt auf, dass sich die DAS von  $\tau_2$  und  $\tau_3$  stark ähneln.

Für die vierte Zeitkonstante  $\tau_4$  ergab die GFA Werte von 17 ps für pH 6,0 bzw. 15 ps für pH 9,5. Die zugehörigen DAS weisen einen sigmoidalen Amplitudenverlauf auf, mit positiven Beiträgen im Bereich um 530 und 625 nm, sowie negativen Beiträgen bei 570 und 700 nm. Dies entspricht einem typischen Muster für die spektrale Verbreiterung eines Absorptionssignals, wie es beispielsweise durch eine Relaxation der Retinalbindetasche oder Kühlprozesse hervorgerufen werden kann.

Die fünfte Zeitkonstante  $\tau_5$  wird benötigt, um die residualen Signale bei maximaler Verzögerungszeit zu beschreiben. Die zugehörige DAS entspricht daher dem transienten Absorptionsspektrum bei maximaler Verzögerungszeit, bestehend aus einem persistenten GSB, sowie der Photoproduktabsorption.

Die Rot-Verschiebung der Anregung führt zu einem leichten Zuwachs des Amplitudenverhältnisses von  $\tau_3$  zu  $\tau_2$ . Dies wird für beide pH-Werte beobachtet. Allerdings ist der Effekt für pH 9,5 deutlich

stärker ausgeprägt, als für pH 6,0, wie anhand der Abbildungen 6.2a bzw. b erkennbar ist. Für pH 9,5 vermindert sich die Amplitude der Photoproduktabsorption deutlich, sobald die Anregungswellenlänge rot verschoben wird.

Wie aus Abbildung 6.1 ersichtlich, wird die Amplitude der Photoproduktabsorption von mehreren Faktoren bestimmt. Da das Maximum der Absorptionsbande von Chrimson bei niedrigen pH-Werten zu längeren Wellenlängen verschoben ist, kommt es bei pH 6,0 zur nahezu vollständigen Kompensation des GSB mit der Photoproduktabsorption. Die daraus resultierende schwache Amplitude der Photoproduktabsorption täuscht jedoch über die tatsächlichen Verhältnisse hinweg. Für pH 9,5 und eine Anregung von Chrimson in das Maximum der Absorptionsbande ist die Entstehung des Photoprodukts dagegen gut sichtbar (siehe Abbildung 6.1c bzw. 6.2d). Auffallend ist die deutlich geringere Amplitude der Photoproduktabsorption in Abbildung 6.2d im Vergleich zu Abbildung 6.2c. Da es sich in beiden Fällen um spektral identische Proben handelt, sind Unterschiede allein auf die rot-verschobene Anregung zurückzuführen, was im Fall der verringerten Amplitude der Photoproduktabsorption auf eine geringere Quantenausbeute der Primärreaktion hindeutet. Nach kurzer Betrachtung allgemeiner Merkmale, wird der Fokus der Diskussion auf diesen, für Chrimson spezifischen Beobachtungen liegen.

In den Transienten kann zeitgleich mit dem Pump-Puls der Anstieg eines Absorptionssignals beobachtet werden, welches auf einer Zeitskala von nur 150 fs wieder zerfällt. Das Erscheinen eines solchen Signales ist typisch für Retinal-Proteine. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für CrChR-2 [95] und PR [96, 97] berichtet. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist eine zeitaufgelöste Studie an BR mit <10 fs Zeitauflösung. Auch hier wurde vom Erscheinen eines solchen Absorptionssignales mit schneller Dynamik berichtet und diese Beobachtung der initialen Bewegung des, durch die Photoanregung des Retinal-Chromophors induzierten Wellenpaketes aus der Frank-Condon-Region hinaus zugeordnet [98]. In den Transienten von Chrimson ist gleichzeitig mit dem Abklingen dieses Absorptionssignales eine dynamische Entwicklung des GSB zwischen

530 und 650 nm zu beobachten. Das Signal der SE ist in den Messungen bei pH 6,0 kaum, für pH 9,5 schwach in den langwelligen Transienten des aufgenommenen Spektralbereiches sichtbar. Aufgenommene 3D-Fluoreszenzspektren legen jedoch ein Erscheinen der SE im Bereich um 700 nm für pH 6,0 bzw. 670 nm für pH 9,5 nahe (siehe Abbildung A.1).

Im kurzwelligen Spektralbereich zeigen die Transienten das Erscheinen eines dominanten, positiven Signals kurz nach Photoanregung an. Dies kann auf die Besetzung eines angeregten Zustandes mit eigener Absorptionsbande (ESA) zurückgeführt werden. Durch Überlagerung mit spektral benachbart liegenden Signalen, beispielsweise dem GSB, ist die spektrale Lage der ESA von Spezies zu Spezies verschieden. So wird im Fall von PR und BR von einem Auftauchen der ESA bei 460 nm berichtet, was jeweils blau-verschoben zum GSB ist [96, 99]. Demgegenüber erscheint die ESA in Messungen an CrChR-2 bei 530 nm, was einer Rot-Verschiebung gegenüber dem GSB entspricht [95]. Für Chrimson wird die ESA im Spektralbereich  $<540$  nm beobachtet, was einer Blau-Verschiebung gegenüber dem GSB entspricht. Ein Blick auf Abbildung 6.1 könnte den Eindruck erwecken, die spektrale Position der ESA sei unabhängig vom pH-Wert. Tatsächlich jedoch lässt sich diese Beobachtung durch eine Kompensation des positiven ESA-Signals mit dem negativen GSB-Signal erklären. Der spektrale Verlauf des GSB entspricht dabei im Wesentlichen dem stationären UV/Vis-Spektrum, sodass die transienten Messungen durch geeignetes Aufaddieren des stationären UV/Vis-Spektrums um den Beitrag des GSB korrigiert werden können. In diesem Fall wird für Chrimson eine pH-abhängige, spektrale Rot-Verschiebung der ESA-Bande von  $\sim 18$  nm ( $\sim 650$   $\text{cm}^{-1}$ ) bei Erhöhung des pH-Wertes von 6,0 auf 9,5 deutlich sichtbar. Demgegenüber schiebt das Absorptionsmaximum des Retinal-Chromophors im stationären UV/Vis-Spektrum um  $\sim 48$  nm ( $\sim 1530$   $\text{cm}^{-1}$ ) hin zu kürzeren Wellenlängen. Dieses unterschiedliche Verhalten beider Signaltypen weist auf einen stärkeren Einfluss des pH-Wertes auf den  $S_0$ - und  $S_2$ -Zustand hin, im Vergleich zum  $S_1$ -Zustand.

Beim Blick auf die DAS fällt auf, dass sich insbesondere die Amplitudenverläufe von  $\tau_2$  und  $\tau_3$  stark ähneln. Ausgenommen hiervon

ist der spektrale Bereich  $>600$  nm, wo für  $\tau_2$  ein negativer Beitrag, für  $\tau_3$  hingegen ein leicht positiver Beitrag gefunden wird. Ein ähnlicher Fall wurde auch für PR berichtet und als bi-phasische Depopulation des angeregten Zustandes interpretiert. Beide Zeitkonstanten wurden der Entstehung mindestens eines Photoproduktes zugeordnet, wobei die Möglichkeit einer Beobachtung mehrerer konsekutiver Photoprodukte nicht ausgeschlossen wurde. Die unterschiedlichen Beiträge von  $\tau_2$  und  $\tau_3$  in der DAS im Bereich 600-700 nm wurden der Entstehung von Grundzustands-Intermediaten auf der Zeitskala von  $\tau_3$  zugewiesen [96]. Übertragen auf die transienten Messungen an Chrimson führt dies zum Schluss, dass auch für dieses ChR ein bi-phasisches Abklingen der ESA beobachtet wird, was insofern bemerkenswert ist, als dass für *CaChR-1* und *CrChR-2* jeweils ein mono-exponentieller Zerfall berichtet wurde [95, 100, 101].

Das Abklingen der ESA führt zur Entstehung eines vergleichsweise langlebigen Absorptionssignals, welches rot-verschoben zum GSB erscheint und einem Photoprodukt zugeordnet werden kann. Was im Fall von Chrimson wie eine einzelne Absorptionsbande erscheint, könnte sich als Summe der Beiträge mehrerer Absorptionsbanden jeweils verschiedener Spezies erweisen, beispielsweise J- und K-ähnliche Zustände. Die aufgenommenen Transienten suggerieren tatsächlich eine schwache Blauverschiebung des betreffenden Absorptionssignals innerhalb der ersten 3-5 ps nach Photoanregung, jedoch verhindert der starke spektrale Überlapp mit dem GSB eine fundierte Aussage zu diesem Sachverhalt. Definitiv zu beobachten ist dagegen eine spektrale Verbreiterung der betreffenden Photoprodukt-Absorption etwa 15-17 ps nach Photoanregung. Dieser Vorgang spiegelt sich auch im Amplitudenverlauf der Zeitkonstante  $\tau_4$  wieder und wird als Kühl- bzw. Relaxationsprozess der Retinal-Umgebung interpretiert. Vergleichbare Beobachtungen wurden auch für BR, *CrChR-2* und SRII gemacht [102–104], wobei Messungen an *CrChR-2* im IR-Spektralbereich einen andauernden Kühlprozess in diesem Zeitfenster ergaben. Im Fall von Chrimson bleibt die betreffende Photoproduktabsorption im Anschluss bis zur maximalen Verzögerungszeit des Experimentes von 5 ns praktisch unverändert bestehen, was sich letztlich im Amplitudenverlauf der Zeitkonstante  $\tau_5$  niederschlägt.

Chrimson wartet mit einer sehr rapiden Dynamik der Primärreaktion auf. So ergab die GFA an den Transienten bei pH 9,5 Zeitkonstanten von 0,2 ps und 1,5 ps. Für mikrobielle Rhodopsine ist ein solcher Befund durchaus passend. So wurde beispielsweise für CrChR-2 eine Zeitkonstante von nur 0,4 ps für die Primärreaktion gefunden [95], was mit Blick auf Chrimson in etwa vergleichbar ist. Auch für BR und SRII wurden ähnlich schnelle Vorgänge berichtet [79, 98]. Im direkten Geschwindigkeitsvergleich mit dem grünabsorbierenden CaChR-1, welches einen, zu Chrimson ähnlichen Farbabstimmungs-Mechanismus aufweist, hat Chrimson sogar das Nachsehen – femtosekunden-zeitaufgelöste Studien an CaChR-1 im Vis- und MIR-Spektralbereich ergaben für die Isomerisierung eine Zeitkonstante von nur 110 fs, gefolgt von Kühlprozessen auf einer Zeitskala von 550-580 fs [101, 105]. Derartige Vergleiche sind jedoch mit einer gewissen Vorsicht zu betrachten, da beispielsweise für CaChR-1 und CrChR-2 ein mono-exponentieller Zerfall gefunden wurde, während Chrimson einen bi-phasischen Zerfall zeigt.

Im Kontext der Reaktionsgeschwindigkeiten ist die, für Chrimson vorgefundene pH- und Wellenlängen-Abhängigkeit der Primärreaktion zu erwähnen. Allgemein führt ein Absenken des pH-Wertes zum Anwachsen einer Retinalprotein-Fraktion, deren Schiff-Basen-Gegenion protoniert ist. Für Chrimson, dessen pKs-Wert im solubilisierten Zustand zu 7,3 bestimmt wurde [106], liegen somit bei pH 6,0 bzw. 9,5 unterschiedliche Startzustände des Photozyklus vor, sodass für beide pH-Werte unterschiedliche Dynamiken der Primärreaktion beobachtet werden. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für PR und BR berichtet, wo die Lebensdauer des angeregten Zustandes bzw. der ESA im Fall eines protonierten Gegenions gegenüber der deprotonierten Spezies deutlich höher ausfiel [96, 107]. Der Einfluss des pH-Wertes auf die Dynamik der Primärreaktion kann dabei über Wechselwirkungen zwischen dem Retinal-Chromophor



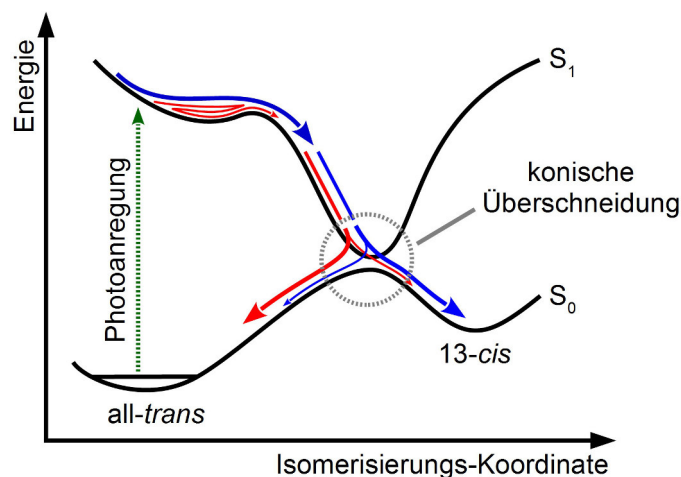
und benachbarter Aminosäurereste verstanden werden. Die Photoanregung des Retinal-Chromophors führt zu einer veränderten Ladungsverteilung innerhalb desselben, indem positive Partialladungen tendenziell aus Richtung der RSB hin zum  $\beta$ -Iononring umverteilt werden. Grundzustand und angeregter Zustand des Retinal-Chromophors weisen daher voneinander abweichende elektrostatische Eigenschaften auf, was sich über veränderte Wechselwirkungen mit den unmittelbar benachbarten, geladenen Aminosäureresten bemerkbar macht [96]. Übertragen auf Chrimson, fällt die Aufmerksamkeit auf die beiden Aminosäuren E165 und D295, welche bei pH 9,5 negativ geladen sind und das Äquivalent zu den Aminosäuren E123 und D253 in CrChR-2 darstellen. Nach Photoanregung übt die negative Ladung beider Aminosäuren einen stabilisierenden Einfluss auf die Ladungsverteilung des Retinal-Chromophors im angeregten Zustand aus. In Folge wird der Doppelbindungscharakter der C13-C14-Doppelbindung gelockert und die Energiebarriere zur Isomerisierung entlang dieser Bindung abgesenkt, was sich letztlich in höheren Reaktionsraten äußert. Liegen die besagten Aminosäuren jedoch in ihrem protonierten Zustand vor, beispielsweise als Folge eines niedrigen pH-Wertes, so entfällt ihr stabilisierender Einfluss, was zu einer Verlangsamung der Reaktionsrate führt. Im Fall von Chrimson kommt hinzu, dass ein Absenken des pH-Wertes von 9,5 auf 6,0 eine Rot-Verschiebung der Retinal-Chromophor-Absorption um 48 nm ( $\sim 1530 \text{ cm}^{-1}$ ) bewirkt. Die jeweiligen Lebensdauern erhöhen sich infolge auf 0,8 ps und 3,4 ps. Dennoch verbleibt die Dynamik der Primärreaktion von Chrimson selbst unter diesen weniger günstigen Bedingungen (protoniertes Gegenion, dadurch fehlender, stabilisierender Einfluss und geringere Anregungsenergie) auf einem schnellen Niveau, verglichen mit anderen Retinal-Proteinen, wie beispielsweise PR [96].

Neben der Reaktionsgeschwindigkeit zeigt auch die Bildung des primären Photoproduktes P1 eine Abhängigkeit vom pH-Wert und der Anregungswellenlänge, auf die im Folgenden eingegangen wird. Die spektrale Signatur der Absorption von P1 tritt deutlicher hervor, wenn die aufgenommenen Transienten um den Beitrag des spektral stark mit der Absorption von P1 überlappenden GSB korrigiert werden. Dabei fällt eine Wellenlängen-Abhängigkeit der Absorption

von P1 auf, sodass fortan eine Unterscheidung zwischen den bei pH 6,0 gebildeten Intermediaten  $P_{ac}$  und den pH 9,5 gebildeten Intermediaten  $P_{alk}$  gemacht wird. Zwischen der Absorption von  $P1_{ac}$  bei ca. 630 nm und der von  $P1_{alk}$  bei ca. 650 nm liegt eine Differenz von ca. 20 nm ( $\sim 540 \text{ cm}^{-1}$ ). Eine vergleichbare Beobachtung wurde auch für PR gemacht [96]. Werden die Amplituden der besagten Transienten für Chrimson nun noch mit der Intensität der Anregung skaliert, so zeichnet sich ab, dass die Amplitude für  $P1_{alk}$  diejenige von  $P1_{ac}$  in etwa um das 4-Fache übertrifft. Es ist verlockend, bereits hier eine pH-Abhängigkeit der Isomerisierungs-Quantenausbeute zu vermuten. Jedoch muss an dieser Stelle unbedingt berücksichtigt werden, dass die Extinktionskoeffizienten für  $P1_{ac}$  und  $P1_{alk}$  nicht bekannt sind und die zuvor beschriebenen Amplitudenverhältnisse möglicherweise auch auf unterschiedliche Absorptionseigenschaften der Intermediate zurückgeführt werden können.

Bezugnehmend auf die zuvor erwähnten Quantenausbeuten ist eine weitere Beobachtung von großem Wert. Sowohl für  $P1_{ac}$ , als auch für  $P1_{alk}$  wird eine Reduktion der Amplitude in den betreffenden Kanälen beobachtet, sobald die Anregungswellenlänge gegenüber dem Maximum der statischen Absorption von Chrimson rot-verschoben wird. Dieser Effekt ist für pH 9,5 am besten zu beobachten. Ferner ist in den zugehörigen DAS eine Veränderung der Amplitudenverhältnisse von  $\tau_2$  und  $\tau_3$  zugunsten von  $\tau_3$  erkennbar. Ein solches Verhalten kann auf eine inhomogene Probe hinweisen, beispielsweise eine Mischung verschiedener Isomere des Retinal-Chromophors, wobei die einzelnen Isomere jeweils eigene, voneinander leicht abweichende spektrale Eigenschaften aufweisen. Für Chrimson ist die Isomeren-Zusammensetzung des Retinal-Chromophors im Ausgangszustand bislang nicht bekannt. Bemerkenswerterweise führt die Rot-Verschiebung der Anregungswellenlänge zwar zu einer Änderung der Amplitudenverhältnisse im DAS, nicht jedoch zu einer signifikanten Veränderung der gefundenen Lebensdauern. Gerade letzteres wäre jedoch zu erwarten, falls sich die Isomeren-Zusammensetzung innerhalb der Gruppe angeregter Chrimson-Moleküle verändert hätte.

Die beobachtete Abhängigkeit der Photoproduktbildung vom



**Abbildung 6.4:** Skizze des vorgeschlagenen Mechanismus der Primärreaktion von Chrimson. Bereits kurz nach Photoanregung teilt sich der Reaktionspfad in einen schnelleren (blau) und einen langsameren (rot) Pfad, wobei letzterer eine geringere Isomerisierungs-Quantenausbeute aufweist. Eine Rot-Verschiebung der Anregungswellenlänge begünstigt dabei den langsameren Pfad.

pH-Wert, vor allem aber von Anregungswellenlänge deutet somit auf unterschiedliche Isomerisierungs-Quantenausbeuten hin. In Abbildung 6.4 wird dieser Gedanke illustriert. Demnach kommt es bereits kurz nach Photoanregung zu einer Teilung des Reaktionspfades. Für den langsameren Reaktionspfad (in Abbildung 6.4 rot dargestellt) ist es denkbar, dass er die konische Überschneidung der Energiehyperflächen von Grundzustand und angeregtem Zustand aus einer anderen Richtung erreicht, als der schnellere Reaktionspfad (in Abbildung 6.4 blau dargestellt). Diese Situation ist gleichbedeutend mit einem angeregten Retinal-Chromophor in seiner *all-trans*-Form, dessen Isomerisierung in seine *13-cis*-Form aufgrund abweichender Torsions- und Streckungskordinaten weniger effizient verläuft, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Isomerisierung sinkt. Diese Vorstellung lässt sich auch auf die beobachtete pH-Abhängigkeit der Primärreaktion von Chrimson erweitern. Hierbei ist es die Neigung der Energiehyperfläche, welche pH-abhängig variiert und somit weniger effiziente Reaktionspfade unter Umständen gegenüber effizienteren begünstigt, worunter letzten Endes die Isomerisierungs-Quantenausbeute leidet.

Zusammengefasst ergibt sich für Chrimson das Bild einer sehr

schnellen Primärreaktion, selbst unter tendenziell ungünstigen Bedingungen. Die Primärreaktion folgt dabei einem verzweigten Reaktionsmodell und weist Abhängigkeiten von verschiedenen Parametern auf. So führt ein Absenken des pH-Wertes zu einer Verlangsamung der Primärreaktion bzw. zu erhöhten Zeitkonstanten. Die Rot-Verschiebung der Anregungswellenlänge begünstigt den langsameren Zerfallsprozess des angeregten Zustandes, erkennbar am veränderten Amplitudenverhältnis der betreffenden Zeitkonstanten  $\tau_2$  und  $\tau_3$  zugunsten von  $\tau_3$ . Diese Beobachtungen deuten auf die Existenz eines lokalen Minimums auf der Energiehyperfläche des angeregten Zustandes hin, was sich gut mit einem bereits vorgeschlagenem Reaktionsmodell [97] in Einklang bringen lässt. Dementsprechend besteht der erste Schritt nach Anregung des Retinal-Chromophors in Chrimson im rapiden Verlassen des Franck-Condon-Bereichs entlang der C=C-Streckkoordinate. Auf diesen initialen Schritt folgt die Entwicklung der Isomerisierung entlang C13-C14-Torsionskoordinate, bis der Reaktionspfad schlussendlich über eine konische Überschneidung die Energiehyperfläche des angeregten Zustandes verlässt und die des Grundzustandes erreicht. Es wird angenommen, dass die meisten Moleküle die konische Überschneidung mehr oder weniger direkt erreichen, während einige eine Art „Umweg“ durch ein lokales Minimum auf der Energiehyperfläche des angeregten Zustandes machen. Letztere erreichen die konische Überschneidung folglich mit einer gewissen „Verspätung“, und möglicherweise auch aus einer abweichenden Richtung bzw. abweichenden Torsions- und Streck-Koordinaten der einzelnen Bindungen im Retinal-Chromophor, was sich auf die Effizienz der Isomerisierung auswirkt. Der beobachtete bi-phasische Zerfall des angeregten Zustandes stützt dieses Modell bzw. die Vorstellung eines verzweigten Reaktionsmodell, wobei die pH-abhängige Neigung der Energiehyperfläche des angeregten Zustandes bestimmte Pfade mehr oder minder begünstigt. Hinzu kommt die Überlegung, dass eine rot-verschobene Anregung dem Retinal-Chromophor weniger überschüssige Energie zur Verfügung stellt, wodurch dem betreffenden System das Verlassen eines lokalen Minimums erschwert wird. Diese Auswirkung anhand der vorliegenden Messungen in

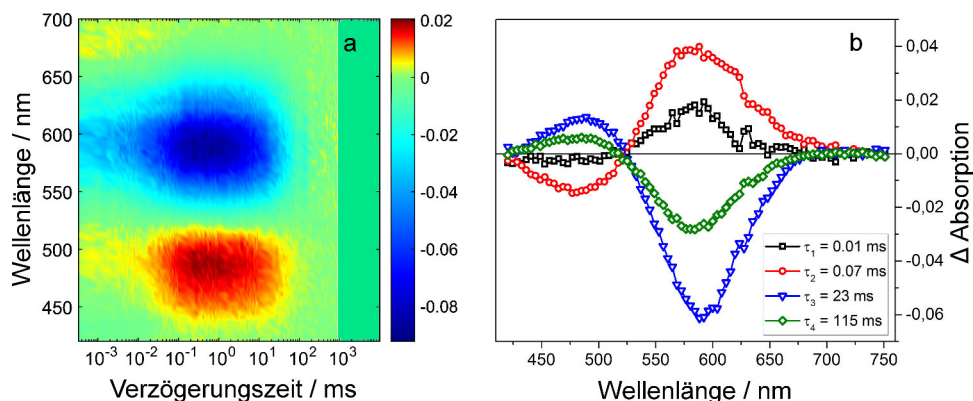
absoluten Zahlen für die Isomerisierungs-Quantenausbeute auszudrücken ist wünschenswert, wird jedoch durch den starken spektralen Überlapp mit anderen Signalen verhindert. Zukünftige Studien der Primärreaktion von Chrimson im IR-Spektralbereich werden sich hierbei als nützlich erweisen.

## 6.4 Photozyklus

Im vorigen Abschnitt wurde die Primärreaktion von Chrimson, das heißt die unmittelbar auf eine Photoanregung folgenden Prozesse behandelt, welche letztlich zur Entstehung eines Photoproduktes P1 führen. Der vorliegende Abschnitt befasst sich mit der Folgereaktion, in deren Zuge Chrimson wieder in seinen Ausgangszustand zurückkehrt, weshalb auch von einem „Photozyklus“ gesprochen wird. Die im vorigen Abschnitt eingeführte Unterscheidung der Photoprodukte, beispielsweise die von P1 in das bei pH 6,0 gebildete Photoprodukt P1<sub>ac</sub> und das bei pH 9,5 gebildete P1<sub>alk</sub>, wird beibehalten. Die Messungen der Chrimson-Proben wurden mit der in Kapitel 3.2 beschriebenen Blitzlichtphotolyse-Messanlage durchgeführt.

### Blitzlichtphotolyse-Messung an Chrimson bei pH 6,0

In Abbildung 6.5a sind die transienten Absorptionsänderungen aus der Blitzlichtphotolyse-Messung von Chrimson bei pH 6,0 dargestellt. Die Farbkodierung weist positiven bzw. negativen Absorptionsänderungen einen roten bzw. blauen Farbton zu und ist damit identisch mit der in Abbildung 6.1 gewählten. Die Skalierung der Verzögerungszeit-Achse ist durchgehend logarithmisch. Die aufgenommenen Transienten zeigen die Präsenz diverser Photointermediate im Mikrosekunden- bis Sekunden-Bereich an. Zur frühesten Verzögerungszeit von 330 ns ist, neben dem negativen Signal des GSB um 590 nm herum, noch ein Überrest des Absorptionssignals von P1<sub>ac</sub> erkennbar, welches bereits kurz nach Photoanregung der Probe beobachtet wird (siehe auch Abbildung 6.1). Zusätzlich wird bei 500 nm die Absorption eines weiteren Photointermediates P2<sub>ac</sub> beobachtet, welches in der Ultrakurzzeitmessung nicht beobachtet wurde. Der Übergang von P1<sub>ac</sub> nach P2<sub>ac</sub> muss folglich zwischen dem nicht abgedeckten Zeitbereich beider Messungen, das heißt



**Abbildung 6.5:** Flashphotolyse-Messungen von Chrimson bei pH 6,0 (a) und die zugehörige DAS (b). Die Dekade 1-9,9 s wurde nicht gemessen, da der Photozyklus innerhalb von 990 ms beendet war.

zwischen 1,5-330 ns erfolgt sein. Bei 330 ns wird bereits das Abklingen des Absorptionssignals von  $P2_{ac}$  beobachtet. Durch den spektralen Überlapp der schwindenden Absorption von  $P1_{ac}$  und  $P2_{ac}$  mit dem GSB scheint dieser ab einer Verzögerungszeit von etwa  $10 \mu s$  an negativer Amplitude zu gewinnen. Zeitgleich baut sich bei 490 nm das Absorptionssignal des nachfolgenden Photoproduktes von  $P3_{ac}$  auf und erreicht bei etwa  $400 \mu s$  Verzögerungszeit sein Maximum. Der daran anschließende Zerfall des Signales vollzieht sich größtenteils innerhalb der folgenden Dekade, sodass die Amplitude des Absorptionssignals von  $P3_{ac}$  bereits bei einer Verzögerungszeit von 100 ms nahezu vollständig abgebaut ist. Die Rückbildung des GSB erfolgt dabei simultan zum Abbau des Absorptionssignals von  $P3_{ac}$ . Im Anschluss werden keine weiteren Absorptionssignale nachfolgender Intermediate beobachtet, sodass der spektroskopisch im sichtbaren Spektralbereich verfolgbare Photozyklus von Chrimson bei pH 6,0 offenbar nach etwa 200-300 ms endet.

Die GFA der aufgenommenen Transienten konnte mit insgesamt vier Zeitkonstanten zufriedenstellend ausgeführt werden. Die zugehörigen DAS sind in Abbildung 6.5b dargestellt. Es zeigt sich, dass die erhaltenen Zeitkonstanten in zwei Gruppen eingeteilt werden können. Für die beiden frühen Zeitkonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  wurden Werte von 0,01 ms und 0,07 ms gefunden. Die zugehörigen DAS weisen

einen praktisch identischen Verlauf auf, wobei das Amplitudenverhältnis durchweg etwa 1:2 zugunsten der DAS von  $\tau_2$  beträgt. Beide DAS weisen eine positive Amplitude  $>520$  nm auf, welcher dem Abbau der Photoprodukt-Absorptionen von  $P1_{ac}$  und  $P2_{ac}$  zugeordnet werden kann. Weiterhin zeigen beide DAS eine negative Amplitude  $<520$  nm, welche den Aufbau der Photoprodukt-Absorption von  $P3_{ac}$  beschreibt.

Für die beiden späten Zeitkonstanten  $\tau_3$  und  $\tau_4$  ergab die GFA Werte von 23 ms und 115 ms. Wie zuvor schon im Fall der beiden frühen Zeitkonstanten, weisen auch die DAS der beiden späten Zeitkonstanten einen praktisch identischen Amplitudenverlauf auf. Das Amplitudenverhältnis beträgt dabei durchweg etwa 2:1 zugunsten von  $\tau_3$ . Beide DAS weisen eine negative Amplitude  $>520$  nm auf, was der Rückbildung des GSB zugeordnet werden kann. Die positive Amplitude  $<520$  nm beschreibt das Abklingen der Absorption von  $P3_{ac}$ .

### Diskussion des Photozyklus von Chrimson bei pH 6,0

Für Chrimson wurde bei pH 6,0 ein sehr schneller Übergang vom frühen, nach Isomerisierung des Retinal-Chromophor gebildeten Photoprodukt  $P1_{ac}$  zum nachfolgenden  $P2_{ac}$  gefunden. Dieser Übergang ist in den Transienten der Ultrakurzzeitmessung noch nicht erkennbar, während die Amplitude der Absorption von  $P2_{ac}$  zu Beginn der Blitzlichtphotolyse-Messung bereits am Abklingen ist. Der Übergang von  $P1_{ac}$  nach  $P2_{ac}$  vollzieht sich somit größtenteils innerhalb des, messtechnisch derzeit nicht zugänglichen Zeitintervalls von 1,5-330 ns. Ein derart rapider Übergang zwischen einem K-ähnlichem Photoprodukt und einem nachfolgenden, in seiner Absorption blauverschobenen Intermediat wurde bislang für kein anderes ChR mit protoniertem Gegenion beobachtet [108, 109].

Auf  $P2_{ac}$  folgt mit  $P3_{ac}$  ein weiteres Intermediat, dessen Absorption im Vergleich zu  $P1_{ac}$  noch weiter blauverschoben ist, als die von  $P2_{ac}$ . Die Eigenschaften dieser Intermediate rein auf den transienten Spektren basierend zu erschließen ist kaum möglich. Hilfreich ist

eine parallel durchgeführte elektrophysiologische Studie an Chrimson\*. Diese ergab für Chrimson bei pH 6,0 eine Öffnungszeit des Ionen-Kanals  $\tau_{open}$  von 0,6 ms. Zu diesem Zeitpunkt hat das transiente Absorptionssignal von P3<sub>ac</sub> sein Maximum bereits überschritten. Die Bildung von P3<sub>ac</sub> erfolgt somit überwiegend noch vor der Öffnung des Ionen-Kanals. Für die Schließung des Kanals wurde ein biphasisches Verhalten gefunden. Die Zeitkonstanten der Schließung des Ionen-Kanals  $\tau_{close}^1$  und  $\tau_{close}^2$  wurden zu 20 ms bzw. 160 ms bestimmt, was gut mit den, aus der GFA der Blitzlichtphotolyse ermittelten Zeitkonstanten  $\tau_3$  und  $\tau_4$  übereinstimmt. Ausgehend von Chrimson mit protoniertem Gegenion, weisen diese Beobachtungen P3<sub>ac</sub> als repräsentatives Intermediat während der Öffnung des Ionenkanals aus. Eine direkte Korrelation zwischen dem Auftreten von spektroskopisch im UV/vis beobachtbaren Intermediaten und der Öffnung des Ionen-Kanals wird für Chrimson bei pH 6,0 jedoch nicht gefunden. Eine vergleichbare Beobachtung wurde auch für CrChR-2 berichtet. Basierend auf Messungen an CrChR-2 im infraroten Spektralbereich wurde geschlussfolgert, dass strukturelle Änderungen des Retinal-Proteins, sowie die Deprotonierung der RSB einer sich einstellenden Ionen-Leitfähigkeit des Kanals vorausgehen, was unter kinetischen Gesichtspunkten mit einem Eintritt von Wasser in den Ionen-Kanal korreliert wurde [10].

Bemerkenswert sind in diesem Zusammenhang auch einige Beobachtungen aus Studien an anderen Retinal-Proteinen. So wurde für CaChR-1 mit deprotoniertem Gegenion beobachtet, dass im Zusammenhang mit der Bildung des K-ähnlichen Zustands eine Protonierung der D295-Homologen ausgehend von der E165-Homologen erfolgt [110]. Die Deprotonierung der RSB erfolgt dabei erst in einem nachfolgenden Schritt, wobei vermutlich die E165-Homologe protoniert wird. Zusammen mit der sich einstellenden Ionen-Leitfähigkeit

---

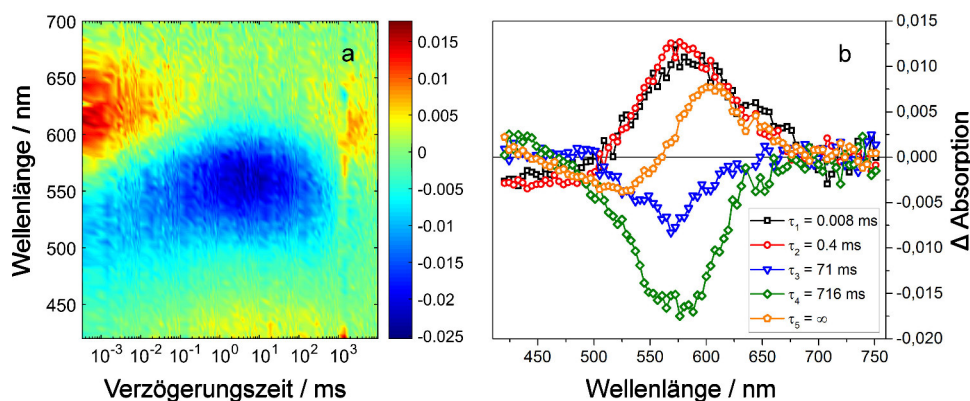
\*Christian Bamann / Max-Planck-Institut für Biophysik (Frankfurt)



des Kanals [111] kommt es so zu einer eher ungewöhnlichen Situation bzw. Ladungsverteilung in der Bindetasche des Retinal-Chromophors, indem gleich zwei saure Aminosäure-Reste im komplexen Gegenion protoniert vorliegen [110]. Für die VChR-1/VChR-2-Chimäre wurde im Fall eines protonierten Gegenions als Startzustand die Akkumulierung eines spektral rot-verschobenen Absorptionssignals eines Intermediates während der Öffnung des Ionenkanals beobachtet [108]. Auch wenn die geschilderten Beobachtungen für CaChR-1 und VChR-1/VChR-2 nicht unbedingt identisch mit denen für Chrimson sind – beispielsweise lässt sich P2<sub>ac</sub> nicht ohne Weiteres einem M-ähnlichen Zustand mit deprotonierter RSB zuordnen –, so weisen sie doch auf eine gewisse Variabilität der Abläufe bzw. des Auftretens diverser Intermediate während des Photozykluses eines Retinal-Proteins hin. Zusammen mit Chrimson werden nun insgesamt drei spektral verschiedene Absorptionssignale von Intermediaten während der leitfähigen Phase des Ionenkanals beobachtet. Wie zuvor bereits erwähnt, übt die Umgebung des Retinal-Chromophors großen Einfluss auf dessen spektrale Eigenschaften aus. Es ist denkbar, dass bereits geringfügige Änderungen der Retinal-Bindetasche sowohl die Absorptionseigenschaften des gebundenen Retinal-Chromophors verändern, als auch zur Akkumulierung von Zuständen mit unterschiedlichem Protonierungsmuster der verfügbaren Aminosäure-Reste führen. Die eigentliche Funktion des Ionen-Kanals mag davon nur wenig bis gar nicht betroffen sein.

### **Blitzlichtphotolyse-Messung an Chrimson bei pH 9,5**

In Abbildung 6.6a sind die transienten Absorptionsänderungen aus der Blitzlichtphotolyse-Messung von Chrimson bei pH 9,5 dargestellt. Die Farbkodierung weist positiven bzw. negativen Absorptionsänderungen einen roten bzw. blauen Farbton zu und ist damit identisch mit der in Abbildung 6.1 gewählten. Die Skalierung der Verzögerungszeit-Achse ist durchgehend logarithmisch. Die frühen transienten Spektren in Abbildung 6.6a weisen mit einem negativen Beitrag bei 460-600 nm, sowie einem positiven Beitrag bei 560-680 nm eine spektrale Signatur auf, welche den späten transienten Spektren



**Abbildung 6.6:** Flashphotolyse-Messungen von Chrimson bei pH 9,5 (a) und die zugehörige DAS (b).

der Ultrakurzzeitmessung gleicht (siehe auch Abbildung 6.1). Folglich hat der Übergang zwischen dem frühen Photoprodukt  $P1_{alk}$  zu einem nachfolgenden Intermediat zu Beginn der Blitzlichtphotolyse-Messung noch nicht stattgefunden. Im Vergleich dazu wurde für Chrimson bei pH 6,0 beobachtet, dass der Übergang von  $P1_{ac}$  nach  $P2_{ac}$  zu Beginn der Blitzlichtphotolyse-Messung bereits nahezu abgeschlossen ist. Diese Beobachtung liefert einen ersten Hinweis darauf, dass sich die Photozyklen von Chrimson bei pH 6,0 und 9,5 unterscheiden. Im weiteren Verlauf des Photozyklus wird im Zeitraum von etwa  $1 \mu s$  bis 1 ms der Übergang von  $P1_{alk}$  zu  $P2_{alk}$  beobachtet. Die Absorption von  $P2_{alk}$  erscheint im Bereich um 400 nm und ist somit blau-verschoben zum GSB, was auf eine Deprotonierung der RSB dieses Intermediats bzw. einen M-ähnlichen Charakter hindeutet. Ab einer Verzögerungszeit von etwa 20 ms ist der Zerfall des Absorptionssignals von  $P2_{alk}$  beobachtbar. Gleichzeitig wird ein Anstieg der Absorption bei 600 nm beobachtet, was die Entstehung eines dritten Intermediats  $P3_{alk}$  anzeigt. Die Absorption von  $P3_{alk}$  durchläuft bei einer Verzögerungszeit von etwa 5 s ihr Maximum und klingt danach wieder ab. Gleichzeitig wird auch ein Zerfall des GSB beobachtet. Dennoch sind bei einer Verzögerungszeit von 9,9 s die Absorptionssignale von  $P3_{alk}$  und GSB noch immer im transienten Spektrum zu beobachten.

Die aufgenommenen Transienten konnten im Zuge der GFA mit insgesamt fünf Zeitkonstanten zufriedenstellend beschrieben werden. Die zugehörigen DAS sind in Abbildung 6.6b dargestellt. Die frühesten Zeitkonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  wurden zu 0,008 ms und 0,4 ms

bestimmt, wobei die zugehörigen DAS nahezu identisch sind. Die positiven Beiträge  $>510$  nm beschreiben dabei den Abbau der Photoprodukt-Absorptionen von  $P1_{\text{alk}}$ , während die negativen Beiträge  $<510$  nm den Aufbau der Photoprodukt-Absorption von  $P2_{\text{alk}}$  reflektieren.

Für die beiden späten Zeitkonstanten  $\tau_3$  und  $\tau_4$  ergab die GFA Werte von 71 ms und 716 ms. Die Amplitudenverläufe der beiden zugehörigen DAS ähneln sich zwar qualitativ, weisen jedoch ein Amplitudenverhältnis von etwa 1:2 zugunsten von  $\tau_4$  auf. Sie beschreiben den Übergang zwischen  $P2_{\text{alk}}$  und  $P3_{\text{alk}}$ . Die positive Amplitude  $<460$  nm kann somit dem Abklingen des Absorptionssignals von  $P2_{\text{alk}}$  zugeordnet werden, während die negative Amplitude  $>460$  nm den Aufbau der Absorption von  $P3_{\text{alk}}$  beschreibt.

Die Zeitkonstante  $\tau_5$  erfüllt die Aufgabe, zu maximaler Verzögerungszeit des Experimentes noch vorhandene Absorptionssignale zu beschreiben. Die zugehörige DAS entspricht somit dem transienten Spektrum bei 9,9 s Verzögerungszeit. Die negative Amplitude im Bereich  $<560$  nm zeigt dabei den noch nicht völlig zurückgebildeten GSB an, während die positive Amplitude im Bereich  $>560$  nm auf noch vorhandene Absorption durch Präsenz von  $P3_{\text{alk}}$  hinweist. Beide Signale sind nicht von permanenter Natur – ein Zerfall wird auf Zeitskalen von einigen 10 s erwartet –, weshalb die Zeitangabe von  $\tau_5$  als „unendlich“ in diesem Zusammenhang irritieren mag. Sie beruht letztlich auf der Tatsache, dass der reale Wert von  $\tau_5$  außerhalb des gemessenen Zeitbereiches liegt und somit anhand der Datenlage nicht sicher bestimmt werden kann.

### Diskussion des Photozyklus von Chrimson bei pH 9,5

Für Chrimson bei pH 9,5 zeigen die Transienten aus der Blitzlichtphotolyse-Messung ein, für Retinalproteine wie beispielsweise *CrChR-2* typisches, transientes Absorptionsmuster. Dies lässt auf einen, mit anderen Retinalproteinen grundsätzlich vergleichbaren Ablauf des Photozyklus schließen. Vorhandene Abweichungen werden nachfolgend näher beleuchtet und diskutiert.

Ein Vergleich der transienten Spektren aus der Ultrakurzzeitmessung bei maximaler Verzögerungszeit, sowie der Blitzlichtphotolyse-Messung bei minimaler Verzögerungszeit ergibt, dass beide Spektren gut übereinstimmen. Dieser Umstand gibt Grund zur Annahme, dass im betreffenden Verzögerungszeitraum von 1,5-330 ns keine nennenswerte Dynamik zu beobachten ist. Bereits hierin unterscheiden sich die Photozyklen von Chrimson mit protoniertem (pH 6,0) und deprotoniertem Gegenion (pH 9,5) als Startzustand. Für den nachfolgenden Übergang von  $P1_{\text{alk}}$  auf  $P2_{\text{alk}}$  wird ein biphasisches Verhalten mit Zeitkonstanten von  $8 \mu\text{s}$  bzw.  $0,4 \text{ ms}$  gefunden. Diese Werte stimmen gut mit den, für *CrChR-2* gefundenen Zeitkonstanten von  $7 \mu$  und  $0,12 \text{ ms}$  überein [95, 112]. Die Absorption des nachfolgenden Intermediats  $P2_{\text{alk}}$  erscheint im Spektralbereich von etwa  $420 \text{ nm}$  und ist somit blau-verschoben zum GSB, was eine weitere Gemeinsamkeit zwischen Chrimson und *CrChR-2* darstellt. Die spektrale Lage der Absorption von  $P2_{\text{alk}}$  spricht dabei für eine deprotonierte RSB bzw. einen M-ähnlichen Charakter dieses Intermediats.

Auffällig an  $P2_{\text{alk}}$  bzw. dem M-ähnlichen Intemediat ist vor allem die lange Lebensdauer dieses Intermediats. Dies weist auf einen fehlenden Protonendonator für die Reprotonierung der RSB hin. Ein Sequenzvergleich mit anderen ChR stützt diese Annahme, indem für Chrimson mit C198 ein Cystein anstelle des sonst konservierten und als Protonendonator diskutierten Aspartats (z.B. D156 in *CrChR-2*) gefunden wird [106]. Die Reprotonierung der RSB durch spontane Protonenaufnahme aus der Umgebung und der damit einhergehende Zerfall des M-ähnlichen Intermediates scheinen für Chrimson jedoch nicht der geschwindigkeitslimitierende Schritt zu sein, wie es beispielsweise für die Protonendonator-Mutante BR-D96N beobachtet wurde [113]. Stattdessen folgt auf den Zerfall von  $P2_{\text{alk}}$ , welcher auf einer Zeitskala von mehreren Hundert Millisekunden stattfindet, ein noch langsamerer Prozess in der Größenordnung von Sekunden, in welchem Chrimson letztlich in den Startzustand zurückkehrt bzw.  $P3_{\text{alk}}$  zerfällt und der GSB zurückgebildet wird. Auch für *CrChR-2* [112, 114] und *CaChR-1* [115] wurden derart lange Rückbildungszeiten gefunden.

In parallel durchgeführten elektrophysiologischen Messungen\* wurde für Chrimson bei pH 9,5 eine komplizierte Kinetik des Ionenkanals beobachtet. Während für hyperpolarisierende Haltepotentiale eine schnelle Öffnungskinetik mit einer Zeitkonstante  $\tau_{open}^1$  von 0,6 ms gefunden wird, erweist sich die Öffnungskinetik bei depolarisierenden Haltepotentialen als biphasisch mit einer zusätzlichen Zeitkonstante  $\tau_{open}^2$  von 15 ms. Die Zeitkonstanten der Schließung des Ionenkanals  $\tau_{close}^1$  und  $\tau_{close}^2$  wurden zu 100 ms und 700 ms bestimmt, was sehr gut mit den, aus der GFA der Blitzlichtphotolyse bestimmten Zeitkonstanten  $\tau_3$  und  $\tau_4$  übereinstimmt. Zusammengekommen deuten diese Beobachtungen auf eine Korrelation zwischen dem Auftreten des M-ähnlichen Intermediats in Chrimson bei pH 9,5 und dem geöffneten Zustand des Ionenkanals hin.

Zusammen mit dem Rückgang der Absorption des M-ähnlichen Intermediats P2<sub>alk</sub> wird auch eine Abnahme der Leitfähigkeit des Ionenkanals beobachtet. Das Absorptionssignal des nachfolgenden Intermediats P3<sub>alk</sub> kann daher als repräsentativ für die Wiederherstellung des geschlossenen Zustands des Ionenkanals betrachtet werden. Die beobachtete Rot-Verschiebung des Absorptionssignals von P3<sub>alk</sub> zu 600 nm deutet zudem auf eine erfolgte Reprotonierung der RSB hin. Wie zuvor bereits angedeutet, zeigt Chrimson – mit C198 eine natürliche Protonendonator-Mutante – hier ein unerwartetes Verhalten, indem mit P3<sub>alk</sub> die Akkumulierung eines weiteren Intermediates auf den vermeintlich geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der spontanen Reprotonierung der RSB aus der Umgebung erfolgt. Die Ähnlichkeit zwischen der Absorptionssignatur von P3<sub>alk</sub> und der von Chrimson im Startzustand bei pH 6,0 legt dabei nahe, dass mit P3<sub>alk</sub> die Reorganisation des Gegenions der RSB vor Rückkehr in den Startzustand beobachtet wird – ein Vorgang, wie er beispielsweise mit dem Zerfall des O-Intermediates in BR beobachtet wird [116].

## 6.5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Dynamik des, in seiner Absorption rotverschobenen ChR Chrimson mittels zeitaufgelöster Spektroskopie

\*Christian Bamann / Max-Planck-Institut für Biophysik (Frankfurt)

im sichtbaren Spektralbereich untersucht. Hierbei wurde berücksichtigt, dass Chrimson aufgrund eines pKs-Wertes des Gegenions der RSB von 7,4 [106] in zwei verschiedenen Startzuständen vorliegen kann. Es wurden daher Messungen bei pH 6,0 und 9,5 durchgeführt, wodurch jeweils die Dynamik von Chrimson mit protoniertem bzw. deprotoniertem Gegenion erfasst werden konnte. Dabei wurden deutliche, photochemische Unterschiede zwischen den Photozyklen beider Startzustände registriert. Die Beobachtung einer Kanalaktivität für beide Photozyklen \* ist dadurch umso bemerkenswerter.

Für die Primärreaktion, welche innerhalb der ersten Nanosekunde nach Anregung des Retinal-Chromophors abläuft, wurde eine Abhängigkeit sowohl vom pH-Wert bzw. dem Protonierungszustand des Gegenions, wie auch von der Anregungswellenlänge gefunden. Die Abhängigkeit vom pH-Wert bzw. vom Protonierungszustand des Gegenions äußert sich dabei vor allem in einer Verlangsamung der Primärreaktion infolge eines Absenkens des pH-Wertes. Ebenso verlangsamt auch die Rot-Verschiebung der Anregungswellenlänge die Primärreaktion und führt darüber hinaus zu einer geringeren Effizienz der Isomerisation des Retinal-Chromophors. Die Primärreaktion von Chrimson lässt sich anhand eines Reaktionsmodells veranschaulichen, welches eine Verzweigung des Reaktionspfades auf der Energiehyperfläche des angeregten Zustandes aufweist. Einer der Reaktionspfade führt dabei noch auf der Energiehyperfläche des angeregten Zustandes durch ein lokales Minimum, welches in seiner Ausprägung stark von der elektrostatischen Umgebung des Retinal-Chromophors abhängt.

Die in der Primärreaktion gebildeten Photoprodukte durchlaufen im Anschluss einen Photozyklus, welche sich abhängig vom jeweiligen Startzustand merklich voneinander unterscheiden. So weist der Photozyklus von Chrimson bei pH 6,0 insgesamt deutlich schnellere Kinetiken auf, als es für den Photozyklus bei pH 9,5 beobachtet wurde und zeigt zudem einen schnellen Übergang zwischen dem primären Photoprodukt  $P1_{ac}$  und dem nachfolgenden Intermediat  $P2_{ac}$ , welcher in dieser Geschwindigkeit bislang bei keinem anderen

---

\*Christian Bamann / Max-Planck-Institut für Biophysik (Frankfurt)

ChR registriert wurde. Der Photozyklus von Chrimson bei pH 9,5 besteht dagegen vor allem durch die sehr lange Lebensdauer eines M-ähnlichen Intermediates, dessen Abbau überraschenderweise nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, obgleich Chrimson eine natürliche Protonendonator-Mutante darstellt. Trotz dieser Unterschiede können in beiden Photozyklen jeweils einzelne Intermediate mit dem geöffneten Zustand des Ionenkanals korreliert werden. Die Kanalfunktion von Chrimson ist somit grundsätzlich nicht vom Protonierungszustand des Gegenions abhängig, wenngleich die Kinetik des Ionenkanals durchaus davon beeinflusst wird. Dies deutet auf Unterschiede in den Wechselwirkungen zwischen dem Ionenkanal und dem Gegenion der RSB hin.





# Zusammenfassung

Bereits in den einleitenden Worten dieser Dissertationsschrift wurde die mehrfache Bedeutung des Begriffes „Licht“ aufgegriffen. Dabei stand die buchstäbliche Bedeutung von Licht zunächst im Vordergrund, denn tatsächlich basieren die vorgestellten experimentellen Methoden und die damit gewonnenen Ergebnisse allesamt auf der Interaktion von Strahlung bzw. Licht mit Materie. In der nun abschließenden Zusammenfassung wird die metaphorische Bedeutung des Begriffes „Licht“ im Sinne von „Erkenntnisgewinn“ überwiegen.

Verschiedene physikalische Effekte erlauben es Licht so zu führen und zu verändern, dass es Einblicke in für Menschen sonst unzugängliche Bereiche gewährt. Eines von insgesamt drei Elementen dieser Dissertationsschrift ist der Aufbau eines **Multiphotonen-Mikroskops**. Dieses fortschrittliche Werkzeug erweitert das zur Verfügung stehende Instrumentarium um verschiedene Analysemethoden, allen voran die 2-Photonen-Fluoreszenz-Mikroskopie. Durch geringfügige Modifikationen können auch weitere Methoden, wie beispielsweise stimulierte Raman-Streuung realisiert werden. Insbesondere die 2-Photonen-Fluoreszenz-Mikroskopie war für das zweite Element dieser Dissertationsschrift von großer Bedeutung. In dieser Studie wurde das Bleichverhalten von **Spinach** bei 2-Photonen-Absorption untersucht, sowohl an frei in Lösung befindlichen als auch auf einem Träger immobilisierten Spinach-Komplexen. Die Ergebnisse zu den frei in Lösung befindlichen Spinach-Komplexen zeigen, dass die Verstärkung der Fluoreszenz von DFHBI grundsätzlich auch im Fall der 2-Photonen-Absorption eintritt. Dabei wurde ein Ausbleichen der 2-Photonen-induzierten Fluoreszenz für frei in Lösung befindliche Spinach-Komplexe erst bei außerordentlich hohen Intensitäten der Anregungsstrahlung beobachtet. Dieser Befund kann zumindest teilweise auf das Eindiffundieren fluoreszenter Spinach-Komplexe in das sehr kleine Fokalvolumen innerhalb der

2-Photonen-Anregung stattfindet zurückgeführt werden. Für immobilisierte Spinach-Komplexe konnte gezeigt werden, dass eine kontinuierliche Bildaufnahme gegenüber einer Bildaufnahme in Intervallen mit jeweils zusätzlichen Dunkelphasen zur Erholung des reversiblen Bleichens der 2-Photonen-induzierten Fluoreszenz, sowie der generelle Verzicht auf spezielle Belichtungsschemata und Methoden der Datenakquise mit keinen besonderen Nachteilen verbunden ist. Abschließend betrachtet erweist sich Spinach bei 2-Photonen-Anregung als ausgesprochen resistent gegenüber einem irreversiblen Ausbleichen des Fluoreszenzsignals.

Als drittes Element dieser Dissertationsschrift wurde die Dynamik von **Chrimson**, einem Kanalrhodopsin mit rot-verschobener Absorption mittels zeitaufgelöster Spektroskopie im sichtbaren Spektralbereich untersucht. Sowohl die Anregungswellenlänge als auch der pH-Wert bzw. der Protonierungszustand des Gegenions haben einen messbaren Einfluss auf die Primärreaktion. Diese verlangsamt sich, sobald der pH-Wert abgesenkt oder die Anregungswellenlänge rot-verschoben wird. Darüber hinaus führt eine Rot-Verschiebung der Anregungswellenlänge zu einer geringeren Effizienz der Isomerisation des Retinal-Chromophors. Die Primärreaktion von Chrimson entspricht dabei einem Reaktionsmodell mit einer Verzweigung des Reaktionspfades auf der Energiehyperfläche des angeregten Zustandes. Ein Reaktionspfad führt dabei durch ein lokales Minimum, welches in seiner Ausprägung stark von der elektrostatischen Umgebung des Retinal-Chromophors abhängt. Je nach ursprünglichem Protonierungszustand des Gegenions der Retinal-Schiff-Base wurden große Unterschiede hinsichtlich der beobachteten transienten Absorptionen für den im Anschluss von Chrimson durchlaufenen Photozyklus gefunden. Bei pH 6,0 weist der Photozyklus von Chrimson eine insgesamt deutlich schnellere Kinetik auf, als es für den Photozyklus bei pH 9,5 beobachtet wurde. Es ist bemerkenswert, dass in elektrophysiologischen Messungen für beide Photozyklen eine Öffnung des Ionenkanals gefunden wurde. Die Kanalfunktion von Chrimson ist somit grundsätzlich nicht vom Protonierungszustand des Gegenions abhängig, wenngleich die Kinetik des Ionenkanals durchaus davon beeinflusst wird. Dies deutet auf Unterschiede

in den Wechselwirkungen zwischen dem Ionenkanal und dem Gegenion der Retinal-Schiff-Base hin.













# Abbildungsverzeichnis

2.1	Elektromagnetisches Spektrum . . . . .	6
2.2	Jablonski-Diagramm . . . . .	11
2.3	Raman-Streuung . . . . .	17
2.4	Raman-Prozess . . . . .	20
2.5	Doppelbrechung . . . . .	28
2.6	Skizze des Kerr-Effektes . . . . .	31
2.7	Skizze des CARS-Prozesses . . . . .	34
2.8	Phasenanpassung bei CARS . . . . .	37
2.9	Skizze der 2-Photonen-Absorption . . . . .	41
2.10	Darstellung modengekoppelter Pulszüge . . . . .	46
2.11	Darstellung des Chirps . . . . .	48
2.12	Darstellung eines Prismenkompressors . . . . .	49
2.13	Abbe-Limit . . . . .	52
2.14	Darstellung des Rayleigh-Kriteriums . . . . .	53
2.15	Intrinsische Ortsauflösung der 2-Photonen-Absorption	55
2.16	3D-Rekonstruktion der GFP-Verteilung in einer GFP- markierte Nukleoporin-43 exprimierenden U2OS-Zelle	56
3.1	Aufbau des Anreg-Abtast-Experiments . . . . .	60
3.2	Aufbau des Blitzlichtphotolyse-Experiments . . . . .	61
4.1	Skizze des experimentellen Aufbaus . . . . .	66
4.2	Modul Tsunami-Lasersystem – Ti:Sa-Laser . . . . .	70
4.3	Integration des GuideStar II-Systems . . . . .	72
4.4	Modul Prismenkompressor . . . . .	73
4.5	Modul Astigmatismus-Korrektur . . . . .	75
4.6	Modul Optische Verzögerungsstrecke . . . . .	77
4.7	Modul Optische Verzögerungsstrecke mit alternativer Strahlführung . . . . .	78
4.8	Modul Photonische Kristallfaser . . . . .	80
4.9	Modul Frequenzverdopplung . . . . .	83
4.10	Modul Laserscanner . . . . .	85
4.11	Frontansicht des Scannertreibergehäuses . . . . .	87

4.12	Skizze der Scanlinsen-Positionierung . . . . .	89
4.13	Modul Olympus IX81 Mikroskop . . . . .	90
4.14	Modul Spektroskopie . . . . .	97
4.15	Modul Tsunami-Lasersystem – Nd:YVO <sub>4</sub> -Laser . . . . .	98
4.16	Durchflussküvettenystem . . . . .	99
5.1	Zyklisierungsreaktion des GFP-Chromophors . . . . .	103
5.2	Strukturvergleich zwischen HBI und DFHBI . . . . .	104
5.3	Sequenz des DFHBI-bindenden RNA-Aptamers . . . . .	105
5.4	Mechanismus der Fluoreszenz-Regenerierung bei Spinach . . . . .	106
5.5	Vergleich der Fluoreszenzintensität einer Spinach- und DFHBI-Lösung . . . . .	110
5.6	Bleichverhalten von Spinach-Lösungen . . . . .	111
5.7	Bleichverhalten immobilisierter Spinach-Komplexe und GFP bei Intervall- und cw-Belichtung . . . . .	114
5.8	Bleichverhalten immobilisierter Spinach-Komplexe und GFP bei unterschiedlichen Bildaufnahmezeiten . . . . .	116
5.9	Vergleich des Bleichverhaltens von immobilisiertem Spinach bzw. GFP bei 2PA. . . . .	118
6.1	Transiente Absorptionsänderungen von Chrimson . . . . .	128
6.2	Transienten von Chrimson . . . . .	129
6.3	DAS der transienten Messung von Chrimson . . . . .	131
6.4	Vorgeschlagener Mechanismus der Primärreaktion von Chrimson . . . . .	139
6.5	Flashphotolyse-Messung von Chrimson und DAS bei pH 6,0 . . . . .	142
6.6	Flashphotolyse-Messung von Chrimson und DAS bei pH 9,5 . . . . .	146
A.1	Chrimson: 3D-Fluoreszenzspektren . . . . .	177

# Tabellenverzeichnis

2.1	Unterteilung des Infrarotspektralbereichs und wissenschaftliche Bedeutung. . . . .	13
6.1	Übersicht der ermittelten Zeitkonstanten aus der globalen Fitanalyse der transienten Absorptionsdaten von Chromson. . . . .	130



# Abkürzungsverzeichnis

<b>1PA</b>	<b>1-Photonen-Absorption</b>
<b>2PA</b>	<b>2-Photonen-Absorption</b>
<b>2PF</b>	<b>2-Photonen-induzierte Fluoreszenz</b>
<b>APD</b>	<b>Avalanche-Photodiode</b>
<b>BBO</b>	<b>Beta-Bariumborat</b>
<b>BR</b>	<b>Bacteriorhodopsin</b>
<b>CARS</b>	<b>Kohärente anti-Stokes Raman-Spektroskopie</b> ( <i>engl. coherent anti-Stokes Raman-spectroscopy</i> )
<b>CCD</b>	<b>Photoeffekt-basierter Bildaufnahmesensor</b> ( <i>engl. charge-coupled device</i> )
<b>ChR</b>	<b>Channelrhodopsin</b>
<b>CnChR-1</b>	<i>Chlamydomonas noctigama</i> <b>Channelrhodopsin-1</b>
<b>CrChR-1</b>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <b>Channelrhodopsin-1</b>
<b>CrChR-2</b>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <b>Channelrhodopsin-2</b>
<b>CPA</b>	<b>Verstärkung gechirpter Pulse</b> ( <i>engl. chirped pulse amplification</i> )
<b>CW</b>	<b>Dauerstrichbetrieb</b> ( <i>continuous wave</i> )
<b>DAS</b>	<b>Zerfallsassoziertes Spektrum</b> ( <i>engl. decay associated spectrum</i> )
<b>DFHBI</b>	<b>4-(3,5-Difluoro-4-hydroxybenzyliden)-1,2-dimethylimidazolidin-5-on</b>
<b>DFG</b>	<b>Differenzfrequenzerzeugung</b> ( <i>engl. difference frequency generation</i> )
<b>DPSS-Laser</b>	<b>Dioden-gepumpter Festkörper-Laser</b> ( <i>engl. diode pumped solid state laser</i> )
<b>ESA</b>	<b>Absorption eines angeregten Zustands</b> ( <i>engl. excited-state absorption</i> )
<b>FIR</b>	<b>Fernes Infrarot</b>
<b>GFA</b>	<b>Globale Fit-Analyse</b>
<b>GFP</b>	<b>Grün fluoreszierendes Protein</b>
<b>GSB</b>	<b>Grundzustandsbleichen</b>

	( <i>engl. ground-state bleach</i> )
<b>HBI</b>	4-(p-Hydroxybenzyliden)imidazolidin-5-on
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b>ICCD</b>	Mikrokanalplatten-verstärkter Bildaufnahmesensor ( <i>engl. intensified charge-coupled device</i> )
<b>IRF</b>	Instrumenten-Antwort-Funktion ( <i>engl. instrument response function</i> )
<b>LBO</b>	<b>Lithiumtriborat</b>
<b>MES</b>	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
<b>MIR</b>	<b>Mittleres Infrarot</b>
<b>NA</b>	<b>Numerische Apertur</b>
<b>ncRNA</b>	Nichtcodierende Ribonukleinsäure ( <i>engl. noncoding ribonucleic acid</i> )
<b>Nd:YAG</b>	<b>Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat</b>
<b>Nd:YVO<sub>4</sub></b>	<b>Neodym-dotiertes Yttrium-Vanadat</b>
<b>NIR</b>	<b>Nahes Infrarot</b>
<b>NOPA</b>	Nicht-kollinearer optisch parametrischer Verstärker ( <i>engl. noncolinear optical parametric amplifier</i> )
<b>OPA</b>	Optisch parametrischer Verstärker ( <i>engl. optical parametric amplifier</i> )
<b>PA</b>	<b>Photoproduktabsorption</b>
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>engl. phosphate buffered saline</i> )
<b>PCF</b>	Photonische Kristallfaser ( <i>engl. photonic crystal fiber</i> )
<b>PMT</b>	Photoelektronenvervielfacher ( <i>engl. photomultiplier tube</i> )
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure ( <i>engl. ribonucleic acid</i> )
<b>RSB</b>	<b>Retinal-Schiff-Base</b>
<b>SE</b>	<b>Stimulierte Emission</b>
<b>SELEX</b>	<b>Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung</b>
<b>SFG</b>	Summenfrequenzerzeugung ( <i>engl. sum frequency generation</i> )
<b>SiPMT</b>	Halbleiteräquivalent einer PMT ( <i>engl. Silicon photomultiplier tube</i> )
<b>SRII</b>	<b>Sensoryrhodopsin-II</b>

<b>SHG</b>	Frequenzverdopplung ( <i>engl. second harmonic generation</i> )
<b>SNR</b>	Signal-zu-Rausch-Verhältnis ( <i>engl. signal-to-noise-ratio</i> )
<b>THG</b>	Frequenzverdreifachung ( <i>engl. third harmonic generation</i> )
<b>TMH</b>	Transmembranhelix ( <i>engl. two-photon absorption</i> )
<b>Ti:Sa</b>	<b>Titan-dotierter Saphir</b>
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>Vis</b>	sichtbarer Spektralbereich ( <i>engl. visible</i> )





# Literatur

- [1] W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb, *Science* **1990**, *248*, 73–76.
- [2] J. S. Paige, K. Y. Wu, S. R. Jaffrey, *Science* **2011**, *333*, 642–646.
- [3] M. You, S. R. Jaffrey, *Annual Review of Biophysics* **2015**, *44*, 187–206.
- [4] O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga, *Journal of cellular and comparative physiology* **1962**, *59*, 223–239.
- [5] O. Shimomura, *Journal of Microscopy* **2005**, *217*, 3–15.
- [6] K. Y. Han, B. J. Leslie, J. Fei, J. Zhang, T. Ha, *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 19033–19038.
- [7] P. Wang, J. Querard, S. Maurin, S. S. Nath, T. Le Saux, A. Gaudier, L. Jullien, *Chemical Science* **2013**, *4*, 2865–2873.
- [8] N. C. Klapoetke, Y. Murata, S. S. Kim, S. R. Pulver, A. Birdsey-Benson, Y. K. Cho, T. K. Morimoto, A. S. Chuong, E. J. Carpenter, Z. Tian, J. Wang, Y. Xie, Z. Yan, Y. Zhang, B. Y. Chow, B. Surek, M. Melkonian, V. Jayaraman, M. Constantine-Paton, G. K.-S. Wong, E. S. Boyden, *Nature methods* **2014**, *11*, 338–346.
- [9] F. Schneider, C. Grimm, P. Hegemann, *Annual Review of Biophysics* **2015**, *44*, 167–186.
- [10] V. A. Lórenz-Fonfría, C. Bamann, T. Resler, R. Schlesinger, E. Bamberg, J. Heberle, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2015**, *112*, 5796–5804.
- [11] E. G. Govorunova, O. A. Sineshchekov, R. Janz, X. Liu, J. L. Spudich, *Science* **2015**, *349*, 647–650.
- [12] L. Fenno, O. Yizhar, K. Deisseroth, *Annual Review of Neuroscience* **2011**, *34*, 389–412.
- [13] C. Bamann, R. Gueta, S. Kleinlogel, G. Nagel, E. Bamberg, *Biochemistry* **2010**, *49*, 267–278.
- [14] M. Kasha, *Discuss. Faraday Soc.* **1950**, *9*, 14–19.

- [15] R. L. Fork, C. V. Shank, C. Hirlimann, R. Yen, W. J. Tomlinson, *Optics Letters* **1983**, *8*, 1–3.
- [16] R. R. Alfano, S. L. Shapiro, *Physical Review Letters* **1970**, *24*, 592–594.
- [17] J.-X. Cheng, X. S. Xie, *Coherent Raman Scattering Microscopy*, CRC Press, **2013**, S. 590.
- [18] A. Zumbusch, G. R. Holtom, X. S. Xie, *Physical Review Letters* **1999**, *82*, 4142–4145.
- [19] E. O. Potma, C. L. Evans, X. S. Xie, *Optics Letters* **2006**, *31*, 241–243.
- [20] J.-X. Cheng, L. D. Book, X. S. Xie, *Optics Letters* **2001**, *26*, 1341–1343.
- [21] J.-x. Cheng, A. Volkmer, L. D. Book, X. S. Xie, *The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105*, 1277–1280.
- [22] F. Ganikhanov, C. L. Evans, B. G. Saar, X. S. Xie, *Optics Letters* **2006**, *31*, 1872–1874.
- [23] C. L. Evans, X. S. Xie, *Annual review of analytical chemistry (Palo Alto Calif.)* **2008**, *1*, 883–909.
- [24] C. Krafft, B. Dietzek, M. Schmitt, J. Popp, *Journal of Biomedical Optics* **2012**, *17*, 1–15.
- [25] M. Müller, J. M. Schins, *Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106*, 3715–3723.
- [26] T. Hellerer, A. M. Enejder, A. Zumbusch, *Applied Physics Letters* **2004**, *85*, 25–27.
- [27] F. Terenziani, C. Katan, E. Badaeva, S. Tretiak, M. Blanchard-Desce, *Advanced Materials* **2008**, *20*, 4641–4678.
- [28] M. Göppert-Mayer, *Annalen der Physik* **1931**, *401*, 273–294.
- [29] W. Kaiser, C. Garrett, *Physical Review Letters* **1961**, *7*, 229–231.
- [30] B. Dick, G. Hohlneicher, *The Journal of Chemical Physics* **1982**, *76*, 5755–5760.
- [31] P. R. Monson, W. M. McClain, *The Journal of Chemical Physics* **1970**, *53*, 29–37.
- [32] W. Denk, K. Svoboda, *Neuron* **1997**, *18*, 351–357.

- [33] L. E. Hargrove, R. L. Fork, M. A. Pollack, *Applied Physics Letters* **1964**, *5*, 4–5.
- [34] E. P. Ippen, C. V. Shank, A. Dienes, *Applied Physics Letters* **1972**, *21*, 348–350.
- [35] D. Strickland, G. Mourou, *Optics Communications* **1985**, *56*, 219–221.
- [36] S. W. Hell, J. Wichmann, *Optics Letters* **1994**, *19*, 780–782.
- [37] T. A. Klar, S. W. Hell, *Optics Letters* **1999**, *24*, 954–956.
- [38] D. Wildanger, B. R. Patton, H. Schill, L. Marseglia, J. P. Hadden, S. Knauer, A. Schönle, J. G. Rarity, J. L. O’Brien, S. W. Hell, J. M. Smith, *Advanced Materials* **2012**, *44*, 309–313.
- [39] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Lonair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, *Nature methods* **2013**, *9*, 1–15.
- [40] P. Theer, M. T. Hasan, W. Denk, *Optics Letters* **2003**, *28*, 1022–1024.
- [41] R. G. W. Norrish, G. Porter, *Nature* **1949**, *164*, 658.
- [42] C. Slavov, H. Hartmann, J. Wachtveitl, *Analytical Chemistry* **2015**, *87*, 2328–2336.
- [43] S. Tyagi, *Nature methods* **2009**, *6*, 331–338.
- [44] P. J. Santangelo, *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2010**, *2*, 11–19.
- [45] E. Bertrand, P. Chartrand, M. Schaefer, S. M. Shenoy, R. H. Singer, R. M. Long, *Molecular Cell* **1998**, *2*, 437–445.
- [46] T. K. Kerppola, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2006**, *7*, 449–456.
- [47] E. M. Merzlyak, J. Goedhart, D. Shcherbo, M. E. Bulina, A. S. Shcheglov, A. F. Fradkov, A. Gaintzeva, K. A. Lukyanov, S. Lukyanov, T. W. J. Gadella, D. M. Chudakov, *Nature methods* **2007**, *4*, 555–557.
- [48] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818–822.
- [49] C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *3*, 505–510.

- [50] D. Grate, C. Wilson, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 6131–6136.
- [51] G. A. Kraus, I. Jeon, M. Nilsen-hamilton, A. M. Awad, J. Banerjee, B. Parvin, *Molecules* **2008**, *13*, 986–994.
- [52] S. J. Remington, *Current Opinion in Structural Biology* **2006**, *16*, 714–721.
- [53] J. Ouellet, *Frontiers in Chemistry* **2016**, *4*, 1–12.
- [54] J. Conyard, M. Kondo, I. A. Heisler, G. Jones, A. Baldrige, L. M. Tolbert, K. M. Solntsev, S. R. Meech, *The Journal of Physical Chemistry B* **2011**, *115*, 1571–1577.
- [55] J. S. Paige, T. Nguyen-Duc, W. Song, S. R. Jaffrey, *Science* **2012**, *335*, 1194.
- [56] W. Song, R. L. Strack, S. R. Jaffrey, *Nature Methods* **2013**, *10*, 873–875.
- [57] H. Huang, N. B. Suslov, N.-S. Li, S. A. Shelke, M. E. Evans, Y. Koldobskaya, P. A. Rice, J. A. Piccirilli, *Nature Chemical Biology* **2014**, *10*, 686–691.
- [58] K. D. Warner, M. C. Chen, W. C. Song, R. L. Strack, A. Thorn, S. R. Jaffrey, A. R. Ferré-D’Amaré, *Nature Structural & Molecular Biology* **2014**, *21*, 658–663.
- [59] R. Y. Tsien, *Annual Reviews of Biochemistry* **1998**, *67*, 509–544.
- [60] S. J. Remington, *Protein Science* **2011**, *20*, 1509–1519.
- [61] G. H. Patterson, D. W. Piston, *Biophysical Journal* **2000**, *78*, 2159–2162.
- [62] G. Nagel, D. Ollig, M. Fuhrmann, S. Kateriya, A. M. Musti, E. Bamberg, P. Hegemann, *Science* **2002**, *296*, 2386–2398.
- [63] G. Nagel, T. Szellas, W. Huhn, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Berthold, D. Ollig, P. Hegemann, E. Bamberg, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100*, 13940–13945.
- [64] V. A. Lórenz-Fonfría, J. Heberle, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **2014**, *1837*, 626–642.
- [65] C. Bamann, G. Nagel, E. Bamberg, *Current Opinion in Neurobiology* **2010**, *20*, 610–616.

- [66] A. H. Marblestone, B. M. Zamft, Y. G. Maguire, M. G. Shapiro, T. R. Cybulski, J. I. Glaser, D. Amodei, P. B. Stranges, R. Kalhor, D. A. Dalrymple, D. Seo, E. Alon, M. M. Maharbiz, J. M. Carmena, J. M. Rabaey, E. S. Boyden, G. M. Church, K. P. Kording, *Frontiers in Computational Neuroscience* **2013**, *7*, 1–34.
- [67] F. Zhang, M. Prigge, F. Beyrière, S. P. Tsunoda, J. Mattis, O. Yizhar, P. Hegemann, K. Deisseroth, *Nature Neuroscience* **2008**, *11*, 631–633.
- [68] M. Prigge, F. Schneider, S. P. Tsunoda, C. Shilyansky, J. Wietek, K. Deisseroth, P. Hegemann, *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 31804–31812.
- [69] J. Y. Lin, P. M. Knutsen, A. Muller, D. Kleinfeld, R. Y. Tsien, *Nature Neuroscience* **2013**, *16*, 1499–1508.
- [70] L. Wen, H. Wang, S. Tanimoto, R. Egawa, Y. Matsuzaka, H. Mushiake, T. Ishizuka, H. Yawo, *PLoS ONE* **2010**, *5*, e12893.
- [71] L. C. Schild, D. A. Glauser, *Genetics* **2015**, *200*, 1029–1034.
- [72] H. E. Kato, F. Zhang, O. Yizhar, C. Ramakrishnan, T. Nishizawa, K. Hirata, I. Jumpei, Y. Aita, T. Tsukazaki, S. Hayashi, P. Hegemann, A. D. Maturana, R. Ishitani, K. Deisseroth, O. Nureki, *Nature* **2012**, *482*, 369–374.
- [73] S. Hayashi, E. Tajkhorshid, E. Pebay-Peyroula, A. Royant, E. M. Landau, J. Navarro, K. Schulten, *Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105*, 10124–10131.
- [74] M. Hoffmann, M. Wanko, P. Strodel, P. H. König, T. Frauenheim, K. Schulten, W. Thiel, E. Tajkhorshid, M. Elstner, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 10808–10818.
- [75] H. Luecke, B. Schobert, J. K. Lanyi, E. N. Spudich, J. L. Spudich, *Science* **2016**, *293*, 1499–1503.
- [76] D. Man, W. Wang, G. Sabehi, L. Aravind, A. F. Post, R. Massana, E. N. Spudich, J. L. Spudich, O. Béjà, *The EMBO Journal* **2003**, *22*, 1725–1731.
- [77] W.-W. Wang, O. A. Sineshchekov, E. N. Spudich, J. L. Spudich, *The Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 33985–33991.

- [78] H. E. Kato, M. Kamiya, S. Sugo, J. Ito, R. Taniguchi, A. Orito, K. Hirata, A. Inutsuka, A. Yamanaka, A. D. Maturana, R. Ishitani, Y. Sudo, S. Hayashi, O. Nureki, *Nature Communications* **2015**, *6*, DOI 10.1038/ncomms8177.
- [79] I Lutz, A Sieg, A. A. Wegener, M Engelhard, I Boche, M Otsuka, D Oesterhelt, J Wachtveitl, W Zinth, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98*, 962–967.
- [80] D. Xu, C. Martin, K. Schulten, *Biophysical Journal* **1996**, *70*, 453–460.
- [81] P. C. Mowery, R. H. Lozier, Q. Chae, Y.-W. Tseng, M. Taylor, W. Stoeckenius, *Biochemistry* **1979**, *18*, 4100–4107.
- [82] H. J. Butt, K. Fendler, E. Bamberg, J. Tittor, D. Oesterhelt, *The EMBO Journal* **1989**, *8*, 1657–1663.
- [83] S. P. Balashov, L. E. Petrovskaya, E. P. Lukashev, E. S. Imasheva, A. K. Dioumaev, J. M. Wang, S. V. Sychev, D. A. Dolgikh, A. B. Rubin, M. P. Kirpichnikov, J. K. Lanyi, *Biochemistry* **2012**, *51*, 5748–5762.
- [84] V. B. Bergo, O. A. Sineshchekov, J. M. Kralj, R. Partha, E. N. Spudich, K. J. Rothschild, J. L. Spudich, *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284*, 2836–2843.
- [85] F. Hempelmann, H. Soraya, M.-K. Verhoefen, A. C. Woerner, T. Köhler, S.-A. Fiedler, N. Pfleger, J. Wachtveitl, C. Glaubitz, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 4645–4654.
- [86] H. Li, E. G. Govorunova, O. A. Sineshchekov, J. L. Spudich, *Biophysical Journal* **2014**, *106*, 1607–1617.
- [87] L. J. Stern, H. G. Khoranat, *Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264*, 14202–14208.
- [88] M. Nack, I. Radu, C. Bamann, E. Bamberg, J. Heberle, *FEBS Letters* **2009**, *583*, 3676–3680.
- [89] H. C. Watanabe, K. Welke, D. J. Sindhikara, P. Hegemann, M. Elstner, *Journal of Molecular Biology* **2013**, *425*, 1795–1814.
- [90] S. Ito, H. E. Kato, R. Taniguchi, T. Iwata, O. Nureki, H. Kandori, *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 3475–3482.

- [91] L. A. Gunaydin, O. Yizhar, A. Berndt, V. S. Sohal, K. Deisseroth, P. Hegemann, *Nature Neuroscience* **2010**, *13*, 387–392.
- [92] S.-Y. Hou, E. G. Govorunova, M. Ntefidou, C. E. Lane, E. N. Spudich, O. A. Sineshchekov, J. L. Spudich, *Photochemistry and Photobiology* **2012**, *88*, 119–128.
- [93] P. Berthold, S. P. Tsunoda, O. P. Ernst, W. Mages, D. Gradmann, P. Hegemann, *The Plant Cell* **2008**, *20*, 1665–1677.
- [94] K. Feldbauer, D. Zimmermann, V. Pintschovius, J. Spitz, C. Bamann, E. Bamberg, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106*, 12317–12322.
- [95] M. K. Verhoefen, C. Bamann, R. Blöcher, U. Förster, E. Bamberg, J. Wachtveitl, *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 3113–3122.
- [96] R. Huber, T. Köhler, M. O. Lenz, E. Bamberg, R. Kalmbach, M. Engelhard, J. Wachtveitl, *Biochemistry* **2005**, *44*, 1800–1806.
- [97] M. O. Lenz, R. Huber, B. Schmidt, P. Gilch, R. Kalmbach, M. Engelhard, J. Wachtveitl, *Biophysical Journal* **2006**, *91*, 255–262.
- [98] R. A. Mathies, C. H. B. Cruz, W. T. Pollard, C. V. Shank, *Science Reports* **1988**, *240*, 777–779.
- [99] K. C. Hasson, F. Gai, P. A. Anfinrud, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, *93*, 15124–15129.
- [100] T. Stensitzki, V. Muders, R. Schlesinger, J. Heberle, K. Heyne, *Frontiers in Molecular Biosciences* **2015**, *2*, 1–10.
- [101] C. Schnedermann, V. Muders, D. Ehrenberg, R. Schlesinger, P. Kukura, J. Heberle, *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138*, 4757–5762.
- [102] R. Gross, M. M. N. Wolf, C. Schumann, N. Friedman, M. Sheves, L. Li, M. Engelhard, O. Trentmann, H. E. Neuhaus, R. Diller, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 14868–14878.
- [103] M.-K. Neumann-Verhoefen, K. Neumann, C. Bamann, I. Radu, J. Heberle, E. Bamberg, J. Wachtveitl, *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 6968–6976.
- [104] R. Diller, R. Jakober, C. Schumann, F. Peters, J. P. Klare, M. Engelhard, *Biopolymers* **2006**, *82*, 358–362.

- [105] T Stensitzki, Y Yang, V Muders, R Schlesinger, J Heberle, K. Heyne, *Structural Dynamics* **2016**, 3, 043208.
- [106] C. Lorenz, Diplomarbeit, Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt am Main, **2015**.
- [107] S. L. Logunov, M. A. El-Sayed, J. K. Lanyi, *Biophysical Journal* **1996**, 71, 1545–1553.
- [108] O. P. Ernst, P. A. Sánchez Murcia, P. Daldrop, S. P. Tsunoda, S. Kateriya, P. Hegemann, *Journal of Biological Chemistry* **2008**, 283, 1637–1643.
- [109] A. Kianianmomeni, K. Stehfest, G. Nematollahi, P. Hegemann, A. Hallmann, *Plant Physiology* **2009**, 151, 347–366.
- [110] J. I. Ogren, A. Yi, S. Mamaev, H. Li, J. Lugtenburg, W. J. DeGrip, J. L. Spudich, K. J. Rothschild, *Biochemistry* **2015**, 54, 377–388.
- [111] V. Muders, S. Kerruth, V. A. Lórenz-Fonfría, C. Bamann, J. Heberle, R. Schlesinger, *FEBS Letters* **2014**, 588, 2301–2306.
- [112] E. Ritter, K. Stehfest, A. Berndt, P. Hegemann, F. J. Bartl, *Journal of Biological Chemistry* **2008**, 283, 35033–35041.
- [113] M. Holz, L. A. Drachev, T. Mogi, H. Otto, A. D. Kaulen, M. P. Heyn, V. P. Skulachev, H. G. Khorana, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1989**, 86, 2167–2171.
- [114] C. Bamann, T. Kirsch, G. Nagel, E. Bamberg, *Journal of Molecular Biology* **2008**, 375, 686–694.
- [115] V. A. Lórenz-Fonfría, V. Muders, R. Schlesinger, J. Heberle, *The Journal of Chemical Physics* **2014**, 141, 22D507.
- [116] S. P. Balashov, E. S. Imasheva, R. Govindjee, T. G. Eberey, *Biophysical Journal* **1996**, 70, 473–481.
- [117] H.-J. Polland, M. A. Franz, W. Zinth, W. Kaiser, E. Kölling, D. Oesterhelt, *Biophysical Journal* **1986**, 49, 651–662.



# Anhang A

## Chrimson:

### 3D-Fluoreszenzspektren

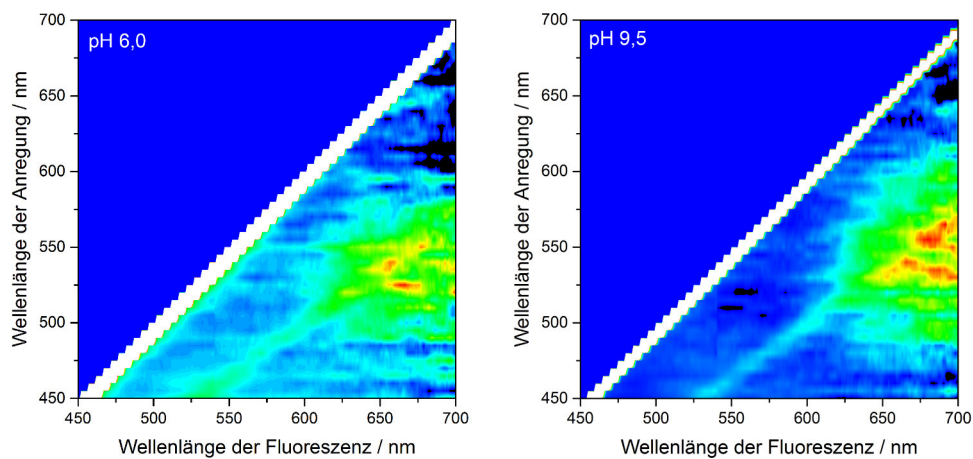


Abbildung A.1: 3D-Fluoreszenzspektren von Chrimson.

In Abbildung A.1 sind die korrigierten 3D-Fluoreszenzspektren von Chrimson bei pH 6,0 und 9,5 dargestellt. Um Artefakte durch Reabsorption der Probe zu vermeiden, erfolgte die Messung an verdünnten Chrimson-Proben deren optische Dichte am Absorptionsmaximum ca.  $0,1 \text{ mm}^{-1}$  betrug. Die Aufnahme der Spektren erfolgte an einem JASCO FP-8500. Während der Messung wurde die Anregungswellenlänge jeweils in Intervallen von 10 nm variiert und das Fluoreszenzsignal in Schrittweiten von 1 nm aufgenommen. Zur Zeitersparnis wurde die Detektion auf Bereiche oberhalb der Anregungswellenlänge beschränkt.

In beiden Messungen wurde für Chrimson, trotz maximaler Sensitivität des Detektors eine sehr schwache Fluoreszenz vorgefunden, welche in ihrer Intensität nur wenig über dem Eigenrauschen des Detektors liegt. Dieser Befund ist für Chrimson nicht überraschend,

da mikrobielle Rhodopsine allgemein für ihre geringe Fluoreszenzquantenausbeute bekannt sind – beispielsweise BR, für das ein Wert von nur  $10^{-4}$  bestimmt wurde [117].

In beiden 3D-Fluoreszenzspektren sind neben dem eigentlichen Fluoreszenzsignal zwei Artefakte erkennbar. Zum einen handelt es sich dabei um Streulicht der Anregungsstrahlung, welche als weißer Balken diagonal das Spektrum durchquert. Zum anderen ist das Residuum eines Raman-Signals des Puffers erkennbar, welcher leicht windschief und in der Fluoreszenzwellenlänge rot verschoben verläuft.