

# Aperturlose Optische Nahfeldmikroskopie am Intermediärfilament Desmin und an Tabakmosaikviren Diplomarbeit

vorgelegt von  
**Niklas Biere**

27. August 2014  
Universität Bielefeld  
Fakultät für Physik





# Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt und sämtliche verwendeten Hilfsmittel und Inhalte aus anderen Quellen als solche erwähnt und kenntlich gemacht zu haben.

(Niklas Biere)

Bielefeld, den 27.8.2014

# Gutachter

Prof. Dr. Dario Anselmetti

Prof. Dr. Thomas Huser



*The age and size of the cosmos are written in light  
the nature of beauty and the substance of the stars  
the laws of space and time.  
They were there all along, but we never saw them  
until we devised a more powerful way of seeing.*

Neil deGrasse Tyson  
(Cosmos: A Spacetime Odyssey)

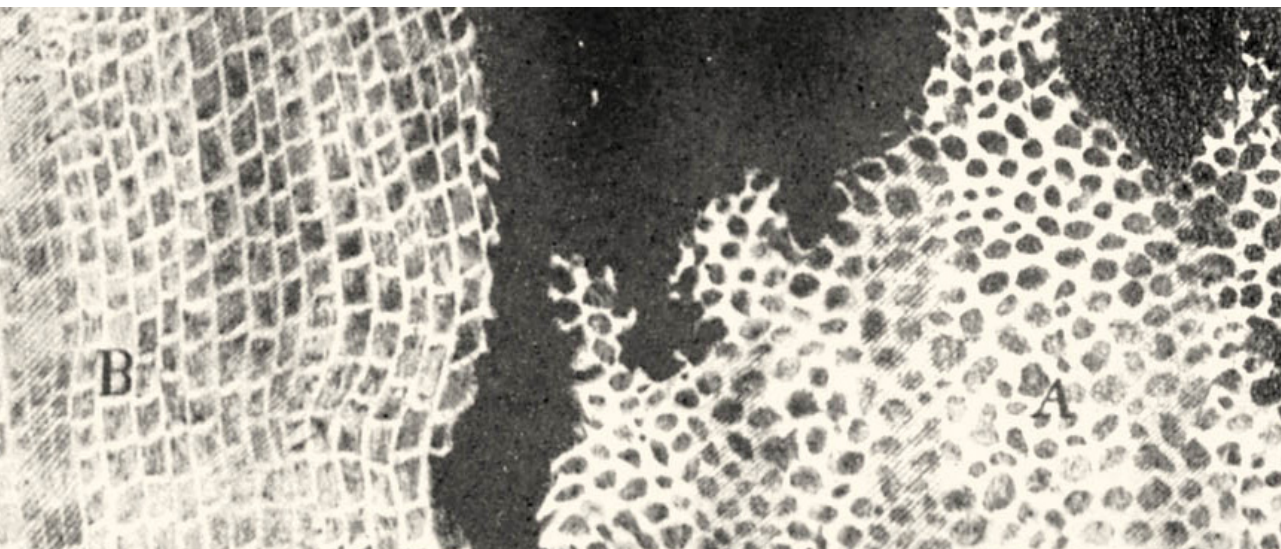


# Inhalt

<b>1 Einleitung</b>	<b>2</b>
<b>2 Grundlagen der Mikroskopie</b>	<b>5</b>
2.1 Das optische Auflösungslimit	5
2.2 Konfokalmikroskopie	10
2.3 Fluoreszenz	11
<b>3 Elektrodynamik des Nahfelds</b>	<b>14</b>
3.1 Physikalische Eigenschaften des Lichts	14
3.2 Evaneszente Felder	19
3.3 Auskopplung, Transportierte Energie und Streuung	20
3.4 Feldverstärkung und Plasmonen	20
3.5 Fluorophore im optischen Nahfeld	26
<b>4 Biologische Systeme</b>	<b>27</b>
4.1 Das Tabakmosaikvirus	27
4.2 Desmin und seine Rolle im Herzmuskel	29
<b>5 Methode</b>	<b>32</b>
5.1 Rasterkraftmikroskopie	32
5.2 Optische Nahfeldmikroskopie	35
<b>6 Aufbau und Durchführung</b>	<b>43</b>
6.1 Versuchsaufbau	43
6.2 Präparation Tabakmosaikviren	46
6.3 Assemblierung und Präparation Desmin	47
6.4 Präparation Quantendots	49
6.5 Ausrichtung und Durchführung	50
<b>7 Ergebnisse und Interpretation</b>	<b>54</b>
7.1 Ergebnisse Tabakmosaikviren	54
7.2 Ergebnisse Desmin-Mutationen	56
7.3 Ergebnisse Quantendots	64
7.4 Auflösung durch Halbwertsbreite	67
7.5 Signal-Rausch-Verhältnis	68
7.6 Auflösung durch Abstände	71
7.7 Artefakte	72
<b>8 Fazit</b>	<b>78</b>
8.1 Danksagungen	81
8.2 Literaturverzeichnis	82

# 1 Einleitung

Als im Jahre 1665 Robert Hooke als einer der ersten durch ein Mikroskop blickte, eröffnete er der Menschheit einen Weg in einen völlig neuen Kosmos [1]. Dabei entdeckte er, dass biologische Organismen aus kleinen Untereinheiten aufgebaut sind – eine revolutionäre Erkenntnis, die dazu führte, dass der Begriff „Zelle“ (lat. *cella/cellula* „kleiner Raum, Wabe, Kammer“), den er für diese Strukturen wählte, heute immer noch verwendet wird. In der Biologie bezeichnet eine Zelle eine in sich abgeschlossene lebende Grundeinheit, deren Größe normalerweise in einem Bereich von 1 bis 50  $\mu\text{m}$  variiert [2, 3] und die Substrukturen besitzt, zu denen unter anderem der meist noch gut sichtbare Zellkern oder bei Pflanzenzellen die grün gefärbten Chloroplasten zählen.

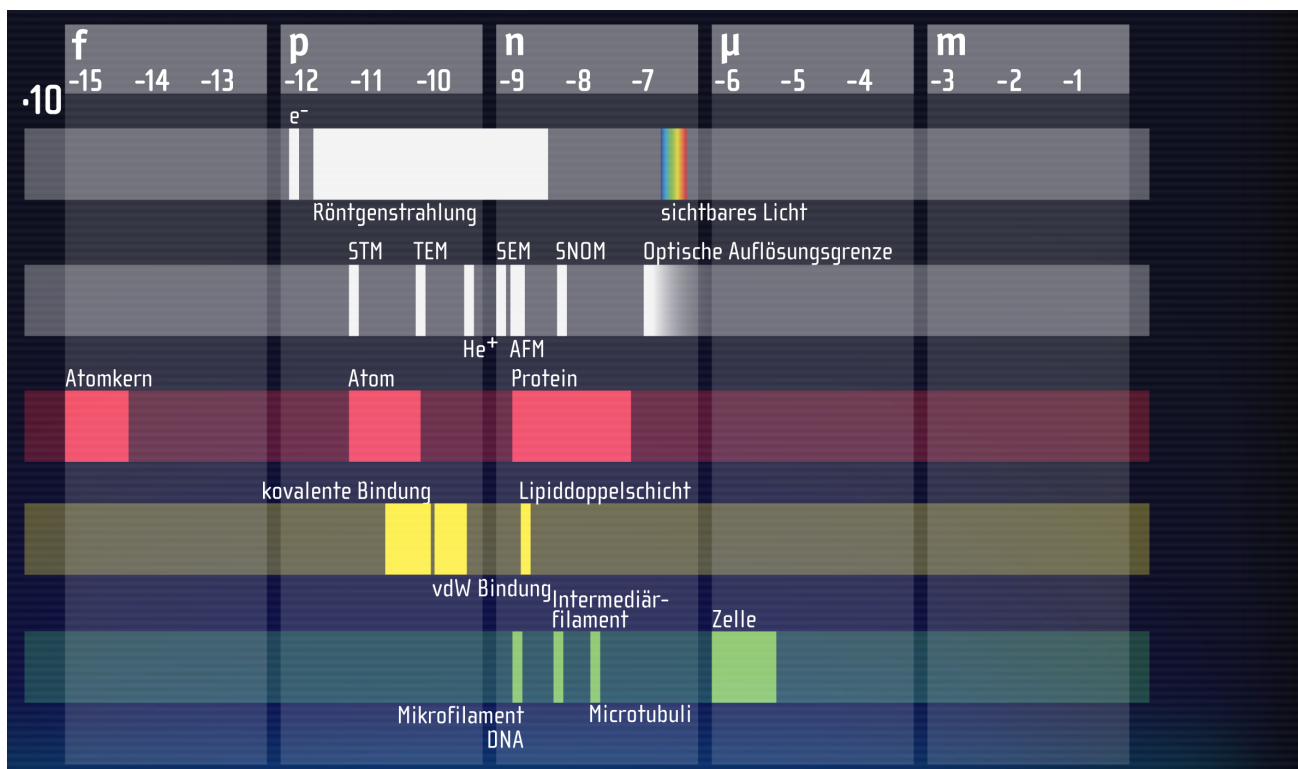


**Abbildung 1.1:** Die erste Abbildung von Zellen, aus Hookes *Micrographia* (1665), mit dem er die Mikroskopie als wissenschaftliche Disziplin etablierte.

Doch stößt man bei der lichtmikroskopischen Untersuchung von Zellen auf eine Grenze, die auch heute noch Gültigkeit hat: Egal wie gut die Linsen des Mikroskops geschliffen und wie perfekt sie zueinander ausgerichtet sind, es ist nicht möglich, eine bestimmte Auflösung zu überschreiten, so dass viele der feineren Strukturen und Formen der Organellen dem Auge verborgen bleiben. Denn aufgrund von Beugungseffekten liegen die mit einem herkömmlichen Lichtmikroskop maximal erkennbaren Strukturen in einer Größenordnung von 250 bis 300 nm, womit beispielsweise die verschiedenen, das Gerüst der Zelle bildenden Filamenttypen unsichtbar bleiben, die nur 7 bis 24 nm in der Breite messen[4]. Noch kleiner sind



viele Proteine, deren gefaltete und verschlungene Ketten ihre Funktionsweise in der Zelle vorgeben. Ihre Konformation bestimmt, ob sie beispielsweise Teil des Stoffwechselkreislaufs sind, Fremdkörper abwehren oder mit anderen gleichartigen Bausteinen zu Filamenten polymerisieren. Schon kleinste Abweichungen in der Sequenz der Aminosäuren können zu einem abweichenden Faltergebnis und damit zu einem massiv geänderten biochemischen Verhalten führen. Da sie mit ihren Ausmaßen von wenigen Nanometern [4] weit unterhalb des optischen Auflösungslimits liegen, ist die Lichtmikroskopie kein adäquates Mittel um die Form oder die Funktionsweise von Proteinen aufzuklären. Deshalb müssen andere Methoden gefunden werden, um tiefer in die mikroskopischen Dimensionen der Zellen vorzudringen.



**Abbildung 1.2: Graphik zur Veranschaulichung der Größenordnungen verschiedener biologischer und biochemischer Größen und Mikroskopiemethoden.**

Derweil stehen der Wissenschaft heute zahlreiche Möglichkeiten zur Verfügung, diese Auflösungsgrenzen zu umgehen: Beispielsweise die Elektronenmikroskopie, bei der Strahlung einer kürzeren Wellenlänge eingesetzt wird, die Konfokalmikroskopie, die eine filternde Blende in den Abbildungsprozess einbringt [77], oder die STORM-Mikroskopie, die zeitlich statistische Mitteilung verwendet [78].

Diese Arbeit widmet sich einer weiteren Methode, eine sub-Wellenlängen-Auflösung zu erzielen und die Beugungsproblematik von vornherein zu umgehen: *der aperturlosen optischen Nahfeld-Mikroskopie*.

Es soll gezeigt werden, dass dieses Verfahren in der Lage ist, einzelne fluoreszente Farbstoffmoleküle mit hoher Genauigkeit zu lokalisieren. Zudem liefert es durch die gleichzeitige Messung von Topographie und Fluoreszenz Vorteile den anderen Methoden gegenüber. Dies wird praktisch anhand der Untersuchung von Tabakmosaikviren und Desmin-Intermediärfilamenten demonstriert, die vorher mit vereinzelt Farbstoffen markiert wurden.

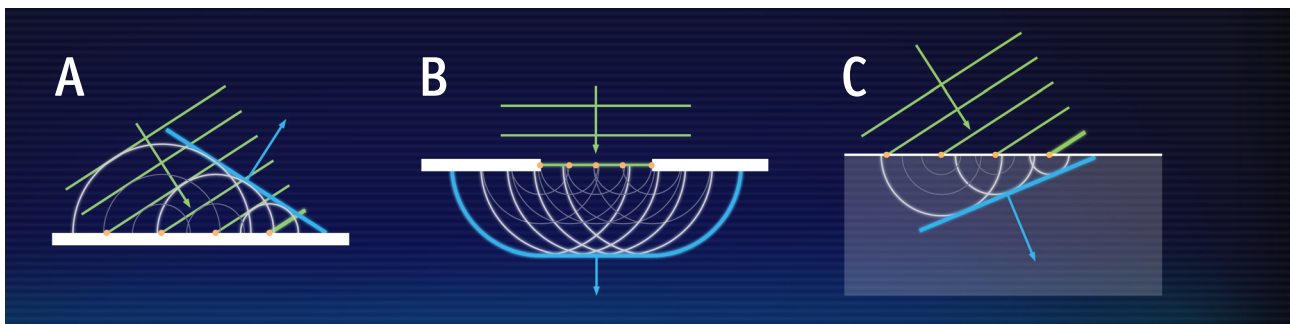
Zu Beginn werden in Kapitel 2 die Grundlagen der optischen Mikroskopie dargelegt, mit besonderem Augenmerk auf die Ursache des Auflösungslimits. Kapitel 3 befasst sich mit den elektrodynamischen Effekten, die bei der optischen Nahfeldmikroskopie ausgenutzt werden. Kapitel 4 gibt eine kurze Einführung in die untersuchten biologischen Systeme. Danach folgt in Kapitel 5 eine detailliertere Erläuterung der experimentellen Methoden, welche in Kapitel 6 zu einer Beschreibung des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Aufbaus führt. Abschließend folgt in Kapitel 7 die Erörterung der experimentell erzielten Ergebnisse.

# 2 Grundlagen der Mikroskopie

## 2.1 Das optische Auflösungslimit

Um zu verstehen, warum das Auflösungsvermögen eines Lichtmikroskops begrenzt ist, müssen wir uns zunächst mit dem Begriff der Beugung vertraut machen.

Licht breitet sich im Raum wellenartig aus. Stammt dieses von einer punktförmigen Lichtquelle, so entfernt es sich von seinem Ursprungspunkt in Form einer kugelförmigen Welle. Handelt es sich um eine emittierende oder reflektierende Fläche, so wird jeder Punkt als Ausgangspunkt einer einzelnen kugelförmigen Elementarwelle verstanden, welche sich in genügender Entfernung zu einer gemeinsamen Wellenfront überlagern. Dies ist als *Huygenssches Prinzip* bekannt [5]. Damit lässt sich die Interaktion und Ablenkung von Wellen an Hindernissen erklären (Abbildung 2.1), welche unter dem Begriff *Beugung* zusammengefasst werden.



**Abbildung 2.1:** Durch das Huygenssche Elementarwellenprinzip lassen sich Phänomene wie Reflexion (A), Beugung (B) und Brechung (C) erklären.

Als Modellsystem soll zunächst ein optisches Gitter betrachtet werden (Abbildung 2.2). Eine ebene Lichtwelle fällt auf eine Reihe von Spalten des Abstands  $g$ . Jeder dieser Spalte dient als Ausgangspunkt einer neuen Elementarwelle. Je nach Austrittswinkel  $\varphi$  kommt nun ein unterschiedlicher Gangunterschied zwischen den einzelnen Wellenzügen zustande, der bestimmt, ob bei Überlagerung der Einzelstrahlen diese sich gegenseitig auslöschen oder konstruktiv interferieren.

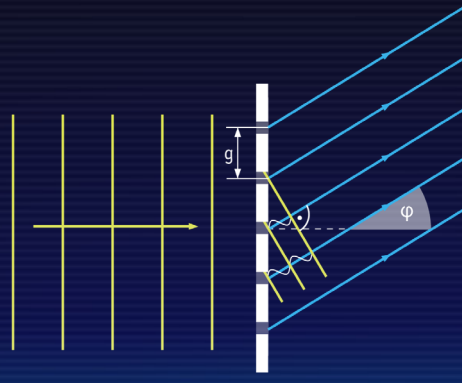


Abbildung 2.2: Eine Wellenfront trifft auf ein optisches Gitter. Jeder Gitterpunkt wird der Ausgangspunkt einer Elementarwelle. Je nach Winkel entsteht ein unterschiedlicher Gangunterschied zwischen den Wellenzügen.

Um die Bedingung für ein Intensitätsmaximum zu erfüllen, müssen die Strahlen sich so überlagern, dass der Gangunterschied genau einem n-fachen Vielfachen der Wellenlänge  $\lambda$  entspricht:

$$n \cdot \lambda = g \cdot \sin \varphi$$

2.1

Je feiner also die Gitterlinien, bzw. die betrachteten Strukturen sind, desto stärker ist die Beugung oder Ablenkung der Nebenmaxima.

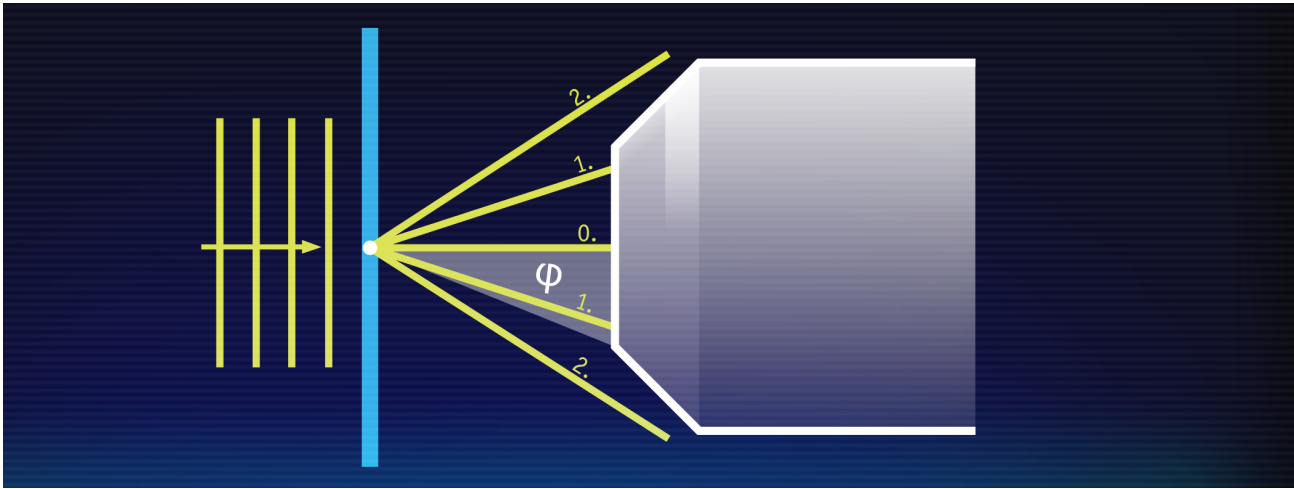
Ernst Abbe erklärte 1873 in seiner Theorie zur Bildentstehung, dass das Interferenzmuster die wesentlichen Strukturinformationen des Objekts enthält [6]. Dabei tragen Maxima höherer Ordnung detailliertere Strukturinformationen zum Bildaufbau bei als die niedrigeren. Um diese Informationen abbilden zu können, müssen die Maxima durch eine Linse gesammelt werden.

Begrenzt ist die Anzahl der nutzbaren Maxima dabei durch das Lichtsammelvermögen des Mikroskopobjektivs, welches durch die Numerische Apertur NA beschrieben wird:

$$NA = b \cdot \sin \varphi$$

2.2

Dabei operiert das Objektiv in einem Medium mit dem Brechungsindex  $b$  und ist in der Lage Licht, welches in einem Winkel  $\varphi$  von der optischen Achse abweicht, aufzusammeln:



**Abbildung 2.3:** Die Numerische Apertur des Objektivs bestimmt wie viele Beugungsmaxima zum Bildaufbau eingesammelt werden können.

Dementsprechend werden bei zu kleinen Strukturen die höheren Intensitätsmaxima so stark abgelenkt, dass sie vom Objektiv nicht mehr aufgenommen werden können und die Abbildung dementsprechend zu unscharf und detailungenau wird [7]. Abbe definierte, dass zur Differenzierung zweier Strukturen mindestens das nullte und das erste Maximum zum Bildaufbau benötigt würde. Demzufolge ergibt sich *Abbes Definition des Auflösungslimit* [6]:

$$d \approx \frac{\lambda}{2NA}$$

2.3

Die Effekte der Beugung sind abhängig von der Größe der zu beobachtenden Objekte und machen sich bei abnehmender Größe stärker bemerkbar. Erweitert man dieses Prinzip auf einen einzelnen Spalt, bzw. einzelnes Objekt, und lässt die Ausdehnung gegen einen einzelnen Punkt gehen, erhält man für das zugehörige Beugungsmuster ein sogenanntes *Airy-Beugungsscheibchen*:

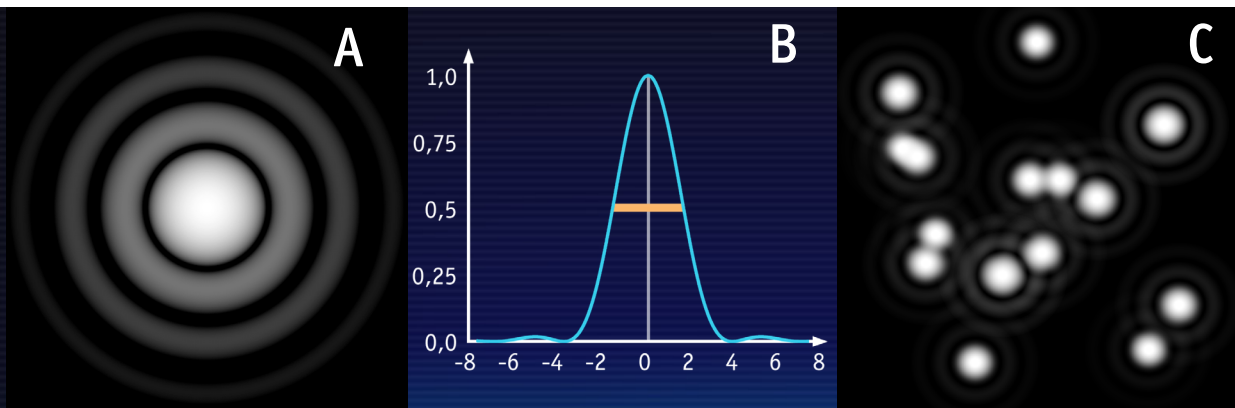


Abbildung 2.4: Airy-Beugungsscheibchen in logarithmischer Helligkeitsskala (A). Graph der Intensitätsverteilung mit eingezeichneter Halbwertsbreite (B). Punktmuster von Lichtpunkten unterschiedlicher Helligkeit gefaltet mit Beugungsscheibchen (C).

Wird ein Bild mit feinen Strukturen abgebildet, wird dabei jeder Bildpunkt mit einem Beugungsscheibchen überlagert – ein Bildpunkt weitet sich auf. Der Abbildungsvorgang ist also eine Faltung der abzubildenden Struktur mit einem gebeugten Bild einer Punktquelle, der sogenannten *Punktspreizfunktion* (PSF). Sie bestimmt, wie sich Beugungseffekte auf abzubildende Strukturen auswirken. Die Intensitätsverteilung eines Beugungsscheibchens wird beschrieben durch

$$I(r) = I_0 \cdot \left( \frac{J_1(2\pi r)}{\pi r} \right)^2$$

2.4

mit  $J_1$  der Besselfunktion erster Ordnung. Idealerweise sind zwei getrennte Punkte gerade noch als solche zu erkennen, wenn sich einer genau im Minimum der Beugungsscheibe des Anderen befindet. Die erste Nullstelle befindet sich bei  $r \approx 3,83$ , was zu *Rayleighs Definition des Auflösungslimit* von

$$d = \frac{0,61\lambda}{NA}$$

2.5

führt [5, 8].

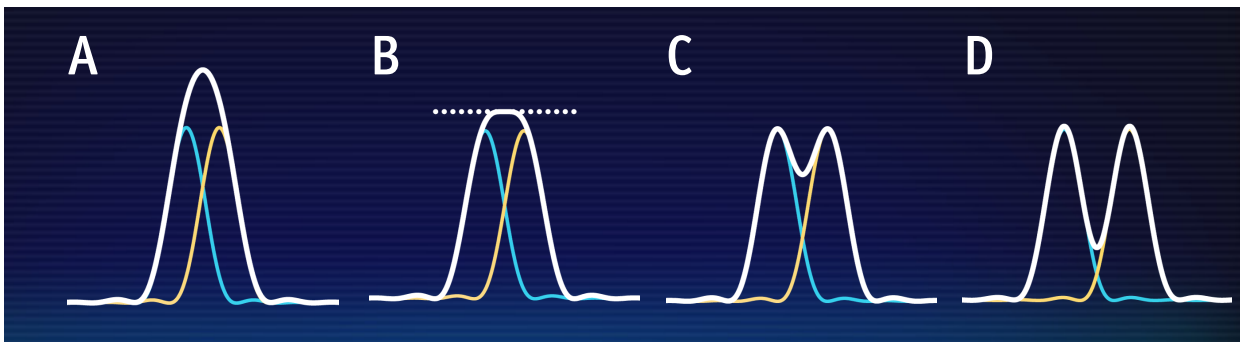
In der Fluoreszenzmikroskopie wird eine andere Definition gewählt, da es sich bei den aufzulösenden Strukturen direkt um die Lichtquellen, die fluoreszenten Moleküle, handelt.

Dort wird die erreichbare Auflösung über die *Halbwertsbreite* oder FWHM (*full width at half maximum*) des nullten Maximums der Airy-Scheibe definiert [9]. Diese liegt bei  $r \approx 1,62$ , was zu einer Definition von

$$d = \frac{0,51\lambda}{NA}$$

2.6

führt [10], ähnlich dem Abbe-Kriterium aus Gleichung 2.3 und daher im Folgenden zur Berechnung der Auflösung herangezogen werden soll.



**Abbildung 2.5: Verschiedene Kriterien zur Beurteilung von Auflösungen: Nicht aufgelöst(A), Sparrow-Kriterium(B), Rayleigh-Kriterium(C), deutlich aufgelöst(D).**

Verwendet man beispielsweise Farbstoffe mit einem Emissionsmaximum im Bereich von 600 nm, so kann man theoretisch optische Strukturen bis zu einer Größenordnung von ungefähr 360 nm auflösen. Ist es beabsichtigt, kleinere Strukturen sichtbar zu machen, bietet sich die Möglichkeit, Licht mit kleinerer Wellenlänge  $\lambda$  zu verwenden: So liefert beispielsweise UV-Licht mit  $\lambda = 300$  nm eine Auflösung von circa 150 nm.

Da die Formeln 2.5 und 2.6 zeigen, dass das Limit neben der Wellenlänge auch von der Numerischen Apertur abhängig ist, legt dies die Möglichkeit nahe, das Auflösungslimit zu verbessern, indem die Numerische Apertur des verwendeten Aufbaus erhöht wird. Durch Verwendung verschiedener Immersionsmedien, die höhere optische Brechungsindizes als Luft haben, lässt sich beispielsweise mit Öl die hohe Numerische Apertur von  $NA = 1,4$  erzielen [5]. Dies hebt das Auflösungslimit des Beispiels auf einen Bereich von ungefähr 130 nm.

## 2.2 Konfokalmikroskopie

Ein weiterer Ansatz ist, in den Bildentstehungsprozess einzugreifen. Dieses Verfahren nutzt die Konfokalmikroskopie, eine Form der Fluoreszenzmikroskopie, bei der zum Leuchten angeregte Moleküle im Zentrum der Betrachtung stehen. Eine punktförmige Lichtquelle, als die ein fluoreszentes Molekül angenommen werden kann, wird mit einer Beugungsfunktion, der Punktspreizfunktion (PSF), multipliziert. Ergebnis ist ein sogenanntes Beugungsscheibchen, dessen Halbwertsbreite als Definition der erreichten Auflösung dient. Dieses kann nun durch eine geschickte Versuchsanordnung verkleinert werden, was in der Konfokalmikroskopie realisiert wird: Dabei wird eine Blende in den bildgebenden Strahlengang eingebracht. Auf diese Weise fügt man einen weiteren Faltungsvorgang in den Bildentstehungsprozess ein. Mathematisch gesehen wird dabei die Beleuchtungs-PSF mit einer weiteren Detektions-PSF multipliziert, was in einem Faktor  $1/\sqrt{2}$  für die erreichbare Auflösung resultiert [10]:

$$d = \frac{0,51\lambda}{\sqrt{2} \cdot NA} = \frac{0,37\lambda}{NA}$$

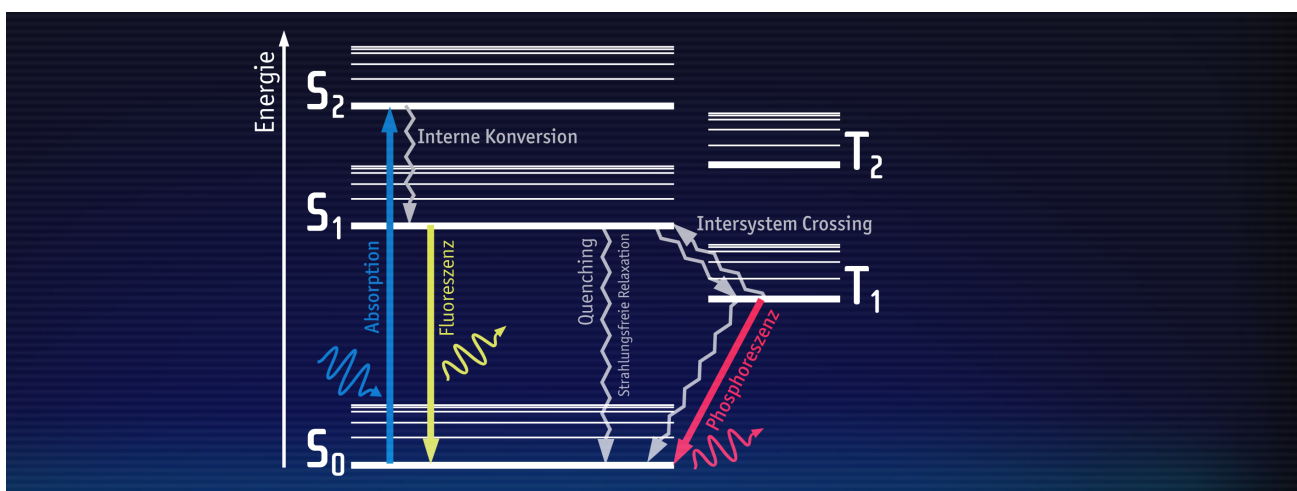
2.7

Da dadurch statt Licht entlang des gesamten Lichtweges nur Licht aus dem Detektionsvolumen aufgenommen wird, muss die Fläche nacheinander abgefahren werden, wodurch sukzessive ein komplettes Bild aufgenommen wird. Trotz der höheren erzielten Auflösung unterliegt diese Methode immer noch der Beugungsbegrenzung, die ihre Ursache in der Wellennatur des Lichts und dessen Ablenkung an den abzubildenden Strukturen hat. Hier setzt die optische Nahfeldmikroskopie an, der die Idee zugrunde liegt, die anregende Lichtquelle von Beugung unabhängig zu machen und die gesamte Problematik zu umgehen, indem eine nicht-beugungsbeschränkte Lichtquelle verwendet wird. Ebenfalls kommen dabei fluoreszente Moleküle zum Einsatz, deren physikalische Grundlagen im nächsten Absatz dargelegt werden.



Fluoreszierende Moleküle finden unter anderem Anwendung in der Fluoreszenzmikroskopie, wo sie sich als Marker an biologische Moleküle binden lassen und somit die Identifikation von gewünschten Gewebestrukturen ermöglicht [11, 12]. Als Fluorophore können sowohl Farbstoffe dienen, deren Moleküle Doppelbindungen aufweisen, die elektromagnetische Strahlung absorbieren und emittieren können und besonders empfindlich für gewünschte Wellenlängen sind [13], als auch mikroskopische Halbleiterkügelchen, sogenannte Quantendots, welche aufgrund ihrer Bandstruktur fluoreszieren können[14].

Fluoreszenz bezeichnet die Aufnahme von Energie, sei es in Form der Anregung eines Hüllenelektrons (Farbstoffmolekül) oder Valenzelektrons (Halbleiter) in einen höheren Energiezustand oder die Anregung eines Exzitons (Quasiteilchen der Gitterschwingung) bei Quantendots, und die dazugehörige Abgabe der aufgenommenen Energie in Form von Strahlung. Die bei der Rückkehr eines angeregten Elektrons auf ein niedrigeres Energieniveau freiwerdende Energie kann auf verschiedene Weisen abgegeben werden. Das dabei zumeist erwünschte Ergebnis ist die Emission von Strahlung. Die Übergänge werden durch ein Jablonski-Diagramm in Abbildung 2.6 verdeutlicht.



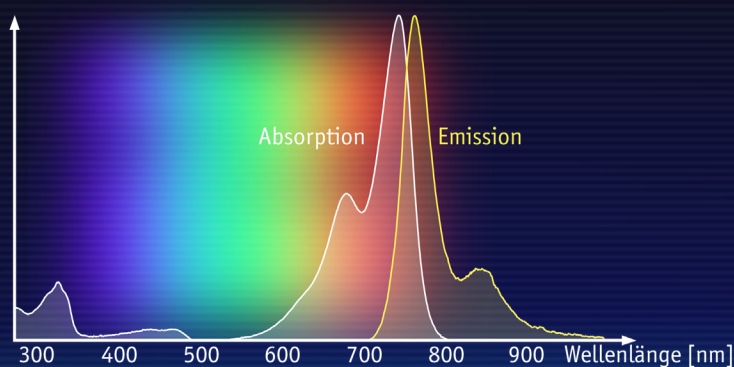
**Abbildung 2.6:** Ein Jablonski-Diagramm zeigt die Übergänge zwischen den Energieniveaus eines Systems bei Absorption und Emission von Energie. Da Interbandübergänge verboten sind, liegen bei der Phosphoreszenz, im Gegensatz zur Fluoreszenz, wesentlich höhere Relaxationszeiten vor, die bis zu vielen Stunden reichen können.

Es ist aber auch der Fall eines strahlungsfreien Übergangs möglich, bei dem die Energie in Wärme, durch Stoßprozesse, oder beim Energietransfer durch Dipol-Dipol-Interaktion

dissipiert[9]. Die Absorption von Photonen erfolgt durch delokalisierte  $\pi$ -Elektronen des Moleküls, bei der die Elektronen eine bestimmte Energie durch ihr Dipolmoment aufnehmen können. Da für eine hohe Wahrscheinlichkeit eines Energieübertrags die Dipolmomente der Welle und der Elektronen zueinander passen müssen, gibt es bevorzugte Wellenlängen, welche im Absorptionsspektrum dargestellt sind.

Ist die Anregung erfolgt, so verweilt das Molekül für eine charakteristische Zeit lang in seinem angeregten Zustand. Diese Lebensdauer ist in der Regel wenige Nanosekunden lang [13] und ist durch äußere Umstände beeinflusst, weshalb die Analyse der Fluoreszenzlebensdauer Erkenntnisse über die chemische Umgebung der Farbstoffe liefern kann [15].

Die Relaxation erfolgt meistens nicht direkt zurück auf das Grundniveau, sondern über nichtstrahlende Übergänge zwischen verschiedenen Vibrationsniveaus zunächst in den Grundzustand des angeregten Niveaus, von dem aus das Molekül dann schließlich über einen strahlenden Übergang zum Grundzustand zurückkehrt (siehe Abbildung 2.6). Dadurch sind Absorptions- und Emissionsspektrum nicht mehr deckungsgleich (Abbildung 2.7). Es handelt sich um die sogenannte *Stokes-Verschiebung*, nach der die durch die Strahlung abgegebene Energie in der Regel kleiner ist als die aufgenommene. Daher ist das Emissionsspektrum zum roten, energieärmeren Ende hin stokesverschoben. Für Fluoreszenzfarbstoffe ist dies eine günstige Eigenschaft, da sie durch einfache Filterung die Trennung von Anregungslicht und emittiertem Licht erlaubt.



**Abbildung 2.7:** Die teilweise strahlungsfreien Abregungsprozesse bewirken eine Verschiebung der Absorptions- und Emissionsspektren eines Farbstoffes. Hier sind die spektralen Charakteristika des in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffes Atto740 dargestellt [17].

Ob ein Photon zu einem Fluoreszenzereignis führt, wird von zwei Prozessen bestimmt: zum einen durch die Anregungsrate  $\gamma_{exc}$ , welche proportional zur Beleuchtungsintensität ist, und zum anderen durch die Quantenausbeute  $\eta$ , welche angibt, ob ein Abregungsvorgang zu einem Emissionsereignis führt. Letztere ist als das Verhältnis zwischen Strahlungsübergängen  $\gamma_r$  und Gesamtabregungsrate  $\gamma = \gamma_r + \gamma_{nr}$ , der Summe aus strahlender und nichtstrahlender Abregungsrate  $\gamma_{nr}$  definiert:

$$\eta = \frac{\gamma_r}{\gamma_r + \gamma_{nr}}$$

2.8

Für eine hohe Fluoreszenzintensität  $S$  sind beide Einzelraten zu berücksichtigen, welche beide unabhängig voneinander durch äußere Umstände beeinflusst werden können [16].

$$S \propto \gamma_{exc} \cdot \eta$$

2.9

Ein praktisches Hindernis, welches der Verwendung von einzelnen fluoreszenten Molekülen inhärent ist, ist die Problematik des Ausbleichens. Die durch das Licht aufgenommene Energie begünstigt das Aufbrechen der Doppelbindungen, welche für die Fluoreszenz verantwortlich sind, und dass die Moleküle somit an diesen Stellen andere Verbindungen eingehen. Passiert dies, ist der Farbstoff nicht mehr in der Lage Licht zu emittieren – er bleicht aus und verliert damit seinen Nutzen für die Fluoreszenzdetektion. Die Stabilität gegenüber Ausbleichung variiert stark zwischen verschiedenen Farbstofftypen. Der hier verwendete Farbstoff Atto740 besitzt eine sehr hohe Photostabilität [17]. Dennoch kann in Anwendungen, wo es auf die Detektion einzelner Moleküle über einen langen Zeitraum ankommt, die Nutzbarkeit einer Messung massiv durch den Verlust zu vieler Fluorophore beeinträchtigt werden [11].

# 3 Elektrodynamik des Nahfelds

In der Nahfeldmikroskopie wird ein lokalisiertes und überhöhtes Nahfeld genutzt, um eine nicht-beugungsbeschränkte Lichtquelle zu schaffen. Dabei greift sie Lichtwellen ab, bevor sie sich gemäß dem Huygens-Prinzip zu gemeinsamen Wellenfronten verbinden. Um die Eigenschaften des Lichtes in der „Nahzone“ besser verstehen zu können, widmet sich folgender Abschnitt einer detaillierteren Beschreibung der physikalischen Eigenschaften des Lichts.

## 3.1 Physikalische Eigenschaften des Lichts

Die heute anerkannte mathematische Beschreibung des Lichts geht auf James Clerk Maxwell zurück, der auf phänomenologischen Erkenntnissen anderer Forscher basierend eine Theorie des Lichts als elektromagnetische Welle entwickelt hat. Hauptsächlich baute er jedoch auf der Arbeit von Michael Faraday auf, der zur Beschreibung von Kraftfeldern das Bild der Feldlinien prägte, eine gedachte Repräsentation der Richtungskomponenten der Vektorfelder, anschaulich auch die auf einen im Feld beweglichen Körper einwirkende Kraft. Im Jahre 1820 entdeckte André-Marie Ampère [18], dass elektrische Leiter, welche mit einem Strom der elektrischen Stromdichte  $\vec{j}$  durchflossen werden, ein Magnetfeld mit der magnetischen Feldstärke  $H$  erzeugen:

$$\nabla \times \vec{H} = \vec{j} + \frac{\partial \vec{D}}{\partial t}$$

3.1

Die Rotation von  $H$  steht hierbei für ein magnetisches Wirbelfeld, welches den elektrisch durchflossenen Leiter ringförmig umschließt. Der Verschiebungsstrom  $D$  wurde von Maxwell in seiner bekannten Ergänzung hinzugefügt, um das Ampère-Gesetz für den zeitabhängigen Fall zu erweitern, da es im nichtstationären Fall zu einem Widerspruch mit der Kontinuitätsgleichung käme [20].

Im Gegenzug erkannte Michael Faraday 1821, dass veränderliche magnetische Felder einen elektrischen

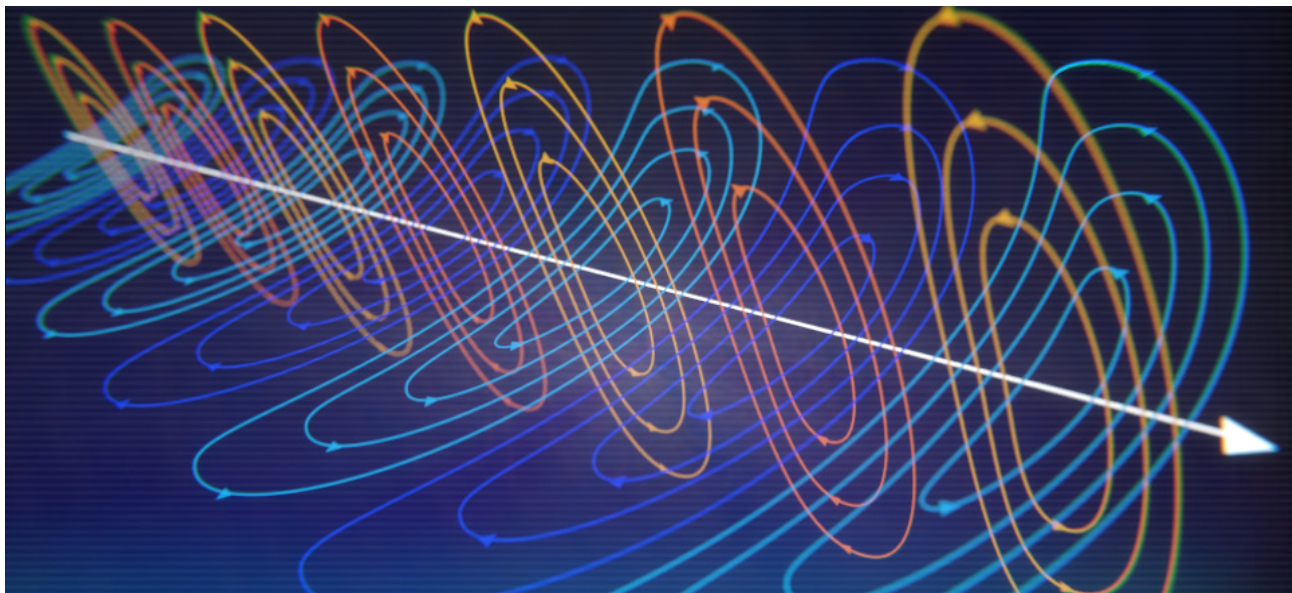
Wirbelstrom erzeugen - die elektromagnetische Induktion - welche Maxwell einige Jahre später mathematisch formulierte [18]:

$$\nabla \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t}$$

3.2

Die Änderung des magnetischen Feldes wird dabei durch die zeitliche Ableitung der magnetischen Flussdichte  $B$ , sowie das elektrische Wirbelfeld durch die Rotation der Feldstärke  $E$  symbolisiert.

Die Gleichungen 3.1 und 3.2 zeigen, wie sich veränderliche freie elektrische und magnetische Felder abwechselnd gegenseitig erzeugen - auf diese Weise erfolgt die Ausbreitung der Lichtwelle im Raum. Abbildung 3.1 veranschaulicht die Felder bei der Propagation einer Welle. Zu beachten ist, dass es sich bei einer propagierenden Welle ausschließlich um Wirbelfelder handelt, also geschlossene Feldlinien, die quellenfrei sind. Hierbei sind keine freien Ladungsträger beteiligt. Erst wenn die Welle in Interaktion mit Materie tritt, wird die Situation komplexer und Ladungen treten auf.



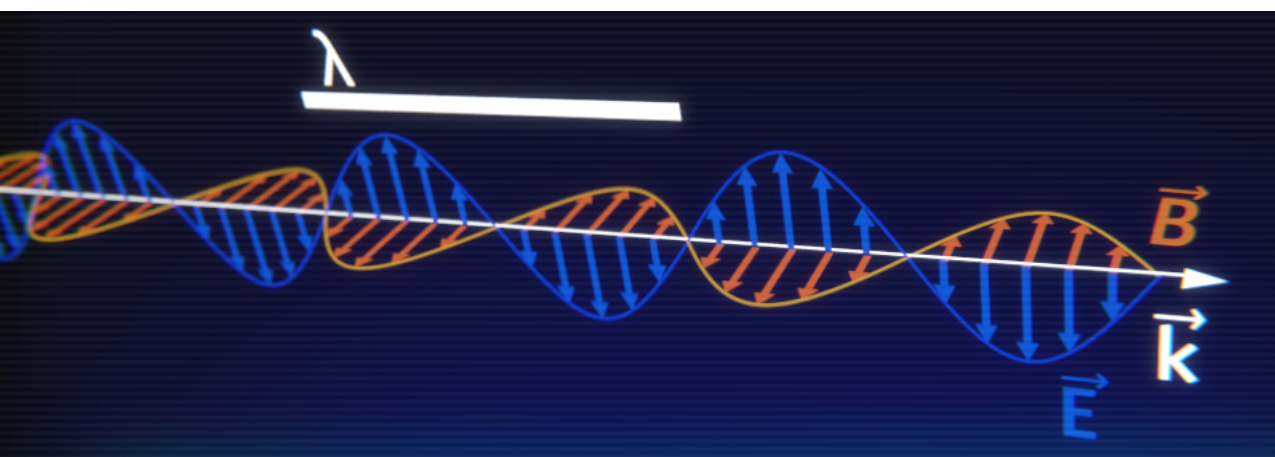
**Abbildung 3.1: Visualisierung der elektrischen (blau) und magnetischen (orange) Feldlinien bei einer sich linear im Raum ausbreitenden Lichtwelle.**

Die Fortpflanzung der Welle im freien Raum erfolgt mit der Lichtgeschwindigkeit  $c$ . Eine grundlegende Eigenschaft einer Welle ist die Frequenz  $f$  mit welcher sich die Felder erzeugen. Diese ist abhängig von ihrer Energie. Da die Lichtgeschwindigkeit konstant ist, hängt die Wellenlänge  $\lambda$ , also die räumliche Ausdehnung eines Schwingungszyklus, reziprok von der Frequenz ab:

$$c = \lambda \cdot f$$

3.3

Als weitere Eigenschaft ist die Polarisationsrichtung zu nennen. Diese bezeichnet die Ebene, in der die elektrische Feldkomponente schwingt. Abbildung 3.2 stellt die Richtungen der Feldkomponenten dar, sowie einige der erwähnten Kenngrößen.



**Abbildung 3.2:** Visualisierung der elektrischen (blau) und magnetischen (orange) Feldkomponenten bei einer sich linear im Raum ausbreitenden Lichtwelle.

Neben den soeben besprochenen Mechanismen der Ausbreitung einer Lichtwelle im Vakuum gilt es nun die Interaktion mit Materie zu klären. In Medien stellt sich die Ausbreitung einer Lichtwelle komplexer dar, denn das Vorhandensein von Materie bedingt auch die Anwesenheit einer Vielzahl von lokalisierten elektrischen Ladungen. In Formel 3.4 wird dem durch die Ladungsträgerdichte  $\rho$  Rechnung getragen, zusammen mit der elektrischen Feldkonstante  $\epsilon_0$ . Fällt eine Lichtwelle auf eine elektrisch leitende, ungeladene Oberfläche, so verursachen die wechselnden elektrischen Felder Ladungsverschiebungen auf der Oberfläche (vgl. Graphik 3.4). Diese Ladungen sind

Ausgangspunkte der zur Veranschaulichung herangezogenen Feldlinien. Dass es sich in diesem Fall nicht um geschlossene, quellenfreie Feldlinien handelt, wird durch die Maxwell-Coulomb-Gleichung bestimmt:

$$\nabla \cdot \vec{E} = \frac{\rho}{\epsilon_0}$$

3.4

Die Divergenz  $\nabla \cdot E$  macht dabei Aussagen über die Form der Feldlinien: Ist diese gleich Null, so sind die Feldlinien quellenfrei, ist sie hingegen abweichend von Null sind Quellen vorhanden. In der Anwesenheit von Materie haben also die Feldlinien ihren Ursprung in den Ladungsträgern des Mediums. Im Gegensatz dazu sind magnetische Felder immer quellenfrei, da keine magnetischen Monopole existieren, was durch die Maxwell-Gauß-Gleichung beschrieben wird:

$$\nabla \cdot \vec{B} = 0$$

3.5

Die bei der Interaktion einer elektromagnetischen Welle durch Polarisation des Materials entstehenden positiven und negativen Ladungszentren sind über elektrische Feldlinien miteinander verbunden.

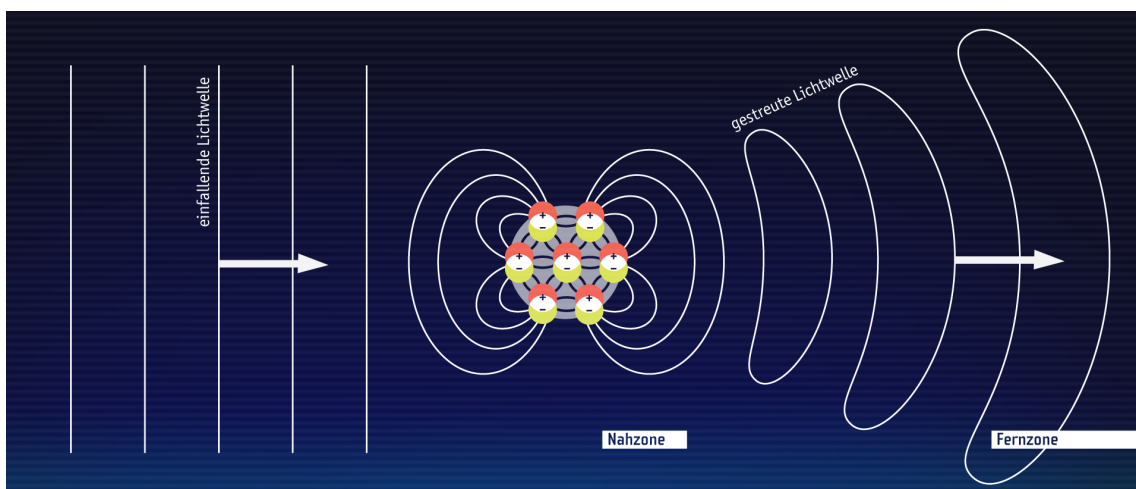


Abbildung 3.3: Vorgänge bei der Streuung einer Lichtwelle an einem Objekt. Darstellung gemäß [7].

Idealerweise lassen sich diese elementaren Dipole bis auf molekulare Ebene zurückverfolgen (Abbildung 3.3). Diese Felder sind allerdings an die Oberfläche gebunden und können nicht im freien Raum existieren und propagieren. Ihre Feldstärke geht mit wachsendem Abstand zur Oberfläche exponentiell gegen Null. Da sich die Felder der negativen und positiven Ladungen in der Entfernung überlagern und aufheben, sind diese Polariationseffekte im sogenannten Fernfeld nicht mehr zu beobachten [7]. Rechnerisch zeigt sich für die Strahlung eines Dipols [7, 20]:

$$\vec{E}(\vec{r}) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \frac{e^{ikr}}{r} \left\{ k^2 [(\vec{n} \times \vec{p}) \times \vec{n}] + \frac{1}{r} \left( \frac{1}{r} - ik \right) [3\vec{n}(\vec{n} \cdot \vec{p}) - \vec{p}] \right\}$$

3.6

wobei Anteile auftreten, die mit der -2. und -3. Potenz des Radius abfallen. Da für große Entfernungen

$$\frac{k^2}{r} \gg \frac{k}{r^2} \gg \frac{1}{r^3} \quad \text{für } r \gg \lambda$$

3.7

gilt, werden diese Terme normalerweise für den Bereich, der weiter als eine Wellenlänge von der Oberfläche entfernt ist, vernachlässigt. Dieser Bereich, wird als optische Fernzone bezeichnet. Für den Bereich der weniger als eine Wellenlänge an der Oberfläche liegt, überwiegt der Einfluss des  $r^{-3}$ -Terms:

$$\frac{k^2}{r} \ll \frac{k}{r^2} \ll \frac{1}{r^3} \quad \text{für } r \ll \lambda$$

3.8

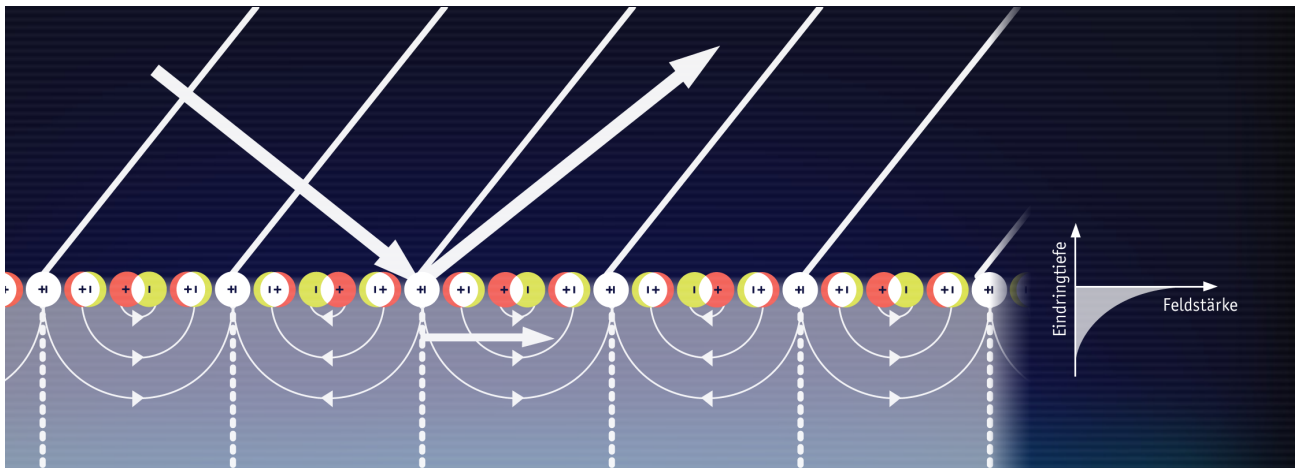
Dieser Bereich, in dem die lokalisierten Felder existieren, ist die sogenannte Nahzone. Aus den Grenzwerten für die verschiedenen Bereiche ergeben sich unterschiedliche Verhaltensweisen für das elektromagnetische Feld.



## 3.2 Evaneszente Felder

Ein weiteres Phänomen von Licht ist die Evaneszenz, deren Eigenschaften für die Beleuchtung im vorliegenden Aufbau genutzt wird.

Trifft eine Lichtwelle auf eine Grenzfläche und wird reflektiert, also an einer weiteren Ausbreitung in die ursprüngliche Richtung gehindert, so gehen die elektrischen und magnetischen Feldanteile nicht sprunghaft auf Null zurück. Analog zum Tunneleffekt pflanzt sich die Welle noch in der ursprünglichen Propagationsrichtung fort, mit exponentiell absinkender Intensität [8]. Sie tunnelt sozusagen in die Oberfläche hinein.



**Abbildung 3.4:** Erzeugung eines evaneszenten Feldes bei der Reflexion einer Lichtwelle an einer Oberfläche.

Obwohl eine evaneszente Welle, wie ein optisches Nahfeld, nicht im freien Raum existieren kann und an eine Oberfläche gebunden ist, so transportiert sie im Gegensatz dazu trotzdem Energie entlang der Materialgrenze. Abbildung 3.4 verdeutlicht, dass sich eine evaneszente Welle innerhalb der Oberflächenebene propagiert. Ihre Wellenlänge ist abhängig von der Wellenlänge des einfallenden Lichts, was sie grundlegend von den Eigenschaften der Nahfelder unterscheidet. Auch die Eindringtiefe ist abhängig von der Wellenlänge, während sie bei Nahfeldern konstant ist [7].

Erzeugt wird eine evaneszente Welle beispielsweise durch Totalreflexion (*total internal reflection*, TIRF) in einem Prisma [21] oder wie im hier vorliegenden Fall in einer hemisphärischen Linse eines TIRF-Objektives [22].

Der praktische Vorteil von Fluoreszenzanregung durch evaneszentes Licht ist, dass sich durch die geringe Ausbreitungslänge störendes Streulicht stark verringern lässt und somit ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis zu erzielen ist [22, 23]. Allerdings können somit auch nur oberflächennahe Farbstoffe angeregt werden.

### *3.3 Auskopplung, Transportierte Energie und Streuung*

Ein Nahfeld ist aufgrund der Ladungen an die entsprechende Oberfläche gebunden. Es kann nicht in den freien Raum propagieren, und es transportiert auch keine Energie. Dies ist eine grundlegende Herausforderung für die experimentelle Arbeit mit Nahfeldern, denn um ein Signal detektieren zu können, muss Energie von einer Quelle in einen Detektor transportiert werden [24].

Es ist also nötig, die Energie des Nahfeldes in das Fernfeld auszukoppeln. Dazu wird ein Vermittler eingesetzt, eine Störung, an der das Nahfeld gestreut und damit detektierbar wird [25, 23, 22]. Dazu eignet sich besonders eine möglichst scharfe Spitze, ein sogenannter Cantilever, wie er bei einem normalen Rasterkraftmikroskop (siehe Abschnitt 5.1) zum Einsatz kommt [26, 27]. Auf die Beziehungen zwischen Nahfeld und Sonde wird in den folgenden Abschnitten genauer eingegangen.

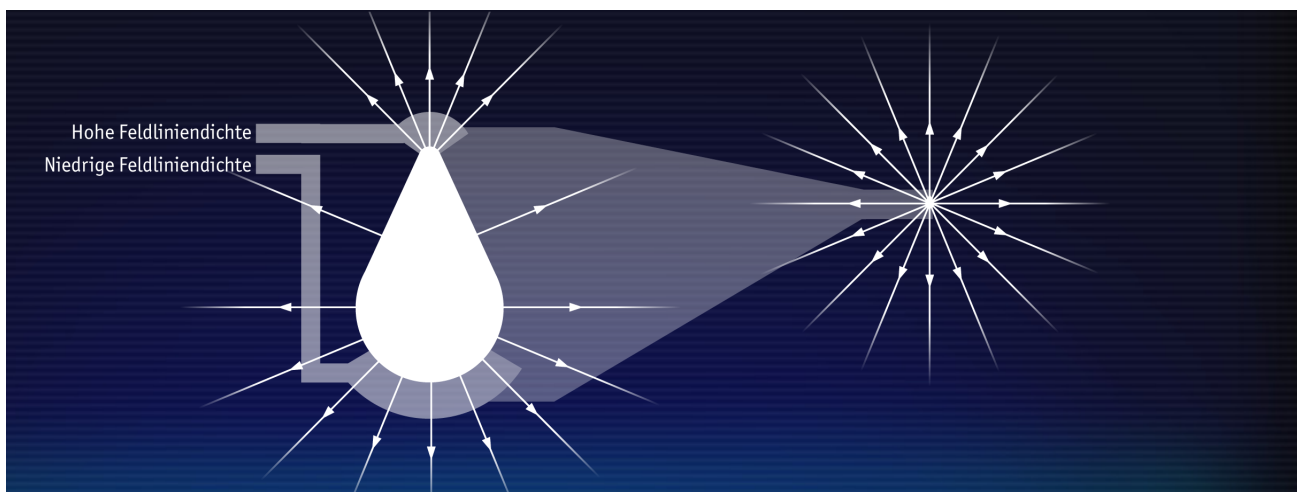
### *3.4 Feldverstärkung und Plasmonen*

Um eine sehr hohe optische Auflösung zu erzielen, die weit über dem Auflösungsvermögen von herkömmlichen Fernfeld-Lichtmikroskopen im sichtbaren Wellenlängenbereich liegt, sind hohe Raumfrequenzen nötig [25]. Dazu lässt sich entweder Strahlung mit sehr viel kleinerer Wellenlänge verwenden - beispielsweise UV-, Röntgen- oder Elektronenstrahlung - oder eine Lichtquelle, die auf einen sehr kleinen Bereich beschränkt ist.

Edward Hutchinson Syngé, der als Erfinder der Nahfeldmikroskopie gilt, wollte dies durch die Beleuchtung einer Probe durch eine Lochblende realisieren, deren Öffnungsdurchmesser klein gegenüber der verwendeten Wellenlänge ist [25]. Allerdings ist eine ähnliche Wirkung auch

umgekehrt durch ein möglichst punktförmiges Streuzentrum beobachtbar [23]. Wie bereits festgestellt wird hier eine Cantilever-Spitze verwendet, die aufgrund ihrer Geometrie als Streuzentrum geeignet ist. Wird nun die Spitze mit einem Laser beleuchtet, so treten zwei verschiedene Effekte auf [22, 26].

Der erste Effekt ist der sogenannte *lightning rod-* oder *Spitzeneffekt*, und leitet sich aus elektrostatischen Überlegungen her [23, 22]. Von einem punktförmigen Ladungszentrum gehen die elektrischen Feldlinien immer radial aus. Bei einer endlich ausgedehnten Oberfläche verteilen sich die Ladungsträger, die der Ursprung der Feldlinien sind, immer so, dass die Feldlinien senkrecht aus der Oberfläche entspringen, da dies der energetisch günstigsten Form entspricht. Bei einem ungleichmäßig geformten Körper, wie beispielsweise einer Cantilever-Spitze, ordnen sich die Ladungsträger verstärkt in der Region hoher Krümmung an, weil die Feldlinien immer senkrecht aus der Oberfläche entspringen, und zudem das Objekt in großer Entfernung als punktförmig angesehen werden kann, die Feldlinien also wieder radial verteilt sind (Abbildung 3.5). Daher sammeln sich an Stellen von Oberflächen mit unregelmäßigen Formen wie scharfen Kanten besonders viele Ladungen an, womit dort die Feldlinien dicht konzentriert sind und hohe elektrische Feldstärken vorliegen. Je schärfer die Spitze, also je kleiner der Spitzenradius ist, desto höher ist die Feldstärke direkt an der Spitze [23].



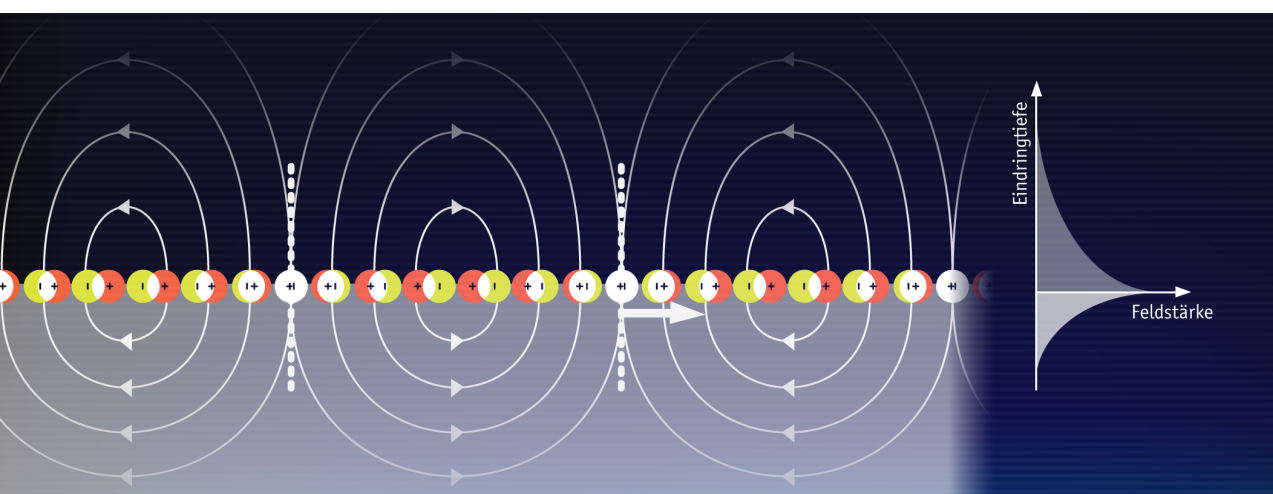
**Abbildung 3.5:** Durch den Spitzeneffekt liegen an Oberflächen mit stärkerer Krümmung dichtere Feldlinien und damit höhere Feldstärken vor (links), weil die Feldlinien senkrecht auf der Oberfläche stehen und das Feld in hinreichender Entfernung radial erscheint (rechts).

Auch der Winkel der Spitze hat einen Einfluss auf das generierte Feld: So können Spitzen mit stumpferen Winkeln stärkere Felder verursachen [28, 29, 30]. Entgegen der intuitiven Vorstellung, dass möglichst schmale Spitzen größere Verstärkungen zeigen, ergaben numerische Simulationen, dass flachere Spitzen höhere Feldeffekte bewirken können. Dies wird darauf zurückgeführt, dass in flachen Spitzen die für Verstärkung mitverantwortliche konstruktive Überlagerung von Plasmonen, auf welche im nächsten Abschnitt eingegangen werden soll, weniger stark durch eine Dephasierung der Plasmonen untereinander beeinträchtigt wird, als in scharfen Spitzen [28]. Die Vorteile eines stärkeren Feldes durch flachere Spitzen stehen hier allerdings den Nachteilen einer abnehmenden Lokalisierung gegenüber.

Der zweite Effekt betrifft eine kollektive Anregung der Elektronen des Materials der Spitze.

Werden die Elektronen eines Atoms relativ zu seinem Atomkern zum Schwingen angeregt, so entstehen durch die negativen Elektronen und positiven Atomrümpfe oszillierende Ladungen, die aufgrund ihrer Polarität an elektromagnetische Felder gekoppelt werden können, sogenannte Polaritonen.

Diese Schwingung des Elektronengases wird als *Plasmon* bezeichnet und kann quantenmechanisch als Teilchen behandelt werden (Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6:** Ein Oberflächenplasmon ist eine longitudinale Schwingung der negativ geladenen Elektronen relativ zu den positiv geladenen Atomrümpfen.

Für die Anregung eines Plasmon-Polaritons gilt sowohl die Energie- als auch die Impulserhaltung. Aussagen über die Zusammenhänge verschiedener Größen einer Welle oder eines Quasiteilchens macht die jeweilige Dispersionsgleichung [31]. Für ein Photon in einem Medium mit der relativen Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_r$  beträgt sie

$$k_{||}^{Photon} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_r}$$

3.9

Dabei ist  $\omega$  die Frequenz der Schwingung, welche über die Dispersionsrelation abhängig vom Wellenvektor  $k$  ist, beziehungsweise hier nur von einer Komponente  $k_{||}$  (vgl. Abbildung 3.8). Der Wellenvektor ist ein gedachter Vektor in Ausbreitungsrichtung der Welle, welcher in Analogie zum Impuls des Quasiteilchens steht. Für ein Oberflächen-Plasmon-Polariton lautet dementsprechend die Dispersionsrelation

$$k_x^{Plasmon} = \frac{\omega}{c} \left( \frac{\epsilon_1 \epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2} \right)^{\frac{1}{2}}$$

3.10

an einer Grenzfläche mit den materialspezifischen dielektrischen Funktionen  $\epsilon_1(\omega)$  und  $\epsilon_2(\omega)$  [31]. Damit ein Energieübertrag aus der elektromagnetischen Welle in das Plasmon möglich ist, muss auch der Wellenvektor übereinstimmen [26].

Plasmonen können normalerweise nicht durch einfallendes Licht angeregt werden, da ihre Dispersionsrelation außerhalb der des Lichts liegt, wie Abbildung 3.7 zeigt [26].

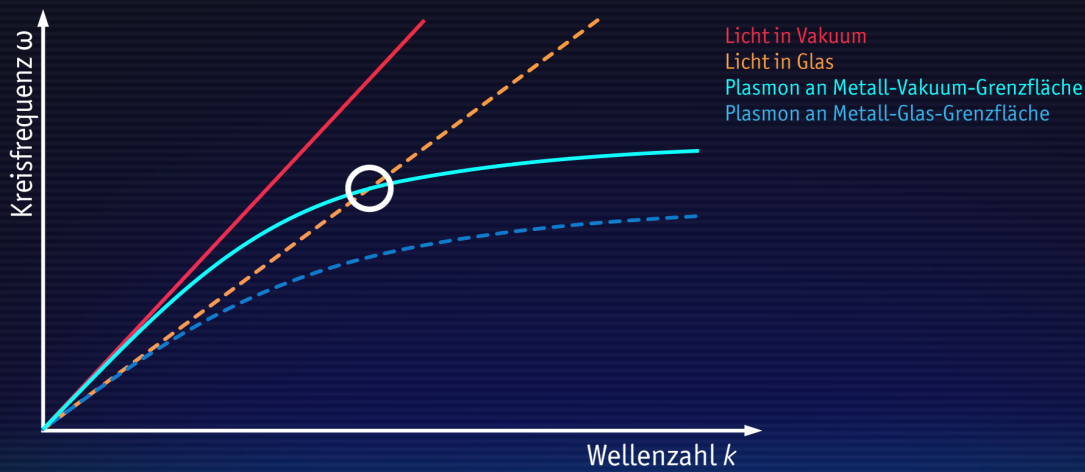


Abbildung 3.7: Erst wenn die Dispersionsrelationen von Licht und Plasmonen an Grenzflächen sich schneiden, lassen sich Oberflächenplasmonen einkoppeln. Graphik nach [60].

Die Dispersionsrelationen von Licht in einem dielektrischen Medium, wie beispielsweise Glas, und die von Oberflächenplasmonen an einer Metall-Vakuum-Grenzschicht schneiden sich hingegen.

Um eine Überlagerung dieser Gegebenheiten zu erreichen, bedient sich die sogenannte Otto-Konfiguration einem Schichtmodell wie in Abbildung 3.8 angegeben [31]. Dabei verursacht die totalreflektierte Lichtwelle in der mittleren Schicht ein evaneszentes Feld, wodurch bei genügend kleiner Schichtdicke Plasmonen an der Metall-Oberfläche angeregt werden können, welche dann in der Ebene der Oberfläche propagieren.

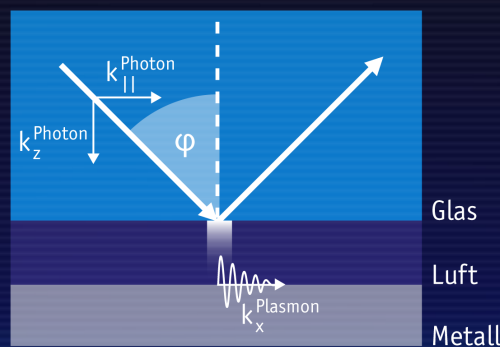


Abbildung 3.8: In der Otto-Konfiguration kann durch Licht in Glas ein Plasmon an einer Luft-Metall-Grenzschicht erzeugt werden, über das bei der Totalreflexion entstehende evaneszente Feld.

Die Oberflächen-Plasmon-Polaritonen laufen analog zu den Ladungen beim Spitzeneffekt zur Spitze hin, wo sie reflektiert werden und sich überlagern, eine sogenannte Oberflächen-Plasmon-Resonanz [32]. Dadurch können bei günstigen

Einfallswinkel und Polarisationsrichtung an der Spitze Felder mit sehr starken Intensitäten entstehen (s.o.).

Die Polarisation des eintreffenden Lichtes ist ein wichtiger Faktor, denn sie legt fest ob eine Ladungsansammlung genau an der Spitze möglich ist oder ob gerade dort keine Verstärkung stattfindet und sich die hohen Feldanteile anderweitig verteilen, ohne nutzbare Feldverstärkung zu erzielen [26].

Auch die Wellenlänge des beleuchtenden Lichtes spielt eine Rolle. Sie bestimmt zwar nicht die Ausdehnung des Nahfeldes, ist aber auch eine Bedingung dafür, wie gut das Licht in Plasmonen eingekoppelt werden kann. Sie hat allerdings keinen Einfluss auf die Wellenlänge der Plasmonen, welche nur von der speziellen Oszillationsfrequenz der Elektronen im Material, der Plasmafrequenz, abhängig ist. Für diese gilt

$$\omega_p = \sqrt{\frac{n_e e^2}{\epsilon_r \epsilon_0 m_e}}$$

3.11

mit der Ladung  $e$  des Elektrons und  $m_e$  deren Masse, welche in der Elektronendichte  $n_e$  vorliegen.  $\epsilon_0$  ist die Dielektrizitätskonstante. Womit sich für Licht eine optimale Einkoppelungswellenlänge von circa 680nm ergibt, was im dunklen roten sichtbaren Bereich liegt, und am besten dazu geeignet ist, Plasmonen in Silizium anzuregen [22, 33].

Neben der Form spielt auch das Material der Spitze eine Rolle. Je nach verwendetem Material und Form können dabei sehr hohe Verstärkungsfaktoren erzielt werden: So wurden für Spitzen aus Gold Verstärkungen vom Faktor 14 simuliert, eine 50-fache Verstärkung unter optimalen Bedingungen bei einem Goldvorsprung an einer Silizium-Spitze [28] bis hin zum Faktor 86 bei Spitzen, die als trigonale Pyramiden geformt waren [22] und sogar Faktoren von 1000 bis 10000 für Gold-Nanopartikel [79]. Für Spitzen aus Silizium, wie sie auch in dieser Arbeit verwendet werden, wurden fünffache [22] bis sechsfache [28] Feldverstärkungen ermittelt.

### 3.5 Fluorophore im optischen Nahfeld

Das Einbringen eines Fluorophors in ein optisches Nahfeld und die Nähe zur Spitze eines Cantilevers beeinflussen die Anregungsrate und die Quantenausbeute auf spezifische Weise. Diese Effekte treten gleichzeitig auf und überlagern sich. Je nachdem welcher Einfluss jedoch stärker ist, kommt es zu einer messbaren Erhöhung der Fluoreszenzemission oder zur Abschwächung der selbigen (*quenching*) [11, 34, 35, 36]. Die starken Feldintensitäten an der Spitze des Cantilevers entsprechen einer erhöhten Beleuchtungsintensität, und verursachen damit eine höhere Anregungsrate [35]. Außerdem bedingt eine kürzere Entfernung zwischen Farbstoff und Feldüberhöhung auch eine höhere Gesamtzerfallsrate [16], was gleichbedeutend mit kürzeren Fluoreszenzlebensdauern ist [16, 36] und somit beide Emissionsraten, die strahlende als auch die strahlungsfreie, erhöht werden [35]. Zum Einsatz kommen Farbstoffe mit geringen intrinsischen Quantenausbeuten - so hat der im folgenden Versuchsaufbau verwendete Farbstoff Atto740 eine intrinsische Quantenausbeute von 10% [17] - denn auch dieser Faktor kann durch den Kontakt mit dem Nahfeld erhöht werden, was zu einem gut sichtbaren Kontrast zwischen den beiden Umständen führt. Die unmittelbare Nähe zur Spitze begünstigt aber auch den strahlungslosen Energieaustausch (beispielsweise durch Ohmsche Verluste [33] und durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen mit in der Spitze induzierten Spiegel-Dipolen [9, 35]) und verringert damit die Quantenausbeute. Ab einer bestimmten Entfernung überwiegt dieser Effekt die Verstärkung und der Farbstoff wird gequenchet.

Die Verstärkung oder Abschwächung der Emission ist hauptsächlich durch die Entfernung zwischen Spitze und Fluorophor gegeben, aber auch andere Faktoren, wie beispielsweise die dielektrische Materialkonstante oder die Polarisation des anregenden Lichts, haben Einfluss darauf [36]. Berechnungen mit der Multiplen-Multipol-Methode ergaben, dass eine maximale Verstärkung bei der Entfernung von  $z \approx 50 \text{ nm}$  zu finden ist [34]. Bei kleineren Entfernungen überwiegt der Abschwächungseffekt.

Somit können für Einzelmolekülfluoreszenz Intensitätsverstärkungen im Bereich von zweifach bis fünffach erzielt werden, durch Einsatz statistischer Rauschunterdrückung kann dies sogar auf sechsfach gesteigert werden [11].



# 4 Biologische Systeme

Im Folgenden sollen zwei biologische Systeme mittels der optischen Nahfeldmikroskopie untersucht werden, welche von besonderem fachlichen Interesse sind. Diese und die jeweiligen Absichten dahinter sollen im folgenden Kapitel näher vorgestellt werden.

## 4.1 Das Tabakmosaikvirus

Die weit verbreitete Tabakmosaik-Krankheit ist hauptsächlich auf Tabak-Pflanzen (*Nicotiana*) zu finden, befällt aber auch diverse andere Pflanzen wie Paprika (*Capsicum annuum*) und Tomate (*Solanum lycopersicum*). Die Krankheit wird nicht wie zuerst angenommen von einem Bakterium verursacht, sondern von Viren, wie Röntgenstrukturanalysen zeigten [37, 38].

Ein einzelnes Tabakmosaikvirus ist ein stäbchenförmiger oder zylindrischer Körper, mit einem Durchmesser von ~18 nm und einer Länge von ~300 nm.

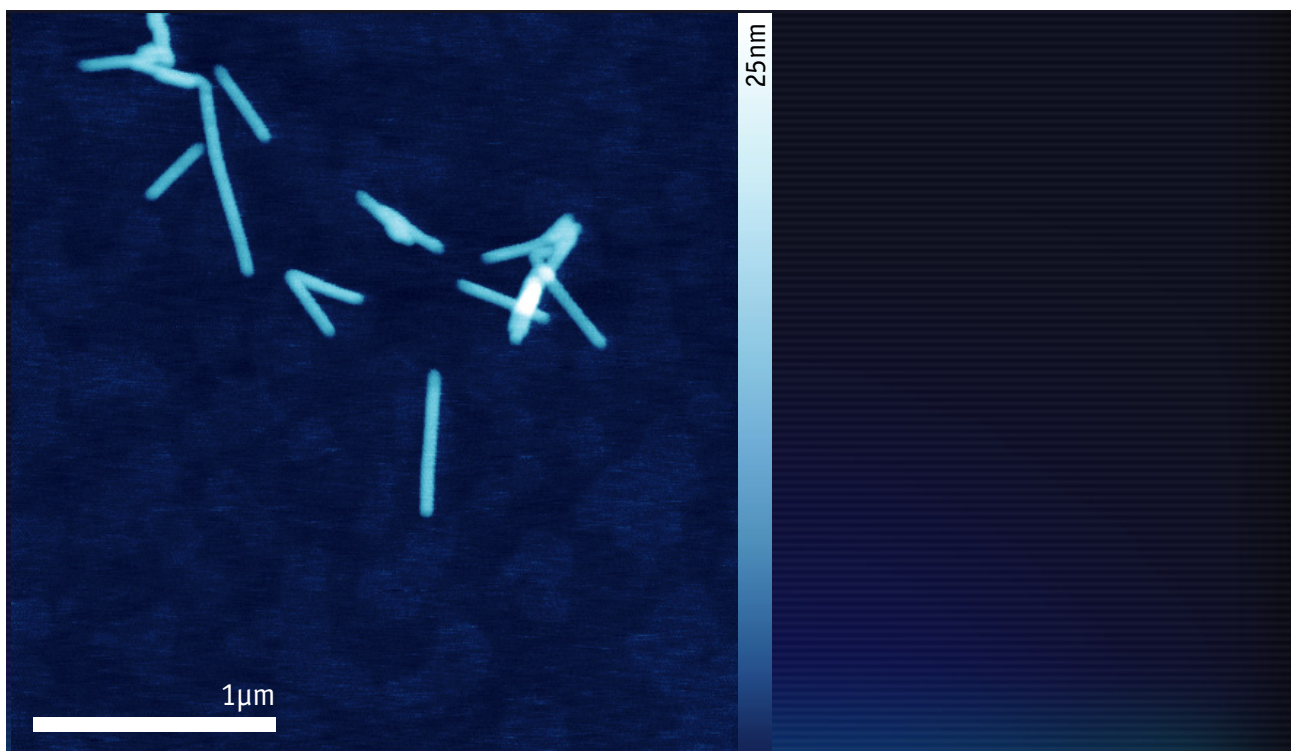


Abbildung 4.1: Rasterkraftaufnahme von Tabakmosaikviren.

Das Besondere ist seine helikale Struktur, in der sich 2130 identische Hüllproteine spiralförmig zu einem Hohlzylinder, dem Kapsid, anordnen [39]. Diese Struktur verleiht dem Virus eine hohe Stabilität. Innerhalb des spiralförmigen Grundgerüsts lagern sich weitere Proteine an, die für die Funktionsweise des Virus nötig sind, was im Inneren einen Hohlraum von ~4 nm lässt. Auf Abbildung 4.2 ist die Anordnung der einzelnen Hüllproteine sowie ein Querschnitt durch das Virus gezeigt.



*Abbildung 4.2: Visualisierung der Struktur und des Aufbaus eines Tabakmosaikvirus. Die Hüllkapside sind helikal angeordnet und zur Anschauung abwechselnd eingefärbt.*

Seine Stabilität, regelmäßige Struktur und seine Zusammensetzung durch Selbstassemblierung machen das Tabakmosaikvirus zu einem vielversprechenden Kandidaten für Nanoengineering. Durch Biomineralisierung können anorganische Materialien an organische Moleküle gebunden werden. Demonstriert wurde dies beim Tabakmosaikvirus mit Au, Pt, Pd, Ni, Co und Cu, zudem mit weiteren Verbindungen wie ZnS, CdS oder SiO<sub>2</sub> [40] und anderen Anhängen wie Proteinen, Antikörpern oder Kontrastmitteln [41].

Ein Nanostäbchen aus den erwähnten Materialien bietet eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten, wie beispielsweise biologische Sensoranwendungen, Batterien und Datenspeicher [40].

Besonders eine Anlagerung von ZnO mit seinen halbleitenden Eigenschaften an das Grundgerüst des Virus eröffnet eine mögliche Verwendung als Feldeffekttransistor [40].

Es wurde demonstriert wie sich in die genetische Sequenz der Kapsidproteine eine Lysin- oder Cystein-Aminosäure

eingefügen lässt [41]. An diese lässt sich beispielsweise über Maleimid- oder NHS-Ester-Gruppen beliebige weitere chemische Funktionalitäten hinzufügen.

Zudem stellen die Viren durch ihre klare Struktur und ihre robuste Handhabung ein geeignetes Testsystem für einführende nahfeldmikroskopische Untersuchungen dar.

## 4.2 Desmin und seine Rolle im Herzmuskel

Desmin ( $\delta\epsilon\sigma\mu\acute{o}\varsigma$ , *desmós* „Verbindung, Kette“) ist ein Typ III Intermediärfilament, welches in der menschlichen Skelett- und der glatten Muskulatur und vor allem in Herzmuskelzellen exprimiert wird. Besonders in letzteren spielt es eine wichtige Rolle, indem es die Myofibrillen und die Z-Scheiben innerhalb der Zellen miteinander verbindet und somit integral für die strukturelle Stabilität der Zelle ist [42].

Außerdem ist es durch die Bindung zu den Desmosomen, Verbindungselemente zwischen Herzmuskelzellen, am intrazellulären Zusammenhalt beteiligt.

Als Intermediärfilament liegen die Desminfilamente mit ihrem Durchmesser von  $\sim 10$  nm zwischen den anderen in Zellen auftretenden Filamenttypen: den Mikrofilamenten von  $\sim 7$  nm und den Mikrotubuli mit  $\sim 25$  nm.

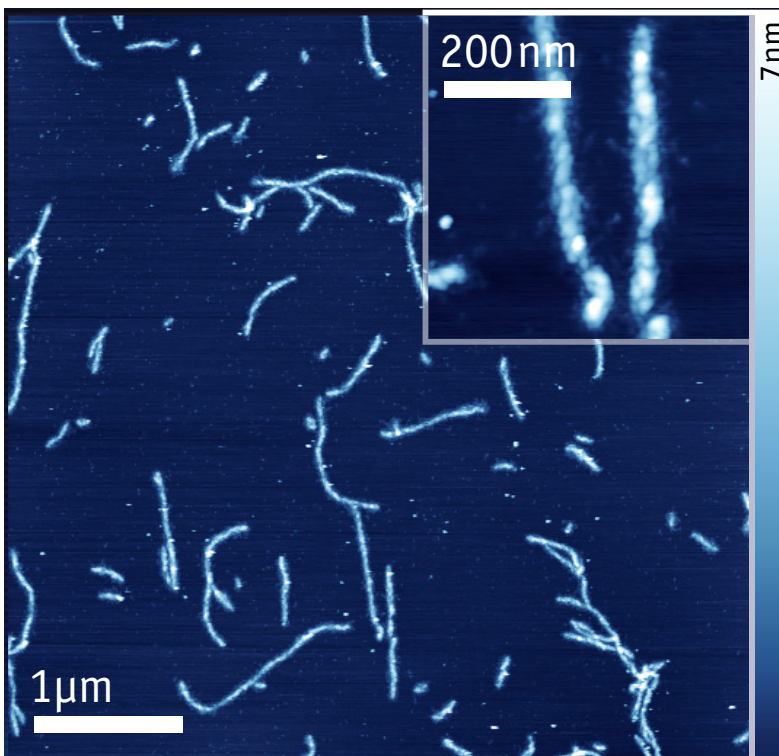


Abbildung 4.3: Rasterkraftaufnahme (Multimode) von Desmin-Wildtyp-Filamenten. Die länglichen Strukturen sind deutlich zu erkennen. Aufnahme: Mareike Dieding [45].

Das Desminprotein ist Gegenstand aktueller Forschungen, da zahlreiche Mutationen des Desmin-Gens mit verschiedenen Formen der Kardiomyopathie in Verbindung gebracht werden [43, 44].

Der Oberbegriff *Kardiomyopathie* bezeichnet eine Sammlung von Erkrankungen des Herzmuskels. Je nach betroffenem Bereich lässt sich diese Zuordnung weiter unterteilen.

So tritt beispielsweise die *Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie* (ARVC) auf, bei der es besonders im rechten Ventrikel zu einer Degeneration des Muskelgewebes und anschließender Ersetzung mit Fett- und Bindegewebe kommt, was schließlich zum plötzlichen Versagen des Muskels und infolgedessen zum Tod führt. Ähnlich führt die *Dilatative Kardiomyopathie* (DCM) bei der linken Herzkammer zu Dilatation und Gewebsdegenerationen, was ebenso eine verminderte Herzmuskelfunktion zur Folge hat [46].

Die Versuchsreihen dieser Arbeit umfassen im Besonderen die Desmin-Mutation L136P, welche mit DCM in Verbindung gebracht wird [47], sowie H326R, welche bei Patienten mit ARVC gefunden wurde [46].

Bei den hier behandelten Mutationen handelt es sich um sogenannte Punktmutationen. Das bedeutet konkret, dass im Fall der Mutation L136P in der Aminosäuresequenz des Desmins an der Stelle 136 die normalerweise auftretende Aminosäure Leucin (L) mit Prolin (P) ersetzt ist, sowie es bei der Mutante H326R zu einer Substitution des Histidins (H) an der 326. Stelle gegen Arginin (R) kommt.

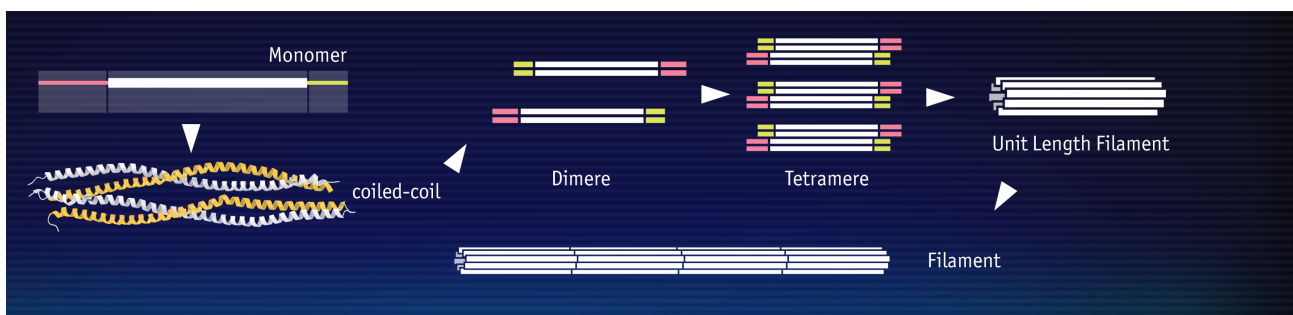


**Abbildung 4.4:** Die Positionen der beiden untersuchten Mutationen in der Aminosäuresequenz des Desmins. Ebenfalls eingezeichnet ist die Position des Cysteins, an welches der Farbstoff angebunden wird.

An der Stelle 333 der Aminosäuresequenz besitzt das Desmin-Protein eine Cysteingruppe, wodurch später über die Thiol-Gruppe der Farbstoff Atto740-maleimide angebunden werden kann (vgl. Mechanismus in Abschnitt 6.2) [48].

Die Strukturdaten des Desmin-Proteins, sowie dessen Assemblierungsprozess werden vom Intermediärfilament Vimentin hergeleitet, welches besser erforscht ist und dem Desmin als sehr ähnlich angenommen wird, da es eine vergleichbare Aminosäuresequenz besitzt. [49].

Ein einzelnes Desminmonomer lässt sich in drei Segmente unterteilen, von denen sich das mittlere und größte, der Mittelteil, nochmal in vier Domänen unterteilen lässt, die jeweils Form einer ausgedehnten  $\alpha$ -Helix annehmen. Abgeschlossen wird es von einem Kopf- und einem Schwanz-Segment, die jeweils eine globuläre Struktur aufweisen.



**Abbildung 4.5: Assemblierungsmodell von Desminfilamenten, gemäß [50].**

In Abbildung 4.5 sind die Schritte der Assemblierung dargestellt. Bei der Assemblierung lagert sich zunächst ein einzelnes Desmin-Protein, oder Monomer, antiparallel mit einem weiteren zu einem Dimer zusammen. Zwei Dimere verbinden sich zu einem Tetramer, welche wiederum zu acht ein *unit length filament* (ULF) mit einer Länge von ca. 60 nm bilden. Im letzten Schritt lagern sich diese longitudinal zum endgültigen Filament zusammen [49, 51].

Da die genaue Beteiligung und Auswirkung der Desmin-Mutationen im Assemblierungsprozess noch unklar ist, ist die Absicht hinter der Versuchsreihe diesen Sachverhalt genauer zu erforschen. Dazu werden lediglich die mutierten Proteine vor der Assemblierung mit Fluoreszenzmarkern gekennzeichnet, um sie auf diese Weise später in der assemblierten Superstruktur mit dem Nahfeldmikroskop identifizieren zu können. Dadurch soll der Einfluss der verschiedenen untersuchten Mutationen auf die Filamentbildung beurteilt werden.

# 5 Methode

Grundlage für die in dieser Arbeit angewandte optische Raster-Nahfeldmikroskopie ist die Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy, AFM*), da hierbei im Wesentlichen die topographische Erfassung der AFM zusätzlich mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden erweitert wird. Daher soll im Folgenden zunächst die Rasterkraftmikroskopie einführend erläutert werden.

## 5.1 Rasterkraftmikroskopie

Als Erweiterung der Tunnelmikroskopie wurde 1986 von Gerd Binnig die Rasterkraftmikroskopie entwickelt [52]. Diese ist nicht von leitenden Proben abhängig und kann auch in wässrigen Umgebungen betrieben werden kann, was für biologische Proben vorteilhaft ist [53]. Im Wesentlichen wird dabei eine zu untersuchende Oberfläche mit einem mechanischen Sensor abgetastet und die topographischen Informationen aufgenommen. Hierbei sind verschiedene Kräfte zu berücksichtigen, die in bestimmten Entfernungshängen auf ein Objekt sehr nahe an der Oberfläche wirken.

Als Sonde zum Abtasten dient dabei ein Cantilever, ein elastischer Federbalken, an dessen Ende sich eine möglichst scharfe Spitze befindet. Nahe an der Oberfläche erfährt die Sensorspitze eine anziehende Kraft. Dafür verantwortlich sind van-der-Waals-Kräfte, bei denen es sich um elektrostatische Anziehungen durch gegenseitig induzierte Ladungsverchiebungen handelt.

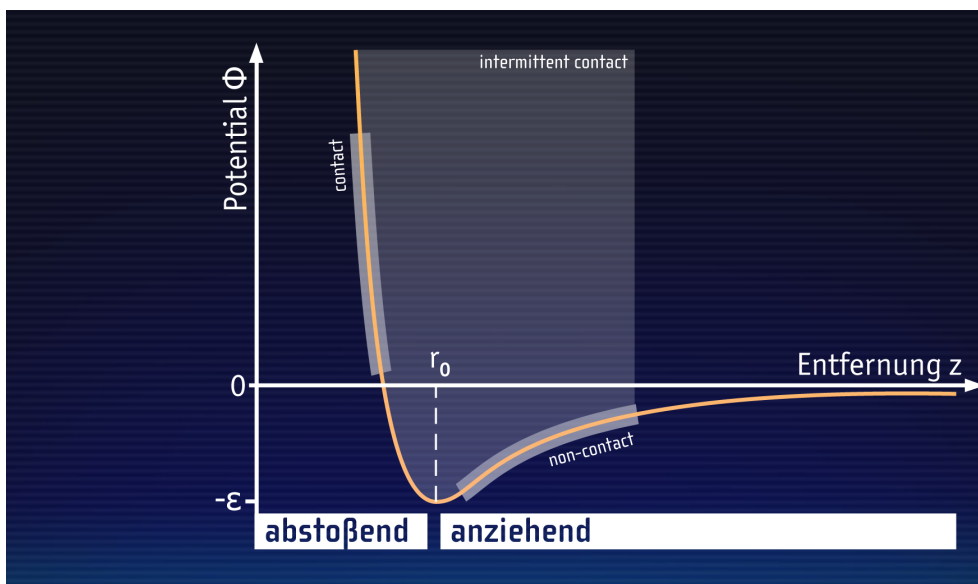
Noch dichter an der Oberfläche gewinnt jedoch eine abstoßende Kraft Oberhand, wenn sich die Elektronenorbitale der beteiligten Körper zu überlappen beginnen. Diese leitet sich maßgeblich aus zwei Einflüssen her: der Coulomb-Abstoßung, welche die elektrostatische Abstoßung gleicher elektrischer Ladungen beschreibt, und der Pauli-Abstoßung, welche aus dem Verbot gleicher Elektronenkonfiguration des Pauli-Prinzips resultiert.

Zusammenfassend beschrieben wird das Potential, das nahe Oberflächen wirkt, durch das Lennard-Jones-Potential [54]:

$$\Phi(z) = 4\varepsilon \left[ \left(\frac{\sigma}{z}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{z}\right)^6 \right]$$

5.1

Der anziehende Anteil wird durch die Term  $z^{-6}$  repräsentiert, der unterhalb einer bestimmten Entfernung von dem abstoßenden Anteil mit der Potenz -12 übertroffen wird. Das Potential hat ein Minimum an der Stelle, an der sich die beiden Kräfte gegenseitig aufheben.



**Abbildung 5.1:** Das Lennard-Jones-Potential zeigt die Kräfteinwirkung auf ein Objekt nahe einer Oberfläche. In größerer Entfernung überwiegt der anziehende Kraftanteil, weiter zur Oberfläche hin ist die abstoßende Kraft vorherrschend. Eingezeichnet sind die Bereiche, in denen die verschiedenen AFM-Betriebsmodi operieren.

Um die Höheninformation aus der Wechselwirkung des Cantilevers mit der Oberfläche auszulesen, lassen sich verschiedene Betriebsmodi anwenden. Diese unterscheiden sich darin, wie der Cantilever in Kontakt mit der Probe tritt. Im *Kontakt-Modus* tritt die Spitze in direkten mechanischen Kontakt mit der Oberfläche. Die Oberflächenkräfte wirken sich auf die Auslenkung der Spitze aus: Je nach Entfernung wirken anziehende oder abstoßende Kräfte und der Federarm wird entsprechend ausgelenkt. Das Funktionsprinzip ist in Abbildung 5.2 illustriert.



Abbildung 5.2: Je nach Auslenkung des Cantilevers wird Licht in einen anderen Teil der Quadrantenodiode reflektiert.

Die Spitze verfügt über eine reflektive Oberfläche, durch die ein Laserstrahl in eine Photodiode reflektiert wird. Diese ist in vier Bereiche geteilt, durch Vergleich der jeweils einfallenden Intensitäten kann der Winkel der Auslenkung errechnet werden. Erst im Kontakt mit der Oberfläche wird die Spitze über einen Ausschnitt der Oberfläche gerastet. Linie für Linie wird die Höheninformation aufgenommen und ein topologisches Profil erstellt. Dabei ist noch zwischen zwei Unterarten des Kontakt-Modus zu unterscheiden:

Das simpelste Verfahren ist der *constant height* Modus. Dabei wird die Spitze in unveränderlichem Abstand zur Probe über selbige gefahren und über die Auslenkung und damit die Wirkung auf die Spitze direkt der Abstand zur Oberfläche gefolgert. Dieser Modus hat allerdings einige Nachteile, da durch Strukturen, die einen höheren Abstand zur Spitze haben, der Kontakt verloren gehen kann, und durch Strukturen, die zu hoch sind, die Spitze hingegen auflaufen und zerstört wird.

Wird die Position des Cantilevers hingegen nachgeregelt, sodass dieser immer im Abstand der geringsten Kraft über der Probe ist, so wird dies als *constant force* Modus bezeichnet. Auch dieser Modus hat Nachteile. Die Aufnahmegeschwindigkeit ist durch die begrenzte Regelgeschwindigkeit des Regelkreises eingeschränkt, und der Cantilever kann trotzdem durch hohe Strukturen beschädigt werden.

Gebräuchlicher ist allerdings der *dynamische Modus*, bei dem der Cantilever nahe seiner Resonanzfrequenz zum Schwingen angeregt wird. In Wechselwirkung mit dem Oberflächenpotential können je nach Regelung verschiedene Wirkungen auftreten. Je nach Entfernung ändert sich die Resonanzfrequenz des Cantilevers und die Höheninformation kann



durch die Modulation der Frequenz, der Phase oder der Amplitude extrahiert werden. Von diesen ist die Amplitudenmodulation die gängigste Methode, die durch ihren Entwickler Digital Instruments auch tapping™-Modus genannt wird.

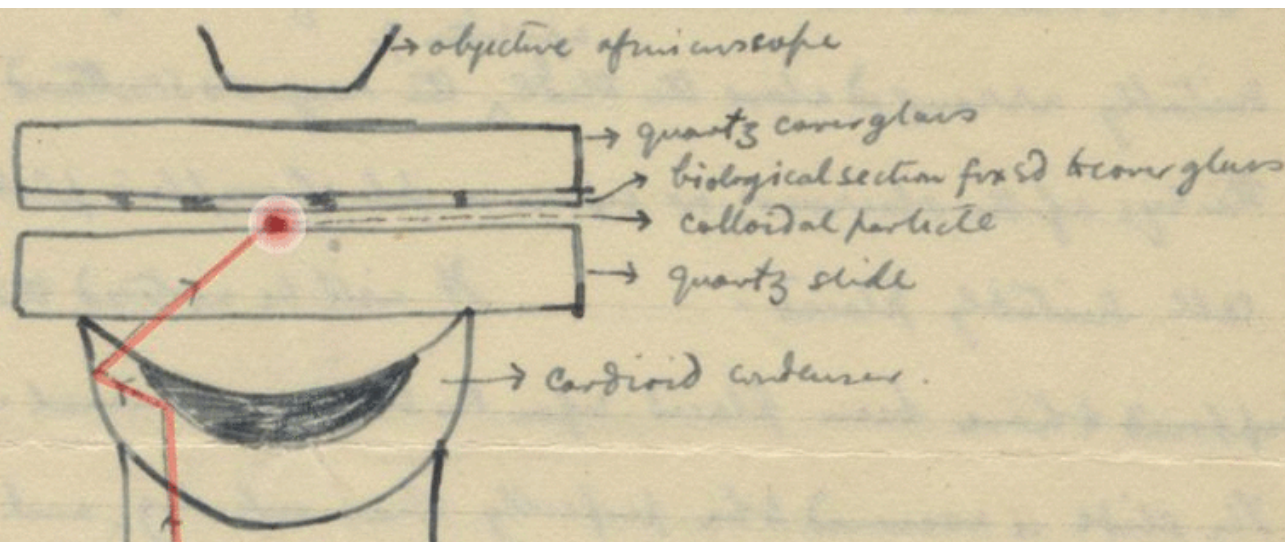
Da die Anregungsfrequenz konstant gehalten wird, ist die Folge eine Verringerung der Schwingungsamplitude. Über das Nachregelsignal kann die Höheninformation der Probe aufgenommen werden, während die Höhe des Cantilevers angepasst wird. Durch das vorsichtige Tasten der Spitze auf die Probe stehen diese nur in geringem direkten Kontakt und die Spitze erfährt eine geringere mechanische Belastung als durch die Kontakt-Verfahren. Darum wird dies auch als *intermittent contact* Modus bezeichnet [54].

Die Schwingungsanregung erfolgt idealerweise nicht genau in der Resonanzfrequenz, sondern leicht versetzt, da sich hier die Verschiebung der Resonanz in einer stärkeren Amplitudenänderung auswirkt.

## 5.2 Optische Nahfeldmikroskopie

Dieses Verfahren geht auf Edward Hutchinson Synge zurück, der 1928 zum ersten Mal die Idee entwickelte, eine Probe mittels einer Lichtquelle mit kleineren Ausdehnungen als die Wellenlänge des verwendeten Lichts zu beleuchten [25, 55]. Hierbei entwarf er auch erstmals das Konzept des Rasternscannens [56], welches den verschiedenen Rastermikroskopiemethoden zugrunde liegt. Synge wendete sich mit seiner Idee an Einstein, der dieses Konzept für wenig erfolgversprechend hielt, ihm aber trotzdem - oder vielmehr deswegen - zu einer Veröffentlichung riet [25].

Synge war sich bewusst, dass seine Idee zunächst reine Theorie war und bis dahin noch nicht praktisch umsetzbar wäre. Erst 1982 lies IBM ein erstes Patent in diese Richtung anmelden und 1984 schließlich erfolgte die erste Veröffentlichung eines Experiments durch Denk und Pohl [68].



**Abbildung 5.3:** Eine von Syngge angefertigte erste Skizze des Prinzips der Nahfeldmikroskopie durch Streuung. Schon Einstein bemängelte die unleserliche Handschrift Syngges [25, 56]. (Eigentum des Albert Einstein Archivs, Hebrew University of Jerusalem, Israel.)

Diese verwendeten in ihren Untersuchungen zunächst ausschließlich das Prinzip kleiner Öffnungen. Dazu wird Licht durch eine Glasfaser geleitet, welche am Ende durch eine sehr schmale Öffnung abgeschlossen wird, die schmäler als die Wellenlänge des Lichts ist. Auf diese Weise wird eine Lichtquelle im Nahfeld mit sehr kleinen Ausmaßen geschaffen, mit der Proben beleuchtet werden können, sofern sie in sehr geringer Entfernung zu selbiger sind. Das Verfahren kann auch umgekehrt angewandt werden: Eine Probe wird normal beleuchtet, die Glasfaserspitze sammelt das Nahfeldlicht an der Oberfläche auf und leitet es an einen Sensor weiter.

Um die für solche Messungen nötigen feinen Spitzen herzustellen, gibt es verschiedenen Methoden: So können beispielsweise Glasfasern erhitzt und gezogen werden oder ein schmaler Faserdurchmesser wird durch chemisches Ätzen erreicht. Anschließend wird die Spitze metallbedampft. Auch zur Herstellung sehr feiner Öffnungen, bestehen unterschiedliche Möglichkeiten, beispielsweise durch mechanisches Abtrennen oder Ionenstrahlätzung [22].

Obwohl die Handhabung dieser Apertur-Faserspitzen relativ einfach ist und die Eigenschaften des eingekoppelten Lichts, wie beispielsweise die Polarisation, gut kontrolliert werden können [22], so gibt es doch einige grundlegende Nachteile. Aufgrund der kleinen Öffnung ist die Lichtstärke stark begrenzt, sodass diese nur ein schwaches Signal-Rausch-Verhältnis liefert [26].

Die Transmission fällt mit der vierten Potenz des Radius ab [31]:

$$T \propto \left(\frac{r}{\lambda_0}\right)^4$$

5.2

Um das zu kompensieren kann mehr Licht durch die Spitze geschickt werden, wodurch sich allerdings die Metallschicht zu sehr erhitzt und eventuell zerstört wird. Vergrößert man aber den Öffnungsdurchmesser, dann geht dies wieder auf Kosten der optischen Auflösung [57]. Zusätzlich ist durch die hohe Breite der Faserspitze die topographische Auflösung begrenzt.

Später wurde das Konzept der *aperturlosen* Nahfeldmikroskopie eingeführt, auch spitzenverstärkte oder streuende Nahfeldmikroskopie genannt. Die Namen rühren daher, dass hier die Auflösung nicht mehr durch die Öffnungsdurchmesser beschränkt ist, sondern das Licht an der Spitze gestreut wird und die erreichbare Auflösung im Wesentlichen nur durch die Spitzengeometrie festgelegt wird [25].

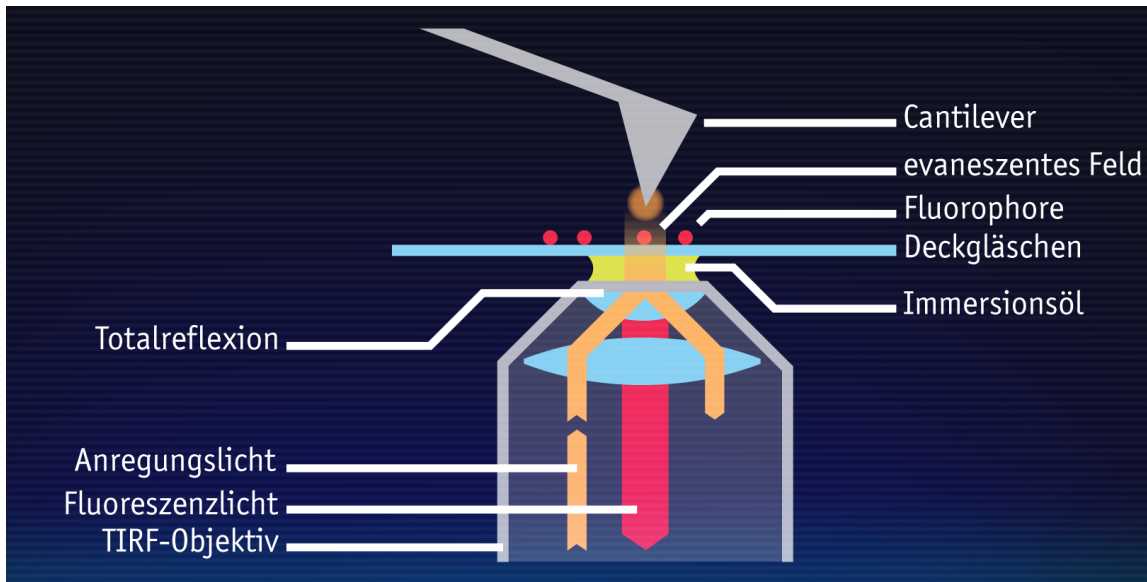
Ein großer Vorteil gegenüber den Aperturspitzen ist, dass hierbei herkömmliche AFM-Cantilever verwendet werden können, die sich in Massenproduktion kostengünstig fertigen lassen und vor allem eine gleichmäßige Qualität liefern [22]. Ein Nachteil des Verfahrens der Streuung ist wiederum, dass aufgrund hoher Hintergrundstrahlung keine direkte Detektion eines nutzbaren Signals möglich ist, weswegen weitere aufwendige Maßnahmen zur Extraktion der gewünschten Information getroffen werden müssen [23, 24, 58].

Die speziellen Eigenschaften der optischen Nahfeldtechnik eröffnen verschiedene spezialisierte Anwendungsmöglichkeiten, die im Folgenden kurz ausgeführt werden sollen. Die naheliegendste Anwendung ist die Untersuchung der optischen Oberflächenstrukturen einer Probe. Analog zur normalen Lichtmikroskopie wird untersucht, wie Oberflächen auf einfallendes Licht reagieren, was grundsätzlich durch das dielektrische Verhalten des Materials bestimmt wird. Durch gleichzeitig entstehendes Hintergrundstreulicht sind allerdings weitere Maßnahmen zur Filterung nötig [23].

Üblicherweise wird hierzu eine interferometrische Detektion im homodynem oder heterodynem Aufbau verwendet. Im Wesentlichen wird dabei das beleuchtende Licht moduliert und ein Referenzstrahl vor der Beleuchtung der Probe abgegriffen. Anschließend werden beide Einzelstrahlen überlagert und auf diese Weise die erwünschte Information gewonnen.

Da die Analyse der optischen Wechselwirkung auf dem dielektrischen Verhalten des Materials basiert, bieten sich als weitere Anwendungsmöglichkeit besonders die Untersuchung von Halbleiterstrukturen an [16, 24, 36]. Außerdem können durch speziell geformte Antennen oder Nanopartikel an der Spitze, die als Emitter des Nahfelds dienen, präzise optische Eigenschaften beeinflusst und konstruiert werden [23, 59]. Auch für die Raman-Spektroskopie, bei der inelastische Streuung des eingestrahlten Lichts untersucht wird, liefert die Nahfeldmikroskopie eine Erhöhung der erreichbaren Auflösung [11, 22]. Und auch die Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie kann durch die Nahfeldanregung verbessert werden. Da hier die Lebensdauern der angeregten Fluoreszenzzustände von der chemischen Umgebung beeinflusst werden, kann diese besonders im zellbiologischen Bereich Erkenntnisse über biochemische Funktionswege liefern [11, 36]. Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Fluoreszenzmikroskopie, bei der über die Fluoreszenzemission die räumlichen Anordnungen von angeregten Farbstoffen untersucht werden soll. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass durch die Verwendung von evanescentem Licht als Fluoreszenzanregung keine aufwendige Filterung von Hintergrundstreulicht nötig ist. Zusätzlich liefert diese Methode neben der Fluorophorverteilung als weitere Datenreihe die Topographie der Probe, welche überlagert werden können und somit einen weiteren Mehrwert an Informationen liefert.

Durch diese Vorzüge liegt die Fluoreszenzdetektion mittels aperturloser optischer Nahfeldmikroskopie im Fokus dieser Arbeit und soll in den folgenden Abschnitten nochmal Gegenstand genauerer Betrachtung sein.



**Abbildung 5.4:** Das zentrale Funktionsprinzip, bei dem durch ein evaneszentes Feld Farbstoffe zum leuchten angeregt werden und gleichzeitig eine Feldüberhöhung an einer feinen Spitze erzeugt wird.

Abbildung 5.4 zeigt das Grundprinzip des hier verwendeten Aufbaus. Dabei wird ein Farbstoffmolekül von unten zum Leuchten angeregt. Oberhalb der Probe befindet sich die schwingende Cantileverspitze, an der sich durch die Beleuchtung ein starkes Nahfeld ausbildet. Erreicht die Spitze den unteren Scheitelpunkt der Schwingung, verursacht dies verstärkte Fluoreszenzemissionen des Moleküls. Durch dieses Verfahren lassen sich einzelne emittierende Moleküle in der Probe sichtbar machen.

Zentrale Bedeutung für das hohe Auflösungsvermögen des Rasternahfeldmikroskops hat neben der bereits erläuterten Fluoreszenzverstärkung auch die Rasterbewegung.

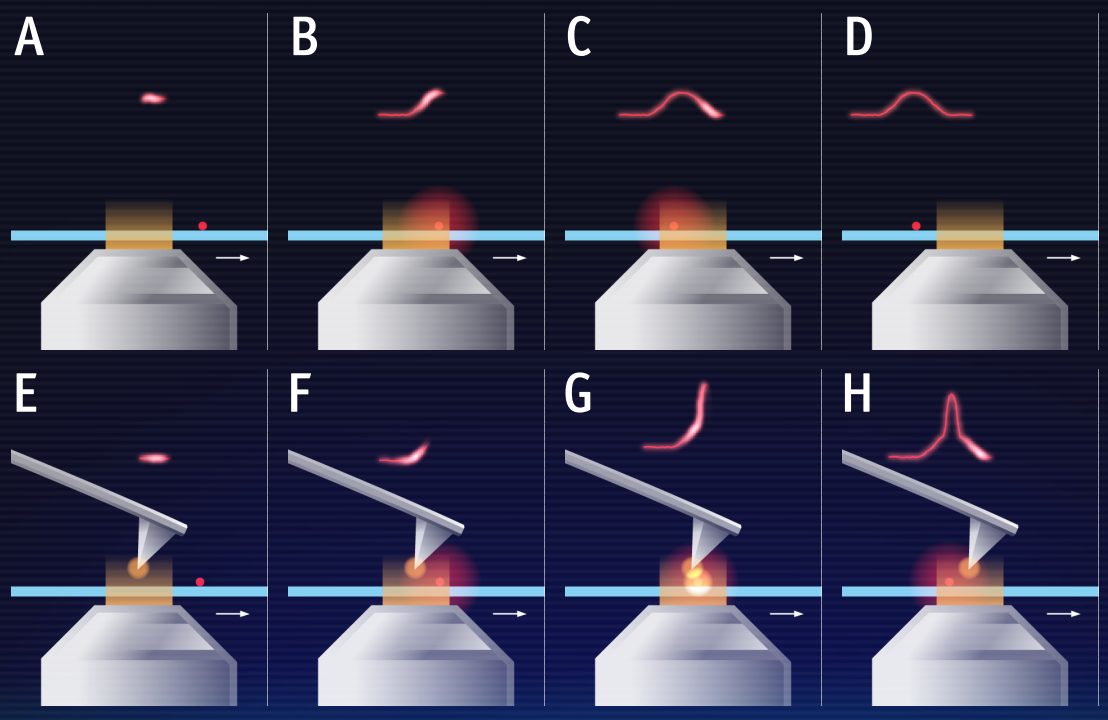
Wie bereits im Kapitel 2.2 erläutert weiten sich Lichtquellen bei mikroskopischer Abbildung durch Beugungseffekte auf. Punktförmige Lichtquellen werden dabei mit einer Punktspreizfunktion multipliziert, sie nehmen die Form von Beugungsscheibchen an. Auf eine ganze abgerasterte Fläche bezogen findet hier mathematisch eine Faltung der Fluorophorverteilung auf der Probe mit dem Faltungskern, der einen (oder mehreren) Punktspreizfunktion, statt.

Der hier vorliegende Aufbau weist Ähnlichkeiten zu einem Konfokalmikroskop auf: So wird nur ein kleiner Bereich nahe der Oberfläche beleuchtet. Die fluoreszenten Farbstoffe werden also mittels gewöhnlicher Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen, was idealerweise einem Peak mit einer Halbwertsbreite gemäß Formel 2.6 von  $\sim 300$  nm bei einer

Wellenlänge von 790 nm entspricht. Jedoch fehlt hier die zusätzliche Blende der Konfokalmikroskopie. Diese ist nicht nötig, da die Aufnahme der herkömmlichen Fernfeld-Peaks eine technische Notwendigkeit ist, die selbst keinen Beitrag zu der erwünschten Subwellenlängenauflösung liefert und später herausgefiltert wird.

Das eigentliche technische Prinzip der Nahfeldmikroskopie ist allerdings eine Modulation des lokalen Feldes durch die Sensorspitze, die nicht der Beugungs-Punktspreizfunktionen unterliegt. Eine Nahfeldlichtquelle hat Ausdehnung weit unterhalb der Wellenlänge des verwendeten Lichts. Sie ist stark an der Oberfläche der Streusonde lokalisiert. Deswegen ist ihre räumliche Ausdehnung nur von der Geometrie der Cantileverspitze abhängig, und die Abbildungen der Fluorophore dementsprechend eine Multiplikation/Faltung mit der Spitzengeometrie. Dementsprechend ist die Auflösung höher, je schärfer die Streuspitze geformt ist.

Im Nachfolgenden Abschnitt folgt anhand von Abbildung 5.5 eine anschauliche schrittweise Erklärung, die den Prozess der Bildentstehung durch mathematische Faltung mittels Rasterbewegung und der verschiedenen Belichtungsquellen erläutern soll.



**Abbildung 5.5:** Schrittweise Erläuterung des Prinzips, wie durch die Scanbewegung eine hohe Auflösung erreicht wird. Das Objektiv fährt dabei nach rechts an der Probe entlang. Obere Reihe: Ohne Nahfeldeinwirkung. Untere Reihe: Mit Cantilever und entsprechender Feldüberhöhung.

Sequenz A-D: Bild A zeigt ein Fluorophor, welches im Pfad des Objektivs liegt. Sobald das Fluorophor in das evaneszente Beleuchtungsvolumen des TIRF-Objektivs kommt, wird dieses angeregt und fängt an Licht zu emittieren (B). Die Emission wird ebenfalls gleich vom Objektiv aufgenommen und detektiert. In Bild D ist ein typischer Fernfeld-Fluoreszenzpeak zu sehen. Diese Funktionsweise entspricht im Wesentlichen einem herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop und bildet das Fluorophor mit einer Auflösung von  $\sim 300$  nm ab.

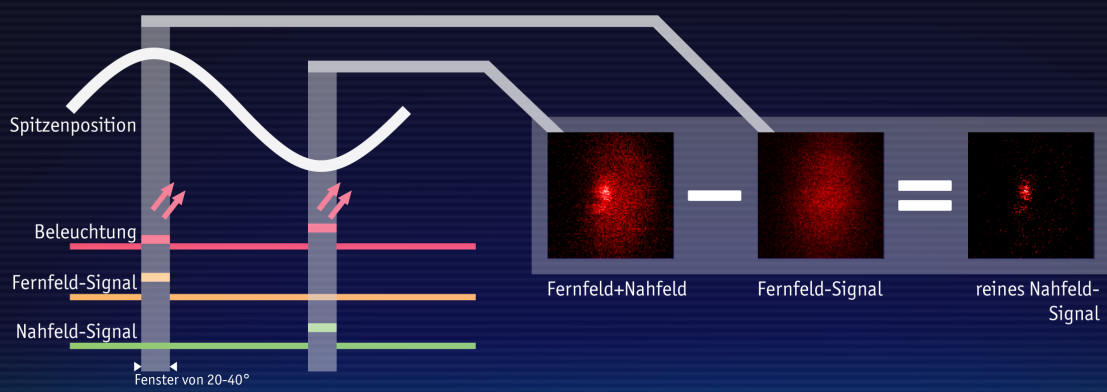
Sequenz E-H: Bild E zeigt den gleichen Prozess, diesmal in Anwesenheit der Cantileverspitze. Sobald der Farbstoff in das Anregungsvolumen des Objektivs kommt, findet die gleiche Fluoreszenzanregung und Detektion durch das Objektiv statt (F). Das Fluorophor befindet sich allerdings noch nicht innerhalb der Reichweite des Nahfeldes. Erst ab einer Entfernung bestimmter Nähe zur Spitze erfährt es den Einfluss des Nahfeldes (G). Dieser Einfluss äußert sich durch eine starke Verstärkung der Fluoreszenzemission. Diese findet allerdings nur im kurzen Einflussbereich des Nahfeldes statt, aufgrund dessen starker räumlicher Lokalisation. Resultat ist ein kurzer Peak, dessen Breite der Ausdehnung des Nahfeldes an der Spitze des Cantilevers entspricht. Die reguläre Fernfeldanregung durch die Probenbeleuchtung findet noch weiterhin statt, auch wenn der Farbstoff den Bereich der Spitze wieder verlassen hat (H).

Dies verdeutlicht auch, wie die erreichbare Auflösung, also wie breit die Emissionspeaks dargestellt werden, von der Geometrie der Spitze abhängt, da diese maßgeblichen Einfluss auf die Ausprägung und Ausdehnung des Nahfeldes hat.

Da bei dem vorliegenden Verfahren neben der intensiveren Nahfeldfluoreszenz trotzdem die herkömmliche Fluoreszenz mit aufgenommen wird, ist - zwar keine komplizierte Filterung durch einen interferometrischen Aufbau, aber dennoch - eine Bildverarbeitung nötig. Das Intensitätssignal wird aufgenommen, wenn der Cantilever in seinem Schwingungszyklus der Oberfläche am nächsten ist, da an diesem Punkt auch der Effekt der Fluoreszenzverstärkung am stärksten ist, wie Abbildung 5.6 zeigt. Die durch das Nahfeld angeregte und stark lokalisierte Fluoreszenz ist überlagert mit der Hintergrundfluoreszenz, die durch die evaneszente Beleuchtung im ganzen Aufnahmevolumen des Objektivs verursacht wird. Entsprechend wird also jeder lokalisierte

Nahfeld-Peak überlagert von einem breiten Fernfeld-Peak, welcher dem normalen Auflösungslimit unterliegt.

Um diesen in der endgültigen Aufnahme herauszufiltern, wird ein weiteres Bild aufgenommen. Dies geschieht wenn sich der Cantilever am oberen Scheitelpunkt der Oszillation befindet und damit der Einfluss des Nahfeldes möglichst minimal ist. Dieses Bild zeigt nur die Fernfeldpeaks. Da der Einfluss der evaneszenten Beleuchtung auf die Fluorophore immer gleich stark ist, liegen auch in beiden aufgenommenen Bildern die Fernfeld-Peaks in gleicher Intensität vor.



**Abbildung 5.6:** Der Schwingungszyklus des Cantilevers und die Positionen, an welchen die Signale aufgenommen werden (links), und die Subtraktion der beiden aufgenommenen Bilder (rechts).

Um das Nahfeldsignal herauszufiltern, ist folglich eine einfache Subtraktion des reinen Fernfeldbildes von dem Gesamtbild nötig [21]. Damit liegt das bloße Nahfeldsignal vor und prinzipiell ist keine weitere Filterung nötig. Es ist allerdings möglich noch weitere mathematische Transformationen und Filterungen durchzuführen, um das Hintergrundrauschen zu verringern und die Peaks deutlicher hervorzuheben. Dazu werden in einer Fouriertransformation die hohen und besonders regelmäßigen Frequenzen aus der Aufnahme entfernt. Dies kann sowohl mit dem Fluoreszenzbild als auch mit der Topographie gemacht werden.

Alle in dieser Arbeit dargestellten und für die Berechnungen verwendeten Schnittprofile sind mathematisch nicht nachbearbeitet, bei allen abgebildeten Aufnahmen erfolgte eine nachträgliche Filterung.



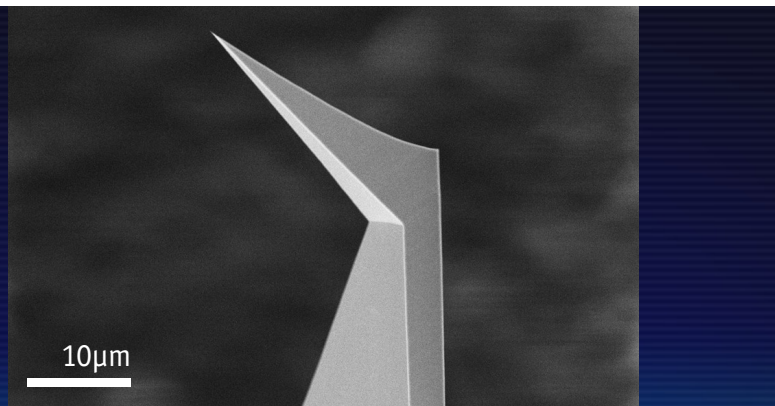
# 6 Aufbau und Durchführung

## 6.1 Versuchsaufbau

Für die Ansteuerung des AFMs wird ein handelsübliches Rastersondenmikroskopie-Controllersystem (Nanonis OC4, Specs, Zürich, Schweiz) verwendet, welches die Anregung des Cantilevers, sowie die Steuerung der vertikalen Position im tapping-Modus kontrolliert. Die flächige Probe wird linienweise abgerastert und das topographische sowie das Fluoreszenzsignal ausgelesen und von der zugehörigen Software zu einem Gesamtbild zusammengesetzt.

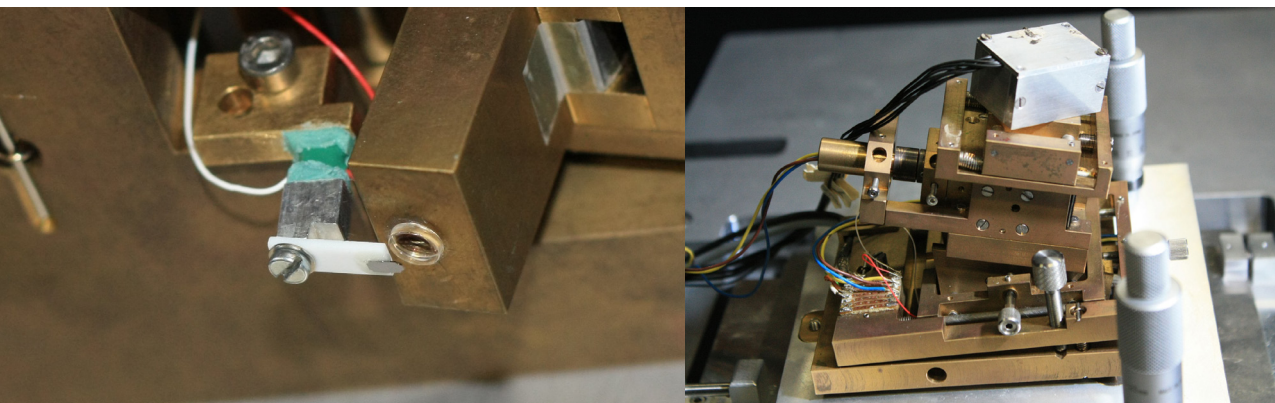
Technisch gesehen wird nicht die Spitze über die Probe gerastert, sondern die Probe wird unter der Sonde, beziehungsweise zwischen Sonde und Objektiv, bewegt, was den Vorteil hat, so mit wenig Aufwand die Beleuchtung der Spitze und damit das sich ausbildende Nahfeld in konstantem Bezug zueinander halten zu können.

Für die Scanbewegung der Probe befindet sich diese auf einem piezomechanischen Tisch (P-733.3DD, Physik Instrumente, Karlsruhe), welcher mit einer Genauigkeit von 0,1 nm bewegt werden kann. Für eine gröbere Positionierung des Messkopfes über der Probe ist diese noch auf einem motorisierten Positionierungstisch (SCAN IM 112x74, Märzhäuser, Wetzlar) montiert, der unabhängig von dem Piezotisch bewegt werden kann. Bei dem Messkopf, in dem sich die Auslenkungsdetektion des Cantilevers befindet, handelt es sich um einen Eigenbau [60]. Die Auslenkung wird mittels einer Laserdiode (RLT904-30MG,  $\lambda = 904 \text{ nm}$ , 30 mW, Roithner Lasertechnik, Wien, Österreich) und eines Quadrantsensors (QD7-5 (R&S 652 027), Anatec Instruments, Oelsnitz (V)) gemessen. Als Messsonden werden Cantilever des Modells ATEC (*Advanced Tip at the End of the Cantilever™* Non Contact, Nanosensors, Neuchatel, Schweiz) aus Silizium verwendet. Das Besondere hierbei ist die spezielle Form, bei der die Spitze gegenüber dem Trägerarm nach vorne geneigt ist. Dies stellt eine große Erleichterung bei der Ausrichtung der Spitze in das anregende Lichtfeld dar.



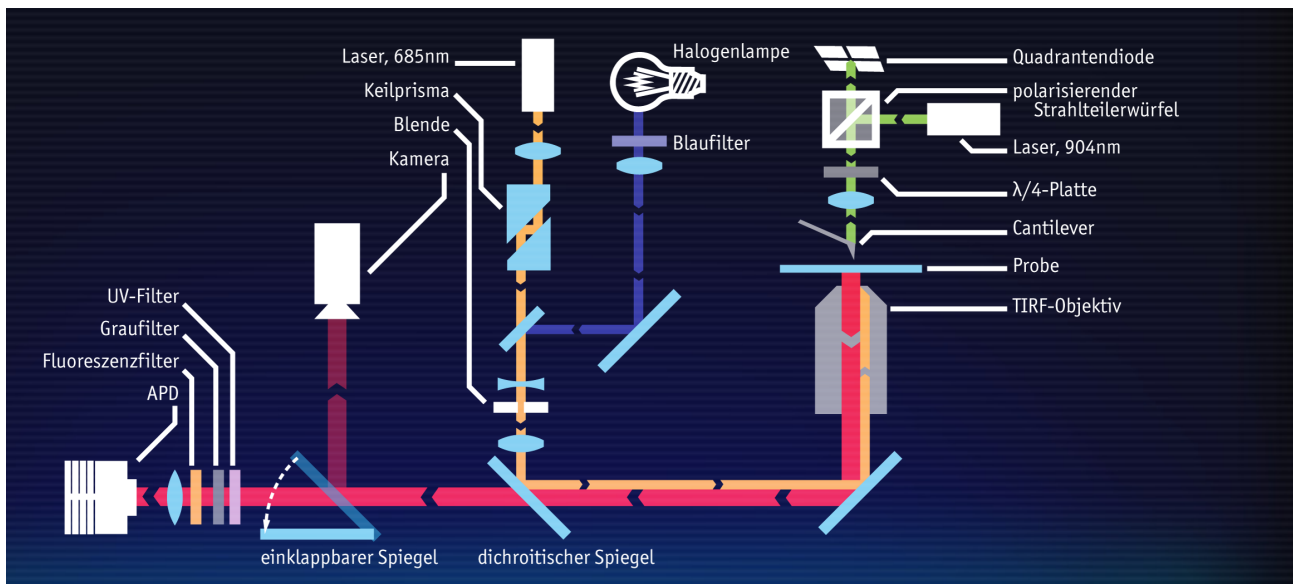
**Abbildung 6.1:** Eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines ATEC-Cantilevers. Erkennbar ist die nach vorne versetzte Spitze. Aufnahme aus [76].

Der Cantilever-Chip ist auf einem selbst-hergestellten Träger aus Keramik mittels Epoxidharz-Kleber (Epoxy-Kleber, Toolcraft) angebracht. Die verwendete Keramik verfügt über eine hohe Festigkeit und ist deswegen gut zur Übertragung von Vibrationen für die Anregung im tapping-Modus geeignet.



**Abbildung 6.2:** Links: Der Cantilever-Chip ist auf dem Keramik-Balken (weiß) aufgeklebt. Dieser ist über eine Halterung an dem Piezo-Element (grün) befestigt. Rechts: Der Messkopf.

Der ganze Aufbau steht auf einem schwingungsgedämpften Tisch (RS4000 Newport Spectra-Physics, Darmstadt). Zum Schutz vor äußeren Einflüssen, im Wesentlichen Luftströmungen, ist der Aufbau zusätzlich noch in einer selbstgebaute Box aus isolierenden Hartschaumplatten platziert. Für die Beleuchtung wird im vorliegenden Aufbau evaneszentes Licht verwendet. Dies hat (wie bereits in Kapitel 3.2 ausgeführt) den Vorteil, dass störende Hintergrundstreuung stark reduziert werden kann und keine aufwendige Filterung nötig ist. Bedingung für die Nutzung von evaneszenter Beleuchtung ist die Verwendung von möglichst dünnen und durchsichtigen Proben.



**Abbildung 6.3: Schematische Darstellung des Strahlenganges im gesamten Aufbau.**

Als Lichtquelle dient eine Laserdiode (RLT6830MG, 30 mW, Roithner Lasertechnik, Wien, Österreich) mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 685 \text{ nm}$ . Deren Licht fällt durch ein Keilprisma, wodurch eine Versetzung des Strahls eingestellt werden kann, durch eine verstellbare Blende, bis es von einem dichroitischen Spiegel reflektiert wird und schließlich ein TIRF-Objektiv (CFI Apochromat 100x TIRF, NA = 1,49, Nikon, Tokio, Japan) erreicht. Damit seine hohe Numerische Apertur von 1,49 erreicht werden kann, muss es unter Öl-Immersion betrieben werden. Dazu wurde hier Immersol™ 518F (Zeiss, Oberkochen) verwendet. Zur gröberen Justierung kann der Aufbau auch auf ein 10x-Objektiv (CFI Plan Achromat 10x Nikon, Tokio, Japan) umgebaut werden.

Nach der Anregung wird das Fluoreszenzlicht wieder durch dasselbe Objektiv aufgesammelt und durch einen dichroitischen Spiegel (z 690 rd AHF Analysentechnik, Tübingen) in Richtung des Sensors geleitet. Wahlweise kann ein Spiegel in den Strahlengang gebracht werden, der das vom Objektiv aufgenommene Licht zur einfacheren Justage in eine Kamera lenkt.

Bei der eigentlichen Messung wird dieser Spiegel aus dem Strahlengang gedreht, sodass das Licht durch einen Fluoreszenzfilter (Fluoreszenz-Filter, T = 715 – 855 nm bei 86%, Optische Laboratorien, Nabburg) und eine Sammellinse fallen und schließlich von einer Avalanche-Photodiode (APD) (SPCMAQR-13, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) detektiert werden kann. Diese ist hochempfindlich und registriert bereits einzelne Photonen, weswegen streng darauf geachtet werden

muss, dass der Laborraum für die Dauer der Untersuchung komplett abgedunkelt ist.

Die Präparation der Proben erfolgt je nach zu untersuchenden Strukturen leicht unterschiedlich.

## 6.2 Präparation Tabakmosaikviren

Die erste Messung konzentriert sich auf die Untersuchung von Tabakmosaikviren (TMV), die von der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Christina Wege (Biologisches Institut der Universität Stuttgart, Abt. Molekularbiologie) bereitgestellt wurden, wo sie aus einer infizierten Pflanze isoliert und fluoreszenzmarkiert wurden [40]. Die Viren sind in SPP-Puffer (10 mM Natrium Kalium Phosphat Puffer mit pH 7,2) suspendiert.

Bei den Viren handelt sich um eine Mutation, deren Kapsidproteinen eine Cystein-Gruppe in ihrer Aminosäuresequenz hinzugefügt wurde. An diese können nachträglich Atto740-Farbstoffmarker mittels einer Maleimid-Gruppe angelagert werden. Der genaue Mechanismus ist in Abbildung 6.4 dargestellt. Die Doppelbindung des Maleimids bricht auf und bindet sich an den Thiol-Rest des Cysteins.

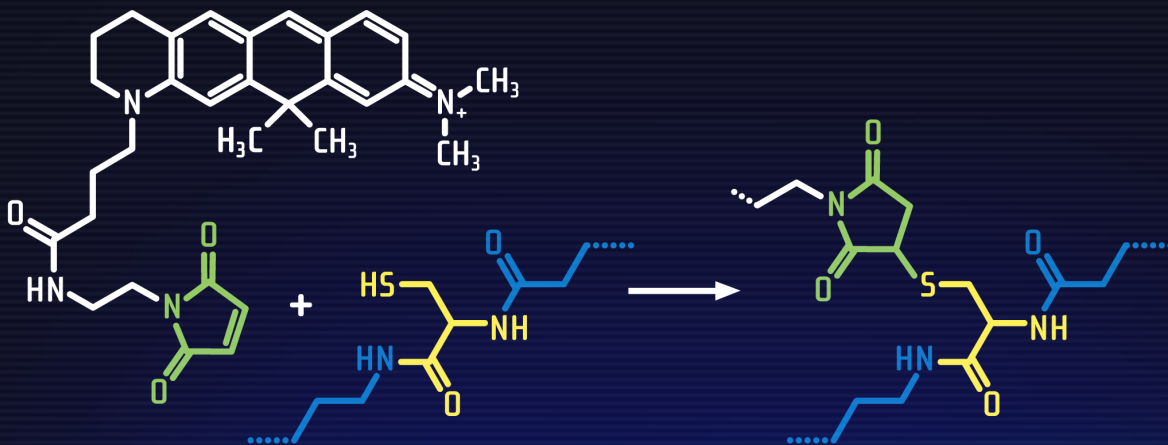


Abbildung 6.4: Molekulare Struktur des verwandten Farbstoffes Atto610mal (weiß) mit Maleimid-Gruppe (grün) und der Anlagerung an die Cystein-Aminosäure (gelb) [61]. Die genaue Struktur des verwendeten Farbstoffes Atto740mal ist nicht zur Veröffentlichung freigegeben (Atto-Tec, Siegen).

Der Grad der Markierung wurde mittels Absorptionsspektroskopie (NanoDrop ND-1000, PEQLAB, Erlangen) auf 1,8% bestimmt [62]. Es sind also nur circa zwei Prozent der Hüllenbausteine, die eine Markierung anlagern könnten, tatsächlich markiert. Dieser Grad der Markierung wurde aus praktischen Gründen gewählt, da hier bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen einzelne Fluorophore noch gut als solche auszumachen sind. Bei einem höheren Markierungsanteil ist dementsprechend zwar die Fluoreszenz stärker ausgeprägt, allerdings ist es mit Schwierigkeiten verbunden, selbst bei superhochauflösenden Bildern einzelne Farbstoffmarker zu identifizieren.

Für die Probenräger werden Deckgläschen mit einer Dicke von 130 bis 160  $\mu\text{m}$  verwendet (Menzel Gläser). Diese werden zunächst in reinem Aceton eingelegt und zwanzig Minuten lang in einem Ultraschallbad behandelt und anschließend wieder mit Aceton abgespült. Danach werden sie ebenfalls nochmal mit Ethanol und hochreinem Wasser (MilliQ) abgespült. Zuletzt trocknen sie in einem Stickstoffstrom.

Nun werden die Deckgläschen für zwanzig Sekunden in konzentrierter Salpetersäure angeätzt, um ihre Oberfläche zu hydrophilisieren und danach erneut mit Wasser abgespült und getrocknet.

Für die Probe wird ein Volumen von 5  $\mu\text{l}$  der Virussuspension auf den Träger gegeben. Der Tropfen wird vorsichtig mit einem Stickstoffstrom auf dem Glassubstrat verteilt. Danach werden eventuelle Rückstände erneut mit Wasser abgespült. Durch die vorherige Aktivierung der Glasoberfläche haften die Viren auf dieser.

### *6.3 Assemblierung und Präparation Desmin*

Die Desmin-Proteine des Wildtyps und der verschiedenen verwendeten Mutationen wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hendrik Milting (Erich & Hanna Klessmann Institut des Herz- und Diabeteszentrums NRW, Bad Oeynhausen) zur Verfügung gestellt, wo sie nach [63] in *E.coli* exprimiert und aufgereinigt wurden. Sie werden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Der erste Schritt ist die Markierung der mutierten Proteine, um sie später in der assemblierten Struktur identifizieren und von den Wildtyp-Proteinen unterscheiden zu können. Dazu werden 100  $\mu\text{l}$  der jeweiligen gelösten Mutante in einen

Dialyse-Schlauch gegeben und zunächst eine Stunde lang gegen einen Liter eines 5M-Urea-Puffers (5M Urea, 5 mM Tris-HCl, pH 7,2) dialysiert. Dann werden sie mit 2 µl Atto740, welches in Dimethylsulfoxid gelöst ist, zusammen 30 Minuten lang geschüttelt. Die Farbstoffe binden über ihre Maleimid-Gruppe dabei an die Cystein-Gruppen der Desmin-Proteine, analog zu dem Mechanismus in Abschnitt 6.2, von denen in jedem Monomer jeweils einer vorliegt. Danach wird die Mischung eine Stunde lang gegen einen Liter eines 5M-Urea-Puffers (5M Urea, 5 mM Tris-HCl, pH 8,4) unter Lichtabschluss dialysiert.

Durch die Dialyse diffundieren ungebundene Farbstoffmoleküle aus der Lösung, da diese, im Gegensatz zu den großen Protein-Molekülen (53535,6 Da), mit ihren kleineren Molekülgrößen die Membran des Dialyseschlauches durchschreiten können (Molekulargewichtsausschlussgrenze 12000 - 14000 Da) und sich im gesamten Volumen der Dialyselösung verteilen. Abschließend folgt die Dialyse gegen einen 8M-Urea-haltigen Puffer (8M Urea, 5 mM Tris-HCl, pH 8,4).

Für die Assemblierung der Filamente werden der Wildtyp und die jeweilige Mutante in einem molaren Mischungsverhältnis von 10:1 gemischt. Da das menschliche Erbgut diploid ist, liegen im Falle einer der betreffenden Erkrankungen beide Versionen des Desmin-Gens, sowohl Wildtyp als auch Mutante, auf den Allelen vor und werden exprimiert, so dass sie gemeinsam in einem Filament koassemblieren können. Durch die Fluoreszenzmarkierung soll die mutierte Spezies vom Wildtyp unterscheidbar werden.

Außerdem wurde beim verwandten Vimentin experimentell festgestellt, dass ein zu hoher Anteil an gelabelten Proteinen die Filamentbildung ebenfalls negativ beeinträchtigen kann. Bei dem Mischungsverhältnis 10:1 konnte jedoch kein Einfluss auf die Assemblierung nachgewiesen werden [48].

Zu Beginn wird die Mischung eine Stunde lang gegen eine Lösung aus 8M Urea und DP-Puffer (5 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, pH 8,4) dialysiert. Die Urea-Konzentration der Lösung wird nun schrittweise auf 6M, 4M, 2M und letztendlich 0M verdünnt und jeweils eine Stunde lang darin dialysiert. Anschließend wird noch über einen längeren Zeitraum von mehreren Stunden gegen einen neuen (0M-Urea-) DP-Puffer dialysiert. Auf diese Weise gehen die Proteine vom denaturierten Zustand in den einer natürlichen Umgebung über, bis schließlich die

Assemblierungsphase der Tetramere vorliegt. Für die endgültige Assemblierung werden zu 5 µl der dialysierten Proteinlösung weitere 5 µl DP-Puffer gegeben, sowie 10 µl AB-Puffer (200 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7,5) und für eine Stunde lang in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt, wodurch der Assemblierungsprozess ausgelöst wird.

Die Deckgläschen werden analog zur Präparation der Tabakmosaikviren in Abschnitt 6.2 mit Salpetersäure behandelt, und 5 µl der Desmin-Lösung aufgebracht. Die Flüssigkeit wird zum Trocknen vorsichtig mittels eines Stickstoff-Stroms auf dem Probenträger verteilt. Danach wird die Probe noch einmal vorsichtig mit Wasser abgespült, um eventuelle lose Rückstände zu entfernen. Durch Physisorption haften die Filamente auf der aktivierten Glasoberfläche.

Nun ist die Probe bereit, in das Mikroskop eingebracht zu werden.

## *6.4 Präparation Quantendots*

Bei Quantendots handelt es sich um Kristalle aus Halbleitermaterialien, die Licht durch die Anregung von Exzitonen (Quasiteilchen der Gitterschwingung) absorbieren und emittieren können [14]. In diesem Fall werden Quantendots aus Cadmiumtellurid (CdTe) des Herstellers PlasmaChem (Berlin) verwendet. Ihre Größe variiert typischerweise in einem Bereich von 2 bis 7 nm.

Durch ihre halbleitenden Eigenschaften können die spektralen Eigenschaften, die Bereiche maximaler Absorption und Emission von Licht, über ihre Bandstruktur genau eingestellt werden. Im vorliegenden Fall absorbieren und emittieren die Quantendots Licht auf einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{max}} = 770 \pm 5$  nm. Ihre präzisen Fluoreszenzeigenschaften sowie ihre Stabilität und die daraus folgende Unempfindlichkeit gegenüber Ausbleichung machen sie zu idealen Fluoreszenzmarkern für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen.

Um Aggregationen untereinander zu vermeiden und um ihnen in diesem Fall hydrophile Oberflächeneigenschaften zu verleihen, sind die Quantendots beschichtet, sodass sie in Wasser gelöst werden können.

Zur Präparation wird eine Menge von 5 µl stark verdünnt auf ein gesäubertes Deckgläschen gegeben und eintrocknen gelassen.

## 6.5 Ausrichtung und Durchführung

Dieser Abschnitt geht auf die allgemeine Durchführung des Versuchs ein, sowie im Besonderen auf die Ausrichtung der optischen Komponenten.

Es ist mit einer gewissen Schwierigkeit verbunden, einen Cantilever zu finden, der eine akzeptable Nahfeldverstärkung ermöglicht, da dies nur bei wenigen (rund jedem vierten) der Fall ist und keine Möglichkeit besteht, die Eignung im Vorhinein festzustellen.

Cantilever gelten als Verbrauchsmaterialien, da sie in mechanischem Kontakt mit der Probe stehen, wodurch sie Abrieb erfahren und ihre Funktionsweise stark von der Unversehrtheit ihrer Form abhängen kann. Auch kleinste Fehljustierungen während des nur semi-automatisierten Annäherungsvorgangs an die Probe führen zum Aufsetzen und zur sofortigen Zerstörung der Spitze. Die Anforderungen für die Nahfeldverstärkung sind sogar noch höher, da hier bei einer fabrikneuen Spitze nicht automatisch von einer Nahfeld-Kompatibilität ausgegangen werden kann.

Der Cantilever wird auf einen Keramikträger geklebt, welcher wiederum an einen Piezo-Kristall (PSt 150/2x3/5, Piezomechanik, München) geschraubt wird (siehe Abbildung Foto Aufklebung), der für die Schwingungsanregung und ebenfalls die vertikale Positionierung verantwortlich ist.

Per Kamera wird der Lichtpunkt der Laserdiode auf die Spitze ausgerichtet, mit der die Auslenkung des Arms bestimmt wird, sodass die Summe des in den Quadrantensensor fallenden Lichts am größten ist.

Durch ein automatisiertes Durchfahren der Anregungsfrequenzen wird die Resonanzfrequenz des Cantilevers ermittelt. Die Anregungsfrequenz wird normalerweise leicht versetzt dazu gewählt, damit sich Änderungen in der Resonanzfrequenz durch Oberflächenwechselwirkung stärker bemerkbar machen.

Der Probenträger wird über dem Objektiv auf einem Plättchen aus PDMS (Polydimethylsiloxan) platziert, welches durch seine adhäsive Kraft weitere Bewegungen und Verrutschen der Probe weitestgehend verhindert.

Die zuvor beschriebene Einrichtung einer neuen Messspitze erfolgt unter Beobachtung durch ein 10-fach Objektiv.



Als nächstes wird das für die Messung zu verwendende 100-fach TIRF-Objektiv eingesetzt und die durchsichtige Probenscheibe vorsichtig in Ölimmersionskontakt mit dem Objektiv gebracht. Nun ist ein experimentell ermittelter Offset der Brennpunkte der beiden Objektive zu kompensieren.

Obwohl für die spätere einfachere Lokalisierung des Cantilevers unter hoher Vergrößerung bereits bei der Justierung unter 10-facher Vergrößerung ein weiterer Laserstrahl auf die genaue Position der Spitze ausgerichtet wurde, stellt diese einen sehr filigranen Vorgang dar. Ist die Spitze im Kamerabild sichtbar, so wird sie grob in den Spot des anregenden Lasers gefahren. Eine genaue Ausrichtung ist noch nicht erzielbar, da sich die Spitze noch räumlich vertikal außerhalb des Anregungsvolumens befindet.

Deshalb folgt nun die Annäherung des Cantilevers an die Probe. Dies stellt den heikelsten Prozess des gesamten Vorganges dar, da schon geringste Überdrehungen zur Beschädigung führen und einen neuen Cantilever nötig machen. Noch kritischer wird der Vorgang dadurch, dass die erste Strecke manuell überbrückt werden muss. Die Schwingungsfrequenz des Cantilevers kann dabei als akustisches Signal abgegriffen werden, um ein mögliches Anzeichen für die Annäherung an die Oberfläche zu erhalten. Erst den letzten Bereich übernimmt das Controllerprogramm, welches den vertikalen Abstand zwischen Spitze und Probe durch den Piezo-Kristall und die Piezo-Stage über einen Bereich von 10  $\mu\text{m}$  variieren kann.

Vier Volumina müssen räumlich höchst präzise in Übereinstimmung gebracht werden: Erstens das Beleuchtungsvolumen, der Bereich der Probe, der beleuchtet werden soll und welcher - um Hintergrundstrahlung zu verringern - möglichst klein sein sollte. Zweitens das Detektionsvolumen, aus welchem das Licht in den Sensor geleitet wird. Diese müssen drittens noch in Übereinstimmung mit dem Bereich auf der Probe gebracht werden, der untersucht werden soll, und zusätzlich noch die Streusonde, an der nur ein Nahfeld generiert wird, wenn sie sich mit ausreichender Genauigkeit im Anregungsvolumen befindet.

Diese vier Volumina in jeweils drei Raumrichtungen in Übereinstimmung zu bringen wird zusätzlich dadurch erschwert, dass eine positive Rückmeldung oft erst bei

dreifacher Übereinstimmung zu beobachten ist und sich die Parameter nicht immer schrittweise annähern lassen. Wie diese Präzision zu erreichen ist, wird im nachfolgenden Abschnitt beschrieben.

Bei hergestelltem Oberflächenkontakt wird noch einmal der Fokus des Objektivs per Kamera nachgeregt. Nun wird die Spitze präzise, vom Kamerabild gesehen aus von oben, in den Spot gefahren. Im Idealfall sind ab einem bestimmten Punkt leichte Reflexe zu sehen (Abbildung 6.5), die von der schrägen Kontur der Spitze ausgehen. Da diese nur sehr schwach zu erkennen sein können, ist eine zusätzliche Ablendung von Teilen des Anregungslaserspots möglich.



**Abbildung 6.5:** Aufnahmen des anregenden Laserspots. Links: Spot ohne Spitze. Rechts: die Spitze ist in den Strahl gefahren, erkennbar an den Reflexen (Markierung).

Da die Nahfeld-Anregung nun so präzise wie vorerst möglich eingerichtet ist, folgt nun die Kalibrierung des Detektors. Bevor jedoch der Fluoreszenzdetektor aktiviert wird, ist sicherzustellen, dass die Raum- und Probenbeleuchtung ausgeschaltet sind, und ein Grau- (AHF Analysetechnik, Tübingen) sowie ein UV-Filter (HQ685/110, AHF Analysetechnik, Tübingen) in den Strahlengang gebracht wurden. Lediglich die Beleuchtung der Cantileverspitze darf noch aktiviert sein, welche durch den Graufilter stark abgeschwächt in den Detektor fällt. Die APD kann lateral verschoben werden, um so möglichst viel des emittierten Lichts aufzunehmen. Ist der Lichteinfall maximiert, werden die Filter ausgetauscht gegen einen Fluoreszenzfilter, welcher nur den Wellenlängenbereich (715 - 855 nm) des emittierten Fluoreszenzlichtes transmittieren lässt. Da die Wellenlänge des Emissionslichtes gegenüber der des anregenden Lichtes stokesverschoben ist, kann auf diese Weise das emittierte vom anregenden Licht getrennt werden.

Anschließend kann mit der Rasterung der Probe begonnen werden. Zwei Parameter können allerdings erst im laufenden Betrieb eingestellt werden:

Zum einen kann die genaue Position der Cantileverspitze im anregenden Fokusvolumen vorher nur begrenzt genau durchgeführt werden. Dies liegt an der limitierten Auflösung und Lichtempfindlichkeit der Kamera, und daran, dass die Reflexe, die als Hinweis gelten, über einen größeren Bereich auftreten können. Eine Verschiebung der Spitze zur Anregungslichtquelle macht sich später dadurch bemerkbar, dass die Fernfeld-Fluoreszenzpeaks, die auch unabhängig von der Nahfeldanregung auftreten, relativ zu der Topographie der Probe verschoben sind.

Diese Verschiebung kann während der Messung ausgemessen und korrigiert werden, um so eine möglichst präzise Ausrichtung zu gewährleisten.

Des Weiteren muss die zeitliche Position der Aufnahme Fenster in der Cantileveroszillation ermittelt werden. Die Fenster in denen die beiden Signale aufgezeichnet werden, sind jeweils  $40^\circ$  breit. Sie lassen sich einfach  $180^\circ$  voneinander entfernt positionieren. Ihre Position relativ zur Schwingung des Cantilevers zu bestimmen ist jedoch nur experimentell möglich und kann zusätzlich auch nur erfolgen, während ein spezifisches Fluorophor angeregt wird. Sobald ein Farbstoff durch die Messung lokalisiert wurde, kann die Rasterbewegung angehalten und der Cantilever über dem Fluorophor platziert werden. Dann werden die Phasen der Aufnahme Fenster durchgeföhren, bis in einem der Kanäle eine verstärkte Fluoreszenzemission registriert wird. Eine kontinuierliche Anregung eines Farbstoffmoleküls sorgt für eine schnelle Ausbleichung desselben, weshalb der Vorgang sehr zügig durchgeführt werden muss.

Die anschließende Auswertung gliedert sich in die Subtraktion der Fluoreszenzkanäle, welche mit der Software SPIP (Image Metrology, Hørsholm, Dänemark) erfolgt, und die Filterung und Aufbereitung mit der Software Gwyddion (Freie Software/GPL). Damit erfolgt auch die Entnahme der Schnittprofile für die Peakbreitenbestimmung. Die Berechnung der Halbwertsbreiten aus den Profilen erfolgt durch numerische Anfitung von Funktionen an die Kurven mittels der Software Gnuplot (Freie Software).

# 7 Ergebnisse und Interpretation

## 7.1 Ergebnisse Tabakmosaikviren

Die erste Versuchsreihe behandelte die Untersuchung von Tabakmosaikviren. Die Viren waren genetisch so verändert, dass die einzelnen Kapsidproteine jeweils eine Cystein-Gruppe trugen, an die beliebige chemische Funktionalitäten gebunden werden konnten. Dies soll idealerweise verwendet werden, um nanoelektrische Effekte zu erzielen, beispielsweise um die Funktion eines Feldeffekttransistors herzustellen [40].

In diesem Fall wurden an circa 2% der Hüllenproteine fluoreszierende Atto740-maleimide-Farbstoffmoleküle gebunden, um die individuellen Markerpositionen identifizieren zu können.

In allen in dieser Arbeit dargestellten Aufnahmen wird der, durch die Cantileverauslenkung gewonnene topographische Kanal, in blau dargestellt, der Fluoreszenzkanal dagegen in roter Farbe, um einen möglichst starken optischen Kontrast der beiden parallelen Informationsebenen zu gewährleisten.

Die Abbildungen 7.1 bis 7.3 zeigen einige der erzielten Messergebnisse.

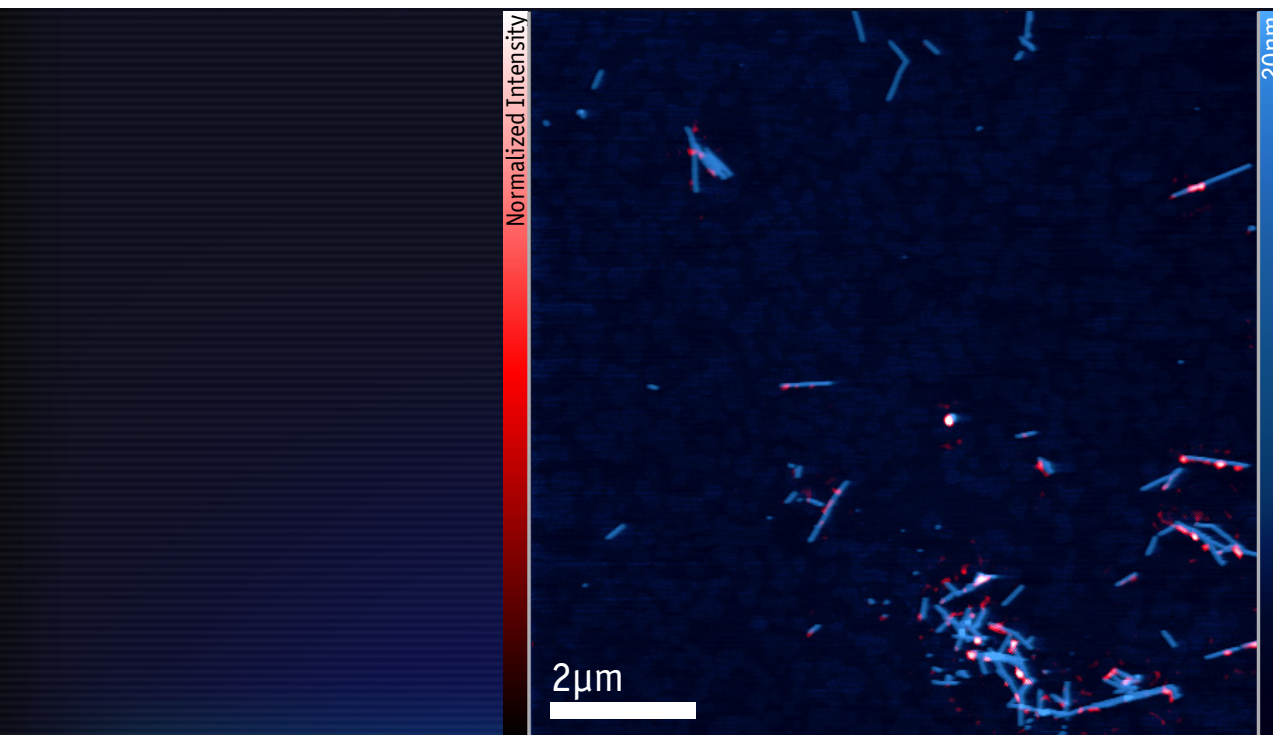


Abbildung 7.1: aSNOM-Aufnahme von Tabakmosaikviren. In blau ist der Topographiekanal dargestellt, in rot die nahfeldverstärkte Fluoreszenzemission.

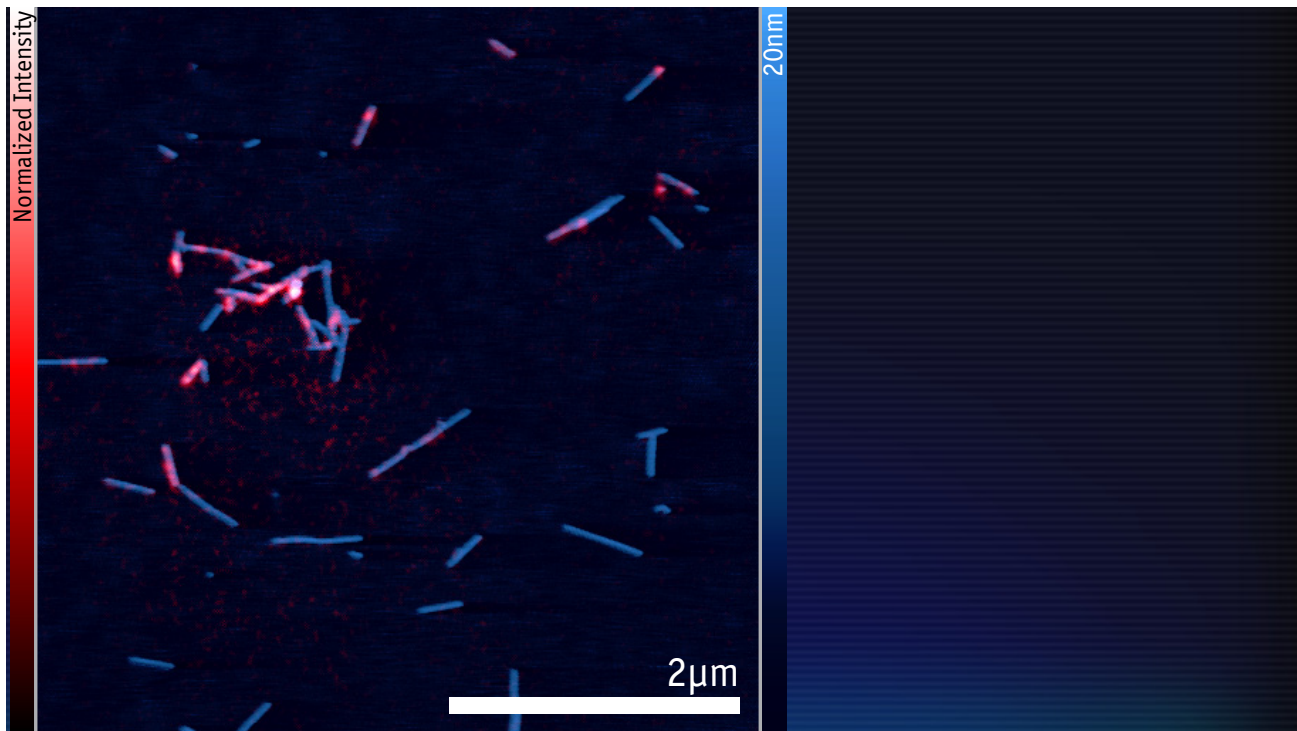


Abbildung 7.2: aSNOM-Aufnahme von Tabakmosaikviren.

Auf allen Aufnahmen sind die stabförmigen Viren gut zu erkennen. Ihre Längen reichen von 300 bis 400 nm. Auch die einzelnen Fluorophore sind deutlich zu identifizieren, ihre durchschnittliche Peakbreite, die über die Halbwertsbreite bestimmt wurde, liegt bei 44,34 nm. Eine genaue Analyse der Breite der einzelnen Peaks findet in Abschnitt 7.4 statt.

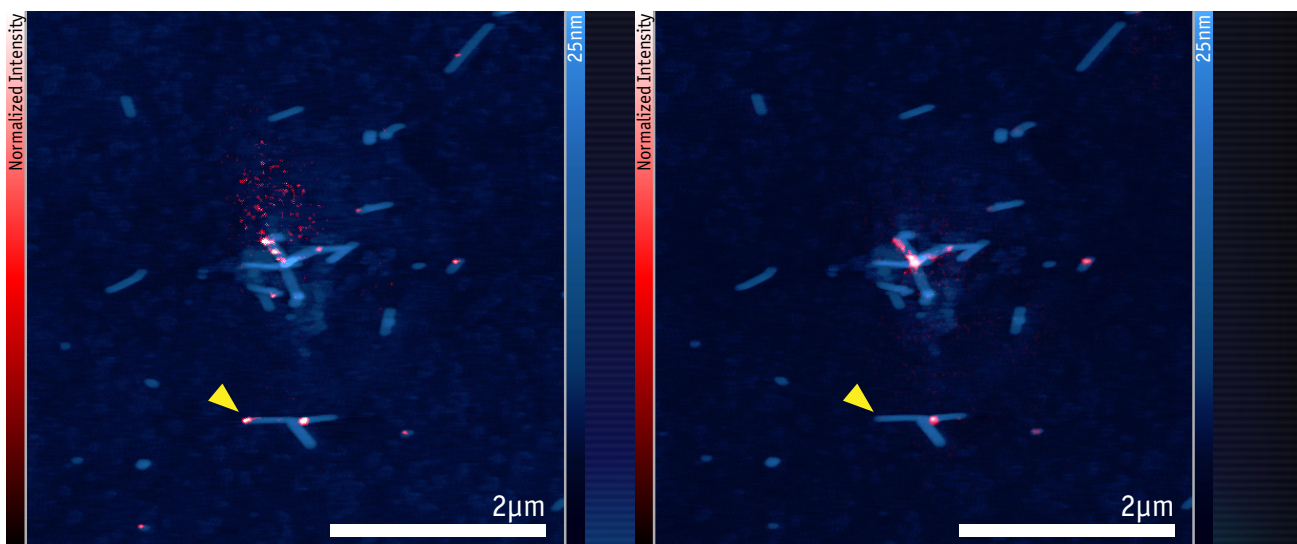


Abbildung 7.3: Zwei aufeinander folgende aSNOM-Messungen von Tabakmosaikviren. Im rechten Bild ist der hervorgehobene Farbstoff nicht durch Emission zu erkennen.

Wie bereits in Abschnitt 2.3 erläutert ist die Ausbleichung der einzelnen Farbstoffe ein häufig auftretendes Problem. Da auf einem Bildausschnitt nur eine begrenzte Anzahl an Fluorophoren sichtbar ist, macht sich der Ausfall vereinzelter Farbstoffmoleküle umso stärker bemerkbar, bis hin zum kompletten Verlust des Informationswertes. Abbildung 7.3 zeigt zwei aufeinander folgende Messungen des gleichen Bildausschnittes. Die beiden Messungen wurden direkt hintereinander ausgeführt, um geringfügig unterschiedliche Positionen des Anregungslichtes zu testen. Die Messergebnisse unterscheiden sich lediglich dadurch voneinander, dass der hervorgehobene Farbstoff auf der zweiten Messung nicht mehr durch seine Lichtemission zu erkennen ist.

Für dieses Verhalten kann die starke Lichtbelastung verantwortlich gemacht werden, die zu Photobleichung führen kann und den Farbstoff zerstört. Eine alternative Erklärung ist allerdings auch in der Ausbildung eines Triplettzustandes zu finden, ein durch Lichtabsorption angeregter Zustand dessen Anregungs- und Abregungsübergänge durch ein quantenmechanisches Verbot in den Auswahlregeln [13] sehr unwahrscheinlich sind und dieser somit sehr lange (mehrere Minuten bis hin zu Stunden) im angeregten Zustand verweilen und nicht mehr zum Leuchten angeregt werden kann.

## *7.2 Ergebnisse Desmin-Mutationen*

Die nächste Versuchsreihe behandelt die verschiedenen untersuchten Desmin-Mutationen. Desminproteine kommen in menschlichen Herzmuskelzellen vor, wo sie zu langen Filamenten assemblieren und dort stabilisierende Funktionen übernehmen. Spezifische Mutationen des Desmin-Gens werden mit Myopathien in Verbindung gebracht, bei denen es zu Degenerationen des Herzmuskels kommt. Da das menschliche Genom diploid ist, also im Falle einer Erkrankung gesunde und mutierte Versionen des Gens koexistent sind, stellt sich die Frage der Beteiligung der Mutationen am Assemblierungsprozess.

Dies soll aufgeklärt werden, indem die jeweiligen mutierten Proteine mit fluoreszenten Markern gelabelt werden, und ihre Position in der assemblierten Superstruktur mittels optischer Nahfeldmikroskopie lokalisiert wird.

Um den Grad der Markierung der Proteine zu bestimmen, wird eine Reihe von Absorptionsspektroskopien durchgeführt um mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes

$$c = \frac{A_\lambda}{\epsilon_\lambda \cdot l}$$

7.1

die Konzentration sowohl des Farbstoffes als auch die der Proteinlösung errechnen zu können. Das Gesetz besagt, dass Licht der Wellenlänge  $\lambda$  beim Durchschreiten einer Strecke  $l$  durch eine Substanz der Konzentration  $c$  um den Faktor  $A_\lambda$  abgeschwächt wird [13].  $\epsilon_\lambda$  ist der spezifische Extinktionskoeffizient der Substanz für die Wellenlänge  $\lambda$ .

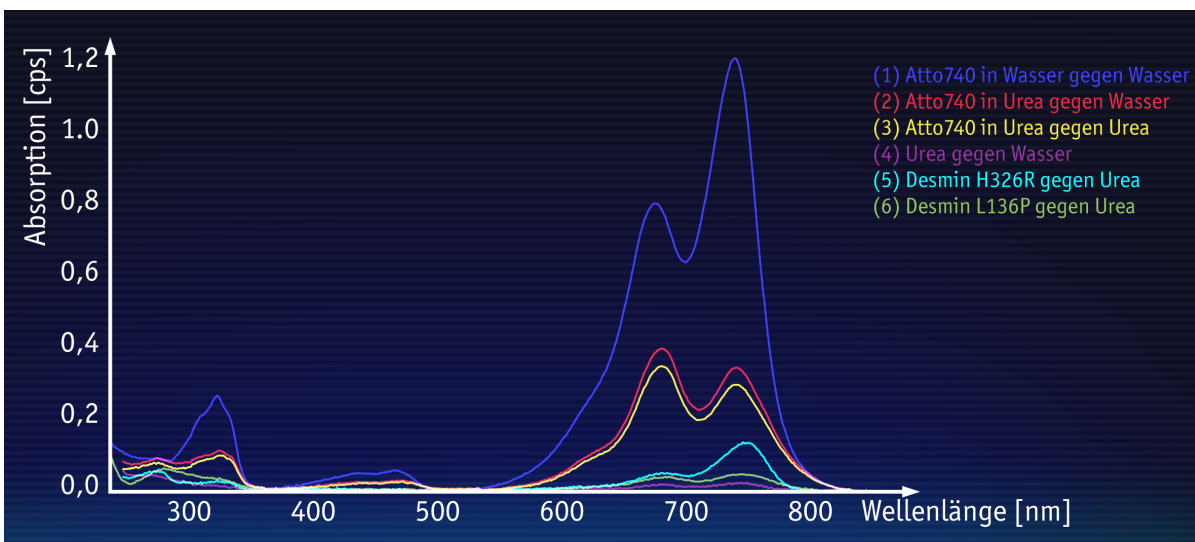


Abbildung 7.4: Absorptionsspektroskopische Messungen der Proteinlösungen und Puffer zur Bestimmung des Markierungsgrades.

Bei der Absorptionsspektroskopie wird die Absorption eines Stoffes in Vergleich zu einem Kontrollmedium in Abhängigkeit der Wellenlänge durchgemessen. Der maximale Extinktionskoeffizient des Farbstoffes Atto740mal in Wasser (Abbildung 7.4, Kurve 1) für eine Wellenlänge von 740 nm beträgt  $12 \cdot 10^4 \text{ (mol}\cdot\text{cm)}^{-1}$  [17]. Durch Formel 7.1 kann damit die Konzentration bestimmt werden und damit wiederum der veränderte Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{740}^{\text{Urea}} = 3,43 \cdot 10^4 \text{ (mol}\cdot\text{cm)}^{-1}$  des Farbstoffes in Urea-haltigem Puffer (2). Hiermit lässt sich nun die Farbstoffkonzentration in der gelabelten Proteinlösung bestimmen.

Für den Extinktionskoeffizienten des Desmins werden die aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin in der Sequenz des Proteins aufsummiert, da diese durch ihre aromatischen Ringstrukturen Strahlung absorbieren können. Für Desmin ergibt sich damit ein Extinktionskoeffizient von  $2,63 \cdot 10^{-4} \text{ (mol} \cdot \text{cm)}^{-1}$ .

1	MSQAYSSSQR	VSSYRRTFGG	APGFPLGSPL	SSPVFPRAGF	GSKGSSSSVT	50
51	SRVYQVSRIS	GGAGGLGSLR	ASRLGTTRTP	SSYGAGELLD	FSLADAVNQE	100
101	FLTTRTNEKV	ELQELNDRFA	NYIEKVRFLF	QQNAALAAEV	NRLKGREPTR	150
151	VAELYEEELR	ELRRQVEVLT	NQRARVDVER	DNLLDDLQRL	KAKLQEEIQL	200
201	KEEAENNLAA	FRADVDAATL	ARIDLERRIE	SLNEEIAFLK	KVHEEEIREL	250
251	QAQLQEQQVQ	VEMDMSKPDL	TAALRDIRAQ	YETIAAKNIS	EAEEWYKSKV	300
301	SDLTQAANKN	NDALRQAKQE	MMEYRHQIQS	YTCEIDALKG	TNDSLMRQMR	350
351	ELEDRFASEA	SGYQDNIARL	EEEIRHLKDE	MARHLREYQD	LLNVKMALDV	400
401	EIATYRKLLF	GEESRINLPI	QTYSALNFRE	TSPEQRGSEV	HTKKTVMIKT	450
451	IETRDGEVVS	EATQQQHEVL				

Abbildung 7.5: Die Aminosäuresequenz des Desmin-Proteins. Hervorgehoben sind die aromatischen Aminosäuren Tyrosin (Y), Tryptophan (W) und Phenylalanin (F), die zur Absorption beitragen. Herkunft: Human Intermediate Filament Database.

Die Absorption des Desmins (5 und 6) wird bei 280 nm gemessen, wovon noch der Absorptionsanteil des Farbstoffes abgezogen wird. Der endgültige Markierungsgrad ergibt sich aus dem Verhältnis der beiden Konzentrationen:

$$\text{Grad der Markierung} = \frac{c(\text{Farbstoff})}{c(\text{Protein})}$$

7.2

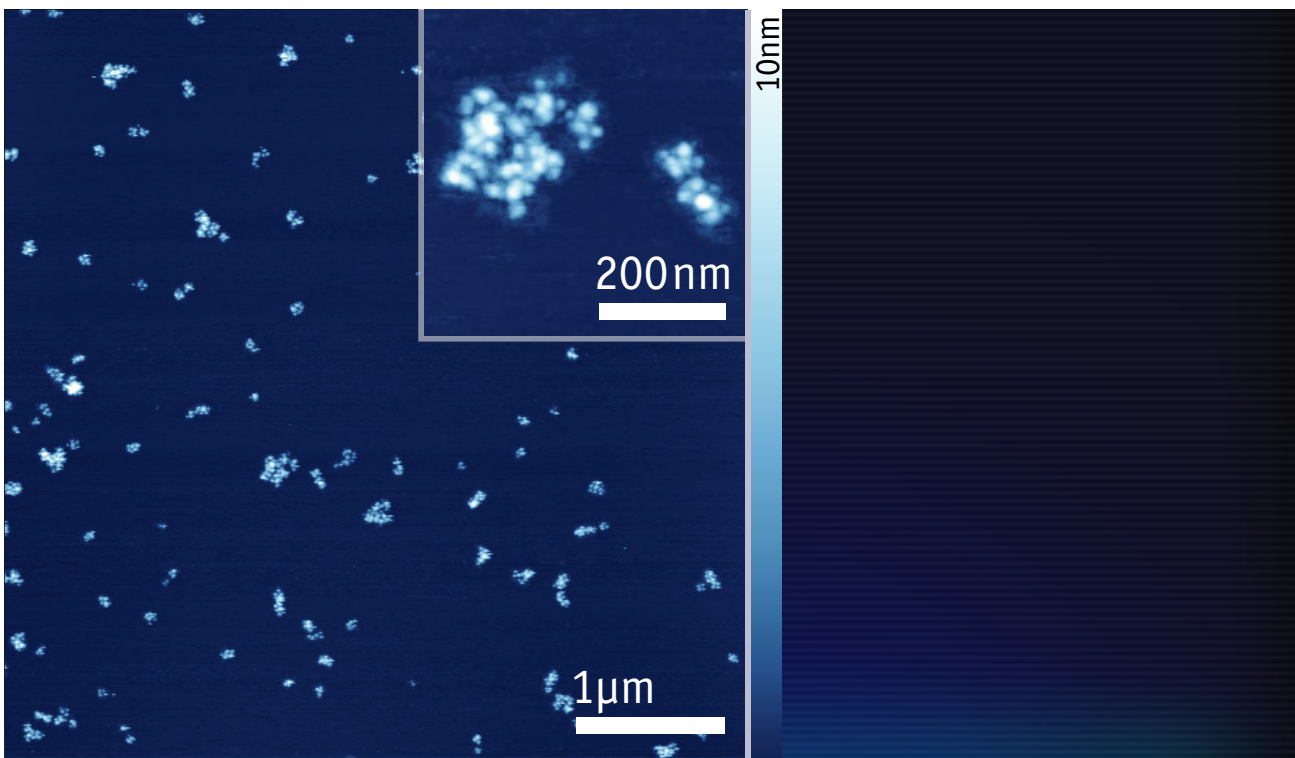
Für die beiden untersuchten Proteinarten ergaben sich Markierungsgrade von 88% für L136P sowie Faktoren von 2,26 bis 6,35 für H326R bei verschiedenen Messungen. Für einen Grad über 100% müssten mehr Farbstoffmoleküle als Proteinmoleküle in der Lösung vorliegen, was nach der ausgedehnten Reinigung durch Dialyse unwahrscheinlich erscheint. Stattdessen liegt es eher nahe, dass viele Einflüsse auf die Absorptionsmessungen nicht ausreichend berücksichtigt werden können. So weist das Gerät (UVVIS-Spectrophotometer UV-2450, Shimadzu, Kyoto, Japan) eine hohe Ungenauigkeit bei geringen Intensitäten unter 0,1 cps auf.

Zudem hängen die spektralen Eigenschaften des Farbstoffes stark von den äußeren chemischen Gegebenheiten ab: Der pH-Wert des Puffers beträgt 8,4, der von Wasser hingegen 7.



Bei der Bindung des Farbstoffes an das Protein bricht außerdem eine Doppelbindung in der Maleimid-Gruppe auf (vgl. Abschnitt 6.2). Zum Schluss ist auch eine Verschmutzung der Messküvetten nicht auszuschließen, da das Spektrum Urea-Puffer gegen Wasser (4) bereits die charakteristischen Peaks des Farbstoffes Atto740 bei 740 nm und 680 nm aufweist.

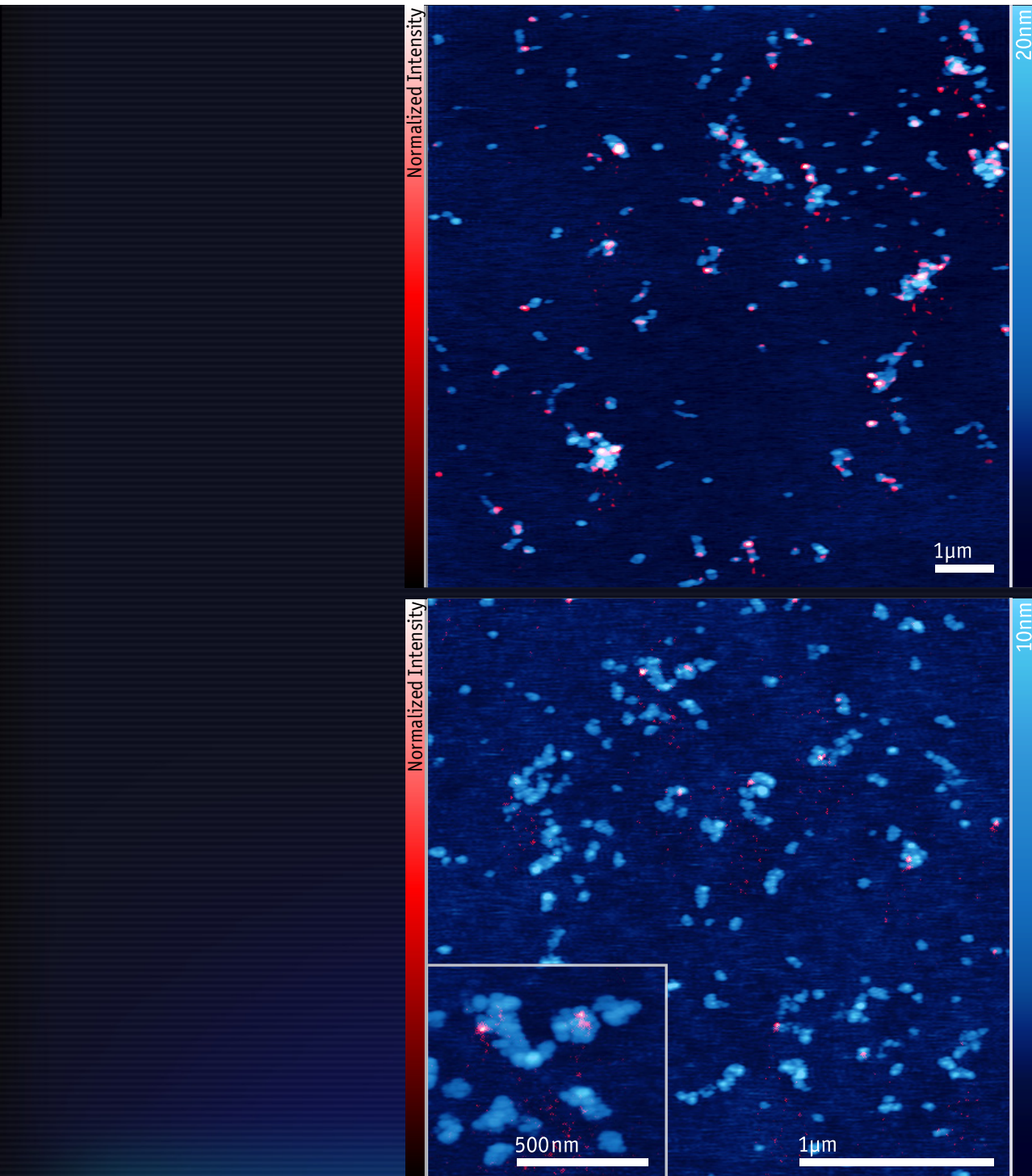
Abbildung 7.6 zeigt zunächst eine reine AFM-Abbildung einer Desmin-Filamentassemblierung unter Beimischung der Mutante DES L136P im Verhältnis Wildtyp zu Mutante von 10:1. Diese Aufnahme wurde im Multimode, einem AFM-Komplettsystem, angefertigt, da die topographische Auflösungsleistung des SNOM-Aufbaues bedingt durch störende Einflüsse, wie die Vibration des Deckgläschens durch Luftschall, nicht optimal ist, und für die feinen Filamente ein hoher Detailgrad hilfreich sein kann.



*Abbildung 7.6: AFM-Messung (Multimode) der assemblierten Desmin-Mutante L136P gemischt mit Wildtyp-Desmin. Erkennbar sind die gebildeten Aggregate.*

Zu erkennen ist, dass sich hierbei keine langen Filamente ausgebildet haben (im Vergleich zu Abbildung 4.3, welche die assemblierten Filamente bei reinem Wildtyp-Desmin zeigt), sondern dass die Beimischung lediglich zu Aggregation oder Verklumpungen geführt hat.

Im Anschluss daran wurde die Probe im Hinblick auf die fluoreszenten Marker untersucht. Abbildung 7.7 zeigt einige der Nahfeldaufnahmen der Assemblierung unter Zumischung der Mutante DES L136P.

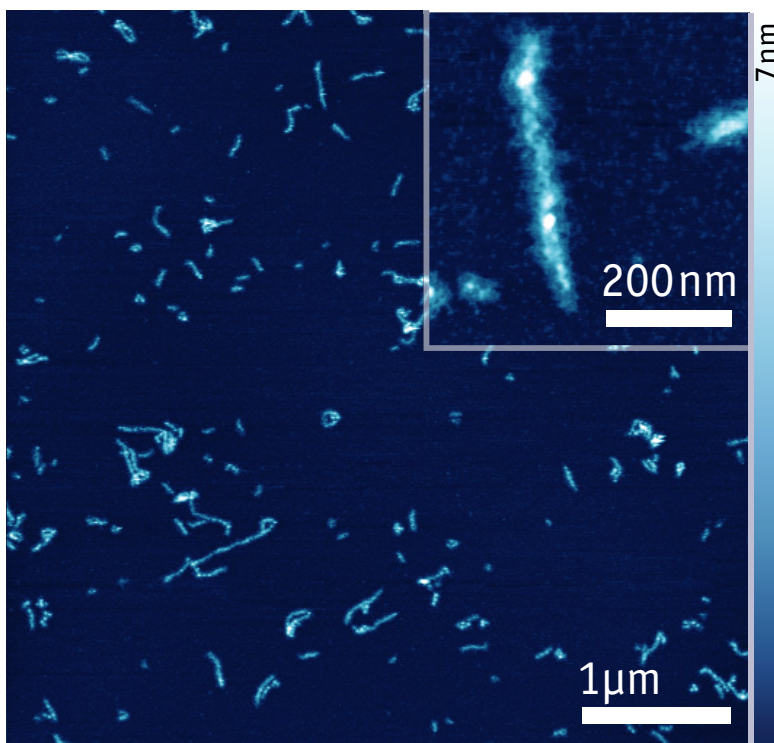


**Abbildung 7.7:** aSNOM-Messungen der Probe mit der Mutante L136P. Die markierten mutierten Proteine wurden in die Aggregate eingebaut.

Erneut sind die Aggregationen und fehlgebildeten Filamente zu erkennen. Zudem sind wieder einzelne Nahfeldausschläge von Fluorophoren gut sichtbar. Von besonderem Interesse ist hierbei die Position der Farbstoffmarker. An den hervorgehobenen Stellen ist zu sehen, dass die Markierungen in den Aggregaten auftreten. Da vorher nur die mutierten Proteine fluoreszenzgelabelt wurden, lässt sich die Aussage treffen, dass die Mutationen an der Fehlbildung der Desmin-Filamente beteiligt sind.

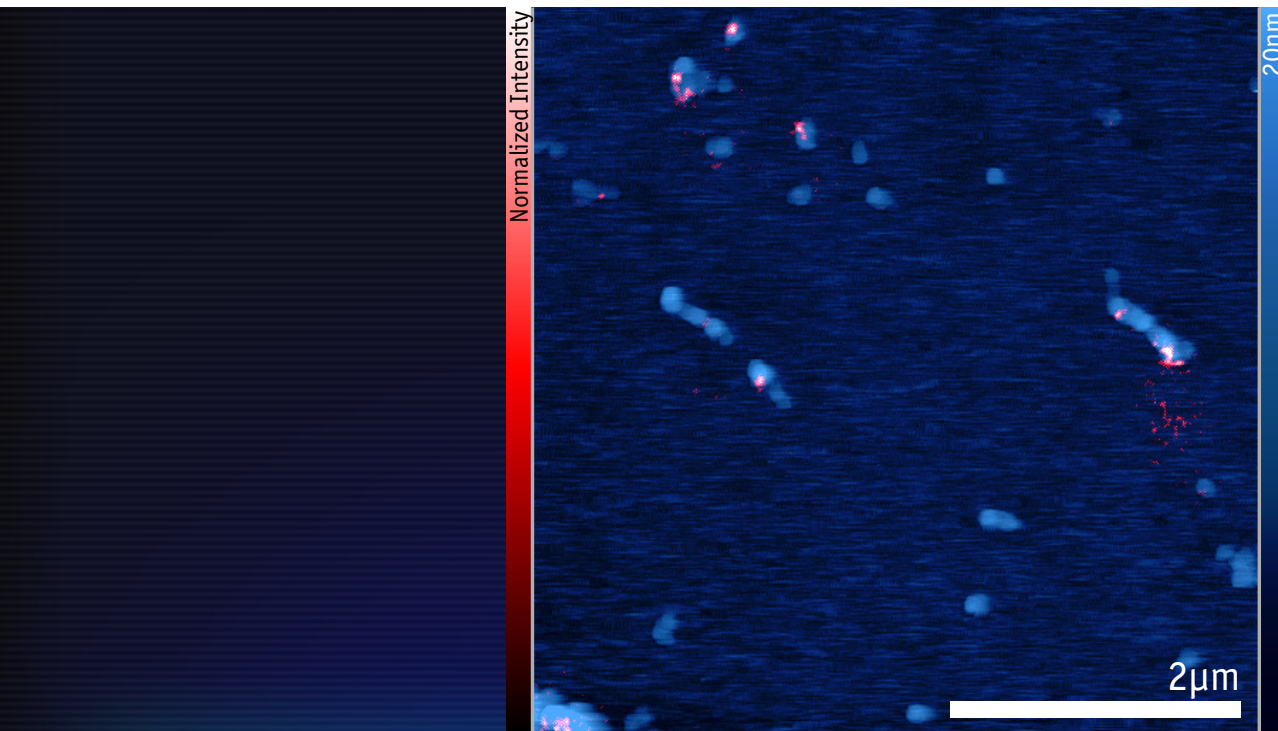
Das Verhältnis der Mutante zu den unveränderten Wildtyp-Proteinen beträgt 1:10, gemäß dem Mischverhältnis in der Präparation. Es ist hervorzuheben, dass bereits solch geringe Beimischungen die Filamentassemblierung stark behindern können, wohingegen im physiologischen Fall beim betroffenen Patienten das Verhältnis 1:1 ausmacht.

Im nächsten Schritt wird die Mutante DES H326R untersucht. Abbildung 7.8 zeigt wieder eine reine Kraftmikroskopieaufnahme hoher räumlicher Auflösung, die mit einem Multimode-AFM erzeugt wurde.



**Abbildung 7.8:** AFM-Messung (Multimode) der assemblierten Desmin-Mutante H326R gemischt mit Wildtyp-Desmin. Erkennbar sind die filamentartigen Strukturen.

Ein Vergleich mit einer Assemblierung aus reinen Wildtyp-Proteinen zeigt, dass diesmal die Filamentbildung weitestgehend korrekt verlaufen ist. Es sind eindeutig filamentartige Strukturen auszumachen, die eine Länge von bis zu einem Mikrometer erreichen können.



**Abbildung 7.9:** aSNOM-Messung der Probe mit der Mutante H326R.

Trotz des Mischverhältnisses 1:10 von Mutante zu Wildtyp, können nicht alle Mutanten in der Fluoreszenzmessung dadurch als solche erkannt werden: Wie aus bereits dargelegten Gründen kann der ermittelte hohe Markierungsgrad tatsächlich wesentlich tiefer liegen. Desweiteren können zum einen bei der Aufnahme konstante Bleichvorgänge auftreten. Zum anderen ist davon auszugehen, dass nicht alle Farbstoffmoleküle von der Feldüberhöhung zu erreichen sind. So können auf der der Spitze abgewandten Seite der Filamente oder Aggregate liegen oder, da jedes Monomer einen Platz für einen Farbstoffmarker bietet, auch in die Filamente eingebaut werden. Durch den Durchmesser der Filamente, der mit  $\sim 10$  nm geringer ist als der der TMVs mit  $\sim 18$  nm, können die von der Spitze weiter entfernten Farbstoffe zwar von der Feldüberhöhung erfasst, aber durch die geringe Ausdehnung des Nahfelds nur schwach angeregt werden.

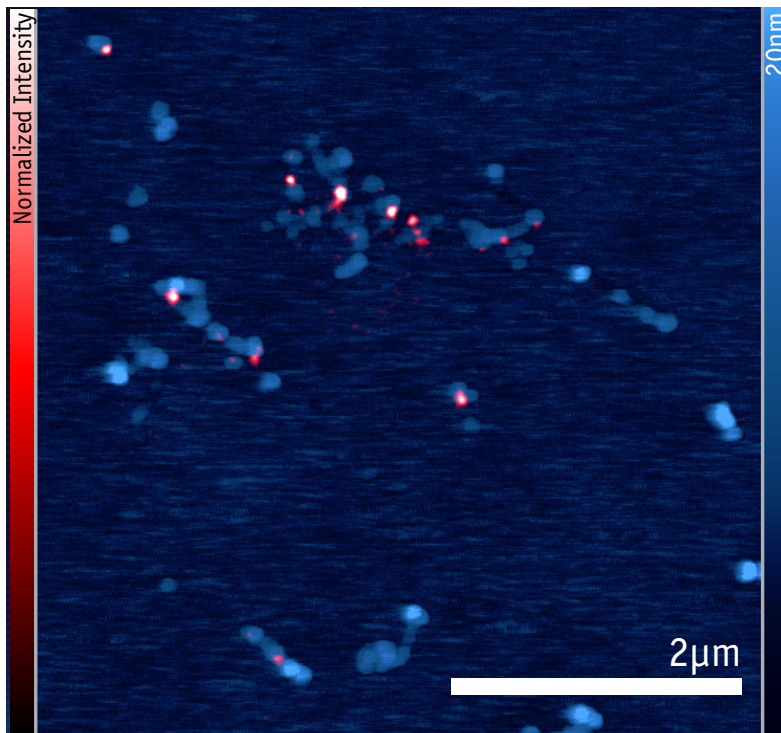


Abbildung 7.10: aSNOM-Messung der Probe mit der Mutante H326R.

Die Fluoreszenzmessungen in den Abbildungen 7.9 und 7.10 zeigen, dass die markierten Mutanten in die Filamente eingebaut werden. Es lässt sich also davon ausgehen, dass die Mutation H326R keine sichtbaren Fehlbildungen der Filamente hervorruft und sich normal assemblieren lässt.

Hier liegt einer der Vorteile der Nahfeldmikroskopie begründet: Eine Aussage über die Rolle und die Verteilung der Mutanten innerhalb der assemblierten Superstrukturen ließe sich durch reine Kraftmikroskopie nicht treffen; gleichfalls würden bei reiner Fluoreszenzmikroskopie keine Daten über Form bzw. Struktur von Filamenten und Aggregation vorliegen. Bei der Nahfeldmikroskopie hingegen liegen sowohl topographische als auch Fluoreszenzinformationen vor, die durch die gegenseitige Kongruenz entscheidende Einblicke in den Assemblierungsprozess liefert.

Eine mögliche Ursache für die Auswirkung der Mutationen auf den Assemblierungsprozess liegt in der Struktur der beteiligten Aminosäuren begründet. Die bei der Mutation L136P beteiligten Aminosäuren Leucin und Prolin sind zwar beide unpolar, dennoch hat Prolin einen starken Einfluss auf die Konformation von Proteinen. Durch seine zyklische Struktur und geringe Größe wirkt es sich besonders auf die Faltung  $\alpha$ -Helizes aus, so dass es sogar als „Helixbrecher“ bezeichnet wird. Eine fehlerhaft gebildete helikale Struktur kann die Anlagerung von Monomeren aneinander erschweren und somit den Assemblierungsprozess behindern.

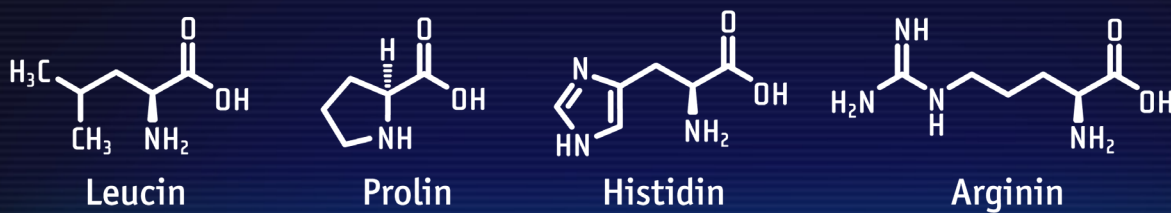


Abbildung 7.11: Die an den hier untersuchten Mutationen beteiligten Aminosäuren.

Die in der Mutation H326R vorkommenden Aminosäuren Histidin und Arginin sind hingegen beide basisch, positiv geladen und unterscheiden sich nur gering in der Größe ihrer Seitenketten. Dadurch können sie trotzdem Salzbrücken mit ihrer Umgebung aufbauen, wodurch die Faltungsstruktur stabilisiert wird [64].

### 7.3 Ergebnisse Quantendots

Die letzte Versuchsreihe war auf die Quantendots fokussiert, Kristalle aus Halbleitermaterialien, die durch ihre optischen Eigenschaften ideale Marker für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen darstellen sollten.

Bei der Präparation der Quantendots auf einem gesäuberten Deckgläschen ist festzustellen, dass sich selbige häufig in Clustern anordnen. Dieses Verhalten wird in der reinen AFM-Aufnahmen (Multimode) in Abbildung 7.12 sichtbar. Die Größe einzelner Quantendots reicht von 2 bis 7 nm.

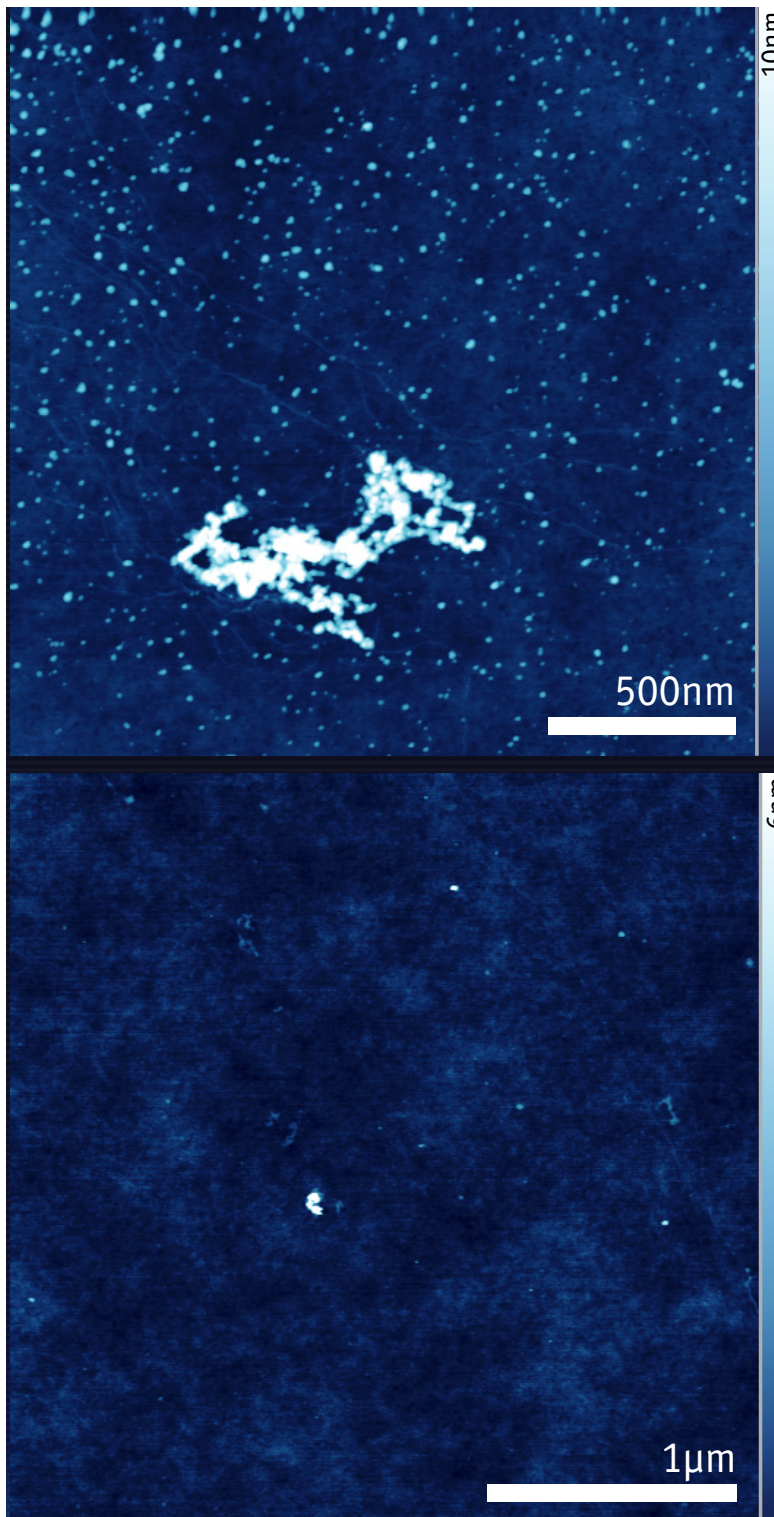


Abbildung 7.12: AFM-Messung (Multimode) der Quantendots.

Abbildung 7.13 zeigt zwei Fluoreszenzaufnahmen der Quantendots. Entgegen der Erwartung, eine sehr hohe Fluoreszenzintensität zu beobachten, da diese eine hohe optische Stabilität aufweisen sollten, konnte nur ein äußerst schwaches Nahfeldsignal erreicht werden.

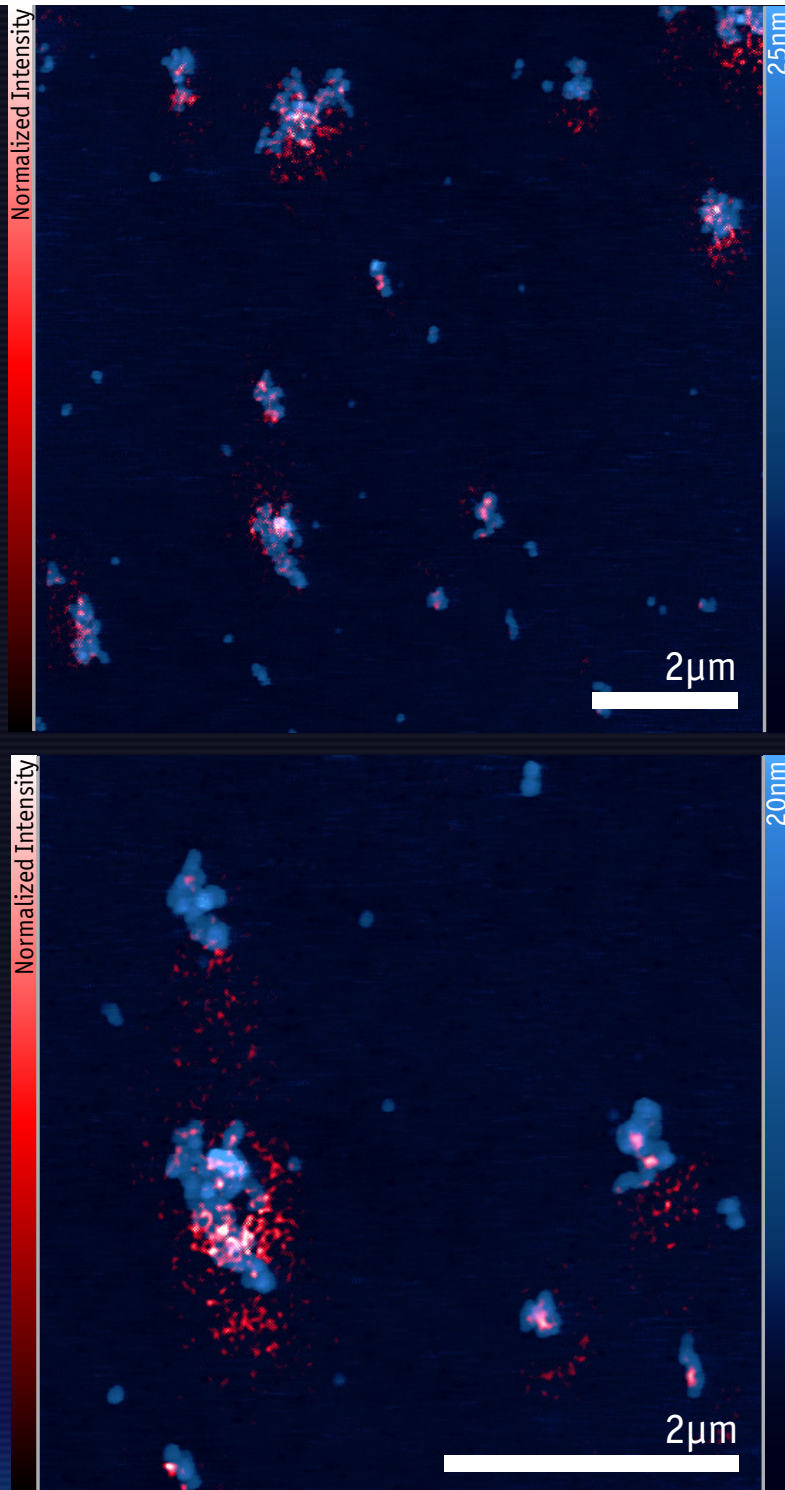


Abbildung 7.13: aSNOM-Messung der Quantendots. Das starke Rauschen ist bedingt durch das verhältnismäßig schwache Fluoreszenzsignal.

In den gefilterten Bildern äußert sich dies durch auffällig starkes Hintergrundrauschen, da die Messung nur relativ zu den Höchstwerten eingefärbt ist. Um dieses Verhältnis qualitativ bewerten zu können und um die Fluoreszenzpeaks aus verschiedenen Messungen untereinander vergleichen zu können, wird in Abschnitt 7.5 das Signal-Rausch-Verhältnis zur Hilfe heran gezogen.



## 7.4 Auflösung durch Halbwertsbreite

Nach Auswertung der Ergebnisse gilt es nun die tatsächlich erreichte optische Auflösung zu bestimmen. Dazu wird zunächst die in Abschnitt 2.1 behandelte Methode der Halbwertsbreite angewandt.

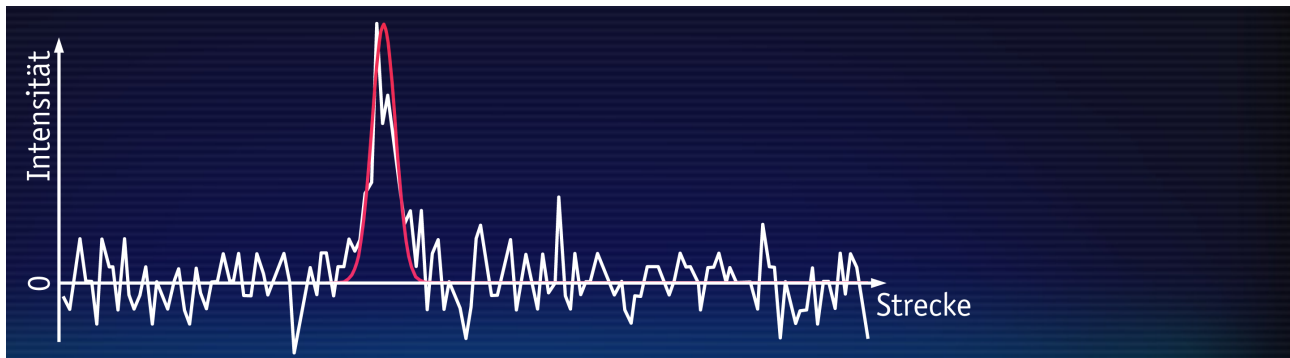


Abbildung 7.14: Ein beispielhaftes Schnittprofil des Nahfeld-Fluoreszenzsignals mit angefitteter Gauß-Kurve.

Von allen gemessenen Aufnahmen werden die jeweils deutlichsten Peaks ausgewertet. Es wird jeweils ein Schnittprofil zentral durch den Peak gelegt. Als nächstes wird ein Gaussprofil der Funktion

$$\varphi_{\mu, \sigma^2}(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \exp\left\{-\frac{(x - \mu)^2}{2\sigma^2}\right\}$$

7.3

iterativ an den Peak angefittet. Aus den Werten für die numerische Annäherung kann so die Halbwertsbreite  $\sqrt{2}\sigma$  abgelesen werden.

Für die jeweiligen Proben erhält man über die fünf stärksten Ausschläge gemittelt folgende Werte:

TMV	DES L136P	DES H326R	QD 770	Durchschnitts- FWHM
44.34 nm	33.1 nm	53.83 nm	59.55 nm	

Deutlich zu sehen ist hier, dass die erreichte Auflösung für die Filamente der Desmin-Mutation L136P mit 33,1 nm am höchsten liegt. Auch für die Tabak-Mosaik-Viren wurde eine sehr gute Peak-Breite von 44,34 nm ermittelt. Bei den schwachen Ausschlägen der Quantendots liegt die Auflösung mit 59,55 nm am niedrigsten. Im Mittel über alle Werte liegt die Breite eines Peaks bei 44,7 nm. Dieser Wert liegt bereits weit unterhalb der klassischen Auflösungsgrenze, welche bei der verwendeten Wellenlänge bei ~300 nm liegt.

Wie bereits in Abschnitt 7.3 festgestellt, kann die Amplitude der Fluoreszenzemission stark schwanken und bei den unterschiedlichen untersuchten Probenarten verschieden sein. Auch die experimentellen Bedingungen haben großen Einfluss auf die Höhe der gemessenen Peaks. Ist ein Peak schwächer, so kann die Bestimmung der Halbwertsbreite eine größere Ausdehnung als bei einem intensiveren Peak ergeben. Um die Einflüsse der Probenart auf die ermittelte Auflösung bewerten zu können, wird eine weitere Auswertungsmethode zu Rate gezogen.

## 7.5 Signal-Rausch-Verhältnis

Aufgrund der Natur der Fluoreszenzmessung, welche inhärent von der Justierung und der Anregungsleistung abhängig ist, lässt sich die Emissionsintensität nicht in absoluten Zahlen quantifizieren. Die Farbskala ist somit nur auf einen im Bild höchsten Relativwert normiert.

Eine weitere Möglichkeit die Qualität einer Messung zu beurteilen ist neben der räumlichen Auflösung das Signal-Rausch-Verhältnis (*signal-to-noise ratio*, SNR). Dieses errechnet sich bei optischen Bilddaten aus dem Verhältnis der durchschnittlichen nutzbaren Peak-Amplitude zum Durchschnittswert des Hintergrundrauschens [65]. Da das Rauschen durch die erfolgte Subtraktion der beiden Kanäle statistisch um Null schwankt, wird hierfür anstatt des Rausch-Durchschnittswertes die quadratische Standardabweichung verwendet:

$$SNR = \frac{\text{Nutzsignalamplitude}}{\text{Rausch – Standardabweichung}}$$

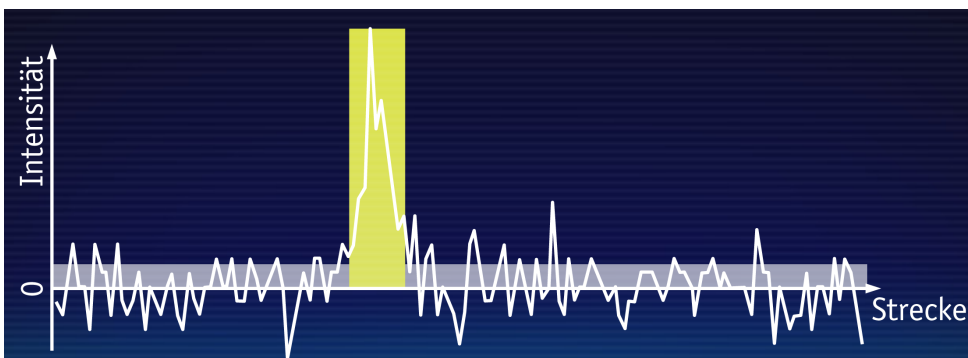
7.4

Die quadratische Standardabweichung (*root mean square*, RMS) ermittelt sich aus:

$$x_{RMS} = \sqrt{\frac{1}{n} (x_1^2 + \dots + x_n^2)}$$

7.5

Abbildung 7.15 zeigt ein beispielhaftes Schnittprofil und die markierten Amplituden, die für die Berechnung des Faktors verwendet werden.



**Abbildung 7.15:** Ein beispielhaftes Schnittprofil des Nahfeld-Fluoreszenzsignals mit hervorgehobener Signal-Amplitude (gelb) und Hintergrundrauschen (grau).

Je höher das Signal-Rausch-Verhältnis ist, desto besser heben sich die Fluoreszenzpeaks vom Hintergrund ab. Zu beachten ist, dass die Stärke des Hintergrundrauschens, welches durch die Subtraktion um Null fluktuiert, aber selbst auch von der Fluoreszenzintensität abhängig ist: Die Fernfeldpeaks sind rauschbehaftet, was auch nach dem Abzug der eigentlichen Emissionsintensität noch persistent bleibt. An den Stellen stärkerer Fernfeldpeaks bleibt somit auch nach der Subtraktion ein stärkeres Rauschen zurück, was sich auch in der Berechnung des RMS niederschlägt.

Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu bewerten, lässt sich auch das sogenannte *Rose-Kriterium* heranziehen, dem zufolge eine Struktur noch vom Hintergrund zu unterscheiden ist, sobald das SNR höher als 5 liegt [65].

Zur Errechnung werden die gleichen Profile wie in Abschnitt

7.4 zur Ermittlung der optischen Auflösung verwendet. Für die verschiedenen Proben wurden folgende Signal-Rausch-Verhältnisse ermittelt:

	TMV	DES L136P	DES H326R	QD 770
Durchschnitts-SNR	9.18	8.69	7.38	6.12

Für die Messungen mit den Tabakmosaikviren ergibt sich das höchste durchschnittliche Signal-Rausch-Verhältnis von 9,18. Wie bereits in den Beobachtungen angemerkt, zeigen die Quantendots mit ihren schlechten Fluoreszenzwerten das schwächste Signal-Rausch-Verhältnis mit 6,12. Die Desmin-Filamente liegen mit ihren Werten dazwischen.

Dieser Trend stimmt ungefähr mit den ermittelten optischen Auflösungen überein und es lässt sich beobachten, dass höhere Signal-Rausch-Verhältnisse mit kleineren durchschnittlicheren Peakbreiten und dementsprechend höheren Auflösungen in Zusammenhang stehen.

Desweiteren sind die Fluoreszenzamplituden sehr stark von den experimentellen Bedingungen abhängig, diverse äußere Einflüsse auf den Versuchsaufbau sind als Fehlerquelle zu berücksichtigen. Hierzu zählen hauptsächlich die eingestellte Intensität der Anregungslichtquelle und der Einkoppelwinkel des evaneszenten Feldes, wobei bei Abweichung die Intensität exponentiell abfällt. Außerdem kann es zwischen den Bauteilen des Aufbaues zu Drifteffekten kommen, welche mit der Zeit nachgeregelt werden müssen. Daher sind Schwankungen in den Ergebnissen jederzeit auf die experimentellen Bedingungen zurückführbar.

Einen weiteren Einfluss hierauf kann die Form der zu untersuchenden Struktur haben: So sind die Tabakmosaikviren ~18 nm im Durchmesser, der allerdings bei immobilisierten Viren in der Höhe auf ~15 nm schrumpft und in der Breite auf ~40 nm anwächst. Ursache für dieses Verhalten ist die Adhäsion durch Coulomb-Wechselwirkung, durch welche versucht wird die Kontaktfläche mit der Glasoberfläche zu maximieren und sich das Viruskapsid dementsprechend verformt. Trotz der verringerten Dicke ist davon auszugehen, dass die auf der gesamten Oberfläche zufällig verteilten Farbstoffmoleküle nicht alle von der Cantileverspitze erreicht werden können und nah genug an das stark lokalisierte

Nahfeld heranreichen. Die Marker an der Unterseite tragen somit zwar zur Hintergrundfluoreszenz bei, liefern allerdings keine lokalisierten Nahfeld-Peaks. Die Marker direkt an der Oberfläche sind hingegen sehr gut für die Cantileverspitze zugänglich und können einfach angeregt werden, was hohe Fluoreszenzemissionen gegenüber dem Hintergrund zur Folge hat. Die Desmin-Filamente sind mit einem Durchmesser von 10nm dünner als die Viren, und Farbstoffe innerhalb des Filaments und an der Unterseite können möglicherweise trotzdem leicht angeregt werden. Ihre Emissionsamplitude ist daher geringer, da sie zwar ins Nahfeld, aber nicht in den der Spitze am dichtesten liegenden Bereich mit der stärksten Feldüberhöhung vordringen.

Das schlechte Fluoreszenzverhalten und damit das schlechte durchschnittliche Signal-Rausch-Verhältnis der Quantendots, welches nur knapp über dem Grenzwert des Rose-Kriteriums liegt, könnte zurückgeführt werden auf eine sich auflösende Beschichtung, mit welcher diese versehen sind um Verklumpungen zu verhindern und ihnen besondere Oberflächeneigenschaften zu geben, beispielsweise bestimmte Löslichkeitsverhalten, wie in diesem Fall Hydrophilie.

## *7.6 Auflösung durch Abstände*

Die Bestimmung der erreichten Auflösung über die Halbwertsbreite ist nur eine grobe Maßnahme, um abschätzen zu können, wann zwei Strukturen noch als getrennt wahrgenommen werden könnten. Diese Methode geht von der augenscheinlichen Breite eines einzigen Peaks aus, da in der Fluoreszenzmikroskopie der Abstand zwischen zwei Strukturen nicht beliebig variiert werden kann, um einen absoluten Grenzwert zu ermitteln. Außerdem gibt es variierende Definitionen, ab welchem Abstand zwei Beugungsmuster als getrennt betrachtet werden können, da die Wahrnehmung hier ein subjektiver Eindruck ist. So reichen die Definitionen vom Rayleigh-Kriterium mit 26% Helligkeitsunterschied zwischen dunkelstem und hellstem Punkt bis zum Sparrow-Kriterium bei dem es gerade keinen Unterschied der Helligkeit zwischen den beiden Lichtpunkten gibt [5].

Allerdings lassen sich natürlich die erhaltenen Aufnahmen nach eng beieinander liegenden Strukturen untersuchen, um so eine Ahnung von der real erreichten Auflösung zu

bekommen. In der Tat liegen in folgendem Bild eines Tabakmosaikvirus gleich vier Farbstoffmoleküle sehr dicht beieinander:

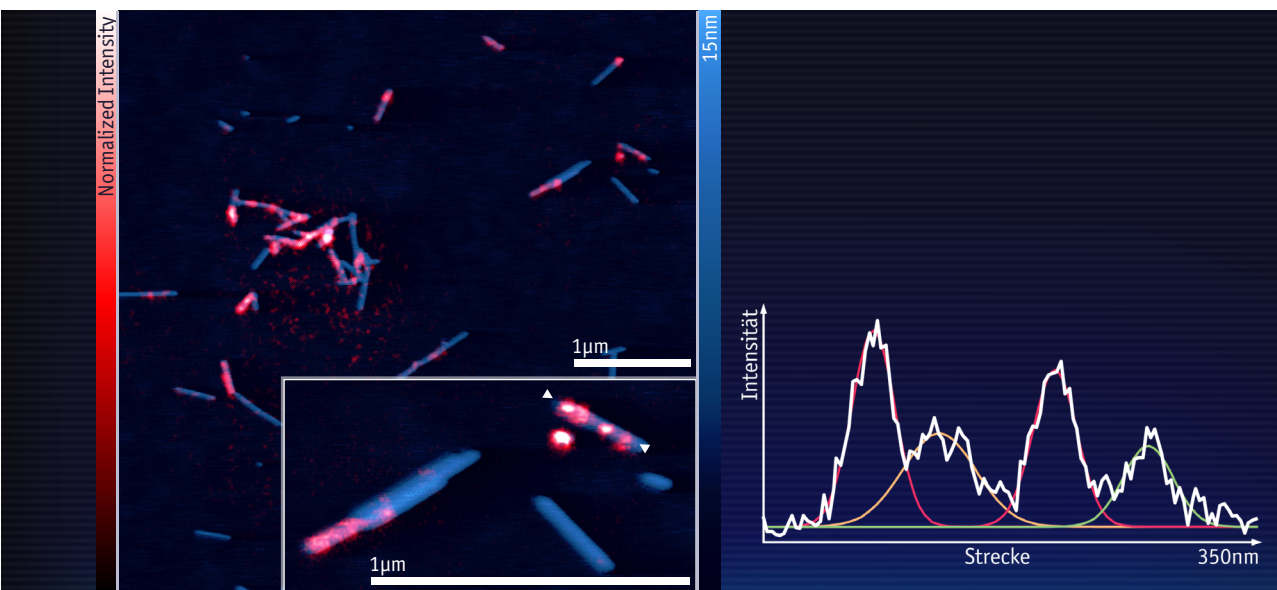


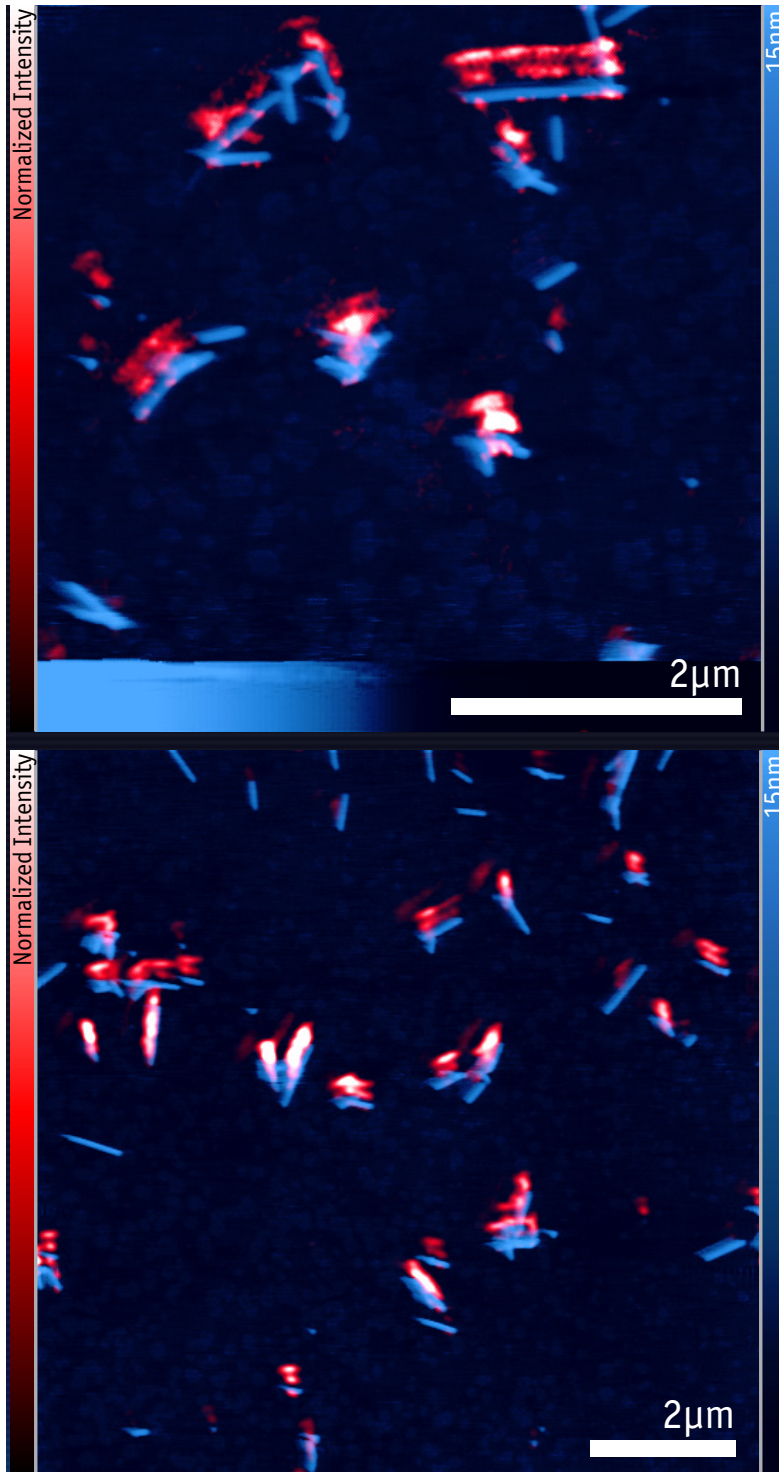
Abbildung 7.16: aSNOM-Aufnahme von Tabakmosaikviren mit vier dicht beieinander lokalisierten Peaks.

Durch das Anfitzen von Gaußkurven an jeden einzelnen der vier Peaks werden die genauen Mittelpunkte bestimmt und daraus ihre Abstände zueinander errechnet. Die kürzeste Entfernung ist in Abbildung 7.16 hervorgehoben. Die beiden Marker liegen 47,5 nm voneinander entfernt und lassen sich klar noch als zwei separate Peaks identifizieren. Damit ist zwar nicht die Obergrenze der möglichen Auflösung des Mikroskops gegeben, sehr wohl jedoch ein Mindestwert, der definitiv erreicht wurde. Dieser korrespondiert außerdem gut mit dem im vorigen Abschnitt 7.4 bestimmten Mittelwert der Halbwertsbreite von 44,7 nm.

## 7.7 Artefakte

Analog zur Kraftmikroskopie ist bei der optischen Nahfeldmikroskopie die Auflösung abhängig von der Spitzengeometrie. Durch die Abtastung in Rasterbewegung ist der Bilderzeugungsprozess eine Faltung der Spitzengeometrie mit der Oberflächenstruktur, oder bei letzterer mit der Fluorophorverteilung.

Weist die Spitze bestimmte Formationen auf, führt dies dazu, dass diese im Bild als wiederholte Artefakte sichtbar werden. Abbildung 7.17 zeigt ein Mehrfachartefakt in der Fluoreszenz. Es handelt es sich um ein Dreifach-Artefakt, wobei ebenfalls auftretende Topographie-Artefakte zu erkennen sind, allerdings in orthogonaler Richtung zu den Fluoreszenzartefakten.

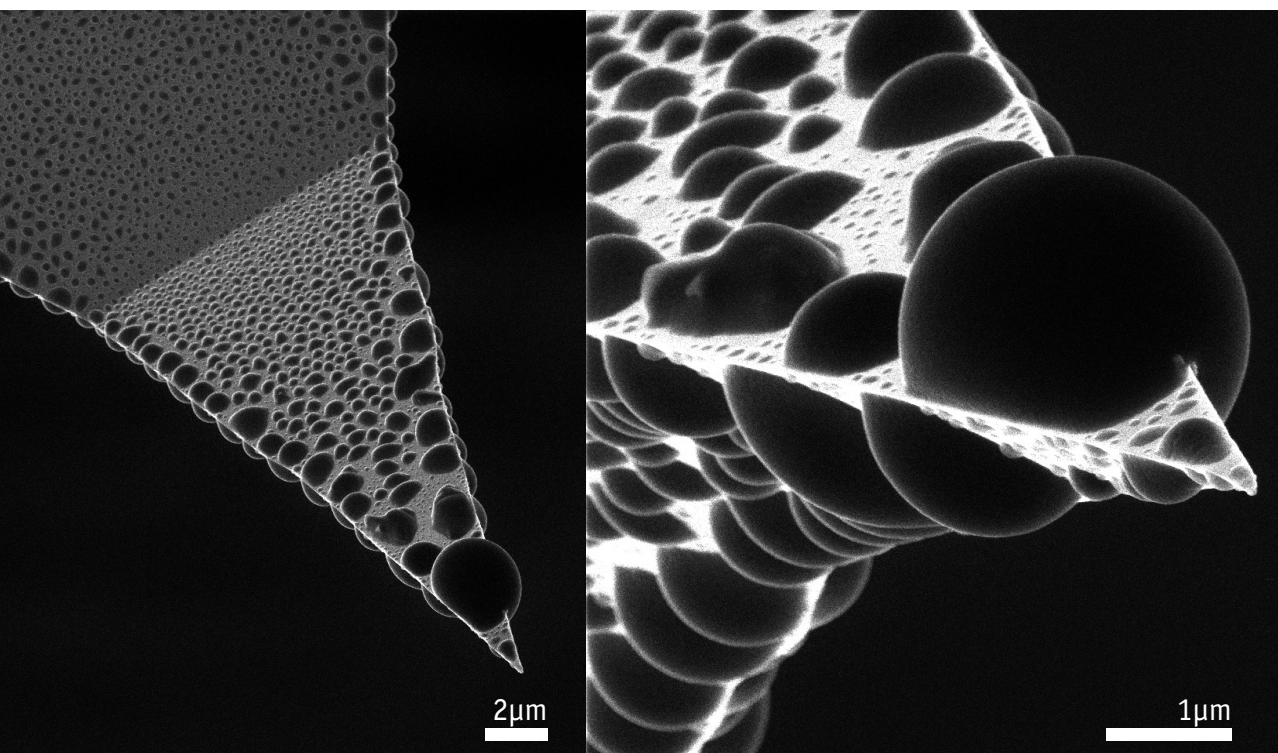


*Abbildung 7.17: aSNOM-Aufnahmen von Tabakmosaikviren, die Fluoreszenzartefakte aufweisen.*

Bruchkanten an der Spitze machen sich bei der Abtastung der Topographie in der Kraftmikroskopie schnell bemerkbar, da diese in der Größenordnung der zu untersuchenden Strukturen liegen. Die Ausdehnung des Nahfelds ist hingegen sehr klein, da die Intensität exponentiell mit der Entfernung von der Oberfläche abfällt. Weist der Cantilever durch Bruch Mehrfachspitzen auf, so machen sich diese normalerweise nicht durch Fluoreszenzartefakte bemerkbar, sobald sie sich in ihrer Höhe schon geringfügig unterscheiden.

Da Fluoreszenzartefakte daher nur sehr selten auftreten, war es von Interesse die fehlerhaften Cantilever genauer zu untersuchen. Dafür stand ein Helium-Ionen-Mikroskop (HIM) zur Verfügung, das mittels eines Ionenstrahls Strukturen abrastern und Bilder mit Auflösungen im Bereich von 0,75 nm liefern kann [Carl Zeiss SMT GmbH].

Abbildung 7.18 zeigt eine Aufnahme der Spitze zu dem Dreifachartefakt aus Bild 7.17.

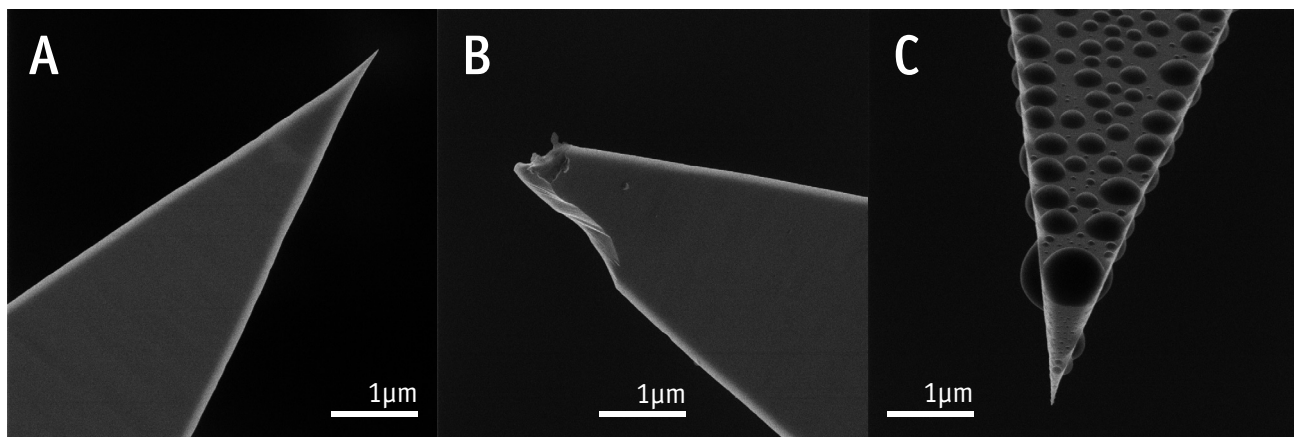


*Abbildung 7.18: HIM-Aufnahmen des Cantilevers, der die Dreifachartefakte zeigte.*

Sofort ins Auge fallen die großen tropfenförmigen Ablagerungen an der Spitze, die bei einem normalen Cantilever aus Silizium nicht vorhanden sind. Untersuchungen weiterer Cantilever zeigen, dass die Ablagerungen auf allen verwendeten Cantilevern auftraten, auch auf solchen, die fehlerfreie Bilder erzeugten.



Abbildung 7.19(A) zeigt die Aufnahme eines fabrikneuen unbehandelten Cantilevers aus der gleichen Charge wie die verwendeten, Abbildung (B) einen Cantilever, der mit Schraubensicherungslack auf dem Keramikträger befestigt wurde. Beide weisen keine sichtbaren Ablagerungen oder Verunreinigungen auf. Hingegen ist auf Abbildung (C) ein Cantilever zu sehen, der zwar nicht verwendet, aber bereits auf den Keramikträger aufgeklebt wurde. Dieser weist ebenfalls die tropfenartigen Ablagerungen auf. Dies legt nahe, dass es sich bei den Ablagerungen, die von ihrer Struktur her stark an kondensierte Tropfen erinnern, um Niederschlag einer Ausdünstung des verwendeten Epoxidharzklebers handeln könnte.

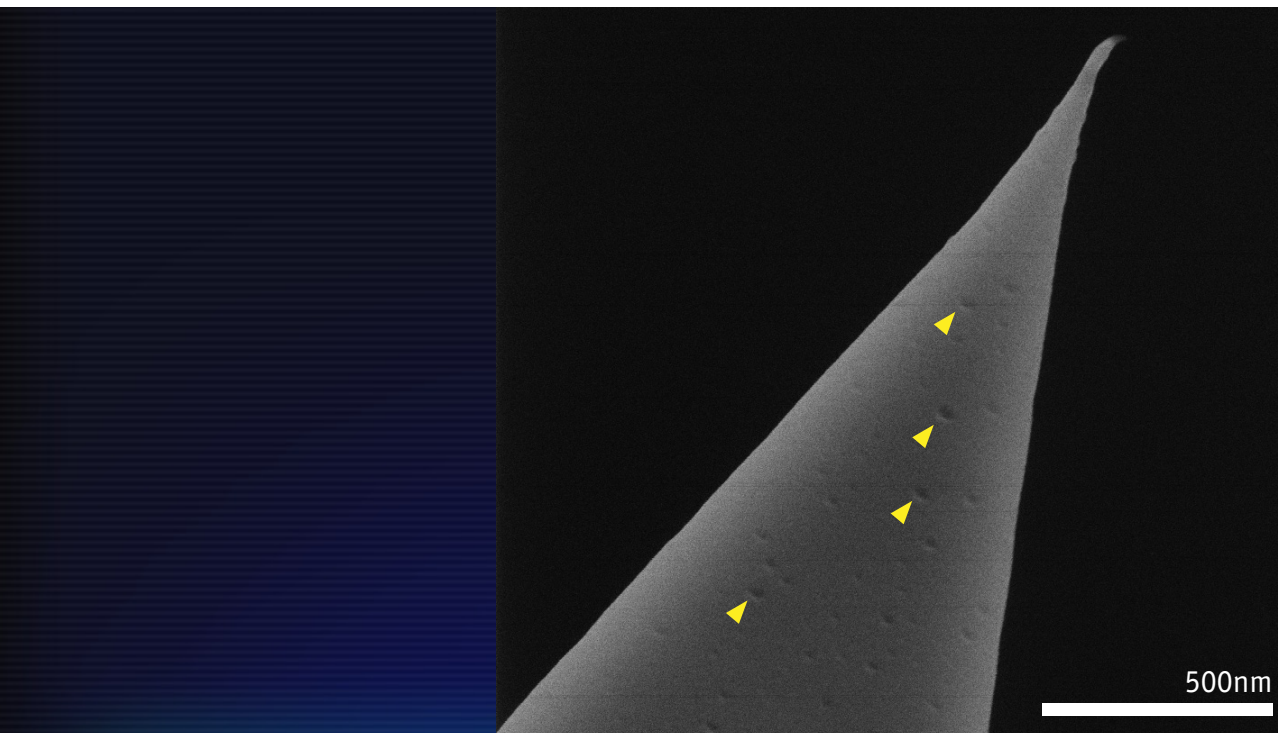


**Abbildung 7.19:** HIM-Aufnahmen eines neuen Cantilevers(A), eines gebrauchten, mit Schraubensicherungslack aufgeklebten Cantilevers(B) und eines ungebrauchten mit Epoxidklebers aufgeklebten Cantilevers(C).

Aufgrund dieses Verdachtes wurde eine neue Spitze mit einem weiteren Epoxidharzkleber (EPO-TEK 377, Epoxy Technology) präpariert und ebenfalls im Helium-Ionen-Mikroskop betrachtet, wie Abbildung 7.20 zeigt.

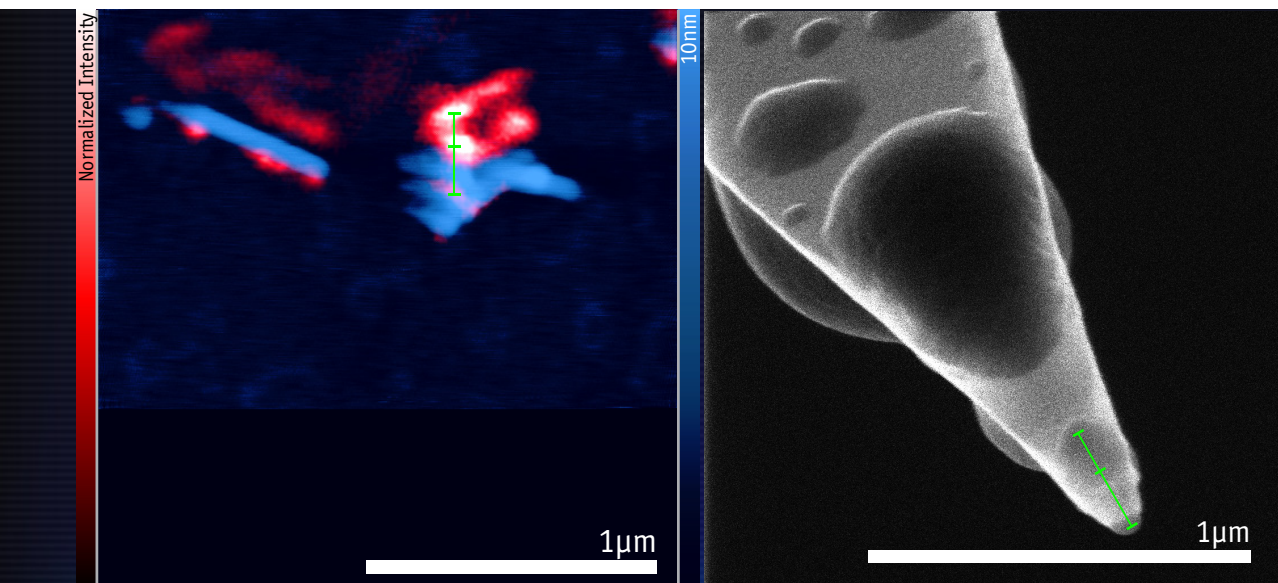
Wie durch die Markierungen gezeigt, weist auch diese Spitze tropfenförmige Ablagerungen und Verunreinigungen auf, obgleich bei weitem nicht so stark wie die restlichen verwendeten Messspitzen.

Da es sich bei den Artefakten um eine Faltung mit der Spitzengeometrie handelt, sollte es möglich sein, die Geometrie der Artefakte auf die der Spitze zu übertragen. Ebenfalls auffällig ist auf den Fluoreszenzbildern in Aufnahme 7.17 die Verbreiterung und Verstärkung der oberen beiden Peaks, wobei der unterste leicht geringere Intensität zeigt und relativ präzise an der AFM-Topographie lokalisiert ist.



**Abbildung 7.20:** HIM-Aufnahme eines Cantilevers, der mit EPO-TEK 377 Kleber aufgeklebt wurde. An den markierten Stellen sind ebenfalls tropfenartige Verunreinigungen zu erkennen.

Ausgemessen beträgt der Abstand zwischen den beiden äußeren Punkten  $\sim 350$  nm. In Abbildung 7.21 wird versucht, die Geometrie auf die HIM-Aufnahme der fehlerhaften Spitze anzuwenden.



**Abbildung 7.21:** Geometrische Abbildung des Fluoreszenzartefakts auf die Spitze, welche dieses erzeugt hat.

Die Projektion des Artefakts auf die Spitze ist nur bedingt möglich, da die Spitze geneigt zur Probe steht und das HIM auch nur eine begrenzte Auflösung geliefert hat. Gingen diese multiplen Anregungen auf die beobachteten tropfenförmigen Niederschläge zurück, so wäre denkbar dass diese ebenfalls Feldüberhöhungen generieren. Die Arbeiten [28], [29] und [30] kommen zu dem Ergebnis, dass höhere Öffnungswinkel stärkere Feldintensitäten verursachen können. Demzufolge könnte durch die sphärische Geometrie der Tropfen ein stärkeres, aber weniger lokalisiertes Nahfeld erzeugt werden, welches für die beiden stärkeren und breiteren Anregungen verantwortlich wäre.

Jedoch sind die chemische Natur sowie die optischen Eigenschaften der abgelagerten Substanz gänzlich unbekannt, so dass dies nur Spekulation bleiben kann.

# 8 Fazit

Von all den verschiedenen Mikroskopiemethoden, die es ermöglichen tief ins Innere von biologischen Zellen vorzudringen, hebt sich die aperturlose optische Nahfeldmikroskopie hervor, weil sie eine spezielle Kombination aus unterschiedlichen Informationen liefert: sub-Wellenlängen-auflösende Fluoreszenzdaten parallel zu topographischen Kraftmikroskopiedaten. Der große Vorteil, der sich aus der Überlagerung dieser Daten ergibt, wurde hier an zwei biologischen Systemen, die Gegenstand aktueller Forschung sind, demonstriert.

Die individuelle Adressierung der Kapsidproteine des Tabakmosaikvirus soll der Konstruktion nanoelektrischer Strukturen dienen. Durch die Farbstoffmarker konnten mittels optischer Nahfeldmikroskopie die Schnittstellen erfolgreich identifiziert werden, an welchen die nanoelektrischen Modifikationen möglich sind.

Das Intermediärfilament Desmin ist maßgeblich an der Stabilität von menschlichen Herzmuskelzellen beteiligt. Mutationen des Desmin-Gens werden mit einigen Formen der Myopathie in Zusammenhang gebracht; der genaue Wirkungsmechanismus dieser Mutationen auf die Krankheit ist jedoch noch nicht bekannt. Die Nahfeldmikroskopie konnte hier erfolgreich eingesetzt werden, um markierte Desminproteine innerhalb eines assemblierten Filaments oder - im Falle der Mutation L136P - innerhalb der Aggregationen zu lokalisieren, einen Einblick in den Assemblierungsprozess zu geben und deren Beteiligung an der Fehlbildung nachzuweisen.

Es wurde eine sehr hohe optische Auflösung erzielt, die weit über der Auflösung liegt, welche durch normale Lichtmikroskopie erreicht werden kann, da diese durch Beugungseffekte begrenzt ist.

Der hier verwendete Aufbau konnte Strukturen mit einer Größe von maximal 33 nm und einem Signal-Rauschverhältnis von 9,18 abbilden, was nahe an der Grenze von 24 nm liegt, die mit selbigem Versuchsaufbau in einer anderen Arbeit ebenfalls an Tabakmosaikviren und Desmin erzielt wurden [62].

Mit vergleichbaren Versuchsanordnungen im aperturlosen Modus wurden Auflösungen von 50 bis 100 nm gezeigt [12], sogar bis zu 10 nm und einem Signal-Rauschverhältnis von

25,5 bei fluoreszenten Molekülen an einem DNA-Strang (unter Verwendung einer Phasen-Filterungstechnik [11]). Bei Einzelmolekülen auf einer Oberfläche in wässriger Umgebung konnte eine Größenordnung von 20 nm beobachtet werden [21].

Es konnten die Vorteile der Kombination von Fluoreszenzmikroskopie und Kraftmikroskopie aufgezeigt werden. Die beiden gleichzeitig vorhandenen Datenkanäle liefern einen wichtigen Beitrag zur Interpretation und ermöglichten hier die erfolgreiche Lokalisierung von markierten Einzelbausteinen in großen assemblierten Superstrukturen. Somit kann die aperturlose optische Nahfeldmikroskopie als eine geeignete Untersuchungsmethode für biologische und nanotechnologische Anwendungen angesehen werden.



## 8.1 Danksagungen

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti bedanken, der mir ermöglichte, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen.

Danken möchte ich auch Dr. Volker Walhorn für die Betreuung und dass er mir immer mit Ideen weitergeholfen hat, wenn sonst nichts mehr ging.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Alexander Harder, der mir geduldig den Aufbau erläuterte und immer den auch manchmal trivialeren Fragen zur Verfügung stand.

Mareike Dieding danke ich für die Hilfe bei der Chemie und den Multimode-Aufnahmen sowie Christoph Pelargus für die technische Unterstützung und die HIM-Messungen.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Andreas Brodehl, der mir die Veröffentlichung einiger Ergebnisse ermöglichte, Herrn Prof. Dr. Hendrik Milting für die Bereitstellung der Desmin-Mutationen und Frau Prof. Dr. Christina Wege für die Tabakmosaikviren, sowie Herrn Prof. Dr. Thomas Huser für die Erstellung des Zweitgutachtens, meinem Bürokollegen Lukas Galla, der bei allen anderen Angelegenheiten Rat wusste und Daniel Fliege für das Korrekturlesen.

Zum Schluss möchte ich auch meinen Dank der gesamten Arbeitsgruppe *Experimental Biophysics & Applied Nanoscience* der Universität Bielefeld aussprechen, für die freundliche und respektvolle Atmosphäre und Zusammenarbeit.

## 8.2 Literaturverzeichnis

- [1] BIRCH, THOMAS: *The History of the Royal Society of London for Improving of Natural Knowledge*/1. Reprograf. Nachdr. der Ausg. London 1756., 1968.
- [2] HOPPE, WALTER, ed: *Biophysik*. 2., völlig Neubearb. Aufl. Berlin [u.a.]: Springer, 1982.
- [3] ALBERTS, BRUCE: *Molecular Biology of the Cell*. 4. ed. New York, NY: Garland Science, 2002.
- [4] DARNELL, JAMES E.: *Molekulare Zellbiologie*. Berlin [u.a.]: de Gruyter, 1994.
- [5] HECHT, EUGENE: *Optik*. 4., überarb. Aufl. München [u.a.]: Oldenbourg, 2005.
- [6] ABBE, E.: *Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung*. Archiv für mikroskopische Anatomie, 9:413–468, 1873.
- [7] OHTSU, MOTOICHI, KIYOSHI KOBAYASHI.: *Optical Near Fields*. Advanced Texts in Physics. Berlin [u.a.]: Springer, 2004.
- [8] PEDROTTI, FRANK L.: *Optik*. 1. Aufl. München [u.a.]: Prentice Hall, 1996.
- [9] SCHULZ, OLAF, ZHAO ZHAO, ALEX WARD, MARCELLE KOENIG, FELIX KOBERLING, YAN LIU, JÖRG ENDERLEIN, HAO YAN und ROBERT ROS: *Tip induced fluorescence quenching for nanometer optical and topographical resolution*. Optical Nanoscopy, 2(1):1–8, 2013.
- [10] AMOS, B., G. MCCONNELL, T. WILSON: *Confocal microscopy. Biophysical Techniques for Characterization of Cells*. Comprehensive Biophysics, Elsevier, Academic Press, Amsterdam, 3-23, 2012.
- [11] MA, ZIYANG, JORDAN M. GERTON, LAWRENCE A. WADE und STEPHEN R. QUAKE: *Fluorescence near-field microscopy of DNA at sub-10 nm resolution*. Phys Rev Lett, 97(26):260801, Dec 2006.



- [12] FREY, HEINRICH G., SUSANNE WITT, KARIN FELDERER und REINHARD GUCKENBERGER: *High-resolution imaging of single fluorescent molecules with the optical near-field of a metal tip*. Phys Rev Lett, 93(20):200801, Nov 2004.
- [13] LOTTSPREICH, FRIEDRICH, ed.: *Bioanalytik*. 2. Aufl. Heidelberg: Spektrum, Akademischer Verlag, 2006.
- [14] DONEGAN, JOHN F., ed.: *Cadmium Telluride Quantum Dots*. Singapore: Pan Stanford, 2014.
- [15] ECKEL, RAINER, VOLKER WALHORN, CHRISTOPH PELARGUS, JÖRG MARTINI, JÖRG ENDERLEIN, THOMAS NANN, DARIO ANSELMETTI und ROBERT ROS: *Fluorescence-emission control of single CdSe nanocrystals using gold-modified AFM tips*. Small, 3(1):44–49, Jan 2007.
- [16] ZHANG, D., U. HEINEMEYER, C. STANCIU, M. SACKROW, K. BRAUN, L. E. HENNEMANN, X. WANG, R. SCHOLZ, F. SCHREIBER und A. J. MEIXNER: *Nanoscale spectroscopic imaging of organic semiconductor films by plasmon-polariton coupling*. Phys Rev Lett, 104(5):056601, Feb 2010.
- [17] *Product Information Atto740*, Atto-Tec GmbH, Siegen, 2013.
- [18] DARRIGOL, OLIVIER: *Electrodynamics from Ampère to Einstein*. Oxford [u.a.]: Oxford Univ. Press, 2000.
- [19] STEINLE, FRIEDRICH: *Explorative Experimente*. Boethius ; 50. Stuttgart: Steiner, 2005.
- [20] NOLTING, WOLFGANG: *Elektrodynamik*. Springer-Lehrbuch. 7. Aufl., 2004.
- [21] FREY, HEINRICH G., JAN PASKARBEIT und DARIO ANSELMETTI: *Tip-enhanced Single Molecule Fluorescence Near-field Microscopy in Aqueous Environment*. Applied Physics Letters, 94, 24, 241116, 2009.
- [22] KALININ, SERGEI: *Scanning Probe Microscopy*. New York: Springer Science+Business Media, LLC, 2007.

- [23] BEK, A., R. VOGELGESANG, K. KERN: *Apertureless Scanning Near Field Optical Microscope with Sub-10 nm Resolution*. Review of scientific instruments, 77, 4, 2006.
- [24] GUCCIARDI, PIETRO GIUSEPPE, GUILLAUME BACHELIER, STEPHAN J. STRANICK, MARIA ALLEGRINI: *Background-Free Apertureless Near-Field Optical Imaging*. Applied Scanning Probe Methods VIII, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1-29, 2008.
- [25] NOVOTNY, LUKAS: *The history of near-field optics*. Progress in Optics, 50:137–184.
- [26] BOUHELIER, A., LUKAS NOVOTNY, M. L. BRONGERSMA, P. G. KIK: *Near-Field Optical Excitation and Detection of Surface Plasmons*. Springer series in optical sciences, 131, 139, 2007.
- [27] GERSEN, H., M. F. GARCÍA-PARAJÓ, L. NOVOTNY, J. A. VEERMAN, L. KUIPERS und VAN HULST NF: *Influencing the angular emission of a single molecule*. Phys Rev Lett, 85(25):5312–5315, Dec 2000.
- [28] Y. C. MARTIN, H. F. HAMANN, und H. K. WICKRAMASINGHE: *Strength of the electric field in apertureless near-field optical microscopy*. J. Appl. Phys. 89, 5774, 2001.
- [29] Y. KAWATA, C. XU, und W. DENK: *Feasibility of molecular-resolution fluorescence near-field microscopy using multi-photon absorption and field enhancement near a sharp tip*. J. Appl. Phys. 85, 1294, 1999.
- [30] CORY, H., A. C. BOCCARA, J. C. RIVOAL und A. LAHRECH: *Electric Field Intensity Variation in the Vicinity of a Perfectly Conducting Conical Probe: Application to Near-field Microscopy*. Microwave & Optical Technology Letters, 18, 2, 120, 1998.
- [31] MAIER, STEFAN A.: *Plasmonics*. New York: Springer, 2007.

- [32] FREY, H. G., C. BOLWIEN, A. BRANDENBURG, R. ROS und D. ANSELMETTI: *Optimized apertureless optical near-field probes with 15 nm optical resolution*. Nanotechnology, 17(13):3105, 2006.
- [33] ANGER, PASCAL, PALASH BHARADWAJ und LUKAS NOVOTNY: *Enhancement and quenching of single-molecule fluorescence*. Phys Rev Lett, 96(11):113002, Mar 2006.
- [34] WALHORN, VOLKER, JAN PASKARBEIT, HEINRICH GOTTHARD FREY, ALEXANDER HARDER und DARIO ANSELMETTI: *Distance dependence of near-field fluorescence enhancement and quenching of single quantum dots*. Beilstein J Nanotechnol, 2:645–652, 2011.
- [35] YOSKOVITZ, EYAL, IDO HADAR, AMIT SITT, ITAI LIEBERMAN und URI BANIN: *Interplay of quenching and enhancement effects in apertureless near-field fluorescence imaging of single nanoparticles*. The Journal of Physical Chemistry C, 115(32):15834–15844, 2011.
- [36] YOSKOVITZ, E., D. ORON, I. SHWEKY, U. BANIN: *Apertureless Near-Field Distance-Dependent Lifetime Imaging and Spectroscopy of Semiconductor Nanocrystals*. Journal of physical chemistry c, 2008, 112, 42, 16306, 2008.
- [37] HARRISON, B. D., T. M. A. WILSON: *Milestones in the Research on Tobacco Mosaic Virus*. Philosophical Transactions: Biological Sciences, Vol. 354, Issue 1383, 521-529, 1999.
- [38] STUBBS, GERALD: *Tobacco Mosaic Virus Particle Structure and the Initiation of Disassembly*. Philosophical Transactions: Biological Sciences, Vol. 354, Issue 1383, 551-55, 1999
- [39] LEWANDOWSKI, DENNIS J., W. O. DAWSON: *Tobamoviruses*. Encyclopedia of Virology, Three-Volume Set, 1780-1783, 1999.

- [40] ATANASOVA, PETIA, DIRK ROTHENSTEIN, JÖRG J. SCHNEIDER, RUDOLF C. HOFFMANN, STEFAN DILFER, SABINE EIBEN, CHRISTINA WEGE, HOLGER JESKE und JOACHIM BILL: *Virus-templated synthesis of ZnO nanostructures and formation of field-effect transistors*. Adv. Mater, 23(42):4918–4922, Nov 2011.
- [41] GEIGER, FANIA C., FABIAN J. EBER, SABINE EIBEN, ANNA MUELLER, HOLGER JESKE, JOACHIM P. SPATZ und CHRISTINA WEGE: *TMV nanorods with programmed longitudinal domains of differently addressable coat proteins*. Nanoscale, 5(9):3808–3816, May 2013.
- [42] BÄR, HARALD, SERGEI V. STRELKOV, GUNNAR SJÖBERG, UELI AEBI und HARALD HERRMANN: *The biology of desmin filaments: how do mutations affect their structure, assembly, and organisation?* JStructBiol, 148(2):137–152, Nov 2004.
- [43] BÄR, HARALD, NORBERT MÜCKE, PHILIPPE RINGLER, SHIRLEY A. MÜLLER, LAURENT KREPLAK, HUGO A. KATUS, UELI AEBI und HARALD HERRMANN: *Impact of Disease Mutations on the Desmin Filament Assembly Process*. Journal of Molecular Biology. Vol. 360 Issue 5, 1031-1042. 12p., Jul 2006.
- [44] GOLDFARB, LEV G., MONTSE OLIVÉ, PATRICK VICART und HANS H. GOEBEL: *Intermediate filament diseases: desminopathy*. Adv Exp Med Biol, 642:131–164, 2008.
- [45] DIEDING, MAREIKE: *Rasterkraftmikroskopische Untersuchung der in vitro Assemblierung und Struktur des Intermediärfilaments Desmin*. Diplomarbeit, Universität Bielefeld (Fakultät für Physik), 2011.
- [46] BRODEHL, ANDREAS: *Charakterisierung von Kardiomyopathieassoziierten Desmin Mutanten*. Dissertation, Universität Bielefeld (Fakultät für Chemie), 2012.

- [47] BRODEHL, ANDREAS, MAREIKE DIEDING, NIKLAS BIERE, TIM SKRZIPCZYK, BÄRBEL KLAUKE, VOLKER WALHORN, JAN GUMMERT, UWE SCHULZ, BRENDA GERULL, MATTHIAS VORGERT, DARIO ANSEMETTI und HENDRIK MILTING: *The novel DES mutation p.L136P has a dominant effect on desmin assembly leading to severe dilative cardiomyopathy without involvement of the skeletal muscle*. In Vorbereitung. 2014.
- [48] WINHEIM, STEFAN, AARON R. HIEB, MARLEEN SILBERMANN, EVA-MARIA SURMANN, TATJANA WEDIG, HARALD HERRMANN, JÖRG LANGOWSKI und NORBERT MÜCKE: *Deconstructing the late phase of vimentin assembly by total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM)*. PLoS One, 6(4):e19202, 2011.
- [49] HERRMANN, HARALD, HARALD BÄR, LAURENT KREPLAK, SERGEI V. STRELKOV und UELI AEBI: *Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics*. Nat Rev Mol Cell Biol, 8(7):562–573, Jul 2007.
- [50] HERRMANN, HARALD, SERGEI V. STRELKOV, PETER BURKHARD und UELI AEBI: *Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity*. J Clin Invest, 119(7):1772–1783, Jul 2009.
- [51] KIRMSE, ROBERT, STEPHANIE PORTET, NORBERT MÜCKE, UELI AEBI, HARALD HERRMANN und JÖRG LANGOWSKI: *A quantitative kinetic model for the in vitro assembly of intermediate filaments from tetrameric vimentin*. J Biol Chem, 282(25):18563–18572, Jun 2007.
- [52] BINNIG, G., C.F. QUATE und C. GERBER: *Atomic Force Microscope*. Physical Review Letters, 56:930–933, 1986.
- [53] KAUPP, GERD: *Atomic Force Microscopy, Scanning Nearfield Optical Microscopy and Nanoscratching*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2006.
- [54] HAUGSTAD, GREG: *Atomic Force Microscopy*. Hoboken, NJ: Wiley, 2012.

- [55] SYNGE, E. H.: *A suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region*. *Philos. Mag.*, 6:356–262, 1928.
- [56] NOVOTNY, LUKAS: *From Near-field Optics to Optical Antennas*. *Physics Today*, 2011, 64, 7, 47, 2011.
- [57] LIAO, CC., YL LO: *Phenomenological Model Combining Dipoleinteraction Signal And Background Effects For Analyzing Modulated Detection In Apertureless Scanning Near-Field Optical Microscopy*. *Progress In Electromagnetics Research-Pier*, 112, 415, 2011.
- [58] HÖPPENER, CHRISTIANE, RYAN BEAMS, LUKAS NOVOTNY: *Background Suppression in Near-Field Optical Imaging*. *Nano Letters: a Journal Dedicated to Nanoscience and Nanotechnology*, 9, 2, 903, 2009.
- [59] FARAHANI, JAVAD N., HANS-JÜRGEN EISLER, DIETER W. POHL, MICHAEL PAVIUS, PHILIPPE FLÜCKIGER, PHILIPPE GASSER, BERT HECHT: *Bow-tie Optical Antenna Probes for Single-emitter Scanning Near-field Optical Microscopy*. *Nanotechnology*, 18, 12, 125506, 2007.
- [60] PASKARBEIT, JAN: *Cantileverbasierte Nahfeldmikroskopie*. *Diplomarbeit, Universität Bielefeld (Fakultät für Physik)*, 2008.
- [61] HERMANSON, GREG T.: *Bioconjugate Techniques*. [Nachdr.]. San Diego [u.a.]: Academic Press, 2007.
- [62] HARDER, ALEXANDER: *Optomechanische Untersuchungen an Biomolekülen mittels Rastersondenmikroskopie*. *Dissertation, Universität Bielefeld (Fakultät für Physik)*, 2014.

- [63] KLAUKE, BAERBEL, SABINE KOSSMANN, ANNA GAERTNER, KRISTINA BRAND, INES STORK, ANDREAS BRODEHL, MAREIKE DIEDING, VOLKER WALHORN, DARIO ANSELMETTI, DÉsirÉE GERDES, BIRTE BOHMS, UWE SCHULZ, EDZARD ZU KNYPHAUSEN, MATTHIAS VORGERD, JAN GUMMERT und HENDRIK MILTING: *De novo desmin-mutation N116S is associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*. Hum Mol Genet, 19(23):4595–4607, Dec 2010.
- [64] MÜLLER-ESTERL, WERNER: *Biochemie*. Korrigierter Nachdr. der 1. Aufl. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl., 2009.
- [65] PAWLEY, JAMES B., ed. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. 3. ed. New York: Springer, 2006.
- [66] HARDER, ALEXANDER, MAREIKE DIEDING, VOLKER WALHORN, SVEN DEGENHARD, ANDREAS BRODEHL, CHRISTINA WEGE, HENDRIK MILTING und DARIO ANSELMETTI: *Apertureless scanning near-field optical microscopy of sparsely labeled tobacco mosaic viruses and the intermediate filament desmin*. Beilstein J Nanotechnol, 4:510–516, 2013.
- [67] BRODEHL, ANDREAS, PER NIKLAS HEDDE, MAREIKE DIEDING, AZRA FATIMA, VOLKER WALHORN, SUSAN GAYDA, TOMO ŠARIC, BÄRBEL KLAUKE, JAN GUMMERT, DARIO ANSELMETTI, MIKE HEILEMANN, GERD ULRICH NIENHAUS und HENDRIK MILTING: *Dual color photoactivation localization microscopy of cardiomyopathy-associated desmin mutants*. J Biol Chem, 287(19):16047–16057, May 2012.
- [68] POHL, D. W., W. DENK und M. LANZ: *Optical stethoscopy: Image recording with resolution  $\lambda/20$* . Applied Physics Letters, 44(7):651–653, 1984.
- [69] MURANISHI, M., K. SATO, S. HOSAKA, A. KIKUKAWA, T. SHINTANI, K. ITO: *Control of Aperture Size of Optical Probes for Scanning Near-field Optical Microscopy Using Focused Ion Beam Technology*. Japanese Journal Of Applied Physics Part 2-Letters & Express Letters, 1997, 36, 7b, L942, 1997.

- [70] ERMUSHEV, A.V., B. V. MCHEDLISHVILI, V. A. OLEINIKOV, A. V. PETUKHOV: *Surface Enhancement of Local Optical Fields and the Lightning-rod Effect*. Quantum Electronics : a Translation of the Journal Kvantovaya Elektronika, 23, 5, 435, 1993.
- [71] NOVOTNY, LUKAS: *Single Molecule Fluorescence in Inhomogeneous Environments*. Applied Physics Letters, 69, 25, 3806, 1996.
- [72] HECHT, B., H. BIELEFELDT, Y. INOUE, D. W. POHL und L. NOVOTNY: *Facts and artifacts in near-field optical microscopy*. Journal of Applied Physics, 81(6):2492–2498, 1997.
- [73] KRASAVIN, ALEXEY V., ANATOLY V. ZAYATS: *Silicon-based Plasmonic Waveguides*. OPTICS EXPRESS, 18, 11, 11791, 2010.
- [74] HOPPENER, C., LUKAS NOVOTNY: *Imaging of Membrane Proteins Using Antenna-based Optical Microscopy*. Nanotechnology, 19, 38, 2008.
- [75] FORT, E., S. GRESILLION: *Surface Enhanced Fluorescence*. Journal of Physics D-Applied Physics, 41, 1, Jan 2008.
- [76] HUBER, C., A. TRÜGLER, U. HOHENESTER, Y. PRIOR, W. KAUTEK: *Optical Near-field Excitation at Commercial Scanning Probe Microscopy Tips: a Theoretical and Experimental Investigation*. Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP, 16, 6, 2289, 2014.
- [77] MINSKY, MARVIN: *Microscopy Apparatus*. US Patent 3.013.467, Eingereicht 7. November 1957, erteilt 19. Dezember 1961.
- [78] RUST, MICHAEL J., MARK BATES, XIAOWEI ZHUANG: *Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)*. Nature Methods, 3, 793–796, 2006.



- [79] CIRACÌ, C., R. T. HILL, J. J. MOCK, Y. URZHUMOV, A. I. FERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ, S. A. MAIER, J. B. PENDRY, A. CHILKOTI, D. R. SMITH: *Probing the Ultimate Limits of Plasmonic Enhancement*. *Science*, 337, 6098, 1072, 2012.





