

Biologische Anwendungen der Fluoreszenz-Nahfeldmikroskopie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat)

vorgelegt von

Achim Klaus Kirsch

Universität Konstanz

Fakultät für Physik

September 1998

Dissertation der Universität Konstanz
Datum der mündlichen Prüfung: 28. 10. 1998

Referent: Prof. Dr. J. Mlynek
Referent: Prof. Dr. P. Leiderer

Die Arbeit ist im Cuvillier Verlag Göttingen erschienen.
ISBN 3-89712-366-5

Kontakt: CUVILLIER VERLAG
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Tel.: 0551 - 54724 - 0
Fax.: 0551 - 54724 - 21

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	4
1.1 Das Auflösungsvermögen optischer Instrumente	8
1.1.1 Laterale Auflösung im Fernfeld	8
1.1.2 Laterale Auflösung im Nahfeld	12
1.2 Das optische Nahfeld: theoretische Beschreibungen	14
1.3 Experimentelle Techniken	20
1.3.1 Nahfeldoptische Sonden	21
1.3.2 Abstandsregelmechanismen	24
1.4 Anwendungen	24
2 Nahfeldmikroskopie mit Glasfaserspitzen	26
2.1 Modell für die Nahfeldmikroskopie im <i>shared-aperture</i> -Modus	29
2.2 Berechnung der Moden der dünnen Glasfaser	30
2.3 Abbildungseigenschaften des Fasermodells	39
3 Aufbau des optischen Nahfeldmikroskops	43
3.1 Die Faserspitze	44
3.2 Der Sensorkopf	45
3.3 Experimente zum Scherkraftmechanismus	49
3.4 Scherkraftmikroskopische Abbildung	52
3.5 Hellfeldreflexionsaufbau	55
3.5.1 Aufbau der Hellfelddetektion	55
3.5.2 Detektion synchron zur Faserschwingung	57
3.6 Fluoreszenz-Nahfeldmikroskopie	60
3.6.1 Aufbau des Fluoreszenz-Nahfeldmikroskops	63
3.6.2 Der Modenfilter	65

4	Anwendungen des Fluoreszenz-Nahfeldmikroskops	71
4.1	LB-Filme mit Metallkomplexdiade	72
4.1.1	Die Ru(II)-Rh(III)-Metallkomplexdiade	73
4.1.2	LB-Filmherstellung	75
4.1.3	Die Diade an der Wasseroberfläche	77
4.1.4	Die Diade in LB-Filmen	78
4.1.5	Modell des LB-Films	86
4.2	FRET	90
4.2.1	Experimenteller Aufbau	93
4.2.2	Akzeptorbleichen FRET	95
4.2.3	Donorbleichen FRET auf PVA-Filmen	97
4.2.4	Donorbleichen FRET auf Zellen	101
4.2.5	Diskussion	103
4.3	Fluoreszenz-Nahfeldmikroskopie an GFP in Zellen	106
4.3.1	Das <i>Green Fluorescent Protein</i> (GFP)	107
4.3.2	GFP in <i>E.coli</i> -Bakterien	111
4.3.3	GFP in <i>Drosophila</i> -Schneiderzellen	116
4.3.4	ErbB-1-EGFP-Fusionsprotein	119
4.3.5	Diskussion	120
5	Zweiphotonen-Nahfeldmikroskopie	122
5.1	Fluoreszenzanregung durch Zweiphotonenabsorption	124
5.2	Experimentelle Techniken	126
5.2.1	Optischer Aufbau	126
5.2.2	Fluoreszenz-Leistungskurven	129
5.2.3	Fluoreszenz-Abstandskurven	130
5.3	Anwendung der Zweiphotonenanregung im Nahfeldmikroskop	131
5.3.1	Fluoreszenz-Nahfeldmikroskopie mit Zweiphotonenanregung	131
5.3.2	Fluoreszenz-Leistungskurven	143
5.3.3	Fluoreszenz-Abstandskurven	148
5.3.4	Bleichexperimente	153
5.4	Diskussion zur Mehrphotonenabsorption in einem optischen Nahfeldmikroskop	154
6	Ausblick	157
	Literaturverzeichnis	161
	Danksagung	179

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit dem Aufbau und der Anwendung eines optischen Nahfeldmikroskops, welches für Untersuchungen an biologischen Proben entworfen wurde. Mit diesem Mikroskop können simultan mit der Probentopographie optische Signale mit einer Auflösung jenseits der Abbeschen Auflösungsgrenze aufgezeichnet werden. Neben der Entwicklung der notwendigen nahfeldoptischen Techniken und Methoden wurde insbesondere auf die Implementation der aus der optischen Fernfeldmikroskopie bekannten Kontrastmechanismen Wert gelegt. Dies ist wichtig, wenn die optische Nahfeldmikroskopie ein für die Biologie bedeutendes hilfreiches Analysewerkzeug werden soll.

Ausgehend von der Erfahrung, daß die Herstellung der gängigen Apertursonden große Probleme bezüglich der Reproduzierbarkeit aufweist, wurden dielektrische Glasfaserspitzen als lokale Sonden für das optische Nahfeld ausgewählt. Sie können sehr gut reproduzierbar hergestellt werden und dienen im *shared-aperture*-Modus sowohl zur Beleuchtung der Probe als auch zum Aufsammeln des von der Probe stammenden Lichtes. Für die Abschätzung der theoretisch erzielbaren Auflösung wurden die Faserspitzen als dünne Glasfasern in Luft modelliert. Aus der Form der in der Glasfaser geführten Moden ergibt sich, daß bei einer Lichtwellenlänge von 488 nm Punkte mit einem Abstand von 120 nm aufgelöst werden können.

Da biologische Proben in der Regel erhebliche Variationen in der Dicke aufweisen, wurde das Mikroskop mit einer Scherkraftdetektion ausgestattet, die es erlaubt, die Sonde der Probentopographie nachzuführen. Die Sensitivität der Scherkraftdetektion reichte aus, einzelne Plasmid-DNA-Moleküle auf einer Glimmeroberfläche abzubilden.

Als erster optischer Kontrastmechanismus wurde die Hellfeldreflexion aufgebaut. Neben dem Gleichanteil des Reflexionssignals kann auch ein synchron zur Faserschwingung modulierter Anteil detektiert werden, der es sogar erlaubt, die Schwingungsrichtung der

Faser bei der Scherkraftdetektion zu bestimmen. Bilder, die sich aus der Aufzeichnung des Reflexionssignals ergeben, können Strukturen mit Größen im Bereich von 70 nm, ohne Korrelation zu Strukturen im Topographiebild, aufweisen. Die Interpretation dieser Bilder ist jedoch sehr schwierig.

Als zweiter Kontrastmechanismus wurde die Detektion des Fluoreszenzsignals realisiert. In diesem Modus kann neben der statischen Fluoreszenzemission auch die Bleichrate und die integrierte Fluoreszenzemission der Probe bestimmt werden. Aus diesen Daten kann die Verteilung von Fluorophoren, unabhängig von deren Fluoreszenzquantenausbeuten, bestimmt werden. Dies wurde am Beispiel von Langmuir-Blodgett-Filmen, die eine Ru(II)-Rh(III)-Metallkomplexdiade enthalten, demonstriert. Mit einem Mehrschichtmodell für den aus Diade und Stearinsäure bestehenden Film können die optischen Daten und die mit einem Kraftmikroskop und der Scherkraftdistanzregelung bestimmte Topographie des Filmes konsistent erklärt werden.

Eine weitere wichtige Methode bei der Fluoreszenzmikroskopie ist die Messung des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET) von einem angeregten Donormolekül auf ein Akzeptormolekül. Dies bietet die Möglichkeit, Abstände auf einer Längenskala von 1 bis 10 nm zu messen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal der Energietransfer über die Methoden des Akzeptor- und des Donorbleichens im Nahfeldmikroskop nachgewiesen. Die bei der Methode des Donorbleichens aufgezeichneten Bleichkurven werden sowohl mit einem einfachen Modell, bei dem ein einziger Abstand zwischen den Molekülen angenommen wird, als auch mit einem Modell, welches der statistischen Verteilung der Moleküle im Film Rechnung trägt, simuliert.

In der Zell- und Entwicklungsbiologie sind das *green fluorescent protein* (GFP) und seine Mutanten sehr wichtige fluoreszente Markermoleküle. Mit dem Nahfeldmikroskop wurden verschiedene Zellkulturen untersucht, die verschiedene Mutanten des GFP exprimieren. *E.coli*-Bakterien reichern das Protein im wesentlichen homogen in ihrem Zellkörper an und zeigen, abhängig von der exprimierten GFP-Mutante, nur Veränderungen der Morphologie. Im Gegensatz dazu bilden sich in *Drosophila*-Schneiderzellen, die eine für die Expression in *Drosophila* optimierte GFP-Mutante exprimieren, Einschlußkörper, die als diskrete helle Punkte mit Durchmessern von 150 bis 400 nm abgebildet werden. Diese Messungen zeigen, daß auch Fluoreszenzsignale aus dem Innern von getrockneten Zellen detektiert werden können. Mit einem an das Nahfeldmikroskop angeschlossenen Spektrographen wurde nachgewiesen, daß die in diesen Präparaten beobachtete Fluoreszenz von dem GFP stammt.

Die Zweiphotonenanregung von Farbstoffen in der Fernfeldmikroskopie bietet den großen Vorteil, daß die Anregung der Moleküle nur im Fokus erfolgt. Dadurch ergibt sich eine inhärente dreidimensionale Auflösung und ein verbessertes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals die Anregung von Farbstoffen über die simultane Absorption von zwei Photonen mit einem Dauerstrichlaser im optischen Nahfeldmikroskop realisiert. Dadurch ist es möglich, im UV absorbierende Farbstoffe mit rotem Licht zur Fluoreszenz anzuregen. Außerdem wird die mit blauem (bzw. ultraviolett) Licht angeregte Autofluoreszenz der verwendeten Glasfaser vermieden, die sonst den Hauptbeitrag zum Hintergrundsignal liefert. Fluoreszenzmessungen an gefärbten Polymerkugeln mit 120 nm Durchmesser ergaben, daß im Mittel die Kugeln um 100 nm vergrößert abgebildet werden. Die kleinsten beobachteten Strukturen in den Fluoreszenzbildern waren 150 nm groß.

Mit einem gepulsten Infrarotlaser konnte außerdem erstmals die simultane Anregung von Farbstoffen durch Zwei- und Dreiphotonenabsorption im optischen Nahfeldmikroskop demonstriert werden. Die kleinsten mit diesem Laser durch Zweiphotonenabsorption beobachteten fluoreszenten Strukturen waren etwa 190 nm groß. Es konnte nachgewiesen werden, daß sich die Anregung der Fluorophore durch Zweiphotonenabsorption auf einen Bereich um die Spitze beschränkt. Insbesondere ist die Dicke der Schicht, die zum Fluoreszenzsignal beiträgt, weniger als halb so groß wie nach der Anregung über einen äquivalenten Einphotonenprozeß.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß ein im *shared-aperture*-Modus arbeitendes Nahfeldmikroskop für Untersuchungen an biologischen Systemen, insbesondere auch aufgrund der Vielfalt der möglichen Kontrastmechanismen, gut geeignet ist.

Kapitel 1

Einleitung

In vielen naturwissenschaftlichen und medizinischen Bereichen hat sich die optische Mikroskopie als ein sehr hilfreiches Instrument zur Untersuchung kleiner Strukturen erwiesen. Dies liegt vor allem an der Vielzahl verschiedener Kontrastmechanismen, die zur Darstellung von Strukturen verwendet werden können, und daran, daß sich die Probe unter fast allen Bedingungen, sei es in physiologischer Pufferlösung oder in Vakuum, untersuchen läßt. Desweiteren transportiert das Licht nicht nur räumliche Informationen, sondern über seine spektrale Zusammensetzung, seine Polarisierung und seine Zeitabhängigkeit kann es noch sehr viel mehr Informationen über die Probe enthalten.

In der Physik ist man sehr oft an den optischen Eigenschaften der Probe selbst interessiert, da sie die energetischen Eigenschaften widerspiegeln. Umstände, die zu einer Veränderung dieser energetischen Eigenschaften führen, können oftmals über eine Veränderung in den Spektren nachgewiesen werden. In der Biologie hingegen ist man nur in wenigen Fällen an den optischen Eigenschaften des Objekts selbst interessiert. Sehr viel häufiger kommt es vor, daß fluoreszierende Farbstoffmoleküle zugesetzt werden, um einen optischen Kontrast zu erzeugen. Dazu wurde eine Vielzahl von Farbstoffen mit sehr spezifischen Eigenschaften entwickelt, die sich zum Beispiel an bestimmte Objekte, wie z. B. DNA oder Mitochondrien, binden und dadurch über Ort, Form und Größe dieses Objekts Aufschluß geben, oder deren Emissionsspektrum vom Säuregrad oder einer Ionenkonzentration abhängt und die dadurch über diese Probeneigenschaften lokal Aufschluß geben. Dadurch ist es möglich, die Verteilung beziehungsweise den funktionalen Zustand von biologischen Strukturen und von Makromolekülen abzubilden.

Eine interessante Erweiterung der Möglichkeiten der Lichtmikroskopie bieten das Konfokal- und das 2-Photonen-Mikroskop. Die axiale Auflösung wird durch die Einführung

einer Blende sowohl im Beleuchtungs- als auch im Detektionslichtweg beziehungsweise der Einschränkung der Fluoreszenzanregung durch den 2-Photonen-Prozeß auf einen kleinen Bereich um den Fokus des Objektivs erhöht, so daß die Erfassung optischer Schnitte möglich ist. Dadurch kann z. B. die dreidimensionale Verteilung der Fluoreszenz in einer Probe bestimmt werden. Die maximale laterale Auflösung wird mit diesen Mikroskopen nicht verbessert, da die räumliche Grenzfrequenz, die das optische System überträgt, nicht vergrößert wird (Inoué, 1995). Allerdings kann sich für andere Auflösungsdefinitionen, die vom Verlauf der Punktabbildungsfunktion abhängen, eine Verbesserung ergeben. So ist z. B. die volle Breite beim halben Maximalwert des Bildes eines Punktes im Konfokalmikroskop nur 73 % der entsprechenden Breite in einem normalen optischen Mikroskop (Corle und Kino, 1996).

Eine große Einschränkung der optischen Mikroskopie entsteht aus dem aufgrund von Beugung lateral auf etwa die halbe Wellenlänge, typischerweise ca. 200 nm, beschränkten Auflösungsvermögen. Strukturen, die näher beieinander liegen, werden nicht mehr als getrennt wahrgenommen. Es gibt die Möglichkeit, die Entfernung zwischen zwei geeignet gewählten Farbstoffen im Bereich zwischen 1 nm und 10 nm über den Fluoreszenz-Energie-Transfer spektral zu kodieren. Allerdings bleibt damit immer noch der zwischen diesen Längenskalen liegende Bereich, der der Lichtmikroskopie nicht zugänglich ist.

Da es jedoch sehr viele Strukturen gibt, die von der Größe her in diesen Bereich fallen, wurden und werden viele Versuche unternommen, im Mikroskop eine bessere Auflösung zu erzielen. Das Auflösungsvermögen skaliert meist mit der Wellenlänge der verwendeten Strahlung. Daher erlauben Mikroskope, die kürzerwellige Strahlung, wie zum Beispiel Röntgenstrahlung oder Elektronen verwenden, kleinere Strukturen abzubilden, als es mit dem Lichtmikroskop möglich ist. Insbesondere die Elektronenmikroskopie ergab eine Vielzahl interessanter Ergebnisse zur Struktur von biologischen Objekten, wie zum Beispiel den Polytän-Chromosomen der Zuckmücke *Chironomus tetans* (Pelling und Allen, 1993). Allerdings haben diese Mikroskope – neben dem großen apparativen Aufwand – auch methodische Nachteile. So können die meisten für die Lichtmikroskopie entwickelten Markierungstechniken nicht mehr eingesetzt werden, und es ist nicht immer möglich, während der Untersuchung die für die Probe idealen Umgebungsbedingungen beizubehalten. Dies trifft besonders für die Elektronenmikroskopie von biologischen Objekten zu, da im für das Elektronenmikroskop notwendigen Vakuum Zellen weder leben, noch Moleküle in einem funktionsfähigen Zustand verbleiben können.

Eine andere Möglichkeit, kleine Strukturen im Nanometerbereich abzubilden, bieten

die verschiedenen Rastersondenmikroskope, die seit der ersten Realisation des Rastertunnelmikroskops durch Binnig und Rohrer (1982) entwickelt wurden. Anstelle von Strahlung verwenden sie sehr kleine Sonden, die mit der Probenoberfläche wechselwirken. Da diese Sonden idealerweise nur einen Punktkontakt zur Probe ausbilden, muß die Probenoberfläche Punkt für Punkt abgetastet werden. Aus den Koordinaten der Meßpunkte und den jeweiligen Meßwerten läßt sich dann ein zweidimensionales Bild der Verteilung der Meßgröße auf der Probenoberfläche gewinnen. Besonders interessante Ergebnisse hat dabei zum Beispiel das Rastertunnelmikroskop ergeben, mit dem selbst die Ausbildung elektronischer Oberflächenwellen abgebildet werden konnte (Crommie et al., 1995).

Die Vereinigung von Lichtmikroskopie und Rastersondenmikroskopie wird als „optisches Nahfeldmikroskop“ bezeichnet (engl. *scanning near-field optical microscope*, *SNOM*). Es bietet die Möglichkeit, optische Kontrastmechanismen und die für die Lichtmikroskopie entwickelten Markierungstechniken mit einer verbesserten lateralen Auflösung zu kombinieren, denn die Abbildung im Nahfeldmikroskop ist im Gegensatz zu den bisher erwähnten optischen Mikroskopen nicht beugungsbeschränkt. Außerdem ist die verwendete Sonde oftmals auch zur Messung weiterer Probeneigenschaften geeignet, so daß simultan zum optischen Bild ein weiterer Informationskanal, wie z. B. die Probentopographie, aufgezeichnet werden kann.

Der Hauptaspekt der vorliegenden Arbeit ist die Anwendung eines optischen Nahfeldmikroskops mit dielektrischen Faserspitzen auf vornehmlich biologische Systeme. Dazu wurde ein bestehendes kommerzielles Kraftmikroskop derart umgebaut, daß das zu einer feinen Spitze geformte Ende einer optischen Faser als lokale Sonde verwendet werden kann. Die theoretische Analyse der Moden in einer dünnen Glasfaser in Kapitel 2 zeigt, daß mit derartigen Faserspitzen eine optische Auflösung jenseits des Beugungslimits möglich ist.

Der Aufbau des Mikroskops und die verwendeten Techniken zur Abstandsregelung werden in Kapitel 3 vorgestellt. Messungen zum mechanischen Verhalten der Faserspitze bei der Annäherung an die Probenoberfläche und Beispiele für die scherkraftmikroskopische Abbildung charakterisieren das System. Der prinzipielle Aufbau der Optik zur Detektion der Reflexion und Fluoreszenz werden dargestellt.

Das 4. Kapitel beschäftigt sich mit verschiedenen Anwendungen des optischen Nahfeldmikroskops mit Fluoreszenzdetektion. Als erstes werden Untersuchungen von Langmuir-Blodgett-Filmen, die eine Metallkomplexdiade enthalten, vorgestellt. Die Diade zeigt einen vektoriellen photoinduzierten Elektronentransfer, so daß sie das erste Element eines mittels der organischen Chemie hergestellten Systems zur Umwandlung von Licht in elektrischen

Strom sein kann.

Wie schon erwähnt, erlaubt die Bestimmung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) zwischen zwei Molekülen deren Abstand im Nanometerbereich zu bestimmen. Anhand von Beispielmessungen an gefärbten Polymerfilmen und Zellen wird im Abschnitt 4.2 der Nachweis von FRET im optischen Nahfeldmikroskop gezeigt. Durch die Kombination der Nahfeldmikroskopie mit FRET ist es möglich, eine Kolokalisierung von Farbstoffpaaren bis auf wenige Nanometer, kombiniert mit der Lokalisierung des Farbstoffpaares auf der Probenoberfläche, durchzuführen.

Das *green fluorescent protein* (GFP), auf das im dann nächsten Abschnitt eingegangen wird, ist in seinem natürlichen Vorkommen in der Qualle *Aequoria victoria* auch Partner eines derartigen Energieübertrags. In der Biologie spielt es allerdings nicht deswegen eine derart herausragende Rolle, sondern aufgrund der Tatsache, daß der Farbstoff ausschließlich aus nativen Aminosäuren besteht (Abschnitt 4.3.1), d. h. von Zellen selbst hergestellt und durch Klonierung mit anderen Proteinen fusioniert werden kann, und somit eine einfache Lokalisierung dieser Proteine erlaubt. Ich werde unter anderem Messungen an *E.coli* Bakterien und *Drosophila*-Schneiderzellen, die GFP exprimieren, zeigen.

In Kapitel 5 wird dann auf die 2-Photonen-Nahfeldmikroskopie eingegangen. Diese Technik bietet gegenüber der 1-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie ein stark verbessertes Signal-zu-Hintergrundverhältnis bei der Fluoreszenzanregung von Farbstoffen, die im nahem UV absorbieren, eine Beschränkung der Fluoreszenzanregung auf eine dünnere Oberflächenschicht und vermeidet ein Ausbleichen der Probe durch Streulicht.

Bevor näher auf die Arbeiten mit dielektrischen Faserspitzen eingegangen wird, möchte ich noch in die Nahfeldmikroskopie im Allgemeinen einführen. Dazu werden zunächst einige Überlegungen zum optischen Auflösungsvermögen im Fern- und Nahfeld vorgestellt. In diesem Zusammenhang werden auch einige der theoretischen Ansätze erwähnt, über die versucht wird, die Kontrastentstehung im Nahfeldmikroskop zu beschreiben. Daran anschließend wird auf verschiedene Entwicklungen im Bereich der Sondenherstellung und der Topographienachführung eingegangen. Dies sind die entscheidenden für die Nahfeldmikroskopie spezifischen Bereiche. Ein kurzer Überblick über Anwendungen des optischen Nahfeldmikroskops beschließt die Einführung.

Einen literarischen Einstieg in die optische Nahfeldmikroskopie bieten die Bücher von Paesler und Moyer (1996) und Fillard (1996), der Tagungsband zur Tagung „Photons and Local Probes“ (Marti und Möller, 1995) und die Tagungsbände zu den NFO-Tagungen in Arc-et-Senans (Frankreich 1992), Raleigh (NC, USA 1993), Brno (Tschechische Republik

1995) und Jerusalem (Israel 1997) (Pohl und Courjon, 1993; Isaacson, 1995; Paesler und van Hulst, 1995; van Hulst und Lewis, 1998).

1.1 Das Auflösungsvermögen optischer Instrumente

Einer der wichtigsten Vorteile der optischen Nahfeldmikroskopie ist die Auflösungsverbesserung im Vergleich zu Mikroskopen, die nur das optische Fernfeld einsetzen. Da die analytische und numerische Beschreibung der Nahfeldmikroskopie sehr schwierig und aufwendig ist, werde ich in diesem Abschnitt versuchen, über eine stark vereinfachte Beschreibung des Abbildungsvorgangs im Nahfeldmikroskop ein intuitives Verständnis für die Ursache der gesteigerten Auflösung zu entwickeln. Dazu wird zunächst die Beugungsbeschränkung der lateralen Auflösung im Fernfeld diskutiert (Hecht, 1989; Fowles, 1989). Die daran anschließende Beschreibung über Fourierkomponenten und deren Abbildung im Fern- und Nahfeld lehnt sich an die Arbeiten von J. M. Vigoureux et al. an (Vigoureux et al., 1992; Vigoureux und Courjon, 1992).

Die Ergebnisse, die in diesen Abschnitten dargestellt werden, beruhen auf mathematischen Modellen und idealen abbildenden Systemen. Die laterale Auflösung wird sich meist durch die Wellenlänge λ der verwendeten Strahlung und die numerische Apertur NA definieren lassen. Diese Rechnungen sind allerdings nur eingeschränkt auf real existierende Mikroskope zu übertragen, da es keine perfekt abbildenden optischen Systeme gibt. Gäbe es sie, könnte man zum Beispiel im Falle der Auflösung zweier Punkte ein Modell numerisch an die Messung anpassen und dadurch eine unbegrenzte Auflösung erzielen (den Dekker und van den Bos, 1997). In der Praxis sind alle abbildenden Systeme mit Bildfehlern behaftet, so daß die Punktabbildungsfunktion (engl. *point-spread function*) nicht genau bekannt und die numerische Anpassung an ein Modell immer mit systematischen Fehlern behaftet ist. Außerdem gehen diese Auflösungsdefinitionen von berechneten, rauschfreien Bildern aus. Im Falle von tatsächlich gemessenen Bildern, die Rauschen enthalten, ist die Auflösung auch durch systematische und zufällige Fehler beschränkt, die sich der Beschreibung durch ein mathematisches Modell entziehen (Goodman, 1968).

1.1.1 Laterale Auflösung im Fernfeld

Die Auflösung eines beliebigen klassischen optischen Systems ist begrenzt, da nicht alle vom Objekt ausgehende Wellen zum Bild beitragen.

Als anschauliches Beispiel mag die Abbildung eines optischen Gitters dienen. Bei einem Gitter mit einem Linienabstand d unter paralleler Beleuchtung bilden sich Intensitätsmaxima unter den Winkeln α_m zum ungebeugten Strahl aus, für die gilt $m \lambda = d n \sin(\alpha_m)$. Dabei ist n der Brechungsindex im Medium, in dem sich das Gitter befindet, λ die Wellenlänge des Lichtes im Vakuum und m die Beugungsordnung. Um ein Bild mit einer das Gitter darstellenden Modulation zu erzeugen, muß das Objektiv neben der nullten Beugungsordnung auch noch mindestens die erste Ordnung aufsammeln. Das heißt, α_1 muß kleiner als θ sein, wobei θ der halbe Öffnungswinkel des Objektivs ist. Daraus ergibt sich für den minimalen Gitterabstand, der mit einem derartigen Mikroskop abgebildet werden kann:

$$d_{\min} = \frac{\lambda}{NA} \quad \text{mit} \quad NA = n \cdot \sin \theta .$$

NA wird als die numerische Apertur des Objektivs bezeichnet. Falls nicht mit achsparalleler Beleuchtung gearbeitet wird, muß NA durch die Summe der numerischen Aperturen des Objektivs und des Kondensors ersetzt werden (Inoué, 1995).

Um die Abbildung eines Punktes zu behandeln, ist es zweckmäßig, sich dies als einen Aufbau zur Beobachtung der Fraunhofer-Beugung vorzustellen (Abbildung 1.1, links). Dabei dient der Punkt als ideale Lichtquelle, und die Linsenfassung des Objektivs stellt eine zirkuläre Blende mit Durchmesser $2R$ dar. An dieser Blende wird das von dem Punkt ausgehende Licht gebeugt, und das Beugungsbild wird durch die folgende Formel beschrie-

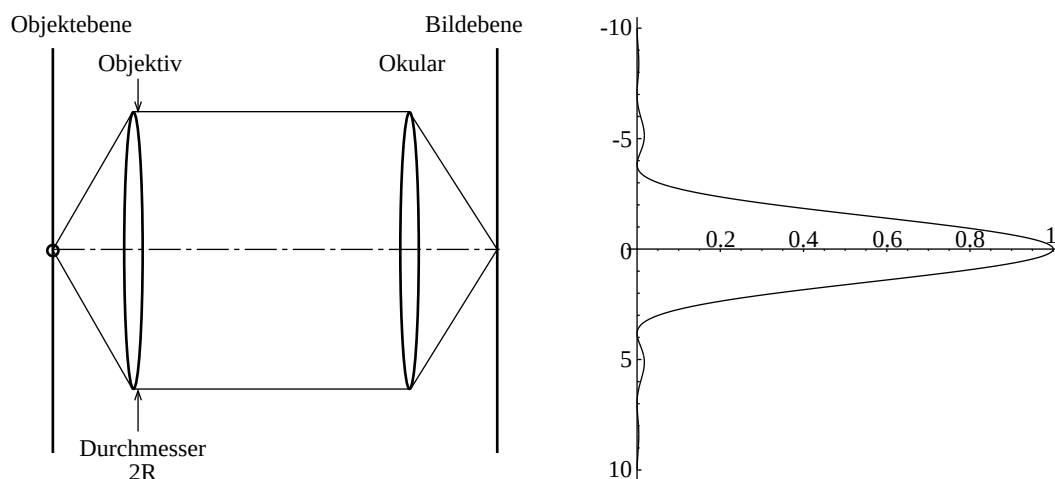


Abbildung 1.1: Schematische Zeichnung zur Abbildung eines Punktes im Mikroskop (links) und Airy-Muster als Bild eines Punktes in einem idealen abbildenden System (rechts)

ben:

$$I = I_0 \left[\frac{2J_1(\varrho)}{\varrho} \right]^2$$

Dabei ist J_1 die Besselfunktion erster Ordnung und ϱ ist $kR \sin \alpha$, wobei α der Winkel zur optischen Achse ist, in den das Licht gebeugt wird. $k = 2\pi/\lambda = \omega/c$ ist die Wellenzahl des Lichts. Das Bild eines Punktes ist somit kein Punkt mehr, sondern besteht aus einem zentralen hellen Bereich (Airy-Scheibchen), umgeben von sogenannten Airy-Ringen. Der Querschnitt durch das Bild des Punktes ist in Abbildung 1.1, rechts dargestellt. Die Intensitätsverteilung im Bild eines Punktes wird als Punktabbildungsfunktion bezeichnet. Sie ist charakteristisch für das abbildende System und kann in linearen Systemen dazu verwendet werden, das Bild eines beliebigen Objektes zu berechnen. Der Beugungswinkel α in diesen Gleichungen kann in reale Abstände in der Objektebene umgerechnet werden, so daß man anhand dieser Intensitätsverteilung Bedingungen für die optische Auflösung von zwei Punkten definieren kann.

Die wohl bekannteste Definition ist mit den Namen von Ernst Abbe und Lord Rayleigh verbunden und besagt, daß zwei gleich helle Punkte genau dann noch als getrennt angesehen werden können, wenn das Zentrum des Airy-Scheibchens des einen Punktes mit dem ersten Minimum des Airy-Musters des zweiten Punktes zusammenfällt (Hecht, 1989). Das erste Minimum ergibt sich aus der ersten Nullstelle der Besselfunktion erster Ordnung und liegt bei $\varrho = 3.83171$. Dies ergibt für die Auflösung die folgende Formel:

$$d_{min} = \frac{3.832}{2\pi} \cdot \frac{\lambda}{NA} = 0.61 \cdot \frac{\lambda}{NA}$$

In der Mitte zwischen den Punkten fällt die Intensität des Gesamtbildes auf etwa 74 % der Intensität im Bildzentrum eines einzelnen Punktes ab. Der Vorteil dieser Definition ist ihre Einfachheit, und der Kontrast von 74 % ist im allgemeinen mit dem Auge gut erkennbar. Allerdings können moderne Detektoren, wie zum Beispiel CCD-Kameras, auch noch sehr viel geringere Intensitätsunterschiede erfassen.

Eine andere Auflösungsdefinition, die unabhängig vom Kontrast ist, geht auf C. M. Sparrow zurück. Sie definiert die Auflösung dadurch, daß bei einem bestimmten Punktabstand das Intensitätsminimum zwischen den Zentren der Bilder der zwei Punkte verschwindet. Dies ist gleichbedeutend damit, daß die zweite Ableitung verschwindet. Sei $f(x)$ die Intensitätsverteilung im Bild eines Punktes, der sich an der Stelle $x = 0$ befindet. Das Gesamtbild $F(x)$ zweier Punkte an den Positionen $\pm x_0$ ist dann die Summe zweier um $\pm x_0$ verschobener Funktionen $f(x)$. Da $f(x)$ symmetrisch ist, gilt $F''(0) = 2f''(x_0)$. Somit

ergibt sich der minimale Abstand zwischen zwei Punkten, die nach dem Sparrow-Kriterium noch aufgelöst werden können, als das Doppelte des Abstandes des ersten Wendepunktes vom Zentrum des Bildes eines Punktes. Im Falle des Airy-Musters liegt der Wendepunkt bei $\varrho = 1.48770$. Die Auflösung ist somit¹

$$d_{min} = 0.47 \cdot \frac{\lambda}{NA}$$

Zur Vorbereitung der Untersuchung des Auflösungsvermögens in der Nahfeldmikroskopie möchte ich die vorigen Überlegungen zur Abbildung eines Punktes an einem zweidimensionalen Modell mit den Methoden der Fourier-Optik wiederholen (Vigoureux et al., 1992). Genauso wie die Beschränkung auf zwei Dimensionen dient die Annahme für den Brechungsindex $n = 1$ zur übersichtlicheren Darstellung. Die Geometrie des Modells ist in der Abbildung 1.2 dargestellt. Es wird die Abbildung eines Punktes mit monochromatischem Licht der Wellenlänge λ bzw. der Kreisfrequenz ω betrachtet.



Abbildung 1.2: Skizze des Modells zur Analyse der Abbildung eines Punktes am Ort $x = x_0$

Durch die Ortsfunktion $f(x) = \delta(x - x_0)$ wird ein Punkt an der Position x_0 in der Objektebene beschrieben. Sein Raumfrequenzspektrum ist dementsprechend

$$\tilde{f}(k_x) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} f(x) e^{ik_x x} dx = \frac{e^{ik_x x_0}}{2\pi}$$

Aus der Feldverteilung in der Ebene $z = 0$ ergibt sich die Feldverteilung in einer Ebene $z = Z$ zu (Goodman, 1968, Seite 50)

$$f(x, z = Z) = \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{f}(k_x, z = 0) e^{-ik_x x} e^{-i\sqrt{k^2 - k_x^2} Z} dk_x$$

¹Corle und Kino (1996) unterlief bei der Behandlung des Sparrow-Kriteriums ein Fehler (Gleichung 3.57), da sie nicht beachteten, daß sich der Meßwert am Ort der Punkte durch den jeweils anderen Punkt erhöht. Dadurch erhielten sie den Vorfaktor 0.51 anstelle von 0.47.

In der zweiten Exponentialfunktion ist k die Wellenzahl des verwendeten Lichts, und die Wurzel kann für $(k^2 - k_x^2) > 0$ positiv beziehungsweise für $(k^2 - k_x^2) < 0$ negativ imaginär sein. Die entsprechenden Feldkomponenten zu dk_x stellen somit homogene bzw. evaneszente Wellen dar, von denen letztere bei der Abbildung im Fernfeldmikroskop vernachlässigt werden können. Raumfrequenzen mit $|k_x| > k_{x\max} = \omega/c$ tragen somit nicht zum Bild bei, und die sich in einer Bildebene ergebende Feldverteilung ist

$$f(x, z = Z) = \frac{1}{2\pi} \int_{-k_{x\max}}^{k_{x\max}} e^{ik_x x_0} e^{-ik_x x} dk_x = \frac{\sin(k_{x\max}(x - x_0))}{\pi(x - x_0)}$$

Das erste Minimum der zugehörigen Intensitätsverteilung ergibt sich für $k_{x\max}(x - x_0) = \pi$, woraus sich als laterale Auflösung $d_{\min} = \lambda/2$ ergibt.

1.1.2 Laterale Auflösung im Nahfeld

Im vorangegangenen Abschnitt war gezeigt worden, daß die Auflösungsbeschränkung sich aus der Tatsache ergibt, daß nur ein Teil der Raumfrequenzen des Objekts vom Mikroskop zu einem entfernt liegenden Detektor transportiert werden kann. Dabei wurde angenommen, daß für die größte übertragene Raumfrequenz $k_{x\max}$ gilt, daß sie kleiner oder gleich der Wellenzahl des Lichts ist.

Für Fernfeldmikroskope ist diese Annahme legitim, da andernfalls die z-Komponente des Wellenvektors $k_z = \sqrt{k^2 - k_x^2}$ imaginär wird und das mit dieser Fourierkomponente verbundene optische Signal mit zunehmendem Abstand vom Objekt exponentiell abnimmt. Bei den in Fernfeldmikroskopen auftretenden Entfernungen können die mit diesen evaneszenten Wellen verbundenen Signale in guter Näherung vernachlässigt werden.

Allerdings ist aus der Analytizität des räumlichen Spektrums des Streufeldes bekannt, daß das an einem Objekt gestreute Feld neben homogenen auch evaneszente Wellen enthalten muß (Wolf und Nieto-Vesperinas, 1985). Die Nahfeldmikroskopie versucht, dieses evaneszente Feld und die darin enthaltene Information in den Abbildungsprozeß miteinzubeziehen. Um zu erläutern, wie die evaneszenten Feldkomponenten mit $k_x > 2\pi/\lambda$ zu einem weit entfernten Detektor transportiert werden können, soll das zweidimensionale Modell aus dem vorigen Abschnitt wieder aufgegriffen werden. Allerdings wird nun eine beliebige Sonde in eine Ebene mit Abstand $z = \epsilon < \lambda$ von der Objektebene gebracht (Abbildung 1.3).

Das Feld in der Ebene $z = 0$ ist

$$E_1(x, z = 0) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} e^{ik_x x_0} e^{-ik_x x} dk_x$$

In der Ebene $z = \epsilon$ der Sonde wird dieses Feld zu

$$E_1(x, z = \epsilon) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} e^{ik_x x_0} e^{-ik_x x} e^{-i\sqrt{k^2 - k_x^2} \epsilon} dk_x$$

Die Sonde selbst soll durch die komplexwertige Aperturfunktion $\mathcal{A}(x)$ beschrieben werden, so daß für das Feld hinter der Sonde gilt: $E_2(x, z = \epsilon) = E_1(x, z = \epsilon) \cdot \mathcal{A}(x)$. Das Fourier-spektrum dieses Feldes ist $\tilde{E}_2(k_x, z = \epsilon) = \tilde{E}_1(z = \epsilon) \otimes \tilde{\mathcal{A}}$, wobei $\tilde{\mathcal{A}}$ das Fourierspektrum der Sonde ist und $\otimes$ eine Faltung darstellt. Das Signal am Detektor bei $z = Z$ ist in diesem Fall also:

$$E_2(x, z = Z) = \int_{-k_{x \max}}^{k_{x \max}} e^{-ik_x x} \{ \tilde{E}_1(z = \epsilon) \otimes \tilde{\mathcal{A}} \} e^{-i\sqrt{k^2 - k_x^2} (Z - \epsilon)} dk_x$$

Die Integrationsgrenzen $\pm k_{x \max}$ ergeben sich wiederum aus der Fernfeldnäherung

$$e^{-\sqrt{k_x^2 - k^2} (Z - \epsilon)} = 0 \quad \text{für} \quad k_x > k_{x \max}$$

Wenn man sich auf eine Komponente K im räumlichen Spektrum der Sonde beschränkt, so ergibt die Faltung eine Verschiebung des Spektrums der Probe um $-K$. Das heißt, daß eine Fourierkomponente des Probenspektrums mit $k_x = K + k_0$ sich hinter der Sonde mit einer Raumfrequenz von $\sqrt{k^2 - k_0^2}$ in z -Richtung ausbreitet. Ist K größer als die Wellenzahl k , so können selbst Komponenten des Spektrums der Probe noch detektiert werden, deren laterale Komponente des Wellenvektors k_x größer als k ist und die ohne Sonde evaneszenten

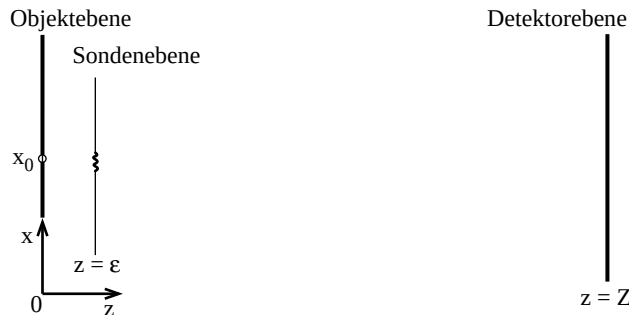


Abbildung 1.3: Skizze des Modells zur Analyse der Abbildung eines Punktes am Ort $x = x_0$ mit Hilfe einer Sonde in einem Abstand $z = \epsilon$

Wellen entsprechen würden. Dadurch erhält man auch die Information zur Beschreibung der Probe auf einer Längenskala kleiner als das Beugungslimit.

Aus dieser Rechnung ergeben sich einige wichtige Kenngrößen für die Funktionalität eines Nahfeldmikroskops. Das Spektrum der Probe wird mit dem Spektrum der Sonde gefaltet, und von dem Ergebnis werden die Komponenten mit $k_x < k_{x\max}$ zur Bildgebung verwendet. Je weiter und stärker das Spektrum der Sonde ist, desto weiter ist der Anteil des Probenspektrums, der zur Bildgebung verwendet werden kann. Da das Spektrum mit abnehmender Sondengröße breiter wird, können mit kleineren Sonden auch kleinere Details der Probe aufgelöst werden.

Durch den Faktor $e^{-\sqrt{k_x^2 - k^2}\epsilon}$ werden die evaneszenten Komponenten des Probenspektrums abgeschwächt. Diese Abschwächung ist umso geringer, je kleiner der Abstand ϵ zwischen der Probe und der Sonde und je kleiner $|k_x|$ ist. Für ein Nahfeldmikroskop ist es somit wichtig, daß sich eine sehr kleine Sonde in geringem Abstand zur Probenoberfläche befindet. Diesen Effekt der Entfernungsabhängigkeit der Auflösung haben E. Betzig und J. Trautman im Experiment demonstriert (Betzig und Trautman, 1992).

1.2 Das optische Nahfeld: theoretische Beschreibungen

Die theoretischen Arbeiten behandeln meistens die Lösung der Maxwell-Gleichungen in einer durch ein spezifisches Mikroskop vorgegebenen Geometrie. Dabei ist die Lösung dieses Problems besonders interessant, da viele Ansätze und Näherungen der wohlbekannten Fernfeldoptik, wie z. B. die Fresnel-Näherung bei der Beugung oder die Beschreibung durch „Lichtstrahlen“ nicht mehr gültig sind und das optische Nahfeld Eigenschaften aufweist, die es von Fernfeldern abhebt. So wird z. B. bei der Dipolstrahlung oft der Term proportional zu $1/r^3$ als der für das Nahfeld entscheidende Term angesehen. Damit entspricht dieses Feld jedoch dem eines statischen elektrischen Dipols ohne Retardierung des Feldes (Jackson, 1983, Seite 466). Im elektrostatischen Fall macht das Konzept eines Brechungsindex oder eines Reflexionskoeffizienten jedoch keinen Sinn mehr, da es die Ausbreitung von elektromagnetischen Wellen beschreibt (Greffet und Carminati, 1997). Die Probe muß vielmehr über ihre Suszeptibilität und Polarisierbarkeit beschrieben werden. Auch ist die Reflexion zur Beschreibung des Verhaltens kleiner Objekte in einem Lichtfeld nicht geeignet, da sie sich aus der Interferenz der gestreuten Wellen ergibt. Allerdings kann die zur Reflexion analoge Methode der Bildladungen verwendet werden, um den Einfluß der

Substratoberfläche auf die Felder zu beschreiben (Greffet und Carminati, 1997). Dies wird zum Beispiel auch von Xiao (1997a) gemacht.

Nachdem in einfachen ersten Rechnungen Vigoureux und Courjon (1992) die Möglichkeiten des optischen Nahfeldes diskutiert hatten (Abschnitt 1.1.2), wurde die numerische Lösung der Maxwell-Gleichungen wichtig, da eine analytische Behandlung in der gegebenen Geometrie nicht möglich ist. Einen Überblick über theoretische Arbeiten zur Nahfeldmikroskopie geben die Übersichtsartikel von Girard und Dereux (1996) und Greffet und Carminati (1997).

Ich möchte in diesem Abschnitt im wesentlichen ein Gerüst für die Einordnung der verschiedenen theoretischen Arbeiten vorstellen. Dafür halte ich zwei Einteilungen für sinnvoll: Zum einen unterscheiden sich die Arbeiten nach der Methode, mit der sie versuchen, die Maxwell-Gleichungen zu lösen, zum anderen darin, welchen Teil der Abbildung im Nahfeldmikroskop sie behandeln. Die zwei Einteilungen sind in Abbildung 1.4 dargestellt. Links sind drei für die Abbildung im Nahfeldmikroskop wesentliche Bereiche markiert. Es sind dies die Beleuchtung im Mikroskop ①, die Wechselwirkung der Sonde mit der Probe ② und die Detektion des optischen Signals ③. Der in der Abbildung dargestellte Fall der Be-

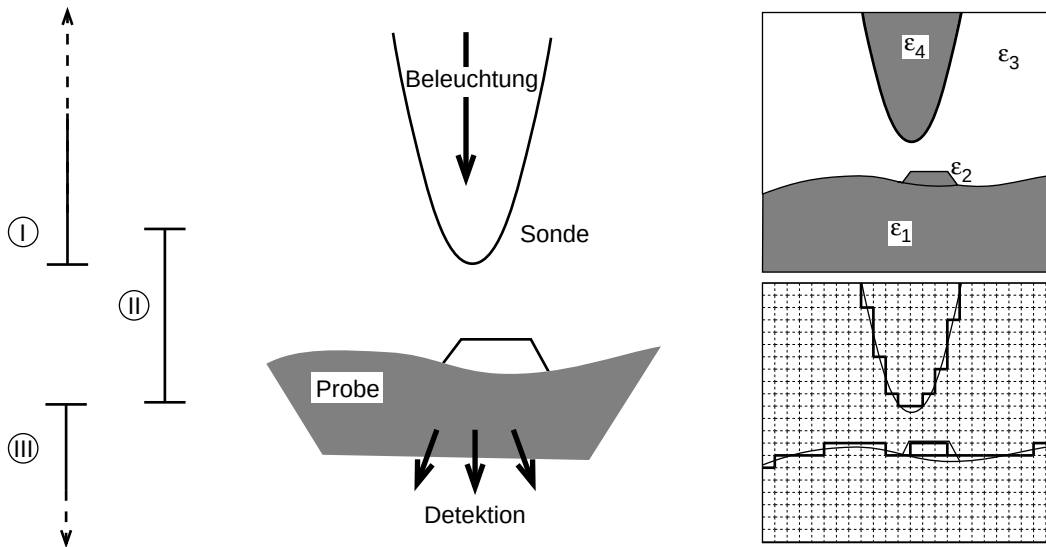


Abbildung 1.4: Mögliche Einteilungen der theoretischen Ansätze zur Beschreibung der Abbildung im optischen Nahfeldmikroskop (Mitte). Links: Einteilung anhand der behandelten Bereiche: Modellierung ① der Spitze, ② des Wechselwirkungsbereiches und ③ des Transfers des optischen Signals zum Detektor. Rechts: Einteilung anhand der verwendeten Methode: makroskopischer (oben) und mikroskopischer (unten) Ansatz.

leuchtung der Probe durch die Sonde ist nur als ein Beispiel anzusehen. Es gibt sehr viele verschiedene optische Nahfeldmikroskope, wobei bei einigen einzelne Teile der Abbildung nicht über ein elektromagnetisches Feld erfolgen. Zum Beispiel kann der in einer Halbleiter-Probe erzeugte Photostrom als bildgebendes Signal verwendet werden (Hsu et al., 1996; Karrai et al., 1995) oder die Probe selbst dient als Lichtquelle, wie zum Beispiel bei der Untersuchung der Modenstruktur von speziellen Laserdioden (*vertical cavity surface emitting lasers*, *VCSEL*, Hörsch et al., 1996).

Die methodische Einteilung kann grob in makroskopische und mikroskopische Theorien erfolgen (Abbildung 1.4 rechts). In makroskopischen Theorien wird das System über die Dielektrizitätskonstante $\epsilon(\underline{r}, \omega)$ beschrieben, wobei zu beachten ist, daß sie den Mittelwert über einen Bereich von mindestens $(10 \text{ nm})^3$ darstellt (Jackson, 1983, Seite 266). Dadurch erfaßt sie an jedem Ort immer eine sehr große Anzahl von Atomen und Molekülen. Im Gegensatz dazu zerlegen mikroskopische Theorien das gesamte System in sehr kleine Grundeinheiten, für die dann Näherungen gemacht werden, um sie numerisch zu behandeln. Diese Grundeinheiten können zum Beispiel einzelne Dipole oder kleine Raumelemente sein.

Im folgenden werden zunächst verschiedene makroskopische und dann verschiedene mikroskopische Theorien vorgestellt, wobei gegebenenfalls auf den damit modellierten Teil der Abbildung im optischen Nahfeldmikroskop entsprechend der Grafik 1.4, links hingewiesen wird.

Makroskopische Theorien: Die Methode der multiplen Multipole (engl. *multiple multipole methode*, *MMP*) wurde für die allgemeine Berechnung elektromagnetischer Felder entwickelt (Hafner, 1990) und von Novotny et al. sehr erfolgreich für die Modellierung von Sonden ① (Novotny et al., 1995a; Novotny und Pohl, 1995; Pohl et al., 1996) und des Probe-Sonde Wechselwirkungsbereichs ② eingesetzt (Novotny et al., 1994, 1995b). Bei ihr werden die Felder in den homogenen Bereichen des betrachteten Systems in eine Linearkombination von Lösungen der Maxwell-Gleichungen, wie z. B. Multipolfelder und ebene Wellen, entwickelt, wobei wegen der Quellfreiheit die Ursprünge der Multipolfelder meist außerhalb des betrachteten Gebietes liegen müssen. Die Amplituden, mit der die einzelnen Lösungen in die Linearkombination eingehen, werden numerisch über die Stetigkeitsbedingungen für die Felder an den Grenzflächen zwischen den Medien bestimmt. Dazu werden die Grenzflächen nur in einzelnen Punkten betrachtet, an denen die Stetigkeitsbedingungen erfüllt sein müssen. Der Vorteil dieser Methode ist, daß nur die Grenzflächen zwischen den Medien diskretisiert werden. Dadurch verringert sich die Dimension, in der das Pro-

blem diskretisiert werden muß, um eins, so daß auch komplexe dreidimensionale Systeme mit vertretbarem Aufwand lösbar sind. Die Wahl der geeigneten Multipole hat erheblichen Einfluß auf die Genauigkeit des Ergebnisses. So ist es zum Beispiel von Vorteil, Multipole mit der Symmetrie des betrachteten Systems einzusetzen. Es ist anzumerken, daß das mit dieser Methode erzielte Ergebnis die Maxwell-Gleichungen im Volumen exakt und an den Grenzflächen genähert erfüllt.

Fukuzawa und Kuwano (1996) haben eine sehr ähnliche Methode für das hochsymmetrische Problem einer kleinen Kugel vor einer Oberfläche verwendet ⑩. Sie bezeichnen ihre Methode als Punktanpassungsmethode (engl. *point matching method*, *PMM*), da sie nur die Mitte der Kugel als Ursprung für die Felder verwenden. Sie erhalten das interessante Ergebnis, daß eine kleine Kugel (Radius $< \lambda/13$) sich wie ein einzelner Dipol verhält, wohingegen in größeren Kugeln ($\lambda/13 < \text{Radius} < \lambda/6$) induzierte Multipole mitbeachtet werden müssen.

Eine weitere makroskopische Theorie wurde von Carminati und Greffet vorgeschlagen (Carminati und Greffet, 1995b; Carminati et al., 1997). Sie betrachten ein System, welches nur aus einem ebenen Substrat und einer darauf aufgetragenen flachen inhomogenen Probe besteht ⑩. Ist diese Probe, verglichen mit der Wellenlänge λ , dünn und/oder ist der Unterschied der Dielektrizitätskonstante $\epsilon(\underline{r})$ der Probe zu der des umgebenden Raumes ϵ_1 klein, so kann in der Lippman-Schwinger-Gleichung für dieses System

$$\underline{E}(\underline{r}) = \underline{E}_0(\underline{r}) + \int_{\text{Probe}} k^2(\epsilon(\underline{r}') - \epsilon_1) \underline{\underline{G}}(\underline{r}, \underline{r}') \underline{E}(\underline{r}') d\underline{r}'$$

das exakte Feld $\underline{E}$ unter dem Integral durch das Feld ohne die Probe $\underline{E}_0$ ersetzt werden (Bornsche Näherung). $\underline{\underline{G}}$ ist die Greensche Funktion des Systems mit dem Substrat und k die Wellenzahl des Lichts. Wenn man die Greensche Funktion und das Feld durch ihre Werte an der Substratoberfläche annähert, kann die z' -Integration unabhängig von ihnen ausgeführt werden, so daß die Probe an jeder Position auf der Oberfläche durch einen einzigen Wert, eine äquivalente Höhe oder Dielektrizitätskonstante, beschrieben werden kann. Diesen Effekt, daß sich Unterschiede in der Dielektrizitätskonstante und der Topographie im optischen Signal ähnlich auswirken, haben auch Martin et al. (1996) in ihren numerischen Rechnungen gefunden. Aufgrund der fehlenden Eindeutigkeit des optischen Signals ist eine einzige Messung zur Beschreibung des Systems nicht ausreichend, sondern die Topographie muß auf eine unabhängige Weise, z. B. über die Kraftmikroskopie, bestimmt werden. Ist die Topographie bekannt, so kann das inverse Problem, die lokale Dielektrizitätskonstante der Probe aus dem optischen Signal zu bestimmen, gelöst werden

(Carminati und Greffet, 1995b).

Es ist allerdings zu beachten, daß das optische Signal idealerweise in einer Ebene über der Probenoberfläche gemessen werden sollte. Dies ist gleichwertig mit dem Verfahren, die Höhe der Sonde derart zu variieren, daß ein konstantes optisches Signal detektiert wird (Carminati und Greffet, 1996), und die Position der Sonde als ein Äquivalent zum optischen Signal zu verwenden. Wenn während der Messung des optischen Signals jedoch die Sonde der Topographie derart nachgeführt wird, daß sie lokal immer einen konstanten Abstand zur Probe hat, ist zu beachten, daß die Topographie in das optische Signal übersprechen kann (Carminati et al., 1997). Dieses Übersprechen wurde auch in einigen experimentellen Studien gezeigt (Valaskovic et al., 1995b; Hecht et al., 1997). Wie Weston und Buratto (1997) zeigen, kann in manchen Fällen der Einfluß der Topographie auf das optische Signal gemessen werden, so daß dieser Effekt in den optischen Bildern kompensiert werden kann.

Mikroskopische Theorien: Die wohl am häufigsten eingesetzte mikroskopische Theorie wurde von Martin et al. (1994) entwickelt. Sie teilt das zu behandelnde System in ein homogenes Referenzsystem und eine Störung ein. Beide Systeme werden in kleine Zellen zerlegt, für die angenommen wird, daß sich die Felder und die Dielektrizitätskonstante darin nur sehr wenig ändern und deshalb durch einen konstanten Wert ersetzt werden können. Die Zellen haben typischerweise eine Kantenlänge von 5 nm. Die Lösung des Gesamtsystems läßt sich, wenn man eine Lösung und die Greensche Funktion für das ungestörte System kennt, über die Lippman-Schwinger-Gleichung ausdrücken. Da die numerische Lösung dieser Gleichung nicht einfach ist, berechnen Martin et al. zunächst die Lösung für nur eine Zelle des diskreten Systems. Die Dyson-Gleichung entspricht einer Lippman-Schwinger-Gleichung für die Greensche Funktion. Mit ihr ist es möglich, die Greensche Funktion für das System mit der einen gestörten Zelle zu berechnen. Damit hat man das notwendige Wissen, um den homogenen Hintergrund mit der einen gestörten Zelle als Referenzsystem zu betrachten. Durch die wiederholte Anwendung der Lippman-Schwinger- und der Dyson-Gleichung ist es somit möglich, sehr effektiv das Gesamtsystem zu berechnen. Ergebnisse dieser Technik sind in dem Übersichtsartikel von Girard und Dereux (1996) und einer Reihe anderer Arbeiten dargestellt (Castiaux et al., 1995a,b; Martin et al., 1996).

Eine alternative mikroskopische Theorie wurde von Xiao und Bozhevolnyi (1996) entwickelt. Sie zerlegen in ihrem Ansatz das System nicht in einzelne kleine Volumenelemente, die durch ihre Dielektrizitätskonstante charakterisiert werden, sondern in eine Anzahl von Dipolen ②. Dies schränkt die Allgemeinheit des Ansatzes etwas ein, hat aber den Vorteil, daß sich auch relativ große Systeme mit wenig Aufwand beschreiben lassen, weil z. B. auch

Metallkugeln mit 20 nm Durchmesser gut als Dipol angenähert werden können (siehe auch Fukuzawa und Kuwano, 1996). Das Problem läßt sich wiederum selbstkonsistent mit der Greenschen Funktion $\underline{\underline{G}}$ lösen.

Die Rechnung kann dadurch vereinfacht werden, daß man in der Greenschen Funktion neben dem Term, der die direkte Kopplung von zwei Dipolen beschreibt, nur noch die Wechselwirkung eines Dipols über die Reflexion von der Substratoberfläche mit sich selbst berücksichtigt. Alle anderen Terme werden als klein gegenüber diesen beiden vernachlässigt. Die Wechselwirkung mit der Oberfläche kann durch eine veränderte Polarisierbarkeit des Dipols beschrieben werden, so daß nur noch die Greensche Funktion für die Wechselwirkung der Dipole benötigt wird. Die Reflektivität der Substratoberfläche wird, wie auch Greffet und Carminati (1997) erwähnen, näherungsweise über Spiegelladungen berücksichtigt. Die meisten Rechnungen mit diesem System bestehen aus ca. 100 Dipolen und stellen schon recht komplexe Systeme dar (Xiao, 1997c,b).

Bei diesem Dipol-Ansatz gibt es die Möglichkeit, die verwendete Greensche Funktion für einen Dipol in Fern-, Mittel- und Nahfeld zu zerlegen. Das gemessene Bild wird dadurch simuliert, daß man einen Dipol, der als Sonde dient, auf einem vorgegebenen Weg über die Probe führt. Das lokale Feld am Ort dieses Dipols wird als das optische Signal interpretiert.

Das Feld eines Dipols am Ursprung kann mit der Greenschen Funktion folgendermaßen geschrieben werden:

$$\underline{E}(\underline{r}) = -\mu_0\omega^2\underline{\underline{G}}(\underline{r})(\underline{\alpha} \cdot \underline{E}_{\text{lokal}})$$

Dabei ist μ_0 die Permeabilität des Vakuums, ω die Kreisfrequenz des Lichts, und $\underline{\alpha}\underline{E}_{\text{lokal}}$ ist der durch das lokale elektrische Feld $\underline{E}_{\text{lokal}}$ induzierte Dipol, wobei $\underline{\alpha}$ seine Polarisierbarkeit ist. Die dyadische Greensche Funktion sieht folgendermaßen aus:

$$\underline{\underline{G}}(\underline{r}) = \frac{1}{4\pi} \left[\left(-\frac{1}{r} - \frac{i}{kr^2} + \frac{1}{k^2r^3} \right) \underline{\underline{1}} + \left(\frac{1}{r} + \frac{3i}{kr^2} - \frac{3}{k^2r^3} \right) \underline{u}_r \underline{u}_r \right] e^{ikr}$$

Dabei ist $\underline{\underline{1}}$ ein Einheitstensor, $\underline{u}_r = \underline{r}/r$ ein Einheitsvektor in Richtung von $\underline{r}$ und k die Wellenzahl des verwendeten Lichts. Diese Funktion ist an der Stelle $r = 0$ nicht definiert und muß deshalb eigentlich dort separat definiert werden (Greffet und Carminati, 1997). Allerdings kann dieser Anteil in die Reaktion der Materie aufgenommen werden, so daß diese Greensche Funktion wieder vollständig ist (Xiao, 1998).

Man kann die Greensche Funktion als aus drei Termen proportional zu $1/r$, $1/r^2$ und $1/r^3$ zusammengesetzt ansehen. Diese drei Terme können mit dem Fern-, Mittel- und Nahfeld identifiziert werden, da der erste Term für große Werte von r dominiert, wohingegen

der letzte Term für kleine r entscheidend wird. In ihrer Arbeit von 1996 zeigen Xiao und Bozhevolnyi, daß insbesondere für die Abbildung mit unbedampften Faserspitzen auch der mittlere Term von Bedeutung ist und wesentlich zum Bild beiträgt.

Es gibt auch die Möglichkeit, die Greensche Funktion in ihre homogenen und inhomogenen Beiträge zu zerlegen (Xiao, 1996, 1997a,b). Dazu wird sie nach ebenen Wellen in der xy -Ebene entwickelt. Bei der Rücktransformation werden dann für den inhomogenen Anteil nur die Wellenvektoren verwendet, deren Betrag in der xy -Ebene größer als ω/c ist. Damit ergibt sich der inhomogene Anteil der Greenschen Funktion zu

$$\underline{\underline{G}}_i(\underline{r}, \omega) = \frac{1}{4\pi} \left[\left(-\frac{1}{2r} + \frac{1}{k^2 r^3} \right) \underline{\underline{1}} + \left(-\frac{1}{2r} - \frac{3}{k^2 r^3} \right) \underline{u}_r \underline{u}_r \right]$$

Eine erstaunliche Eigenschaft dieser inhomogenen dyadischen Greenschen Funktion ist, daß sie Terme proportional zu $1/r$ enthält, so daß inhomogene Komponenten auch in größerer Entfernung vorhanden sind.

Als eine letzte mikroskopische Theorie möchte ich die Methode der endlichen Differenzen erwähnen (engl. *finite-difference time domain*, *FDTD*). Zusätzlich zu einer räumlichen Diskretisierung, wie bei der Methode von Martin et al., wird auch die Zeit in kleine Teile eingeteilt, und die zeitabhängigen differenziellen Maxwell-Gleichungen werden über Gleichungen mit endlichen Differenzen angenähert. Typische Zellgrößen sind dabei $(1 \text{ nm})^3$ und $T/707.1$, wobei T die Periodendauer des Lichts ist (Kann et al., 1995b). Da der Rechen- und Speicheraufwand recht groß ist, wird nur der Wechselwirkungsbereich $\textcircled{\text{II}}$ damit modelliert (Christensen, 1995; Furukawa und Kawata, 1996). Das berechenbare Modell kann dadurch erweitert werden ($\textcircled{\text{II}} \& \textcircled{\text{III}}$), daß man die FDTD-Methode durch eine weitere Methode ergänzt, die aus den Feldern an den Grenzen des FDTD-Modells das Fernfeld bestimmt, wie z. B. über eine Entwicklung nach ebenen Wellen (Kann et al., 1995a,b).

1.3 Experimentelle Techniken

Das in dieser Arbeit eingesetzte Nahfeldmikroskop verwendet Glasfaserspitzen, die nicht mit Metall bedampft wurden, zur Beleuchtung der Probe und zum Aufsammeln des von der Probe stammenden Lichtes. Dieser Modus wird im weiteren mit *shared-aperture*-Modus bezeichnet, da sowohl die Beleuchtung als auch die Detektion durch die als Apertur dienende Faserspitze erfolgen. Er wurde auch als *external-reflection*- (Courjon et al., 1990) oder einfach nur als *reflection*-Modus (Bielefeldt et al., 1994) bezeichnet. In diesen Bezeichnungen sind allerdings andere Kontrastmechanismen, wie z. B. Fluoreszenzdetektion,

nicht mit eingeschlossen. Wenn die Sonde nur zur Beleuchtung der Probe dient, wird dies in der Regel als *illumination*-Modus bezeichnet. Der umgekehrte Fall, in dem man durch die Spitze detektiert, wird entsprechend als *collection*-Modus bezeichnet. In der Theorie kann der *shared-aperture*-Modus ähnlich wie der *collection*-Modus behandelt werden (Greffet und Carminati, 1997).

In dem verwendeten Mikroskop erfolgt die Abstandsregelung über die Detektion von Scherkräften zwischen der Spitze und der Probe. Dieser Regelmechanismus wurde 1992 speziell für gerade Faser- und Mikropipettenspitzen entwickelt (Toledo-Crow et al., 1992; Betzig et al., 1992).

Neben unbedampften Faserspitzen gibt es noch eine Vielzahl weiterer Sonden. Dementsprechend gibt es auch noch andere Abstandsregelmechanismen, die für die verschiedenen Sondenformen entwickelt wurden. In den nächsten Abschnitten werden einige andere Sonden und Abstandsregelmechanismen vorgestellt, die in Nahfeldmikroskopen eingesetzt werden.

1.3.1 Nahfeldoptische Sonden

Die Nahfeldsonde stellt das wichtigste Bauteil eines Nahfeldmikroskops dar. Aus den theoretischen Überlegungen in Kapitel 1.1.2 folgte die Forderung an die Sonde, daß sie klein gegenüber der Lichtwellenlänge sei und somit ein breites Spektrum an Fourierkomponenten besitze, und daß sie bis auf eine sehr kleine Distanz an die zu untersuchende Probe angenähert werden kann. Dabei ist „kleine Distanz“ wiederum im Vergleich zur Wellenlänge des Lichts zu verstehen, und für sichtbares Licht bedeutet dies einige wenige Nanometer. Auf dieser Höenskala sind allerdings die meisten Proben nicht flach, so daß aus geometrischen Gründen wiederum mit einer in der Richtung parallel zur mittleren Probenoberfläche kleinen Sonde gearbeitet werden muß, die gegebenenfalls der Korrugation der Probe folgen kann.

Drei wichtige Typen von Sonden sind in der Abbildung 1.5 dargestellt. Es sind dies gerade Glasfaser- oder Mikropipettenspitzen (links), gebogene Glasfaserspitzen (Mitte) und Sonden basierend auf Kraftmikroskopbalken (rechts).

Aus Glasfasern oder Mikropipetten ist es möglich, sehr feine Spitzen zu erzeugen, die einfach an eine externe Optik angeschlossen werden können (Abbildung 1.5 links). Man kann zum Beispiel die Faser lokal so weit erhitzen, daß das Glas flüssig wird, und gleichzeitig ziehen (Betzig et al., 1991; Xiao et al., 1997). Zunächst verjüngt sich die Faser, bis sie schließlich reißt (Williamson und Miles, 1996). Oder man nutzt die unterschiedlichen

Ätzgeschwindigkeiten von dotiertem und undotiertem Quarz, um eine Spitze zu erzeugen (siehe z. B. Mononobe und Ohtsu, 1996). Eine weitere Methode, das Ende einer Faser mit eine Spitze zu versehen, ist das Anbringen einer mikromechanisch erzeugten Spitze (Noell et al., 1997). Die so erzeugte Spitze kann direkt für die optische Tunnelmikroskopie (Reddick et al., 1989; Courjon et al., 1989) und den *shared-aperture*-Modus verwendet werden. Versieht man sie mit einem Metallüberzug, der eine kleine Öffnung hat, können sie im *collection*- oder *illumination*-Modus verwendet werden.

Die Öffnung an der Spitze kann durch Abschattung während des Aufdampfens des Metallfilms erzeugt werden (Betzig et al., 1991), oder sie wird nachträglich durch einen Erosionsprozeß erzeugt (Mulin et al., 1997). Die Transmission derartiger Spitzen ist in der Regel recht gering und hängt stark vom Öffnungsdurchmesser, vom Öffnungswinkel der Spitze und der Länge des Bereiches ab, in dem die Lichtausbreitung evaneszent verläuft. Daher wurden einige Methoden entwickelt, die Spitzengeometrie zum Beispiel über eine Kombination von thermischem Ziehen und Ätzen (Schoch et al., 1994; Pagnot und Pierali, 1996; Islam et al., 1997; Essaidi et al., 1998) oder durch das Ätzen speziell entwickelter Fasern (Mononobe und Ohtsu, 1998) zu beeinflussen.

Die Abstandsregelung mit diesen Sonden ist verglichen mit der Kraftmikroskopie (Binnig et al., 1986) recht schwierig, da die Sonde entlang der Faser- bzw. Pipettenachse sehr steif ist. Daher wurde versucht, Kraftmikroskopie-Balken als optische Nahfeldsonden zu verwenden (van Hulst et al., 1993b; Adam et al., 1998; Baida et al., 1998) (Abbildung 1.5 rechts). Allerdings sind die optischen Eigenschaften nicht so gut, so daß Varianten wie zum Beispiel Balken mit integrierten mikromechanischen Spitzen (Ruiter et al., 1996) oder Balken, die eine metallische Apertur integriert haben (Mihalcea et al., 1996), entwickelt wurden.

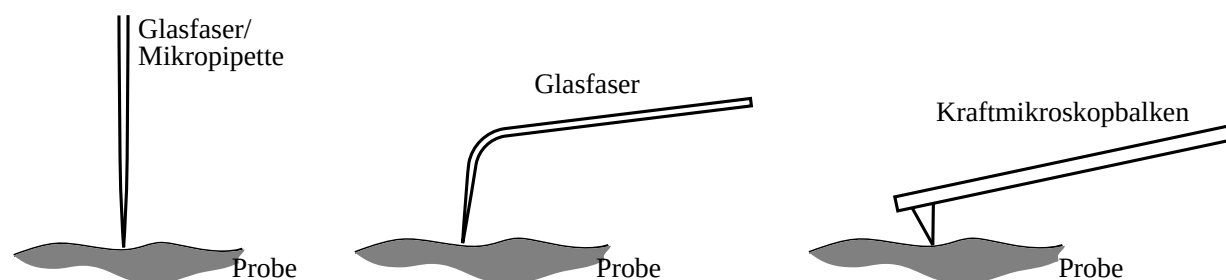


Abbildung 1.5: Verschiedene Typen von Sonden, die in der optischen Nahfeldmikroskopie eingesetzt werden.

Die Kombination von Glasfaser und Kraftmikroskopbalken, eine kurz hinter der Spitze gebogene Glasfaser, wurde auch entwickelt (Abbildung 1.5 Mitte). Sie vereint die einfache Abstandsregelung des Kraftmikroskopbalkens mit den guten optischen Eigenschaften der Glasfaser (Lieberman et al., 1994; Muramatsu et al., 1997).

Weitere passive Sonden, die nicht in die oben aufgeführten drei Gruppen eingeordnet werden können, sind die Tetraederspitze von Fischer et al. (1994) und Tunnelspitzen (Gimzewski et al., 1993). Ein Problem vieler Nahfeldmikroskope ist, daß die Abbildung aufgrund eines langsamen Abstandsregelmechanismus oder eines schwachen optischen Signales sehr langsam ist. Ein interessanter Ansatz, den Abbildungsvorgang zu beschleunigen, ist der Einsatz von Sonden-Arrays, wie er von Pantano und Walt (1997) vorgeschlagen wurde.

Im Gegensatz zu den beschriebenen passiven Sonden enthalten aktive Sonden entweder eine kleine Lichtquelle oder einen Photodetektor. Der Vorteil bei diesem Aufbau ist, daß man einen Teil der Kopplung des Nahfeld-Wechselwirkungsbereiches an eine makroskopische Lichtquelle oder einen Detektor nicht durchführen muß. Diese Kopplung ist in der Regel mit erheblichen Verlusten behaftet. Eine der ersten Arbeiten zur Integration eines Photodetektors in einen Kraftmikroskopbalken stammt von U. Danzebrink, der durch Metallbedampfen des Siliziumbalkens eine doppelte Schottky-Diode erzeugte (Danzebrink, 1994). Eine ähnliche Sonde wurde auch von Davis et al. (1996) vorgestellt. Im Gegensatz zu diesen Schottky-Dioden entwickelten Akamine et al. (1996) einen Kraftmikroskopbalken, in dessen Spitze eine Photodiode integriert ist. In diese Balken kann auch eine kleine Spitze integriert werden, die eine bessere laterale Auflösung erlaubt (Tanaka et al., 1998). Diese Sonden mit integrierten Photodetektoren haben jedoch den Nachteil, daß nur im *collection* Modus gearbeitet werden kann. Außerdem ist es nicht möglich, spektrale Unterschiede zu detektieren, und die erzeugten Dioden besitzen nur eine geringe Sensitivität, so daß sie für Fluoreszenzuntersuchungen nicht geeignet sind.

Der umgekehrte Fall, eine Lichtquelle in die Sonde einzubauen, wird meist mit Spitzen gemacht, die aus Mikropipetten hergestellt wurden. Dazu kann eine fluoreszierende Substanz in die Spitze eingebaut werden, die über eine externe Lichtquelle angeregt wird (Lewis und Lieberman, 1991; Kopelman und Tan, 1994; Stürmer et al., 1998). Einen Nachteil dieser Technik, die Präsenz des anregenden Lichts im Probenbereich, kann durch die Verwendung elektrolumineszenter Sondenmaterialien, wie z. B. ZnS-Pulver (Kuck et al., 1992) oder poröses Silizium (Göttlich und Heckl, 1995), umgangen werden. Allerdings haben alle diese Sonden in der Regel ein recht breites Emissionsspektrum, so daß spektral

aufgelöste Messungen nicht möglich sind. Eine Besonderheit stellt der Vorschlag von Sekatskii und Letokhov (1996) dar, den nichtstrahlenden Förster-Energietransfer zur Anregung der Probe zu verwenden (siehe auch Kapitel 4.2). Dabei sollen mit einem Laser angeregte Farbzentren in einem Kristall als Energiedonor dienen. Da der Energieübertrag mit der sechsten Potenz des Abstandes zwischen Donor und Akzeptor abnimmt, sollte es möglich sein, eine Sonde zu erzeugen, bei der nur ein einziges Farbzentrum die Probe anregt.

1.3.2 Abstandsregelmechanismen

Als einer der ersten Abstandsregelmechanismen wurde der Tunnelstrom zwischen einer als Sonde dienenden metallbeschichteten Spitze eines Quarzkristalls und der Probe verwendet (Dürig et al., 1986). Analog kann man auch zwischen einer metallbeschichteten Faserspitze und einer Probe den Tunnelstrom messen (Garcia-Parajo et al., 1994). Leider ist die Messung des Tunnelstroms auf elektrisch leitende Proben beschränkt. Mechanismen, die auf der Detektion von Kräften zwischen der Probe und der Sonde beruhen, sind allgemeiner einsetzbar, da sie fast keine Anforderung an die Probe stellen. In diese Klasse fällt die schon erwähnte Scherkraftdetektion (siehe auch Abschnitt 3.2) und die Messung von Normalkräften wie im Kraftmikroskop. Eine interessante Variation ist der Aufbau von Stephenson et al. (1996). Sie präparieren ihre Proben auf einem Kraftmikroskopbalken und detektieren seine Auslenkung, um die Kraft auf eine gerade Faserspitze zu messen.

Diese Methoden funktionieren nicht zur Abstandsregelung an einer flüssig-gasförmig-Grenzfläche. Für dieses Problem entwickelten Kramer et al. (1998) einen interferometrischen Aufbau.

1.4 Anwendungen

Da die nahfeldoptische Sonde meist der Probentopographie nachgeführt wird, erhält man gleichzeitig ein optisches und eine topographisches Bild der Probe mit einer sehr guten lateralen Auflösung. Die optische Sensitivität genügt für den Nachweis einzelner Farbstoffmoleküle (Ambrose et al., 1993; Xie und Dunn, 1994; Bopp et al., 1996; van Hulst et al., 1997), und es ist möglich, Proben in Flüssigkeiten zu untersuchen (Muramatsu et al., 1996b; Moyer und Kammer, 1996; Mertesdorf et al., 1997; Brunner et al., 1997). Dies hat zu einer weit verbreiteten Anwendung der optischen Nahfeldmikroskopie geführt. So wird das Nahfeldmikroskop zum Beispiel zur Charakterisierung passiver und aktiver optoelektronischer Bauteile (Choo et al., 1994; van Hulst et al., 1995; Hörsch et al., 1996; Herzog et al., 1997),

zur Spektroskopie an Halbleiter-*quantum-wire* und -*dot* Strukturen (Harris et al., 1996; Guttroff et al., 1997; Richter et al., 1997) oder zur Untersuchung von dünnen Filmen (z. B. Hwang et al., 1995; Fujihira et al., 1996; van den Bout et al., 1997; Kirsch et al., 1998a,b) verwendet.

Auch in der Biologie wurde die optische Nahfeldmikroskopie schon gelegentlich eingesetzt, so z. B. zur Untersuchungen des zytoskeletischen Aktins (Betzig et al., 1993; Pohl et al., 1997), von GFP in Bakterien (Muramatsu et al., 1996a; Tamiya et al., 1997; Subramaniam et al., 1997), von Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungs-Sonden an Chromosomen in der Metaphase (Moers et al., 1996; van Hulst und Moers, 1996; van Hulst et al., 1997), von Nervenzellen aus der Großhirnrinde (Talley et al., 1996) und von Retinagewebe (Rytki et al., 1994) der Ratte, von Maus-Fibroblasten (Kirsch et al., 1996; Subramaniam et al., 1998), von Myofibrillen (Seibel und Pollack, 1997), von Domänenstrukturen auf Zellplasmamembranen (Hwang et al., 1998) und zur Kolokalisierung von Malaria- und Zytoskelett-Proteinen der Wirtszelle (Enderle et al., 1997).

Nahfeldmikroskopie mit dielektrischen Faserspitzen

Wie schon in der Einleitung erwähnt, wurden in den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten dielektrische Faserspitzen ohne Metallüberzug verwendet. Mit einer dünnen Glasspitze mit einem Radius im Bereich von 100 nm ist es möglich, ein Lichtfeld auf der gleichen Längenskala zu modifizieren. Allerdings ist es bei einer Faserspitze nicht möglich, das Austreten des Lichts aus der Faser aufgrund der konischen Form und der damit einhergehenden Modenkopplung (Marcuse, 1987) schon in einiger Entfernung vor dem Ende der Spitze zu verhindern, wie es mit der in Abschnitt 1.3.1 erwähnten Metallbedampfung möglich ist. Deshalb hat der Einsatz dieser Spitzen im *illumination*-Modus mit einem recht großen Signalhintergrund aufgrund des seitlich aus der Spitze austretenden Lichtes zu kämpfen. Ähnliches gilt auch für den *collection*-Modus, da in diesem Fall Licht von außen im Konusbereich an die in der Faser geführten Moden ankoppeln kann. Im Gegensatz zu den Apertur-Sonden mit Metallbedampfung besitzen rein dielektrische Glasfaserspitzen jedoch eine sehr hohe Transmission, so daß sie sowohl zur Beleuchtung als auch zur Detektion im *shared-aperture*-Modus eingesetzt werden können. In diesem Modus trägt Licht, welches schon weit vor der Spitze aus der Faser auskoppelt, nur wenig zum detektierten Signal bei.

Historisch gesehen wurde der *shared-aperture*-Modus von der Gruppe um Daniel Courjon, ausgehend vom *Photon-Scanning-Tunneling-Microscope* (PSTM), entwickelt (Courjon et al., 1990). Im PSTM wird die interne Totalreflexion eines Laserstrahls an der Probenoberfläche mit einer dielektrischen Faserspitze frustriert. Durch den exponentiellen Abfall der Feldstärke mit dem Abstand zur Oberfläche wechselwirkt im wesentlichen der vorder-

ste Bereich der Sonde mit dem Lichtfeld und transformiert das evaneszente Feld in ein in der Glasfaser propagierendes Feld (Courjon et al., 1989; Reddick et al., 1989). Allerdings wird in dieser Art der optischen Nahfeldmikroskopie die Abbildung durch Interferenzen gestört, die sich durch die Streuung der Beleuchtungswelle an Strukturen und Objekten auf der Probenoberfläche ergeben, so daß eine Bildinterpretation schwierig werden kann (van Hulst et al., 1993a).

Der *shared-aperture*-Modus zeigt nur in seltenen Fällen derartige Interferenzen (siehe Kapitel 3.5.1 und Bozhevolnyi et al., 1995) und ist relativ einfach aufzubauen, da der Beleuchtungs- und Detektionsstrahlengang automatisch aufeinander ausgerichtet sind. Es ist möglich, eine Vielzahl verschiedener Kontrastmechanismen zu implementieren. Einige Beispiele sind:

- Hellfeldreflexion (Krausch et al., 1995; Schwarz et al., 1997)
- Fluoreszenz (Jalocha und van Hulst, 1995a; Kirsch et al., 1996)
- Fluoreszenzanregung durch Mehrphotonenabsorption (Kirsch et al., 1998c; Lewis et al., 1998; Jenei et al., 1998)
- Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (Subramaniam et al., 1998)
- Polarisierung in Verbindung mit
 - Reflexion (Depolarisation; Madsen et al., 1998)
 - Fluoreszenz (Jalocha und van Hulst, 1995b).

Weitere wesentliche Vorteile des *shared-aperture*-Modus sind die sehr gute Reproduzierbarkeit, mit der die Sonden hergestellt werden können, und die sehr gute Lichttransmission der Sonden. Außerdem ist der Effekt gering, den dielektrische Objekte auf die Emissionscharakteristika von Fluoreszenzfarbstoffen haben, so daß die Faserspitzen, verglichen mit metallisierten Sonden, die Probe nur wenig stören. Eingesetzt wurde der *shared-aperture*-Modus unter anderem zur Analyse der Fluoreszenzverteilung von ZnSe-Filmen (Bielefeldt et al., 1994), dem Entmischungsverhalten von Polymermischungen (Straub et al., 1995), zur Untersuchung von überwachsenen InGaAs/GaAs-Quantum-Dots (Pahlke et al., 1998), zur Mikroskopie an teilweise oxidierten Antrazenkristallen (Kaupp und Herrmann, 1997), zur Untersuchung von verschiedenen biologischen Systemen (Kirsch et al., 1996; Subramaniam et al., 1997, 1998) und Langmuir-Blodgett-Filmen, die eine Metallkomplexdiade

enthalten (Kirsch et al., 1998a,b), und zu Experimenten mit phasenkonjugierenden Spiegeln (Bozhevolnyi et al., 1994b; Bozhevolnyi und Smolyaninov, 1995).

Bei den Experimenten im *shared-aperture*-Modus ist meist jedoch nicht geklärt, wo die erreichbare Auflösungsgrenze liegt. Abgesehen von der Frage nach der Definition des Begriffs „Auflösung“ ist die erzielbare Auflösung sicher auch vom verwendeten Kontrastmechanismus, der Sondenform, der Probe und unter Umständen auch von der Wellenlänge abhängig. So haben z. B. Sandoghdar et al. (1997) die Abbildung von Aluminium-Strukturen auf Glas mit Hellfeldreflexion experimentell untersucht und kommen zum Schluß, daß die Auflösungsgrenze in diesem System auf die Hälfte der Wellenlänge beschränkt ist (zu einem ähnlichen Ergebnis kommen auch Atia et al., 1998). Die in anderen Arbeiten erzielten, besseren Auflösungen erklären Sandoghdar et al. durch ein Übersprechen der Proben topographie in das optische Signal, wobei der wesentliche Mechanismus die Interferenz des in der Sonde reflektierten mit dem an der Probe reflektierten Licht ist.

Im Gegensatz zu diesen Arbeiten konnten Madsen et al. (1998) demonstrieren, daß auf einer ähnlichen Probe mit gekreuzten Polarisatoren eine sehr viel höhere Auflösung erzielt werden kann. Dabei konnten sie durch Messungen in konstanter Höhe, d. h. ohne eine aktive Regulierung des Abstandes zwischen Sonde und Probe (Hecht et al., 1997), zeigen, daß die von ihnen gemessene Auflösung kein topographisches Artefakt ist.

Bei Untersuchungen, die die Fluoreszenz der Probe als Kontrastmechanismus ausnutzen, hat die Topographie der Probe einen sehr viel schwächeren Einfluß auf das optische Signal. Die Interferenz von zwei Signalwellen, die im wesentlichen für das Übersprechen verantwortlich ist, kann in diesem Fall ausgeschlossen werden, da Fluoreszenz ein inkohärenter Prozeß ist.

Neben der experimentellen Untersuchung des Abbildungsverhaltens derartiger Nahfeldmikroskope mit dielektrischen Faserspitzen ist die theoretische Modellierung bei der Beantwortung der Frage nach dem erzielbaren Auflösungsvermögen hilfreich und kann eine Erklärung für die beobachteten Phänomene liefern. Dabei ist in diesem System allerdings zu beachten, daß die einfache Grenzbedingung einer verschwindenden Tangentialkomponente des elektrischen Feldes an den Rändern der metallbedampften Sonde in der dielektrischen Sonde durch kompliziertere Grenzbedingungen ersetzt werden muß. So ist auch die einfachste Beschreibung der Sonde durch ein Loch in einer Metallblende, welches wiederum durch einen elektrischen und einen magnetischen Dipol beschrieben werden kann (Bethe, 1944), vollkommen unbrauchbar.

Theoretische Modelle, die auch auf die Abbildung in einem Nahfeldmikroskop im *shared-*

aperture-Modus angewendet wurden, sind das mikroskopische Modell wechselwirkender Dipole von Xiao und Bozhevolnyi (1996) und das makroskopische selbstkonsistente Modell von Berntsen et al. (Berntsen et al., 1993; Bozhevolnyi et al., 1994a). Mit diesen Modellen wurde die tatsächliche Abbildung eines derartigen Mikroskops untersucht. Sie gehen insofern über die reine Modellierung der dielektrischen Sonde (Castiaux et al., 1995b; Novotny et al., 1995a) hinaus. Allerdings kann man unter der Annahme, daß die Spitze die Felder auf der Probenoberfläche nicht modifiziert, auch sehr viel aus der Modellierung der Sonde über das Abbildungsverhalten lernen, wie Buckland et al. (1993) für den Fall eines Nahfeldmikroskops im *collection*-Modus zeigten.

2.1 Modell für die Nahfeldmikroskopie im *shared-aperture*-Modus

In einem einfachen Modell für die optische Nahfeldmikroskopie mit dielektrischen Faserspitzen wird im folgenden die Sonde durch eine dünne Glasfaser angenähert. Der wesentliche Wechselwirkungsmechanismus sei die Kopplung der Felder auf der Probe an die Moden in der Glasfaser (Buckland et al., 1993). Dazu wird angenommen, daß die Sonde die Felder auf der Probe nicht modifiziert, und umgekehrt, daß für die Felder in der Sonde die Moden der unendlich langen Glasfaser verwendet werden können. An einer End- oder Stoßfläche, als die auch der Übergang von der Spitze zur Probe angesehen werden kann, gelten natürlich die für die unendlich lange Glasfaser gemachten Annahmen nicht mehr. Man muß die Kopplung an strahlende und evaneszente Moden bei der Beschreibung der Stoßstelle mit berücksichtigen (Jackson, 1983). Allerdings werden diese Moden hier vernachlässigt und nur die geführten Moden der idealen Glasfaser berücksichtigt.

Das Beleuchtungsprofil, welches sich durch dieses Modell für die Sonde ergibt, entspricht dem Profil der geführten Moden in der dünnen Glasfaser. Da bei den hier beschriebenen Experimenten meist die Fluoreszenz von Farbstoffmolekülen als optisches Signal verwendet wurde, sollen auch in dem Modell einzelne Farbstoffmoleküle als Probe verwendet werden. Ein derartiges Molekül wird als elektrischer Dipol beschrieben, dessen Anregungsrate proportional zum Quadrat des elektrischen Feldes in Richtung des Übergangsdipols am Ort des Moleküls ist. Moleküle unterschiedlicher Orientierung testen somit den vektoriellen Charakter des elektrischen Feldes (Betzig und Chichester, 1993).

Die Detektion erfolgt wiederum über die geführten Moden der Glasfaser. Es wird nur der Teil der Fluoreszenzemission detektiert, der an die geführten Moden ankoppelt. Diese

Kopplung ist wiederum proportional zum elektrischen Feld am Ort des Moleküls in Richtung des Übergangsdipols. Da nicht das elektrische Feld, sondern die Intensität detektiert wird, geht auch bei der Detektion das Quadrat des elektrischen Feldes ein. Die Abbildung eines Moleküls hängt damit sowohl von der Orientierung des Absorptions- als auch von der Orientierung des Emissionsdipols ab. Im einfachsten Fall eines stationären Farbstoffmoleküls, bei dem Absorptions- und Emissionsdipol einander parallel sind, ist das detektierte optische Signal proportional der vierten Potenz der elektrischen Feldstärke in der Glasfaser. Dieser einfache Fall wird bei der Analyse des Modells zugrunde gelegt.

Den Moden in der dünnen Glasfaser kommt somit bei diesem Modell die größte Bedeutung zu, und sie werden im nächsten Abschnitt berechnet. Diese Rechnung orientiert sich an der Darstellung von Yariv (1991). Eine vergleichbare Rechnung im Gausschen Einheitensystem findet sich in der Diplomarbeit von C. Meyer (1996), wobei hier nun die exakten Ausdrücke für die Felder verwendet werden, die die Grenzbedingungen exakt erfüllen. Auch Buckland et al. (1993) haben die Moden für eine dünne Glasfaser in Luft berechnet, wobei sie allerdings nicht die Stetigkeit der Tangentialkomponenten des elektrischen und magnetischen Feldes an der Grenzfläche zwischen verschiedenen dielektrischen Medien verwendet haben, sondern die Stetigkeit der Tangentialkomponente des elektrischen Feldes und ihrer ersten Ableitung forderten. Sowohl Buckland et al. als auch C. Meyer erhalten damit Modenformen, die von den exakten Lösungen teilweise stark abweichen.

2.2 Berechnung der Moden der dünnen Glasfaser

Ausgehend von den makroskopischen Maxwell-Gleichungen wird in diesem Abschnitt die Berechnung der Moden der dünnen Glasfaser in Luft dargestellt. Dazu wird der Raum in Bereiche i eingeteilt, die durch eine skalare, ortsunabhängige Dielektrizitätskonstante $\epsilon_i(\omega)$ oder den Brechungsindex n_i mit $n_i^2(\omega) = \epsilon_i(\omega)$ beschrieben werden können.

Bei einer dicken Glasfaser erfolgt diese Einteilung typischerweise in drei Bereiche:

1. der Faserkern mit der Dielektrizitätskonstante ϵ_1 und einem Brechungsindex von typischerweise $n_1 = 1.467$
2. der Fasermantel mit $\epsilon_2 < \epsilon_1$
3. das umgebende Medium mit einer Dielektrizitätskonstante $\epsilon_3 = 1$ im Falle von Luft

Der Unterschied zwischen den Brechungsindizes des Kerns und des Mantels ist typischerweise sehr klein ($< 1\%$), und in vielen Rechnungen wird der Einfluß der Außenfläche der

Faser vernachlässigt (Yariv, 1991), da die Felder im Mantel in radialer Richtung abnehmen und an der Außenfläche in sehr guter Näherung verschwinden.

Auch in den Glasfaserspitzen, die mit diesem Modell beschrieben werden sollen, sind alle drei Bereiche vorhanden. Allerdings sind die Durchmesser so klein, daß die Felder im Faserkern durch den Mantel bis an die Glas-Luft-Grenzfläche und darüber hinaus reichen. In diesem Fall ist der Einfluß der Grenzfläche zur umgebenden Luft mit dem sehr viel größeren Brechungsindexunterschied auf die Moden sehr viel stärker als der der Kern-Mantel-Grenzfläche, so daß ich letztere in den Rechnungen vernachlässigen werde und die umgebende Luft die Rolle des Mantels der Glasfaser ($i = 2$) übernimmt. Es treten somit nur die Brechungsindizes $n_1 = 1.467$ für das Glas und $n_2 = 1$ für die Luft auf.

Nimmt man an, daß die magnetische Suszeptibilität verschwindet, ergeben sich die Maxwell-Gleichungen im ladungs- und stromfreien Raum zu

$$\nabla \times \underline{H} = \partial_t \underline{D} \qquad \nabla \times \underline{E} = -\mu_0 \partial_t \underline{H} \qquad (2.1)$$

und

$$\nabla \underline{B} = 0 \qquad \nabla \underline{D} = 0 \qquad (2.2)$$

mit dem elektrischen Feld $\underline{E}$, der dielektrischen Verschiebung $\underline{D} = \epsilon_i \epsilon_0 \underline{E}$, der magnetischen Induktion $\underline{H}$ und der magnetischen Feldstärke $\underline{B} = \mu_0 \underline{H}$. Dabei steht $\partial_t = \partial/\partial t$ für die partielle Ableitung nach der Zeit. Bildet man die Rotation einer der Gleichungen von 2.1 und setzt die andere ein, so ergibt sich daraus für die betrachteten homogenen Medien die Wellengleichung für $\underline{E}$ oder $\underline{H}$. Wenn nur eine spektrale Komponente betrachtet wird, besitzen die Felder eine harmonische Zeitabhängigkeit, wie z. B. $\underline{E}(\underline{r}, t) = \Re[\underline{E}(\underline{r}) \exp(i\omega t)]$. Damit wird die Wellengleichung zu

$$\left[\nabla^2 + n_i^2 \frac{\omega^2}{c^2} \right] \begin{bmatrix} \underline{E} \\ \underline{H} \end{bmatrix} (\underline{r}) = 0 \qquad (2.3)$$

Dabei ist $c = \sqrt{\epsilon_0 \mu_0}$ die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum, und der Index i numeriert die einzelnen homogenen Bereiche des Systems. Die Formel 2.3 faßt sechs Gleichungen für die sechs unbekannten Komponenten der Felder $\underline{E}$ und $\underline{H}$ zusammen.

Da die Glasfaser eine zylindrische Symmetrie besitzt, ist es günstig, die Berechnung der Felder in Zylinderkoordinaten (r, ϕ, z) durchzuführen. In diesem Koordinatensystem ist allerdings nur der Einheitsvektor $\hat{e}_z$ entlang der z-Achse konstant. Die anderen Einheitsvektoren $\hat{e}_r$ und $\hat{e}_\phi$ sind ortsabhängig, so daß die Darstellungen der Wellengleichungen für diese Feldkomponenten sehr kompliziert werden. Deshalb wird nur für die Feldkomponenten ent-

lang der z -Achse die Wellengleichung verwendet, in deren allgemeinen Lösungen eine Reihe von Unbekannten auftreten. Diese Unbekannten werden dann durch die Stetigkeitsbedingungen für die Tangentialkomponenten der Felder an der Fasergrenzfläche bestimmt. Dazu werden die fehlenden Feldkomponenten mit Hilfe der Maxwell'schen Gleichungen durch die Felder in z -Richtung ausgedrückt.

Wenn die sich entlang der Faser ausbreitenden Wellen gesucht werden, kann für alle Feldkomponenten die gleiche z -Abhängigkeit von $\exp(-i\beta z)$ angenommen werden. Für die sich in $+z$ -Richtung fortpflanzende Wellen muß β als reell und positiv angesetzt werden. Damit ergeben sich die transversalen Komponenten aus den axialen durch die Maxwell-Gleichungen in Zylinderkoordinaten zu

$$\begin{aligned} E_r &= \frac{-i\beta}{\omega^2 \mu_0 \epsilon \epsilon_0 - \beta^2} \left(\partial_r E_z + \frac{\omega \mu_0}{\beta} \frac{1}{r} \partial_\phi H_z \right) \\ E_\phi &= \frac{-i\beta}{\omega^2 \mu_0 \epsilon \epsilon_0 - \beta^2} \left(\frac{1}{r} \partial_\phi E_z - \frac{\omega \mu_0}{\beta} \partial_r H_z \right) \\ H_r &= \frac{-i\beta}{\omega^2 \mu_0 \epsilon \epsilon_0 - \beta^2} \left(\partial_r H_z - \frac{\omega \epsilon \epsilon_0}{\beta} \frac{1}{r} \partial_\phi E_z \right) \\ H_\phi &= \frac{-i\beta}{\omega^2 \mu_0 \epsilon \epsilon_0 - \beta^2} \left(\frac{1}{r} \partial_\phi H_z + \frac{\omega \epsilon \epsilon_0}{\beta} \partial_r E_z \right) \end{aligned} \quad (2.4)$$

Aus der Wellengleichung 2.3 wird mit der Darstellung des Laplace-Operators ∇^2 in Zylinderkoordinaten $\nabla^2 = \partial_r^2 + 1/r \partial_r + 1/r^2 \partial_\phi^2 + \partial_z^2$ für die z -Komponenten

$$\left[\partial_r^2 + \frac{1}{r} \partial_r + \frac{1}{r^2} \partial_\phi^2 + (n_i^2 k_0^2 - \beta^2) \right] \begin{bmatrix} E_z \\ H_z \end{bmatrix} (r, \phi) = 0$$

mit $k_0^2 = \omega^2/c^2$. Mit dem Produktansatz $\Psi(r) \exp(\pm il\phi)$ für $E_z(r, \phi)$ und $H_z(r, \phi)$ ergibt sich daraus für $\Psi(r)$ die Besselsche Differentialgleichung, wobei l wegen der Eindeutigkeit der Abhängigkeit von ϕ eine ganze Zahl sein muß.

$$\partial_r^2 \Psi(r) + \frac{1}{r} \partial_r \Psi(r) + (n_i^2 k_0^2 - \beta^2 - \frac{l^2}{r^2}) \Psi(r) = 0 \quad (2.5)$$

Die Lösungen dieser Gleichung sind die Besselfunktionen der Ordnung l . Für den Fall, daß $h^2 = n_i^2 k_0^2 - \beta^2 > 0$ ist, ergibt sich die Lösung zu

$$\Psi(r) = c_1 J_l(hr) + c_2 Y_l(hr)$$

wobei J_l und Y_l die Besselfunktionen erster und zweiter Gattung der Ordnung l sind. c_1 und c_2 sind Konstanten, die später über Grenzbedingungen an die Felder bestimmt werden.

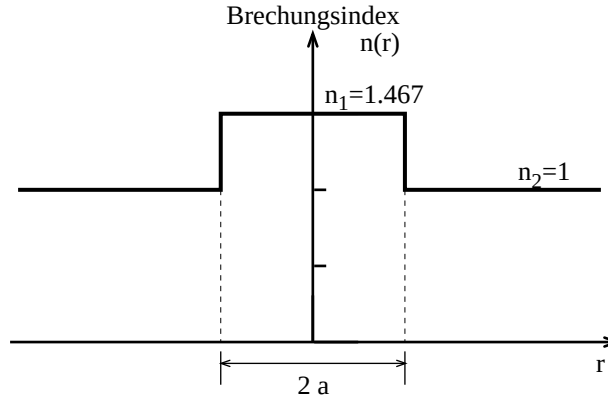


Abbildung 2.1: Verlauf des Brechungsindex der dünnen Faser mit Durchmesser $2a$ in Luft

Entsprechend ist für $n_i^2 k_0^2 - \beta^2 < 0$ die allgemeine Lösung der Gleichung 2.5 gegeben durch

$$\Psi(r) = c_3 I_l(qr) + c_4 K_l(qr)$$

mit $q^2 = \beta^2 - n_i^2 k_0^2$ und den Konstanten c_3 und c_4 . I_l und K_l sind die modifizierten Besselfunktionen erster und zweiter Gattung der Ordnung l .

Die Konstanten c_1 bis c_4 müssen nun für die Felder in und um die dünne Glasfaser bestimmt werden. Der Verlauf des Brechungsindex ist in der Abbildung 2.1 dargestellt. Da die durch die Faser geführten Moden gesucht sind, kann aufgrund des asymptotischen Verhaltens der Besselfunktionen für große Argumente im Außenraum ($r > a$) nur die modifizierte Besselfunktion zweiter Gattung K_l als Lösung in Frage kommen. Damit muß auch $\beta > n_2 k_0$ gelten. Im Außenraum ($r > a$) sind folglich die Felder durch

$$\begin{aligned} E_z(\underline{r}, t) &= C K_l(qr) \exp[i(\omega t + l\phi - \beta z)] \\ H_z(\underline{r}, t) &= D K_l(qr) \exp[i(\omega t + l\phi - \beta z)] \end{aligned} \quad (2.6)$$

mit $q^2 = \beta^2 - n_2^2 k_0^2$ gegeben. Es wurde im Exponenten das positive Vorzeichen von l verwendet. Das negative Vorzeichen ergibt einen weiteren Satz unabhängiger Lösungen. Da die Glasfaser keine Rotationsrichtung auszeichnet, sind die beiden Gruppen von Lösungen entartet.

Im Inneren der Faser kommen, nach dem asymptotischen Verhalten zu urteilen, die Besselfunktionen erster Gattung J_l und die modifizierten Besselfunktionen erster Gattung I_l in Frage. Allerdings ist es mit den modifizierten Besselfunktionen nicht möglich, die Stetigkeitsbedingungen am Rande der Faser $r = a$ zu erfüllen (Yariv, 1991), so daß sich

die Lösungen im Inneren ($r < a$) der Faser zu

$$\begin{aligned} E_z(\underline{r}, t) &= A J_l(hr) \exp[i(\omega t + l\phi - \beta z)] \\ H_z(\underline{r}, t) &= B J_l(hr) \exp[i(\omega t + l\phi - \beta z)] \end{aligned} \quad (2.7)$$

mit $h^2 = n_1^2 k_0^2 - \beta^2$ ergeben. Damit muß für die Konstante β auch gelten: $n_1 k_0 > \beta$. Daraus ergibt sich, daß β im Bereich zwischen $n_2 k_0$ und $n_1 k_0$ liegen muß. Für den Modenindex einer geführten Mode $n = \beta/k_0$ gilt somit die einfache Bedingung $n_2 < n < n_1$.

Entsprechend der Gleichungen 2.4 können alle Feldkomponenten durch ω , l , β und die Konstanten A , B , C und D dargestellt werden. Die Tangentialkomponenten E_ϕ , E_z , H_ϕ und H_z müssen an der Fasergrenzfläche bei $r = a$ stetig sein. Daraus ergibt sich ein Gleichungssystem für die vier Konstanten A bis D :

$$\begin{aligned} E_z: \quad & A J_l(ha) - C K_l(qa) = 0 \\ E_\phi: \quad & A \left[\frac{il}{h^2 a} J_l(ha) \right] + B \left[-\frac{\omega \mu_0}{h \beta} J'_l(ha) \right] + C \left[\frac{il}{q^2 a} K_l(qa) \right] + D \left[-\frac{\omega \mu_0}{q \beta} K'_l(qa) \right] = 0 \\ H_z: \quad & B J_l(ha) - D K_l(qa) = 0 \\ H_\phi: \quad & A \left[\frac{\omega n_1^2}{h \beta} J'_l(ha) \right] + B \left[\frac{il}{h^2 a} J_l(ha) \right] + C \left[\frac{\omega n_2^2}{q \beta} K'_l(qa) \right] + D \left[\frac{il}{q^2 a} K_l(qa) \right] = 0 \end{aligned} \quad (2.8)$$

Dabei bezeichnen in den Gleichungen, die sich aus den ϕ -Komponenten der Felder ergeben, die Striche „ $\prime$ “ eine Ableitung nach dem Argument der Besselfunktion. Damit dieses Gleichungssystem nichttrivial für A bis D gelöst werden kann, muß die Determinante verschwinden. Daraus ergibt sich die folgende Gleichung 2.9, aus der die Konstante β bzw. der Modenindex n bestimmt werden kann.

$$\left(\frac{J'_l(ha)}{ha J_l(ha)} + \frac{K'_l(qa)}{qa K_l(qa)} \right) \left(\frac{n_1^2 J'_l(ha)}{ha J_l(ha)} + \frac{n_2^2 K'_l(qa)}{qa K_l(qa)} \right) = l^2 \left(\frac{1}{(qa)^2} + \frac{1}{(ha)^2} \right)^2 n^2 \quad (2.9)$$

Diese Gleichung ist quadratisch in dem Faktor $J'_l(ha)/(ha J_l(ha))$ mit den Lösungen

$$\begin{aligned} \frac{J'_l(ha)}{ha J_l(ha)} &= - \left(\frac{n_1^2 + n_2^2}{2 n_1^2} \right) \frac{K'_l(qa)}{qa K_l(qa)} \\ &\pm \underbrace{\sqrt{\left(\frac{n_1^2 - n_2^2}{2 n_1^2} \right)^2 \left(\frac{K'_l(qa)}{qa K_l(qa)} \right)^2 + l^2 \frac{n^2}{n_1^2} \left(\frac{1}{(qa)^2} + \frac{1}{(ha)^2} \right)^2}}_R \end{aligned} \quad (2.10)$$

Meist werden die Lösungen dieser Gleichung 2.10 nach EH- (oberes Vorzeichen) bzw. HE-Moden (unteres Vorzeichen) aufgeteilt. Vereinfacht werden die Gleichungen durch die

für die Besselfunktionen J_l gültigen Relationen $J'_l(x) = -J_{l+1}(x) + l/x J_l(x)$ bzw. $J'_l(x) = J_{l-1}(x) - l/x J_l(x)$ und man erhält:

$$\begin{aligned} \text{EH: } \frac{J_{l+1}(ha)}{ha J_l(ha)} &= \frac{n_1^2 + n_2^2}{2 n_1^2} \frac{K'_l(qa)}{qa K_l(qa)} + \left(\frac{l}{(ha)^2} - R \right) \\ \text{HE: } \frac{J_{l-1}(ha)}{ha J_l(ha)} &= -\frac{n_1^2 + n_2^2}{2 n_1^2} \frac{K'_l(qa)}{qa K_l(qa)} + \left(\frac{l}{(ha)^2} - R \right) \end{aligned} \quad (2.11)$$

wobei qa über die Bedingung $(qa)^2 = (n_1^2 - n_2^2)k_0^2 a^2 - (ha)^2$ auch durch ha ausgedrückt werden kann. Da die Lösungen der Besselschen Differentialgleichung 2.5 so konstruiert wurden, daß q reell ist, können physikalisch sinnvolle Lösungen nur mit ha im Bereich $0 \leq ha \leq V = k_0 a \sqrt{n_1^2 - n_2^2}$ auftreten. Aus der graphischen Lösung der Gleichungen 2.11 erkennt man, daß für $V < 2.405$ nur die HE_{11} -Mode (kleinste Lösung ha zu $l = 1$) existiert.

Mit den Brechungsindizes $n_1 = 1.467$ und $n_2 = 1$ für die Glasfaser in Luft ergibt sich der Durchmesser $2a$, bei dem nur noch die HE_{11} -Mode geführt wird zu:

$$2a = 0.71 \cdot \lambda$$

wobei λ die Wellenlänge des verwendeten Lichts in Vakuum ist. Selbst bei der kürzesten Wellenlänge $\lambda = 457$ nm, die in den durchgeführten Experimenten verwendet wurde, ist der Durchmesser $2a = 326$ nm immer noch groß genug, daß man sich für die Analyse der Ergebnisse dieses Modells auf die HE_{11} -Mode beschränken kann.

Die Aufgabe ist nun, die Lösung h^*a der Gleichung 2.11, und damit auch das erlaubte $\beta = \sqrt{n_1^2 k_0^2 - h^{*2}}$ zu finden. In der Abbildung 2.2 sind die rechte und die linke Seite der Gleichung 2.11 für die HE -Moden zu vier verschiedenen Werten von V gegen ha aufgetragen. Während für $V = 8$ noch drei Schnittpunkte existieren (HE_{11} , HE_{12} und HE_{13}), gibt es für $V = 2, 1$ und 0.4 nur noch jeweils einen Schnittpunkt, der den erlaubten Modenindex bestimmt. Allerdings ist der Schnittpunkt zu $V = 0.4$ nicht mehr in der Grafik enthalten. Auf seine Existenz kann jedoch aus dem asymptotischen Verhalten der Kurven geschlossen werden. Aus dieser Abbildung sieht man, daß der Wert h^*a , an dem sich die Kurven schneiden, für kleine Werte des Parameters V sehr nahe an V liegt. In der Abbildung 2.3 ist der Wert h^*a der Schnittpunkte gegen V aufgetragen. Außerdem ist auch die Asymptote $V = V$ mit eingezeichnet. Für den Modenindex n bedeutet dies, daß er sich an n_2 annähert und die geführte Mode sich mit einer ähnlichen Geschwindigkeit $v = c/n$ ausbreitet wie eine Welle in Luft. Die sehr dünne Glasfaser wirkt somit wie eine schwache Störung, entlang der sich die elektromagnetische Welle ausbreitet.

Für die Abbildung im Nahfeldmikroskop ist es nun wichtig zu wissen, wie die Feldver-

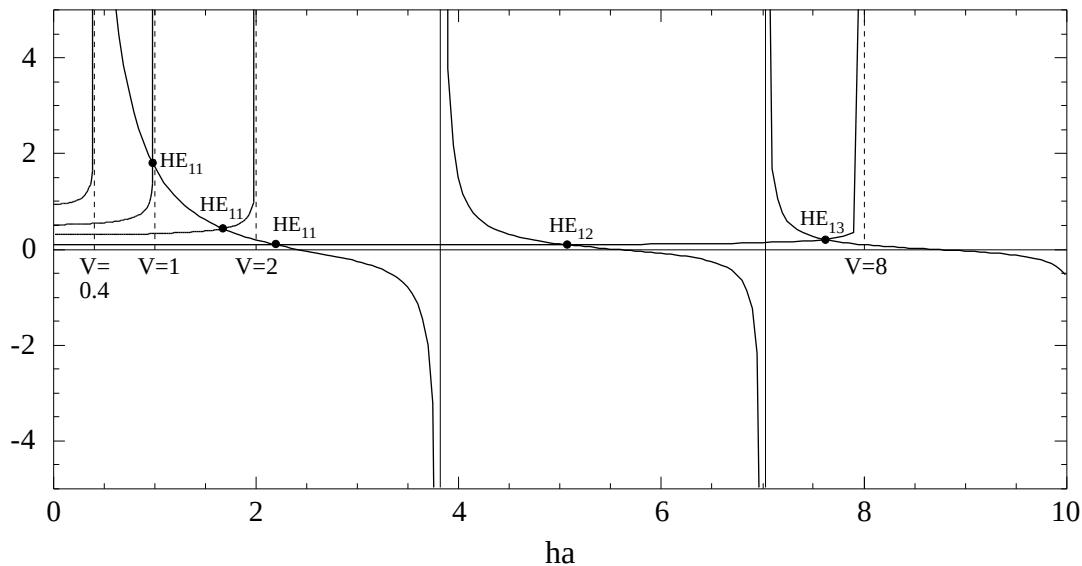


Abbildung 2.2: Graphische Lösung der Gleichung 2.11 für $l = 1$, HE-Moden. Die rechte Seite der Gleichung ist für vier verschiedenen Werten von V mit der Beziehung $(qa^2) = V^2 - (ha)^2$ eingezeichnet. Die Punkte markieren die Werte von h^*a , die die Gleichung lösen.

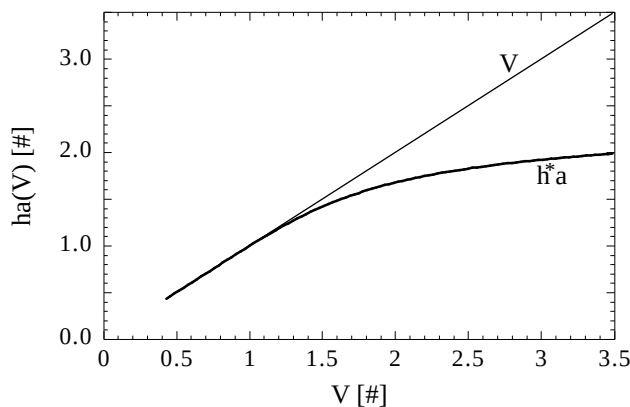


Abbildung 2.3: Verlauf des Wertes h^*a , der die Ausbreitung der HE_{11} -Mode beschreibt, in Abhängigkeit von V .

teilung der durch die dünne Glasfaser geführten Mode aussieht. Aus dem Gleichungssystem 2.8 ergeben sich die Verhältnisse der z -Komponenten der Felder, aus denen mit den Gleichungen 2.4 die anderen Feldkomponenten berechnet werden können. Da für dieses Modell das elektrische Feld wichtig ist, wird im folgenden die Rechnung für dieses Feld dargestellt. Die Berechnung der magnetischen Induktion erfolgt analog. Im folgenden muß für den Parameter h der Wert h^* , der sich aus der Lösung der Gleichung 2.11 ergibt, eingesetzt werden. Zunächst setzt man die allgemeinen Lösungen nach den Gleichungen 2.6 und 2.7

in die Ausdrücke für E_r und E_ϕ ein. Es ergibt sich:

$$\begin{aligned}
 r \leq a: \quad E_r(r) &= \frac{-i\beta}{h^2} \left[AhJ_1'(hr) + \frac{i\omega\mu_0}{\beta r} BJ_1(hr) \right] \\
 E_\phi(r) &= \frac{-i\beta}{h^2} \left[\frac{i}{r} AJ_1(hr) - \frac{\omega\mu_0}{\beta} BhJ_1'(hr) \right] \\
 E_z(r) &= AJ_1(hr) \\
 r > a: \quad E_r(r) &= \frac{i\beta}{q^2} \left[AqK_1'(qr) + \frac{i\omega\mu_0}{\beta r} BK_1(qr) \right] \\
 E_\phi(r) &= \frac{i\beta}{q^2} \left[\frac{i}{r} AK_1(qr) - \frac{\omega\mu_0}{\beta} BqK_1'(qr) \right] \\
 E_z(r) &= AK_1(qr)
 \end{aligned}$$

Dabei wurde der gemeinsame Phasenfaktor $\exp(i(\omega t + l\phi - \beta z))$ weggelassen. Aus dem Gleichungssystem 2.8 ergeben sich die Verhältnisse

$$\begin{aligned}
 \frac{C}{A} &= J_1(ha)/K_1(qa) \\
 \frac{B}{A} &= \frac{i\beta}{\omega\mu_0} \left(\frac{1}{(qa)^2} + \frac{1}{(ha)^2} \right) \bigg/ \left(\frac{J_1'(ha)}{ha J_1(ha)} + \frac{K_1'(qa)}{qa K_1(qa)} \right) \\
 \frac{D}{A} &= J_1(ha)/K_1(qa) \cdot \frac{B}{A}
 \end{aligned}$$

für die Konstanten A bis D , wobei eine frei wählbar bleibt.

In den Abbildungen 2.4 (A) und (B) ist der radiale Verlauf der ϕ - und der z -Komponente des elektrischen Feldes für vier Fasern verschiedenen Durchmessers gezeigt. Für diese Rechnung wurde eine Vakuumwellenlänge von 488 nm zugrunde gelegt. Die Kurven wurden derart skaliert, daß entlang der z -Achse immer der gleiche Energiefluß

$$I = \int_0^\infty \int_0^{2\pi} \underline{S} \cdot \hat{e}_z r d\phi dr = 2\pi \int_0^\infty \Re(\underline{E} \times \underline{H}^*) \cdot \hat{e}_z r dr$$

auftritt. Die in (A) gezeigten ϕ -Komponenten der Felder zeigen auf der z -Achse eine maximale Feldstärke. Interessant ist, daß der Wert dieses Maximums sowohl für kleine als auch für große Radien abnimmt, bei 130 nm am größten ist und in dieser Skalierung einen Wert von 13.4 hat. Dies kann dadurch erklärt werden, daß bei großen Faserradien mit dem Faserradius auch die Breite der Verteilung der ϕ -Komponente des elektrischen Feldes zunimmt. Nimmt der Faserradius ab, wird auch diese Verteilung schmaler und höher und erreicht einen Maximalwert. Bei einer weiteren Verringerung des Faserradius nimmt der

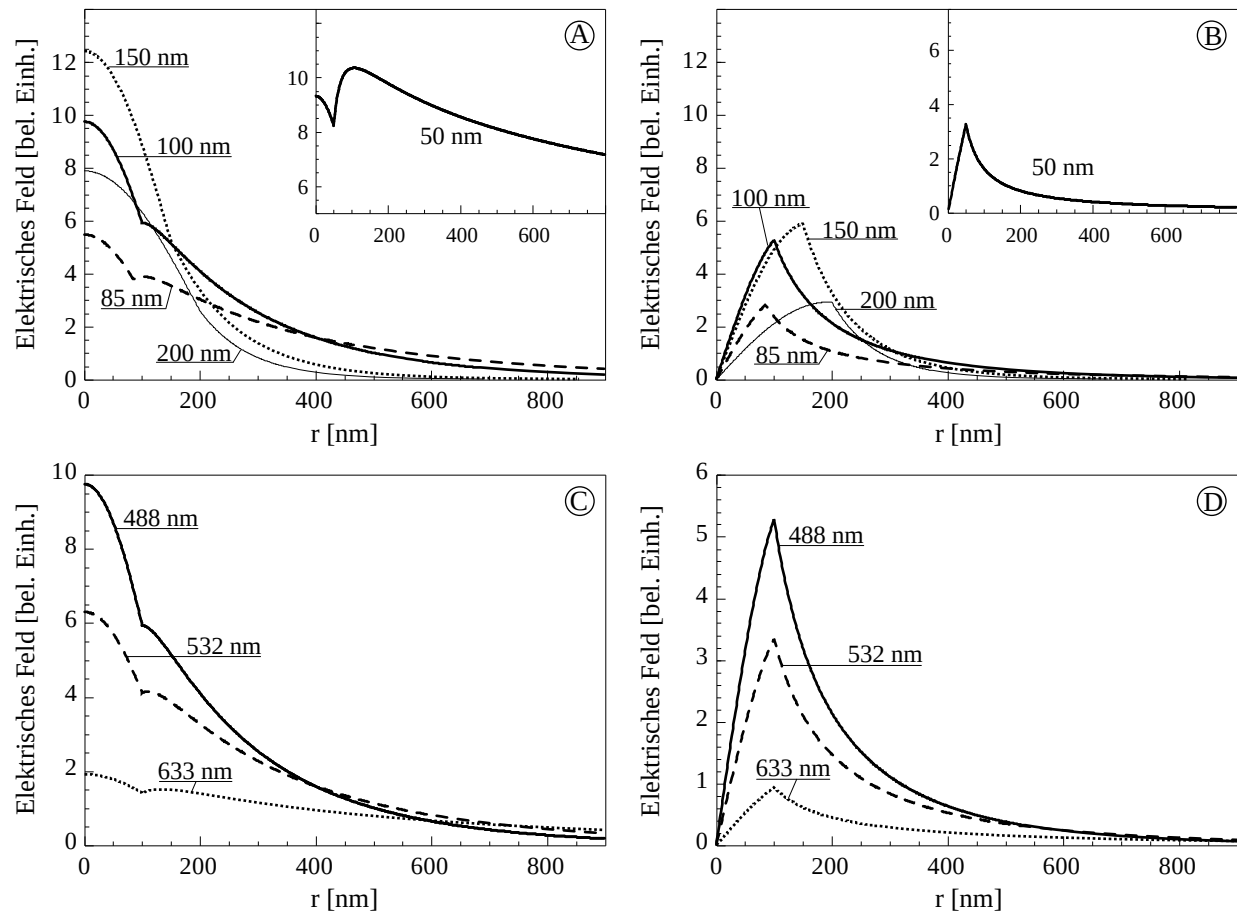


Abbildung 2.4: Radialer Verlauf der (A und C) ϕ - und (B und D) z -Komponente der elektrischen Felder für Fasern verschiedener Durchmesser (A und B) bzw. für verschiedene Wellenlängen (C und D). In (A) und (B) ist jeweils der Radius der Faser angegeben, wobei eine Wellenlänge von 488 nm der Rechnung zugrunde gelegt wurde. Die einzelnen Kurven wurden derart normiert, daß sie den gleichen Energiefluß entlang der Faser ergeben. Die separat gezeichneten Kurven gelten für eine Faser mit 50 nm Radius. Sie sind nicht normiert. In (C) und (D) ist jeweils die eingestrahlte Wellenlänge angegeben, wobei ein Faserradius von 100 nm angenommen wurde. Die Normierung stimmt mit der Normierung in (A) und (B) überein.

Feldanteil außerhalb der Glasfaser zu und die effektive Verteilung wird breiter, was wieder zu einer Abnahme des Maximalwertes führt.

Ein weiteres interessantes Detail ist die Unstetigkeit der Ableitung an der Stelle $r = a$, die insbesondere für kleine Faserradien deutlich wird. Dies unterscheidet die hier gefundene Lösung von den von Buckland et al. (1993) bestimmten Lösungen, die anstelle der sich aus den Maxwell-Gleichungen ergebenden Grenzbedingungen für die Tangentialkomponenten von $\underline{E}$ und $\underline{H}$ (bzw. $\underline{B}$) die Stetigkeit der Tangentialkomponente von $\underline{E}$ und deren ersten

Ableitung forderten.

Etwas außerhalb der Faser bildet sich in der ϕ -Komponente des elektrischen Feldes ein Nebenmaximum, welches bei noch geringeren Faserradien (kleine Kurven in (A) und (B) zu 50 nm Radius) so weit an Feldstärke zunehmen kann, daß das elektrische Feld außerhalb der Faser einen größeren Wert annimmt als in der Faser. Sie wurden separat gezeichnet, da die zugehörige Mode sehr breit ist und nach der Normierung eine so geringe Feldstärke hätte, daß die Form nicht erkennbar wäre. Dies stimmt auch mit den Ergebnissen von Novotny et al. (1995a) überein, die bei der Berechnung des Feldes in einer Glasfaserspitze mittels der MMP-Methode feststellten, daß dünne dielektrische Faserspitzen (Spitzenradius 10 nm) ein Minimum der Feldstärke in der Faser aufweisen. Die z -Komponente des elektrischen Feldes, die in der Abbildung 2.4 (B) für die gleichen Parameter wie die ϕ -Komponente in (A) aufgetragen ist, besitzt bei $r = a$ ein Maximum, und der Wert fällt sowohl für $r \rightarrow \infty$ als auch für $r \rightarrow 0$ auf Null ab.

Der Vergleich der elektrischen Felder für die gleiche Faserspitze zu unterschiedlichen Wellenlängen ist in Abbildung 2.4 (C) und (D) gezeigt. Auch hier wurden die Felder untereinander derart skaliert, daß sich der gleiche Energiefluß entlang der z -Achse ergibt. Für die Faser wurde ein Radius von 100 nm verwendet. Da in den Parameter V das Verhältnis von Radius a zur Wellenlänge λ eingeht, verändert sich die Modenform mit zunehmender Wellenlänge ähnlich wie bei der Verringerung des Durchmessers der Faser. Das zentrale Maximum wird flacher und das Nebenmaximum außerhalb der Faser deutlicher.

2.3 Abbildungseigenschaften des Fasermodells

Wie in Abschnitt 2.1 hergeleitet, erfolgt die Abbildung eines Farbstoffmoleküls proportional zur vierten Potenz des elektrischen Feldes. In Abbildung 2.5 (A) sind die Kurven aus Abbildung 2.4 (A) in der vierten Potenz dargestellt. Da die Kurven erheblich schmäler sind, wurde die r -Achse um den Faktor 3 gestreckt. Um die Form der Kurven besser vergleichen zu können, zeigt Abbildung 2.5 (B) die Kurven zu Fasern mit 85, 100 und 150 nm Radius, die auf den gleichen Wert an $r = 0$ normiert sind. In dieser Skalierung stellen sich die kleineren Faserradien als den großen Radien vorzuziehen dar. Allerdings ist die Verringerung der Halbwertsbreite bei Wechsel von 100 nm auf 85 nm nur noch gering, wohingegen sich das Nebenmaximum in der Stärke etwa verdoppelt. Die Halbwertsbreiten liegen für die dünnen Fasern bei etwa 120 nm. Bei einer weiteren Verringerung des Faserdurchmessers gewinnt das Nebenmaximum erheblich an Bedeutung, und die Halbwertsbreite nimmt

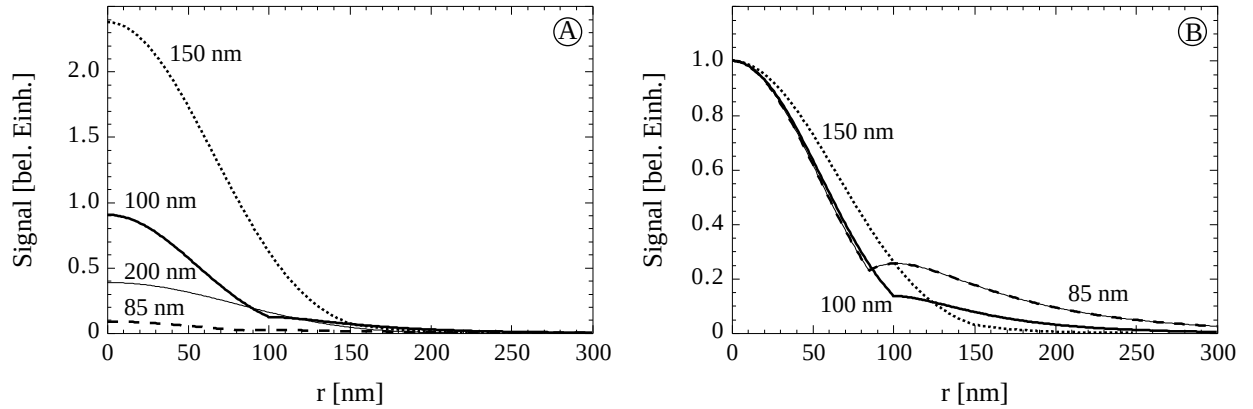


Abbildung 2.5: Abhängigkeit des detektierten Signals vom Abstand des Objekts zur Faserachse r . In (A) ist der Signalverlauf für vier Fasern unterschiedlichen Durchmessers gezeigt, wobei der jeweilige Durchmesser angegeben ist. Die Kurven wurden derart normiert, daß sich der Energiefluß entlang der Faser ergibt. In (B) sind die Kurven zu 150 nm, 100 nm und 85 nm nochmals gezeigt, wobei sie zum besseren Vergleich auf das gleiche Signalmaximum normiert wurden. Für diese Rechnungen wurde eine Wellenlänge von 488 nm angenommen.

wieder zu.

Für den Fall, daß ein Farbstoffmolekül mit dem Übergangsdipol parallel zur Oberfläche über die ϕ -Komponente des elektrischen Feldes abgebildet wird, zeigen diese Kurven, daß sich das Signalmaximum dann ergibt, wenn das Molekül auf der Faserachse liegt. Um zu testen, ob zwei Moleküle im Abstand von 120 nm noch aufgelöst werden können, ist in Abbildung 2.6 die Summe von zwei um ± 60 nm verschobenen Kurven aufgetragen. In diesem Fall kann einfach die Summe genommen werden, da die inkohärente Emission von zwei verschiedenen Fluorophoren keine Interferenz ausbilden kann. Es sind die Kurven zu einem Faserdurchmesser von 200 nm und den zuvor schon verwendeten Wellenlängen von 488 nm, 532 nm und 633 nm gezeigt. In allen drei Fällen sind zwei getrennte Maxima zu sehen, wobei sich allerdings mit zunehmender Wellenlänge ein Nebenmaximum in der Mitte zwischen den Punkten bildet. Dieses Nebenmaximum entsteht durch die schon in Abbildung 2.4 (C) gesehenen Nebenmaxima des elektrischen Feldes außerhalb der Faser. Der Kontrast der Abbildung nimmt mit zunehmender Wellenlänge von 7.6 % bei 488 nm über 4.5 % bei 532 nm auf 3.8 % bei 633 nm ab. Insofern ist ein Einfluß der Wellenlänge auf die Abbildung im Mikroskop zu beobachten.

Bei der Abbildung eines vertikalen Dipols durch die z -Komponente des elektrischen Feldes ergibt sich in diesem Modell immer ein Bild mit zwei Maxima, zwischen denen das Signal auf Null zurückgeht. Der Abstand dieser Maxima ist gleich dem Durchmesser der Faser. Die Abbildung von dieser Art Objekten profitiert somit von einer weiteren

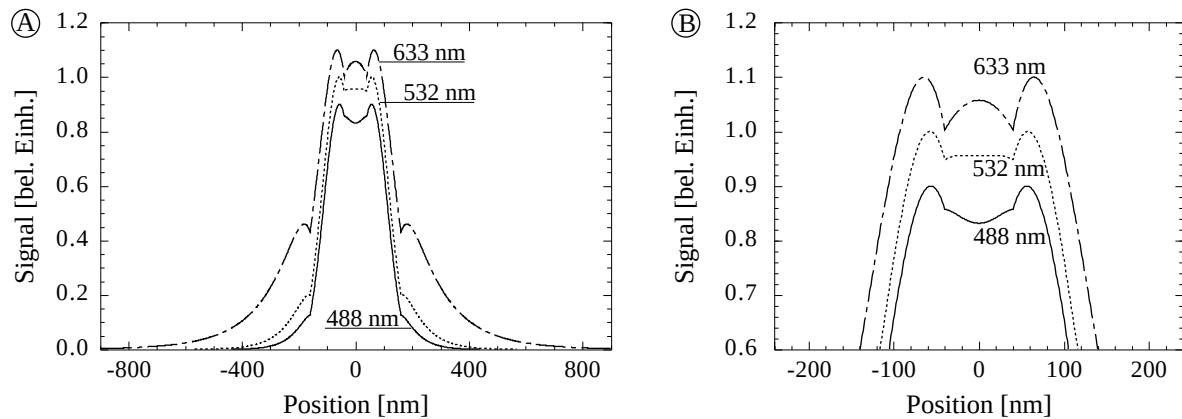


Abbildung 2.6: Verlauf des Signals, welches durch zwei Objekte an den Positionen ± 60 nm erzeugt wird. Der Rechnung wurde eine Faser mit 100 nm Radius zugrunde gelegt. Die verwendeten Wellenlängen sind jeweils angegeben. In (B) ist der zentrale Bereich der Abbildung (A) nochmals vergrößert dargestellt. Der Signalverlauf hängt von der verwendeten Wellenlänge ab.

Verringerung des Faserdurchmessers, und sie kann zum Beispiel durch ihre depolarisierende Wirkung von anderen Signalkomponenten isoliert werden. So kann mit diesem Modell die von Madsen et al. (1998) beobachtete sehr gute Auflösung erklärt werden.

Das hier diskutierte Modell ist sehr stark vereinfacht und dadurch über weite Strecken analytisch lösbar. Allerdings werden dabei zwei sehr wichtige Eigenschaften der Glasfaser Spitze vollkommen vernachlässigt: die Spitze verjüngt sich, und sie endet an einem Punkt wenige Nanometer über der Oberfläche.

Durch die Veränderung des Durchmessers der Spitze verändert sich auch die Form der lokal geführten Moden. Die geführten Moden können an strahlende Moden ankoppeln, und solange mehrere Moden geführt werden, kann es zu einer Kopplung der Moden untereinander kommen. Da kohärentes Licht zur Beleuchtung verwendet wird, können die an verschiedenen Stellen entlang des Faserkonus generierten strahlenden Moden untereinander interferieren und zu den Seitenlinien führen, die z. B. bei den Bleichexperimenten in Abschnitt 4.2.2 beobachtet wurden. Die Kopplung zwischen den Moden ist nach Marcuse (1987) proportional zu dem Faktor da/dz , so daß diese Kopplung bei sich nur langsam verjüngenden Glasfaserspitzen minimal sein sollte. Dieses Optimierungskriterium unterscheidet sich von dem Kriterium für Apertursonden, bei denen man versucht, die Spitze möglichst schnell zu verjüngen, um den Bereich der evaneszenten Lichtleitung möglichst kurz zu halten.

Das Ende der Spitze führt auch zu einer Kopplung zwischen Moden, wobei in diesem Fall zusätzlich noch evaneszente Moden auftreten können (Jackson, 1983). Allerdings ist

bei einem Nahfeldmikroskop zu beachten, daß die makroskopischen Maxwell-Gleichungen für die Bereiche gelten, in denen sich der Brechungsindex auf einer Längenskala von 10 nm nicht wesentlich ändert. Diese Bedingung ist im Bereich der Sondenspitze eines optischen Nahfeldmikroskops sicherlich nicht erfüllt, da sie sich typischerweise nur 2 nm (siehe Abschnitt 3) von der Probe entfernt befindet. Dieser Bereich müßte deshalb mit einer mikroskopischen Theorie behandelt werden, wie sie z. B. von Martin et al. (1994) entwickelt wurde.

Kapitel 3

Aufbau des optischen Nahfeldmikroskops

Die optische Nahfeldmikroskopie basiert darauf, daß mit einer kleinen Sonde die Oberfläche einer Probe rasterförmig abgetastet wird. Dabei werden mit der Sonde an den Punkten des Rasters lokal optische Messungen gemacht, wobei der Abstand zwischen Sonde und Probe nur wenige Nanometer beträgt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein kommerzielles Kraftmikroskop (NanoScope IIIa, Digital Instruments, Inc., Santa Barbara, CA, USA) derart umgebaut, daß eine Glasfaserspitze anstelle des Kraftmikroskopbalkens eingesetzt wird und die Abstandsregelung über die Detektion lateraler Kräfte (engl. *shear force detection*) erfolgt (Toledo-Crow et al., 1992; Betzig und Trautman, 1992). Die optische Messung wird im *shared-aperture*-Modus durchgeführt, d. h. die Glasfaserspitze dient sowohl zur Beleuchtung der Probe als auch zum Aufsammeln des von der Probe stammenden Lichtes. In diesem Modus ist es möglich, bis auf die Sonde die gesamte Optik separat vom Nahfeldmikroskop aufzubauen und sie nur durch eine Glasfaser mit dem Mikroskop zu koppeln. Dadurch wird der Mikroskopaufbau sehr einfach, und es ist möglich, die Beleuchtungs- und Detektionsoptik flexibel zu gestalten. Eine schematische Skizze des Gesamtaufbaus ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

In diesem Kapitel wird zunächst das Mikroskop mit der Scherkraftdistanzregelung beschrieben, da es eine Grundlage für alle weiteren Arbeiten ist. Die Faserspitze und ihre Herstellung wird kurz behandelt und der Aufbau des selbstentwickelten Sensorkopfes und die Funktionsweise der Scherkraftregelung erläutert. Die Faserspitze stellt einen mechanischen Oszillator dar, dessen Wechselwirkung mit der Probenoberfläche zur Abstandsregelung verwendet wird. Die Messung der Amplitude und der Phase der Schwingung der Faserspitze während der Annäherung an die Probe erlaubt zu untersuchen, welchen Charakter, dissipativ oder konservativ, die auftretende Wechselwirkung hat. Anhand von Messungen an

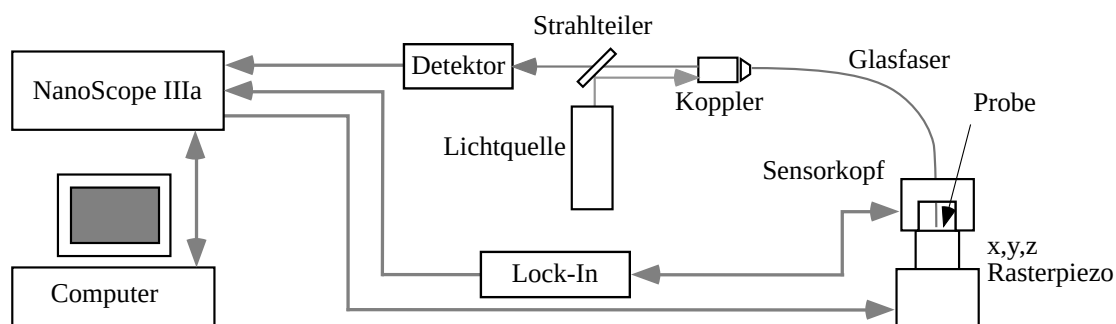


Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau des Gesamtsystems des optischen Nahfeldmikroskops mit Steuerelektronik, Optik und Mikroskop

verschiedenen Proben werden im Abschnitt 3.4 die Abbildungseigenschaften dieses Systems demonstriert.

In Abschnitt 3.5 schließt sich die Beschreibung des optischen Aufbaus zur Hellfeldreflexionsmessung an. Einige Beispielmessungen zeigen die Möglichkeiten dieser Mikroskopiemethode. Sie ist jedoch in der Biologie nicht so universell und vielseitig einsetzbar wie die Fluoreszenzdetektion. Im Rahmen dieser Arbeit erlaubt sie allerdings, die Schwingungsrichtung der Faser zur Scherkraftdetektion zu bestimmen.

Der prinzipielle Aufbau zur Fluoreszenzdetektion und einige Messungen zum Einfluß von Glasfasern auf Fluoreszenzmessungen finden sich in Abschnitt 3.6. Der tatsächliche Aufbau variierte je nach der Anwendung. Insbesondere die Anforderungen verschiedener Farbstoffe an die Lichtquelle und die Filter sind sehr unterschiedlich, so daß diese erst im Zusammenhang mit den jeweiligen Anwendungen im nächsten Kapitel genauer aufgeführt werden.

3.1 Die Faserspitze

Die für die Herstellung der Spitzen in dieser Arbeit zumeist verwendeten Glasfasern (SMF 1528 CPC6, Siecor, Neustadt) bestehen aus einem Glaskern, einem Glasmantel und einer Polymerschicht. Der Kern mit einem Durchmesser von $8.3 \mu\text{m}$ hat einen höheren Brechungsindex als der ihn umgebende Mantel. Der Glasmantel besitzt einen Außendurchmesser von $125 \mu\text{m}$. Die Polymerschicht dient zur mechanischen Stabilisierung der Faser und wird vor der Spitzenherstellung im Bereich der Spitze entfernt. Die Glasfaser wird in ein für das Ziehen von Glasfasern modifiziertes Pipettenziehgerät (P-2000, Sutter Instruments Co., Novato, CA, USA) eingespannt und mit einem CO_2 -Laser erhitzt. Zunächst wird mit einer

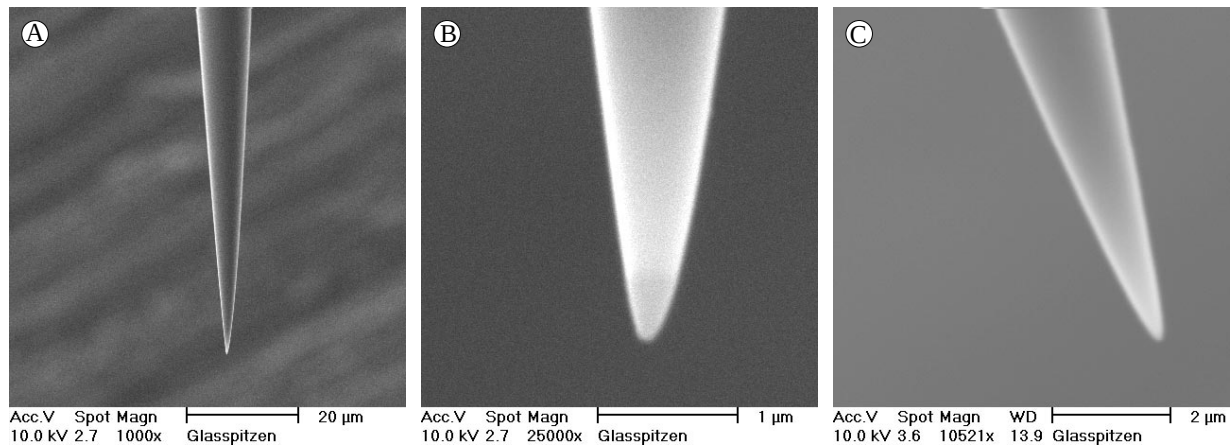


Abbildung 3.2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von zwei mit ca. 40 nm Gold bedampften Faserspitzen. (A) und (B) zeigen die selbe Spitze mit unterschiedlichen Vergrößerungen. (C) zeigt eine 3 Monate später hergestellte Spitze mit der gleichen Spitzenform.

kleinen Kraft gezogen, bis eine bestimmte Zuggeschwindigkeit erreicht ist. Dann wird mit relativ großer Kraft die Faser auseinandergezogen und 2 ms später der CO₂-Laser ausgeschaltet. Bei diesem Prozeß wird die Faser in zwei Teile getrennt und die Enden zu Spitzen geformt.

Um die Form der Spitzen zu kontrollieren, wurde eine ca. 40 nm dicke Goldschicht aufgebracht und dann die Spitze in einem Rasterelektronenmikroskop abgebildet. In Abbildung 3.2 sind zwei Spitzen abgebildet. Die zweite Spitze wurde etwa 3 Monate später hergestellt. Die Bilder zeigen die hohe Reproduzierbarkeit der Spitzenherstellung. Desweiteren war kein Unterschied zwischen den zwei Spitzen, die in einem Zugprozeß hergestellt wurden, feststellbar. Die Krümmungsradien der Spitzen lagen in der Regel bei ca. 70 nm.

Es wurden auch Spitzen aus verschiedenen Glasfasern mit gleichem Manteldurchmesser, aber unterschiedlichem Kerndurchmesser hergestellt. Für Kerndurchmesser zwischen 3.1 µm (Einzelmodenglasfaser bei 488 nm Wellenlänge) und 50 µm (Telekommunikationsglasfaser) war die Form der Spitze im Rahmen der Meßgenauigkeit unabhängig von der verwendeten Glasfaser. Allerdings war zum Beispiel mit der Telekommunikationsglasfaser nur eine sehr schlechte optische Auflösung zu erzielen.

3.2 Der Sensorkopf

Der Scherkraft-Sensorkopf besitzt im wesentlichen die gleiche Funktionalität wie der Sensorkopf des kommerziellen Kraftmikroskops: er enthält die Sonde und die Bauteile, die zur

Detektion der Wechselwirkung der Sonde mit der Probe benötigt werden. Da außer der Sonde keine weiteren Elemente für die optischen Messungen im Mikroskop benötigt werden, ist es möglich, alle anderen Teile des Kraftmikroskops, wie z. B. die Elektronik und den Piezoaktuator zur Bewegung der Probe relativ zur Sonde, mit nur geringfügigen Änderungen weiterzuverwenden. Das Mikroskop ist in der Abbildung 3.3 gezeigt. Die Breite des Kopfes beträgt ca. 8 cm und ist somit in etwa gleich der Breite des Kraftmikroskopkopfs. Durch die kompakte Bauform ist er nur wenig anfällig gegen mechanische Schwingungen.

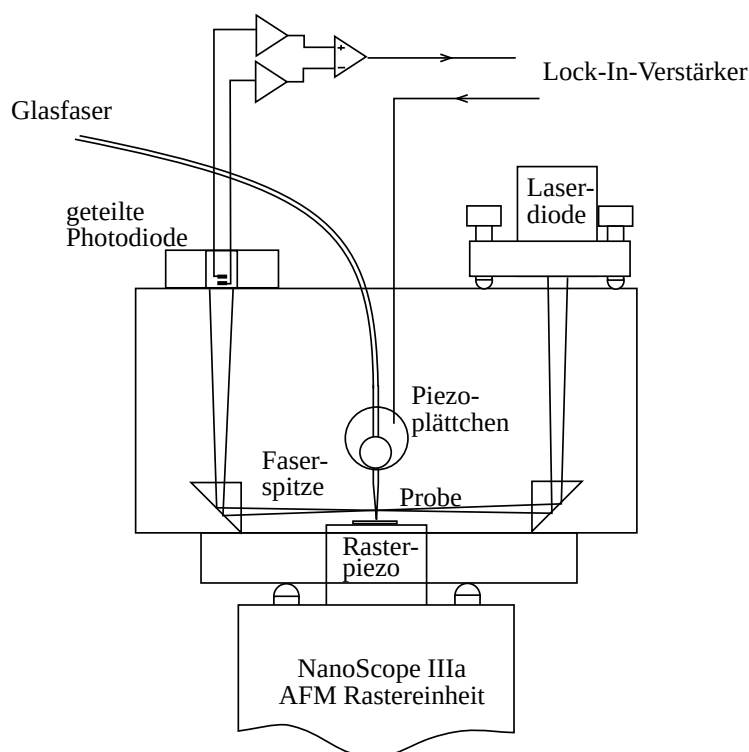
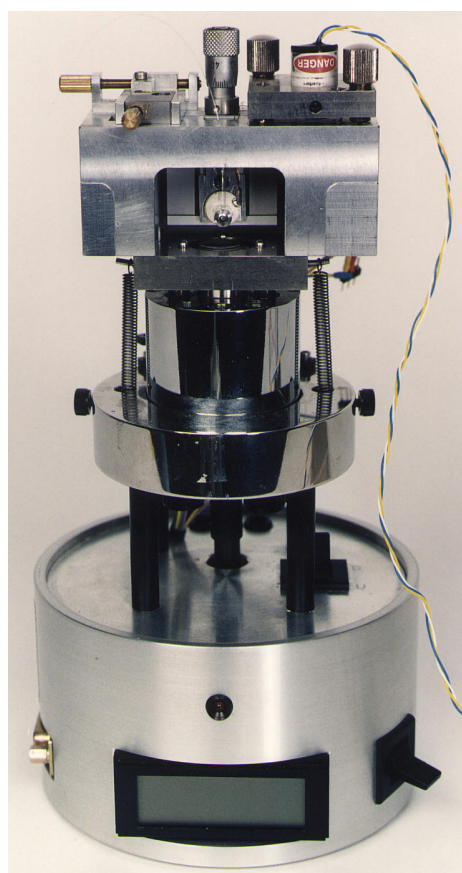


Abbildung 3.3: Fotografie des Mikroskops (links) und schematische Skizze des Mikroskopkopfes mit der Scherkraftdetektion (rechts). Neben dem Kopf ist auf dem Foto der Piezoaktuator für die Rasterbewegung und die Mikroskopbasis des kommerziellen Kraftmikroskops zu sehen.

Die Glasfaser Spitze wird zur besseren Handhabung in ein Glas- oder Metallröhrchen eingeklebt und mit Hilfe des piezoelektrischen Plättchens in Schwingung versetzt. Die Anregungsfrequenz wird dabei gleich einer der Resonanzfrequenzen der Faserspitze gewählt. Die Resonanzfrequenzen der Spitze hängen von der freien überstehenden Länge der Faserspitze über das Röhrchen ab, und die niedrigste Resonanz sollte in einem Bereich von

8–102 kHz liegen. Die obere Grenze ergibt sich daraus, daß ein Lock-In-Verstärker (SR 830, Stanford Research Systems, Sunnyvale, CA, USA) zur Detektion der Schwingung eingesetzt wird und er höhere Frequenzen nicht verarbeiten kann. Zu niedrigen Frequenzen hin ist der nutzbare Bereich dadurch begrenzt, daß der Lock-In-Verstärker zur Detektion des Signals über einige Perioden der Schwingung mitteln muß. Bei niedrigen Frequenzen wird dadurch aber die Reaktionszeit relativ lange und der Regelkreis langsam. Typische Schwingfrequenzen liegen im Bereich von 15 bis 45 kHz, wobei die Faserspitze 3–4 mm weit über das Röhrchen übersteht. Als Zeitkonstante des Lock-In-Verstärkers wurden 30 bis 100 μs verwendet.

Um die Schwingung der Faserspitze zu detektieren, wird eine Laserdiode etwa 0.5–1 mm oberhalb des Endes der Spitze auf die Faser fokussiert (Moyer und Paesler, 1993) und eine zweigeteilte Photodiode (LD2C-5T, Centronic Electro-Optics, Croydon, GB) im Bild der Spitze positioniert. Die Photoströme der zwei Hälften der Diode werden separat in Spannungen umgewandelt (0.2 V/ μA). Sie sind wegen der Faserbewegung moduliert, und die Modulation wird mit dem Lock-In-Verstärker detektiert. Dabei kann entweder das Signal einer einzelnen Diodenhälfte oder die Differenz der beiden Spannungen verwendet werden. Bei der verwendeten Photodiode und der Geometrie des Kopfes ist bei guter Justage die Modulation im Differenzsignal meist durch die Modulation im Signal nur einer Diodenhälfte gegeben, so daß die beiden Betriebsarten äquivalent sind.

Das Photodiodensignal ist bei ausreichend kleinen Schwingungsamplituden der Faserspitze mit der gleichen Frequenz wie die Faserschwingung moduliert, und die Amplitude hängt monoton von der Schwingungsamplitude der Faser ab. Bei größeren Amplituden kann das Photodiodensignal auch Harmonische der Schwingfrequenz der Faserspitze enthalten, wenn mehr als nur eine Hell-Dunkel-Kante des Bildes der Spitze die Photodiode überquert.

Wenn die schwingende Faserspitze mit der Probenoberfläche wechselwirkt, wird die Schwingung gedämpft, und/oder durch eine weitere Rückstellkraft wird die Eigenfrequenz des Systems verschoben. Der Lock-In-Verstärker detektiert das Signal $x = r \cos(\phi + \delta\phi)$, wobei r die Amplitude und ϕ die Phase der Schwingung sind. Durch Veränderung der Referenzphase $\delta\phi$ des Lock-In-Verstärkers wird dieses Signal maximiert¹.

Die beiden möglichen Effekte bei der Wechselwirkung der Sonde mit Probe, Dämpfung und zusätzliche Rückstellkräfte, führen zu einer Verringerung des x -Signals des Lock-In-

¹Es wird nicht die Amplitude r verwendet, da sie in der Regel digital bestimmt werden muß und bei derzeit gängigen Lock-In-Verstärkern zu langsam für einen Regelkreis auf Veränderungen im Photodiodensignal reagiert.

Verstärkers. Während der Messung wird der Abstand zwischen der Probe und der Sonde im Mikroskop derart geregelt, daß die mit dem Lock-In-Verstärker detektierte Modulation des Photodiodensignals einen festen Wert x_0 besitzt, der kleiner als der Wert für die freie Schwingung ist. Oftmals kann die dadurch erhaltene Fläche mit der Probentopographie gleichgesetzt werden. Dies gilt jedoch nicht für Proben mit chemisch stark unterschiedlichen Oberflächen, da dadurch auch die Wechselwirkung der schwingenden Sonde mit der Oberfläche variiert (Jalocha et al., 1995). Dies kann zu einem Fehler in der Topographiebestimmung führen, der in der Größenordnung der Wechselwirkungslänge der Faserspitze mit der Probe von in unserem Fall 2–10 nm liegt. Eine typische Abstandskurve für das Scherkraftsignal ist in Abbildung 3.4 gezeigt. Die Probe war eine frisch gespaltene Glimmeroberfläche.

Eine wichtige Größe bei der Scherkraftmessung ist die Amplitude der Faserschwingung. Um sie wird, verglichen mit einer nicht schwingenden Spitze, der Probenbereich vergrößert, über den bei jeder mit der Faserspitze gemachten lokalen Messung gemittelt wird. Die Amplitude der Faserbewegung kann durch eine Messung im quasistatischen Fall kalibriert werden. Da die typischen Resonanzfrequenzen der Faserspitzen oberhalb von 15 kHz liegen, kann man annehmen, daß bei 1.5 kHz die Faser der Bewegung des Piezoplättchens folgt (quasistatischer Grenzfall). Aus den bekannten piezoelektrischen Konstanten kann die Dickenänderung des Piezoplättchens und damit auch die Bewegung der Faserspitze berechnet werden. Gleichzeitig wird das mit der Photodiode detektierte Scherkraftsignal gemessen. Damit ist die Bewegungsamplitude der Faserspitze, die einem bestimmten

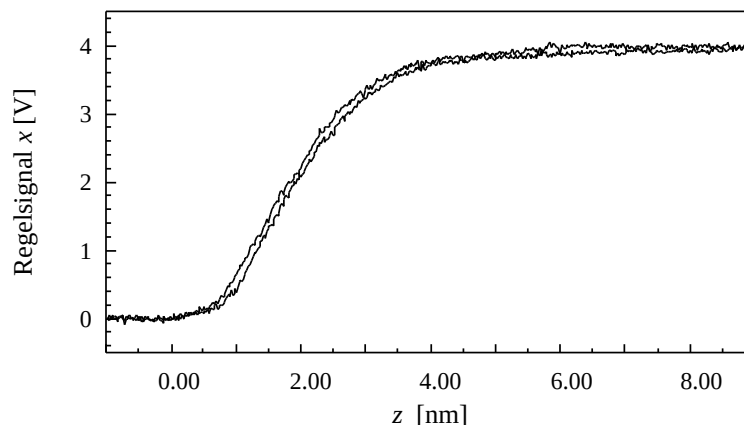


Abbildung 3.4: Scherkraftsignal während der Annäherung und anschließenden Entfernung der Faserspitze von einer Glimmeroberfläche. Es ist eine leichte Hysterese sichtbar. Der Nullpunkt der Abszisse wurde willkürlich festgelegt.

Photodiodensignal entspricht, bekannt. Der Zusammenhang von Bewegungsamplitude und Photodiodensignal hängt von der Justage der Scherkraftdetektion ab. Typische Werte für die Bewegungsamplitude der Faserspitze für die Scherkraftdistanzregelung sind 2–10 nm, typische Amplituden der Dickenschwingung des Piezoplättchens 10–250 pm.

3.3 Experimente zum Scherkraftmechanismus

Der Einsatz der Scherkraftdetektion zur Abstandsregelung in der optischen Nahfeldmikroskopie hat sich seit seiner Einführung 1992 weit verbreitet, und es wurden viele verschiedene Methoden zur Messung der Faserschwingung vorgeschlagen (Toledo-Crow et al., 1992; Betzig und Trautman, 1992; Leong und Williams, 1995; Barenz et al., 1996; Lee et al., 1996; Karrai und Grober, 1995). Allerdings ist der physikalische Mechanismus, der zur Änderung des Schwingverhaltens der Faserspitze führt, noch weitgehend ungeklärt. Es wurden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen, die auf dissipativen Kräften beruhen (Moyer und Paesler, 1993; Valaskovic et al., 1995a). Des weiteren gibt es für Messungen in suprafluidem Helium mit Proben, die nicht normal zur Faserachse ausgerichtet sind, starke Hinweise dafür, daß ein direkter mechanischer Kontakt der Sonde mit der Probe auftritt (Gregor et al., 1996).

Um zu entscheiden, ob reine Reibungskräfte auftreten oder ob auch andere Kräfte auf die Faser wirken, wurde das Verhalten der Amplitude und Phase der Faserschwingung während der Annäherung an eine frisch gespaltene Glimmeroberfläche aufgezeichnet. Die Resonanzkurve der frei schwingenden Faser ist in Abbildung 3.5 (A) gezeigt. Dabei betrug die Amplitude der Dickenschwingung des Piezoplättchens 38 pm. Die Resonanzfrequenz der Faserspitze war 22.39 kHz. Aus der Kalibrierung im quasistatischen Fall ergab sich eine Resonanzüberhöhung von 125, was in einer Amplitude von 4.8 nm für die freie Faserschwingung resultierte.

Das Verhalten der Amplitude $r(z)$ und der Phase $\phi(z)$ der Faserschwingung in Abhängigkeit vom Abstand z zwischen der Faserspitze und der Probe bei Annäherung an die Glimmeroberfläche zeigt Abbildung 3.5 (B). Für diese Messung wurden das Amplituden- und das Phasenausgangssignal des Lock-In-Verstärkers während der Annäherung an die Probe aufgezeichnet. Der Ursprung der z -Achse ist willkürlich und wurde so gewählt, daß er mit dem Verschwinden einer meßbaren Schwingungsamplitude der Faserspitze zusammenfällt. Wie aus der Abbildung zu sehen, betrug der Bereich, in dem die Schwingungsamplitude abnahm, etwa 3 nm. Wenn man im niederfrequenten Grenzfall annimmt, daß sich

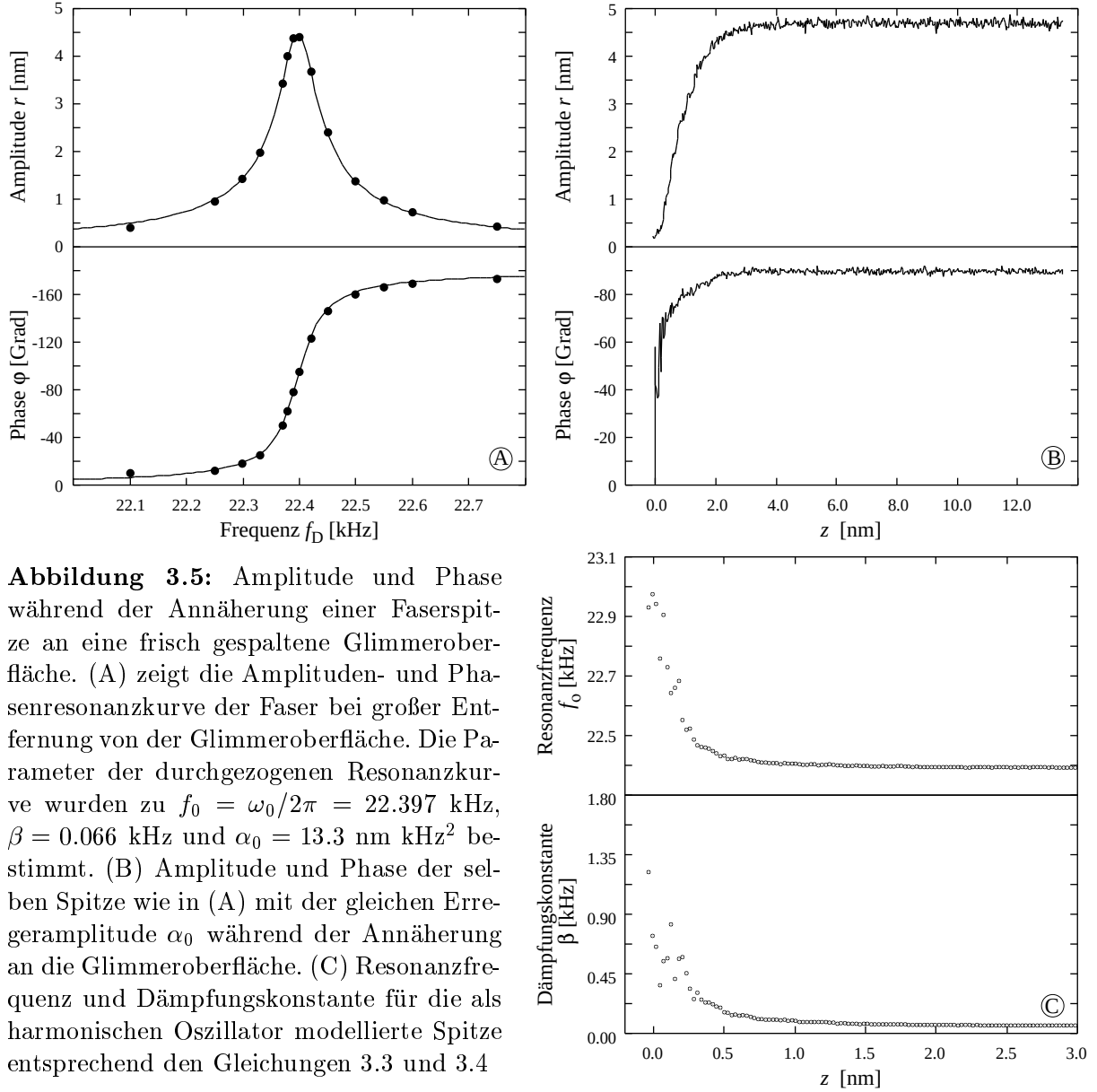


Abbildung 3.5: Amplitude und Phase während der Annäherung einer Faserspitze an eine frisch gespaltene Glimmeroberfläche. (A) zeigt die Amplituden- und Phasenresonanzkurve der Faser bei großer Entfernung von der Glimmeroberfläche. Die Parameter der durchgezogenen Resonanzkurve wurden zu $f_0 = \omega_0/2\pi = 22.397$ kHz, $\beta = 0.066$ kHz und $\alpha_0 = 13.3$ nm kHz² bestimmt. (B) Amplitude und Phase der selben Spitze wie in (A) mit der gleichen Erregeramplitude α_0 während der Annäherung an die Glimmeroberfläche. (C) Resonanzfrequenz und Dämpfungskonstante für die als harmonischen Oszillator modellierte Spitze entsprechend den Gleichungen 3.3 und 3.4

die Faserspitze und das Piezoplättchen synchron bewegen, dann hinkte im Resonanzfall die Spitzenbewegung der Piezobewegung um $89.6 \pm 0.8^\circ$ hinterher. Bei der Annäherung an die Probe nahm neben der Amplitude auch diese Phasendifferenz ab.

Beschreibt man die Faserspitze als einen harmonischen Oszillator (Kittel et al., 1965), dann sind die relevanten physikalischen Größen, die in das Modell eingehen, geschwindigkeitsabhängige Dämpfungskräfte und die Rückstellkraft des Potentials, in dem sich die Spitze bewegt. Im Modell werden sie über die Parameter β für die Dämpfung und ω_0 für die

Resonanzfrequenz des ungedämpften Resonators beschrieben. Wenn durch die Oberfläche zusätzliche Reibungskräfte auftreten, muß β ansteigen, wohingegen weitere Rückstellkräfte, wie z. B. ein direkter mechanischer Kontakt mit der Probe, die Resonanzfrequenz ω_0 ansteigen lassen, da im mechanischen Oszillator ω_0 durch die Gleichung $\omega_0^2 = k/m$ gegeben ist, wobei k die Richtgröße und m die Masse des Oszillators ist. Die Bewegungsgleichung für den Oszillator lautet

$$\ddot{\xi} + \beta(z)\dot{\xi} + \omega_0^2(z)\xi = \alpha_0 \sin(\omega_D t) = F(t)/m ,$$

wobei α_0 die Amplitude der Beschleunigung aufgrund der externen harmonischen Kraft $F(t)$ und ω_D die Frequenz dieser Kraft ist. In dieser Gleichung wurden β und ω_0 als von dem Parameter z , dem Abstand zwischen der Spitze und der Probe, abhängig angenommen.

Die Bewegung des Oszillators wird durch die Amplitude r und die Phase ϕ relativ zur antreibenden Kraft beschrieben, wobei ϕ angibt, um wieviel der Oszillator der antreibenden Kraft hinterhinkt. Für r und ϕ ergeben sich die folgenden Resonanzkurven

$$r(\omega_D, z) = \frac{\alpha_0}{\sqrt{(\omega_0^2(z) - \omega_D^2)^2 + (\omega_D \beta(z))^2}} \quad (3.1)$$

$$\phi(\omega_D, z) = \arctan\left(\frac{\omega_D \beta(z)}{\omega_0^2(z) - \omega_D^2}\right) \quad (3.2)$$

Aus diesen Gleichungen kann umgekehrt von r und ϕ auf die den Oszillator beschreibenden Parameter ω_0 , β und α_0 geschlossen werden. Der Wert für α_0 hängt von der Amplitude der antreibenden Kraft, d. h. von der Amplitude der Dickenschwingungen des piezoelektrischen Plättchens, ab und ergibt sich aus einer numerischen Anpassung der Resonanzkurven in Abbildung 3.5 (A). Die Gleichungen 3.1 und 3.2 können nach $\omega_0(z)$ und $\beta(z)$ aufgelöst werden:

$$\omega_0(z) = \sqrt{\frac{\alpha_0 \cdot \cos(\phi(z))}{r(z)} + \omega_D^2} \quad (3.3)$$

$$\beta(z) = \frac{\alpha_0 \cdot \sin(\phi(z))}{\omega_D \cdot r(z)} \quad (3.4)$$

Damit kann aus den Kurven in Abbildung 3.5 (B) die Resonanzfrequenz und die Dämpfungskonstante in Abhängigkeit vom Abstand z berechnet werden. Sie sind in der Abbildung 3.5 (C) dargestellt. Dabei ist zu bemerken, daß sowohl $\omega_0(z)$ als auch $\beta(z)$ mit abnehmendem Abstand zwischen Sonde und Probe zunehmen. Daraus ergibt sich, daß in diesem Experiment neben einer Dämpfung auch noch eine Rückstellkraft auftrat. Ein realistisches

Modell der Wechselwirkung zwischen der Spitze und der Probe im Scherkraftmikroskop muß somit beide Arten von Kräften berücksichtigen.

3.4 Scherkraftmikroskopische Abbildung

Auch wenn der physikalische Mechanismus, der der Scherkraftwechselwirkung zugrunde liegt, nicht genau bekannt ist, so kann sie dennoch als Abstandsregelung in einem optischen Nahfeldmikroskop eingesetzt werden. Außerdem stellt diese Abstandsregelung auch eine selbständige Mikroskopietechnik dar, die es erlaubt, mit sehr geringen Normalkräften die Oberflächentopographie einer Probe abzubilden (Moyer und Kammer, 1996). Im folgenden werden Messungen an sehr flachen Objekten vorgestellt, die die Sensitivität des Systems demonstrieren. Es ist auch möglich, Proben mit sehr großen Höhenunterschieden abzubilden, wie anhand von Messungen an Zellen gezeigt wird.

In Abbildung 3.6 sind relaxierte, zirkuläre, dimere pUC18 Plasmid-DNA-Moleküle zu sehen (Kirsch et al., 1997). Sie wurden auf Glimmer gespreitet, der mit einem Cetylpyridiniumchlorid-Film bedeckt war (Schaper et al., 1994). Die Resonanzfrequenz der Faser war 18.1 kHz und die Amplitude der Dickenschwingung des Piezoplättchens 15 pm. Die Amplitude der Faserschwingung betrug ca. 4.5 nm, die Zeilenfrequenz war 0.3 Hz. Einzelne dop-

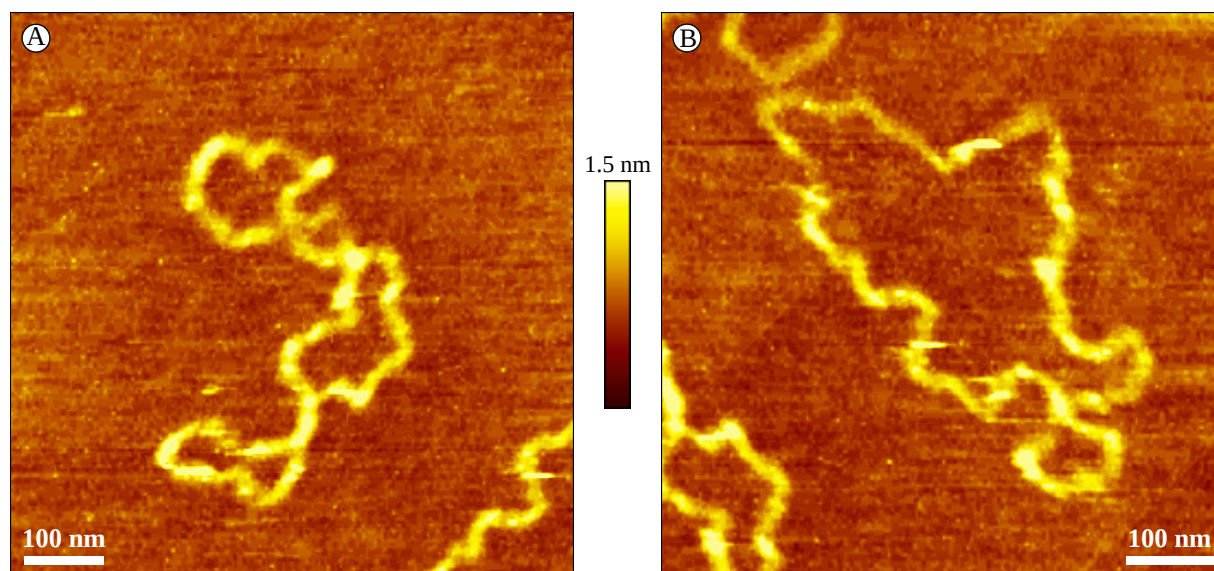


Abbildung 3.6: Scherkraftmikroskopische Aufnahmen von einzelnen, relaxierten, zirkulären, dimeren pUC18 Plasmid-DNA-Molekülen mit Cetylpyridiniumchlorid auf Glimmer gespreitet. Abbildungsparameter: 0.3 Hz Zeilenfrequenz.

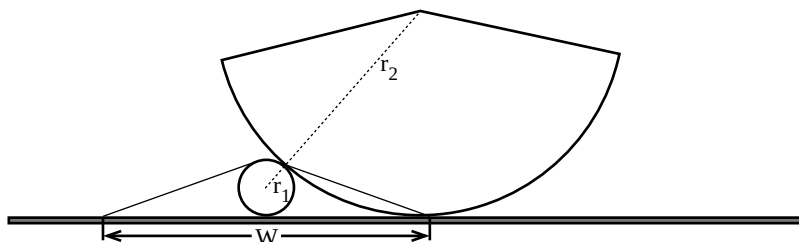


Abbildung 3.7: Modell zur Berechnung des Sondenradius aus der Abbildung von Objekten bekannter Größe.

pelsträngige Plasmid-DNA-Moleküle sind eindeutig erkennbar und konnten über Stunden hinweg stabil abgebildet werden. Die Hintergrundkorrektur erfolgte mit dem Bildverarbeitungsprogrammpaket SCIL-Image (Universität Amsterdam, Technische Universität Delft, NL) mit den Routinen von Starink und Jovin (1996).

Die Abweichung der gemessenen Höhe und Breite der DNA-Moleküle von den für B-DNA erwarteten 2 nm erlaubt es, den effektiven Radius der abbildenden Spitze zu bestimmen. Dazu wurde die Breite und Höhe der DNA aus Querschnitten senkrecht zur Kontur der DNA-Moleküle bestimmt. Sie hatte eine Breite von 28 ± 5 nm und eine Höhe von 0.6 ± 0.3 nm. Wenn man ein Modell harter Kugeln für die Spitze und die DNA annimmt

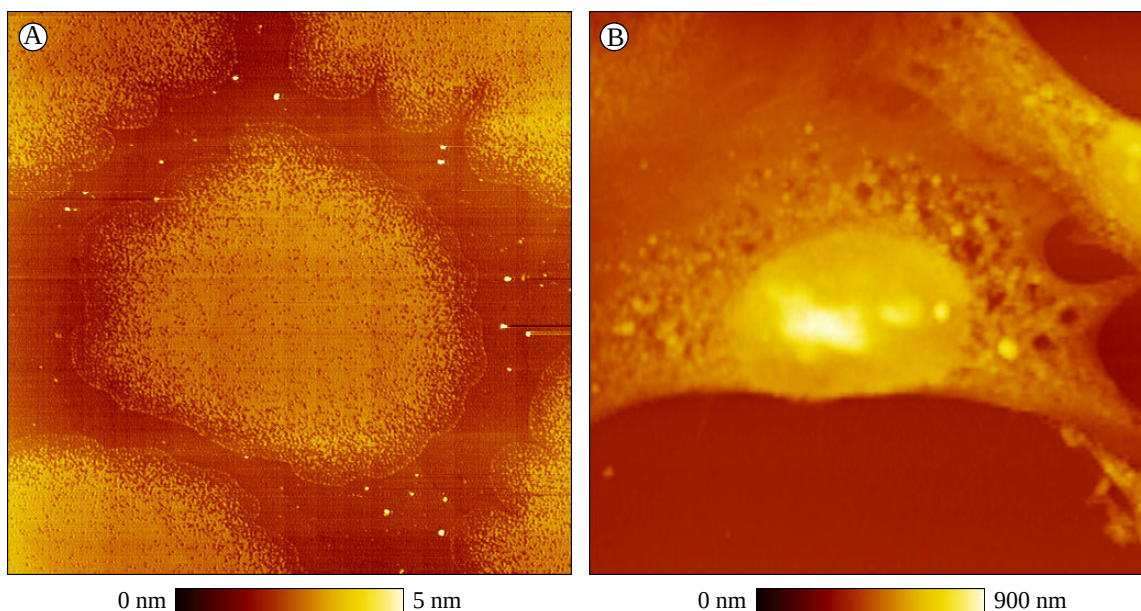


Abbildung 3.8: Scherkraftmikroskopische Aufnahme eines LB-Films (A) und einer 3T3 Balb/c Zelle (B). Abbildungsparameter: (A) $14.8 \mu\text{m}$ Kantenlänge, 0.6 Hz Zeilenfrequenz, (B) $60 \mu\text{m}$ Kantenlänge, 0.23 Hz Zeilenfrequenz

(Abbildung 3.7; Bustamante et al., 1992), ergibt sich für die gemessene Breite W folgender Wert:

$$W = 4(r_1 + r_2)\sqrt{r_1(r_2 - r_1)}/r_2 \approx 4\sqrt{r_1 r_2} \quad \text{für} \quad r_1 \ll r_2$$

Für die Faserspitze ergibt sich damit ein Spitzenradius von $r_2 \approx 25$ nm oder 82 nm, wenn man für die DNA einen Durchmesser von 2 nm bzw. 0.6 nm annimmt. Diese Radien liegen größenordnungsmäßig im Bereich der mit dem Elektronenmikroskop gemessenen Radien (Abschnitt 3.1). Allerdings geht in das hier aufgeführte Modell ausschließlich der Bereich der Spitze ein, der maximal 2 nm von der Probe entfernt ist. Dies ist ein Bereich, der mit dem Elektronenmikroskop nicht aufgelöst werden kann. Die Messungen müssen insofern als sich ergänzend verstanden werden.

Die für die DNA gemessene Höhe entspricht der mit einem Kraftmikroskop gemessenen Höhe für derartige Proben (Schaper et al., 1994). Die Differenz zu den erwarteten 2 nm ergibt sich vermutlich aus der Dehydrierung der getrockneten Proben, Deformationen der DNA aufgrund der Wechselwirkung mit den Sonden und unterschiedlichen Abfallängen der Wechselwirkung aufgrund lokal unterschiedlicher physikalischer und chemischer Eigenschaften der Probe.

Eine weitere sehr flache Probe stellen phasenseparierte Langmuir-Blodgett-Filme (LB-Filme) dar. Auf diese Filme wird in Kapitel 4.1 näher eingegangen. Abbildung 3.8 (A) zeigt eine scherkraftmikroskopische Aufnahme eines LB-Films, der aus einer Mischung einer Metallkomplexdiade und Stearinsäure besteht und bei einem Oberflächendruck von 20 mN/m auf Glimmer übertragen wurde. Die Spitze war mit Dimethylchlorosilan (ABCR Karlsruhe, D) silanisiert worden. Die Resonanzfrequenz betrug 13.2 kHz, und die Zeilenfrequenz war 0.6 Hz. Es ist eine Domäne zu sehen, die etwa 0.7 nm dicker als der sie umgebende Film erscheint. Im Rand der Domäne können Strukturen bis zu einer Größe von 50 nm erkannt werden.

Im Gegensatz zu diesen sehr flachen Proben sind in Abbildung 3.8 (B) getrocknete Maus-Fibroblasten (3T3 Balb/c) zu sehen. Sie wurden fixiert, mit einem Farbstoff markiert und mit einer Ethanolreihe getrocknet. Durch den Dehydrierungsprozeß kollabiert die Zellmembran, und Strukturen des Zellinneren werden in der Topographie sichtbar. Ähnlich wie in Kraftmikroskopaufnahmen von vergleichbaren Proben (Pietrasanta et al., 1994b) ist insbesondere der Zellkern mit den Nukleoli klar zu erkennen. Die Resonanzfrequenz der Spitze war 22.8 kHz. Da die maximale Höhe dieser Zellen etwa 550 nm war, mußte, um Beschädigungen der Probe und der Sonde zu vermeiden, mit einer Zeilenfrequenz von 0.23 Hz gemessen werden.

3.5 Hellfeldreflexionsaufbau

Einer der am einfachsten zu implementierenden Modi in einem optischen Mikroskop und insbesondere in einem optischen Nahfeldmikroskop ist die Hellfeldreflexion. Dabei wird die Lichtintensität unabhängig von der Wellenlänge detektiert, und somit dominiert die zur Beleuchtung der Probe verwendete spektrale Komponente des Lichtes. Dieser Modus wurde schon in einer Anzahl von Arbeiten mit diesem und vergleichbaren Mikroskopen eingesetzt (Spajer et al., 1991; Jalocha und van Hulst, 1995a; Krausch et al., 1995; Straub et al., 1995; Kirsch et al., 1996; Madsen et al., 1998). Man muß allerdings bei der Interpretation der optischen Daten vorsichtig sein, da meist die Sonde der Probentopographie aktiv nachgeführt wird und es sowohl aus theoretischen (Carminati et al., 1997) als auch aus experimentellen (Valaskovic et al., 1995b; Sandoghdar et al., 1997; Hecht et al., 1997) Arbeiten bekannt ist, daß dies zu Artefakten führen kann. Dabei ist jedoch auch zwischen Artefakten, die aufgrund der aktiven Distanzregelung zustande kommen (Valaskovic et al., 1995b), und dem optischen Signal, welches auf Variationen in der Probentopographie beruht (Carminati und Greffet, 1995a), zu unterscheiden.

3.5.1 Aufbau der Hellfelddetektion

Der optische Aufbau ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Ein durchstimmbarer HeNe-Laser (LSTP-1010, Research Electro-Optics Inc., Boulder, CO, USA), auf 632.8 nm eingestellt, wurde als Lichtquelle eingesetzt. Der Laserstrahl wurde durch Graufilter abgeschwächt, passierte einen halbdurchlässigen Spiegel und wurde mit einem Fasereinkoppelsystem (MDE 610, Martock Design Ltd., GB) in die schräg angeschnittene Glasfaser eingekoppelt. Das reflektierte Licht wird von der Faserspitze wieder aufgesammelt und vom Anregungslicht getrennt und mit einer Irisblende und einer Photodiode (OSD60-5T, Centronic) detektiert. Das analoge Signal der Photodi-

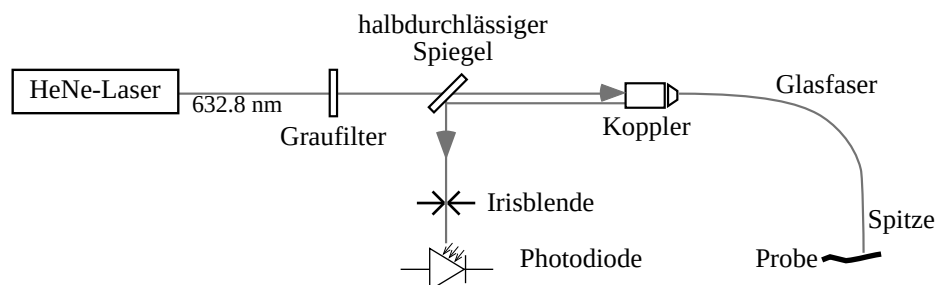


Abbildung 3.9: Optischer Aufbau zur Detektion im Hellfeldreflexionsmodus

ode wird von der NanoScope-Elektronik digitalisiert und aufgezeichnet.

In Abbildung 3.10 sind Maus-Fibroblasten gezeigt. Die über die Scherkraftdetektion bestimmte Topographie zweier sich berührender Zellen ist in Abb. 3.10 (A) zu sehen. Das markierte Gebiet ist in (B) und (C) nochmals vergrößert abgebildet, wobei (B) die Scherkraft-Topographie und (C) die reflektierte Intensität zeigt. Viele der kleinen dunklen Flecken korrelieren zu Erhebungen, die etwa 2–8 nm über die gemittelte Oberfläche herausragen, und können daher auch durch die Nachführung der Spitze verursacht sein.

Eine Quelle für Bildartefakte stellen bei der Hellfeldreflexion auch Interferenzen zwischen an entfernten Objekten und direkt bei der Spitze reflektiertem Licht dar. Dies ist gut bei den in Abbildung 3.11 gezeigten Erythrozyten zu sehen. Sie wurden durch Ausschmieren eines Blutropfens auf einer Glasplatte präpariert. Es ist deutlich zu sehen, daß jede Zelle von Interferenzenringen umgeben ist, die einen lateralen Abstand von ca. 320 nm haben. Dies entspricht wie erwartet im Rahmen der Meßgenauigkeit der halben Wellenlänge des verwendeten Lichts in Luft.

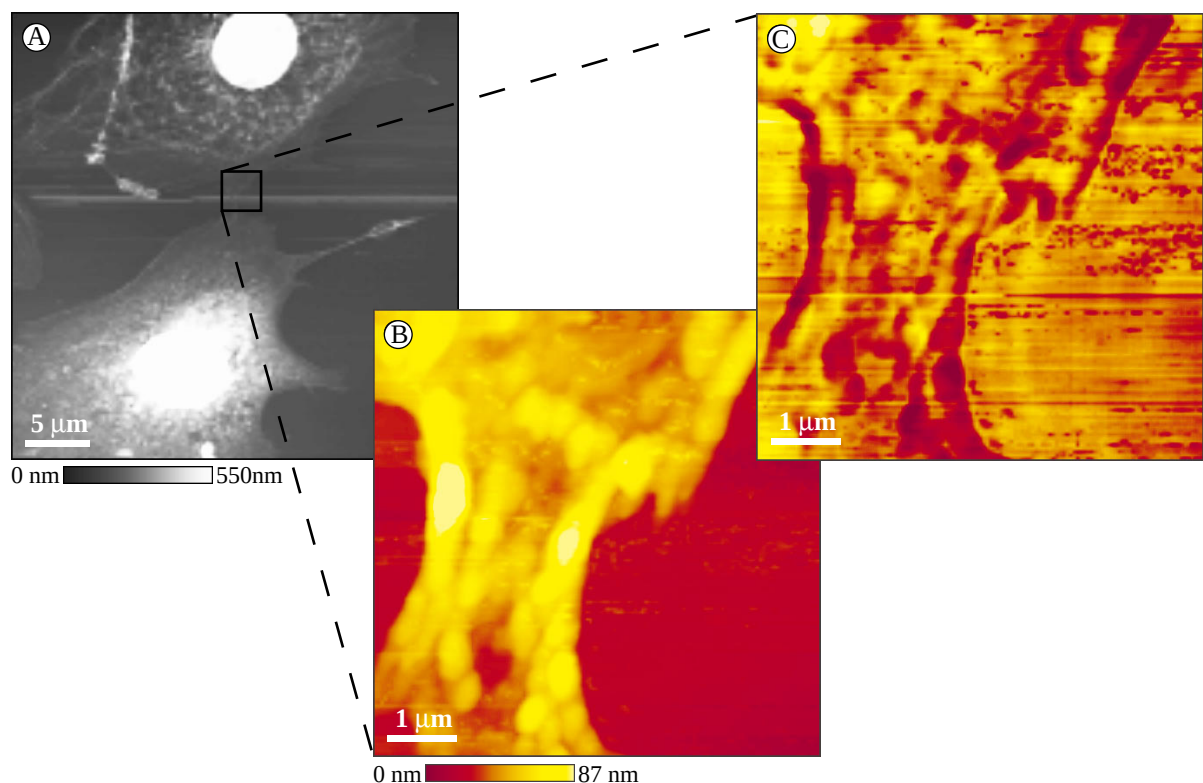


Abbildung 3.10: Bilder von getrockneten 3T3 Balb/c Zellen. (A) Topographisches Übersichtsbild. (B) zeigt die Topographie und (C) das Hellfeldreflexionssignal des in (A) markierten Gebiets. In (C) bedeutet eine dunklere Farbe eine geringere Reflexion. 10 s pro Zeile, 128 Zeilen.

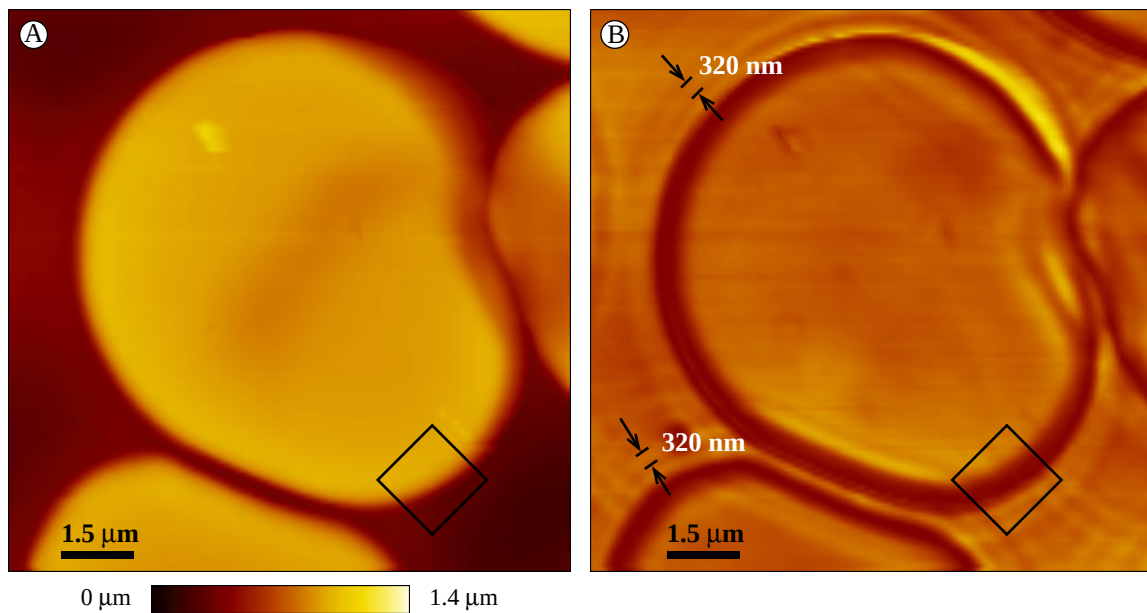


Abbildung 3.11: Scherkraft- und Hellfeldreflexionsmessung von getrockneten menschlichen Erythrozyten. Es sind um die Zellen deutliche Interferenzstrukturen zu beobachten. Das Quadrat rechts unten kennzeichnet die Position der Messung in Abbildung 3.14. 5 s pro Zeile, 128 Zeilen.

3.5.2 Detektion synchron zur Faserschwingung

Mit der Hellfelddetektion kann auch der Einfluß der Schwingbewegung der Faserspitze zur Scherkraftdetektion einfach untersucht werden. Befindet sich die schwingende Spitze über einer inhomogenen Probe, so ist auch das optische Signal mit der Schwingfrequenz und Vielfachen davon moduliert. Der zeitliche Verlauf des optischen Signals, erzeugt von einer punktförmigen Lichtquelle mit verschiedenen Abständen zur Ruhelage der Faserspitze, ist in Abbildung 3.12 (A) gezeigt. Für die Sonde wurde ein Gaußförmiges Detektionsprofil mit einer $1/e$ -Breite von 100 nm und einer Schwingungsamplitude von 7.5 nm angenommen. Wenn sich die Spitze genau über der Punktquelle befindet, ist das optische Signal im wesentlichen mit dem doppelten der Schwingfrequenz f_0 moduliert.

Das Bild dieser Punktlichtquelle, welches sich aus dem Gleichanteil des Signals ergibt, ist in Abbildung 3.12 (B) zu sehen. Es ist aufgrund der Faserschwingung gegenüber dem mit einer ruhenden Faserspitze aufgenommenen Bild verbreitert und das Maximum leicht verringert. Bei der Detektion des mit dem doppelten der Faserschwingfrequenz modulierten Signalanteils (2f-Modus) ergibt sich das in Abbildung 3.12 (C) dargestellte, symmetrische Bild. Die Breite des zentralen Maximums ist gegenüber dem Bild in 3.12 (B) verringert, und es wird von zwei Minima begleitet. Eine Phasenverschiebung zwischen dem detektierten

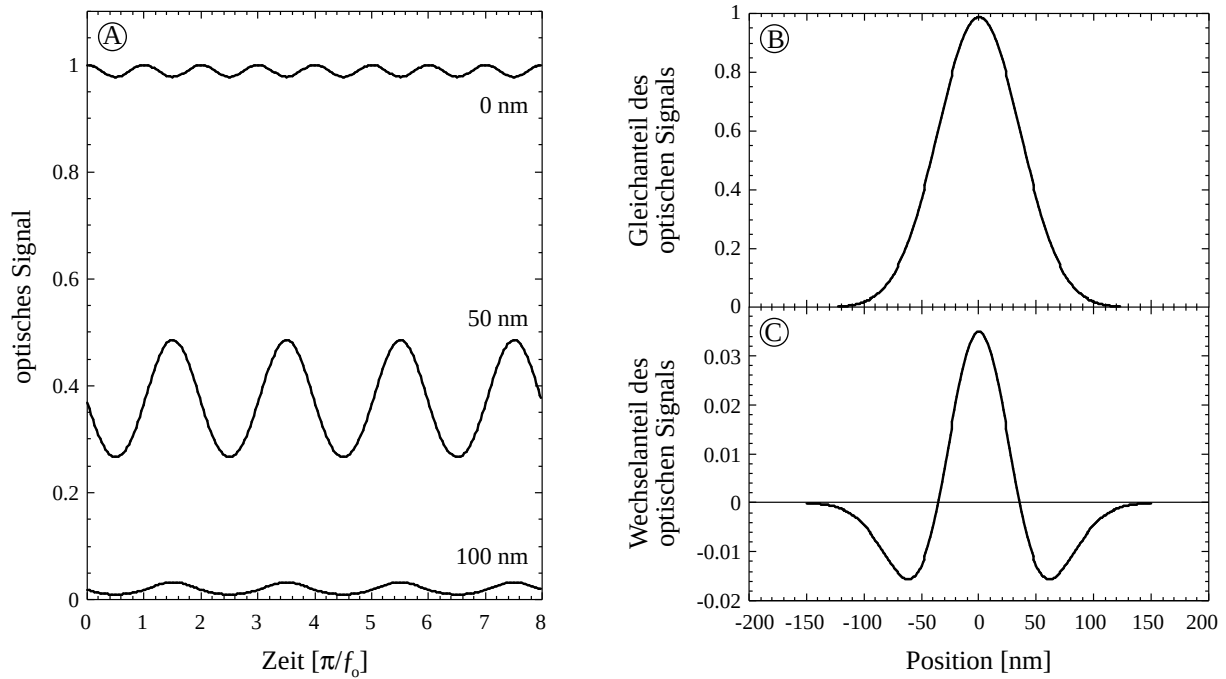


Abbildung 3.12: Simulation der Abbildung einer Punktlichtquelle mit einer schwingenden Sonde. Gaußförmiges Detektionsprofil mit einer $1/e$ -Breite von 100 nm und 7.5 nm Schwingungsamplitude. (A) zeigt den zeitlichen Verlauf des Signals für die Abstände 100 nm, 50 nm und 0 nm zwischen der Punktquelle und der Ruheposition der Faser. (B) und (C) zeigen das optische Bild der Punktlichtquelle erzeugt durch die Detektion des (B) Gleichanteils des optischen Signals und (C) des mit dem doppelten der Schwingfrequenz modulierten Anteil des optischen Signals.

Signal und der Referenz läßt die Form des Bildes unverändert, und nur die Amplitude wird verringert bzw. invertiert.

Ausgehend vom Wechselanteil des optischen Signals kann man versuchen, durch Entfaltung ein Bild mit besserer Auflösung zu erhalten. Allerdings kann im Scherkräftmikroskop die Faser in zwei Dimensionen beliebig schwingen. Oftmals zeigen die Fasern zwei eng zusammenliegende erste Resonanzen. Dabei ist die Resonanz mit der höheren Frequenz nicht die erste harmonische zur Grundschwingung, da diese, entsprechend der Schwingungsmoden eines einseitig eingespannten Balkens, erst beim etwa sechsfachen der Grundfrequenz auftreten sollte (Bielefeldt, 1994). Diese Aufspaltung resultiert wahrscheinlich aus Asymmetrien der Faserspitze und ihrer Montage. Die Faserspitze selbst schwingt bei den verschiedenen Resonanzen in unterschiedlichen Ebenen. Dies kann mit dem 2f-Modus untersucht werden, da in diesem Modus nur die Objekte einen Kontrast erzeugen, die entlang der Faserschwingung eine Modulation des optischen Signals hervorrufen. Lineare Strukturen, die parallel zur Schwingungsebene der Faser orientiert sind, erzeugen somit keinen Kontrast.

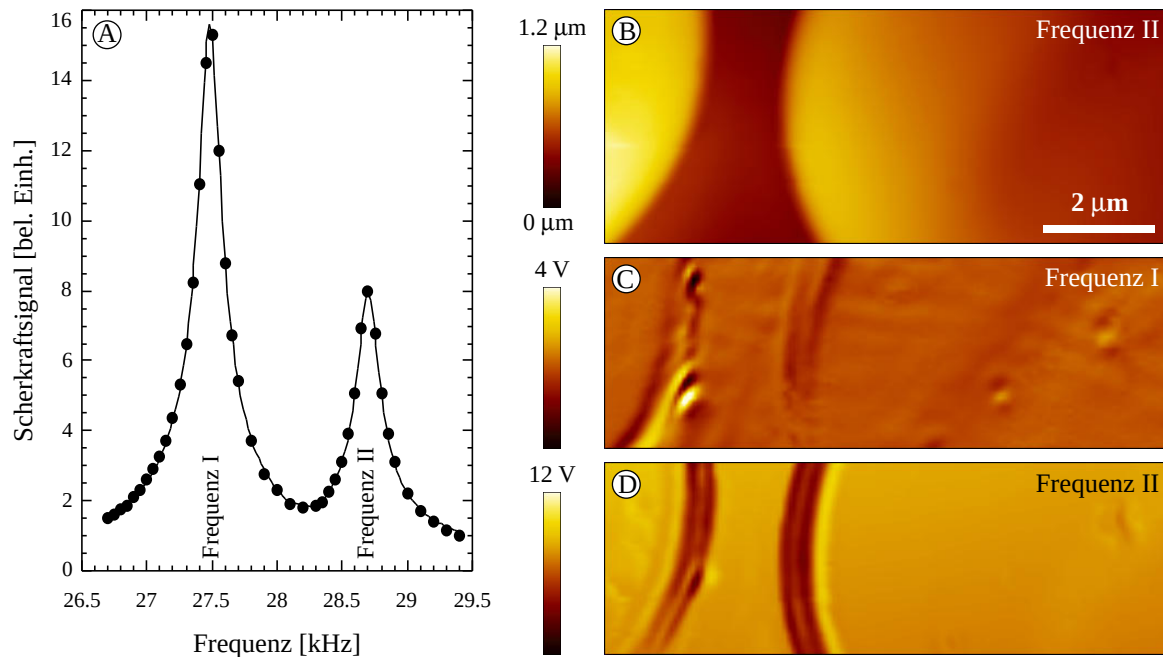


Abbildung 3.13: Abhängigkeit der Abbildung im 2f-Modus von der Schwingungsrichtung der Faser am Beispiel von getrockneten Erythrozyten. (A) Resonanzkurve der Faserspitze. Aufgrund von Asymmetrien treten zwei Resonanzen auf. (B) Scherkraftmikroskopisches Bild, wobei die Faserspitze mit der zweiten Resonanzfrequenz getrieben wurde. (C) und (D) zeigen das optische Signal im 2f-Modus, wenn die Faserspitze bei der (C) ersten bzw. (D) zweiten Resonanzfrequenz angetrieben wird. Es erzeugen jeweils verschiedene Strukturen einen optischen Kontrast. 5 s pro Zeile, 128 Punkte, (B) 53 Zeilen, (C) und (D) 44 Zeilen.

Ein entsprechendes Experiment ist in Abbildung 3.13 gezeigt. In (A) ist die Resonanzkurve der Faser aufgetragen. Sie besitzt zwei Resonanzen bei 27.48 und 28.70 kHz. In (B) ist die Topographie, bestimmt durch Scherkraftdistanzregelung mit einer Faserschwingungsfrequenz von 28.70 kHz, gezeigt. Es sind Teile von zwei Erythrozyten zu sehen. Bei 27.48 kHz ergab sich die gleiche Topographie. Die mit einem Lock-In-Verstärker detektierte Modulation des optischen Signals beim jeweils doppelten der Schwingfrequenz ist in (C) und (D) für die zwei Resonanzfrequenzen gezeigt. Aus den optischen Signalen kann auf die Schwingungsrichtung der Faser geschlossen werden. In (C) ist diese Achse nahezu senkrecht im Bild, parallel zur im Bild unteren Kante des rechten roten Blutkörperchens. In (D) steht sie nahezu senkrecht auf dieser Kante.

Ein weiteres Beispiel für eine in diesem Modus gemachte Messung zeigt Abbildung 3.14. Es ist der in Abbildung 3.11 markierte, um 45° rotierte Bereich am Rand des Erythrozyten. In (A) ist das Regelsignal dargestellt, da es Details der Topographie besser sichtbar macht. Die Gesamthöhe der Zelle betrug 750 nm. Im gleichzeitig aufgenommenen modulierten

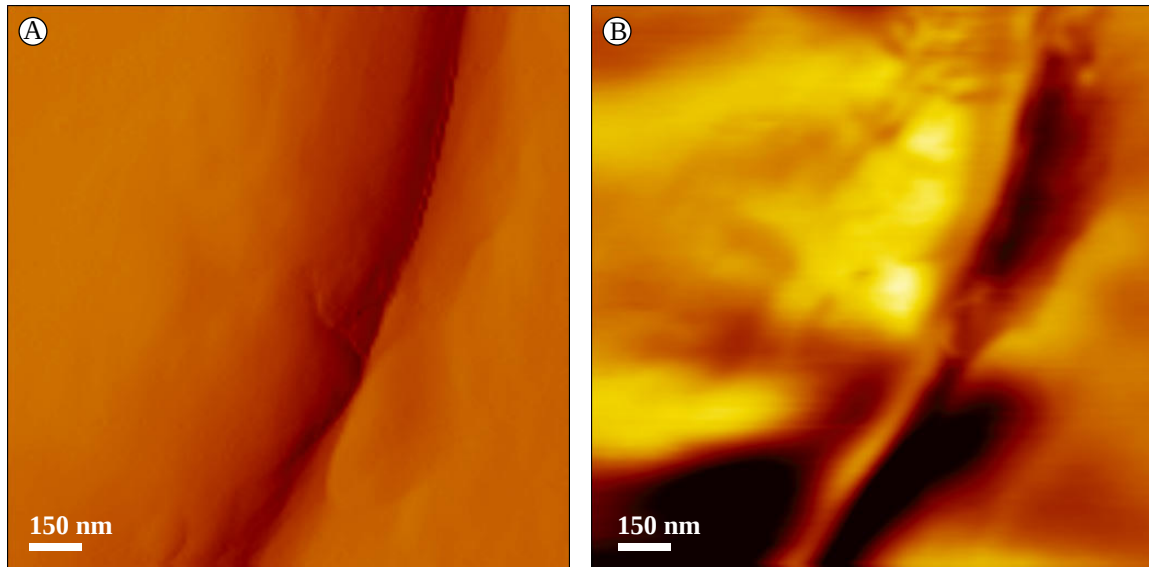


Abbildung 3.14: Hochaufgelöste Abbildung von Erythrozyten mit dem 2f-Modus. Die Faserspitze besaß nur eine Resonanzfrequenz bei 31.64 kHz. (A) Scherkraftmikroskopisches Bild. (B) optisches Bild im 2f-Modus aufgezeichnet. 10 s pro Zeile, 128 Zeilen.

optischen Signal (B) sind sehr viele kleine Strukturen im Größenbereich von 70 nm zu sehen, die keine Entsprechung in der Topographie besitzen.

3.6 Fluoreszenz-Nahfeldmikroskopie

Gegenüber der Hellfeldreflexion bietet die Fluoreszenzdetektion sehr viele Vorteile, so daß sie heutzutage in der optischen Mikroskopie eine überragende Stellung einnimmt. Insbesondere in den biomedizinischen Wissenschaften liegt das daran, daß es eine Unzahl von fluoreszenten Farbstoffen gibt, die zumeist sehr kontrastarmen Proben zu färben. Mit bestimmten Farbstoffen können z. B. einzelne Zellbestandteile selektiv gefärbt und ihre Position und Morphologie aufgezeichnet werden. Abhängig davon, ob es sich um lebende oder fixierte Proben handelt, gibt es eine Vielzahl von Methoden, Farbstoffe an Moleküle oder bestimmte Zellbestandteile zu binden (Haugland, 1996). Es ist außerdem möglich, das lumineszierende Protein GFP mit einem zu untersuchenden Protein in der Erbsubstanz zu integrieren, so daß die Zelle den Farbstoff an das richtige Molekül gekoppelt erzeugt (siehe z. B. Gerdes und Kaether, 1996).

Eine weitere sehr hilfreiche Eigenschaft vieler Farbstoffe ist, daß sie unter bestimmten Umständen ihre spektroskopischen Eigenschaften verändern. Zum Beispiel erhöhen der

DNA Farbstoff 4',6'-diamidino-2-phenylindol (DAPI) (Barcellona et al., 1990; Kapuscinski, 1995) und die Gruppe der Bisbenzimidazol-Farbstoffe ihre Fluoreszenzquantenausbeute bei der Bindung an doppelsträngige DNA um ein Vielfaches, so daß sich die DNA noch deutlicher über den Hintergrund hervorhebt. Oder es gibt andere Farbstoffe, die über charakteristische Änderungen ihres Emissionsspektrums oder anderer photophysikalischer Parameter, wie z. B. Fluoreszenzlebensdauer oder Polarisierung, auf Eigenschaften ihrer Umgebung reagieren, wie zum Beispiel auf den Säuregrad oder die Ionenstärke des Lösungsmittels. Dadurch erhöhen diese Farbstoffe die Spezifität ihrer Markierung und erlauben es außerdem, Eigenschaften der untersuchten Probe zu messen, die sonst nur sehr schwer zugänglich wären.

Ein weiterer Vorteil der Fluoreszenzmikroskopie ist, daß sie auf einem inkohärenten Streuprozess beruht. In der traditionellen Fernfeldmikroskopie spielt die Kohärenz noch eine untergeordnete Rolle, da meist mit inkohärenten Lichtquellen, wie zum Beispiel Quecksilberhochdrucklampen, die Probe beleuchtet wird. In der optischen Nahfeldmikroskopie hingegen wird sehr oft ein Laser zur Beleuchtung eingesetzt. Dadurch treten Interferenzartefakte auf, wie sie zum Beispiel in der Abbildung 3.11 zu sehen sind. Im Gegensatz dazu kann bei der inkohärenten Fluoreszenzmikroskopie sehr oft das Bild als eine Superposition der Bilder einzelner Punkte aufgefaßt werden, was die Bildinterpretation sehr stark vereinfacht.

Wie bei allen Nahfeldmikroskopen, die die Sonde der Topographie nachführen, kann jedoch ein durch diese axiale Bewegung erzeugtes Artefakt im optischen Signal auftreten. Dadurch scheint das optische Bild die gleiche laterale Auflösung wie das topographische Bild zu besitzen. Derartige Artefakte wurden schon mehrfach im Zusammenhang mit Reflexionsmessungen beschrieben und analysiert (Valaskovic et al., 1995b; Sandoghdar et al., 1997; Hecht et al., 1997). Allerdings gibt es nur wenige Arbeiten, die den Einfluß der Abstandsregelung auf ein Fluoreszenzbild untersuchen. Ein Hauptmerkmal derartiger Artefakte ist die Korrelation von Strukturen im topographischen und optischen Bild. In Abbildung 3.15 sind zwei Messungen gezeigt, die mit unterschiedlichen Glasfaserspitzen an der selben Probe von CHO-Zellen gemacht wurden. Diese Zellen exprimieren ein Fusionsprotein aus dem ErbB-1 Rezeptor für den Wachstumsfaktor EGF und der GFP-Mutante EGFP, welches sich in der Zellmembran anlagert (siehe Abschnitt 4.3.4). In (A) und (D) ist das mit den zwei Spitzen aufgenommene topographische Regelsignal gezeigt. Die Messung in (A) zeigt verglichen mit der in (D) dargestellten Messung sehr viel mehr große Strukturen, die sehr glatt sind. Die mit (A) bzw. (D) gleichzeitig aufgezeichneten Fluoreszenzbilder (B)

und (E) unterscheiden sich erheblich. In (B) besteht das Fluoreszenzbild aus relativ großen hellen Strukturen mit einer geringen Intensitätsvariation, die von sehr scharfen Rändern begrenzt sind. Diese Ränder fallen mit den Grenzen der großen Strukturen in der Topographie zusammen. Dies sieht man sehr gut an den in (C) aufgezeichneten Profilen entlang den vertikalen Linien in (A) und (B). Zwei Beispiele für übereinstimmende Kanten sind durch die vertikalen gestrichelten Linien markiert. An diesen Stellen zeigt sowohl das Fluoreszenzsignal als auch das Topographiesignal eine rasche Änderung des Meßwertes. Derartige Übereinstimmungen finden sich nicht nur entlang dieses Profils, sondern im ganzen Bild. Zwei weitere Beispiele sind in (A) und (B) durch die weißen Pfeile markiert. Das Fluoreszenzbild, welches mit der zweiten Spitze gleichzeitig mit der in (D) gezeigten Topographie

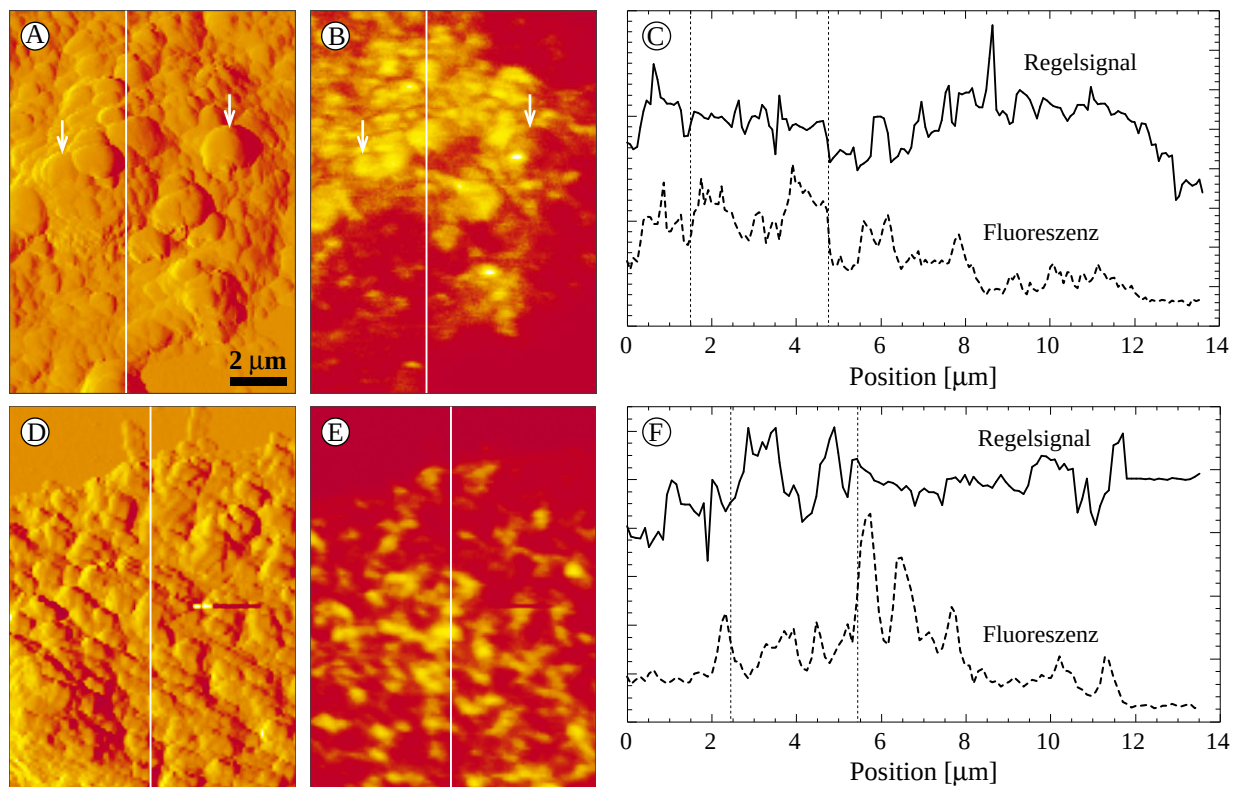


Abbildung 3.15: Mit zwei verschiedenen Faserspitzen aufgezeichnete nahfeldmikroskopische Aufnahmen von CHO-Zellen, die ein Fusionsprotein aus dem ErbB-1 Rezeptor und EGFP exprimieren. (A) Topographisches Regelsignal und (B) Fluoreszenz, gemessen mit einer Faserspitze, die deutliche Artefakte aufgrund der Topographienachführung erzeugt. Die Pfeile weisen auf übereinstimmende Kanten in (A) und (B) hin. (C) Profile entlang der Linien in (A, durchgezogen) und (B, gestrichelt). Die vertikalen gestrichelten Linien markieren übereinstimmende Kanten. (D) bis (F): gleiche Messungen wie in (A)–(C) mit einer anderen Spitze, die keine Korrelation zwischen Topographie und Fluoreszenz erzeugt.

aufgezeichnet wurde (Abb. 3.15 E), zeigt relativ schmale fluoreszierende Strukturen, deren Intensität zu ihrem jeweiligen Rand hin kontinuierlich abnimmt. Am in (F) dargestellten Vergleich der Profile, die entlang der Linien in (D) und (E) genommen wurden, erkennt man, daß in diesem Fall die Topographie und die Fluoreszenz nicht miteinander korreliert sind. Als Vergleichshilfe sind wieder zwei gestrichelte Linien eingezeichnet, die sich an Kanten von fluoreszierenden Strukturen befinden.

Aus dem Vergleich dieser zwei Messungen sieht man, daß die hohe Kantenauflösung in (A)–(C) durch die axiale Bewegung der Spitze entstanden ist. Im Gegensatz dazu bildet meines Erachtens die Messung in (D)–(F) die Fluoreszenzverteilung im wesentlichen artefaktfrei ab. Es gibt aber auch hier Strukturen in den zwei Signalkanälen (D) und (E), die miteinander korreliert sind. Ein Beispiel dafür ist der Regelfehler in der Mitte des Bildes, er geht mit einer Abnahme der Fluoreszenzintensität einher. Die Häufigkeit, mit der Sonden auftreten, die derartige Artefakte zeigen, ist ein wichtiger Punkt, der in die generelle Nutzbarkeit eines Nahfeldmikroskops eingeht. In dem hier vorgestellten Fluoreszenznahfeldmikroskop mit dielektrischen Faserspitzen wurde dieses Artefakt nur extrem selten beobachtet, was vermutlich an der guten Reproduzierbarkeit liegt, mit der die Sonden hergestellt werden können.

Nach diesen Vorbemerkungen werden im Rest dieses Abschnittes 3.6 die grundlegenden Techniken vorgestellt, die im Rahmen dieser Arbeit zur optischen Fluoreszenz-Nahfeldmikroskopie im *shared-aperture*-Modus entwickelt und eingesetzt wurden.

3.6.1 Aufbau des Fluoreszenz-Nahfeldmikroskops

In einem Fluoreszenzmikroskop wird neben der Intensität auch die spektrale Zusammensetzung des Lichts, sowohl bei der Anregung als auch bei der Detektion, kontrolliert. Dazu sind im Vergleich zu einem Hellfeldreflexionsaufbau (Abbildung 3.9) zusätzliche Elemente notwendig. Ein entsprechender Aufbau ist in Abbildung 3.16 dargestellt.

Als Lichtquelle dient ein Laser im Einzellinienbetrieb. Um Instabilitäten der Emission des Lasers zu kompensieren, wird die Lichtintensität zunächst mit einem Rauschverminderer (LS-PRO HP, Cambridge Research & Instrumentation, Cambridge, MA, USA) stabilisiert. Danach werden das Plasmaleuchten und andere störende spektrale Komponenten mit einem schmalbandigen Laserlinienfilter entfernt. Da die Fluorophore vor dem irreversiblen Bleichen nur eine begrenzte Zahl von Photonen emittieren können, muß ihre Bestrahlung mit Anregungslicht minimiert werden. Die unbedampfte Fasersonde leitet sehr effektiv das Licht auf die Probe, so daß der Laser mit zusätzlichen Graufiltern abgeschwächt werden

muß. Ein elektromechanischer Verschuß (VS25S2T1, Vincent Associates, Rochester, NY, USA) blockt den Laser während der Zeit, in der nicht gemessen wird, ab. In der Regel werden in diesem Nahfeldmikroskop nur in einer Rasterrichtung Daten aufgezeichnet. Während der Umkehrphase und des Rücklaufs erfolgt keine Messung, so daß zu dieser Zeit der Laser blockiert bleiben kann. Zu diesem Zweck ist die Elektronik des Verschlusses zusätzlich mit dem Zeilen- und Bildsynchronisationssignal der NanoScope-Elektronik gekoppelt.

Neben dem an der Probe reflektierten Anregungslicht sammelt die Faserspitze auch das Fluoreszenzlicht auf. Nach der Auskopplung aus der Glasfaser separiert ein dichroitischer Strahlteiler das Anregungslicht des Lasers vom Fluoreszenzlicht. Emissionsfilter (Em) unterdrücken zusätzlich das Anregungslicht und anderes Hintergrundlicht, wie zum Beispiel das der zur Scherkraftdetektion verwendeten Laserdiode. Die eingesetzten Laser und Filter sind von den verwendeten Farbstoffen abhängig. Die in dieser Arbeit verwendeten Laser- und Filterkombinationen werden jeweils im Zusammenhang mit den damit durchgeführten Experimenten angegeben.

Die Detektion des verbleibenden Lichtes erfolgt mit einer Avalanche-Photodiode (APD; AQ-131, EG&G Optoelectronics, Canada), die eine sehr hohe Quanteneffizienz von typischerweise 70 % bei einer Wellenlänge von 633 nm besitzt. Die APD erzeugt für jedes detektierte Photon einen TTL-Puls. Diese Pulse können mit einem Photonenzähler (SR 400, Stanford Research Systems) gezählt und in ein analoges Signal umgewandelt werden, welches wiederum von der Nanoscope-Elektronik digitalisiert wird. Alternativ ist der Ein-

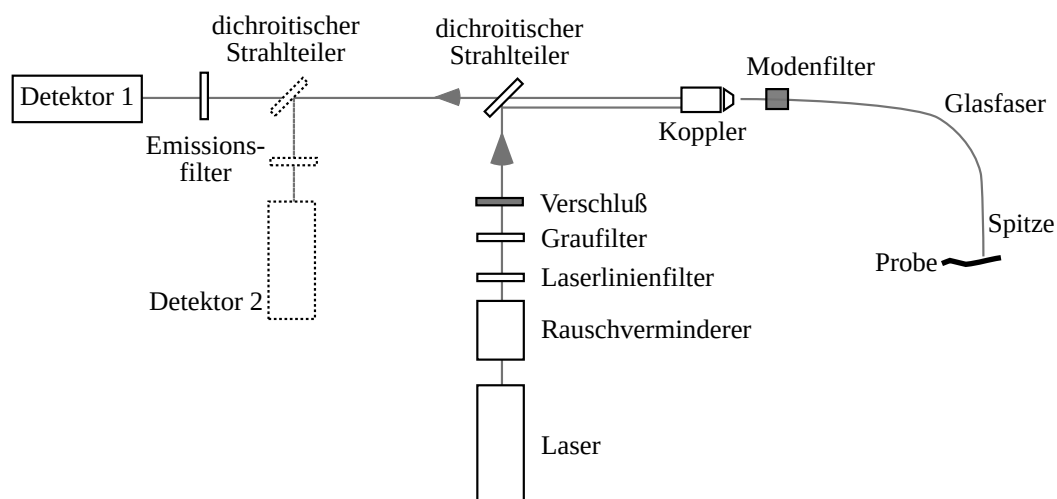


Abbildung 3.16: Schematischer Aufbau zur Fluoreszenzdetektion. Der anregungsseitig eingesetzte Laser und die Filter und Strahlteiler hängen von der jeweiligen Anwendung ab. Detektionsseitig sind Erweiterungen wie die ange deutete Mehrkanaldetektion möglich.

satz einer Pulszählerplatine (PHO-CNT-A165 oder CNT-PGA-1278, Counter Raft, Digital Instruments) anstelle eines Analog-Digitalwandlers direkt in der NanoScope-Elektronik möglich. Diese Platine erlaubt es, die Zahl der Pulse, ohne sie zunächst in ein Analogsignal umzuwandeln, aufzuzeichnen. Detektorseitig können auch Photomultiplier eingesetzt oder das Fluoreszenzsignal noch weiter aufgespalten werden. Zum Beispiel ist der Einsatz eines zweiten dichroitischen Strahlteilers zur simultanen Detektion der Emission von verschiedenen Farbstoffen möglich. Wenn ein glasfasergekoppelter Spektrograph (MS125, Oriel, Stratford, CT, USA) gekoppelt mit einer verstärkten CCD Kamera InstaSpec 5, Oriel) als Detektor verwendet wird, ist es sinnvoll, anstelle des dichroitischen Strahlteilers halbdurchlässige Spiegel zu verwenden.

Eine Fotografie des optischen Aufbaus ist in Abbildung 3.17 gezeigt. Die in den Beschreibungen der Experimente angegebenen Laserleistungen beziehen sich, sofern nicht anders angegeben, auf die aus der Spitze austretende Intensität, gemessen an der Unterseite des Sensorkopfes.

3.6.2 Der Modenfilter

Ein Nachteil von Fluoreszenzmessungen durch Glasfasern ist, daß die Glasfasern selbst ein sehr breites Spektrum an Hintergrundlicht erzeugen. Um dies zu demonstrieren, wurde Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm von einem Ar-Kr-Mischgaslaser (Performa 200, Spectra Physics, Mountain View, CA, USA) in jeweils 1 m lange Stücke von zwei verschiedenen Glasfasern (8.3 μm Kerndurchmesser, SMF 1528 CPC6, Siecor; 3.1 μm Kerndurchmesser, F-SA, Newport Corp., Irvine, CA, USA) eingekoppelt. Im Fluoreszenzaufbau (Abbildung 3.16) wurde anstelle des dichroitischen Strahlteilers ein halbdurchlässiger Spiegel verwendet, und ein als Emissionsfilter eingesetzter holographischer Super-Notch-Filter (HSNF-488.0-1.0, Kaiser Optical Systems, Inc., Ann Arbor, MI, USA) schwächte das anregende Laserlicht um mehr als 4 Größenordnungen ab. Für die Emissionsspektren wurden jeweils 20 Einzelspektren mit 0.05 s Integrationszeit aufsummiert und über jeweils 50 dieser Summenspektren gemittelt. Der Wertebereich des AD-Wandlers der CCD-Kamera, und damit auch die Dynamik der damit aufgezeichneten Spektren, ist auf 16 Bit beschränkt. Durch die Summation ist es möglich, eine von dem AD-Wandler unabhängige, bessere Dynamik in den Spektren zu erhalten.

Die Emissionsspektren der zwei Fasern sind als gestrichelte Linien in den oberen Bildhälften der Abbildungen 3.17 (A) und (B) gezeigt. Sie setzen sich jeweils aus einzelnen Linien der Ramanstreuung am Quarzglas der Faser und einem breiten Kontinuum zusam-

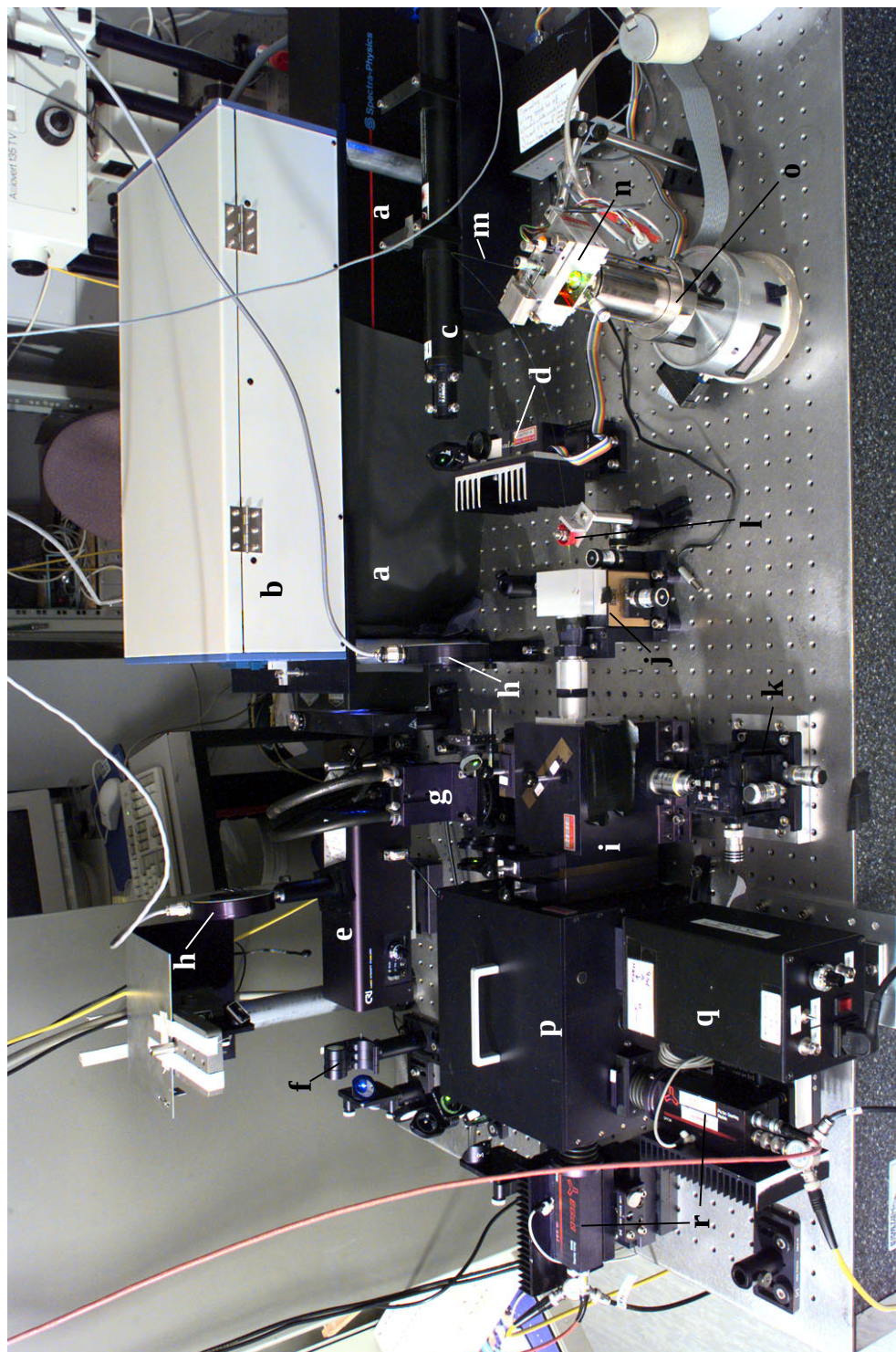


Abbildung 3.17: Fotografie des optischen Nahfeldmikroskops. **a:** cw-Ar-Kr-Mischgaslaser; **b:** Nd:YVO₄-Laser, 1064 nm, 7 ps; **c:** HeNe-Laser, 543 nm; **d:** cw-Nd:YAG-Laser, 532 nm; **e:** Rauschverminderer; **f:** Laserlinienfilter für den Ar-Kr-Laser; **g:** Akustooptischer-Modulator mit Wasserkühlung; **h:** elektromechanische Verschlüsse; **i:** Filterhalter mit dichroitischen Spiegel; **j:** Einkoppler; **k:** Einkoppler für dichroitische Spiegel, die das Emissionslicht reflektieren; **l:** Modenfilter; **m:** Glasfaser; **n:** Mikroskopkopf; **o:** Mikroskopbasis mit Rasterpiezo; **p:** Lichtabschirmung für weitere optische Elemente im Detektionsstrahlengang; **q:** Photomultiplier; **r:** Avalanche-Photodioden.

men, das sich über das gesamte spektrale Fenster des Spektrographen bis 650 nm erstreckt. Dieses Kontinuum ist insbesondere bei der Faser mit 3.1 μm Kerndurchmesser stark ausgeprägt. Für die Fasern wurde die gleiche Koppellinse verwendet. Die Koppelleffizienzen betrugen etwa 60 % für die 8.3 μm Faser und 20 % für die Faser mit 3.1 μm Kerndurch-

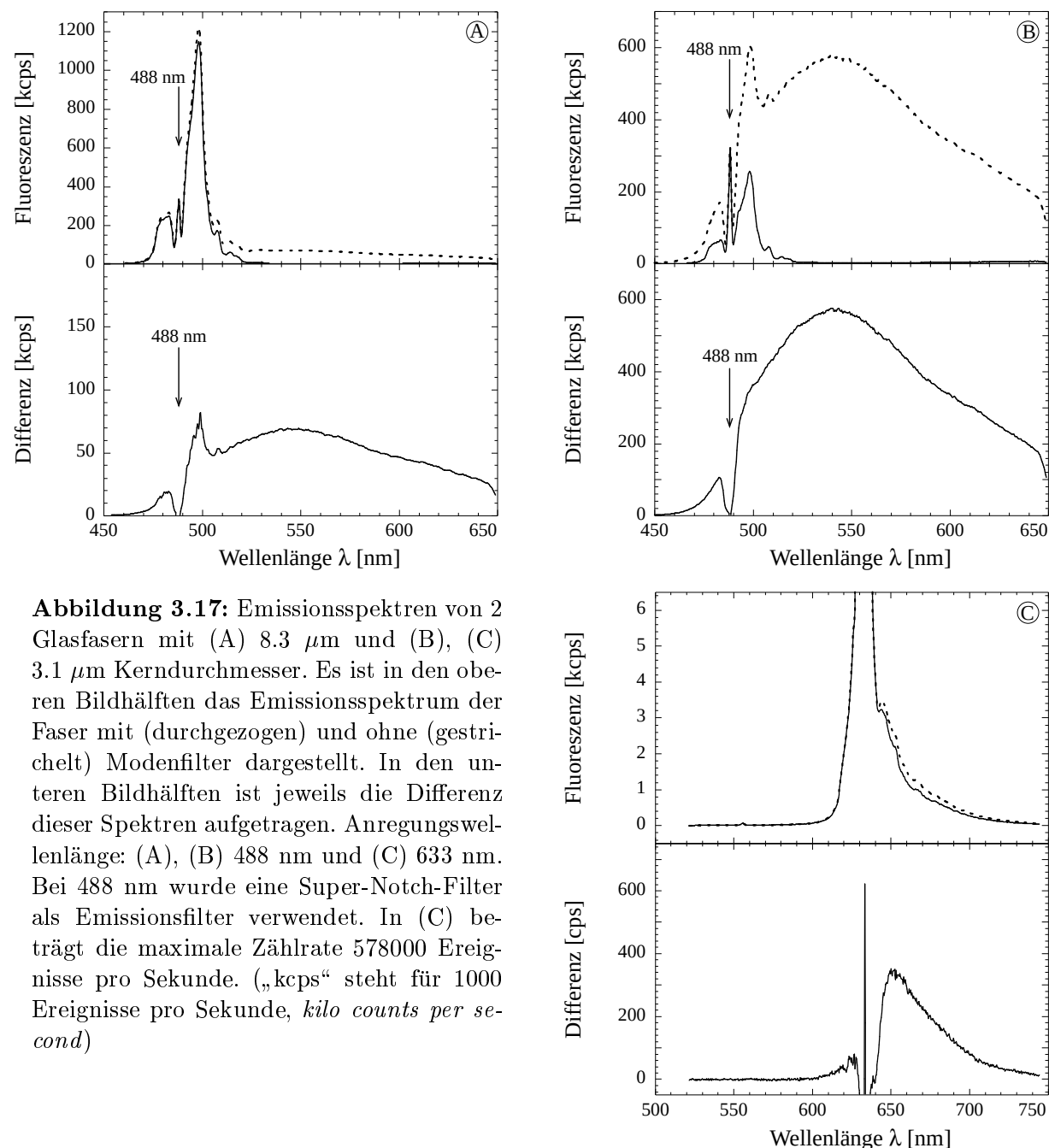


Abbildung 3.17: Emissionsspektren von 2 Glasfasern mit (A) 8.3 μm und (B), (C) 3.1 μm Kerndurchmesser. Es ist in den oberen Bildhälften das Emissionsspektrum der Faser mit (durchgezogen) und ohne (gestrichelt) Modenfilter dargestellt. In den unteren Bildhälften ist jeweils die Differenz dieser Spektren aufgetragen. Anregungswellenlänge: (A), (B) 488 nm und (C) 633 nm. Bei 488 nm wurde eine Super-Notch-Filter als Emissionsfilter verwendet. In (C) beträgt die maximale Zählrate 578000 Ereignisse pro Sekunde. („kcps“ steht für 1000 Ereignisse pro Sekunde, *kilo counts per second*)

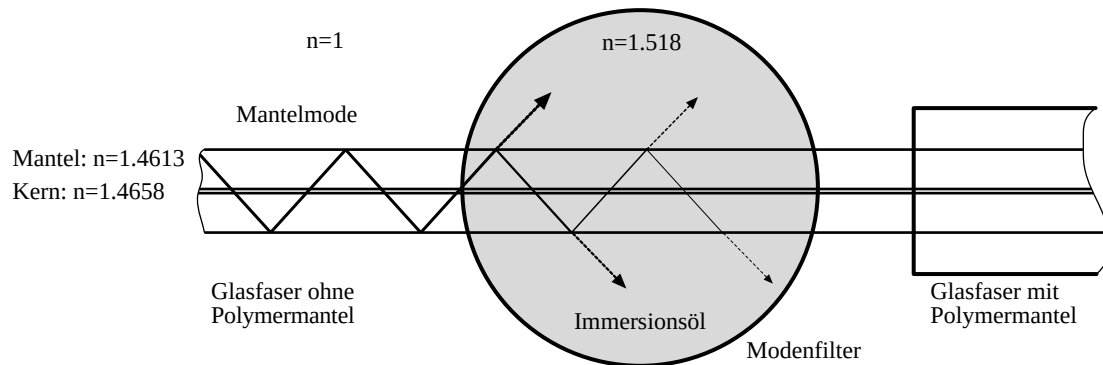


Abbildung 3.18: Funktionsprinzip des Modenfilters: von links ankommende Mantelmoden, die in der Glasfaser geführt werden, können in das höherbrechende Immersionsöl auskoppeln.

messer.

Für Fluoreszenzexperimente stellt insbesondere das sehr breite Kontinuum ein Problem dar. Die Ramanlinien liegen sehr nahe bei der Anregungswellenlänge. Der bei der Fluoreszenz auftretende Stokes-Shift der Emission führt dazu, daß sich diese zwei Signale nur geringfügig überlagern und durch geeignete Filter getrennt werden können. Das Kontinuum hingegen erstreckt sich sehr viel weiter in den roten Teil des Spektrums. Es überlagert sich mit dem Fluoreszenzsignal der Probe und kann nicht herausgefiltert werden. Der Hauptbeitrag zu diesem Hintergrundspektrum ist die Fluoreszenz des Polymermantels der Faser.

Diese Fluoreszenz wird nicht durch die im Kern der Glasfaser geführten Moden angeregt, da diese eine vernachlässigbare Intensität am äußeren Rand des Glasmantels besitzen. Vielmehr regen im Glasmantel geführte, sogenannte Mantelmoden, diese Fluoreszenz an. Sie werden vor allem bei der Einkopplung des Lasers in die Glasfaser und durch die Ankopplung an die im Kern geführten Moden bei Deformationen der Faser angeregt. Daher ist auch der Hintergrund bei der geringen Einkoppleffizienz in die $3.1\ \mu\text{m}$ Faser viel stärker ausgeprägt. Um diese Fluoreszenz zu verhindern, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Es kann z. B. der Plastikmantel auf der gesamten Länge der Glasfaser entfernt werden (Meiners, 1998), was jedoch zur Folge hat, daß die Glasfaser mechanisch sehr empfindlich wird.

Eine andere Möglichkeit, die Fluoreszenz des Polymermantels zu unterbinden, ist die Vermeidung der Mantelmoden. Dazu müssen die bei der Einkopplung angeregten Mantelmoden gedämpft und eine Anregung im weiteren Verlauf der Faser verhindert werden. Letzteres wird dadurch erreicht, daß Druckbelastungen und Biegungen der möglichst kurz gehaltenen Faser vermieden werden. Die bei der Einkopplung angeregten Mantelmoden werden durch einen Modenfilter aus der Glasfaser ausgekoppelt und so gedämpft.

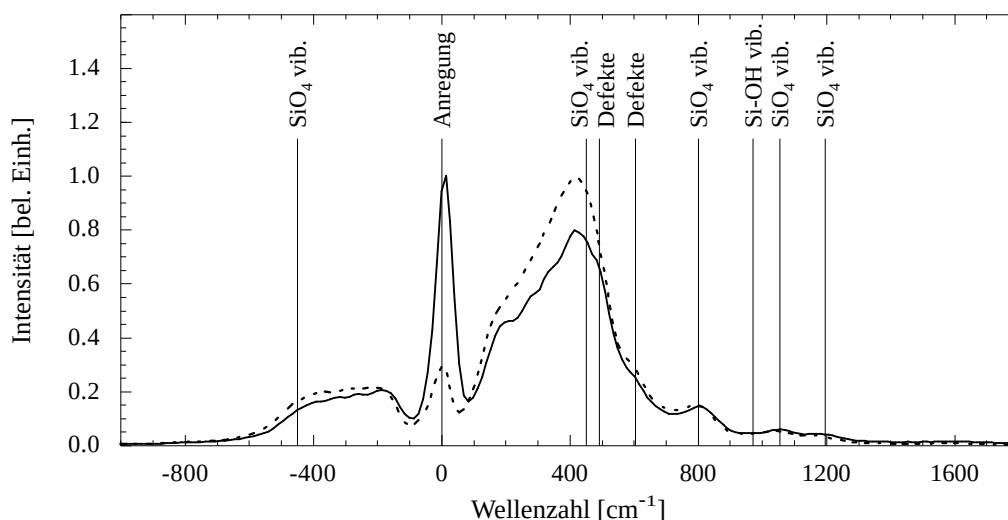


Abbildung 3.19: Emissionsspektren der Glasfasern aus Abbildung 3.17 (A) mit $8.3 \mu\text{m}$ Kerndurchmesser, gestrichelt und (B) mit $3.1 \mu\text{m}$ Kerndurchmesser, durchgezogen, jeweils mit Modenfilter. Die Zuordnung zu Schwingungen im Quarzglas erfolgt entsprechend der von Tsai et al. (1994) angegebenen Ramanverschiebungen.

Das Prinzip des Modenfilters ist in der Abbildung 3.18 dargestellt. Eine Glasfaserstück ohne Polymermantel wird in eine Flüssigkeit eingetaucht, so daß die im Glasfaser-mantel geführten Moden dort auskoppeln können. Der Brechungsindex der Flüssigkeit sollte gleich oder größer als der der Glasfaser sein, um eine Totalreflexion an der Glas-Flüssigkeitsgrenzfläche zu vermeiden. Das hier verwendete Immersionsöl hat einen Brechungsindex von $n = 1.518$. Dieser ist größer als der Brechungsindex von $n = 1.4613$ des Mantels der $3.1 \mu\text{m}$ Glasfaser.

Die Spektren der zwei 1 m langen Glasfaserstücke mit eingesetztem Modenfilter sind ebenfalls in den Abbildungen 3.17 (A) und (B) in den oberen Bildhälften als durchgezogene Linien eingezeichnet. In den unteren Bildhälften ist jeweils die Differenz zwischen den Emissionsspektren mit und ohne Modenfilter in geeigneter Skalierung aufgetragen. Es ist eindeutig zu sehen, daß der Modenfilter im wesentlichen das durch die Fluoreszenz des Polymermantels erzeugte Kontinuum verhindert. Das übriggebliebene Linienspektrum kann einzelnen Schwingungen des Quarzglases der Faser zugeordnet werden. In Abbildung 3.19 ist die Zuordnung der Linienspektren der zwei Glasfasern, entsprechend der von Tsai et al. (1994) angegebenen Ramanverschiebungen für Quarzfasern, gezeigt.

Interessanterweise zeigen die Glasfasern auch bei rotem Anregungslicht Autofluoreszenz. In Abbildung 3.17 (C) sind in der oberen Bildhälfte die Emissionsspektren der Faser mit $3.1 \mu\text{m}$ Kerndurchmesser bei einer Anregung mit Licht der roten Laserlinie eines

HeNe-Lasers (632.8 nm) dargestellt. Leider stand für diese Wellenlänge kein Notchfilter zur Verfügung. Um die Unterschiede in den Spektren sichtbar zu machen, mußten die Kurven so skaliert werden, daß nicht das ganze Spektrum sichtbar ist. Die maximale Zählrate bei 633 nm betrug 587000 Ereignisse pro Sekunde. Die untere Bildhälfte zeigt wiederum die Differenz der beiden Spektren.

In unserem Aufbau betrug die Länge des Ölbad für den Modenfilter ca. 1.7 cm. Es war direkt hinter dem Einkoppler angebracht. Die Auskopplung wird durch eine leichte Krümmung der Faser im Ölbad unterstützt. Zum Brechen des Faserendes für die Einkopplung muß der Polymermantel auf 12 mm Länge entfernt werden. Für den Modenfilter muß er auf weiteren 5 cm entfernt werden. Somit hat die Glasfaser nur auf 6.2 cm keinen mechanisch schützenden Polymermantel und zeigt dennoch kaum störende Hintergrundfluoreszenz.

Kapitel 4

Anwendungen des Fluoreszenz-Nahfeldmikroskops

In diesem Kapitel werden mit unserem im *shared aperture* Modus arbeitenden optischen Nahfeldmikroskop durchgeführte Fluoreszenzexperimente vorgestellt. Die untersuchten Systeme waren

- Langmuir-Blodgett-Filme (LB-Filme), die eine Metallkomplexdiade enthalten,
- Polymerfilme und Zellen, die mit einem Farbstoffgemisch markiert wurden, welches Fluoreszenz-Energie-Transfer (FRET) zeigt, und
- Zellen, die verschiedene Mutanten des *green fluorescent protein* (GFP) exprimieren.

Experimente zur Zwei- und Dreiphotonenanregung von Farbstoffen im Nahfeldmikroskop werden in Kapitel 5 behandelt.

4.1 LB-Filme mit Metallkomplexdiade

Ru(II)-Rh(III)-Metallkomplexdiaden zeigen eine Reihe verschiedener photoinduzierter intramolekularer Reaktionsprozesse, wie z. B. einen photoinduzierten vektoriellen Elektronentransfer. Das heißt, nach der Absorption eines Photons durch die Ru-Untereinheit ist einer der möglichen Reaktionswege der Transfer eines Elektrons auf die Rh-Untereinheit. Damit bieten sich diese Supermoleküle¹ als erstes Glied in einer Kette zur Umwandlung und Speicherung von Sonnenenergie an (Huesmann et al., 1996) und können zum Aufbau künstlicher Photosyntheseeinheiten oder optoelektronischer Bauelemente verwendet werden (Fujihira et al., 1996).

Für den technischen Einsatz muß dazu die Diade in der Regel auf eine wohlgeordnete und regelmäßig ausgerichtete Art auf eine feste Oberfläche aufgebracht werden. Dies kann durch Spreiten an einer flüssig-gasförmig Grenzfläche und anschließenden Übertrag auf ein festes Substrat mit der Langmuir-Blodgett-Methode geschehen (Abschnitt 4.1.2).

Derartige LB-Filme sind – abhängig auch vom Substrat – meist sehr flach und können eine Unzahl verschiedener lateraler Strukturen aufweisen. Für die Untersuchung dieser Dünnschichten sind insbesondere die verschiedenen rastersondenmikroskopischen Techniken geeignet, da sie fast ausschließlich auf Oberflächeneigenschaften reagieren. Im Gegensatz dazu mitteln viele andere optische Mikroskopiertechniken über eine Schicht gewisser Dicke. Die geringe topographische Modulation der LB-Filme macht sie für rastersondenmikroskopische Untersuchungen zusätzlich besonders geeignet. Dementsprechend ist es nicht verwunderlich, daß auch mit optischen Nahfeldmikroskopen einige derartige Systeme untersucht wurden (Hwang et al., 1995; Jalocha und van Hulst, 1995a; Nagahara und Tokumoto, 1996; Tamm et al., 1996; van den Bout et al., 1997). Insbesondere Arbeiten von Fujihira et al. sind im Zusammenhang mit diesem Abschnitt interessant, da sie ein dem hier vorgestellten sehr ähnliches System mit Triaden als funktionalen Bestandteilen der Filme behandeln (siehe z. B. Fujihira et al., 1996).

In diesem Abschnitt werde ich die Eigenschaften der verwendeten Diade und die Filmherstellung näher erläutern. An eine Zusammenfassung der Untersuchung der Filme an der Wasseroberfläche (Huesmann et al., 1997) schließen sich die Ergebnisse an, die mit Rastersondenmikroskopen an den auf ein festes Substrat übertragenen Filmen erhalten wurden. Diese mit dem optischen Nahfeldmikroskop (Kirsch et al., 1998a) und einem Kraftmikroskop gemachten Messungen führen zu einem einfachen Modell für den Aufbau der Filme

¹Aus mehreren Einheiten zusammengesetzte Moleküle, die Eigenschaften besitzen, die sie von einer bloßen Summe der Untereinheiten unterscheiden, werden als Supermoleküle bezeichnet (Vögtle, 1989).

bei niedrigen Schüben (Kirsch et al., 1998b).

4.1.1 Die Ru(II)-Rh(III)-Metallkomplexdiade

Die hier verwendete Diade $[\text{Rh(III)}(\text{dc-bipy})_2(\text{Mebipy-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Mebipy})\text{-Ru(II)(phen)}_2]^{5+}(\text{PF}_6)^{-5}$ (dc-bipy = 4,4'-Dicarboxy-2,2'-bipyridin; Mebipy = 4-Methyl-2,2'-bipyridin; phen = 4,7-Dimethyl-1,10-phenanthrolin) wurde von M. T. Indelli (Universität Ferrara, Italien) synthetisiert und isoliert (Abbildung 4.1). Sie setzt sich aus einer Ru- und einer Rh-Untereinheit zusammen, wobei die Ru-Untereinheit als Elektronendonator und die Rh-Untereinheit als Elektronenakzeptor fungiert. Der Elektronentransfer kann sowohl durch einen Photonenabsorptionsprozeß der Ru- als auch durch einen Absorptionsprozeß der Rh-Untereinheit induziert werden. Weitere intramolekulare Prozesse dieser Diade sind der Rückreaktionsprozeß, bei dem das auf die Rh-Einheit übertragene Elektron zum Ru-Ion zurückkehrt und ein Energietransferprozeß von der Rh- auf die Ru-Einheit. Der Energieübertrag verläuft also dem Elektronentransfer entgegengesetzt.

Diese 4 Prozesse wurden von Indelli et al. (1994) an einer sehr ähnlichen Diade näher untersucht. Der Unterschied der hier verwendeten Diade zur von Indelli et al. untersuchten ist die Funktionalisierung der Bipyridinmoleküle der Rh-Einheit durch Säuregruppen. Das Jablonski-Diagramm für die Diade von Indelli et al. mit den 4 intramolekularen Prozessen ist in Abbildung 4.2 (A) gezeigt. Das Absorptionsspektrum der beiden Diaden ist nahezu identisch. In der Abbildung 4.2 (B) ist das Absorptionsspektrum der Diade ohne die Säuregruppen zusammen mit den Absorptionsspektren von zwei Modellspezies für die

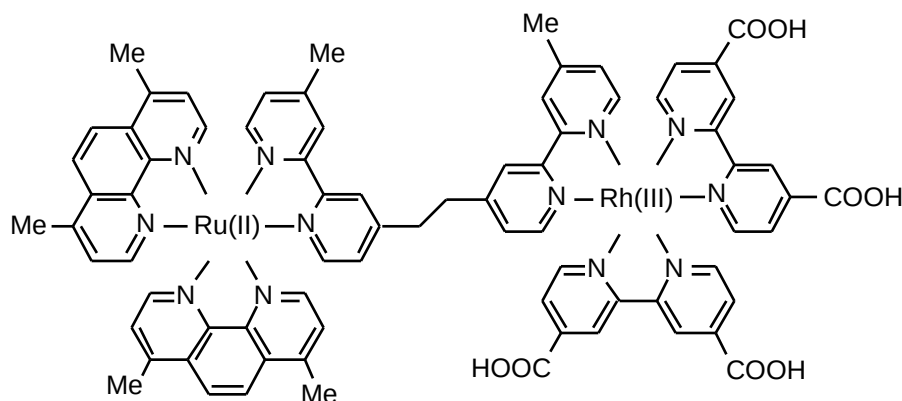


Abbildung 4.1: Chemische Struktur der Ru(II)-Rh(III)-Metallkomplexdiade. Sie ist $2.8 \text{ nm} \times 1.5 \text{ nm}^2$ groß, der Durchmesser einer Untereinheit beträgt 1.4 nm . (Modellierung mit CS ChemDrawPro, CambridgeSoft Corp., Cambridge, MA)

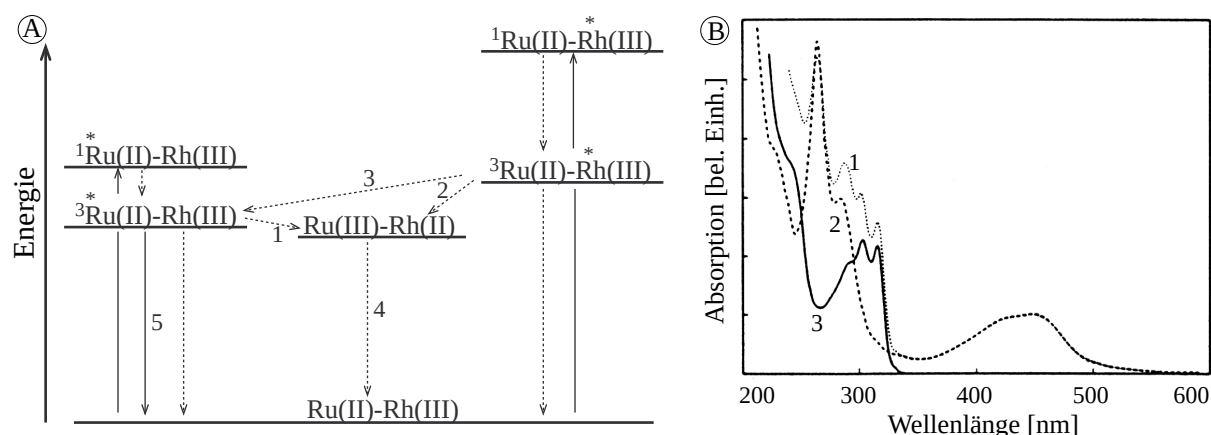


Abbildung 4.2: Jablonski-Diagramm und Absorptionsspektren der Diade. (A) Jablonski-Diagramm mit den 4 intramolekularen Prozessen: (1)/(2) Elektronentransfer nach der Anregung der Ru- bzw. Rh-Untereinheit, (3) intramolekularer Energietransfer, (4) Rückreaktion, (5) die im SNOM beobachtete Phosphoreszenz. (B) Absorptionsspektren der (1) Diade und der Modellspezies für die (2) Ru- und (3) Rh-Untereinheit (nach Indelli et al., 1994).

einzelnen Untereinheiten gezeigt. Es ist die exakte Summe der zwei einzelnen Absorptionsspektren. Das breite Absorptionsband bei 450 nm ist ein MLCT (*metal-to-ligand-charge-transfer*) Übergang der Ru-Einheit. Bei Zimmertemperatur ist die zugehörige Emission stark Stokes-verschoben und besitzt ihr Maximum bei ca. 610 nm. In Flüssigkeiten ist diese Phosphoreszenz sehr stark durch den Elektronentransferprozeß gelöscht, so daß sich die Quantenausbeute gegenüber der Quantenausbeute der Modellspezies für die Ru-Einheit um einen Faktor 90 verringert. Die Modellspezies selbst besitzt eine Quantenausbeute von 0.11. Die Phosphoreszenzabklingkurve der Diade ist biexponentiell mit den Lebensdauern 6 ns (85 %) und >30 ns (15 %). Diese Lebensdauern sind sehr viel kürzer als die entsprechenden 1.8 μs der Modellspezies für die Ru-Einheit. In festen Matrizen tritt der Elektronentransferprozeß nicht auf, da eine Umpolarisierung des Lösungsmittels verhindert ist (Indelli et al., 1994).

Für Phosphoreszenzuntersuchungen von ausgerichteten Molekülen ist es wichtig zu wissen, in welcher Richtung die Absorptions- und Emissionsdipole liegen. Im Fall der Diade sollte es aufgrund der oktaedrischen Symmetrie am Ru-Ion für die Absorption keine bevorzugte Richtung geben. Gleiches kann für die Emission angenommen werden. Damrauer et al. (1997) fanden bei der Untersuchung eines ähnlichen Ru-Komplexes eine Relaxierung des Komplexes aus dem Frank-Condon-Zustand, der sich nach dem Übergang eines Elektrons von einem d -Orbital des Metalls in das π^* -System eines Liganden ergibt, in den

energetisch niedrigsten Anregungszustand innerhalb von 300 fs nach der Anregung. Dieser energetisch niedrigste Anregungszustand besitzt, statistisch gesehen, nahezu eine Gleichverteilung des Elektrons auf die drei Liganden des Ru-Atoms, obgleich es ein Bipyridin- und zwei Phenantrolinliganden sind (Indelli et al., 1994).

4.1.2 LB-Filmherstellung

Die Wasser-Luft-Grenzfläche ist gut geeignet, amphiphile Moleküle anzuordnen. Diese bestehen aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Teil, wobei der hydrophile Teil in das Wasser eintaucht, während der hydrophobe Teil auf der Wasseroberfläche verbleibt und ein vollständiges Abtauchen des Moleküls in die Subphase verhindert. Typische amphiphile Moleküle sind Fettsäuren und langkettige Alkohole. Dabei ist die lange Kohlenwasserstoffkette der hydrophobe Teil. Die chemische Struktur der Stearinsäure ist als Beispiel für ein amphiphiles Molekül in Abbildung 4.3 dargestellt.

Um die Amphiphile auf die Wasseroberfläche aufzubringen, werden sie zunächst in einem leichtflüchtigen organischen Lösungsmittel gelöst, von dem man eine definierte Menge auf die Grenzfläche gibt („spreiten“). Das Lösungsmittel verdampft schnell, und die amphiphilen Moleküle bleiben auf der Oberfläche zurück. Wasserlösliche Moleküle wie die Diade bilden jedoch keinen Film an der Wasseroberfläche. Man muß sie mit einem Amphiphil „cospreiten“ (Hada et al., 1985). Dazu werden beide Substanzen gleichzeitig gelöst und auf der Oberfläche gespreitet. Bei den hier untersuchten Filmen wurde die Diade mit Stearinsäure in einer Mischung aus Methanol und Chloroform (1:3 Volumenverhältnis) gelöst. Ein möglicher Aufbau des Films an der Wasseroberfläche ist schematisch in der Abbildung 4.4 (A) gezeigt.

Die Moleküle bilden unter geeigneten Bedingungen an der Wasseroberfläche ein zweidimensionales System. Ist die Wasser-Luft-Grenzfläche von beweglichen Barrieren umgeben, kann die den Molekülen zur Verfügung stehende Fläche verändert werden. Eine wichtige Zustandsgröße eines derartigen Systems ist der Schub π . Er ist als die Differenz zwischen der Oberflächenspannung der unbedeckten und der mit dem Film bedeckten Oberfläche der

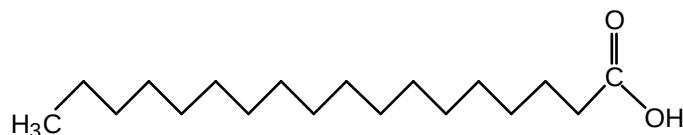


Abbildung 4.3: Chemische Struktur der Stearinsäure $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$ mit langer hydrophober Kohlenwasserstoffkette und hydrophiler Säuregruppe.

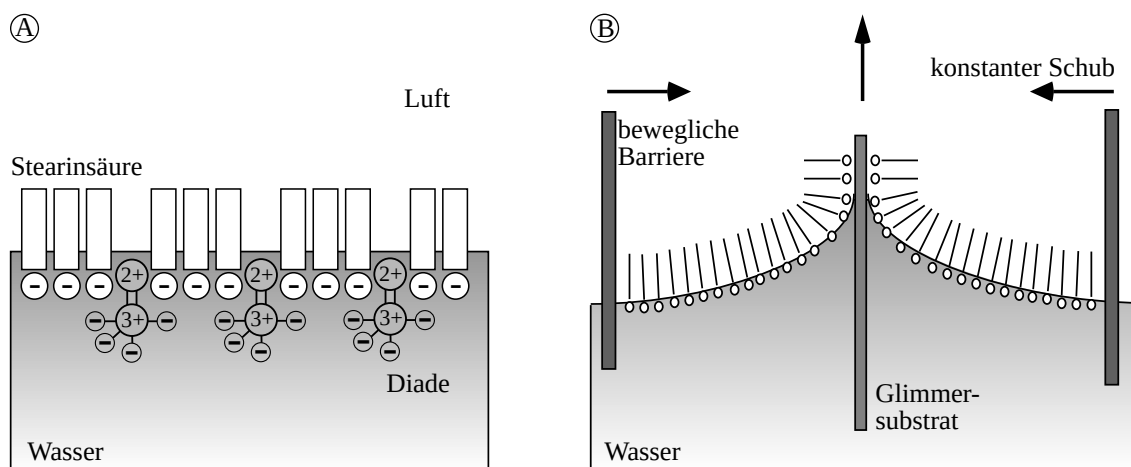


Abbildung 4.4: Herstellung von LB-Filmen, die eine wasserlösliche Diade enthalten. (A) Möglicher schematischer Aufbau eines Dünnschichtfilms nach dem Cospreiten der Diade mit Stearinsäure. Elektrostatische Anziehungskräfte zwischen den deprotonierten Säuren und der positiv geladenen Diade verhindern die Verteilung der Diade in der Subphase. (B) Übertrag des Dünnschichtfilms auf ein festes Substrat mit der Langmuir-Blodgett-Methode. Bewegliche Barrieren sorgen für konstanten Schub während des Übertrags.

Subphase definiert. Er kann zum Beispiel über die Wilhelmy-Methode (Wilhelmy, 1863) mit einer Papierwaage gemessen werden. Schub und Fläche sind die zweidimensionalen Analoga zu Druck und Volumen. Über sie können verschiedene Phasen im zweidimensionalen System identifiziert werden. Bei extrem geringem Schub, wenn die Wechselwirkung zwischen den Molekülen vernachlässigt werden kann, verhalten sich die gespreiteten Moleküle wie ein zweidimensionales Gas. Wenn man die Fläche verringert und den Schub erhöht, wechseln die Filme über flüssig-analoga in fest-analoga Phasen. Dabei kann die Kinetik sehr langsam sein, so daß sich die Filme nicht immer im thermodynamischen Gleichgewicht befinden.

Für die Untersuchung mit dem optischen Nahfeldmikroskop muß der Film von der Wasseroberfläche auf ein festes Substrat, in unserem Fall frisch gespaltene Glimmerstücke mit 15 mm Durchmesser, übertragen werden. Zunächst taucht man das frisch gespaltene Glimmerstück in die Subphase ein. Der Monofilm wird dann bis zum gewünschten Schub komprimiert und 10 Minuten ruhen gelassen, damit er einen Gleichgewichtszustand einnimmt. Dann wird der Film durch Austauschen des Glimmerstücks durch die Grenzfläche übertragen. Dabei werden die beweglichen Barrieren derart nachgeführt, daß ein konstanter Schub beibehalten wird. Diese Technik heißt „Langmuir-Blodgett-Technik“ und ist in Abbildung 4.4 (B) schematisch dargestellt.

Eine Darstellung der verschiedenen Methoden zur Präparation und Untersuchung von

Mono- und Multischichten findet sich bei Roberts (1990).

4.1.3 Die Diade an der Wasseroberfläche

Vor dem Übertrag auf ein festes Substrat wurden die Dünnsfilme, die die Ru(II)-Rh(III)-Metallkomplexdiade enthalten, auf der Wasseroberfläche von Huesmann et al. (1996) untersucht. In diesem Abschnitt werden kurz die für die vorliegende Arbeit wichtigen Punkte zusammengefaßt. Dabei werde ich mich auf Filme, die aus einer Mischung aus Diade und Stearinsäure im Molverhältnis 1:3 bestehen, beschränken. Diese Ergebnisse sind im wesentlichen der Arbeit von Huesmann et al. (1997) entnommen.

In den Schub-Flächen-Isothermen führt die Addition der Diade zu einer erheblichen Expansion des Films, verglichen mit Filmen aus reiner Stearinsäure. Dies deutet auf eine starke Wechselwirkung der positiv geladenen Diade mit den Stearinsäuremolekülen hin. In einem Schubbereich von 5 bis 10 mN/m kann ein Phasenübergang beobachtet werden, und bei ca. 45 mN/m geht die Isotherme in die für reine Stearinsäure über. Messungen des Oberflächenpotentials (Kinloch und McMullen, 1959) zeigen, daß die Diade ausgerichtet ist, wobei die Ru-Untereinheit zur Grenzfläche weist.

Mit einem Brewster-Winkel-Mikroskop (engl. *brewster angle microscope*, *BAM*) (Hönig und Möbius, 1991) ist es möglich, die Struktur des Films auf der Wasseroberfläche zu untersuchen. Der Kontrast ergibt sich in diesem Mikroskop aus unterschiedlichen Dicken oder Brechungsindizes des Dünnsfilms. Bei endlichem Schub findet man bei den aus Diade und Stearinsäure bestehenden Filmen zwei Phasen. Runde, helle Domänen mit Durchmessern im Mikrometerbereich, die eine optische Anisotropie aufweisen, sind von einer homogenen Phase umgeben. Die optische Anisotropie deutet darauf hin, daß die Moleküle in den Domänen dicht gepackt sind und eine langreichweitige Ordnung aufweisen (Overbeck et al., 1994).

Reflexionsspektren, die bei verschiedenen Schüben aufgenommen wurden, zeigen bis zu einem Schub von 40 mN/m keine Sättigung. Dies bedeutet, daß innerhalb dieses Schubbereichs keine Diade in die Subphase verloren geht. Ausgehend von der aus dreidimensionalen Modellen berechneten Querschnittsfläche einer vertikal orientierten Diade (1.5 nm^2) bedeutet dies aber, daß die Diade in mehreren Schichten angeordnet sein muß, da die mittlere einer Diade zur Verfügung stehende Fläche zu klein wird. Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, daß die zwei im BAM identifizierten Phasen zum einen aus einer dichtgepackten Schicht, zum anderen aus einer Vielfachschicht von Diadenmolekülen unter einer Schicht von Stearinsäuremolekülen bestehen.

4.1.4 Die Diade in LB-Filmen

Die mit einem Rasterkraftmikroskop im *tapping mode* bestimmte Topographie der auf Glimmer übertragenen Filme ist in der Abbildung 4.5 zu sehen. Runde Domänen mit verschiedenen Durchmessern sind gleichmäßig über die Probenoberfläche verteilt. Berühren sich zwei Domänen, bleibt manchmal eine feine Trennungslinie sichtbar (in der Abbildung mit weißen Pfeilen markiert). Vereinzelt treten auch Defekte im Zwischenbereich auf, die auf einer reinen Glimmeroberfläche nicht beobachtbar sind. In der Detailaufnahme (Abbildung 4.5 B) ist einer dieser Defekte vergrößert dargestellt. Das Höhenprofil entlang der weiß markierten Zeile ist in (C) dargestellt. Die Domänen sind etwa 0.9 nm hoch, und die Tiefe der Defekte beträgt etwa 0.5 nm.

Im Vergleich dazu ist die mit der Scherkraftdetektion bestimmte Topographie und die Phosphoreszenz eines gleichartigen Filmes in Abbildung 4.6 dargestellt. Im Scherkraftmi-

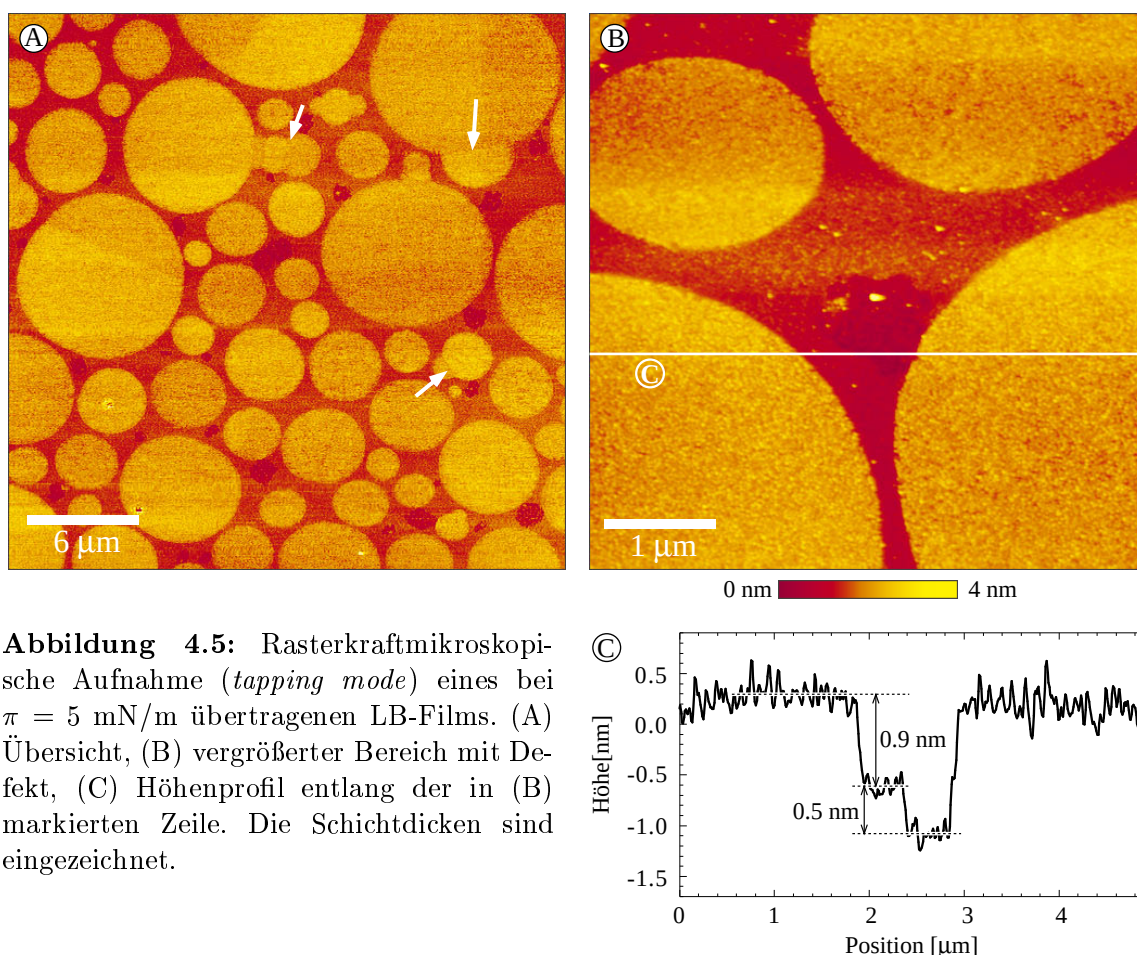


Abbildung 4.5: Rasterkraftmikroskopische Aufnahme (*tapping mode*) eines bei $\pi = 5$ mN/m übertragenen LB-Films. (A) Übersicht, (B) vergrößerter Bereich mit Defekt, (C) Höhenprofil entlang der in (B) markierten Zeile. Die Schichtdicken sind eingezeichnet.

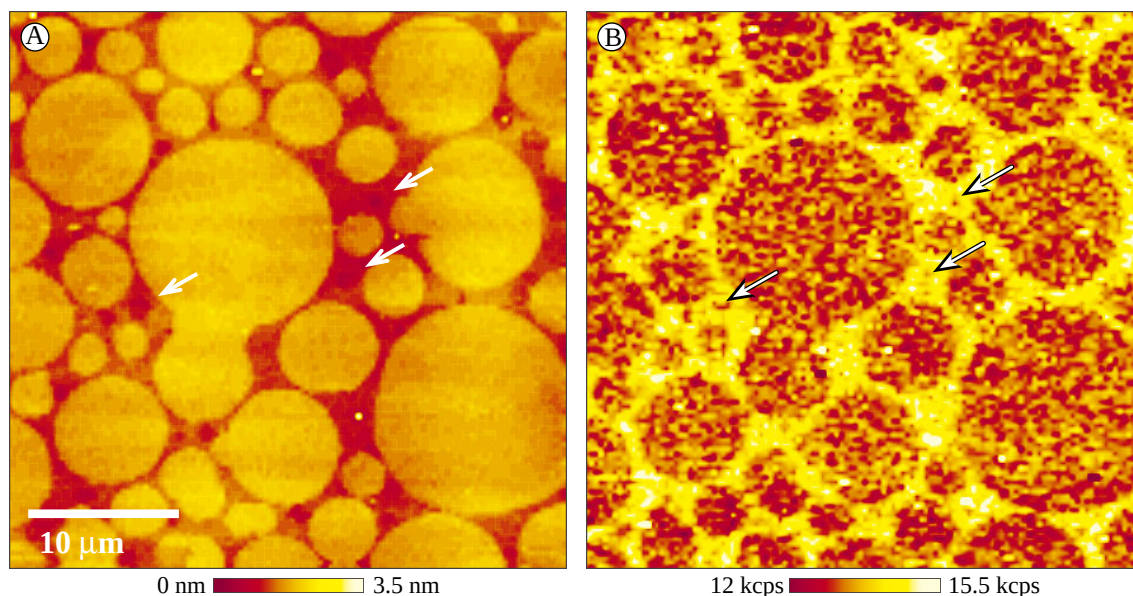


Abbildung 4.6: Scherkraftmikroskopische (A) und nahfeldoptische (B) Aufnahmen eines LB-Films aus Diade und Stearinsäure ($\pi = 5$ mN/m). Anregungsintensität: $1.1 \mu\text{W}$ bei 488 nm; Filter: 565DRLP02 (Dic, Omega); Em: 590DF35 (Omega), KV550 (Schott); 40 ms Photonenzeit pro Pixel

kroskop erscheint der Film etwas flacher, d. h. die Domänen zeigen eine Höhe von 0.7 nm und die Defekte sind 0.4 nm tief. Die Morphologie entspricht weitgehend der mit dem Kraftmikroskop bestimmten. Die Phosphoreszenz wurde mit $1.1 \mu\text{W}$ bei 488 nm mit einem Ar^+ -Laser angeregt. Es sind die gleichen Strukturen wie im Scherkraftmikroskop sichtbar. Sowohl die Domänen als auch die Defekte (schwarze Pfeile in der Abbildung 4.6) zeigen eine geringere Phosphoreszenzintensität als die sie trennenden Stege. Die Trennungslinien zwischen sich berührenden Domänen können nicht aufgelöst werden.

Es treten bei der Scherkraftdistanzregelung gelegentlich Probleme in Form von abrupten Änderungen der Wechselwirkung auf. Dies ist in Abbildung 4.7 (A) gezeigt. Es ist die gleiche Probe und Spitze wie in Abbildung 4.6. Es gibt mehrere Bildzeilen, in denen die Stege zwischen den Domänen höher erscheinen als im restlichen Teil des Bildes. Da zur Darstellung von jeder Bildzeile der Mittelwert abgezogen wurde, entstehen durch diese erhöhten Stege die dunklen Streifen in den Domänen. Der Deutlichkeit halber wurden die Profile entlang der zwei im Bild markierten Zeilen in 4.7 (B) nochmals dargestellt. Anstelle des niedrigeren Steges und des Defektes, die in dem gestrichelten Profil zu sehen sind, ist im Profil der gestörten Bildzeile, durchgezogen dargestellt, eine Erhöhung um ca. 2.5 nm gegenüber den benachbarten Domänen mit einer verhältnismäßig großen Höhenmodulation

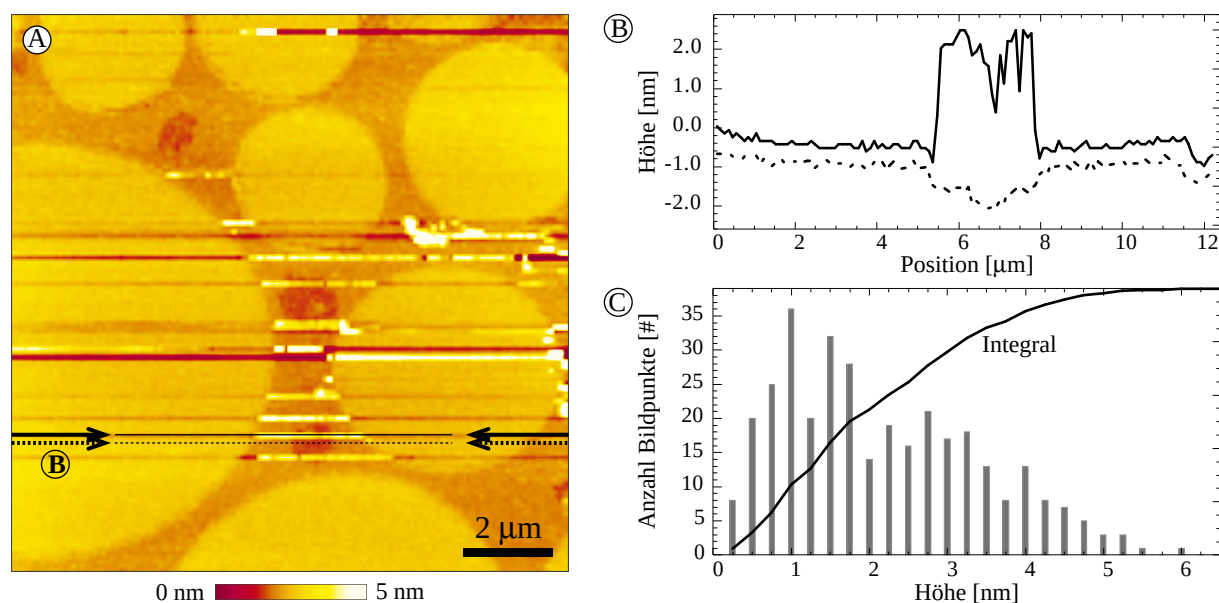


Abbildung 4.7: Scherkraftmikroskopische Aufnahme (A) eines LB-Films aus Diade und Stearinsäure ($\pi = 5 \text{ mN/m}$) mit zeilenweiser Veränderung der Scherkraftwechselwirkung. (B) Höhenprofile entlang der in (A) markierten Zeilen. (C) Histogramm der Höhendifferenzen zwischen der Domänenoberfläche und den Punkten mit veränderter Scherkraftwechselwirkung, jeweils gemessen innerhalb einzelner Bildzeilen.

von mehr als 1.5 nm zu sehen. Bestimmt man die Verteilung der in diesen Bildzeilen gemessenen Höhen der Stege gegenüber den Domänen, so ergibt sich die in 4.7 (C) gezeigte Verteilung. Die meisten Bildpunkte (85 %) liegen im Bereich bis 3.5 nm. Es ist zu beachten, daß einige der Zeilen durch Defekte gehen (wie z. B. die in (B) dargestellte Zeile). In der Verteilung kann dies dazu führen, daß für die Bildpunkte in den Defekten eine zu geringe Höhe gemessen wird. Da es sich jedoch um nur wenige Bildpunkte handelt und aufgrund der großen Höhenmodulation in den Stegen die Ränder der Defekte nicht erkennbar sind, wird der Einfluß dieser Punkte auf die Verteilung nicht weiter berücksichtigt.

Diese Probleme mit der Scherkraftdistanzregelung traten bei mit Dimethylchlorosilan (ABCR Karlsruhe) passivierten Spitzen sehr viel seltener auf. Dazu wurden die Spitzen direkt nach der Herstellung und Montage im Röhrchen in das Silan getaucht. Die sonstigen Abbildungseigenschaften wurden durch diese Behandlung nicht merklich beeinflusst.

Bei höheren Schüben während des Übertrags verlieren die Domänen ihre runde Form und werden etwas größer. Ein kraftmikroskopisches Bild eines bei 20 mN/m übertragenen LB-Films wird in Abbildung 4.8 (A) gezeigt. In der Vergrößerung 4.8 (B) sieht man, daß die Domänenoberfläche einen granularen Charakter angenommen hat. Dies zeigt sich auch

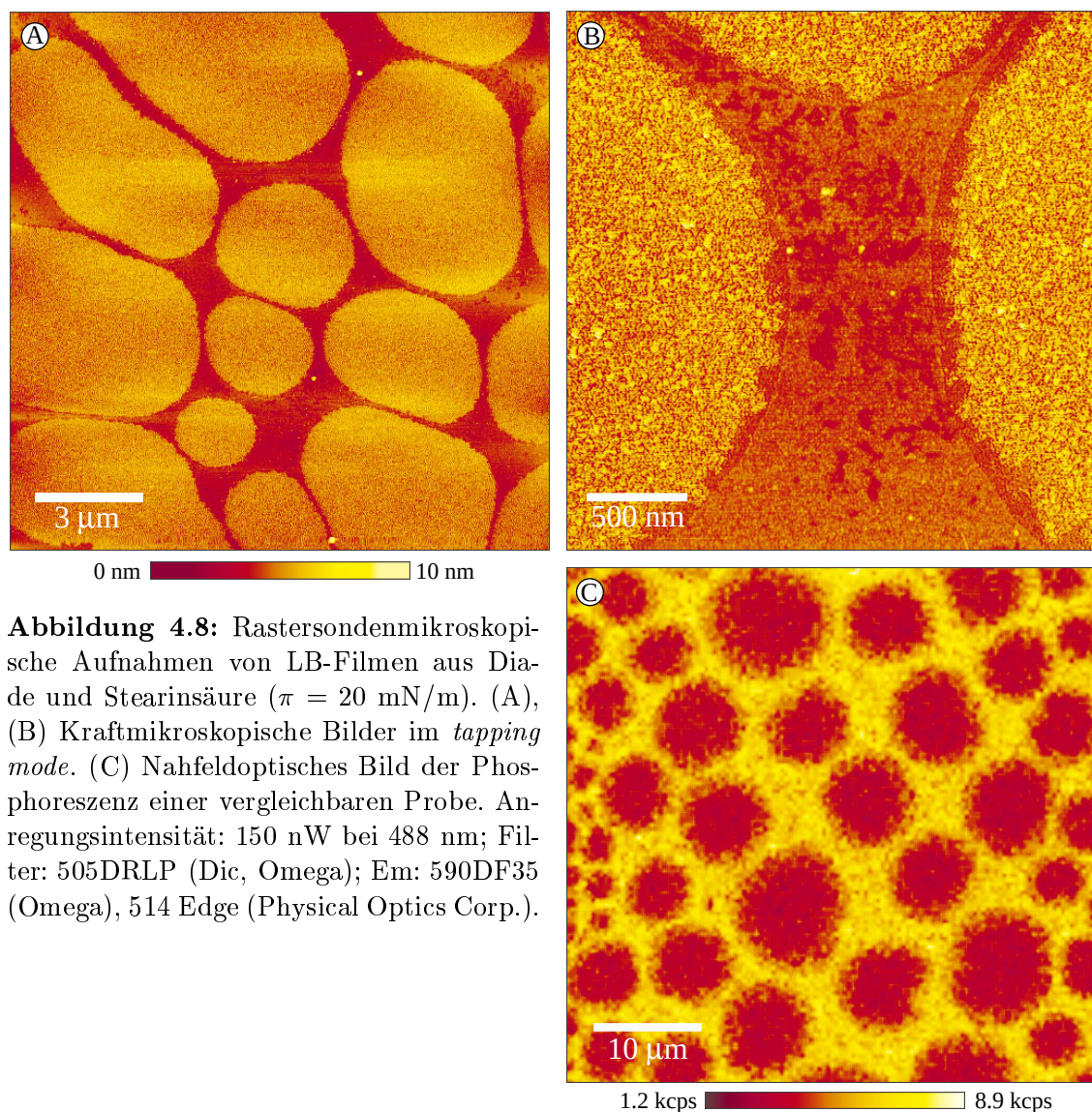


Abbildung 4.8: Rastersondenmikroskopische Aufnahmen von LB-Filmen aus Diade und Stearinsäure ($\pi = 20 \text{ mN/m}$). (A), (B) Kraftmikroskopische Bilder im *tapping mode*. (C) Nahfeldoptisches Bild der Phosphoreszenz einer vergleichbaren Probe. Anregungsintensität: 150 nW bei 488 nm; Filter: 505DRLP (Dic, Omega); Em: 590DF35 (Omega), 514 Edge (Physical Optics Corp.).

bei der Bestimmung der Rauigkeit der Domänenoberflächen, die von 0.1 nm bei niedrigen Schüben (Abbildung 4.5 B) auf 0.7 nm zunimmt. Die Defekte in den Bereichen zwischen den Domänen sind immer noch vorhanden. Mit dem Scherkraftmikroskop ergab sich eine vergleichbare Topographie.

Die LB-Filme zeigten auch eine zeitabhängige Veränderung der Morphologie. Die bei niedrigem Schub übertragenen Filme veränderten sich nicht mit der Zeit, wohingegen die bei höherem Schub übertragenen Filme im Zwischenbereich innerhalb von Monaten Erhebungen von einigen Ångström Höhe und der Domänenrand eine Substruktur entwickelten.

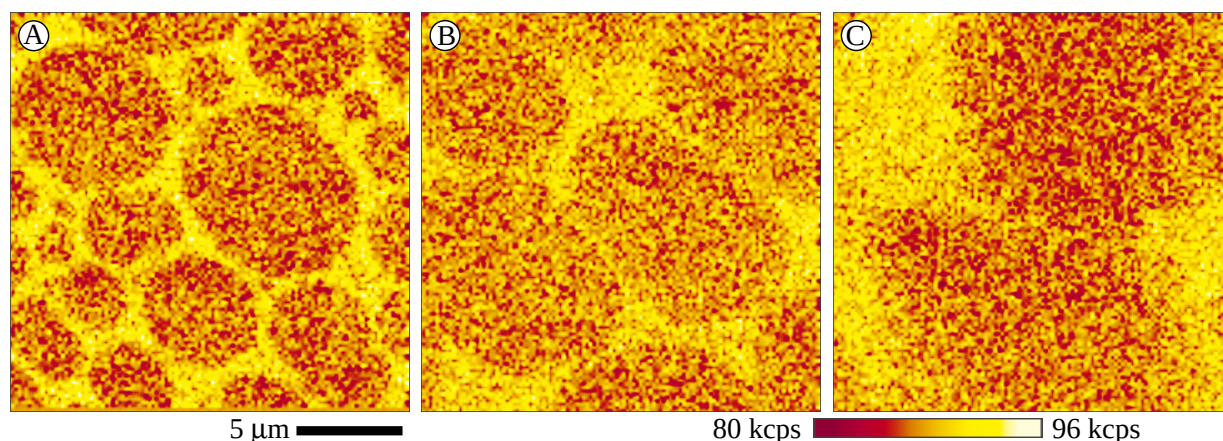


Abbildung 4.9: Nahfeldoptische Phosphoreszenzbilder von LB-Filmen aus Diade und Stearinsäure die bei (A) 5 mN/m, (B) 20 mN/m und (C) 40 mN/m übertragen wurden. Die Skalierungen stimmen für alle Bilder überein. Anregungsintensität: $2.4 \mu\text{W}$ bei 488 nm; Filter wie in Abb. 4.8 (C).

In Abbildung 3.8 (A) auf Seite 53 war die mit dem Scherkraftmikroskop gemessene Topographie eines ca. 6 Monaten alten LB-Films, der bei 20 mN/m übertragen wurde, gezeigt worden.

Das Phosphoreszenzsignal in Abbildung 4.8 (C) zeigt, ähnlich wie im Fall niedrigen Schubes, die gleichen Strukturen wie die Topographie. Die Domänen sind wiederum dunkler als die sie trennenden Stege. Die Signalintensitäten selbst hängen nur wenig vom Schub ab, bei dem der Film übertragen wurde. Abbildung 4.9 zeigt die Phosphoreszenzbilder von drei LB-Filmen auf der gleichen lateralen Größenskala mit der gleichen Spitze und der gleichen Anregungsintensität. Die Schübe, bei denen die Filme übertragen wurden, waren (A) 5 mN/m, (B) 20 mN/m und (C) 40 mN/m. Im direkten Vergleich der Phosphoreszenzbilder der LB-Filme, die bei verschiedenen Schüben übertragen wurden, sieht man, daß der Übergang zwischen den Domänen und den Stegen breiter wird, auch wenn die absoluten Signalintensitäten gleich bleiben. Dies spiegelt nicht notwendigerweise eine kontinuierliche Veränderung der Verteilung der Phosphoreszenz wider, sondern kann auch durch eine optisch nicht aufgelöste Feinstruktur, wie sie in Abbildung 3.8 (A) zu sehen ist, verursacht werden.

Um den Aufbau eines derartigen Films zu modellieren, ist es hilfreich, die Dichte der Diade zu kennen. Aus der Anzahl der Diadenmoleküle beim Spreiten und der Fläche, die der Film bei einem bestimmten Schub einnimmt, läßt sich allerdings nur die mittlere Dichte, über den ganzen Film gemittelt, bestimmen. Von den Mikroskopietechniken kann nur

die Phosphoreszenzmessung im SNOM selektiv die Diade nachweisen. Jedoch ist die Phosphoreszenzintensität nicht nur von der Dichte der Diade, sondern auch von der Phosphoreszenzquantenausbeute der Diade abhängig, und diese muß für die Diadenmoleküle in den verschiedenen Phasen nicht gleich sein. Um die Diadendichte und die Quantenausbeute zu bestimmen, kann man Bleichexperimente durchführen. Die Grundlage für diese Messungen legte Hirschfeld (1976) durch seine Beobachtung, daß das Integral über eine Bleichkurve unabhängig von der Quantenausbeute ist, sofern die Bleichreaktionen von unimolekularem bzw. pseudounimolekularem Charakter sind. Pseudounimolekular bedeutet dabei, daß eine zweite Spezies, die in die Bleichreaktion eingeht, in großem Überschuß vorhanden ist. Durch diese Annahme wird die Bleichkonstante $k_R = 1/\tau_R$ eine zeitunabhängige Konstante, und für die Anzahl $G(t)$ der ungebleichten Farbstoffmoleküle gilt

$$dG(t) = -k_R \frac{\tau_L}{\tau_E} G(t) dt$$

Dabei ist τ_L die Lebensdauer des angeregten Zustandes, und τ_E ist die Zeit zwischen zwei Anregungsereignissen. Die Differentialgleichung stellt eine Exponentialfunktion mit der Zeitkonstante $\tau_B = \tau_R \cdot \tau_E / \tau_L$ dar. Für die Gesamtzahl der emittierten Photonen $S(t \rightarrow \infty)$ muß über die Exponentialfunktion integriert werden, und man erhält

$$S(t \rightarrow \infty) = \int_0^\infty I(t') dt' = \frac{Q}{\tau_E} \int_0^\infty G(t') dt' = G_0 Q \frac{\tau_B}{\tau_E}$$

mit der Emissionsintensität $I(t)$, der Emissionsquantenausbeute Q und der Anzahl der anfänglich vorhandenen Moleküle G_0 . Dabei ist Q gleich dem Verhältnis der Lebensdauer des angeregten Zustandes zur Strahlungslebensdauer τ_F . Da die Strahlungslebensdauer im wesentlichen nur vom Absorptionsspektrum abhängt (Strickler und Berg, 1962), sind Variationen der Quantenausbeute auf Veränderungen der Lebensdauer des angeregten Zustandes zurückzuführen. Faßt man die Terme zusammen, erhält man

$$S = G_0 \frac{\tau_R}{\tau_F}$$

Im Falle, daß die Bleichrate für die Diaden in beiden Phasen die gleiche ist, kann die über die Bleichkurven integrierte Emission als ein Maß für die Diadendichte verwendet werden. Weiterhin kann die Emissionsquantenausbeute Q entweder als der Bleichkonstanten τ_B umgekehrt proportional oder als dem Verhältnis der anfänglichen Intensität $I(0)$ zur integrierten Intensität $S(t \rightarrow \infty)$ proportional angesehen werden. Es gelten somit folgende

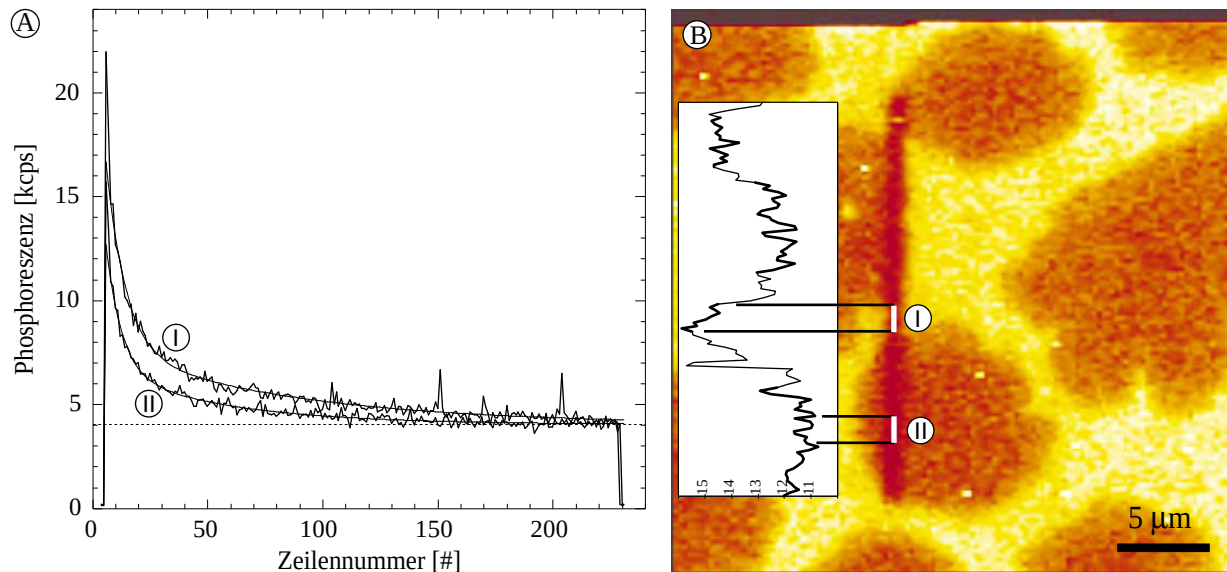


Abbildung 4.10: Bleichexperiment auf den Domänen und Stegen eines LB-Films aus Diade und Stearinsäure ($\pi = 20$ mN/m). (A) Bleichkurven für den Zwischenbereich (I) und die Domänen (II) gemessen in den in (B) weiß eingezeichneten Bereichen. Die horizontale gestrichelte Linie stellt das Hintergrundsignal dar. (B) Phosphoreszenzbild nach dem Bleichen. Die eingezeichnete Kurve zeigt den Mittelwert der 2. bis 5. Zeile des Bleichexperiments. Für die Auswertung in Tabelle 4.1 wurden die Meßwerte aus den dicker gezeichneten Liniensegmenten verwendet. Anregungsintensität: 470 nW bei 488 nm; Filter wie in Abb. 4.6 (B).

Proportionalitäten:

$$G_0 \sim S(t \rightarrow \infty) \quad (4.1)$$

$$Q \sim 1/\tau_B \quad (4.2)$$

$$Q \sim I(0)/S(t \rightarrow \infty) \quad (4.3)$$

Ein entsprechendes Bleichexperiment auf einem bei 20 mN/m übertragenen Film ist in Abbildung 4.10 dargestellt. Dazu wurde die gleiche Bildzeile durch Ausschalten des langsamen Zeilenvorschubs wiederholt belichtet, wobei die Phosphoreszenz sowohl bei der Hin- als auch bei der Rückbewegung der Spitze während des Rastervorgangs aufgezeichnet wurde. In den sich daraus ergebenden Bildern ist die Zeilennummer proportional zur verstrichenen Belichtungszeit, und die Spalten entsprechen einzelnen Bleichkurven. An diese Bleichkurven wurden biexponentielle Funktionen derart numerisch angepaßt, daß sie das gleiche Hintergrundsignal aufweisen.

Die in Abbildung 4.10 (A) gezeigten Bleichkurven sind den durch weiße Striche markierten Bereichen im Bild 4.10 (B) entnommen. Abgesehen von einer sehr schnellen, nicht

Tabelle 4.1: Ergebnisse des Bleichexperiments in Abbildung 4.10. In (A) sind die Amplituden in Ereignissen pro 20 ms ($= 0.05$ kcps) und die Zeitkonstanten in Zeilennummern gegeben.

(A)

Parameter	Domänen	Zwischenbereich
Amplitude A_1	134 ± 20	179 ± 13
Bleichkonstante τ_1	5.6 ± 1.4	7.3 ± 1.3
Amplitude A_2	63 ± 9	77 ± 8
Bleichkonstante τ_2	46 ± 8	67 ± 8
$I_0 = A_1 + A_2$	197 ± 23	256 ± 17
A_1/A_2	2.1 ± 0.4	2.3 ± 0.3
τ_1/τ_2	8.4 ± 1.5	9.4 ± 1.3
$S(t \rightarrow \infty) = \sum A_i \cdot \tau_i$	3597 ± 595	6426 ± 419

(B)

Parameter	Verhältnis der Quanteneffizienzen (Domänen/Stege)
$I_0/S(t \rightarrow \infty)$	1.38 ± 0.31
$1/\tau_1$	1.30 ± 0.40
$1/\tau_2$	1.47 ± 0.31

(C)

Parameter	Verhältnis der Diadendichten (Domänen/Stege)
$S(t \rightarrow \infty)$	0.56 ± 0.10

weiter aufgelösten Komponente können die Kurven sehr gut durch die biexponentiellen Funktionen beschrieben werden. Die Parameter für diese Funktionen sind in Tabelle 4.1 (A) zusammengefaßt. Die aus diesen Kurven berechneten Verhältnisse der Quantenausbeuten und Diadendichten sind in den Tabellen 4.1 (B) und (C) aufgelistet.

Die Quanteneffizienz ist in den Domänen um etwa 40 % größer als in den Stegen. Sie hängt vom Auftreten intra- und intermolekularer Elektronen- und Energietransferprozesse ab. In Lösungen sind aufgrund der großen Abstände zwischen den Molekülen die intermolekularen Prozesse oft zu vernachlässigen. Dies gilt jedoch nicht in den LB-Filmen, in denen der Abstand zwischen zwei Diaden in der gleichen Größenordnung liegt wie der Abstand zwischen den zwei Untereinheiten. Die lokale Umgebung der Diaden in den beiden Phasen sind wahrscheinlich unterschiedlich, so daß damit die Unterschiede in den Quantenausbeuten erklärt werden können. Die geringere Quantenausbeute in den Stegen deutet darauf hin, daß dort den angeregten Diaden mehr Reaktionsprozesse offen stehen als den Diaden in den Domänen. Allerdings ist die Diadendichte in den Stegen 1.5–2mal so hoch wie in den Domänen, so daß sie im Phosphoreszenzbild heller erscheinen.

Die photophysikalischen Eigenschaften derartiger Diaden sind komplex. Es stellt sich

jedoch die Frage, ob das Auftreten von zwei Exponenten in den Bleichkurven auf Eigenschaften der Probe oder des Nahfeldmikroskops zurückzuführen sind. Dafür, daß das Nahfeldmikroskop diese Aufspaltung in zwei Exponenten verursacht, spricht, daß sowohl das Amplitudenverhältnis als auch das Zeitkonstantenverhältnis für die Domänen und Stege gleich ist. Die Bleichkonstante τ_B hängt über die Zeit zwischen zwei Anregungen τ_E auch von der Anregungsintensität ab. Für die Fläche, mit der die nahfeldoptische Sonde wechselwirkt, ist nicht anzunehmen, daß die Anregungsintensität konstant ist. Wenn man annimmt, daß ein gaußförmiges Beleuchtungsprofil vorliegt, dann sollte man auch eine gaußförmige Verteilung der Bleichkonstanten erhalten. Die numerische Anpassung der sich daraus ergebenden Bleichkurve an die experimentellen Daten schlägt jedoch fehl.

Die beste laterale Auflösung im optischen Signal auf diesen Filmen betrug etwa 600 nm. Kleinere Strukturen in den Abbildungen sind auf Rauschen zurückzuführen. Die Signalintensität auf diesen Filmen, verglichen mit dem Hintergrund, war meist sehr klein (siehe z. B. Abbildung 4.9 oder 4.6 B), was zu einem kleinen Signal-zu-Rausch-Verhältnis führte. Da die in Bildern gemessene Auflösung auch von diesem Wert abhängt (den Dekker und van den Bos, 1997), wurde die laterale Auflösung vermutlich durch die Phosphoreszenzintensität beschränkt. In den entsprechenden Bildern, die mit einem Konfokalmikroskop (Model 310 CLSM, Zeiss) aufgezeichnet wurden, waren die Domänen im Film kaum erkennbar (Huesmann, 1996).

4.1.5 Modell des LB-Films

Zum Abschluß dieses Abschnittes über die Metallkomplexdiaden in LB-Filmen möchte ich ein Modell für den Aufbau des LB-Films vorschlagen, welches die mit den verschiedenen Rastersondenmikroskopen gefundenen Ergebnisse erklären kann (Kirsch et al., 1998b). Zunächst ist allerdings wichtig zu überlegen, inwieweit der Übertrag des Dünnsfilms von der Wasseroberfläche auf ein festes Substrat den Aufbau des Films stört. Deshalb wird hier das von Huesmann et al. (1997) vorgeschlagene Modell für den Film an der Wasseroberfläche zusammengefaßt.

Für den Dünnsfilm auf der Wasseroberfläche bei nicht verschwindendem Schub wurde entsprechend der Ergebnisse des BAM und der für die Diade benötigten Fläche ein Zweiphasenmodell vorgeschlagen, bei dem die eine Phase aus mehreren Lagen von Diadenmolekülen, die andere aus nur einer Lage Diadenmoleküle unter jeweils einer Schicht Stearinsäure besteht. Aus der Annahme, daß ein Film aus mehreren Lagen Diaden eine geringere Ordnung aufweist, wurde vermutet, daß die runden Domänen, die eine optische

Anisotropie aufweisen, nur eine Lage Diadenmoleküle enthalten. Aus folgenden Beobachtungen kann geschlossen werden, daß der Übertrag des Films auf ein festes Substrat das Zwei-Phasen-System nicht stört:

- Während des Übertrags geht keine Diade verloren. Dies ergibt sich aus dem Vergleich der Absorption des MLCT-Übergangs auf dem Substrat und an der Wasser/Luft-Grenzfläche.
- Die lateralen Strukturen im Film, die mit dem BAM auf der Wasseroberfläche gesehen wurden, haben die gleiche Form wie die mit den Rastersondenmikroskopen gefundenen Strukturen auf dem festen Substrat, so daß die Morphologie des Filmes auf der Mikrometer-Längenskala nicht zerstört zu sein scheint.
- Im BAM sah man, daß die runden Domänen optisch anisotrop waren. Davon kann auf eine laterale Fernordnung der Moleküle im Film geschlossen werden. Diese Fernordnung bedeutet auch gleiche Neigungs- und Richtungswinkel der Moleküle. Diese Winkel können in verschiedenen Domänen unterschiedlich sein, so daß ein Verschmelzen von Domänen behindert wird beziehungsweise es zu einem Übergangsbereich zwischen den Domänen kommt, in dem die Neigungs- und Richtungswinkel der einen Domäne in die der anderen Domäne übergehen. Beide Modelle führen dazu, daß eine Trennungslinie zwischen sich berührenden Domänen wahrnehmbar bleibt, wie sie auch in Abbildung 4.5 (A) gefunden wurde.

Es ist somit anzunehmen, daß die in den rastersondenmikroskopischen Bildern gefundenen Domänen den mit dem BAM gesehenen, optisch anisotropen runden Domänen an der Wasser-Luft-Grenzfläche entsprechen und daß in den Domänen die Moleküle eine fest-analoge Anordnung einnehmen.

Aus den nahfeldoptischen Untersuchungen war geschlossen worden, daß in den Stegen die Dichte der relativ großen Diadenmoleküle größer ist als in den Domänen. Dies muß mit den Ergebnissen des Rasterkraft- und Scherkraftmikroskops in Einklang gebracht werden, in denen die Domänen meist höher erscheinen als die dazwischen liegenden Stege. Dazu möchte ich das in Abbildung 4.11 dargestellte Modell vorschlagen. Der Zwischenbereich besteht aus einer dichten Lage Diadenmoleküle, an die der Überschuß an Diade in Form von weiteren Lagen geheftet ist. Die darüberliegende Stearinsäure ist wie in einem gas-analogen Zustand nicht dicht gepackt. Diese Phase steht im Gleichgewicht mit den Domänen, in denen eine Monolage Diade unter einer Lage dichtgepackter Stearinsäure vorliegt. Aufgrund

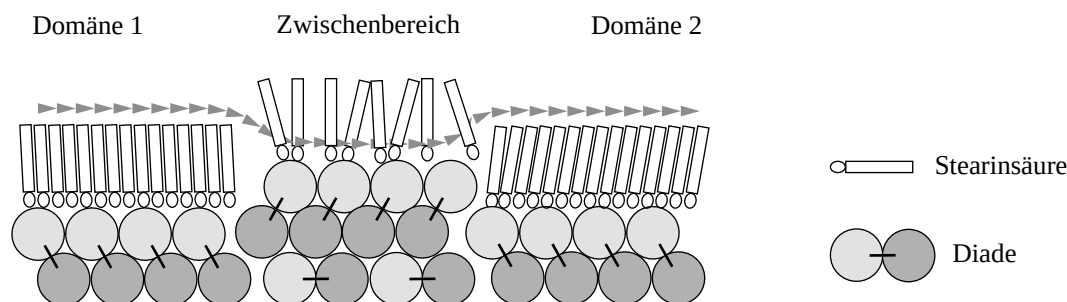


Abbildung 4.11: Modell des Aufbaus des LB-Films aus Diade und Stearinsäure auf Glimmer. Die Pfeilkette deutet einen möglichen Weg der Spitze des Kraftmikroskops während der Messung an.

der schwachen Wechselwirkung der einzelnen Stearinsäuremoleküle miteinander im gas-analogenen Zustand erscheinen sie in der topographischen Abbildung als eine dünnere Schicht, in die die Sondenspitze unter Umständen auch eindringen kann. Dies führt dazu, daß sie weniger zur Höhe des LB-Films beitragen als die dichtgepackte Stearinsäure in den Domänen.

In diesem einfachen Modell kann man durch die Beschreibung der Diade als zwei sich berührenden Kugeln mit jeweils 1.4 nm Durchmesser die Dicke der zwei Phasen abschätzen. Die Länge eines gestreckten Stearinsäuremoleküls ist 2.2 nm. Entsprechend dem Modell besteht eine Domäne aus zwei Lagen dichtgepackter Kugeln unter einer Lage Stearinsäure. Wenn man den Einfluß eines Kippwinkels der Stearinsäure außer acht läßt, erhält man eine Dicke von $h_{dom} = 2.5 \text{ nm} + 2.2 \text{ nm} = 4.7 \text{ nm}$. Für den Zwischenbereich erhält man $h_{zw} = 3.7 \text{ nm}$, entsprechend drei Lagen dichtgepackter Kugeln. Diese drei Lagen stellen, wie in Abbildung 4.11 gezeichnet, 1.5 Lagen Diadenmoleküle dar. Dieser Wert ist mit dem Diadendichte-verhältnis, wie es aus den Bleichkurven bestimmt wurde, verträglich. Er ergibt sich auch aus den Messungen an der Wasseroberfläche, die eine Fläche von 1.25 nm^2 pro Diadenmolekül bei einem Schub von 5 mN/m ergaben, und aus der Beobachtung mit dem Rasterkraftmikroskop, daß der Flächenanteil der Domänen bei diesem Schub ungefähr 70 % beträgt. Im Zwischenbereich wurde die Stearinsäure nicht mitbeachtet, da sie im gas- oder flüssig-analogen Zustand nicht zu den gemessenen Höhen beiträgt. Die theoretische Höhendifferenz von $\Delta h = 1.0 \text{ nm}$ stimmt sehr gut mit der im Kraftmikroskop gemessenen Höhe von 0.9 nm überein.

Wie sind in diesem Modell die abweichenden Messergebnisse mit dem Scherkraftmikroskop zu verstehen? Zunächst wurde eine etwas geringere Höhe der Domänen als im Kraftmikroskop gemessen. Es ist aus Messungen an anderen LB-Filmen bekannt, daß

die Scherkraftwechselwirkung auch von der chemischen Zusammensetzung der Oberfläche abhängt (Jalocha et al., 1995). In diesem Fall unterscheiden sich die Oberflächen jedoch nur wenig, da überall Stearinsäure als oberste Lage vorhanden sein sollte. Allerdings ist die Schichtdicke der Stearinsäure im Zwischenbereich erheblich geringer, so daß eine stärkere Wechselwirkung der polaren Glasoberfläche der Spitze mit den Kopfgruppen der Stearinsäure oder den Diaden auftreten kann. Das läßt diesen Bereich dicker erscheinen. Eine alternative Erklärung ist, daß die Kraftmikroskopspitze mit einem Endradius von 5 nm den Stearinsäurefilm gar nicht wahrnimmt und daher in den Film eindringt. Dies ist jedoch bei den Faserspitzen mit einem Endkrümmungsradius im Bereich von 50 nm nicht anzunehmen, so daß mit diesen Spitzen eine größere Dicke detektiert werden sollte.

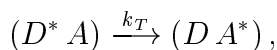
Ein weiteres auffälliges Detail sind die Störstreifen in den Stegen, die bei Glasspitzen mit der Scherkraftdetektion unregelmäßig auftraten. Eine mögliche Erklärung ist die Aufnahme von Stearinsäure durch die Spitze. In den Domänen sind die Stearinsäuremoleküle dicht gepackt, so daß eine mit der polaren Kopfgruppe an der Faserspitze hängende Stearinsäure nicht in diese Schicht eindringen kann. Sie hat somit im Bereich der Domänen keinen Einfluß auf das scherkraftmikroskopische Bild. Im Zwischenbereich kann sie jedoch mit den dortigen Stearinsäuremolekülen stark hydrophobe Wechselwirkungen ausbilden, die die Schwingung der Faserspitze zusätzlich dämpfen. Zum Ausgleich wird durch den Regelkreis der Abstand zwischen Probe und Spitze vergrößert, was als eine größere Schichtdicke interpretiert wird. Die maximale Wechselwirkungslänge entspricht der doppelten Länge einer Stearinsäure. Diese 4.4 nm müssen zur Dicke des Films in den Stegen h_{zw} addiert werden. Damit ergibt sich eine maximale Höhendifferenz zwischen den zwei Phasen von $\Delta h_{max} = 3.4$ nm. Dieser Wert ist von der gleichen Größenordnung wie die gemessenen Höhen, von denen 85 % kleiner als 3.5 nm sind. Die starke Modulation auf den Höhenprofilen (Abbildung 4.7 B, durchgezogene Kurve) kann durch die Unordnung der Stearinsäuremoleküle auf der Oberfläche in der gas-analogen Phase erklärt werden. Diese Unordnung führt zu unterschiedlich starken Wechselwirkungen zwischen den Stearinsäuremolekülen an der Spitze und auf der Probe.

In Verbindung mit den Störstreifen war beobachtet worden, daß sie nach einer Passivierung der Glasoberfläche der Spitze mit Silan sehr viel seltener auftreten. Dies kann dadurch erklärt werden, daß die Wahrscheinlichkeit, daß Stearinsäure an der Spitze hängen bleibt, durch das Silan verringert wird.

4.2 FRET

Mit Fluoreszenz-Resonanz-Energieübertrag (engl. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*, *FRET*) wird der strahlungslose Energieübertrag von einem angeregten Donor-Chromophor (D) auf ein Akzeptormolekül (A) bezeichnet (Förster, 1946). Dadurch wird die Fluoreszenz des Donors gelöscht, die Fluoreszenzlebensdauer des Donors verkürzt und damit auch die Bleichgeschwindigkeitskonstante verringert (siehe auch Seite 83f in Abschnitt 4.1.4). Im Fall von fluoreszenten Akzeptoren wird deren Fluoreszenz sensibilisiert. In Abbildung 4.12 (A) ist ein Jablonski-Diagramm für dieses System aufgezeichnet.

Der Energieübertrag geschieht über eine langreichweitige Dipol-Dipol-Wechselwirkung (Förster, 1946). Er kann als der Übergang zwischen zwei Zuständen geschrieben werden



wobei der Stern das angeregte Molekül kennzeichnet. Die Reaktionskonstante k_T bezieht sich auf ein einzelnes Donor-Akzeptor-Paar und hat eine starke Abhängigkeit vom Abstand R zwischen Donor und Akzeptor:

$$k_T = \frac{1}{\tau_L} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (4.4)$$

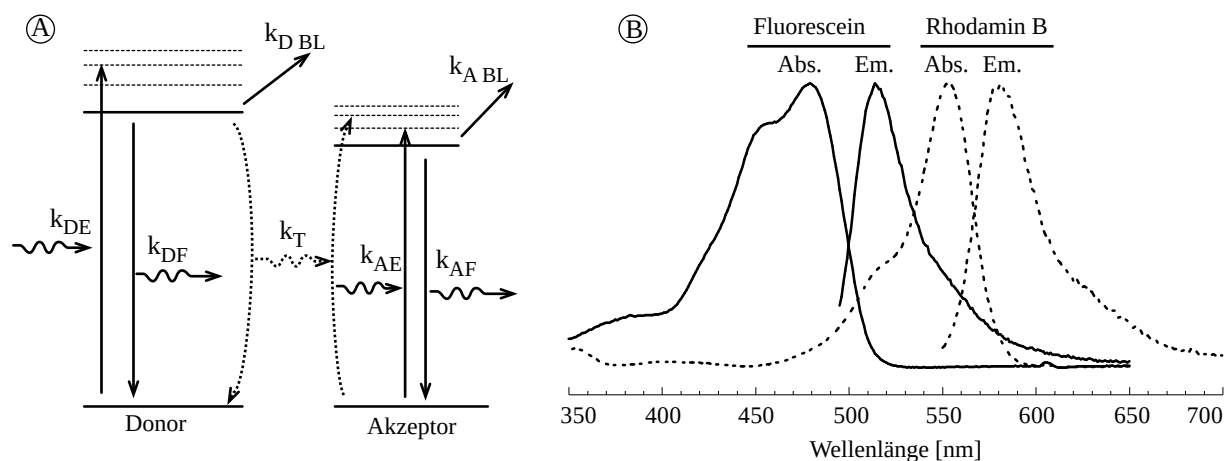


Abbildung 4.12: Jablonski Diagramm und Spektren eines FRET-Systems. (A) Einfaches Jablonski Diagramm eines aus Donor und Akzeptor bestehenden Systems mit Energietransfer k_T , Fluoreszenzanregung k_{DE} und k_{AE} , Fluoreszenzemission k_{DF} und k_{AF} und Bleichreaktionen k_{DBL} und k_{ABL} des Donors und Akzeptors. (B) Absorptions- und Emissionsspektren von Fluoresceinisothiocyanat (FITC; durchgezogen) und Rhodamin B (gestrichelt). Es besteht ein Überlapp zwischen der Emission des FITC und des Rhodamin B.

wobei τ_L wie in Abschnitt 4.1.4 die Lebensdauer des angeregten Donormoleküls ohne den Energietransferprozeß ist (Förster, 1946). Somit bezeichnet die Konstante R_0 die Entfernung zwischen den Molekülen, bei der der Energietransfer die gleiche Reaktionsrate wie alle anderen Prozesse zusammen genommen besitzt. Dieser Abstand R_0 hängt sowohl von den spektroskopischen Eigenschaften als auch von den Orientierungen der Absorptions- und Emissionsdipole ab und liegt in der Regel zwischen 1 und 10 nm, wobei die untere Grenze durch das Auftreten weiterer zwischenmolekularer Wechselwirkungen (z. B. Austauschwechselwirkungen (Dexter, 1953)) gegeben ist.

Eine weitere oft verwendete Größe ist die Effizienz des Energieübertrags E . Sie ist als das Verhältnis der von D auf A übertragenen Quanten zu den von D absorbierten Quanten definiert. Somit ist E das Verhältnis der FRET-Reaktionskonstante k_T zur Summe der Reaktionskonstanten aller Prozesse $k_T + 1/\tau_L$, die dem angeregten Donor offen stehen.

$$E = \frac{k_T}{1/\tau_L + k_T} = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6} \quad (4.5)$$

Alternativ kann die Effizienz über die Quantenausbeuten Q_T und Q eines beliebigen Prozesses x mit und ohne Energietransfer dargestellt werden, wobei für die Bestimmung der FRET-Effizienz oft die Fluoreszenzausbeute verwendet wird.

$$E = 1 - \frac{Q_T}{Q} = 1 - \left(\frac{k_x}{1/\tau_L + k_T} \right) \bigg/ \left(\frac{k_x}{1/\tau_L} \right) = \frac{k_T}{1/\tau_L + k_T} \quad (4.6)$$

Eine Voraussetzung für FRET ist, daß das Fluoreszenzemissionsspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. Die Spektren der in Polymerfilmen eingesetzten Farbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC; Merck, Darmstadt) und Rhodamin B (Merck) in wässriger Polyvinylalkohol-Lösung (PVA; Schuhardt, München) sind in Abbildung 4.12 (B) gezeigt. Die Überlappung zwischen der Emission des FITC und der Absorption des Rhodamin B ist klar zu sehen. Die FRET-Entfernungskonstante R_0 sollte der der Kombination von FITC mit Tetramethylrhodamin (TMR) vergleichbar sein, die bei 4.9 nm – 5.4 nm liegt. In ihrem Übersichtsartikel geben Wu und Brand (1994) die R_0 Werte für mehr als 70 Donor-Akzeptor-Paare an.

Die in Gleichung 4.4 angegebene Geschwindigkeitskonstante k_T gilt nur für ein einzelnes Donor-Akzeptor-Paar. Sind mehrere Akzeptoren vorhanden, muß der Energieübertrag auf alle Akzeptoren berücksichtigt werden. Allerdings ist eine einfache Aufsummation der Reaktionsraten unter der Annahme einer gleichmäßigen statistischen Verteilung der Akzeptoren im Raum nicht möglich, da das Mittelungsintegral für kleine Abstände aufgrund des $1/R^6$ -Terms divergent wird.

Im Fall einer statistischen Verteilung der Moleküle im Raum lassen sich diese Probleme allerdings umgehen, wenn man, wie Förster in seiner Arbeit von 1949, zunächst das zeitliche Abklingverhalten der Emission für ein einzelnes Donormolekül betrachtet. Er zeigte, daß aufgrund des Energieübertrags die rein exponentielle Fluoreszenzabklingkurve eines einzelnen Moleküls bei der Mittelung über alle Moleküle zu einer Komponente proportional zu $\exp(-\alpha\sqrt{t})$ führt. Diese Kurve ist für kleine Zeiten t steiler, für große Zeiten flacher als eine rein exponentielle Abklingkurve. Dies ist dadurch anschaulich erklärbar, daß zunächst die Donor Moleküle, die nahe bei einem Akzeptor Molekül liegen, ihre Anregungsenergie schnell an dieses abgeben können. Übrig bleiben dann die Moleküle, die ihre Anregungsenergie nur langsam abgeben können. Aus dem zeitlichen Verlauf läßt sich die Fluoreszenzausbeute Q_T durch Integration errechnen. Normalisiert auf die Fluoreszenzausbeute ohne Akzeptor Q erhält man schließlich

$$\frac{Q_T}{Q} = 1 - \sqrt{\pi} \frac{c}{c_0} \exp\left(-\left(\frac{c}{c_0}\right)^2\right) \left[1 - \Phi\left(\frac{c}{c_0}\right)\right] \quad (4.7)$$

Dabei ist $c_0 = 3/(2\sqrt{\pi^3} R_0^3)$ eine kritische Akzeptorkonzentration und

$$\Phi(q) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^q e^{-x^2} dx$$

die Gaußsche Wahrscheinlichkeitsfunktion². Durch eine Reihenentwicklung erhält man für kleine bzw. große Dichten c

$$\begin{aligned} Q_T/Q &= 1 - 2(c/c_0)^2 & \text{für} & \quad c \ll c_0 \\ Q_T/Q &= c_0^2/(2c^2) & \text{für} & \quad c \gg c_0 \end{aligned} \quad (4.8)$$

Über diese Gleichungen läßt sich die Konstante R_0 aus Messungen der Fluoreszenzausbeute bei unterschiedlichen Akzeptorkonzentrationen bestimmen. Typische kritische Konzentrationen für die untersuchten Systeme FITC–Rhodamin B beziehungsweise FITC–TMR liegen bei 2.8 – 3.8 mM.

Das wichtigste Charakteristikum von FRET ist die starke Abhängigkeit vom Abstand zwischen den Chromophoren. Dadurch kann FRET als „spektroskopischer Zollstock“ auf der Nanometerskala verwendet werden (Stryer und Haugland, 1967) und eröffnet damit

²In der Arbeit (Förster, 1949) stimmen einige Gleichungen nicht. Richtig lauten sie: $-d\rho/dt = (1/\tau_0 + 1/\tau_0 \sum (R_0/R_k)^6) \rho$ (Gleichung 5), $\int \dots = 2/\sqrt{\zeta_g} - 2\sqrt{\pi} + 2\sqrt{\zeta_g} + \dots$ (Gleichung 12) und es wird in den Gleichungen (17) und (18) anstelle des Gaußschen Fehlerintegrals die in dieser Arbeit angegebene Gaußsche Wahrscheinlichkeitsfunktion $\Phi(q) = \int_0^q \dots$ verwendet.

einen Längenbereich, der der routinemäßigen Untersuchung mit optischen Mikroskopen bisher verschlossen war. Insbesondere für die Biologie ist FRET wichtig, da sehr oft der räumliche Aufbau (Clegg et al., 1993; Jares-Erijman und Jovin, 1996; Stühmeier et al., 1997) und die Zusammenlagerung von Makromolekülen (Kubitscheck et al., 1993) von Interesse sind. Dazu bietet FRET die einzigartige Möglichkeit, räumliche Entfernungen auf der Längenskala dieser Moleküle zu bestimmen. Für die Messung des Energietransfers zwischen einzelnen Molekülen haben Ha et al. (1996) ein optisches Nahfeldmikroskop verwendet. In ihrem Übersichtsartikel von 1989 geben Jovin und Arndt-Jovin eine ausführliche Literaturliste zu Anwendungen von FRET in der Zellbiologie. Ein weiterer Übersichtsartikel von Clegg (1996) erläutert näher die physikalischen Mechanismen von FRET mit besonderer Berücksichtigung der Anwendung von FRET in der Mikroskopie.

In diesem Abschnitt 4.2 wird die Messung von FRET über Akzeptor- und Donorbleichen (Bastiaens und Jovin, 1996; Jovin und Arndt-Jovin, 1989) im optischen Nahfeldmikroskop behandelt. Nach der Demonstration von FRET über Akzeptorbleichen von mit Farbstoffen versetzten Polymerfilmen wird Donorbleichen sowohl auf den Polymerfilmen als auch auf Zellen, deren Zellmembran mit fluoreszent markiertem Concanavalin A belegt wurde (Subramaniam et al., 1998), gezeigt. Mit diesen Messungen sind die Grundlagen für weitergehende Untersuchungen, wie zum Beispiel des Aggregationsverhaltens von Rezeptoren auf Zelloberflächen, geschaffen.

4.2.1 Experimenteller Aufbau

Für Experimente mit zwei verschiedenen Farbstoffen ist der Einsatz von zwei unterschiedlichen Anregungswellenlängen notwendig. Für die Anregung von FITC im Nahfeldmikroskop sind die blauen Linien des Ar-Kr-Mischgaslasers geeignet (siehe Spektren in Abbildung 4.12 (B)). Für Messungen an diesem Farbstoff in einem Farbstoffgemisch ist es bei großen Intensitäten günstig, die kürzerwelligen Linien (z. B. 457 nm) zu verwenden, da eine gleichzeitig auftretende Anregung des Rhodamin B bei 457 nm um etwa einen Faktor 10 kleiner ist als bei 488 nm. Für die Anregung des Rhodamin B und des bei den Zellen verwendeten TMR ist die grüne 543 nm Linie eines HeNe-Lasers gut geeignet. Um das Licht der beiden Laser gleichzeitig in das optische Nahfeldmikroskop einzukoppeln, wurden sie über einen dichroitischen Spiegel (620DRLP02, Omega Optical) kolinearisiert. Die Messungen erfolgten immer mit nur einem Laser, wobei das Licht des anderen Lasers durch einen Verschuß abgeblockt wurde. Für die zwei Anregungswellenlängen wurden unterschiedliche dichroitische Strahlteiler (Dic1; 505DRLP02 und 540DRLP, Omega Optical) verwendet.

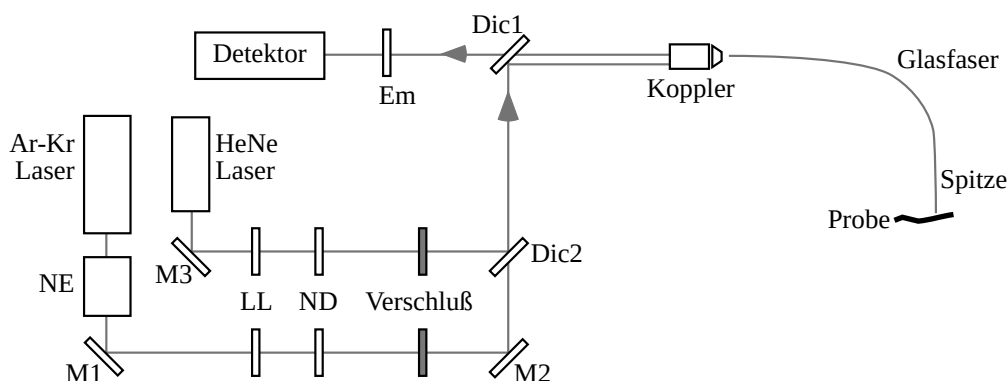


Abbildung 4.13: Optischer Aufbau zur FRET-Detektion mit zwei Lasern. Die zwei zur Fluoreszenzanregung verwendeten Laser werden über einen dichroitischen Spiegel (Dic2) vereint (M Spiegel, LL Laserlinienfilter, ND Graufilter, NE Rauschverminderer, Em Emissionsfilter).

Die Nachjustage der Einkopplung in die Glasfaser beim Wechsel zwischen den Lasern ist während eines Experimentes nicht möglich. Deshalb müssen beide Laser gleichzeitig eingekoppelt und die Einkopplung soweit möglich optimiert werden. Zunächst wird dazu die Einkopplung für einen Laser mit dem Faserkoppler optimiert. Die Einkopplung des zweiten Lasers wird dann ohne Veränderung des Faserkopplers, nur mit den externen Spiegeln (Dic2 und M3 oder M1 und M2), optimiert. Da die Messungen der Donorfluoreszenz und der sensibilisierten Akzeptorfluoreszenz über Anregung mit dem Ar-Kr-Mischgaslaser erfolgten, wurde zunächst dieser in die Glasfaser eingekoppelt und danach die Einkopplung des grünen HeNe-Lasers mit den Spiegeln M3 und Dic2 (Abbildung 4.13) optimiert. Typische Koppeleffizienzen sind 75 % für den Ar-Kr-Laser und 40 % für den HeNe-Laser. Die Emissionsfilter (Em) wurden entsprechend der Emissionsspektren der zu beobachtenden Farbstoffe (535DF35 für FITC, 590DF35 für die Rhodamine) ausgewählt. Der optische Aufbau ist in Abbildung 4.13 dargestellt.

Für das Bleichen wurde, ähnlich wie bei dem Bleichexperiment in Abbildung 4.10 auf Seite 84, der langsame Zeilenvorschub ausgeschaltet und somit die gleiche Zeile auf der Probe wiederholt abgebildet. Über den elektromechanischen Verschluß wurde die Beleuchtung so gesteuert, daß nur während einer Rasterrichtung der Laser eingekoppelt wurde. Die Spalten des sich ergebenden Bildes stellen die Bleichkurven dar, wobei die Zeilennummer der verstrichenen Belichtungszeit proportional ist.

4.2.2 Akzeptorbleichen FRET

FRET kann sehr einfach dadurch nachgewiesen werden, daß die Messung der Donorfluoreszenz mit und ohne Akzeptor durchgeführt wird. Durch den Energietransfer bei Anwesenheit von Akzeptormolekülen wird die Quantenausbeute der Donorfluoreszenz verringert. Die auf die Donorkonzentration normalisierten Fluoreszenzintensitäten sind den Fluoreszenzquantenausbeuten Q_T und Q mit und ohne Akzeptor proportional, so daß sich daraus mit Gleichung 4.6 die FRET-Effizienz berechnen läßt. Eine einfache Möglichkeit, in einem

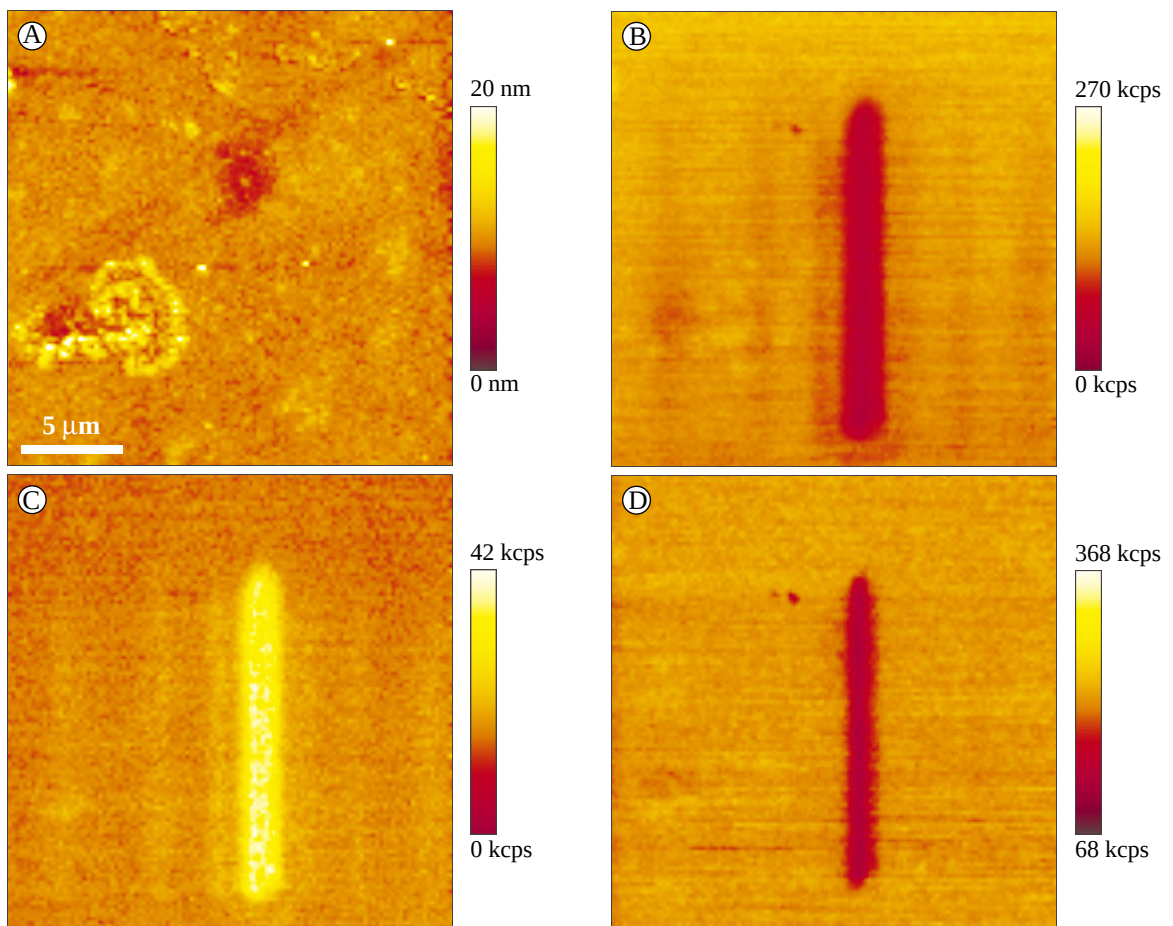


Abbildung 4.14: Nachweis von FRET über Akzeptorbleichen auf einem mit FITC und Rhodamin B versetzten PVA-Film. (A) Scherkraftmikroskopisches und (B-D) nahfeldoptische Bilder nach dem Bleichen einer Linie. Die Topographie (A) wurde nicht beeinflußt. Die Fluoreszenzbilder von (B) Rhodamin B, (C) FITC und (D) die Fluoreszenz der Probe im Emissionsbereich des Rhodamin B nach der Anregung mit blauem Licht zeigen die gebleichte Linie. Anregungsintensitäten: (B) 9.5 nW bei 543 nm, (C) und (D) 166 nW bei 488 nm. Detektion: (B) und (D) 590 ± 17 nm, (C) 535 ± 17 nm.

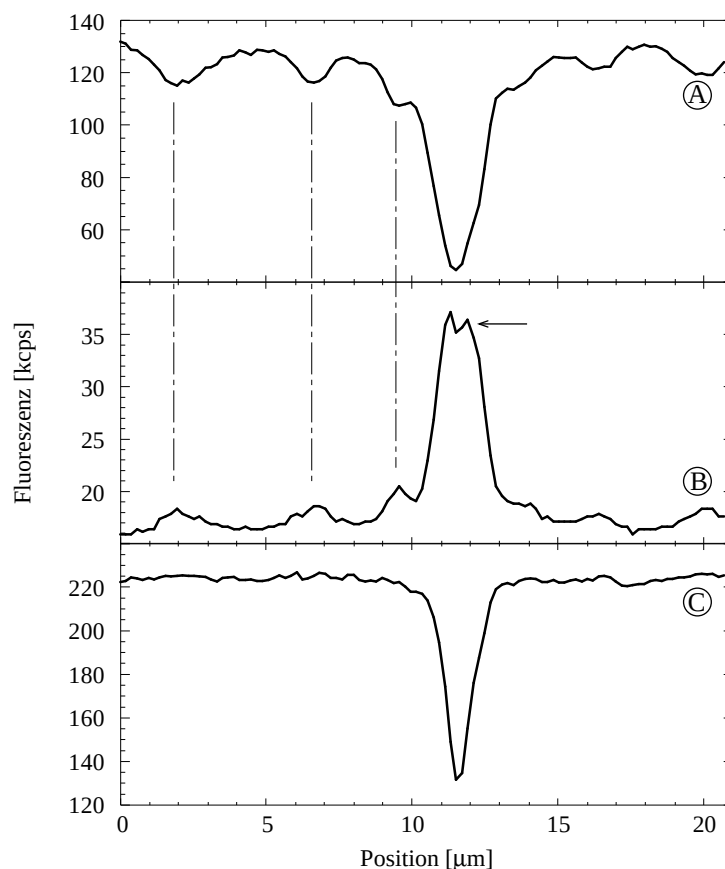


Abbildung 4.15: Verlauf der Fluoreszenzintensität normal zu der gebleichten Linie in Abbildung 4.14. Fluoreszenzintensität des (A) Akzeptors Rhodamin B (Abb. 4.14 B), des (B) Donors FITC (Abb. 4.14 C) und der (C) Emission des Rhodamin B nach Anregung bei 488 nm (Abb. 4.14 D).

Mikroskop diesen Vergleich zu machen, ist das gezielte Bleichen des Akzeptors in einzelnen Probenbereichen (Bastiaens und Jovin, 1996).

Das Ergebnis eines derartigen Experimentes ist in Abbildung 4.14 gezeigt. Als Probe wurde ein mit FITC und Rhodamin B versetzter PVA-Film verwendet, der durch Eintauchen eines frisch gespaltenen Glimmerplättchens in die wässrige PVA/Farbstoff-Lösung hergestellt wurde. In einer einzelnen Zeile wurde der Akzeptor durch etwa 100maliges Bleichen mit hoher Intensität ($3 \mu\text{W}$ bei 543 nm) gebleicht. In dem danach mit 9.5 nW bei 543 nm aufgenommenen Akzeptorbild 4.14 (B) ist die gebleichte Linie mit einer Reihe von Seitenlinien zu sehen. Dem Profil (Abbildung 4.15 A) durch diese Struktur entnimmt man, daß die Seitenlinien 2, 5 und 8.5 bzw. $9.5 \mu\text{m}$ von der mittleren Linie entfernt sind. Die Struktur selbst ist nicht symmetrisch. Die Seiten unterscheiden sich sowohl in den Amplituden der Linien als auch in den Positionen der äußeren Linien (links: $9.5 \mu\text{m}$, rechts: $8.5 \mu\text{m}$). Dies deutet auf eine Asymmetrie der verwendeten Glasfaserspitze hin. Das Profil wurde aus der Mittelung entlang der Linie, ohne die Randpunkte, gewonnen. Derartige Sei-

tenlinien sind auch bei der Belichtung von Photolacken mit dielektrischen Faserspitzen zu beobachten. Wenn eine Gaußkurve an die mittlere Linie numerisch angepaßt wird, erhält man eine Breite (2σ) von $1.6 \mu\text{m}$.

Im Fluoreszenzbild des Donors in Abbildung 4.14 (C) sieht man die gleiche Struktur wie im Akzeptorfluoreszenzbild. Allerdings erscheinen nun die Bereiche, in denen der Akzeptor gebleicht wurde, heller. Am Profil in Abbildung 4.15 (B) sieht man, daß die Positionen der Seitenlinien den Positionen der im Akzeptorbild gefundenen Seitenlinien entsprechen (vertikale strichpunktierte Linien). Die etwa $1.5 \mu\text{m}$ breite mittlere Linie zeigt in der Mitte noch ein Fluoreszenzminimum (Pfeil in Abbildung 4.15).

Nach der Anregung der Probe mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm und der Detektion in dem Spektralbereich, in dem im wesentlichen der Akzeptor emittiert, ergibt sich das in Abbildung 4.14 (D) gezeigte Bild. Es ist nur noch die zentrale Linie zu sehen, Seitenlinien sind nicht zu erkennen, und die zentrale Linie ist schmaler als in den Donor- oder Akzeptorfluoreszenzbildern. Dem Profil in Abbildung 4.15 (C) kann man eine Breite von $1.0 \mu\text{m}$ für diese Linie entnehmen. Das in diesem Bild aufgezeichnete Signal setzt sich aus der sensibilisierten Fluoreszenz des Rhodamin B, der Fluoreszenz nach der direkten Anregung des Rhodamin B durch blaues Licht und der Fluoreszenz des FITC in diesem Spektralbereich zusammen.

4.2.3 Donorbleichen FRET auf PVA-Filmen

Eine weitere Möglichkeit, FRET nachzuweisen, ist die Aufzeichnung von Bleichkurven des Donorfarbstoffes (Jovin und Arndt-Jovin, 1989). Wie schon in Verbindung mit den Bleichkurven auf den Langmuir-Blodgett-Filmen gezeigt, ist die Fluoreszenzquantenausbeute der Zeitkonstanten der Bleichkurve τ_B umgekehrt proportional (Gleichung 4.2). Mißt man die Bleichkonstante mit (τ_{BT}) und ohne Akzeptor (τ_B), ergibt sich die FRET-Effizienz entsprechend Gleichung 4.6 zu

$$E = 1 - \frac{\tau_B}{\tau_{BT}}$$

In der Abbildung 4.16 (A) sind die Bleichkurven für einen mit FITC und Rhodamin B (durchgezogene Linie) beziehungsweise für einen nur mit FITC (gestrichelte Linie) versetzten PVA-Film gezeigt. Das Bleichen wurde mit einer Leistung von $9 \mu\text{W}$ mit der 457 nm Linie des Ar-Kr-Lasers vorgenommen. Es wurde die 457 nm Linie verwendet, um möglichst wenig Akzeptormoleküle direkt anzuregen. Es ist eindeutig eine schnellere Abnahme der Donoremission auf dem Film ohne Akzeptor zu sehen.

Dieses einfache Bleichverhalten tritt allerdings nur bei niedrigen Farbstoffkonzentrationen auf. Zum Vergleich ist in Abbildung 4.16 (B) die Donorbleichkurve für einen PVA-Film gezeigt, der sowohl Donor als auch Akzeptor in einer dreifach höheren Konzentration enthält. Bei diesem Film nahm zunächst die Donoremission zu, um nach einer gewissen Zeit wieder abzunehmen. Durch Erhöhen der Farbstoffkonzentration wird der mittlere Abstand zwischen Donor- und Akzeptormolekülen verringert, so daß die FRET-Effizienz zunimmt. Anfangs wird somit die Donorfluoreszenz stark durch die Akzeptoren gelöscht. Die von den Akzeptoren aufgenommene Energie führt allerdings dazu, daß diese ausbleichen und dadurch ihre Konzentration abnimmt. Damit nimmt die Transfereffizienz ab und die Donoremission zu. Nach einer gewissen Zeit überwiegt das Bleichen der Donoren, so daß die Donorfluoreszenz wieder abnimmt. Derartige durch den Donor sensibilisierte photochemische Reaktionen des Akzeptors können genutzt werden, sehr geringe Energietransfereffizienzen nachzuweisen (Mekler, 1994).

Man kann dieses Phänomen mit dem in Abbildung 4.17 skizzierten Modell qualitativ simulieren. Dabei geben n_x und n_x^* die Konzentration von Donor ($x = D$) bzw. Akzeptor ($x = A$) im Grund- und angeregten Zustand an. Die Reaktionskonstanten k_{xE} , k_{xF} , k_{xD} und k_{xBL} gelten für die Anregung, die Fluoreszenzemission, nichtstrahlende Relaxationsprozesse und Bleichreaktionen. Es sind immer Prozesse erster Ordnung angenommen.

In diesem Modell interessiert insbesondere die Abhängigkeit der Energietransferegeschwindigkeitskonstante k_T von der Konzentration der Akzeptoren im PVA-Film. Um ein

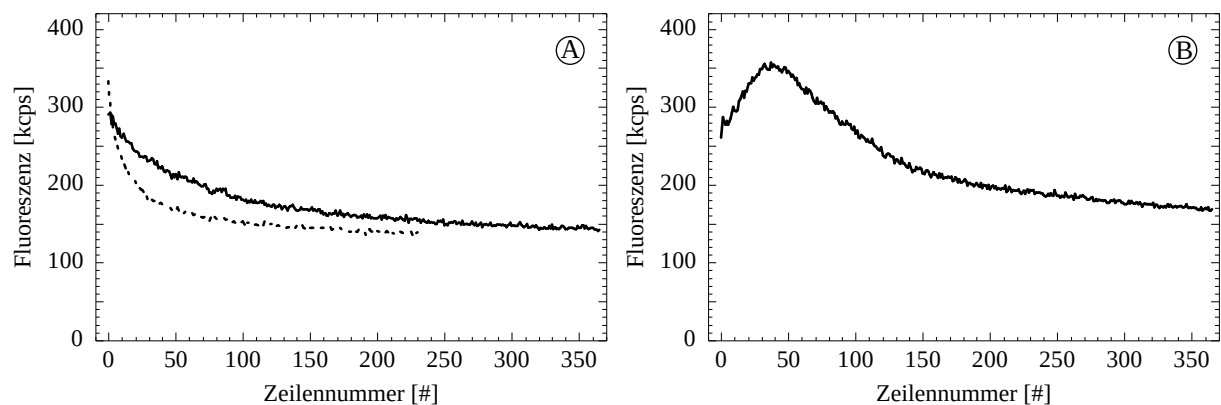


Abbildung 4.16: Nachweis von FRET über die Bleichkinetik des Donors auf PVA-Filmen. (A) Vergleich der FITC-Bleichkinetiken auf einem nur mit FITC (gestrichelt) und einem mit FITC und Rhodamin B im Verhältnis 1:2 (durchgezogen) versetzten Film. (B) FITC-Bleichkurve eines mit einer höheren Konzentration von FITC und Rhodamin B im Verhältnis 1:2 versetzten PVA-Films. Die Konzentration betrug etwa das Dreifache von der des Films mit Farbstoffgemisch in (A). Anregungsintensität: $9 \mu\text{W}$ bei 457 nm .

qualitatives Ergebnis zu erhalten, kann man entweder den Abstand R über den Abstand nächster Nachbarn der Farbstoffmoleküle im Film annähern, oder die Reaktionskonstante über die Fluoreszenzausbeute ausdrücken. Bei diesen Ausdrücken für k_T wird allerdings vernachlässigt, daß nicht alle Akzeptormoleküle im PVA-Film statistisch gleichverteilt bleiben, sondern daß die Akzeptormoleküle mit einem geringeren Abstand zu einem Donormolekül schneller ausbleichen sollten.

Wenn der Einfachheit halber angenommen wird, daß die Verteilung der Akzeptoren durch ein Würfelgitter angenähert werden kann, dann ist die Konzentration $c = 1/R^3$. Damit kann k_T nach der Gleichung 4.4 durch c/c_0 ausgedrückt werden:

$$k_T = \frac{1}{\tau_L} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 = \frac{1}{\tau_L} \frac{9}{4\pi^3} \left(\frac{c}{c_0} \right)^2 \quad (4.9)$$

Die zweite Möglichkeit, k_T darzustellen, geht von den Fluoreszenzausbeuten $Q_T = k_{DF}/(k_{DF} + k_{DD} + k_{DBL} + k_T)$ mit Akzeptor und $Q = k_{DF}/(k_{DF} + k_{DD} + k_{DBL})$ ohne Akzeptor aus. Die Reaktionsrate des Energietransfers ergibt sich zu

$$k_T = \left(\frac{Q}{Q_T} - 1 \right) \frac{k_{DF}}{Q} = \frac{\sqrt{\pi} c/c_0 \exp(c^2/c_0^2) [1 - \Phi(c/c_0)]}{1 - \sqrt{\pi} c/c_0 \exp(c^2/c_0^2) [1 - \Phi(c/c_0)]} \frac{1}{\tau_L}, \quad (4.10)$$

wobei das Verhältnis der Fluoreszenzausbeuten entsprechend der Gleichung 4.7 eingesetzt wurde.

Das Differentialgleichungssystem für das Modell aus Abbildung 4.17 setzt sich aus den folgenden 4 Differentialgleichungen für die einzelnen beteiligten Spezies zusammen:

$$\frac{d n_D^*}{dt} = k_{DE} n_D(t) - (k_{DF} + k_{DD} + k_{DBL}) n_D^*(t) - k_T (n_A(t)) n_D^*(t)$$

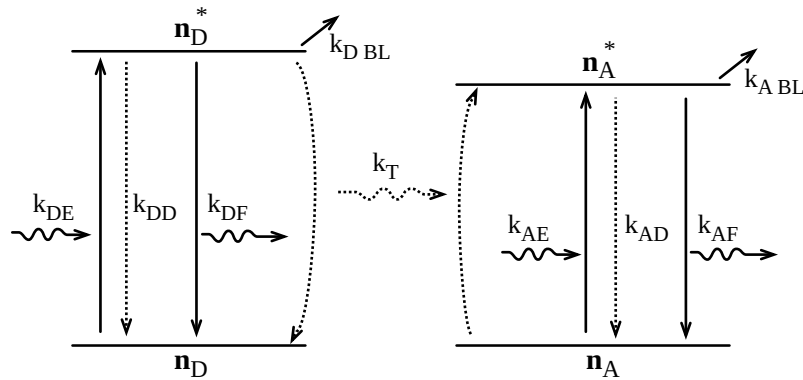


Abbildung 4.17: Modell zur Simulation der Kinetik des Donorbleichens mit Energietransfer (Für die Bezeichnungen siehe Text).

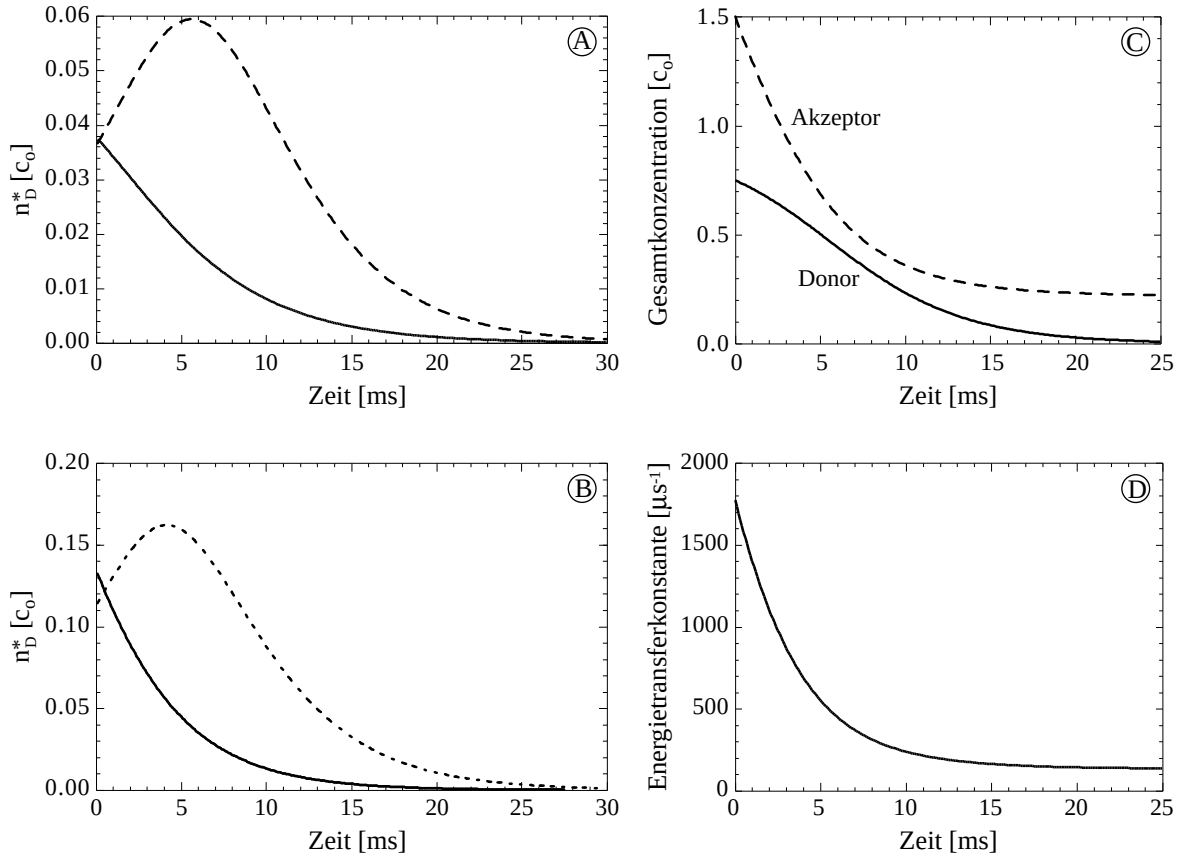


Abbildung 4.18: Simulation der Bleichkinetik des Donors mit Energieübertrag auf einen bleichbaren Akzeptor. (A) und (B): zeitlicher Verlauf der Konzentration des angeregten Donors bei niedriger (durchgezogen) und hoher (gestrichelt) Anfangskonzentration mit der Transferrate berechnet nach Gleichung 4.10 (A) bzw. Gleichung 4.9 (B). Gesamtkonzentration von ungebleichtem Donor und Akzeptor (C) und Energietransferkonstante (D) zu der Bleichkinetik bei hoher Konzentration in (A).

$$\begin{aligned}
 \frac{d n_D}{dt} &= -k_{DE} n_D(t) + (k_{DF} + k_{DD}) n_D^*(t) + k_T(n_A(t)) n_D^*(t) \\
 \frac{d n_A^*}{dt} &= k_{AE} n_A(t) - (k_{AF} + k_{AD} + k_{ABL}) n_A^*(t) + k_T(n_A(t)) n_D^*(t) \\
 \frac{d n_A}{dt} &= -k_{AE} n_A(t) + (k_{AF} + k_{AD}) n_A^*(t) - k_T(n_A(t)) n_D^*(t)
 \end{aligned}$$

wobei für $k_T(n_A(t))$ entweder die Reaktionsrate aus Gleichung 4.9 oder aus Gleichung 4.10 mit $n_A(t) = c(t)/c_0$ verwendet werden kann. In Abbildung 4.18 sind die Ergebnisse einer Simulation dieses Systems gezeigt. Für die Zeitkonstanten der einzelnen Prozesse wurde gewählt: $\tau_{DF} = \tau_{AF} = 5$ ns, $\tau_{DD} = \tau_{AD} = 10$ ns, $\tau_{DBL} = \tau_{ABL} = 1$ μs , $\tau_{DE} = 10$ μs und $k_{AE} = 0$. In 4.18 (A) und (B) ist jeweils der zeitliche Verlauf der Konzentrationen

von n_D^* für zwei verschiedene Ausgangskonzentrationen dargestellt, wobei das Verhalten des Systems mit der dreifachen Anfangskonzentration durch die gestrichelte Linie dargestellt ist. In (A) wurde die Energietransferrate nach Gleichung 4.10 berechnet, wobei die Anfangskonzentration des Akzeptors $n_A(0)$ das 0.5 bzw. 1.5 fache der kritischen Konzentration $c_0 = 3/(2\sqrt{\pi^3}R_0^3)$ betrug. In (B) wurde k_T nach der Gleichung 4.9 berechnet. Für die Simulation in (B) wurde das 1.2 bzw. 3.6fache der kritischen Konzentration als Anfangskonzentration eingesetzt. In beiden Fällen wird das qualitativ gleiche Verhalten wie im Experiment erzeugt.

Für das Modell, in dem k_T nach der Gleichung 4.10 berechnet wurde, ist in Abbildung 4.18 (C) der Verlauf der Gesamtkonzentrationen von Akzeptor und Donor über der Zeit gezeigt. Damit ist die erste Vermutung bestätigt, nach der zunächst der Akzeptor und dann der Donor ausgebleicht wird. Die gleichzeitig auftretende Energietransferkonstante $k_T(t)$ ist in (D) dargestellt. Sie nimmt, wie aufgrund der starken Abhängigkeit von der Entfernung zwischen den Energietransferpartnern zu erwarten war, mit dem Bleichen des Akzeptors sehr schnell ab.

4.2.4 Donorableichen FRET auf Zellen

Ein Bereich der Zellbiologie, in dem der Abstand zwischen zwei Molekülen sehr wichtig ist, ist die Signalübermittlung über die Zellmembran durch Rezeptortyrosinkinasen (RTK). Dies sind Transmembranproteine, und die Bindung von Liganden an der Außenseite führt zu einer Dimersierung der Kinasen, die zur Signalerzeugung im Zellinneren führt (Alroy und Yarden, 1997). Dabei kann die wichtige Frage, wann die Rezeptoren sich paaren, sehr gut mittels FRET untersucht werden. Die Zahl der Rezeptoren auf der Zelloberfläche kann im Bereich zwischen 500 und 100 000 liegen. Als ein erstes einfaches System wurde die Verteilung des Pflanzenlektins Concanavalin A (conA) nach der Bindung an die Zellmembran untersucht. Es bindet an α -Methylmannosid, einen Zucker, der Bestandteil einiger Glycoproteine und Glycolipide in den Membranen von Säugetierzellen ist und damit eine sehr große Zahl von Bindungsstellen für conA auf der Zelloberfläche anbietet.

Es wurden auf Deckgläsern aufgewachsene 3T3 Balb/c Zellen mit kovalent mit Fluorescein (F-conA) beziehungsweise mit Tetramethylrhodamin (TMR-conA) verbundenem conA markiert. Zum Vergleich wurden neben den Zellen, die mit einer Mischung der zwei conA Varianten im Verhältnis 1:2 (F-conA:TMR-conA) markiert wurden, auch Proben mit F-conA und einem unmarkierten conA im Verhältnis 1:2 präpariert. In Abbildung 4.19 (A) und (B) sind die Scherkrafttopographie und das Fluorescein-Fluoreszenzsignal einer mit

F-conA markierten Vergleichszelle zu sehen. Um die flachen Strukturen trotz der großen Dickenunterschiede ($1.3\ \mu\text{m}$) dieser Zellen gut sichtbar zu machen, wurde ein Anteil des gleichzeitig aufgezeichneten Regelsignals zur Topographie addiert. Dies führt dazu, daß die Zelle im topographischen Bild von rechts beleuchtet erscheint. Im Fluoreszenzbild 4.19

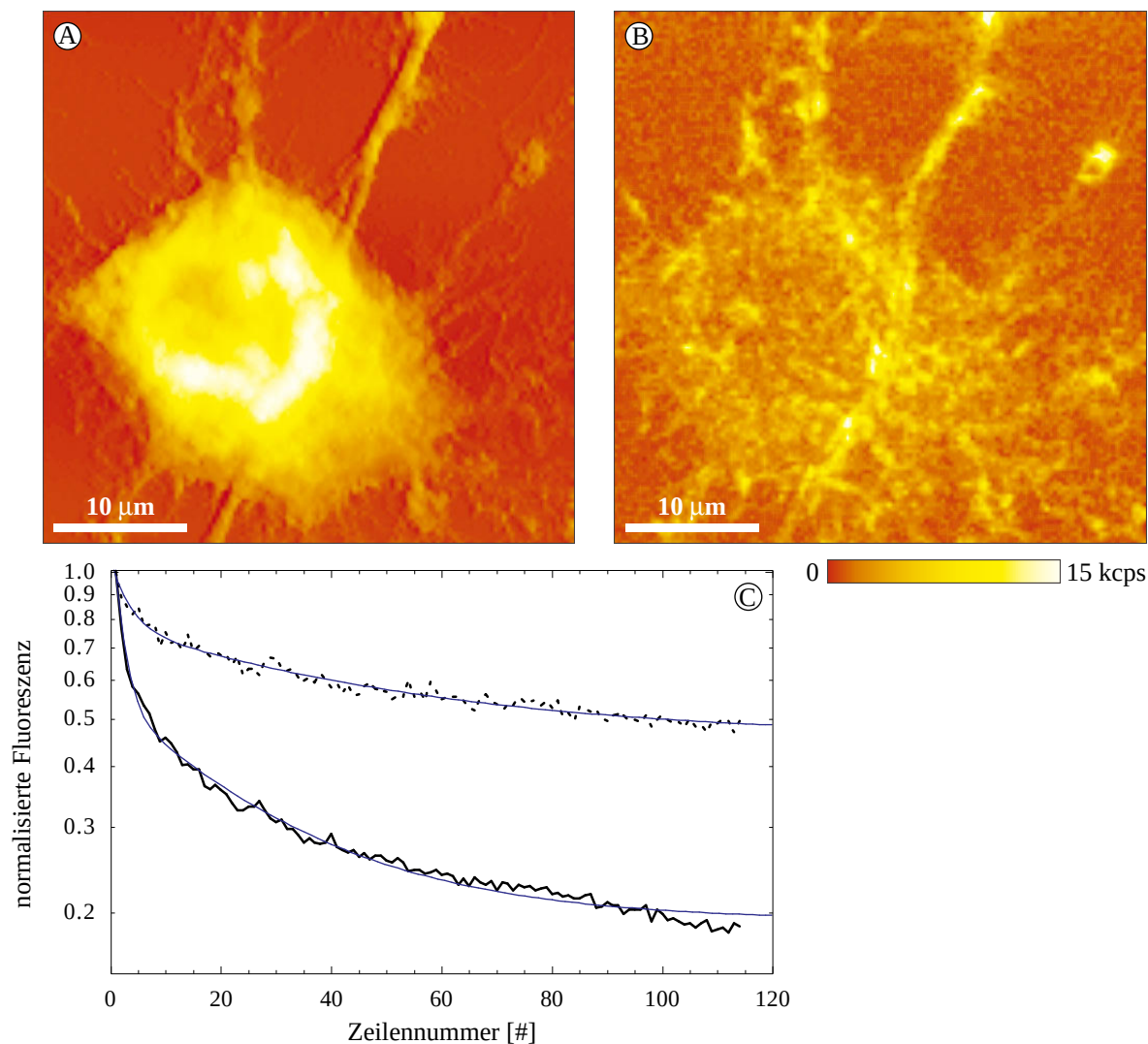


Abbildung 4.19: FRET-Nachweis über die Bleichkinetik des Donors auf 3T3 Balb/c Zellen deren Zellmembran mit fluorescent markiertem Concanavalin A bedeckt wurde. (A) Topographisches Bild einer typischen Zelle auf einem Deckglas. Zur besseren Darstellung wurden die Kanten betont. (B) Nahfeldoptische Aufnahme der F-conA Fluoreszenz. (C) Logarithmisch aufgetragene Donorbleichkinetiken einer nur mit F-conA (durchgezogen) und einer mit F-conA und TMR-conA im Verhältnis 1:2 (gestrichelt) bedeckten Zelle. Die durchgezogenen Linien sind die Graphen numerisch angepaßter doppeltexponentieller Kurven. Anregungsintensitäten: (B) 300 nW bei 488 nm, (C) $1.7\ \mu\text{W}$ bei 488 nm

(B) sieht man eine granulare Struktur der Fluoresceinemission, was auf eine inhomogene Verteilung der Glycoproteine hinweist.

Aus der Inhomogenität des Fluoreszenzsignals folgt für Donorbleichexperimente, daß die Messung nur in kleinen Probenbereichen gemacht werden kann, in denen conA gebunden hat. Deshalb wurde hier, anstatt wie im Falle der PVA-Filme über die ganze Zeile zu mitteln, aus den gebleichten Linien jeweils immer nur helle Bereiche von wenigen Mikrometern Breite ausgewählt, anhand derer die Bleichkurven bestimmt wurden. In Abbildung 4.19 (C) sind die auf eins normalisierten Bleichkurven für eine nur mit F-conA (durchgezogene Kurve) und eine mit F-conA und TMR-conA im Verhältnis 1:2 (gestrichelte Linie) belegte Zelle gezeigt. Sie wurden mit der gleichen Spitze bei gleicher Anregungsintensität aufgenommen. Die Kurve ohne TMR als Akzeptor entstand aus der Mittelung über sieben helle Strukturen, die Kurve mit TMR aus sechs hellen Strukturen. Man sieht deutlich, daß die Fluorescein-Fluoreszenz der mit beiden Farbstoffen markierten Zelle deutlich langsamer abnimmt als die der anderen Zelle. Die durchgezogenen Linien sind die Graphen von numerisch angepaßten doppelt exponentiellen Kurven. Das Verhältnis der jeweiligen Bleichkonstanten beträgt 1.8. Daraus ergibt sich mit Gleichung 4.6 eine gemittelte Energietransfereffizienz von etwa 45 %.

4.2.5 Diskussion

Die Detektion des Energietransfers zwischen zwei Chromophoren eröffnet der optischen Mikroskopie den Längenbereich von 1 bis 10 nm. In diesem Abschnitt 4.2 wurde der Energieübertrag sowohl durch den Vergleich von Probenbereichen mit und ohne Akzeptor als auch durch seine Auswirkung auf die Bleichkurven des Donors im optischen Nahfeldmikroskop nachgewiesen.

Der Vergleich der Donorfluoreszenz mit und ohne Akzeptor wurde durch Ausbleichen des Akzeptors in einer einzelnen Linie durchgeführt. Interessanterweise unterschied sich die Form der in den Fluoreszenzbildern des Donors und des Akzeptors gefundenen Linien von der Form der Linie im Bild der sensibilisierten Emission des Akzeptors (Abbildung 4.15). Die Fluoreszenzbilder stellen das Produkt aus Farbstoffkonzentration und Fluoreszenzquantenausbeute dar. Da es keinen Grund dafür gibt, eine Variation in der Fluoreszenzquantenausbeute des Akzeptors zu vermuten, spiegelt das Akzeptorfluoreszenzbild weitgehend die Verteilung des Rhodamin B wieder. Im Gegensatz dazu variiert aufgrund des Energietransfers die Fluoreszenzquantenausbeute des Donors. Die breite zentrale Linie und die Seitenlinien sind insofern aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit dem Fluoreszenzbild des

Akzeptors auf Variationen in der Quantenausbeute zurückzuführen. Die Abweichung davon, das Minimum im Fluoreszenzsignal in der Mitte der zentralen Linie deutet dahingegen auf ein Bleichen des Donors hin.

Das Signal, welches nach der Anregung mit blauem Licht in dem Spektralbereich der Hauptemission des Akzeptors liegt, setzt sich aus drei Anteilen zusammen. Dies ist erstens die Fluoreszenz des Donors, die entsprechend dem Emissionsspektrum (Abbildung 4.12 B) etwa ein Siebtel der im Donorfluoreszenzbild detektierten Intensität beträgt, zweitens die Fluoreszenz, die sich nach der direkten Anregung des Akzeptors mit blauem Licht ergibt und drittens die sensibilisierte Fluoreszenz des Akzeptors. Aus den Zählraten erkennt man, daß der Beitrag der Donorfluoreszenz vernachlässigt werden kann. Der Beitrag der direkten Anregung des Akzeptors sollte ein dem Akzeptorfluoreszenzbild ähnlichen Beitrag liefern. Da die Seitenlinien jedoch nicht sichtbar sind und die zentrale Linie schmaler ist, muß man schließen, daß auch dieser Beitrag zum Signal vernachlässigbar ist. Die Intensität der sensibilisierten Fluoreszenz ist dem Produkt aus Donordichte, Energietransfereffizienz und Fluoreszenzquantenausbeute des Akzeptors proportional. Aus dem Linienprofil muß man schließen, daß in diesem Fall die Variation der Donordichte den wesentlichen Teil der Modulation des Fluoreszenzsignals ausmacht. Die Unterschiede in der Energietransfereffizienz, die im Donoremissionsbild zu sehen waren, ergeben, verglichen mit den Zählraten der sensibilisierten Fluoreszenz, so kleine Variationen in der Zählrate, daß diese im Hintergrundsignal untergehen.

Als zweite Möglichkeit, FRET nachzuweisen, wurden Bleichkurven für den Donor mit und ohne Akzeptor aufgenommen. Insbesondere für gefärbte PVA-Filme mit einer statistischen Verteilung der Farbstoffmoleküle können diese Bleichkurven mit einem einfachen Modell simuliert werden. Wenn die Bleichkurven für andere Systeme wie z. B. fluoreszent markierte Zellmembranen simuliert werden sollen, so ist ein Modell für die geometrische Anordnung der Farbstoffmoleküle zur Bestimmung der Energietransferrate notwendig (siehe z. B. Kubitscheck et al., 1993). Insbesondere kann man nicht davon ausgehen, daß die Bleichkurven einen exponentiellen Verlauf annehmen, so daß die hier numerisch angepaßten Kurven nur als eine Möglichkeit der Beschreibung der Kurvenform zu verstehen sind.

Eine weitere Nachweismöglichkeit für den Energietransfer und seine quantitative Bestimmung in einem optischen Nahfeldmikroskop ist die Messung der Fluoreszenzlebensdauer $(1/\tau_L + k_T)^{-1}$. Der Vergleich dieser Daten mit Daten, die aus den Bleichexperimenten gewonnen werden, ist besonders interessant, da die Messungen auf sehr verschiedene Zeitskalen durchgeführt werden. Während die Fluoreszenzlebensdauern im Nanosekundenbe-

reich liegen, verläuft das Bleichen auf Zeitskalen von Milisekunden bis Minuten (Hirschfeld, 1976).

4.3 Fluoreszenz-Nahfeldmikroskopie an GFP in Zellen

In diesem Abschnitt über Fluoreszenz-Nahfeldmikroskopie werde ich den Einsatz einer speziellen Farbstoffgruppe besprechen: die grün fluoreszierenden Proteine. Sie werden nach dem englischen *green fluorescent protein* als GFPs bezeichnet. Neben dem Wildtyp werden heutzutage auch eine Reihe von Mutanten des natürlich in der Qualle *Aequorea victoria* vorkommenden, mit 238 Aminosäuren (27 kDa) recht kleinen Proteins, verwendet. In *A. victoria* dient es dazu, die blaue Chemilumineszenz des *Aequorin* in grünes Licht umzuwandeln. Der Energieübertrag erfolgt im wesentlichen strahlungslos (Kendall und Badminton, 1998), wobei in den Photocyten von *A. victoria* die Proteine in ausreichend hoher Konzentration vorliegen, so daß keine kovalente Bindung zwischen dem *Aequorin* und GFP notwendig ist (Morise et al., 1974). Das Absorptions- und Emissionsspektrum des natürlich vorkommenden GFP ist in Abbildung 4.20 dargestellt. Heute sind das GFP und seine Mutanten wichtige fluoreszente Markermoleküle in der Zell-, Entwicklungs- und Molekularbiologie (Cubitt et al., 1995; Chalfie, 1995).

Wichtige Schritte bei der Erforschung des GFP, die zu seiner heutigen Bedeutung geführt haben, waren die Klonierung (Prasher et al., 1992) und heterologe Expression (Chalfie et al., 1994; Cubitt et al., 1995) der *gfp* cDNA. Künstliche Mutagenese des in *A. victoria* vorkommenden GFP führte dazu, daß Varianten des Proteins mit anderen optischen Eigenschaften, wie zum Beispiel einem vereinfachten Absorptionsspektrum, nun zur

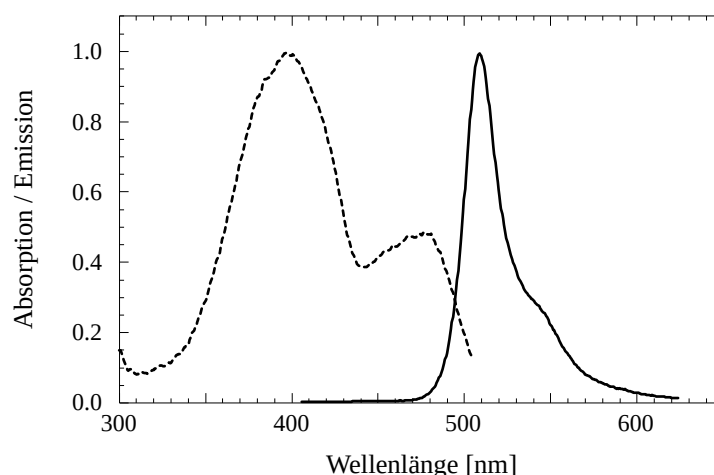


Abbildung 4.20: Absorptionsspektrum (gestrichelt) und Emissionsspektrum (durchgezogen) des natürlich in *A. victoria* vorkommenden GFPs. Anregung der Emission mit 400 nm.

Verfügung stehen. Das interessante an den Mutationen mit Einfluß auf die optischen Spektren ist, daß sowohl Mutationen am Chromophor (Aminosäuren 64-69) als auch Mutationen an bezüglich der Primärstruktur weit entfernten Stellen (z. B. Aminosäuren 167, 203, 222) vorkommen. Nach der Aufklärung der Kristallstruktur des natürlich vorkommenden GFP (wtGFP) durch Yang et al. (1996a) und der Mutante S65T durch Ormö et al. (1996) konnte das Ergebnis vieler dieser Mutationen erklärt werden. Durch die Kenntnis der Struktur sind auch zielgerichtete Mutationen bestimmter Aminosäuren möglich geworden, die weitergehende Veränderungen der optischen Eigenschaften nach sich ziehen (Ormö et al., 1996). Eine weitere wichtige Erkenntnis ist, daß in Fusionsproteinen das GFP in der Regel seinen fluoreszenten Charakter beibehält und oftmals auch die ursprüngliche Funktionalität des Fusionspartners unverändert erhalten bleibt (Cubitt et al., 1995). Durch diese Fusionsproteine ist es möglich, mittels GFP die Produktion und den Aufenthaltsort bzw. die Funktion von Proteinen nachzuweisen, ohne sie aufwendig zu extrahieren, markieren, reinigen und anschließend wieder in Zellen mikroinjizieren zu müssen.

In diesem Abschnitt 4.3 werden Messungen mit dem Fluoreszenz-Nahfeldmikroskop an Zellen, die GFP produzieren, gezeigt. Dabei wurden die relativ zu wtGFP rotverschobenen Mutanten S65T (Heim et al., 1995), RSGFP (RSGFP4 von Delagrave et al., 1995) und EYFP (von D. Piston, Vanderbilt University, Nashville, TN, zur Verfügung gestellt) eingesetzt, wobei EYFP ähnliche Spektren wie die 10c Mutante von Ormö et al. (1996) hat. Zusätzlich wurde eine GFP-Variante eingesetzt, die speziell für die Expression in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* optimiert ist. Außerdem werden Bilder von *chinese hamster ovary*-Zellen (CHO-Zellen) gezeigt, die ein Fusionsprotein aus dem ErbB-1 Rezeptor und EGFP expremieren. Teile der hier gezeigten Ergebnisse wurden schon in den zwei Artikeln (Subramaniam et al., 1997) und (Subramaniam et al., 1998) veröffentlicht. Außerdem haben Tamiya et al. (1997) und Muramatsu et al. (1996a) Bilder von wtGFP expremierenden *E.coli*-Bakterien gezeigt, die mit einem optischen Nahfeldmikroskop mit gebogenen Faserspitzen aufgenommen wurden. Bevor ich auf die nahfeldmikroskopischen Ergebnisse eingehe, werden kurz noch einige Eigenschaften des GFP zusammengefaßt.

4.3.1 Das *Green Fluorescent Protein* (GFP)

Die Primärstruktur des aus 238 Aminosäuren bestehenden wtGFP mit einigen natürlich vorkommenden Mutationen ist zum Beispiel bei Chalfie (1995) zu finden. Der Chromophor wird aus der Aminosäuresequenz -Phe-Ser-Tyr-Gly-Val-Gln- an den Stellen 64 bis 69 gebildet. Die Aminosäurekette Ser65 bis Gly67 ist in Abbildung 4.21 skizziert. Ein wahr-

scheinlicher Reaktionsweg zur Bildung des Chromophors beinhaltet die Zyklisierung des Gly67 an das Ser65 und eine anschließende Oxidation des Tyr66 (Heim et al., 1994). Das Tyr66 im Chromophor kann sowohl in protonierter (Abb. 4.22 links) als auch deprotonierter Form (Phenolat; Abb. 4.22 rechts) vorliegen, wobei diese Formen für die Absorption des wtGFP bei 395 bzw. 475 nm (Abbildung 4.20) verantwortlich sind (Heim et al., 1994). Da das Phenol im angeregten Zustand eine stärkere Säure als im Grundzustand ist, stammt die Emission wahrscheinlich ausschließlich von der deprotonierten Form (Heim et al., 1994). Derartige Deprotonierungsreaktionen im angeregten Zustand wurden von Förster (1950) näher untersucht.

Aus den Kristallstrukturanalysen des GFP (Ormö et al., 1996; Yang et al., 1996a) ergibt sich, daß das Protein eine Tertiärstruktur einnimmt, die als „ β -can“ bezeichnet wird (Abbildung 4.23). Sie besteht aus 11 β -Strängen (helle Bänder), die eine α -Helix (dunkelgrau) mit dem Chromophor in der Mitte (Stabmodell) umgeben. Oben und unten ist die β -can von kurzen Aminosäuresträngen abgeschlossen, so daß der Chromophor sehr effektiv von der Umgebung abgeschirmt ist. Die sehr dichte Packung der β -can und die Abschirmung erklärt die Stabilität des Proteins gegen Denaturierung und die Unabhängigkeit der Fluoreszenz von äußeren Parametern wie z. B. dem Säuregrad (Patterson et al., 1997). Außerdem wird aus dieser Struktur verständlich, warum sich auch Mutationen, die bezüglich der Primärstruktur weit entfernt sind, sich dennoch auf die optischen Eigenschaften auswirken, da die β -Stränge immer wieder sehr nahe an dem Chromophor vorbeilaufen.

Ein Problem bei der Expression vieler GFP-Varianten einschließlich des Wildtyps ist, daß sie nach der Translation nicht immer eine korrekte Faltung und Bildung des Chromophors durchlaufen. So sind z. B. in *E.coli*-Bakterien wtGFP-Proteineinschlüsse zu beobachten, die nicht-fluoreszentes Protein enthalten (Heim et al., 1994). Außerdem erfolgt die korrekte Faltung vielfach am besten bei 20° C. Höhere Temperaturen wie z. B. 37° C

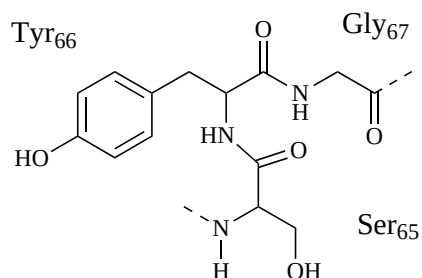


Abbildung 4.21: Chemische Struktur der Aminosäuresequenz -Ser65-Tyr66-Gly67- aus der der Chromophor des GFP gebildet wird.

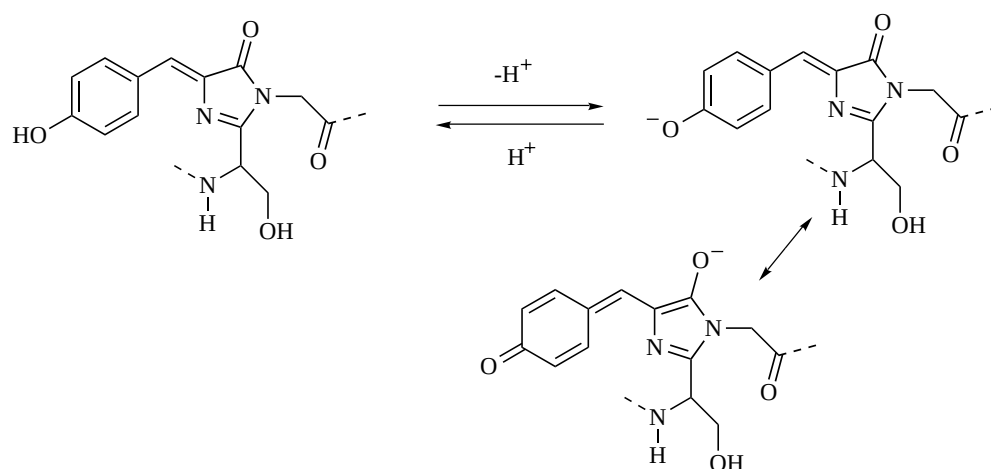


Abbildung 4.22: Struktur des Chromophors von GFP nach der Zyklisierung. Er kann in einer protonierten (links) und in einer deprotonierten Form (rechts) vorliegen. Für das Phenolat gibt es zwei mesomere Formen.

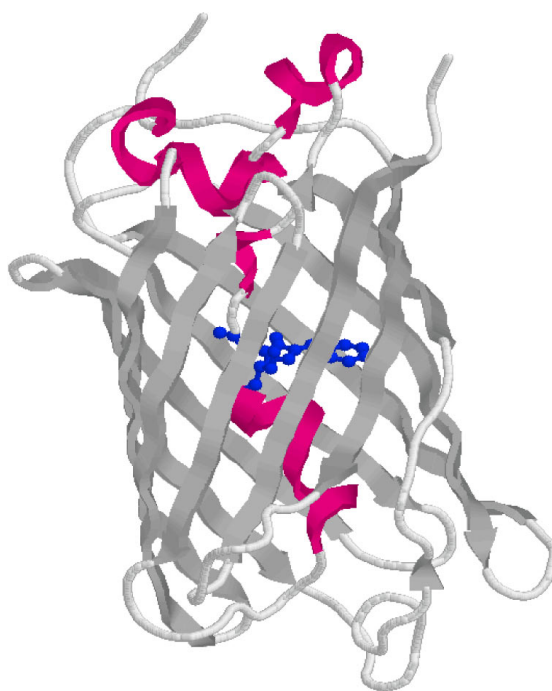


Abbildung 4.23: Schematische Zeichnung der Struktur des GFP nach den Daten von Yang et al. (1996a), erstellt mit dem Programm RasMOL (von R. Sayle, 1995). 11 β -Stränge (hellgraue Bänder) bilden einen Zylinder um eine α -Helix (dunkelgrau), die den Chromophor (Stabmodell) enthält.

führen bei wtGFP dazu, daß nur 25% des erzeugten Proteins auch eine fluoreszente Form einnimmt. Dies kann durch Mutationen und Optimierung der auf DNA-Ebene verwendeten Codons verbessert werden (Patterson et al., 1997).

Das größte Interesse an Mutationen des wtGFP gilt aber den Variationen der optischen Eigenschaften. Wie in Abbildung 4.20 gezeigt, besitzt wtGFP zwei Absorptionsmaxima bei 395 und 475 nm und emittiert bei 508 nm. Ein derartig breites Absorptionsspektrum, zusammen mit einer Photokonversion, die bei Bestrahlung des wtGFP mit Licht von 488 nm Wellenlänge zunächst zu einer Zunahme der Fluoreszenz führt (Patterson et al., 1997), machen den gleichzeitigen Einsatz mit anderen Farbstoffen oder quantitative Fluoreszenzmikroskopie schwierig.

Mutanten mit veränderten optischen Eigenschaften können relativ einfach dadurch erhalten werden, daß nach einer zufälligen Mutagenese diejenigen Klone ausgewählt werden, deren Anregungs- und Emissionsspektren, Stabilität gegenüber Bleichreaktionen, Absorptionskoeffizienten oder Quanteneffizienzen verändert sind (Heim et al., 1994). Alternativ können, ausgehend von den bekannten Kristallstrukturen, gezielt Mutationen vorgenommen werden, von denen veränderte Spektren erwartet werden (Ormö et al., 1996). Inzwischen wurde sowohl die gleichzeitige Detektion von zwei (Delagrave et al., 1995) bzw. drei (Heim und Tsien, 1996) verschiedenen GFP-Mutanten und FRET zwischen zwei GFP-Mutanten (Mitra et al., 1996; Heim und Tsien, 1996; Miyawaki et al., 1997) demonstriert.

Bezüglich ihrer Absorptions- und Emissionsspektren interessante Mutanten sind

- EBFP (F64L/S65T/Y66H/Y145F Yang et al., submitted; zitiert nach Patterson et al. (1997)) mit gegenüber wtGFP blauverschobenen Spektren (Absorption bei 380 nm, Emission bei 440 nm),
- H9 (S202F, T203I; Heim et al., 1994), welches von der wtGFP-Absorption nur das Maximum bei 395 nm besitzt,
- S65T (Heim et al., 1995), EGFP (F64L, S65T; Yang et al., 1996b) bzw. RSGFP (F64M, S65G, Q69L; Mutante RSGFP4 von Delagrave et al., 1995), die nur ein einzelnes Absorptionsmaximum bei ca. 490 nm und ein Emissionsmaximum bei 505-510 nm haben, und
- die Mutante 10C (T203Y, S65G, V68L, S72A) von Ormö et al. (1996) und EYFP (von D. Piston), die verglichen mit S65T um weitere 20 nm ins Rote verschobene Spektren haben (Absorption 513 nm, Emission 527 nm).

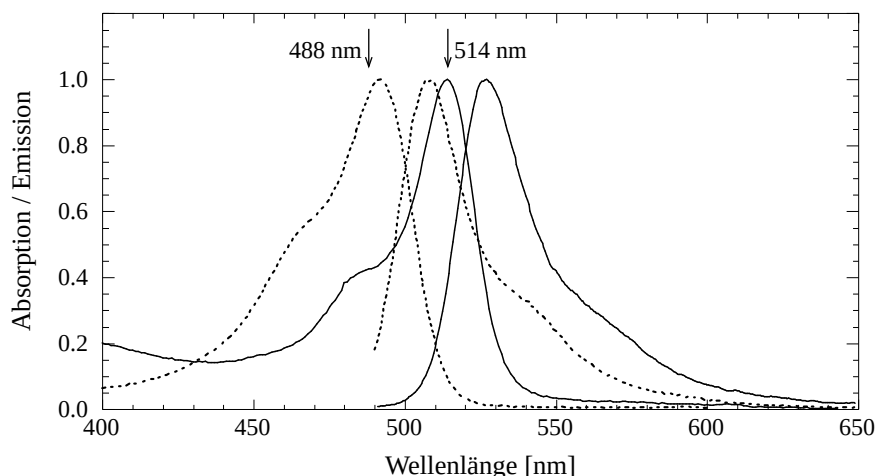


Abbildung 4.24: Absorptions- und Emissionsspektren der GFP-Mutanten RSGFP (gestrichelt) und EYFP (durchgezogen). Die Emissionsspektren wurden nach Anregung mit 480 nm gemessen.

Die Anregungs- und Emissionsspektren der hier verwendeten Proteine RSGFP und EYFP sind in Abbildung 4.24 gezeigt. Dabei sind die Spektren von RSGFP gestrichelt und die von EYFP durchgezogen dargestellt. Die Spektren der ebenfalls verwendeten Mutante S65T stimmen sehr gut mit den Spektren von RSGFP überein, so daß sie hier weggelassen wurden. Alle hier verwendeten GFP-Mutanten können effektiv mit der 488 nm Linie des Ar-Kr-Mischgaslasers angeregt werden, wobei für EYFP die 514 nm Linie des gleichen Lasers besser geeignet wäre. Als dichroitischer Strahlteiler wurde ein 505DRLP (Omega) und als Emissionsfilter wurde eine Kombination aus einem holographischem Notch-Filter (HSNF-488.0-1.0, Kaiser) und einem Blauglasfilter (1mm BG40, Schott) verwendet.

4.3.2 GFP in *E.coli*-Bakterien

Ein einfaches System zur Produktion von GFP-Proteinen sind *E.coli*-Bakterien. Sie können sehr einfach transformiert werden und reichern nach der Induktion der GFP-Produktion das Protein in ihrem Zellplasma an. Allerdings kann auch falsch gefaltetes, unlösliches und nicht-fluoreszentes Protein entstehen, welches in Einschußkörpern angereichert wird. Auf einem denaturierenden Gel läßt es sich allerdings nicht von richtig gefaltetem, fluoreszentem GFP unterscheiden (Heim et al., 1994). Wenn diese Zellen mit einem Mikroskop abgebildet werden, ist, abgesehen von den Einschlüssen ungelösten Proteins, eine relativ gleichmäßige Verteilung der Fluoreszenz im Zellkörper zu erwarten.

In den Abbildungen 4.25 und 4.26 ist auf der linken Seite jeweils die Topographie und auf der rechten Seite die Fluoreszenz von Proben getrockneter *E.coli*-Bakterien gezeigt, die

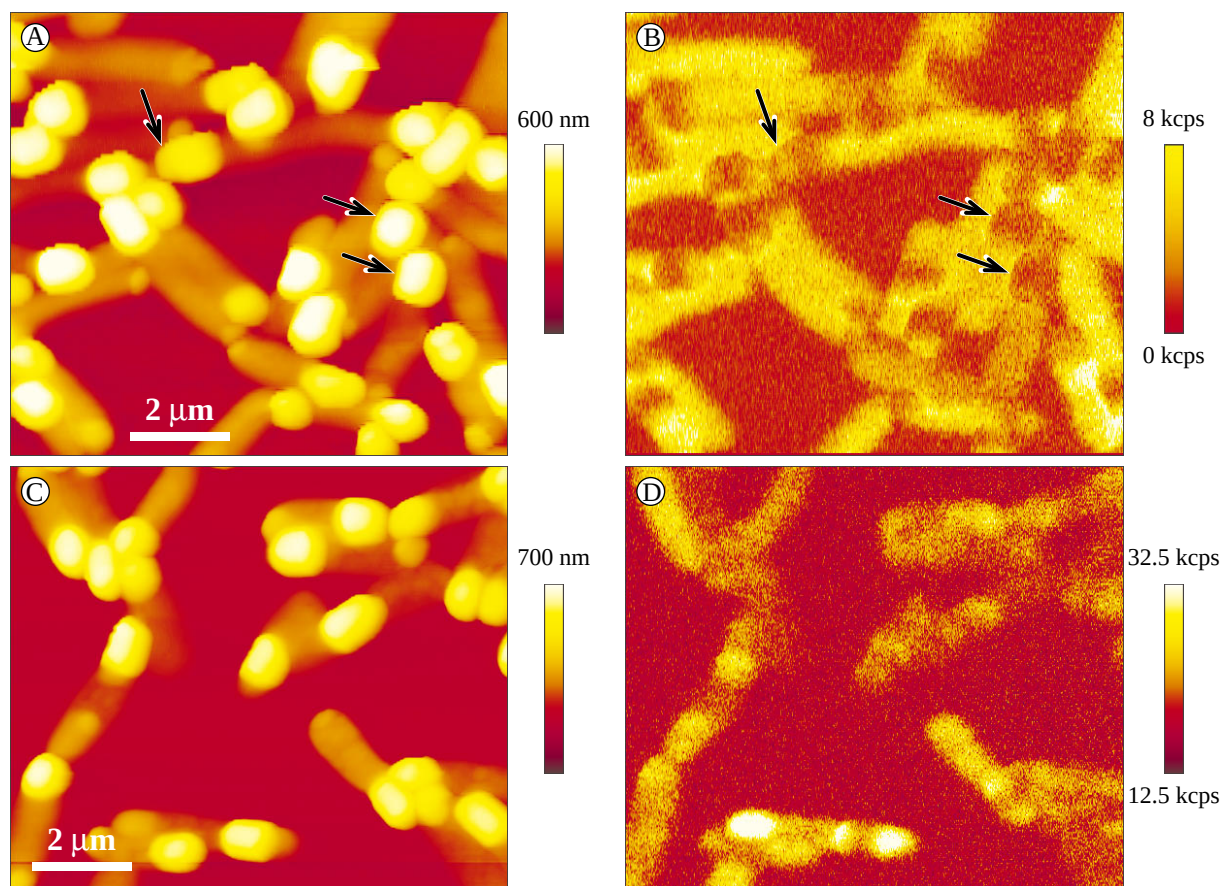


Abbildung 4.25: Nahfeldmikroskopische Aufnahmen von *E.coli*-Bakterien, die die GFP-Mutanten RSGFP (A, B) und S65T (C, D) exprimieren. Gezeigt ist jeweils links die Topographie und rechts die Fluoreszenzintensität. Anregung: (B) 2.9 nW bei 488 nm, (D) 28 nW bei 488 nm.

die GFP-Mutanten RSGFP (Abb. 4.25 A und B), S65T (Abb. 4.25 C und D) und EYFP (Abb. 4.26 A und B) produzieren. Obgleich in allen drei Experimenten die gleiche *E.coli*-Zelllinie verwendet wurde, besitzen die Bakterien sehr unterschiedliche Morphologien. Diese Unterschiede müssen auf die unterschiedlichen Proteine, die sie produzieren, zurückgeführt werden.

Bei RSGFP und S65T bilden die Bakterien eine Verdickung in der Nähe eines der Enden aus. Die Zellkörper selbst sind etwa 150 nm und die Verdickungen 350 bis 550 nm hoch. Im Fluoreszenzbild werden die Verdickungen von einer Verringerung des optischen Signals begleitet. Da die Zellen ansonsten eine sehr gleichmäßige Fluoreszenz aufweisen, bestehen die Verdickungen vermutlich aus Einschlusskörpern von nichtfluoreszentem GFP-Protein.

Es ist aber zu beachten, daß das optische Nahfeldmikroskop eine ausschließlich oberflächensensitive Methode ist. Das heißt, über den fluoreszenten Zustand des Proteins in der

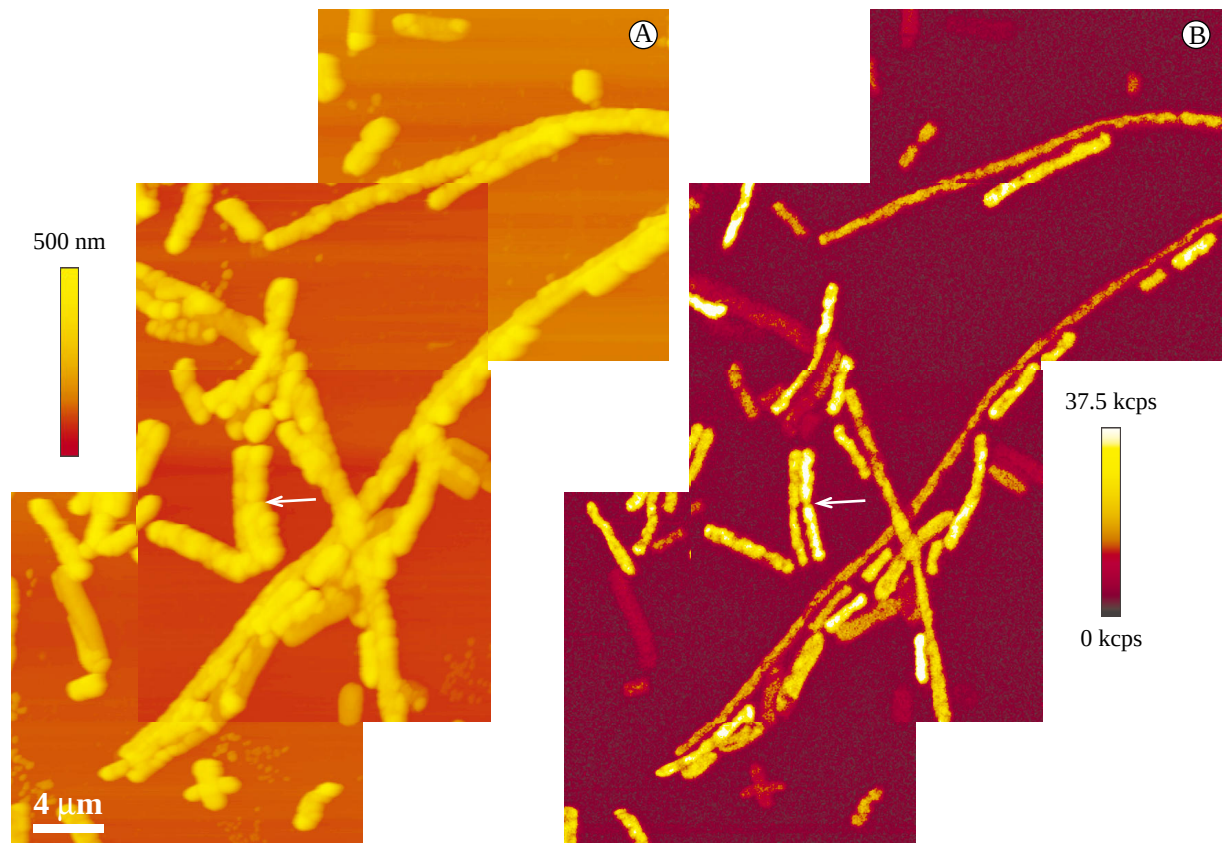


Abbildung 4.26: Nahfeldmikroskopische Aufnahmen von *E.coli*-Bakterien, die die GFP-Mutante EYFP exprimieren. Links Topographie, Rechts Fluoreszenz. Anregung: 25 nW bei 488 nm.

Zelle unter der Verdickung, mehrere hundert Nanometer von der Sonde entfernt, kann keine Aussage gemacht werden. Es kann durchaus sein, daß das Bakterium durchgehend hell ist und nur die Glasfaser Spitze wegen einer nichtfluoreszenten Anlagerung zu weit entfernt ist, als daß eine Fluoreszenz nachgewiesen werden könnte. Diese Möglichkeit kann durch fernfeldmikroskopische Techniken ausgeschlossen werden. In Abbildung 4.27 sind Bilder einer Probe von *E.coli*-Bakterien, die RSGFP exprimieren, gezeigt, die mit einem Konfokal- und einem Zweiphotonenmikroskop aufgenommen wurden. Auch in diesen Bildern besitzen die Bakterien dunkle Streifen in der Nähe eines der Enden. Somit befindet sich im Bereich der Verdickungen tatsächlich weniger fluoreszentes Protein.

Ein anderer Effekt, der bei der nahfeldoptischen Abbildung immer als Möglichkeit berücksichtigt werden sollte, ist gut in Abbildung 4.25 (A) und (B) zu sehen. In diesen Messungen ist auffallend, daß einige der Übergänge in der Fluoreszenzintensität genau mit den Grenzen der Verdickungen im topographischen Bild übereinstimmen (schwarze Pfeile).

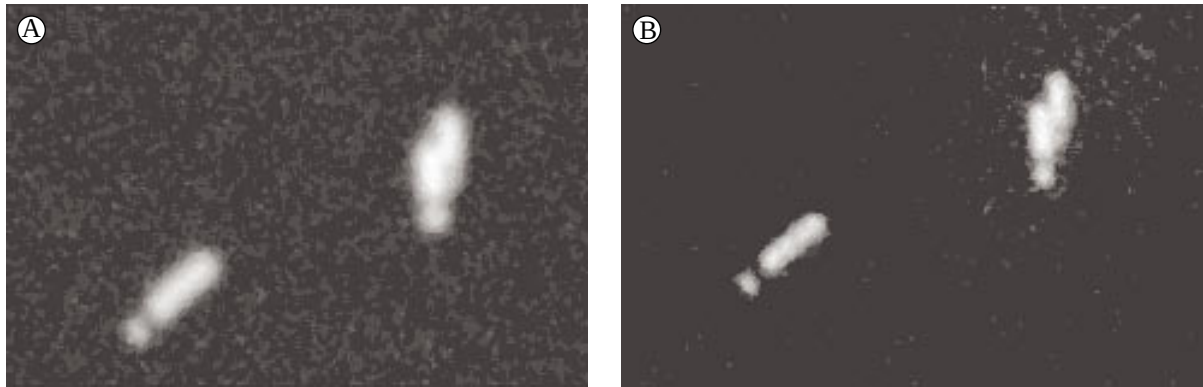


Abbildung 4.27: Konfokal- und Zweiphotonenmikroskopie-Aufnahme von *E.coli*-Bakterien die RSGFP expremieren. (A) Anregung bei 488 nm, (B) Anregung zentriert um 840 nm mit 100 fs Pulsen eines Ti:Saphir Lasers. (Mikroskop: Zeiss LSM 410, Ti:Saphir Laser: Spectra Physics Tsunami; Bilder von Vinod Subramaniam)

Für die Form der Strukturen im Fluoreszenzbild gibt es insofern zwei Erklärungen. Entweder spiegelt sie die tatsächliche Verteilung des GFP wieder, oder sie ist ein topographisches Artefakt.

Während die Bakterien, die RSGFP und S65T produzieren, Verdickungen aufweisen, bilden die Bakterien, die EYFP expremieren, sehr lange, gleichmäßig hohe Strukturen aus (Abbildung 4.26 A). Dies deutet darauf hin, daß ihr Zellzyklus so weit durch die EYFP-Expression gestört ist, daß sie sich entweder gar nicht vollständig teilen (langer Strang in Abbildung 4.26) oder sich nach einer Zellteilung nicht mehr trennen können (Pfeil in Abbildung 4.26) und die Bakterien aneinander haften bleiben. Die Fluoreszenz der Bakterien (Abbildung 4.26 B) ist den Erwartungen entsprechend relativ homogen und besitzt keine auffallenden Bereiche, in denen sich kein EYFP befindet.

Einer der Hauptgründe für die Entwicklung von Mutanten des in *A. victorea* vorkommenden GFP war die Suche nach Mutanten, die veränderte Spektren besitzen, so daß verschiedene Proteine gleichzeitig mit verschiedenen GFP markiert werden können und sie so optisch unterscheidbar sind. Für derartige Experimente ist es hilfreich, lokal Fluoreszenzspektren aufzeichnen zu können. Abbildung 4.28 zeigt das Emissionsspektrum eines Bakteriums, welches RSGFP produziert. Zum Vergleich ist das mit einem Spektrofluorimeter (SLM 800, SLM Instruments, Urbana, IL, USA) bestimmte Emissionsspektrum einer Lösung von Bakterien, die RSGFP expremieren, eingezeichnet. Für die Messung im optischen Nahfeldmikroskop wurde die Glasfaserspitze über einem hellen Bakterium positioniert und das optische Signal anstelle mit der APD mit einem Spektrographen

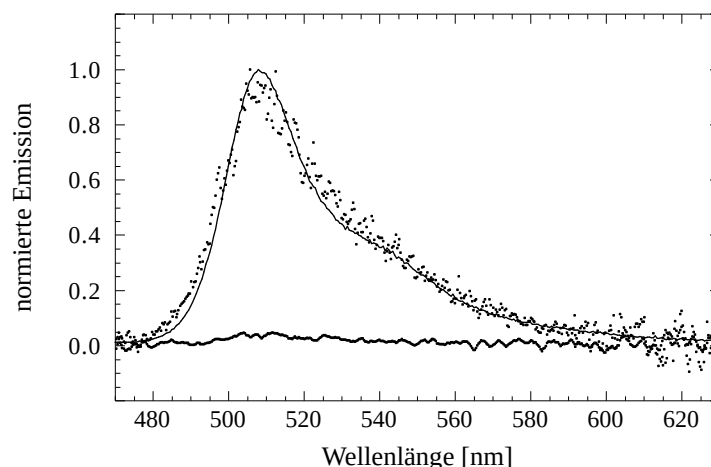


Abbildung 4.28: Fluoreszenzspektrum von Bakterien, die RSGFP exprimieren, aufgezeichnet mit dem optischen Nahfeldmikroskop (Punkte, Anregung bei 457.9 nm) durch Positionieren der Faserspitze über einem hellen Bakterium. Die Linie zeigt das in einem Fluorimeter aufgezeichnete Spektrum einer Suspension von Bakterienzellen, die RSGFP produzieren (Anregung bei 458 nm). Die untere Linie ist das nahfeldoptische Hintergrundspektrum.

(MS 125, Oriel) detektiert. Statt der 488 nm Linie wurde die 457.9 nm Linie des Ar-Kr-Mischgaslasers verwendet, um einen möglichst großen Teil des Fluoreszenzspektrums aufzeichnen zu können. Zum Vergleich ist außerdem in Abbildung 4.28 ein Hintergrundspektrum aufgetragen, welches durch Positionierung der Spitze neben dem Bakterium aufgezeichnet wurde. Dieses Hintergrundspektrum zeigt keine der auffälligen Strukturen der anderen zwei Spektren.

Wie erwartet stimmt das mit dem optischen Nahfeldmikroskop aufgezeichnete Fluoreszenzspektrum mit dem der Bakterienlösung im Spektrofluorimeter sehr gut überein. Die Möglichkeit, lokale Spektroskopie zu machen, wird wichtig, wenn verschiedene GFP-Mutanten in einem System vorkommen. Dadurch lassen sich nicht nur verschiedene GFP-Mutanten identifizieren, sondern es können auch andere Prozesse wie zum Beispiel FRET zwischen den verschiedenen Mutanten durch die charakteristischen Veränderungen der Emissionsspektren nachgewiesen werden.

Einen interessanten Effekt zeigen *E.coli*-Bakterien, bei denen die RSGFP-Produktion nicht induziert wurde. In der Bakterienlösung beobachtet man die Produktion von geringen Mengen von GFP. Bei der Untersuchung von diesen Bakterien im Nahfeldmikroskop stellt man fest, daß nicht alle Bakterien ein gleichmäßig schwaches Fluoreszenzsignal erzeugen, sondern daß es einzelne Bakterien gibt, die sehr viel heller als die meisten anderen Bakterien sind (Abbildung 4.29). Die Fluoreszenz des einzelnen hellen Bakteriums ist etwa

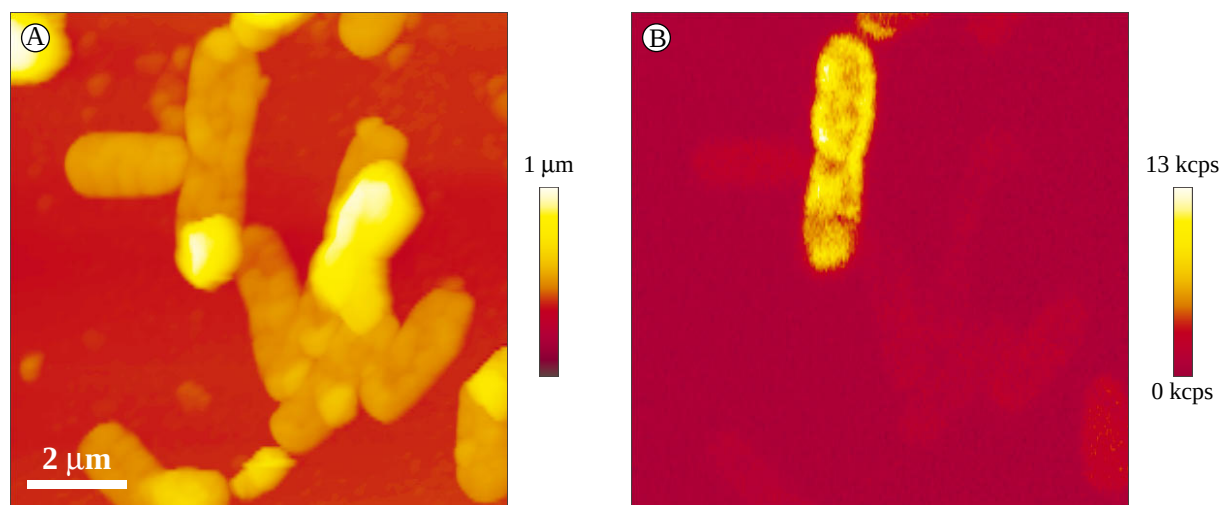


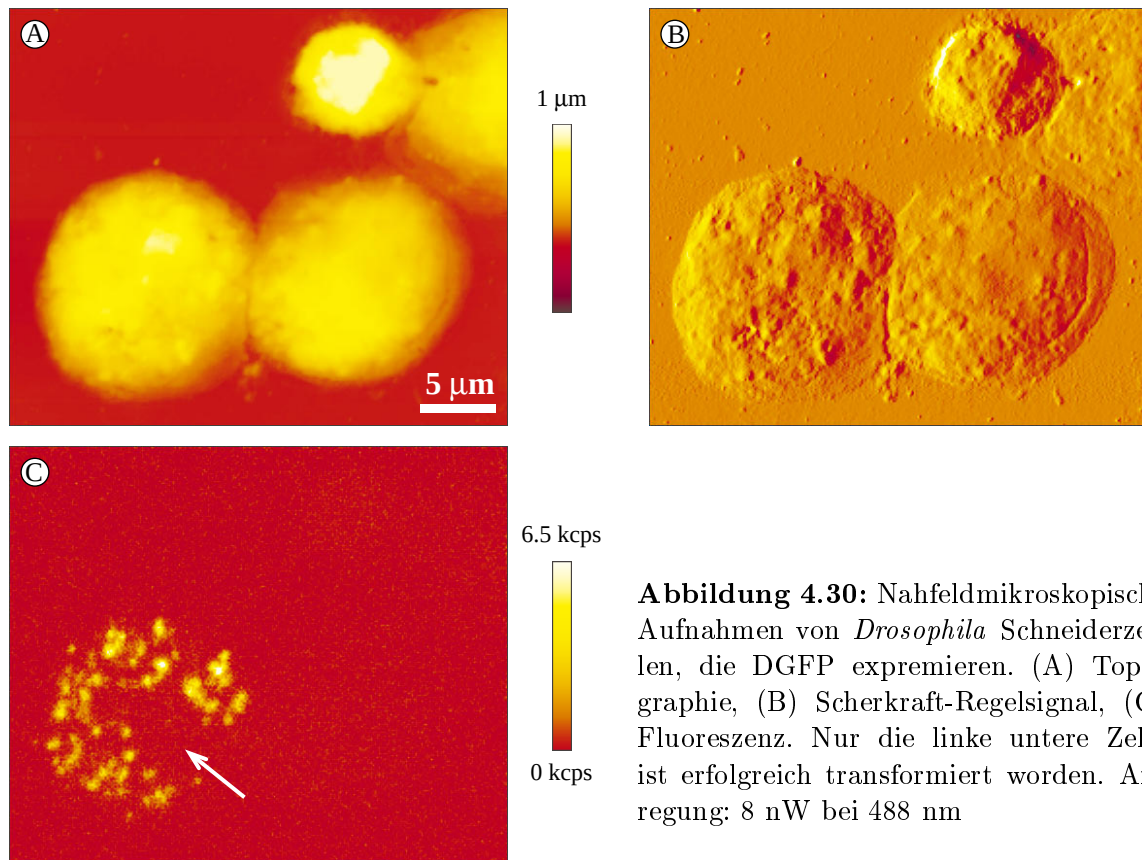
Abbildung 4.29: Nahfeldmikroskopische Aufnahmen von *E.coli*-Bakterien, bei denen die Expression von RSGFP nicht induziert wurde. (A) Topographie, (B) Fluoreszenz. Anregung: 25 nW bei 457.9 nm

fünffmal schwächer als die der induzierten Bakterien in Abbildung 4.25 (B). Auffällig an der Morphologie ist, daß im wesentlichen nur die Bakterien, die eine beträchtliche Menge GFP produzieren, auch die Verdickung in der Nähe des einen Endes aufweisen. Da im Bereich der Verdickung allerdings eine Restfluoreszenz sichtbar ist, scheint in diesen Bakterien das fluoreszierende GFP auch in die Verdickung eindringen zu können.

4.3.3 GFP in *Drosophila*-Schneiderzellen

Neben den GFP-Mutanten, deren Absorptions- und Emissionsspektren sich von den Spektren anderer Mutanten unterscheiden, sind auch solche besonders interessant, die zwar die gleichen spektralen Eigenschaften besitzen, jedoch für den Einsatz in bestimmten Systemen optimiert sind. Ein publiziertes Beispiel ist das EGFP (Yang et al., 1996b), dessen Spektren mit denen von S65T übereinstimmen, das allerdings bei 37°C sehr viel effektiver gefaltet wird, und so besser für den Einsatz in z. B. Säugetierzellkulturen geeignet ist, die nicht auf 20°C gekühlt werden können (Patterson et al., 1997).

Ein anderes Beispiel ist ein GFP-Protein, welches von A. Brand (Cambridge, GB) für *Drosophila melanogaster* optimiert wurde (im weiteren als DGFP bezeichnet). Als System für die Expression wurden *Drosophila*-Schneiderzellen verwendet. Da das reine Protein nicht zur Verfügung stand, sind die genauen Spektren nicht bekannt. Es kann allerdings, ähnlich wie S65T und RSGFP, gut mit der 488 nm Linie des Ar-Kr-Mischgaslasers angeregt



werden. Die Detektion kann mit einer Filterkombination erfolgen, die als 505 nm Langpaß-Kantenfilter wirkt.

Abbildung 4.30 zeigt die Topographie, das Regelsignal und die Fluoreszenz einer kleinen Gruppe von Schneiderzellen. Die größeren Zellen sind etwa 300 bis 500 nm hoch und die kleine Zelle am oberen Bildrand etwa 600 nm. Das Regelsignal ist mitabgebildet, da es einen guten plastischen Eindruck von der Morphologie der Zellen gibt. Am Fluoreszenzbild sieht man deutlich, daß nur die linke untere Zelle erfolgreich transformiert war. Im normalen Fluoreszenzmikroskop war zu sehen, daß in nur etwa 1% der Zellen die Transformation erfolgreich verlief.

In Systemen, die GFP nicht als Fusionsprotein produzieren, wird oft beobachtet, daß sich das GFP im gesamten Zytoplasma verbreitet. Interessanterweise ist dies in dem hier gezeigten System von Schneiderzellen und DGFP nicht der Fall. Das Fluoreszenzsignal zeigt unterschiedlich helle Punkte, die nahezu homogen über die Zelle verteilt sind. Nur der durch den weißen Pfeil gekennzeichnete Bereich enthält weniger helle Punkte. Wahrscheinlich befindet sich an dieser Stelle der Zellkern der Schneiderzelle. Zwischen den hellen Punkten

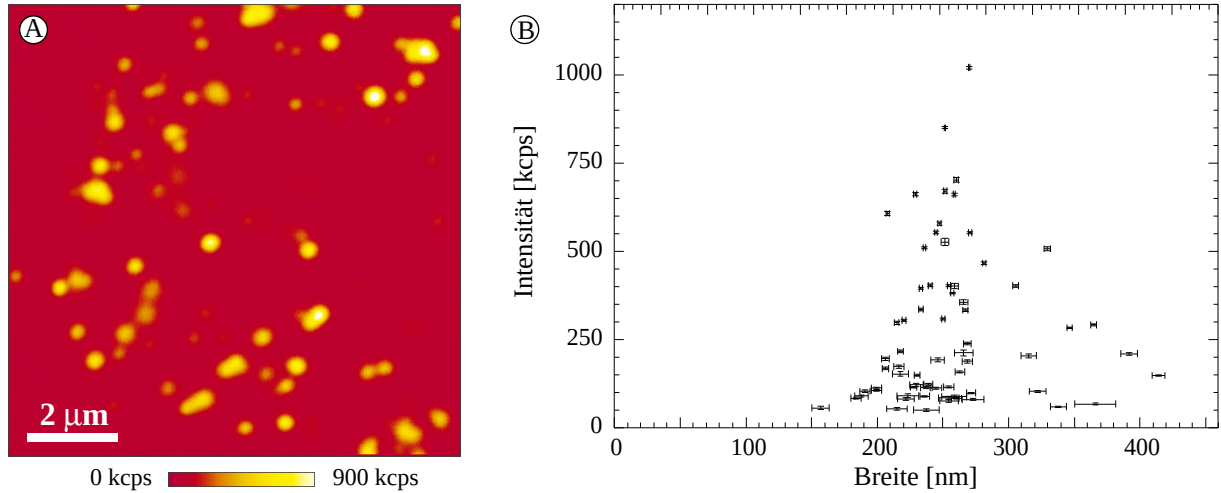


Abbildung 4.31: Analyse der Punktgröße bei Schneiderzellen die DGFP exprimieren. (A) Hochaufgelöstes Fluoreszenzbild. (B) Maximalintensität aufgetragen gegen die Breite 2σ von 67 Punkten aus (A) bestimmt durch numerisches Anpassen von Gaußkurven. Anregung: 800 nW bei 488 nm.

geht das Fluoreszenzsignal auf den Hintergrundwert zurück.

Eine vergrößerte Aufnahme (Abbildung 4.31 A) der Zelle zeigt, daß sich das Fluoreszenzbild aus vielen einzelnen Punkten ähnlicher Durchmesser zusammensetzt, die sich allerdings in der maximalen Helligkeit erheblich unterscheiden. Für eine nähere Untersuchung wurden ihre Breiten und Höhen durch numerisches Anpassen von Gaußkurven an Schnitte durch das Bild bestimmt. Die Höhe von 67 Punkten aus Abbildung 4.31 (A) ist in (B) gegen die jeweilige Breite aufgetragen. Damit keine Meßfehler durch eine Drift des Piezostellelements entlang der langsamen Rasterrichtung auftreten, wurden alle Schnitte durch das optische Bild entlang der schnellen horizontalen Achse gelegt. Die so bestimmte Verteilung hat eine auffällige Häufung zwischen 200 und 300 nm, wobei dies nicht die Auflösung darstellt, da auch eindeutig kleinere Punkte gesehen werden. Für die Punkte, die einen Durchmesser größer als etwa 300 nm haben, nimmt die maximale Intensität mit der Größe ab.

Da es sich nur um die Analyse eines einzelnen Bildes handelt, kann keine eindeutige Erklärung für die beobachtete Verteilung gegeben werden. So kann diese Verteilung die tatsächliche Verteilung der Intensitäten und Breiten der Punkte wiedergeben. Allerdings sollte auch die räumliche Verteilung der Punkte in der Zelle eine Rolle spielen. So kann man erwarten, daß Punkte, die tiefer in der Zelle liegen und somit weiter von der Faserspitze entfernt sind, dunkler und breiter erscheinen als Punkte, die an der Oberfläche liegen.

Dadurch ließe sich zum Beispiel die Intensitätsabnahme bei den Punkten mit Durchmessern jenseits von 300 nm sehr gut erklären.

Durch die hier angedeutete Analyse des Fluoreszenzsignals ließe sich bei besser charakterisierten Systemen aus dem zweidimensionalen nahfeldoptischen Bild auf die dreidimensionale Struktur schließen. Die laterale Auflösung, die in größerer Entfernung von der Oberfläche erzielt werden kann, ist zwar schlechter als direkt an der Oberfläche, aber es ergibt sich die Möglichkeit, die räumliche Anordnung einzelner Objekte zueinander zu bestimmen. Dazu wäre allerdings noch eine sorgfältige Kalibration der Tiefenabhängigkeit der Abbildung von Objekten notwendig.

4.3.4 ErbB-1–EGFP-Fusionsprotein

Die bisher gezeigten Messungen zeigten, daß GFP auch im optischen Nahfeldmikroskop als Farbstoff eingesetzt werden kann. Für die Biologie ist jedoch GFP deshalb so interessant, weil es relativ einfach zur Markierung von anderen Proteinen in der Wirtszelle verwendet werden kann. Dies erfolgt, wie schon erwähnt, durch Fusion des zu markierenden Proteins mit einem GFP. Es zeigte sich, daß vielfach die Funktionalität beider Bestandteile des Fusionsproteins erhalten bleibt (Cubitt et al., 1995). Dadurch ist es möglich, den Aufenthaltsort eines Proteins in einer intakten Zellen nachzuweisen. Insbesondere für Rezeptorproteine ist die Markierung mit GFP wichtig, da vielfach eine *in vitro* Markierung mit anschließendem funktionstüchtigen Einbau der Rezeptorproteine in eine Zelle nicht möglich ist und eine Markierung über fluoreszente Antikörper die Funktion beeinträchtigt.

Als Beispiel für ein derartiges System wurde ein Fusionsprotein, bestehend aus einem ErbB-1 Rezeptor für den Wachstumsfaktor *epidermal growth factor* und EGFP, in den CB1-Zelllinien von CHO-Zellen (Tzahar et al., 1996) verwendet (Zellen von R. Brock, MPIbpc Göttingen, zur Verfügung gestellt). In Abbildung 4.32 (A) und (B) sind die Topographie und das topographische Regelsignal während der Messung gezeigt. Wie schon in anderen Messungen der Topographie von getrockneten Zellen stellt auch hier wiederum der Zellkern die dominierende topographische Struktur dar. Im Fluoreszenzbild (C) sieht man eine stark inhomogene Verteilung der GFP-Fluoreszenz und kann damit auf eine inhomogene Verteilung des Rezeptors schließen. Ähnlich wie bei der Fluoreszenzmarkierung mit Concanavalin A (Abbildung 4.19 B) tritt der Zellkern nicht in Erscheinung. Die fadenartigen Strukturen im Fluoreszenzbild besitzen unabhängig von der Dicke der Zelle an den jeweiligen Orten in etwa die gleiche Breite. Für membrangebundene Fluorophore ist dies auch zu erwarten, da sie unabhängig von der lokalen Dicke der Zelle während der

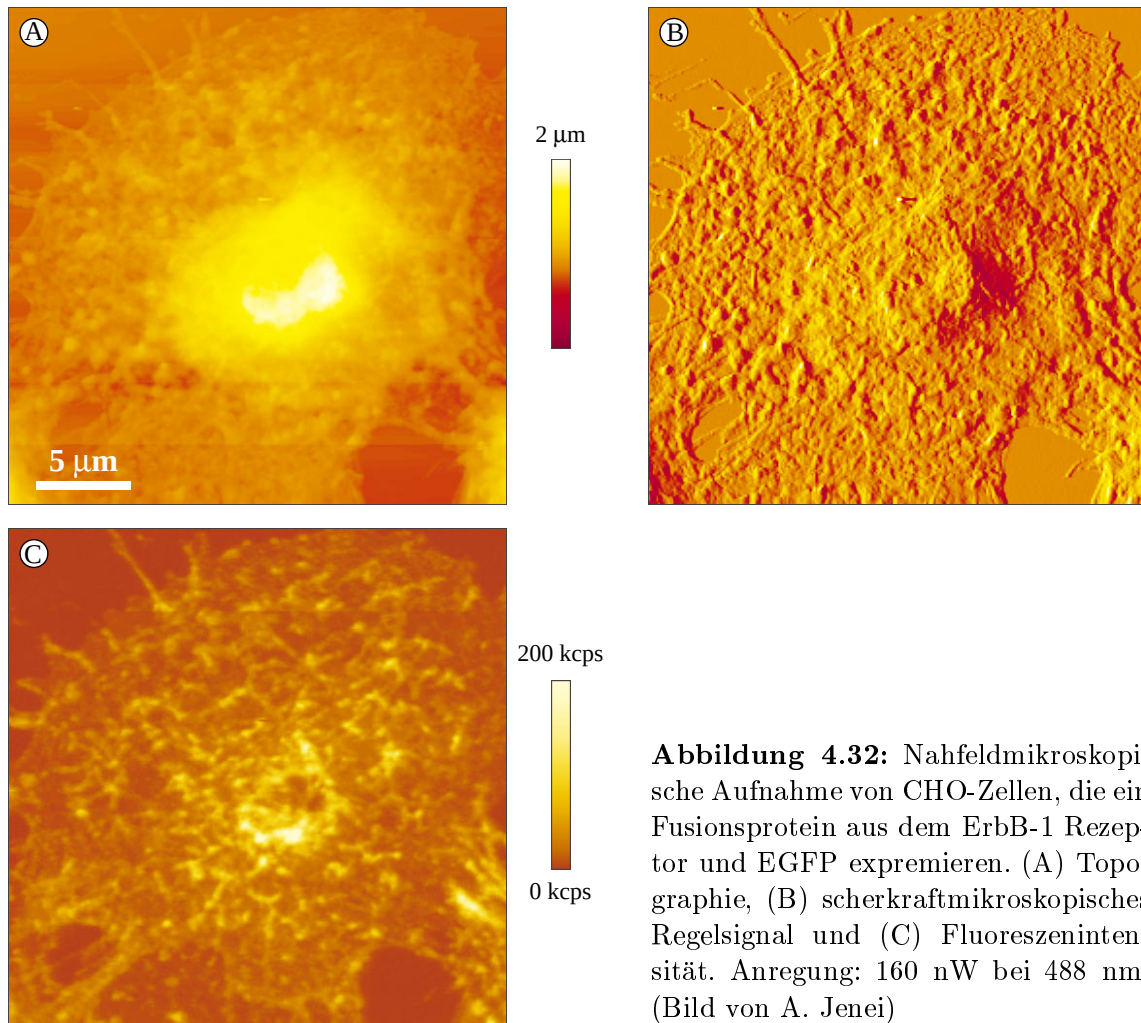


Abbildung die gleiche Entfernung zur Faserspitze besitzen.

4.3.5 Diskussion

Der Einsatz von GFP eröffnet viele neue Untersuchungsmöglichkeiten in der Zell-, Entwicklungs- und Molekularbiologie. Dies liegt vor allem daran, daß es mit GFP möglich ist, Proteine *in vivo* fluorescent zu markieren, ohne deren Funktion oder die Teilungsfähigkeit der Zellen zu beeinträchtigen. Die optische Nahfeldmikroskopie bietet dazu die Möglichkeit, sowohl optische Mikroskopie als auch eine topographische Abbildung der Probenoberfläche simultan und mit hoher lateraler Auflösung zu machen. Außerdem ist es im Nahfeldmikroskop möglich, neben der normalen Fluoreszenzmikroskopie auch Fluoreszenz-Resonanz Energietransfer (FRET) zu beobachten und, wie im nächsten Kapitel gezeigt wird, auch

Zwei- und Mehr-Photonen-Prozesse zur Fluoreszenzanregung zu verwenden.

Im letzten Abschnitt wurde am Beispiel des ErbB-1 Rezeptors und EGFP gezeigt, daß auch die Verteilung eines Fusionsproteins in Säugetierzellen untersucht werden kann. Dieser Rezeptor ist ein Mitglied der aus vier verschiedenen Rezeptoren bestehenden Klasse der ErbB-Rezeptoren. Sie können nach ihrer Aktivierung so unterschiedliche Reaktionen wie Zellteilung oder Zelltod einleiten. Dabei wird die Wirkung einer Aktivierung durch die Bildung von Homo- und Heterodimeren dieser vier Rezeptoren verstärkt (Alroy und Yarden, 1997). Fragen dabei sind, inwieweit die Rezeptoren schon vor der Bindung eines Liganden in Dimeren vorliegen, ob es noch größere Aggregate gibt und ob die Rezeptoren homogen über die Oberfläche verteilt sind oder ob sie sich in bestimmten Bereichen ansammeln.

Das optische Nahfeldmikroskop ist für die Beantwortung derartiger Fragen im Zusammenhang mit Rezeptorproteinen sehr gut geeignet, da sich aufgrund der Topographienachführung der Spitze die Zellmembran immer im Fokus der Mikroskopoptik befindet³. Dabei kann zum Beispiel mit der Kombination aus Nahfeldmikroskopie und FRET die räumliche Verteilung von Rezeptoren und von Rezeptor-Aggregaten untersucht werden. Die gleichzeitig aufgezeichnete Topographie kann zur Lokalisierung der Fluoreszenzsignale auf der Zelle genutzt werden.

Da die Markierung mit GFP *in vivo* erfolgt, wäre es nützlich, auch ein Nahfeldmikroskop zu haben, welches die Untersuchung der Zellen *in vivo* erlaubt. Bei der vergleichenden Untersuchung der Rezeptorverteilung auf ungetrockneten und getrockneten Zellen haben Hwang et al. (1998) allerdings festgestellt, daß auf den routinemäßig zugänglichen Längenskalen während der Trocknung keine Umordnung der Rezeptoren erfolgt. Somit können die mittels Nahfeldmikroskopie oder auch Elektronenmikroskopie an getrockneten Zellen erhaltenen Ergebnisse über die Rezeptorverteilung auch einen biologisch relevanten Zustand beschreiben.

³Die Zellmembran auf der Unterseite der Zelle ist allerdings dem Nahfeldmikroskop nicht zugänglich. Andere Mikroskopie-Methoden, wie z. B. die TIR-Mikroskopie (*total internal reflection*), sind dafür geeignet.

Kapitel 5

Zweiphotonen-Nahfeldmikroskopie

Dieses Kapitel befaßt sich mit der Anregung von Farbstoffen durch die simultane Absorption von zwei und mehr Photonen in einem optischen Nahfeldmikroskop (Zwei- bzw. Mehrphotonen-Nahfeldmikroskopie). Die angeregten Farbstoffmoleküle können durch die Aussendung eines einzelnen Photons wieder in den Grundzustand zurückkehren. Dieses Fluoreszenzphoton kann detektiert und zur Bildgebung im Nahfeldmikroskop verwendet werden. Maria Göppert-Mayer hat schon in ihrer Dissertation von 1931 quantenmechanisch die Wahrscheinlichkeit für die Anregung durch, wie sie es bezeichnete, Doppelabsorption berechnet und schrieb dazu „...die quadratische Abhängigkeit von der Lichtdichte [wirkt] ungünstig, so daß zur Beobachtung sicher große Lichtintensitäten erforderlich sind.“

Durch den Einsatz von Lasern ist es heutzutage in der optischen Mikroskopie relativ einfach möglich, die für die Zweiphotonenabsorption benötigten Lichtintensitäten zu erzeugen und zur Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen zu verwenden (Denk et al., 1995). Dadurch erhält man die Möglichkeit, Farbstoffe, die im ultravioletten Spektralbereich absorbieren, ohne UV-Laser oder UV-transmittive Objektive anzuregen. Außerdem erzielt man eine dreidimensionale Auflösung ohne den Einsatz einer Blende in der Bildebene und vermeidet ein Bleichen der Fluorophore außerhalb der Fokusebene. Die letzten beiden Punkte ergeben sich aus der quadratischen Abhängigkeit der Anregung von der eingestrahnten Lichtintensität.

Die Einschränkung der Anregung auf eine dünne Oberflächenschicht und die Vermeidung von ultraviolettem Anregungslicht können auch in der Fluoreszenz-Nahfeldmikroskopie sehr nützlich sein. Insbesondere zeigen viele der eingesetzten Glasfasern eine starke Autofluoreszenz bei der Anregung mit blauem bzw. ultraviolettem Licht (siehe auch Abschnitt 3.6.2), die durch die Zweiphotonen-Nahfeldmikroskopie vermieden werden kann. Es

gibt allerdings das Problem, daß die zumeist eingesetzten Apertur-Sonden, die im wesentlichen aus einer kleinen Öffnung in einem dünnen Metallfilm bestehen, eine sehr schlechte optische Transmission haben und aufgrund von Absorptionen im Metallfilm und der damit verbundenen thermischen Belastung der Sonde (Kavaldjiev et al., 1995; La Rosa et al., 1995; Stähelin et al., 1996) keinen allzu großen Lichtintensitäten widerstehen können. Es ist somit mit diesen Sonden nicht möglich, die benötigten hohen Lichtintensitäten zu erzeugen. Dies gilt jedoch nicht für rein dielektrische Sonden wie die in dieser Arbeit verwendeten Glasfaserspitzen. Sie haben eine sehr große Transmission von etwa 90 % und überstehen Lichtintensitäten von mehreren hundert Milliwatt. Insofern ist es nicht verwunderlich, daß alle publizierten Experimente zur Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie in optischen Nahfeldmikroskopen mit dieser Art von Sonden durchgeführt wurden (Lewis et al., 1998; Kirsch et al., 1998c).

In diesem Kapitel werden nach einer kurzen Einführung in die Zweiphotonenanregung die verwendeten optischen Aufbauten und die eingesetzten Methoden zur Messung von Leistungs- und Abstandskurven beschrieben. Die Experimente wurden mit zwei sehr unterschiedlichen Lasern durchgeführt. Zunächst stand ein Ar-Kr-Mischgaslaser im Dauerstrichbetrieb (engl. *continuous wave, cw*) zur Verfügung, mit dessen 647 nm Linie sowohl UV-Farbstoffe über einen Zweiphotonenprozeß, als auch im roten Spektralbereich absorbierende Farbstoffe durch einen Einphotonenprozeß, angeregt werden konnten. Die damit gemachten Messungen wurden zum Teil schon in der Arbeit von Kirsch et al. (1998c) veröffentlicht.

Gleichzeitig mit einem gepulsten Nd:YVO₄-Festkörperlaser, der Lichtpulse mit einer Pulsdauer von etwa 7 ps bei einer Wellenlänge von 1064 nm erzeugt, stand ein frequenzverdoppelter cw-Nd:YAG-Laser zur Verfügung, so daß für ein und denselben Farbstoff die Anregung durch Ein- und Zweiphotonenabsorption verglichen werden konnte (Jenei et al., 1998). Mit den zwei Lasern wurden ähnliche Experimente gemacht, so daß der Ergebnisteil zunächst nach der Art der Experimente untergliedert ist. In diesen Unterabschnitten werden dann jeweils zuerst die mit dem Ar-Kr-Mischgaslaser erzielten Ergebnisse dargestellt, gefolgt von den mit dem gepulsten Nd:YVO₄-Laser erhaltenen.

5.1 Fluoreszenzanregung durch Zweiphotonenabsorption

Bei der Doppelabsorption werden zwei Photonen durch ein Molekül in einem einzigen Quantenereignis absorbiert (Göppert-Mayer, 1931), ohne daß ein Zwischenzustand bevölkert wird. Analog ist auch die simultane Absorption von drei und mehr Photonen möglich. Die folgenden Ausführungen gelten entsprechend auch für diese Prozesse, auch wenn sie nicht mehr gesondert erwähnt werden.

Die Energien der absorbierten Photonen müssen nicht gleich sein, einzig die Summe der Energien der zwei Photonen muß einer Übergangsenergie des Moleküls entsprechen. Da in den Experimenten mit einer einzigen Laserlinie gearbeitet wird und somit nur Photonen mit Energien in einem einzigen schmalen Energiebereich vorkommen, wird im folgenden angenommen, daß die zwei Photonen die gleiche Energie besitzen. Durch die Absorption von zwei niederenergetischen Photonen aus dem nahen infraroten bzw. roten Spektralbereich ist es möglich, Molekülübergänge anzuregen, die bei höheren Energien im grünen bis nahen ultravioletten Spektralbereich liegen. Nach der Anregung kann das Molekül, unter Aussendung eines Fluoreszenzphotons, in den Grundzustand zurückkehren. Im Gegensatz zur Fluoreszenzanregung durch Absorption eines einzelnen Photons, bei der das emittierte Photon eine geringere Energie als das anregende Photon hat, besitzt das Fluoreszenzphoton nach einer Anregung durch Zweiphotonenabsorption in der Regel eine größere Energie als eines der anregenden Photonen. Dadurch ist es einfacher, das Fluoreszenzsignal durch Filter vom Signal parasitärer Prozesse zu trennen, die in der Regel Photonen geringerer Energie erzeugen.

In Bezug auf die quantenmechanischen Auswahlregeln unterscheidet sich die Zweiphotonenanregung von der Anregung mit einem einzigen Photon. Es sind nur Übergänge mit Paritätserhalt erlaubt, wohingegen bei der Einphotonenabsorption ein Paritätswechsel erfolgt. Dieser von der Anzahl der Photonen abhängige Unterschied ist auch aus der Raman- und Infrarotspektroskopie bekannt. Beim Ramaneffekt geht das Molekül unter Absorption und Emission von jeweils einem Photon in einen anderen Zustand über, wohingegen die Anregung durch Licht aus dem infraroten Spektralbereich nur ein einziges Photon involviert. Ähnlich, wie durch Raman- und Infrarotspektroskopie unterschiedliche Teile des Termschemas eines Moleküls untersucht werden, können sich auch die durch Ein- und Zweiphotonenabsorption erhaltenen Spektren unterscheiden, wenn eine definierte Parität vorliegt (Shen, 1984; Kennedy und Lytle, 1986). Allerdings besitzen Farbstoffmoleküle in

der Regel nur geringe Symmetrie und komplizierte Energieniveausysteme mit so geringen energetischen Abständen zwischen den einzelnen Zuständen, daß sie besser als elektronische Anregungsbänder angesehen werden statt als einzelne Zustände definierter Energie und Parität (Brakenhoff et al., 1996). Deshalb kann man trotz der unterschiedlichen Auswahlregeln für Ein- bzw. Zweiphotonenanregung die gleichen Molekülspektren erwarten, was auch experimentell bestätigt wurde (Curley et al., 1992; Fischer et al., 1995; Xu und Webb, 1996).

Die Signalintensität bei der Zweiphotonenanregung der Fluoreszenz ist proportional zum zeitlichen Mittel des Quadrats der Lichtintensität. Im Falle der Anregung mit einem cw-Laser ist das Fluoreszenzsignal dem Quadrat der mittleren Leistung P_{av} proportional. Für Laser, deren Emission in Form von Rechteckpulsen der Dauer τ mit der Wiederholungsrate f und der Leistung P_{max} erfolgt, ergibt sich

$$\langle P^2(t) \rangle = f \cdot \int_0^{1/f} P^2(t) dt = \tau f P_{max}^2 = P_{av}^2 \frac{1}{\tau f}$$

wobei in diesem Fall für die gemittelte Leistung gilt: $P_{av} = \tau f P_{max}$. Im Vergleich zu einem cw-Laser gleicher mittlerer Leistung ist somit ein um den Faktor $1/\tau f$ vergrößertes Fluoreszenzsignal zu erwarten. Für ein typisches Ti:Saphir-Lasersystem ($\tau = 250$ fs, $f = 80$ MHz) ist $1/\tau f = 5 \cdot 10^4$, und für einen passiv modengelockten Nd:YVO₄-Laser ($\tau = 7$ ps, $f = 200$ MHz) ergibt sich $1/\tau f = 714$.

Aufgrund des durch den Faktors $1/\tau f$ vergrößerten Fluoreszenzsignals wurden die meisten Experimente zur Zweiphotonenmikroskopie mit Lasersystemen durchgeführt, die Pulsdauern im Femtosekundenbereich besitzen (Denk et al., 1990; Bennett et al., 1996; Potter et al., 1996; Summers et al., 1996; König et al., 1996; Köhler et al., 1997; Masters et al., 1997; Svoboda et al., 1997). Allerdings ist auch der Einsatz von Lasern mit Pulsdauern im Pikosekundenbereich (Bewersdorf und Hell, 1998) und von Dauerstrichlasern (Hänninen et al., 1994; Booth und Hell, 1998; Hell et al., 1998) möglich. Um mit diesen drei Lasertypen die gleiche Fluoreszenzintensität zu erhalten, muß die mittlere Leistung des cw-Lasers um den Faktor $\sqrt{1/\tau f} = 220$ und die des ps-Lasers um den Faktor 8.5 erhöht werden. Diese Erhöhung der mittleren Leistung ist mit den verfügbaren Lasern durchaus möglich, da sich in der Zweiphotonenmikroskopie die verwendete mittlere Leistung für Ti:Saphir-Laser im Bereich von wenigen Milliwatt bewegt. Wenn man in einem Zahlenbeispiel annimmt, daß die Strahlung des oben erwähnten Ti:Saphir-Lasers ($\tau = 250$ fs, $f = 80$ MHz) mit einer gemittelten Leistung von 3 mW bei einer Wellenlänge von 800 nm auf eine Fläche mit

$d = 500$ nm Durchmesser fokussiert wird, ergibt sich für ein Molekül mit einem Absorptionsquerschnitt $\delta = 10^{-58} \text{ m}^4 \text{ s}$ (Denk et al., 1990) eine Anregungsrate von

$$C = \frac{\delta}{\tau f} \cdot \frac{I_{av}^2}{(\hbar\omega)^2} \left(\frac{4}{\pi d^2} \right)^2 = 18 \text{ kHz}$$

Bei etwa 50 mW wird eine Sättigung der Anregung erreicht, da dann die Wahrscheinlichkeit, ein Farbstoffmolekül innerhalb eines Pulses anzuregen, nahezu eins wird. Aufgrund seiner Fluoreszenzlebensdauer von typischerweise einigen Nanosekunden kann aber das Molekül während eines Laserpulses nur ein einziges Mal angeregt werden (Denk et al., 1990).

Beim Wechsel zu Lichtquellen mit längeren Pulsdauern bzw. zu cw-Lasern ergibt sich neben der Erhöhung der mittleren benötigten Leistung auch eine Verringerung der maximalen Leistung um den selben Faktor. Sind bei Lasersystemen mit Femtosekundenpulsen wegen der hohen Maximalintensität vor allem nichtlineare Effekte wie Bleichen des Fluorophors, die Erzeugung der Harmonischen an der Probenoberfläche (Sánchez et al., 1997) oder der dielektrische Durchbruch (Shen, 1984; Brakenhoff et al., 1996) die Ursachen für eine begrenzte Signalintensität, ergeben sich die Beschränkungen bei cw-Lasern im wesentlichen aus linearen Effekten wie einer Erhitzung der Probe, eine Veränderung der Probe durch die erzeugten optischen Kräfte (*trapping*) oder photochemische Reaktionen.

5.2 Experimentelle Techniken

5.2.1 Optischer Aufbau

Die optischen Aufbauten zur Fluoreszenz-Nahfeldmikroskopie mit Zweiphotonenanregung können durch den prinzipiellen Fluoreszenzdetektionsaufbau aus Abschnitt 3.6.1 beschrieben werden. Da sie sich jedoch in Details von dem dort vorgestellten Aufbau unterscheiden, werden sie hier separat erläutert.

In Abbildung 5.1 ist der Aufbau zur Zweiphotonenanregung mit einem Ar-Kr-Mischgaslaser im Dauerstrichbetrieb (Performa, Spectra Physics) gezeigt. Die 647 nm Kr-Linie ist in diesem Laser die stärkste Einzellinie mit einer Leistung von bis zu 1 W. Durch den Rotglasfilter (3mm RG630, Schott) wird das Plasmaleuchten abgeblockt, und die Strahlintensität wird durch den Rauschverminderer (LS-PRO HP, Cambridge Research) stabilisiert und reguliert. Der verwendete dichroitische Strahlteiler (505DRLP, Omega Optical) stammt aus einem Fluoreszenzfiltersatz für Rhodamin, wobei die Anregungs- und Detektionsarme vertauscht wurden. Das Transmissionsspektrum des 505DRLP, aufgenommen

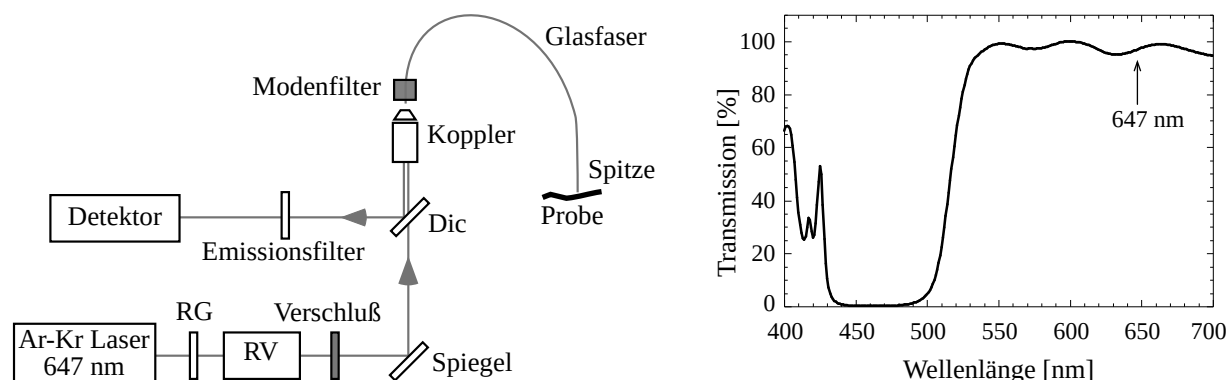


Abbildung 5.1: Schematischer Aufbau der Optik des Nahfeldmikroskops zur Fluoreszenzmikroskopie mit Zweiphotonenanregung mit einem cw-Laser. Der dichroitische Strahlteiler (Dic) ist ein standard Langpaßfilter für die Fluoreszenzmikroskopie mit dem rechts gezeigten Transmissionspektrum. Die Position der Anregungslinie bei 647 nm ist eingezeichnet. RG, Rotglasfilter; RV, Rauschverminderer.

unter 45° Beleuchtung, ist in Abbildung 5.1 rechts gezeigt. Bei diesem Aufbau muß darauf geachtet werden, daß die reflektierende Seite des Filters in Richtung des Faserkopplers zeigt. Dadurch wird die Zahl der vom Licht zu passierenden Oberflächen minimiert. Der 505DRLP-Strahlteiler reflektiert den Bereich von 430 bis 505 nm, in dem die verwendeten DNA-Farbstoffe Ethidium Bromid (EtBr), 4',6'-diamidino-2-phenylindol (DAPI) und der Bisbenzimidazol-Farbstoff Hoechst-33342 (BBI-342) den wesentlichen Teil ihrer Fluoreszenz emittieren. Als Emissionsfilter wurden ein Blauglasfilter (1 mm BG39, Schott) zum Abblocken des Lichtes der Laserdiode zur Scherkraftdetektion und eine Kombination aus den Filtern IF395-515 (Schott) mit einem SWP490 oder einem SWP560 Kurzpaßfilter (Delta Light and Optics, Lyngby, Dänemark) verwendet.

Für Vergleichsmessungen an Proben, die mit dem Farbstoff TO-PRO-3 markiert wurden, der bei 642 nm eine starke Einphotonenabsorption zeigt, wurde ein halbdurchlässiger Spiegel anstelle des dichroitischen Strahlteilers eingesetzt. In diesem Fall diente ein Langpaßfilter (700EFLP, Omega) als Emissionsfilter. Wie schon bei den anderen Fluoreszenzexperimenten wurde als Detektor eine Avalanche-Photodiode (AQ-131, EG&G) verwendet.

Der optische Aufbau mit dem gepulsten Laser ist in Abbildung 5.2 gezeigt. Es wurde ein GE-100-1064-VAN-Laser der Firma Time Bandwidth Products, Zürich, Schweiz verwendet. Dieser Laser ist ein mit einem sättigbaren Absorber passiv modengekoppelter Nd:YVO₄-Laser, der 7 ps lange Pulse mit einer Wiederholrate von 200 MHz bei einer Wellenlänge von 1064 nm emittiert. Die mittlere Ausgangsleistung beträgt etwa 200 mW.

Zum Vergleich der Fluoreszenzanregung durch ein und zwei Photonen wurde ein fre-

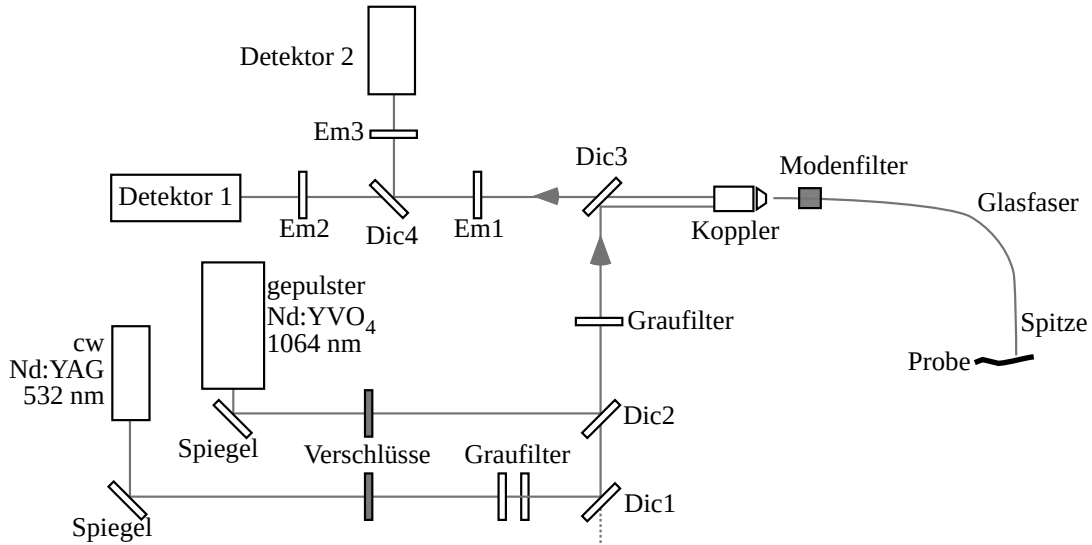


Abbildung 5.2: Schematischer Aufbau der Optik des Nahfeldmikroskops zur Fluoreszenzmikroskopie mit Zweiphotonenanregung mit einem gepulsten Nd:YVO₄-Laser. Die verwendeten dichroitischen Strahlteiler (Dic) und Emissionsfilter (Em) sind im Text aufgeführt.

quenzverdoppelter Nd:YAG-Laser im Dauerstrichbetrieb mit 50 mW Ausgangsleistung bei 532 nm (GCL-050-L, CrystaLaser, Reno, NV, USA) verwendet. Die Emission dieser zwei Laser wurde über zwei dichroitische Strahlteiler (Dic1: 564DRLP, Omega; Dic2: HR1064, Jenoptik, Jena) mit dem Licht des in diesen Experimenten nicht verwendeten Ar-Kr-Mischgaslasers kollinearisiert. Als Strahlteiler, um die Fluoreszenz von der Anregung zu trennen (Dic3), wurde entweder ein für die Anregung bei 1064 nm hochoptimierter dichroitischer Filter (Zwei- und Dreiphotonenexperimente; HR1064, Jenoptik) oder ein dichroitischer Filter (HR532/1064, Jenoptik) verwendet, der sowohl Licht einer Wellenlänge von 1064 nm als auch von 532 nm reflektiert (Ein- und Zweiphotonenexperimente).

Emissionsseitig wurde zunächst das Licht des Infrarotlasers und der Laserdiode, die zur Scherkraftdetektion verwendet wurde, mit Blauglasfiltern (Em1: 1 mm BG40, 2 mm BG39, Schott) abgeschwächt. Das verbleibende Licht wurde je nach Experiment weiter gefiltert. Bei der Ein- und Zweiphotonenanregung wurden ein 605/55 Bandpaßfilter (Em2: Chroma Technology Corp, Brattleboro, VT, USA) und eine Avalanche-Photodiode (Detektor 1: AQ-231, EG&G) zur Detektion verwendet. Bei der gleichzeitigen Detektion der Fluoreszenz nach der Zwei- und Dreiphotonenanregung der Farbstoffe wurde das kürzerwellige Fluoreszenzlicht der Dreiphotonenanregung mit einem dichroitischen Strahlteiler (Dic4: 565DCLP, Chroma) vom Fluoreszenzlicht der Zweiphotonenanregung getrennt und nach dem Passieren eines Kurzpaßfilters (Em3: SWP490, Delta) mit einer separaten APD

(Detektor 2: AQ-131, EG&G) detektiert.

5.2.2 Fluoreszenz-Leistungskurven

Für die Bestimmung der Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals von der Anregungsintensität wurden zwei verschiedene Methoden eingesetzt. Im Falle der cw-Zweiphotonenanregung wurde die Laserintensität durch den Rauschverminderer stabilisiert und reguliert. Dabei wurde der Sollwert der Laserleistung nach dem Rauschverminderer durch eine externe Spannung vorgegeben. Zur Messung der Fluoreszenz-Leistungskurven wurde diese Spannung und damit auch die Laserleistung in 100 bis 250 Schritten von einem minimalen auf einen maximalen Wert vergrößert und dann wieder verringert. Dies wurde automatisch 5 bis 20 mal wiederholt. Während jedes einzelnen dieser Schritte wurde die mit der APD detektierte Fluoreszenzintensität mit einem externen Photonenzähler (SR400, Stanford Research) gemessen und in eine analoge Spannung gewandelt. Die Messung wurde mit Hilfe eines Computers über die Analog-Digital- und Digital-Analog-Konverter des zur Scherkraftdetektion verwendeten Lock-In-Verstärkers gesteuert.

Bei der numerischen Analyse wurde die Abnahme der Signalintensität aufgrund des Bleichens zwischen den einzelnen Kurven mitberücksichtigt. Jede der m Kurven setzt sich aus n Punkten zusammen ($m = 10 \dots 40$, $n = 100 \dots 250$). Aufgrund des Rauschens der einzelnen Messungen ist es nicht möglich, für die m Meßwerte zu einer gegebenen Laserleistung eine Bleichkonstante zu bestimmen. Wenn man jedoch annimmt, daß jeder der n Punkte einer gleichen Bleichrate unterliegt, ist es möglich, den gesamten Datensatz gleichzeitig numerisch an die Funktion $F_n = F_{o,n} \cdot \exp(i/\tau)$ für $i = 0, \dots, m - 1$ anzupassen. Aus dieser Anpassung mit einer globalen Bleichkonstante τ ergeben sich die einzelnen Amplituden $F_{o,n}$, die im weiteren als Meßwerte zu den einzelnen Laserintensitäten verwendet wurden. An sie wird eine Potenzfunktion (Gleichung 5.1) oder ein Polynom zweiter Ordnung (Gleichung 5.2) angepaßt. Für diese Analyse wurden von George Striker entwickelte Programme eingesetzt.

Im Falle der gepulsten Zwei- und Mehrphotonenanregung wurde die Laserintensität durch Veränderung der Graufilter vor dem Einkoppler variiert. Für jede verwendete Filterkombination wurde die in die Glasfaser eingekoppelte Leistung gemessen. Zur Messung der Fluoreszenz-Leistungskurven wurde zu jeder Filterkombination das mit den APDs gemessene Fluoreszenzsignal mit dem Photonenzähler aufgezeichnet. Dabei wurde die eingekoppelte Laserleistung zunächst vergrößert und danach wieder verringert. Um das Ausbleichen der Probe zu minimieren, wurde der elektromechanische Verschluß vor dem Laser erst kurz

vor der Messung der Fluoreszenzintensität geöffnet und direkt danach wieder geschlossen. Die Messung wurde wiederum durch einen Computer gesteuert, wobei die Ansteuerung des Verschlusses über den Digital-Analog-Wandler des Photonenzählers erfolgte.

Für die Messungen der Fluoreszenz-Leistungskurven an den fluoreszenzmarkierten Proben wurde der Abstand zwischen der Spitze und der Probe über die Scherkraftdetektion auf einen konstanten Wert geregelt. Die eingestellte Bildkantenlänge war 0 nm.

5.2.3 Fluoreszenz-Abstandskurven

Abstandskurven wurden dadurch gemessen, daß die Spitze von 2 bis 3 μm oberhalb der Probenoberfläche in den Regelbereich der Scherkraftdetektion gebracht wird. Dazu wird zunächst die Spitze normal an die Probe angenähert. Durch eine Veränderung des Nullpunktes des vom Lock-In-Verstärker generierten Scherkraftsignals ist es möglich, durch den Regelkreis die Spitze vollständig von der Probe zurückzuziehen oder wieder an die Probe anzunähern. Die mit dieser Methode überbrückbare Distanz entspricht in etwa der Hälfte des gesamten z-Hubes der piezoelektrischen Rastereinheit. Als Nullpunkt der z-Achse für jede einzelne Abstandskurve wurde der Meßwert verwendet, bei dem die Scherkraftwechselwirkung einen ersten Maximalwert erreicht.

Da für eine derartige Bewegung der piezoelektrischen Rastereinheit keine Kalibration vorlag, wurde sie zunächst in einer separaten Messung mit Hilfe eines Piezosystems mit integrierten kapazitiven Wegmessern (P-730.20, Physik Instrumente, Waldbronn) kalibriert. Der Aufbau für diese Kalibrationsmessung wird in Abbildung 5.3 gezeigt. Zwischen einem als Probe dienenden Aluminiumspiegel und einem Faserende eines 2×2 Faserkopplers wird

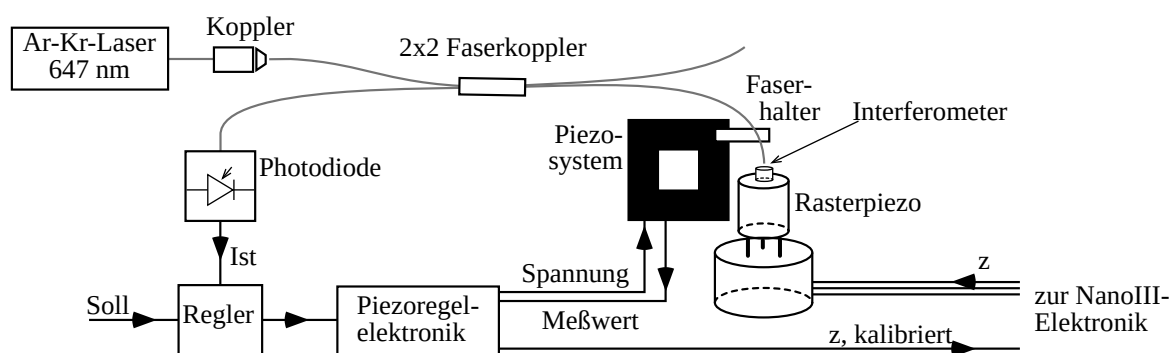


Abbildung 5.3: Aufbau zur Kalibrierung der z-Achse des Rasterpiezos gegen ein Piezosystem mit kapazitiven Wegmessern. Die Bewegung der zwei Piezoelemente wird dadurch synchronisiert, daß ein Interferometer stabilisiert wird.

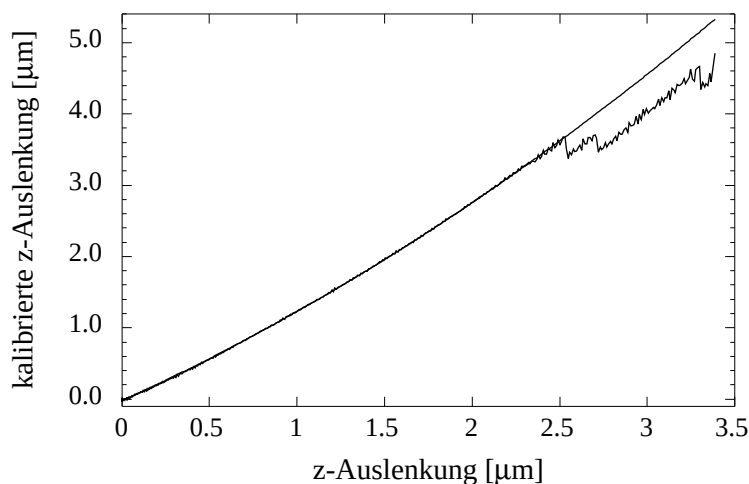


Abbildung 5.4: Beispiel einer Messung zur Kalibration der z-Achse der Rastereinheit. Die Stufen ergeben sich aus Sprüngen zwischen einzelnen Interferenzlinien.

ein Interferometer gebildet. Dabei ist das Faserende fest an das kalibrierte Piezosystem gekoppelt. Mit einem separaten Regelkreis wird dadurch, daß das kalibrierte Piezosystem der Bewegung des unkalibrierten Systems nachgeführt wird, das Interferometer stabilisiert. Über die kapazitiven Wegmesser kann dann die vom NanoScope-System bestimmte z-Bewegung gegen die tatsächliche Bewegung kalibriert werden. In wenigen Messungen trat, aufgrund einer Drift in der Einkopplung des Lasers in den 2×2 Faserkoppler ein Springen zwischen einzelnen Interferenzlinien auf. In Abbildung 5.4 ist eine derartige Messung mit Sprüngen gezeigt. Der Abstand zwischen den Kurven beträgt wie erwartet ein Vielfaches der halben im Interferometer eingesetzten Wellenlänge von 647 nm.

5.3 Anwendung der Zweiphotonenanregung im Nahfeldmikroskop

5.3.1 Fluoreszenz-Nahfeldmikroskopie mit Zweiphotonenanregung Zweiphotonen-Nahfeldmikroskopie mit einem cw-Laser

Die Abbildung 5.5 zeigt die Topographie und die gleichzeitig gemessene Fluoreszenz der über Zweiphotonenabsorption angeregten Farbstoffmoleküle einer mit DAPI gefärbten Probe von Polytänchromosomen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Diese Chromosomen entstehen dadurch, daß im Verlaufe der Embryonal- und Larvalentwicklung sich die

Chromosomen in der Speicheldrüse 9mal duplizieren, ohne daß eine Zellteilung erfolgt. Im dritten Larvenstadium der Fruchtfliege enthalten diese Zellen somit 1024 Chromatiden, die sequenzspezifisch nebeneinander liegen und ein sogenanntes Riesenchromosom bilden. Aufgrund der unterschiedlichen Kondensationsgrade entlang der Chromosomenachse ergeben sich Bänder unterschiedlicher Zusammensetzung und Dichte. Vor dem Fixieren und Färben der Chromosomen werden diese zwischen einem Deckglas und einem Objektträger gequetscht. Dadurch wird aus der dreidimensionalen Struktur ein für die Mikroskopie geeignetes zweidimensionales Präparat (Ashburner, 1989, S. 28f.).

In der Topographie (Abbildung 5.5 A und C) sind die einzelnen Bänder des Chromosoms deutlich zu sehen. Außerdem ist das Chromosom von Resten der Zellen der Speicheldrüse umgeben. Das Chromosom selbst ist zwischen 50 und 270 nm hoch und die es umgebenden Zellbestandteile etwa 150 nm. In den Fluoreszenzbildern (Abbildung 5.5 B und D) hebt sich das Chromosom deutlich von der Umgebung ab, da DAPI vornehmlich an doppelsträngige DNA bindet. Die in der Topographie höheren Bänder werden im Fluoreszenzbild meist von einer Zunahme der Fluoreszenz begleitet, da die der Höhe entsprechende Chromosomenmasse vielfach mit der Menge an DNA einhergeht. In der Detailaufnahme (C) und (D) des in (A) und (B) markierten Bereichs zeigen sich allerdings Unterschiede in der Bandstruktur im topographischen und im Fluoreszenzbild. Die zwei mit den weißen Pfeilen markierten Bänder sind nahezu gleich hoch (C), wobei das rechte Band eine sehr viel hellere Fluoreszenz zeigt (D). Dies kann durch die unterschiedliche Basenzusammensetzung erklärt werden, da DAPI bei der Bindung an DNA-Abschnitte, die überwiegend das Basenpaar Adenin-Thymin (AT) enthalten, eine etwa 20-fache Zunahme der Fluoreszenzquantenausbeute zeigt (Barcellona et al., 1990; Kapuscinski, 1995). Außerdem können im Bereich zwischen zwei hohen Bändern, einem sogenannten *Interband*, die Chromatinfasern, die entlang der Chromosomenachse verlaufen, deutlich gesehen werden (schwarze Pfeile in Abb. 5.5 D). Dem Querschnitt durch das Chromosom (kleine Zeichnung in Abb. 5.5 D) entnimmt man eine Breite von etwa 360 nm für die hellste Faser.

Interessanterweise gehen die Unterschiede zwischen Topographie und Fluoreszenz so weit, daß hohe Bänder im Fluoreszenzbild auch dunkel erscheinen können. In Abbildung 5.6 ist als Beispiel ein derartiges mit DAPI gefärbtes Chromosom gezeigt. Mit Ausnahme des durch den Pfeil markierten Bandes stimmen die meisten Strukturen in den Bildern (A) und (B) überein. In dem durch den Pfeil markierten Band jedoch entspricht eine hohe Topographie einem deutlichen Abfall der Fluoreszenzintensität. Dies kann man noch deutlicher an den in Abbildung 5.6 (C) gezeigten Querschnitten entlang der gestrichelten Linie durch

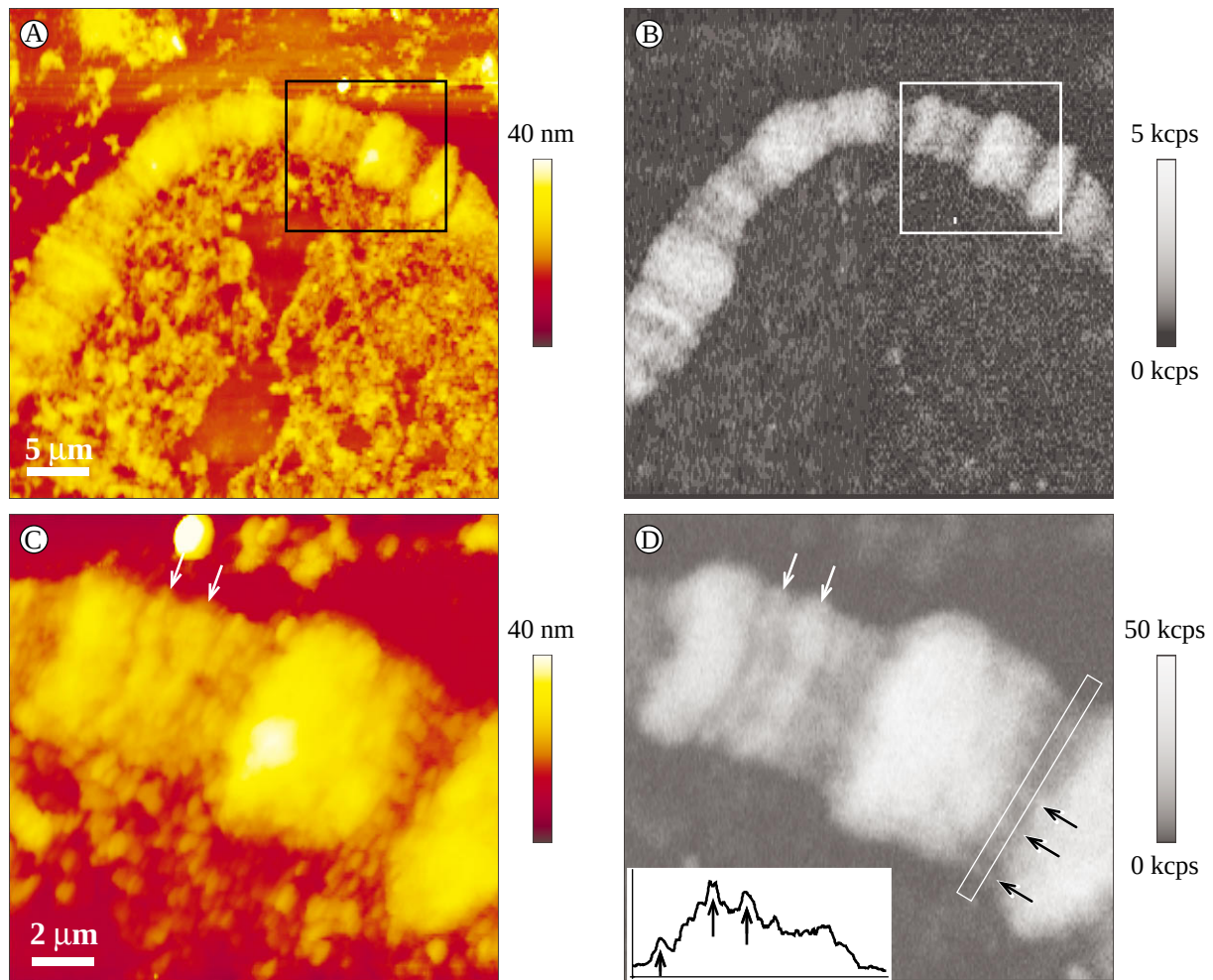


Abbildung 5.5: Nahfeldmikroskopische Aufnahmen von Polytäanchrosomen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, die mit DAPI gefärbt wurden und deren Fluoreszenz durch cw-Zweiphotonenabsorption angeregt wurde. (A) Topographie und (B) Fluoreszenz. (C) und (D) zeigen Topographie und Fluoreszenz von dem in (A) und (B) markierten Rechteck. Die weißen Pfeile weisen auf Bänder gleicher Höhe, aber unterschiedlicher Fluoreszenzintensität, hin. Das Profil in (D) zeigt das Mittel der Profile aus dem markierten weißen Rechteck. Die schwarzen Pfeile weisen auf Chromatinfasern hin. Anregungsintensitäten: (B) 31 mW bei 647 nm, (D) 92 mW bei 647 nm.

diese Bilder sehen. Zum besseren Vergleich sind zwei auffällige Strukturen grau hinterlegt. Im Bereich (I) ist das Band mit dem invertierten Kontrast zu sehen. Aus der Struktur im Bereich (II), bei der Topographie und Fluoreszenz übereinstimmen, erkennt man, daß diese Inversion nicht durch eine Verschiebung der zwei Signale zueinander entstand, sondern tatsächlich durch die Probe gegeben ist. Diese Beobachtung demonstriert deutlich die unterschiedlichen Mechanismen, die im optischen Nahfeldmikroskop zur Bilderzeugung

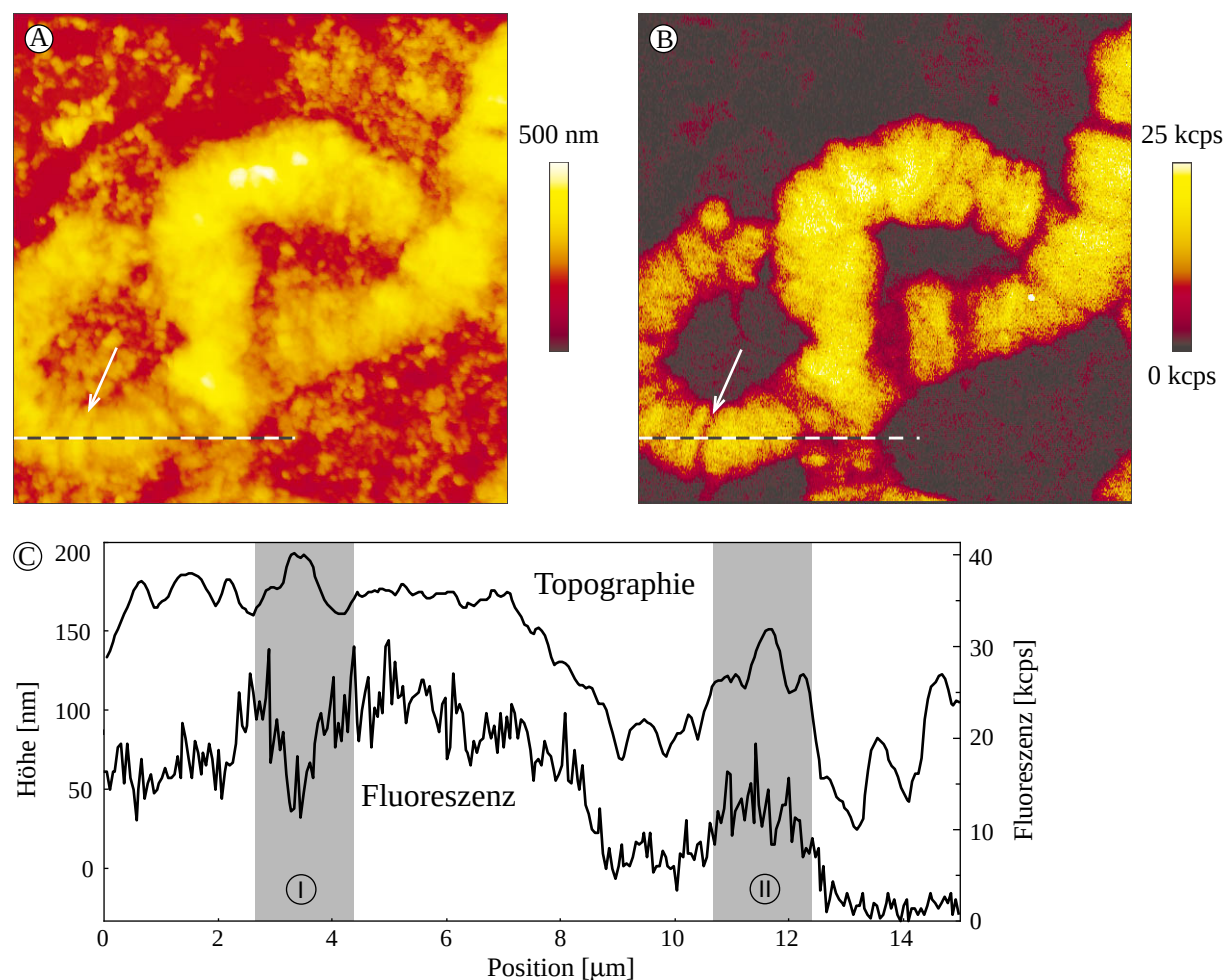


Abbildung 5.6: Nahfeldmikroskopische Aufnahmen von Polytänchromosomen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, die mit DAPI gefärbt wurden und deren Fluoreszenz durch cw-Zweiphotonenabsorption angeregt wurde. (A) Topographie und (B) Fluoreszenz. Der weiße Pfeil weist auf ein Band mit invertiertem Kontrast hin. (C) Topographie- (obere Linie) und Fluoreszenz-Profil (untere Linie) entlang der gestrichelten Linie in (A) und (B). Im Bereich (I) ist das Verhältnis von Fluoreszenz zu Topographie, verglichen mit dem Verhältnis in Bereich (II), invertiert. Anregungsintensität: 68 mW bei 647 nm.

verwendet werden. Das Fluoreszenzsignal ist am stärksten in den Bereichen, die eine hohe Konzentration von AT-Basenpaaren enthalten, wohingegen sich die Topographie im wesentlichen aus der lokalen Massenverteilung ergibt. Die Beachtung dieser Unterschiede ist von großer Bedeutung, wenn die Ergebnisse verschiedener Mikroskopietechniken verglichen werden.

Bei der Untersuchung der DGFP-Verteilung in *Drosophila*-Schneiderzellen (Abschnitt 4.3.3) war gesehen worden, daß auch Fluoreszenzsignale aus dem Inneren von getrockne-

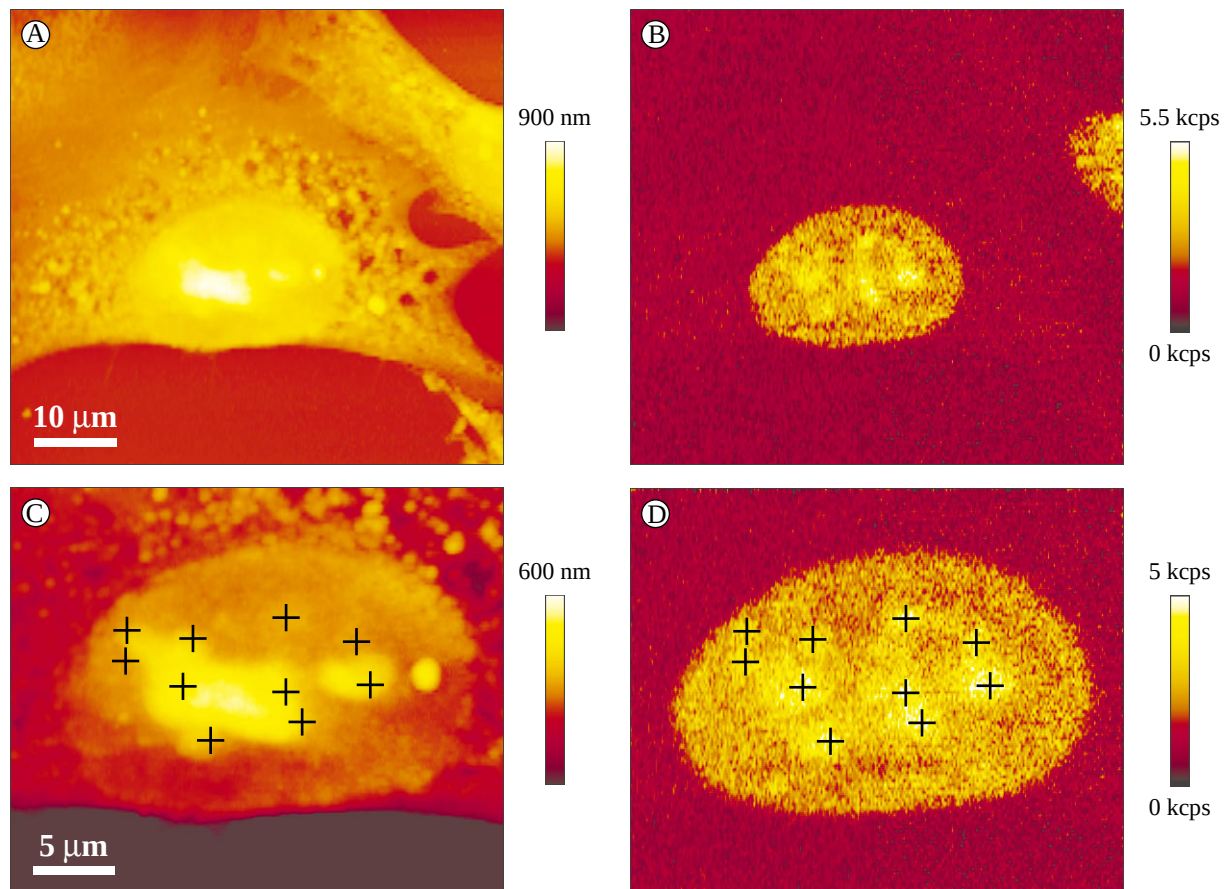


Abbildung 5.7: Nahfeldmikroskopische Aufnahmen von 3T3 Balb/c-Zellen, die mit BBI-342 markiert wurden und deren Fluoreszenz durch cw-Zweiphotonenabsorption angeregt wurde. (A) Topographie und (B) Fluoreszenz einer ganzen Zelle. (C) und (D) zeigen vergrößert die Topographie und Fluoreszenz des Zellkerns. Die Erhebungen in der Topographie sind die Nukleoli, und die hellen Punkte im Fluoreszenzbild die AT-reichen Zentromere. Zum einfacheren Vergleich sind die Positionen der hellen Punkte durch Kreuze markiert. Anregung: (B) und (D) 90 mW bei 647 nm.

ten Zellen im optischen Nahfeldmikroskop detektiert werden können. Das gilt auch bei der Zweiphotonenanregung des Farbstoffes BBI-342, mit dem der Zellkern von 3T3 Balb/c Maus-Fibroblasten gefärbt wurde (siehe z. B. Osborn, 1998). Dies wird dadurch möglich, daß durch den Trocknungsprozeß die Membranen kollabieren und nur eine sehr dünne Schicht über den Strukturen im Zellinneren zurückbleibt. Dadurch wird der Zellkern sowohl im topographischen als auch im Fluoreszenzbild in Abbildung 5.7 (A) und (B) zur auffälligsten Struktur. Der Kern der Zelle im Bildmittelpunkt ist in einer höheren Auflösung in der Abbildung 5.7 (C) und (D) nochmals gezeigt. In der Topographie sind die Nukleoli die höchsten Objekte, die sich 220-300 nm über den Rest des Kernes erheben. In ihnen

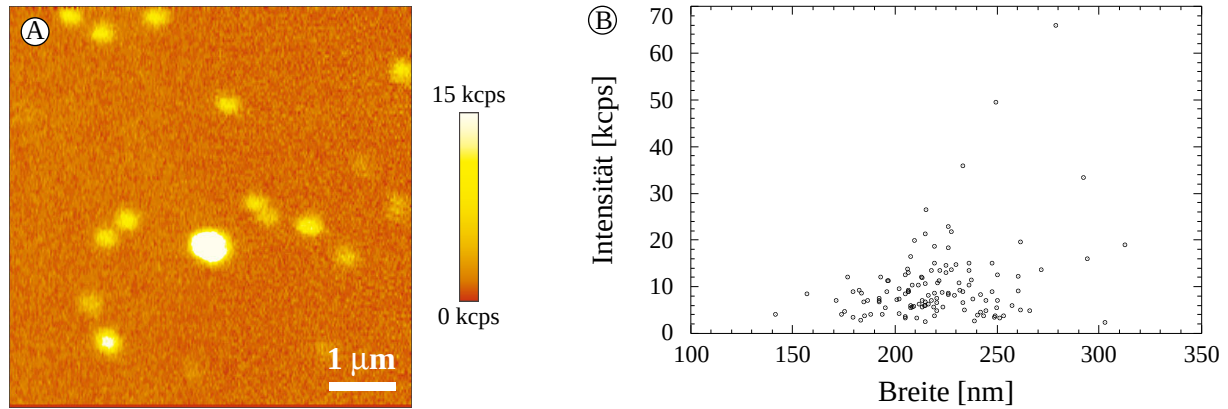


Abbildung 5.8: Analyse der Abbildung von UV-absorbierenden Polymerkugeln mit dem Nahfeldmikroskop mit cw-Zweiphotonenanregung. (A) Fluoreszenzbild mit 23 nm Pixelabstand. (B) Maximalintensität aufgetragen gegen die Breite 2σ von 127 Punkten aus 12 zu (A) vergleichbaren Bildern, bestimmt durch numerisches Anpassen von Gaußkurven an horizontale Schnitte durch die Bilder der Kugeln. Anregung: 146 mW bei 647 nm.

werden die Ribosomen der Zelle produziert, und sie wurden in ähnlichen Proben auch schon mit einem Kraftmikroskop abgebildet (Pietrasanta et al., 1994a). Ihr Durchmesser variiert zwischen 2 und 12 µm. Die hellen Punkte im Fluoreszenzbild sind zumeist um die Erhebungen im topographischen Bild gruppiert (Kreuze in Abbildung 5.7 C und D). BBI-342 färbt, ähnlich wie DAPI, vornehmlich die AT-reichen Bereiche der DNA. Bei diesen Maus-Fibroblasten sind die Zentromere AT-reich, und sie gruppieren sich um die Nukleoli. Im Gegensatz zu letzteren besitzen sie jedoch keine größere Dichte als der Rest des Chromatins im Kern, so daß sie in der Topographie nicht als gesonderte Objekte ausgemacht werden können.

Um die Eigenschaften der Fluoreszenzabbildung mit Zweiphotonenanregung näher zu charakterisieren, wurde eine Probe von fluoreszierenden Polymerkugeln mit einem Durchmesser von durchschnittlich 120 nm untersucht. Diese Kugeln besitzen ein (Einphoton-) Absorptionsmaximum bei etwa 365 nm, emittieren Fluoreszenz im blauen Spektralbereich und sind sehr stabil gegenüber Bleichreaktionen. In Abbildung 5.8 (A) ist das Fluoreszenzsignal einer derartigen Probe gezeigt. In diesem Bild sind 17 einzelne Kugeln zu sehen. Der sehr helle und große Punkt in der Mitte besteht entweder aus einer Verunreinigung oder einer Zusammenlagerung von einer größeren Anzahl von Kugeln. Um ein quantitatives Maß für die Abbildung in diesem Mikroskop zu erhalten, wurde an 127 verschiedene Fluoreszenzsignale aus 12 Bildern jeweils eine Gaußkurve angepaßt, ähnlich wie bei der Analyse der DGFP-Fluoreszenzsignale in der *Drosophila*-Schneiderzelle auf Seite 118. Die

maximale Fluoreszenzintensität dieser Signale ist in Abbildung 5.8 (B) gegen die Breite der Gaußkurve aufgetragen. Im Gegensatz zu den Fluoreszenzsignalen in der Schneiderzelle scheint es hier für größere Objekte keine Abnahme des maximalen Signals zu geben. Der Mittelwert aller Durchmesser beträgt 219 ± 33 nm. Dies bedeutet, daß durch die Abbildung mit diesem optischen Nahfeldmikroskop im *shared-aperture*-Modus mit Zweiphotonenanregung die Kugeln um etwa 100 nm gegenüber dem nominellen Durchmesser der Kugeln vergrößert wiedergegeben werden. Die Größe der Kugeln ist nicht gleich, so daß sich bei ihrer Abbildung eine breite Verteilung wie die in Abbildung 5.8 ergibt. Die nur 140 bis 150 nm großen Bildsignale stellen somit meines Erachtens sehr kleine Kugeln dar.

Bei dieser Art der Zweiphotonenanregung mit einem Dauerstrichlaser bei biologischen Proben ist noch auf eine Beschränkung hinzuweisen. Bei der wiederholten Abbildung desselben Probenbereichs mit schrittweise vergrößerter Anregungsleistung ergab sich plötzlich eine auffällige Veränderung in den erhaltenen Meßbildern. Im Fluoreszenzsignal wurden sehr helle Streifen beobachtet, die keine Ähnlichkeit zu den zuvor erhaltenen Strukturen hatten. In der topographischen Abbildung über die Scherkraftdetektion erzeugte das Objekt keinen Kontrast mehr. Wurde das Anregungslicht abgeblockt, zeigte die topographische Abbildung das völlige Verschwinden des biologischen Objekts im zuvor untersuchten Bereich. Im Gegensatz zu der Beobachtung im Kraftmikroskop, wo sich locker gebundenes Material an die Seiten eines untersuchten Probenbereichs schieben läßt und dort Wälle bildet, waren in diesem Fall keine Anhäufungen von Material zu beobachten.

Wurde die optische Messung bei den ersten Anzeichen von Störungen unterbrochen, konnte ein stabiles topographisches Bild erst wieder nach der drastischen Verringerung der optischen Anregungsleistung erhalten werden. Allerdings war in diesem Fall das Fluoreszenzsignal durch Zweiphotonenanregung zu schwach, um ein Bild zu ergeben. Die Stabilität der biologischen Proben erwies sich, solange keine starke Einphotonenabsorption auftrat, als unabhängig von der Feuchtigkeit der Probe oder der Gegenwart eines Farbstoffes, der im UV-Bereich absorbiert. Aus diesen Beobachtungen muß geschlossen werden, daß die Schädigung der Probe nicht wesentlich durch thermische Effekte gegeben ist, sondern sich eher aus chemischen Reaktionen wie der Erzeugung freier Radikale ergibt, die die beobachtete Hysterese erklären können.

Für den Vergleich der Anregung durch ein und zwei Photonen wurden auch Polytän-Chromosomen sowohl mit TO-PRO-3 als auch mit einem im UV absorbierenden Farbstoff markiert. TO-PRO-3 zeigt eine starke Einphotonenabsorption bei 642 nm mit einem Fluoreszenzemissionsmaximum bei 666 nm. Es war möglich, Fluoreszenzbilder durch Einpho-

tonenanregung des TO-PRO-3 zu erhalten. Allerdings waren die Proben für die Zweiphotonenanregung des UV-Farbstoffes zu empfindlich. Wahrscheinlich lag dies an einer hohen thermischen Belastung aufgrund der Absorption durch TO-PRO-3 oder an einer Schädigung der DNA durch photochemische Reaktionen mit dem Farbstoff TO-PRO-3, wie sie z. B. von Åkerman und Tuite (1996) beschrieben wurden.

Zweiphotonen-Nahfeldmikroskopie mit einem gepulsten Laser

In Abbildung 5.9 ist das topographische Regelsignal und die Fluoreszenz einer menschlichen Brustkrebszelle (MCF-7) gezeigt, bei der die Mitochondrien mit MitoTracker Orange CM-H₂TMRos (M-7511; Molecular Probes, Leiden, Niederlande) markiert wurden. In den Mitochondrien erfolgt die oxidative Umsetzung von Zucker und Fettsäuren und die Synthese von energiereichem ATP (Adenosintriphosphat), welches zum Antrieb vieler biochemischer Reaktionen in der Zelle verwendet wird. Die Mitochondrien bestehen im wesentlichen aus zwei Membranen, die zwei Räume vom Zytoplasma abtrennen. Ihre Form ist sehr variabel, und sie sind oft um Mikrotubuli des Zellskeletts oder in Bereichen hohen ATP-Bedarfs gruppiert. Sie dringen nicht in den Zellkern ein.

Im Topographiebild 5.9 (A) kann man den Zellkern an der etwas glatteren Oberflächenstruktur erkennen. Die großen herausragenden Objekte sind wieder Nukleoli. Im Fluoreszenzbild 5.9 (B) sind die Mitochondrien klar erkennbar. Sie konzentrieren sich auf einen Bereich im Zytoplasma nahe am Zellkern. Die Mitochondrien, die sich am unteren Bildrand

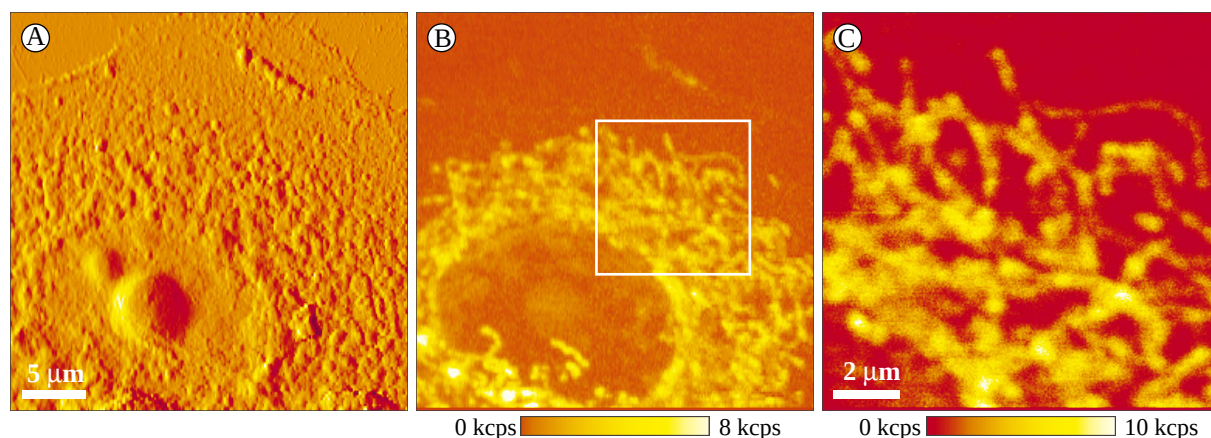


Abbildung 5.9: Zweiphotonen-Nahfeldmikroskopische Aufnahmen von MCF-7-Zellen, deren Mitochondrien mit MitoTracker markiert wurden. (A) Topographisches Regelsignal und (B) Fluoreszenzintensität. (C) zeigt den in (B) markierten Bereich vergrößert. Die Mitochondrien sind als längliche Bänder zu sehen. Anregung: 25 mW bei 1064 nm.

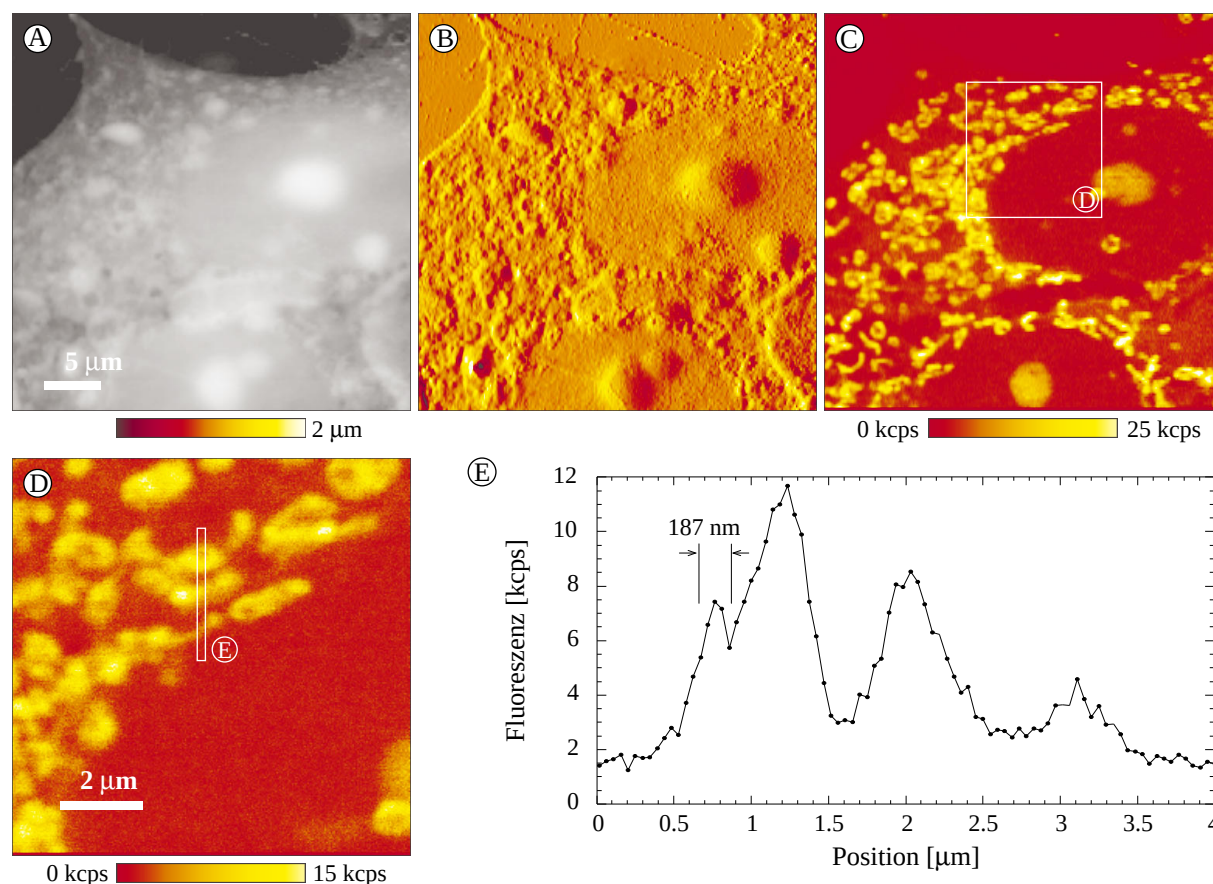


Abbildung 5.10: Zweiphotonen-Nahfeldmikroskopische Aufnahmen von MCF-7-Zellen, deren Mitochondrien mit MitoTracker markiert wurden. (A) Topographie, (B) topographisches Regelsignal und (C) Fluoreszenzintensität. Der in (C) markierte Bereich ist in (D) nochmals dargestellt. Das Profil in (E) ist das Mittel der Profile des markierten Rechtecks in (D). Anregungsintensitäten: (C) und (D) 28 mW bei 1064 nm.

im Bereich des Zellkerns befinden, liegen wahrscheinlich auf dem Zellkern. In der vergrößerten Aufnahme (C) kann man die langgestreckte Form der Mitochondrien gut erkennen.

Ein ähnliches Präparat ist in Abbildung 5.10 abgebildet. In (A) und (B) sind die Topographie und das topographische Regelsignal zu sehen. Im Gegensatz zu den in Abbildung 5.7 untersuchten Maus-Fibroblasten ist hier der Zellkern in etwa gleich hoch wie das ihn umgebende Cytoplasma. Im dazugehörigen Fluoreszenzbild (C) sieht man, daß der Fluoreszenzmarker MitoTracker sich nicht nur in den Mitochondrien, sondern zum Teil auch in den Nukleoli anreichert. Die feiner strukturierten Objekte im Bereich des Zellkerns sind vermutlich wiederum Mitochondrien, da sie sich nicht in der Topographie abzeichnen. In diesen Zellen sind die Mitochondrien jedoch nicht langgestreckt wie in Abbildung 5.9, son-

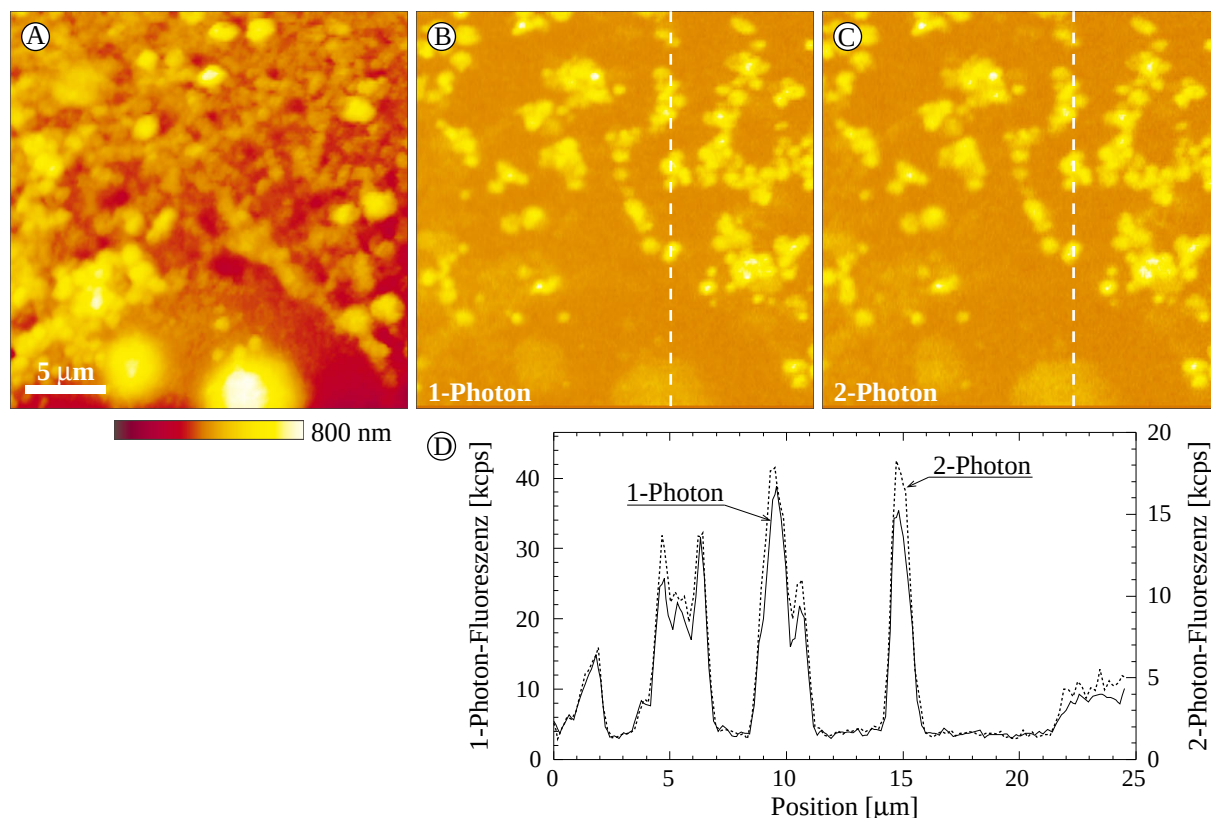


Abbildung 5.11: Vergleich der Anregung durch Ein- bzw. Zweiphotonenabsorption im Nahfeldmikroskop an MCF-7-Zellen, die mit MitoTracker markiert wurden. (A) Topographie, (B) und (C) Fluoreszenzsignal nach Anregung des Farbstoffes durch Absorption eines Photons bei 532 nm (B) bzw. Absorption von zwei Photonen bei 1064 nm (C). (D) Fluoreszenzprofile entlang der weißen Linien in (B) und (C). Anregung: (B) 3.3 μ W bei 532 nm, (C) 33 mW bei 1064 nm.

dern nehmen eine ringförmige Struktur an. Da in ihnen die Reaktionen der Atmungskette ablaufen, kann ihre Form durch den Sauerstoffgehalt direkt vor der Fixierung beeinflusst sein. In Abbildung 5.10 (D) ist der in (C) markierte Bereich nochmals vergrößert aufgenommen worden. Dem Fluoreszenzprofil in (E), welches sich aus der Mittelung über den markierten Bereich ergibt, entnimmt man, daß die kleinsten lateralen Strukturgrößen unter 200 nm liegen. Dies ist weniger als ein Fünftel der verwendeten Anregungswellenlänge.

Bei den bisherigen Messungen an fluoreszent markierten Mitochondrien wurde nur der gepulste Nd:YVO₄-Laser mit Anregungsleistungen von 25 mW (Abb. 5.9) bzw. 28 mW (Abb. 5.10) bei 1064 nm verwendet. In Abbildung 5.11 ist dagegen nun die Abbildung einer derartigen Probe mit dem frequenzverdoppelten Nd:YAG-Laser (B) und dem gepulsten Nd:YVO₄-Laser (C) gezeigt. Für die Messung wurde bei der Bewegung der Spitze von links nach rechts der Nd:YAG- und bei der Rückbewegung der Nd:YVO₄-Laser verwen-

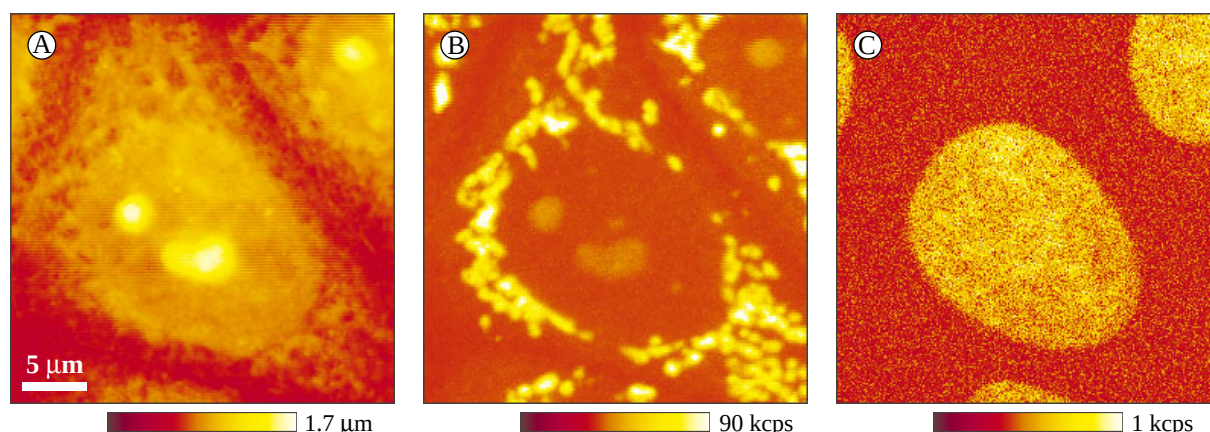


Abbildung 5.12: Simultane Zwei- und Dreiphotonanregung von Farbstoffen im Nahfeldmikroskop an MCF-7-Zellen, die mit MitoTracker und BBI-342 markiert wurden. (A) Topographie, (B) Fluoreszenz des über Zweiphotonenabsorption angeregten MitoTrackers und (C) Fluoreszenz des über Dreiphotonenabsorption angeregten BBI-342 DNA-Farbstoffes. Anregung: 51 mW bei 1064 nm

det. Dadurch werden von derselben Probenregion quasi-simultan zwei Fluoreszenzbilder mit verschiedenen Lasern als Anregungslichtquelle erhalten. Dabei waren die Leistungen so weit angepaßt, daß sich größenordnungsmäßig die gleichen Fluoreszenzzählraten ergaben. Neben den hellen Mitochondrien können auch die etwas schwächer gefärbten Nukleoli erkannt werden. Zwischen den Strukturen in der Topographie und der Fluoreszenz der Mitochondrien ist keine Korrelation feststellbar. Die zwei Fluoreszenzbilder (B) und (C) sind sich sehr ähnlich. In den normierten Autokorrelationen ist kein Unterschied feststellbar, und nur das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis ist bei der Zweiphotonenanregung geringfügig besser, wie an den zwei in (D) gezeigten Profilen zu sehen ist. Die Skala für das Fluoreszenzsignal nach der Zweiphotonenanregung wurde um den Faktor 2.32 gestreckt. Das Fluoreszenz-zu-Hintergrund-Verhältnis ist um 16 % größer als bei der Einphotonenanregung.

Der gepulste Nd:YVO₄-Laser bietet allerdings nicht nur die Möglichkeit der Zweiphotonenanregung von Farbstoffen, sondern es ist auch möglich, Farbstoffe, die im UV-Bereich absorbieren, durch die simultane Absorption von drei Photonen anzuregen. Die Energie dieser drei Photonen entspricht der Energie eines Photons bei einer Wellenlänge von 355 nm. Damit ist es möglich, neben einem durch Zweiphotonenabsorption anregbaren Farbstoff wie MitoTracker gleichzeitig Farbstoffe durch Dreiphotonenabsorption anzuregen, die ihr Absorptionsmaximum im nahen UV-Bereich haben. In Abbildung 5.12 wird eine Zelle gezeigt, die mit MitoTracker und BBI-342 markiert wurde. Die Fluoreszenz der zwei verschiedenen

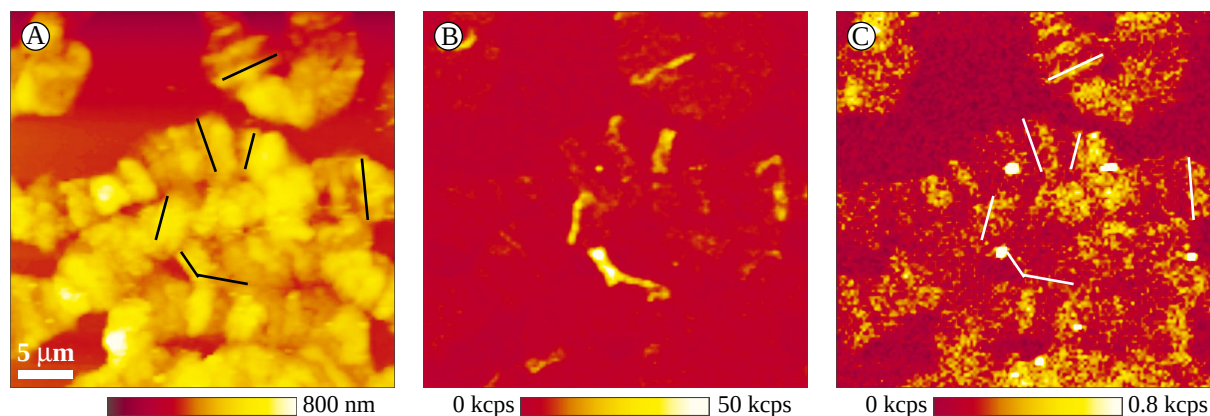


Abbildung 5.13: Simultane Zwei- und Dreiphotonanregung von Farbstoffen im Nahfeldmikroskop an Polytänchromosomen von *Drosophila melanogaster*. Die Chromosomen wurden mit einem polyklonalen Antikörper aus Kaninchen gegen das *Drosophila*-Protein Polyhomeotic und dann mit einem mit Cy3 fluoreszent markierten Ziege-anti-Kaninchen F(ab')₂-Fragment markiert. Außerdem wurde der DNA-Farbstoff DAPI eingesetzt. (A) Topographie, (B) Fluoreszenz des über Zweiphotonenabsorption angeregten Cy3-Farbstoffes und (C) Fluoreszenz des über Dreiphotonenabsorption angeregten DAPI. Zum Vergleich wurden die Positionen der mit Cy3 markierten Bänder durch Linien im Topographie- und DAPI-Bild markiert. Anregung: 48 mW bei 1064 nm.

Farbstoffe wurde in getrennten Kanälen aufgezeichnet. Im Zweiphotonensignalkanal (B) ist ein den vorigen Messungen ähnelndes Bild, mit sich um den Zellkern gruppierenden Mitochondrien, zu sehen. Aufgrund des großen Unterschieds in den Emissionswellenlängen der zwei Farbstoffe ist eine gute Trennung der Signale möglich. Daher ist die Fluoreszenz der gefärbten Mitochondrien im Dreiphotonenkanal (C) nicht sichtbar, sondern ausschließlich die Fluoreszenz des mit BBI-342 gefärbten Kernes. Die Intensität der BBI-342-Fluoreszenz ist dabei etwa achzigmal schwächer als die des MitoTrackers. Da diese Zellen von einer menschlichen Zelllinie stammen, sind die bei den Maus-Fibroblasten beobachteten Zentromere hier nicht sichtbar.

Auch bei mit DAPI gefärbten Polytänchromosomen von *Drosophila melanogaster* ergibt die Anregung durch die simultane Absorption von drei Photonen ein deutlich schlechteres Signal als die Anregung mit zwei Photonen aus dem roten Spektralbereich. Ein Beispiel ist in Abbildung 5.13 gezeigt. Das Chromosom wurde mit DAPI und über eine indirekte Antikörperfärbung gegen das *Drosophila*-Protein *polyhomeotic*, welches in nur wenigen Bändern vorkommt, mit dem Farbstoff Cy3 markiert. Neben der in (A) gezeigten Topographie ist die durch Zweiphotonenabsorption angeregte Fluoreszenz des Cy3-Farbstoffes (B) und die gleichzeitig aufgezeichnete DAPI-Fluoreszenz (C) gezeigt. Im DAPI-Signal sind schwach einzelne Bänder zu erkennen, wohingegen der Antikörper sehr klar einzelne Bänder

markiert. Zum besseren Vergleich der Verteilung der Signale sind die Positionen der Banden des Antikörpers in den anderen zwei Signalkanälen durch Linien markiert. Neben den Banden sieht man in (B) auch noch ein schwaches, über das gesamte Chromosom verteiltes Signal. Dies entsteht vermutlich durch die unspezifische Bindung des Antikörpers an die Probe. Es bleibt noch anzumerken, daß bei der hier verwendeten Anregungsleistung von 48 mW das Fluoreszenzsignal des Antikörpers in aufeinanderfolgenden Messungen schon deutliches Bleichen zeigte, wohingegen die DAPI-Fluoreszenz unverändert blieb. Dies ist bei Berücksichtigung des geringen Fluoreszenzsignals und damit der geringen Anregung der DAPI-Moleküle einfach zu verstehen.

5.3.2 Fluoreszenz-Leistungskurven

Fluoreszenz-Leistungskurven mit einem cw-Laser

Einer der überzeugendsten Nachweise, daß eine Anregung über einen Zweiphotonenprozeß erfolgt, ist die Messung der Abhängigkeit der Anregung von der Anregungsintensität. Im Falle von fluoreszierenden Molekülen kann die Anregung sehr einfach über die Fluoreszenz nachgewiesen werden. In Abbildung 5.14 ist die Abhängigkeit der Fluoreszenz verschiedener Farbstoffe von den verwendeten Laserintensitäten für die Anregung mit dem cw-Ar-Kr-Mischgaslaser gezeigt. In den Abbildungen 5.14 (A), (B) und (C) befand sich die Glasfaserspitze in Kontakt mit Chromosomen, die mit DAPI, BBI-342 und EtBr gefärbt waren. In (D) ist zum Vergleich dazu die gleiche Messung nur für die Glasfaser ohne Probe gezeigt.

Für die Beschreibung dieser Kurven können verschiedene Funktionen verwendet werden. Die am häufigsten verwendete Funktion ist eine Potenzkurve (siehe z. B. Denk et al., 1990; Curley et al., 1992; Xu und Webb, 1996).

$$F = d \cdot I^e + f \quad (5.1)$$

Dabei ist I die Anregungsintensität und F das Fluoreszenzsignal. Die Parameter d , e und f werden numerisch angepaßt und stellen die Amplitude, die Ordnung der Potenzfunktion und eine von der Anregung unabhängige Dunkelzählrate dar. Im Falle eines linearen Zusammenhangs zwischen der Fluoreszenz und der Anregungsintensität sollte e den Wert 1 annehmen, bei einer reinen Zweiphotonenanregung den Wert 2 und im Falle von Dreiphotonenanregung den Wert 3. Treten mehrere Prozesse gleichzeitig auf, so wird e einen Wert zwischen den Ordnungen der beteiligten Prozesse annehmen. Die Gleichung 5.1 beschreibt

dann keinen physikalischen Prozeß mehr, sondern liefert über den Wert von e ein qualitatives Maß dafür, von welcher Ordnung die auftretenden Prozesse sind, und welcher Prozeß den dominanten Signalbeitrag liefert.

In der Tabelle 5.1 sind die für die in Abbildung 5.14 gezeigten Messungen die Werte des Parameters e und die Mittelwerte $\langle e \rangle$ dieser Parameter über alle Messungen angegeben. Für die Proben mit Fluoreszenzfarbstoffen liegt der Wert von e sehr nahe bei dem erwarteten Wert 2, wohingegen er bei der Glasfaser Spitze eindeutig kleiner als 2 ist. Dies

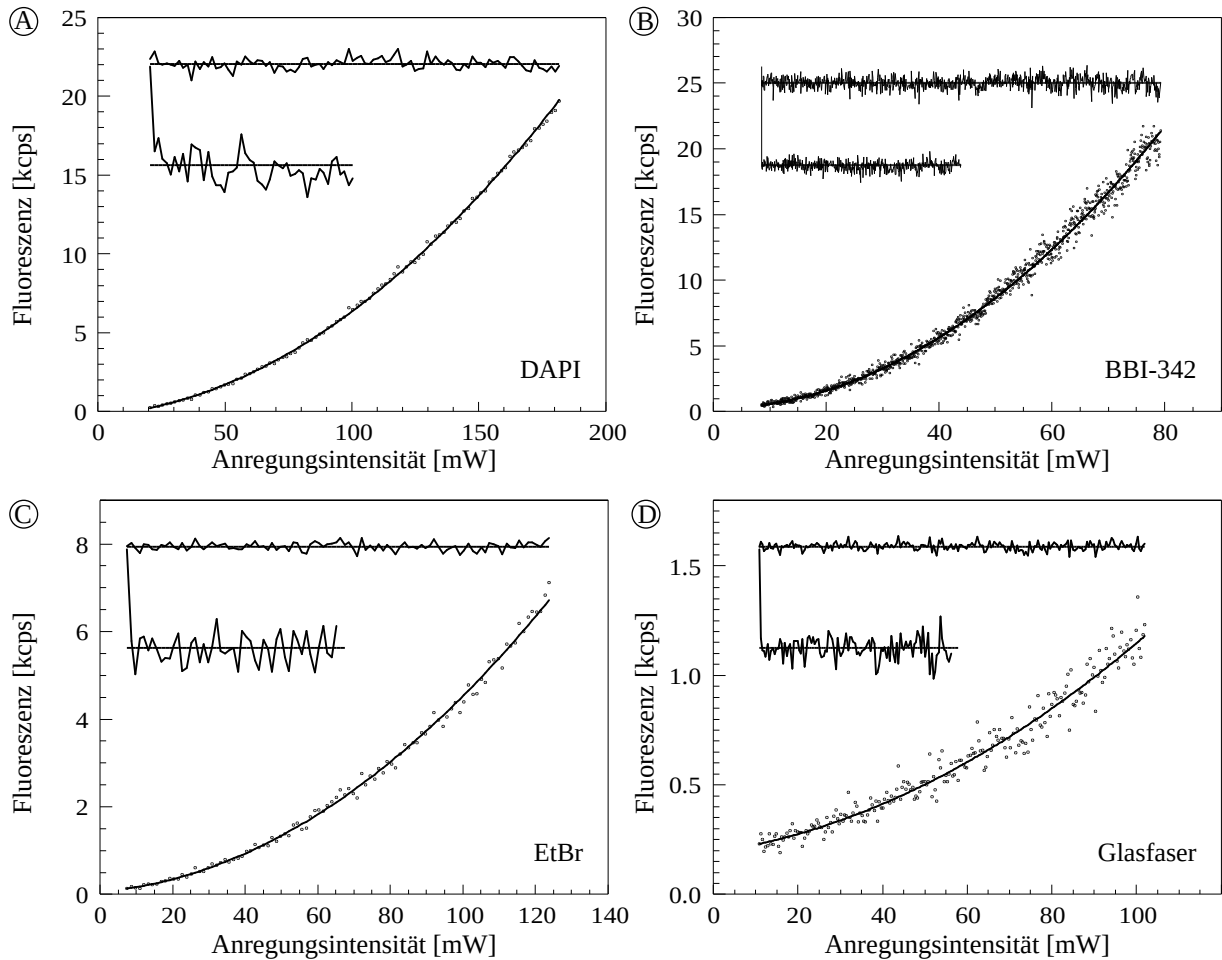


Abbildung 5.14: Mit dem cw-Ar-Kr-Laser aufgenommene Fluoreszenz-Leistungskurven auf Polytänchromosomen, die mit (A) DAPI, (B) BBI-342 und (C) EtBr gefärbt wurden. (D) zeigt die gleiche Messung für eine etwa 70 cm lange Glasfaser mit Faserspitze ohne Probe. Die Graphen der numerisch angepassten Polynome zweiter Ordnung (Gleichung 5.2) sind als durchgezogene Linie miteingezeichnet. Die weiteren Kurven zeigen die Residuen (oben) und die Autokorrelation der Residuen (unten). Zur Darstellung sind die Ordinaten in kcps skaliert. Die Meßzeit pro Datenpunkt betrug 0.1 s in (A), (C) und (D), und 0.02 s in (B).

Tabelle 5.1: Ergebnisse der numerischen Anpassung der Fluoreszenz-Leistungskurven aus der Abbildung 5.14. Die Werte von a , bI und cI^2 geben die in 0.1 s detektierten Ereignisse bei einer Anregungsintensität von 100 mW an.

Probe	a	bI	cI^2	e	$\langle e \rangle$
DAPI	-27	118	543	1.9	1.88 ± 0.18
BBi-342	25	20	3360	2.0	1.92 ± 0.09
EtBr	6	65	381	1.9	1.91 ± 0.02
Glasfaser ohne Probe	19	27	58	1.7	1.76 ± 0.12

bedeutet, daß in diesem Fall auch ein Signalanteil mit linearer Abhängigkeit von der Anregungsintensität auftrat. Dieser Signalanteil stammt vermutlich von nicht abgeblocktem Anregungslicht. Der nichtlineare Anteil zum Fluoreszenzsignal der Faser stammt vermutlich von Verunreinigungen im Faserkern. Aufgrund der Länge der Faser von ca. 70 cm können auch sehr schwache Prozesse ein detektierbares Signal ergeben.

Eine alternative Beschreibung des Zusammenhangs zwischen dem Fluoreszenzsignal und der Anregungsintensität verwendet ein Polynom zweiter Ordnung:

$$F = a + bI + cI^2 \quad (5.2)$$

Damit wird den einzelnen möglichen Signalbeiträgen Rechnung getragen. a ist wiederum ein von der Anregungsintensität unabhängiger Hintergrund. bI sind lineare Beiträge, die auch nicht durch die Filter abgeblocktes Anregungslicht enthalten. cI^2 schließlich stellt den nichtlinearen Anteil aufgrund der Zweiphotonenabsorption dar. In der Abbildung 5.14 sind die Meßdaten zusammen mit den numerisch angepaßten Polynomen zweiter Ordnung gezeigt. Die gute Qualität dieser Anpassung kann von den normalisierten Residuen und ihrer Autokorrelation abgelesen werden. Im Rahmen dieser Messungen war es nicht möglich, Unterschiede in der Qualität der numerischen Anpassungen an die Gleichung 5.1 oder 5.2 festzustellen. Über dem gesamten Intensitätsbereich war der Unterschied zwischen den durch die Gleichungen beschriebenen Kurven kleiner als die durch das Poisson-Rauschen gegebene Einhüllende der Daten.

Die Beiträge der drei Terme a , bI und cI^2 aus Gleichung 5.2 zum Fluoreszenzsignal sind in der Tabelle 5.1 gegeben. Sie wurden auf eine Anregungsintensität von 100 mW bezogen. Es ist deutlich zu sehen, daß für die gefärbten Proben der nichtlineare Term cI^2 den dominierenden Beitrag zum Signal liefert, wie auch aus dem Wert des Exponenten e von nahezu 2 zu erwarten war. Im Falle der Glasfaser dagegen ist der Beitrag des konstanten und des linearen Terms mit dem Beitrag des nichtlinearen Terms vergleichbar. Dies ist

wieder in Übereinstimmung mit dem deutlich von 2 verschiedenen Wert von e . In diesem Zusammenhang muß darauf hingewiesen werden, daß bei diesen Experimenten nur das qualitative Verhalten verglichen werden kann. Die absoluten Zählraten können nicht verglichen werden, da die Messungen mit verschiedenen Sonden an unterschiedlichen Proben mit sich unterscheidenden Farbstoffen, Farbstoffkonzentrationen und Filterkombinationen durchgeführt wurden.

Mit dieser Beschreibung durch ein Polynom zweiter Ordnung wurde versucht, die physikalischen Prozesse, die zum beobachteten Signal führen, zu beschreiben. Allerdings beschreibt auch dieser Ansatz die physikalischen Vorgänge nicht vollständig, wie an dem kleinen negativen konstanten Anteil zum Fluoreszenzsignal bei der mit DAPI gefärbten Probe gesehen werden kann. Die physikalischen Prozesse, die nicht berücksichtigt wurden, sind entweder höherer Ordnung oder besitzen eine andere Abhängigkeit von der Anregungsintensität, die nicht über einen einzigen Term in einem Polynom beschrieben werden kann. Beispiele für derartige, in Gleichung 5.2 nicht berücksichtigte, Prozesse sind:

- Bleichen. Durch den Wechsel der Richtung, in der die Fluoreszenz-Leistungskurven aufgezeichnet wurden, und die gleichzeitige globale Analyse der Daten wurde versucht, den Einfluß von Bleichprozessen zu minimieren. Die dabei gemachten Annahmen, wie z. B. einer einzigen Bleichkonstanten, können durchaus nicht angebracht sein, so daß sich ein anderer funktionaler Zusammenhang für die Meßdaten ergibt.
- Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute. Wenn man von einem negativen linearen Temperaturkoeffizienten der Fluoreszenzquantenausbeute ausgeht, erhält man einen Term dritter Ordnung mit negativem Vorfaktor.
- Nichtlineare Effekte höherer Ordnung. Zum Beispiel ergibt eine Dreiphotonenabsorption im Fluoreszenzsignal einen kubischen Term mit positivem Vorfaktor.

Fluoreszenz-Leistungskurven mit einem gepulsten Laser

Mit dem gepulsten Nd:YVO₄-Laser wurden Fluoreszenz-Leistungskurven auf mit MitoTracker markierten Mitochondrien und mit DAPI gefärbten Polytänchromosomen von *Drosophila melanogaster* gemessen. Da hierbei die Anregungsintensität durch Austauschen von Graufiltern variiert wurde, konnten im Vergleich zu den Messungen mit dem cw-Laser nur zu wenigen unterschiedlichen Leistungen Meßwerte aufgezeichnet werden. Sie sind in der Abbildung 5.15 als Punkte (ansteigende Laserleistung) und Kreuze (abnehmende Laserleistung) eingezeichnet.

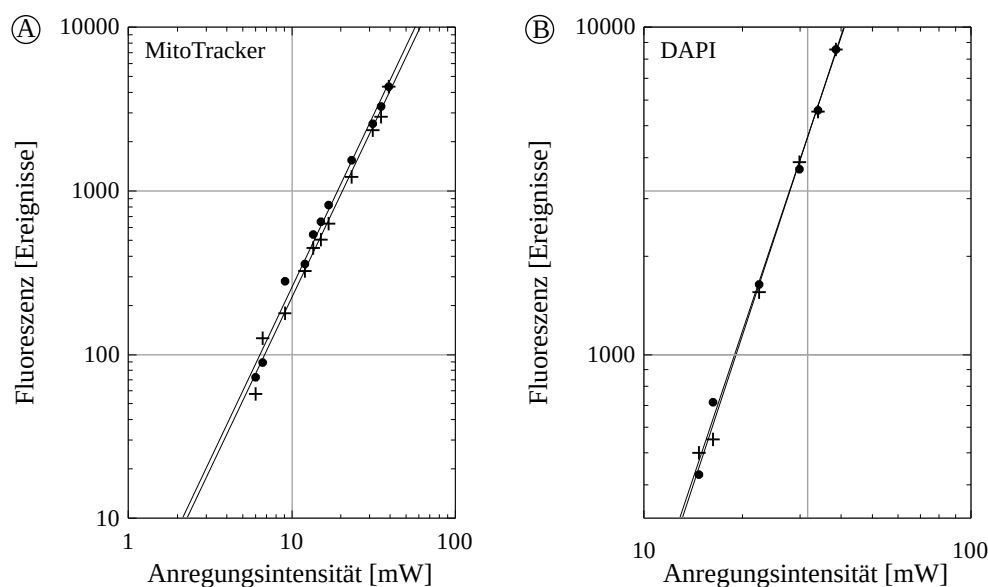


Abbildung 5.15: Mit dem gepulsten Nd:YVO₄-Laser aufgenommene Fluoreszenz–Leistungskurven auf einem mit MitoTracker markierten Mitochondrium einer MCF-7-Zelle (A) und einem mit DAPI gefärbten Polytänchromosom (B). Die Laserintensität wurde über Graufilter variiert. Punkte markieren die Anzahl der Detektionsereignisse bei ansteigender und Kreuze bei absteigender Laserleistung. Die Linien sind die Graphen der numerisch angepaßten einfachen Exponentialfunktion aus Gleichung 5.3, die in der doppelt logarithmischen Darstellung Geraden sind. Die Zählzeit betrug 0.3 s in (A) und 20 s in (B).

Für die Messung (A) auf dem Mitochondrium wurde zunächst das Fluoreszenzbild einer Zelle mit dem Nahfeldmikroskop aufgezeichnet und dann die Glasfaser Spitze über einem hellen Objekt positioniert. Mit zwei Graufiltern in Serie wurde die Anregungsintensität über eine Größenordnung variiert. Die Zählzeit betrug 0.3 s. Für die Messung (B) an dem mit DAPI gefärbten Polytänchromosom wurde die Position anhand der Topographie der Probe ausgewählt, da DAPI das gesamte Chromosom färbt. Da die Zählraten sehr gering waren, wurde nur ein einziger Graufilter verwendet und die Integrationszeit auf 20 s erhöht.

Von den gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden die experimentell bestimmte Dunkelzählrate ohne anregenden Laser abgezogen. An diese Meßwerte wurde die einfache Po-

Tabelle 5.2: Ergebnisse der numerischen Anpassung der Fluoreszenz–Leistungskurven aus der Abbildung 5.15.

Farbstoff	$\langle e \rangle$
MitoTracker Orange	2.10 ± 0.11
DAPI	2.94 ± 0.07

tenzfunktion

$$F = d \cdot I^e \quad (5.3)$$

numerisch angepaßt. Die Mittelwerte der Parameter e sind in der Tabelle 5.2 aufgeführt. Sie liegen sehr nahe an den erwarteten Werten von 2 und 3 und bestätigen damit, daß die detektierte Fluoreszenz tatsächlich von über einen Zwei- bzw. Dreiphotonenabsorptionsprozeß angeregten Farbstoffmolekülen stammt.

5.3.3 Fluoreszenz-Abstandskurven

Fluoreszenz-Abstandskurven mit einem cw-Laser

Eine Folge der quadratischen Abhängigkeit der Fluoreszenzanregung von der Anregungsintensität bei Zweiphotonenanregung ist, daß im Konfokalmikroskop entlang der optischen Achse eine Einschränkung der Anregung auf den Bereich um den Fokus erfolgt. Dadurch erhält man eine dreidimensionale Auflösung ohne den Einsatz einer Blende in der Bildebene (Denk et al., 1990). Der dazu im Nahfeldmikroskop korrespondierende Effekt ist in Abbildung 5.16 gezeigt. Es ist die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Distanz zwischen Probe und Sonde gezeigt. Als Proben dienten Polytänchromosomen, die mit DAPI (Abb. 5.16 A) bzw. TO-PRO-3 (Abb. 5.16 B) gefärbt wurden. Die DAPI-Fluoreszenz wird durch die Absorption von zwei, die TO-PRO-3-Fluoreszenz durch die Absorption von einem Photon der gleichen Wellenlänge angeregt. In der Abbildung 5.16 (A) sind 13 nacheinander aufgezeichnete Annäherungskurven gezeigt. Es ist keine Verringerung des Signals aufgrund des Ausbleichens des Farbstoffes festzustellen. Im Gegensatz dazu sind in Abbildung 5.16 (B) nur die erste, dritte und neunte Annäherungskurve an ein mit TO-PRO-3 gefärbtes Chromosom gezeigt. Die Abnahme des Fluoreszenzsignals aufgrund von Bleichprozessen ist deutlich zu sehen.

Zur Beschreibung wurde eine doppelt exponentielle Funktion an die Kurven numerisch angepaßt:

$$F_i(z) = g_i \cdot e^{-z/z_1} + h_i \cdot e^{-z/z_2} + k_i \quad (5.4)$$

Dabei ist $F_i(z)$ die Fluoreszenzintensität bei der i -ten Annäherung im Abstand z von der Probe. z_1 und z_2 sind globale Abfallängen, die sich aus der Anpassung aller Annäherungskurven eines Experimentes ergeben. g_i , h_i und k_i sind die Amplituden der Exponentialfunktionen und der Hintergrund bei der i -ten Annäherung. Die durchgezogenen Linien in den

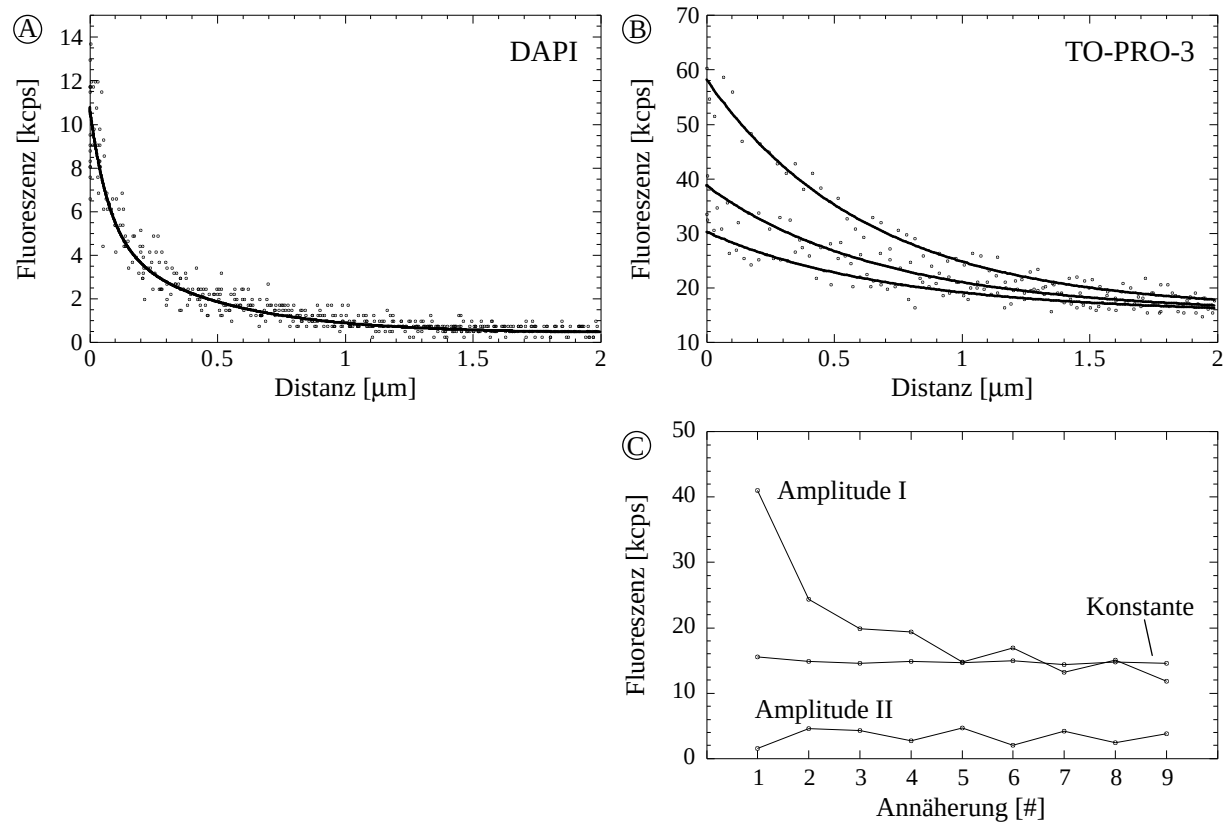


Abbildung 5.16: Fluoreszenz–Abstandskurven mit dem cw-Ar-Kr-Laser über einem mit (A) DAPI bzw. (B) TO-PRO-3 gefärbten Polytänchromosom. (A) 13 nacheinander aufgezeichnete Annäherungskurven (Punkte) und der Graph einer numerisch angepaßten doppelt exponentiellen Funktion (durchgezogene Linie). (B) Erste, dritte und neunte Annäherungskurve und die Graphen der numerisch angepaßten doppelt exponentiellen Funktion mit gemeinsamen Abfalllängen. (C) Amplituden der Komponenten mit der kurzen (g_i) und langen (h_i) Abfalllänge und der Konstanten k_i für die neun Annäherungskurven an das mit TO-PRO-3 markierte Chromosom. Anregung: (A) 179 mW bei 647 nm, (B) 5.1 μ W bei 647 nm.

Abbildungen 5.16 (A) und (B) sind die Kurven, die sich aus dieser numerischen Anpassung ergeben. Die verwendeten Programme wurden von George Striker entwickelt.

Die doppelt exponentielle Funktion wurde deshalb verwendet, weil sie die gemessenen Kurven im Rahmen der Meßgenauigkeit gut beschreibt. Eine einfache Exponentialfunktion

Tabelle 5.3: Abfalllängen zu den Fluoreszenz-Abstandskurven aus Abbildungen 5.16

Farbstoff	z_1	z_2	$\langle H_i \rangle$
DAPI	75 nm	447 nm	98 ± 11 nm
TO-PRO-3	626 nm	1726 nm	502 ± 30 nm

war dafür nicht ausreichend. Die Abfallängen z_1 und z_2 sind in der Tabelle 5.3 aufgeführt. Da in das Verhalten der Kurve auch noch das Verhältnis der Amplituden mit eingeht, wurde für die einzelnen Kurven der Abstand H_i berechnet, für den der Signalbeitrag der zwei Exponentiale, ohne den konstanten Term, auf die Hälfte abgefallen war. Der Mittelwert der Entfernungen H_i ist in der Tabelle 5.3 als dritter Wert angegeben. Dieser Wert ist für die über Zweiphotonenabsorption angeregte DAPI-Fluoreszenz sehr viel geringer als für die TO-PRO-3-Fluoreszenz. Das bedeutet auch, daß eine sehr viel dünnere Oberflächenschicht durch die Zweiphotonenabsorption angeregt wird und zum Fluoreszenzsignal beiträgt.

Durch die numerische Anpassung an die doppelt exponentielle Funktion kann auch das Bleichverhalten näher analysiert werden. Bei der mit DAPI gefärbten Probe konnte kein Bleichen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu nahm das Fluoreszenzsignal von der mit TO-PRO-3 gefärbten Probe innerhalb weniger Annäherungskurven ab. Dabei ist dieser Unterschied nicht auf die unterschiedlichen Anregungsmechanismen zurückzuführen sondern vielmehr auf die Unterschiede der verwendeten Farbstoffe.

Bei der mit TO-PRO-3 gefärbten Probe war das Bleichen nicht gleichmäßig auf die beiden Amplituden der Exponentialfunktion verteilt. Die Werte der Amplituden g_i und h_i und der Konstanten k_i sind in Abbildung 5.16 (C) aufgezeichnet. Deutlich ist die Abnahme der zur kurzen Abfallänge gehörenden Amplitude zu sehen, wohingegen die andere Amplitude und die Konstante nahezu unverändert bleiben. Auf die Entfernungen H_i hat diese Abnahme von g_i jedoch nur einen geringen Einfluß, da g_i immer noch erheblich größer als h_i bleibt und Schwankungen in H_i im wesentlichen durch Unterschiede im Parameter h_i bedingt sind.

Fluoreszenz-Abstandskurven mit einem gepulsten Laser

Im Gegensatz zu den Experimenten mit dem Ar-Kr-Mischgaslaser, bei denen zwei verschiedene Farbstoffe mit der gleichen Laserlinie über einen Ein- bzw. einen Zweiphotonenprozeß angeregt wurden, stand neben dem gepulsten Laser mit einer Emissionswellenlänge von 1064 nm auch ein frequenzverdoppelter Laser bei 532 nm zur Verfügung, so daß damit die axiale Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals an der gleichen Probe bei den zwei verschie-

Tabelle 5.4: Abfallängen zu den Fluoreszenz-Abstandskurven aus Abbildungen 5.17

Anregungslaser	z_1	z_2	$\langle H \rangle$
Nd:YVO ₄ , 1064 nm	227 nm	952 nm	178±3 nm
Nd:YAG, 532 nm	180 nm	1164 nm	404±62 nm

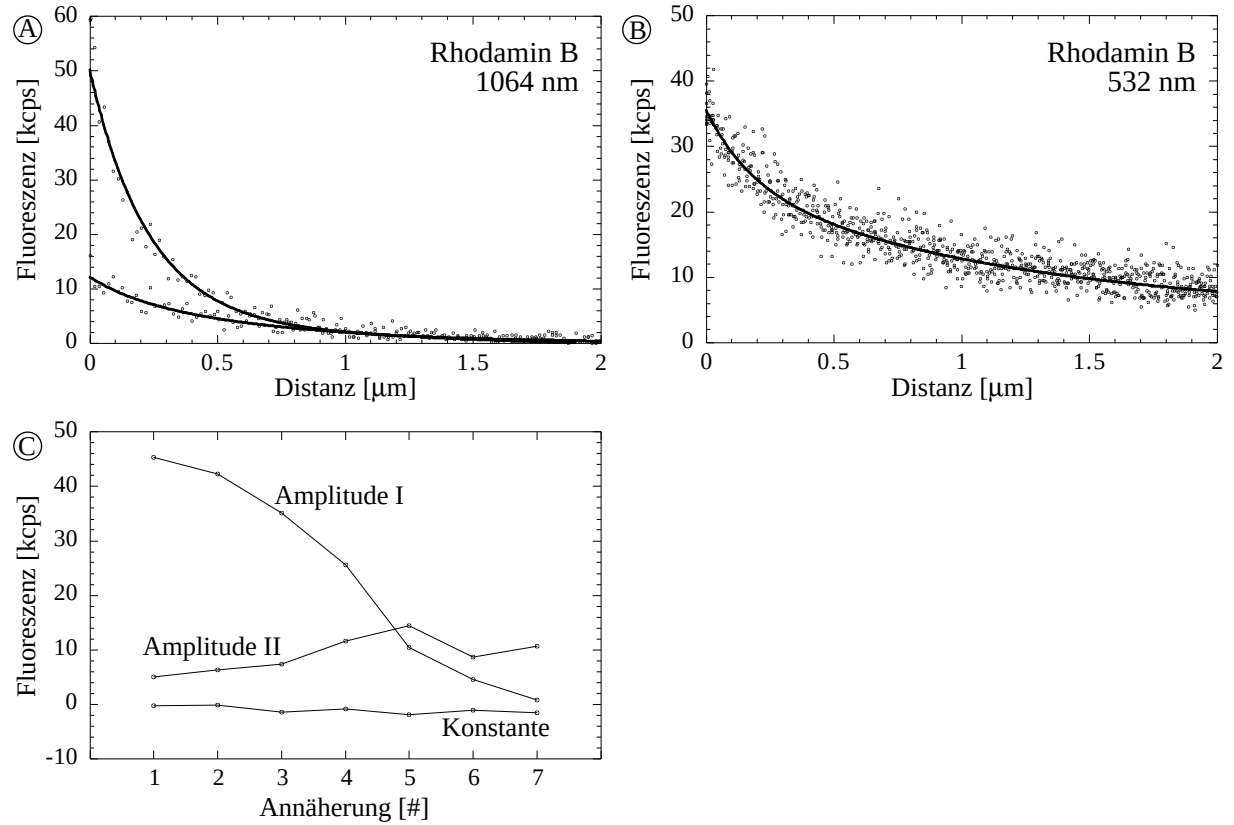


Abbildung 5.17: Fluoreszenz–Abstandskurven mit Zweiphotonenabsorption bei 1064 nm und Einphotonenabsorption bei 532 nm über einem mit Rhodamin B versetzten PVA-Film. (A) Erste und sechste mit dem gepulsten Nd:YVO₄-Laser bei 1064 nm, und (B) sieben nacheinander aufgezeichnete Annäherungskurven mit dem frequenzverdoppelten Nd:YAG-Laser bei 532 nm gemessen. Die durchgezogenen Linien sind die Graphen numerisch angepaßter doppelt exponentieller Funktionen mit für jedes der Experimente globalen Abfallängen. (C) Amplituden der Komponenten mit der kurzen (g_i) und langen (h_i) Abfallänge und der Konstanten k_i für die sieben Annäherungskurven an den PVA-Film bei Anregung des Rhodamin B über die Zweiphotonenabsorption. Anregung: (A) 53 mW bei 1064 nm, (B) 0.3 μW bei 532 nm.

denen Prozessen verglichen werden konnte. In Abbildung 5.17 ist der Verlauf der Fluoreszenzintensität gezeigt, die von einem mit Rhodamin B versetzten PVA-Film ausgeht, während die Glasfaser Spitze an die Probe angenähert wird. In (A) erfolgte die Anregung des Rhodamins durch Zweiphotonenabsorption des gepulsten Laserlichts, wohingegen in (B) die frequenzverdoppelte Emission des Nd:YAG-Lasers zur Anregung des Rhodamins verwendet wurde. Die Messungen erfolgten mit der selben Spitze an der selben Probe. Die Laserleistungen wurden so eingestellt, daß sich für die zwei Laser in etwa die gleichen Detektionsraten ergaben.

Im Verlauf des Experiments wurde im Falle der Anregung mit dem grünen frequenzverdoppelten Laser in Abb. 5.17 (B) keine Veränderung der Fluoreszenzintensität festgestellt. In der Abbildung sind sieben Annäherungskurven einander überlagert. Bei der Anregung über die Zweiphotonenabsorption war allerdings eine deutliche Abnahme des Fluoreszenzsignals feststellbar. Deshalb sind in der Abb. 5.17 (A) nur die erste und die sechste Annäherungskurve gezeigt.

Ähnlich wie bei den Experimenten mit dem Ar-Kr-Mischgaslaser können auch diese Kurven nicht über eine einfach exponentielle Funktion beschrieben werden, wohl aber über eine doppelt exponentielle Funktion entsprechend der Gleichung 5.4. Die Graphen der numerisch angepaßten Funktionen zu den gezeigten Messungen sind in den Abbildungen 5.17 (A) und (B) als durchgezogene Linien eingezeichnet. Die globalen Abfallängen z_1 und z_2 sind in der Tabelle 5.4 (B) aufgeführt. Interessanterweise enthält die Kurve, die sich aus der Anregung mit dem grünen Laser ergibt, die kürzere Abfallänge. Für den Vergleich müssen jedoch auch die Amplituden der einzelnen Komponenten mitberücksichtigt werden. Für die Einphotonenabsorption sind die gemittelten Werte $g_i = 11.10$ kcps, $h_i = 20.29$ kcps und $k_i = 4.16$ kcps für die Komponenten mit den Abfallängen 180 nm, 1164 nm und den konstanten Hintergrund. Da bei der Zweiphotonenanregung ein deutlicher Bleichprozeß auftritt, sind in der Abbildung 5.17 (C) die Werte der zwei Amplituden und des Hintergrundes in diesem Experiment aufgetragen. Wenn die Abstände H_i zwischen Probe und Spitze berechnet werden, bei denen das Fluoreszenzsignal auf die Hälfte zurückgegangen ist, so ergeben sich die in der letzten Spalte der Tabelle 5.4 angegebenen Werte. Da sich bei der Anregung durch Zweiphotonenabsorption im wesentlichen die Amplitude mit der kurzen Abfallänge verringert, verändert sich dieser Abstand im Verlauf der Messungen. Daher wurde in der Tabelle nur der Mittelwert aus den ersten drei Annäherungskurven aufgeführt. Dieser Abstand beträgt für die Zweiphotonenanregung weniger als die Hälfte des Abstandes bei der Einphotonenanregung. Unter der Annahme, daß das Probenmaterial auf der hier betrachteten Längenskala von $2\text{ }\mu\text{m}$ das Anregungslicht nur unwesentlich abschwächt, gibt dieser Abstand auch die Dicke der Schicht an, aus der die Hälfte des detektierten optischen Signals stammt. Somit ist in diesem Fall, bei dem derselbe Farbstoff durch einen Ein- bzw. Zweiphotonenprozeß angeregt wird, die Zweiphotonenanregung auf eine um den Faktor 2.3 dünnere Oberflächenschicht beschränkt.

5.3.4 Bleichexperimente

Als eine weitere Folge der quadratischen Abhängigkeit der Anregung der Farbstoffe von der lokalen Lichtintensität sollten in Bleichexperimenten, vergleichbar den Experimenten in Abschnitt 4.2.2, die Seitenlinien schwächer werden, da sie durch Licht geringerer Intensität erzeugt werden. Das Ergebnis eines derartigen Bleichexperimentes ist in Abbildung 5.18 gezeigt. Als Probe diente ein mit Rhodamin B versetzter PVA-Film. Ähnlich wie in Abschnitt 4.2.2 wurde eine einzelne Zeilen durch wiederholtes Belichten gebleicht. Als Lichtquellen wurden der frequenzverdoppelte Nd:YAG-Laser (Abb. 5.18 A und B) und der gepulste Nd:YVO₄-Laser (Abb. 5.18 C und D) verwendet.

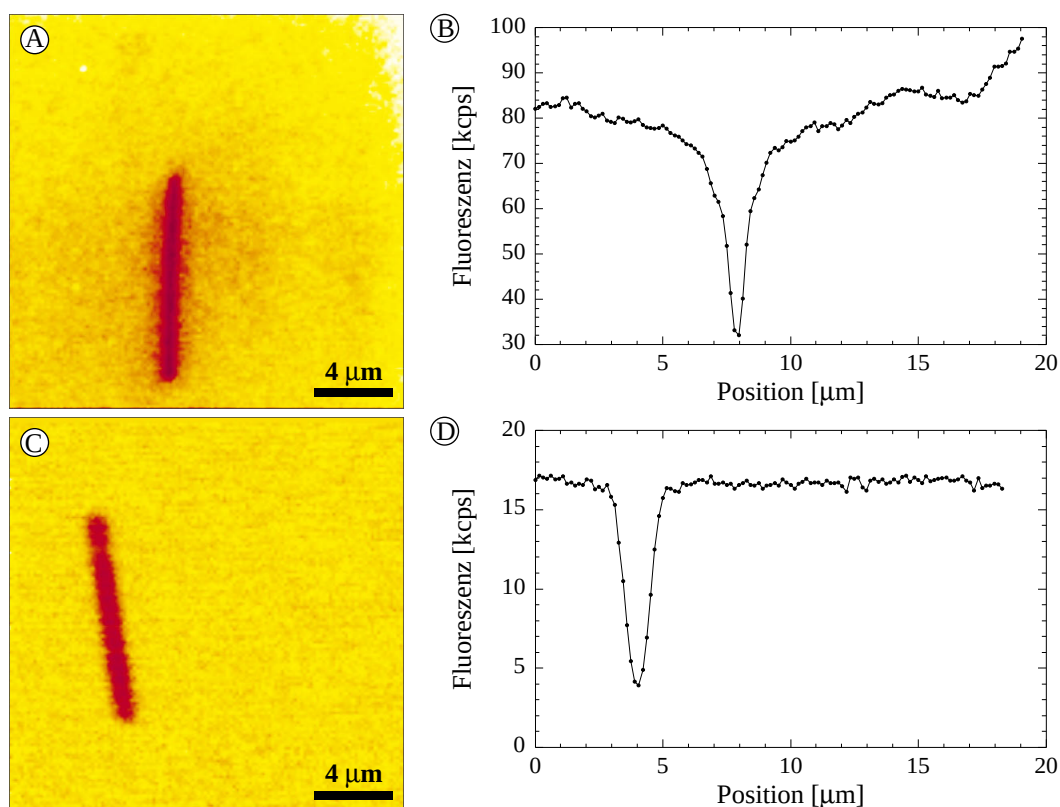


Abbildung 5.18: Zeilenbleichexperiment auf einem mit Rhodamin B versetzten PVA-Film mit Ein- bzw. Zweiphotonenanregung. (A) Fluoreszenzbild des PVA-Films, nachdem eine Zeile über Einphotonenabsorption des Rhodamin B bei 532 nm gebleicht wurde. (B) Verlauf der Fluoreszenzintensität senkrecht zur gebleichten Linie in (A). (C) Fluoreszenzbild des PVA-Films, nachdem eine Zeile über Zweiphotonenabsorption des Rhodamin B bei 1064 nm gebleicht wurde. (D) Verlauf der Fluoreszenzintensität senkrecht zur gebleichten Linie in (C). Bleichvorgang: (A) und (B) 3 µW bei 532 nm, 64 Zeilen; (C) und (D) 46 mW bei 1064 nm, 64 Zeilen. Abbildung: (A) 3 µW bei 532 nm, (C) 46 mW bei 1064 nm.

Abbildung 5.18 (A) und (C) zeigen jeweils ein Fluoreszenzbild der Oberfläche, nachdem in einer Zeile der Rhodamin-Farbstoff durch die Anregung über den Ein- bzw. Zweiphotonenabsorptionsprozeß gebleicht wurde. In (A) ist deutlich sichtbar, daß nach dem Bleichen der Zeile mit dem grünen Laserlicht auch in der Umgebung der gebleichten Linie die Fluoreszenz der Probe verringert ist. Es sind auch vage die schon in Abschnitt 4.2.2 beobachteten Seitenlinien zu erkennen. Im Gegensatz dazu scheint das Bleichen einer Linie über den Zweiphotonenprozeß die Fluoreszenzintensität in der Umgebung nicht zu beeinflussen (Abb. 5.18 C). Der Unterschied zwischen den sich ergebenden Fluoreszenzverteilungen wird noch deutlicher, wenn der Verlauf der Fluoreszenzintensität senkrecht zur gebleichten Linie aufgetragen wird. Die entsprechenden Profile, die sich aus der Mittelung über die Länge der gebleichten Linie ergeben, sind in (B) und (D) gezeigt. Die schon am Bild erkennbaren Unterschiede sind hier deutlich zu sehen. Außerdem sieht man, daß sich in (B) die Form der zentralen Linie nicht durch eine einfache Gaußkurve beschreiben läßt, wie es in (D) möglich ist. Vielmehr setzt sie sich aus einer $1.9\text{ }\mu\text{m}$ und einer $0.5\text{ }\mu\text{m}$ breiten Gaußkurve zusammen. An das in (D) gezeigte Profil der gebleichten Linie kann dagegen sehr gut eine $0.9\text{ }\mu\text{m}$ breite Gaußkurve numerisch angepaßt werden.

Da der Belichtungsprozeß für keine der zwei Belichtungsarten optimiert wurde, stellen diese Linienbreiten wahrscheinlich nicht die minimalen erzielbaren Breiten dar. Für die Linie, die durch die Anregung des Farbstoffes über Zweiphotonenabsorption erzeugt wird, erwartet man nicht nur das Verschwinden der Seitenlinien, sondern auch die zentrale Linie sollte aufgrund des Zweiphotoneneffekts schmaler sein. Dies kann durch eine Überbelichtung der Linie oder eine Veränderung der Modenform überdeckt worden sein. In Abbildung 2.4 (C) wurde die Form der in der dünnen Glasfaser geführten Moden in Abhängigkeit von der Wellenlänge gezeigt. Dabei ergab sich bei vorgegebenem Durchmesser der Faser für größere Wellenlängen ein breiteres Modenfeld. In dem Bleichexperiment würde das in einer breiteren Linie resultieren.

5.4 Diskussion zur Mehrphotonenabsorption in einem optischen Nahfeldmikroskop

In diesem Kapitel wurde gezeigt, daß die Fluoreszenzanregung durch Zweiphotonenabsorption in einem optischen Nahfeldmikroskop möglich ist. Dazu kann sowohl ein leistungsstarker Dauerstrichlaser als auch ein gepulster Laser mit Pulsdauern im Picosekundenbereich verwendet werden, wobei mit letzterem das Problem der Schädigung der Probe durch hohe

gemittelte Leistungen vermieden werden kann. Wenn ein Laser im roten Spektralbereich verwendet wird, ist es möglich, durch den Zweiphotonenprozeß Farbstoffe anzuregen, die im ultravioletten Spektralbereich absorbieren. Dabei wird der Fluoreszenzhintergrund, der bei der Einphotonenanregung in der Glasfaser entsteht, fast vollständig vermieden. Laser mit Emissionswellenlängen im nahen Infrarotbereich, wie z. B. der hier verwendete Nd:YVO₄-Laser bei 1064 nm, bieten bezüglich der Abbildungsleistung im Nahfeldmikroskop nur geringe Vorteile gegenüber einem frequenzverdoppelten cw-Laser, wie die Messungen an den MitoTracker-markierten Zellen zeigen. Bei Experimenten können jedoch andere Effekte mit von Bedeutung sein, für die der Einsatz der Zweiphotonenanregung von Vorteil ist. So ist bei der Zweiphotonenanregung von Farbstoffen sowohl das Ausbleichen der Probe durch Streulicht als auch das Hintergrundsignal aus tiefer liegenden Probenbereichen verringert.

Aus den Fluoreszenz-Abstandskurven ergab sich, daß das Signal nach der Zweiphotonenanregung schneller mit der Entfernung zur Probe abnimmt als das Signal nach der Einphotonenanregung; ein Verhalten, das auch Smith et al. (1998) bei dem nichtlinear von der Intensität abhängenden *equal-pulse-correlation*-Signal beobachteten. Bei der Anregung des Rhodamin B über Zweiphotonenabsorption bei 1064 nm war die mittlere Abfalllänge um den Faktor 2.3 kleiner als bei der Anregung über Einphotonenabsorption bei 532 nm. Bei der Anregung von DAPI bzw. TO-PRO-3 mit dem cw-Ar-Kr-Laser betrug das Verhältnis der Abfallängen sogar 1 zu 5.1. Dabei ist jedoch zu beachten, daß sowohl die effektive Anregungswellenlänge als auch die Emissionswellenlänge bei der DAPI-Anregung über den Zweiphotonenprozeß kürzer ist als bei der Einphotonenanregung von TO-PRO-3, wodurch sich wahrscheinlich der zweieinhalbmal so große Faktor erklärt.

Das unterschiedlich schnelle Bleichen des Rhodamin B bei der Aufnahme der Fluoreszenz-Abstandskurven kann qualitativ recht einfach erklärt werden. Das Fluoreszenzsignal F ist proportional zur Zahl N der anregbaren Moleküle und der mittleren Anregungsrate I dieser Moleküle:

$$F = \alpha \cdot N \cdot I = \alpha \cdot n \cdot V \cdot I$$

wobei n die Dichte der Farbstoffmoleküle in der Probe ist. Im Einphotonenexperiment ist das Signal nur etwa 60 % des Signals im Zweiphotonenfall, das Detektionsvolumen V ist aufgrund der größeren Abfalllänge jedoch etwa doppelt so groß. Damit ist bei dem Einphotonenexperiment die mittlere Anregungsrate pro Molekül weniger als ein Drittel der Anregungsrate im Zweiphotonenexperiment. Dies erklärt den vergleichsweise langsamen Bleichprozeß bei der Einphotonenanregung, da die Bleichrate proportional zur Anregungsrate ist.

Mit gepulsten Lasern im nahen Infrarotbereich ist es schließlich auch möglich, simultan verschiedene Farbstoffe über Zwei- und Dreiphotonenprozesse anzuregen, wie es in diesem Kapitel für die Paare MitoTracker/BBI-342 und Cy3/DAPI gezeigt wurde. Bei diesen Experimenten besteht kein Versatz zwischen den Signalen, wie er sich bei alternierenden Messungen mit verschiedenen Lichtquellen einstellt. Da die Intensität der Fluoreszenz der über Dreiphotonenanregung angeregten Farbstoffe jedoch sehr gering war, wäre für diese Anwendung der Einsatz von Lasern mit noch kürzeren Pulsdauern, wie z. B. einem Ti:Saphir-Laser, interessant. Bei der Dreiphotonenanregung geht der Verstärkungsfaktor $1/(\tau f)$ quadratisch in die Anregungsrate ein, so daß eine beträchtliche Zunahme der Signalintensität zu erwarten ist. Allerdings muß bei diesen Lasern darauf geachtet werden, daß sehr kurze Pulse sich in der Glasfaser aufgrund der Dispersion verbreitern. Dies kann jedoch vor der Einkopplung in die Faser kompensiert werden, wie Smith et al. (1998) es für ihre zeitaufgelösten Messungen machten. Mit einem derartigen System ließe sich dann unter Umständen nicht nur die Fluoreszenz von zugesetzten Farbstoffen anregen, sondern auch die intrinsische Fluoreszenz von Proteinen aufgrund der enthaltenen Tryptophane, die im Bereich von 280 bis 295 nm absorbieren.

Kapitel 6

Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein optisches Nahfeldmikroskop für Untersuchungen an organischen und biologischen Systemen entwickelt. Es setzt dielektrische Faserspitzen im *shared-aperture*-Modus ein und verfügt über eine aktive Regelung des Abstandes zwischen der Sonde und der Probe. Die im Fluoreszenzmodus erzielte laterale optische Auflösung liegt im Bereich zwischen 150 und 200 nm. Ausgehend von dieser Arbeit können weiterführende Untersuchungen in drei Bereiche gegliedert werden: Zunächst gibt es (I) eine Reihe weiterer Experimente, die mit dem Mikroskop in seiner jetzigen Form, mit den zur Verfügung stehenden Anregungs- und Detektionsmöglichkeiten, durchgeführt werden können, und man kann (II) weitere Kontrastmechanismen in das Mikroskop integrieren. Der *shared-aperture*-Modus ist derzeit auf trockene Proben beschränkt, so daß die meisten biologischen Präparate getrocknet werden müssen. Um dies zu vermeiden, ist (III) die Entwicklung und der Aufbau eines neuen Nahfeldmikroskops lohnend, welches die Untersuchung einer Probe unter physiologischen Bedingungen erlaubt.

(I) Experimente, die mit dem Mikroskop in seiner jetzigen Form gemacht werden können:

Zellmembranen sind komplexe, heterogene Objekte, die die Oberfläche der Zellen bilden und somit ideal für Untersuchungen mit dem Nahfeldmikroskop sind. Zunächst wurden sie als zweidimensionale Flüssigkeiten beschrieben (Singer und Nicolson, 1972). Allerdings haben verschiedene Experimente gezeigt, daß die Bewegung von Membranbestandteilen, wie z. B. Transmembran-Proteinen, oftmals behindert ist. Wird die Bewegung als durch Barrieren in der Membran eingeschränkt beschrieben, so liegt der Abstand zwischen den einzelnen Barrieren im Bereich mehrerer hundert Nanometer (Jacobson et al., 1995). Au-

ßerdem verteilen sich Membranbestandteile nicht homogen über die Zellmembran, sondern bilden oftmals Gruppen oder Domänen, in denen sie sich anreichern. Woraus die Barrieren für die Diffusion bzw. die Domänengrenzen aufgebaut sind, ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt.

Das optische Nahfeldmikroskop bietet die Möglichkeit, laterale Strukturen auf einer Längenskala jenseits des Beugungslimits aufzulösen, auf der auch die Zellmembran strukturiert ist. Hierdurch wird die Untersuchung der Form und Größe der Domänen möglich, und es kann versucht werden, mögliche Barrieren direkt abzubilden. Dabei bietet das Nahfeldmikroskop den Vorteil, daß es über die Abstandsregelung der Topographie der Zellmembran folgen kann. Damit ist die Membran immer im ‚Fokus‘ des Mikroskops und die beobachteten Strukturen in der Membran können mit der Topographie korreliert werden, die auch durch den inneren Aufbau der Zelle beeinflußt ist, wie am Beispiel der Zellkerne zu sehen war.

Neben der Untersuchung der Membran auf Längenskalen von einigen hundert Nanometern kann gleichzeitig auch über die Detektion des Energietransfers zwischen zwei Farbstoffmolekülen der Aufbau kleinerer Molekülaggregate, wie z. B. Rezeptordimere oder Rezeptor-Ligand-Komplexe, auf einer Längenskala von wenigen Nanometern untersucht werden.

(II) Implementation weiterer Kontrastmechanismen:

Die Polarisierung des Lichtes und die Lebensdauer des angeregten Zustandes der Farbstoffe sind zwei Beispiele für weitere Charakteristika des Lichtes, deren Detektion in das Nahfeldmikroskop integriert werden kann.

Die Fluoreszenzlebensdauer vieler Farbstoffe hängt in starkem Maße von verschiedenen Parametern der lokalen Umgebung ab. So bietet sie z. B. eine weitere Möglichkeit, den Energieübertrag zwischen Fluorophoren zu bestimmen (Clegg, 1995). In der Abbildung 3.17 war ein akustooptischer Modulator (AOM) und ein Photomultiplier zu sehen. Diese beiden Geräte können verwendet werden, um die Fluoreszenzlebensdauer eines Farbstoffes mit einer Dauerstrichlichtquelle zu messen. Im einfachsten Fall kann das Fluoreszenzsignal nach einer δ -förmigen Anregung durch eine einfache Exponentialfunktion mit der Zeitkonstanten τ_F beschrieben werden. Bei einer mit dem AOM mit der Frequenz $f = \omega/2\pi$ modulierten Anregung ist das Fluoreszenzsignal relativ zur Anregung um die Phase $\Delta\Phi = \arctan(\omega\tau_F)$ verschoben. Durch elektronische Mischtechniken oder sehr hochfrequent arbeitende Lock-In-Verstärker kann diese Phasenverschiebung detektiert und zur Kontrasterzeugung verwendet werden.

Alternativ kann die Lebensdauer auch durch die Bestimmung der Fluoreszenzabklingkurve durch zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen mit einer gepulsten Lichtquelle gemessen werden. Bei diesem experimentellen Ansatz ist es möglich, die Farbstoffe auch über Zweiphotonenabsorption zur Fluoreszenz anzuregen.

Die Detektion der Fluoreszenzlebensdauer kann dabei als eine Möglichkeit der Kontrasterzeugung während der Bildaufnahme verwendet werden. In komplizierten Systemen mit mehreren Lebensdauern sind diese Methoden jedoch zu langsam, um Aufnahmen von der Probenoberfläche zu machen. Es ist aber möglich, das Nahfeldmikroskop für lokale spektroskopische Untersuchungen einzusetzen. Über die Fluoreszenz- oder Topographie-detektion kann die Probe abgebildet werden. An ausgewählten Punkten werden dann in einem zweiten Schritt mit dem Nahfeldmikroskop lokal spektroskopische Untersuchungen gemacht. So kann, wie in dieser Arbeit an den GFP exprimierenden Bakterien gezeigt, ein Spektrum der Emission aufgenommen oder die Fluoreszenzlebensdauer der Fluorophore bestimmt werden.

Eine andere Möglichkeit, weitere Informationen über die Probe zu erhalten, ist die Detektion der Polarisierung des Lichtes. Neben der Bestimmung der Absorptions- und Emissionsdipole kann die depolarisierende Wirkung des Nahfeldes, die sich aus der z -Komponente des elektrischen Feldes (siehe Abschnitt 2.2) ergibt, bestimmt und möglicherweise zur Auflösungsverbesserung ausgenutzt werden. Für Polarisationsmessungen müssen Einzelmode- oder polarisationserhaltende Glasfasern verwendet werden. Wenn der Einfluß der Faser auf den Polarisationszustand des Lichtes kontrolliert wird, besitzen die Einzelmoden-Glasfasern den Vorteil, daß die Richtung der Polarisierung kontinuierlich verändert und der Probe angepaßt werden kann. Bei polarisationserhaltenden Glasfasern sind die möglichen Richtungen der Polarisierung durch den Aufbau der Faser festgelegt. Eine Anpassung der Polarisationsrichtung auf ausgerichtete Strukturen in der Probe müßte durch die Rotation der Probe oder Faserspitze erfolgen.

(III) Entwicklung eines optischen Nahfeldmikroskops für Experimente in Flüssigkeiten:

Das in dieser Arbeit verwendete Nahfeldmikroskop ist auf die Untersuchung getrockneter Präparate beschränkt, da der große Brechkraftunterschied zwischen der Glasfaserspitze und der umgebenden Luft essentiell für die Abbildungseigenschaften ist. Zwar haben Hwang et al. (1998) gezeigt, daß sich während des Trocknungsprozesses die Transmembranmoleküle des Histokompatibilitätskomplexes nicht umlagern, so daß die Ergebnisse von Messungen an getrockneten Zellproben auf die lebende Zelle übertragen werden können, jedoch für

andere Systeme muß dieser Nachweis noch erbracht werden.

Deshalb wurde begonnen, ein optisches Nahfeldmikroskop zu entwickeln, welches Apertur-Sonden im *illumination*-Modus einsetzt. Mit derartigen Sonden wurde schon mehrfach gezeigt, daß eine laterale Auflösung im Bereich von 50 nm erzielt werden kann. Damit kommt man in den Größenbereich von biologischen Makromolekülen, wie z. B. Antikörpern, die etwa 10 nm groß sind. Es sollte damit auch möglich sein, optische Spektroskopie an sehr wenigen, bzw. einzelnen Proteinen oder Proteinkomplexen durchzuführen.

In dem neuen Mikroskop werden zunächst mit Metall bedampfte Glasfaserspitzen als Sonden verwendet, und als Detektionsoptik dient ein invertiertes Mikroskop (Axiovert 135TV, Zeiss, Jena), welches auch gleichzeitig eine Untersuchung der Probe im Fernfeld-Epifluoreszenzmodus erlaubt. Durch die Kombination von Fernfeld- und Nahfeldmikroskop kann zunächst eine interessante Zelle ausgesucht werden, die dann mit der besseren Auflösung, die das Nahfeldmikroskop bietet, genauer untersucht wird. Als piezoelektrische Rastereinheit wird ein Zweiachsenpiezosystem mit kapazitiven Wegmessern (P-730.20, Physik Instrumente), kombiniert mit einem selbstentwickelten, piezoelektrisch getriebenen z-Tisch, verwendet. Die mit diesem System bewegbare Masse reicht aus, um den Probenhalter mit einem Perfusionssystem zu versehen. Die Scherkraftdetektion erfolgt piezoelektrisch (Brunner et al., 1997).

Neben der Messung im *illumination*-Modus in Flüssigkeiten bietet dieses System auch für den *shared-aperture*-Modus Vorteile, da ein Experiment mit dem Fernfeldmikroskop vorbereitet und kontrolliert werden kann. Dadurch kann eine zu untersuchende Probenstelle ausgewählt oder bei Polarisationsmessungen der Einfluß, den die Faser auf die Polarisation des Lichtes hat, *in situ* kontrolliert werden.

Zusätzlich zu den Mikroskopietechniken bietet dieses Mikroskop die Möglichkeit der Kombination mit Methoden zur Messung der Dynamik des biologischen Systems, da das Präparat nicht getrocknet werden muß. Dadurch kann z. B. bei Untersuchungen der Zellmembran die Domänenstruktur bestimmter Membranbestandteile mit der Messung der lokalen Diffusionskonstanten für diese Bestandteile kombiniert werden. So wäre die Beantwortung der Frage, ob die beobachteten Barrieren bei der Diffusion mit den Domängrenzen zusammenfallen, möglich. Mögliche dynamische Meßmethoden wären *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP), sofern die Sonde eine ausreichende Transmission für ein schnelles Bleichen der Probe aufweist, oder die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) (Elson und Madge, 1974). Neben den reinen Diffusionskonstanten können damit auch Reaktionskonstanten gemessen werden.

Literaturverzeichnis

- P. M. Adam, P. Royer, R. Laddada, und J. L. Bijeon. Apertureless near-field optical microscopy - influence of the illumination conditions on the image-contrast. *Applied Optics*, 37:1814–1819, 1998.
- S. Akamine, H. Kuwano, und H. Yamada. Scanning near-field optical microscope using an atomic-force microscope cantilever with integrated photodiode. *Applied Physics Letters*, 68:579–581, 1996.
- B. Åkerman und E. Tuite. Single- and double-strand photocleavage of DNA by YO, YOYO and TOTO. *Nucleic Acids Research*, 24:1080–1090, 1996.
- I. Alroy und Y. Yarden. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS letters*, 410:83–86, 1997.
- W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. C. Martin, und R. A. Keller. Single molecule detection and photochemistry on a surface using near-field optical excitation. *Physical Review Letters*, 72:160–163, 1993.
- M. Ashburner. *Drosophila, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- W. A. Atia, S. Pilevear, A. Gungor, und C. C. Davis. On the spatial-resolution of uncoated optical-fiber probes in internal-reflection near-field scanning optical microscopy. *Ultramicroscopy*, 71:379–382, 1998.
- F. I. Baida, D. Courjon, und H. Bielefeldt. Compact stand-alone near-field optical microscope combined with force detection. *Applied Optics*, 37:1808–1813, 1998.
- M. L. Barcellona, G. Cardiel, und E. Gratton. Time-resolved fluorescence of DAPI in solution and bound to polydeoxynucleotides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 170:270–280, 1990.
- J. Barenz, O. Holtricher, und O. Marti. An easy-to-use non-optical shear-force distance control for near-field optical microscopes. *Review of Scientific Instruments*, 67:1912–1916, 1996.

- P. I. H. Bastiaens und T. M. Jovin. Microscopic imaging tracks the intracellular processing of a signal transduction protein: Fluorescent-labeled protein kinase C β I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93:8407–8412, 1996.
- B. D. Bennett, T. L. Jetton, G. Ying, M. A. Magnuson, und D. W. Piston. Quantitative subcellular imaging of glucose metabolism within intact pancreatic islets. *Journal of Biological Chemistry*, 271:3647–3651, 1996.
- S. Berntsen, E. Bozhevolnaya, und S. Bozhevolnyi. Macroscopic self-consistent model for external-reflection near-field microscopy. *Journal of the Optical Society of America A*, 10:878, 1993.
- H. A. Bethe. Theory of diffraction by small holes. *Physical Review, Second Series*, 66:163–182, 1944.
- E. Betzig und R. J. Chichester. Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy. *Science*, 262:1422–1425, 1993.
- E. Betzig, R. J. Chichester, F. Lanni, und D. L. Taylor. Near-field fluorescence imaging of cytoskeletal actin. *Bioimaging*, 1:129–135, 1993.
- E. Betzig, P. L. Finn, und J. S. Weiner. Combined shear force and near-field scanning optical microscopy. *Applied Physics Letters*, 60:2484–2486, 1992.
- E. Betzig und J. K. Trautman. Near-field optics - microscopy, spectroscopy, and surface modification beyond the diffraction limit. *Science*, 257:189–195, 1992.
- E. Betzig, J. K. Trautman, T. D. Harris, J. S. Weiner, und R. L. Kostelak. Breaking the diffraction barrier: Optical microscopy on a nanometric scale. *Science*, 251:1468–1470, 1991.
- J. Bewersdorf und S. W. Hell. Picosecond pulsed two-photon imaging with repetition rates of 200 and 400 MHz. *Journal of Microscopy*, 191:23–38, 1998.
- H. Bielefeldt. *Optische Nahfeldmikroskopie und ihre Anwendung in Reflexion und Transmission*. Doktorarbeit, Universität Konstanz, 1994.
- H. Bielefeldt, I. Hörsch, G. Krausch, M. Lux-Steiner, J. Mlynek, und O. Marti. Reflection-scanning near-field optical microscopy and spectroscopy of opaque samples. *Applied Physics A*, 59:103–108, 1994.
- G. Binnig, C. F. Quate, und C. Gerber. Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, 56:930–933, 1986.
- G. Binnig und H. Rohrer. Scanning tunneling microscopy. *Helvetica Physica Acta*, 55:726–735, 1982.
- M. J. Booth und S. W. Hell. Continuous wave excitation two-photon fluorescence microscopy exemplified with the 647nm ArKr laser line. *Journal of Microscopy*, 190:294–304, 1998.
- M. A. Bopp, A. J. Meixner, G. Tarrach, I. Zschokke-Gränacher, und L. Novotny. Direct imaging single molecule diffusion in a solid polymer host. *Chemical Physics Letters*, 263:721–726, 1996.

- S. Bozhevolnyi, S. Berntsen, und E. Bozhevolnaya. Extension of the macroscopic model for reflection near-field microscopy: regularization and image formation. *Journal of the Optical Society of America A*, 11:609–617, 1994a.
- S. I. Bozhevolnyi, O. Keller, und I. I. Smolyaninov. Phase conjugation of an optical near field. *Optics Letters*, 19:1601–1603, 1994b.
- S. I. Bozhevolnyi und I. I. Smolyaninov. Characterization of phase-conjugated near-field light spots. *Journal of the Optical Society of America B*, 12:1617–1620, 1995.
- S. I. Bozhevolnyi, I. I. Smolyaninov, und O. Keller. Correlation between optical and topographical images from an external reflection near-field microscope with shear force feedback. *Applied Optics*, 34:3793–3799, 1995.
- G. J. Brakenhoff, M. Müller, und R. I. Ghauharali. Analysis of efficiency of two-photon versus single-photon absorption for fluorescence generation in biological objects. *Journal of Microscopy*, 183:140–144, 1996.
- R. Brunner, A. Bietsch, O. Hollricher, und O. Marti. Distance control in near-field optical microscopy with piezoelectrical shear-force detection suitable for imaging in liquids. *Review of Scientific Instruments*, 68:1769–1772, 1997.
- E. L. Buckland, P. J. Moyer, und M. A. Paesler. Resolution in collection-mode scanning optical microscopy. *Journal of Applied Physics*, 73:1018–1028, 1993.
- C. Bustamante, J. Vesenska, C. L. Tang, W. Rees, M. Guthold, und R. Keller. Circular DNA-molecules imaged in air by scanning force microscopy. *Biochemistry*, 31:22–26, 1992.
- R. Carminati und J.-J. Greffet. Influence of dielectric contrast and topography on the near field scattered by an inhomogeneous surface. *Journal of the Optical Society of America A*, 12:2716–2725, 1995a.
- R. Carminati und J. J. Greffet. Reconstruction of the dielectric contrast profile from near-field data. *Ultramicroscopy*, 61:11–16, 1995b.
- R. Carminati und J.-J. Greffet. Equivalence of constant-height and constant-intensity images in scanning near-field optical microscopy. *Optics Letters*, 21:1208–1210, 1996.
- R. Carminati, A. Madrazo, M. Nietovesperinas, und J. J. Greffet. Optical content and resolution of near-field optical-images: influence of the operating mode. *Journal of Applied Physics*, 82:501–509, 1997.
- A. Castiaux, A. Dereux, C. Girard, und J. P. Vigneron. Interference patterns in and outside a dielectric prism combined with a fabry-perot cavity. *Ultramicroscopy*, 61:29–34, 1995a.
- A. Castiaux, A. Dereux, J.-P. Vigneron, C. Girard, und O. Martin. Electromagnetic fields in two-dimensional models of near-field optical microscope tips. *Ultramicroscopy*, 60:1–9, 1995b.
- M. Chalfie. Green fluorescent protein. *Photochemistry & Photobiology*, 62:651–656, 1995.

- M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, und D. C. Prasher. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263:802–805, 1994.
- A. G. Choo, H. E. Jackson, U. Thiel, G. N. Debrabander, und J. T. Boyd. Near field measurements of optical channel waveguides and directional couplers. *Applied Physics Letters*, 65:947–949, 1994.
- D. A. Christensen. Analysis of near field tip patterns including object interaction using finite-difference time-domain calculations. *Ultramicroscopy*, 57:189–195, 1995.
- R. M. Clegg. Fluorescence resonance energy transfer. *Current Opinion in Biotechnology*, 6:103–110, 1995.
- R. M. Clegg. Fluorescence resonance energy transfer. In X. F. Wang und B. Herman, Editoren, *Fluorescence Imaging Spectroscopy and Microscopy*, Seiten 179–252. John Wiley & Sons, Inc., 1996.
- R. M. Clegg, A. I. H. Murchie, A. Zechel, und D. M. J. Lilley. Observing the helical geometry of double-stranded DNA in solution by fluorescence resonance energy transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90:2994–2998, 1993.
- T. R. Corle und G. S. Kino. *Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems*. Academic Press, San Diego, 1996.
- D. Courjon, K. Sarayedine, und M. Spajer. Scanning tunneling optical microscopy. *Optics Communications*, 71:23–28, 1989.
- D. Courjon, J. M. Vigoureux, M. Spajer, K. Sarayedine, und S. Leblanc. External and internal-reflection near-field microscopy: experiments and results. *Applied Optics*, 29:3734–3740, 1990.
- M. F. Crommie, C. P. Lutz, D. M. Eigler, und E. J. Heller. Waves on a metal surface and quantum corrals. *Surface Review & Letters*, 2:127–137, 1995.
- A. B. Cubitt, R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross, und R. Y. Tsien. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 20:448–455, 1995.
- P. F. Curley, A. I. Ferguson, J. G. White, und W. B. Amos. Application of a femtosecond self-sustaining mode-locked Ti:sapphire laser to the field of laser scanning confocal microscopy. *Optical and Quantum Electronics*, 24:851–859, 1992.
- N. H. Damrauer, G. Cerullo, A. Yeh, T. R. Boussie, C. V. Shank, und J. K. McCusker. Femtosecond dynamics of excited-state evolution in $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$. *Science*, 275:54–57, 1997.
- H. U. Danzebrink. Optoelectronic detector probes for scanning near-field optical microscopy. *Journal of Microscopy*, 176:276–280, 1994.
- R. C. Davis, C. C. Williams, und P. Neuzil. Optical intensity mapping on the nanometer scale by near-field photodetection optical microscopy. *Optics Letters*, 21:447–449, 1996.

- S. Delagrave, R. E. Hawtin, C. M. Silva, M. M. Yang, und D. C. Youvan. Red-shifted excitation mutants of the green fluorescent protein. *BioTechnology*, 13:151–154, 1995.
- A. J. den Dekker und A. van den Bos. Resolution: a survey. *Journal of the Optical Society of America A*, 14:547–557, 1997.
- W. Denk, D. W. Piston, und W. W. Webb. Two-photon molecular excitation in laser-scanning microscopy. In J. P. Pawley, Editor, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Seiten 445–458. Plenum Press, 1995.
- W. Denk, J. H. Strickler, und W. W. Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248:73–76, 1990.
- D. L. Dexter. A theory of sensitized luminescence in solids. *Journal of Chemical Physics*, 21: 836–850, 1953.
- U. Dürig, D. W. Pohl, und F. Rohner. Near-field optical-scanning microscopy. *Journal of Applied Physics*, 59:3318–3327, 1986.
- E. L. Elson und D. Mudge. Fluorescence correlation spectroscopy. I. conceptual basis and theory. *Biopolymers*, 13:1–27, 1974.
- T. Enderle, T. Ha, D. F. Ogletree, D. S. Chemla, C. Magowan, und S. Weiss. Membrane specific mapping and colocalization of malarial and host skeletal proteins in the plasmodium-falciparum-infected erythrocyte by dual-color near-field scanning optical microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94:520–525, 1997.
- N. Essaidi, Y. Chen, V. Kottler, E. Cambil, C. Mayeux, N. Ronarch, und C. Vieu. Fabrication and characterization of optical-fiber nanoprobe for scanning near-field optical microscopy. *Applied Optics*, 37:609–615, 1998.
- J. P. Fillard. *Near Field Optics and Nanoscopy*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, 1996.
- A. Fischer, C. Cremer, und E. H. K. Stelzer. Fluorescence of coumarins and xanthenes after two-photon absorption with a pulsed titanium-sapphire laser. *Applied Optics*, 34:1989–2003, 1995.
- U. C. Fischer, J. Koglin, und H. Fuchs. The tetrahedral tip as a probe for scanning near-field optical microscopy at 30 nm resolution. *Journal of Microscopy*, 176:231–237, 1994.
- T. Förster. Energiewanderung und Fluoreszenz. *Die Naturwissenschaften*, 6:166–175, 1946.
- T. Förster. Experimentelle und theoretische Untersuchungen des zwischenmolekularen Übergangs von Elektronenanregungsenergie. *Zeitschrift für Naturforschung*, 4A:321–327, 1949.
- T. Förster. Elektrolytische Dissoziation angeregter Moleküle. *Zeitschrift für Elektrochemie*, 54: 42–46, 1950.
- G. R. Fowles. *Introduction to Modern Optics*. Dover Publications, Inc., New York, 1989.

- M. Fujihira, M. Sakomura, D. Aoki, und A. Koike. Scanning probe microscopies for molecular photodiodes. *Thin Solid Films*, 273:168–176, 1996.
- K. Fukuzawa und H. Kuwano. Scattering of evanescent light by a finite-size probe in near-field scanning optical microscopy. *Journal of Applied Physics*, 80:4799–4803, 1996.
- H. Furukawa und S. Kawata. Analysis of image formation in a near-field scanning optical microscope: effects of multiple scattering. *Optics Communications*, 132:170–178, 1996.
- M. Garcia-Parajo, E. Cambril, und Y. Chen. Simultaneous scanning tunneling microscope and collection mode scanning near-field optical microscope using gold coated optical-fiber probes. *Applied Physics Letters*, 65:1498–1500, 1994.
- H. H. Gerdes und C. Kaether. Green fluorescent protein: applications in cell biology. *FEBS letters*, 389:44–7, 1996.
- J. K. Gimzewski, R. Berndt, R. R. Schlittler, A. W. McKinnon, M. E. Welland, T. M. H. Wong, P. Dumas, M. Gu, S. Syrykh, F. Salvan, und A. Hallimaoui. Optical spectroscopy and microscopy using scanning tunneling microscopy. In D. W. Pohl und D. Courjon, Editoren, *Near Field Optics*, Seiten 333–340. Kluwer Academic Publishers, 1993.
- C. Girard und A. Dereux. Near-field optics theories. *Reports on Progress in Physics*, 59:657–699, 1996.
- J. W. Goodman. *Introduction to Fourier Optics*. McGraw-Hill Book Company, San Francisco, 1968.
- M. Göppert-Mayer. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Annalen der Physik*, 9: 273–295, 1931.
- H. Göttlich und W. M. Heckl. A novel probe for near-field optical microscopy based on luminescent silicon. *Ultramicroscopy*, 61:145–153, 1995.
- J.-J. Greffet und R. Carminati. Image formation in near-field optics. *Progress in Surface Science*, 56:133–237, 1997.
- M. J. Gregor, P. G. Blome, J. Schofer, und R. G. Ulbrich. Probe surface interaction in near-field optical microscopy - the nonlinear bending force mechanism. *Applied Physics Letters*, 68: 307–309, 1996.
- G. Guttroff, M. Bayer, A. Forchel, D. V. Kazantsev, M. K. Zundel, und K. Eberl. Investigation of electronic-structure of InP single quantum dots using near-field scanning optical spectroscopy. *Physica Status Solidi A-Applied Research*, 164:291–296, 1997.
- T. Ha, T. Enderle, D. F. Ogletree, D. S. Chemla, P. R. Selvin, und S. Weiss. Probing the interaction between two single molecules: Fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93:6264–6268, 1996.

- H. Hada, R. Hanawa, A. Haraguchi, und Y. Yonezawa. Preparation of the J-aggregate of cyanine dyes by means of the Langmuir-Blodgett technique. *Journal of Physical Chemistry*, 89:560, 1985.
- C. Hafner. *The generalized multiple multipole method technique for computational electromagnetics*. Artech, Boston, 1990.
- P. E. Hänninen, E. Soini, und S. W. Hell. Continuous wave excitation two-photon fluorescence microscopy. *Journal of Microscopy*, 176:222–225, 1994.
- T. D. Harris, D. Gershoni, R. D. Grober, L. Pfeiffer, K. West, und N. Chand. Near-field optical spectroscopy of single quantum wires. *Applied Physics Letters*, 68:988–990, 1996.
- R. P. Haugland. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*. Molecular Probes, Eugene, OR, 1996.
- B. Hecht, H. Bielefeldt, Y. Inouye, D. W. Pohl, und L. Novotny. Facts and artifacts in near-field optical microscopy. *Journal of Applied Physics*, 81:2492–2498, 1997.
- E. Hecht. *Optik*. Addison-Wesley (Deutschland) GmbH, Bonn, 1989.
- R. Heim, A. D. Cubitt, und R. Y. Tsien. Improved green fluorescence. *Nature*, 373:663–664, 1995.
- R. Heim, D. C. Prasher, und R. Y. Tsien. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91:12501–12504, 1994.
- R. Heim und R. Y. Tsien. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Current Biology*, 6:178–182, 1996.
- S. W. Hell, M. Booth, S. Wilms, C. M. Schnetter, A. K. Kirsch, D. J. Arndt-Jovin, und T. M. Jovin. Two-photon near- and far-field fluorescence microscopy with cw laser excitation. *Optics Letters*, 23:1238–1240, 1998.
- W. D. Herzog, M. S. Ünlü, B. B. Goldberg, G. H. Rhodes, und C. Harder. Beam divergence and waist measurements of laser diodes by near-field scanning optical microscopy. *Applied Physics Letters*, 70:688–690, 1997.
- T. Hirschfeld. Quantum efficiency independence of the time integrated emission from a fluorescent molecule. *Applied Optics*, 15:3135–3139, 1976.
- D. Hönig und D. Möbius. Direct visualisation of monolayers at the air-water interface by brewster angle microscopy. *Journal of Physical Chemistry*, 95:4590–4592, 1991.
- I. Hörsch, R. Kusche, O. Marti, B. Weigl, und K. J. Ebeling. Spectrally resolved near-field mode imaging of vertical-cavity semiconductor-lasers. *Journal of Applied Physics*, 79:3831–3834, 1996.

- J. W. P. Hsu, E. A. Fitzgerald, Y. H. Xie, und P. J. Silverman. Studies of electrically active defects in relaxed GeSi films using a near-field scanning optical microscope. *Journal of Applied Physics*, 79:7743–7750, 1996.
- H. Huesmann. *Photoprozesse an Grenzflächen*. Doktorarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 1996.
- H. Huesmann, C. A. Bignozzi, M. T. Indelli, L. Pavanin, M. A. Rampi, und D. Möbius. Organization of a metal complex dyad in monolayers. *Thin Solid Films*, 284-285:62–65, 1996.
- H. Huesmann, D. B. Spohn, M. T. Indelli, M. A. Rampi, und D. Möbius. Incorporation of a ruthenium-rhodium dyad in monolayers and organized molecular systems. *Langmuir*, 13: 4877–4881, 1997.
- J. Hwang, L. A. Gheber, L. Margolis, und M. Edidin. Domains in cell plasma-membranes investigated by near-field scanning optical microscopy. *Biophysical Journal*, 74:2184–2190, 1998.
- J. Hwang, L. K. Tamm, C. Bohm, T. S. Ramalingam, E. Betzig, und M. Edidin. Nanoscale complexity of phospholipid monolayers investigated by near-field scanning optical microscopy. *Science*, 270:610–614, 1995.
- M. T. Indelli, C. A. Bignozzi, A. Harriman, R. J. Schoonover, und F. Scandola. Four intercomponent processes in a Ru(II)-Rh(III) polypyridine dyad: Electron transfer from excited donor, electron transfer to excited acceptor, charge recombination and electronic energy transfer. *Journal of the American Chemical Society*, 116:3768–3769, 1994.
- S. Inoué. Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy. In J. P. Pawley, Editor, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Seiten 1–17. Plenum Press, 1995.
- M. Isaacson, Editor. *Near-Field Optics*, Band 57(2/3) von *Ultramicroscopy*. Elsevier, Amsterdam, 1995.
- M. N. Islam, X. K. Zhao, A. A. Said, S. S. Mickel, und C. F. Vail. High-efficiency and high-resolution fiberoptic probes for near-field imaging and spectroscopy. *Applied Physics Letters*, 71:2886–2888, 1997.
- J. D. Jackson. *Klassische Elektrodynamik*. Walter de Gruyter, Berlin, 1983.
- K. Jacobson, E. D. Sheets, und R. Simson. Revisting the fluid mosaic model of membranes. *Science*, 268:1441–1442, 1995.
- A. Jalocha, M. H. P. Moers, A. G. T. Ruiter, und N. F. van Hulst. Multi-detection and polarization contrast in scanning near-field optical microscopy in reflection. *Ultramicroscopy*, 61:221–226, 1995.
- A. Jalocha und N. F. van Hulst. Dielectric and fluorescent samples imaged by scanning near-field optical microscopy in reflection. *Optics Communications*, 119:17–22, 1995a.
- A. Jalocha und N. F. van Hulst. Polarization contrast in fluorescence scanning near-field optical reflection microscopy. *Journal of the Optical Society of America B*, 12:1577–1580, 1995b.

- E. A. Jares-Erijman und T. M. Jovin. Determination of DNA helical handedness by fluorescence resonance energy transfer. *Journal of Molecular Biology*, 257:597–617, 1996.
- A. Jenei, A. K. Kirsch, V. Subramaniam, D. J. Arndt-Jovin, und T. M. Jovin. Picosecond multi-photon scanning near-field optical microscopy. *Biophysical Journal*, im Druck, 1998.
- T. M. Jovin und D. J. Arndt-Jovin. FRET microscopy: Digital imaging of fluorescence resonance energy transfer. Application in cell biology. In E. Kohen und J. Hirschberg, Editoren, *Cell Structure and Function by Microspectrofluorometry*, Seiten 99–117. Academic Press, 1989.
- J. Kapuscinski. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic and Histochemistry*, 70: 220–233, 1995.
- J. L. Kann, T. D. Milster, F. Froehlich, R. W. Ziolkowski, und J. Judkins. Numerical analysis of a two-dimensional near-field probe. *Ultramicroscopy*, 57:251–256, 1995a.
- J. L. Kann, T. D. Milster, F. F. Froehlich, R. W. Ziolkowski, und J. B. Judkins. Near-field optical detection of asperities in dielectric surfaces. *Journal of the Optical Society of America A*, 12: 501–512, 1995b.
- K. Karrai und R. D. Grober. Piezoelectric tip-sample distance control for near field optical microscopes. *Applied Physics Letters*, 66:1842–1844, 1995.
- K. Karrai, G. Kolb, G. Abstreiter, und A. Schmeller. Optical near-field induced current microscopy. *Ultramicroscopy*, 61:299–304, 1995.
- G. Kaupp und A. Herrmann. Chemical contrast in scanning near-field optical microscopy. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 10:675–679, 1997.
- D. I. Kavaldjiev, R. Toledo-Crow, und M. Vaez-Iravani. On the heating of the fiber tip in a near-field scanning optical microscope. *Applied Physics Letters*, 67:2771–2773, 1995.
- J. M. Kendall und M. N. Badminton. *Aequorea victoria* bioluminescence moves into an exciting new era. *TIBTECH*, 16:216–224, 1998.
- S. M. Kennedy und F. E. Lytle. *p*-Bis(*i*-methylstyryl)benzene as a powersquared sensor for two-photon absorption measurements between 537 and 694 nm. *Analytical Chemistry*, 58:2643, 1986.
- C. D. Kinloch und A. I. McMullen. Improved equipment for the measurement of interfacial potentials. *Review of Scientific Instruments*, 36:347, 1959.
- A. Kirsch, C. Meyer, und T. M. Jovin. Integration of scanning probe microscopes with optical techniques. In E. Kohen und J. G. Hirschberg, Editoren, *NATO Advanced Research Workshop: Analytical use of fluorescent probes in oncology. Miami, Fl*, Seiten 317–323. Plenum Press, 1996.
- A. K. Kirsch, C. K. Meyer, H. Huesmann, D. Möbius, und T. M. Jovin. Fluorescence SNOM of domain-structures of LB films containing electron-transfer systems. *Ultramicroscopy*, 71: 295–302, 1998a.

- A. K. Kirsch, C. K. Meyer, und T. M. Jovin. Shear force imaging of DNA in a near-field scanning optical microscope (NSOM). *Journal of Microscopy*, 185:396–401, 1997.
- A. K. Kirsch, A. Schaper, H. Huesmann, M. A. Rampi, D. Möbius, und T. M. Jovin. Scanning force and scanning near-field optical microscopy of organized monolayers incorporating a non-amphiphilic metal dyad. *Langmuir*, 14:3895–3900, 1998b.
- A. K. Kirsch, V. Subramaniam, G. Striker, C. Schnetter, D. J. Arndt-Jovin, und T. M. Jovin. Continuous wave two-photon scanning near-field optical microscopy. *Biophysical Journal*, 75:1513–1521, 1998c.
- C. Kittel, W. D. Knight, und M. A. Ruderman. *Mechanics*. McGraw-Hill Book Company, New York, 1965.
- R. H. Köhler, J. Cao, W. R. Zipfel, W. W. Webb, und M. R. Hanson. Exchange of protein molecules through connections between higher plant plastids. *Science*, 276:2039–2042, 1997.
- K. König, U. Simon, und K. J. Halbhauer. 3D resolved two-photon fluorescence microscopy of living cells using a modified confocal laser scanning microscope. *Cellular & Molecular Biology*, 42:1181–1194, 1996.
- R. Kopelman und W. H. Tan. Near-field optical microscopy, spectroscopy, and chemical sensors. *Applied Spectroscopy Reviews*, 29:39–66, 1994.
- A. Kramer, T. Hartmann, R. Eschrich, und R. Guckenberger. Scanning near-field fluorescence microscopy of thin organic films at the water/air interface. *Ultramicroscopy*, 71:123–132, 1998.
- G. Krausch, S. Wegscheider, A. Kirsch, H. Bielefeldt, J. C. Meiners, und J. Mlynek. Near-field microscopy and lithography with uncoated fiber tips - a comparison. *Optics Communications*, 119:283–288, 1995.
- U. Kubitschek, R. Schweitzer-Stenner, D. J. Arndt-Jovin, T. M. Jovin, und I. Pecht. Distribution of type I Fc ϵ -receptors on the surface of mast cells probed by fluorescence resonance energy transfer. *Biophysical Journal*, 64:110–120, 1993.
- N. Kuck, K. Lieberman, A. Lewis, und A. Vecht. Visible electroluminescent subwavelength point source of light. *Applied Physics Letters*, 61:139–141, 1992.
- A. H. La Rosa, B. I. Yakobson, und H. D. Hallen. Origins and effects of thermal processes on near-field optical probes. *Applied Physics Letters*, 67:2597–2599, 1995.
- M. Lee, E. B. McDaniel, und J. W. P. Hsu. An impedance based non-contact feedback control system for scanning probe microscopes. *Review of Scientific Instruments*, 67:1468–1471, 1996.
- J. K. Leong und C. C. Williams. Shear force microscopy with capacitance detection for near-field scanning optical microscopy. *Applied Physics Letters*, 66:1432–1434, 1995.
- A. Lewis und K. Lieberman. Near-field optical imaging with a non-evanescently excited high-brightness light source of sub-wavelength dimensions. *Nature*, 354:214–216, 1991.

- M. K. Lewis, P. Wolanin, A. Gafni, und D. G. Steel. Near-field scanning optical microscopy of single molecules by femtosecond two-photon excitation. *Optics Letters*, 23:1111–1113, 1998.
- K. Lieberman, A. Lewis, G. Fish, S. Shalom, T. M. Jovin, A. Schaper, und S. R. Cohen. Multifunctional, micropipette based force cantilevers for scanned probe microscopy. *Applied Physics Letters*, 65:648–650, 1994.
- S. Madsen, S. I. Bozhevolnyi, und J. M. Hvam. Sub-wavelength imaging by depolarization in a reflection near-field optical microscope using an uncoated fiber probe. *Optics Communications*, 146:277–284, 1998.
- D. Marcuse. Mode conversion in optical fibers with monotonically increasing core radius. *Journal of Lightwave Technology*, LT-5:125–133, 1987.
- O. Marti und R. Möller, Editoren. *Photons and Local Probes*, Band 300 von *NATO ASI Series E*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995.
- O. J. F. Martin, A. Dereux, und C. Girard. Iterative scheme for computing exactly the total field propagating in dielectric structures of arbitrary shape. *Journal of the Optical Society of America A*, 11:1073–1080, 1994.
- O. J. F. Martin, C. Girard, und A. Dereux. Dielectric versus topographic contrast in near-field microscopy. *Journal of the Optical Society of America A*, 13:1801–1809, 1996.
- B. R. Masters, P. T. C. So, und E. Gratton. Multiphoton excitation fluorescence microscopy and spectroscopy of in vivo human skin. *Biophysical Journal*, 72:2405–2412, 1997.
- J.-C. D. Meiners. *Nanostrukturen in ultradünnen Blockcopolymerfilmen*. Doktorarbeit, Universität Konstanz, 1998.
- V. M. Mekler. A photochemical technique to enhance sensitivity of detection of fluorescence resonance energy transfer. *Photochemistry and Photobiology*, 59:615–620, 1994.
- M. Mertesdorf, M. Schönhoff, F. Lohr, und S. Kirstein. Scanning near-field optical microscope designed for operation in liquids. *Surface and Interface Analysis*, 25:755–759, 1997.
- C. K. Meyer. *Fluoreszenz-Nahfeldmikroskopie mit dielektrischen Fasersonden*. Diplomarbeit, Universität Göttingen, 1996.
- C. Mihalcea, W. Scholz, S. Werner, S. Munster, E. Oesterschulze, und R. Kassing. Multipurpose sensor tips for scanning near-field microscopy. *Applied Physics Letters*, 68:3531–3533, 1996.
- R. D. Mitra, C. M. Silva, und D. C. Youvan. Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein. *Gene*, 173:13–17, 1996.
- A. Miyawaki, J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura, und R. Y. Tsien. Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 388:882–887, 1997.

- M. H. P. Moers, W. H. J. Kalle, A. G. T. Ruiter, J. C. A. G. Wiegant, A. K. Raap, J. Greve, B. G. Degrooth, und N. F. van Hulst. Fluorescence in-situ hybridization on human metaphase chromosomes detected by near-field scanning optical microscopy. *Journal of Microscopy*, 182: 40–45, 1996.
- S. Mononobe und M. Ohtsu. Fabrication of a pencil-shaped fiber probe for near-field optics by selective chemical etching. *Journal of Lightwave Technology*, 14:2231–2235, 1996.
- S. Mononobe und M. Ohtsu. Development of a fiber used for fabricating application-oriented near-field optical probes. *IEEE Photonics Technology Letters*, 10:99–101, 1998.
- H. Morise, O. Shimomura, F. H. Johnson, und J. Winant. Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry*, 13:2656–2662, 1974.
- P. J. Moyer und S. B. Kammer. High-resolution imaging using near-field scanning optical microscopy and shear force feedback in water. *Applied Physics Letters*, 68:3380–3382, 1996.
- P. J. Moyer und M. A. Paesler. Shear force/reflection near-field scanning optical microscopy. *SPIE Proceedings*, 1855:58–66, 1993.
- D. Mulin, D. Courjon, J. P. Malugani, und B. Gauthier-Manuel. Use of solid electrolytic erosion for generating nano-aperture near-field collectors. *Applied Physics Letters*, 71:437–439, 1997.
- H. Muramatsu, N. Chiba, T. Ataka, S. Iwabuchi, N. Nagatani, E. Tamiya, und M. Fujihira. Scanning near-field optical/atomic force microscopy for fluorescence imaging and spectroscopy of biomaterials in air and liquid: observation of recombinant escherichia coli with gene coding to green fluorescent protein. *Optical Review*, 3:470–474, 1996a.
- H. Muramatsu, N. Chiba, und M. Fujihira. Frictional imaging in a scanning near-field optical/atomic-force microscope by a thin step etched optical fiber probe. *Applied Physics Letters*, 71:2061–2063, 1997.
- H. Muramatsu, N. Chiba, K. Homma, K. Nakajima, T. Ataka, S. Ohta, A. Kusumi, und M. Fujihira. Scanning near-field optic/atomic force microscopy in liquids. *Thin Solid Films*, 273: 335–338, 1996b.
- L. A. Nagahara und H. Tokumoto. Scanning near-field optical microscopy/spectroscopy of thin organic films. *Journal of Vacuum Science & Technology B*, 14:800–803, 1996.
- W. Noell, M. Abraham, K. Mayr, A. Ruf, J. Barenz, O. Holtricher, O. Marti, und P. Güthner. Micromachined aperture probe tip for multifunctional scanning probe microscopy. *Applied Physics Letters*, 70:1236–1238, 1997.
- L. Novotny und D. W. Pohl. Light propagation in scanning near-field optical microscopy. In O. Marti und R. Möller, Editoren, *Photons and Local Probes*, Seiten 1–20. Kluwer Academic Publishers, 1995.
- L. Novotny, D. W. Pohl, und B. Hecht. Light confinement in scanning near-field optical microscopy. *Ultramicroscopy*, 61:1–9, 1995a.

- L. Novotny, D. W. Pohl, und P. Regli. Light-propagation through nanometer-sized structures - the 2-dimensional-aperture scanning near-field optical microscope. *Journal of the Optical Society of America A*, 11:1768–1779, 1994.
- L. Novotny, D. W. Pohl, und P. Regli. Near-field, far-field and imaging properties of the 2D aperture SNOM. *Ultramicroscopy*, 57:180–188, 1995b.
- M. Ormö, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, und S. J. Remington. Crystal structure of the aequorea victoria green fluorescent protein. *Science*, 273:1392–1395, 1996.
- M. Osborn. Immunofluorescence microscopy of cultured cells. In J. E. Celis, Editor, *Cell Biology: A Laboratory Handbook, Volume 2*, Seiten 462–468. Academic Press, 2 Auflage, 1998.
- G. A. Overbeck, D. Hönig, und D. Möbius. Stars, stripes and shells in monolayers: Simulation of the molecular arrangement in schlieren structures. *Thin Solid Films*, 242:213–219, 1994.
- M. Paesler und N. F. van Hulst, Editoren. *Near-field Optics and Related Techniques*, Band 61(1-4) von *Ultramicroscopy*. Elsevier, Amsterdam, 1995.
- M. A. Paesler und P. J. Moyer. *Near-Field Optics*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1996.
- T. Pagnot und C. Pierali. Fabrication of multimode fiber tapers with a high reproducibility of the subwavelength extremity size: application to scanning near-field optical microscope probes. *Optics Communications*, 132:161–169, 1996.
- D. Pahlke, I. Manke, F. Heinrichsdorff, M. Dähne-Prietsch, und W. Richter. Photoluminescence of buried InGaAs/GaAs quantum dots spectrally imaged by scanning near-field optical microscopy. *Applied Surface Science*, 123:400–404, 1998.
- P. Pantano und D. R. Walt. Toward a near-field optical array. *Review of Scientific Instruments*, 68:1357–1359, 1997.
- G. H. Patterson, S. M. Knobel, W. D. Sharif, S. R. Kain, und D. W. Piston. Use of green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophysical Journal*, 73:2782–2790, 1997.
- C. Pelling und T. D. Allen. Scanning electron microscopy of polytene chromosomes (I). *Chromosome Research*, 1:221–237, 1993.
- L. I. Pietrasanta, A. Schaper, und T. M. Jovin. Imaging subcellular structures of rat mammary carcinoma cells by scanning force microscopy. *Journal of Cell Science*, 107:2427–2437, 1994a.
- L. I. Pietrasanta, A. Schaper, und T. M. Jovin. Probing specific molecular conformations with the scanning force microscope. Complexes of plasmid DNA and anti-Z-DNA antibodies. *Nucleic Acids Research*, 22:3288–3292, 1994b.
- D. W. Pohl, H. Bach, M. A. Bopp, V. Deckert, P. Descouts, R. Eckert, H. J. Güntherodt, C. Hafner, B. Hecht, H. Heinzelmann, T. Huser, M. Jobin, U. Keller, T. Lacoste, P. Lambelet, F. Marquis-Waible, O. J. F. Martin, A. J. Meixner, B. Nechay, L. Novotny, M. Pfeiffer,

- C. Philipona, T. Plakhotnik, A. Renn, A. Sayah, J.-M. Segura, B. Sick, U. Siegner, G. Tarach, R. Vahldieck, U. Wild, D. Zeisel, und R. Zenobi. Optical microscopy in the nano-world. *Chimia*, 51:760–767, 1997.
- D. W. Pohl und D. Courjon, Editoren. *Near Field Optics*, Band 242 von *NATO ASI Series E*. Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, 1993.
- D. W. Pohl, L. Novotny, B. Hecht, und H. Heinzelmann. Radiation coupling and image-formation in scanning near-field optical microscopy. *Thin Solid Films*, 273:161–167, 1996.
- S. M. Potter, C. M. Wang, P. A. Garrity, und S. E. Fraser. Intravital imaging of green fluorescent protein using two-photon laser-scanning microscopy. *Gene*, 173:25–31, 1996.
- D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, und M. J. Cormier. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111:229–333, 1992.
- R. C. Reddick, R. J. Warmack, und T. L. Ferrell. New form of scanning optical microscopy. *Physical Review B*, 39:767–770, 1989.
- A. Richter, G. Behme, M. Süptitz, C. Lienau, T. Elsaesser, M. Ramsteiner, R. Nötzel, und K. H. Ploog. Real-space transfer and trapping of carriers into single GaAs quantum wires studied by near-field optical spectroscopy. *Physical Review Letters*, 79:2145–2148, 1997.
- G. Roberts, Editor. *Langmuir-Blodgett-Films*. Plenum Press, New York, 1990.
- A. G. T. Ruiter, M. H. P. Moers, N. F. van Hulst, und M. de Boer. Microfabrication of near-field optical probes. *Journal of Vacuum Science & Technology B*, 14:597–601, 1996.
- R. J. Rykki, P. J. Moyer, und P. E. West. Scanning near-field optical microscopy and scanning thermal microscopy. *Japanese Journal of Applied Physics Part 1*, 33:3785–3790, 1994.
- E. J. Sánchez, L. Novotny, G. R. Holtom, und X. S. Xie. Room-temperature fluorescence imaging and spectroscopy of single molecules by two-photon excitation. *Journal of Physical Chemistry A*, 101:7019–7023, 1997.
- V. Sandoghdar, S. Wegscheider, G. Krausch, und J. Mlynek. Reflection scanning near-field optical microscopy with uncoated fiber tips: How good is the resolution really? *Journal of Applied Physics*, 81:2499–2503, 1997.
- A. Schaper, J. P. P. Starink, und T. M. Jovin. The scanning force microscopy of DNA in air and in n-propanol using new spreading agents. *FEBS letters*, 355:91–95, 1994.
- B. Schoch, B. E. Jones, und A. Franks. A simple technique for the manufacture of optical probes for scanning near-field optical microscopes. *Measurement Science & Technology*, 5:663–666, 1994.
- U. Schwarz, M. L. Berthié, D. Courjon, und H. Bielefeldt. Simple reflection scanning near-field optical microscope using the back reflected light inside the laser cavity as detection mode. *Optics Communications*, 134:301–309, 1997.

- E. J. Seibel und G. H. Pollack. Imaging 'intact' myofibrils with a near-field scanning optical microscope. *Journal of Microscopy*, 186:221–231, 1997.
- S. K. Sekatskii und V. S. Letokhov. Single fluorescence centers on the tips of crystal needles: First observation and prospects for application in scanning one-atom fluorescence microscopy. *Applied Physics B*, 63:525–530, 1996.
- Y. R. Shen. *The Principles of Nonlinear Optics*. John Wiley & Sons, New York, 1984.
- S. J. Singer und G. L. Nicolson. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175:720–731, 1972.
- S. Smith, N. C. R. Holme, B. Orr, R. Kopelman, und T. Norris. Ultrafast measurement in GaAs thin-films using NSOM. *Ultramicroscopy*, 71:213–223, 1998.
- M. Spajer, D. Courjon, K. Sarayedine, A. Jalocha, und J. M. Vigoureux. Reflection near-field optical microscopy. *Journal de Physique III*, 1:1–12, 1991.
- M. Stähelin, M. A. Bopp, G. Tarrach, A. J. Meixner, und I. Zschokke-Gränacher. Temperature profile of fiber tips used in scanning near-field optical microscopy. *Applied Physics Letters*, 68:2603–2605, 1996.
- J. P. P. Starink und T. M. Jovin. Background correction in scanning probe microscope recordings of macromolecules. *Surface Science*, 359:291–305, 1996.
- R. J. Stephenson, S. J. O'Shea, J. R. Barnes, T. Rayment, und M. E. Welland. A near-field optical microscope with normal force distance regulation. *Review of Scientific Instruments*, 67:3891–3897, 1996.
- W. Straub, F. Bruder, R. Brenn, G. Krausch, H. Bielefeldt, A. Kirsch, O. Marti, J. Mlynek, und J. F. Marko. Transient wetting and 2d spinodal decomposition in a binary polymer blend. *Europhysics Letters*, 29:353–358, 1995.
- S. J. Strickler und R. A. Berg. Relationship between absorption intensity and fluorescence lifetime of molecules. *Journal of Chemical Physics*, 37:814–822, 1962.
- L. Stryer und R. P. Haugland. Energy transfer: A spectroscopic ruler. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 58:719–726, 1967.
- F. Stühmeier, J. B. Welch, A. I. H. Murchie, D. M. Lilley, und R. M. Clegg. Global structure of three-way DNA junctions with and without additional unpaired bases: A fluorescence resonance energy transfer analysis. *Biochemistry*, 36:13530–13538, 1997.
- H. Stürmer, J. M. Köhler, und T. M. Jovin. Microstructured polymer tips for scanning near-field optical microscopy. *Ultramicroscopy*, 71:107–110, 1998.
- V. Subramaniam, A. K. Kirsch, und T. M. Jovin. Cell biological applications of scanning near-field optical microscopy (SNOM). *Cellular and Molecular Biology*, 44:689–700, 1998.

- V. Subramaniam, A. K. Kirsch, R. V. Rivera-Pomar, und T. M. Jovin. Scanning near-field optical microscopy and microspectroscopy of green fluorescent protein (GFP) in intact escherichia coli bacteria. *Journal of Fluorescence*, 7:381–385, 1997.
- R. G. Summers, D. W. Piston, K. M. Harris, und J. B. Morrill. The orientation of first cleavage in the sea urchin embryo *Lytechinus Variegatus* does not specify the axes of bilateral symmetry. *Developmental Biology*, 175:177–183, 1996.
- K. Svoboda, W. Denk, D. Kleinfeld, und D. W. Tank. In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. *Nature*, 385:161–165, 1997.
- C. E. Talley, G. A. Cooksey, und R. C. Dunn. High-resolution fluorescence imaging with cantilevered near-field fiber optic probes. *Applied Physics Letters*, 69:3809–3811, 1996.
- E. Tamiya, S. Iwabuchi, N. Nagatani, Y. Murakami, T. Sakaguchi, K. Yokoyama, N. Chiba, und H. Muramatsu. Simultaneous topographic and fluorescence imagings of recombinant bacterial-cells containing a green fluorescent protein gene detected by a scanning near-field optical/atomic force microscope. *Analytical Chemistry*, 69:3697–3701, 1997.
- L. K. Tamm, C. Böhm, J. Yang, Z. F. Shao, J. Hwang, M. Edidin, und E. Betzig. Nanostructure of supported phospholipid monolayers and bilayers by scanning probe microscopy. *Thin Solid Films*, 285:813–816, 1996.
- Y. Tanaka, K. Fukuzawa, und H. Kuwano. Microfabrication of microtip on photocantilever for near-field scanning microscopy and investigation of effect of microtip shape on spatial resolution. *Journal of Applied Physics*, 83:3547–3551, 1998.
- R. Toledo-Crow, P. C. Yang, Y. Chen, und M. Vaez-Iravani. Near-field differential scanning optical microscope with atomic force regulation. *Applied Physics Letters*, 60:2957–2959, 1992.
- D. P. Tsai, A. Othonos, M. Moskovits, und D. Uttamchandani. Raman spectroscopy using a fiber optic probe with subwavelength aperture. *Applied Physics Letters*, 64:1768–1770, 1994.
- E. Tzahar, H. Waterman, X. Chen, G. Levkowitz, D. Karunakaran, S. Lavi, B. J. Ratzkin, und Y. Yarden. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Molecular and Cellular Biology*, 16:5276–5287, 1996.
- G. A. Valaskovic, M. Holton, und G. H. Morrison. Biological near-field scanning optical microscopy - instrumentation and sample issues for shear-force feedback. *Ultramicroscopy*, 57:212–218, 1995a.
- G. A. Valaskovic, M. Holton, und G. H. Morrison. Image-contrast of dielectric specimens in transmission mode near-field scanning optical microscopy: imaging properties and tip artifacts. *Journal of Microscopy*, 179:29–54, 1995b.
- D. A. van den Bout, J. Kerimo, D. A. Higgins, und P. F. Barbara. Near-field optical studies of thin-film mesostructured organic materials. *Accounts of Chemical Research*, 30:204–212, 1997.

- N. F. van Hulst, M. F. Garcia-Parajo, M. H. P. Moers, J. A. Veerman, und A. G. T. Ruiter. Near-field fluorescence imaging of genetic material: toward the molecular limit. *Journal of Structural Biology*, 119:222–231, 1997.
- N. F. van Hulst und A. Lewis, Editoren. *Near-Field Optics and Related Techniques*, Band 71(1-4) von *Ultramicroscopy*. Elsevier, Amsterdam, 1998.
- N. F. van Hulst, M. Moers, und E. Borgonjen. Applications of near field optical microscopy: Fluorescence in situ hybridisation, Langmuir-Blodgett films and integrated optical waveguides. In O. Marti und R. Möller, Editoren, *Photons and Local Probes*, Seiten 165–180. Kluwer Academic Publishers, 1995.
- N. F. van Hulst und M. H. P. Moers. Biological application of near-field optical microscopy. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, 15:51–58, 1996.
- N. F. van Hulst, M. H. P. Moers, und B. Bölger. Near-field optical microscopy in transmission and reflection modes in combination with force microscopy. *Journal of Microscopy*, 171:95–105, 1993a.
- N. F. van Hulst, M. H. P. Moers, O. F. J. Noordman, R. G. Tack, F. B. Segerink, und B. Bölger. Near-field optical microscope using a silicon-nitride probe. *Applied Physics Letters*, 62:461–463, 1993b.
- J. M. Vigoureux und D. Courjon. Detection of nonradiative fields in light of the Heisenberg uncertainty principle and the Rayleigh criterion. *Applied Optics*, 31:3170 – 3177, 1992.
- J. M. Vigoureux, F. Depasse, und C. Girard. Superresolution of near-field optical microscopy defined from properties of confined electromagnetic-waves. *Applied Optics*, 31:3036–3045, 1992.
- F. Vögtle. *Supramolekulare Chemie*. Teubner, Stuttgart, 1989.
- K. D. Weston und S. K. Buratto. A reflection near-field scanning optical microscope technique for subwavelength resolution imaging of thin organic films. *Journal of Physical Chemistry B*, 101:5684–5691, 1997.
- L. Wilhelmy. Über die Abhängigkeit der Capillaritäts-Constanten des Alkohols von Substanz und Gestalt des benetzten festen Körpers. *Annalen der Physik*, 119:117–217, 1863.
- R. L. Williamson und M. J. Miles. Melt-drawn scanning near-field optical microscopy probe profiles. *Journal of Applied Physics*, 80:4804–4812, 1996.
- E. Wolf und M. Nieto-Vesperinas. Analyticity of the angular spectrum amplitude of scattered fields and some of its consequences. *Journal of the Optical Society of America A*, 2:886–889, 1985.
- P. Wu und L. Brand. Resonance energy transfer: Methods and applications. *Analytical Biochemistry*, 218:1–13, 1994.
- M. Xiao. A study of resolution limit in optical microscopy: near and far field. *Optics Communications*, 132:403–409, 1996.

- M. Xiao. On near-field scanning optical microscopy homogeneous and evanescent radiation. *Journal of Modern Optics*, 44:327–344, 1997a.
- M. Xiao. Polarization effects in reflection scanning near field optical microscopy. *Optics Communications*, 136:213–218, 1997b.
- M. Xiao. Theoretical treatment for scattering scanning near-field optical microscopy. *Journal of the Optical Society of America A*, 14:2977–2984, 1997c.
- M. Xiao. private communication, 1998.
- M. Xiao und S. Bozhevolnyi. Imaging with reflection near-field optical microscope - contributions of middle and far fields. *Optics Communications*, 130:337–347, 1996.
- M. Xiao, J. Nieto, J. Siqueiros, und R. Machorro. Simple device for making optical-fiber tips for scanning near-field optical microscopes. *Review of Scientific Instruments*, 68:2787–2789, 1997.
- X. S. Xie und R. C. Dunn. Probing single molecule dynamics. *Science*, 265:361–364, 1994.
- C. Xu und W. W. Webb. Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. *Journal of the Optical Society of America B*, 13:481–491, 1996.
- F. Yang, L. G. Moss, und G. N. Phillips. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 14:1246–1251, 1996a.
- T.-T. Yang, L. Cheng, und S. T. Kain. Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Research*, 24:4592–4593, 1996b.
- A. Yariv. *Optical Electronics*. Saunders College Publishing, Philadelphia, 4 Auflage, 1991.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere gilt mein Dank

- Dr. Tom Jovin, der es mir ermöglichte, meine Ideen in seiner Abteilung am MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen zu verwirklichen und durch Vorschläge, Fragen und Forderungen neue Richtungen und Möglichkeiten aufzeigte.
- Prof. Dr. J. Mlynek für die Betreuung dieser externen Doktorarbeit.
- C. Meyer, T. Rath, V. Subramaniam und A. Jenei für die gute Zusammenarbeit im Nahfeld-Labor.
- A. Schaper und H. Huesmann für die Zusammenarbeit bei den Diaden und G. Striker für die Hilfe bei der numerischen Auswertung der Zweiphotonenexperimente.
- M. Gemkow, D. Arndt-Jovin, C. Schnetter und R. Rivera-Pomar für die Herstellung und Überlassung vieler Proben.
- S. Hell für die motivierenden Worte bzgl. der Möglichkeit/Unmöglichkeit der Zweiphotonen-Nahfeldmikroskopie.
- den feinmechanischen und elektronischen Werkstätten des MPI. Insbesondere möchte ich hier Herrn Jaitner danken, der es mit seinem Geschick vollbrachte, anhand meiner Zeichnungen kleine wundersame Objekte zu bauen.
- allen übrigen Studenten, Mitarbeitern und Gästen der Abteilung Molekulare Biologie, die zu der guten Stimmung und stimulierenden Atmosphäre beigetragen haben.
- Hanne, Meli, Imke und Vinod für das Korrekturlesen der Arbeit.

Schließlich bleibt mir noch, mich bei meinen Eltern und Hans-Hermann für die Unterstützung und das Verständnis während der letzten Jahre zu danken.