

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

Photonische
Rasterkraftmikroskopie an
fluoreszierenden Nanokristallen
und molekularen Photoschaltern

vorgelegt von

Volker Walhorn

Universität Bielefeld

Fakultät für Physik

6. November 2009

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und dabei keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Mit einer Auslegung in der Universitätsbibliothek bin ich einverstanden.

Diese Arbeit ist auf alterungsbeständigem Papier gemäß ISO 9706 gedruckt.

Bielefeld im November 2009

(Volker Walhorn)

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von
Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti
in der Arbeitsgruppe
Experimentelle Biophysik
und Angewandte Nanowissenschaften
der Fakultät für Physik der Universität Bielefeld
im Rahmen des
Sonderforschungsbereichs 613.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	3
2.1	Rasterkraftmikroskopie	3
2.1.1	Topografie	4
2.1.2	Einzelmolekülkraftspektroskopie	5
2.2	Thermodynamik und Kinetik von Wirt-Gast-Komplexen	6
2.2.1	Die Standard-Theorie	7
2.2.2	Heterogenität der chemischen Bindung	11
2.3	Photoschaltbare Calix[<i>n</i>]arene	14
2.4	Fluoreszenzmikroskopie	16
2.4.1	Fluoreszenz	17
2.4.2	Quantendots	18
2.4.3	TIRF Mikroskopie	22
2.4.4	Fluoreszenzverstärkung und Quenching	24
2.5	Die Mehrfach-Dipol Methode	28
3	Material und Methoden	33
3.1	Die Aufbauten	33
3.1.1	Das kombinierte TIRF-AFM	33
3.1.2	Das Veeco Multimode	36
3.2	Die Cantilever	37
3.2.1	Modifikation der Cantilever	39
3.2.2	Bestimmung der Federkonstanten	40
3.3	Proben	42
3.3.1	Quantendots	42
3.3.2	Goldsubstrate	43
3.3.3	Calixarene	45

3.4	Datenerfassung	46
3.4.1	Die Programme	47
3.5	Datenauswertung	51
3.5.1	Fluoreszenz	51
3.5.2	Kraftspektroskopie	52
3.5.3	Topografie	55
3.6	MDP-Simulationen	57
4	Experimente und Resultate	61
4.1	Quantendots	61
4.1.1	Externe Fluoreszenzkontrolle an einzelnen Quantendots	61
4.1.2	Externe Fluoreszenzkontrolle - Simulationen	68
4.1.3	Diskussion - Externe Fluoreszenzkontrolle	75
4.2	Photoschaltbare Calixarene	77
4.2.1	AFM-Kraftspektroskopie an photoschaltbaren Calixarenen	77
4.2.2	Kompetition und Photoschalten	80
4.2.3	Topografie photoschaltbarer Calixarene	82
4.2.4	Diskussion Calixarene	87
5	Zusammenfassung und Ausblick	91
	Glossar	95
	Literaturverzeichnis	97
	Danksagung	115
	Anhang	117
1	Veröffentlichungen	117
2	Konferenzbeiträge	117

1 Einleitung

Willst du dich am Ganzen erquicken,
So musst du das Ganze im Kleinsten erblicken.

(Johann Wolfgang von Goethe)

Die Mikroskopie hat einen wesentlichen Anteil an der Erweiterung unseres Verständnisses der belebten und unbelebten Natur. Der Aufbruch des Menschen in den Mikrokosmos ist anfangs eng mit der Entwicklung der Optik verbunden. Grundlegende optische Prinzipien, wie die geradlinige Ausbreitung des Lichtes, waren bereits in Babylon ca. 5000 v. Chr. [67] bekannt. Jedoch wurden erst mit dem Beginn der Glasherstellung in Ägypten etwa 1500 v. Chr. einfache optische Elemente wie Brennläser benutzt. Erste Versuche mit Linsenkombinationen werden von Girolamo Fracastoro (1478 - 1553) beschrieben. Die Erfindung des Mikroskops selbst kann jedoch nicht eindeutig einer Person zugeordnet werden. Sicher ist, dass Galileo Galilei (1564 - 1642) und Cornelius Drebbel (1572 - 1633) um 1610 die ersten zweilinsigen Mikroskope konstruierten [80]. Sie sind die Basis der modernen optischen Mikroskopie.

Selbst relativ einfache zweilinsige Mikroskope ermöglichten bahnbrechende Entdeckungen: So wurde der Begriff der (biologischen) Zelle von Robert Hooke (1635 - 1703) durch seine Untersuchungen an Korkrinde geprägt [66]. Robert Brown (1773 - 1858) entdeckte den Zellkern [22] und die später nach ihm benannte Brownsche Molekularbewegung [21]. Trotz großer Fortschritte in Technik und Methodik limitierte bis in die jüngste Zeit die Beugung die Auflösung aller optischen Mikroskope [101]. Erst seit etwa zwanzig Jahren kann durch verfeinerte Beleuchtungstechniken der Probe die Beugungsbegrenzung umgangen werden [29, 56, 102]. Für die Bio- und Nanotechnologie ist die Fluoreszenzmikroskopie [7, 78, 89] von herausragender Bedeutung. Fluoreszente Farbstoffe dienen dabei als Positionsmarker oder sie können durch abstandsabhängige Energietransfer-Effekte wie Fluorescence Resonant Energy Transfer (FRET) oder Fluoreszenzquenching

Informationen über ihre direkte Umgebung liefern [46, 96].

Die Entwicklung der Rastersondenmikroskopie - Scanning Probe Microscope (SPM) - [12, 14] seit Mitte der Achtziger Jahre haben die Bio- und Nanotechnologie revolutioniert: Einerseits war es erstmals möglich biologisch und biochemisch relevante Systeme unter physiologischen bzw. Umgebungsbedingungen mit einer Auflösung jenseits der Beugungsgrenze abzubilden. Andererseits erlaubt die Rasterkraftmikroskopie - Scanning Force Microscopy (SFM) - die Applikation und Detektion von Kräften im Pikonewton-Bereich, was für die mechanische Manipulation in molekularen Dimensionen oder zur Durchführung von Bindungsstudien interessant ist [109, 107].

Konzepte wie optisches [25, 58, 81] bzw. optomechanisches Schalten [68, 111] einzelner Moleküle sowie FRET bzw. Fluoreszenzquenching eröffnen für die Kombination von SPM und optischer Mikroskopie in einem Aufbau die Bearbeitung völlig neuer Fragestellungen.

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Entwicklung und dem Aufbau eines kombinierten Setups zur gleichzeitigen Durchführung von rasterkraft- und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen. Gegenstand der Messungen waren einerseits fluoreszente Halbleiter-Nanokristalle, die sogenannten Quantendots, deren Fluoreszenzemission extern durch einen Gold modifizierten Sensor beeinflusst wurde. Zur Klärung der beobachteten Phänomene ist das System durch Multiple Dipol (MDP)-Rechnungen simuliert worden. Andererseits wurden kraftspektroskopische Bindungsstudien an optisch affinitätsschaltbaren Rezeptormolekülen durchgeführt. Zudem konnte die optisch induzierte Konformationsänderung der Calixarene direkt durch topografische Messungen nachgewiesen und quantisiert werden.

Der folgende Abschnitt (Kapitel 2) widmet sich den theoretischen Grundlagen der Rasterkraft- und Fluoreszenzmikroskopie, der Reaktionskinetik von Rezeptor-Ligand-Komplexen sowie der Methode der Multiplen Dipole (engl. MDP) zur Berechnung elektromagnetischer Felder. In Kapitel 3 werden die verwendeten Aufbauten vorgestellt, sowie die Datenerfassung und Auswertung erläutert. Des Weiteren wird die Präparation der Proben und Sensoren beschrieben. Erläuterungen zur Erstellung von Modellen für die Simulationen und die Durchführung der MDP-Rechnungen schließen das Kapitel ab. Die Resultate in Kapitel 4 zeigen die externe Fluoreszenzkontrolle an einzelnen Quantendots sowie die Simulation des Experiments durch die MDP-Methode. Ferner werden die Ergebnisse der kraftspektroskopischen Bindungsstudien und der topografischen Messungen an beiden Isoformen der photoschaltbaren Calixarene präsentiert. Zum Abschluss (Kapitel 5) folgt auf Basis der Ergebnisse ein Ausblick.

2 Grundlagen

Se non è vero,
è ben trovato.

(Giordano Bruno)

2.1 Rasterkraftmikroskopie

Hochauflösende Mikroskopie jenseits der Beugungsbegrenzung des sichtbaren Lichtes war bis in die achtziger Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts nur durch Elektronenmikroskope [73] möglich. Obwohl es bereits Arbeiten über die „Umgehung“ der Beugungsbegrenzung [116] gab, konnten diese mangels technischer Möglichkeiten nicht umgesetzt werden. Mit seinen wegweisenden Arbeiten über die Messung eines abstandsabhängigen Tunnelstroms durch ein Vakuumgap [13] und der Entwicklung des Rastertunnelmikroskops 1982 [14] sowie des Rasterkraftmikroskops 1986 [12] haben Gerd Binnig et al. eine völlig neue Mikroskopietechnik aus der Traufe gehoben. Diese ersten Rastersondenmikroskope ermöglichten es, Oberflächen unter Umgebungsbedingungen bis zur atomaren Auflösung abzubilden. Grundlegende Idee der Rastersondenmikroskopie ist das punktweise Messen einer Wechselwirkung zwischen einer mikroskopisch kleinen Sonde und einer Oberfläche. Dieses Prinzip wurde je nach Art der Wechselwirkung und Oberfläche mannigfaltig variiert. Daraus entstanden neben Anderen auch das optische Rasternahfeldmikroskop - Scanning Nearfield Optical Microscope (SNOM) - [102] und das Ionenleitfähigkeits-Rastermikroskop - Scanning Ion Conductance Microscope (SICM) - [62].

Die Sonde des Rasterkraftmikroskops - Atomic Force Microscope (AFM) - ist eine mikroskopisch kleine Spitze (engl. Tip) mit einem Spitzenradius von ca. 10 nm. Der

Tip befindet sich am frei schwingenden Ende eines Federbalkens (engl. Cantilever). Die Auslenkung des Cantilevers ist ein Maß für die Wechselwirkung zwischen Tip und Oberfläche. Diese wurde von Binnig et al. noch durch ein Rastertunnelmikroskop - Scanning Tunneling Microscope (STM) - bestimmt [12]. In der breiten Anwendung haben sich heute kapazitive [27], piezoresistive [54, 16] und auch verschiedene optische Methoden etabliert. Bei vielen kommerziellen AFM hat sich die Lichtzeigermethode - Optical Beam Deflection (OBD) - durchgesetzt [87]. Dabei wird ein Laserstrahl auf einen Cantilever fokussiert, sodass der Reflex des Lasers auf eine Quadrantenphotodiode trifft. In jedem Feld des Detektors fließt ein zur Beleuchtung proportionaler Strom. Mit den Bezeichnungen aus Abbildung 2.1 bestimmt man die Auslenkung den Cantilevers wie folgt:

$$Deflection = A + B - C - D \quad (2.1)$$

$$Lateral = B + C - A - D \quad (2.2)$$

$$Sum = A + B + C + D \quad (2.3)$$

Deflection ist eine Auslenkung entlang der Normalen, *Lateral* entspricht einer Torsion entlang der Längsachse des Cantilevers und *Sum* der Summe über alle Elemente des Sensors.

Neben der ursprünglichen Verwendung des AFM, Oberflächen hochauflösend abzubilden (Kapitel 2.1.1) wurden eine Reihe weiterer Anwendungen entwickelt. Neben der Nanolithografie [84] und Nanomanipulation [109] wird in Kapitel 2.1.2 die Einzelmolekülkraftspektroskopie - Single Molecule Force Spectroscopy (SMFS) - [106] erläutert.

2.1.1 Topografie

Bei topografischen Messungen wird die Probe punktweise in einem Zeilenmuster abgetastet. Die Wechselwirkung zwischen Tip und Probenoberfläche gibt dabei Aufschluss über die Topografie der Oberfläche. Für unterschiedlich geartete Proben wurden jeweils optimierte Messmodi entwickelt. Diese kann man grob in Kontakt-, Nichtkontakt- und intermittierende Kontaktmodi unterteilen. Da sämtliche AFM Scans in dieser Arbeit im sogenannten dynamischen oder *Tapping Mode* [61, 126] durchgeführt wurden, soll auch

nur dieser im Folgenden erläutert werden: Beim *Tapping Mode* wird der Cantilver nahe seiner Resonanzfrequenz zur Oszillation angeregt und an die Probenoberfläche gebracht. Die Spitze des Cantilevers „tippt“ bei jeder Oszillation leicht auf die Oberfläche, was eine Verringerung der Amplitude des Cantilevers zur Folge hat. Während des Scans wird nun durch einen Regelkreis die (leicht verringerte) Amplitude konstant gehalten. Der aus der Regeldifferenz bestimmte Stellwert des Reglers enthält die quantitativen Topografieinformationen. Piezoscanner mit Positionssensoren erlauben zudem das direkte Abgreifen des Positionssignals.

2.1.2 Einzelmolekülkraftspektroskopie

Einzelmolekülkraftspektroskopie (engl.: SMFS) ist eine hoch sensitive Methode, die durch kraftinduzierte Dissoziation inter- oder intramolekularer Bindungen Rückschlüsse auf deren Bindungspotential, Lebensdauer und Elastizität erlaubt. Die Ursachen dieser Wechselwirkungen sind vielfältig. Einerseits gibt es Kräfte, die durch die Coulomb Wechselwirkung hervorgerufen werden. Dazu gehören ionische Bindungen, Wasserstoffbrückenbindungen und permanente Di- bzw. Multipole. Da kraftspektroskopische Messungen in der Regel in wässriger Lösung durchgeführt werden, treten auch Hydratationskräfte und Polarisationskräfte auf. Außerdem tragen Wechselwirkungen quantenmechanischen Ursprungs wie chemische Bindungen (kovalent und ionisch) sowie kurzreichweitige, repulsive sterische und Austauschwechselwirkungen (Pauli-Prinzip) bei [70]. Unabhängig von den im jeweiligen System dominierenden Wechselwirkungen sind die inter- oder intramolekularen Kräfte sehr klein (maximal einige 100 pN). Im Laufe der Zeit haben sich einige Methoden herauskristallisiert, die über eine entsprechende Empfindlichkeit und Auflösung verfügen. Neben dem im Rahmen dieser Arbeit benutzen AFM haben sich optische Pinzetten [5], Mikropipetten [38], magnetische Beads [114] und der Surface Force Apparatus (SFA) [70] als geeignete Kraftmesser etabliert. Für ein typisches AFM Kraftspektroskopie Experiment werden die Bindungspartner auf der Oberfläche bzw. am Cantilever immobilisiert. Der Cantilever wird an die Oberfläche angenähert und bis zu einem voreingestellten Schwellwert auf die Oberfläche aufgedrückt. Nach einer gewissen Haltezeit wird der Cantilever zurückgezogen. Wenn sich ein molekularer Komplex ausbilden konnte, erhält man durch das Zurückziehen des Cantilevers einen charakteris-

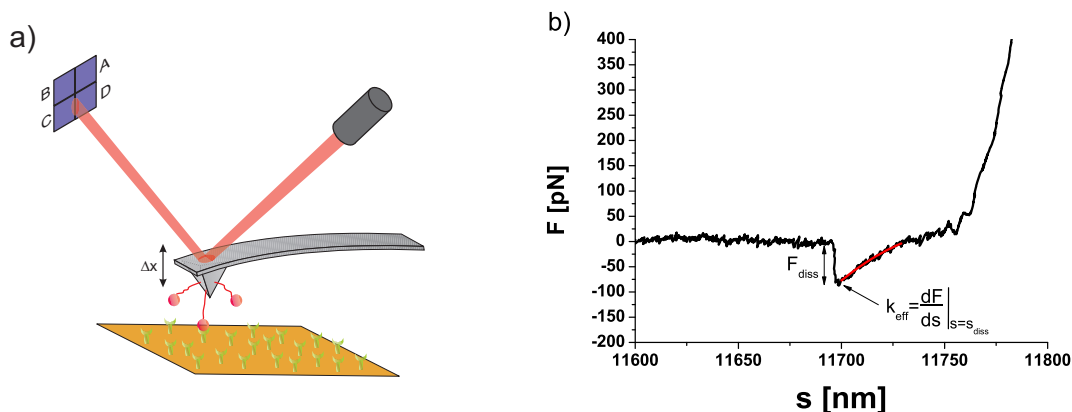


Abbildung 2.1: a) Prinzipieller Aufbau eines AFM-Kraftspektroskopie-Experiments.
 b) Die Kraft-Distanz-Kurve zeigt ein Dissoziationsereignis eines Rezeptor-Ligand Komplexes.

tischen Kraft-Distanz Plot, wie er in Abbildung 2.1b dargestellt ist. Aus diesem Graphen erhält man zwei Größen: die Dissoziationskraft F_{diss} und die Elastizität k_{eff} des Systems¹. Da Dissoziationsereignisse stochastischer Natur sind, müssen die Einzelmessungen vielfach wiederholt werden, um die wahrscheinlichste Dissoziationskraft zu ermitteln.

2.2 Thermodynamik und Kinetik von Wirt-Gast-Komplexen

Die Ableitung thermodynamischer (Ensemble-) Größen aus kraftspektroskopischen Daten wird nach wie vor lebhaft diskutiert [86]. Das 1995 von Evans und Ritchie vorgeschlagene sogenannte Standard-Modell [40] basiert auf Arbeiten von Bell [10]. Nach diesem Modell ermittelte thermodynamische Dissoziationsraten werden zwar prinzipiell von anderen Methoden wie der Oberflächenplasmonenresonanz - Surface Plasmon Resonance (SPR) - bestätigt [90], dennoch zeigen sich im Experiment Phänomene, die nicht durch das Standard-Modell erklärt werden können.

Im folgenden Kapitel wird zunächst das Standard-Modell vorgestellt. Es wird bei der

¹Das System sind der Cantilever, eventuelle Crosslinker und der eigentlich interessante Wirt-Gast Komplex.

Auswertung der Kraftspektroskopiedaten benutzt, um den Vergleich mit älteren Daten zu vereinfachen [32]. In Kapitel 2.2.2 werden die Grenzen der Standard-Theorie erläutert und darauf aufbauend eine erweiterte Theorie vorgestellt [103].

2.2.1 Die Standard-Theorie

Betrachtet man ein System mit Liganden (L) und Rezeptoren (R) im thermodynamischen Gleichgewicht, so kann die Assoziations- und Dissoziationsreaktion folgendermaßen dargestellt werden:



Dabei bezeichnen L , R und $L \cdot R$ jeweils die Konzentration von Rezeptoren, Liganden und deren Komplexen in $\frac{mol}{l} = M$. Die Assoziationsrate $k_{on}^0 [M^{-1}s^{-1}]$ und die Dissoziationsrate $k_{off}^0 [s^{-1}]$ beschreiben die Reaktionsraten in der entsprechenden Richtung. Die inverse Dissoziationsrate ist zugleich die Lebensdauer des Komplexes ($\tau = (k_{off}^0)^{-1}$). Abbildung 2.2a illustriert die Kinetik zwischen zwei metastabilen Zuständen.

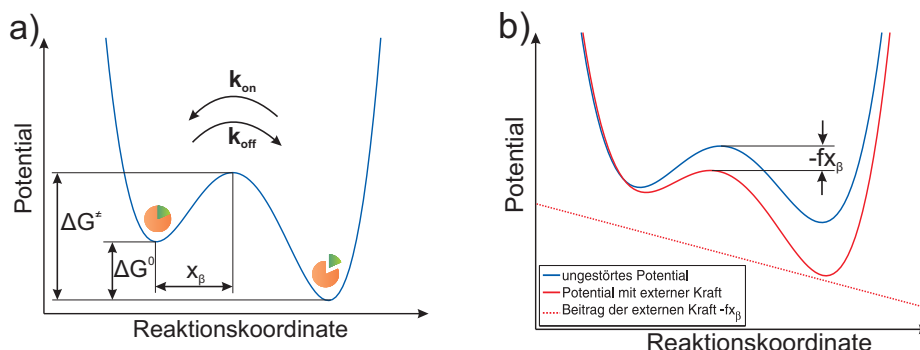


Abbildung 2.2: a) Ein System mit zwei metastabilen Zuständen. Die Komplexbildung und Dissoziation geschieht durch thermisch induziertes Überwinden der Potentialbarriere ΔG^\ddagger . b) Der Einfluss einer externen Kraft auf den Potentialverlauf. Die Barriere wird um den Betrag $f x_\beta$ reduziert.

Im thermodynamischen Gleichgewicht ($t \rightarrow \infty$) verlaufen Assoziation und Dissoziation mit gleicher Geschwindigkeit, sodass sich konstante Gleichgewichts-Konzentrationen auf

beiden Seiten der Reaktionsgleichung einstellen. Die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation $K_D = \frac{k_{off}^0}{k_{on}^0}$ ist dabei ein Maß für die Affinität der Bindung.

Der Zusammenhang von statistischen Größen und thermodynamischen Potentialen stellt sich wie folgt dar: Zunächst ist die Freie Reaktionsenthalpie ΔG bei konstantem Druck und Temperatur T definiert als

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = G_2 - G_1 \quad (2.5)$$

Die Freie Standardreaktionsenthalpie ΔG^0 ist mit der Freien Reaktionsenthalpie über die Dissoziationsgleichgewichts-Konstante K_D wie folgt verknüpft:

$$\Delta G = \Delta G^0 - RT \ln K_D \quad (2.6)$$

Dabei ist $R=8.314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ die Ideale Gaskonstante. Da sich das System im thermodynamischen Gleichgewicht befinden soll, gilt $\Delta G = 0$ und es ergibt sich:

$$\Delta G^0 = RT \ln K_D \quad (2.7)$$

Die Dissoziation eines Komplexes wie in Abbildung 2.2a illustriert, erfolgt spontan (da $\Delta G^0 < 0$). Die Dissoziationsgeschwindigkeit bzw. die Off-Rate k_{off}^0 im thermodynamischen Gleichgewicht ist eine Funktion der Potentialbarriere ΔG^\ddagger :

$$k_{off}^0 \propto e^{-\beta\Delta G^\ddagger} \quad (2.8)$$

mit $\beta = 1/k_B T$ (k_B : Boltzmannkonstante und T : Temperatur). Svante Arrhenius hat 1899 erkannt, dass die Dissoziation eines Komplexes als thermisch induziertes Überwinden der Potentialbarriere ΔG^\ddagger interpretiert werden kann [4]. Zur Bestimmung des Proportionalitätsfaktors ist es daher unumgänglich ein quantitatives Verständnis der Brownschen Molekularbewegung zu haben [34]. Eyring [42] und Kramers [75] konnten erstmals Ratenkonstanten mit Hilfe der statistischen Mechanik ableiten.

In SMFS-Experimenten wird die Potentialbarriere ΔG^\ddagger wie in Abbildung 2.2b durch eine extern angreifende Kraft abgesenkt [39, 75]:

$$\Delta G^\ddagger(f) = G^\ddagger - f x_\beta \quad (2.9)$$

Wobei $x_\beta = x_B - x_A$ gerade der Abstand vom Maximum der Potentialbarriere zum Potentialminimum im gebundenen Zustand entlang der Reaktionskoordinate ist. Setzt man

Gleichung 2.9 in 2.8 ein, folgt daraus die sogenannte Bell-Rate; die Off-Rate in Abhängigkeit einer externen Kraft:

$$k_{off}(f) = k_{off}^0 e^{\beta f x_{\beta}} \quad (2.10)$$

Für konstante Ziehgeschwindigkeit v berechnet sich die zeitliche Entwicklung der auf einen molekularen Komplex wirkenden Kraft gemäß:

$$\dot{f} = k_{eff} \cdot v = r. \quad (2.11)$$

k_{eff} ist dabei die effektive Federkonstante des Systems, welches sich aus den Federkonstanten des Cantilevers und eventueller Crosslinker zusammensetzt und r bezeichnet die Belastungsrate (engl.: loading-rate). Bei konstanter Ziehgeschwindigkeit ändert sich die externe Kraft (im Idealfall) linear in der Zeit und die Off-Rate (Gleichung 2.10) ist somit implizit zeitabhängig.

Da die Dissoziation eines molekularen Komplexes nach Evans und Ritchie [40] als thermisch induzierter Zerfall eines metastabilen Zustandes interpretiert werden kann, lässt sich dessen Kinetik wie folgt approximieren:

$$\frac{dp(t)}{dt} = -k_{off}(f(t))p(t) \quad (2.12)$$

Dabei ist $p(t)$ die Wahrscheinlichkeit, dass ein metastabiler Komplex zur Zeit t noch intakt ist. Eine Wiederassoziierung einer einmal aufgebrochenen Bindung ist dabei im Prinzip nicht möglich [37]. Es wird ferner angenommen, dass die Dissoziationswahrscheinlichkeit nur von der momentan auf den Komplex wirkenden Kraft abhängt und nicht von seiner zeitlichen Entwicklung. Rechtfertigen kann man diese Annahme dadurch, dass die molekulare Relaxation in einem Zeitraum von $t_r \approx 10^{-10} \text{ s}$ stattfindet. Die externe Kraft $f(t)$ ändert sich in diesem Zeitintervall nicht und kann jeweils als konstant angenommen werden². Eine weitere Annahme der Standard-Theorie ist, dass die Abhängigkeit der externen Kraft $f(t)$ nur von der Auslenkung des Sensors abhängt:

$$f(t) = F(vt) = F(s) \quad (2.13)$$

Diese Annahmen können unter der Voraussetzung getroffen werden, dass sich alle Komponenten im oder nahe des thermodynamischen Gleichgewichts befinden.

Die Wahrscheinlichkeit, dass ein molekularer Komplex bei einer extern anliegenden Kraft

²Einzelne Kraftspektroskopie-Experimente finden in Zeiträumen von 10^{-4} s - min statt.

f noch intakt ist, lässt aus Gleichung 2.12 bestimmen. Lösen der Gleichung durch Separation der Variablen und Substitution ($dt \rightarrow df$) ergibt:

$$p_v(f) = \exp \left(-\frac{1}{v} \int_{f_{min}}^f df' \frac{k_{off}(f')}{F'(F^{-1}(f'))} \right) \quad (2.14)$$

Wobei f_{min} der Kraftschwellwert ist, unterhalb dem Dissoziationsereignisse nicht vom thermischen Rauschen unterschieden werden können. Außerdem muss angenommen werden, dass $F(s)$ streng monoton ansteigt, damit F^{-1} definiert ist. Setzt man die Gleichungen 2.10 und 2.13 in 2.14 ein und führt die Integration aus, ergibt sich:

$$p_v(f) = \exp \left(-\frac{k_{off}}{r} \frac{\exp \left(\frac{x_\beta f}{k_B T} \right) - \exp \left(\frac{x_\beta f_{min}}{k_B T} \right)}{\frac{x_\beta}{k_B T}} \right) \quad (2.15)$$

Die wahrscheinlichste Dissoziationskraft \hat{F} für eine vorgegebene Belastungsrate r ist das Maximum der Verteilungsfunktion $-dp_v(f)/df$:

$$\hat{F} = \frac{k_B T}{x_\beta} \ln \left(\frac{x_\beta r}{k_{off}^0 k_B T} \right) \quad (2.16)$$

Diese Relation ist die Grundlage der dynamischen Kraftspektroskopie: Für über mehrere Größenordnungen variierende Belastungsraten (d. h. Ziehgeschwindigkeiten) werden die wahrscheinlichsten Dissoziationskräfte bestimmt. In einer semilogarithmischen Darstellung zeigen die Kräfte eine lineare Abhängigkeit von den Belastungsraten. Aus der Steigung der Regressionsgraden ergibt sich die Reaktionslänge x_β und die Extrapolation von \hat{F} für $r \rightarrow 0$ ermöglicht die Bestimmung der thermodynamischen Off-Rate k_{off}^0 .

2.2.2 Heterogenität der chemischen Bindung

Trotz bemerkenswert guter Ergebnisse zeigen sich bei der Standard-Theorie nicht auflösbare Widersprüche [41]: Ausgehend von der Überlebenswahrscheinlichkeit einer Bindung (Gleichung 2.14) kann eine Funktion $g(f)$ wie folgt definiert werden:

$$g(f) = -v \ln p_v(f) \quad (2.17)$$

Nach den im vorherigen Kapitel getroffenen Annahmen hat $g(f)$ die folgende Form

$$g(f) = \int_{f_{min}}^f df' \frac{k_{off}(f')}{F'(F^{-1}(f'))} \quad (2.18)$$

und ist insbesondere unabhängig von der Ziehgeschwindigkeit v . Dieser Ausdruck kann berechnet, aber ebenso aus experimentell bestimmten Datensätzen approximiert werden. Betrachtet wird ein Datensatz aus N_v experimentell bestimmten Abrisskräften f_n mit $n = 1, \dots, N_v$ und $f_n > f_{min}$ für eine beliebige, aber feste Ziehgeschwindigkeit. Die Überlebenswahrscheinlichkeit $p_v(f)$ einer Bindung kann durch einen Schätzwert $\tilde{p}_v(f)$ approximiert werden:

$$\tilde{p}_v(f) = \frac{1}{N_v} \sum_{n=1}^{N_v} \Theta(f_n - f) \quad (2.19)$$

mit der Heaviside-Funktion [$\Theta(x < 0) = 0$; $\Theta(x \geq 0) = 1$]. Die Approximation von 2.17 hat dann die Form

$$\tilde{g}(f) = -v \ln \tilde{p}_v(f). \quad (2.20)$$

Die Unabhängigkeit von der Ziehgeschwindigkeit sollte sich zeigen, wenn diese Approximation für mehrere Datensätze mit unterschiedlichen Ziehgeschwindigkeiten durchgeführt und $\tilde{g}(f)$ gegen f aufgetragen wird. Die Graphen sollten dabei für jede Geschwindigkeit auf einer einzigen Kurve zusammenfallen. Dies ist, wie auch in Abbildung 2.3 dargestellt, nicht der Fall. Diese Abweichung von der Standard-Theorie konnte sowohl für AFM kraftspektroskopische Messungen an verschiedenen Rezeptor-Ligand-Systemen [104] als auch für Experimente mit einem Mikropipettensetup gezeigt werden [94]. Des Weiteren sind die im Experiment ermittelten Verteilungen der Abrisskräfte wesentlich breiter, als durch die Standard-Theorie vorhergesagt. Ein neuer Ansatz ist die Postulierung der *Heterogenität der chemischen Bindung* (engl. Heterogeneous Bond Model (HBM))

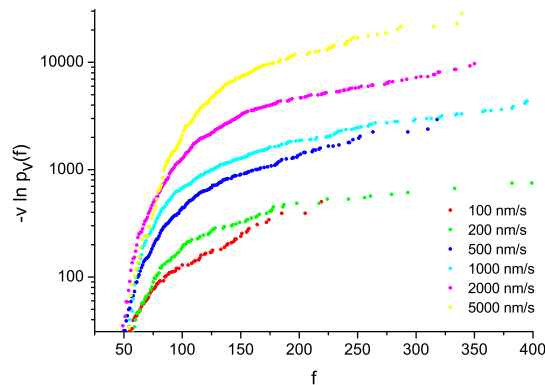


Abbildung 2.3: $g(f) = -v \ln p_v(f)$ für unterschiedliche Ziehgeschwindigkeiten. Die Daten stammen von photoschaltbaren Calixaren-Rezeptoren und Trimethylammonium Gastmolekülen. Nach der Standard-Theorie sollten die Datenpunkte für alle Geschwindigkeiten auf einem Graphen liegen

[103]. Die Annahmen der Standard-Theorie bleiben dabei gültig (Gleichungen 2.12 und 2.13). Zusätzlich wird angenommen, dass jede Wiederholung des Experiments statistischen Fluktuationen unterliegt.

Diese Schwankungen können folgende Ursachen haben:

- geometrische Variationen, wie die Orientierung von Rezeptor und Ligand zueinander und die daraus resultierende Variation der angelegten Kraft. Die externe Kraft und x_β müssen nicht notwendigerweise parallel zueinander sein.
- Variationen der unmittelbaren Umgebung eines Komplexes verursacht durch Wasser bzw. Ionen. Dazu gehören lokale Schwankungen des pH, der Ionenstärke oder lokale Fluktuationen elektrischer Felder.
- thermisch induzierte strukturelle Fluktuationen können zu verschiedenen Konformationen eines Moleküls führen und somit die Bindungseigenschaften verändern.
- komplexe (Bio-) Moleküle können mehrere verschiedene Bindungsdomänen aufweisen.

- multiple Dissoziationsereignisse können im Experiment als Einzelereignisse fehlinterpretiert werden.
- unspezifische Ereignisse können die gleiche Kraft-Distanz-Charakteristik aufweisen wie Spezifische und in die Auswertung einfließen.

Ausgedrückt werden kann dies durch das Einführen statistisch fluktuierender Parameter $\alpha = x_\beta/k_B T$ und k_{off}^0 , die in einem Parametersatz $\vec{\lambda} = (k_{off}^0, \alpha)$ zusammengefasst werden. Die Schwankung der Parameter wird durch die Wahrscheinlichkeitsdichte $\rho(\vec{\lambda}, \vec{\mu})$ mit den Fit-Parametern $\vec{\mu}$ wiedergegeben. Die mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit einer Bindung $\bar{p}_v(f, \vec{\mu})$ ergibt sich dann als:

$$\bar{p}_v(f, \vec{\mu}) = \frac{\int d\vec{\lambda} \rho(\vec{\lambda}, \vec{\mu}) p_v(f, \vec{\mu})}{\int d\vec{\lambda} \rho(\vec{\lambda}, \vec{\mu}) p_v(f_{min}, \vec{\mu})} \quad (2.21)$$

mit der Überlebenswahrscheinlichkeit p_v aus Gleichung 2.15. Es hat sich allerdings gezeigt, dass eine Randomisierung der thermischen Dissoziationsrate k_{off}^0 keine bessere Übereinstimmung zwischen Theorie und den experimentellen Daten zur Folge hat [103]. Da die Bell-Rate (Gleichung 2.10) ohnehin eine Exponentialfunktion von α ist, sollte eine Variation von k_{off}^0 vergleichsweise geringe Auswirkungen haben. Die Fluktuation der Dissoziationslänge x_β kann durch eine abgeschnittene Normalverteilung approximiert werden:

$$\rho(\alpha; a, \sigma) = \exp\left[-\frac{(\alpha - a)^2}{2\sigma^2}\right] \Theta(\alpha) \quad (2.22)$$

Dabei geben a und σ das Mittel und die Standardabweichung von α wieder. Dieser Ansatz zeigt eine sehr gute Übereinstimmung zwischen Theorie und experimentellen Daten [48]. Der neue Parameter ist demzufolge die Dispersion der effektiven Dissoziationslänge x_β .

2.3 Photoschaltbare Calix[*n*]arene

Calix[*n*]arene sind eine Klasse zyklischer Oligomere aus *n* Phenolen oder Phenolderivaten, die durch Methylengruppen miteinander verbunden sind. Phenolcalix[*n*]arene werden durch die Kondensationsreaktion von *para*-Alkylphenolen und Formaldehyd [57] synthetisiert. Die kelchförmige Gestalt dieser Makrocyclen in der *Krone*-Konformation hat zur Bezeichnung Calix[*n*]aren (lat. Calix=Kelch) geführt. Diese Systeme bilden durch die vielfältigen Möglichkeiten der Modifikation einen idealen Ausgangspunkt für maßgeschneiderte Rezeptorsysteme [11]. In dieser Arbeit werden ausschließlich Resorc[4]arene verwendet, die durch Kondensation des Phenolderivats Resorcin mit Aldehyden erhalten werden ³. Abbildung 2.4 zeigt neben der planar gezeichneten Struktur auch eine dreidimensionale Darstellung der Rezeptorkavität.

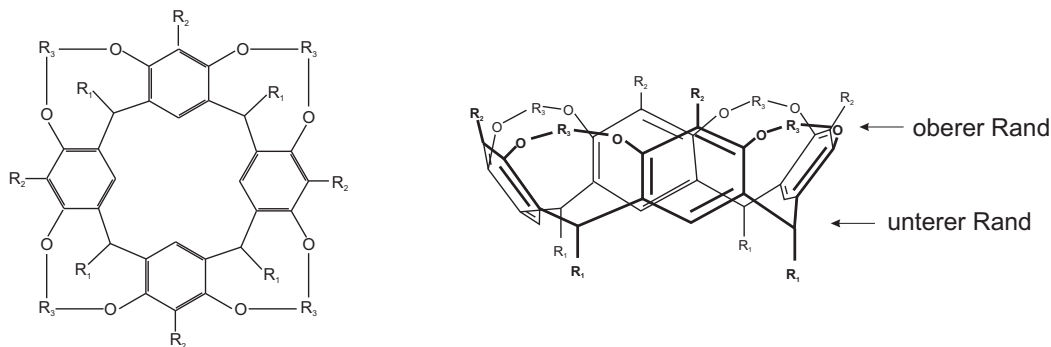


Abbildung 2.4: Planare und dreidimensionale Strukturformel eines Resorcarens

Resorcarene können mit geeigneten Gastmolekülen supramolekulare Komplexe bilden. Dabei gibt es im Wesentlichen drei verschiedene Wechselwirkungen, die eine Komplexbildung ermöglichen: Die Sauerstoffatome des oberen Ringes können Metallionen koordinieren und Wasserstoffbrückenbindungen mit Ammoniumionen ausbilden. Zudem kann die sogenannte Kation- π -Wechselwirkung einen supramolekularen Komplex stabilisieren. Dabei handelt es sich um eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen den elektronenreichen aromatischen Ringen der Kavität und einem elektronenarmen Liganden [82].

³Aus Gründen der besseren Lesbarkeit werden diese im Folgenden nur noch Calixarene bzw. Resorcarene genannt.

Die in dieser Arbeit verwendeten photoschaltbaren Calixarene sind wie folgt modifiziert: Zur Immobilisierung auf Goldsubstraten ist der untere Rand des Kelches (R_1) mit Di-*n*-decylsulfid Gruppen modifiziert. Diese ermöglichen die Ausbildung selbstassemblierter

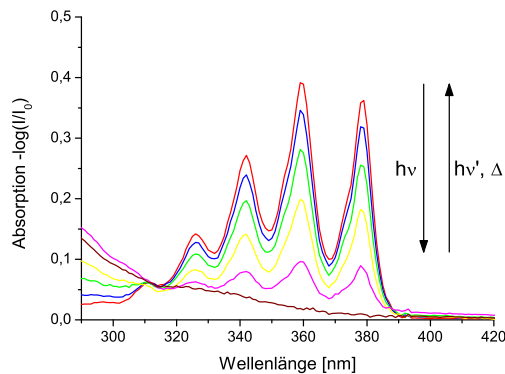


Abbildung 2.5: Absorptionsspektren von Anthracen. Eine millimolare Anthracenlösung in Chloroform vor der UV-Bestrahlung (rot) und während einer anhaltenden UV-Exposition ($h\nu$). Der wachsende Anteil der Anthracendimere zeigt sich durch das Verschwinden der Absorptionsbanden im Bereich von 300-380 nm und durch die Ausbildung neuer Absorptionsbanden unterhalb von 300 nm. Erwärmen oder Bestrahlung mit einer Wellenlänge unter 300 nm ($h\nu'$) kehrt den Prozess um.

Monolagen [118]. Die Photoschaltbarkeit wird durch zwei Anthracengruppen (R_2) am oberen Rand des Kelches erreicht. Anthracen ist ein bekanntes photochromes System, d.h. durch Einstrahlen von Licht einer bestimmten Wellenlänge ändern sich seine Absorptionseigenschaften. Beim Anthracen wird dieser Effekt durch eine Photodimerisierung ([4+4]-Cycloaddition) hervorgerufen [45, 33]. Am Absorptionsspektrum von Anthracen in Abbildung 2.5 erkennt man das Verschwinden der Absorptionsbanden im Bereich von 300-380 nm, verursacht durch das Einstrahlen von nahem UV-Licht ($\lambda=365\pm 5$ nm). Gleichzeitig bilden sich neue Absorptionsbanden unterhalb von 300 nm aus. Erwärmen über $60^\circ C$ oder Einstrahlen von Licht mit einer Wellenlänge unterhalb 290nm führt zu einer Umkehrung der Reaktion. Allerdings wird das Ausgangsniveau nicht wieder erreicht, da neben den Dimeren weitere Nebenprodukte entstehen, die nicht wieder zurückreagie-



Abbildung 2.6: Bildung eines Endoperoxids durch die Anwesenheit von Sauerstoff.

ren. Außerdem sind nicht alle Anthracendimere reversibel schaltbar [19]. Eine häufige mit der Dimerisierung konkurrierende Nebenreaktion ist die Bildung eines Anthracenendo-peroxids (siehe Abbildung 2.6). Diese kann allerdings unterdrückt werden, indem die UV-

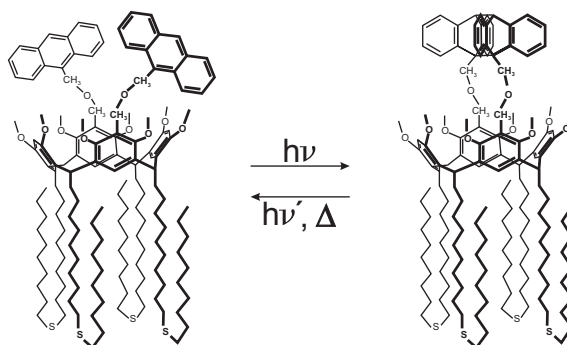


Abbildung 2.7: Photoschaltbares Calixaren in „offener“ und „geschlossener“ Form.

Bestrahlung in einem entgasten Lösungsmittel unter Schutzgas durchgeführt wird. Wie in Abbildung 2.7 illustriert, lässt sich die reversible Anthracendimerisierung für Anthracen-modifizierte Calixarene ausnutzen, um das Molekül durch Einstrahlen von Licht bzw. Erwärmung zwischen einer offenen und einer geschlossenen Isoform wechseln zu lassen. Die Bestrahlung der photoschaltbaren Calixarene mit Wellenlängen unterhalb von 300nm hat sich jedoch als problematisch herausgestellt, da neben dem „Öffnen“ des Rezeptors auch Bindungen innerhalb des Resorcarens aufgebrochen werden können [110].

2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Das Fluoreszenzmikroskop wurde bereits 1913 von H. Lehmann in Zusammenarbeit mit der Firma Zeiss entwickelt [78]. Kern der Technik ist die Beobachtung der Fluoreszenz (siehe Kapitel 2.4.1) oder Phosphoreszenz eines optisch angeregten Präparates. Anfangs war die hohe Hintergrundfluoreszenz ein gravierender Nachteil dieser Methode. Die Ursache dafür ist, dass entlang des gesamten Lichtwegs durch das Präparat Lumineszenz angeregt wird, wobei aber nur Licht aus dem Fokus scharf auf einem Detektor abgebildet wird. Fluoreszierende Objekte außerhalb des Fokus erzeugen einen unscharfen Hintergrund. Zur Lösung dieses Problems haben sich im Wesentlichen zwei Techniken etabliert. Zum einen gibt es die Möglichkeit, das Detektionsvolumen einzuschränken.

Prominentester Vertreter dieser Technik ist das Fluoreszenzmikroskop mit konfokaler Detektion [89]. Andererseits kann man das Anregungsvolumen begrenzen. Hier gibt es neben der der Zweiphotonenmikroskopie [28] die Interne-Totalreflektions-Fluoreszenz-Mikroskopie [7] (engl.: Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (TIRFM)), die in Kapitel 2.4.3 detaillierter betrachtet wird. Die Fluoreszenzmikroskopie ist heute eine etablierte und breit angewandte Methode in biotechnologischen bzw. biomedizinischen Untersuchungen. Fluorophore dienen dabei als Positionsmarker. Durch *Particle Tracking*-Techniken können die zeitliche Entwicklung der Farbstoffposition aufgenommen und dreidimensionale Bewegungsprofile erstellt werden. Dadurch sind Einsichten in verschiedene aktive und passive Transportphänomene möglich [124].

2.4.1 Fluoreszenz

Fluoreszierende Stoffe haben die Eigenschaft Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren und nach einer charakteristischen Zeit $\tau \approx 10^{-9}s$, der Fluoreszenzlebensdauer, Licht einer längeren Wellenlänge zu emittieren [65, 77]. Veranschaulicht wird dieser Prozess durch ein so genanntes Jablonski-Diagramm (Abbildung 2.8). Im Fall der Absorption eines einzelnen Photons wird das Fluorophor vom Grundzustand S_0 durch Absorption eines Photons mit der Energie $E_e = h\nu_e = c/\lambda_e$ in einen angeregten Zustand S_1 angeregt (Abbildung 2.8,a). Das Fluorophor relaxiert innerhalb kurzer Zeit ($\approx 10^{-11}s$) in den niedrigsten Vibrationszustand (Abbildung 2.8b). Unter Abgabe eines Photons der Energie ($E_f = h\nu_f = c/\lambda_f$; $E_f < E_e$) geht das System in den Grundzustand über (Abbildung 2.8,c). Neben diesem „erwünschten“ Prozess gibt es auch störende Effekte wie die Interkombination - Intersystem Crossing (IC) -, bei der das Fluorophor in einen metastabilen Triplettzustand T übergeht und schließlich durch Phosphoreszenz $\tau > 10^{-3}s$ in den Grundzustand relaxiert (Abbildung 2.8,d→e). Zudem kann das Fluorophor strahlungslos relaxieren. Neben der Abregung durch Stöße spielt das Quenchen der Fluoreszenz eine wichtige Rolle. Dabei gibt das System seine Energie an einen Akzeptor in seiner unmittelbaren Umgebung ab (Abbildung 2.8,f). Dieser Effekt wurde bereits 1948 von Theodor Förster [46] postuliert. Zuletzt kann das Fluorophor durch photochemische Prozesse bleichen (Abbildung 2.8,g). Eine erneute Anregung ist dann nicht mehr möglich.

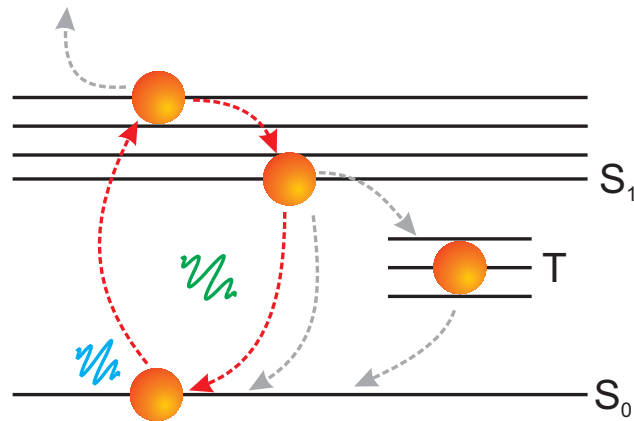


Abbildung 2.8: Beschreibung der Fluoreszenz durch ein Jablonski-Diagramm. Neben der eigentlichen Fluoreszenz (Prozess $a \rightarrow b \rightarrow c$) treten auch unerwünschte Effekte wie Intersystem Crossing (d), Phosphoreszenz (e) oder strahlungslose Relaxation durch Stöße oder Quenchen (f) sowie das Bleichen des Fluorophors durch photochemische Effekte (g) auf.

2.4.2 Quantendots

Der Einsatz von Quantendots oder Quantenpunkten als Fluoreszenzfarbstoff hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Die optischen Eigenschaften von Halbleiternanopartikeln sind jedoch schon lange bekannt. Bereits 1932 wurde von H.P. Rooksby die rötlich gelbe Tönung verschiedener Silikatgläser mit dem Einschluss mikroskopischer Verunreinigungen durch Cadmiumselenid (CdSe) und Cadmiumsulfid (CdS) in Verbindung gebracht [105]. Der Nachweis der Korrelation zwischen Bandlücke und Abmessungen der Halbleiterkristalle gelang A.I. Ekimov 1985 [35]. Die Verkleinerung der Abmessungen eines Halbleiterkristalls vom makroskopischen, dreidimensionalen Bulk zum quasi nulldimensionalen quantenmechanischen Potentialtopf (engl. quantum well) verursacht eine Einschränkung der möglichen Elektronenwellenfunktionen Ψ_e und somit der möglichen Wellenvektoren \mathbf{k} (Abbildung 2.9). Betrachtet man als vereinfachtes Modell ein Elektron in einem beliebig tiefen dreidimensionalen Kastenpotential mit der Ausdehnung \mathbf{L} so sind nur Elektronenwellenfunktionen mit der Randbedingung $\Psi_e(0) = \Psi_e(\mathbf{L}) = 0$ erlaubt.

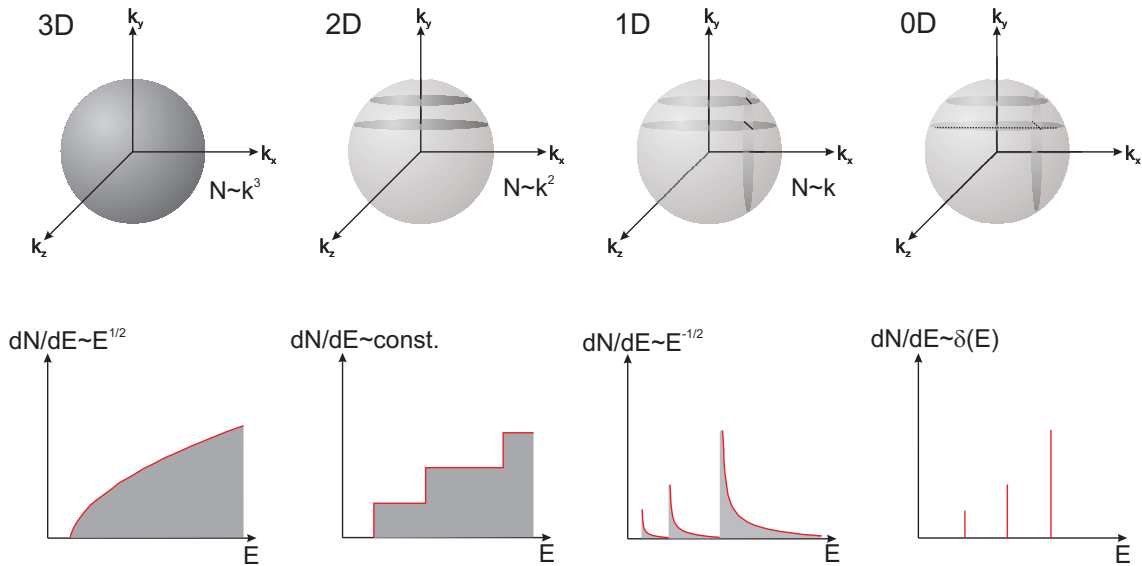


Abbildung 2.9: Oben: Die erlaubten Wellenvektoren k eines Elektrons im drei-, zwei-, ein- bzw. nulldimensionalen Potentialtopf. Unten: Die jeweils dazugehörigen Zustandsdichten dN/dE .

Die Schrödingergleichung

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 \Psi_e(\mathbf{x}) + V(\mathbf{x}) \Psi_e(\mathbf{x}) = E \Psi_e(\mathbf{x}) \quad (2.23)$$

wird von Funktionen

$$\Psi_e \propto \sin\left(\frac{n_x \pi x}{L_x}\right) \sin\left(\frac{n_y \pi y}{L_y}\right) \sin\left(\frac{n_z \pi z}{L_z}\right) \quad (2.24)$$

mit $n_x, n_y, n_z \in \mathbb{N}$ gelöst. Die zugehörigen Energieeigenwerte

$$E_n \propto \frac{\hbar^2 n_x^2}{2m L_x^2} + \frac{\hbar^2 n_y^2}{2m L_y^2} + \frac{\hbar^2 n_z^2}{2m L_z^2} \quad (2.25)$$

sind in n_x, n_y, n_z quantisiert. Obwohl dies eine grobe Vereinfachung ist, werden typische Eigenschaften wie die Abhängigkeit der Bandlücke bzw. des Energieniveaus E_n von den Abmessungen qualitativ richtig dargestellt. Beispielsweise kann in CdSe-Quantendots die Bandlücke von 1.7eV (tiefrot) bis 2.4eV (grün) durch eine Reduzierung des Durchmessers von 20nm auf 2nm erreicht werden [91]. Das hier benutzte Bändermodell gilt jedoch nur für unendlich ausgedehnte Festkörper. Die geringen Ausmaße der Quantendots und die damit verbundene große Anzahl an Oberflächenatomen verhindert eine diskrete Bandstruktur. Einzelne Energieniveaus liegen innerhalb der Bandlücke und ermöglichen

so eine Vielzahl an konkurrierenden strahlungslosen Zerfällen [2, 96]. Die Lösung dieses Problems ist die sogenannte *Passivierung*. Die Quantendots erhalten eine Schale aus einem weiteren halbleitenden Material mit einer wesentlich größeren Bandlücke. Dies ist schematisch in Abbildung 2.10 dargestellt. Der zentrale Teil mit einer Bandlücke E_G ist der eigentliche Quantenpunkt, während die äußeren Teile mit der größeren Bandlücke die passivierende Schale darstellen.

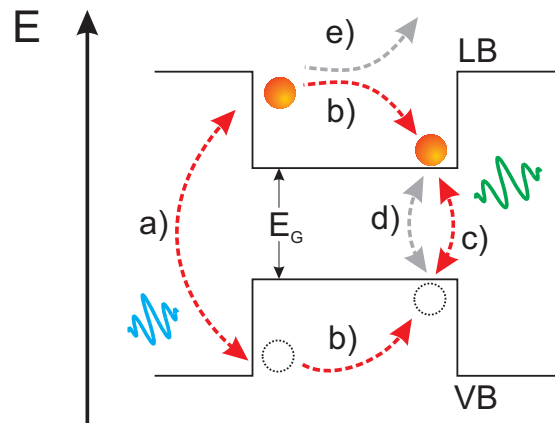


Abbildung 2.10: Bandschema und Fluoreszenz eines Core-Shell Quantendots. a) Erzeugung eines Exzitons durch das Einstrahlen von Licht mit $E = \hbar\omega > E_G$. b) Relaxation von angeregten Vibrationszuständen des Exzitons, Loch und Elektron wandern in die niedrigsten Energiezustände des Valenz- (VB) bzw. Leitungsbandes (LB). c) Rekombination von Elektron und Loch unter Emission von Licht. Ursache des charakteristischen Blinkens ist einerseits d) strahlungslose Rekombination andererseits das e) Tunneln von Elektronen. Bleichen wird durch photoinduzierte Gitterdefekte bewirkt, was zu einer Zunahme der strahlungslosen Rekombination d) führt. Die Kristallstruktur wird irreversibel gestört, sodass keine Photoemission mehr möglich ist.

Da in halbleitenden Materialien nicht nur Elektronen, sondern auch Löcher zu den elektronischen und optischen Eigenschaften beitragen [72], muss das in Kapitel 2.4.1 eingeführte Konzept der Fluoreszenz modifiziert werden. In Abbildung 2.10 wird die Fluoreszenz eines Quantendots illustriert. Einstrahlen von Licht mit $\hbar\omega > E_g$ erzeugt ein Quasiteilchen, das sogenannte Exziton. Exzitonen sind angeregte aber gebundene Elektron-Loch Paare. Angeregte Vibrationszustände relaxieren, d.h. Elektron und Loch wandern an

die jeweiligen Bandkanten. Unter Emission eines Photons rekombinieren Loch und Elektron [18]. Auch in Quantendots gibt es eine Reihe unerwünschter Effekte, dazu gehören ein Blaushift der Photoemission, Blinken und Bleichen. Die im Folgenden erläuterten Effekte sind noch nicht vollständig verstanden und Gegenstand aktueller Arbeiten. Sie stellen somit einen Querschnitt aktueller Arbeitshypothesen dar.

In spektral aufgelösten Fluoreszenzmessungen an einzelnen Quantendots kann eine Verschiebung des Emissionsspektrums zu kürzeren Wellenlängen beobachtet werden [117]. Ursache des Blaushift ist nach gegenwärtiger Meinung eine fortschreitende photoinduzierte Oxidation des Quantendots (z.B. $\text{CdSe} \rightarrow \text{CdSeO}_x$ [64, 71]), wodurch der photoaktive Kern kleiner und die Bandlücke E_G größer wird.

Obwohl in jüngster Vergangenheit erstmals von nicht blinkenden Quantendots berichtet wurde [122], ist in der breiten Anwendung die intermittierende Photoemission ein kennzeichnendes Merkmal. Als Ursache wird allgemein Auger-Photoionisation angenommen [117]. Die Dunkelzeit des Quantendots entspricht dabei der Zeit, die ein Elektron benötigt, um zurückzutunneln und zu rekombinieren. Zudem wurden auch Einflüsse des umgebenden Mediums auf die Blinkfrequenz beobachtet [74].

Zuletzt bleibt das Bleichen. Zwar sind Quantendots erheblich photostabiler als viele organische Farbstoffe [125], dennoch bleichen auch sie nach einer gewissen Zeit. Die Ursachen des Bleichens sind noch nicht endgültig geklärt, wahrscheinlich sind sie aber vielfältig. Einerseits wird durch die zuvor genannte Oxidation des Quantendots sein Kern kleiner und somit auch sein Absorptionsquerschnitt [50]. Neben dem plötzlich auftretenden Bleichen wurde außerdem eine sukzessive Verminderung der Photoemission bis zum Bleichen beobachtet. Dieser Vorgang wird mit oxidationsinduzierten Gitterdefekten in Zusammenhang gebracht. Diese Defekte sollen kompetitierende, strahlungslose Zerfallskanäle öffnen, die mit Fortschreiten dieses Prozesses die Rekombination dominieren [15]. Quantendots bleichen jedoch auch in einer Stickstoffatmosphäre [117], sodass Photooxidation mit Sicherheit nicht der einzige Prozess ist, der zum Bleichen der Quantenpunkte beiträgt.

2.4.3 TIRF Mikroskopie

Zentrale Idee der TIRF Mikroskopie ist die Beleuchtung des Präparates durch ein evaneszentes Feld [7]. Evaneszente Felder treten niemals in homogenen Medien auf. Ihre Entstehung erfordert immer die Wechselwirkung von Licht mit Inhomogenitäten des Mediums [17, 96]. Im einfachsten Fall ist dies die Grenzfläche zwischen zwei dielektrischen Medien. Betrachtet man eine beliebig polarisierte ebene Welle $\mathbf{E} = \mathbf{E}_0 e^{i(\mathbf{k}\mathbf{x} - \omega t)}$, so kann diese als eine Superposition von zwei orthogonal zueinander polarisierten Wellen beschrieben werden:

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}^p + \mathbf{E}^s \quad (2.26)$$

Wie in Abbildung 2.11 illustriert, wählt man gewöhnlich die Richtung der Polarisation jeweils senkrecht (\mathbf{E}^s) und parallel (\mathbf{E}^p) zur Einfallsebene, welche durch den Wellenvektor \mathbf{k} und den Normalenvektor \mathbf{n} der Grenzfläche aufgespannt werden. Hier soll eine ebene Welle aus einem optisch dichteren Medium (z.B. Glas) auf die Grenzfläche zu einem optisch dünneren Medium (z.B. Luft) treffen. Die dielektrischen Konstanten der Medien sind

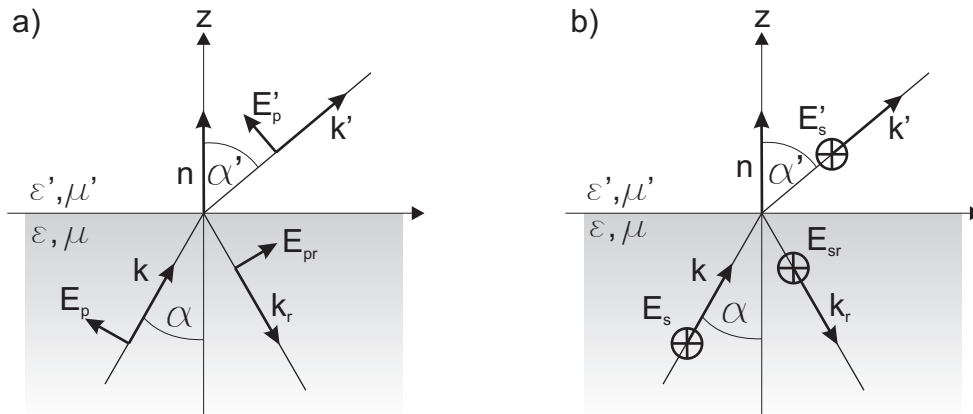


Abbildung 2.11: Zwei orthogonal zueinander polarisierte Wellen mit dem Wellenvektor \mathbf{k} treffen auf eine Grenzfläche. In a) ist die Polarisation parallel zur Einfallsebenen, in b) senkrecht dazu.

in diesem Fall $\epsilon = 2,25$ und $\epsilon' = 1$ und die magnetischen Permeabilitäten $\mu = \mu' = 1$. Für die Wellenvektoren der einfallenden \mathbf{k} und transmittierten Welle \mathbf{k}' ergibt sich

$$\mathbf{k} = (k_x, k_y, k_z), \quad |\mathbf{k}| = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon\mu} = n \quad (2.27)$$

$$\mathbf{k}' = (k'_x, k'_y, k'_z), \quad |\mathbf{k}'| = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon'\mu'} = n' \quad (2.28)$$

mit den Brechungsindizes (n, n') . Nach dem Snelliusschen Brechungsgesetz [17] gilt nun:

$$\frac{\sin \alpha'}{\sin \alpha} = \frac{|\mathbf{k}|}{|\mathbf{k}'|} = \frac{n}{n'} = \tilde{n} \quad (2.29)$$

$$\alpha_c = \arcsin \tilde{n} \quad (2.30)$$

mit dem kritischen Winkel α_c für die Totalreflexion. Für eine ebene p-Welle, die unter einem Winkel $\alpha > \alpha_c$ auf die Grenzfläche trifft, lässt sich der transmittierte Anteil schreiben als:

$$E'_p = E'_0 \exp(-i(\mathbf{k}'\mathbf{x} - \omega t)) \quad (2.31)$$

$$\Leftrightarrow E'_0 \exp(-i(|\mathbf{k}'|x\tilde{n} \sin \alpha - \omega t)) \exp(-|\mathbf{k}|z\sqrt{\tilde{n}^{-2} \sin^2 \alpha_1 - 1}) \quad (2.32)$$

Das evaneszente Feld fällt in z-Richtung exponentiell ab und propagiert in x-Richtung entlang der Grenzfläche. Das Abklingen des Feldes mit wachsendem Abstand von der Grenzfläche ist gegeben durch den zweiten Exponentialterm in 2.32: $\gamma = |\mathbf{k}|\sqrt{\tilde{n}^{-2} \sin^2 \alpha_1 - 1}$. Für einen Einstrahlwinkel von $\alpha = 45^\circ$ ist $\gamma = 2.22\lambda$, d.h. nach der halben Wellenlänge ist das Feld schon um den Faktor e reduziert. Da die Polarisation erhalten bleibt [17, 96], ergibt sich eine Besonderheit der evaneszenten Wellen: elektromagnetische Wellen sind Longitudinalwellen d.h. $\mathbf{E} \perp \mathbf{k}$. Das evaneszente Feld einer p-Welle hat jedoch auch transversale Anteile. Eine weitere Besonderheit zeigt sich bei der Berechnung der Amplituden E_0 des evaneszenten Feldes. Die Snellius-Koeffizienten (siehe Gleichung 2.33) geben die Amplitudenverhältnisse von eingestrahelter Welle und gebrochener bzw. reflektierter Welle wieder. Die Intensität erhält man durch das Betragsquadrat des entsprechenden Anteils. Für Intensitäten (I_s und I_p) der Transmission gilt:

$$I_s = \left| \frac{E'_0}{E_0} \right|_s^2 \quad I_p = \left| \frac{E'_0}{E_0} \right|_p^2 \quad (2.33)$$

In Abbildung 2.12 sind die Amplituden für ein evaneszentes Feld aufgetragen, die von einer p-polarisierten bzw. s-polarisierten Welle erzeugt wurden. Nahe des Winkels α_c zeigt sich, abhängig von der Polarisation, eine deutliche Überhöhung der Amplitude, die für wachsende Einstrahlwinkel schnell wieder absinkt. D.h. die Amplitude des evaneszenten Feldes kann erheblich größer sein als die des eingestrahnten Feldes. Ursache dieser Amplitudenverstärkung sind Polarisationseffekte der Oberfläche [97, 96], die sogar noch wesentlich erhöht werden können, wenn eine dünne Metallschicht oder metallische Nanopartikel auf der Grenzfläche aufgebracht werden [55, 98].

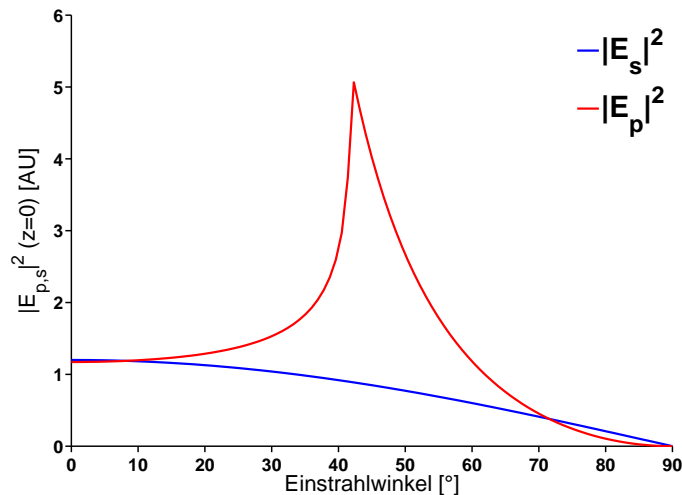


Abbildung 2.12: Intensität einer evaneszenten Welle an einer Luft-Glas Grenzfläche. Wird das Feld durch eine p-polarisierte Welle erzeugt (rot) zeigt sich im Gegensatz zur s-polarisierten Welle (blau) eine deutliche Feldüberhöhung.

2.4.4 Fluoreszenzverstärkung und Quenching

Die Fluoreszenzemission eines Farbstoffes kann sehr empfindlich auf Veränderungen seiner Umgebung reagieren [77, 96]. Insofern können Farbstoffe weit mehr sein als einfache Positionsmarker. Lokale Variationen der Feldintensität an Grenzflächen haben ebenso Einfluss auf die Fluoreszenzemission, wie die Wechselwirkung des Farbstoffes mit seiner Umgebung [3, 36, 98]. Strahlungslose Energietransfereffekte wie Fluoreszenzquenching oder FRET aber auch Exziton-Plasmon-Kopplung sind Dipol-Dipol Wechselwirkungen und reagieren durch die r^{-6} -Abhängigkeit sehr empfindlich auf Variationen des Abstandes. Diese Phänomene ermöglichen z.B. Abstandsmessungen mit Nanometer Auflösung [115].

Die messbare Fluoreszenzintensität I eines Fluorophors bestimmt sich aus dem Anteil des emittierten elektrischen Feldes \mathbf{E}_{em} , der innerhalb des Öffnungswinkels der Mikroskopoptik, mit der numerischen Apertur NA , abgestrahlt wird. Dies entspricht dem Integral der elektrischen Feldintensität $|\mathbf{E}_{em}|^2$ über eine Kugeloberfläche mit dem Radius R , die

vom Öffnungswinkel des Objektivs begrenzt wird.

$$I = R^2 \int_{NA} |\mathbf{E}_{em}|^2 \sin \theta \, d\theta \, d\phi \quad (2.34)$$

Dabei ist die Emissionsrate des Fluorophors Γ_{em} proportional zu I .

$$\Gamma_{em} \propto I \quad (2.35)$$

Γ_{em} berechnet sich aus dem Produkt der Anregungsrate Γ_{exc} mit der Quanteneffizienz Q :

$$\Gamma_{em} = \Gamma_{exc} Q \quad (2.36)$$

Die Anregungsrate Γ_{exc} ist proportional zur externen Feldintensität am Ort des Fluorophors $|\mathbf{E}_{exc}|^2$:

$$\Gamma_{exc} \propto |\mathbf{E}_{exc}|^2 \quad (2.37)$$

Die Quanteneffizienz Q eines Farbstoffes gibt das Verhältnis von Relaxation mit Photoemission γ_r zur Gesamtrelaxationsrate $\gamma_r + \gamma_{nr}$ an:

$$Q = \frac{\gamma_r}{\gamma_r + \gamma_{nr}} \quad (2.38)$$

Grenzflächen können sowohl Einfluss auf das externe Feld \mathbf{E}_{exc} als auch auf die Quanteneffizienz Q haben. Beobachtbar ist dies durch eine entsprechende Variation der Emissionsrate Γ_{em} bzw. Fluoreszenzintensität I . Im Folgenden sollen diese Phänomene genauer betrachtet werden.

Im einfachsten Fall kann es durch Reflexionen an einer Grenzfläche zu Überlagerung mehrerer Wellen kommen. Je nach Phasenlage kommt es zu konstruktiver oder destruktiver Interferenz und somit zu einer lokalen Variation von \mathbf{E}_{exc} . Dies ist ein sogenannter Fernfeldeffekt. Je nach Feldkonfiguration und Geometrie der Grenzfläche kann er Auswirkungen über makroskopische Distanzen haben.

In dieser Arbeit sind jedoch die kurzreichweitigen Nahfeldeffekte von wesentlich größerer Bedeutung: Der oszillierende Dipol des elektromagnetischen Feldes kann das freie Elektronengas bzw. die gebundenen Elektronen eines Mediums gegen die positiven Atomrümpfe verschieben, ebenfalls zur Schwingung anregen und so lokal Verstärkungen des elektromagnetischen Feldes bewirken. Propagation und Dämpfung der so induzierten Oszillationen werden durch den Real- bzw. Imaginärteil der dielektrischen Funktion $\epsilon(\omega)$

quantisiert. Sie lässt sich direkt aus den Rotations-Gleichungen der Maxwell Gleichungen ableiten:

$$\nabla \times \mathbf{E}(\mathbf{r}) = i\omega\mu\mu_0\mathbf{H}(\mathbf{r}) \quad (2.39)$$

$$\nabla \times \mathbf{H}(\mathbf{r}) = -i\omega\epsilon\epsilon_0\mathbf{E}(\mathbf{r}) \quad (2.40)$$

Multiplizieren von Gleichung 2.39 mit μ^{-1} , anwenden der Rotation und Substitution von $\nabla \times \mathbf{H}(\mathbf{r})$ aus Gleichung 2.40 ergibt

$$\nabla \times \mu^{-1}\nabla \times \mathbf{E}(\mathbf{r}) - \frac{\omega^2}{c^2} \left[\epsilon + \frac{i\sigma}{\omega\epsilon_0} \right] \mathbf{E}(\mathbf{r}) = i\omega\mu_0\mathbf{j}(\mathbf{r}) \quad (2.41)$$

mit der dielektrischen Funktion

$$\epsilon(\omega) = \left[\epsilon + \frac{i\sigma}{\omega\epsilon_0} \right] \quad (2.42)$$

$$\Leftrightarrow \epsilon_1 + i\epsilon_2 \quad (2.43)$$

An einer Metall-Isolator Grenzfläche werden diese Oszillationen des Elektronengases (Oberflächen-) Plasmonen genannt. Zu deren Anregung muss jedoch der Wellenvektor des eingestrahlen Lichtes mit dem der Plasmonen übereinstimmen. Die Bedingung ist erfüllt, wenn sich die Dispersionsrelationen für verschiedene Medien bzw. Grenzflächen schneiden. Der Schnittpunkt der Graphen für Glas und die Grenzfläche Gold-Vakuum in Abbildung 2.13a beschreibt die Anregung von Oberflächenplasmonen in einer sogenannten Kretschmann Raether Konfiguration [76].

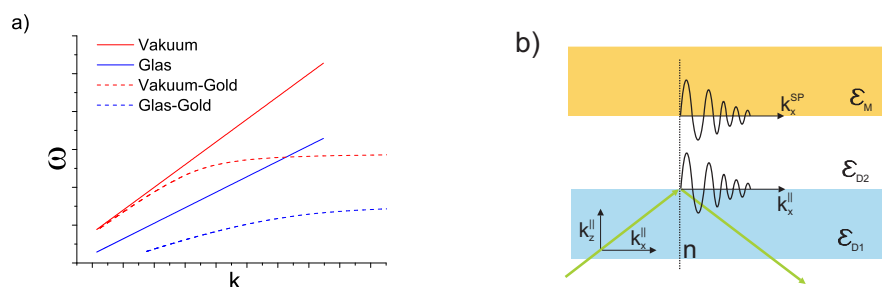


Abbildung 2.13: a) Dispersionsrelation einer elektromagnetischen Welle im Vakuum (rot) und Glas (blau), sowie an den Grenzflächen Vakuum-Gold und Glas-Gold. b) Erzeugen von Oberflächenplasmonen durch eine transversale, evaneszente Welle.

Maßgeblich für diese Arbeit ist jedoch die in Abbildung 2.13b dargestellte Otto-Konfiguration [99]. Hier wird durch Totalreflexion an der Grenzfläche zwischen zwei Dielektrika (mit $\epsilon_{D1} > \epsilon_{D2}$) eine evaneszente Welle erzeugt, deren Intensität in z-Richtung exponentiell mit dem Abstand abklingt (vgl. Kap 2.4.3). Befindet sich jedoch ein metallisches Medium sehr nah an der Grenzfläche, kann die evaneszente Welle mit den Metall koppeln und Oberflächenplasmonen anregen. Dies kann dann zu einer lokalen Erhöhung der Feldintensität führen. Allerdings ist dieser Effekt in seiner Ausdehnung sehr begrenzt. Die Eindringtiefe z_i und die Propagationslänge L_i sind ein Maß für den Abfall der Plasmonenintensität parallel und senkrecht der Grenzflächennormalen \mathbf{n} .

$$z_i = \frac{\lambda}{2\pi} \sqrt{\frac{\text{Re}(\epsilon_M) + \epsilon_{D1}}{\text{Re}(\epsilon_M)^2}} \quad (2.44)$$

$$L_i = \frac{c \text{Re}(\epsilon_M)^2}{\left(\frac{\text{Re}(\epsilon_M)\epsilon_{D1}}{\text{Re}(\epsilon_M) + \epsilon_{D1}}\right)^{3/2} \text{Im}(\epsilon_M)\omega} \quad (2.45)$$

Für ein Vakuum-Gold-Glas System und eine Wellenlänge von 488nm sind $z_i \approx 52\text{nm}$ und $L_i \approx 30\text{nm}$. Verstärkungseffekte durch Oberflächenplasmonen sind demzufolge auf kleine Bereiche lokalisierte Phänomene.

Neben den externen Feldern können sich auch Eigenschaften wie die Quanteneffizienz Q des Farbstoffes ändern. Die Wechselwirkung eines Fluorophors mit seiner Umgebung kann Einfluss auf die Raten der strahlenden Relaxation γ_r und strahlungslose Relaxation γ_{nr} haben. Metallische Oberflächen in der Nähe eines Farbstoffes führen im Allgemeinen durch strahlungslosen Energietransfer zu einer wesentlichen Dämpfung der Fluoreszenzemission. Die Kopplung des Dipols mit dem Elektronengas des Metalls führt so zu einer Zunahme der strahlungslosen Relaxationsrate. Bei einer konstanten Anregungsrate γ_{exc} kann das nach Gleichung 2.36 als eine Verringerung der Quanteneffizienz interpretiert werden. Wenn gewisse Voraussetzungen erfüllt sind, wie z.B. der Abstand des Farbstoffes zur Grenzfläche und die Geometrie sowie Material der Grenzfläche, kann es durch resonante Dipol-Dipol Kopplung zu einer Verstärkung der Fluoreszenzemission kommen [3, 36, 96]. Für ein konstantes externes Feld ist dann ein Anstieg der Quanteneffizienz Q zu beobachten. Da Q jedoch nicht größer als eins werden kann, ist dieser Effekt nur bei Farbstoffen mit kleiner intrinsischer Quanteneffizienz Q_0 besonders deutlich.

In unmittelbarer Nähe zum Metall ($\lesssim 5\text{nm}$) kann das angeregte Fluorophor auch durch Elektronentransfer relaxieren. Bei derart kleinen Abständen dominiert die strahlungslose Relaxation bei weitem, sodass der Farbstoff praktisch keine Strahlung mehr emittiert.

2.5 Die Mehrfach-Dipol Methode

Die im vorherigen Kapitel beschriebenen Effekte der Fluoreszenzverstärkung bzw. Dämpfung lassen sich nur für sehr einfache Systeme wie unendlich ausgedehnte Oberflächen direkt analytisch berechnen. Für komplexere Geometrien haben sich numerische Verfahren wie die Finite Elemente Methode (FEM) oder die Finite Integral Methode (FIM) etabliert. Während bei diesen Verfahren das gesamte System diskretisiert wird, sind es bei der im Rahmen dieser Arbeit benutzten Multiple Dipol (MDP)-Methode nur die Übergänge zwischen den Medien. Die MDP-Methode ist als Vereinfachung aus der Multiple Multipole (MMP)-Methode hervorgegangen [59]. Sie ist ein semi-analytisches Verfahren, bei dem die Felder innerhalb einzelner Domänen rein analytisch berechnet werden, während lediglich die Übergänge der Felder an den Domänenrändern numerisch behandelt werden.

Die Felder müssen an den Domänengrenzen stetig sein. Diese Randbedingungen ergeben sich aus den Maxwellgleichungen in integraler Form,

$$\int_{\partial V} \mathbf{D}(\mathbf{r}, t) \mathbf{n}_S da = \int_V \rho(\mathbf{r}, t) dV \quad (2.46)$$

$$\int_{\partial V} \mathbf{B}(\mathbf{r}, t) \mathbf{n}_S da = 0 \quad (2.47)$$

$$\int_{\partial S} \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) ds = - \int_S \frac{\partial}{\partial t} \mathbf{B}(\mathbf{r}, t) \mathbf{n}_S da \quad (2.48)$$

$$\int_{\partial S} \mathbf{H}(\mathbf{r}, t) ds = \int_S \left(\mathbf{j}(\mathbf{r}, t) + \frac{\partial}{\partial t} \mathbf{D}(\mathbf{r}, t) \mathbf{n}_S da \right) \quad (2.49)$$

mit der elektrischen und magnetischen Feldstärke \mathbf{E} und \mathbf{H} , sowie der dielektrischen Verschiebung \mathbf{D} und der magnetischen Flussdichte \mathbf{B} . \mathbf{n}_S ist der Normalenvektor eines Flächenelementes, da und ∂S ein Linienelement auf dem Rand der Fläche S (Abbildung 2.14a). Analog ist V ein Volumen, das die Domänengrenze D_{ij} schneidet und ∂V ein Flächenelement auf V (Abbildung 2.14b). Betrachtet man nun die Grenzfläche auf einem hinreichend kleinen Stück, das als glatt angenommen werden kann, gehen durch Verkleinern der Fläche S die elektrischen und magnetischen Flussdichten gegen Null; Die Maxwellgleichungen 2.46 und 2.47 ergeben dann mit dem Normalenvektor \mathbf{n}_S der

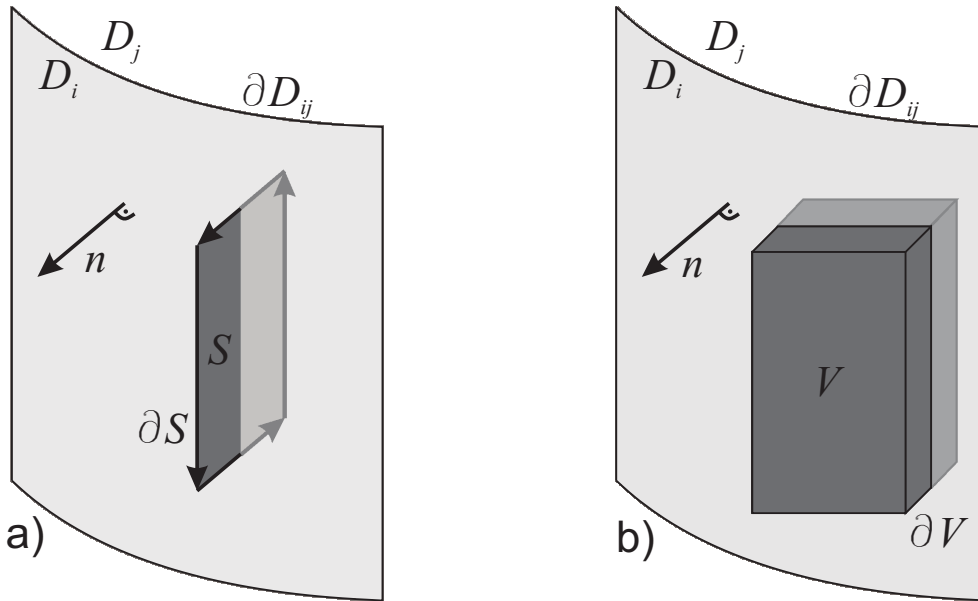


Abbildung 2.14: Integrationspfade für die Herleitung der Stetigkeitsbedingungen an der Grenzfläche ∂D_{ij} zwischen den homogenen Medien D_i und D_j

Grenzfläche D_{ij} die Grenzbedingungen für die tangentialen Feldkomponenten.

$$\mathbf{n} \times (\mathbf{E}_i - \mathbf{E}_j) = 0 \text{ auf } \partial D_{ij} \quad (2.50)$$

$$\mathbf{n} \times (\mathbf{H}_i - \mathbf{H}_j) = \mathbf{j}_S \text{ auf } \partial D_{ij} \quad (2.51)$$

Für die senkrechten Feldkomponenten leitet man die Grenzbedingungen aus den Maxwell Gleichungen 2.48 und 2.49 ab. Betrachtet wird ein infinitesimales Volumen V mit der Oberfläche ∂V , dass die Grenzfläche schneidet (Abbildung 2.14b). Die Felder werden auf beiden Seiten der Grenzfläche als homogen angenommen und es wird eine Oberflächenladungsdichte σ vorausgesetzt. Die Randbedingungen für die normalen Feldkomponenten ergeben sich dann als:

$$\mathbf{n} \cdot (\mathbf{E}_i - \mathbf{E}_j) = \sigma_S \text{ auf } \partial D_{ij} \quad (2.52)$$

$$\mathbf{n} \cdot (\mathbf{H}_i - \mathbf{H}_j) = 0 \text{ auf } \partial D_{ij} \quad (2.53)$$

Für viele Anwendungen geht man von quellenfreien Domänen aus, sodass die Flächenstromdichte \mathbf{j}_S und die Flächenladungsdichte σ_S verschwinden. Die dielektrische Verschiebung \mathbf{D} und die magnetische Flussdichte \mathbf{B} lassen sich mit der elektrischen Suszeptibilität ϵ_r und der magnetischen Permeabilität μ_r in homogenen Medien ohne Vorzugs-

richtung ausdrücken als:

$$\mathbf{B} = \mu_0 \mu_r \mathbf{H} \quad (2.54)$$

$$\mathbf{D} = \epsilon_0 \epsilon_r \mathbf{E} \quad (2.55)$$

Damit lassen sich die Grenzbedingungen wie folgt ausdrücken:

$$\mathbf{n} \times (\mathbf{E}_i - \mathbf{E}_j) = 0 \quad \text{auf } \partial D_{ij} \quad (2.56)$$

$$\mathbf{n} \times (\mathbf{H}_i - \mathbf{H}_j) = 0 \quad \text{auf } \partial D_{ij} \quad (2.57)$$

$$\mathbf{n} \cdot (\epsilon_0 \epsilon_i \mathbf{E}_i - \epsilon_0 \epsilon_j \mathbf{E}_j) = 0 \quad \text{auf } \partial D_{ij} \quad (2.58)$$

$$\mathbf{n} \cdot (\mu_0 \mu_i \mathbf{E}_i - \mu_0 \mu_j \mathbf{E}_j) = 0 \quad \text{auf } \partial D_{ij} \quad (2.59)$$

Die elektrischen und magnetischen Felder eines oszillierenden Dipols \mathbf{p} ergeben sich als:

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \frac{e^{ikr}}{r^3} \left(k^2 ((\mathbf{r} \times \mathbf{p}) \times \mathbf{r}) + (1 - ikr) \left(\frac{3}{r^2} \mathbf{r}(\mathbf{r} \cdot \mathbf{p}) - \mathbf{p} \right) \right) \quad (2.60)$$

$$\mathbf{H}(\mathbf{r}) = \frac{1}{4\pi} ck^2 \frac{e^{(ikr)}}{r^2} \left(1 - \frac{1}{ikr} \right) (\mathbf{r} \times \mathbf{p}) \quad (2.61)$$

Mit den Vektoren $\mathbf{r} = x, y, z$ und $\mathbf{p} = p_x, p_y, p_z$ ergibt sich für die elektrische Feldstärke:

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \frac{e^{ikr}}{r^3} \cdot \left\{ \begin{array}{l} (1 - ikr) \left(-p_x + \frac{3x(p_x x + p_y y + p_z z)}{r^2} \right) + k^2 (-x(p_z z + p_y y) + p_x(z^2 + y^2)) \\ (1 - ikr) \left(-p_y + \frac{3x(p_x x + p_y y + p_z z)}{r^2} \right) + k^2 (-y(p_x x + p_z z) + p_y(x^2 + z^2)) \\ (1 - ikr) \left(-p_z + \frac{3x(p_x x + p_y y + p_z z)}{r^2} \right) + k^2 (-z(p_y y + p_x x) + p_z(y^2 + x^2)) \end{array} \right\} \quad (2.62)$$

Für die magnetische Feldstärke folgt analog:

$$\mathbf{H}(\mathbf{r}) = \frac{1}{4\pi} \frac{e^{ikr}}{r^2} ck^2 \left\{ \begin{array}{l} p_z y - p_y z \\ p_x z - p_z x \\ p_y x - p_x y \end{array} \right\} \quad (2.63)$$

Diskretisiert wird das System dadurch, dass entlang der Domänengrenze Punkte bestimmt werden, an denen die Stetigkeitsbedingungen erfüllt sein sollen. Diese werden im Folgenden Messpunkte genannt. Die Felder innerhalb einer Domäne werden durch Dipole

erzeugt, die jeweils außerhalb dieser liegen und ausschließlich zum Feld der ihnen zugewiesenen Domäne beitragen sollen. Das Feld an einem beliebigen Punkt ist dann die Superposition aus den Einzelbeiträgen der Dipole, die dem entsprechenden Medium zugeordnet sind. Mit den Stetigkeitsbedingungen (Gleichung 2.57-2.59) ergibt sich für N_M Messpunkte und N_D Dipole ein Gleichungssystem mit $3N_M$ Gleichungen und $2N_D$ Dipolparametern.

Das Ausnutzen von Symmetrien kann Rechenzeit und Speicherbelegung erheblich reduzieren. Im Rahmen dieser Arbeit werden deshalb ausschließlich rotationssymmetrische Systeme angenommen. Das ursprünglich dreidimensionale Problem lässt sich so auf zwei Dimensionen reduzieren. Die verwendeten Sensorspitzen sind zwar nicht rotationssymmetrisch, zudem wird mit linear polarisiertem Licht, statt mit radialer Polarisation gearbeitet. Dennoch sind sich die Systeme ausreichend ähnlich, sodass die Ergebnisse der Simulation auf das reale nicht rotationssymmetrische System übertragen werden können [100].

Die Dipole können weiter in einen senkrecht und einen parallel zur z-Achse stehenden Anteil aufgespalten werden. Für den parallel zur z-Achse stehenden Anteil mit $\mathbf{p} = \{0, 0, p_z\}$ gilt:

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \frac{e^{ikr}}{r^3} \left\{ \begin{array}{l} (1 - ikr)\left(\frac{3xp_zz}{r^2}\right) + k^2(-xp_zz) \\ (1 - ikr)\left(\frac{3yp_zz}{r^2}\right) + k^2(-yp_zz) \\ (1 - ikr)\left(\frac{3zp_zz}{r^2}\right) + k^2(p_z(y^2 + x^2)) \end{array} \right\} \quad (2.64)$$

und

$$\mathbf{H}(\mathbf{r}) = \frac{1}{4\pi} \frac{e^{ikr}}{r^2} ck^2 \left\{ \begin{array}{l} p_z y \\ p_r x \\ 0 \end{array} \right\} \quad (2.65)$$

Da die Beleuchtung mit radialer Polarisation erfolgt, heben sich die senkrecht zur z-Achse schwingenden Anteile mit $\mathbf{p} = \{p_x, p_y, 0\}$ auf. Mit den Stetigkeitsbedingungen der Felder an den Grenzflächen \mathbf{E}_0 und den Dipolfeldern \mathbf{E} wird ein Gleichungssystem aufgestellt, dessen Lösung ein Vektor mit den Dipolstärken \mathbf{I} ist.

$$-\mathbf{E}_0 = \mathbf{I} * \mathbf{E} \quad (2.66)$$

Außerdem kann der beim Lösen des Gleichungssystems auftretende Fehler quantisiert werden:

$$\text{Fehler} = \mathbf{I} * \mathbf{E} + \mathbf{E}_0 \quad (2.67)$$

Da das Gleichungssystem numerisch gelöst wird, ist die Lösung nicht exakt. Es besteht jedoch die Möglichkeit den Fehler zu minimieren: Beim Erstellen des Modells sollte das Netz der Dipole und Messpunkte möglichst dicht sein. Außerdem sollte das Anzahlverhältnis von Dipolen zu Messpunkten so gewählt werden, dass das Gleichungssystem etwa um den Faktor 1,5 überbestimmt ist (vgl. Kapitel 3.6).

3 Material und Methoden

Though this be madness,
yet there is method in 't.

(William Shakespeare)

3.1 Die Aufbauten

Für die kombinierten Rasterkraftmikroskopie-Photonik-Messungen dieser Arbeit werden zwei verschiedene Aufbauten benutzt. Dabei handelt es sich jeweils um die Kombination eines Rastersonden- und optischen Mikroskops. In den nächsten beiden Abschnitten werden die jeweiligen Setups kurz vorgestellt.

3.1.1 Das kombinierte TIRF-AFM

Die externe Fluoreszenzkontrolle an einzelnen Fluorophoren und die Kraftspektroskopieexperimente werden an einem selbst entwickelten AFM durchgeführt. Eine schematische Übersicht ist im oberen Teil von Abbildung 3.1 abgebildet. Der AFM-Kopf wurde im Rahmen von zwei Diplomarbeiten als *Small Focus AFM* konzipiert und aufgebaut [83] [120]. Für den kombinierten Aufbau bleibt der AFM-Kopf im Wesentlichen unverändert. Lediglich kleinere Modifikationen zur Anpassung an das optische Mikroskop sind eingeflossen. Wichtigste Neuerung ist ein Bandpassfilter (3RD640-740, Omega Optical, Brattleboro, VT, USA) vor der Quadrantendiode zur Unterdrückung von Streulicht des Fluoreszenzmikroskops. Zum gleichen Zweck ist der Strahlengang des AFM um ca. 10°

gegenüber der optischen Achse des Fluoreszenzmikroskops geneigt worden [31] [121]. Die Basis des optischen Aufbaus ist ein invertierendes Mikroskop (Zeiss Axiovert S100, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Der ursprüngliche Probenkreuztisch wird durch eine selbst konstruierte Aufnahme ersetzt. Diese nimmt den Piezoscanner (E-517.3CL Physikinstrumente, Karlsruhe, Deutschland) des AFM und den AFM-Kopf auf. Der Piezotisch verfügt über eine quadratische Apertur mit einer Kantenlänge von ca. 66 mm , die die Zugänglichkeit der Probe von oben und unten gewährleistet. Die optische Anregung der Probe geschieht über einen Ar^+ -Laser mit einer Standby-Ausgangsleistung von 10 mW . Der Laserstrahl durchläuft einen Laserlinienfilter und einen Abschwächer ($\text{OD}=1$). Durch eine Plankonvexlinse mit 500 mm Brennweite wird er in den rückwärtigen Brennpunkt des Mikroskopobjektivs fokussiert. Zwei Keilprismen versetzen den Strahl parallel zur optischen Achse, wodurch die evaneszente Beleuchtung der Probe erst ermöglicht wird. Die Prismen sind längs der optischen Achse drehbar. Das ermöglicht es, die Probe wahlweise durch reine p-Wellen, s-Wellen oder beliebige Superpositionen anzuregen. Um ein maximales Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten, wird die Probe jedoch ausschließlich durch p-Wellen angeregt (vgl. Kapitel 2.4.3).

Nach dem seitlichen Versatz des Strahlenganges folgt ein dichroitischer Strahlteiler (z488 RDC, Chroma, Rockingham VT USA), der den Laserstrahl zur Probe umlenkt. Die Beleuchtung der Probe sowie das Auffangen des Fluoreszenzlichtes geschieht durch ein TIRF-Objektiv (Plapo $100\times$ TIRFM, $\text{NA}=1,45$; Olympus, Tokyo, Japan). Das Fluoreszenzlicht durchläuft hinter dem Strahlteiler einen Fluoreszenzfilter (HQ 582RDC, Chroma, Rockingham VT USA), eine 10-fach Vergrößerung und wird durch eine CCD-Kamera detektiert. (Roper Scientific I-Pentamax, Princeton Instruments, Trenton NJ, USA). Der CCD-Sensor der Kamera wird während der Messungen durch ein Peltier-Element auf -30°C gekühlt. Der Wärmetauscher der Kühlung kann sowohl wasser- als auch luftgekühlt werden. Zur Vermeidung von Vibrationen wird ausschließlich die Wasserkühlung verwendet. Der werkseitig kontinuierlich laufende Ventilator der Luftkühlung ist stillgelegt.

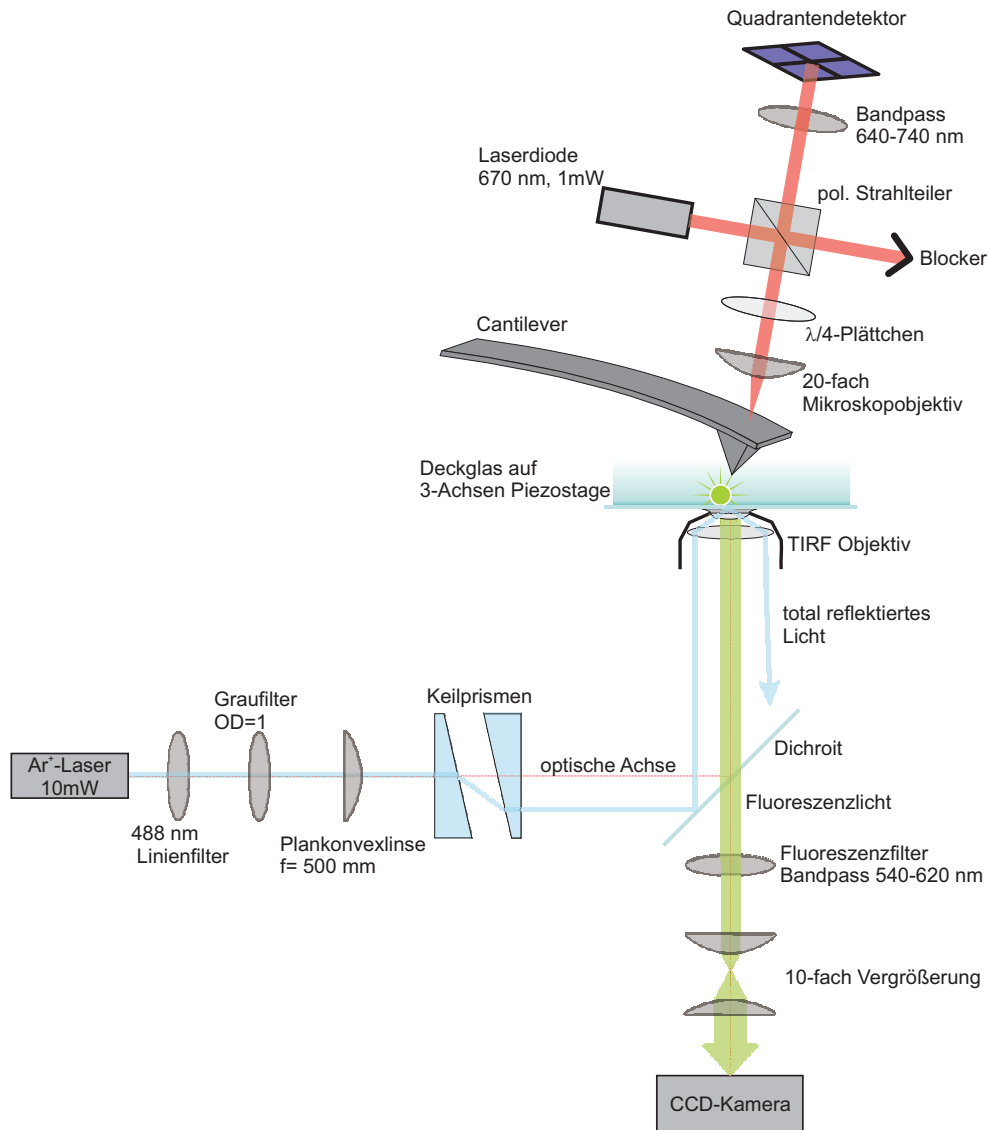


Abbildung 3.1: Schema des kombinierten Rasterkraft-Fluoreszenzmikroskopie-Aufbaus. Zur Vermeidung von Störungen durch Streulicht sind der Detektionstrahlengang des AFM und die optische Achse des Mikroskops ca. 10° gegeneinander geneigt.

3.1.2 Das Veeco Multimode

Für die Topografiemessungen an den photoschaltbaren Calixarenen und die Charakterisierungen der Goldsubstrate wird das Multimode AFM mit Nanoscope *IIIa* Controller, Softwareversion 5.30r3sr3 (Veeco Instruments, Santa Barbara, CA, USA) verwendet. Dabei wird ein E-Scanner (Scanbereich ca. 15 μm) eingesetzt, der regelmäßig mit entsprechenden Kalibrationsgittern (für die x,y,z Achsen) und mit monoatomaren Stufen auf Gold(111) (für die z-Achse) kalibriert wird. Das AFM ist herstellerseitig bereits mit einem optischen Auflichtmikroskop (Optizoom 0,8-2-fach, Nikon, Tokyo, Japan) kombiniert. Die Beleuchtung der Probe geschieht durch eine 50 Watt Halogenlampe. Der Kameraport des Mikroskops ist mit einer CCD-Kamera bestückt. Das optische Mikroskop erleichtert das Einlegen und Ausrichten der Probe sowie die Justage des Cantilevers ganz erheblich.

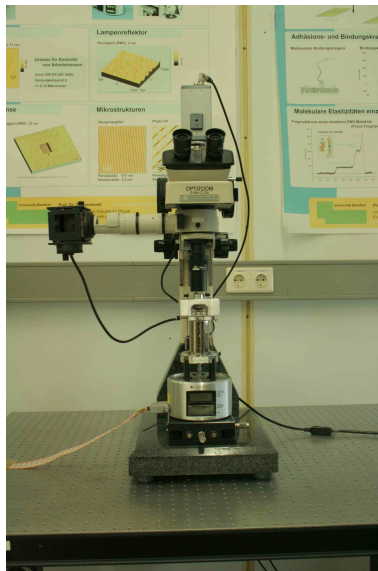


Abbildung 3.2: Veeco Multimode AFM mit Nikon Optizoom. Die Probenbeleuchtung geschieht durch eine 50 Watt Halogenleuchte.

3.2 Die Cantilever

Für die Kraftspektroskopiemessungen an Calixarenen werden ausschließlich Siliziumnitrid-Cantilever des Typs Veeco Microlever MSCT-AU (Veeco Instruments, Santa Barbara, CA, USA) genutzt. Jeder Chip dieses Typs hat fünf V-förmige und einen rechteckigen Sensor unterschiedlicher Dimensionen und Federkonstanten. Die Spitzen sind geschärft (Spitzenradius $< 20 \text{ nm}$) und haben die Form einer vierseitigen Pyramide. Verwendet werden lediglich die Lever des Typs C ¹:

Typ	MSCT AU Lever C
Länge [μm]	320
Breite [μm]	22
Stärke [μm]	0,6
Federkonstante [N/m]	0,01
Resonanzfrequenz [$k\text{Hz}$]	7

Die externe Kontrolle der Fluoreszenzemission an einzelnen Chromophoren wird mit Siliziumcantilevern des Typs Nanosensors PPP-NCH (NanoWorld AG, Neuchâtel, Schweiz) durchgeführt. Diese Sensoren bestehen gänzlich aus Silizium, was für die Nanomanipulation aufgrund der Sprödigkeit ungünstig ist. Silizium zeigt im Gegensatz zu Siliziumnitrid jedoch praktisch keine Autofluoreszenz [49] und macht sie so zur ersten Wahl in kombinierten AFM-Fluoreszenz Experimenten. Des Weiteren besitzen diese Cantilever keine Reflexbeschichtung, welche einen Einfluss auf die Fluoreszenzemission haben könnte.

¹Die Bezeichnungen und Daten aller hier aufgeführten Cantilever stammen aus den aktuellen Datenblättern der jeweiligen Hersteller. Stand Mai 2009.

Typ	Nanosensors PPP-NCH
Länge [μm]	125
Breite [μm]	30
Stärke [μm]	4
Federkonstante [N/m]	42
Resonanzfrequenz [kHz]	330

Für topografische Messungen werden entweder die genannten Nanosensors PPP-NCH benutzt oder Cantilever des Typs Tap300Al (Budgetsensors, Sofia, Bulgarien). Da die Daten der topografischen Messungen keine Unterschiede aufweisen, welche auf die benutzten Sensoren zurückzuführen sind, wird im Ergebnisteil auf die Angabe des jeweiligen Cantilevertyps verzichtet.

Typ	Tap300Al
Länge [μm]	125
Breite [μm]	30
Stärke [μm]	4
Federkonstante [N/m]	40
Resonanzfrequenz [kHz]	300

3.2.1 Modifikation der Cantilever

Für die Kraftspektroskopie- und Fluoreszenzexperimente werden die Cantilever modifiziert, was hier in Kürze beschrieben wird.

Externe Fluoreszenzkontrolle

Für die Fluoreszenzexperimente werden die Cantilever mit einer Goldschicht modifiziert. Hier kommen zwei unterschiedliche Verfahren zum Einsatz. Einerseits werden Gold-Nanopartikel durch einen Crosslinker kovalent an die Spitze gebunden:

Die Goldpartikel entstehen bei der Reduktion von Tetrachlorgoldsäure HAuCl_4 durch Zitronensäure in wässriger Lösung [9]. Zur Modifikation mit Gold-Nanopartikeln werden die Cantilever in konzentrierter Salpetersäure (65%) geätzt und mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend werden die Cantilever für eine Stunde in einer 1%-igen 3-Mercaptopropyltriethoxysilan-Lösung (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) in trockenem Toluol inkubiert. Die so modifizierten Cantilever werden in einer wässrigen Lösung mit Goldpartikeln für mehrere Stunden inkubiert [30].

Andererseits werden die Cantilever in einer Vakuum-Beschichtungsanlage (Baltec MED020, Balzers, Liechtenstein) mit Gold bedampft. Auf die Sensoren wird eine 20 nm bzw. 50 nm Goldschicht mit einer Rate von etwa 0,3 nm/s aufgebracht. Schichtdicke und Aufdampftrate werden während des Prozesses mit einem integrierten Schichtdickenmesser (Baltec QSG060, Balzers, Liechtenstein) bestimmt.

Kraftspektroskopie

In den Kraftspektroskopieexperimenten werden die Cantilever über einen heterobifunktionellen Polyethylenglycol (PEG)-Linker mit zwei verschiedenen Liganden modifiziert. Der Linker mit einer Länge von etwa 30 nm hat dabei mehrere wichtige Funktionen. Er erhöht die sterische Flexibilität des Systems und stellt sicher, dass Bindungen in räum-

licher Entfernung von der Oberfläche erfolgen können. Ferner erleichtert er die Unterscheidung zwischen unspezifischer Adhäsion und spezifischen Dissoziationsereignissen. Ferner können (unerwünschte) multiple Dissoziationsereignisse besser erkannt werden. Die Funktionalisierungsvorschrift ist abgesehen vom letzten Schritt, in dem die Liganden, Ammonium bzw. Trimethylammonium angebrungen werden, identisch und etabliert [106]:

Die Cantilever werden in Aceton, Ethanol und Wasser gereinigt und in einem schwachen Stickstoffstrom getrocknet. Anschließend werden sie für ca. 30 Sekunden in konzentrierter Salpetersäure (65%) aktiviert, mit destilliertem Wasser gespült und wie zuvor sorgfältig getrocknet. Danach werden sie für 90 Minuten in einer 2%-igen 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES)-Lösung in trockenem Toluol inkubiert. Die Cantilever werden mit Toluol und Ethanol gespült, erneut getrocknet und mit Maleimid-PEG-Succinimidyl Valerat (molare Masse 3400 g mol^{-1}) (Laysan Bio Inc., Arab, AL, USA) bei Raumtemperatur in einem Phosphatpuffer (1 mM MAL-PEG-SVA in 0,1 M KH_2PO_4 , pH 8,0) für 90 Minuten inkubiert. Nach dem Spülen mit Wasser und erneutem Trocknen inkubieren die Sensoren in $40 \mu\text{l}$ einer ethanolischen Lösung (1mM) des Liganden bei 4°C für 16 Stunden.

3.2.2 Bestimmung der Federkonstanten

Für kraftspektroskopische Messungen ist es erforderlich, die Federkonstante k des Cantilevers möglichst genau zu kennen. Es hat sich gezeigt, dass die Federkonstanten mitunter erheblich von den Herstellerangaben abweichen. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine chemische Modifikation Einfluss auf die Federkonstante hat. Aus diesem Grund ist es unumgänglich, die Sensoren nach ihrer Funktionalisierung zerstörungsfrei kalibrieren zu können. In der Vergangenheit haben sich mehrere Verfahren etabliert: Einerseits kann die Federkonstante aus der Geometrie und den Materialkonstanten (wie dem Youngs Modul) berechnet werden [93] [53]. Weiter ist die Kopplung des Cantilevers mit einer Eichfeder [52] oder das Beladen des Cantilevers mit einer zusätzlichen Masse möglich [26]. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Federkonstante aus dem thermischen Rauschverhalten des Sensors abgeleitet [69]. Dieses Verfahren soll hier kurz skizziert werden:

Für kleine Auslenkungen kann der Cantilever als harmonischer Oszillator betrachtet werden. Der entsprechende Hamiltonoperator ist mit dem Impuls p , der Ortskoordinaten q , der Masse m und der Resonanzfrequenz ω_c gegeben als:

$$H = \frac{p^2}{2m} + \frac{1}{2}m\omega_c^2 q^2 \quad (3.1)$$

Durch die thermischen Fluktuationen des umgebenden Mediums wird der Sensor zu Oszillationen angeregt. Nach dem Äquipartitionstheorem gilt für jeden Freiheitsgrad der Bewegung:

$$\left\langle \frac{1}{2}m\omega_c^2 q^2 \right\rangle = \frac{1}{2}k_B T \quad (3.2)$$

Mit der Substitution von $\omega_c^2 = k/m$ folgt für die Federkonstante des Cantilevers:

$$k = \frac{k_B T}{\langle q^2 \rangle} \quad (3.3)$$

Die thermischen Fluktuationen des Cantilevers sind jedoch gleichmäßig über das Frequenzspektrum verteilt [23]. Nach dem Fluktuations-Dissipations Theorem ist die mittlere quadratische Amplitude des thermischen Rauschens je Frequenzintervall:

$$\langle \Delta q^2(\omega) \rangle_{eq} = \frac{2k_B T}{b(\omega_c^2 - \omega^2)} \quad (3.4)$$

wobei b der Dämpfung des Oszillators entspricht. Im Experiment wird dieser Term gerade durch die spektrale Leistungsdichte - Power Spectral Density (PSD) - des thermischen Rauschens wiedergegeben. Diese kann durch einen Lorentzfit approximiert werden. Die Integration über den Resonanzpeak ergibt dann $\langle q^2 \rangle$. Der Fehler dieses Verfahrens ist vergleichbar mit anderen Methoden und liegt im Bereich von 10% [53].

3.3 Proben

3.3.1 Quantendots

Für die Fluoreszenzexperimente dieser Arbeit werden CdSe/ZnS-Quantendots aus der Arbeitsgruppe von Thomas Nann benutzt [92]. Abbildung 3.3 zeigt ein Absorptions- und Emissionsspektrum der Halbleiterkristalle. Die nominale Emissionswellenlänge liegt bei 585 nm , was sehr gut mit dem gemessenen Peak des Emissionsspektrums (588 nm) übereinstimmt.

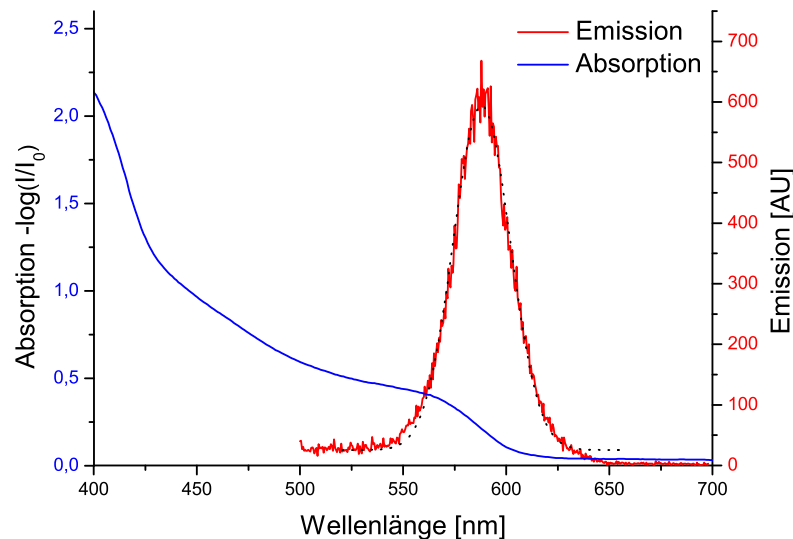


Abbildung 3.3: Absorptions- und Emissionsspektrum der verwendeten Quantendots. Zur Bestimmung des Emissionsmaximums wird das Emissionsspektrum durch einen Gaußfit approximiert.

Die Quantendots werden auf Borosilikat-Deckgläschen ($24 \times 24\text{ mm}^2$) aufgebracht, die zuvor gründlich gereinigt werden: Nach einem ca. einminütigen Bad in sprudelnder Caroscher Säure² werden die Gläschen gründlich mit destilliertem Wasser gespült. Danach

²Schwefelsäure 96% und Wasserstoffperoxid 30% 1:3. ACHTUNG Carosche Säure ist extrem ätzend und reagiert stark exotherm!

folgen weitere Spülgänge mit Aceton, Ethanol und destilliertem Wasser. Die Gläschen werden im Stickstoffstrom getrocknet und verbleiben abschließend mindestens 5 Minuten im UV-Ozon Reiniger. Die Gläschen sind dann frei von (fluoreszierenden) Verunreinigungen. Zur Präparation der Proben werden die Quantendots in n-Heptan suspendiert. $2\ \mu\text{l}$ des Kolloids werden auf die gereinigten Gläschen aufgebracht. Sobald das Heptan verdunstet ist, kann die Oberflächenbelegung fluoreszenzmikroskopisch kontrolliert werden. Ziel ist eine Dichte von nicht mehr als 5 Fluorophoren je μm^2 . Das Quantendot-Kolloid kann nach der Kontrolle schrittweise weiter verdünnt werden, bis eine entsprechende Belegung der Gläschen erreicht ist.

3.3.2 Goldsubstrate

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Calixarene werden über den Schwefel der Didecylsulfidgruppen an Goldsubstrate angebunden. Für Kraftspektroskopieexperimente kommen kommerziell erhältliche $11 \times 11\ \text{mm}^2$ Substrate zum Einsatz (Arrandee, Werther, Deutschland). Sie bestehen aus einem $0,7\ \text{mm}$ starken Borosilikatglas-Chip, auf den eine Chrom ($2 \pm 1,5\ \text{nm}$) und Gold ($200 \pm 50\ \text{nm}$) Schicht aufgebracht ist³. Für hochauflösende, topografische Messungen eignen sich thermisch aufgebraute Goldfilme wegen ihrer zu großen Rauheit nicht. Es besteht allerdings die Möglichkeit diese Substrate kontrolliert zu erhitzen, sodass Areale innerhalb des Goldfilms kristallisieren und atomar ebene Gold(111)-Terrassen ausbilden [24] [20]. Für große (einige $100\ \text{nm}^2$) atomar ebene Areale eignen sich Glassubstrate allerdings nicht [24]. Hier sind Micasubstrate eine gute Alternative, da sie sich ebenso tempern lassen und die flachen Areale größer als $1\ \mu\text{m}$ werden können [95]. Mica ist allerdings für die Funktionalisierung in organischen Lösungsmitteln wenig geeignet, da das Lösungsmittel zwischen die Kristallebenen „kriechen“ kann und das Substrat so zerstört. Für hochauflösende Topografiemessungen eignen sich unter den genannten Voraussetzungen besonders Template Stripped Gold (TSG)-Substrate. Ihre Rauheit ist vergleichbar mit Gold(111)-Terrassen. Die flachen Areale sind größer als einige μm^2 und sie lassen sich problemlos in organischen Lösungsmitteln modifizieren [119] [27] [63].

Mica Substrate von etwa $5 \times 5\ \text{cm}$ werden mit einem Skalpell gespalten und auf einem

³Daten entsprechend dem Datenblatt vom Mai 2009

eigens konstruierten temperaturgeregelten Heiztisch fixiert. Die Fixierung erfolgt durch eine Lochblende mit 5×5 Aussparungen, die jeweils eine Größe von etwa $7 \times 7 \text{ mm}$ haben. Die Blende drückt über einen mit Federn vorgespannten Rahmen das Mica-Substrat auf die Heizfläche und stellt so einen optimalen Wärmeschluss sicher. Der Heiztisch wird unmittelbar nach der Fixierung des Mica Substrats in die Vakuum-Beschichtungsanlage (Baltec MED020, Balzers, Liechtenstein) eingebracht und für 20 Stunden bei einem Druck von 10^{-6} mbar bei mindestens 300°C ausgeheizt.

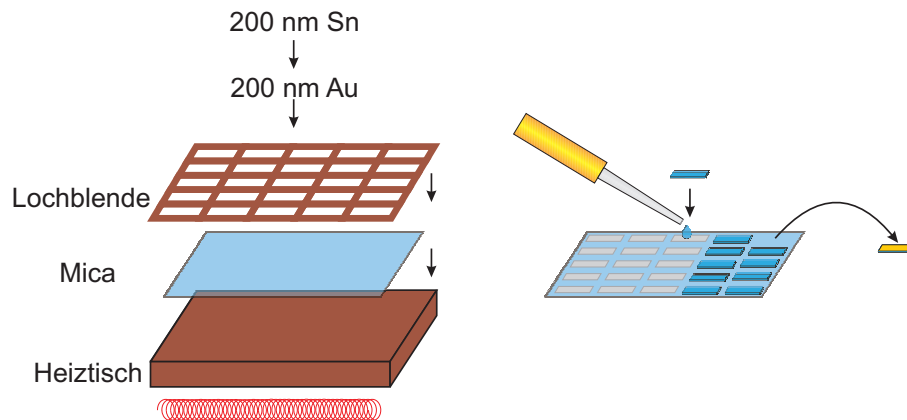


Abbildung 3.4: Schematischer Herstellungsprozess von TSG-Substraten.

Danach wird der Heizstrom reduziert, sodass sich eine Substrattemperatur von 70°C einstellt. Nach zwei weiteren Stunden zur thermischen Equilibrierung wird eine 200 nm messende Goldschicht mit einer Rate von $0,2 \text{ nm/s}$ aufgesputtert. Nachdem die Probe abgekühlt ist, wird zur Haftvermittlung 200 nm Zinn aufgedampft. Durch die Lochblende ergeben sich 25 Felder eines Gold Zinn Schichtsystems. Anschließend werden aufgeraute⁴ und gesäuberte Glassubstrate aufgeklebt. Da der Kleber (Panavia 21 von Kuraray Medical, Tokyo, Japan) anaerob aushärtet, werden die Proben sofort nach dem Aufbringen der Gläschen in einen mit Argon gefluteten Exsikkator gebracht. Nach mindestens 30 min. können nicht abgebundene Klebstoffreste gründlich mit Aceton und Ethanol abgespült werden. Die Gläschen können unmittelbar vor der Präparation mit einer Pinzette vom Mica abgehoben werden. Durch eine Messung des elektrischen Widerstands der Oberfläche kann sichergestellt werden, dass sich keine Mica-Anhaftungen mehr auf der Probe befinden.

⁴Zur besseren Haftung werden die Gläschen mit Schleifpapier feiner Körnung (z.B. 100) leicht angeraut und im Ultraschallbad mit Aceton, Ethanol und Wasser gereinigt.

3.3.3 Calixarene

Die im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Goldsubstrate dienen der Immobilisierung der Calixarene. Sowohl für die Kraftspektroskopie, als auch für die topografische Abbildung der Calixarene ist es erforderlich, die Rezeptoren ausreichend voneinander zu separieren. Bei der Kraftspektroskopie kann so die Anzahl an multiplen Dissoziationsergebnissen reduziert werden, in topografischen Messungen kann sichergestellt werden lediglich einzelne Moleküle abzubilden. Ferner erhöht sich für die Photodimerisation die Wahrscheinlichkeit, dass nur Anthracene des gleichen Moleküls Komplexe bilden, der Rezeptorkelch also verschlossen wird. Der Funktionalisierungslösung wird deshalb eine passivierende Substanz - Di-n-decylsulfid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) - zugegeben. In der Ethanol-Chloroform Lösung (1:1) werden Rezeptor und Kompetitor in ein-millimolarer Konzentration gelöst, wobei der Kompetitor in 40-fachem (Kraftspektroskopie) [32] bzw. 200-fachem Überschuss (Topografie) zugegeben wird. Die Goldsubstrate werden für mindestens 16 Stunden in die auf 60°C erhitzte Lösung eingebracht, die anschließend über mehrere Stunden abkühlt. Die Proben werden gründlich mit Dichlormethan, Aceton und Ethanol gespült, um jegliche Anhaftungen zu entfernen. Für die topografischen Messungen werden auch Substrate benutzt, die bei Raumtemperatur innerhalb von 2 Stunden funktionalisiert werden. Die vorher beschriebene „heiße“ Funktionalisierung begünstigt die Ausbildung weitgehend defektfreier Monolagen auf Gold(111) [85] [118]. TSG-Substrate sind zwar vergleichbar flach aber nicht monokristallin, insofern kann bei keiner Art der Modifikation mit großen Monolagen gerechnet werden. Da im Experiment kein Unterschied zwischen den beiden Verfahren festgestellt werden kann, wird im Weiteren auf eine Unterscheidung verzichtet.

3.4 Datenerfassung

Bei der Kombination unterschiedlicher experimenteller Techniken stellt sich die Frage, wie beide Techniken sinnvoll gesteuert und synchronisiert sowie Daten ausgelesen werden können. Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Aufbau vereint neben Komponenten unterschiedlicher Hersteller einen selbst entwickelten AFM-Kopf. Damit die Steuerung des Experiments und die Datenerfassung nicht unnötig komplex werden, erscheint es sinnvoll das gesamte Setup durch *einen* Controller zu steuern. Anforderungen an ein solches System sind wie folgt: Ausreichende Konnektivität für die Datenerfassung und die Integration verschiedener Komponenten, flexible und einfache Programmierung zur Anpassung des Experimentablaufes an unterschiedliche Anforderungen. Zur Synchronisation verschiedener Komponenten und für einen zeitlich exakten Ablauf des Experimentes ist eine definierte (und möglichst kurze) Latenzzeit des Systems wünschenswert.



Abbildung 3.5: Frontpanel des Controllers

All diese Ansprüche können mit dem im Rahmen dieser Arbeit aufgebauten Controller erfüllt werden. Herzstück ist ein ADwin Gold System (Jäger Messtechnik GmbH, Lorsch, Deutschland). Es enthält einen eigenen Prozessor (32-bit Digitaler Signal Prozessor (DSP) ADSP21062 von Analog Devices) mit einer Taktfrequenz von 40 MHz. Die Besonderheit dieses Systems ist das echtzeitfähige ereignisgesteuerte Betriebssystem. Das ADwin System ist in ein 19-Zoll Gehäuse integriert. Die analogen und digitalen Ein- und Ausgänge sind auf koaxiale LEMO Konnektoren auf der Frontblende aufgeführt (siehe Abbildung 3.5). Insgesamt sind es 16 analoge Eingänge

(2×8 Multiplex), 8 analoge Ausgänge und jeweils 8 analoge Ein- und Ausgänge. Insgesamt sind vier 32-bit Zähler verfügbar, von denen drei auf DIN-Buchsen auf der Frontblende ausgeführt sind. Weiter sind zwei 9-polige D-Sub (male) Anschlüsse als serielle Schnittstelle für das RS232 bzw. RS485 Protokoll vorgesehen. Speziell für die Synchronisation der Piezocontroller sind drei digitale Ein- und Ausgänge auf einer MDR14 Buchse ausgeführt. Rechts oben auf der Ausgangsfrontblende sind drei Spannungsausgänge (jeweils mit 500 mA belastbar), $\pm 15 V$ als Festspannungen und ein variabler Ausgang mit 0-5 V. Auf der rechten Seite befinden sich Einschübe für drei Eurokartenmodule. Das mittlere Modul ist die für AFM-Experimente obligatorische Quadrantendetektorelektronik. Sie dient zur analogen Generierung der Signale *Deflection*, *Lateral* und *Sum* [83] [120]. Das Modul bietet die Möglichkeit durch Verstärkung der Ausgänge *Deflection* und *Lateral* das Signal an den Messbereich der Analogeingänge anzupassen. Zwei weitere Einschübe sind frei belegbar und können wie in der Abbildung für Filtermodule genutzt werden. Alternativ können auch nicht ausgeführte Anschlüsse des ADwin Systems auf die Frontblende gelegt werden.

Die Programmierung des ADwin Controllers erfolgt durch eine eigene Entwicklungsumgebung in der Skriptsprache ADwin Basic. Der Quellcode wird durch einen externen, via Netzwerk angebindenen PC compiliert und auf den Controller übertragen. Über den Mess-PC können Echtzeitprozesse auf dem ADwin System gesteuert sowie Daten übertragen werden. Eine Benutzeroberfläche - Graphical User Interface (GUI) - zur Steuerung des Experiments kann durch entsprechende Treiber unter *MATLAB* (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) erstellt werden.

3.4.1 Die Programme

Für die Steuerung und Datenerfassung der Fluoreszenz- und Kraftspektroskopieexperimente sind eigene Programme entwickelt worden, die im Folgenden kurz vorgestellt werden: Ein vereinfachter Programmablauf für die Fluoreszenzexperimente ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Mit dem Start des Experimentes wird der Sensor an die Probenoberfläche angenähert. Vergleichbar mit dem Tapping Mode (Kapitel 2.1.1) schwingt der Cantilever dabei nahe seiner Resonanzfrequenz. Wenn die Amplitude auf 80-90% einbricht, ist die Oberfläche erreicht und das Unterprogramm *Fluorophor suchen* wird gestartet.

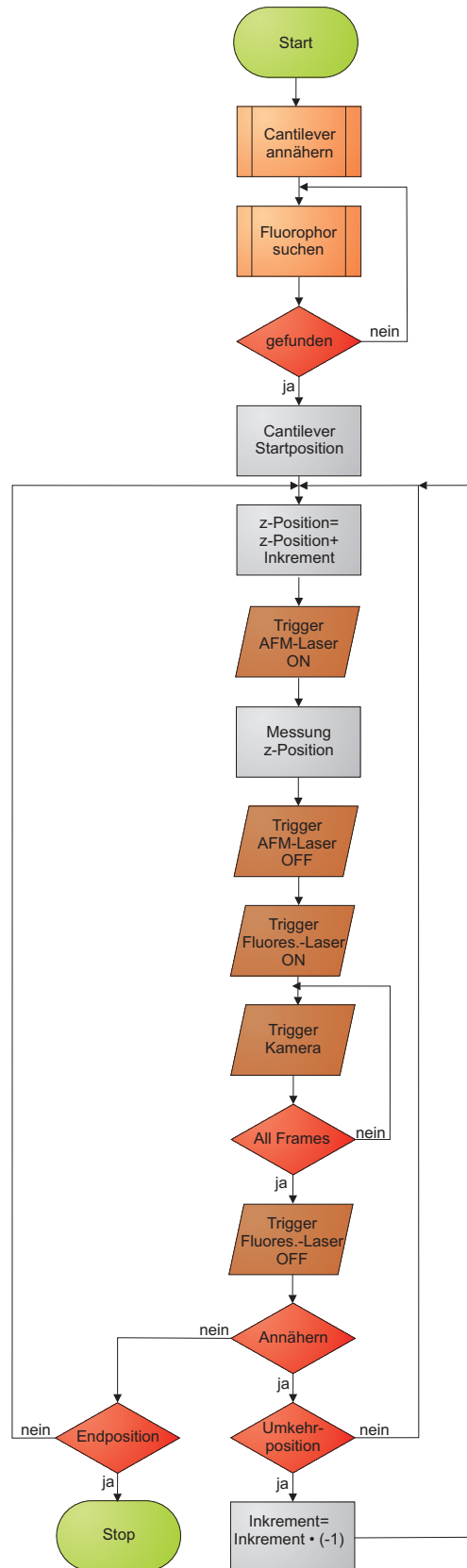


Abbildung 3.6: Ablaufdiagramm eines Experiments zur externen Fluoreszenzkontrolle

Der Cantilever wird mit konstanter Amplitude über die Probenoberfläche geführt, wobei gleichzeitig die Fluorophore beobachtet werden. Bricht die Fluoreszenz eines Farbstoffes nahe der (vermuteten) Position des Cantilevers ein, kann man von einem Quencherereignis ausgehen und der Cantilever wird etwa 150 nm zurückgezogen und nicht weiter zur Oszillation angeregt. Jetzt beginnt die eigentliche abstandsabhängige Messung der Fluoreszenzemission. Der Cantilever wird um ein definiertes Inkrement angenähert. Das *Deflection* Signal wird gemessen (der Fluoreszenzlasers ist derweil durch einen Shutter geblockt). Der AFM-Laser wird deaktiviert, der Fluoreszenzlasers wird freigegeben. Die Kamera wird der Anzahl der Aufnahmen und der Belichtungszeit entsprechend getriggert. Es folgt eine Abfrage des *Deflection* Signals, um einen eventuellen Kontakt mit der Oberfläche festzustellen. Ist die Oberfläche erreicht wird das Inkrement mit (-1) multipliziert, andernfalls wird die nächste Position angefahren und die Prozedur wiederholt sich. Hat der Cantilever nach dem Umkehren auf der Oberfläche seine Startposition wieder erreicht, ist das Experiment beendet.

In Abbildung 3.7 ist das Ablaufdiagramm eines Kraftspektroskopieexperimentes dargestellt. Mit dem Start der Messung wird der Cantilever an die Oberfläche angenähert. Beim Erreichen eines *Deflection*-Schwellwertes wird der Cantilever bis zu einer Position oberhalb der Probe zurückgezogen und die Steigung des Kontaktbereiches wird ermittelt. Der Sensor wird in einer Schleife mit einem Inkrement von einem Bit⁵ an die Probenoberfläche angenähert. Die Schleife wird abgearbeitet bis ein Schwellwert⁶ erreicht wird. Das Inkrement wird dann mit (-1) multipliziert. Ist der Schwellwert am Ende des voreingestellten Weges nicht erreicht, wird das Inkrement ebenfalls mit (-1) multipliziert. Nach dem Verstreichen der Haltezeit wird der Cantilever von der Oberfläche zurückgezogen. Diese Schleife ist abgesehen vom negativen Inkrement mit der Annäherungsschleife identisch. Mit Erreichen der Start/Endposition kann die nächste Messung beginnen.

In kraftspektroskopischen Bindungsstudien (vgl. 2.1.2) müssen tausende von Kraft-Distanzkurven gemessen werden. Die Messung von einer Kraft-Distanz Kurve pro Sekunde ist ein realistischer Durchschnittswert. Dies macht deutlich, dass diese Messungen bisweilen mehrere Stunden dauern können. Das macht die Experimente empfindlich für langsame thermische Drifteffekte. Dem wird hier Rechnung getragen, indem die Ansteuerung des z-Piezos laufend angepasst wird. Dadurch ist es möglich, Messungen mit reproduzierbarer Kraft auf den Cantilever durchzuführen.

⁵15-bit auf 0-10V entspricht bei einem maximalen Verfahrweg von $20\mu\text{m}$ einem Inkrement von ca. $0,6\text{nm}$

⁶Dieser Schwellwert ist das Auslenkungssignal des Cantilvers in Volt, Nanometer oder Newton.

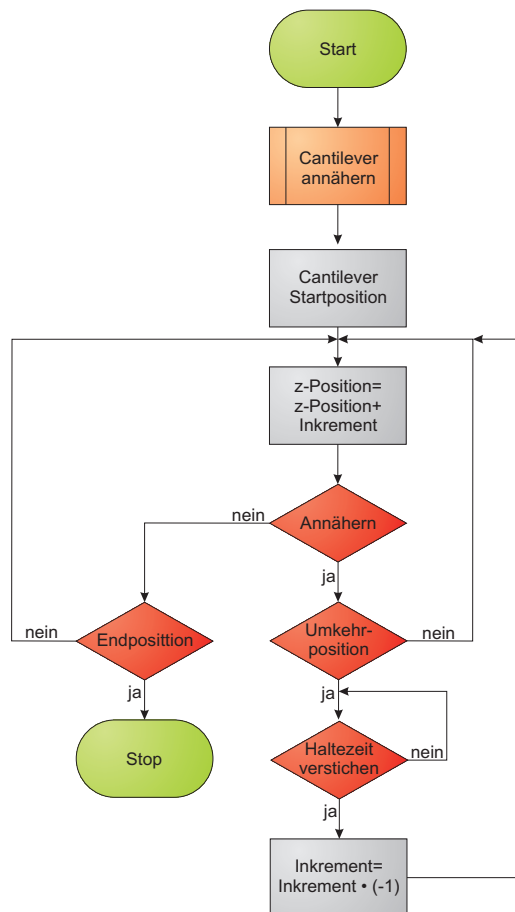


Abbildung 3.7: Ablaufdiagramm eines Kraftspektroskopieexperimentes

3.5 Datenauswertung

3.5.1 Fluoreszenz

Die Fluoreszenzemission wird von einer CCD-Kamera mit der systemeigenen Software *Winview32* erfasst. Die Daten der Kamera liegen in einer Auflösung von 12-bit vor und werden unkomprimiert im Tagged Image File (tif) Format abgespeichert. Zur weiteren Auswertung wird die freie, quelloffene Software *ImageJ* in der Version 1.42q und ein eigens entwickeltes *Matlab* Skript benutzt, dessen Funktion hier kurz skizziert werden soll.

Nach dem Einlesen der Daten wird zunächst ein Schwellwert der Fluoreszenzintensität bestimmt, anhand dessen eine Unterscheidung zwischen „Hell-“ und „Dunkel-Zustand“ des Quantendots erfolgt.

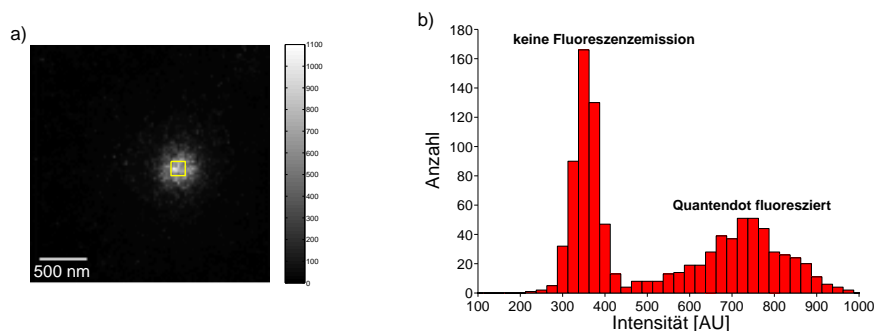


Abbildung 3.8: a) Fluoreszenzbild eines einzelnen Quantendots. Die Fluoreszenzintensität wird für jedes Bild eines Stapels über das markierte Rechteck gemittelt. b) Die ermittelten Werte werden in einem Histogramm aufgetragen. Das Minimum zwischen den beiden Verteilungen definiert den Intensitätsschwellwert.

Dies ist unbedingt erforderlich, da die zum Teil hochfrequenten Fluktuationen der Fluoreszenzemission und die im Vergleich dazu lange Integrationszeit der Kamera (50 *ms*) eine breite Verteilung der gemessenen Fluoreszenzintensität verursachen. Gerade in Bereichen geringer Fluoreszenz geht das Signal praktisch nahtlos in das Rauschen des CCD-Chips über. Eine visuelle Unterscheidung zwischen einem dunklen und fluoreszierenden

Quantendot ist gerade dann kaum mehr möglich. Dieser Umstand macht eine definierte Bestimmung eines Schwellwertes erforderlich. Intensitätshistogramme wie in Grafik 3.8 sind hier hilfreich. Für alle Bilder eines Stapels wird dazu die mittlere Intensität in einem kleinen Bereich von ca. 4×4 Pixeln bestimmt und in einem Histogramm aufgetragen. „Hell-“ und „Dunkel-Zustand“ des Quantendots lassen sich leicht anhand der beiden „Gauss-artigen“ Verteilungen erkennen. Der Schwellwert wird durch das Minimum zwischen beiden Verteilungen definiert. Zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität eines Quantendots werden die Aufnahmen ebenfalls in einem Areal von etwa 4×4 Pixel ausgewertet. Mit dem ermittelten Schwellwert lassen sich die Dauer der Hell- und Dunkelphasen t_{hell} , t_{dunkel} sowie die Emissionswahrscheinlichkeit P_{em} bestimmen.

$$P_{em} = \frac{t_{hell}}{t_{hell} + t_{dunkel}} \quad (3.5)$$

Bei der externen Kontrolle Fluoreszenzemission (Kapitel 4.1.1) wird die Fluoreszenzintensität für jede Sensorposition über mehrere hundert Aufnahmen gemittelt, um den Einfluss des Fluoreszenzblinkens zu minimieren.

3.5.2 Kraftspektroskopie

In Kraftspektroskopie-Experimenten fallen mehrere zehntausend Kraft-Distanz Kurven an. Zur Auswertung dieser Datenmengen werden deshalb automatisierte Prozeduren benutzt, die unter *Matlab* entwickelt wurden. Vorhandene Programme [47] [8] wurden zu diesem Zweck angepasst und erweitert. Sowohl für die Standard-Theorie (Kapitel 2.2.1) als auch für das HBM (Kapitel 2.2.2) erfolgt die Bestimmung der Dissoziationskräfte F_{Diss} und der effektiven Federkonstante k_{eff} nach der gleichen Methode:

Nach dem Einlesen einer Kraft-Distanz Kurve, wie sie in Abbildung 3.9 dargestellt ist, wird im hinteren Drittel der Kurve der Effektivwert - Root Mean Square (RMS) - des Krafrauschens F_{RMS} bestimmt. Außerdem wird in diesem Datenbereich durch lineare Regression die Basislinie F_0 definiert. Die Länge des Kontaktbereiches wird beginnend vom Startpunkt durch intervallweises Bestimmen der Steigung entlang der Kurve ermittelt. Unterschreitet die Steigung während der Prozedur einen definierten Schwellwert hat der Sensor keinen Kontakt mehr zur Oberfläche.

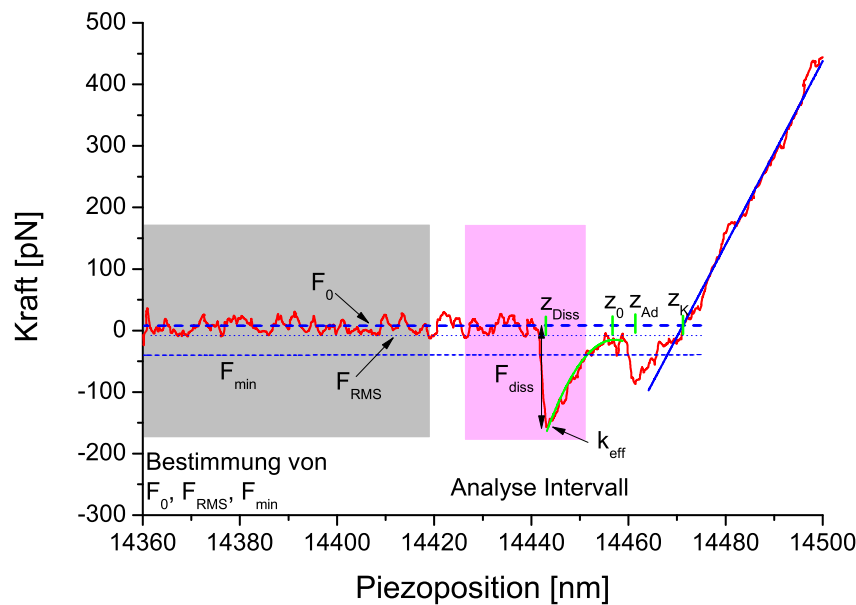


Abbildung 3.9: Auswertung einer Kraftspektroskopiekurve

Die entsprechende Piezoposition (z_{Ad}) wird dann mit dem Schnittpunkt der Regressionsgraden für den Kontaktbereich und Basislinie (z_K) verglichen. Da der Schnittpunkt beider Graden die Position der Oberfläche markiert, können nun unspezifische Adhäsionsereignisse erkannt und herausgefiltert werden: Adhäsionsereignisse können problematisch sein, wenn sie spezifische Wechselwirkungen überlagern. Insofern werden Kurven mit starken Adhäsionen verworfen ($z_K - z_{Ad} > 15nm$).

Das Analyse Intervall wird abhängig vom Crosslinker definiert. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete PEG-Linker hat eine Konturlänge von etwa $30nm$, deshalb werden Dissoziationsereignisse nur in einem Bereich von $20-45nm$ gesucht und akzeptiert. Die Suche der Abrisse geschieht wie folgt: Innerhalb des Analyse Intervalls wird die Steigung jeweils in $2nm$ -Intervallen bestimmt. Haben von der Oberfläche her gesehen zwei aufeinanderfolgende Intervalle positive und negative Steigung, ist das ein Indiz für einen Abriss. Es müssen allerdings weitere Kriterien erfüllt sein: Die maximale Sensorauslenkung im Dissoziationspunkt z_{Diss} muss größer sein als der Kraft-Schwellwert F_{min} . Das Signal zu Rauschverhältnis soll dabei mindestens drei sein ($F_{min} = F_0 + 3F_{RMS}$). Nach der Dissoziation soll keine Kraft mehr auf den Sensor wirken, d.h. die mittlere Kraft in einem Intervall von $2nm$ soll im Bereich $F_0 \pm F_{RMS}$ liegen. Von z_{Diss} aus wird der

Startpunkt z_0 der Kraft-Distanzkurve gesucht. Dies soll der erste Punkt sein, der im Bereich $F_0 \pm F_{RMS}$ liegt. Im Intervall $[z_0, z_{Diss}]$ wird die Kurve durch ein Polynom zweiter Ordnung approximiert (grüner Graph). Die effektive Federkonstante k_{eff} lässt sich nun durch Bestimmung der Steigung im Abrisspunkt z_{Diss} ermitteln. Die Abrisskraft F_{Diss} bestimmt sich aus dem Wert des Approximationspolynoms bei $z = z_{Diss}$.

Da die Kurven unabhängig von der Ziehgeschwindigkeit eine universelle Kraft-Distanz-Charakteristik haben (Gleichung 2.13), können Daten, die zu weit von der sogenannten *Masterkurve* abweichen herausgefiltert werden [48]. Die weitere Auswertung für die verschiedenen Theorien wird nun separat in den folgenden Abschnitten beschrieben.

Auswertung nach der Standard-Theorie

Aus den ermittelten Abrisskräften F_{Diss} wird nun die wahrscheinlichste Dissoziationskraft \hat{F} ermittelt. Die Kräfte werden dazu in einem Histogramm aufgetragen und durch eine Normalverteilung approximiert. Das Maximum der Verteilung entspricht \hat{F} . Diese Prozedur wird für jede Ziehgeschwindigkeit v wiederholt. Die Schar der effektiven Federkonstanten wird ebenso für jede Geschwindigkeit durch eine Normalverteilung approximiert. Das Maximum der Verteilung entspricht der wahrscheinlichsten \hat{k}_{eff} Elastizität. Die Belastungsrate errechnet sich für jede Ziehgeschwindigkeit als:

$$r = \hat{k}_{eff} \cdot v \quad (3.6)$$

Die thermodynamische Dissoziationsrate k_{off}^0 und die Dissoziationslänge x_β können durch Approximation von $\hat{F}(r)$ an Gleichung 2.16 bestimmt werden.

Auswertung nach dem HBM

Die experimentellen Daten, wie die Schar der Abrisskräfte f_i , die Ziehgeschwindigkeit v , die minimal detektierbare Kraft f_{min} sowie die theoretische Masterkurve $F(s)$ werden mit einem von Sebastian Getfert⁷ entwickelten Programm durch einen Maximum Likelihood Ansatz ausgewertet [51]. Kern der Prozedur ist den Parametersatz $\vec{\mu} = (k_{off}^0, a, \sigma)$ abzuschätzen, der die Likelihood Funktion $L(\vec{\mu})$ maximiert.

$$L(\vec{\mu}) = \prod_{i=1}^N p(f_i | \vec{\mu}, v_i, F(s), f_{min}(v_i)) \quad (3.7)$$

3.5.3 Topografie

Die Topografiedaten des Multimode AFM werden entweder mit der System eigenen *NanoScope* Software Version 5.30r3sr3 oder mit Gwyddion⁸ Version 2.9 gesichtet. Die Rauheit der TSG-Substrate wird anhand des RMS-Wertes der Höhe bestimmt. Sowohl die Nanoscope Software, als auch Gwyddion liefern konsistente Ergebnisse, weshalb im Weiteren nicht auf das verwendete Programm eingegangen wird.

Für die quantitative Auswertung der Konformationsänderung wird die Höhe der Calixarene bestimmt. Zu diesem Zweck wird ein eigens entwickeltes *MATLAB*-Skript genutzt. Die Notwendigkeit ist darin begründet, dass für diese Messungen bis zu zwanzig aufeinanderfolgende Scans desselben Areals durchgeführt werden⁹. Zur Auswertung müssen jeweils die gleichen Areale - Region Of Interest (ROI) - aus aufeinanderfolgenden Scans extrahiert werden. Durch die langen Messzeiten können sich jedoch thermische Drifteffekte (lateral und vertikal) bemerkbar machen, sodass aufeinanderfolgende Bilder gegeneinander verschoben sind. Zum Finden und Extrahieren gleicher Areale wird deshalb eine Mustererkennung auf der Basis einer zweidimensionalen Kreuzkorrelation verwendet. Für eine ROI R mit der Größe von $R_x \times R_y$ Pixeln und einem Bild I der Größe $I_x \times I_y$ Pixel

⁷Arbeitsgruppe *Theorie der Kondensierten Materie*, Universität Bielefeld

⁸Gwyddion ist ein freies quelloffenes SPM-Analyse Programm. <http://gwyddion.net>

⁹Bei einer Zeilenfrequenz von 1 Hz und 512 Zeilen dauert jeder Scan knapp 9 Minuten.

folgt für die Kreuzkorrelation:

$$C(i, j) = \sum_{m=1}^{R_x} \sum_{n=1}^{R_y} R(m, n) I(m + i, n + j) \quad (3.8)$$

Aus den Reihen- und Spaltenindizes des Maximums von $C(i, j)$ mit $1 \leq i < I_x + R_x$ und $1 \leq j < I_y + R_y$ ergibt sich der laterale Versatz von R .

Zum Ausgleich des (vertikalen) Höhen-Offset wird für jede ROI ein Höhenhistogramm ermittelt. Die Form des Histogramms ist für jeden Ausschnitt praktisch identisch, jedoch können sie entsprechend einem Höhen-Offset gegeneinander verschoben sein. Nach dem Angleichen der Höhe können Linienprofile aus allen Ausschnitten einfach überlagert werden.

Die Höhe eines Calixarens vor und nach der UV-Exposition wird nun wie folgt bestimmt. Aus zwei Bildstapeln des gleichen Areals werden jeweils die gemittelten Linienprofile, die punktweise Standardabweichung σ und die entlang des Profils gemittelte Standardabweichung $\bar{\sigma}$ bestimmt.

3.6 MDP-Simulationen

Die Simulation der elektromagnetischen Felder basiert auf der in Kapitel 2.5 beschriebenen MDP-Methode. Benutzt werden zwei unterschiedliche *MATLAB*-basierte Programme. Neben einer basalen Version [43] wird ebenso eine laufzeitoptimierte, multiprozessorfähige Version [100] verwendet, wodurch es möglich ist, größere Modelle zu berechnen. Da die Ergebnisse beider Versionen konsistent sind, wird im Weiteren auf eine Unterscheidung verzichtet.

Die Geometrie eines Modells wird durch seine Grenzflächen vollständig bestimmt. Diese werden mit einem Netz aus Messpunkten belegt, an denen die Felder den Grenzbedingungen (Gleichungen 2.57-2.59) genügen. Zu beiden Seiten der Grenzfläche werden Dipole positioniert, die ausschließlich zum Feld im jeweils gegenüberliegenden Medium beitragen. Die Anzahl der Messpunkte und Dipole ist prinzipiell frei wählbar. Sie hat aber neben dem Abstand der Dipole zur Grenzfläche Einfluss auf den Fehler bei der Berechnung der Dipolstärken. Es hat sich bewährt das Verhältnis von Dipolen zu Messpunkten so zu wählen, dass das Gleichungssystem (Gleichung 2.66) etwa um den Faktor 1,5 überbestimmt ist. Der Abstand der Dipole zu den Messpunkten beträgt etwa dem 3-5 fachen des Messpunktabstandes. So kann sichergestellt werden, dass einzelne Dipole keinen zu starken Einfluss auf benachbarte Messpunkte haben [44, 59, 96].

Um die Geometrie möglichst genau zu modellieren, sollte das Netz der Messpunkte und Dipole möglichst dicht sein. Gleichungssysteme großer Geometrien mit mehreren Grenzflächen können aber leicht mehrere Gigabyte groß werden. Begrenzte Rechen- und Speicherkapazität zwingen deshalb dazu, vereinfachte Modelle zu erstellen. Für sämtliche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Simulationen werden folgende Vereinfachungen angenommen: Alle Modelle sind rotationssymmetrisch. Dadurch kann die Dimension des Problems von drei auf zwei reduziert werden. Ebenso ist die Beleuchtung radial polarisiert. Die im Experiment benutzten Gold beschichteten Silizium Cantilever werden als massive, goldene Spitzen mit einer Höhe von etwa $1\ \mu\text{m}$ angenommen. Dadurch wird eine Grenzfläche gespart und statt des gesamten Cantilevers fließt nur ein Teil der Sensorspitze ein. Außerdem wird angenommen, dass das im Experiment benutzte etwa $0,2\ \text{mm}$ starke Deckgläschen den gesamten unteren Halbraum einnimmt.

Das Modell der Sensorspitze besteht aus zwei zusammengesetzten Teilen. Der Spitze, die durch ein Polynom zweiter Ordnung approximiert wird und einem sphärischen Abschluss. Da es an den Übergängen der Segmente durch Unstetigkeiten zu Fehlern in der

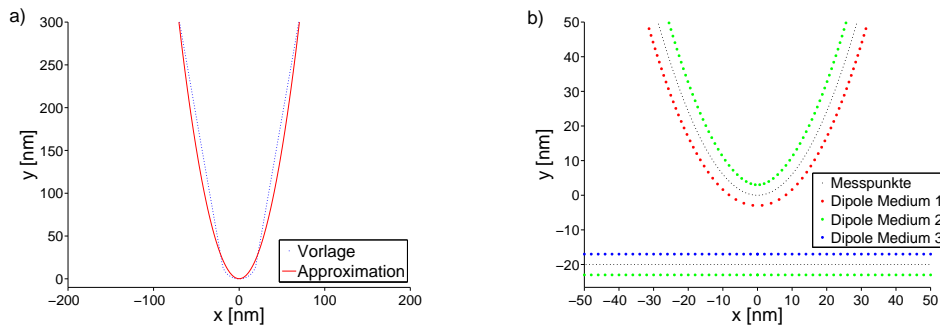


Abbildung 3.10: a) Vorlage und Approximation für ein Sensormodell bestehend aus einer sphärischen Spitze mit einem Radius von 20 nm und einem Öffnungswinkel $\alpha = 20$. b) Messpunkte und Dipole für eine Sensorspitze nahe einer Oberfläche.

Berechnung der Felder kommen kann, sollten die modellierten Spitzen aus möglichst wenigen Segmenten bestehen. Insbesondere sollten Übergänge in Bereichen vermieden werden, an denen in den Rechnungen die Felder bestimmt werden sollen. Die Modelle der Spitzen werden durch Approximation eines Polynoms zweiter Ordnung an eine einfache geometrische Vorlage erstellt. Diese besteht aus einer sphärischen Spitze und einer Flanke mit konstanter Steigung. Nach der Approximation durch ein Polynom (Abbildung 3.10a) wird der obere sphärische Abschluss stetig angefügt. Auf die so modellierte Grenzfläche werden die Messpunkte mit definiertem Abstand zueinander positioniert. Die Dipole werden zu beiden Seiten der Grenzfläche gesetzt. In Abbildung 3.10b ist ein Ausschnitt eines typischen Modells einer Sensorspitze dargestellt. In den Simulationen werden die Felder für verschiedene Spitzengeometrien berechnet. Sie unterscheiden sich durch die Form der Spitze und den Öffnungswinkel.

Ziel der Simulationen sind lediglich qualitative Aussagen. Aus diesem Grund werden konstante Faktoren nicht berücksichtigt. Ebenso fließen abgesehen von der numerischen Apertur des Mikroskopobjektivs keine Parameter aus dem Experiment ein. Die Berechnung der Fluoreszenzemission eines einzelnen Dipolemitters in einer inhomogenen Umgebung wird wie folgt durchgeführt: Da die Anregungsrate Γ_{exc} proportional zum Betragsquadrat $|\mathbf{E}_{exc}|^2$ des externen Feldes ist (Gleichung 2.37), wird dieses am Ort des Dipols berechnet. In Abbildung 3.11a ist das elektrische Feld an einer Goldspitze nahe einer evaneszent beleuchteten Luft-Glas Grenzschicht dargestellt. Das Feld eines stehenden Dipolemitters durch Integration von $|\mathbf{E}_{em}|^2$ über eine Kugeloberfläche berechnet (Gleichung 2.34). Damit Nahfeldeffekte das Ergebnis nicht verfälschen, beträgt der Radius der Kugel $10 \mu\text{m}$. In Abbildung 3.11b ist das elektrische Feld eines einzelnen stehenden Dipolemit-

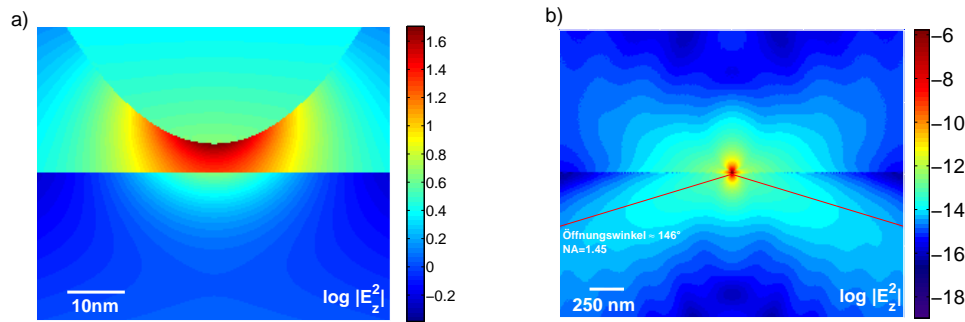


Abbildung 3.11: a) Das elektrische Feld an einer Goldspitze 5 *nm* oberhalb einer Luft-Glas Grenzfläche. Die Konfiguration wird von unten mit einem Winkel von 50° beleuchtet, sodass sich oberhalb der Grenzfläche ein evaneszentes Feld ausbildet. b) Emission eines einzelnen stehenden Dipols nahe einer Luft-Glas Grenzfläche. Außerdem ist der Öffnungswinkel eines Immersionsobjektives mit einer numerischen Apertur von 1,45 aufgetragen.

ters an einer Luft-Glas Grenzfläche dargestellt. Mit wachsendem Abstand zum Dipol zeigt sich die typische Abstrahlcharakteristik eines Dipolemitters. Zur Orientierung ist der Öffnungswinkel eines Objektivs mit einer numerischen Apertur von 1,45 aufgetragen. Nur Fluoreszenzemission innerhalb dieser Grenzen kann detektiert werden. Die ermittelten Größen $|\mathbf{E}_{exc}|^2$ und I werden mit denen eines ungestörten Systems gewichtet. Ein Sensorabstand von 500 *nm* reicht dabei aus. Mit den Gleichungen 2.36 und 2.37 folgt dann:

$$\frac{\Gamma_{exc}}{\Gamma_{exc}^0} = \frac{|\mathbf{E}_{exc}|^2}{|\mathbf{E}_{exc}^0|^2} \quad (3.9)$$

$$\frac{\Gamma_{em}}{\Gamma_{em}^0} = \frac{Q}{Q_0} \quad \text{mit } \Gamma_{exc} = \text{const.} \quad (3.10)$$

4 Experimente und Resultate

Stets findet Überraschung statt
Da, wo man's nicht erwartet hat.

(*Wilhelm Busch*)

4.1 Quantendots

4.1.1 Externe Fluoreszenzkontrolle an einzelnen Quantendots

In diesem Kapitel wird die Möglichkeit der externen Kontrolle der Fluoreszenzemission an einzelnen Fluorophoren demonstriert. Gold modifizierte Cantilever werden in die Nähe einzelner Quantendots gebracht. Der kombinierte TIRF-AFM Aufbau (Kapitel 3.1.1) ermöglicht einerseits durch die Piezostellelemente den Abstand zwischen Quantendot und Cantilever mit Nanometer-Genauigkeit einzustellen, während gleichzeitig die Fluoreszenz einzelner Fluorophore gemessen wird.

Quantendots werden wie beschrieben (Kapitel 3.3.1) präpariert. Zunächst wird die ungestörte Fluoreszenz einzelner Quantendots beobachtet. Die Fluoreszenzemission mehrerer evaneszent beleuchteter, gut voneinander separierter Quantendots wird über mindestens zehn Minuten aufgenommen. Die Belichtungszeit der einzelnen Bilder beträgt bei diesen Messungen 50 *m.s.* Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität einzelner Quantendots kann durch die Funktion *Plot Z-axis Profile* von *ImageJ* extrahiert werden. Für die weitere Auswertung werden die in Kapitel 3.5.1 beschriebenen *Matlab*-Skripte verwendet.

In Abbildung 4.1a ist die Fluoreszenzintensität eines einzelnen Quantendots über die Zeit aufgetragen. Typisch ist die von längeren Dunkelphasen unterbrochene stark fluktuieren-

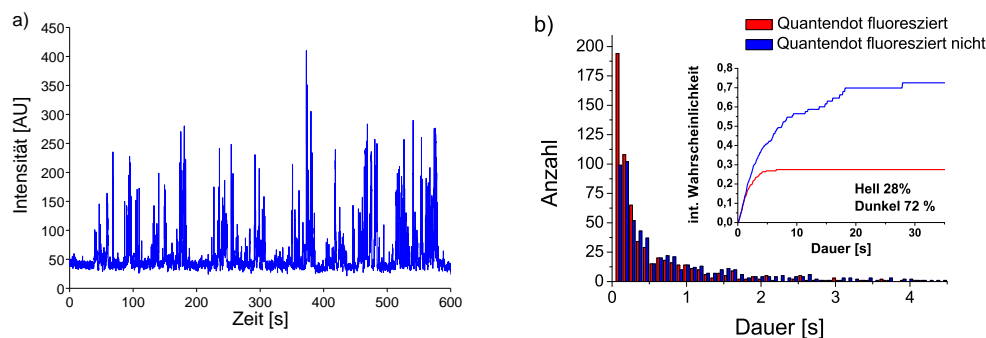


Abbildung 4.1: a) Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität eines Quantendots.
 b) Histogramm der entsprechenden Hell- und Dunkelphasen. Im Inset die integrierte Wahrscheinlichkeit der beiden Zustände *Hell* und *Dunkel*

de Fluoreszenzemission. Hell- und Dunkelphasen sind jedoch nicht gleich verteilt. Im Histogramm in Abbildung 4.1b ist die Anzahl ununterbrochener Hell- bzw. Dunkelphasen über deren Dauer aufgetragen. Zur besseren Übersicht sind nur Intervalldauern bis 4,5 s abgebildet. Im Bereich bis ca. 3 s ist der Anteil von Hell- und Dunkelzustand ungefähr gleich. Während der Quantendot kaum über längere Zeiten ununterbrochen fluoresziert (hier maximal ca. 6 s), sind lange Dunkelphasen relativ häufig. Die längste Dunkelphase in der hier abgebildeten Messung beträgt 27 s. Das Inset von Abbildung 4.1b zeigt die integrierte Wahrscheinlichkeit des emittierenden und nicht emittierenden Zustandes. Im Verlauf der gesamten Messung fluoreszierte der Quantendot 28% der Messdauer, während er 72% dunkel war.

Im nächsten Schritt wird die Fluoreszenz extern durch einen Gold beschichteten Cantilever beeinflusst. Einzelne Quantendots werden wie zuvor auf ein Deckgläschen aufgebracht. Ein mit Gold Nanopartikeln modifizierter Cantilever (vgl. Kapitel 3.2.1) wird alternierend an einzelne Quantendots angenähert und wieder entfernt. In Abbildung 4.2 ist übereinander angeordnet jeweils der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität eines einzelnen Quantendots und der Abstand des Cantilevers von der Oberfläche dargestellt. Die Korrelation von Fluoreszenzemission und dem Abstand des Cantilevers ist sehr deutlich. Während der Quantendot für einen großen Abstand zum Sensor die typische, fluktuierende Fluoreszenzemission zeigt, ist für den angenäherten Sensor fast keine Emission mehr festzustellen. Wie zuvor werden die Hell- und Dunkelphasen über deren Dauer in einem Histogramm aufgetragen (Abbildung 4.3). Jetzt allerdings separat für den zurückgezogenen und angenäherten Cantilever dargestellt. Während für den großen Sensorabstand die Anzahl und Dauer der Hellphasen wesentlich größer ist als die Dunkelphasen, zeigt sich für den angenäherten Cantilever eine umgekehrte Verteilung. Die integrierten Wahr-

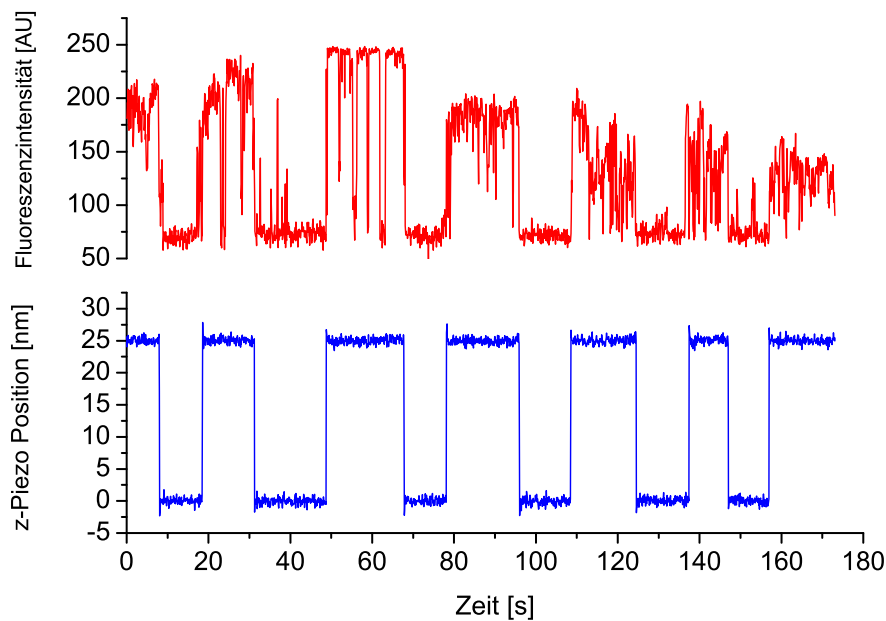


Abbildung 4.2: Externes „Schalten“ der Fluoreszenz durch einen Gold beschichteten Cantilever. Dargestellt sind die zeitlichen Verläufe der Fluoreszenzintensität (oben) und des Cantileverabstands von der Oberfläche (unten).

scheinlichkeiten in den eingesetzten Grafiken zeigen für den großen Abstand ein Verhältnis von 95% hell zu 5% dunkel, während die Fluoreszenz des Quantendots für den angenäherten Cantilever mit 4% hell zu 96% dunkel praktisch ausgelöscht ist.

In einem Kontrollexperiment soll gezeigt werden, dass das externe „Schalten“ der Fluoreszenzemission der Goldbeschichtung des Cantilevers zuzuschreiben ist. Wiederum werden Quantendots auf ein Deckgläschen aufgebracht. Der Cantilever bleibt jedoch unmodifiziert. Der Sensor wird an die Oberfläche angenähert. Durch das Aufsetzen der Cantileverspitze auf die Oberfläche werden Bewegungen eines einzelnen Quantendots in einer Richtung unterbunden. Wie in Abbildung 4.4a illustriert, wird die Oberfläche unter einem mit der Sensorspitze fixierten Nanokristall hinweggeschoben. Während die Fluoreszenzemission durch die CCD-Kamera erfasst wird. Der fixierte Quantendot bleibt durch den mechanischen Kontakt an Ort und Stelle, wohingegen benachbarte Nanokristalle mit der Oberfläche bewegt werden. Abbildung 4.4b zeigt aufeinanderfolgende Aufnahmen einiger Quantendots. Der durch den Cantilever fixierte Quantendot ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Probe wird nach rechts verschoben. Die nicht fixierten Nanokristalle wandern mit der Oberfläche um einige hundert Nanometer nach rechts, während der mitt-

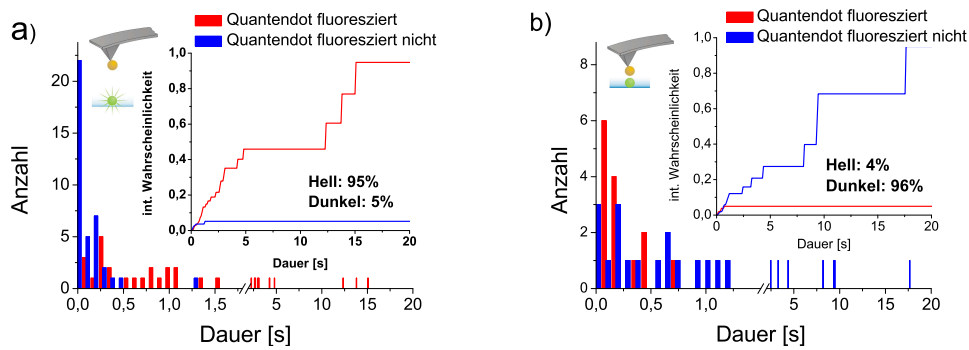


Abbildung 4.3: Histogramme der Hell- und Dunkelzeiten eines einzelnen Quantendots für den entfernten Cantilever a) und den angenäherten Cantilever b) Das Inset zeigt jeweils die integrierte Wahrscheinlichkeit des Hell- und Dunkelzustands.

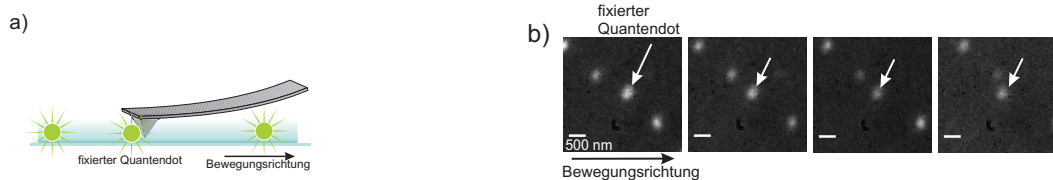


Abbildung 4.4: a) Illustration des Kontrollexperimentes mit einem unmodifizierten Cantilever. b) Die gemittelte Fluoreszenzemission mehrerer Quantendots. Während die Probenoberfläche nach rechts verschoben wird, bleibt der fixierte Quantendot (Pfeil) an Ort und Stelle. Die Fluoreszenzintensität wird durch den Kontakt mit der unmodifizierten Spitze nicht gequenchet.

lere Quantendot durch die Spitze des Cantilevers fixiert wird. Die Fluoreszenzintensität des fixierten Nanokristalls ist vergleichbar mit den Benachbarten. Um den Einfluss des Fluoreszenzblinkens zu minimieren, zeigen die Bilder jeweils das Mittel von 200 Aufnahmen mit je 50 *ms* Integrationszeit. Sowohl die Nähe zum unmodifizierten Siliziumsensor als auch die „moderate“ mechanische Wechselwirkung bewirken kein Verlöschen der Fluoreszenz. Insofern ist sicher, dass lediglich die Goldauflage für das Auslösen der Fluoreszenz verantwortlich ist.

In Kapitel 2.4.4 werden die Wechselwirkungen zwischen Fluorophoren metallischen (Nano-) Objekten und einem externen Feld beschrieben. Da diese Phänomene im Wesentlichen durch Dipol-Dipol Wechselwirkungen bedingt sind, welche eine r^{-6} -Abhängigkeit zeigen, müssen auch im Experiment Effekte auftreten, die vom Abstand des Sensors abhängig sind. Im Folgenden werden die Quantendots wie zuvor präpariert. Die Sensoren werden mit einer 20 *nm* bzw. 50 *nm* starken Goldauflage bedampft. Der modifizierte Sensor wird in Schritten von 2,5 *nm* an die Oberfläche angenähert, während die Flu-

reszenz durch die CCD-Kamera detektiert wird. Zudem wird die Auslenkung des Cantilevers bestimmt, um den Kontakt mit der Oberfläche zu bestimmen. Dadurch kann der Oberflächenabstand des Sensors für die zuvor angefahrenen Positionen bestimmt werden. An jeder Sensorposition werden 200 Bilder mit einer Belichtungszeit von je 50ms aufgenommen. Um den Einfluss des Fluoreszenzblinkens zu minimieren, wird jeweils über drei Sensorpositionen gemittelt. Die Fluoreszenzemission wird in einem 4×4 Pixel Ausschnitt (etwa $100 \times 100\text{nm}^2$) ausgewertet.

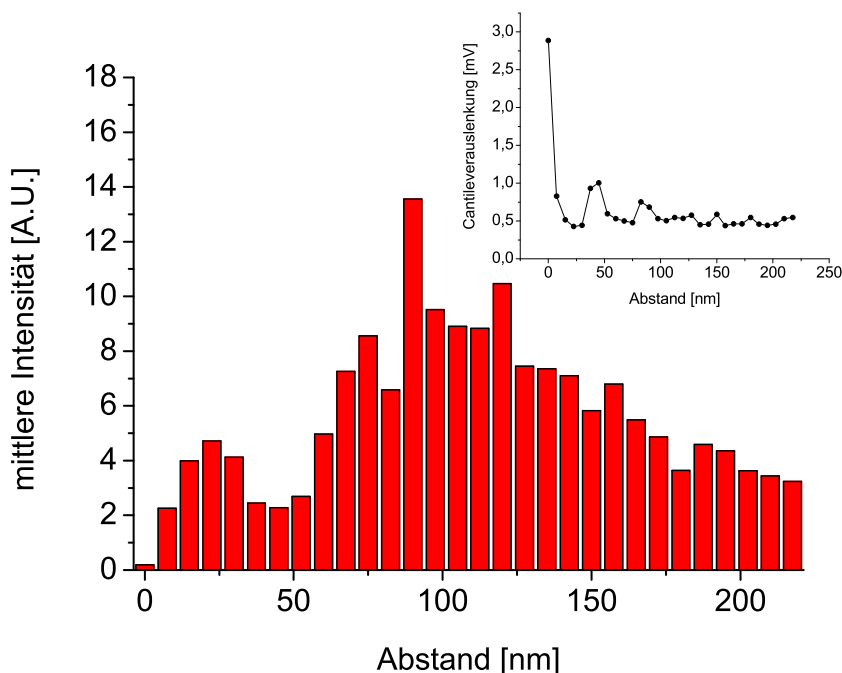


Abbildung 4.5: Abstandabhängige Intensität der Fluoreszenzemission eines Quantendots. Die Goldauflage des Cantilevers beträgt 20nm . Im Inset ist das Auslenkungssignal des Cantilevers dargestellt, es dient zur Bestimmung des Kontaktpunktes. Die Auslenkung des Sensors durch das Aufsetzen auf die Oberfläche zeigt sich durch den Anstieg im letzten Messpunkt.

Abbildung 4.5 zeigt die abstandsabhängige Fluoreszenzintensität eines einzelnen Quantendots. Die Goldschicht des Cantilevers hat eine Stärke von 20nm . Die Emission zeigt eine deutliche Abstandsabhängigkeit: Im Bereich von $200 - 100\text{nm}$ nimmt sie etwa um den Faktor zwei zu. Bei etwa 100nm zeigt sich ein Maximum. Weiteres Annähern des Sensors führt zu einem Absinken der Intensität, um unterhalb von 50nm ein relatives Mi-

nimum zu erreichen. Weiteres Verringern des Abstands zwischen Sensor und Quantendot führt zu einem erneuten Anwachsen der Fluoreszenz bis zu einem Maximum bei 20 nm . Von dort geht die Emissionswahrscheinlichkeit stark zurück, um dann beim Kontakt mit der Oberfläche praktisch vollständig zu verlöschen. Im kleinen Einsatz in Abbildung 4.5 ist die Auslenkung des Cantilevers während des Experiments dargestellt. Sie dient neben der Bestimmung des Kontaktpunktes auch der Kontrolle des seitlichen Versatzes zwischen Sensor und Quantendot: Wenn das Auslöschung der Fluoreszenz erst nach dem Aufsetzen der Sensors erfolgt, muss man davon ausgehen, dass Spitze und Quantendot seitlich gegeneinander versetzt sind und so der Abstand nicht eindeutig bestimmt werden kann. Insofern werden Daten, bei denen die Auslöschung der Fluoreszenz nicht spätestens mit dem Aufsetzen des Sensors erfolgt, verworfen.

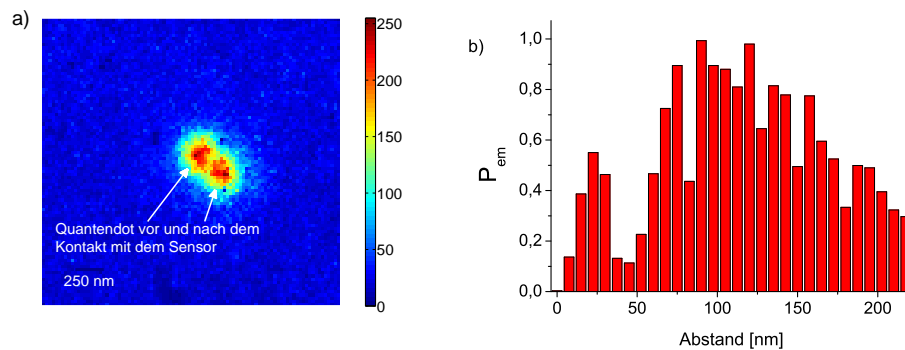


Abbildung 4.6: Zur Kontrolle, dass der Sensor Kontakt zum Fluorophor hat dient eine Überlagerung zweier Fluoreszenzbilder; eines vor und eines nach der Messung. Der Quantendot wurde durch den Kontakt deutlich verschoben. b) Die Emissionswahrscheinlichkeit P_{em} korreliert mit der mittleren Intensität aus Abbildung 4.5.

Des Weiteren muss der Quantendot nach dem Zurückziehen des Sensors noch deutliche Emission zeigen um sicherzustellen, dass das unerwünschte Bleichen des Quantendots nicht mit dem Auslöschung der Fluoreszenz verwechselt wird. Abbildung 4.6a zeigt eine Überlagerung von zwei Fluoreszenzbildern. Eines ist vor und das andere nach dem Experiment aufgenommen worden. Zudem wurde der Quantendot durch den Kontakt mit dem Sensor verschoben. Die während des gleichen Experiments detektierte Emissionswahrscheinlichkeit (vgl. Gleichung 3.5) ist in Abbildung 4.6b dargestellt. Qualitativ ist die Abstandsabhängigkeit von Emissionswahrscheinlichkeit und Fluoreszenzintensität gleich. Da dies für alle durchgeführten Messungen gilt, wird im Weiteren nur noch die

Emissionsintensität betrachtet.

Für das folgende Experiment wird ein Sensor mit einer 50 nm messenden Goldauflage verwendet. Die übrigen Parameter werden nicht verändert.

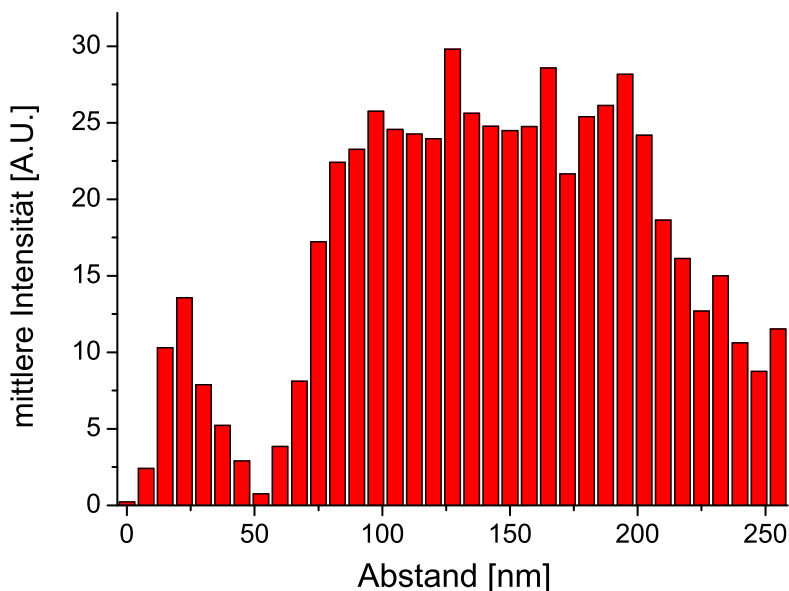


Abbildung 4.7: Abstandsabhängige Intensität der Fluoreszenzemission eines Quantendots. Die Goldauflage des Cantilevers beträgt 50 nm .

Die abstandsabhängige Fluoreszenzintensität in Abbildung 4.7 zeigt ein vergleichbares Verhalten wie im Experiment zuvor. Zunächst gibt es hier auch einen Anstieg der Emissionswahrscheinlichkeit. Ein isoliertes Maximum ist jedoch nicht zu erkennen, sondern vielmehr ein Plateau, das sich über den Bereich von etwa $200\text{--}100\text{ nm}$ erstreckt. Der Bereich von $100\text{--}50\text{ nm}$ zeigt auch hier einen Rückgang der Fluoreszenz bis zu einem Minimum oberhalb von 50 nm . Nahe der Oberfläche zeigt sich das gleiche Verhalten wie zuvor, ein Maximum bei ca. 20 nm und ein vollständiges Verlöschen der Fluoreszenz beim Oberflächenkontakt.

Eine Interpretation der beobachteten Phänomene an dieser Stelle ist nicht möglich, da sich im Experiment verschiedene Effekte wie Exziton-Plasmon Kopplung, Überhöhung des externen Feldes und Fluoreszenzdämpfung überlagern. In Simulationen können diese Effekte voneinander getrennt betrachtet werden. Die Ergebnisse werden deshalb in Kapitel 4.1.3 nach den Simulationen dieses Systems diskutiert.

4.1.2 Externe Fluoreszenzkontrolle - Simulationen

In diesem Kapitel wird das vorherige Experiment der abstandsabhängigen externen Fluoreszenzkontrolle mit der MDP-Methode simuliert. Dabei werden verschiedene Cantilvermodelle benutzt, die sich durch Öffnungswinkel und Spitzenform unterscheiden. Die dielektrischen Funktionen $\epsilon_\lambda = \epsilon_1 + i\epsilon_2$ der Medien werden wie folgt angenommen [123].

$$\text{Luft:} \quad \epsilon_{488} = 1 \quad \epsilon_{585} = 1$$

$$\text{Glas:} \quad \epsilon_{488} = 2.14 \quad \epsilon_{585} = 2.13$$

$$\text{Gold:} \quad \epsilon_{488} = -1,33 + 3,06i \quad \epsilon_{585} = -7,7 + 1,06i$$

Zur Bestimmung der Anregungsrate Γ_{exc} eines Fluorophors wird das elektrische Feld 2 nm oberhalb einer Glas-Luft Grenzfläche bestimmt. Die Beleuchtung erfolgt von unten durch radial polarisiertes Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm . Zunächst wird nur der Einstrahlwinkel des Lichtes im Bereich von 0° bis 90° variiert, wobei 0° der Senkrechten entspricht. Bedingt durch die radiale Polarisation der Beleuchtung, sind die transversalen Komponenten des Feldes $E_{x,y}$ gleich Null. In Abbildung 4.8 ist das Betragsquadrat $|\mathbf{E}_z|^2$ des Feldes senkrecht zur Grenzfläche über den Einstrahlwinkel aufgetragen. Hier zeigt sich ähnlich wie in Abbildung 2.12 eine Überhöhung des Feldes bei etwa $\theta_c \approx 43$. Für

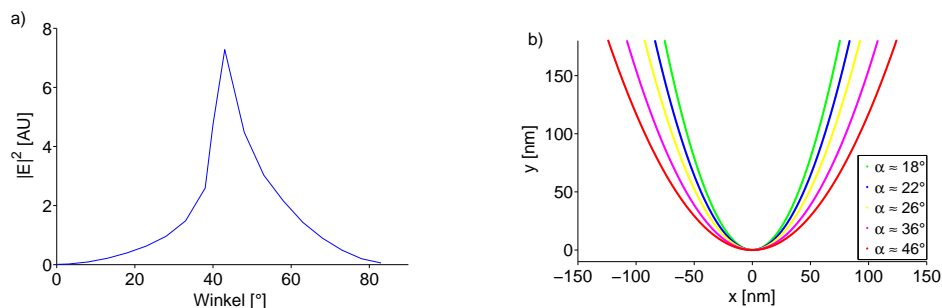


Abbildung 4.8: a) Feldintensität $|\mathbf{E}|^2$ in Abhängigkeit des Einstrahlwinkels. b) Modelle der Sensoren mit verschiedenen Öffnungswinkeln α .

die folgenden Rechnungen werden die in Kapitel 3.6 vorgestellten Modelle verwendet. Die Spitzen der Sensoren sind in Abbildung 4.8b dargestellt. Die Emissionsrate eines Dipolemitters ergibt sich aus dem Produkt der Quanteneffizienz Q mit der Anregungsrate Γ_{exc} (Gleichung 2.36). Beide Größen werden im Folgenden separat für verschiedene Sensorabstände bestimmt. Im Ergebnis ist das Produkt die messbare Fluoreszenzintensität.

Die Intensität des externen elektrischen Feldes $|\mathbf{E}_z|^2$ am Ort des Dipolemitters wird für Sensorabstände im Bereich von 500 - 5 nm berechnet. Durch die Gewichtung mit dem Feld für ein ungestörtes System ergibt sich daraus die relative Anregungsrate $\Gamma_{exc}/\Gamma_{exc}^0$. In den folgenden Simulationen erfolgt die Beleuchtung durch eine ebene Welle von unten, in einem Winkel von 50° zur Senkrechten. Die Wellenlänge beträgt 488 nm.

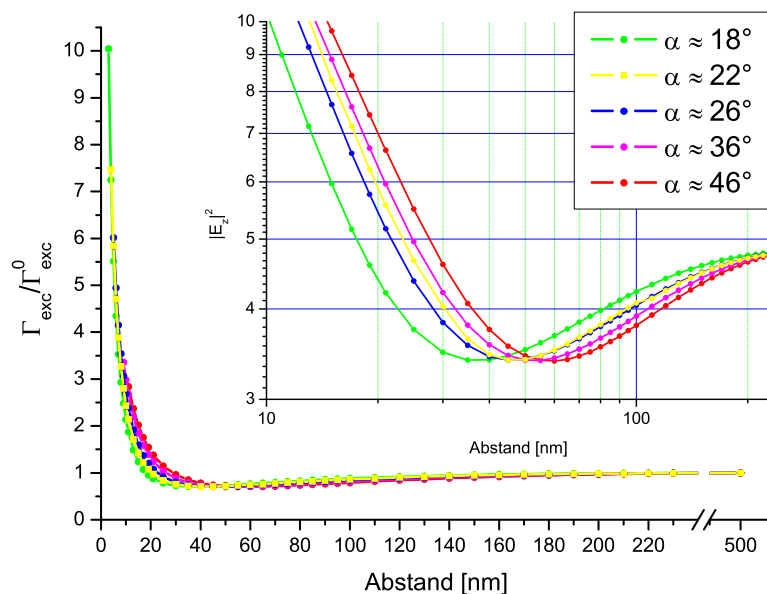


Abbildung 4.9: Die Abstandsabhängigkeit der relativen Anregungsrate $\Gamma_{exc}/\Gamma_{exc}^0$ für verschiedene Sensor-Öffnungswinkel α . Γ_{exc}^0 des ungestörten Systems bezieht sich auf einen Sensorabstand von 500 nm. In den Insets sind der abstandsabhängige Verlauf der Feldintensität in doppelt logarithmischer Skalierung, sowie die jeweiligen Sensorformen dargestellt.

In Abbildung 4.9 ist die relative Anregungsrate $\Gamma_{exc}/\Gamma_{exc}^0$ über den Sensorabstand aufgetragen. Die Anregungsrate des ungestörten Systems Γ_{exc}^0 bezieht sich auf einen Sensorabstand von 500 nm. Zur besseren Übersicht ist in der eingesetzten Grafik der Verlauf der Feldintensität doppelt logarithmisch über den Sensorabstand aufgetragen. Qualitativ ist für die verschiedenen Sensorformen eine ähnliche Abstandsabhängigkeit zu erkennen: Die Feldintensität nimmt vom Startpunkt bei 230 nm zuerst um etwa 1/4 ab, bis im Bereich von etwa 60 - 35 nm ein Minimum durchlaufen wird.

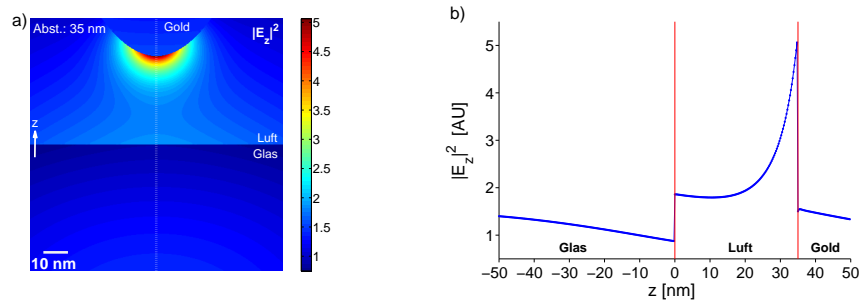


Abbildung 4.10: a) Feldintensität $|E_z|^2$ für einen evaneszent beleuchteten Sensor 35 nm über der Glas-Luft Grenzfläche. Die durch Oberflächenplasmonen erzeugte Überhöhung des elektrischen Feldes an der Sensorspitze regt Spiegeldipole im Glas an. b) Feldverlauf entlang der markierten Symmetrieachse. Überlagerung der Felder von Plasmonen und Spiegeldipolen führt zu einem lokalen Feldminimum etwa 10 nm über der Grenzfläche

Weiteres Annähern an die Oberfläche führt zu einem sehr starken Anstieg. Bei einem Abstand von 5 nm ist die relative Anregungsrate abhängig von der Sensorgeometrie um den Faktor 5-10 erhöht. Sensoren mit großem Öffnungswinkel bewirken eine stärkere Überhöhung des Feldes. Zur Erklärung dieser Effekte soll Abbildung 4.10a herangezogen werden. Sie zeigt die elektrische Feldintensität $|E_z|^2$ an einem evaneszent beleuchteten Sensor 35 nm oberhalb einer Luft-Glas Grenzfläche. An der Spitze des Sensors zeigt sich eine deutliche Überhöhung des elektrischen Feldes. Diese kann auf Oberflächenplasmonen zurückgeführt werden, die durch das äußere Feld angeregt werden. Dies erscheint plausibel, da die Goldspitze im evaneszenten Feld oberhalb einer Luft-Glas Grenzfläche prinzipiell mit der sogenannten Otto-Konfiguration [99] zur Erzeugung von Oberflächenplasmonen vergleichbar ist. Der quantitative Feldverlauf entlang der markierten Symmetrieachse ist in Abbildung 4.10b aufgetragen. Dort zeigt sich insbesondere die starke Überhöhung des Feldes nahe der Spitze. Für Sensorabstände kleiner als etwa 20 nm dominiert das Feld der Oberflächenplasmonen an der Glasoberfläche. Dies verursacht den starken Anstieg der Feldintensität für kleine Abstände von der Oberfläche.

Des Weiteren zeigt sich eine leichte Erhöhung des Feldes im Glas, die zur Grenzfläche hin abfällt. Diese Felderhöhung kann auf sogenannte Spiegeldipole zurückgeführt werden, die durch das Plasmonenfeld induziert werden. Die Überlagerung beider Felder kann zu einer Dämpfung des elektrischen Feldes führen. In den Abbildungen 4.10 a bzw. b ist etwa 10 nm oberhalb der Grenzfläche ein Sattelpunkt bzw. ein Minimum erkennbar. Dieser

Effekt kann den leichten Rückgang des Feldes bei der Annäherung des Sensors erklären. Außerdem zeigt sich hier eine eindeutige Abhängigkeit von der Form der Sensorspitze: Für stumpfe Sensoren wird das Minimum bei größeren Abständen zur Oberfläche durchlaufen als für Scharfe.

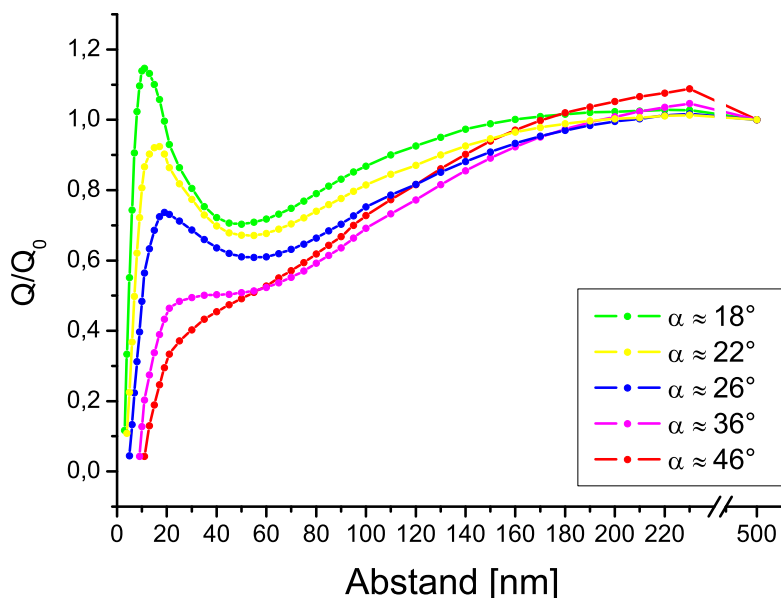


Abbildung 4.11: Relative Quanteneffizienz Q/Q_0 eines einzelnen, stehenden Dipolemitters für verschiedene Sensor-Öffnungswinkel α . Die Detektion erfolgt durch ein Objektiv mit der numerischen Apertur von 1,45

Im zweiten Schritt wird die (messbare) Fluoreszenz eines stehenden Dipolemitters mit einem Abstand von 2 nm zur Grenzfläche berechnet. Die Emissionswellenlänge beträgt 585 nm . Zur Bestimmung der detektierbaren Emission wird das Betragsquadrat des elektrischen Feldes $|\mathbf{E}_z|^2$ über den Ausschnitt einer Kugeloberfläche mit einem Radius von $10 \mu\text{m}$ integriert (vgl. Gleichung 2.34). Der Rand der Fläche wird von der numerischen Apertur des Objektivs bestimmt. In diesem Fall wird $NA = 1,45 \equiv 73^\circ$ angenommen. In Abbildung 4.11 ist die relative Quanteneffizienz $\frac{Q}{Q_0}$ über den Sensorabstand dargestellt. Da zunächst eine konstante Anregungsrate Γ_{exc} angenommen wird, zeigen die Graphen direkt die Verstärkung bzw. Dämpfung der Fluoreszenzintensität für verschiedene Spitzengeometrien. Schon für Sensorabstände von etwa 200 nm setzt die Dämpfung

der Fluoreszenzemission ein. Weiteres Annähern des Sensors an die Oberfläche führt zu einem weiteren Absinken der Fluoreszenzemission, bis im Bereich von 50 nm ein Minimum durchlaufen wird. Nur für den Sensor mit dem größten Krümmungsradius ist kein Minimum erkennbar. Die Fluoreszenzemission geht zurück bis sie praktisch vollständig verlischt. Für die übrigen Spitzen steigt die Emission wieder bis zu einem Maximum bei $20\text{-}10\text{ nm}$ an. Für kleinere Sensorabstände setzt dann auch hier eine starke Dämpfung der Fluoreszenzemission ein. Die Höhe des Emissionsmaximums zeigt eine eindeutige Abhängigkeit von der Form des Sensors. Für scharfe Sensorspitzen ist sogar eine Erhöhung der relativen Quanteneffizienz über Q_0 hinaus festzustellen. Mit zunehmendem Krümmungsradius der Spitze sind die Maxima weniger ausgeprägt.

Die Ursache dieser Effekte ist die Kopplung des Dipolemitters mit dem Sensor. Abbildung 4.12 zeigt die Intensität des elektrischen Feldes für einen stehenden Dipolemitter nahe einer Luft-Glas Grenzfläche für verschiedene Sensorabstände. Das verwendete Modell entspricht im Wesentlichen dem grünen Graphen in Abbildung 4.11. Außerdem ist der Öffnungswinkel eines Objektivs mit $NA = 1,45$ aufgetragen. Er dient zur Orientierung, welcher Anteil der Emission noch detektiert werden kann. Für einen Sensorabstand von 200 nm koppelt der Dipolemitter nur schwach mit dem Sensor. Die Emissionscharakteristik ähnelt sehr einem ungestörten Dipol, wie er in Abbildung 3.11b dargestellt ist. Bei einem Abstand von 50 nm zeigt sich für diesen Sensor ein lokales Minimum (vgl. Abbildung 4.11), was sich auch im Bild widerspiegelt. Neben der verringerten Fluoreszenzemission in den unteren Halbraum, koppelt der Sensor stärker mit dem Dipolemitter und zeigt selbst auch eine „dipolartige“ Emission in den oberen Halbraum. Diese Dipol-Dipol Kopplung hat ein Maximum bei einem Sensorabstand von 10 nm . Neben der erhöhten Emission in den unteren Halbraum tritt ebenfalls eine sehr starke Emission nach oben auf. Weiteres Annähern des Sensors bis auf 5 nm zeigt einen dramatischen Einbruch der detektierbaren Fluoreszenzintensität. Ebenso geht die Emission in den oberen Halbraum zurück. Neben der durch den Sensorabstand bedingten Variationen der Emissionsintensität bewirkt die Kopplung des Dipols mit dem Sensor auch eine Veränderung der bevorzugten Abstrahlrichtung. Für die Sensorabstände von 200 und 5 nm sind jeweils Scheitelpunkte der „Dipolkeulen“ markiert (Pfeile). Für große Sensorabstände liegen diese innerhalb des Detektionsbereiches. Allerdings wächst der Winkel der bevorzugten Emissionsrichtung mit der Verringerung des Sensorabstandes. Für einen Abstand von 5 nm liegen die Scheitelpunkte deutlich außerhalb des Öffnungswinkels des Objektivs. Ein gewisser Anteil der Fluoreszenzemission kann demzufolge nicht mehr detektiert werden.

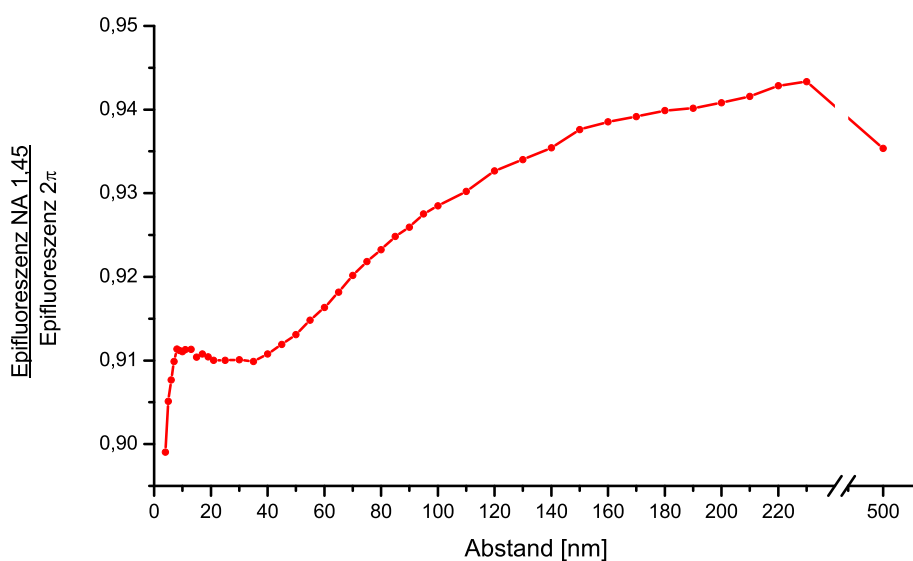
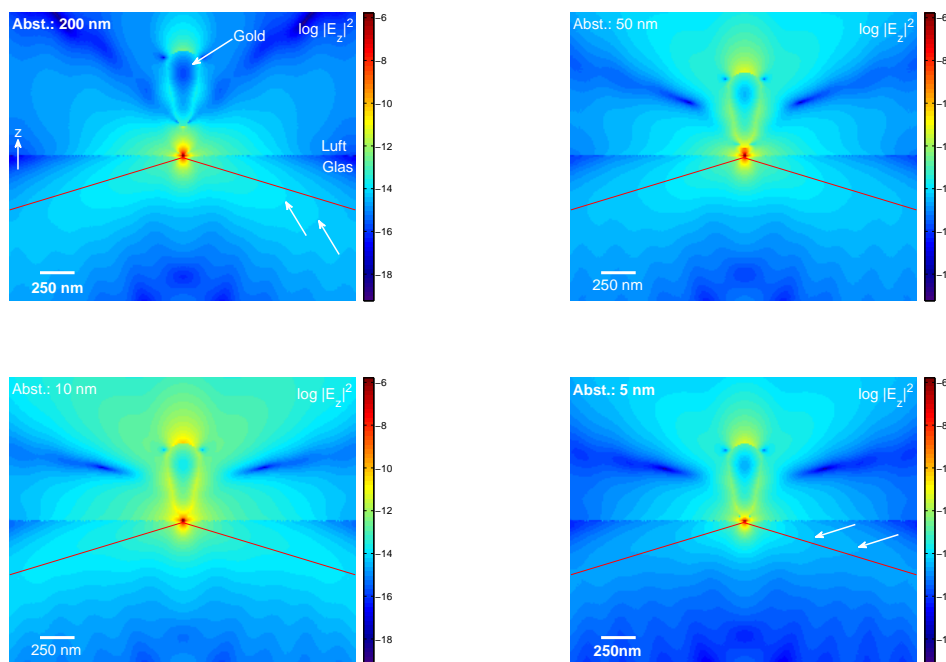


Abbildung 4.12: Oben: Emission eines stehenden Dipolemitters für verschiedene Sensorabstände. Der Sensor hat einen Öffnungswinkel von 18° und eine Höhe von etwa 450 nm . Die Form der Spitze entspricht dem grünen Plot in Abbildung 4.8. Neben der Emissionsintensität zeigen sich auch Veränderungen in der Richtungscharakteristik der Abstrahlung. Zur Orientierung ist jeweils der Öffnungswinkel eines Objektivs mit einer numerischen Apertur von 1,45 aufgetragen. Die markierten Scheitelpunkte der „Emissionskeulen“ liegen für einen Sensorabstand von 200 nm deutlich innerhalb des Objektivöffnungswinkels. Für 5 nm Sensorabstand liegen die Scheitelpunkte außerhalb des Detektionsbereiches. Unten: Im Graphen ist die Abstandsabhängigkeit der detektierbaren Fluoreszenzemission im Verhältnis zur Gesamtemission in den unteren Halbraum aufgetragen.

Die Abstandsabhängigkeit der detektierbaren Fluoreszenz im Verhältnis zur Gesamtemission in den unteren Halbraum ist im Graphen in Abbildung 4.12 aufgetragen. Der Anteil der detektierbaren Emission geht mit etwa 4% nur wenig zurück und ist im Vergleich zu den anderen Effekten zu vernachlässigen. Abbildung 4.13 zeigt das Produkt der zuvor er-

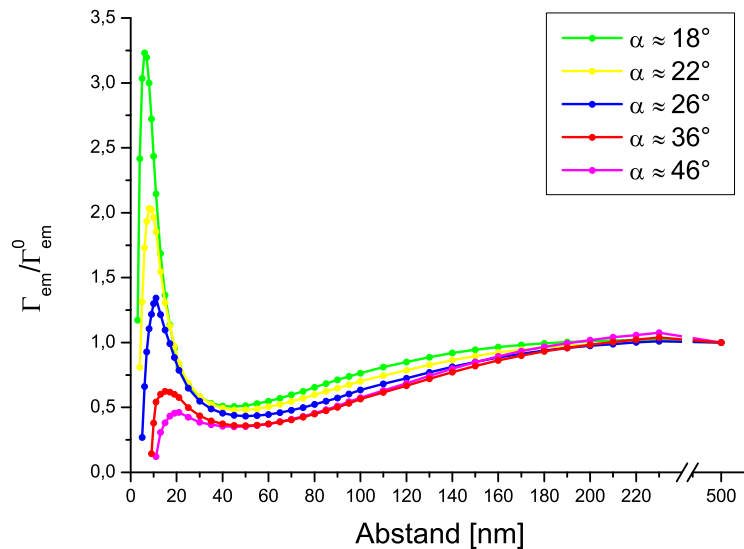


Abbildung 4.13: Abstandsabhängigkeit der relativen Emissionsrate eines Quantendots für verschiedene Sensor-Öffnungswinkel α .

mittelten relativen Anregungsrate $\Gamma_{exc}/\Gamma_{exc}^0$ und relativen Quanteneffizienz Q/Q_0 . Nach Gleichung 2.36 entspricht das der relativen Fluoreszenzintensität, wie sie in einem Experiment messbar wäre. Durch die separate Betrachtung der Wechselwirkung zwischen externem Feld und verschiedenen Medien einerseits sowie Dipolemitter und Medien andererseits kann der vom Sensorabstand abhängige Verlauf der Fluoreszenz eindeutig erklärt werden: Die bei Sensorabständen von ca. 200 nm beginnende Dämpfung der Fluoreszenz kann im wesentlichen einem Rückgang der Quanteneffizienz zugeschrieben werden. Das Minimum der Fluoreszenzemission bei etwa 50 nm wird durch die Überlagerung von zwei Effekten verursacht: Einerseits der Verringerung der Anregungsrate durch Überlagerung vom Plasmonenfeld der Spitze und den Spiegeldipolen im Glas. Andererseits zeigt sich eine von der Spitzegeometrie abhängige Dämpfung der Fluoreszenz von ca. 20-50%. Ebenfalls von der Form der Spitze hängt das Fluoreszenzmaximum im Bereich von 10-20 nm Sensorabstand ab. Es wird verursacht durch eine resonante Dipol-Dipol Kopplung. Für das System Quantendot Goldspitze spricht man von einer Exziton-Plasmon Kopplung.

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der externen Fluoreszenzkontrolle aus Experiment und Simulation diskutiert.

4.1.3 Diskussion - Externe Fluoreszenzkontrolle

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass der neu entwickelte Aufbau für die Durchführung kombinierter fluoreszenz- und rastersondenmikroskopischer Untersuchungen an einzelnen Farbstoffen geeignet ist. Die Fluoreszenzemission einzelner Quantendots kann durch Gold modifizierte Cantilever kontrolliert werden. Ebenso können einzelne Farbstoffe gezielt mechanisch manipuliert und gleichzeitig fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden. Ferner kann die Abhängigkeit der Fluoreszenzemission vom Abstand eines Gold beschichteten Sensors aufgenommen werden. Der Vergleich der simulierten Daten mit den experimentellen Ergebnissen zeigt trotz der angenommenen Vereinfachungen qualitativ eine sehr gute Übereinstimmung. Insbesondere wird durch die separate Betrachtung von relativer Anregungsrate $\Gamma_{exc}/\Gamma_{exc}^0$ und relativer Quanteneffizienz Q/Q^0 ein besseres Verständnis des Experiments ermöglicht: Die im Experiment beobachteten Phänomene können eindeutig auf Effekte wie Exziton-Plasmon-Kopplung, Fluoreszenzdämpfung oder lokale Feldverstärkungseffekte zurückgeführt werden.

Die Ergebnisse aus Experiment und Simulation sind außerdem konsistent mit Untersuchungen an anderen aber durchaus vergleichbaren Systemen: Messungen an einzelnen im Hellfeld angeregten *Nile Blue* Farbstoffmolekülen zeigen beim Annähern eines sphärischen Gold Nanopartikels ebenso eine Fluoreszenzverstärkung für einen Abstand von etwa 20 nm [3]. Simulationen des Systems ergeben eine vergleichbare Abstandsabhängigkeit von Anregungsrate und Quanteneffizienz. Ferner kann ebenso wie in dieser Arbeit die Abhängigkeit von der Geometrie und Größe des Quenchers gezeigt werden.

Weitere theoretische Arbeiten zeigen, dass auch an planaren, dünnen Metallfilmen eine Verstärkung der Fluoreszenzemission erwartet werden kann [36] [96]. Neben der Abstandsabhängigkeit wird auch der Einfluss der Stärke des Metallfilms diskutiert.

Externe Fluoreszenzkontrolle - Experiment vs. Simulation

Trotz qualitativ guter Übereinstimmung zeigen die gemessenen Daten einige Details, die durch die Simulationen nicht dargestellt werden können. Die gemessene Dämpfung der Fluoreszenz im Bereich von 100 - 50 nm ist wesentlich steiler als in den simulierten Daten. Außerdem zeigt sich in den Simulationen kein ausgeprägtes Maximum im Bereich von etwa 150 - 100 nm Sensorabstand. Ebenso kann in den Simulationen keine nennenswerte Variation der Fluoreszenzintensität für große Sensorabstände festgestellt werden. Lediglich für Sensoren mit großem Öffnungswinkel gibt es bei großen Abständen einen geringen Anstieg der Quanteneffizienz bzw. Emissionsrate.

Die Ursache für diese Abweichungen können sowohl im Experiment, als auch in der Simulation begründet sein. Das typische Blinken von Quantendots kann eine Ursache der Abweichungen sein. Trotz langer Integrationszeiten und dem Mitteln über mehrere Sensorpositionen können Einflüsse dieser Fluktuationen nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Ein weiterer kritischer Punkt könnte der 3D-Piezotisch mit der Probenaufnahme sein. Da während des gesamten Experiments der Cantilever fest steht und nur die Probe bewegt wird, ist es möglich, dass sich die Probe für große Abstände gerade außerhalb des Fokus befindet und erst mit dem Annähern an den Cantilever scharf abgebildet wird. Dies könnte eine Erklärung für den Anstieg der Fluoreszenz bei großen Sensorabständen sein. Eine dahingehende Überprüfung der Daten hat das jedoch nicht bestätigt.

Ebenso kann es auch sein, dass die Simulationen das Experiment nicht genau genug wiedergeben. Die in Kapitel 3.6 vorgestellten Modelle könnten zu sehr vereinfacht sein. Im Experiment werden mit einem Goldfilm belegte Silizium Cantilever verwendet, während in der Simulation massive Goldspitzen angenommen werden. Zudem sind die verwendeten Sensorspitzen nicht rotationssymmetrisch sondern vierseitige Pyramiden mit deltoider Grundfläche. Da die Simulationen eine starke Abhängigkeit von der Form der Sensoren zeigen, ist es nicht auszuschließen, dass Rechnungen mit einem entsprechenden Sensormodell das Experiment besser darstellen können.

4.2 Photoschaltbare Calixarene

In diesem Teil der Arbeit werden die Ergebnisse der Messungen an photoschaltbaren Calixarenen präsentiert. Durch kraftspektroskopische Bindungsstudien am offenen Rezeptor können für zwei verschiedene Liganden die Bindungslänge x_β und die thermodynamische Dissoziationsrate k_{off}^0 bestimmt werden. Dabei wird sowohl die Standard-Theorie (Kapitel 2.2.1) als auch der HBM-Ansatz (Kapitel 2.2.2) verwendet. Die Spezifität der Bindung und die Reversibilität des Konformationswechsels werden ebenfalls kraftspektroskopisch nachgewiesen. Ferner wird demonstriert, dass sich der Konformationswechsel topografisch nachweisen und quantisieren lässt.

4.2.1 AFM-Kraftspektroskopie an photoschaltbaren Calixarenen

Die Kraftspektroskopie-Experimente an photoschaltbaren Calixarenen wurden mit dem TIRF-AFM (vgl. Kapitel 3.1.1) durchgeführt. Die UV-Beleuchtung der Probe erfolgt jedoch durch eine UV-Handlampe ($\lambda = 365 \pm 5 \text{ nm}$). Die Substrate werden dazu aus dem Gerät entnommen und für 20 Minuten in entgastem Ethanol bestrahlt. Die Modifikation der Sensoren und die Immobilisierung der Rezeptoren wird wie in den Kapiteln 3.2.1 bzw. 3.3.3 beschrieben durchgeführt. Die Ziehgeschwindigkeiten liegen im Bereich von 100 - 5000 nm/s . Die Haltezeit auf der Oberfläche beträgt $t_{dwell} = 50 \text{ ms}$. Variationen im Bereich von 10 bis 500 ms zeigten keine signifikante Änderung. Die Messungen werden in Ethanol bei Raumtemperatur ($T=21^\circ\text{C}$) durchgeführt. Durch die geringe Dichte der Calixarene auf der Oberfläche ist die Wahrscheinlichkeit einer spezifischen Bindung mit 3-5% relativ klein. Die Datensätze enthalten deshalb je Geschwindigkeit mindestens 10000 Kraft-Distanz-Kurven, aus denen durch die in Kapitel 3.5.2 erläuterte Prozedur spezifische Ereignisse herausgefiltert werden. Die Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Dissoziationskräfte enthalten jeweils mindestens 150 spezifische Ereignisse. In Abbildung 4.14 sind die Verteilungen der Dissoziationskräfte für Trimethylammonium-Liganden bei verschiedenen Ziehgeschwindigkeiten dargestellt.

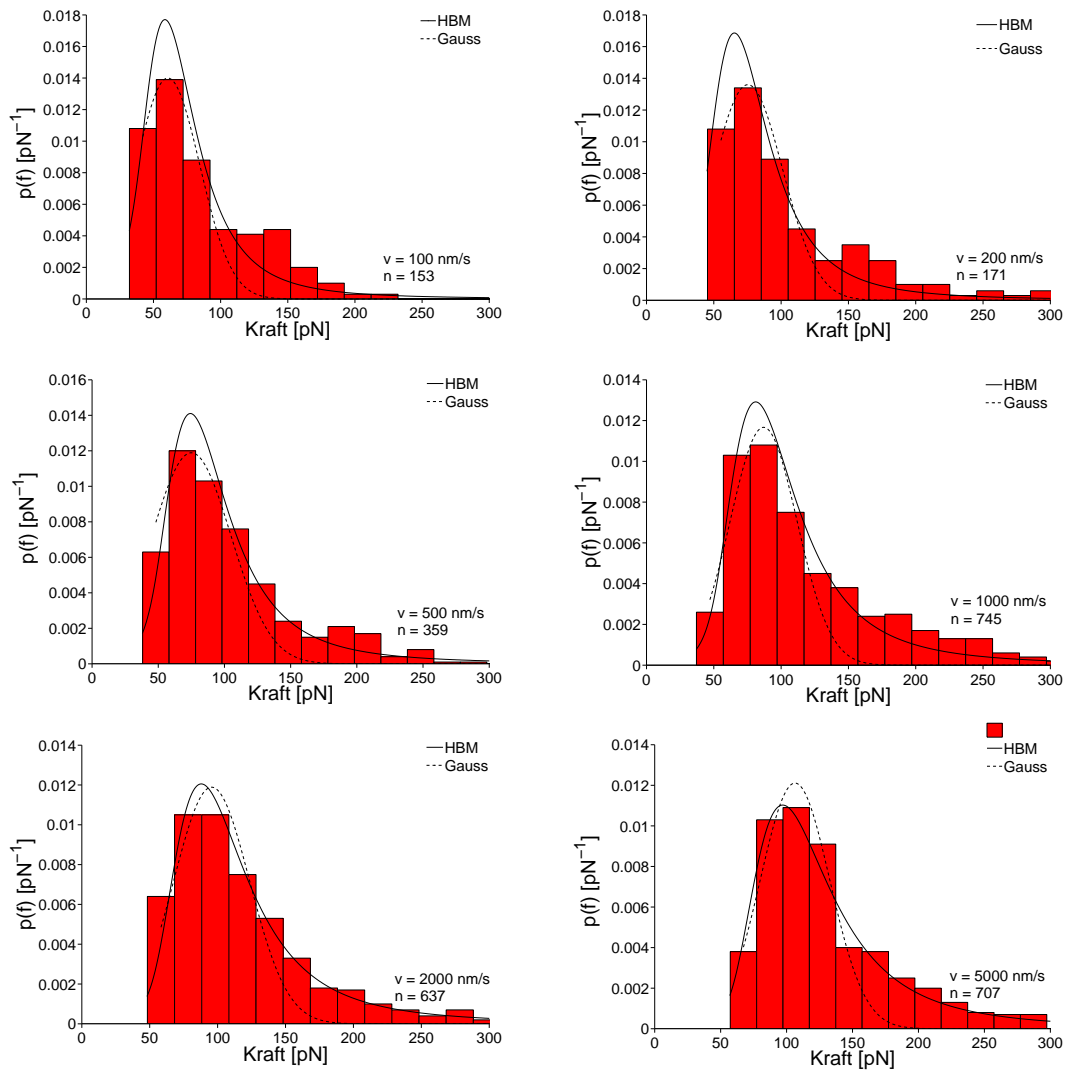


Abbildung 4.14: Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Dissoziationskräfte von Calixaren-Trimethylammonium⁺-Komplexen für Ziehgeschwindigkeiten von 100 bis 5000 nm/s . Die Daten werden durch eine Normalverteilung bzw. durch eine Verteilung nach dem HBM-Ansatz approximiert. n bezeichnet die Anzahl der spezifischen Ereignisse.

Die wahrscheinlichsten Dissoziationskräfte \hat{F} werden für die Auswertung nach der Standard-Theorie durch angepasste Normalverteilungen ermittelt. Diese können wie in Abbildung 4.15 in einem semilogarithmischen Plot gegen die Belastungsrate r aufgetragen werden. Durch Anpassen des Datensatzes an Gleichung 2.16 werden die Bindungslänge x_β und die thermodynamische Dissoziationsrate k_{off}^0 ermittelt. Die Ergebnisse für beide Liganden sind in Tabelle 4.1 angegeben.

Bei der Auswertung nach dem HBM-Ansatz wird der Parametersatz $\vec{\mu} = (k_{off}^0, a, \sigma)$ abgeschätzt, welcher die Likelihood-Funktion $L(\vec{\mu})$ (Gleichung 3.7) maximiert. Die aus diesem Verfahren ermittelten Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Dissoziationskräfte sind in Abbildung 4.14 aufgetragen. Die abgeschätzten Parameter sind ebenfalls in Tabelle 4.1 angegeben.

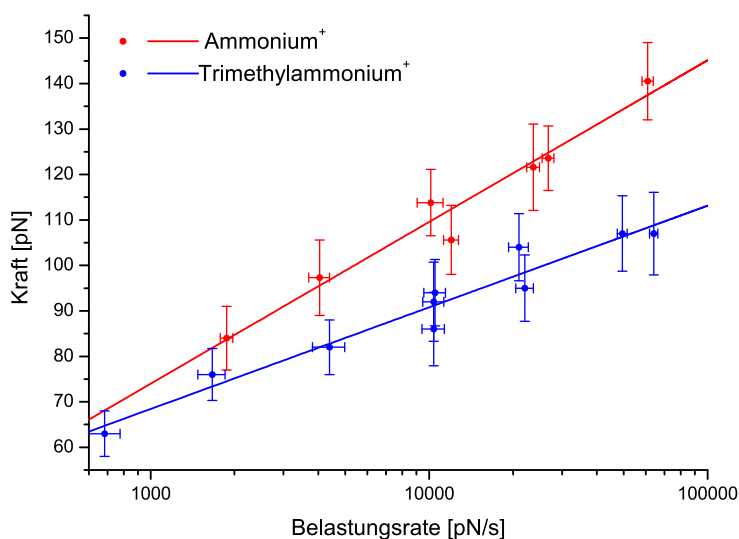


Abbildung 4.15: Dynamische Kraftspektroskopie an photoschaltbaren Calixarenen. Als Liganden werden Ammonium⁺ und Trimethylammonium⁺ verwendet.

Ligand	Standard-Theorie		HBM			
	x_β [nm]	k_{off}^0 [s ⁻¹]	x_β [nm]	σ [pN ⁻¹]	k_{off}^0 [s ⁻¹]	$\Delta \ln k_{off}^0$
Ammonium	0,265 ± 0,059	0,54 ± 0,77	0,148 ± 0,006	0,017 ± 0,001	0,42	±0,15
Trimethylammonium	0,422 ± 0,082	0,09 ± 0,15	0,324 ± 0,016	0,032 ± 0,002	0,22	±0,34

Tabelle 4.1: Ergebnisse der dynamischen Kraftspektroskopie

4.2.2 Konkurrenz und Photoschalten

Im Folgenden werden die Spezifität der Rezeptor-Ligand-Bindung und die Photoschaltbarkeit des Rezeptors demonstriert. Die Calixarene werden in Submonolagendichte auf einem Goldsubstrat immobilisiert. Die Messungen werden in Ethanol bei einer Ziehgeschwindigkeit von 500 nm/s durchgeführt. Um präparationsbedingte Schwankungen der Bindewahrscheinlichkeit zu vermeiden, werden die aufeinanderfolgenden Messungen der Reihe mit dem gleichen Sensor bzw. Substrat durchgeführt. In Abbildung 4.16 sind die Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Dissoziationskräfte für die einzelnen Experimente dargestellt. Für jede Messung wurden 7500 Kurven aufgenommen. Die Reihe beginnt mit einer Messung an einem frisch präparierten Substrat. Die Wahrscheinlichkeit einer spezifischen Bindung liegt mit $n = 332$ Ereignissen bei $p = 4,4\%$ (Abbildung 4.16a). Im darauffolgenden Schritt wird die Probe für 20 min in entgastem Ethanol mit einer UV-Handlampe ($\lambda = 265 \pm 5 \text{ nm}$) bestrahlt. Die lichtinduzierte Dimerisierung der Anthracengruppen führt zu einem Verschließen des Rezeptors, was auch am drastischen Absinken der Bindewahrscheinlichkeit ($p = 4,1\%$) abzulesen ist (Abbildung 4.16b). Das Substrat wird danach in Ethanol für 60 min bei 60°C reaktiviert. Die Anthracengruppen des Rezeptors dissoziieren und geben die Rezeptorkavität wieder frei. Die Verteilung der Dissoziationskräfte zeigt eine Wiederherstellung der Aktivität. Die Wahrscheinlichkeit einer spezifischen Bindung liegt bei $p = 4,9\%$ wieder auf dem Ausgangsniveau (Abbildung 4.16c). Im folgenden Experiment wird die Spezifität der Bindung demonstriert. Dazu wird die Messung in einer ethanolischen Lösung mit freiem Liganden (10 mM) durchgeführt. Dieser blockiert die Bindestellen des Rezeptors und reduziert wie in Abbildung 4.16d ersichtlich die Bindewahrscheinlichkeit ($p = 0,6\%$) der am Sensor immobilisierten Liganden. Nach dem gründlichen Waschen des Goldsubstrates mit Ethanol kann die Aktivität ($p = 4,7\%$) wiederhergestellt werden (Abbildung 4.16e).

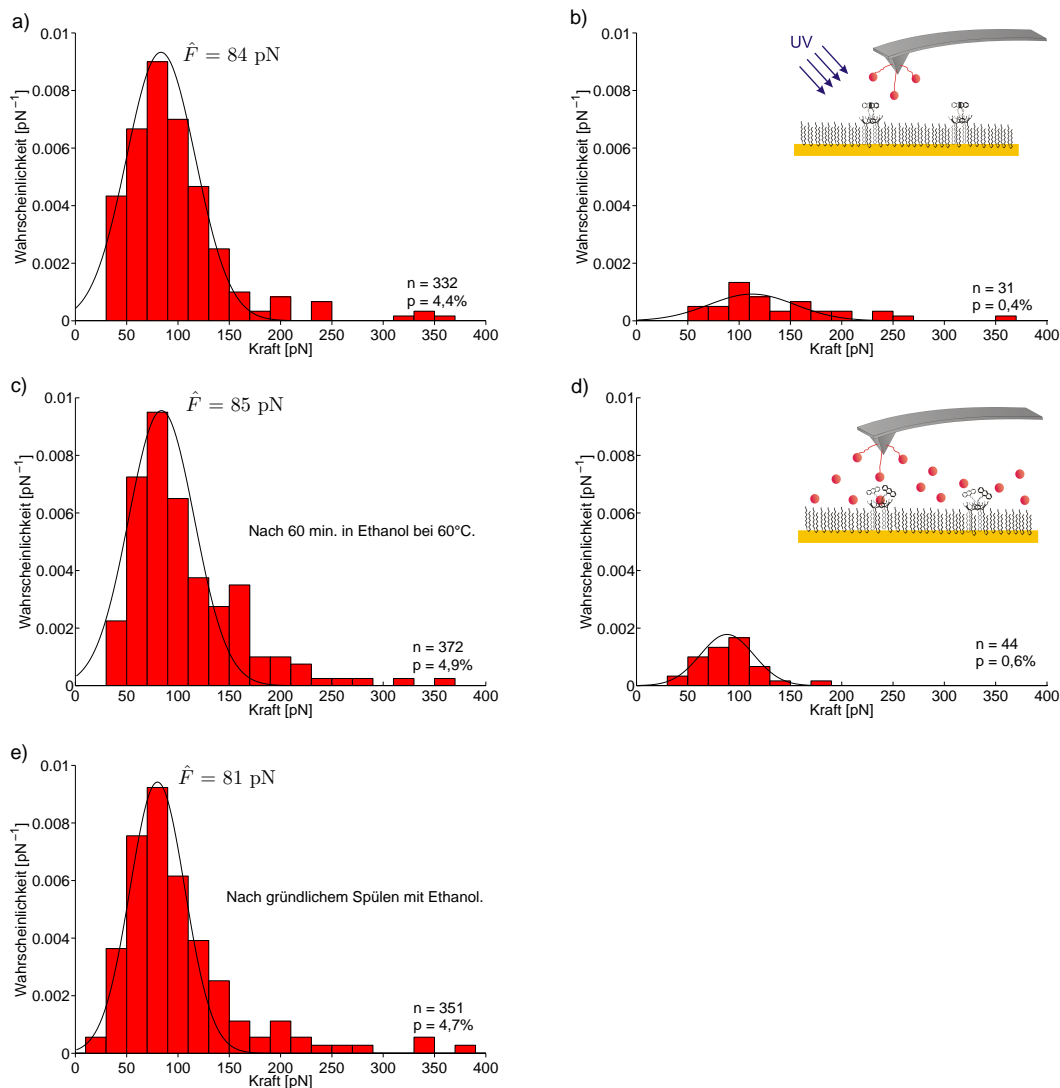


Abbildung 4.16: Photoschalten und Konkurrenzexperiment an photoschaltbaren Calixarenen. Die Ziehgeschwindigkeit beträgt 500 nm/s . a) Verteilung der Dissoziationskräfte für eine frisch präparierte Probe. b) Nach 20-minütiger Bestrahlung bei $\lambda=365 \pm 5 \text{ nm}$. c) Reaktiviert nach 60 min. in entgastem Ethanol bei 60°C . e) In ethanolischer Lösung mit freiem Ligand (Trimethylammonium, 10 mM). f) Nach gründlichem Spülen der Probe mit Ethanol.

4.2.3 Topografie photoschaltbarer Calixarene

Durch topografische AFM-Messungen kann die Konformationsänderung eines einzelnen Calixarens direkt nachgewiesen werden. Dazu werden AFM-Scans vor und nach der UV-Exposition miteinander verglichen. Maßgebliche Größe dabei ist die Höhe der Moleküle.

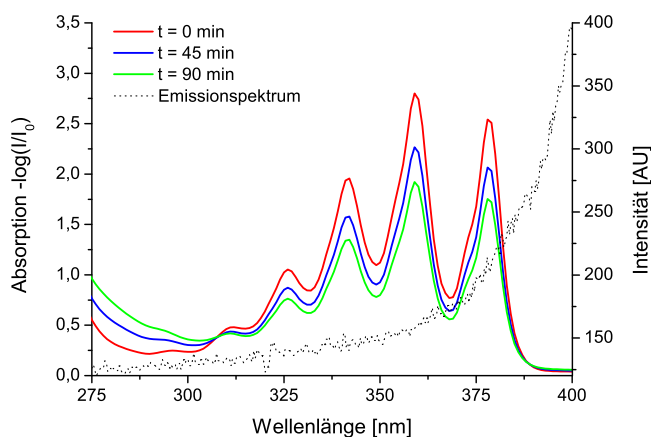


Abbildung 4.17: Absorptionsspektren einer 1mM Anthracenlösung in Chloroform vor und nach 45 bzw. 90-minütiger Bestrahlung mit einer Halogenlampe. Zudem ist das Emissionsspektrum der Lampe dargestellt.

Sämtliche in diesem Kapitel präsentierten AFM-Scans wurden mit dem Veeco Multimode (vgl. Kapitel 3.1.2) durchgeführt. Damit jeweils die gleichen Moleküle vor und nach der UV-Exposition verglichen werden können, sollen die Calixarene während der Messung geschaltet werden. In Abbildung 4.17 wird gezeigt, dass dies auch mit einer konventionellen Halogenlampe möglich ist, wie sie in der Probenbeleuchtung des AFM genutzt wird. Neben den Absorptionsspektren einer ein-millimolaren Anthracenlösung ist das Emissionsspektrum der Probenbeleuchtung aufgetragen. Die Intensität fällt unterhalb von 400 nm zwar stark ab, allerdings zeigen die Spektren nach 45 bzw. 90 min, dass selbst diese vergleichbar geringe Intensität für die Dimerisierung der Anthracene ausreicht. Da die Transmissionscharakteristik des gesamten optischen Systems nicht außer Acht gelassen werden darf, ist die Küvette für diese Messung direkt auf der Probenhalterung des AFM befestigt.

Man kann also davon ausgehen, dass immobilisierte, photoschaltbare Calixarene durch

die Probenbeleuchtung von der offenen in die geschlossene Isoform überführt werden können.

Vor der Immobilisierung der Calixarene werden die TSG-Substrate bezüglich ihrer Rauheit charakterisiert. Wegen der erwarteten geringen Änderung der Molekülhöhe durch das Photoschalten werden ausschließlich Substrate mit einer Rauheit von weniger als 150 pm auf $500 \times 500 \text{ nm}^2$ verwendet.

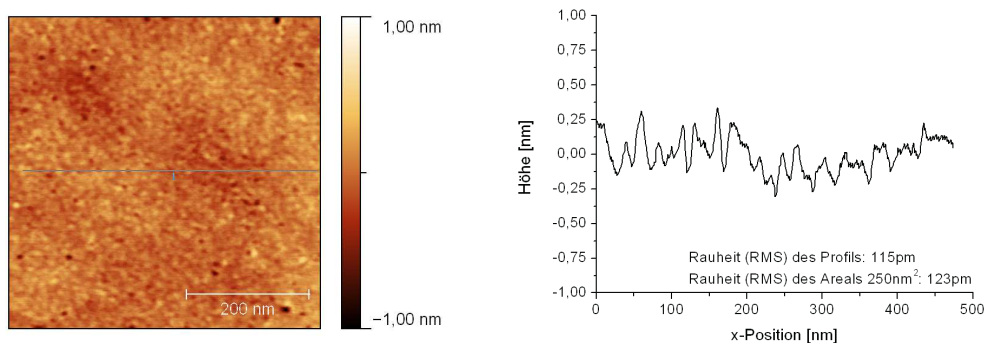


Abbildung 4.18: AFM-Scan und Höhenprofil eines typischen TSG-Substrats.

In Abbildung 4.18 ist ein typisches Substrat abgebildet. Die Immobilisierung der Calixarene wird wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben durchgeführt. TSG-Substrate sind zwar sehr glatt, aber nicht monokristallin wie z.B. Gold(111). Sie verfügen somit nicht über eine Fernordnung, wie sie kristallinen Festkörpern zu Eigen ist. Vielmehr kann man bei TSG-Substraten nur von einer Nahordnung ausgehen, d.h. es gibt lediglich kleine kristalline Domänen, die durch Defektbereiche voneinander getrennt sind. Diese Defekte können Ursache für „fehlerhaft“ adsorbierte Calixarene sein: Die Rezeptoren binden über vier Schwefelatome an das Substrat. Wenn mindestens eine dieser Bindestellen in den Bereich eines Substratdefektes fällt, ist es wahrscheinlich, dass das Calixaren nicht mehr „korrekt“, d.h. senkrecht an die Oberfläche bindet. Das hat zur Folge, dass eine Veränderung der Molekülhöhe nicht mehr in vollem Umfang detektiert werden kann. Insofern ist es essenziell, dass korrekt adsorbierte Moleküle von den Anderen unterschieden werden können. Die Vorgehensweise wird in Abbildung 4.19 illustriert. Einzelne Calixarene werden durch eine Schwellwertmaske markiert und die Höhenverteilung bestimmt. Das ausgeprägte Maximum bei $0,2 \text{ nm}$ kann nicht korrekt adsorbierten Calixarenen oder Substratdefekten zugeordnet werden. Zwischen $0,4$ und $0,9 \text{ nm}$ bleibt die Verteilung konstant, um dann schnell abzufallen. Für die Höhe der photoschaltbaren Calixarene selbst sind keine Daten vorhanden, allerdings wurde die Höhe von Calixarenen ohne Anthracenreste

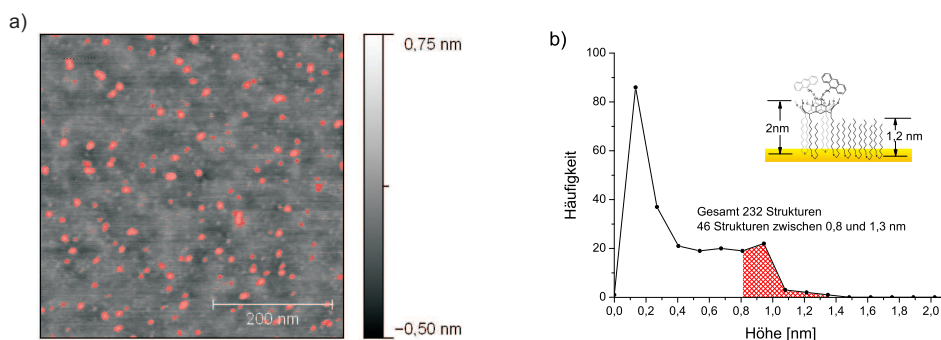


Abbildung 4.19: a) AFM Topografie-Scan einzelner Calixarene, eingebettet in eine (Mono-) Lage aus Didecylsulfid auf einem TSG Substrat. Die Calixarene werden mit einer Schwellwertmaske (rot) markiert. b) Mit einer Partikelanalyse wird die Höhenverteilung der markierten Moleküle ermittelt. Die eingesetzte Grafik illustriert die Höhen der Calixarene und der Didecyl Lage. Korrekt adsorbierte Calixarene sollten mindestens $0,8 \text{ nm}$ höher erscheinen als ihre unmittelbare Umgebung. Der entsprechende Bereich ist im Höhenhistogramm rot schraffiert dargestellt.

abhängig von der Methode mit $1,8\text{-}2,0 \text{ nm}$ bestimmt [118]. Für die Höhe der Didecyl (Mono-) Lage soll folgende geometrische Abschätzung genügen: Die C-C Bindung hat eine Bindungslänge von 152 pm und einen Bindungswinkel von $109,47^\circ$ [79]. Aus neun C-C Bindungen und einer C-S Bindung mit einer Bindungslänge von 181 pm [79] folgt eine Gesamtlänge von ca. $1,2 \text{ nm}$. Vor diesem Hintergrund erscheint es sinnvoll nur Calixarene für eine weitere Auswertung heranzuziehen, die mindestens $0,8 \text{ nm}$ höher als ihre unmittelbare Umgebung erscheinen. Diese sind mit einiger Wahrscheinlichkeit korrekt an die Oberfläche adsorbiert. In Abbildung 4.19b ist der entsprechende Bereich im Höhenhistogramm rot schraffiert.

Des Weiteren werden stark elliptische Strukturen nicht ausgewertet. Für die Messung der Höhendifferenz durch die Konformationsänderung wird die Konzentration der Calixarene auf der Oberfläche so weit wie möglich herabgesetzt. Während für die Probe in Abbildung 4.19 das molare Verhältnis von Calixarenen zu Didecylsulfid noch 1:40 ist, wird es für die eigentlichen Photoschaltexperimente bis auf 1:200 reduziert (Abbildung 4.20). Dies dient vor allem der Vermeidung von Calixaren-Clustern, da dort nicht notwendigerweise Anthracengruppen desselben Moleküls dimerisieren.

Zur Ermittlung des Höhenunterschiedes vor und nach der UV-Exposition werden jeweils mindestens drei Scans aufgenommen. Die Messung wird während der 20-minütigen UV-Beleuchtung nicht unterbrochen. Aus den Topografiedaten werden wie in Kapitel 3.5.3

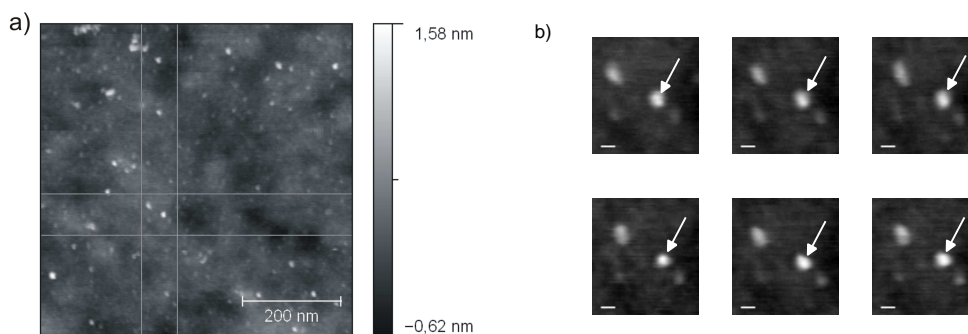


Abbildung 4.20: a) Einzelne Calixarene auf einem TSG Substrat mit einem markierten Bildareal. b) Extrahierte ROI aus einer Serie aufeinanderfolgender Scans. In der oberen Reihe vor der UV-Exposition und in der unteren Reihe nach 20-minütiger UV-Exposition. Der Maßstab entspricht 10 nm .

beschrieben einzelne Höhenprofile extrahiert, gemittelt und die Höhendifferenz im Maximum des Moleküls bestimmt. Abbildung 4.20a zeigt eine AFM-Aufnahme einzelner Calixarene auf einem TSG-Substrat. Der markierte Ausschnitt ist in Abbildung 4.20b dargestellt. In der oberen Reihe ist eine Serie vor und darunter nach 20-minütiger UV-Exposition dargestellt. Bei diesen Aufnahmen sind lediglich die Neigung und der Höhen-Offset der Areale korrigiert. Zur Unterscheidung, ob die gemessene Höhenänderung tatsächlich signifikant ist, oder ob es sich um zufällige Fluktuationen handelt, wird ein minimales Signal zu Rausch Verhältnis von drei vorausgesetzt. Die RMS-Rauschamplitude wird ermittelt indem die Standardabweichung für jeden Punkt der Profile berechnet und über das gesamte Profil gemittelt wird. Wie in den in Abbildung 4.21 dargestellten Daten liegt die effektive Rauschamplitude im Bereich von 40 pm ($\sigma_{offen} = 41 \pm 18 \text{ pm}$ bzw. $\sigma_{offen} = 37 \pm 23 \text{ pm}$). Daraus lässt sich ein Schaltschwellwert von 120 pm ableiten. Höhenänderungen unterhalb dieser Schwelle werden insofern nicht als Konformationsänderung interpretiert. In Abbildung 4.21 sind horizontale Höhenprofile des in Abbildung 4.20b markierten Moleküls dargestellt, jeweils drei vor (blau) und drei nach (rot) der UV-Exposition. Deutlich ist der Unterschied in der Höhe des Moleküls zu erkennen. Die mittlere Höhendifferenz zwischen offener und geschlossener Form des Calixarens beträgt $\Delta \bar{h} = 182 \pm 42 \text{ pm}$. Die gemessene Höhendifferenz ist zwar klein, korreliert aber eindeutig mit der UV-Beleuchtung. Insofern ist die Konformationsänderung der Calixarene eine schlüssige Erklärung für dieses Phänomen. In Abbildung 4.22 sind gemittelte Höhenprofile weiterer „schaltender“ und auch „nicht schaltender“ Calixarene dargestellt. Auch hier liegen die Höhendifferenzen im Bereich von 200 pm . Insgesamt sind auf sechs

Proben 49 Moleküle ausgewertet worden. Davon zeigten 18 signifikant eine signifikant größere Höhe nach der UV-Beleuchtung. Die mittlere Änderung der Höhe beträgt dabei $\Delta\bar{h} = 221 \pm 43 \text{ pm}$.

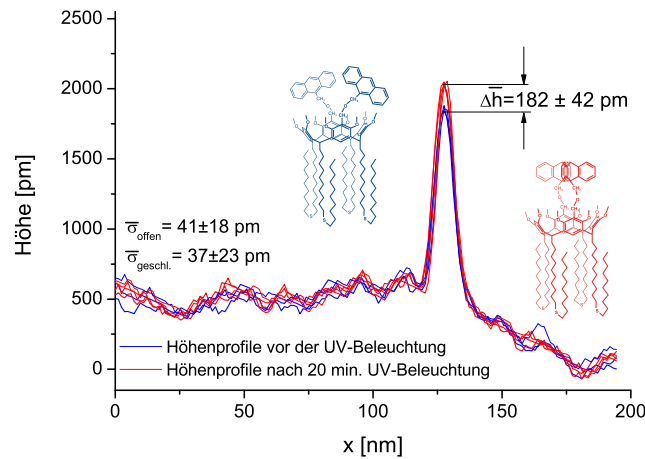


Abbildung 4.21: Höhenprofile des in Abbildung 4.20b markierten Calixarens vor und nach der UV-Beleuchtung.

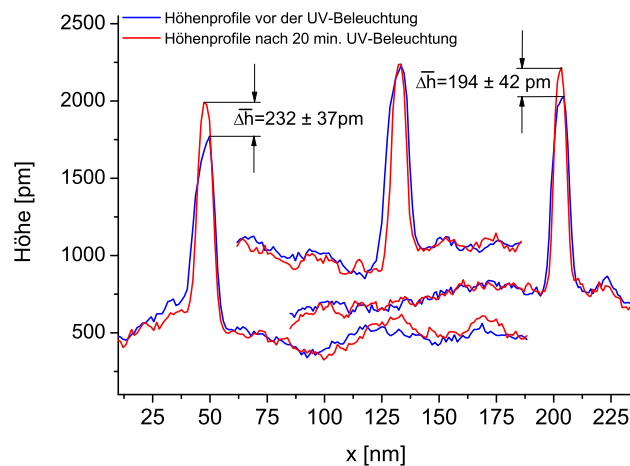


Abbildung 4.22: Höhenprofile „photoschaltender“ und „nicht photoschaltender“ Calixarene. Die Profile sind zur besseren Übersicht vertikal gegeneinander verschoben.

4.2.4 Diskussion Calixarene

Dynamische Kraftspektroskopie

In dynamischen Kraftspektroskopie-Experimenten wurden die thermodynamischen Dissoziationsraten k_{off}^0 und die Dissoziationslängen x_β von Anthracen modifizierten Calixarenen und zwei verschiedenen Liganden ermittelt. Die Dissoziationslängen für Ammonium Liganden sind nach der Standard-Theorie $x_\beta = 0,265 \pm 0,059$ bzw. $x_\beta = 0,148 \pm 0,006$ nach dem HBM-Ansatz. Für Trimethylammonium ergibt sich analog $x_\beta = 0,422 \pm 0,082$ bzw. $x_\beta = 0,324 \pm 0,016$. Vergleicht man diese Werte mit den berechneten van-der-Waals Durchmessern von Ammonium ($0,3 \text{ nm}$) und Trimethylammonium ($0,6 \text{ nm}$) [108], erhält man eine grobe Abschätzung wie tief der Ligand in Rezeptortasche bindet. Weiterhin sind die Ergebnisse konsistent mit früheren Messungen an Calixarenen, deren oberer Rand nicht modifiziert wurde [31].

Für den Vergleich mit ähnlichen Rezeptor-Ligand-Komplexen lässt sich die Bindungsenergie der hier verwandten Systeme mit Hilfe einer abgeschätzten Dissoziationskonstanten $K_D = \frac{k_{off}^0}{k_{on}^0}$ berechnen. Für Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen wird K_D durch die thermodynamische Dissoziationsrate k_{off}^0 dominiert [113]. Für eine diffusionslimitierte Assoziation ist $k_{on}^0 = 10^5 M^{-1} s^{-1}$ ein typischer Wert [112, 113]. Damit ergibt sich für den Ammoniumliganden $K_D = 5,4 \cdot 10^{-6} M$ nach der Standard-Theorie bzw. $K_D = 4,2 \cdot 10^{-6} M$ nach dem HBM-Ansatz. Für Trimethylammonium ergeben sich analog $K_D = 9 \cdot 10^{-7} M$ bzw. $K_D = 2,2 \cdot 10^{-6} M$. Mit der Gibbschen freien Energie $\Delta G^0 = RT \ln K_D$ kann die Bindungsenergie der verschiedenen Komplexe berechnet werden: Damit ergibt sich $\Delta G^0 = -30,0 kJ mol^{-1}$ (Standard-Theorie) bzw. $\Delta G^0 = -30,7 kJ mol^{-1}$ (HBM) für Ammonium und analog $\Delta G^0 = -34,5 kJ mol^{-1}$ bzw. $\Delta G^0 = -32,3 kJ mol^{-1}$ für Trimethylammonium. Diese Bindungsenergien korrespondieren sehr gut mit Werten, wie sie für Cyclodextrine [6] oder wasserlöslichen Kavitanden [60] ermittelt wurden.

Der Vergleich zwischen Standard-Theorie und HBM-Ansatz zeigt, dass beide Modelle konsistente Ergebnisse liefern. Die Verteilungen der Abrisskräfte werden jedoch durch den HBM-Ansatz für große Kräfte jenseits des Maximums wesentlich besser modelliert als durch die nach der Standard-Theorie benutzten Normalverteilung. Ferner fallen die Fehler des HBM-Ansatzes tendenziell kleiner aus.

Topografische AFM-Scans

Durch die topografischen AFM-Scans ist es gelungen die beiden Isoformen des Calixarens vor und nach der UV-Exposition anhand der Molekülhöhe zu unterscheiden. Der durch die Dimerisierung der Anthracene bedingte Höhenzuwachs von $221 \pm 43 \text{ pm}$ kann auf den ersten Blick zu klein erscheinen: Die Länge der kürzeren Achse des Anthracens liegt bei etwa 280 pm [1]. Dazu kommt noch die Dimehtylether-Gruppe, durch die das Anthracen an den oberen Rand des Calixarens gebunden ist. Betrachtet man jedoch die Größenverhältnisse von Sensorspitze und Rezeptormolekül wie sie in Abbildung 4.23 dargestellt sind, wird deutlich, dass die Anthracengruppen auch in der offenen Konformation einen wesentlichen Anteil an der messbaren Molekülhöhe haben müssen.

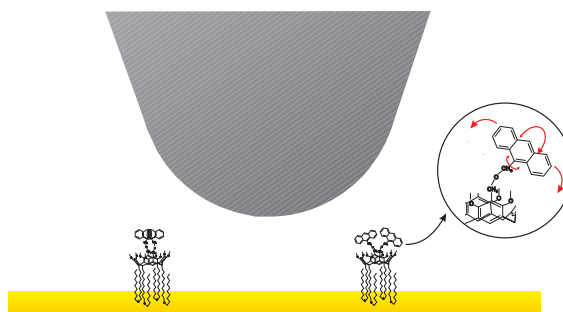


Abbildung 4.23: Maßstabgetreue Darstellung von Calixarenen und einer AFM Spitze mit einem Spitzenradius von 5 nm .

Allerdings können sie wegen der im Vergleich zum geschlossenen Molekül größeren Anzahl an Bewegungsfreiheitsgraden, der Sensorspitze weniger Widerstand entgegenbringen. Insofern ist der gemessene Höhenzuwachs des geschlossenen Calixarens im Wesentlichen durch eine Vergrößerung der Rigidität des Moleküls verursacht durch eine Einschränkung der Bewegungsfreiheitsgrade bedingt.

Der geringe Anteil geschalteter Moleküle hat wohl mehrere Gründe. Einerseits ist die Intensität des eingestrahelten Lichtes sehr gering. Die Umstellung auf einen UV-Laser kann sicher zu einer größeren Schaltwahrscheinlichkeit führen. Zudem werden die Moleküle unter Umgebungsbedingungen bestrahlt, was zur Folge hat, dass neben den Anthracendimeren unerwünschte Nebenprodukte entstehen (siehe Kapitel 2.3), die ein Photoschalten nicht mehr zulassen. Beabsichtigt man die Rezeptoren viele mehrere Male zu schalten, sollten diese Messungen entweder in einem entgastem organischen Lösungsmittel oder

unter Schutzgas z.B. Argon durchgeführt werden. Die AFM-Scans von diesem Vorgang sind mit dem verwendeten Aufbau jedoch nicht ohne weiteres möglich: Das Erwärmen der Probe während des Scans führt zu thermischen Drifteffekten, die bereits bei einer Temperaturerhöhung von etwa 10°C größer sind als der Stellbereich des z-Piezos. AFMs mit positionsgeregelten Piezostellelementen und großem Stellbereich können hier Abhilfe schaffen. Ferner sollten diese Messungen in einem entgasten, organischen Lösungsmittel stattfinden, was eine temperaturstabile, UV-transparente Flüssigmesszelle voraussetzt.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden Nahfeld-Wechselwirkungen zwischen einem Gold beschichteten Sensor und einzelnen Quantendots sowie ein optisch schaltbares supramolekulares Rezeptormolekül untersucht. Für die meisten der hier präsentierten Messungen kam ein neu entwickeltes Rasterkraftmikroskop mit evaneszenter Probenbeleuchtung und Fluoreszenzdetektion zum Einsatz. In diesem Kapitel sollen die Ergebnisse resümiert und ein kurzer Ausblick gegeben werden.

Die externe Kontrolle der Fluoreszenzemission von einzelnen Quantendots wird im ersten Teil von Kapitel 4 demonstriert. Abstandsabhängige Energietransfer-Effekte wie Fluoreszenzdämpfung und Elektronentransfer zwischen einem angeregten Fluorophor und einem nanoskopischen Goldfilm haben einen messbaren Einfluss auf die Fluoreszenzintensität. Durch die alternierende Variation des Abstandes einer Gold beschichteten Sensorspitze zu einem einzelnen Quantendot konnte dessen Fluoreszenzemission reversibel vom emittierenden in den dunklen Zustand „geschaltet“ werden. Die Piezo-Stellelemente des AFM ermöglichen den Abstand zwischen Sensor und Fluorophor mit Sub-Nanometer-Auflösung einzustellen, wodurch die Abstandsabhängigkeit der Fluoreszenzemission gemessen werden konnte.

Durch MDP-Simulationen war es möglich die beobachteten Phänomene prinzipiell zu modellieren. Die separate Betrachtung von Anregungsrate Γ_{exc} und Quanteneffizienz Q ermöglichte es, die Beiträge von strahlungslosem Energietransfer, Fluoreszenzverstärkung durch Exziton-Plasmon-Kopplung oder der lokalen Verstärkung des externen Feldes durch Oberflächenplasmonen aufzuschlüsseln.

Im zweiten Teil von Kapitel 4 werden die Ergebnisse von SMFS-Experimenten an photoschaltbaren Resorc[4]arenen präsentiert. Die thermodynamische Dissoziationsrate k_{off} und die Dissoziationslänge x_{β} konnten für zwei verschiedene Liganden bestimmt werden. Dabei wurden die experimentellen Daten nach zwei verschiedenen Verfahren ausgewer-

tet. Die Ergebnisse sind, unabhängig von der verwendeten Auswertung, konsistent mit vorangegangenen Messungen. Diese wurden an nicht photoschaltbar modifizierten Calixarenen und anderen vergleichbaren Systemen durchgeführt.

Die Auswertung nach dem HBM-Ansatz zeigte einige Vorteile gegenüber der Standard-Theorie: Die Verteilungen der Dissoziationskräfte werden besser modelliert und die Fehler der Abschätzung von Dissoziationslänge und Dissoziationsrate sind für gleiche Datensätze meistens kleiner als bei der Standard-Theorie.

Die Spezifität der Bindung konnte für den Trimethylammonium-Liganden im Konkurrenzexperiment nachgewiesen werden. Die mit dem licht- bzw. wärmeinduzierten Konformationswechsel des Rezeptors einhergehende Änderung der Affinität wurde kraftspektroskopisch demonstriert. Ferner konnte durch topografische AFM Messungen das Schließen des Rezeptors durch eine Vergrößerung der Molekülhöhe nachgewiesen und quantifiziert werden.

Photoschaltbare Resorcarene bieten durch die vielfältige chemische Modifizierbarkeit ein großes Potential für zukünftige Experimente: So könnten die hier verwendeten photoschaltbaren Calixarene als molekulare Pinzetten verwendet werden: Die Dissoziation eines gebundenen Liganden sollte durch „verschließen“ des Rezeptors erschwert oder gar verhindert werden können. Ebenso erscheint es möglich, photoschaltbare Calixarene als molekulare Datenspeicher zu verwenden. Selbstassemblierte Monolagen können optisch „beschrieben“ mittels AFM (kraftspektroskopisch oder topografisch) ausgelesen sowie durch Erwärmung „gelöscht“ werden.

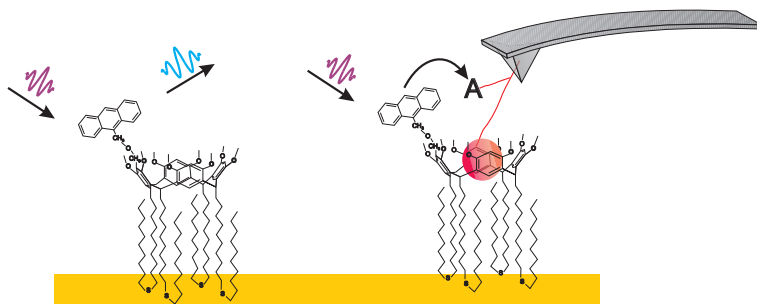


Abbildung 5.1: Identifikation einer spezifischen Bindung durch den lokalen Energietransfer zwischen der angeregten Anthracen-Gruppe des Rezeptors auf einen nahe des Liganden befindlichen Akzeptor A

Weiterhin ist auch dynamische Kraftspektroskopie mit Fluoreszenz-Feedback denkbar (Abbildung 5.1): Einfach Anthracen modifizierte Calixarene können als fluoreszenzmar-

kierte Rezeptoren dienen. Durch entsprechend modifizierte Liganden kann Fluoreszenz-
quenching oder FRET den Komplex anzeigen. So könnten einerseits spezifische Bindung
identifiziert werden. Außerdem ist es denkbar alternative Bindungsdomänen für komplexe
Systeme zu identifizieren. Zudem hat man bereits vor der kraftinduzierten Dissoziation
des Komplexes die Information, ob ein Ligand an den Rezeptor gebunden hat. Für aus-
reichend langlebige Bindungen eröffnet das die Möglichkeit, weitere Manipulation am
Komplex vorzunehmen.

Am Beispiel der Calixarene wird jedoch auch deutlich, dass den Substraten in Zukunft
verstärkte Aufmerksamkeit geschenkt werden muss. Die Immobilisierung auf Gold ist
nicht optimal für derartige kombinierte Experimente. Die Calixarene müssten am unteren
Rand chemisch entsprechend modifiziert werden, um eine Immobilisierung auf Glas zu
ermöglichen. Eine Alternative dazu könnten jedoch *photonische* Substrate sein [88]. Die
MDP-Simulationen haben gezeigt, dass die Fluoreszenzemission eines Farbstoffes stark
von der Geometrie des jeweiligen Quenchers abhängt. In der Nähe von sehr scharfen
Goldspitzen können die Verstärkung des externen Feldes und Dipol-Dipol-Kopplung die
Fluoreszenzdämpfung überwiegen. Insofern könnten dünne, strukturierte Goldfilme als
Substrate dienen. MDP-Simulationen sind hier sicher hilfreich. Voraussetzung ist jedoch
eine Erweiterung der Software auf echt dreidimensionale Geometrien. Für derartige Mo-
delle wachsen jedoch auch die Anforderungen an die Hardware. Komplexe Systeme mit
mehreren Grenzflächen verlangen leicht mehr als ein Terabyte Arbeitsspeicher und ent-
sprechend leistungsfähige Prozessoren. Geschicktes Reduzieren der Grenzflächen, Aus-
nutzen von Spiegelsymmetrien und Beschränkung auf kleine, dreidimensionale Geome-
trien kann den Speicherbedarf jedoch auf etwa 100 Gigabyte sinken lassen. Dies erscheint
in den nächsten Jahren durchaus erreichbar zu sein.

Die Fülle der sich eröffnenden Möglichkeiten macht deutlich, dass eine Kombination
von Rasterkraftmikroskopie und Photonik eine Vielzahl neuartiger experimenteller An-
sätze ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nur ein vergleichsweise kleiner Aus-
schnitt beleuchtet werden. Trotz, oder gerade wegen der anstehenden Herausforderungen
erscheint es sicher, dass dieses Thema in den nächsten Jahren faszinierende Ergebnisse
hervorbringen wird.

Glossar

AFM Atomic Force Microscope. 3–5, 11, 33–35, 37, 44–46, 53, 59, 79, 81, 87

APTES 3-Aminopropyltriethoxysilan. 39

DSP Digitaler Signal Prozessor. 45

FEM Finite Elemente Methode. 27

FIM Finite Integral Methode. 27

FRET Fluorescence Resonant Energy Transfer. 1, 2, 24, 88

GUI Graphical User Interface. 46

HBM Heterogeneous Bond Model. 11, 51, 53, 77

IC Intersystem Crossing. 17

MDP Multiple Dipol. 2, 27, 54, 66, 87, 89

MMP Multiple Multipole. 27

OBD Optical Beam Deflection. 4

PEG Polyethylenglycol. 39

PSD Power Spectral Density. 40

RMS Root Mean Square. 51, 53, 82

ROI Region Of Interest. 53, 54

SFA Surface Force Apparatus. 5

SFM Scanning Force Microscopy. 2

SICM Scanning Ion Conductance Microscope. 3

SMFS Single Molecule Force Spectroscopy. 4, 5, 8, 87

SNOM Scanning Nearfield Optical Microscope. 3

SPM Scanning Probe Microscope. 2

SPR Surface Plasmon Resonance. 6

STM Scanning Tunneling Microscope. 4

tif Tagged Image File. 49

TIRFM Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. 16

TSG Template Stripped Gold. 42, 44, 53, 79–81

Literaturverzeichnis

- [1] F. R. Ahmed and D. W. J. Cruickshank. A refinement of the crystal and molecular structures of naphthalene and anthracene. *Acta Crystallographica*, 5:852–853, 1952.

- [2] A. P. Alivisatos. Perspectives on the physical chemistry of semiconductor nanocrystals. *The Journal of Physical Chemistry*, 100:13226–13239, 1996.

- [3] P. Anger, P. Bharadwaj, and L. Novotny. Enhancement and quenching of single-molecule fluorescence. *Phys.Rev.Lett.*, 96:113002–1–113002–4, 2006.

- [4] S. Arrhenius. Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. *Zeitschrift f. Phys. Chemie*, 4:226–248, 1889.

- [5] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, and T. Yamane. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature*, 330(6150):769–771, 1987.

- [6] Tommaso Auletta, Menno R de Jong, Alart Mulder, Frank C J M van Veggel, Jurriaan Huskens, David N Reinhoudt, Shan Zou, Szczepan Zapotoczny, Holger Schönherr, G. Julius Vancso, and Laurens Kuipers. Beta-cyclodextrin host-guest complexes probed under thermodynamic equilibrium: thermodynamics and afm force spectroscopy. *J Am Chem Soc*, 126(5):1577–1584, Feb 2004.

- [7] D. Axelrod, N. L. Thompson, and T. P. Burghardt. Total internal inflection fluorescent microscopy. *J Microsc*, 129(Pt 1):19–28, Jan 1983.
- [8] F. W. Bartels. *Kraftspektroskopische Bindungsstudien an einzelnen Protein-DNA-Komplexen*. PhD thesis, Bielefeld University, 2005.
- [9] W. Bücking and T. Nann. Electrophoretic analysis of gold nanoparticles: size-dependent electrophoretic mobility of nanoparticles. *IEE Proc Nanobiotechnol*, 153(3):47–53, Jun 2006.
- [10] G. I. Bell. Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science*, 200(4342):618–627, May 1978.
- [11] V. Böhmer. Calixarene - Makrocyclen mit (fast) unbegrenzten Möglichkeiten. *Angewandte Chemie*, 107:785–818, 1995.
- [12] G. Binnig, C.F. Quate, and C. Gerber. Atomic force microscope. *Phys.Rev.Lett.*, 56:930–933, 1986.
- [13] G. Binnig, H. Rohrer, Ch. Gerber, and E. Weibel. Tunneling through a controllable vacuum gap. *Applied Physics Letters*, 40:178–180, 1982.
- [14] G. Binnig [sic], H. Rohrer, Ch. Gerber, and E. Weibel. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Physical Review Letters*, 49:57–61, 1982.
- [15] S. A. Blanton, M. A. Hines, and P. Guyot-Sionnesta. Photoluminescence wandering in single cdse nanocrystals. *Applied Physics Letters*, 69:3905–3907, 1996.

- [16] Boisen, Thaysen, Jensenius, and Hansen. Environmental sensors based on micro-machined cantilevers with integrated read-out. *Ultramicroscopy*, 82(1-4):11–16, Feb 2000.
- [17] Max Born and Emil Wolf. *Principles of optics*. Pergamon Press, Oxford [u.a.], 1980.
- [18] Elena [Hrsg.] Borovitskaya. *Quantum dots*. Selected topics in electronics and systems ; 25. World Scientific, 2002.
- [19] H. Bouas-Laurent, A. Castellan, J. P. Desvergne, and R. Lapouyadec. Photodimerization of anthracenes in fluid solution: structural aspects. *Chemical Society Reviews*, 29:43–55, 2000.
- [20] F. Bretthauer. *Photoschaltbare Azobenzol-modifizierte selbstorganisierte Monoschichten auf Gold(111)-Oberflächen*. PhD thesis, Universität Kassel, 2007.
- [21] R. Brown. A brief account of microscopical observations made in the months of june, july and august, 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies. *Phil. Mag.*, 4:161–173, 1828.
- [22] R. Brown. On the organs and mode of fecundation of orchidex and asclepiadea. *Miscellaneous Botanical Works*, 1:511–514, 1866.
- [23] C. Bustamante, J. C. Macosko, and G. J. Wuite. Grabbing the cat by the tail: manipulating molecules one by one. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1(2):130–136, Nov 2000.

- [24] O. Cavalleri, C. Natale, M. E. Stroppolo, A. Relini, E. Cosulich, S. Thea, M. Novie, and A. Gliozziab. Azurin immobilisation on thiol covered au(111). *Physcal Chemistry, Chemical Physics*, 2:4630?4635, 2000.
- [25] Dmitriy M Chudakov, Vladislav V Verkhusha, Dmitry B Staroverov, Ekaterina A Souslova, Sergey Lukyanov, and Konstantin A Lukyanov. Photoswitchable cyan fluorescent protein for protein tracking. *Nat Biotechnol*, 22(11):1435–1439, Nov 2004.
- [26] J. P. Cleveland, S. Manne, D. Bocek, and P. K. Hansma. A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy. *Rev Sci Instrum*, 64:403–405, 1993.
- [27] Richard J. [Hrsg.] Colton. *Procedures in scanning probe microscopies*. Wiley, Chichester [u.a.], 1999.
- [28] W. Denk, J.H. Strickler, and W.W. Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248:73–76, 1990.
- [29] Marcus Dyba and Stefan W Hell. Focal spots of size $\lambda/23$ open up far-field fluorescence microscopy at 33 nm axial resolution. *Phys Rev Lett*, 88(16):163901, Apr 2002.
- [30] R. Eckel, V. Walhorn, C. Pelargus, J. Martini, J. Enderlein, T. Nann, D. Anselmetti, and R. Ros. Fluorescence-emission control of single cdse nanocrystals using gold-modified afm tips. *Small*, 3:44–49, 2007.
- [31] R. Eckel, V. Walhorn, C. Pelargus, R. Ros, and D. Anselmetti, editors. *Combined TIRF-AFM setup: controlled quenching of individual quantum dots*, volume 6092. Spie, 2006.

- [32] Rainer Eckel, Robert Ros, Björn Decker, Jochen Mattay, and Dario Anselmetti. Supramolecular chemistry at the single-molecule level. *Angew Chem Int Ed Engl*, 44(3):484–488, Jan 2005.
- [33] M. Ehrenberg. The crystal structure of di-para-anthracene. *Acta Crystallographica*, 20:177–182, 1966.
- [34] Einstein. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen der Physik*, 322:549–560, 1905.
- [35] A.I. Ekimov, Al.L Efros, and A.A. Onushchenko. Quantum size effect in semiconductor microcrystals. *Solid State Communications*, 56:921–924, 1985.
- [36] J. Enderlein. A theoretical investigation of single-molecule fluorescence detection on thin metallic layers. *Biophys J*, 78(4):2151–2158, Apr 2000.
- [37] E. Evans. Probing the relation between force–lifetime–and chemistry in single molecular bonds. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 30:105–128, 2001.
- [38] E. Evans, D. Berk, and A. Leung. Detachment of agglutinin-bonded red blood cells. i. forces to rupture molecular-point attachments. *Biophys J*, 59(4):838–848, Apr 1991.
- [39] E. Evans and K. Ritchie. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys J*, 72(4):1541–1555, Apr 1997.
- [40] E. Evans, K. Ritchie, and R. Merkel. Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces. *Biophys J*, 68(6):2580–2587, Jun 1995.

- [41] Mykhaylo Evstigneev and Peter Reimann. Dynamic force spectroscopy: optimized data analysis. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 68(4 Pt 2):045103, Oct 2003.
- [42] H. Eyring. The activated complex in chemical reactions. *The Journal of Chemical Physics*, 3:107–115, 1935.
- [43] H. G. Frey. *Eine hochauflösende optische Nahfeld-Sonde für Fluoreszenzmessungen an biologischen Proben*. PhD thesis, TU München, 2004.
- [44] H. G. Frey, C. Bolwien, A. Brandenburg, R. Ros, and D. Anselmetti. Optimized apertureless optical near-field probes with 15nm optical resolution. *Nanotechnology*, 17:3105–3110, 2006.
- [45] J. Fritzsche. Sur les hydrocarbures solides du gondron de houille. *Bulletin de l'Académie impériale des sciences de St.-Petersbourg*, 9:406–419, 1866.
- [46] T. Förster. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 437:55–75, 1948.
- [47] A. Fuhrmann. Single molecule force spectroscopy on protein-nucleic acid-complexes. Master's thesis, Bielefeld University, 2006.
- [48] Alexander Fuhrmann, Dario Anselmetti, Robert Ros, Sebastian Getfert, and Peter Reimann. Refined procedure of evaluating experimental single-molecule force spectroscopy data. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 77(3 Pt 1):031912, Mar 2008.

- [49] Alexander Gaiduk, Ralf Kühnemuth, Matthew Antonik, and Claus A M Seidel. Optical characteristics of atomic force microscopy tips for single-molecule fluorescence applications. *Chemphyschem*, 6(5):976–983, May 2005.
- [50] S. V. Gaponenko. *Optical Properties of Semiconductor Nanocrystals*. Cambridge University Press, 1998.
- [51] Sebastian Getfert and Peter Reimann. Optimal evaluation of single-molecule force spectroscopy experiments. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 76(5 Pt 1):052901, Nov 2007.
- [52] C. T. Gibson, G. S. Watson, and S. Myhra. Determination of the spring constants of probes for force microscopy/spectroscopy. *Nanotechnology*, 7:259–262, 1996.
- [53] Christopher T Gibson, Brandon L Weeks, Chris Abell, Trevor Rayment, and Sverre Myhra. Calibration of afm cantilever spring constants. *Ultramicroscopy*, 97(1-4):113–118, 2003.
- [54] Gotszalk, Grabiec, and Rangelow. Piezoresistive sensors for scanning probe microscopy. *Ultramicroscopy*, 82(1-4):39–48, Feb 2000.
- [55] M. Gu and P. C. Ke. Image enhancement in near-field scanning optical microscopy with laser-trapped metallic particles. *Opt Lett*, 24(2):74–76, Jan 1999.
- [56] M. G. Gustafsson. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc*, 198(Pt 2):82–87, May 2000.
- [57] Carl David Gutsche. *Calixarenes*. Monographs in supramolecular chemistry ; 1. Royal Soc. of Chemistry, 1989.

- [58] Satoshi Habuchi, Ryoko Ando, Peter Dedecker, Wendy Verheijen, Hideaki Mizuno, Atsushi Miyawaki, and Johan Hofkens. Reversible single-molecule photoswitching in the gfp-like fluorescent protein dronpa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(27):9511–9516, Jul 2005.
- [59] Ch. Hafner. Die MMP Methode. *Electrical Engineering (Archiv für Elektrotechnik)*, 5:321–325, 1986.
- [60] Haino, Rudkevich, Shivanyuk, Rissanen, and Rebek. Induced-fit molecular recognition with water-soluble cavitands. *Chemistry*, 6(20):3797–3805, Oct 2000.
- [61] P. K. Hansma, J. P. Cleveland, M. Rademacher, D. A. Walters, P. E. Hillner, M. Bezuanilla, M. Fritz, G. H. Hansma D. Vie, C. B. Prater, J. Massie, L. Fukunaga, J. Gurvey, and V. Elings. Tapping mode atomic force microscopy in liquids. *Applied Physics Letters*, 64:1738–1740, 1994.
- [62] P. K. Hansma, B. Drake, O. Marti, S. A. Gould, and C. B. Prater. The scanning ion-conductance microscope. *Science*, 243(4891):641–643, Feb 1989.
- [63] M. Hegner, P. Wagner, and G. Semenza. Ultralarge atomically flat template-stripped Au surfaces for scanning probe microscopy. *Surface Science*, 291:39–46, 1993.
- [64] A. Henglein. *Mechanism of reactions on colloidal microelectrodes and size quantization effects*, volume 143. Springer Berlin / Heidelberg, 1988.
- [65] Brian Herman. *Fluorescence microscopy*. Microscopy handbooks ; 40. BIOS Scientific, 1998.
- [66] Robert Hooke. *Micrographia*. Culture et Civilisation, Bruxelles, 1966.

- [67] Edmund Hoppe. *Geschichte der Optik*. Saendig, Wiesbaden, 1967.
- [68] Thorsten Hugel, Nolan B Holland, Anna Cattani, Luis Moroder, Markus Seitz, and Hermann E Gaub. Single-molecule optomechanical cycle. *Science*, 296(5570):1103–1106, May 2002.
- [69] J. L. Hutter and J. Bechhoefer. Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev Sci Instrum*, 7:1868–1873, 1993.
- [70] J.N. Israelachvili. *Intermolecular and surface forces*. Acad. Press, 2 edition, 2000.
- [71] J. E. Bowen Katari, V. L. Colvin, and A. P. Alivisatos. X-ray photoelectron spectroscopy of cdse nanocrystals with applications to studies of the nanocrystal surface. *The Journal of Physical Chemistry*, 98:4109–4117, 1994.
- [72] Charles Kittel and Siegfried [Bearb.] Hunklinger. *Einführung in die Festkörperphysik*. Oldenbourg, München [u.a.], 2006.
- [73] M. Knoll and E. Ruska. Das Elektronenmikroskop. *Zeitschrift für Physik A*, 78:318–339, 1932.
- [74] F. Koberling, A. Mews, and T. Basche. Oxygen-induced blinking of single cdse nanocrystals. *Advanced Materials*, 13:672–676, 2001.
- [75] H. A. Kramers. Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions. *Physica*, 7:284–304, 1940.
- [76] E. Kretschmann and H. Raether. Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light. *Zeitschrift für Naturforschung*, 68a:2135–2136, 1968.

- [77] Joseph R. Lakowicz. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer, New York, NY, 2006.
- [78] H. Lehmann. Das Luminszenz-Mikroskop seine Grundlagen und Anwendungen. *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und mikroskopische Technik*, 30:417–440, 1913.
- [79] David R. Lide and Phd Frederikse H. P. R., editors. *CRC handbook of chemistry and physics*, volume 77. Robert C. Weast, 1996.
- [80] David C. Lindberg. *Auge und Licht im Mittelalter*. Suhrkamp, Frankfurt am Main, 1987.
- [81] B. Lounis and W. E. Moerner. Single photons on demand from a single molecule at room temperature. *Nature*, 407(6803):491–493, Sep 2000.
- [82] J. C. Ma and D. A. Dougherty. The cation- π interaction. *Chemical Reviews*, 97:1303–1323, 1997.
- [83] J. Martini. Aufbau eines rasterkraftmikroskopes für kleine cantilever. Master's thesis, Universität Bielefeld, 2003.
- [84] C. Martín, G. Rius, X. Borrísé, and F. Pérez-Murano. Nanolithography on thin layers of pmma using atomic force microscopy. *Nanotechnology*, 16:1016–1022, 2000.
- [85] Edoardo Menozzi, Roberta Pinalli, Emiel A Speets, Bart Jan Ravoo, Enrico Dalcanele, and David N Reinhoudt. Surface-confined single molecules: assembly and disassembly of nanosize coordination cages on gold (111). *Chemistry*, 10(9):2199–2206, May 2004.

- [86] R. Merkel. Force spectroscopy on single passive biomolecules and single biomolecular bonds. *Physics Reports*, 346:343–385, 2001.
- [87] G. Meyer and N. M. Amer. Novel optical approach to atomic force microscopy. *Applied Physics Letters*, 53:1045–1047, 1988.
- [88] P. Mühlischlegel, H-J. Eisler, O. J F Martin, B. Hecht, and D. W. Pohl. Resonant optical antennas. *Science*, 308(5728):1607–1609, Jun 2005.
- [89] M. Minsky. Microscopy apparatus, 1961. USA Patent No. 3,013,467; 1961.
- [90] Julia Morfill, Kerstin Blank, Christian Zahnd, Beatrice Luginbühl, Ferdinand Kühner, Kay-E. Gottschalk, Andreas Plückthun, and Hermann E Gaub. Affinity-matured recombinant antibody fragments analyzed by single-molecule force spectroscopy. *Biophys J*, 93(10):3583–3590, Nov 2007.
- [91] C. B. Murray, D. J. Norris, and M. G. Bawendi. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites. *Journal of the American Chemical Society*, 115:8706–8715, 1993.
- [92] Arup Neogi, Hadis Morkoç, Takamasa Kuroda, and Atsushi Tackeuchi. Coupling of spontaneous emission from gan-aln quantum dots into silver surface plasmons. *Opt Lett*, 30(1):93–95, Jan 2005.
- [93] J. M. Neumeister and W. A. Ducker. Lateral, normal and longitudinal spring constants of atomic force microscopy cantilevers. *Rev Sci Instrum*, 64:2527–2531, 1994.
- [94] M. Nguyen-Duong, K. W. Koch, and R. Merkel. Surface anchoring reduces the lifetime of single specific bonds. *Europhys. Lett.*, 61:845–851, 2003.

- [95] Claude Nogues and Meni Wanunu. A rapid approach to reproducible, atomically flat gold films on mica. *Surface Science Letters*, 573:383–389, 2004.
- [96] Lukas Novotny and Bert Hecht. *Principles of nano-optics*. Cambridge Univ. Press, Cambridge [u.a.], 2006.
- [97] M. Oheim and F. Schapper. Non-linear evanescent-field imaging. *Journal of Physics D*, 38:R185–R197, 2005.
- [98] Biow Hiem Ong, Xiaocong Yuan, Yong Yi Tan, Rudi Irawan, Xiaoqin Fang, Lesheng Zhang, and Swee Chuan Tjin. Two-layered metallic film-induced surface plasmon polariton for fluorescence emission enhancement in on-chip waveguide. *Lab Chip*, 7(4):506–512, Apr 2007.
- [99] A. Otto. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Zeitschrift für Physik A*, 216:398–410, 1968.
- [100] J. Paskarbeit. Cantileverbasierte Nahfeldmikroskopie. Master’s thesis, Universität Bielefeld, 2008.
- [101] Frank L. Pedrotti. *Optik*. Prentice Hall, München [u.a.], 1996.
- [102] D.W. Pohl, W. Denk, and M. Lanz. Optical stethoscopy: Image recording with resolution $\lambda/20$. *Applied Physics Letters*, 44:651, 1984.
- [103] M. Raible, M. Evstigneev, F. W. Bartels, R. Eckel, M. Nguyen-Duong, R. Merkel, R. Ros, D. Anselmetti, and P. Reimann. Theoretical analysis of single-molecule force spectroscopy experiments: heterogeneity of chemical bonds. *Biophys J*, 90(11):3851–3864, Jun 2006.

- [104] M. Raible, M. Evstigneev, P. Reimann, F. W. Bartels, and R. Ros. Theoretical analysis of dynamic force spectroscopy experiments on ligand-receptor complexes. *J Biotechnol*, 112(1-2):13–23, Aug 2004.
- [105] H.P. Rooksby. The colour of selenium ruby glasses. *J. Soc. Glass Tech.*, 16:171, 1932.
- [106] R. Ros, F. Schwesinger, D. Anselmetti, M. Kubon, R. Schäfer, A. Plückthun, and L. Tiefenauer. Antigen binding forces of individually addressed single-chain fv antibody molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(13):7402–7405, Jun 1998.
- [107] Robert Ros, Rainer Eckel, Frank Bartels, Andy Sischka, Birgit Baumgarth, Sven David Wilking, Alfred Pühler, Norbert Sewald, Anke Becker, and Dario Anselmetti. Single molecule force spectroscopy on ligand-dna complexes: from molecular binding mechanisms to biosensor applications. *J Biotechnol*, 112(1-2):5–12, Aug 2004.
- [108] Alexander B Rozhenko, Wolfgang W Schoeller, Matthias C Letzel, Björn Decker, Ceno Agena, and Jochen Mattay. Calixarenes as hosts for ammonium cations: a quantum chemical study and mass-spectrometric investigations. *Chemistry*, 12(35):8995–9000, Dec 2006.
- [109] F. J. Rubio-Sierra, W. M. Heckl, and R. W. Stark. Nanomanipulation by atomic force microscopy. *Advanced Engineering Materials*, 7:193–196, 2005.
- [110] C. Schäfer. *Photoschaltbare Resorc[4]arene*. PhD thesis, Universität Bielefeld, 2007.
- [111] Christian Schäfer, Rainer Eckel, Robert Ros, Jochen Mattay, and Dario Anselmetti. Photochemical single-molecule affinity switch. *J Am Chem Soc*, 129(6):1488–1489, Feb 2007.

- [112] Maximilian Schlosshauer and David Baker. Realistic protein-protein association rates from a simple diffusional model neglecting long-range interactions, free energy barriers, and landscape ruggedness. *Protein Sci*, 13(6):1660–1669, Jun 2004.
- [113] F. Schwesinger, R. Ros, T. Strunz, D. Anselmetti, H. J. Güntherodt, A. Honegger, L. Jermutus, L. Tiefenauer, and A. Pluckthun. Unbinding forces of single antibody-antigen complexes correlate with their thermal dissociation rates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(18):9972–9977, Aug 2000.
- [114] S. B. Smith, L. Finzi, and C. Bustamante. Direct mechanical measurements of the elasticity of single dna molecules by using magnetic beads. *Science*, 258(5085):1122–1126, Nov 1992.
- [115] L. Stryer and R. P. Haugland. Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 58(2):719–726, Aug 1967.
- [116] E. H. Synge. Suggested method for extending microscopic resolution into the ultramicroscopic region. *Phil. Mag.*, 6:356–362, 1928.
- [117] W.G.J.H.M. van Sark, P.L.T.M. Frederix, A.A. Bol, H.C. Gerritsen, and A. Meijerink. Blueing, bleaching, and blinking of single CdSe/ZnS quantum dots. *Chem-PhysChem*, 3:871–879, 2002.
- [118] Eggo U. Thoden van Velzen, Johan F.J. Engbersen, Pieter J. de Lange, Jan W.G. Mahy, and David N. Reinhoudt. Self-assembled monolayers of resorcin[4]arene tetrasulfides on gold. *Journal of the American Chemical Society*, 117:6853–6862, 1995.
- [119] P. Wagner, M. Hegner, H. J. Güntherodt, and G. Semenza. Formation and *in situ* modification of monolayers chemisorbed on ultraflat template-stripped gold surfaces. *Langmuir*, 11:3867–3875, 1995.

- [120] V. Walhorn. Rasterkraftmikroskopie mit kleinen Cantilevern. Master's thesis, Universität Bielefeld, 2004.
- [121] V. Walhorn, O. Schulz, C. Pelargus, D. Anselmetti, and R. Ros, editors. *Impact of metal-modified AFM tips on the fluorescence of single nanocrystals*, volume 6444. Spie, 2007.
- [122] Xiaoyong Wang, Xiaofan Ren, Keith Kahen, Megan A Hahn, Manju Rajeswaran, Sara Maccagnano-Zacher, John Silcox, George E Cragg, Alexander L Efros, and Todd D Krauss. Non-blinking semiconductor nanocrystals. *Nature*, 459(7247):686–689, Jun 2009.
- [123] M. J. Weber. *Handbook of Optical Materials*. Laser and Optical Science and Technology Series. CRC Press, 1rst. edition, 2002.
- [124] M. Wu, J. W. Roberts, and M. Buckley. Three-dimensional fluorescent particle tracking at micron-scale using a single camera. *Experiments in Fluids*, 38:461–465, 2005.
- [125] X. Wu, H. Liu, J. Liu, K. N. Haley, J. A. Treadway, J. P. Larson, N. Ge, F. Peale, and M. P. Bruchez. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol*, 21(1):41–46, Jan 2003.
- [126] Q. Zhong, D. Innissa, K. Kjollerb, and V.B. Elingsb. Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy. *Surface Science Letters*, 290:L688–L692, 1993.

Danksagung

Die Naturwissenschaften sind komplex und übersteigen die Fähigkeiten eines Einzelnen. Deshalb möchte ich an dieser Stelle allen danken, die ihren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben.

Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti danke ich für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Sein Enthusiasmus hat mich stets angespornt eigene Ideen zu entwickeln und zu verfolgen.

Des Weiteren gilt mein Dank Prof. Dr. Andreas Hütten, für die Bereitschaft als Co-Gutachter aufzutreten.

Herr Prof. Dr. Robert Ros hat bis zu seiner Berufung an die Arizona State University diese Arbeit betreut. Er stand mir auch in den USA mit Rat und Hilfestellung zur Seite. Danke für die Skype-Sessions.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Mattay und seinen Mitarbeitern Dr. Christian Schäfer sowie Dipl.-Chem. Tobias Schröder aus der Abteilung *Organische Chemie I* für die Synthese der photoschaltbaren Calixarene, diverser Liganden und die Unterstützung in chemischen Fragen.

Dr. Sebastian Getfert danke ich für die Erläuterung der *Heterogenität der chemischen Bindung* und für das Fitten meiner Daten.

Herrn Prof. Dr. Thomas Nann gebührt Dank für die Bereitstellung der in dieser Arbeit verwendeten Quantendots.

Erste analytische Berechnungen zur externen Fluoreszenzkontrolle hat Prof. Dr. Thomas Enderlein durchgeführt. Sie haben mir gezeigt, dass meine Messergebnisse durchaus Sinn ergeben.

Dr. Heinrich Frey und Dipl.-Phys. Jan Paskarbeit haben es mir durch die Programmierung der Simulationssoftware ermöglicht, meine Modelle zu berechnen und die beobachteten Phänomene zu verstehen.

Durch die geballte Kompetenz der Mitarbeiter der Elektronik-Werkstatt war es möglich, meine Ideen in Leiterbahnen und integrierte Schaltkreise umzusetzen und so den Controller zur Steuerung meines Setups aufzubauen. Allen Mitarbeitern der Mechanischen Werkstatt danke ich für die Mühe meine technischen Zeichnungen zu verstehen und für die Kreuztische aus „U-Boot-Stahl“.

Für die Lösung aller EDV-Probleme und die Assistenz beim Aufbau des TIRF-AFMs danke ich Christoph „Scotty“ Pelargus. Gabi Krome war über all die Zeit der gute Geist im Hintergrund. Carolin und Lukas haben mir beim Lösen meiner L^AT_EX-Probleme stets durch aufmunterndes Achselzucken zur Seite gestanden.

Dominik danke ich für seinen Support am Fluoreszenzspektrometer und das Teilhaben an seinen philosophischen Exkursen. Meinen aktuellen und ehemaligen „Büromitbewohnern“ sowie allen bislang nicht genannten Kollegen der Abteilung *Experimentelle Biophysik und Angewandte Nanowissenschaften* danke ich für die herzliche Arbeitsatmosphäre. Ingo, Jan, Katja, Monika, Robert und Tobias gebührt besonderer Dank für die gleichmütige Korrektur meiner orthografischen Kapriolen. Alle nicht namentlich genannten Freunde können sicher sein, dass ich ihre Nachsicht während der „heißen Phase“ zu schätzen weiß. Meinen Eltern und meinem Bruder danke für den Rückhalt und die vielen Aufmerksamkeiten.

Meine Frau Monika ließ mir während der letzten Jahre ihre ausdauernde Unterstützung zuteil werden. Sie hat es immer wieder verstanden mich in das „echte“ Leben zurückzuholen. Meinem kleinen Sohn Erik danke ich dafür, dass er mir täglich zeigt, wie faszinierend die Natur ist. Ich hoffe, wie er mit offenen Augen und kindlicher Neugier durch das Leben zu gehen.

Anhang

1 Veröffentlichungen

R. Eckel, V. Walhorn, C. Pelargus, R. Ros, D. Anselmetti; *Combined TIRF-AFM setup: controlled quenching of individual quantum dots*, SPIE Proceedings Vol. 6092, 2006.

V. Walhorn, O. Schulz, C. Pelargus, D. Anselmetti, R. Ros *Impact of metal-modified AFM tips on the fluorescence of single nanocrystals*, SPIE Proceedings Vol. 6444, 2007.

R. Eckel, V. Walhorn, C. Pelargus, J. Martini, J. Enderlein, T. Nann, D. Anselmetti, R. Ros; *Fluorescence-Emission Control of Single CdSe Nanocrystals Using Gold-Modified AFM Tips*, Small, 3, 44-49, 2007.

2 Konferenzbeiträge

V. Walhorn, J. Martini, R. Eckel, J. Steen, B. Decker, J. Brugger, J. Mattay, R. Ros, D. Anselmetti; *Force Spectroscopy With a Novel Small Focus AFM*, DPG Frühjahrstagung, Berlin 04.03.-09.03. 2005 (Poster).

V. Walhorn, R. Eckel, C. Pelargus, D. Anselmetti, R. Ros; *Combining AFM and Optical Spectroscopy*, Scanning Probe Microscopies and Organic Materials, München 14.-16.09.2005 (Poster).

V. Walhorn, R. Eckel, C. Pelargus, D. Anselmetti, R. Ros; *A Combined Setup for Single Molecule Manipulation and Optical Spectroscopy*, DPG Frühjahrstagung, Dresden 27.-31.03.2006 (Vortrag).

V. Walhorn, R. Eckel, T. Nann, C. Pelargus, J. Martini, D. Anselmetti, R. Ros; *Controlled Fluorescence Emission of a Single Semiconductor Nanocrystal by a combined AFM/TIRF Setup*, International Conference on Nanoscience + Technology Basel, 30.07.-04.08. 2006 (Vortrag).

V. Walhorn, O. Schulz, H. Frey, C. Pelargus, D. Anselmetti and R. Ros; *Fluorescence-Emission Control of Single CdSe-Nanocrystals using Metal-Modified AFM Tips*, DPG Frühjahrstagung, Regensburg 26.-30.03. 2007 (Poster).

V. Walhorn, R. Eckel, C. Pelargus, D. Anselmetti, R. Ros; *A Combined Setup for Single Molecule Manipulation and Optical Spectroscopy*, Biophysical Society 51th Annual Meeting, Baltimore 03.-07.03. 2007 (Poster).

O. Schulz, V. Walhorn, C. Pelargus, D. Anselmetti, R. Ros; *Methods for attaching individual metallic Nanoparticles on AFM Tips*, DPG Frühjahrstagung, Regensburg 26.-30.03. 2007 (Poster).

M. Lilie, P. Wilhelm, U. Müller, V. Walhorn, R. Ros, D. Anselmetti; *Haftkräfte vs. Ablösende Kräfte - Einsatz der Rasterkraftmikroskopie zur quantitativen Haftkraftmessung von Bacillus spp. Sporen*, ProcessNet-Fachausschusssitzung Lebensmittelverfahrenstechnik, Zürich 15.-16.03.2007 (Poster);

M. Lilie, U. Müller, V. Walhorn, R. Ros, D. Anselmetti, K. Friehs, E. Flaschel; *Haftkraftuntersuchungen an bakteriellen Sporen von Bacillus spp. in Luft und Wasser mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM)*, GDL-Kongress Lebensmitteltechnologie, Hamburg-Harburg 11.-13.10.2007 (Vortrag).

V. Walhorn, C. Schäfer, T. Schröder, J. Mattay, D. Anselmetti; *Reversible Affinity Switching of a Single Supramolecular Receptor Molecule*, DPG Frühjahrstagung, Dresden 22.-27.03. 2009 (Vortrag).