

# Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde  
der  
Fakultät für Physik  
der Universität Bielefeld

vorgelegt von  
Simon Hennig  
geboren in Bielefeld

Bielefeld, August 2012

1. Gutachter: Prof. Dr. Markus Sauer
2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Huser

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine weiteren, als die ausdrücklich erwähnten Hilfsmittel verwendet habe.

Bielefeld, 28. August 2012

---

Simon Hennig





# Anwendungen der Ionenleitfähigkeitsmikroskopie in der Biophysik

Universität Bielefeld  
Fakultät für Physik – Biomolekulare Photonik



# Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird ein kombiniertes Rasterionenleitfähigkeits-/Weitfeldfluoreszenzmikroskop entwickelt. Die Zusammenführung der verschiedenen Techniken erlaubt das Erforschen neuer, unkonventioneller Methoden in der Biophysik. Die Weitfeldfluoreszenzmikroskopie bietet in Kombination mit hochauflösenden Techniken die Möglichkeit, biologische Proben passiv mit Hilfe fluoreszierender Farbstoffe mit bisher ungeahnter Schärfe zu beobachten. Über die Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie (Scanning Ion Conductance Microscopy, SICM) können topographische Informationen von nicht leitenden Proben erhalten werden. Neben der ursprünglichen Verwendung kann das SICM über die funktionalisierte Nanopipette mit einem Öffnungsdurchmesser von 60 nm auch als aktiver Manipulator von weichen Proben eingesetzt werden. Die Kombination von Fluoreszenzmikroskopie und SICM bietet daher vor allem für die Biophysik neue Möglichkeiten der Beobachtung sowie der aktiven Manipulation von Proben auf mikroskopischer Ebene.

Neben dem Aufbau der kombinierten Mikroskope wurde für die SICM Technik eine optimierte Softwareroutine entwickelt, welche die Zeit, die ein SICM benötigt, um topographische Informationen von Proben zu bekommen auf  $2/3$  der ursprünglichen Zeit reduziert.

Für eine aktive Nutzung der Nanopipette wird eine neue Softwaresteuerung entwickelt, die eine Subnanometersteuerung einer Pipette erlaubt. Weiterhin wurden leitende Oberflächen mit einer sehr planen, transparenten Struktur entwickelt, die ein hochpräzises punktförmiges Ablegen von Farbstoffmolekülen mit Hilfe der Nanopipette nahe der Auflösungsgrenze von Fluoreszenzmikroskopen ermöglichten. Des Weiteren bieten die Oberflächen die Vorteile einer mehrfachen Verwendbarkeit und die Möglichkeit die erzeugten Strukturen über die dSTORM Technik unterhalb der Beugungsgrenze aufzulösen.

Neben der Erzeugung fluoreszenter Referenzstrukturen ist eine weitere Anwendung der funktionalisierten Nanopipette das direkte Injizieren von Farbstoffmolekülen und farbstoffbasierten Sonden in lebende Zellen über Elektrophorese. Es wird gezeigt, dass verschiedene Farb-

stoffe in eine Zelle nahezu instantan eingebracht werden können, ohne die Apoptose der Zelle durch den invasiven Vorgang auszulösen. Des Weiteren werden Strukturmarkierungen innerhalb von lebenden Zellen über das Einbringen von Antikörpern und Proteinen die sich an spezifische Strukturen einer Zelle binden, sowie die Beobachtung von dynamischen Prozessen mittels Fluoreszenzmikroskopie in lebenden Zellen gezeigt.

# Abstract

In this work, a combined scanning ion conductance -/widefield fluorescence microscope has been developed. The combination of these two techniques opens the door to new applications in biophysics. Fluorescence microscopy combined with super-resolution imaging techniques allows the user to investigate biological samples with so far unmatched resolution. The SICM technique provides topographic information of non-conducting samples. Additionally, SICM can be an active device. Thereby the functionalized nanopipette can be used to manipulate soft samples actively. The combination of fluorescence microscopy and scanning ion conductance microscopy provides significantly new capabilities in the biosciences for manipulating samples on a microscopic scale.

This work includes the combination of the two microscopy forms and the software improvement of the scanning process for SICM. Thereby the scanning process has been optimized in speed to yield faster topographic images.

Active usage of the nanopipette required the development of a new software package to get sub-nanometer control of the pipette. In addition to that, new surfaces for high precision delivery of fluorophores were created. These thin transparent surfaces provide electrical conductivity, the capability for super-resolution imaging and are flat at the nanometer scale. With these surfaces it is possible to create fluorescent structures near the diffraction limit of optical microscopes which can be resolved by dSTROM.

Beside the generation of fluorescent structures, an additional task is the delivery of dyes as well as dye-functionalized probes to living cells. It can be shown, that the molecules can be delivered nearly instantly to the target cell, without killing the living organism by the penetration of the nanopipette. Further, fluorescence staining of a specific cell structure with antibodies and proteins is shown as well as dynamic processes are observed in living cells.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	<b>5</b>
2.1	Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie . . . . .	5
2.1.1	Funktionsprinzip . . . . .	5
2.1.2	Ionenleitfähigkeit und Silberchlorid-Elektroden in Elektrolytlösungen . . . . .	9
2.1.3	E-Feld und Ionenstrom der Nanopipette . . . . .	11
2.1.4	Phasensensitive Detektion / Lock-In Technik . . . . .	14
2.1.5	Rückkopplungsregelung (Distanzregelungstechnik)	17
2.1.6	Elektromagnetische Störquellen . . . . .	20
2.1.7	Signalwege im Rasterionenleitfähigkeitsmikroskop	21
2.2	Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	24
2.2.1	Prinzipien der Fluoreszenz . . . . .	24
2.2.2	Farbstoffe . . . . .	27
2.2.3	Mikroskopietechniken . . . . .	31
2.3	Raman-Spektroskopie . . . . .	40
2.3.1	Molekülschwingungen . . . . .	40
2.3.2	Spontane Raman-Streuung . . . . .	43
2.3.3	Raman-Spektrometer . . . . .	46
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>49</b>
3.1	Experimentelle Umgebung . . . . .	49
3.2	Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie . . . . .	49
3.2.1	Vorbereitung der Nanopipetten . . . . .	58
3.2.2	Annäherung der Nanopipette an die Oberfläche . . . . .	60
3.2.3	Vorbereitung der Elektroden . . . . .	61
3.3	Weitfeldfluoreszenzmikroskop . . . . .	62
3.4	Raman-Spektroskopie . . . . .	67
3.5	Vorbereitung der Proben . . . . .	69
3.6	Farbstoffe und Antikörper . . . . .	70

## *Inhaltsverzeichnis*

<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>73</b>
4.1	Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie . . . . .	73
4.1.1	Re-Charakterisierung des SICM . . . . .	74
4.1.2	Softwareverbesserung und Verifizierung . . . . .	76
4.1.3	Zelltopographie . . . . .	78
4.2	Hochpräzise Farbstoffablage . . . . .	80
4.2.1	Oberflächen und Ablageprinzip . . . . .	81
4.2.2	Neuentwicklung der Software . . . . .	84
4.2.3	Charakterisierung der Oberflächen mittels Raman- Spektroskopie . . . . .	87
4.2.4	Ablage, Weitfeldmikroskopie und Hochauflösung	92
4.2.5	Haltbarkeit der erzeugten Oberflächen . . . . .	101
4.2.6	Farbstoffablage in Zellen . . . . .	104
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>115</b>
	<b>Abkürzungen</b>	<b>129</b>
	<b>Publikationsverzeichnis</b>	<b>131</b>
	<b>Anhang</b>	<b>133</b>
	Dokumentation der Software für die hochpräzise Farbstoff- ablage . . . . .	133
	<b>Danksagung</b>	<b>141</b>

# 1 Einleitung

## Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie und hochpräzise Farbstoffablage auf Oberflächen

Die Entwicklung des Rasterkraftmikroskops (Atomic Force Microscope, AFM) durch Binnig et al. [Binnig et al., 1986] wurde von dem Gedanken angetrieben, kleinste Details auf Oberflächen sichtbar machen zu können. Dabei wird ein sog. Cantilever mit einer sehr feinen Spitze mit wenigen Nanometern Durchmesser über eine Probe geführt. Über optische Sensoren werden die Kräfte zwischen Spitze und Oberfläche welche sich proportional zum Krümmungsradius des Cantilevers verhalten gemessen. Durch schrittweises Abrastern der Probe entsteht ein topographisches Bild der Oberfläche. Es sind je nach Auslegung und Betriebsmodus des AFM laterale Auflösungen von 0,1-10 nm möglich. Biologische Proben mit ihren weichen Oberflächen stellen dabei eine besondere Herausforderung für ein AFM dar. Das direkte Abrastern von fixierten Zellen führt dabei zu Artefakten in den entstehenden Bildern [Rheinlaender et al., 2011]. Allerdings ist es nur schwer und mit sehr großem Aufwand möglich, topographische Bilder von lebenden Zellen mit einem AFM zu machen [Le Grimmelc et al., 1998, Vié et al., 2000]. Mit der Einführung des Rasterionenleitfähigkeitsmikroskops (Scanning Ion Conductance Microscope, SICM) [Hansma et al., 1989] wurde eine neue Generation der "Scanning Probe Microscopes" (SPM) eingeführt. Hier war es erstmals möglich, direkt topographische Informationen von lebenden Zellen [Korchev et al., 1997] zu erhalten. Mittlerweile ist dies mit einer Präzision von 20 nm lateral möglich [Klenerman et al., 2011, Novak et al., 2009]. Auch können mit Hilfe des SICM Untersuchungen von Zelldynamiken wie die Kontraktion von Herzzellen [Korchev et al., 2000b] realisiert werden. Allgemein können alle nichtleitenden biologischen Proben in annähernd natürlichen Umgebungsbedingungen beobachtet werden. Dabei benutzt das SICM eine hohle Nanopipette mit einem Durchmesser von wenigen Nanometern, welche in einer Elektrolytlösung platziert ist. Durch die Pipette wird ein Ionenstrom geleitet, um eine Abstandsabhängigkeit zwischen Ober-

## 1 Einleitung

fläche der Probe und Pipettenspitze zu generieren. Die Probe wird so auf eine nichtinvasive Art und Weise in einem konstanten Abstand von typischerweise 100-150 nm über die Probe geführt. Dabei wird diese abgerastert und ein topographisches Bild der Oberfläche erzeugt. Eine konsequente Weiterentwicklung der SICM-Technologie die den Einsatz von feineren Nanopipetten bis zu einem Öffnungsdurchmesser von 8 nm [Takahashi et al., 2010, Shevchuk et al., 2006], neuen Regelungstechniken wie der Lock-In Technik [Pastré et al., 2001], sowie innovativer Abtastmethoden (“hopping”-mode, “standing approach mode”) konnte die Palette an untersuchbaren Proben erweitern. Dies konnte die Zuverlässigkeit, Stabilität und nicht zuletzt die Genauigkeit der Technologie weiter verbessern. Hier setzt ein Teil der vorliegenden Arbeit an, indem die Software zur Steuerung des SICM verbessert wurde. Die Verbesserung bezieht sich dabei auf die Höhenkontrolle der Nanopipette über der Probe und deren Rückführung auf den Referenzwert bei Änderung der lateralen Position. So wurde ein neuer Algorithmus implementiert, der eine schnellere und ebenso zuverlässige Steuerung zulässt.

Basierend auf der SICM-Technologie wurden weitere Ableger der SPM geschaffen, wie z.B. die “Scanning Electrochemical Microscopy” (SECM) [Bard et al., 1991] welche über kleinste chemische Reaktionen Informationen von Oberflächen gewinnt. Die Kombination der SICM-Technik mit SECM oder anderen etablierten Untersuchungsmethoden wie “Scanning Nearfield Optical Microscopy” (SNOM) [Korchev et al., 2000a] oder konfokaler Fluoreszenzmikroskopie zu Scanning Surface Confocal Microscopy (SSCM) [Gorelik et al., 2002] machen das SICM zu einer wertvollen Quelle zusätzlicher Informationen über biologische Systeme. Kombiniert mit anderen fluoreszenzmikroskopischen Systemen lässt sich das SICM zu einem vielseitigen Werkzeug ausbauen. Durch das Ablegen von Molekülen auf funktionalisierten Oberflächen durch ein modifiziertes SICM wurde dieses erstmals von [Bruckbauer et al., 2002] et al. nicht nur als passives Mikroskop für die Beobachtung oder das Gewinnen von topographischen Informationen von Proben genutzt, sondern die Nanopipette aktiv funktionalisiert. Die Ablage der biotinierten Farbstoffmoleküle auf einer streptavidinierten Oberfläche fand dabei in einer leitenden Lösung statt. Die Nanopipette wurde bis 100nm an die Oberfläche herangeführt und die Farbstoffmoleküle über Elektrophorese abgelegt. Die Anzahl der abgelegten Farbstoffe wurde mit  $46000 \pm 12000$  angegeben und wurden über ein mit dem modifizierten SICM gekoppeltes konfokales Fluoreszenzmikroskop detektiert. Die erreichte Präzision einzelner Farbstoffpunkte wurde dabei mit

830 nm FWHM angegeben. Eine Weiterentwicklung der modifizierten SSCM-Technik mit einer doppelten Nanopipette, welche ohne Lösungsbad auskam erreichte eine Präzision von 480 nm FWHM, wobei 2 Arten von Farbstoffen über eine Nanopipette abgelegt und konfokal detektiert werden konnten [Rodolfa et al., 2005]. Basierend auf der beständigen Entwicklung neuartiger Farbstoffe haben sich hochauflösende Techniken, welche unterhalb der Auflösungsgrenze von Licht arbeiten mittlerweile in der Fluoreszenzmikroskopie etabliert. Dabei bauen die meisten Techniken auf dem sog. Blinken von Farbstoffmolekülen auf, die in einer Bildsequenz die Positionen der Farbstoffmoleküle bestimmen und zu einem hochaufgelösten Bild rekonstruieren [Rust et al., 2006a, Hess et al., 2006]. Die sog. "Stochastik Optical Reconstruction Microscopy" (STORM) kann mittlerweile mit vielen Standard Farbstoffen durchgeführt werden [van de Linde et al., 2011]. Auch das gleichzeitige Auflösen mehrerer verschiedener Farbstoffe in einer Probe ist mittlerweile über hochauflösende Mikroskopie möglich [Bates et al., 2007]. Basierend auf der "direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy" (dSTORM) werden in dieser Arbeit Oberflächen entwickelt, die eine präzise Ablage von Farbstoffmolekülen und eine hochaufgelöste Detektion der einzelnen Moleküle mit dSTORM erlauben. Die Anforderungen an die Eigenschaften, die dabei an die Oberflächen gestellt werden, sind vielfältig. So muss die Oberfläche transparent sein und leitende Eigenschaften für den Ionenstrom besitzen. Des Weiteren muss sie für ein präzises Arbeiten im Nanometerbereich absolut gleichmäßig und plan sein. Nicht zuletzt ist eine gewisse Elastizität notwendig, damit die Nanopipette bei Berührung nicht zerbricht. Das Ablegen der Farbstoffe geschieht dabei über eine eigens entwickelte Software, die eine präzise Steuerung der Nanopipette über eine Piezoelektrische Stage bis in den Subnanometerbereich erlaubt. Eine automatisierte Routine steuert dabei die sichere Annäherung der Pipette an die Oberfläche.

## **Zellmarkierung über Nanopipetten**

Das Markieren einzelner Zellstrukturen über funktionalisierte Antikörper oder Proteine, die mit Farbstoffen gekoppelt sind, bringt häufig einen langwierigen Prozess mit sich. So müssen die Zellen herangezüchtet werden um anschließend über verschiedene Schritte fixiert und permeabilisiert zu werden. Danach werden die funktionalisierten Moleküle eingebracht. Nachdem die Strukturen in der fixierten Zelle markiert sind, werden schlussendlich überschüssige Moleküle über mehrere

## 1 Einleitung

Waschschritte entfernt. Mit Hilfe dieser Technik ist es möglich vielfältige Strukturen innerhalb von fixierten Zellen gezielt mit Farbstoffen zu markieren. Durch die eingesetzte Art der Farbstoffe ist es ebenfalls möglich die Strukturen über STORM oder andere hochauflösende Techniken mit einer hohen Präzision von bis zu 20 nm zu visualisieren. Auch die Analyse von Strukturen innerhalb von lebenden Organismen wurde bereits über die hochauflösende Mikroskopie durchgeführt [Klein et al., 2011]. Viele Schwierigkeiten stehen der allgemeinen Verwirklichung dabei im Weg. So sind die meisten Antikörper oder Proteine zu groß für die ca. 5 nm großen Poren in der Zellmembran und werden so nicht von den Zellen aufgenommen. Die funktionalisierten Moleküle können dementsprechend die Zielstruktur nicht erreichen. Die Snap-Tag Technologie [Klein et al., 2011] bietet hier eine Lösung. Dabei muss die Zelle allerdings in ihrem genetischen Code verändert werden. Es wird im letzten Teil der Arbeit gezeigt, dass ein Einbringen von Farbstoffen und funktionalisierten farbstoffbasierten Molekülen in eine lebende Zelle ebenso über eine Nanopipette möglich ist. Hierbei wird die Nanopipette mit einem Gesamtdurchmesser von  $\approx 100$  nm invasiv in die Zelle eingebracht. Die Moleküle werden dann über Elektrophorese in der Zelle abgesetzt und können über Diffusion ihre Zielstruktur erreichen. Dabei wird durch die Penetration der Nanopipette keine Apoptose der Zelle ausgelöst. Der Markiervorgang kann dabei direkt über Weitfeldmikroskopie beobachtet werden. Direkt im Anschluss ist die Beobachtung der markierten Strukturen und deren Dynamiken möglich. Gezeigt wird außerdem, dass nicht nur Zellen selbst markiert werden können, sondern auch einzelne Zellkompartimente, wie der Nukleus einer lebenden Zelle. Die Zellmarkierung über eine Nanopipette dauert dabei in Abhängigkeit der Konzentration von der Moleküllösung nur wenige Sekunden.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie

Ein Ziel der Biophysik ist es möglichst umfassende Kenntnisse der zu untersuchenden biologischen Systeme zu erlangen. Die Methodenentwicklung und deren Etablierung ist hier ein wichtiger Bereich. Dabei steht die Auflösung kleinster Strukturen und die Interaktion von verschiedenen biologischen Komponenten auf subzellulärer Ebene im Fokus der aktuellen Forschung.

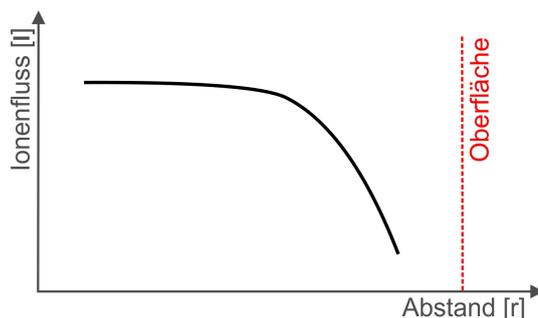
Im Folgenden wird die genaue Funktionsweise der SICM-Technik, sowie eine Beschreibung der physikalischen Gesetzmäßigkeiten sowie einiger Komponenten eines SICM behandelt. Es wurde dabei größtenteils auf die Beschreibung von A. Donnermeyer [Donnermeyer, 2007] und C.C. Chen [Chen et al., 2012] zurückgegriffen.

#### 2.1.1 Funktionsprinzip

Die SICM-Technik funktionalisiert eine hohle Glaskapillare, eine sog. Nanopipette [Morris et al., 2010], um topographische Informationen über (biologische) nichtleitende Proben zu erhalten. Dabei wird bei einer angelegten Spannung der Ionenfluss zwischen zwei Elektroden in wasserbasierter Elektrolytlösung gemessen. Der Ionenstrom wird dabei durch die Nanopipette mit typischerweise 10-60nm Öffnungsdurchmesser geleitet. Diese wiederum wird ca. 50-150nm über der Probe positioniert. Durch die Annäherung der Nanopipette an die Probe wird der Ionenfluss verringert und somit eine Abstandsabhängigkeit der Pipettenspitze zur Oberfläche generiert.

Eine typische Annäherungskurve für Glasoberflächen ist in Abbildung 2.1.1 gezeigt. Die Oberfläche bzw. Probe muss dabei nicht zwingend aus Glas bestehen. Einzige Bedingung ist eine nichtleitende Eigenschaft. Hier ist deutlich der Abfall des Ionenstroms bei Annäherung der Pipettenspitze an die Oberfläche zu erkennen. Der Ionenstrom wird zum Abrastern der Probe auf eine bestimmte Stärke d.h. auf einen bestimmten Abstand zur Oberfläche fixiert und die Probe Punkt für

## 2 Theoretische Grundlagen



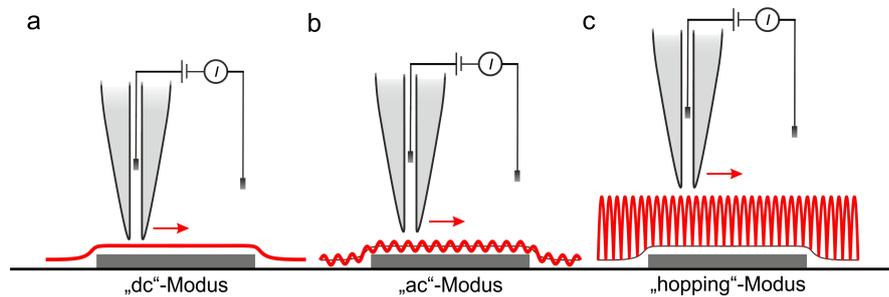
**Abbildung 2.1.1:** Annäherungskurve einer Nanopipette an eine Glasoberfläche. Der Punkt, ab dem der Ionenstrom abfällt, skaliert mit dem Öffnungsdurchmesser an der Spitze der Nanopipette. Die Beschaffenheit der Oberfläche hat Einfluss auf die Stärke des Stromabfalls.

Punkt abgerastert. Dadurch, dass in jedem Punkt der Abstand zur Probe auf den vorher festgesetzten Ionenstrom geregelt wird, entsteht ein hochaufgelöstes Rasterbild mit topographischer Information, welches ohne direkten Kontakt der Nanopipette zur Probe erzeugt wurde. Die maximal erreichbare Auflösung beträgt dabei typischerweise die Hälfte des Spitzendurchmessers (also 5-30nm) [Shevchuk et al., 2001] in lateraler Richtung und 2 bis 10 nm in axialer Richtung.

Die Technik basiert dabei auf einer Distanzregelung, die direkt abhängig vom Ionenstrom ist. Dieser sog. "dc"-Modus (Abb. 2.1.2 (a)) ist allerdings sehr fehleranfällig gegenüber Leitfähigkeitsschwankungen der Elektrolytlösung, welche durch Temperaturschwankungen, Verdampfen oder Veränderungen in der Leitfähigkeit der Elektroden ausgelöst werden können.

Die Stabilität des Systems ist daher nicht sehr hoch. Um die Distanzregelung unabhängig von sich zeitlich ändernden Größen zu machen, wurde die Lock-In Technik für das SICM eingeführt. Hierbei wird die Nanopipette mit einer Referenzfrequenz in axialer Richtung moduliert. Bei genügend kleinem Abstand der Nanopipette zur Oberfläche wird dabei der Ionenstrom ebenfalls mit dieser Referenzfrequenz moduliert. Dies hat den Vorteil, dass jetzt nicht mehr der Ionenstrom direkt detektiert werden muss, sondern nur die Modulation des Ionenstroms, das sog. Feedbacksignal gemessen wird. Dabei ergibt sich nicht nur eine Invarianz gegenüber Schwankungen des Ionenstroms durch die zuvor beschriebenen Effekte als auch eine genauere Messbarkeit des Feedbacksignals zur präziseren axialen Steuerung der Spitze über der

## 2.1 Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie

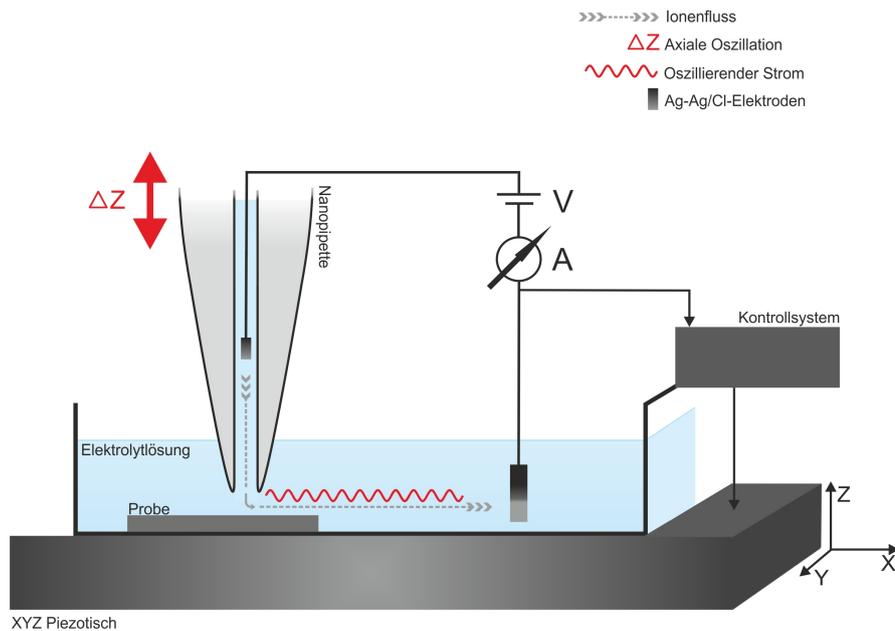


**Abbildung 2.1.2:** Unterschiedliche Abrasterungsmodi der SICM-Technik. **a)** „dc“-Modus: Die Nanopipette wird gleichmäßig über die Probe geführt. Der Ionenstrom bildet das Feedbacksignal. **b)** „ac“-Modus: Die Nanopipette oszilliert in axialer Richtung. Es fließt ein oszillierender Ionenstrom. Die Oszillation wird über einen Lock-In Verstärker detektiert. Die Stärke des Lock-In Signals bildet das Feedbacksignal. **c)** „hopping“ Modus: Um Proben mit großen Höhenunterschieden ohne Beschädigung abrastern zu können, wird die Nanopipette im „ac“-Modus von einer definierten Höhe aus an die Probe angenähert. Als Feedbacksignal dient hier ebenfalls das Lock-In Signal.

Probe. Darüber hinaus ist es mit dieser Feedbackmethode möglich, reproduzierbare Langzeitmessungen an Systemen vorzunehmen. Dieser sog. „ac“-Modus ist in Abbildung 2.1.3 dargestellt und begründet den Standard der SICM-Technik.

Ein weiteres Problem beim Abrastern von Proben ist der Steigungswinkel von verschiedenen Proben wie er beispielsweise bei gewissen Zelltypen vorliegt. Hier kann die Steigung der Probe bei dem Übergang von einem Punkt zum Nächsten größer sein, als der Abstand der Spitze zur Oberfläche. Dabei berührt die Nanopipette die Probe und verfälscht so im günstigsten Fall nur die Messung. Es ist allerdings auch möglich, dass die Spitze beschädigt wird und somit die Messung abgebrochen werden muss. Um diese Problematik zu lösen wird das SICM im sog. „hopping“-Modus (Abb. 2.1.2 (c)) über die Probe geführt. Dabei wird die Nanopipette an jeder lateralen Rasterkoordinate axial von einem vorher definierten Punkt schrittweise an die Oberfläche angenähert bis die Referenzstärke des Feedbacksignals erreicht ist. Nach Erreichen der Referenzstärke wird die Spitze wieder auf die Ausgangshöhe gesetzt und zur nächsten Rasterkoordinate bewegt. Durch den „hopping“-Modus wird zwar effektiv ein Abbrechen der Nanopipette verhindert, allerdings bedeutet diese Methode auch einen sehr hohen Zeitverlust gegenüber den anderen Modi beim Erstellen der to-

## 2 Theoretische Grundlagen



**Abbildung 2.1.3:** Prinzip der SICM-Technik. Zwischen zwei Elektroden in einer Elektrolytlösung wird eine Spannung angelegt, die einen Ionenstrom erzeugt. Durch die axiale Oszillation der Nanopipette oszilliert der Ionenstrom ab einer bestimmten Distanz zur Probe. Diese ist von dem Öffnungsdurchmesser der Pipettenspitze und der Oszillationsamplitude abhängig. Die Oszillation wird über das Kontrollsystem detektiert und als Feedbacksignal genutzt, um die Nanopipette auf einer konstanten Höhe über der Probe zu halten. Die Probe wird Punkt für Punkt in lateraler Richtung kontaktlos von der Nanopipette abgerastert wodurch ein hochaufgelöstes topographisches Bild der Oberfläche entsteht.

## 2.1 Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie

pographischen Oberfläche einer Probe. Es hat sich daher durchgesetzt, durch Annähern der Spitze an bestimmten Referenzpunkten die Rauigkeit der Probe zu bestimmen, die dann wiederum die Dichte der lateralen Rasterkoordinaten festlegt, um eine optimale Auflösung der Topographie bei geringst möglichem Zeitaufwand zu erreichen [Novak et al., 2009].

### 2.1.2 Ionenleitfähigkeit und Silberchlorid-Elektroden in Elektrolytlösungen

#### Ionenleitfähigkeit

Die Elektrolytlösung im SICM stellt das Bindeglied zwischen den beiden Elektroden dar, wobei die Ionenleitfähigkeit die wichtigste Eigenschaft der Elektrolytlösung ist. Diese hängt von der Gesamtanzahl, der Gesamtladung und der Größe (Beweglichkeit) der gelösten Ionen in der Lösung ab. Wirkt ein elektrisches Feld  $E$  auf die gelösten Ionen, so erfahren diese eine elektrophoretische Kraft:  $F_E = z \cdot eE$ , wobei  $z$  die Anzahl der Ionen und je nach Ladung (Vorzeichen von  $z$ ) die Richtung der Kraft (parallel oder anti-parallel zu  $E$ ) beschreibt und  $e$  die Elementarladung mit  $e = 1,6022 \cdot 10^{-19}C$  entspricht. Demgegenüber steht die Reibungskraft  $F_R = 6\pi\eta r_i v$ , dabei repräsentiert  $\eta$  die Viskosität der Lösung,  $r_i$  den Radius und  $v_i$  die Driftgeschwindigkeit der im Elektrolyt gelösten Ionen. Die *Driftgeschwindigkeit* kann für den Gleichgewichtsfall  $F_E = F_R$  über

$$v_i = \frac{zeE}{6\pi\eta r_i} \quad (2.1.1)$$

berechnet werden.

Allgemein ist der Strom definiert als  $I = \frac{dQ}{dt}$ , also als Ladung  $Q$  pro Zeit  $t$ . Für die Ladung  $Q$  gilt weiterhin für unseren Fall:  $Q = z \cdot e$ . In einer Elektrolytlösung existieren positiv ( $Q^+$ ) und negativ ( $Q^-$ ) geladene Ionen. Berücksichtigt man ferner den zeitlichen Aspekt, gilt für den *Ionenstrom* in einer Elektrolytlösung

$$I_i = e \sum_{i=1}^m ((n_i z v_i)^+ + (n_i z v_i)^-) \quad (2.1.2)$$

wobei hier davon ausgegangen wird, dass eine bestimmte Dichte  $n_m$  von geladenen Ionen pro Volumenelement in der Lösung existiert. Die *Ionenstromdichte*  $j_i$  ist definiert über den Ionenstrom  $I_i$  pro Fläche  $A$ . Es gilt also

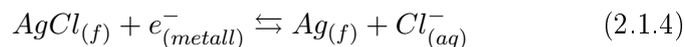
## 2 Theoretische Grundlagen

$$j_i = \frac{I_i}{A} \quad (2.1.3)$$

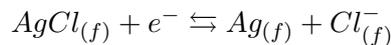
Zu berücksichtigen ist allerdings, dass die Formeln nur eine grobe Näherung an die realen Verhältnisse sind, da die Viskosität  $\eta$  von der Temperatur abhängt. Auch die Coulomb-Kraft zwischen zwei gegensätzlich geladenen Ionen ist nicht berücksichtigt. Des Weiteren wird die Elektrolytlösung noch von der Helmholtzschicht der Glaskapillare beeinflusst. Diese Helmholtzschicht tritt in Borosilikatglas, eine Mischung aus Siliziumoxid ( $\text{SiO}_2$ ) und Bortrioxid ( $\text{B}_2\text{O}_3$ ) auf und ist den Silanolgruppen ( $\text{SiOH}$ ) geschuldet, welche hauptsächlich in negativer Form ( $\text{SiO}^-$ ) vorliegen.

### Silberchlorid Elektroden

Die Elektroden in der SICM-Technik bestehen aus einem feinen Silberdraht mit einer dünnen Teflonbeschichtung. Durch die Elektroden wird der Strom vom Elektronenstrom im Silberdraht in einen Ionenstrom in der Elektrolytlösung und dann an der Gegenelektrode vom Ionenstrom zurück zu einem Elektronenstrom umgewandelt. Die Umwandlung stellt aus physikalischer Sicht eine Potentialbarriere dar, die es für den Strom zu überwinden gilt. Die Umwandlung findet unter Zunahme von  $\text{Cl}^-$ -Ionen statt. Um die Potentialbarriere so niedrig wie möglich zu gestalten, werden die Silber Elektroden chloriert und somit zu Silberchlorid Elektroden ( $\text{Ag} \rightarrow \text{AgCl}$ ). Der Übergang von Elektronen- zu Ionenstrom sieht dabei wie folgt aus:



Dieser findet in wässriger Umgebung statt. Die Silberchlorid Elektrode (festes System (f)) besteht dabei aus einem Ag-Kern und einer den Kern nach außen umgebenden AgCl-Schicht. Beim Übergang zwischen diesen Schichten findet ein Elektronenaustausch statt:



Nachdem dieser Austausch stattgefunden hat, können sich dann die fest gebundenen Chlorionen  $\text{Cl}^-_{(f)}$  mit den Chlorionen in Lösung  $\text{Cl}^-_{(aq)}$  austauschen. Die chemische Umwandlung von Silber nach Silberchlorid bewirkt also eine Verminderung des Potentials, die es für die Elektronen zu überwinden gilt. Dabei ist das Potential  $E$  der Elektrode gegeben durch die Nernstsche Gleichung

## 2.1 Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie

$$E = E^0 - \frac{RT}{F} \ln(a_{Cl^-}) \quad (2.1.5)$$

wobei  $E^0$  das Standardpotential einer Wasserstoff Elektrode ist und  $R = 8,31 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  die ideale Gaskonstante,  $F = 96,49 \text{ kC mol}^{-1}$  die Faraday Konstante sowie  $a_{Cl^-}$  die Aktivität der Chlorionen ist.

Neben der Eigenschaft, die Potentialbarriere herabzusetzen haben Silberchlorid Elektroden weitere nützliche Eigenschaften, die den konsequenten Einsatz in der SICM-Technik festigten. So bieten sie eine hohe Potentialstabilität, sind nicht toxisch, was für den Einsatz in biologischen Systemen unabdingbar ist und können reversibel eingesetzt werden, was den Einsatz als Gegenelektrode erklärt. Allerdings verbrauchen sich durch das ständige Ablösen und Wandern der Chlorionen die Silberchlorid Elektroden langsam und das Silber kommt in Kontakt mit der Elektrolytlösung. Dies hat den Effekt, dass der Stromfluss durch die erhöhte Potentialbarriere absinkt. Zusätzlich kommen Silberatome, die sich von der Elektrode lösen in direkten Kontakt mit der Lösung. Da Silber toxische Eigenschaften gegenüber biologischen Systemen wie Zellen hat, sollte eine Silberchlorid Elektrode nicht bis zum vollständigen Verbrauch der Chlorionen verwendet werden [N. B. Standen and Whitaker, 1987].

### 2.1.3 E-Feld und Ionenstrom der Nanopipette

Die Nanopipette in einem konstanten Abstand zur Probe zu halten ist eine der schwierigsten Prozesse der gesamten SICM-Technik. Dabei ist eine genaue Kenntnis des Ionenflusses durch die Öffnung der Nanopipette und der Verlauf des vorhandenen elektrischen Feldes außerhalb der Öffnung und in der Pipette selbst wünschenswert. Die daraus resultierende Kenntnis der Abstandsabhängigkeit des Ionenstroms aus der Nanopipette hin zur Oberfläche hat entscheidenden Einfluss auf die Stabilität der Messung.

Der Widerstand einer Nanopipette kann mathematisch über

$$R_N = \frac{l}{\kappa \pi r_r r_i} \quad (2.1.6)$$

berechnet werden. Hierbei steht  $l$  für die Pipettenlänge,  $\kappa$  beschreibt die Leitfähigkeit der Elektrolytlösung und  $r_r$  steht für den inneren Radius der rückwärtigen bzw.  $r_i$  für die vordere Öffnung der Nanopipette.

## 2 Theoretische Grundlagen

Für die Berechnung des Ionenstromes muss allerdings für den Gesamtwiderstand  $R_G$  noch der Widerstand  $R_A$ , der zwischen der Öffnung der Pipette und der Oberfläche herrscht berechnet werden:

$$R_A \approx \frac{\frac{3}{2} \ln\left(\frac{r_a}{r_i}\right)}{\kappa \pi a} \quad (2.1.7)$$

mit dem äußeren Radius der vorderen Spitzenöffnung  $r_a$  und dem Abstand  $a$  der Spitze zur Oberfläche. Der Gesamtwiderstand berechnet sich dann zu  $R_G = R_N + R_A$ . Über  $I_{dc}(a) = \frac{U}{R_G}$  berechnet sich dann über die angelegte Spannung  $U$  der Ionenstrom  $I_{dc}(a)$ . Eingesetzt in die Formel ergibt dies

$$I_{dc}(a) \approx I_{max} \left(1 + \frac{\frac{3}{2} \ln\left(\frac{r_a}{r_i}\right) r_r r_i}{l \cdot a}\right) \quad (2.1.8)$$

mit  $I_{max} = \frac{U}{R_A}$ . Dies gilt für den Ionenstrom der Spitze eines SICM im "dc"-Modus. Wird die Spitze hingegen mit einer bestimmten Kreisfrequenz  $\omega$  und Amplitude  $A$  moduliert, so ergibt sich für den Ionenstrom  $I_{ac}(a)$ :

$$I_{ac}(a) \approx \int_0^T I_{dc}(a) (a + A \sin(\omega t)) \sin(\omega t) dt \quad (2.1.9)$$

wobei  $T = \frac{2\pi}{\omega}$  die Periodendauer der Modulation ist.

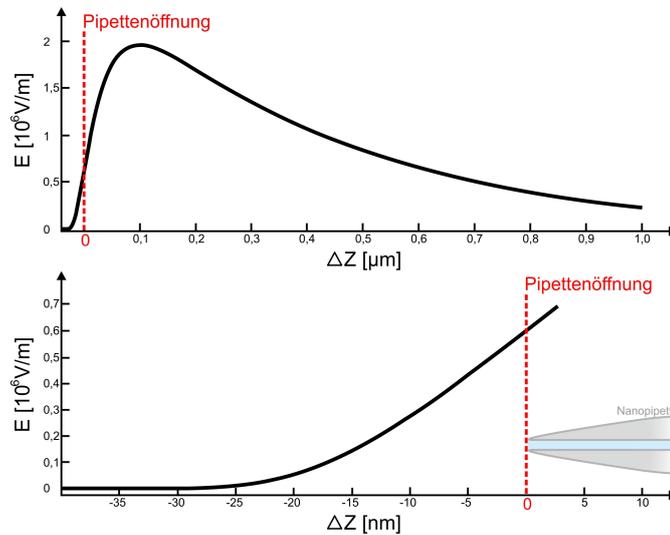
Das elektrische Feld der Pipette verhält sich nicht gleichmäßig über die Länge der Pipette. Legt man ein angelegtes Potential  $U_0$  zu Grunde, verhält sich das E-Feld zunächst stetig steigend in Richtung der Spitze der Nanopipette. Das Potential ändert sich hier also nur wenig. In kleinem Abstand zur Spitzenöffnung fällt das E-Feld jedoch rapide ab. Dies ist in diesem Bereich durch eine starke Änderung des Potentials bedingt. Die Änderung des Potentials über die Länge der Pipette ist gegeben durch

$$dU(z) = -I_{dc} dR_N(z) = -\frac{I_{dc}}{\kappa \pi (r_i + z(\tan\theta))^2} dz \quad (2.1.10)$$

dabei wird von einem kegelförmigen Öffnungswinkel der Spitze ausgegangen, der über den Winkel  $\theta$  definiert ist. Integrieren der Terme und Einsetzen ergibt für das elektrische Feld der Spitze

$$E(z) = \frac{dU(z)}{dz} = \frac{U_0 r_i \tan\theta}{(r_i + z(\tan\theta))^2} \quad (2.1.11)$$

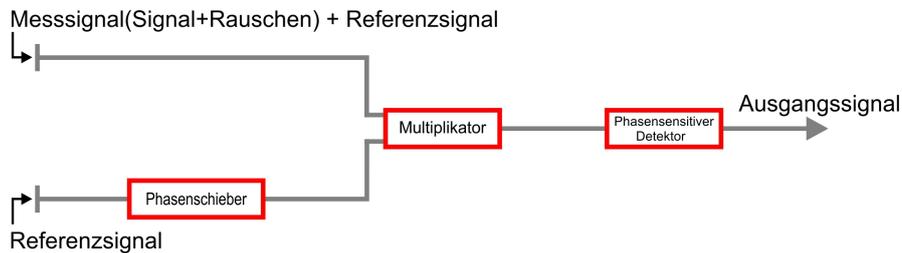
## 2.1 Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie



**Abbildung 2.1.4:** Verlauf der Stärke des elektrischen Feldes einer Nanopipette entlang ihrer der axialen Achse berechnet für eine angelegte Spannung von 1V. Die obere Abbildung zeigt den Verlauf des E-Feldes für einen axialen Bereich von  $-0,4$  bis  $1 \mu\text{m}$ . Auffällig ist hier die hohe Intensität des Feldes an der Spitze der Nanopipette und der sehr schnelle Abfall hin zur Pipettenöffnung. Der Hauptteil der angelegten Spannung fällt in dem Bereich der schnellen Verjüngung der Spitze ab. Die untere Abbildung zeigt den Ausschnitt der Pipette in der Elektrolytlösung ab  $-400 \text{ nm}$  bis hin zur Pipettenöffnung bei  $0 \text{ nm}$ . Hier fällt das E-Feld recht schnell und gleichmäßig ab. [Ying et al., 2004]

Abbildung 2.1.4 zeigt den simulierten Verlauf der Stärke des E-Feldes in Abhängigkeit der z-Richtung für eine angelegte Spannung von 1V. Dabei fällt der unsymmetrische Verlauf auf, die der spitz zulaufenden Form der Nanopipette geschuldet ist. Die Stärke des E-Feldes erreicht im Maximum  $\approx 100 \text{ nm}$  vor der Öffnung  $2 \cdot 10^6 \text{ V/m}$ . Zur Öffnung hin nimmt das Feld dann rasant gegen 0 ab, so dass es außerhalb der Öffnung nur noch  $\approx 250 \text{ nm}$  in die Elektrolytlösung hineinreicht. Angesichts der Tatsache, dass die Spitze während eines Messvorgangs  $50\text{-}150 \text{ nm}$  über der Probe geführt wird, kann eine Beeinflussung der Probe durch das elektrische Feld nahezu ausgeschlossen werden. Nur Proben, welche sehr sensitiv auf das Vorhandensein eines E-Feldes reagieren werden beeinflusst [Bard et al., 1989].

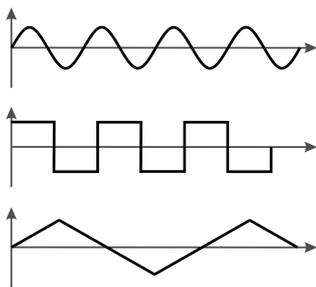
## 2 Theoretische Grundlagen



**Abbildung 2.1.6:** Schematischer Aufbau eines typischen Lock-In Verstärkers.

### 2.1.4 Phasensensitive Detektion / Lock-In Technik

Sehr schwache Signale sind oftmals ein Problem in Messanordnungen. Diese werden in vielen Fällen zusätzlich von Rauschen überdeckt, so dass ein sehr schlechtes Signal zu Rausch Verhältnis (Signal to Noise Ratio, SNR) das Detektieren von Signalen erschwert.

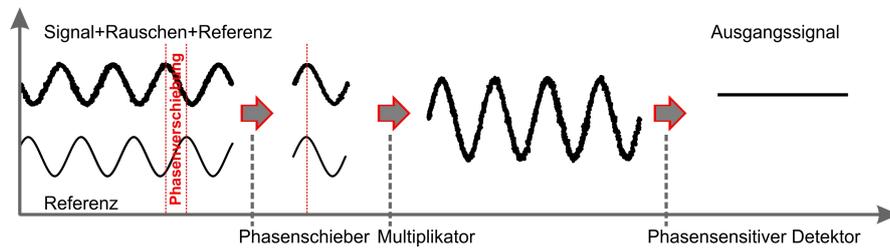


**Abbildung 2.1.5:** Modulationsformen der Referenzsignale in der Lock-In Technik

Des Weiteren kommt es vor, dass in einem Messsystem periodisch oder statistisch auftretende Störquellen vorkommen, die das Messsignal für kurze Zeit überlagern. Um diesen Problemen zu begegnen wurde die Lock-In Technik entwickelt. Diese Korrelationsdetektionsmethode arbeitet mit Hilfe der Modulation von diesen verrauschten oder von Störquellen überlagerten Messsignalen. Diese Modulation kann entweder mechanisch über ein sog. Chopperrad oder elektronisch über einen Frequenzgenerator erzeugt werden. Verschiedene

Modulationsformen sind in Abbildung 2.1.6 aufgeführt. Die Modulation kann dabei sinus-, rechteck-, oder dreiecksförmig verlaufen und ist in Frequenz und Amplitude frei wählbar. Das Modulationssignal wird als Referenzsignal bezeichnet. Nach der Modulation des Messsignals mit dem Referenzsignal wird dieses im Lock-In Verstärker mit dem Referenzsignal abgeglichen. Der schematische Aufbau eines Lock-In Verstärkers ist in Abbildung 2.1.5 gezeigt. Typischerweise liegt zwischen modulierte Messsignal und Referenzsignal eine Phasenverschiebung vor. Ein Phasenrichter verschiebt die Phasen soweit gegeneinander-

## 2.1 Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie

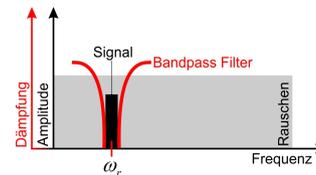


**Abbildung 2.1.7:** Signalverlauf im Lock-In Verstärker.

der, dass beide Signale dieselbe Phase bekommen. Der Signalverlauf selbst ist in Abbildung 2.1.7 illustriert.

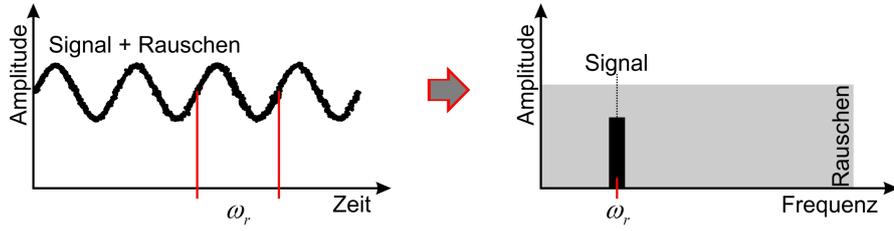
Danach werden beide Signale miteinander multipliziert. Herzstück des Lock-In Verstärkers ist der Phasensensitive Detektor (PSD). In diesem wird das Signal gefiltert und von der Referenzfrequenz bereinigt, so dass schlussendlich ein rauscharmes Messsignal am Ausgang des Verstärkers vorliegt. Der Phasensensitive Detektor wird auch als Integrator bezeichnet. In diesem wird über eine einstellbare Integrationszeit das vorliegende Signal aus dem Multiplikator mit Hilfe einer Fouriertransformation vom Ortsraum in den Fourierraum übertragen (siehe Abb. 2.1.9).

In diesem Raum ist es möglich, das Rauschen vom Signal über einen Bandpass Filter zu separieren (Abbildung 2.1.8). Dabei hängt die Integrationszeit in der Praxis stark mit der gewählten Referenzfrequenz zusammen. Allgemein ist eine möglichst hohe Referenzfrequenz zu bevorzugen, da eine Frequenz, welche zu nahe am Signal im Fourierraum gewählt ist elektronisch schlecht vom Signal separiert werden kann. Weiterhin ist eine möglichst große Integrationszeit wünschenswert, da die Flankensteilheit des Bandpass Filters sich proportional zur Integrationszeit verhält. Allerdings ist eine hohe Integrationszeit in der Praxis selten durchsetzbar, da der Lock-In Verstärker idealerweise in Echtzeit arbeiten sollte. Lock-In Verstärker können in der Praxis ein Messsignal mit einer Bandbreite von bis zu 0,01Hz Genauigkeit filtern [SRS, 2002]. Die Wahl der verschiedenen Parameter eines Lock-In Verstärkers sind allerdings immer ein Kompromiss von Geschwindigkeit und Genauigkeit in Abhängigkeit der ex-



**Abbildung 2.1.8:** Bandpass-Filter [SRS, 2002]

## 2 Theoretische Grundlagen



**Abbildung 2.1.9:** Übertragung des Signals vom Ortsraum in den Fourierraum

perimentellen Gegebenheiten. Nimmt man an, dass das Referenzsignal im Lock-In Verstärker mit einer Kreisfrequenz  $\omega$  und einer Amplitude  $V_L$ , sowie einer Phasenverschiebung  $\vartheta_{ref}$  belegt ist, so lässt sich das Referenzsignal mathematisch über  $V_L \sin(\omega_L t + \vartheta_{ref})$  ausdrücken. Das modulierte Messsignal wäre dann entsprechend  $V_{sig} \sin(\omega_r t + \vartheta_{sig})$ . Nachdem beide Signale den Multiplikator durchlaufen haben kann das Gesamtsignal aus dem PSD wie folgt berechnet werden

$$V_{PSD1} = V_{sig} V_L \sin(\omega_r t + \vartheta_{sig}) \sin(\omega_L t + \vartheta_{ref}) \quad (2.1.12)$$

Dieser Ausdruck ergibt sich dann zu

$$V_{PSD1} = \frac{1}{2} V_{sig} V_L \cos([\omega_r - \omega_L]t + \vartheta_{sig} - \vartheta_{ref}) - \frac{1}{2} V_{sig} V_L \cos([\omega_r + \omega_L]t + \vartheta_{sig} + \vartheta_{ref})$$

Das Signal aus dem PSD besteht also aus zwei Komponenten mit jeweils wellenförmigen Verlauf und einem Term  $(\omega_r - \omega_L)$  bzw.  $(\omega_r + \omega_L)$ . Wenn das Signal einen Tiefpassfilter passiert ergibt sich dieses im Normalfall zu Null. Allerdings wird für den Fall  $(\omega_r = \omega_L)$ , das Ausgangssignal des PSD zu

$$V_{PSD1} = \frac{1}{2} V_{sig} V_L \cos(\vartheta_{sig} - \vartheta_{ref}) \quad (2.1.13)$$

Das Ausgangssignal ist also unabhängig von der Referenzfrequenz  $\omega_L$  und der Frequenz des Signals  $\omega_r$ . Einzige Abhängigkeit bleibt erhalten. Für den Fall, dass beide Signale in Phase sind, wird  $(\vartheta_{sig} - \vartheta_{ref})$  aufgrund der Kosinus-Abhängigkeit einen Maximalwert annehmen. Für jede Phasenverschiebung zwischen dem Referenz- und dem Messsignal schwankt das Messsignal. Es wäre also während einer Messung immer nötig, die Phasendifferenz manuell zu korrigieren, um die Stärke des Ausgangssignals nicht zu verfälschen.

## 2.1 Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie

Um zu jedem Zeitpunkt das maximale Ausgangssignal aus dem Lock-In Verstärker zu erhalten wird das Signal des PSD geteilt und die Phase des zweiten Teils um  $\frac{\pi}{2}$  verschoben.

$$V_{PSD2} = \frac{1}{2}V_{sig}V_L\sin(\vartheta_{sig} - \vartheta_{ref}) \quad (2.1.14)$$

Die zwei Teilsignale  $V_{PSD1}$  und  $V_{PSD2}$  werden addiert. Das Gesamtsignal  $V_{GES}$  ergibt sich dann zu

$$V_{GES} = V_{PSD1} + V_{PSD2} \quad (2.1.15)$$

Durch diese Methode wird sichergestellt, dass unabhängig von der Phasenverschiebung des Referenzsignals gegenüber dem Messsignal immer das maximale Ausgangssignal zur Verfügung steht.

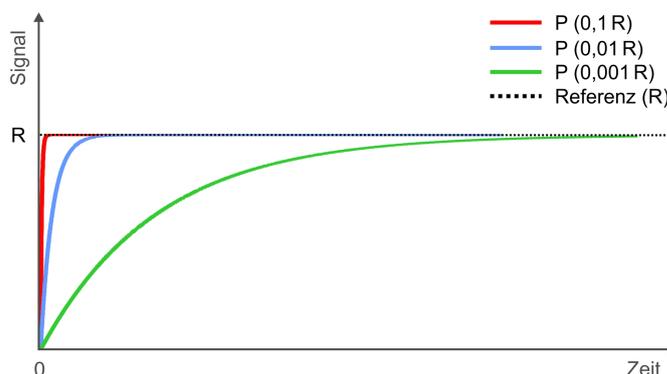
Betrachtet man den Ionenstrom in einem SICM, so stellt dieser mit typischerweise 1-2nA eine schwer detektierbare Messgröße dar. Wird die Nanopipette nun mechanisch durch einen Piezostack axial mit einer Referenzfrequenz moduliert, so wird der Ionenstrom ab einer bestimmten Höhe der Pipette (dabei ist die Höhe abhängig vom Öffnungsdurchmesser der Pipette) über der Oberfläche immer stärker mit der Referenzfrequenz oszillieren. Der Ionenstrom ist mit der Referenzfrequenz belegt und kann im Lock-In Verstärker detektiert werden.

### 2.1.5 Rückkopplungsregelung (Distanzregelungstechnik)

Der Hauptprozess während des Abrasterns einer inhomogenen Probe besteht aus der Nachführung der Höhe der Nanopipette auf die Referenzhöhe; der Distanzregelung. Ziel der Distanzregelung ist es, in möglichst kurzer Zeit, also mit möglichst wenig Schritten und möglichst präzise die Referenzhöhe bzw. den Referenzwert der Nanopipette über der Probe auf jeder Rasterkoordinate zu erreichen.

Um das Ziel der schnellen und präzisen Höhenkontrolle zu erreichen stehen verschiedene Kontrollmechanismen zur Verfügung. Dabei bestehen diese sog. Regler aus einer Transferfunktion  $D(s)$ , die abhängig vom Sensorsignal  $s$  ein Steuersignal  $a(t)$  am Ausgang des Reglers erzeugen, mit dem Ziel den vorgegebenen Referenzwert  $R$  schrittweise in möglichst kurzer Zeit zu erreichen. Dieses Ausgangssignal wird dann wiederum auf den Eingang gelegt und mit dem Referenzwert verglichen. Abhängig vom Vergleich wird dann ein neues Ausgangssignal erzeugt, bis der Referenzwert erreicht ist.

## 2 Theoretische Grundlagen



**Abbildung 2.1.10:** P-Regler mit Korrekturfunktion für verschiedene Konstanten  $k = 0,1 \cdot R$ ,  $k = 0,01 \cdot R$  und  $k = 0,001 \cdot R$ . Zu beachten ist die richtige Einstellung der Konstanten  $k$  in Abhängigkeit zum Referenzsignal bzw. dem Regelweg, die einen großen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Annäherung an den Referenzwert haben.

Als einfachster Kontrollprozess steht der Proportional (P)-Regler zur Verfügung. Dieser besteht aus einer Konstante  $k$  und ist idealerweise einige Größenordnungen kleiner gewählt, als der zu erwartende Regelweg. Das Ausgangssignal  $a$  wäre dann entsprechend den Vorgaben über die Konstante abhängig vom Eingangssignal  $e$

$$a = ke \quad (2.1.16)$$

Damit ergibt sich für den P-Regler die einfache Transferfunktion

$$D(s) = k \quad (2.1.17)$$

Die Annäherung an den Referenzwert ist also linear. Um die Schrittweite weiter zu verringern, kombiniert man den P-Regler mit einer linearen Funktion, die mit der Konstanten in Abhängigkeit vom Abstand zum Referenzwert multipliziert wird. In Abb. 2.1.10 ist der Regelweg für ideale Bedingungen (kein Rauschen oder anderweitige Störfaktoren) aufgetragen. Die Abbildung zeigt den P-Regler für verschiedene Proportionalkonstanten  $k$ , die  $\frac{1}{10}$ ,  $\frac{1}{100}$  und  $\frac{1}{1000}$  des Referenzwertes  $R$  entsprechen. Gut zu sehen ist hier, dass die Wahl der Konstanten für ein schnelles Erreichen von  $R$  wichtig ist. Allerdings darf die Konstante  $k$  auch nicht zu groß gewählt werden, da dies in einer Oszillation um den Referenzwert enden würde bei dem  $R$  selbst nie erreicht würde. Daher wird in der Praxis oft mit einer variablen Konstante gearbeitet,

## 2.1 Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie

die sich in der Schrittweite der Differenz des Eingangssignals vom Referenzwert anpasst. Das heißt im konkreten Fall, dass der Wert  $K$  umso größer ist, je größer die Differenz zwischen Eingangs- und Referenzwert ist.

Der PI-Regler stellt eine Erweiterung des Regelkreislaufs dar. Durch Hinzufügen eines Integralterms wird der P-Regler zwar stabiler und genauer, allerdings leidet darunter die Reaktionszeit des Systems. Konsequenz kann hier ein Überschwingen des Systems sein. Im Integralterm wird über einen definierten Zeitabschnitt das Eingangssignal integriert. Das Ausgangssignal ergibt sich dann entsprechend zu

$$a(t) = \frac{k}{T_I} \int_{t_0}^t e \, d\tau \quad (2.1.18)$$

Die Transferfunktion wird dann

$$D(s) = \frac{k}{T_I s} \quad (2.1.19)$$

wobei die  $T_I$  die Zeitkonstante ist.

Alternativ zum Integrationsterm I kann auch ein Differenzialterm hinzugefügt werden. Man erhält nun einen PD-Regler. Der Differenzialterm registriert die Änderungen im Eingangssignal und reagiert entsprechend schnell. Hier ist nicht die Abweichung des Eingangssignals zum Referenzpunkt entscheidend, sondern nur die Änderung des Eingangssignals zum vorherigen Wert. Das Ausgangssignal ist hier

$$a(t) = kT_D \frac{d}{dt} e(t) \quad (2.1.20)$$

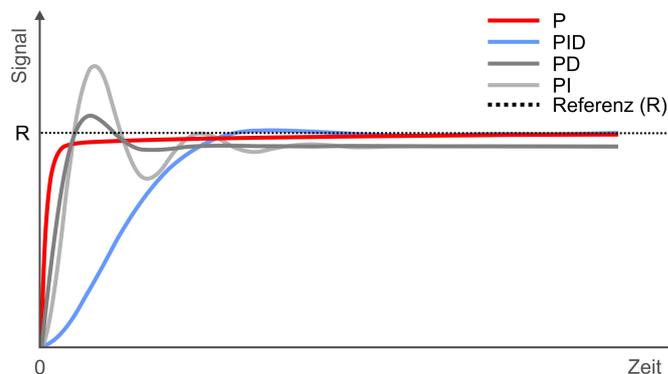
Die Transferfunktion entsprechend

$$D(s) = kT_D s \quad (2.1.21)$$

Eine Kombination aller drei Regler ergibt den PID-Regler. Dieser Regler vereint alle zuvor genannten Eigenschaften. Richtig an das System angepasst bietet er eine schnelle und stabile Regelung. Ausgangssignal ist hier

$$a(t) = k \left( e + \frac{1}{T_I} \int_{t_0}^t e \, d\tau + T_D \frac{d}{dt} e(t) \right) \quad (2.1.22)$$

## 2 Theoretische Grundlagen



**Abbildung 2.1.11:** Regelwege für verschiedene Regler. Proportional (P-Regler), Proportional Integral (PI-Regler), Proportional Differenzial (PD-Regler) und Proportional Integral Differenzial (PID-Regler)

Die Transferfunktion

$$D(s) = k\left(1 + \frac{1}{T_I s} + T_D s\right) \quad (2.1.23)$$

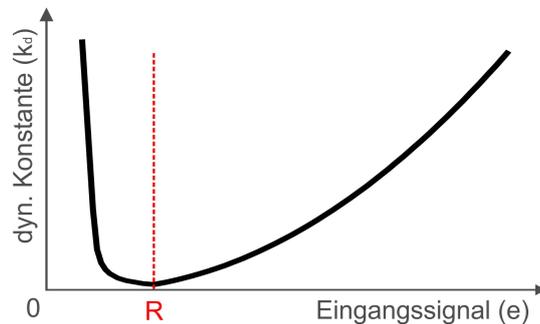
Die verschiedenen Regler sind in Abbildung 2.1.11 aufgeführt. Die Regelkurven sind idealisierte Darstellungen, da weder Rauschen noch sonstige Störfaktoren einbezogen wurden. Der Verlauf der Kurven hängt sehr von der Kombination der gewählten Parameter ab. Er kann dementsprechend je nach gewählten Parametern für P-, I- und D-Term die Kurve stark verzerren.

In der Praxis hat sich für das SICM eine Kombination von P-Regler mit variabler Konstante  $k_d$  bewährt. Dabei wird die Größe der Konstante abhängig von der Differenzgröße zum Referenzwert angepasst. Abbildung 2.1.12 zeigt den Verlauf einer Korrekturkurve, die für das SICM in dieser Arbeit verwendet wurde. Der Korrekturterm  $k_d$  wird hier umso kleiner, je näher sich das Eingangssignal am Referenzwert  $R$  befindet.

### 2.1.6 Elektromagnetische Störquellen

Um sensitive Messungen durchzuführen ist eine Umgebung notwendig, die frei von jeglichen Störquellen ist. Eine genaue Kenntnis dieser Störquellen kann daher effizient dazu beitragen zu vermeiden, dass Störquellen entstehen bzw. wenn ein Entstehen nicht verhindert werden kann, diese effektiv zu unterdrücken. In einem SICM ist der sensitivste

## 2.1 Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie



**Abbildung 2.1.12:** Verlauf der dynamischen Konstante  $k_d$  in Abhängigkeit vom Eingangssignal. Wenn das Eingangssignal gegen den Referenzwert läuft, geht der Korrekturfaktor gegen Null. Für hohe Differenzen zum Referenzwert werden die Korrekturterme entsprechend höher.

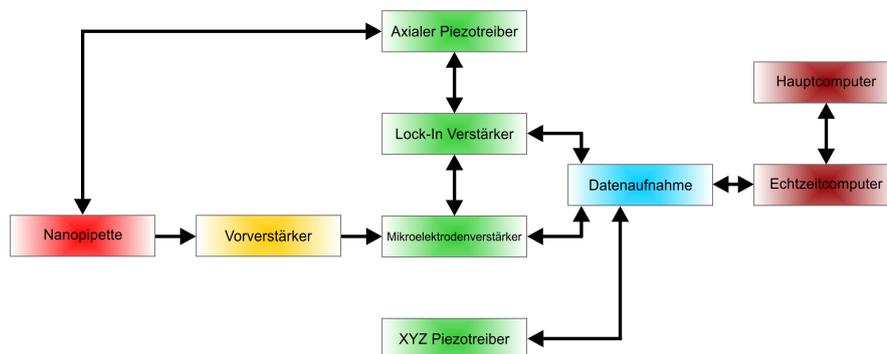
Teil der Ionenstrom, der eine Größe von wenigen Nanoampere (nA) hat. Um diesen detektieren zu können, müssen sämtliche auftretende Störquellen ausgeschlossen werden.

Das Einstreuen von elektrischen Feldern aus der Umgebung gehört zu den häufigsten Störquellen. Sie haben ihren Ursprung z.B. in eingeschalteten Deckenlampen, Mikroskoplampen, Computern oder stromführenden Kabeln. Sie können effektiv über das Abschirmen der sensitiven Bereiche des SICM mit Hilfe von geerdeten Käfigen unterbunden werden, oder - wenn möglich - durch einfaches Abschalten der nicht benötigten Geräte. Eine weitere Störquelle bilden sich ändernde Magnetfelder. Quellen für diese Störsignale können aufgerollte Kabel oder Netzteile von Geräten sein. Einzige Möglichkeit den Einfluss dieser Störquellen zu vermeiden ist, diese so weit wie möglich von den sensitiven Teilen zu separieren. Erdschleifen erzeugen ebenfalls Störsignale. Sie entstehen, wenn die Erdung an mehreren Stellen durchgeführt wird. Effektiv können sie vermieden werden, indem sich auf nur einen Erdungspunkt beschränkt wird. [Morrison, 1967]

### 2.1.7 Signalwege im Rasterionenleitfähigkeitsmikroskop

Ein SICM besteht aus vielen einzelnen Komponenten. Die Kommunikation zwischen den einzelnen Komponenten wird durch eine schnelle und genaue Signalweitergabe realisiert. Die Kommunikation zwischen den einzelnen Komponenten kann in Abb. 2.1.13 schematisch nachverfolgt werden.

## 2 Theoretische Grundlagen



**Abbildung 2.1.13:** Schematische Darstellung der Kommunikationswege zwischen den Komponenten eines SICM

Ein Echtzeitcomputer (Real-Time Computer, RTC) bildet die zentrale Einheit, in der Daten aufgenommen, weiterverarbeitet und wiederum abgegeben werden. Eingaben des Nutzers werden über den Hauptcomputer (Host PC, HPC) getätigt, der über ein TCP/IP-Interface mit dem RTC verbunden ist. Ausgehend von der Nanopipette, die mit Hilfe des Z-Piezo axial mit der vom axialen Piezotreiber vorgegebenen Referenzfrequenz gesteuert wird, wird der Ionenstrom, der zwischen Elektrode und Gegenelektrode fließt direkt abgegriffen und im Vorverstärker in ein Spannungssignal umgewandelt. Am Mikroelektrodenverstärker (Microelectrode Amplifier, MEA) wird die Spannung geglättet und gefiltert, sowie ein Offset berechnet und ein Spannungssignal proportional zum Ionenfluss generiert. Im MEA kann der Strom mit bis zu einer Genauigkeit von einigen Picoampere gemessen werden. Des Weiteren wird über den MEA die Spannung (Potentialdifferenz), welche zwischen den Elektroden herrscht, angelegt. Der MEA gibt die Ionenstrominformation direkt an den RTC und den Lock-In Verstärker (Lock-In Amplifier, LIA) weiter. In Gegenrichtung wird im MEA über den HPC via RTC die Spannungsstärke zwischen den Elektroden gesteuert. Die Spannungsstärke wird i.d.R. während einer Messung nicht verändert. Im LIA wird der (oszillierende) Ionenstrom mit Hilfe der Referenzfrequenz gefiltert und ein Spannungssignal proportional zum Ionenstrom generiert. Weiterhin wird die Referenzfrequenz mit vorgegebener Amplitude im LIA erzeugt und an den axialen Piezotreiber weitergegeben. Gesteuert werden die Parameter für die Referenzfrequenz/Amplitude sowie weitere Einstellungsmöglichkeiten des LIA über den Benutzer, der über den HPC die Befehle an den RTC

## 2.1 Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie

weitergibt. Das zuvor generierte Spannungssignal aus dem LIA wird direkt an den RTC weitergegeben und dort weiterverarbeitet. Im RTC wird über einen Softwareregler der axiale Korrekturweg für die Spitze berechnet, der dann an den XYZ-Piezotreiber weitergegeben wird. Der XYZ-Piezotreiber positioniert die Probe mit einer Geschwindigkeit von 2 ms und einer Genauigkeit von 0,1 nm in axialer und lateraler Position unter der Spitze.

## 2.2 Fluoreszenzmikroskopie

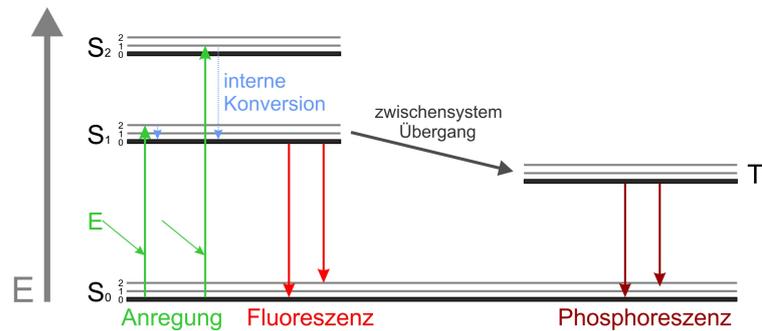
Absorption und Emission von Licht sind die Grundprinzipien der Fluoreszenz. 1845 beobachtete Sir John Friedrich William Herschel ein bläuliches Schimmern an der Oberfläche von "Tonic Water", wenn das Sonnenlicht unter einem bestimmten Winkel auf die Oberfläche trifft. Er beschrieb damit zum ersten Mal das Phänomen der Fluoreszenz an Chinin als Bestandteil des "Tonic Water" [Herschel, 1845]. Über die letzten Jahrzehnte hat sich um die Fluoreszenz ein eigener Wissenschaftszweig, die Fluoreszenzmikroskopie gebildet. Diese hat sich mittlerweile zu einem weit verbreiteten Forschungswerkzeug in der Biologie und Biophysik weiterentwickelt [Lakowicz, 2006].

Aufgabe der Fluoreszenzmikroskopie ist u.a. die hochsensitive Auflösung von Zellulären und subzellulären Strukturen und Dynamiken mit möglichst hoher zeitlicher Auflösung. Dabei basieren die angewendeten Techniken immer auf der natürlichen Fluoreszenz einzelner Stoffe oder der Markierung der Strukturen von Interesse mit kleinsten fluoreszierenden Sonden, sog. Farbstoffen. Diese bestehen zumeist aus fluoreszenzaktiven aromatischen Molekülen, oder Halbleiternanokristallen. Sowohl bildgebende Verfahren sog. Imaging-Techniken wie Konfokale- oder Weitfeldmikroskopie, als auch Korrelationstechniken wie die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) kommen dabei als Detektionstechniken der Fluoreszenz zum Einsatz.

Die verschiedenen Techniken und Prinzipien werden in diesem Abschnitt erläutert. Dabei orientiert sich die Darstellung an den Beschreibungen von Joseph R. Lakowicz [Lakowicz, 2006].

### 2.2.1 Prinzipien der Fluoreszenz

Als Lumineszenz bezeichnet man generell die Emission von Licht. Dabei unterscheidet man zwischen Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Phosphoreszenz findet auf Zeitskalen von Millisekunden bis Sekunden statt und beschreibt normalerweise die Emission von Licht aus dem Tripletzustand in den Grundzustand eines Moleküls. Die Fluoreszenz hingegen findet auf Zeitskalen von  $10^{-8}$  Sekunden statt und wird der Emission von Licht aus dem angeregten Singulettzustand zugeschrieben. Die Lebenszeiten dieser Zustände liegen – abhängig vom Molekül – bei  $10^{-9}$  Sekunden. Der Anregungsvorgang eines Moleküls selbst geschieht im Bereich von  $10^{-12}$  Sekunden. Die Übergänge zwischen den einzelnen Zuständen ereignen sich in einem Zeitraum von  $10^{-15}$  Sekunden.



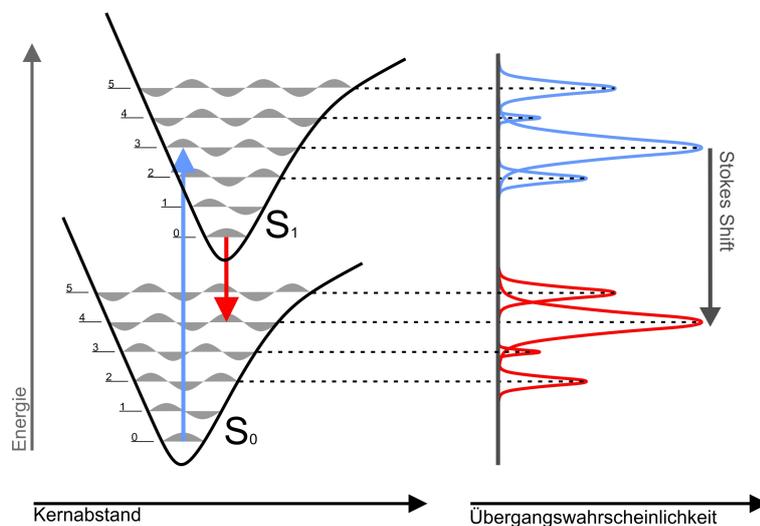
**Abbildung 2.2.1:** Jablonski-Diagramm. Dargestellt sind die Energiezustände eines Moleküls ( $S_0$ =Grundzustand und  $S_1$ = erster angeregter Zustand sowie  $T_1$ =Tripletzustand). Die Linien zeigen die entsprechenden Übergänge, die für ein Elektron zur Auswahl stehen.

Dabei basiert die Vorstellung der Energieübergänge in einem Molekül auf dem Borschen Atommodell. Allerdings sind in einem Molekül die Zustände energetisch aufgespalten. In den energetischen Zuständen  $S_0 \dots S_n$  existieren also weitere Zwischenzustände. Die sog. Rotations- und Vibrationszustände. Bei den Übergängen von Elektronen in einem Molekül spielen die Rotationszustände keine Rolle. Es werden dementsprechend nur die Vibrationszustände behandelt. Der Absorptionsprozess eines Photons und die verschiedenen Emissionsvorgänge werden im Jablonski-Diagramm zusammengefasst (siehe Abb. 2.2.1). Durch Absorption eines Photons oder durch Stöße kann ein Elektron vom Grundzustand  $S_0$  in einen angeregten Zustand  $S_n$  angehoben werden. Die Energie, die ein Elektron dabei aufnimmt entspricht

$$E = h \cdot \nu \quad (2.2.1)$$

wobei  $h$  die Planck Konstante und  $\nu$  die Frequenz des eingestreuerten Photons ist. Die Anregung geschieht dabei überwiegend in einen vibronischen Zustand des angeregten Zustands. Durch Interne Konversion geht das Elektron dann strahlungslos in den Grundzustand des angeregten Zustands über. Von hier aus kann es unter Abgabe eines Photons fluoreszierend in den Grundzustand rekombinieren. Der Übergang erfolgt überwiegend in einen vibronischen Zustand, von dem aus das Elektron wieder in den Grundzustand übergeht. Eine andere Möglichkeit für das angeregte Elektron ist einen Zwischensystem Übergang (Intersystem Crossing) zu vollziehen und in den Tripletzustand zu gehen. Dieser Übergang ist mit einer Spinumkehr des Elektrons verbun-

## 2 Theoretische Grundlagen



**Abbildung 2.2.2:** Franck-Condon-Prinzip. Darstellung zweier Energiezustände  $S_0$  und  $S_1$  eines Moleküls mit ihren entsprechenden Vibrationszuständen. Die Vibrationszustände sind als quantenmechanische Wellenfunktion dargestellt. Die Übergangswahrscheinlichkeiten der Zustände ergeben sich durch den Überlapp der einzelnen Wellenfunktionen.

den. Für die Dauer, die das Molekül diesen Zustand einnimmt, kann keine weitere Absorption von Photonen stattfinden, bis das Elektron über die Abgabe eines Photons phosphoreszierend rekombiniert. Die Rekombination geschieht wiederum meist in vibronische Unterzustände des Grundzustands. Der Triplettzustand ist quantenmechanisch gesehen ein verbotener Zustand. Die Wahrscheinlichkeit für den Übergang in einen Triplettzustand und die damit verbundene Phosphoreszenz ist daher sehr viel kleiner, als die der Fluoreszenz.

Die Übergangswahrscheinlichkeiten werden durch das Franck-Condon-Prinzip beschrieben. Hier geht man davon aus, dass sich im Zeitraum der Übergänge eines Elektrons der Kern nicht bewegt. In Abbildung 2.2.2 sind schematisch zwei Energiezustände eines Moleküls  $S_0$  und  $S_1$  und deren Vibrationszustände als quantenmechanische Wellenfunktion gezeigt. Die Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen den Energiezuständen ergeben sich durch den Überlapp der einzelnen Wellenfunktionen. Durch die Übergangswahrscheinlichkeiten bildet sich das Absorptions- und Emissionsspektrum eines fluoreszenzaktiven Moleküls. Betrachtet man die Übergangswahrscheinlichkeiten fällt auf, dass in der Regel das Absorptions- und Emissionsspektrum spiegel-

verkehrt zueinander sind. Des Weiteren ist das Emissionsspektrum eines Moleküls gegenüber dem Absorptionsspektrum aufgrund der zuvor beschriebenen nicht radiativen Effekte weniger energiereich. Das Emissionsspektrum ist um einen bestimmten Wert ins Rote verschoben. Dieser Effekt wurde als erstes von Sir George Stokes beschrieben und wird als "Stokes Shift" bezeichnet. Durch diesen Effekt ist es möglich über spektrale Filter die Anregungswellenlänge von der Emissionswellenlänge spektral zu trennen. Das Emissionsspektrum eines Moleküls ist außerdem unabhängig von der Anregungswellenlänge. Dieser Umstand wird als "Kashas Rule" bezeichnet und stellt eine weitere wichtige Eigenschaft der Fluoreszenz dar.

### 2.2.2 Farbstoffe

Neben intrinsischen Farbstoffen wie beispielsweise Chlorophyll oder das Green Fluorescent Proteine (GFP) werden in der Fluoreszenzmikroskopie hauptsächlich extrinsische Farbstoffe benutzt. An diese Farbstoffe werden vielfältige Anforderungen gestellt. Sie sollten eine gut definierte Wellenlänge besitzen, eine hohe Photostabilität haben und einen hohen Absorptionskoeffizienten einhergehend mit einer hohen Quantenausbeute haben. Weitere wünschenswerte Eigenschaften sind pH Stabilität, und ein möglichst großer Stokes Shift. Darüber hinaus werden gute Bindungseigenschaften mit anderen Molekülen wie Antikörpern gebraucht.

Mittlerweile sind eine große Anzahl von Farbstoffen für alle erdenklichen Zwecke verfügbar. Die wichtigste Farbstoffgruppe ist die Klasse der synthetisch hergestellten organischen Farbstoffe. Die gebräuchlichsten Farbstoffe dieser Gruppe sind die Cyanine, Rhodamine und Oxazine (Abb. 2.2.3).

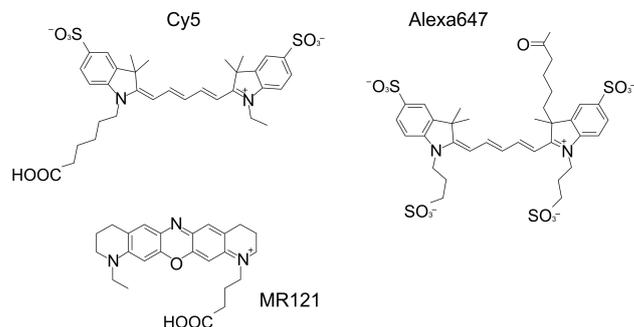
### Quantenausbeuten und Lebenszeiten

Photostabilität und die Quantenausbeute sind die wichtigsten Eigenschaften eines Farbstoffs. Die Quantenausbeute (Quantum yield, QY) beschreibt dabei die Anzahl der emittierten Photonen gegen die absorbierten. Sie ist also gegeben durch

$$Q = \frac{\rho}{\rho + \nu} \quad (2.2.2)$$

wobei  $\rho$  die radiative Emission und  $\nu$  die nicht-radiative Emission eines Farbstoffes ist. Weiter kann über die radiative Emission die Fluores-

## 2 Theoretische Grundlagen



**Abbildung 2.2.3:** Gruppen verschiedener Farbstoffe. Cyanine (Cy5), Rhodamine (Alexa Fluor 647) und Oxazine (MR121)

zenzlebensdauer  $\tau$  ermittelt werden

$$\tau = \frac{1}{\rho + \nu} \quad (2.2.3)$$

Da Fluoreszenz ein spontaner zufälliger Prozess ist, handelt es sich bei der Lebensdauer um einen Mittelwert. Die Photostabilität ist ein Maß für die Zeit, die ein Farbstoff in der Lage ist, Photonen zu absorbieren und zu emittieren.

### Fluoreszenzlöschung

Kommen Farbstoffe in Kontakt mit anderen Molekülen, kann die Fluoreszenz unterdrückt werden. Dieser Prozess wird Fluoreszenzlöschung (Quenching) genannt. Die Moleküle, die diesen Prozess auslösen, werden Fluoreszenzlöcher (Quencher) genannt. Dabei handelt es sich in diesem speziellen Fall um die sog. Stoßlöschung (Collisional Quenching). Darüber hinaus gibt es noch weitere Formen der Fluoreszenzlöschung. Die Moleküle werden beim Löschen im Gegensatz zur Photozerstörung (Bleaching) chemisch nicht verändert. Über die Stern-Volmer-Gleichung kann die Fluoreszenzlöschung beschrieben werden

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K [Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (2.2.4)$$

Dabei ist  $K$  die Stern-Volmer-Löschkonstante,  $k_q$  ist die bimolekulare Löschkonstante,  $\tau_0$  ist die Fluoreszenzlebensdauer und  $[Q]$  ist die Konzentration der Fluoreszenzlöcher. Dabei hängt die Art und Weise, sowie die Effizienz der Fluoreszenzlöschung, vom Farbstoff-Löschpaar ab. Der Löschvorgang kann so durch Elektronentransfer, "Spin-Orbit"

Kopplung oder “Intersystem Crossing” ausgelöst werden. Des Weiteren ist es möglich, dass Farbstoffe nicht fluoreszierende Komplexe mit anderen Molekülen bilden und so dauerhaft gelöscht sind. Diese Art der Fluoreszenzlöschung wird Statische Löschung (Static Quenching) genannt.

Der *Resonanz Energietransfer (RET)* tritt immer dann auf, wenn ein Farbstoff-Löschpaar sich auf 2-10nm nähert und das Emissionsspektrum vom Donor (Farbstoff) mit dem Absorptionsspektrum vom Akzeptor (Fluoreszenzlöcher) überlappt [Galla, 1988, Lakowicz, 2006]. Das Farbstoff-Löschpaar interagiert dabei miteinander über eine Dipol-Dipol Wechselwirkung. Ist der Akzeptor ein weiteres Farbstoffmolekül, so spricht man von Fluoreszenz Resonanz Energietransfer (FRET). Die Effizienz von RET bzw. FRET ist wie anfangs erwähnt abstandsabhängig. Die Transferrate  $k_T(r)$  kann über

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r}\right)^6 \quad (2.2.5)$$

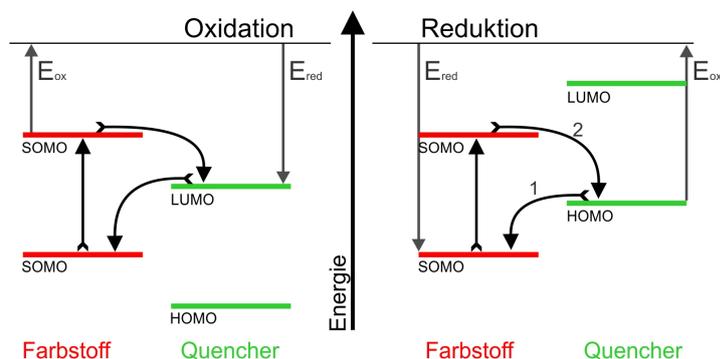
berechnet werden. Dabei ist  $r$  der Abstand zwischen Donor und Akzeptor,  $\tau_D$  die ungestörte Fluoreszenzlebensdauer des Farbstoffs und  $R_0$  der Försterradius [Förster, 1960]. Der Försterradius beschreibt den Abstand zwischen Donor und Akzeptor, an dem die Übertragungseffizienz auf die Hälfte abgesunken ist. Er hängt dabei von der relativen Orientierung des Dipolmoments des Donors, der Quantenausbeute, dem Brechungsindex des umgebenden Mediums, sowie einigen weiteren Konstanten ab. Die Transfereffizienz zwischen Donor und Akzeptor kann mit Hilfe von

$$E_T = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (2.2.6)$$

bestimmt werden.

*Photoinduzierter Energietransfer (PET)* liegt dann vor, wenn Farbstoff und Fluoreszenzlöcher in direkten Kontakt miteinander kommen [Marcus and Sutin, 1985]. Es wird eine direkte Wechselwirkung der Elektronenwolken beider Moleküle ermöglicht. Abbildung 2.2.4 veranschaulicht diesen Vorgang. Im angeregten Zustand wechselt im Farbstoff (Donor) vom Highest Occupied Molecular Orbit (HOMO) in das Lowest Unoccupied Molecular Orbit (LUMO) und bildet dadurch zwei Semi Occupied Molecular Orbits (SOMO). Dadurch, dass sich der Donor im angeregten Zustand befindet, ist es für beide Moleküle energetisch günstiger, einen Ladungstransferkomplex zu bilden. Dabei kann

## 2 Theoretische Grundlagen



**Abbildung 2.2.4:** Photoinduzierter Elektronentransfer. Donor und Akzeptormolekül befinden sich in direktem Kontakt zueinander. Durch die Anregung des Farbstoffs (Donor) ist ein Exiplex entstanden. Über Oxidation kann das angeregte Elektron des Donors direkt mit dem Lowest Unoccupied Molecular Orbit (LUMO) des Quenchers interagieren und so den Grundzustand erreichen. Im Reduktionsfall geht erst ein Elektron vom Highest Occupied Molecular Orbit (HOMO) in das Semi Occupied Molecular Orbit (SOMO) des Donors über, bevor das angeregte Elektron über das HOMO rekombiniert.

das Elektron auf zwei Arten (je nach Akzeptor) ausgetauscht werden. Über den Oxidationsweg wechselwirkt das angeregte Elektron im Semi Occupied Molecular Orbit (SOMO) des Donors mit dem (LUMO) des Fluoreszenzlöschers (Akzeptors) und gelangt über diesen wieder in den Grundzustand des Donors. Bei der Reduktion geht das Elektron im (HOMO) des Akzeptors in den (SOMO) des Donors über. Jetzt kann das angeregte Elektron vom Donor in das (HOMO) des Akzeptors überwechseln. Ein Photoinduzierter Elektronen Transfer kann nur stattfinden, wenn sich der Donor im angeregten Zustand befindet, da nur in diesem Zustand eine vorübergehende Ladungsseparation möglich ist. Die Energieänderung  $\Delta G$  für PET ist über die Rehm-Weller Gleichung gegeben

$$\Delta G = E_{ox} - E_{red} - \Delta G_{01} - \frac{e^2}{\epsilon d} \quad (2.2.7)$$

Dabei beschreibt  $E_{ox}$  das Oxidations- und  $E_{red}$  das Reduktionspotential,  $\Delta G_{01}$  ist die Energie des Übergangs von  $S_0$  nach  $S_1$  und  $\epsilon$  ist die Dielektrizitätskonstante des Mediums.  $d$  beschreibt den Abstand zwischen den Ladungen und  $e$  die Elementarladung.

Fluoreszenzlöschung von Farbstoffen kann auch über molekularen

Sauerstoff ( $O_2$ ) stattfinden [Evans, 1957]. Allgemein löscht  $O_2$  jeden angeregten Zustand  $S_1$  und  $T_1$  eines Farbstoffmoleküls. Dabei geht  $S_1 \rightarrow T_1$  und  $T_1 \rightarrow S_0$ . Ein Löschweg findet also über *Intersystem Crossing* statt. Beide Löschvorgänge treten mit annähernd gleicher Wahrscheinlichkeit auf. Dadurch, dass der  $T_1$  ein langlebiger Zustand ist, ist es möglich durch eine genau dosierte Sauerstoffkonzentration in einer Lösung die meisten Farbstoffe im  $T_1$  Zustand zu halten. Die radikalen Eigenschaften des Sauerstoffmoleküls werden für das Löschen der Fluoreszenz verantwortlich gemacht. Physikalisch gesehen geht man davon aus, dass der Löschprozess über die Bildung eines Exiplex (angeregter Molekülkomplex, der nur im angeregten Zustand eines Reaktionspartners existieren kann) und Elektronen Energietransfer stattfindet.

Weitere Fluoreszenzlöschung über Elektronen Energietransfer kann durch schwere Atome oder auch über Elektronensammler wie freie Protonen oder Cystein erfolgen. Dabei geht man davon aus, dass der genaue Austausch eine Elektronenabgabe des Farbstoffs beinhaltet [Lakowicz, 2006].

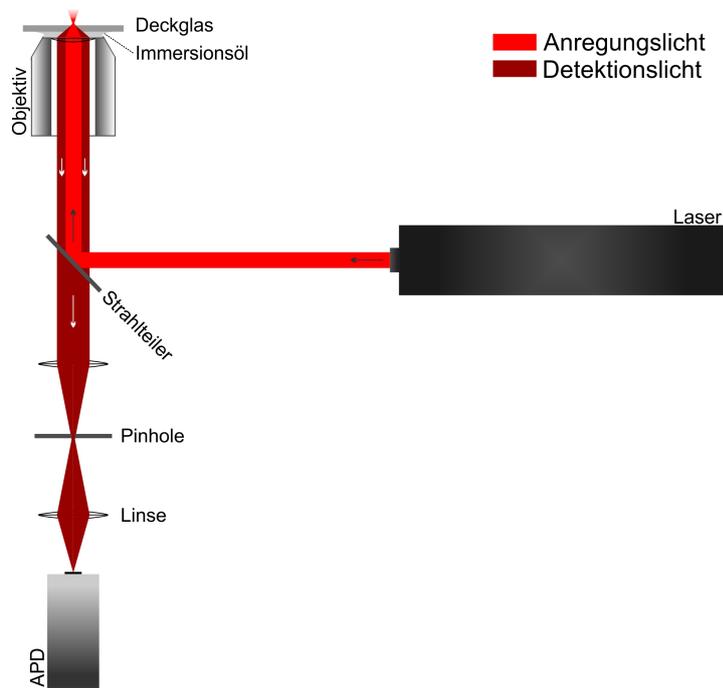
### 2.2.3 Mikroskopietechniken

In der bildgebenden Fluoreszenzmikroskopie wird eine Probe über ein Objektiv mit einer monochromatischen Lichtquelle angeregt. Die Fluoreszenzantwort der Probe wird orts- oder zeitaufgelöst detektiert. Zentrale Einheit der Fluoreszenzmikroskope ist ein inverses Mikroskop. Angeregt wird meist über einen Laser mit einer für die Probe passenden Wellenlänge. Für die Detektion wird Anregungs- und Fluoreszenzlicht über Filter spektral separiert. Die Detektoren selbst variieren je nach Auslegung des Fluoreszenzmikroskopes. Nachfolgend werden einige Standardtechniken und Einschränkungen in der Detektion der Fluoreszenzmikroskopie behandelt.

#### Konfokale Mikroskopie

Eine Standardtechnik der Fluoreszenzmikroskopie beschreibt die Konfokale Mikroskopie. Der Aufbau eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops ist in Abbildung 2.2.5 gezeigt. Das parallel verlaufende Anregungslicht wird über einen Strahlteiler in das Objektiv eingekoppelt. Von diesem wird das Licht dann in die Probe auf dem Deckglas fokussiert. Gewöhnlich werden Immersionsölobjektive mit einer Numerischen Apertur (NA) von 1,4 bis 1,45 benutzt. Das Anregungsvolumen

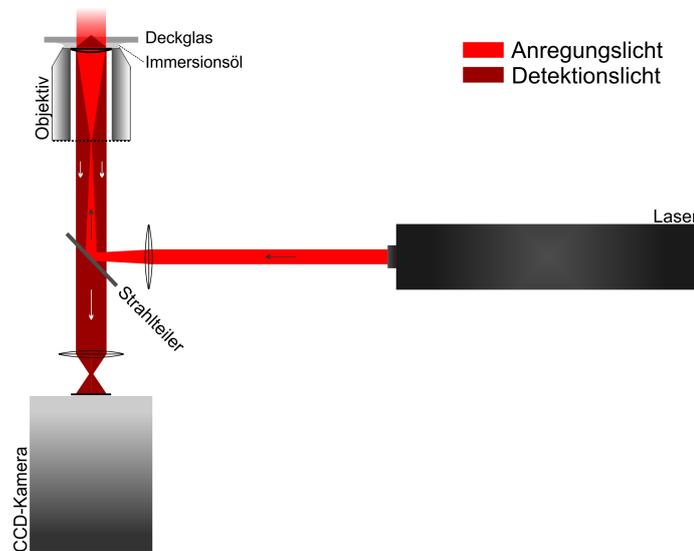
## 2 Theoretische Grundlagen



**Abbildung 2.2.5:** Schematischer Aufbau eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops

beträgt dabei typischerweise 1fl. Die Fluoreszenz wird über dasselbe Objektiv gesammelt und transmittiert nachfolgend durch den Strahlteiler. Durch eine Linse wird das Licht dann auf ein Pinhole fokussiert, welches das Detektionsvolumen axial und lateral einschränkt. Danach erfolgt eine weitere Fokussierung auf einen photosensitiven Detektor, meist auf eine sog. Photolawinendiode (Avalanche Photo Diode, APD). Diese sind i.d.R. Einzelphotonensensitiv. Mit ihnen können neben dem reinen Fluoreszenzereignis auch Lebenszeiten einzelner Farbstoffe gemessen werden.

Um ein Fluoreszenzbild der Probe auf dem Objektiv zu erstellen wird die Probe mit Hilfe eines Piezotisches Punkt für Punkt über das Anregungsvolumen geführt. Dabei kann die Probe durch den Tisch sowohl lateral als auch axial abgerastert werden.



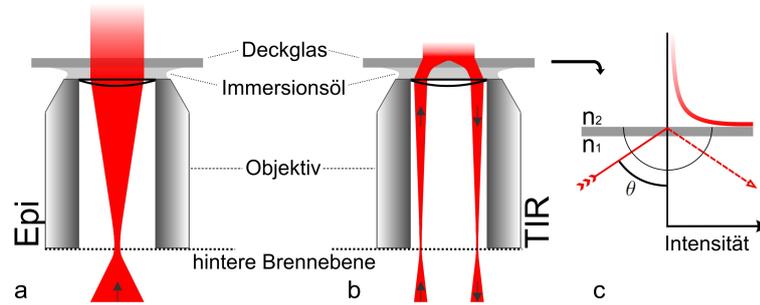
**Abbildung 2.2.6:** Schematischer Aufbau eines Weitfeldfluoreszenzmikroskops

### Weitfeldmikroskopie

Eine weitere Standardtechnik ist die Weitfeldmikroskopie (Abbildung 2.2.6). Das Anregungslicht wird dabei über den Strahlteiler auf die hintere Brennebene des Objektivs fokussiert. Dies hat den Effekt, dass das Licht aus dem Mikroskop nicht fokussiert, sondern parallel aus dem Objektiv austritt. Die Probe auf dem Deckglas wird nahezu gleichmäßig über die gesamte Fläche angeregt. Das Fluoreszenzlicht wird durch das Objektiv eingesammelt und passiert dann den Strahlteiler. Über eine Linse wird dann das Fluoreszenzbild auf einen CCD-Chip fokussiert. Es ist direkt das gesamte Bild des Anregungsbereichs sichtbar. Dabei kommen bei der Weitfeldfluoreszenzmikroskopie aufgrund des für den CCD-Chip geringen Fluoreszenzlichts sog. EMCCD-Chips zum Einsatz. Im EMCCD befindet sich hinter jedem Pixel des Chips ein Elektronenvervielfacher, der das Fluoreszenzlicht verstärkt.

Ein Problem der normalen Weitfeldanregung (Epifluoreszenz) ist die Anregung von axialen Schichten der Probe, über und unterhalb der Fokusebene. Dies bringt unerwünschte Fluoreszenz mit sich und verschmiert die Fluoreszenzbilder. Eine Möglichkeit, nur eine sehr dünne Schicht der Probe anzuregen bietet die Totale Interne Reflexion (TIR).

## 2 Theoretische Grundlagen



**Abbildung 2.2.7:** Schematische Darstellung der verschiedenen Anregungsarten in der Weitfeldfluoreszenzmikroskopie. **a)** Epifluoreszenz. Der Anregungsstrahl wird auf die hintere Brennebene fokussiert und tritt parallel aus dem Objektiv aus. **b)** Totale Interne Reflexion. Der Anregungsstrahl wird seitlich in das Objektiv geführt. Am Deckglas findet eine Totalreflexion statt und ein evaneszentes Feld breitet sich durch das Deckglas aus. Probe wird nur direkt über dem Deckglas angeregt. **c)** Totale Reflexion beim Übergang zwischen zwei Brechungsindizes und abnehmendes evaneszentes Feld.

In Abbildung 2.2.7 ist der Verlauf des Anregungslichts für die Erzeugung von TIR schematisch dargestellt. Das Anregungslicht wird seitlich im Objektiv derart geführt, dass unter dem Einfallswinkel  $\theta$  eine Totalreflexion an dem Deckglas stattfindet. Im Deckglas breitet sich ein evaneszentes Feld in Richtung Oberfläche aus. Die Intensität des Feldes nimmt ab der Oberfläche exponentiell ab und dringt so nur einige Nanometer in die Probe ein. Die Intensität des Feldes entlang der axialen Achse  $I(z)$  kann über

$$I(z) = I(0) e^{-\frac{z}{d}} \quad (2.2.8)$$

berechnet werden, wobei  $I(0)$  die Eingangsintensität und  $d$  die Abklingkonstante ist. Die Abklingkonstante hängt vom Einfallswinkel  $\theta$ , der Wellenlänge des Anregungslichts  $\lambda_0$  und den Brechungsindizes  $n_1$  und  $n_2$  ab

$$d = \frac{\lambda_0}{4\pi} (n_2^2 \sin^2 \theta - n_1^2)^{-1/2} \quad (2.2.9)$$

Die Probe wird vom evaneszenten Feld also nur dicht über dem Deckglas angeregt. Der reflektierte Anregungsstrahl wird über das Objektiv zurückgeführt. Der Nachteil der TIR-Anregung ist die Beschränkung auf Fokusebenen auf und knapp oberhalb der Oberfläche.

### Anregungsquellen

Monochromatische Lichtquellen wie Laser bieten die idealen Voraussetzungen für das Anregen von Farbstoffen. Es gibt eine große Auswahl an Wellenlängen mit einer schmalen spektralen Emissionsbreite, passend um nahezu jeden Farbstoff optimal anregen zu können. Man unterscheidet grob zwischen kontinuierlich emittierenden (continuous wave, cw) und gepulsten Lasern. Die Leistungsbandbreite reicht dabei von einigen Milliwatt (Diodenlaser) bis hin zu Werten im Watt Bereich (Gaslaser). Aber auch die LED-Technik als günstige Alternative zu Laserquellen findet zunehmend Verwendung in der Fluoreszenzmikroskopie.

### Auflösungsvermögen

Der Wellenlänge kommt bei der Abbildung von Objekten eine entscheidende Bedeutung zu. Sie entscheidet darüber, wie klein zwei Objekte sein dürfen, damit ihre Abbildung noch als zwei getrennte Objekte wahrgenommen wird. Dieser Zusammenhang wird über

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin\alpha} = \frac{\lambda}{2NA} \quad (2.2.10)$$

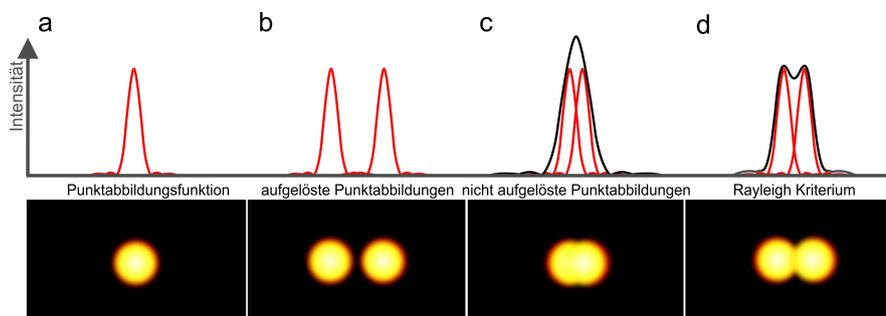
ausgedrückt, und wurde von Ernst Abbe erstmals formuliert. Dabei beschreibt  $d$  den Abstand zweier Objekte,  $\lambda$  die Wellenlänge und  $n \sin\alpha = NA$  die Numerische Apertur der Linse bzw. des Objektivs durch das die Objekte abgebildet werden.

Bildet man ein punktförmiges Objekt ab, so wird dieses durch eine Punktabbildungsfunktion (Point Spread Function, PSF) beschrieben. Diese hat ein Maximum und fällt symmetrisch wellenförmig zu den Seiten hin ab. Die wellenförmigen Fortpflanzungen werden dabei Airy-Scheibchen genannt. Mathematisch lässt sich diese über eine Besselfunktion  $J_1(r)$  1.Art 1.Ordnung beschreiben. Der Intensitätsverlauf  $I(r)$  ergibt sich dann wie folgt

$$I(r) \propto \left(\frac{J_1(r)}{r}\right)^2 \quad (2.2.11)$$

wobei  $r$  der Abstand zum Mittelpunkt des Objekts ist. In Abbildung 2.2.8 ist eine Punktabbildungsfunktion abgebildet. Gut zu sehen ist hier der Intensitätsverlauf der einzelnen PSF. Das Rayleigh Kriterium bietet einen Anhaltspunkt für die Auflösbarkeit von zwei Objekten. Hier sind zwei Objekte noch zu unterscheiden, wenn das erste Minimum

## 2 Theoretische Grundlagen



**Abbildung 2.2.8:** Punktabbildungsfunktionen und Auflösungsvermögen. **a)** Einzelne PSF und deren Intensitätsverlauf **b)** Zwei aufgelöste Punkte **c)** Zwei sehr dicht beieinanderliegende Punkte, deren resultierende Intensitätskurve nicht mehr aufgelöst werden kann **d)** Rayleigh Kriterium. Hierbei liegt das erste Minimum der PSF des zweiten Punktes gerade im Maximum des ersten. Diese beiden Punkte sind gerade noch auflösbar.

der PSF des ersten Objekts genau im Maximum der PSF des zweiten Objekts liegt. Dieser Abstand  $r$  kann berechnet werden über

$$r = 0,61 \frac{\lambda}{NA} \quad (2.2.12)$$

Zwei Objekte können also nur aufgelöst werden, wenn der Abstand zwischen ihnen  $r$  nicht unterschreitet. Dieser Wert ist allerdings ein theoretischer Wert. In der Praxis liegt das Auflösungslimit bedingt durch zusätzliche Effekte meist etwas höher.

Für konfokale Mikroskopiesysteme ändert sich der theoretische Wert bedingt durch die Einschränkung des Detektionsvolumens durch das Pinhole und liegt dann für die laterale Auflösung bei

$$r_{lateral} = 0,41 \frac{\lambda}{NA} \quad (2.2.13)$$

Die axiale Auflösung beträgt hier

$$r_{axial} = 1,41 \frac{\lambda}{NA^2} \quad (2.2.14)$$

Typische Werte für das laterale Auflösungsvermögen für Weitfeldmikroskope liegen bei  $\approx 300$  nm. Für konfokale Systeme liegen die Werte bei  $\approx 200$  nm lateral und  $\approx 600$  nm axial [Pawley, 2006].

### Hochauflösende Mikroskopietechniken

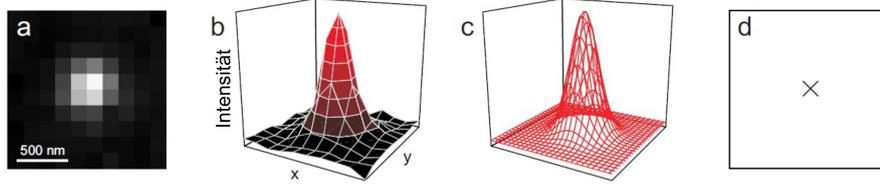
Das Auflösungsvermögen von Fluoreszenzmikroskopen begrenzt die Abbildung der Objekte. Die Untersuchung von biologischen Proben stellt die herkömmlichen Mikroskope vor eine Herausforderung, da die Dimension vieler Strukturen unterhalb der Beugungsgrenze liegen. Die Wellenlänge zu verändern wäre hier der logische Schritt, um die Auflösung zu erhöhen. Allerdings müssten dafür neue Farbstoffe entwickelt werden, die an die entsprechenden Wellenlängen angepasst werden. Das eigentliche Problem besteht hier aber in der Empfindlichkeit der Proben selbst gegen kleinere Wellenlängen wie UV- oder Röntgenstrahlung, welche die (lebenden) Organismen schädigen würden.

Um das natürliche Auflösungsvermögen von Fluoreszenzmikroskopen zu erhöhen werden diverse Techniken angewendet. Im Normalfall sind diese Techniken speziell an den Mikroskoptyp angepasst. So gibt es Techniken für konfokale Fluoreszenzmikroskopie wie "Stimulated Emission Depletion" (STED) [Klar et al., 2000], bei der zwei Laser benutzt werden. Der erste zum Anregen und der zweite zum Abregen (stimulierte Emission) der Probe. Dabei wird der zweite Laser in einer Ringform über den ersten gelegt, so dass effektiv die Anregungsfläche verringert wird. Für diese Technik sind sehr hohe Laserleistungen nötig. Die erreichbare Auflösung skaliert proportional mit der Laserleistung und liegt in der Praxis für Laserleistungen von  $\approx 1 \text{ GW/cm}^2$  bei  $< 100 \text{ nm}$  [Hell et al., 2003].

Eine weitere Technik zur Auflösungserhöhung bietet die Structured Illumination (SIM) Mikroskopie. Bei diesem Prinzip wird die Probe durch ein gleichmäßiges Streifenmuster beleuchtet. Es werden dabei für eine Aufnahme mehrere Bilder unter verschiedenen Drehwinkeln des Musters erstellt. Diese werden dann rechnergestützt zu einem hochaufgelösten Bild zusammengesetzt. Es werden hier normale Laserleistungen gebraucht. Mit Hilfe dieser Technik kann die Auflösung axial und lateral verdoppelt werden [Gustafsson, 2000].

Des Weiteren kann über das Generieren von mehreren angeregten Zuständen innerhalb der Lebenszeit der einzelnen Zustände eine Auflösungserhöhung erreicht werden. Diese Technik wird als "Quantum Dot Triexciton Imaging" (QDTI) bezeichnet. Auch hier werden relativ hohe Laserleistungen im Vergleich zur normalen konfokalen Mikroskopie gebraucht. Zusätzlich werden spezielle Fluoreszenzmarker, sog. Quantum Dots (QDots), benötigt. Diese Halbleiternanokristalle haben einen Radius von  $\approx 5\text{-}10 \text{ nm}$  und sind im Gegensatz zu konventionellen

## 2 Theoretische Grundlagen



**Abbildung 2.2.9:** Einzelmoleküllokalisierung. Das Bild (a) einer beugungsbegrenzten Punktabbildungsfunktion (b) wird mit Hilfe einer zweidimensionalen Gaußfunktion angenähert (c). Anschließend wird der Mittelpunkt bestimmt (d). [Van de linde, 2011]

Farbstoffen in der Lage mehrere angeregte Zustände (Exzitonen) zu erzeugen. Auch hier wird die Auflösung eines konfokalen Mikroskops ungefähr verdoppelt [Heidbreder et al., 2010, Hennig et al., 2009].

### Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie

Für die Weitfeldfluoreszenzmikroskopie kommen in der Regel rechnergestützte Verfahren zur Auflösungserhöhung zum Einsatz. Die meisten Verfahren wie die Photoactivated Localization Microscopy (PALM) [Betzig et al., 1991], die Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy (FPALM) [Hess et al., 2006], die Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) [Rust et al., 2006a] oder die direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (dSTORM) [Heilemann et al., 2008] beruhen auf der Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie. Das Prinzip basiert dabei auf einem Näherungsverfahren bei dem auf einer beugungsbegrenzten Abbildung eines Fluoreszenzmoleküls der Mittelpunkt mit hoher Präzision bestimmt wird. Der Mittelpunkt wird mit einer Genauigkeit ermittelt, die in direktem proportionalen Zusammenhang mit den detektierten Photonen des PSF erzeugenden Fluoreszenzemitters steht. Hierbei wird die Punktabbildungsfunktion des Moleküls mit Hilfe einer zweidimensionalen Gaußfunktion angenähert und der Mittelpunkt bestimmt (siehe Abbildung 2.2.9).

Die Gaußfunktion wird mathematisch über

$$f(x_m, y_m, A, H) = \frac{A}{2\pi\sigma_x\sigma_y} \exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-x_m}{\sigma_x}\right)^2 - \frac{1}{2}\left(\frac{y-y_m}{\sigma_y}\right)^2\right) + H \quad (2.2.15)$$

bestimmt. Dabei sind  $x_m$  und  $y_m$  die Koordinaten des Mittelpunkts,  $A$  die Amplitude,  $H$  der Hintergrund und  $\sigma_x$  und  $\sigma_y$  die Standardab-

weichung in  $x$ - bzw.  $y$ -Richtung. Da die Photonen eines Farbstoffs über einen CCD-Chip gesammelt werden, ist auch das Abbildungsverhältnis wichtig. Ein einzelner Farbstoff wird auf eine Fläche von Pixeln abgebildet, die mit Rauschen behaftet sind. Die Lokalisationsunsicherheit  $\mu$  ergibt sich zu

$$\mu = \sqrt{\frac{\sigma^2 + a^2/12}{N} + \frac{8\pi\sigma^4h^2}{a^2N^2}} \quad (2.2.16)$$

$a$  beschreibt dabei die Größe eines einzelnen Pixels (mit  $a \leq \sigma$ ) und  $h$  ist die Anzahl der Hintergrundphotonen. Zu beachten ist, dass in der Praxis eine um 30% abweichende Lokalisationsunsicherheit gegenüber dem theoretischen Wert gemessen wird [Thompson et al., 2002]. Bleibt es nicht bei einer einzelnen Bestimmung des Mittelpunkts, sondern wird die Messung über eine definierte Anzahl wiederholt, so nähern sich die einzelnen Lokalisationspunkte in ihrer Gesamtheit einer Gaußverteilung an.

Für die hochauflösende Rekonstruktion eines Fluoreszenzbildes wird eine Reihe von Bildern benötigt. Hier spielt die Photoschaltbarkeit von Farbstoffen, also die Fähigkeit zwischen einem dunklen emissionslosen und einem hellen emittierenden Zustand wechseln zu können eine große Rolle. Für eine hochaufgelöste Aufnahme wird die größte Anzahl von Farbstoffen im dunklen Zustand gehalten. Stochastisch werden jetzt über eine festgelegte Zeit immer wieder Farbstoffe ein und ausgeschaltet. Nach einer gewissen Zeit geht man davon aus, dass jeder Farbstoff im beobachteten Bereich mindestens einmal Photonen emittiert hat. Mit Hilfe eines Programms werden dann die einzelnen Bilder der Aufnahme analysiert. Hierbei werden in jedem einzelnen Bild die beugungsbegrenzten Abbildungen jedes Farbstoffs mit einer Gaußfunktion angenähert und der Mittelpunkt bestimmt. Die Gesamtzahl der Lokalisationen wird schließlich in einem resultierenden hochaufgelösten Bild dargestellt. Durch die Photoschaltbarkeit können auch unterhalb der Beugungsgrenze beieinanderliegende Photonenemitter aufgelöst werden.

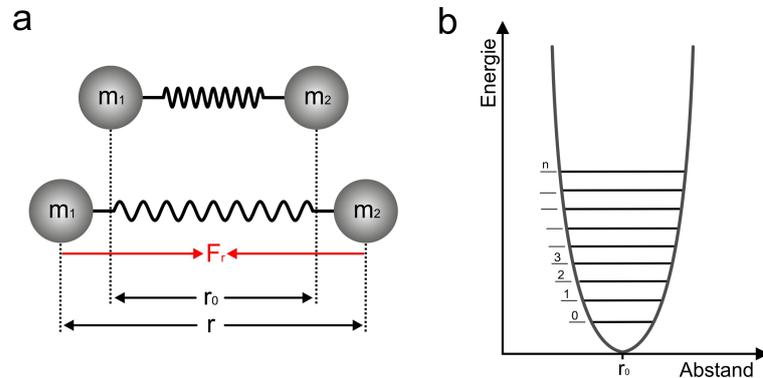
## 2.3 Raman-Spektroskopie

Eine der Standardmethoden, nicht nur in der Biophysik ist die Schwingungsspektroskopie. Mit ihrer Hilfe lassen sich schwingungsaktive Molekülverbindungen mit hoher Präzision nachweisen. Die Strukturauflösung geschieht dabei invasionsfrei allein mit elektromagnetischen Wellen. Man unterscheidet allgemein zwischen Absorptions- und Emissionsspektroskopie, aber auch zwischen den verschiedenen Anregungswellenlängen, die in den schwingungsspektroskopischen Untersuchungsmethoden zum Einsatz kommen. Dabei sind die verschiedenen Moleküle für unterschiedliche Wellenlängen schwingungssensitiv. In der Biophysik werden vor allem die Infrarotspektroskopie und die Raman-Spektroskopie angewendet. Während die Infrarotspektroskopie sich auf Wellenlängenbereiche zwischen 800 und  $10^6$  nm beschränkt und Ergebnisse über Absorptionsspektren liefert, kommen in der Raman-Spektroskopie Wellenlängen im sichtbaren Bereich von 400-800 nm zum Einsatz. Sie wurde 1928 von C.V. Raman das erste Mal beschrieben [Raman and Krishnan, 1928] und bietet eine nichtinvasive und ohne zusätzliche Markierung auskommende Methode zum Auflösen von Strukturen. Bei der Raman-Spektroskopie werden Molekülbindungen über eine Anregungsquelle in Schwingung versetzt. Dabei wird die einkommende Strahlung inelastisch gestreut und blau- bzw. rotverschoben emittiert. Es entsteht ein für das Molekül charakteristisches Spektrum. Die aktuelle Raman-Spektroskopie beschränkt sich allerdings nicht mehr nur auf die spontane Raman-Streuung, vielmehr werden einzelne Effekte und Eigenschaften ausgenutzt, die das schwache Raman-Signal generell (Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS) [Jeanmaire and Van Duyne, 1977] oder nur punktuell auf einer bestimmten Wellenlänge (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering, CARS) verstärken [Duncan et al., 1982, Cheng et al., 2002].

In diesem Abschnitt wird die Raman-Spektroskopie behandelt, sowie eine Beschreibung der physikalischen Gesetzmäßigkeiten gegeben. Es wurde dabei auf die Beschreibung von R.Winter und F.Noll [Winter and Noll, 1998] zurückgegriffen.

### 2.3.1 Molekülschwingungen

Grundlage der Raman-Spektroskopie sind Molekülschwingungen. Diese können über das Modell des harmonischen Oszillators erklärt werden. In der klassischen Mechanik ist der harmonische Oszillator aus zwei



**Abbildung 2.3.1:** a) Harmonischer mechanischer Oszillator b) Potential des harmonischen Oszillators, mit Frequenzen  $\nu = 0 \dots n$

Massen  $m_1$  und  $m_2$  aufgebaut, die mit einer Feder verbunden sind (Abb.2.3.1 a). Die Feder besitzt die Federkonstante  $k$ . Der Abstand zwischen beiden Massen wird durch  $r$  beschrieben und der Gleichgewichtsabstand in Ruhe durch  $r_0$ . Staucht oder lenkt man das System aus, so wird es in Schwingung versetzt. Auf beide Massen wirkt währenddessen durch die Feder eine rücktreibende Kraft  $F_r$ , die das System wieder in den Ruhezustand bringen will. Die rücktreibende Kraft wird durch

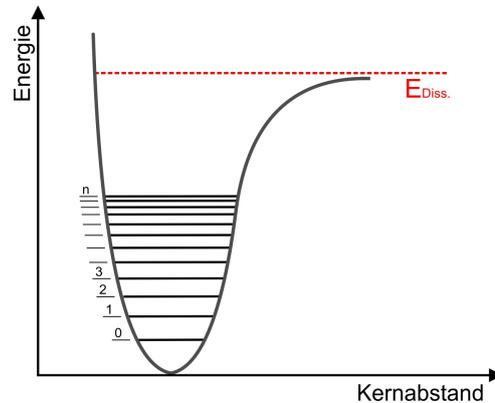
$$F_r = -k \Delta r \quad (2.3.1)$$

beschrieben. Dabei ist  $\Delta r = r - r_0$  die Strecke um die das System gedehnt bzw. gestaucht wird. Die potentielle Energie des Systems kann über

$$E_{pot} = \frac{1}{2} k \Delta r^2 \quad (2.3.2)$$

ausgedrückt werden. Dabei wird die potentielle Energie bei maximaler Auslenkung maximal und bei Durchqueren des Gleichgewichtsabstandes  $r_0$  minimal. In Abbildung 2.3.1b sind die verschiedenen Schwingungsmodi dargestellt. Rein praktisch kann man sich dort am Verlauf der Potentialkurve die Auslenkung des Oszillators vorstellen, wobei der Rand der Kurve die Umkehrpunkte darstellt. Übersetzt auf die molekulare Ebene, sind die Massen  $m_1$  und  $m_2$  zwei Moleküle, die durch eine bestimmte Bindungsart zusammengehalten werden. Die Federkonstante  $k$  entspricht dann der Bindungsstärke zwischen beiden Molekülen.

## 2 Theoretische Grundlagen



**Abbildung 2.3.2:** anharmonischer Oszillator, mit Frequenzen  $\nu = 0 \dots n$

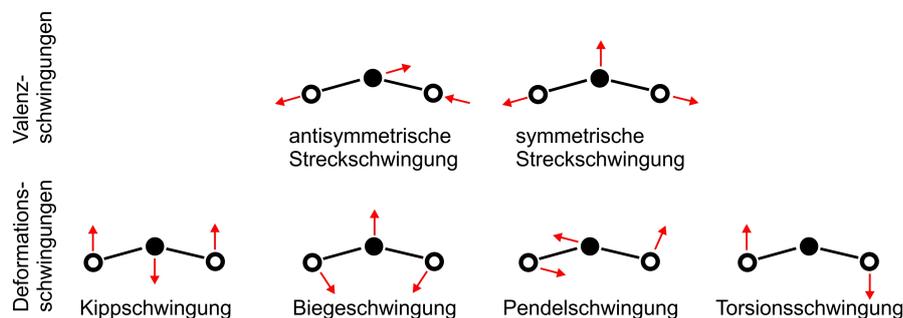
Der harmonische Oszillator wird dann zum quantenmechanischen harmonischen Oszillator. Allerdings stimmt dieser Vergleich nicht ganz, denn theoretisch kann im harmonischen mechanischen Oszillator der Abstand zwischen den Massen Null werden. Dies ist aber physikalisch bei zwei Molekülen nicht möglich. Weiterhin ist die Bindungsstärke zwischen den Molekülen, nicht konstant, sondern wird mit wachsendem Abstand kleiner, bis sich die Moleküle komplett voneinander entfernt haben und keine Bindungskraft mehr zwischen ihnen herrscht (Dissoziationsenergie  $E_{Diss}$ ). Die Potentialkurve entspricht daher einem Morsepotential (anharmonischer Oszillator), wie sie in Abbildung 2.3.2 dargestellt ist. Die Schwingungsenergiezustände können berechnet werden, indem das Morsepotential in die Schrödinger-Gleichung des linearen harmonischen Oszillators eingesetzt wird. Die Eigenwerte  $E_\nu$  der Gleichung ergeben sich dann zu

$$E_\nu = hc\omega_0(\nu + 1/2) - \frac{h^2c^2\omega_0^2}{4D}(\nu + 1/2)^2 \quad (2.3.3)$$

dabei ist  $\omega_0 = \nu_0/c$  wobei  $\nu_0$  die Eigenfrequenz,  $\nu$  die Frequenz, und  $D$  die Dissoziationsenergie des Moleküls ist. Die Eigenfrequenz  $\nu_0$  eines Moleküls wird wiederum über

$$\nu_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (2.3.4)$$

berechnet, wobei  $\mu$  die reduzierte Masse beschreibt.



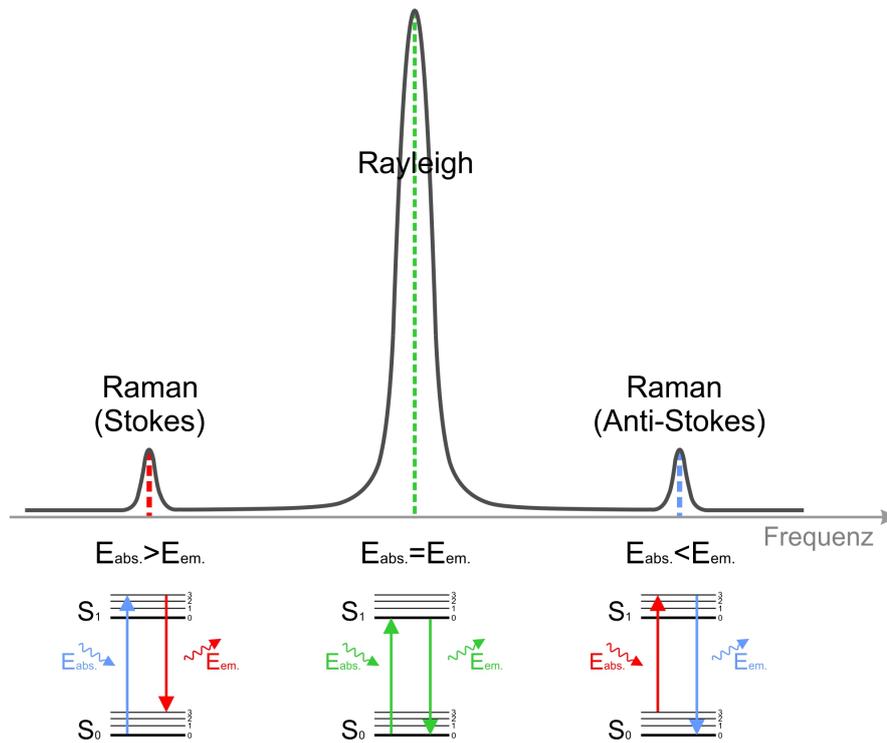
**Abbildung 2.3.3:** Typische Schwingungen eines  $\text{CH}_2$ -Moleküls [Winter and Noll, 1998]

Die Schwingungsarten, die von Molekülen ausgeführt werden können sind vielfältig. In Abbildung 2.3.3 sind verschiedene Schwingungen am Beispiel eines  $\text{CH}_2$ -Moleküls aufgeführt. Zu unterscheiden sind hier Valenz- und Deformationsschwingungen. Bei den Valenzschwingungen gibt es symmetrische und antisymmetrische Streckschwingungen. Hier erfolgt die Auslenkung der Atome aus der Ruhelage in Richtung der Bindungsachse. Unter den Deformationsschwingungen können Kippschwingungen, Biegeschwingungen, Pendelschwingungen und auch Torsionsschwingungen auftreten. Bei Deformationsschwingungen ändert sich der Bindungswinkel periodisch. Dabei bleibt der Bindungsabstand der Atome erhalten.

### 2.3.2 Spontane Raman-Streuung

Trifft Licht mit einer Frequenz  $\nu_0$  auf eine Probe, so wechselwirkt das elektrische Feld der Lichtwelle mit den Elektronenhüllen der in der Probe enthaltenen Molekülen. Der größte Teil der Strahlung geht allerdings ohne Wechselwirkung durch die Probe. Nur ein kleiner Teil wird an den Molekülen gestreut (siehe Abbildung 2.3.4). Davon ist wiederum der größte Teil ein elastischer Streuprozess. Die Frequenz der Welle bleibt dabei erhalten. Dieser elastische Streuprozess wird Rayleigh Streuung genannt. Ein kleiner Teil wird aber inelastisch an den Molekülen gestreut. Der Raman-gestreute Teil. Das Licht wird dabei in seiner Frequenz verändert. Man unterscheidet hier zwischen der Stokes-Streuung ( $\nu < \nu_0$ ) und der Anti-Stokes-Streuung ( $\nu > \nu_0$ ). Das emittierte Licht ist bei der Stokes Streuung rot- und bei der Anti-Stokes Streuung blau verschoben. Die Moleküle emittieren Licht also

## 2 Theoretische Grundlagen



**Abbildung 2.3.4:** Elastischer und inelastischer Streuprozess an einem Molekül. Der elastische Streuprozess verändert die Frequenz des Lichtes nicht (Rayleigh Streuung). Der inelastische Streuprozess verändert die Frequenz (Raman-Streuung) und wird nochmals unterschieden in Stokes Streuung (niedrigere Frequenz → Rotverschiebung) und Anti-Stokes Streuung (höhere Frequenz → Blauverschiebung). Der größte Teil des einfallenden Lichts passiert ein Molekül allerdings ohne Wechselwirkung.

### 2.3 Raman-Spektroskopie

nicht aufgrund von Absorption und Emission von Photonen, sondern allein durch einen Streuprozess.

Nicht jedes Atom bzw. Molekül reagiert schwingungssensitiv auf das einfallende Licht. Da das eingestreuete Licht mit der Elektronenhülle der Atome bzw. Moleküle wechselwirkt und diese zu erzwungenen Schwingungen anregt hängt der Streuprozess davon ab, wie leicht sich die Moleküle in Schwingung versetzen lassen. Dies hängt wiederum von der Polarisierbarkeit  $\alpha$  ab. Bei der Schwingung wird ein oszillierendes Dipolmoment  $\mu$  erzeugt

$$\mu = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (2.3.5)$$

$E_0$  ist dabei die elektrische Feldstärke, und  $\nu_0$  die Frequenz des einfallenden Lichts. Durch das oszillierende Dipolmoment emittiert das Molekül seinerseits elektromagnetische Strahlung. Die Strahlung mit der unveränderten Frequenz gegenüber der einfallenden Strahlung ist die Rayleigh Strahlung. Allerdings kann das Molekül auch mit einer Eigenschwingung  $\nu_e$  schwingen. Dabei ändert sich die Polarisierbarkeit periodisch mit der Schwingung.

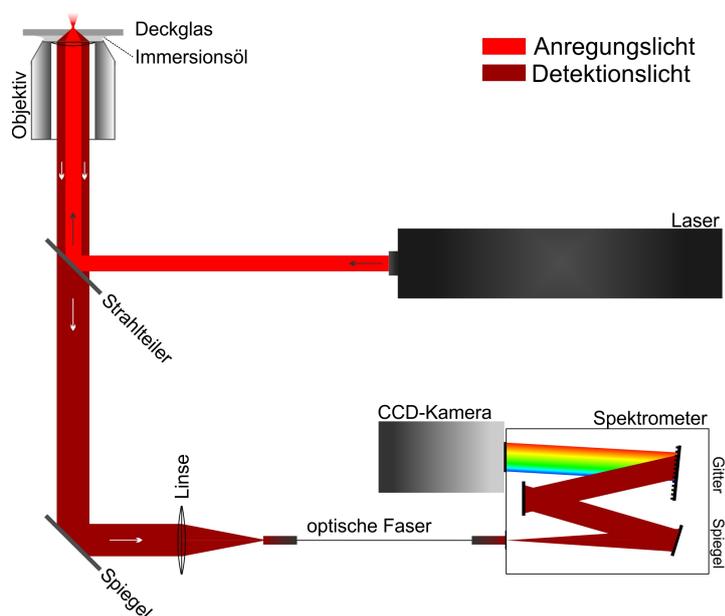
$$Q = Q_{max} \cos(2\pi\nu_e t) \quad (2.3.6)$$

$Q$  beschreibt dabei die Schwingungsbewegung entlang der Normalkoordinate. Raman-Streuung wird nur dann beobachtet, wenn sich die Polarisierbarkeit während der Schwingung des Moleküls entlang der Normalkoordinate ändert

$$\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \neq 0 \quad (2.3.7)$$

Gegenüber der Fluoreszenzmikroskopie hat die Raman-Spektroskopie Vor- und Nachteile. Einer der größten Nachteile ist sicherlich, dass die Raman-Streuung selbst sehr schwach ist. Dementsprechend wird viel Laserleistung gebraucht, um den Effekt überhaupt detektieren zu können. Des Weiteren ist bedingt durch diese Schwäche die Aufnahmedauer trotz hoher Leistungen im Gegensatz zur Fluoreszenzmikroskopie recht lang. Auch die Auflösung eines Ramanaufbaus kommt aufgrund der zumeist großen Wellenlängen nicht an die der Fluoreszenzmikroskopie heran. Typische Auflösungen liegen bei 1-2 $\mu$ m. Weiterhin müssen die Proben selbst Raman-Aktiv sein. Es gibt aber vor allem bei den biologischen Proben viele Verbindungen, die nativ ramansensitiv sind. Der größte Vorteil der Raman-Spektroskopie ist sicherlich, dass die

## 2 Theoretische Grundlagen



**Abbildung 2.3.5:** Schematischer Aufbau eines konfokalen Raman-Mikroskops. In der Abbildung ist eine Variante mit Reflexionsspektrometer dargestellt.

Raman-Streuung eine intrinsische Eigenschaft der Moleküle ist. Es ist daher keine aufwändige Markierung notwendig. Eine weitere positive Eigenschaft ist, dass das Raman-Signal zeitlich stabil ist. Es wird kein Quenching oder Bleaching beobachtet. Ebenfalls kann man eine große Anzahl von Molekülen allein durch ihr Spektrum bestimmen. So können auch kleinste Veränderungen der Stoffzusammensetzung registriert werden.

### 2.3.3 Raman-Spektrometer

Ein konfokales Raman Mikroskop unterscheidet sich bis auf einige Details im Anregungs- und Emissionsstrahlengang kaum von einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop. Einer der wenigen Unterschiede ist der zusätzliche Emissionsfilter im Anregungsstrahlengang, der gebraucht wird, um effektiv die Anregungswellenlänge und ggf. Streueffekte aus dem Detektionsstrahlengang fern zu halten. Der Hauptunterschied ist allerdings der Detektor. Anstatt einer Photolawinendiode ist hier ein Spektrometer eingebaut. Über eine optische Faser, die zusätzlich als

### 2.3 Raman-Spektroskopie

“Pinhole” fungiert wird der Detektionsstrahlengang in das Spektrometer eingekoppelt. Im Spektrometer selbst wird dann das Raman Licht auf ein Gitter projiziert. Dieses kann je nach Auslegung des Spektrometers ein Reflexions- oder Transmissionsgitter sein. Hier wird das detektierte Licht in seine spektralen Bestandteile aufgespalten und von einem CCD-Chip über eine definierte Integrationszeit detektiert. Die Kalibration eines Spektrometers erfolgt zumeist über geeignete Proben, deren Maxima genau bekannt sind und möglichst viel über den gesamten Bereich emittieren. Der Aufbau eines konfokalen Ramanmikroskops ist in Abbildung 2.3.5 gezeigt.



## 3 Material und Methoden

Die Kombination von Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie, Fluoreszenzmikroskopie und Raman-Spektroskopie bedingt eine komplexe experimentelle Umgebung, genauso wie neue Vorgehensweisen in der Probenpräparation, die auf die experimentellen Umstände zugeschnitten sind. So muss der Versuchsaufbau beispielsweise zwischen Konfokal- und Weitfeldmikroskopie umgeschaltet werden können, um zwischen hochauflösender Mikroskopie und Raman-Spektroskopie zu wechseln. Die einzelnen Komponenten, aus denen der Versuchsaufbau besteht, sowie die Materialien und Vorgehensweisen in der Probenpräparation werden in diesem Kapitel beschrieben und erläutert.

### 3.1 Experimentelle Umgebung

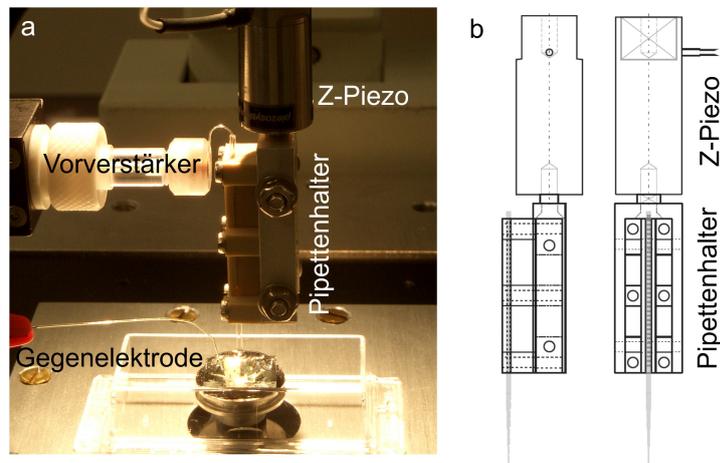
Zu einer optimierten Arbeitsumgebung gehört ebenfalls das Labor, in dem sich das Experiment befindet. Die Einrichtung des Labors sollte zweckdienlich sein und so gestaltet sein, dass es dem Experimentator eine effiziente Arbeitsweise gestattet.

Das gesamte Experiment ist auf einem schwingungsgedämpften Tisch (Newport RS-4000, Newport Corporate, Irvine CA, USA) aufgebaut, mit dessen Hilfe störende Schwingungen wie z.B. Gebäudeschwingungen oberhalb von 10Hz effektiv vom Experiment ferngehalten werden. Das Labor selbst ist mit einer Verdunkelungsanlage ausgestattet, die ein Arbeiten in einer lichtarmen Umgebung erlaubt. Um die Einstellungen der empfindlichen Optiken nicht zu verstellen verfügt der Raum über eine Klimatisierung, die eine konstante Raumtemperatur erzeugt.

### 3.2 Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie

Die zentrale Einheit, die Probenhalterung des Rasterionenleitfähigkeitsmikroskops (Scanning Ion Conductance Microscope, SICM), wird auf einem Lichtmikroskop befestigt. In direkter Nähe dazu wird die Vorverstärkereinheit des Mikroelektrodenverstärkers platziert. Durch die

### 3 Material und Methoden



**Abbildung 3.2.1:** a) Stage mit Pipettenhalter b) Schematische Darstellung des Pipettenhalters [Donnermeyer, 2007]

Nähe zur Ionenstromquelle wird das Rauschen effektiv reduziert und die Signalführung optimiert. Die benötigten Kontrollgeräte werden in einem "Rack" direkt neben dem Mikroskop angeordnet um die Kabelführung so kurz wie möglich zu halten. Es sollte allerdings darauf geachtet werden, dass die Kabel schwingungsentkoppelt zu den Geräten geführt werden. Darüber hinaus ist es wichtig die Geräte weit genug von der Probenhalterung anzuordnen, um elektromagnetische Streufelder, die die Sensitivität des Mikroskops verringern zu unterbinden. Die Rechner können beliebig platziert werden. Hier sind keine speziellen Anforderungen zu erfüllen.

#### Pipettenhalter und manuelle Verstelleinheit

Um die Nanopipette optimal über die Probe führen zu können, muss der Pipettenhalter einige Vorgaben erfüllen. So muss er, bedingt durch die axiale Oszillation, die durch einen Piezostack durchgeführt wird möglichst leicht sein. Allerdings darf er auch nicht zu klein dimensioniert sein, da die bruchempfindliche Pipette stabil, aber nicht zu fest gehalten werden darf. Die Lösung ist eine in Abbildung 3.2.1 gezeigte Eigenkonstruktion [Donnermeyer, 2007]. Die äußere Halterung ist aus Aluminium, wodurch maximale Stabilität bei geringen Gewicht erreicht wird. Der eigentliche Pipettenhalter bietet auf der gesamten Länge maximalen Halt bei minimalem Druck. Die gesamte Konstruktion wiegt

### 3.2 Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie

dabei nur 4,8 g.

Die manuelle Verstelleinheit dient gleichzeitig als Halterung für die gesamte Anordnung (Nanopipette/Halter), an der der Piezostack befestigt ist. Die Verstelleinheit (Modell M-562 XYZ ULTRAlign, Newport Corporate, Irvine CA, USA) kann die gesamte Anordnung in XYZ-Richtung bewegen. Die Mikrometerschrauben in lateraler Richtung können dabei mit einer Präzision von  $0,5\ \mu\text{m}$  positioniert werden, bei einem Gesamtstellweg von  $5,5\ \text{cm}$ . Die Höhenverstellung in axialer Richtung ist primär mit der normalen Mikrometerschraube ( $0,5\ \mu\text{m}$  Präzision,  $5,5\ \text{mm}$  Stellweg) versehen, und zusätzlich mit einer feineren Schraube, die über einen Stellweg von  $0,2\ \text{mm}$  eine präzise Positionierung von  $0,07\ \mu\text{m}$  erlaubt. Dadurch lässt sich die Pipette optimal manuell über der Probe platzieren.

#### **Piezosteuerung**

Genau und schnelle Positionierung der Probe unter der Nanopipette sind Eigenschaften, die eine hohe Stabilität und eine schnelle Rastergeschwindigkeit eines SICM ausmachen. Die Positionierung wird von einem Nanopositionierungssystem auf der Basis von piezoelektrischen Kristallen, einem sog. Piezotisch (MCL Nano-PDQ375HS, Mad City Labs, Madison WI, USA) zusammen mit der Steuereinheit (NanoDrive 85, Mad City Labs) übernommen. Der Piezotisch verfügt über einen lateralen Stellweg von  $75\ \mu\text{m}$  und einen axialen von  $50\ \mu\text{m}$ . Dabei wird eine minimale Schrittweite von  $0,1\ \text{nm}$  erreicht. Die Positionierungszeit beträgt  $2\ \text{ms}$  im Mittel. Der Scantisch verfügt über ein Rückkopplungssystem, welches die aktuelle Position des Scantisches erkennt, an die Steuereinheit weitergibt, wo sie schließlich ausgelesen werden kann. Die Steuereinheit verfügt über Standard BNC-Eingänge mit einem Eingangsbereich von  $-10\ \text{V}$  bis  $10\ \text{V}$ , der linear auf den Stellweg des Scantisches übersetzt wird. Das Rückkopplungssignal wird umgekehrt linear auf eine Ausgangsspannung von  $0-10\ \text{V}$  übersetzt.

#### **Axialer Piezoblock**

Die Oszillation der Nanopipette übernimmt ein Piezoblock PA8/12 (Piezosystem Jena, Jena, Germany). Er ist oberhalb des Pipettenhalters angebracht (vgl. Abbildung 3.2.1) und oszilliert mit der Referenzfrequenz, die vom Lock-In Verstärker vorgegeben ist. Typische Oszillationsfrequenzen für ein Experiment liegen dabei in einem Bereich von

### 3 *Material und Methoden*

1-4 kHz. Der Piezoblock muss also über ein schnelles Ansprechverhalten verfügen. Um das zu erreichen, ist der Piezoblock mit einer Feder ausgestattet, die einen internen Gegendruck auf den Piezoblock selbst ausübt. Der Block besteht intern aus einer Vielzahl von Keramikscheiben, an die die Elektroden parallel angelegt sind, um eine möglichst schnelle Reaktionszeit zu gewährleisten. Der PA8/12 ist bis Frequenzen von 20 kHz (50  $\mu$ s Reaktionszeit) ausgelegt und hat einen maximalen Verstellweg von 8  $\mu$ m. Was für die im SICM typischen Oszillationsamplituden von 50-200 nm völlig ausreichend ist. Die Steuerung des Piezoblocks wird über ein Steuergerät (ENV400, Piezosystem Jena) vorgenommen. Dieses ist eine Sonderausführung und verfügt über einen internen Steuerbereich von -10 V bis 150 V, der über eine Kalibrationskurve mit einer Eingangsspannung von 0 bis 10 V am BNC-Eingang gesteuert wird. Die interne Spannung von -10 V bei einer angelegten Eingangsspannung von 0 V ermöglicht eine Oszillation um den Nullpunkt.

#### **Mikroelektrodenverstärker**

Die Spannung zwischen Elektrode und Gegenelektrode wird von einem Mikroelektrodenverstärker Axopatch200B (Axon Instruments, Molecular Devices Corp., Union City, USA) bereitgestellt. Gleichzeitig wird über diesen mit Hilfe eines Vorverstärkers (CV203BU, Axon Instruments) der Ionenstrom zwischen beiden Elektroden gemessen. Der Vorverstärker wird direkt auf dem Mikroskop in unmittelbarer Nähe der Nanopipette positioniert und wandelt den detektierten Strom linear in eine Spannung um. Dadurch wird die Signalstärke und die Detektionsgenauigkeit des Ionenstroms maximiert. Um Rauschen effektiv zu unterdrücken wird der Vorverstärker über ein Peltier-Element auf eine Temperatur von -25°C gekühlt.

Die maximale Spannung, die der Mikroelektrodenverstärker zur Verfügung stellt, liegt zwischen -1 V und 1 V mit minimalen Schrittweiten von 1 mV. Der Ionenstrom wird dabei zwischen -18 und 18 nA gemessen. Um den Ionenstrom zu normalisieren, steht ein "Offset" in einem Bereich von  $\pm 250$  mV zur Verfügung. Das vorhandene Rauschen erzeugt einen Fehler in der Ionenstrommessung von  $\approx 1,6$  pA. Der Mikroelektrodenverstärker dient als Erdungspunkt für sämtliche Komponenten des Experiments. An ihm werden über den auf der Rückseite verfügbaren Anschluss alle Erdungsleitungen zusammengeführt, um Rauschen, Brummen und andere Störquellen zu beseitigen (vgl.

### 3.2 Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie



**Abbildung 3.2.2:** Stanford Research Systems Modell SR830 digitaler Lock-In Verstärker [SRS, 2002]

Kapitel 2.1.6). Die Steuerung der Spannung und das Auslesen des Ionenstroms erfolgt über jeweils einen Anschluss auf der Rückseite des Geräts. Hierzu muss der Schalter auf der Vorderseite des Geräts auf “External Command” gesetzt werden.

#### Lock-In Amplifier

Die Detektion des Ionenstroms erfolgt über einen Lock-In Verstärker der Firma Stanford Research System (SRS), Modell SR830 (Stanford Research Systems, Sunnyvale CA, USA). Dieser Lock-In Verstärker (Lock-In Amplifier, LIA) arbeitet mit einem digitalen Signalprozessor und zwei Kanälen. Dadurch steht, unabhängig von der Phasenverschiebung zwischen Referenzsignal und Messsignal, immer das maximale Signal zur Verfügung (vgl. Kapitel 2.1.4). Neben der Detektion erzeugt er außerdem das Referenzsignal. Der LIA ist dabei in der Lage, Referenzsignale von Rechteck-, Dreieck- und Sinusform zu erzeugen. Die Amplitude ist hier von 4 mV bis 5 V wählbar. Das Signal selbst wird digital mit einer Geschwindigkeit von 4  $\mu$ s (256 kHz) berechnet. Die Frequenz kann zwischen 1 mHz und 100 kHz in 1 mHz Schritten gewählt werden. Aufgrund der digitalen Signalverarbeitung sind höhere Frequenzen nicht möglich. Dafür sind digital arbeitende LIA in vielen Fällen rauschärmer als analoge. Dies ist dem Umstand geschuldet, dass die Flankensteilheit der digitalen Filter in einem LIA größer ist, als die der analogen Filter. Es kann dadurch z.B. der Tiefpassfilter, der durch eine Zeitkonstante eingestellt wird, schneller (also mit kleinerer Flankensteilheit) eingestellt werden als ein analoger LIA bei gleicher Referenzfrequenz.

### 3 Material und Methoden

Die Eingangsempfindlichkeit für die Detektion des Messsignals reicht von 2 nV bis 1 V in Schritten von jeweils 1, 2, 5, 10. Typischerweise wird für SICM-Messungen eine Eingangsempfindlichkeit zwischen 20 und 100 mV gewählt. Dies hängt aber sehr von den experimentellen Umständen ab. Über die Zeitkonstante wird die Filterbandbreite des Tiefpassfilters in Abhängigkeit von der Referenzfrequenz gewählt. Er besteht aus einem einfachen Dämpfungsglied (RC-Glied) und separiert das durch die Referenzfrequenz alternierende (ac) Signal vom Messsignal, welches eine konstante (dc) Amplitude hat. Dabei ist bei konstantem Widerstand  $R$  und Kapazität  $C$  die Dämpfung umso wirkungsvoller, je größer die Frequenz des Eingangssignals ist. Die Zeitkonstante ist dabei  $t = 1/2\pi f$  bzw.  $t = RC$ , wobei  $f$  die Frequenz ist, bei der das Eingangssignal um 3 dB durch das RC-Glied abgeschwächt worden ist (Grenzfrequenz bzw. "cutoff frequency"). Anders gesagt: Führt man einen Spannungssprung (z.B. von 0→1 V) am Eingang des RC-Glieds durch, so ist die Antwort des Ausgangssignals eine Exponentialfunktion, die sich der Eingangsspannung in einer bestimmten Zeit  $t$  annähert. Diese Zeit ist die Zeitkonstante  $t$ . Die Flankensteilheit solcher Tiefpassfilter beträgt typischerweise 6 dB/oct. Im SR830 sind mehrere Tiefpassfilter hintereinandergeschaltet. Die Flankensteilheit der Filter kann über die Funktion "Filter Slope/Oct" gewählt werden. Zur Verfügung stehen hier die Werte 6/12/18/24 dB. Die Zeitkonstante kann zwischen 10  $\mu$ s und 30 sec (bzw. bis 500 min unterhalb von einer Referenzfrequenz von 200 Hz) gewählt werden. Die Schritte, die zur Verfügung stehen, folgen dabei einer 1, 3, 10, 30, 100, 300 Einstellung in den jeweiligen Bereichen. Zusätzlich können sehr schmalbandige Filter sog. "Notch-Filter" bei 50/60 Hz und 100/120 Hz gesetzt werden, um Störsignal aus dem Stromnetz zu eliminieren. Typische Zeitkonstanten für SICM-Experimente liegen zwischen 300  $\mu$ s und 3 ms. Die Zeitkonstante muss dabei aber immer in Abhängigkeit der Referenzfrequenz gewählt werden. Grundsätzlich gilt: Je höher die Referenzfrequenz gewählt ist, desto kleiner kann die Zeitkonstante sein.

Das Ausgangssignal wird über die zwei Kanäle  $X$  und  $Y$  des LIA berechnet. Dabei wird das Gesamtsignal  $R$  über

$$R = \sqrt{X^2 + Y^2} \quad (3.2.1)$$

berechnet. Auf dem Display des LIA kann jeweils  $X$ ,  $Y$ , oder  $R$  bzw., die Phasenverschiebung angezeigt werden. Die Displays werden dabei mit einer Rate von 512 Hz aktualisiert. Die tatsächliche Aktualisierung

### 3.2 Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie

des Ausgangssignals an den BNC-Anschlüssen des LIA beträgt dabei 100 kHz. Obwohl der LIA das Gesamtsignal zur Verfügung stellen kann, wird für das SICM-Experiment  $X$  und  $Y$  getrennt abgegriffen und erst im Echtzeitrechner über Formel 3.2.1 zum Gesamtsignal  $R$  berechnet.

## Hardware/Software

### Hardwarecontroller

Die Hardware zur Steuerung des Experiments besteht aus zwei Rechnern. Dem Hauptcomputer (HPC) und dem Echtzeitcomputer (RTC). Dabei kommt dem Hauptcomputer die Aufgabe der Schnittstelle zwischen Experimentator und Experiment zu. Hier werden alle wichtigen Eingaben (Scanbereiche, Auflösung bzw. Schrittweite des Scans) und Einstellungen (Spannung zwischen den Elektroden, sämtliche Einstellungen für den LIA wie Referenzfrequenz, -amplitude, Eingangsempfindlichkeit, Zeitkonstante und Einstellungen für die Regelsoftware auf dem RTC) für das Experiment vorgenommen. Während und nach dem Experiment werden die Messdaten vom RTC auf den HPC transferiert. Als Hauptcomputer dient ein handelsüblicher PC mit Microsoft Windows Betriebssystem.

Verbunden ist der HPC über eine TCP/IP-Schnittstelle mit dem RTC. Der RTC (PXI-1031 mit einer Messkarte NI-PXI6259, National Instruments Corp., Austin TX, USA) verfügt über einen P4-Prozessor mit 2,2 GHz und 1 GB Arbeitsspeicher. Auf ihm arbeitet ein NI-eigenes Betriebssystem (RT-OS), welches allein für die Ausführung der Regelsoftware des SICM zuständig ist. Er dient als Knotenpunkt für alle Variablen, die während des Experiments gesteuert werden müssen. Zum Start des Experiments werden alle Einstellungen, die im HPC vorgenommen wurden, auf den RTC transferiert. Die Steuerung des Experiments erfolgt mit einer Genauigkeit von 16bit bei einer Regelspannung von -10 V bis 10 V. Als Regelschritte stehen also  $2^{16}$  Schritte zur Verfügung. Für die Genauigkeit des Experiments bedeutet dies, dass eine Schrittweite von

$$\frac{20\text{V}}{2^{16}} = 305\mu\text{V} \quad (3.2.2)$$

als minimale Schrittweite zur Steuerung des Experiments zur Verfügung steht. Die Eingangsempfindlichkeit beträgt ebenfalls 16bit, was in derselben Spannungssensitivität resultiert. Die Piezostage selbst ist

### 3 Material und Methoden

damit in der Lage, die Spitze in Schrittweiten von minimal 0,61 nm über die Oberfläche einer Probe zu führen.

#### Software

Die Steuerung des SICM selbst geschieht über Software, die in LabView (Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench) geschrieben ist. LabView wird von National Instruments entwickelt und vertrieben. Diese Software basiert auf einem visuellen Programmieransatz, bei dem Routinen durch verschiedene virtuelle Instrumente dargestellt werden. Verknüpft werden diese durch virtuelle Kabel. Die erstellten Programme haben die Endung “.vi” und stellen für LabView ausführbare Routinen dar. Die Steuerung des gesamten SICM erfolgt über eine Software geschrieben in LabView, Version 8.2. In diesem Kapitel wird ein kurzer Abriss über die grundlegenden Funktionen gegeben. Für ein ausführlicheres, tieferes Verständnis der Software sei auf [Donnermeyer, 2007] Kapitel 4.1.1 verwiesen.

Die Software besteht aus zwei Teilen und wird auf den zwei Systemen HPC und RTC parallel ausgeführt. Die Kommunikation der Softwareteile erfolgt über eine TCP/IP Schnittstelle. Dabei sind Eingaben durch den Experimentator grundsätzlich nur auf dem HPC-Teil erlaubt. Die HPC-Software ist in 5 Modi unterteilt: “INI” (Startmodus), “CONF” (Ruhemodus oder auch Eingabemodus), “APP” (Annäherungsmodus), “SCAN” (Scanmodus oder Arbeitsmodus) und “STOP” (Stoppmodus oder Abschaltmodus).

Der “INI” oder Startmodus wird direkt nach dem Starten der Software ausgeführt. Es ist also die erste Routine, die die Software durchläuft. Hier werden Einstellung und Werte, wie z.B. die letzten gespeicherten Einstellungen des SICM, aus einer Konfigurationsdatei gelesen. Der Kontakt zwischen den beiden Programmteilen wird hergestellt und synchronisiert. Der Nutzer kann in dieser Phase keine Einstellungen am Programm vornehmen. Danach bekommt das Programm die Anweisung sich in den “CONF” Modus zu begeben.

Im “CONF” Modus sind Einstellungen durch den Nutzer zugelassen. Die Einstellungsmöglichkeiten sind vielfältig und können über die verschiedenen Reiter im Hauptfenster vorgenommen werden. Gleichzeitig wird der Status des SICM über Information des Ionenflusses, Lock-In Signal, Phaseninformation von Referenz- und Messsignal dargestellt. Die verschiedenen Reiter enthalten alle Steuerungsoptionen für die unterschiedlichen Komponenten des SICM. Im Reiter “Data Acquisition”

### 3.2 Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie

können Einstellungen für den Speicherort der Dateien gemacht werden. Der Reiter "Network" enthält Informationen über die Kommunikation beider Programmteile. "Image" enthält alle wichtigen definierbaren Parameter für die Aufnahme des topographischen Bildes. Im "PCA" Reiter kann die Spannung des Mikroelektrodenverstärkers in 10 mV Schritten festgelegt werden. Der "LIA" Reiter enthält Einstelloptionen für die Referenzfrequenz und -amplitude (in nm), Eingangssensitivität und Zeitkonstante. "Scan Dynamics" lässt eine genaue Definition der Höhenkontrolle der Spitze und die Geschwindigkeit mit der beide Programmteile arbeiten zu. In "FileIO" lassen sich Standardwerte für die Konfigurationsdatei abspeichern.

Der Annäherungsmodus "APP" nähert die Spitze der Nanopipette über die Software bis auf wenige Nanometer an die Oberfläche an. Dabei beträgt der maximale Verstellweg 50µm. Die Annäherung erfolgt über die Beobachtung der Änderung im Lock-In Signal. Liegt diese Änderung über dem vom Nutzer eingestellten Wert (Threshold) gilt die Spitze als an die Oberfläche angenähert. Nach einer erfolgreichen Annäherung an die Oberfläche wechselt die Software automatisch in den "CONF" Modus.

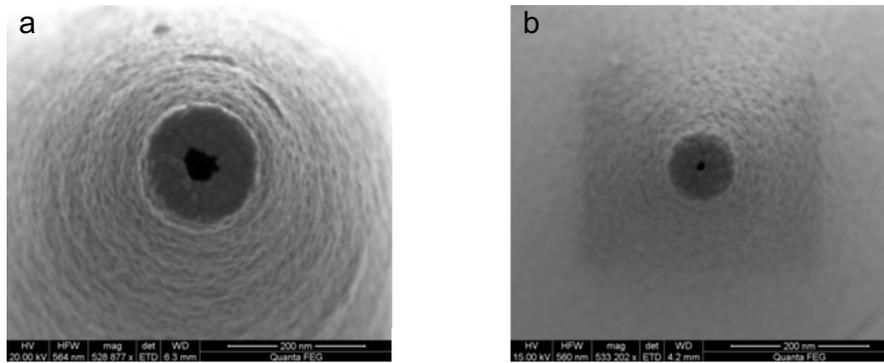
Der Hauptarbeitsmodus eines SICM ist der "SCAN" Modus. Hier wird die Messung mit den vorher definierten Parametern gestartet, das topographische Bild der Probe während der Messung zeitnah erstellt und die Messung - wenn nötig - abgebrochen. Nachdem die Messung beendet ist, geht die Software in den "CONF" Modus.

Die finale Darstellung, ggf. Korrektur und Analyse der topographischen Daten erfolgt in einem in Matlab (The MathWorks, Inc., Natick MA, USA) geschriebenen Programm. Hier ist eine 2D oder 3D Darstellung der aufgenommenen Daten möglich.

### **Plexiglashaube und Faraday-Käfig**

Da der Ionenstrom zwischen Elektrode und Gegenelektrode sehr klein ist, muss ein Höchstmaß an Vorkehrungen getroffen werden um einen störenden Einfluss aus der Umgebung zu unterbinden. Daher befindet sich um den gesamten sensitiven Teil der Versuchsanordnung auf dem Mikroskop ein Faradayscher Käfig. Dieser hält elektromagnetische Strahlung ab, die von Deckenbeleuchtung oder anderweitigen Störquellen erzeugt wird (vgl. Kapitel 2.1.6). Um den Einfluss durch Luftbewegungen zu unterbinden wird der gesamte Bereich durch einen Plexiglasten abgeschirmt, der per Magnethalter befestigt ist. So kann

### 3 Material und Methoden



**Abbildung 3.2.3:** SEM Bilder der Pipettenöffnung: **a)** 60 nm Borosilikatglas-Nanopipette, **b)** 20 nm Quarzglas-Nanopipette [Chen et al., 2012]

ein mechanischer Einfluss auf die Nanopipette durch Luftbewegungen ausgeschlossen werden.

#### 3.2.1 Vorbereitung der Nanopipetten

Zwei Arten von Nanopipetten kommen bei den Experimenten zum Einsatz: Quarzglaspipetten mit einem Öffnungsdurchmesser von  $\approx 20$  nm und Borosilikatglaspipetten mit einem Öffnungsdurchmesser von  $\approx 60$  nm. Ausgangsmaterial für die Nanopipetten sind zylinderförmige Glaskapillare mit einem Außendurchmesser von 1 mm und einem variablen Innendurchmesser. Zum Einsatz kommen durchweg Glaskapillare mit einem Innendurchmesser von 0,58 mm. Nanopipetten aus Quarzglas werden aus den Kapillaren QF100-70-7.5 mit einer Länge von 70 mm (Science Products GmbH, Hofheim, Germany) hergestellt. Für Borosilikat-Nanopipetten wurden Glaskapillare mit einer Länge von 80 mm der Firma Science Products (Best.Nr. GB100F-8P, Science Products GmbH) benutzt. Die Pipetten werden mit einem Pipettepuller P-2000 (Sutter Instruments, Novato CA, USA) gezogen. Dieser verfügt über einen  $\text{CO}_2$  Laser und erhitzt die eingespannten Glaskapillare auf einen vordefinierten Wert. Danach wird die Kapillare auseinandergezogen. Es entstehen zwei Nanopipetten, die sehr identisch in ihren Eigenschaften sind ( $\approx 5\%$  Abweichung). Dabei hat der Pipettepuller verschiedene Parameter (HEAT, FILAMENT(FIL), VELOCITY(VEL), PULL und DELAY(DEL)) deren Werte genau definiert werden müssen, um im Ergebnis eine Nanopipette mit einem bestimmten Öffnungsdurch-

### 3.2 Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie

messer zu bekommen Instruments [1999]. Die Programme, die benutzt wurden enthalten folgende Parameter:

HEAT	FIL	VEL	DEL	PULL
350	3	30	220	
330	2	27	180	250

Tabelle 3.2.1: 60nm Borosilikat-Nanopipette. Parameter für den P-2000 Pipettepuller

HEAT	FIL	VEL	DEL	PULL
650	4	40	160	190

Tabelle 3.2.2: 20nm Quarzglas Nanopipette. Parameter für den P-2000 Pipettepuller [Chen et al., 2012]

Bevor die Glaskapillare in den Puller eingespannt werden, müssen sie mit Methanol gereinigt werden, um eventuelle Verschmutzungen zu entfernen. Diese können beim Ziehprozess ungewollte Effekte haben und die Qualität der Nanopipette negativ beeinflussen und bei einer späteren Messung einen leitenden Kanal an der Außenseite der Nanopipette bilden, der den Ionenstrom verfälscht.

Das Befüllen der Nanopipette gestaltet sich nicht immer einfach. Grundsätzlich sind Glaskapillare mit Filament zu bevorzugen. Diese verschmälern zwar den Innendurchmesser ein wenig, sorgen aber dafür, dass die Flüssigkeit in der Nanopipette bis zur Öffnung vordringt. Die Nanopipetten werden von hinten mit einer handelsüblichen Pipette, welche mit einem Microloader (Best. Nr. 5242956.003, Eppendorf, Hamburg, Germany) kombiniert ist befüllt. Über die Pipette werden 20  $\mu$ l der Lösung eingezogen. Danach wird der Microloader bis  $\approx 2$  mm vor die Spitze in die Nanopipette eingeführt. Die Nanopipette wird bei diesem Prozess nahezu waagrecht gehalten. Es wird dann ein wenig der Lösung in die Nanopipette injiziert. Der injizierte Teil wandert aufgrund von Kapillarkräften nach einem Moment in die Spitze und füllt diese bis zur vorderen Öffnung. Dann wird der Microloader soweit wie möglich nach vorne in die Spitze geschoben, ohne die Spitze der Nanopipette zu beschädigen. Der Rest der Flüssigkeit wird daraufhin langsam appliziert und dabei der Microloader langsam nach hinten gezogen, bis die gesamte Nanopipette mit der Lösung gefüllt ist. Über eine visuelle

### 3 Material und Methoden

Kontrolle kann festgestellt werden, ob der Füllprozess erfolgreich war. Sollte die Lösung nicht bis ganz in die Spitze der Nanopipette vorgedrungen sein, kann die Nanopipette senkrecht mit der Spitze nach unten gehalten, und zwischen den Fingern gedreht werden. Dadurch löst sich oftmals die in der Spitze vorhandene Luftblase und wandert zum hinteren (oberen) Ende der Nanopipette. Die Spitze ist nun vollständig befüllt.

#### 3.2.2 Annäherung der Nanopipette an die Oberfläche

Bedingt durch den Umstand, dass die piezoelektrische Steuerung des SICM einen axialen Verstellweg von nur 50  $\mu\text{m}$  aufweist, muss die Spitze für die softwarebasierte Annäherung innerhalb dieses Bereiches gebracht werden. Optimalerweise wird die Pipette per Hand 20  $\mu\text{m}$  über die Oberfläche positioniert, damit eine optimale softwaregesteuerte Annäherung auf Messdistanz (ca. 100 - 150 nm) erfolgen kann.

Die mechanische Annäherung erfolgt dabei mit Hilfe der manuellen Verstelleinheit (vgl. 3.2 "Pipettenhalter und manuelle Verstelleinheit"). Ist die Nanopipette in den Pipettenhalter eingefügt und an den Cantilever der manuellen Verstelleinheit befestigt, wird die Nanopipette mit dem Auge grob über der Probe positioniert. Dann wird mit Hilfe des Fokusverstellrades an der Seite des Mikroskops über visuelle Kontrolle durch das Okular die Fokusebene auf die Oberfläche gelegt. Danach werden am Mikroskop die beiden Okularlinsen herausgenommen. Der Arm für die Mikroskopbeleuchtung wird ganz herangezogen und die Beleuchtung wird auf etwa 1/3 Helligkeit gestellt. Beim Hindurchblicken ohne die beiden Linsen entsteht ein sehr verzerrtes Bild der Pipette, die nun von unten durch das Objektiv sichtbar ist. Durch die senkrechte Beleuchtung ist die Spitze der Nanopipette sehr gut zu erkennen. Die Spitze wird mit Hilfe der Verstelleinheit genau in die Mitte des Bildes geschoben. Danach wird über die Z-Mikrometerschraube die Pipette langsam abgesenkt. Das Bild der Spitze wird etwas unscharf und die Spitze verschiebt sich im Sichtfeld etwas. Dies wird über die X-Y-Schrauben korrigiert. Wenn die Spitze – bedingt durch die Unschärfe – etwa das dreifache ihres ursprünglichen Durchmessers erreicht hat wird das Absenken der Spitze durch die Z-Schraube gestoppt. Die Okularlinsen werden nun wieder eingesetzt und der Beleuchtungsarm vorsichtig nach hinten gedrückt. Die Fokusebene wird nun 30  $\mu\text{m}$  oberhalb der Oberfläche gewählt (Markierung am Verstellrad) und die Beleuchtungsstärke auf ungefähr 2/3 erhöht. Nun wird die Spitze lang-

### 3.2 Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie

sam mit Hilfe der Z-Schraube in Richtung der Oberfläche bewegt. Nach einer bestimmten Distanz kann man immer wieder durch "Pendelbewegungen" an der X-Schraube kontrollieren, ob ein Schatten, der durch die Nanopipette verursacht wird im Bild zu sehen ist. Es muss aber darauf geachtet werden, dass die X-Schraube immer wieder auf ihren Ausgangspunkt zurückgestellt wird. Wenn der Schatten sichtbar ist, wird der Anfang des Schattens durch Repositionierung der lateralen Schrauben immer in der Mitte des Bildes gehalten, während die Spitze weiter abgesenkt wird. Nach einigen  $\mu\text{m}$  ist nun ein klares Bild der Spitze zu sehen. Dies wird durch weiteres – vorsichtiges – Absenken weiter scharf gestellt. Die Spitze befindet sich nun in der Fokusebene 30  $\mu\text{m}$  über der Oberfläche. Es ist dem Nutzer überlassen, ob er die Distanz um weitere 10  $\mu\text{m}$  auf 20  $\mu\text{m}$  verringert. Dies geschieht, indem am Mikroskop die Fokusebene 10  $\mu\text{m}$  weiter nach unten verlagert wird. Die Spitze wird dann mit Hilfe der feinen (!) Z-Schraube wieder auf die Fokusebene scharfgestellt.

#### 3.2.3 Vorbereitung der Elektroden

Um den Ionenstrom zu erzeugen sind chlorierte Silberelektroden notwendig (vgl. Kapitel 2.1.2). Die Elektrode an der Nanopipette wird dabei aus einem TFE-überzogenen Silberdraht (Best.Nr. 786500, A-M Systems Inc., Carlsborg WA, USA) hergestellt. Der Draht selbst hat einen Durchmesser von 200  $\mu\text{m}$ , die TFE Beschichtung noch einmal 80  $\mu\text{m}$ . Ein Stück mit einer Länge von ca. 4 cm wird zur Herstellung der Elektrode benötigt. Dieses wird auf einer Länge von 0,5 cm vom TFE abisoliert. Danach wird der Draht mit der nicht abisolierten Seite in ein Natriumhypochlorid (NaOH)-Bad getaucht. Der Silberdraht wird in dem Bad für 30 min chloriert. Nachdem der Draht chloriert ist, wird dieser an der abisolierten Seite auf einer Länge von 2 mm mit Hilfe einer Pinzette um 90° gebogen und anschließend derart in die Halterung des MEA montiert, dass die chlorierte Seite in die Nanopipette eingeführt werden kann. Dabei ist Vorsicht geboten, dass die chlorierte Seite des Drahts nicht berührt wird. Die Gegenelektrode (Model E-205 Ag/AgCl-Pellet, In Vivo Metric, Healdsburg CA, USA) ist bereits fertig chloriert und bedarf keiner Behandlung. Sie wird einfach in die Krokodilklemme am MEA eingespannt. Das andere Ende mit dem Pellet wird in der Elektrolytlösung positioniert. Für die Experimente zur hochpräzisen Farbstoffablage wurde eine Gegenelektrode verwendet, die der Elektrode in der Herstellung gleichkommt. Die Länge dieser

### 3 Material und Methoden

Gegenelektrode liegt bei 6 cm. Der abisolierte Teil bei 2 cm. Die Gegenelektrode wird ebenfalls in die Krokodilklemme eingespannt und der chlorierte Teil in die PVA-G-C Schicht platziert.

## 3.3 Weitfeldfluoreszenzmikroskop

In der Weitfeldfluoreszenzmikroskopie wird ein Anregungsstrahl auf die hintere Brennebene eines Objektivs fokussiert (Abb. 3.6.1). Der Anregungsstrahl beleuchtet annähernd gleichmäßig eine Probe auf einer definierten Fläche. Das Fluoreszenzsignal der Probe wird durch dasselbe Objektiv auf einem CCD-Chip detektiert. Als Basis dient ein invertiertes Lichtmikroskop, in das der Anregungsstrahl eingekoppelt wird. Über einen Strahlteiler wird das Fluoreszenzlicht vom Anregungslicht spektral getrennt und dann detektiert. Das verwendete Fluoreszenzmikroskop stellt einen Eigenbau aus verschiedenen kommerziell erhältlichen Komponenten dar, die sorgfältig aufeinander abgestimmt sind. Die laterale Auflösung des gesamten Systems beträgt  $\approx 280$  nm FWHM für die hauptsächlich verwendete Anregungswellenlänge von 647 nm. Über einen AOTF können verschiedene Wellenlängen gewählt werden. Der verwendete Aufbau ist in Abbildung 3.6.1 dargestellt.

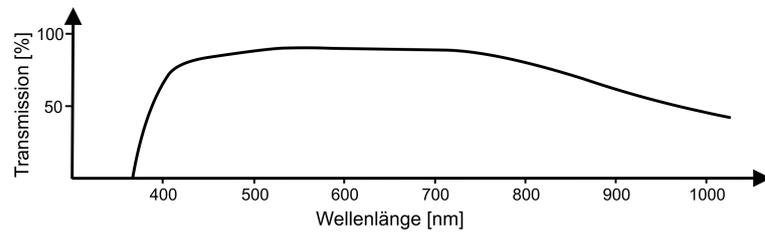
### Anregungsquellen

Als primäre Anregungsquelle für die Fluoreszenzexperimente dient ein Argon Krypton Ionen Laser (ArKr<sup>+</sup>-Laser) 70C-Spectrum der Firma Coherent (Coherent Inc. Santa Clara, CA, USA). Der Laser hat eine Gesamtleistung von  $\approx 2,5$  W (Multiline "Whitelight"-Modus). Der Strahldurchmesser liegt an der Austrittsstelle bei 1,5 mm. Die Laserlinien, die zur Verfügung stehen sind folgende:

Wellenlänge [nm]	752	647	568	531	521	514	488	476	458
Intensität [mW]	30	250	150	130	130	250	250	100	30

Tabelle 3.3.1: Laserlinien des ArKr<sup>+</sup>-Lasers [Coherent, 2011]

Die einzelnen Laserlinien werden über einen Acousto Optical Tunable Filter (AOTF) der Firma A-A Opto Electronic Modell "AOTFnC-VIS-TN" mit 97-98% Effizienz separiert. Die Fluoreszenzmessungen wurden dabei hauptsächlich mit der 647 nm Emissionslinie durchgeführt.



**Abbildung 3.3.1:** Transmissionskurve des Olympus APO N 1,49NA/60x Immersionsölobjektiv [Quelle: Olympus Inc.]

Alternativ steht ein Diodenlaser mit 643 nm i-Beam smart (TOP-TICA Photonics AG, Germany), mit 150 mW maximaler Leistung zur Verfügung. Der Laserstrahl wird dabei direkt in eine Faser eingekoppelt. Über einen Auskoppler mit 2 mm Strahldurchmesser wird der Laser in das Gesamtsystem eingebunden.

#### Mikroskop

Als Basis dient ein inverses Fluoreszenzmikroskop IX71 der Fa. Olympus (Olympus, Tokio, Japan). Es verfügt über verschiedene Ein- und Ausgänge und bietet für die Fluoreszenzmikroskopie optimale Bedingungen. Zur Verfügung stehen ein Seiteneingang über den Strahlteilerhalter (nachträglich implementiert), ein hinterer Eingang, ein Seitenausgang, sowie ein Ausgang an der unteren Seite des Mikroskops. Für die Fluoreszenzmikroskopie wird der Eingang über den Strahlteilerhalter genutzt. Über diesen gelangt das Anregungslicht über den Strahlteiler direkt in das Objektiv. Als Objektiv kommt ein Olympus APO N 1,49NA/60x TIRF-Immersionölobjektiv zum Einsatz (siehe Abbildung 3.3.1). Ein verstellbarer Ring am Objektiv erlaubt eine Einstellung der Deckglasdicke von 0,13-0,19 mm bei zwei verschiedenen Arbeitstemperaturen (23°C und 37°C). Der Transmissionsbereich liegt bei diesem Objektiv zwischen 375 und 800 nm. Der Probenhalter und die Probe selbst befindet sich auf einem lateral verstellbaren Tisch, um die Bereiche von Interesse der Probe optimal und möglichst präzise in den Detektionsbereich bringen zu können. Das gesammelte Fluoreszenzlicht wird über das Objektiv auf den unteren Ausgang des Mikroskops gelegt. Für die Weißlichtbeleuchtung (Durchlicht) steht eine dimmbare Halogenlampe mit 100 W Leistung zur Verfügung. Mit Hilfe des Durchlichts lässt sich eine grobe Probenpositionierung durchführen.

#### Detektion

Der Detektionsteil des Fluoreszenzmikroskops umfasst eine Anordnung von 4 Linsen. Durch diese wird der durch das Objektiv abgebildete Bereich noch einmal vergrößert und fokussiert. Das Fluoreszenzlicht wird auf einen Electron Multiplying Charged Coupled Device, EMCCD-Kamera abgebildet (iXON+, Andor Technology, Belfast, Irland). Der EMCCD-Chip hat eine Auflösung von 1024x1024 Pixel bei einer Pixelgröße von 13x13  $\mu\text{m}$ . Das entspricht einer gesamten Ausdehnung des Chips von 13,3x13,3 mm. Der EMCCD-Chip wird für die Datenaufnahme über ein Peltier-Element auf  $-80^\circ\text{C}$ , gekühlt um das Rauschen des Chips zu verringern. Pro Lesezyklus tritt dabei das sog. Schrotrauschen (Shot Noise) auf, welches sich immer dann bemerkbar macht, wenn ein Pixel ausgelesen wird, also die Elektronen, die in einem Pixel vorhanden sind eine Potentialbarriere überwinden müssen. Das Schrotrauschen ist dabei kein fester Wert, sondern eine stochastische Größe, die sich um einen Mittelwert bewegt. Die EMCCD-Technik erlaubt das Elektronenvervielfachen (Electron Multiplying) des Signals in jedem Pixel. Der "EM-Gain", also die Verstärkung kann als Faktor zwischen 0 und 300 eingestellt werden, um das Signal deutlicher hervorzuheben. Das gesamte erzielte Abbildungsverhältnis in der verwendeten Konfiguration liegt bei 75,92 nm pro Pixel. Als Software für die Datenaufnahme wird die mit der Kamera mitgelieferte Solis Software von Andor verwendet (Version 4.19.300001). Die Software erlaubt eine umfassende Steuerung der Aufnahmeparameter, wie Bildausschnitt, Pixelbinning (Zusammenfassen mehrerer Pixel zu einem Superpixel), Anzahl der aufgenommenen Bilder, Belichtungszeit, Auslesezeit des CCD-Chips, Steuerung des EM-Gains, sowie die Auswahl der verschiedenen Formate in denen die Aufnahme abgespeichert werden soll. Die Kamera hat bei voll belichtetem Chip eine minimale Belichtungszeit von 113 ms. Mit der Auslesezeit ergibt sich dies zu einer minimalen Aufnahmefrequenz von 8,3 Hz.

Weitfeldfluoreszenzaufnahmen werden typischerweise mit 120 ms Belichtungszeit und einem EM-Gain von 50 bis 100 (je nach verwendeter Anregungsleistung) aufgenommen. Die hochaufgelösten Aufnahmen haben eine Länge von 10000 bis 25000 Aufnahmen und werden mit einer typischen Belichtungszeit von 10 bis 20ms aufgenommen. Hier wird nur ein kleiner Teil des EMCCD-Chips ausgelesen. Der EM-Gain liegt typischerweise bei einem Wert zwischen 200 und 300.

## Filter und Strahlteiler

Für die spektrale Filterung des Fluoreszenzlichts kommen zwei Arten von Filtern zum Einsatz: *Langpassfilter*, der vornehmlich dafür sorgt, das Restlicht vom Laser, welches noch durch den Strahlteiler kommt, zu blocken. Dieser wird üblicherweise spektral gesehen kurz über der Wellenlänge des Lasers gesetzt. Bandpassfilter engen spektral das Detektionsfenster auf beiden Seiten für eine bestimmte Wellenlänge ein, um die Fluoreszenz der Probe optimal detektieren zu können und ggf. Infrarotanteile von Raman-Streuung herauszufiltern. Mit Hilfe eines *Anregungsfilters* wird die Anregungswellenlänge eines Lasers von unerwünschten spektralen Anteilen bereinigt und (wie beispielsweise bei Diodenlasern üblich) die spektrale Breite eingeengt. Ein *Strahlteiler* kommt innerhalb des Mikroskops zum Einsatz. Über diesen wird das Anregungslicht unter einem Winkel von  $45^\circ$  in das Objektiv reflektiert. Dagegen wird das Fluoreszenzlicht, welches aus dem Objektiv kommt, hindurchtransmittiert. Der Strahlteiler ist also ein Langpassfilter mit der Besonderheit, dass er unterhalb der Trennwellenlänge auf eine Reflexion unter  $45^\circ$  ausgelegt ist. Es gibt außerdem Strahlteiler, die bestimmte Wellenlängen reflektieren und etwas darüber transmittieren und danach wiederum reflektieren und kurz darüber transmittieren. Dies hat den Vorteil, dass mehrere Anregungswellenlängen genutzt werden können, ohne den Strahlteiler wechseln zu müssen.

In dem Versuchsaufbau werden folgende spektrale Filter der Firma Semrock (IDEX Corp., Lake Forest, IL, USA) verwendet:

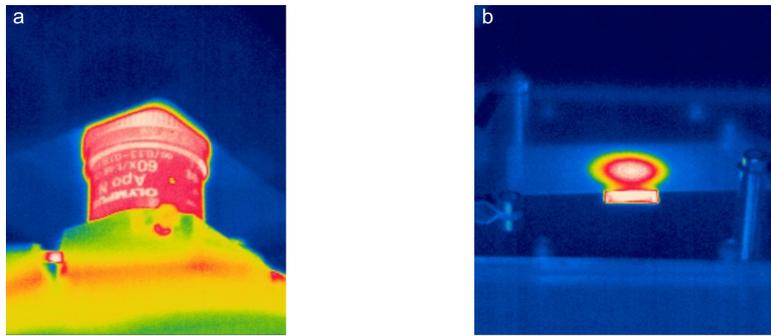
Wellenlänge [nm]	spektrale Breite [nm]	Filtertyp	Art. Nr.
640	14	Anregungsfilter	FF01-640/14-25
560/659	-	Strahlteiler	FF560/659-Di01
647	-	Langpassfilter	LP02-647RS-25
700	75	Bandpassfilter	FF01-700/75-25

Tabelle 3.3.2: Auflistung der verwendeten Filter für die Fluoreszenzmikroskopie

## Temperaturkontrolle der Probe

Um Lebendzelleexperimente über einen längeren Zeitraum durchführen zu können, müssen die Zellen auf dem Mikroskop konstant auf einer Temperatur gehalten werden, die möglichst nahe an der für den

### 3 Material und Methoden



**Abbildung 3.3.2:** Wärmebilder des Objektivs **a)** und des Probenbereichs **b)**. Deutlich zu sehen ist der Temperaturverlauf auf dem Probenbereich.

Zelltyp natürlichen Umgebungstemperatur liegt. Für die verwendeten Zellen der Linie Cos7 liegt diese Temperatur bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Die Temperaturkontrolle wird über ein Objektivring aus Kupfer für optimale Wärmeleitung realisiert, der an ein Wärmereservoir angeschlossen ist. Dieses Reservoir beinhaltet ein Volumen von  $\approx 2,5\text{l H}_2\text{O}$  welches mit einer Genauigkeit von  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$  auf der eingestellten Temperatur gehalten wird. Durch den Objektivring wird die Probe über das Objektiv und das Immersionsöl indirekt gewärmt und auf der Temperatur von  $\approx 35^{\circ}\text{C}$  gehalten. Bedingt durch den Temperaturgradienten zwischen Objektivring und Probe wird das Wärmereservoir selbst auf  $42,5^{\circ}\text{C}$  eingestellt. Der Temperaturgradient und die Verteilung der Temperatur auf der Oberfläche ist in Abbildung 3.3.2 gezeigt. Die Temperaturkontrolle hält dabei die Probe auf dem Mikroskop bei einer eingestellten Temperatur von  $42,5^{\circ}\text{C}$  in dem in Abbildung 3.3.1b gezeigten Bereich bei  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Die Raumtemperatur liegt dabei bei etwa  $22^{\circ}\text{C}$ . Unter den angegebenen Parametern lässt sich die Arbeitsdauer mit lebenden Zellen von ca. 10 min auf maximal 120 min heraufsetzen.

#### Hardware

Die Steuerung der EMCCD-Kamera erfolgt mit Hilfe einer mitgelieferten PCI-Karte, an die die Kamera angeschlossen ist. Als Rechner dient dabei ein handelsüblicher Intel Core2Duo mit  $2 \times 2,33\text{ GHz}$  und  $4\text{ GB}$  Arbeitsspeicher. Die Solis Software wird unter WindowsXP betrieben. Die Aufnahme der Daten erfolgt in der Solis Software im “kinetic Mode”. Die aufgenommenen Bilder werden dabei direkt in ein Verzeichnis auf der Festplatte geschrieben. Eine Bildsequenz hat dabei typischer-

weise eine Größe von 0,5-12 GByte.

## 3.4 Raman-Spektroskopie

Für die Raman-Spektroskopie wird der experimentelle Weitfeldfluoreszenz-Aufbau um das Olympus IX71 erweitert (siehe Kapitel 3.3). Über den hinteren Eingang wird der Laser als Anregungsquelle in das Mikroskop eingekoppelt und konfokal in das Objektiv geführt. Der Detektionsstrahlengang verläuft dabei über den Seitenausgang des Mikroskops. Über eine Multimodefaser wird das Raman-Signal in ein Spektrometer geführt. Die Anregungsquelle für die Raman-Spektroskopie besteht aus dem ArKr<sup>+</sup>-Laser (vgl. Kapitel 3.3 – Anregungsquellen). Es wird hier ausschließlich die 488 nm Emissionslinie genutzt.

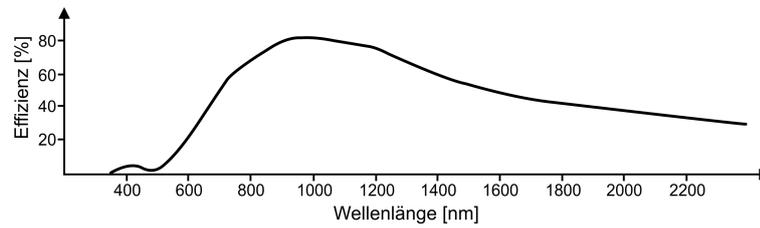
### Einkoppler

Um das konfokale Detektionsvolumen einzuschränken und eine variable Führung des Strahlengangs zu erreichen, wird das detektierte Raman-Signal in eine Multimodefaser mit einem Kerndurchmesser von 50  $\mu\text{m}$  eingekoppelt (GIF50C-CUSTOM-MUC, Thor Labs, Newton NJ, USA). Dafür wird das Detektionssignal vorher aufgeweitet und in ein Objektiv (Olympus 20x Luftobjektiv) geführt. Über eine XYZ-Verstelleinheit mit 0,5  $\mu\text{m}$  Genauigkeit wird das fokussierte Raman-Signal auf die Faser gegeben. Die Transmission durch die Faser beträgt dabei 65-70%.

### Detektion

Über die Faser wird das Raman-Signal in das Spektrometer (ACTON Spectra Pro2300i, Princeton Instruments, Trenton NJ, USA) eingekoppelt. Das Spektrometer verfügt über ein Reflexionsgitter mit 600 g/mm (grooves/millimeter). Das Interferenzgitter besitzt seine maximale Reflexionsintensität bei 1  $\mu\text{m}$  (der sog. "Blaze-Angle"). Dieser beträgt bei 1  $\mu\text{m}$   $\approx 80\%$  der eingestrahlten Leistung. Der für die Messungen interessante Bereich liegt bei der Anregungswellenlänge von 488 nm ( $20492\text{ cm}^{-1}$ ) zwischen einem Raman Shift von 2800 und  $3100\text{ cm}^{-1}$ . Umgerechnet auf die Wellenlänge liegt der Bereich also zwischen 565 und 575 nm. Das Gitter hat dort keine optimalen Reflexionseigenschaften. Der reflektive Anteil liegt in diesem Bereich nur bei 17% (vgl. Abb. 3.4.1). Die Experimente müssen dementsprechend mit mehr Leistung durchgeführt werden, um ein auswertbares Spektrum zu erhalten. Detektiert

### 3 Material und Methoden



**Abbildung 3.4.1:** Reflexionseigenschaften des eingesetzten Gitters mit 600 g/mm (grooves/millimeter) und 1  $\mu\text{m}$  Blaze-Angle [Quelle: Princeton Instruments]

wird das Raman Spektrum mit einer Newton CCD Kamera (Andor Technology). Die Kamera besitzt einen CCD Chip mit 1024x256 Bildpunkten. Jeder Pixel hat eine Abmessung von 26x26  $\mu\text{m}$ . Damit ergibt sich eine Gesamtabmessung des CCD Chips von 26,6x6,6 mm. Für die Spektroskopiemessungen wird die Kamera über ein Peltier-Element auf  $-80^\circ\text{C}$  gekühlt um den Rauschanteil zu minimieren. Die Kalibration des Spektrometers erfolgt über Toluol oder Methanol. Beide Stoffe haben charakteristische Intensitätsmaxima in dem benötigten Wellenzahlbereich. Die typische Aufnahmedauer für ein Spektrum liegt bei 30 sec für eine Anregungsleistung vom 50 mW.

#### Filter und Strahlteiler

Bedingt durch den “Multiline”-Betriebsmodus des ArKr<sup>+</sup>-Lasers und der Wellenlängenauswahl über den AOTF, gibt es aufgrund der Filtereffizienz des AOTF von max. 98%, Reststrahlung der übrigen Emissionslinien des Lasers. Bei der genutzten Wellenlänge von 488 nm ist somit immer ein Restspektrum der übrigen Emissionslinien enthalten. Um dieses herauszufiltern wird ein 488/10 Anregungsfilter benutzt, um das schwache Raman-Signal nicht zu überlagern. Insgesamt werden für die Raman-Spektroskopie folgende Filter verwendet:

Wellenlänge [nm]	spektrale Breite [nm]	Filtertyp	Art. Nr.
488	10	Anregungsfilter	FF01-488/10-25
500	–	Strahlteiler	FF500-Di01-25
500	–	Langpass	FF01-500/LP-25

Tabelle 3.4.1: Auflistung der verwendeten Filter für die Raman-Spektroskopie

#### Hardware

Die Steuerung der Newton Kamera erfolgt über einen USB-Port, an den die Kamera angeschlossen ist. Als Rechner dient dabei ein handelsüblicher Intel Core2Duo mit 2x2,33 GHz und 4 GB Arbeitsspeicher. Die Solis Software wird unter WindowsXP betrieben. Die Aufnahme der Daten erfolgt in der Solis Software im "Spectroscopy"-Modus. Die aufgenommenen Bilder werden dabei direkt als Spektrum auf dem Bildschirm dargestellt und müssen einzeln abgespeichert werden.

## 3.5 Vorbereitung der Proben

#### Zellen

Zellen der Linie COS7, Nierenfibroblasten vom Affen aus der Gattung Cercopithecus aethiops (Grüne Meerkatze) werden unter optimalen Bedingungen im Inkubator bei 37°C und 5% Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) in Nährlösung, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), (Best.Nr.12491-015, Life Technologies Corp., Carlsbad CA, USA) für 2 bis 3 Tage inkubiert. Die Zellen haben sich in dieser Zeit an den Glasboden der LabTekII Kammern (Best.Nr. 154534, Thermo Scientific, Waltham Ma, USA) angeheftet und besitzen die optimale Dichte für die Messungen. Für die Lebendzelleexperimente wird die Nährlösung direkt vor der Messung gegen Phosphate Buffered Saline (PBS) (Best.Nr. PBS1, Sigma-Aldrich, St.Louis MO, USA) ausgetauscht. Ab diesem Zeitpunkt kann noch  $\approx 120$  min mit den Zellen gearbeitet werden.

#### Oberflächen für die hochpräzise Farbstoffablage

Für die Präparation der PVA-G-C (Polyvinylalkohol-Glycerin-Cysteamin) Oberflächen werden 100  $\mu$ l in H<sub>2</sub>O gelöstes PVA (Best.Nr.341584, Sigma-Aldrich) zusammen mit 1  $\mu$ l Glycerin und 16  $\mu$ l 1 M Lösung Cysteamin (Best.Nr. 30070, Sigma-Aldrich) gemischt. Die Deckgläser werden vorher für 20 min mit Hellmanex im Ultraschallbad bei 45°C gereinigt und weitere 20 min in H<sub>2</sub>O. Danach wird eine Silikonmanschette mit einem Durchmesser von 4 mm auf das Deckglas aufgebracht, um eine Diffusion der aufgetragenen Lösung zu verhindern. 10  $\mu$ l der zuvor angemischten Lösung werden vorsichtig in die Silikonmanschette auf das Deckglas getropft. Die fertige Probe wird für 12 std. überkopf zum trocknen im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Nach dieser Zeit ist das überschüssige Wasser aus der Probe entwichen und ein 1 bis 1,5  $\mu$ m

### 3 Material und Methoden

dicker fester Film auf dem Deckglas entstanden. Die leitenden Eigenschaften dieser Oberflächen variieren sehr stark. Nur ca. 10% der Oberflächen zeigten dabei überhaupt eine elektrische Leitfähigkeit. Für die Charakterisierung der Oberflächen durch Raman-Spektroskopie wurden abweichend vom o.g. Protokoll auch Oberflächen ohne Cysteamin erstellt (PVA-G). Für den Vergleich von Blinkstatistiken wurden außerdem PVA-G-C Oberflächen erstellt, in die direkt Farbstoff (Alexa Fluor 647) in einer Konzentration von  $10^{-9}$  M gegeben wurden. Der Cysteaminanteil wurde ebenfalls variiert (30 bis 160 mM).

#### SICM Charakterisierungsproben

Für das SICM wurden zwei Charakterisierungsproben verwendet. Zum einen eine "weiche" Probe, die zum Verifizieren des Annäherungsmodus geeignet ist und zweitens eine Probe, deren Rauheit bekannt ist. Als "weiche" Probe wurde in einem Bad von PBS ein Tropfen von 10  $\mu$ l Immersionsöl eingebracht. Dieser bleibt aufgrund von adhäsiven Kräften auf dem Glasboden der LabTek Kammer und bietet eine optimale, glatte nicht leitende Oberfläche. Als zweite Probe wurde ein "AFM-Kalibrationssample" verwendet. Dieses ist aus Silizium hergestellt und besitzt über Photolithographie hergestellte Vertiefungen mit einer Abmessung von  $5 \times 5$   $\mu$ m und einer Tiefe von 180 nm.

### 3.6 Farbstoffe und Antikörper

Für Experimente mit PVA-G-C, sowie einigen Zellexperimenten wurde Alexa Fluor 647 mit gekoppelter einzelsträngiger DNA (10-30 bp) (IBA GmbH, Göttingen, Germany) benutzt. Dabei wurden 20  $\mu$ l mit Konzentrationen von  $10^{-6}$  bis  $10^{-9}$  M in PBS oder  $H_2O$  gelöst direkt in die Nanopipette gegeben.

Für Lebendzelleexperimente wurde Phalloidin mit ATTO647N (Best. Nr. 65906-10NMOL, Sigma-Aldrich) und "Alexa Fluor 647 F(ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti mouse" (Best.Nr.A-21235, Life Tec.) als sekundärer Antikörper mit "Anti- $\beta$ -Tubulin produced in mouse" (Best.Nr. T8328-200UL, Sigma) als primärer Antikörper verwendet. Die Antikörper wurden vor der Applikation in die Nanopipette gemischt. Nach 5 min wurden 20  $\mu$ l in die Nanopipette gegeben. Zusätzlich wurde Protease Inhibitor (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Risch, Schweiz) für einige Experimente an Zellen zusätzlich direkt mit in die Antikörperlösung gemischt.

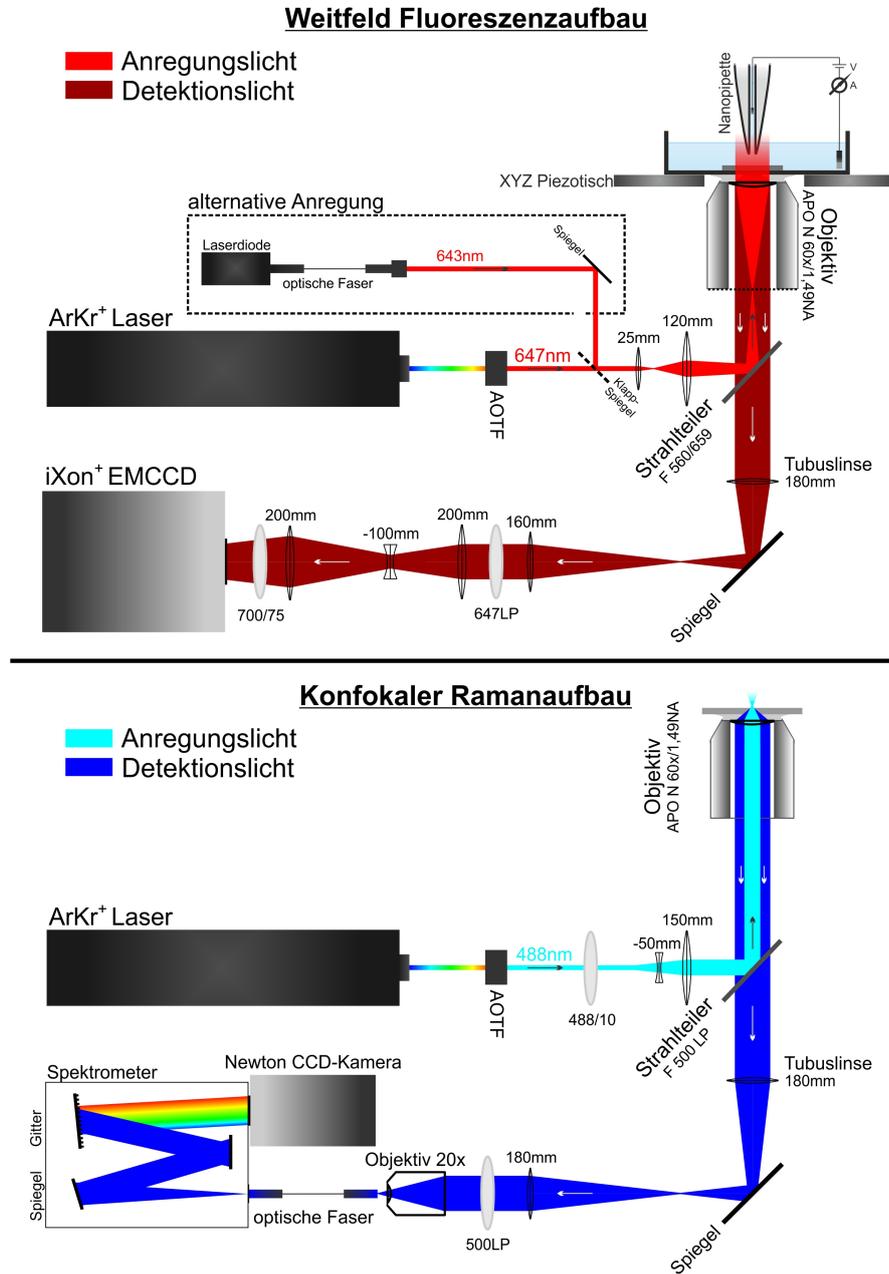


Abbildung 3.6.1: Schematischer Aufbau der Messanordnungen



## 4 Ergebnisse und Diskussion

Eine der Schlüsseltechnologien zur Erforschung biologischer Prozesse in kleinsten Dimensionen ist die Fluoreszenzmikroskopie. Kombiniert man diese mit anderen Technologien, wie dem Rasterionenleitfähigkeitsmikroskop (Scanning Ion Conductance Microscope, SICM), so erhält man eine sehr vielseitige Technologie, die die Untersuchung von kleinsten biologischen Einheiten und deren Interaktionen untereinander um eine entscheidende Komponente bereichert. Die Fluoreszenzmikroskopie ist im Allgemeinen nur darauf ausgelegt, ein Objekt passiv zu beobachten. Ein SICM mit einer funktionalisierten Nanopipette ist ein aktiv ausgelegtes Untersuchungs- und Manipulationswerkzeug. Es scheint also sehr vorteilhaft, diese beiden Techniken miteinander zu verbinden. Primär dient das SICM dem Zweck topographische Informationen, die von einem Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscope, AFM) nur unter erschwerten - in der Regel nicht natürlichen - Bedingungen erfasst werden, von biologischen Proben zu erhalten. Die Proben können dabei in ihrer nahezu natürlichen Umgebung verbleiben. So werden Lebendzelleexperimente zur Erforschung von Zelldynamiken möglich.

In diesem Kapitel werden die Experimente und Ergebnisse erläutert und diskutiert, die während der Promotionsphase durchgeführt wurden. Weiterhin werden die Hauptresultate im Kontext zum Stand der aktuellen Forschung behandelt.

### 4.1 Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie

Das Prinzip des SICM wurde 1989 von Hansma et al. [Hansma et al., 1989] erstmals vorgestellt. Für die vorliegenden Experimente wurde ein SICM auf Basis dieses Prinzips benutzt. Der Ionenstrom wird dabei über ein Referenzsignal moduliert und detektiert. Dies erhöht die Zuverlässigkeit und Stabilität des SICM. Es ist eine Eigenentwicklung und wurde von 2004-2007 von A. Donnermeyer [Donnermeyer, 2007] im Rahmen der Promotion entwickelt. Es besteht dabei aus den Komponenten, die in Kapitel 3.2 einzeln beschrieben sind. Charakteristische Merkmale des Mikroskops sind dabei die 16bit Umgebung, in der die

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Steuerung des SICM operiert. Sie erlaubt eine sehr hohe Genauigkeit von bis zu 0,61 nm. Weiterhin ist die zu der Zeit noch sehr untypische direkte Kombinierbarkeit des SICM mit der Fluoreszenzmikroskopie zu erwähnen. Diese war direkt zu Beginn der Entwicklung eine der Hauptvorgaben für das SICM.

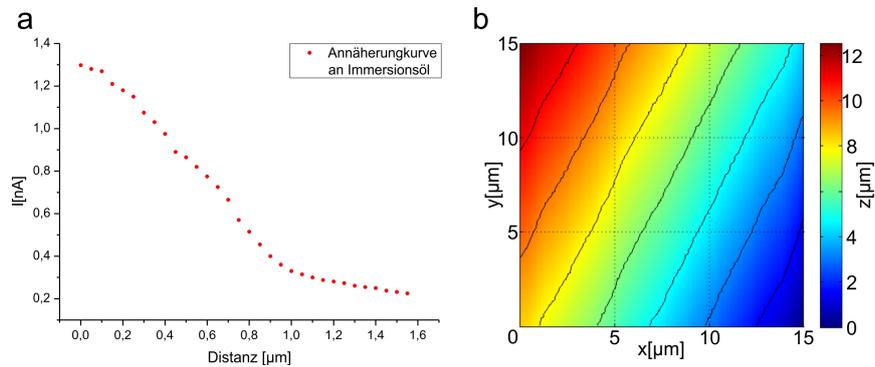
Nach seiner Fertigstellung gelang es, einige Charakterisierungsmessungen mit dem Mikroskop zu durchzuführen, um die wichtigsten Eckdaten, wie Auflösungsvermögen und Geschwindigkeit, sowie Zuverlässigkeit des Mikroskops zu ermitteln. Diese sollten allerdings die einzigen sein, die mit dem System vorerst gemessen wurden. Die Kombination mit der Fluoreszenzmikroskopie wurde nur unter dem Aspekt von grundlegenden einfachen Testmessungen mit dem kombinierten Fluoreszenz-/SICM-Aufbau durchgeführt. Einzelmoleküloberflächen mit fluoreszierenden Nanokristallen (sog. Quantendots, QDots) auf einem Weitfeldfluoreszenzmikroskop, welches mit dem SICM kombiniert wurde stellten dabei die einzigen Proben dar, die untersucht wurden. Dabei gelang es die QDots, welche typischerweise einen Durchmesser von 15-20 nm haben gleichzeitig sowohl topographisch, als auch fluoreszierend abzubilden.

Nachdem das SICM mehrere Jahre ungenutzt blieb, wurde die Idee der Kombination von SICM und Fluoreszenzmikroskopie wieder aufgenommen. Das Mikroskop musste dafür wieder aufgebaut und betriebsbereit gemacht werden. Die ersten Messungen im Rahmen der aktuellen Arbeit dienten also der Re-Charakterisierung des Systems. Relativ zeitnah dazu wurde die Software zur Steuerung des Systems verbessert. Die Verbesserung liegt dabei in der Optimierung der Repositionierung der Spitzenhöhe über der Probe nach einem lateralen Schrittwechsel. Die Verbesserungen bewirken, dass die Spitze schneller, also in weniger Schritten wieder auf die Referenzhöhe über der Probe gebracht wird.

### 4.1.1 Re-Charakterisierung des SICM

Die Charakterisierung des SICM erfolgt über einen Tropfen Immersionsöl, der als Beispielprobe verwendet wurde. Dieser wird in eine mit PBS gefüllte LabTekII Kammer gebracht (vgl. 3.5 – SICM Charakterisierungsproben). Er bietet eine Umgebung, die sowohl die Annäherung an ein "weiches" Objekt wie eine Zelle, als auch die Oberflächeneigenschaften einer solchen biologischen Probe hinreichend simuliert. Die Oberfläche ist allerdings weniger rau. Ein Öltropfen bietet so eine idealisierte Oberfläche, die bis in den Nanometerbereich sehr glatt ist.

#### 4.1 Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie



**Abbildung 4.1.1:** SICM Charakterisierungsprobe: Immersionsöl in PBS. **a)** Annäherungskurve an eine Immersionsöloberfläche über 1,8  $\mu\text{m}$ . Öffnungsdurchmesser der Nanopipette: 50 nm. Die Schrittweite beträgt 50 nm. **b)** Topographisches Bild einer Immersionsöloberfläche. Die Dimensionen sind 15x15  $\mu\text{m}$  bei einer Auflösung von 100 nm/px.

Abbildung 4.1.1a zeigt die Annäherungskurve an einen Immersionsöltropfen. Der Startpunkt für die Annäherung liegt dabei  $\approx 1 \mu\text{m}$  über der Öloberfläche. Die Spitze wurde mit einer Amplitude von 40 nm und einer Frequenz von 1,5 kHz oszilliert. Der freie Ionenstrom beträgt dabei zu Anfang der Annäherung 1,3 nA. Die angelegte Spannung am Mikroelektrodenverstärker beträgt 40 mV. Die Spitze wird mit 50 nm pro Schritt angenähert. Der Wert von 50 nm ist allerdings nicht verallgemeinbar. Die Schrittweite für die Annäherung hängt in erster Linie von der Probe selbst ab. Weiche Proben haben eine höhere Schrittweite, harte, eine Kleine. Dabei variiert die Schrittweite zwischen 3 nm und 50 nm. Die Messung selbst ist in Abbildung 4.1.1b gezeigt. Die Abmessungen betragen 15x15  $\mu\text{m}$  bei einer Auflösung von 100 nm/px. Der Referenzpunkt wurde für die Messung bei 1 V des Lock-In Signals gesetzt. Die Zeitkonstante am Lock-In Verstärker beträgt 300  $\mu\text{sec}$ , die Eingangssensitivität 20 mV/nA. Die Frequenz der Steuerschleife beträgt 8 kHz.

Das Bild zeigt einen gleichmäßigen Verlauf, wie er bei Immersionsöl zu erwarten ist. Dabei beträgt der gesamte Höhenunterschied diagonal über die Probe 12  $\mu\text{m}$ . Dieser recht große Abfall der Höhe auf relativ kurzer Breite lässt die Vermutung zu, dass der Bildbereich recht weit am Rand der Probe liegt, wo diese erfahrungsgemäß zum Glasboden hin sehr stark abfällt. Es wurde mit dieser Messung gezeigt, dass die Annäherungsroutine und die topographische Erfassung einer Probe mit

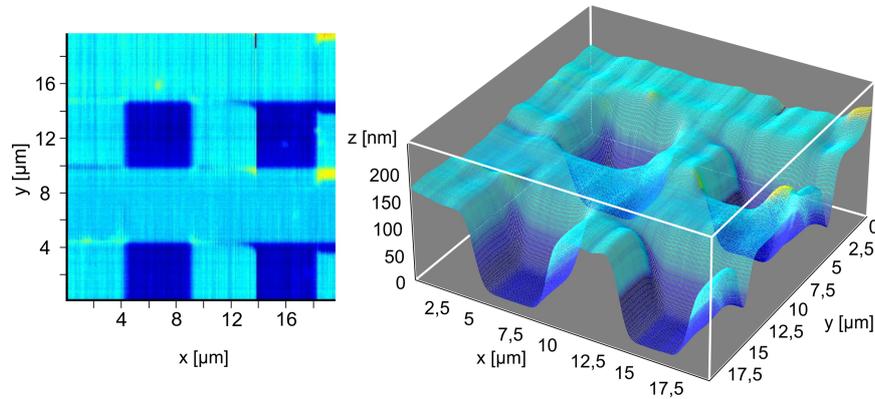
## 4 Ergebnisse und Diskussion

dem wiederaufgebauten SICM funktioniert und sämtliche Komponenten zuverlässig arbeiten.

### 4.1.2 Softwareverbesserung und Verifizierung

Während der Arbeit mit dem SICM stellte sich heraus, dass die Rückführung der Spitze auf den Referenzwert nach einem Pixelwechsel nicht immer effektiv funktionierte. Die Anzahl der Schritte zur Korrektur auf den Referenzwert waren oftmals sehr groß. Auch eine Anpassung des Wertes für die Proportionalkonstante  $k_c$ , die die Schrittweite reguliert veränderte an der Situation nur wenig. Gleichzeitig wurde in der Software selbst mit einem in LabView integrierten und als vorgefertigtes “.vi” vorliegenden PID-Regler gearbeitet, der die Berechnungsgeschwindigkeit und damit die Durchläufe der Steuerschleife pro Sekunde verminderte und das System unnötig belastete, da die Software nur mit einem P-Regler arbeitete. Die zusätzlichen Komponenten des I- und D-Reglers waren nur unnötiger Ballast. Die Lösung war ein eigens für das SICM programmierter Regler. Die Idee war, einen P-Regler zu programmieren, der die Korrekturwerte in einem gewissen Bereich sehr dynamisch anpasst und kein Überschwingen (vgl. Abb. 2.1.11) zeigt. Durch die dynamische Korrektur  $k_d$  würde so die Schrittzahl, die das System für die Rückführung auf den Referenzwert benötigt, effektiv herabgesetzt und gleichzeitig die Durchläufe pro Sekunde der Steuerschleife erhöht. Die dynamische Regelkurve wurde dabei experimentell angepasst. Sie ist in Abbildung 2.1.12 dargestellt. Dabei besteht die Kurve im Kern aus zwei Regelbereichen: *Regelbereich 1*:  $LIA\text{-Signal} < \text{Referenzwert}$  ( $k_d \propto \frac{k_c R}{LIA}$ ) und *Regelbereich 2*:  $LIA\text{-Signal} \geq \text{Referenzwert}$  ( $k_d \propto \frac{k_c LIA^2}{R^2}$ ). Dabei ist  $R$  der Referenzpunkt im Lock-In Verstärker und  $LIA$  das zu dem Zeitpunkt gemessene Lock-In Signal. Die Werte von  $k_d$  werden dabei mit der ursprünglichen Proportionalkonstante  $k_c$  multipliziert und werden durch einen festgelegten Wert (dynamic  $k_c$  upper threshold), der als Vielfaches von  $k_c$  angegeben wird beschränkt. Um die getätigten Veränderungen an der Steuerroutine zu überprüfen, wurde eine Messung mit einer möglichst standardisierten Probe durchgeführt. Als überaus geeignet erscheint ein “AFM-Kalibrationssample”, da an diesem schon Messungen vor Veränderung der Software vorgenommen worden waren. Das Sample besteht aus Silizium und enthält definierte Vertiefungen (vgl. 3.5 – SICM Charakterisierungsproben). Ein Problem bei der Messung solcher optisch nicht transparenten Proben ist die manuelle Annäherung der Spitze an

#### 4.1 Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie

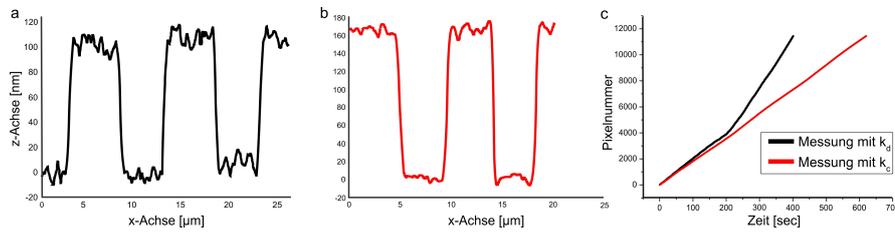


**Abbildung 4.1.2:** Topographisches Bild eines “AFM-Kalibrationssamples”. Das Sample besteht aus einem Raster mit Vertiefungen von 180 nm. Die Vertiefungen sind quadratisch und haben eine Kantenlänge von 5  $\mu\text{m}$ . Dabei liegen sie äquidistant zu beiden Seiten 5  $\mu\text{m}$  auseinander. Durch das SICM konnte die Struktur sehr gut rekonstruiert werden.

die Oberfläche, da kein optisches “Feedback” möglich ist. Die Nanopipette wurde also langsam manuell per Auge über dem Sample positioniert. Erst dann wurde ein Tropfen PBS zwischen Nanopipette und Sample gegeben. Dann wurde die softwarebasierte Annäherung gestartet. Wenn die Spitze nicht innerhalb der 50  $\mu\text{m}$  angenähert wurde, wurde mit Hilfe der Z-Schraube die Spitze um 50  $\mu\text{m}$  nach unten gelassen. So wurde schrittweise die Nanopipette an das Sample angenähert. Abbildung 4.1.2 zeigt das topographische Bild des “AFM-Kalibrationssamples”. Die Abmessungen des Bildes betragen 20x20  $\mu\text{m}$  bei einer Auflösung von 100 nm/px. Der Referenzpunkt lag bei 1 V Lock-In Signal, die Eingangsempfindlichkeit bei 20 mV/nA und die Zeitkonstante bei 300  $\mu\text{s}$ . Die Spitze oszillierte dabei mit einer Frequenz von 1,7 kHz bei einer Amplitude von 50 nm. Die Steuerschleife hatte eine Wiederholungsrate von 5 kHz. Die angelegte Spannung am Mikroelektrodenverstärker lag bei 10 mV.

Die topographischen Eigenschaften des “AFM-Kalibrationssamples” wurden durch das SICM sehr gut herausgearbeitet. Die Vertiefungen sind klar und deutlich zu erkennen. Der Querschnitt durch eine Pixelreihe zeigt sehr deutlich die Vertiefung von 180 nm (Abb. 4.1.3b). Der Vergleich mit vorherigen Daten eines Kalibrationssamples zeigt, dass die Höhenfluktuationen auf den ebenen Teilen des Samples in bei-

## 4 Ergebnisse und Diskussion



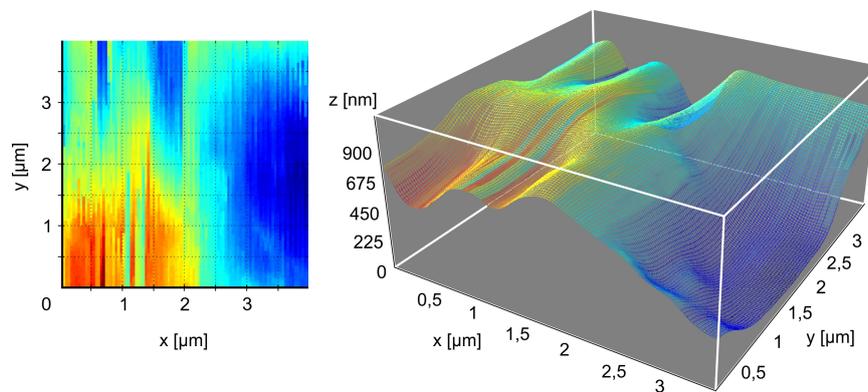
**Abbildung 4.1.3:** Querschnitt durch ein topographisches Bild eines “AFM-Kalibrationssamples) (a,b) und Zeiten, die die Steuerschleife braucht, um eine Anzahl Pixel abzurastern (c). **a)** Vorhandene Daten von A. Donnermeyer [Donnermeyer, 2007] mit der alten Distanzregelung. **b)** Querschnitt gemessen mit der neuen Distanzregelung. Deutlich zu sehen: Die Genauigkeit mit der auf den ebenen Flächen gemessen wird schwankt in beiden Fällen um  $\pm 10$  nm. **c)** Auftragung der ersten 12000 abgerasterten Pixel gegen die Zeit. Deutlich zu sehen: Die Messung mit dem dynamischen  $k_d$  (schwarz) braucht nur  $\approx 2/3$  der Zeit (400 sec) gegenüber der Messung mit  $k_c$  (rot, 620 sec).

den Fällen  $\approx 20$  nm betragen. Dies deutet darauf hin, dass der neue Regelungsmechanismus einwandfrei und ebenso präzise wie die alte Steuerung arbeitet. Vergleicht man die Zeiten, die zur Repositionierung der Spitze über der Oberfläche nötig sind, so wird mit der neuen Abstandsregelung nur  $\approx 2/3$  der vorher benötigten Zeit gebraucht, um ebenso präzise die Höhe der Nanopipette zu korrigieren. Es konnte gezeigt werden, dass das Ersetzen des PID-Reglers in der Software durch einen P-Regler mit dynamischen Korrekturwert  $k_d$  bei ähnlichen experimentellen Bedingungen dieselbe Präzision bei einer Verringerung der Schrittzahl nach sich zieht. Des Weiteren wurde eine Verringerung der CPU-Last am Echtzeitrechner um 10% registriert.

### 4.1.3 Zelltopographie

Im Laufe der Experimente wurde versucht, die Oberfläche von Zellen topographisch abzubilden. Durch die dünne Zellmembran ist diese Aufgabe für ein SICM nicht einfach, aber prinzipiell lösbar. Dadurch, dass die Zelle während des Messprozesses nicht berührt wird, kommt es zu keiner Beschädigung oder sonstigen Veränderung der Oberfläche. Ein Problem ist der Übergang von Zelle zum Glasboden. Hier kann der Höhenunterschied für das SICM zu groß sein, so dass die Nanopipette die Zellmembran berührt. Dadurch wird nicht nur die Oberfläche verändert, sondern es steigt auch die Wahrscheinlichkeit, dass die Messung aufgrund fehlerhafter Distanzkontrolle abbricht. Lösung die-

#### 4.1 Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie



**Abbildung 4.1.4:** Topographische Oberfläche einer Cos7-Zelle. Die Zelle wurde fixiert und in einer PBS Lösung platziert. Das Bild zeigt einen  $4 \times 4 \mu\text{m}$  großen Ausschnitt der Oberfläche bei einer Auflösung von  $40 \text{ nm/px}$ .

ses Problems bietet der “Hopping Mode” für ein SICM. In diesem ist es möglich, auch sehr steil ansteigende oder abfallende Bereiche einer Zelle topographisch zu erfassen (vgl. Kapitel 2.1.1). Abbildung 4.1.4 zeigt einen  $4 \times 4 \mu\text{m}$  großen Ausschnitt der Zelloberfläche einer fixierten Cos7-Zelle bei einer Auflösung von  $40 \text{ nm/px}$ . Da das SICM nicht in der Lage ist, im “ac”-Modus aufgrund der vorher genannten Probleme die gesamte Zelle abzurastern, wurde nur ein kleiner Ausschnitt gewählt. Die angelegte Spannung zwischen den Elektroden lag bei  $40 \text{ mV}$ . Die Oszillation der Pipettenspitze bei einer Frequenz von  $1,5 \text{ kHz}$ . Die Eingangssensitivität des LIA betrug  $50 \text{ mV}$ , die Zeitkonstante  $1 \text{ ms}$ . Der Referenzpunkt wurde standardmäßig bei einem LIA-Signal von  $1 \text{ V}$  gesetzt und die Steuerschleife auf eine Frequenz von  $4 \text{ kHz}$ . Die Amplitude der Nanopipette von  $100 \text{ nm}$  ist für eine Zellmessung vergleichbar hoch. Dies ist recht deutlich im entstandenen Höhenprofil im lateralen x-Bereich von  $0$  bis  $2 \mu\text{m}$  zu sehen. Der Verlauf der Rasterrichtung der Messung ist dabei entlang der y-Achse für eine Zeile und von rechts nach links über die x-Achse für das Bild. Im genannten Bereich sieht man einen unnatürlichen Höhenverlauf der Bild-Rasterrichtung. Das Höhenprofil ist dabei immer wieder durch abrupte Höhenunterschiede gestört. Dieses Problem basiert auf der zu hoch gewählten Amplitude. Dadurch kommt die Spitze in Berührung mit der Zellmembran und verursacht ein Signal, welches vom Regelkreis falsch interpretiert wird. Die Messung wird daraufhin auf einer falschen Höhe fortgesetzt.

## 4.2 Hochpräzise Farbstoffablage

Die Idee Proben, mit der Nanopipette zu manipulieren und über Fluoreszenzmikroskopie die Veränderungen an der Probe zu detektieren, basiert auf dem Gedanken der sog. Mikroinjektion, bei der vorwiegend biologische Proben wie Zellen über eine Glaspipette manipuliert werden. Das Prinzip basiert dabei auf einer druckgesteuerten Injektion in die Probe. Dabei hat die Pipette, mit der die Injektion durchgeführt wird einen Öffnungsdurchmesser von mehreren Mikrometern und ein Injektionsvolumen von minimal 100 pl. Die Pipette wird über einen Schrittmotor mit Mikrometer-Genauigkeit an die Probe herangeführt. Nachteile der Mikroinjektion sind die niedrige Präzision und die hohe Mortalitätsrate von kleineren lebenden Proben durch den sehr groben Eingriff, der an ihnen vorgenommen wird. Nanopipetten mit 50 nm Innendurchmesser, die über Elektrophorese fluoreszierende Proben ablegen wurden erstmals von Bruckbauer et al. in 2002 [Bruckbauer et al., 2002] angewendet. Dabei wurde DNA – markiert mit Farbstoffen – und Biotin auf eine Streptavidinoberfläche gebracht. Durch die negative Ladung der DNA-Stränge waren die Moleküle sensitiv für die angelegte Spannung. Der gesamte Aufbau basierte auf einem SSCM, welches für das Experiment modifiziert wurde. Die erreichte Punktgröße konnte mit 830 nm Halbwertsbreite (Full Width Half Maximum, FWHM) konfokal verifiziert werden. Die Anzahl der abgelegten Moleküle wurde in diesen Experimenten auf 46000 Moleküle pro Spot geschätzt. Die kleinste Punktgröße erreichte Rodolfa et al. [Rodolfa et al., 2005] mit 480 nm FWHM. Ablegen von fluoreszenten Proben in biologische Systeme erfolgte durch Bruckbauer et al. [Bruckbauer et al., 2007]. Dabei wurde die Nanopipette nicht invasiv genutzt, sondern 100 nm über der Oberfläche positioniert. Durch elektrophoretische Kräfte gelangte so ein Bruchteil der fluoreszenten Proben über Nanoporen in das System. Dadurch wurde allerdings die Größe der Proben auf die maximale Größe der von den Nanoporen durchgelassenen Breite von ca. 5 nm beschränkt.

Für die nachfolgenden Experimente wurde der SICM-Aufbau mit dem Weitfeldfluoreszenzmikroskop kombiniert. Das Ablegen von Farbstoffen mit Hilfe der Nanopipette erfolgte über Elektrophorese. Das Ziel der Experimente war die möglichst präzise Erstellung von fluoreszierenden Strukturen auf Oberflächen, möglichst unterhalb der Beugungsgrenze. Die erzeugten Strukturen wurden dann über hochauflösende Mikroskopie (direct Stochastic Optical Reconstruction Micros-

copy, dSTORM) aufgelöst.

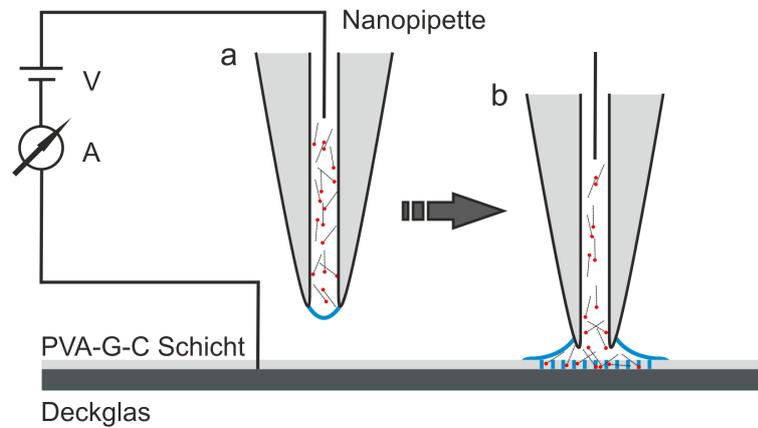
### 4.2.1 Oberflächen und Ablageprinzip

Da die zuvor durchgeführten Experimente von Bruckbauer et al. gezeigt hatten, dass der limitierende Faktor die Diffusion der Moleküle in der leitenden Lösung war, wurde beschlossen, die Moleküle direkt ohne Lösungsbad auf eine Oberfläche zu bringen. Limitierender Faktor ist in diesem Fall nur der Öffnungsdurchmesser der Nanopipette ( $\approx 50$  nm). Der limitierende Faktor durch Diffusion [Bruckbauer et al., 2002] wird so umgangen. Eine geeignete Oberfläche sollte also nur minimale Diffusion der Moleküle zulassen, optisch transparent sein, die Möglichkeit für hochauflösende Mikroskopie bieten, elektrisch leitend, sehr glatt mit einer minimalen Höhendifferenz und mehrfach einsetzbar sein.

#### PVA-G-C Oberflächen

Die Lösung, welche alle zuvor gestellten Anforderungen für das Ablegen von Farbstoffen erfüllt, ist eine PVA Schicht, die die zusätzlichen Komponenten Glycerin und Cysteamin enthält. Dabei werden alle Komponenten in einer wässrigen Lösung angemischt, und wenige Mikroliter als Tropfen auf ein Deckglas gebracht. Durch Verdunstung entweicht der Wasseranteil fast vollständig und es entsteht eine 1-1,5  $\mu\text{m}$  dicke, transparente Schicht auf dem Glas. Die sog. PVA-G-C Oberfläche. Die Idee für die Entwicklung der Zusammensetzung ist einfach: Der Schaltpuffer, der für das Schalten von Farbstoffen (vgl. Kapitel 2.2.3 – Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie) benötigt wird, enthält Cysteamin. Es ist hauptsächlich für das Löschen der Farbstoffe zuständig, hat aber auch die Eigenschaft, dass es durch einen pH-Wert von 12 eine gewisse elektrische Leitfähigkeit besitzt. Gibt man Cysteamin in einer geeigneten Konzentration zur PVA Lösung hinzu, müssten die Farbstoffe, die mit Hilfe der Spitze in die fertige PVA Oberfläche gebracht werden, dasselbe Schaltverhalten wie in dem normalen Schaltpuffer zeigen. Da reines Cysteamin in kristallisierter Form vorliegt, muss ein Auskristallisieren in der PVA Schicht verhindert werden, da die Oberfläche sonst zu rau wird, um zuverlässig Farbstoffe über eine Nanopipette abzulegen. Das Glycerin hat die Eigenschaft einen restlichen Wasseranteil in der Oberfläche zu binden und damit ein Auskristallisieren zu verhindern. Es entsteht durch diese Komponenten eine weiche, glatte Oberfläche, die sich optimal für das Ablegen von Farbstoffen eignet. Für

#### 4 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4.2.1:** Prinzip der hochpräzisen Farbstoffablage. Nachdem die Nanopipette mit der Farbstofflösung gefüllt ist, wird sie manuell ca. 10-20  $\mu\text{m}$  über der Oberfläche positioniert. Zu diesem Zeitpunkt fließt kein Ionenstrom **a)**. Die Oberfläche wird schrittweise an die Spitze herangeführt. Kommt diese in Kontakt mit der Oberfläche, wird ein Strom detektiert und die Annäherung gestoppt. Das Ablagern von Farbstoff beginnt **b)**.

die Experimente wurden PVA-G-C Schichten benutzt, die in der Zusammensetzung den in Kapitel 3.5 – Oberflächen für die hochpräzise Farbstoffablage entsprechen.

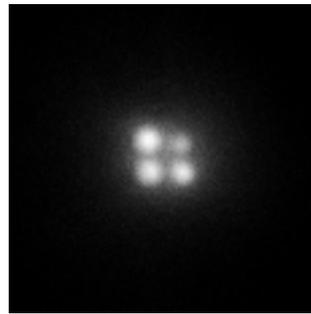
#### Das Prinzip der hochpräzisen Farbstoffablage

Das prinzipielle Vorgehen zum Ablegen von Molekülen ohne Pufferlösung unterscheidet sich in vielen Punkten von der Ablage unter Bedingungen mit einer leitenden Lösung. Für das Ablagern unter Pufferbedingungen befindet sich die Spitze der Nanopipette dauerhaft im Lösungsbad mit der Gegenelektrode. Durch die zwischen den Elektroden angelegte Spannung kann ein konstanter Ionenstrom detektiert werden. Die Annäherung der Spitze erfolgt bei axial oszillierender Spitze über das Lock-In Signal, bei Annäherung ohne Oszillation einfach durch die Verringerung des Ionenstroms. Die Annäherung über das LIA Signal ist dabei wesentlich präziser als über die Verminderung des Stroms. Allerdings wird die minimale Höhe der Spitze über der Oberfläche durch die axiale Oszillation begrenzt. Die Annäherung über den Strom erlaubt also prinzipiell eine größere Nähe zur Oberfläche, ohne die Spitze abzubauen. Eine Kombination aus beiden Prinzipien ist ebenfalls möglich.

## 4.2 Hochpräzise Farbstoffablage

Hier wird die Spitze erst oszillierend über das Lock-In Signal angenähert. Nachdem dieser Prozess abgeschlossen ist, wird die Oszillation abgeschaltet. Die Amplitude sollte bekannt sein. Um diesen Wert ist eine axiale Nachführung der Spitze an die Oberfläche möglich, ohne diese zu gefährden. Die Spitze befindet sich bei diesem Annäherungsverfahren typischerweise in für ein SICM normalem Arbeitsabstand von 50-150 nm über der Oberfläche. Dieser Abstand ermöglicht eine Diffusion der Moleküle in lateraler Richtung, wenn sie aus der Spitze kommen, um an die Oberfläche zu binden.

Bei der Annäherung ohne Pufferlösung wird die Spitze der Nanopipette, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, 10-20  $\mu\text{m}$  über der Oberfläche positioniert. Das Prinzip der Farbstoffablage ist in Abbildung 4.2.1 gezeigt. In der Ausgangsposition (a) ist die Spitze ohne Kontakt zur Oberfläche. Dementsprechend existiert trotz angelegter Spannung zwischen den Elektroden kein Ionenstrom. Die Annäherung der Spitze an die Oberfläche muss sehr kleinschrittig und mit äußerster Vorsicht geschehen, um ein Abbrechen und ein damit verbundenes Freisetzen von Molekülen zu



**Abbildung 4.2.2:** Erzeugte Struktur mit einem Abstand von jeweils 1  $\mu\text{m}$  auf einer PVA-G-C Oberfläche

verhindern. Ist die Nanopipette in Kontakt zur Oberfläche (b), bildet sich über das Cysteamin ein leitender Kanal zur Gegenelektrode aus, die in der PVA-G-C Schicht platziert ist. Es fließt ein Ionenstrom. Zu diesem Zeitpunkt wird die Annäherung gestoppt und die Probe ist an die PVA-G-C Schicht angenähert. Die Spannung kann nun erhöht oder umgeschaltet werden (je nach Ladung der Moleküle in der Spitze), um die Moleküle aus der Spitze in die Oberfläche diffundieren zu lassen. Für die Annäherungsmethode ist eine axiale Oszillation der Nanopipette nicht sinnvoll, da die Spitze bei gewöhnlichen Oszillationsfrequenzen und Amplituden und der damit verbundenen harten Berührung mit der Oberfläche sofort abbrechen würde. Der Einsatz des LIA für die Detektion eines Annäherungssignals ist hier also nicht möglich.

Abbildung 4.2.2 zeigt ein Beispiel-Fluoreszenzbild einer Struktur, die mit der vorher beschriebenen Ablagemethode ohne Pufferlösung auf einer PVA-G-C Oberfläche erzeugt wurde. 20  $\mu\text{l}$  einer Farbstofflösung wurden dafür in die Nanopipette gegeben. Die Lösung enthielt  $10^{-7}$

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Mit den Farbstoffmolekülen Alexa Fluor 647 in  $\text{H}_2\text{O}$ . Dabei waren die Farbstoffe an eine negativ geladene einsträngige DNA mit einer Länge von 30 bp gekoppelt. Die Spitze war ca. 10 sec mit der Oberfläche bei einer angelegten Spannung von 500 mV in Berührung. Der Ionenstrom variierte in dieser Zeit zwischen 40 und 100 pA. Die fluoreszierenden Punkte (Spots) wurden in einem Abstand von 1  $\mu\text{m}$  gelegt.

### 4.2.2 Neuentwicklung der Software

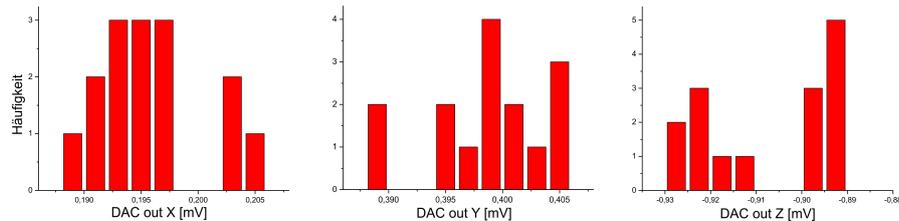
Die Annäherung der Nanopipette über das Prinzip ohne leitendes Lösungsbad setzt hohe Anforderungen an die Steuertechnik. So müssen die Schritte, mit der die Spitze an die Oberfläche angenähert wird, sehr klein sein (1,5 bis 3 nm), um ein Abbrechen dieser zu vermeiden. Gleichzeitig muss das System sehr schnell reagieren, wenn ein Ionenstrom detektiert wird. Um diese Vorgaben für das Ablegen von Farbstoffen auf trockenen Oberflächen zu erfüllen musste die Software, die hauptsächlich für die Steuerung des SICM ausgelegt war umgeschrieben werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Änderungen zu groß gewesen wären, da das SICM für die Arbeit in einer Elektrolytlösung ausgelegt ist. Daher wurde entschieden, die Steuerung zum Ablegen der Farbstoffe auf der Basis der vorhandenen Hardware komplett neu zu entwickeln.

Angelehnt an die SICM Software wird die neu entwickelte Software auf zwei Rechnern (HPC und RTC) parallel ausgeführt. Die Eingabe von Parametern durch den Nutzer ist auch hier nur auf dem HPC gestattet. Prinzipiell laufen auf dem RTC zwei Schleifen. Zum einen eine Schleife, die Befehle vom HPC entgegennimmt und sie direkt umsetzt (beispielsweise ein "Stage Up"- oder ein "Stage Down"-Befehl) und zum anderen eine automatisierte Annäherungsroutine, die vorher eingestellte Parameter vom HPC übernimmt und dann in einer Schleife die Oberfläche an die Spitze annähert. Diese Schleife läuft ausschließlich auf dem RTC und wird erst abgebrochen, wenn ein Annäherungsparameter erfüllt, oder der maximale Verstellweg der Piezostage erreicht ist. Des Weiteren ist ein Abbruchbefehl und ein Stopp-Befehl während der Annäherungsroutine vom HPC als Eingabe zugelassen. Die Routinen auf dem HPC sind in erster Linie darauf ausgelegt, Informationen über den aktuellen Zustand des Systems zu liefern. Dabei wird der Ionenstrom, der momentan fließt angezeigt und während der Annäherung die aktuelle Position der Piezostage, sowie Informationen über Annäherungsintervalle und Ionenstrom dargestellt. Weiterhin sind hier

## 4.2 Hochpräzise Farbstoffablage

Eingabeparameter für die Annäherungsroutine auf dem RTC möglich, sowie eine Einstellung der angelegten Spannung am MEA. Wenn ein Annäherungsprozess erfolgreich war, ist zusätzlich die direkte axiale und laterale Steuerung der Piezostage in definierten Schritten, sowie die axiale Steuerung der Nanopipette über den Z-Piezoblock möglich.

Die Schrittweiten, mit denen die Piezostage axial an die Spitze der Nanopipette angenähert sind sehr klein und betragen im Normalfall ungefähr 1,5 bis 3 nm. Diese kleine Schrittweite ist notwendig, um eine Zerstörung der Spitze bei Kontakt mit der Oberfläche zu vermeiden. Eine Schrittweite von 1,5 nm bedeutet eine Spannungsänderung in der Steuerungsroutine um  $610 \mu\text{V}$ , wobei die kleinste Schrittänderung  $305 \mu\text{V}$ , also  $0,7625 \text{ nm}$  beträgt. Dieser Wert gilt allerdings nur rein rechnerisch, da die minimale Schrittweite der Piezostage technisch zwar auf  $0,1 \text{ nm}$  beschränkt ist, aber das Rauschen nicht berücksichtigt wird. Diese kleinen Schrittweiten erfordern ein sehr präzises Arbeiten der Signalverarbeitung. Es ist deshalb wichtig, zu wissen, wie

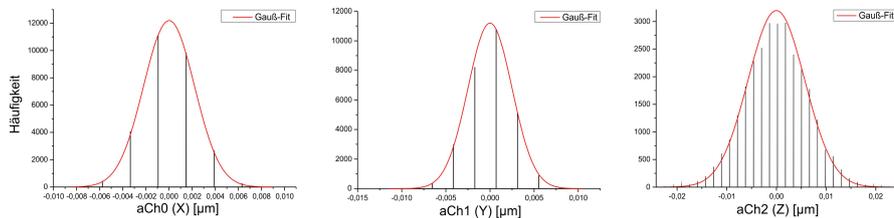


**Abbildung 4.2.3:** Statistik über das Rauschverhalten der Steuerausgänge X,Y,Z der NI-PXI6259 Karte für die Piezostage. X-Achse: gemessene Spannung, Y-Achse: Häufigkeit des jeweils gemessenen Spannungswertes

groß das Rauschen auf den jeweiligen Steuerkanälen ist. In Abbildung 4.2.3 ist das Rauschen für die Ausgangskanäle der NI-PXI6259 aufgetragen. Dafür wurden pro Ausgangskanal X,Y,Z jeweils 15 Werte bei einer angelegten Spannung von  $0 \text{ V}$  mit einem hochpräzisen Multimeter (Keithley 2000, Keithley Instruments Inc., Cleveland OH, USA) gemessen und histogrammiert. Auf den ersten Blick ist zu erkennen, dass bei einem angelegten Wert von  $0 \text{ V}$  die Ausgangsspannung nicht genau  $0 \text{ V}$  ist. Sie variiert in einem Bereich von  $-0,9 \text{ V}$  und  $0,4 \text{ V}$ , was bedeutet, dass die Nullpunkte nicht exakt kalibriert sind. Auch eine Neukalibration der Kanäle brachte keine Änderung. Wichtiger ist hier aber die Schwankungsbreite der Werte, da sich eine Schwankung in der Spannung schlussendlich in einer Schwankung der Piezostage widerspiegelt. Wenn zu dem Zeitpunkt gerade die Spitze in Berührung mit

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

der Oberfläche ist, würde eine zu starke Schwankung der Piezostage schlimmstenfalls in einem Abbruch der Spitze resultieren. Betrachtet man nun die Spannungswerte, so stellt man fest, dass die Stage lateral um maximal  $16 \mu\text{V}$  schwankt, was einer Verschiebung von  $0,04 \text{ nm}$  und axial um  $39 \mu\text{V}$ , was  $0,098 \text{ nm}$  entspricht. Die Ausgangskanäle zur Steuerung der Piezostage weisen also neben einer zu vernachlässigenden Verschiebung um den Nullpunkt nur eine minimale Schwankung auf. Ebenso interessant sind die Eingangskanäle für das “Feedback-signal” der Piezostage, das die aktuelle laterale und axiale Position ausgibt. Die Messungen sind in Abbildung 4.2.4 zu sehen. Hier wurde eine kleine LabView Routine geschrieben, die über 30000 Schritte mit  $1 \text{ kHz}$  das Rauschen bei nicht belegten BNC Anschlussbuchsen aufzeichnete. Über die Werte wurde ebenfalls histogrammiert. Es fällt auf,



**Abbildung 4.2.4:** Statistik über das Rauschverhalten der Eingänge X,Y,Z der NI-PXI6259 Karte für die Piezostage. X-Achse: gemessene Spannung umgerechnet in  $\mu\text{m}$ , Y-Achse: Häufigkeit des jeweils gemessenen Spannungswertes.

dass das Rauschen nur diskrete Werte annimmt. Dies könnte an Rundungsfehlern oder allgemeiner Messungenauigkeit der Datenerfassung gelegen haben. Allerdings sollte für die große Anzahl der Messwerte eine Gaußverteilung zu erwarten sein. Diese wurde an die Werte angefitet. Gut zu sehen ist, dass das Maximum der Verteilungen immer auf oder sehr nahe am Nullpunkt ist. Der  $2\sigma$  Bereich der Messwerte bewegt sich für den X- und Y-Eingang des Feedbacksignals bei  $\pm 5 \text{ nm}$  ( $\pm 2 \text{ mV}$ ). Für den Z-Eingang sogar bei  $\pm 10 \text{ nm}$  ( $\pm 4 \text{ mV}$ ). Diese Ungenauigkeit ist vor allem in axialer Richtung zu groß, um die Nanopipette mit Schritten von  $1,5 \text{ nm}$  anzunähern. Deswegen wurde bei der Software auf ein Arbeiten mit dem Feedbacksignal verzichtet. Es wurde stattdessen eine zeitliche Limitierung in der Steuerschleifendurchlauf-frequenz eingeführt. Diese ist auf  $500 \text{ Hz}$  begrenzt, da die Piezostage  $2 \text{ ms}$  benötigt, um eine Position anzufahren.

Zur Bestimmung des Annäherungspunktes der Spitze an die Oberflä-

che dient der Ionenstrom. Dieser ist allerdings oftmals mit einem Wert von  $\approx 5$  pA bei einem Rauschanteil von  $\approx 3$  pA sehr schwer zu detektieren. Herkömmliche Annäherungsprozeduren, wie die Bestimmung der Ionenstromänderung über ein definiertes Zeitintervall und das Setzen eines Thresholds sind nicht sensitiv genug, um eine zuverlässige Annäherung zu gewährleisten. Da das Rauschen, mit dem der Ionenstrom belegt ist, die größten Probleme bereitet, wurde die Annäherung über eine Intervallbildung mit Hilfe des Rauschens realisiert. Das heißt, dass über eine definierte Anzahl von Schritten bei der Annäherung davon ausgegangen wird, dass keine Annäherung vorliegt. In dieser Zeit wird das Rauschen gemessen und eine maximale Abweichung ermittelt. Diese Abweichung definiert den Threshold für die Annäherung. Liegt der Ionenstrom öfter als eine definierte Anzahl von Messwerten hintereinander über dem Threshold, so wird die Spitze als angenähert definiert. In der Praxis ergibt sich durch diese Annäherungsweise ein Fehler von 6 nm, den die Spitze in die Oberfläche eindringt, nachdem ein Ionenstrom detektiert wurde.

Für eine genauere und detailliertere Softwarebeschreibung inkl. der Beschreibung und Funktion der einzelnen Bedienelemente sei auf den Anhang dieser Arbeit verwiesen.

### 4.2.3 Charakterisierung der Oberflächen mittels Raman-Spektroskopie

Die Raman-Spektroskopie bietet vielfältige Möglichkeiten zur Analyse nicht nur von biologischen Proben, sondern auch von Materialien allgemein. Um Aufschluss über die genaue Zusammensetzung und Abmessungen der PVA-G-C Schichten zu bekommen wurde entschieden eine Charakterisierung über spontane Raman-Streuung durchzuführen, da die Bestandteile der Schichten PVA, Glycerin und Cysteamin eine Raman-Aktivität zeigen. Das in den Schichten vorhandene restliche Wasser zeigt allerdings eine weniger ausgeprägte Raman-Resonanz. Grundsätzliche Probleme bereitete die Tatsache, dass die drei Hauptbestandteile ihre größte Schwingungssensitivität im Bereich einer Raman-Verschiebung von 2850 bis 3100  $\text{cm}^{-1}$ , also dem Bereich der C-H Schwingungen zeigen. Die verschiedenen Spektren überlagern sich also. Durch Messung der Spektren jedes einzelnen Stoffes ist es allerdings möglich nachdem die Messungen durchgeführt sind die Spektren voneinander zu subtrahieren, um an die gewünschten Daten zu gelangen.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

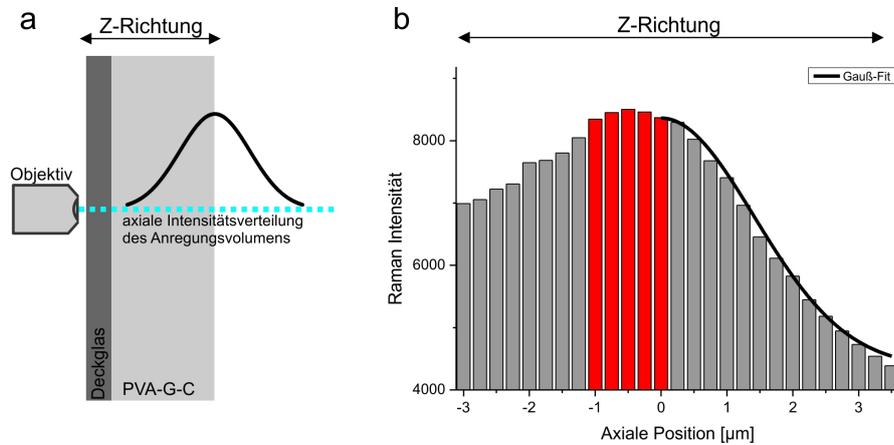
Für die Bestimmung der Schichtdicke einer typischen PVA-G-C Schicht (vgl. 3.5 – Oberflächen für die hochpräzise Farbstoffablage) wurde das Gesamtspektrum in Abhängigkeit von der axialen Position des konfokalen Anregungsvolumens gemessen. Die Raman-Spektren sollten dann den Intensitätsverlauf des axialen Anregungsvolumens widerspiegeln. Wenn ein charakteristischer axialer Punkt bekannt ist, könnte über diesen mit Hilfe der axialen Schrittweiten der Piezostage die Schichtdicke über symmetrische Überlegungen im Intensitätsverlauf bestimmt werden.

Als charakteristischer Punkt kann der Fokus des Laserstrahls, der im Mikroskop beim Übergang von einem Medium mit höherem Brechungsindex zum Medium mit einem kleineren Brechungsindex entsteht, dienen. Die Brechungsindizes der einzelnen Komponenten sind in Tabelle 4.2.1 aufgeführt. Hier muss eine Abschätzung des Brechungsindex der Kombination von PVA, Glycerin und Wasser gemacht werden. Der

Material	Immersionsöl	Glas	PVA	Glycerin	H <sub>2</sub> O	Luft
Brechungsindex	1,52	1,52	1,53	1,48	1,33	1

Tabelle 4.2.1: Brechungsindizes der beteiligten Komponenten

Brechungsindex von Cysteamin kann durch die geringe Konzentration in der Schicht vernachlässigt werden. Berücksichtigt man die Anteile der Komponenten an der Schicht, so wird der gesamte Brechungsindex auf 1,50 geschätzt. Der größte Sprung findet also vom Übergang von PVA-G-C nach Luft statt. Hier sollte dann auch der Laserstrahl fokussieren. Der Ausgangspunkt (Nullpunkt) für die Messungen liegt also auf dieser Grenzschicht. Abbildung 4.2.5 zeigt den Verlauf der Raman Intensität des gesamten PVA-G-C Spektrums (b). Die Daten wurden dabei pro Intensitätspunkt mit einer Anregungsleistung von 50 mW bei 488 nm über 30 sec aufgenommen. Das verwendete Gitter besaß 600 Linien pro Millimeter (l/mm). Der Fokus wurde in Schrittweiten von 200 nm durch die Schicht gefahren. Der Nullpunkt wurde dabei, wie beschrieben zu Anfang der Messung auf die PVA-G-C Oberfläche gelegt. Das Prinzip der Messung ist in (a) dargestellt. Der Fokus (dargestellt durch den axialen Intensitätsverlauf) wird dabei vom Nullpunkt 3µm nach rechts verschoben. Die Intensität des gesamten Spektrums nimmt dabei mit der Intensität des Fokus ab, was gut im Gaußförmigen Verlauf der Intensitätskurve in (b) zu sehen ist. Vom Nullpunkt 3 µm nach links zum Deckglas hin bewegt wird die Intensität des Spektrums erst



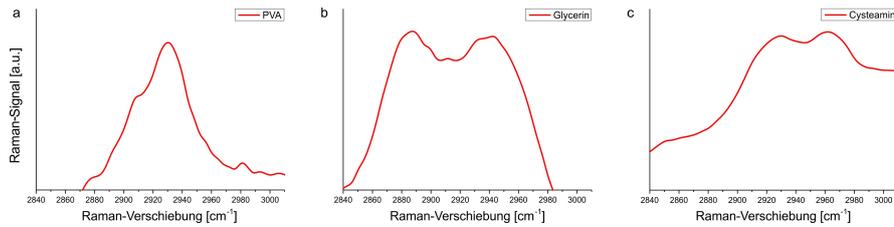
**Abbildung 4.2.5:** Schichtdickenmessung über Raman-Intensitäten. **a)** Darstellung des Messprinzips **b)** Raman-Intensitäten gegen die axiale Position. Der Raman-Intensitätsverlauf durch die PVA-G-C Schicht wurde vom Gaußverteilten Anregungsvolumen axial in 200 nm Schritten aufgenommen. Der Fokus wurde dabei zu Beginn der Messung auf die Oberfläche der PVA-G-C Schicht gelegt. Die Dicke der PVA-G-C Schicht liegt bei  $1\ \mu\text{m} \pm 125\ \text{nm}$ . Gemessen wurde jeweils die gesamte Raman-Emission.

größer und fällt dann sehr unregelmäßig ab. Das Maximum ist dabei der Punkt, an dem der Fokus den größten Anregungsquerschnitt in der PVA-G-C Schicht hat. Danach wandert der Fokus in das Deckglas, was zu zusätzlichem Streulicht und zusätzlichem Raman-Signal führt. Das erklärt den unregelmäßigen Abfall der Kurve auf dieser Seite. Die Dicke der Schicht ist über die rot markierten Intensitätsbalken angezeigt. Aus Symmetriegründen befindet sich dabei links der maximalen Intensität an einem bestimmten Punkt derselbe Anregungsquerschnitt des Fokus innerhalb der Schicht, wie auf der rechten Seite. Das ist dann notwendigerweise der Punkt, wo die Grenze von PVA-G-C Schicht und Deckglas liegt. Dadurch ergibt sich eine Dicke von  $1\ \mu\text{m} \pm 125\ \text{nm}$ . Der Fehler beschreibt dabei die Unsicherheit beim manuellen Einstellen des Fokus von insgesamt  $\approx 250\ \text{nm}$ .

Raman-Spektren der einzelnen Komponenten der PVA-G-C Schichten sind in Abbildung 4.2.6a-c gezeigt. Zu sehen sind die C-H Schwingungsbereiche von PVA, Glycerin und Cysteamin, an denen die Auswertung vorgenommen wurde. Ziel der Experimente war es herauszufinden, in welcher Form das Cysteamin vorliegt, um eine Aussage über die Ursache der Leitfähigkeit machen zu können. Daher ist es

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

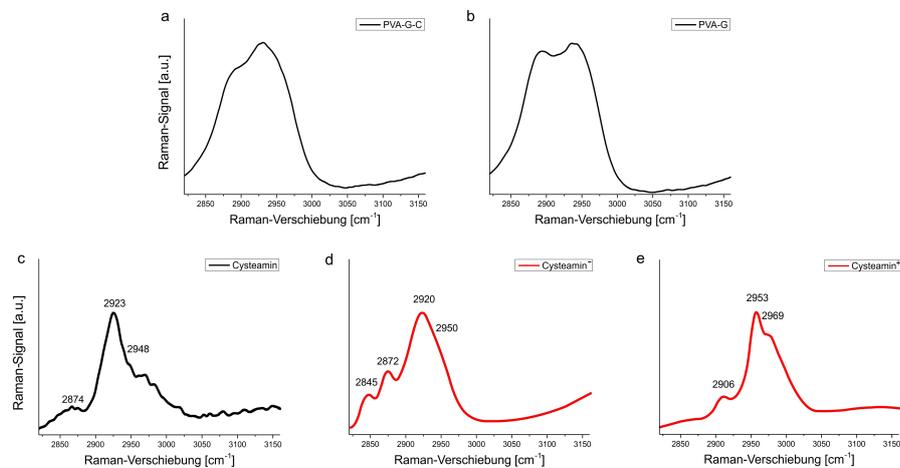
wichtig, Spektren der einzelnen Komponenten zu betrachten. Es ist bekannt, dass Cysteamin in  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und in kristallisierter Form als Zwitterion vorliegt. Es gibt allerdings auch negativ und positiv geladenen Formen, die für eine Leitfähigkeit verantwortlich sein können [Riauba et al., 2006]. Die einzelnen Spektren wurden mit einer Anre-



**Abbildung 4.2.6:** Ausschnitte von Raman-Spektren der C-H Schwingungsbereiche für die einzelnen Komponenten der PVA-G-C Schicht. **a)** Raman-Spektrum einer eingetrockneten PVA Schicht ( $2931$ ) **b)** Glycerin ( $2887$  und  $2944$ ) **c)** kristallförmiges Cysteamin in Zwitterform ( $2931$  und  $2960$ )

gungsintensität von  $40 \text{ mW}$  bei einer Wellenlänge von  $488 \text{ nm}$  über  $30 \text{ sec}$  aufgenommen. Als Monochromator wurde wieder ein Gitter mit  $600 \text{ l/mm}$  eingesetzt. Das PVA wurde dabei in wässriger Lösung angemischt und  $50 \mu\text{l}$  der Lösung auf ein Deckglas gegeben. Das Spektrum wurde nach Verdunsten des  $\text{H}_2\text{O}$  und Ausbildung einer dünnen Schicht aufgenommen. Glycerin wurde direkt aus dem Vorratsbehälter entnommen und  $10 \mu\text{l}$  auf ein Deckglas gegeben, wo dann das Spektrum aufgenommen wurde. Das Cysteamin wurde ebenfalls in einer wässrigen Lösung angemischt ( $1 \text{ M}$ ),  $50 \mu\text{l}$  auf ein Deckglas appliziert und nach Verdunsten spektral detektiert. Die Detektion fand dabei konfokal ca.  $5 \mu\text{m}$  über der Glasoberfläche statt. Die Intensitätsspitzen liegen für reines PVA bei  $2931 \text{ cm}^{-1}$  (in Übereinstimmung mit [Badr et al., 2004]), für Glycerin bei  $2887$  und  $2944 \text{ cm}^{-1}$  und für Cysteamin – als Zwitterion vorliegend – bei  $2931$  und  $2960 \text{ cm}^{-1}$  [Kudelski and Hill, 1999]. Messungen von PVA-G-C Oberflächen und PVA-G Oberflächen sind in Abbildung 4.2.7a,b zu sehen. Die Spektren wurden mit einer Leistung von  $25 \text{ mW}$  und einer Anregungswellenlänge von  $488 \text{ nm}$  aufgenommen. Die Aufnahmedauer betrug  $2 \text{ min}$ , das verwendete Gitter hatte  $600 \text{ l/mm}$ . Der Unterschied zwischen der Oberfläche mit Cysteamin (a) und ohne Cysteamin (b) ist deutlich zu sehen. Ohne Cysteamin dominieren die beiden Intensitätsmaxima des Glycerin und bilden insgesamt zwei Intensitätsspitzen bei  $2895$  und  $2935 \text{ cm}^{-1}$ . Mit Cysteamin verschmiert das gesamte Spektrum zu einem breiten Inten-

## 4.2 Hochpräzise Farbstoffablage



**Abbildung 4.2.7:** Vergleich des extrahierten Cysteamin Spektrums (c) mit den ionisierten Formen (d-e). Das Differenzspektrum von PVA-G-C und PVA-G Oberflächen (a-b) wurden erstellt. Das resultiert im Cysteaminspektrum (c). Die charakteristischen Intensitätsmaxima wurden markiert. Das Cysteamin entspricht im Vergleich der Maxima recht genau der negativ ionisierten Form (Cysteamin<sup>-</sup>). Quelle d,e:[Riauba et al., 2006]

sitätsmaximum bei  $2927 \text{ cm}^{-1}$ . Normalisiert und subtrahiert man das Spektrum (b) von Spektrum (a), so ergibt sich ein Differenzspektrum (c). Dieses sollte nur das Cysteamin enthalten. Allerdings wurde die Subtraktion dadurch erschwert, dass beide Spektren an unterschiedlichen Oberflächen aufgenommen wurden und diese nicht unter absolut identischen Bedingungen hergestellt und gemessen werden konnten. Jedoch wurde größte Sorgfalt darauf verwendet, möglichst identische Oberflächen herzustellen. Das resultierende Cysteaminspektrum weist keinerlei Ähnlichkeit mit der vorher gemessenen Zwitterform auf, die in der kristallisierten Form und in wässriger Lösung vorliegt (vgl. Abb. 4.2.6). Beide Intensitätsmaxima bei der Raman-Verschiebung von  $2887$  und bei  $2960 \text{ cm}^{-1}$  sind nicht vorhanden. Es dominiert ein charakteristisches Intensitätsmaximum bei  $2923 \text{ cm}^{-1}$ . Allerdings weist die ionisierte Form von Cysteamin jeweils einen charakteristischen Peak auf, der der symmetrischen Streckschwingung von  $\text{CH}_2$  für das positiv geladene Ion des Cysteamins (Cysteamin<sup>+</sup>) und der antisymmetrischen Streckschwingung des  $\text{CH}_2$  für das negativ geladene Ion des Cysteamins (Cysteamin<sup>-</sup>) zugeordnet wird [Riauba et al., 2006]. Vergleicht man das gemessene Spektrum von Cysteamin mit den Spektren der

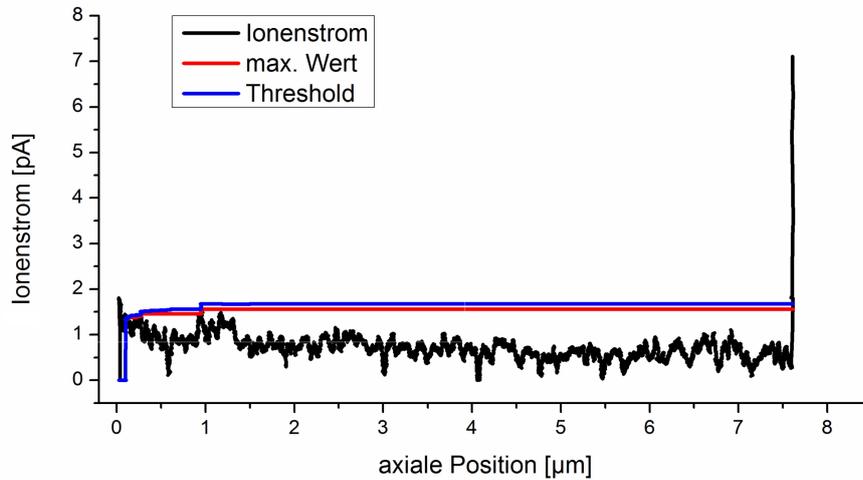
#### 4 Ergebnisse und Diskussion

ionisierten Form, so gibt es eine Übereinstimmung für das Hauptmaximum bei  $2923\text{ cm}^{-1}$  mit der negativ ionisierten Form des Cysteamin. Dieses hat sein Hauptmaximum bei  $2920\text{ cm}^{-1}$ . Die Abweichung von 3 Wellenzahlen ist dabei vernachlässigbar. Für das Maximum bei  $2953\text{ cm}^{-1}$  gibt es im Cysteaminspektrum eine minimale Übereinstimmung. Für die Nebenmaxima des Cysteamin<sup>-</sup> gibt es bei 2874 Wellenzahlen noch eine Übereinstimmung. Das Maximum bei 2845 kann hingegen nicht nachgewiesen werden. Jedoch spricht vieles dafür, dass das Cysteamin in den PVA-G-C Oberflächen vorwiegend als negatives Ion (Cysteamin<sup>-</sup>) vorliegt. Ob neben dem Cysteamin<sup>-</sup> noch weitere Formen wie das Cysteamin<sup>+</sup> oder die Zwitterform vorliegen kann aufgrund des ungenauen Spektrums nicht zweifelsfrei geklärt werden. Alle Interpretationen in diese Richtung würden in Spekulationen enden.

Über die Experimente konnte nachgewiesen werden, dass die PVA-G-C Schicht eine axiale Ausdehnung von ca.  $1\mu\text{m}$  hat. Des Weiteren konnte geklärt werden, dass das Cysteamin beim Ausbilden der PVA-G-C Schicht eine Konformationsänderung von der Zwitterform in die Cysteamin<sup>-</sup>-Form durchläuft. Ob diese nun für die leitenden Eigenschaften der Oberfläche verantwortlich ist, ist wahrscheinlich, konnte aber nicht zweifelsfrei geklärt werden. Ebenso wie die Frage, ob neben dem Cysteamin<sup>-</sup> noch weitere Formen in der Oberfläche existieren. Weiterhin wäre es für die Blinkeigenschaften von Farbstoffen, die in die PVA-G-C Oberfläche abgelegt werden, interessant gewesen zu erfahren, wie die Verteilung des Cysteamin innerhalb der PVA-G-C Schicht aussieht. Dadurch hätte man darauf schließen können, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass ein Cysteamin direkt neben einem Farbstoff liegt, was wiederum Auswirkungen auf die Löscheffizienz hat. Dies konnte allerdings ebenfalls nicht geklärt werden. Es wird angenommen, dass das Cysteamin relativ homogen verteilt in der Schicht vorliegt.

#### 4.2.4 Ablage, Weitfeldmikroskopie und Hochauflösung

Das Ablegen von Farbstoffmolekülen mit Hilfe einer Nanopipette auf PVA-G-C Oberflächen ist ein komplexer Vorgang, bei dem eine Vielzahl einzelner Komponenten präzise aufeinander abgestimmt werden müssen. In Kapitel 4.2.1 wurde das Prinzip erklärt, mit dem die Farbstoffmoleküle in die Oberfläche gebracht werden. In diesem Abschnitt wird eingehender auf die praktischen Vorgänge und die einzelnen Abläufe vom Ablegen der Farbstoffe über die Weitfelddetektion bis hin zur hochauflösenden Detektion eingegangen werden.



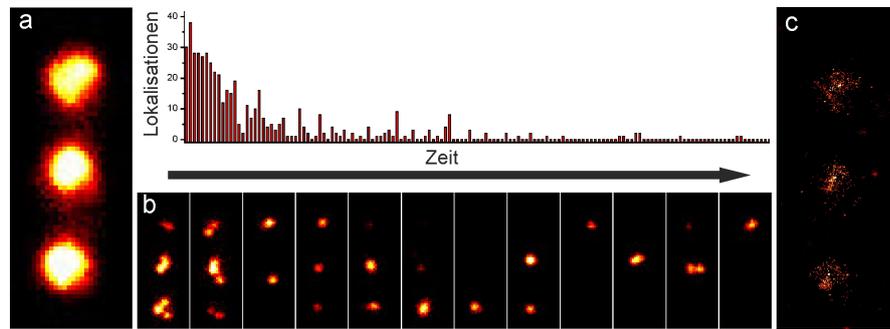
**Abbildung 4.2.8:** Annäherung der Nanopipette an eine PVA-G-C Oberfläche. Der Ionenstrom wurde über 50 Werte gemittelt, um eine Glättung zu erreichen. Der maximale Wert markiert den höchsten gemessenen Ionenstrom, der Threshold definiert die Annäherungsbedingung. Wird ein Ionenstrom über eine bestimmte Anzahl von Werten hintereinander (typischerweise 3-5 Werte) außerhalb des Thresholds detektiert, so wird die Spitze als angenähert betrachtet. Die Schrittweite beträgt hier 1,5 nm.

Der schwierigste Prozess ist das Annähern der Nanopipette an die PVA-G-C Oberfläche. Hat man alle vorbereitenden Aufgaben wie das Befüllen und Einspannen der Nanopipette erledigt, so wird die Spitze ca. 10  $\mu\text{m}$  manuell mit Hilfe der manuellen Verstelleinheit oberhalb der PVA-G-C Oberfläche positioniert (vgl. Kapitel 3.2.2). Eine Spannung von 0,5 bis 1 V wird daraufhin für den automatischen, softwarebasierten Annäherungsprozess angelegt. Danach wird die Annäherung mit einer Schrittweite von 1,5 bis 3 nm gestartet. Die Software fährt nun die Piezostage Richtung Pipettenspitze und detektiert dabei den Ionenstrom. Dabei berechnet sie über ein vorher definiertes Schrittintervall die einzelnen Grenzwerte, die einen Annäherungspunkt (Threshold) definieren. Abbildung 4.2.8 zeigt die Verlaufskurve einer Annäherung an eine PVA-G-C Oberfläche. Aufgetragen ist die axiale Position vom Startpunkt der Piezostage (0  $\mu\text{m}$ ) bis zum Annäherungspunkt bei  $\approx 7,6 \mu\text{m}$  gegen den detektierten Ionenstrom in Picoampere (pA). Der Strom ist dabei geglättet, indem er über 50 Werte gemittelt wurde. Das impliziert zwar eine gewisse Trägheit in das System,

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

jedoch können so effektiv Störungsspitzen herausgefiltert werden, die ungewollt eine Annäherung auslösen würden. Die Intervallbildung erfolgt über den maximal detektierten Ionenstromwert (max. Wert). Dieser wird über ein definiertes Intervall von Schritten immer wieder mit dem aktuellen Strom verglichen und der Maximalwert herausgefiltert, mit dem alten Maximalwert verglichen und ggf. als neuer maximaler Wert festgesetzt. Die Intervallbildung ist nach ca. 1  $\mu\text{m}$  abgeschlossen. Der Maximalwert wird jetzt nicht mehr verändert. Der Annäherungswert (Threshold) wird bestimmt, indem der maximale Wert mit einem bestimmten Intervall, welches vom Nutzer festgelegt ist, addiert wird. Dieser Threshold ist der Grenzwert, den der detektierte Ionenstrom eine festgelegte Anzahl aufeinanderfolgend überschreiten muss, um die Spitze als angenähert zu definieren. Die Annäherung erfolgte im gezeigten Beispiel mit 1,5 nm Schrittweite. Zu sehen ist, dass der Ionenstrom bei Berührung mit der Oberfläche sehr abrupt einsetzt. Die Annäherungssteuerung hat also nicht viel Zeit, den Annäherungsprozess zu stoppen. Nachdem der Ionenstrom fünf mal hintereinander über dem Threshold detektiert wurde, dauerte es noch drei Schritte, bis die Annäherung gestoppt wurde. Nach dem ersten Kontakt der Nanopipette mit der Oberfläche dringt diese also noch insgesamt mindestens 12 nm in die PVA-G-C Schicht ein. Bei jedem Schritt besteht dabei die Gefahr, dass die Spitze abbricht. Deshalb ist es wichtig, diese Schrittzahl so gering wie möglich zu halten, ohne auf der anderen Seite die Zuverlässigkeit des Annäherungsprinzips zu vermindern.

Nachdem der Kontakt mit der Oberfläche ohne Abbrechen der Spitze erfolgt ist, wird die Spannung auf einen Wert zwischen -20 und -50 mV gesetzt. Aufgrund der negativen Spannung bewegen sich die Moleküle zur Spitzenöffnung und können aus dieser herausdiffundieren. Jetzt beginnt die eigentliche Ablage der Farbstoffmoleküle. Der Ionenstrom pendelt sich dann in den meisten Fällen nach Änderung der Spannung zwischen 5 und 50 pA ein. Der Strom kann also um mehr als das 10-fache schwanken. Die Ursache liegt wahrscheinlich darin, dass durch das  $\text{H}_2\text{O}$  in der Nanopipette die Oberfläche angelöst wird und mit der Zeit mehr Ionen für die Leitung des Stroms zur Verfügung stehen. Es wird vermutet, dass der Übergang zwischen Spitze und Oberfläche aufgrund des kleinen Innendurchmessers und die Übersetzung von  $\text{Cl}^-$ -Ionen zu  $\text{Cyst}^-$ -Ionen als leitendes Medium die größte Potentialbarriere für den Strom darstellt. Die Ablage von Farbstoffen erfolgt dabei mit einem typischerweise schwankenden Strom. Dieser kann als abgelegte Ladung (Strom·Zeit) über einen Wert voreingestellt werden. D.h. die Ablage-



**Abbildung 4.2.9:** Prinzip der Hochauflösung. **a)** Weitfeld Fluoreszenzbild von drei Farbstoffpunkten, aufgenommen mit  $150 \text{ W/cm}^2$  **b)** Einzelne Fluoreszenzbilder aufgenommen mit  $40 \text{ ms}$  bei  $1 \text{ kW/cm}^2$  mit einer Anregungswellenlänge von  $647 \text{ nm}$  **c)** Rekonstruiertes Bild, basierend auf  $10.000$  einzelnen Bildern.

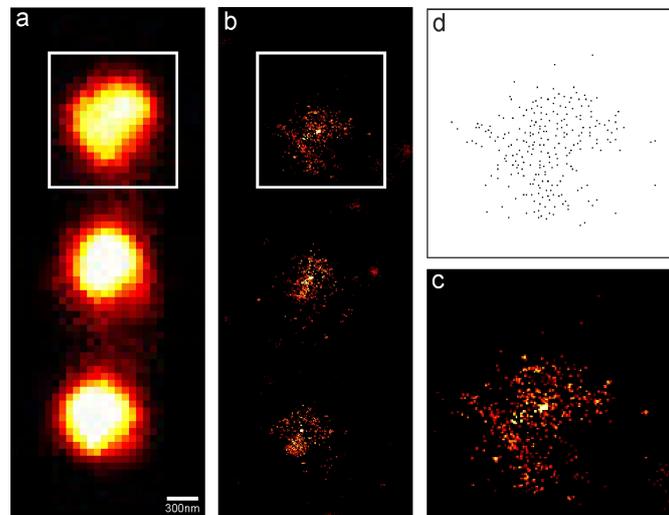
dauer ist pro gelegtem Farbstoffpunkt nicht gleich, sondern variiert umgekehrt proportional mit dem Ionenstrom. Das ermöglicht im Mittel eine annähernd gleiche Ablage von Molekülen. Dabei wird davon ausgegangen, dass die elektrophoretische Kraft, die auf die Moleküle wirkt in der Spitze relativ konstant ist und die Anzahl der Moleküle mit der Stromstärke linear skaliert. Ist der Ablagewert erreicht, wird die Spitze von der Oberfläche gelöst und in die Ausgangsposition für die Annäherung zurückgefahren. Die Anzahl der abgelegten Moleküle kann nicht direkt beobachtet werden. Ein Fluoreszenzweitfeldbild zeigt während des Ablageprozesses hauptsächlich die Farbstoffe in der Nanopipette. Erst nachdem die Spitze von der Oberfläche gelöst wurde, kann detektiert werden, ob und in welcher Größe ein Farbstoffpunkt bestehend aus einer bestimmten Anzahl von Farbstoffmolekülen in der PVA-G-C Schicht abgelegt wurde.

Die möglichst genaue Charakterisierung der gelegten Farbstoffpunkte erfolgt über die Hochauflösung der gelegten Farbstoffe. Dabei wird eine Zeitserie von Bildern der Punkte (typischerweise  $10000$ - $20000$  Bilder) mit einer kurzen Belichtungszeit ( $10$ - $20 \text{ ms}$ ) aufgenommen und eine Einzelmoleküllokalisation durchgeführt (vgl. Kapitel 2.2.3 – Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie). In Abbildung 4.2.9 ist das grundsätzliche Prinzip dargestellt. Zu sehen sind drei Farbstoffpunkte bestehend aus Alexa Fluor 647 gekoppelt an ein DNA Fragment mit  $30 \text{ bp}$ , die mit einer Nanopipette mit einem Öffnungsdurchmesser von  $60 \text{ nm}$  auf eine PVA-G-C Oberfläche gelegt wurden. Die Farbstofflösung in der

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Nanopipette hatte dabei eine Konzentration von  $10^{-7}$  M in  $\text{H}_2\text{O}$ . Die Farbstoffpunkte wurden in einem Abstand von  $1,5 \mu\text{m}$  gelegt (Mittelpunkt zu Mittelpunkt). Sie können mit Hilfe der Weitfeldmikroskopie sehr gut voneinander unterschieden werden. Für die Ablage der drei Spots wurde bei einer angelegten Spannung von  $-50$  mV bei einem Ionenstrom von  $\approx 20$  pA die Spitze ca. 3 sec auf der Oberfläche gehalten, bevor sie wieder in die Ausgangsposition zurückgesetzt wurde. Die Weitfeldaufnahme in a) wurde bei einer Laserleistung von  $150 \text{ W/cm}^2$  bei einer Anregungswellenlänge von  $647 \text{ nm}$  und einer Belichtungszeit von  $100 \text{ ms}$  gemacht. Die dSTORM Rekonstruktion der Punkte geschieht über Blinken der Farbstoffe und Aufnahme einer Zeitserie [van de Linde et al., 2011]. Die Zeitserie der Fluoreszenzbilder (b) wurde über  $10000$  Bilder bei einer Belichtungszeit von  $40 \text{ ms}$  und einer Laserleistung von ca.  $1 \text{ kW/cm}^2$  aufgenommen. Dabei wurden innerhalb der  $10000$  Bilder  $4000$  einzelne Moleküle lokalisiert. Durch das Cysteamin in der Oberfläche ließ sich das Alexa Fluor 647 effektiv schalten, ohne photozerstört zu werden. Auf eine Photoaktivierung mit einer kleineren Wellenlänge, um die Anzahl der detektierten Moleküle zu erhöhen wurde verzichtet. Die Anregungswellenlänge war wiederum  $647 \text{ nm}$ . Deutlich zu sehen ist in den Beispielbildern: Nicht jedes Farbstoffmolekül emittiert zu jedem Zeitpunkt. Die Zeitspur zeigt dabei ein Histogramm über die Anzahl der detektierten Farbstoffe pro Zeitabschnitt. Bild c) zeigt das resultierende rekonstruierte Bild. Hier sind die Umrisse der einzelnen Punkte zu erkennen. Ebenso kann die Verteilung der einzelnen Farbstoffmoleküle innerhalb eines Punktes ausgemacht werden. Gut zu erkennen ist, dass die Verteilung der Moleküle innerhalb eines gelegten Punktes nicht gleichmäßig ist. In der Mitte ist die Dichte der Moleküle tendenziell höher, als an der Seite. Dies lässt die Vermutung zu, dass während des Ablageprozesses Diffusion stattfindet. Die hochaufgelöste Rekonstruktion der Bilder wurde in sämtlichen Experimenten mit der RapidSTORM Software Version 2.20 [Wolter et al., 2010] gemacht.

Die Anzahl der Moleküle innerhalb eines gelegten Fluoreszenzpunktes ist eine interessante Größe, um Aussagen über die Genauigkeit, mit der Punkte reproduziert werden können zu machen. Abbildung 4.2.10d zeigt die Anzahl von detektierten Maxima in einem hochaufgelösten Fluoreszenzpunkt. für die Analyse wurden dieselben Fluoreszenzpunkte wie in Abbildung 4.2.9 genommen. Es gelten also dieselben Aufnahmeparameter für Weitfeld- und rekonstruierte Bilder. Um eine Angabe über die Anzahl der Moleküle in dem Punkt machen zu können, wurde das hochaufgelöste Bild (c) in ImageJ (Version 1.45s) geladen. Über

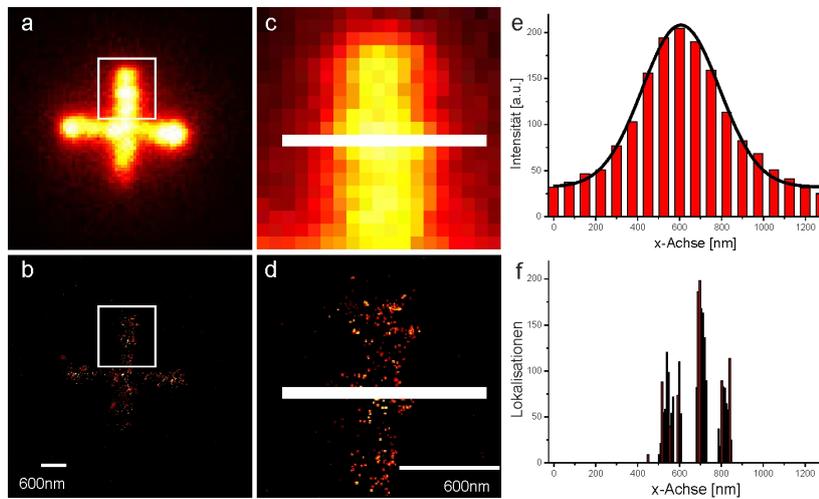


**Abbildung 4.2.10:** Anzahl der Moleküle, die pro Farbstoffpunkt gelegt werden. **a)** Weitfeldaufnahme der gelegten Punkte (Aufnahmeparameter vgl. Abb. 4.2.9). **b)** rekonstruiertes hochaufgelöstes Bild. **d)** Markierte Maxima der einzelnen Lokalisationen aus **c)**. Für diesen Punkt sind 247 Maxima bzw. Gesamtlokalisationen.

den “Maxima Finder” wurden mit einem Threshold von 30 die einzelnen Maxima gezählt und deren Position auf dem Bild markiert. Dies resultiert in der Abbildung 4.2.10d. Gefunden wurden für diesen Punkt 247 Maxima. Die Anzahl der detektierten Lokalisationen mittels dSTORM wird für diesen Punkt auf 247 festgesetzt. Eine Auswertung über mehrere Fluoreszenzpunkte ergibt eine mittlere Anzahl von  $214 \pm 38$  Lokalisationen für eine 60 nm Pipette mit einer Farbstoffkonzentration von  $10^{-7}$  M und bei einer Ablegezeit von 3 sec, einer angelegten Spannung von -50 mV und einem Strom von -20 pA im Mittel (der Ionenstrom schwankt teilweise sehr heftig während der Ablage).

Um das Auflösungsvermögen der Ablagetechnik herauszufinden wurden weitere Strukturen erzeugt, in deren Verlauf der Punkt zu Punktabstand weiter reduziert wurde. Abbildung 4.2.11 zeigt 13 einzelne Farbstoffpunkte Alexa Fluor 647 mit 30 bp DNA zu einem Kreuz angeordnet. Der Punktabstand beträgt hier 300 nm (Mittelpunkt zu Mittelpunkt). Die Punkte wurden mit einer 60 nm Pipette abgelegt. Die verwendete Farbstofflösung hatte eine Konzentration von  $10^{-7}$  M. Die angelegte Spannung betrug -30 mV, bei einem Ionenstrom von -5 bis -30 pA und einer Ablagezeit von ca. 1 bis 3 sec. Die Aufnahmen entstanden

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

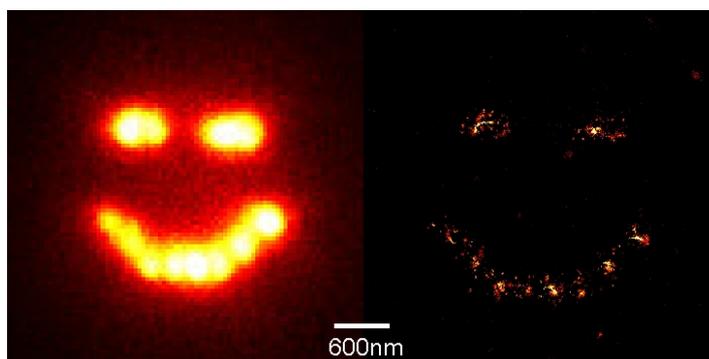


**Abbildung 4.2.11:** 13 einzelne Farbstoffpunkte mit Alexa Fluor 647 kreuzförmig angeordnet. Der Mittelpunkt zu Mittelpunkt Abstand der Punkte beträgt 300 nm. Sie wurden mit einer 60 nm Pipette über ein Potential mit -30 mV und einem Ionenstrom von -5 bis -30 pA abgelegt. Die Weitfeldaufnahme (a) wurde mit einer Leistung von  $350 \text{ W/cm}^2$  gemacht. Die Anregungswellenlänge betrug 647 nm. Das rekonstruierte Bild (b) wurde aus über 8000 einzelnen Lokalisationen erzeugt. Diese wurden aus einer Bildserie von 10000 Einzelbildern extrahiert, die mit  $1 \text{ kW/cm}^2$  aufgenommen wurden.

mit einer Anregungswellenlänge von 647 nm bei  $350 \text{ W/cm}^2$  (Weitfeld) und  $1 \text{ kW/cm}^2$  (dSTORM Aufnahme). Für das rekonstruierte Bild wurde eine Bildserie über 10000 Einzelbilder bei einer Belichtungszeit von 40 ms aufgenommen. Das rekonstruierte Bild wurde dabei aus 8000 Lokalisationen erzeugt. Bild a) zeigt das normale Weitfeldbild, b) das hochaufgelöste Bild. c) und d) enthalten jeweils vergrößerte Ausschnitte und e) bzw. f) enthalten die Querschnitte durch eine Pixelreihe. Die einzelnen Farbstoffpunkte sind in der Abbildung über das Weitfeldfluoreszenzbild (a) nicht mehr auszumachen. Der Querschnitt durch die Punkte zeigt eine Halbwertsbreite von 435 nm. Dies liegt deutlich über dem theoretischen Auflösungsvermögen von  $\approx 300 \text{ nm}$  für das Weitfeldmikroskop bei der entsprechenden Wellenlänge. Auch in dem rekonstruierten Bild (b und d) können die einzelnen Punkte nicht unterschieden werden, obwohl die einzelnen Moleküle zu unterscheiden sind. Es liegt also nicht am Auflösungsvermögen des Mikroskops, dass die Farbstoffpunkte nicht mehr zu unterscheiden sind, sondern an der Punktgröße selbst. Abbildung 4.2.11f zeigt den Querschnitt durch das

rekonstruierte Bild. Hier kann man erkennen, dass die reine Ausdehnung der Punkte ungefähr bei 340 nm liegt. Die Farbstoffpunkte gehen bei einem gelegten Abstand von 300 nm also ineinander über. Einzelne Gesamtlokalisationen haben im rekonstruierten Bild eine Halbwertsbreite von 38 nm. Die Verteilung der Farbstoffmoleküle innerhalb eines Punktes weist kein einheitliches Muster auf. Die Diffusionsprozesse scheinen also sehr komplex und nicht richtungsgesteuert zu verlaufen. Kleinere Strukturen konnten während der Arbeit nicht erzeugt werden. Dies liegt zum einen wahrscheinlich an der Diffusion der Farbstoffmoleküle durch die PVA-G-C Schicht, die ihrerseits wieder von der angelegten Spannung abhängt, die auf die negativ geladenen DNA Stränge wirkt, an denen der Farbstoff hängt. Zum anderen spielt der Öffnungswinkel der Nanopipette eine nicht zu unterschätzende Rolle. Hier könnte der Öffnungsdurchmesser auf 20 nm reduziert werden. Linear approximiert würde dies den Radius der Farbstoffpunkte von 340 nm auf  $\approx 125$  nm reduzieren. Allerdings wäre vorher zu klären, ob die Moleküle aus dem Öffnungsdurchmesser von 20 nm überhaupt herausdiffundieren. Ein anderer Ansatz wäre die Länge der DNA Stränge, an denen der Farbstoff befestigt ist zu kürzen. Damit würde die Kraft, die auf die einzelnen Moleküle wirkt verringert und der Diffusionsweg der Moleküle durch die PVA-G-C Schicht reduziert. Eine Verringerung der Farbstoffkonzentration in der Nanopipette hätte wahrscheinlich nur Einfluss auf die Dichteverteilung der Moleküle innerhalb des Punktes und nicht auf dessen Ausdehnung. Die Verbesserungen müssten in der Praxis allerdings mit der Detektionsgenauigkeit der einzelnen Geräte vereinbar sein. Für die Verringerung des Öffnungsdurchmessers der Nanopipette würde dies heißen, dass der Ionenstrom in einem detektierbaren Rahmen bleiben muss. Dieser würde sich durch die Verringerung des Durchmessers sehr stark verkleinern. Dem könnte man allerdings wieder über die Erhöhung, also letztendlich der Verbesserung der Leitfähigkeit der PVA-G-C Schicht entgegenwirken. Der Verkürzung der DNA Fragmente würde praktisch gesehen nichts im Weg stehen, solange sich der Durchmesser der Punkte nur auf die elektrischen Kräfte beschränkt. Ebenso denkbar ist natürlich auch eine Kombination der eben genannten Vorschläge. Dies würde heißen, dass man den Spitzendurchmesser verkleinert und gleichzeitig die Länge der DNA Fragmente kürzt. Wenn man dann die Spannung erhöhen müsste, um einen detektierbaren Strom durch die kleinere Spitze zu erzeugen, so würde die Kraft, die auf die Moleküle wirkt durch die kürzeren DNA Fragmente nicht größer. Es sollten sich damit dann kleinere Farbstoffpunkte

#### 4 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4.2.12:** Weitfeldfluoreszenzbild und dSTORM Rekonstruktion einer Struktur mit variablen Punktabständen. Verwendet wurde Alexa Fluor 647 mit 30 bp DNA in einer Konzentration von  $10^{-7}$  M. Die Weitfeldaufnahme wurde mit  $350 \text{ W/cm}^2$ , die rekonstruierte Aufnahme aus 5500 Lokalisationen rekonstruiert, welche aus 10000 Einzelbildern aufgenommen bei  $1 \text{ kW/cm}^2$  mit 647nm Anregungswellenlänge stammen. Die Abstände zwischen den einzelnen Punkten variieren zwischen 300, 425, 900 und 1200 nm.

erzeugen lassen.

An Abbildung 4.2.12 wird gezeigt, dass auch Strukturen mit variablen Farbstoffpunkt-Abständen möglich sind. Hier wurden Abstände von 300, 425, 900 und 1200 nm erzeugt. Für die Punkte wurde eine 60 nm Pipette mit einer  $10^{-7}$  M Farbstofflösung Alexa Fluor 647 markiert mit 30 bp DNA verwendet. Die Punkte wurden mit einer angelegten Spannung von -20 mV und einem Ionenstrom von -5 bis -50 pA über einen Zeitraum von jeweils 1 bis 10 sec in die PVA-G-C Schicht gebracht. Das Weitfeldfluoreszenzbild wurde mit einer Wellenlänge von 647 nm bei einer Anregungsleistung von  $350 \text{ W/cm}^2$  bei einer Belichtungszeit von 80 ms erzeugt. Das rekonstruierte dSTORM Bild wurde aus 10000 Einzelbildern berechnet, die mit einer Anregungsleistung von  $1 \text{ kW/cm}^2$  und einer Belichtungszeit von 15 ms aufgenommen wurden. Die Anzahl der Lokalisationen für das rekonstruierte Bild lag bei 5000. Das Bild selbst besteht dabei aus 12 Einzelpunkten. Die einzelnen Punkte können hier auch im Weitfeldbild recht gut voneinander unterschieden werden. Die Form der einzelnen Farbstoffpunkte ist sehr unregelmäßig ausgeprägt. Auch in dieser Aufnahme kann kein Muster für die Verteilung der einzelnen Farbstoffmoleküle innerhalb eines Punktes erkannt werden. Auffällig im rekonstruierten Bild sind große Cluster, die im Mittelpunkt fast eines jeden Farbstoffpunktes zu sehen

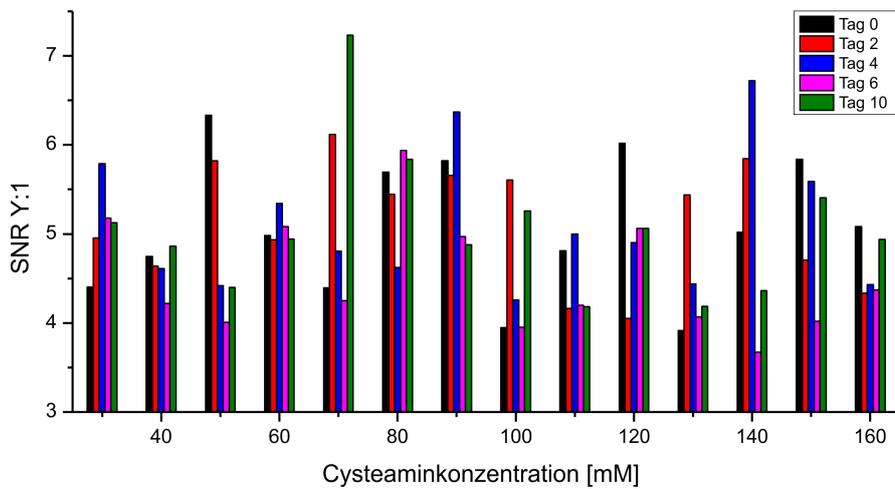
sind. Die Diffusion scheint hier nicht so deutlich ausgeprägt zu sein, da auch im normalen Diffusionsradius von 160 nm kaum Farbstoffe zu sehen sind. Eine Erklärung dafür wäre ein geringerer Durchmesser der Spitze, die den Diffusionsradius einengen würde. Dies würde die These stützen, dass nur der Öffnungsdurchmesser der Nanopipette großen Einfluss auf den Diffusionsradius hat. Eine andere Erklärung wäre eine festere Konsistenz der PVA-G-C Oberfläche. Die Farbstoffmoleküle würden dann nicht so weit durch das Medium diffundieren können.

### 4.2.5 Haltbarkeit der erzeugten Oberflächen

Um die Haltbarkeit der erzeugten PVA-G-C Oberflächen zu ermitteln, wurden Testoberflächen mit verschiedenen Cysteamin Konzentrationen angefertigt. Die durchschnittlichen Photonenausbeuten pro Farbstoff, aus einem zufällig gewählten Bereich der Oberfläche, diente dabei als Indikator für den Zustand der Oberfläche. Die durchschnittlichen Photonenausbeuten wurden gegen das Rauschen aufgerechnet und so ein Signal zu Rausch Verhältnis (Signal to Noise Ratio, SNR) ermittelt. Die PVA-G-C Oberflächen wurden über 10 Tage immer wieder vermessen. Dabei wurde jeweils das SNR ermittelt. Die Messungen wurden mit zwei Zielen durchgeführt: 1. Aufgrund der Messergebnisse können Aussagen zum SNR in Abhängigkeit von der Cysteamin Konzentration gemacht werden, da das Blinken der Farbstoffe von der Cysteaminkonzentration abhängt. Dies würde helfen, eine optimale Oberfläche mit möglichst großen Photonenausbeuten aus den Farbstoffen zu bekommen. 2. Aussagen über der Haltbarkeit in Abhängigkeit der Zeit können gemacht werden. Zeitgleich würde eine zeitliche Einschätzung der SNR Entwicklung für jede Cysteamin Konzentration möglich sein.

Zwischen den Messungen wurden die Oberflächen bei 4°C gelagert. Die Oberflächen wurden nach Kapitel 3.5 – Oberflächen für die hochpräzise Farbstoffablage angefertigt. Die Cysteaminkonzentration wurde dabei von 30 bis 160 mM variiert. Die Konzentrationsgrenzen wurden gewählt, da unterhalb von 30 mM keine Leitfähigkeit unter den experimentellen Gegebenheiten mehr nachgewiesen werden konnte. Oberhalb von 160 mM beginnt das Cysteamin auszukristallisieren, da der Wasseranteil in der Oberfläche zu gering wird. Dadurch, dass das Glycerin hauptsächlich für den Wasseranteil in der Oberfläche verantwortlich ist, würde nur eine Erhöhung des Glycerinanteils der Auskristallisierung entgegenwirken. Dies würde allerdings dazu führen, dass die Diffusion der Farbstoffmoleküle in der Oberfläche wahrscheinlich zu-

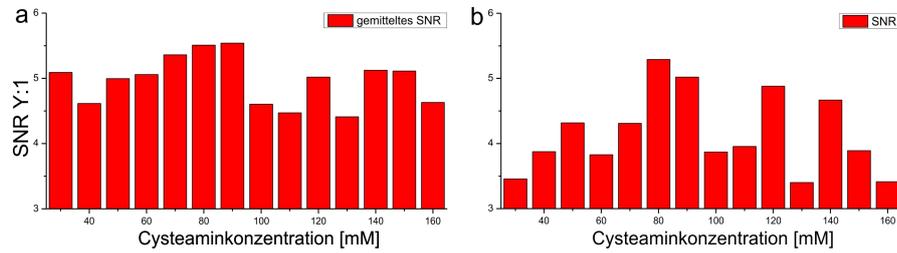
#### 4 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4.2.13:** Haltbarkeit der PVA-G-C Oberflächen mit einer Konzentration von  $10^{-9}$  M Alexa Fluor 647 bei verschiedenen Cysteaminkonzentrationen. Ausgewertet wurden jeweils 5000 Einzelbilder pro Konzentration und Messtag. Die Aufnahmen wurden mit einer Leistung von  $350 \text{ W/cm}^2$  bei einer Anregungswellenlänge von 647 nm und einer Belichtungszeit von 25 ms gemacht.

nimmt. Abbildung 4.2.13 zeigt das Ergebnis der Haltbarkeitsmessungen. Aufgetragen sind die Cysteaminkonzentrationen gegen das SNR. Jede Konzentrationsangabe ist noch einmal in verschiedenfarbige Messbalken unterteilt. Sie repräsentieren den Tag der Messung und geben ein Gefühl für die zeitliche Entwicklung der Einzelmoleküloberflächen. Auffallend ist hier, dass das SNR für eine Cysteaminkonzentration über die zeitlichen Messungen zum Teil sehr stark schwanken. Dies ist wahrscheinlich den Aufnahmen und der komplexen Auswertung geschuldet, die einen sehr großen Fehler verursacht. Die Aufnahmen können durch das Durchwecheln der Oberflächen, die auf einzelnen Probendeckgläsern lagen und für jede Messung getauscht und neu fokussiert werden mussten, sowie den unterschiedlichen Messtagen nicht absolut identisch sein. Für die Auswertung wurden 5000 einzelne Bilder der Oberfläche bei einer Anregungsleistung von  $350 \text{ W/cm}^2$  bei 647 nm und einer Belichtungszeit von 25 ms genommen. Danach wurde die durchschnittliche Gesamtanzahl der detektierten Photonen der Bilderserie genommen und das Hintergrundrauschen subtrahiert. Es ergibt sich ein durchschnittliches SNR gemittelt über 5000 Einzelbilder. Dies ist eine statistische Größe, die natürlich ebenfalls gewissen Schwankungen

## 4.2 Hochpräzise Farbstoffablage

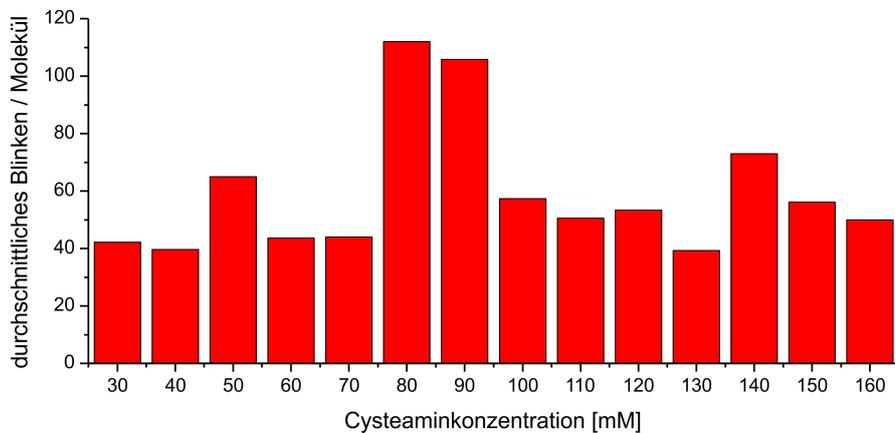


**Abbildung 4.2.14:** Gemittelt SNR für verschiedene Cysteaminkonzentrationen aus 4.2.13 bei  $350 \text{ W/cm}^2$  (a). SNR bei einer Leistung von  $1 \text{ kW/cm}^2$ (b).

abhängig von der Aufnahme selbst unterworfen ist. Für die einzelnen Konzentrationen schwankt das SNR zwischen 3,5:1 und 7,2:1, wobei die größten Schwankungen bei einer Konzentration von 70 mM Cysteamin auftreten. Die Konzentration von 80 mM hat zwar einen Einbruch bei Tag vier und 90 mM geht von durchschnittlich 6:1 an den letzten beiden Messtagen auf 5:1 zurück, aber die beiden Oberflächen scheinen am stabilsten auf einem hohen SNR zu liegen. Insgesamt kann aber gesagt werden, dass die Oberflächen über die Zeit einen recht stabilen Eindruck machten. Es konnte immer an einer beliebigen Stelle gemessen werden. Alle Farbstoffmoleküle in den jeweiligen PVA-G-C Oberflächen waren auch nach 10 Tagen noch einfach zu detektieren.

Die Schwankungen im SNR über die einzelnen Messtage machen es schwer, die Vorteile im SNR für eine bestimmte Cysteaminkonzentration zu erkennen. Deshalb wurde für die einzelnen Konzentrationen über die Messtage gemittelt, um ein durchschnittliches SNR zu generieren, damit eine pauschale Aussage über die Helligkeit der einzelnen Farbstoffmoleküle unter den experimentellen Bedingungen gemacht werden kann. Dies ist in Abbildung 4.2.14a gezeigt. Hier zeichnet sich ab, dass die Konzentrationen von 80 und 90 mM Cysteamin die besten SNR haben. Erhöht man die Anregungsleistung auf  $1 \text{ kW/cm}^2$ , so ist deutlich zu sehen, dass die beiden Konzentrationen auch bei höheren Leistungen konstant bleiben (Abb. 4.2.14b). Eine weitere wichtige Größe für die Hochauflösung über dSTORM ist das Blinkverhalten der einzelnen Farbstoffmoleküle. Dieses konnte ebenfalls anhand der aufgenommenen Daten ausgewertet werden. Dafür wurden die einzelnen Aufnahmen mit Hilfe der dSTORM Software ausgewertet. Im hochaufgelösten Bild wurden die einzelnen detektieren Gesamtlokalisationen gezählt. Anschließend wurde in der entsprechenden "Log-Datei" die Anzahl der

## 4 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4.2.15:** Durchschnittliches Blinken pro Farbstoffmolekül Alexa Fluor 647 in Abhängigkeit der Cysteaminkonzentration. Aufgenommen bei einer Leistung von  $1 \text{ kW/cm}^2$  über 5000 Bilder mit einer Belichtungszeit von 25 ms bei 647 nm.

Gesamtlokalisationen pro Bild entnommen und durch die Anzahl der Moleküle geteilt. Das Ergebnis ist eine ungefähre Größe für das Blinken eines detektierten Moleküls über 5000 Bilder. Die Ergebnisse müssen allerdings mit Vorsicht behandelt werden, da in der Auswertung nicht berücksichtigt ist, dass ein Farbstoffmolekül über mehrere Bilder der Zeitserie Photonen emittiert. Wie hoch der Anteil dieser “Fehllokalisationen” ist, wurde nicht ermittelt. Dafür hätte es einer weiteren Auswertung bedurft, die eine Statistik darüber erstellt, wie lange ein Farbstoffmolekül im Mittel Photonen emittiert. Für die entsprechende Belichtungszeit mit der die Bildserie aufgenommen wurde hätte man dann ermitteln können, wie viele Farbstoffe durchschnittlich mehr als einmal ohne zu blinken detektiert werden. Die Auswertung zeigt aber einen deutlichen Anstieg des durchschnittlichen Blinkverhaltens eines Farbstoffmoleküls bei einer Cysteaminkonzentration von 80 und 90 mM. Dieser ist so signifikant, dass davon ausgegangen werden kann, dass diese Konzentrationen für die PVA-G-C Oberflächen insgesamt als ideal anzusehen sind.

### 4.2.6 Farbstoffablage in Zellen

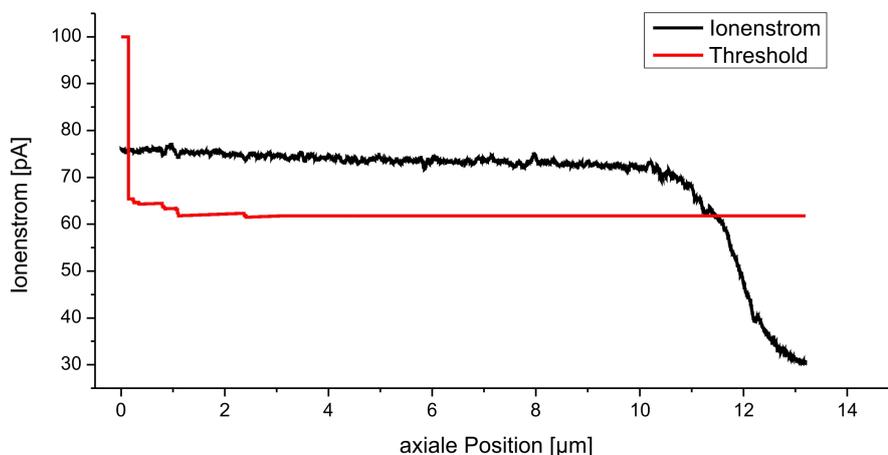
Gezieltes Ablegen von Farbstoffmolekülen oder Farbstoffen kombiniert mit einem Molekül, welches spezifische Bindungen an eine Zellstruktur

erlaubt in einzelne lebende Zellen mit Hilfe von Nanopipetten stellt ein sehr interessantes Themengebiet dar. Prinzipiell können in einzelne lebende Zellen über Mikroinjektion bestimmte Proben eingebracht werden, allerdings ist die Mortalitätsrate der mikroinjizierten Zellen sehr hoch. Des Weiteren können Proben nicht in einzelne Zellkompartimente eingebracht werden. Weiterhin wird mit der Probe immer das Zellvolumen spürbar erhöht, da konventionelle Mikroinjektoren immer über Druck die Proben in die Zellen bringen. Einbringen von Molekülen in Zellen via Submikrometerpipetten mit Hilfe von Diffusion ohne das Zellvolumen zu verändern wurde erstmals von [Gratzl et al., 2008] gezeigt. Hier wurde eine Glaspipette an ihrer Öffnung mit einem Hydrogel versehen, welches die Moleküle über einen Konzentrationsgradienten in die Zelle injizierte. Allerdings sind die Injektionszeiten sehr hoch (bis zu einer Stunde) und das Hydrogel kann nur in relativ groben Pipetten ( $\approx 1 \mu\text{m}$ ) platziert werden, was prinzipiell die Problematik einer Mikroinjektion mit sich bringt.

Anders ist die Injektion über Nanopipetten. Hier wird die elektrische Ladung der einzelnen Moleküle in der Pipette ausgenutzt. Über die angelegte Spannung zwischen den Elektroden wird die Nanopipette an die Zelle herangeführt und dann die Zellwand durchstoßen. Dabei dringt die Pipette ca. 1 bis 2  $\mu\text{m}$  in die Zelle ein. Durch den geringen Durchmesser der Pipette an ihrer Spitze von ca. 120 nm kann das Überleben der Zelle nahezu garantiert werden. Das Einbringen der Farbstoffmoleküle erfolgt dann durch Erhöhen oder Umkehren der Spannung. Jetzt können die Moleküle aus der Pipette in die Zelle diffundieren. Der reine Ablageprozess dauert dabei – abhängig von der Konzentration der Moleküle in der Pipette – wenige Sekunden. Nachdem der Prozess beendet ist, wird die Nanopipette wieder aus der Zelle entfernt. Die Moleküle wurden so spezifisch in die Zelle eingebracht.

Abbildung 4.2.16 zeigt den Ionenstromverlauf bei der Annäherung einer Nanopipette an eine lebende Cos7 Zelle. Die Zelle befand sich in einer PBS Lösung. Die Pipette wurde im PBS-Bad manuell 15  $\mu\text{m}$  über der Zelle positioniert. Dann wurde mit Hilfe des MEA eine Spannung zwischen Elektrode und Gegenelektrode angelegt. Bei Beginn der Annäherung ist der Ionenstrom nahezu konstant. In dieser Zeit wird das Intervall gebildet, welches dann den Threshold für die Annäherung definiert. Nach ca. 3  $\mu\text{m}$  ist der Prozess abgeschlossen. Der Threshold ist nun fest. Nach 10  $\mu\text{m}$  fällt der Ionenstrom ab und unterschreitet bei ca. 11,5  $\mu\text{m}$  die Markierung. Bei 13  $\mu\text{m}$  unterschreitet der Strom die Hälfte des Thresholdstromes. Die Nanopipette ist nun in der Zelle platziert

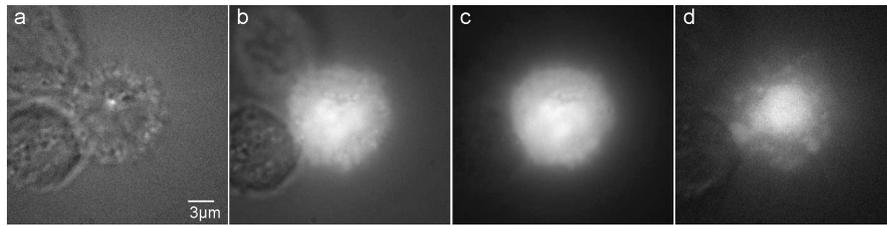
#### 4 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4.2.16:** Ionenstromverlauf und Thresholdentwicklung bei der Annäherung einer Nanopipette mit einem Innendurchmesser von 60 nm an eine Cos7 Zelle. Der Ionenstrom ist während des Annäherungsprozesses nahezu konstant und fällt dann bei Berührung mit der Zellmembran innerhalb von 3 µm auf die Hälfte seiner ursprünglichen Stärke ab.

und das Ablegen von Farbstoffmolekülen kann beginnen. Die Annäherungsschritte betragen in diesem Experiment 4,5 nm. Die Annäherung erfolgte dabei mit einer veränderten Version der Ablagesoftware aus 4.2.2. Um die Software der veränderten Annäherungssituation an die Zelle mit einem Ionenstrom, der bei Eindringen in die Zelle geringer wird anzupassen, wurde die Intervallbildung für den Threshold der die Annäherung definiert umgeschrieben.

In Abbildung 4.2.17 sind drei lebende Zellen der Art Cos7 in einer PBS Lösung gezeigt. Bild a) zeigt die Zellen in einer Kombination von Durchlicht und Fluoreszenzbild. Hier sind die Umrisse der Zellen zu sehen. Die Fokusebene ist dabei auf die Spitze der Nanopipette gelegt, die zu diesem Zeitpunkt schon in der Zelle platziert war. Sie ist als weißer fluoreszierender Punkt im Bild zu sehen. Die Pipette wurde für dieses Experiment mit einer Lösung von  $10^{-7}$  M Alexa Fluor 647, gebunden an 60 bp lange DNA Fragmente in einer PBS Lösung gefüllt. Die Zellen lagen in einer PBS Lösung, welche kurz vor der Messung die Nährlösung ersetzt hat. b) zeigt die markierte Zelle kurz nach dem Einbringen vom Farbstoff. Das Bild ist wieder eine Kombination von Durchlicht und Fluoreszenzbild. Es ist gut zu sehen, dass nur die ausgewählte Zelle markiert wurde. In Bild c) ist das reine Fluoreszenzbild gezeigt. Durch das Einbringen der Farbstoffmoleküle in das Zytoplasma fluoresziert



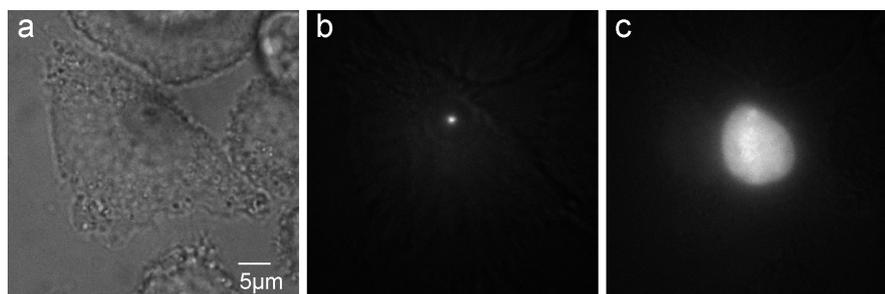
**Abbildung 4.2.17:** Markierung einer einzelnen lebenden Cos7 mit Alexa Fluor 647 gebunden an 60 bp DNA Fragmente. **a)** Durchlicht und Fluoreszenzbild überlagert. Zu sehen sind drei Zellen und die Spitze (weißer Punkt) vor dem Ablageprozess. Die Nanopipette ist in der Zelle platziert. **b)** Durchlicht und Fluoreszenzbild direkt nach dem Injizieren des Farbstoffs in die Zelle. **c)** Fluoreszenzbild direkt nach dem injizieren. Die Nachbarzellen sind nicht markiert worden. **d)** 10 min nach dem Injektionsprozess. Die Farbstoffe sind hauptsächlich in den Nucleus der Zelle gewandert.

die gesamte Zelle. Bild d) ist ca. 10 min nach Aufnahme c) entstanden. Es zeigt eine Diffusion des überwiegenden Teils des Farbstoffs in den Nucleus der Zelle.

Neben der Ablage von Farbstoffen in das Zytoplasma können auch gezielt Zellteile markiert werden. Dies ist in Abbildung 4.2.18 gezeigt. Hier ist in einer Cos7 Zelle der Farbstoff nur in den Nucleus eingebracht worden. Bild a) zeigt ein Durchlichtbild der Zelle vor dem einbringen des Farbstoffs. Der Nucleus der Zelle zeichnet sich bereits im Durchlichtbild ab und die Nanopipette kann genau über diesem platziert werden. Dringt nun die Pipette durch die Zellmembran in das Zytoplasma der Zelle ein ist der normale Abfall im Ionenstrom zu verzeichnen. Beim Eindringen in den Nucleus fällt der Ionenstrom noch einmal abrupt ab. Hier wird die Annäherung gestoppt. In b) ist ein Fluoreszenzbild der im Nucleus platzierten Pipette nach der Annäherungsprozedur zu sehen. c) zeigt das Fluoreszenzbild der Zelle mit dem markierten Zellkern. Es ist deutlich zu sehen, dass nur der Zellkern markiert wurde.

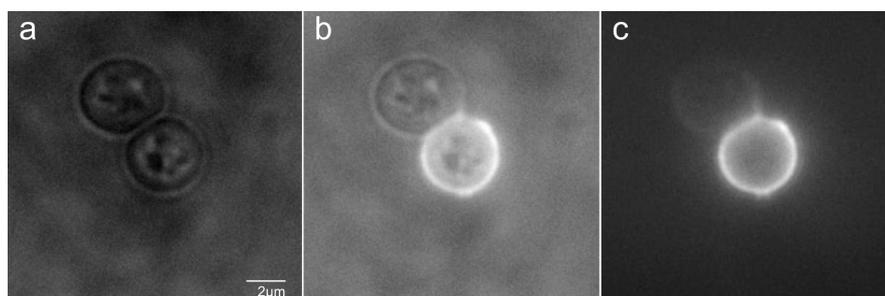
Um die Präzision zu demonstrieren, mit der Zellen markiert werden können, wurden einzelne Hefezellen (Backhefe) markiert. Hefezellen haben einen Durchmesser von ca. 3  $\mu\text{m}$  und sind nicht adhäsiv an der Glasoberfläche der LabTek Kammer. Deshalb wurden sie zuvor in eine PVA-Matrix eingebettet. Bei vorherigen Versuchen war beobachtet worden, dass die nicht adhäsiven Hefezellen sonst an der Spitze hängen bleiben, oder die Spitze an der Zellmembran abrutscht. Für den Versuch wurde wiederum eine  $10^{-7}$  M Lösung Alexa Fluor 647 gekoppelt

#### 4 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4.2.18:** Gezielte Markierung des Nukleus einer Cos7 Zelle mit einer 60 nm Pipette und Alexa Fluor 647 gebunden an 60 bp DNA Fragmenten. **a)** Durchlichtbild der Zelle. Im Hintergrund die Nanopipette als Schatten zu sehen. **b)** Fluoreszenzbild der Öffnung der Nanopipette. Die Pipette ist in diesem Bild schon in der Zelle platziert. **c)** Markierter Nukleus der Zelle.

an 60 bp DNA Fragmente in PBS in einer 60 nm Pipette verwendet. Die Hefezellen wurden direkt in die PBS PVA Lösung appliziert. Nach 5 min wurde der größte Teil des PBS abgezogen und 30 min eingetrocknet. Hierbei bildete sich eine 1 µm dicke und durch das PBS leitende Schicht.



**Abbildung 4.2.19:** Markierung von Hefezellen eingebettet in eine PVA Matrix. **a)** Durchlichtbild der Hefezellen vor Markierung. **b)** Durchlicht und Fluoreszenzbild der markierten Zellen. **c)** Fluoreszenzbild der markierten Zelle. Die obere Zelle ist nicht markiert, zeigt aber etwas Autofluoreszenz.

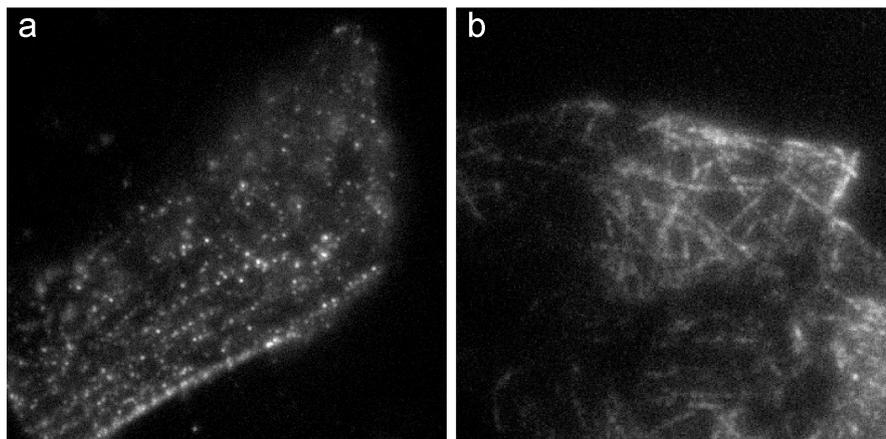
Eine Restfeuchtigkeit blieb dabei erhalten. Die Gegenelektrode wurde in der PVA Schicht platziert. Die Annäherung erfolgte wie bei den PVA-G-C Oberflächen mit angelegter Spannung und ohne Ionenstrom. Nachdem ein Ionenstrom detektiert wurde, stoppte die Annäherungsroutine. Es wurde daraufhin die Spitze manuell ca. 1,5 µm nachgeführt, so dass sich die Nanopipette mit Sicherheit in der Hefezelle befand.

## 4.2 Hochpräzise Farbstoffablage

Danach wurde der Ablageprozess gestartet. Abbildung 4.2.19a zeigt das Durchlichtbild zweier Hefezellen. In b) ist eine Kombination von Durchlicht und Fluoreszenzbild zu sehen. Die Zellränder und Fluoreszenz stimmen überein. Bild c) zeigt das reine Fluoreszenzbild. Interessant ist hier, dass sich der markierte Bereich nur im äußeren Rand der Zelle befindet. Die Nanopipette allerdings mitten in die Zelle platziert wurde. Die zweite Zelle zeigt eine leichte Autofluoreszenz. Es ist nur eine Zelle mit dem Farbstoff markiert worden.

Das fluoreszente Markieren von Zellstrukturen stellt eine besondere Herausforderung dar. Es ist ein komplizierter Prozess, bei dem die Zellen erst herangezüchtet um dann bei optimaler Dichte über mehrere Schritte fixiert werden, so dass ihr momentaner Zustand erhalten bleibt. Dann muss die Zellmembran für die Moleküle, die eine bestimmte Struktur innerhalb der Zelle markieren sollen durchlässig gemacht werden. Schließlich werden die Moleküle hinzugegeben und dadurch die Strukturen innerhalb der Zelle markiert. Danach werden überschüssige Moleküle, die nicht an die Zielstruktur gebunden haben durch mehrmaliges Austauschen der Lösung entfernt. Es gibt viele verschiedene Moleküle, die bestimmte Zellstrukturen markieren. Die verbreitetste Methode in der Fluoreszenzmikroskopie ist das Markieren über Antikörper. Diese bieten eine bestmögliche Flexibilität. Dadurch, dass sie als primärer und sekundärer Antikörper vorliegen, können sie beliebig kombiniert werden. Der primäre Antikörper enthält eine Bindestelle für das Zielmolekül innerhalb der Zelle und eine Bindestelle für den sekundären Antikörper. Der sekundäre Antikörper ist an ein Farbstoffmolekül gebunden und enthält außerdem eine Bindestelle für den primären Antikörper. Markieren einer Zellstruktur basiert hier auf dem Hinzugeben des ersten Antikörpers, der an die Zellstruktur bindet und mehrmaliges Waschen um überflüssige Antikörper zu entfernen. Daraufhin erfolgt das Hinzugeben des sekundären Antikörpers, der dann an den Primären bindet. Man erhält so eine fluoreszente Markierung der Zellstruktur mit einem Farbstoff seiner Wahl. Das direkte Markieren einer lebenden Zelle über Antikörper ist bis jetzt noch nicht gelungen, da die Antikörperkonstrukte selbst einen Durchmesser von  $\approx 10$  nm besitzen. Will man diese in eine lebende Zelle einbringen so muss man die Zellmembran überwinden. Diese ist mit sog. Nanoporen ausgestattet, welche einen Durchmesser von  $\approx 5$  nm besitzen. Die Antikörper können also nicht durch eine intakte Zellmembran in die Zelle hineindiffundieren. Erste Ansätze zur spezifischen Markierung von Proteinen in lebenden Zellen wurden über die "Snap-Tag" Technik realisiert [Keppler

#### 4 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4.2.20:**  $\beta$ -Tubulin Markierung in Cos7 Zellen. **a)** Fluoreszenzbild der injizierten Zelle. Eingebracht wurden primärer und sekundärer Antikörper zur selben Zeit über die Nanopipette mit 60 nm Öffnungsdurchmesser. Die Injektionszeit betrug 30 min. **b)** Vergleichsbild einer fixierten Cos7 Zelle mit über Antikörper markiertem  $\beta$ -Tubulin.

et al., 2004]. Bei dieser wird das sog. “Tag” Protein durch genetische Modifizierung der Zelle an einer bestimmten Struktur gebildet. Der Farbstoff wird über eine kovalente Bindung an das “Snap” Substrat gebunden. Das Farbstoff-Snap Konstrukt geht jetzt über Diffusion in die lebende Zelle hinein und bindet an die Zielstruktur. Bei dieser Technik muss allerdings die Zelle genetisch verändert werden.

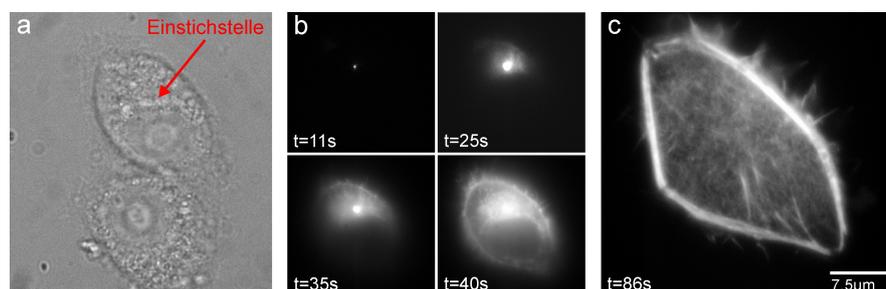
Über die Nanopipette öffnet sich ein einfacher und effizienter Weg, um Strukturen in lebenden Zellen ohne Modifikation derselben zu markieren. Abbildung 4.2.20b zeigt eine markierte lebende Cos7 Zelle. In der Zelle wurde die  $\beta$ -Tubulin Struktur über einen primären und einen sekundären Antikörper mit Alexa Fluor 647 markiert. Dabei wurde eine 60 nm Pipette für das Einbringen der Antikörper benutzt. Die Antikörper selbst wurde schon in der Pipette gemischt. Dafür wurde jeweils 5  $\mu$ l primärer und 5  $\mu$ l sekundärer Antikörper der Stammlösung gemischt. Dazu kamen 5  $\mu$ l Proteaseinhibitor und 45  $\mu$ l PBS. 20  $\mu$ l der Lösung wurden direkt nach dem Zusammenmischen in die Nanopipette gegeben. Die Pipette wurde manuell 15  $\mu$ m über der Zelle positioniert. Die Zellen befanden sich in einer LabTekII Kammer mit PBS Lösung und wurden über das Mikroskopobjektiv auf einer Temperatur von  $\approx 35^\circ\text{C}$  gehalten. Nachdem die Nanopipette innerhalb der Zelle positioniert war, wurden über 30 min die Antikörper in die Zelle eingebracht.

## 4.2 Hochpräzise Farbstoffablage

Das Bild 4.2.20b wurde direkt nach entfernen der Spitze gemacht. Die  $\beta$ -Tubulin Struktur der Zelle ist zu erkennen. Die Markierungsdichte ist allerdings sehr dünn. Als Vergleich ist in c) das  $\beta$ -Tubulin einer fixierten Zelle, die auf herkömmliche Art markiert wurde zu sehen. Hier sind die  $\beta$ -Tubulin Strukturen der Zelle deutlich zu erkennen. Des Weiteren diffundierten in b) viele einzelne Farbstoffe noch frei in der Zelle. Es konnte nicht genau geklärt werden, warum diese Farbstoffe nicht an die Zielstruktur gebunden haben. Möglicherweise ist das Verwenden von primärem und sekundärem Antikörper für das Ablegen via Nanopipette nicht geeignet, da sich beide Antikörper schon in der Pipette aneinander koppeln müssen. Weiterhin wäre es möglich, dass diese durch das elektrische Feld, welches in der Pipette herrscht wird wieder auseinandergerissen werden. So bindet dann zwar der primäre Antikörper, der sekundäre diffundiert aber frei in der Zelle.

Zellmarkierungen mit Hilfe der Nanopipette können innerhalb weniger Sekunden geschehen. Dabei hängt die Anzahl der abgelegten Moleküle hauptsächlich von der angelegten Spannung zwischen den Elektroden, dem Strom, der fließt und der Konzentration der Moleküle innerhalb der Pipette ab. Als Beispiel wird hier der Markierungsprozess von Aktinfilamenten innerhalb einer lebenden Cos7 Zelle gezeigt. In Abbildung 4.2.21 ist der Markierungsprozess dargestellt. Hierbei wird Atto647N gebunden an Phalloidin in die Zelle eingebracht. Das Phalloidin heftet sich an die Aktinfilamente. Die Markierung der Filamente mit Phalloidin selbst scheint dabei ein beinahe instantaner Prozess zu sein. Das Einbringen der Moleküle dauert insgesamt 40 Sekunden. Hochkonzentriertes Phalloidin gebunden an Atto647N wurde dabei unverdünnt in die Nanopipette gegeben. Diese wurde dann 15  $\mu\text{m}$  über der Zelle platziert, dann angenähert und in der Zelle nahe dem Zellkern platziert. Nach Umschalten begann der Markierungsprozess mit 1 V Spannung. Nach 40 Sekunden wurde die Spitze aus der Zelle entfernt. Abbildung 4.2.21a zeigt das Durchlichtbild von zwei nebeneinanderliegenden Zellen. Die obere der beiden Zellen wurde markiert. Die Einstichstelle ist eingezeichnet. In b) ist der Markierungsprozess selbst als Fluoreszenzbildreihe zu sehen. Nach einer Zeit von 11 Sekunden ist hauptsächlich die Spitze der Nanopipette zu sehen. Nach 25 Sekunden sind ersten Moleküle abgelegt. Es kann schon eine Struktur ausgemacht werden. 10 Sekunden später können erste Filopodien an der Zellmembran, sowie die Umrisse des Zellkerns ausgemacht werden. Nach 40 Sekunden ist der Markierungsprozess abgeschlossen. Deutlich zu sehen: In den Nukleus wurden keine Moleküle eingebracht. Bild c) zeigt eine TIRF-

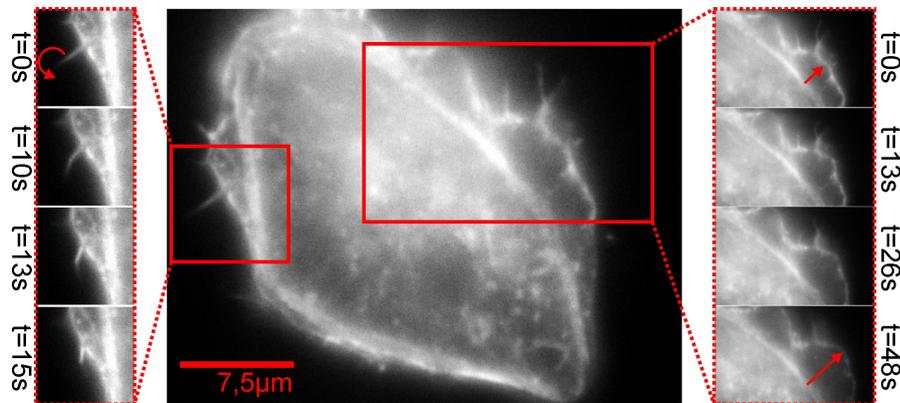
#### 4 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4.2.21:** Markierungsprozess mit Atto647N gebunden an Phalloidin, eingebracht mit Hilfe einer 60 nm Pipette. Diese wurde mit 20 µl der Stammlösung gefüllt. Die Belichtungszeit für jedes Bild betrug 40 ms. **a)** Durchlichtbild zweier nebeneinanderliegenden Cos7 Zellen in einer PBS Lösung. Die Zellen wurden mit Hilfe des Objektivs auf einer Temperatur von  $\approx 35^\circ\text{C}$  gehalten. Die obere Zelle wurde markiert. **b)** Fluoreszenzbilder der Zeitentwicklung des Markierungsprozesses. Nach 11 sec ist hauptsächlich die Spitze zu sehen t=25s zeigt erste eingebrachte Moleküle. Erste Strukturen sind erkennbar. Nach 35 Sekunden ist die Zellmembran und der Kern erkennbar und nach 40 sec ist der Markierungsprozess abgeschlossen. Die Zelle ist nun vollständig markiert. **c)** TIRF-Bild der markierten Zelle. Die Aktinstrukturen zeichnen sich hier deutlich ab.

Aufnahme, der Zelle nach 86 Sekunden. Hier können deutlich einzelne Aktinfilamente voneinander unterschieden werden. Besonders die Zellmembran hat ein dichtes Geflecht der Filamente.

Obwohl Phalloidin ein Zellgift ist, das nach einiger Zeit zur Apoptose der Zelle führt, konnten aufgrund der effizienten und schnellen Markierung einige Zelldynamiken beobachtet werden. Diese sind in Abbildung 4.2.22 dargestellt. Zu sehen ist eine TIRF-Aufnahme derselben Zelle aus dem vorherigen Markierungsprozess. Ca. 4 Minuten nach Beenden des Markierungsprozesses. Die Bewegungen die von der Zelle ausgehen sind sehr stark. Wahrscheinlich eine Reaktion auf das Eindringen des Phalloidins. An der Zelle konnten noch ca.15 min lang Bewegungen erkannt werden, bevor die Apoptose einsetzte. Links zu sehen: Die kreisförmige Bewegung einer Ausstülpung der Zellmembran. Diese steht zu Anfang noch  $90^\circ$  vom Aktinfilament ab. Innerhalb von 10 Sekunden findet eine eher geringe Bewegung statt. Dann klappt die Ausstülpung innerhalb von 5 Sekunden zusammen. In der rechten Zeitserie ist die Bewegung von Aktinfilamenten der Zellmembran zu sehen. Dabei entfernen sich die Filamente von der Zelle. Innerhalb von 48 Sekunden wurde eine Strecke von 2,25 µm beobachtet.



**Abbildung 4.2.22:** Zeldynamiken an Aktinfilamenten markiert mit ATTO647N an Phalloidin. TIRF Aufnahme mit 40 ms Belichtungszeit. Ausschnitt links: kreisförmige Bewegung einer Plasmaausstülpung aus der Zellmembran innerhalb von 15 Sekunden in einem Winkel von  $50^\circ$ . Ausschnitt rechts: Reaktion der Zelle. Einige Aktinfilamente bewegen sich von der Zellmembran der Zelle weg. Die Bewegung geschieht innerhalb von 48 Sekunden. Dabei bewegen sich die Filamente insgesamt über eine Distanz von  $2,25 \mu\text{m}$ .

Es wurde mit den vorhergehenden Experimenten gezeigt, dass die Zellmarkierung über Nanopipetten eine präzise Alternative für herkömmliche Methoden darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur simpel Farbstoffe in die Zelle eingebracht werden konnte, sondern sogar gezielt Strukturen in diesen markiert werden konnten. Die Methode ist dabei noch ausbaufähig und muss noch mit vielen anderen Zelltypen sowie Antikörpern oder Proteinen zur Strukturmarkierung getestet werden. Aber ein vielversprechender Anfang ist gemacht.



## 5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden vielfältige Anwendungsmöglichkeiten für Nanopipetten demonstriert. Ursprünglich als rein passives Element für das hochpräzise Abrastern von biologischen Proben mit Hilfe der Ionenleitfähigkeitsmikroskopie entwickelt, kann die Nanopipette für das gezielte Ablegen und Einbringen vielfältiger Molekülararten über Elektrophorese genutzt werden. Sie bietet dabei vielfältige Möglichkeiten, zum Ablegen oder Einbringen einer sehr großen Anzahl von Molekülen in Oberflächen, oder Zellen. Dabei wurde gezeigt, dass die Operationsumgebung nicht notwendigerweise aus einem Elektrolytbad bestehen muss, sondern auch ein Arbeiten in trockener Umgebung möglich ist. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Nanopipette auch als minimal-invasives Instrument genutzt werden kann, um gezielt Moleküle in lebende Organismen einzubringen, ohne diese dauerhaft durch den Penetrationsprozess zu schädigen.

### Hochpräzise Farbstoffablage auf Oberflächen

Ablegen von Farbstoffmolekülen auf Oberflächen setzt ein Höchstmaß an Präzision in der Steuerung voraus. Es wurde demonstriert, dass es möglich ist, mit Hilfe einer Nanopipette über Elektrophorese gezielt Farbstoffe mit einer Genauigkeit von wenigen hundert Nanometer in eine Oberfläche einzubringen und diese über ein Fluoreszenzmikroskop hochaufgelöst zu detektieren. Dafür wurde ein Softwarepaket in LabView entwickelt, welches die Steuerung einer Nanopipette mit einer Präzision von  $0,76 \pm 0,04$  nm in lateraler und  $0,76 \pm 0,098$  nm in axialer Richtung erlaubt.

Des Weiteren wurden Oberflächen, bestehend aus einer Mischung von PVA, Glycerin und Cysteamin (PVA-G-C) entwickelt, die ein gezieltes Einbringen von Farbstoffmolekülen über eine Nanopipette erlauben. Diese Oberflächen besitzen Schichtdicken von  $1,25 \pm 0,125$   $\mu\text{m}$ , was durch konfokale Messung über Raman-Intensitäten bestimmt wer-

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

den konnte. Sie sind transparent und leitfähig, um über die Messung des Ionenstroms erst die Annäherung an die Oberfläche und dann das Ablegen einer kleinen Anzahl von Molekülen zu erlauben. Es konnte dabei mit Hilfe der Raman-Spektroskopie nachgewiesen werden, dass die Anordnung des Cysteamin sich innerhalb der Schichtbildung der PVA-G-C Oberflächen vom Zwitterion zu einer negativ geladenen Form ändert, was höchstwahrscheinlich für die leitenden Eigenschaften der Oberfläche verantwortlich gemacht werden kann. Weitere Eigenschaften dieser Oberflächen sind eine sehr glatte und weiche Oberfläche, durch die ein Kontakt mit der sehr empfindlichen Nanopipette möglich ist. Außerdem wird durch das Cysteamin in der dünnen Schicht die hochauflösende Detektion der Farbstoffe über dSTORM möglich.

Es wurde gezeigt, dass über die von der Nanopipette punktförmig abgelegten Farbstoffmoleküle Alexa Fluor 647 gebunden an 30 bp DNA Fragmente das Erstellen beliebiger Strukturen mit einer Punktabstand von 300 nm in sehr kurzer Zeit möglich ist. Das Erzeugen von einem Farbstoffpunkt dauert ca. 2 bis 3 Sekunden. Ein einzelner Punkt konnte mit einer Genauigkeit von  $430 \pm 20$  nm FWHM über Weitfeld Fluoreszenzmikroskopie aufgelöst werden. Vorhergehende Experimente mit Nanopipetten in trockener Umgebung zeigten eine konfokale Auflösung von 480 bis 630 nm bei einer geschätzten abgelegten Molekülanzahl von  $46000 \pm 12000$  [Rodolfa et al., 2005]. Rekonstruierte Bilder über dSTORM zeigten, dass einzelne Punkte in einem erzeugten Farbstoffpunkt mit einer durchschnittlichen Präzision von 38 nm aufgelöst werden können. Der Durchmesser der gelegten Farbstoffpunkte konnte mit  $340 \pm 19$  nm verifiziert werden. Die abgelegte Menge von Farbstoffmolekülen wurde in den Experimenten auf  $214 \pm 38$  Moleküle verifiziert.

Zusätzlich konnte die Möglichkeit einer mehrfachen Verwendbarkeit der PVA-G-C Oberflächen gezeigt werden. Dafür wurden vorbereitete Einzelmoleküloberflächen insgesamt 5 Mal über 10 Tage mit dem Fluoreszenzmikroskop durchgemessen und das durchschnittliche Signal zu Rausch Verhältnis (Signal to Noise Ratio, SNR) der Farbstoffe in den PVA-G-C Oberflächen bestimmt. Die Messungen ergaben ein durchgehend stabiles SNR über die gesamte Zeit. Es wurde eine Abhängigkeit des SNR von der Cysteaminkonzentration in der PVA Schicht festgestellt. Ein optimiertes SNR von  $\approx 6:1$  für eine Anregungsleistung von  $350 \text{ W/cm}^2$ , welches auch bei höheren Leistungen stabil blieb wurde bei 80 und 90 mM Cysteaminkonzentration erkannt.

Ein Einsatz der erzeugten Strukturen ist dabei in der hochauflösen-

den Fluoreszenzmikroskopie denkbar. Dabei könnten sie als Kalibrationsproben eingesetzt werden, um die Auflösung und Detektionsgenauigkeit der Fluoreszenzmikroskope zu bestimmen. Dafür sind allerdings weitere Verbesserungen am gesamten System notwendig. Vor allem an der Punktgröße der abgelegten Farbstoffe muss gearbeitet werden. Momentan wird davon ausgegangen, dass Diffusionsprozesse und gerichtete Bewegung der Farbstoffmoleküle durch das erzeugte elektrische Feld und die daraus resultierende Kraft auf die abgelegten geladenen Moleküle für die Verbreiterung der erzeugten Punkte verantwortlich sind, da die Nanopipette an ihrer Spitze selbst nur einen Öffnungsdurchmesser von 60 nm und einen Gesamtdurchmesser von 100 nm besitzt. Die einfachste Veränderung wäre also die Reduzierung der Gesamtladung der durch die Spitze abgelegten Moleküle. Dadurch würde die auf sie wirkende Kraft effektiv reduziert. Allerdings ist unklar, wie hoch der Gewinn an Verbesserung der Punktgröße wäre. Weitere Veränderungen und Weiterentwicklungen könnten den Durchmesser der gelegten Punkte zuverlässiger reduzieren. Zum Einen könnte eine andere Nanopipette mit einem kleineren Öffnungsdurchmesser von 20 nm benutzt werden. Diese hätte einen Gesamtdurchmesser von  $\approx 35$  nm. Linear approximiert würde durch die Verkleinerung des Spitzendurchmessers die Punktgröße der abgelegten Farbstoffe auf  $\approx 100$  nm reduziert werden können. Allerdings skaliert auch der Ionenstrom proportional mit dem Durchmesser der Pipettenspitze. Es müsste also sichergestellt werden, dass dieser weiterhin zuverlässig detektiert werden kann. Hier gibt es wiederum mehrere Ansätze um dies zu gewährleisten. Einerseits könnte das Optimieren der PVA-G-C Oberflächen durch Zugabe weiterer Stoffe, oder Änderung der Konzentration der aktuellen Zusammensetzung eine bessere Leitfähigkeit erzielt werden. Andererseits könnte die angelegte Spannung erhöht werden um den Ionenstrom auch weiterhin durch die kleinere Spitze detektieren zu können. Geht man davon aus, dass dies auch die Kraft auf die abgelegten Moleküle erhöht, würde die Diffusion dieselbe sein. Die Punktgröße würde also nur reduziert, wenn die verwendeten Moleküle in der Spitze eine kleinere Gesamtladung besitzen und die auf sie wirkende Kraft reduziert wird.

Für die Anzahl der Moleküle, die in einem Ablageprozess in die PVA-G-C Schicht eingebracht wurden, ist nur eine grobe Mittelung erfolgt. Es fehlt eine genaue Messreihe, welche die Abhängigkeit der Anzahl der Farbstoffmoleküle von den äußeren Bedingungen wie die Konzentration der Farbstofflösung in der Nanopipette, dem Öffnungsdurchmesser der Spitze, der angelegten Spannung und dem Ionenstrom verifiziert. Mit

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Hilfe einer solchen Messreihe wäre es möglich die Anzahl der abgelegten Moleküle zu reduzieren. Es könnten dann definierte Farbstoffpunkt mit einer genau bestimmten Anzahl von Farbstoffmolekülen erzeugt werden. Die könnte wiederum eine weitere Charakterisierungsgröße für ein Fluoreszenzmikroskop darstellen.

### Zellmarkierung über Nanopipetten

Eine weitere Anwendung der Nanopipette wurde mit dem invasiven Einbringen von Farbstoffmolekülen in lebende Cos7 Zellen demonstriert. Dabei wurde gezeigt, dass es möglich ist, einzelne Farbstoffe über Elektrophorese in eine lebende Zelle zu bringen, ohne durch das Eindringen der Nanopipette die Apoptose der Zelle einzuleiten. Dabei wird das Zellvolumen nicht signifikant erhöht, da die Elektrophorese nur die Moleküle in die Zelle einbringt, nicht aber die Lösung, in der die Moleküle vorliegen. Es ist weiterhin gelungen mit Antikörpern – gebunden an Alexa Fluor 647 –  $\beta$ -Tubulin Strukturen sowie über ATTO647N-Phalloidin fluoreszierende Markierung einzelner Aktinstrukturen in lebenden Zellen vorzunehmen. Dabei konnte der Injektionsprozess direkt über die Fluoreszenzmikroskopie verfolgt werden. Die Injektion der Moleküle dauerte dabei nur wenige Sekunden. Es wurde beobachtet, dass der Markierungsprozess selbst, mit Phalloidin nahezu instantan abläuft. Weiterhin konnten Zelldynamiken wie die Bewegung einzelner Aktinfilamente oder Reaktionen der Zelle durch verschieben ganzer Aktinstrukturen beobachtet werden.

Die Markierung einzelner Strukturen in lebenden Zellen wurde beispielhaft an zwei zufällig ausgewählten Molekülarten gezeigt. Dabei zeigte sich, dass vor allem die Markierung über Antikörper noch weit von einer idealen Markierungsdichte entfernt ist. Die Wahl kombinierter Antikörper scheint nicht die Beste für das Einbringen via Nanopipette zu sein, da der primäre und der sekundäre Antikörper zunächst in der Pipette koppeln müssen, um dann in der Zelle die Zielstruktur zu finden. Ein gekoppelter Antikörper hat Abmessungen von  $\approx 20$  nm, wird sich also recht träge in der Zelle verhalten und im ungünstigsten Fall sogar aufgrund des reduzierten Milieus in der Zelle auseinanderfallen. Weiterhin ist unklar, wie sich das elektrische Feld sowie die Zelle selbst auf die Antikörper auswirkt. All diese Fragen müssten in zusätzlichen Experimenten geklärt werden. Ein erster Schritt wäre, keine kombinierten Antikörper, sondern direkt an den Farbstoff gebundene Antikörper zu verwenden, um die Größe und damit auch die Diffusi-

ongeschwindigkeit zu minimieren sowie eventuelle Effekte, die durch die gekoppelten Antikörper in der Nanopipette und in der Zelle auftreten zu eliminieren. Für ein umfassendes Verständnis muss die Technik außerdem an weiteren Zellen, sowie mit den verschiedensten Arten von Proteinen und fluoreszenzmarkierten Antikörpern gezeigt werden.

Die Anwendungen für eine solche Technik sind vielfältig. So könnten beispielsweise mehrere Strukturen in einer Zelle oder Zellkompartimente gleichzeitig sehr schnell und effektiv markiert werden. Danach könnte die Zelle beobachtet und mit den richtigen Farbstoffmolekülen über hochauflösende Fluoreszenztechniken wie dSTORM in Echtzeit beobachtet werden. Beispielsweise könnte man auch an die Markierung von kleineren Objekten wie Bakterien denken. Diese wären wahrscheinlich nur mit einer kleineren Spitze von 8 oder 20 nm markierbar. Gleichzeitig muss geklärt werden ob aus einer Spitze mit 8 nm noch Farbstoffmoleküle herausdiffundieren und wie solche kleinen Objekte auf der Oberfläche gehalten werden, da diese selbst meistens nicht adhäsiv an der Oberfläche sind. Weiterhin kann man die Anwendungen auch auf andere Beobachtungstechniken wie die Raman-Spektroskopie ausweiten. Hier würde sich die "Coherent anti-Stokes Raman Spectroscopy" (CARS) anbieten. Damit wäre zwar keine Hochauflösung möglich, aber es wäre möglich einzelne CARS Sensitive Moleküle an einem Zielmolekül zu binden, in die Zelle einzubringen und "Single Particle Tracking" innerhalb der lebenden Zelle zu realisieren. Dadurch, dass keine störenden Effekte wie Bleaching bei dieser Methode auftreten könnte ein einzelnes Molekül in einer lebenden Zelle über eine sehr lange Zeit beobachtet werden. Weiterhin könnte man mit etwas größeren Nanopipetten von einem Durchmesser von 150 bis 200 nm versuchen direkte Infektionen mit Viren an lebenden Zellen, deren Strukturen zuvor markiert wurden durchführen. Damit würden viele Erkenntnisse über einzelne Infektionsschritte in der Zelle selbst gewonnen, da man den Infektionszeitpunkt genau bestimmen kann.



## Literaturverzeichnis

- Y. A. Badr, K. M. Abd El-Kader, and Rasha M. Khafagy. Raman spectroscopic study of cds, pva composite films. *Journal of Applied Polymer Science*, 92(3):1984–1992, 2004. ISSN 1097-4628. doi: 10.1002/app.20017. URL <http://dx.doi.org/10.1002/app.20017>.
- A. J. Bard, G. Denuault, R. A. Friesner, B. C. Dornblaser, and L. S. Tuckerman. Scanning electrochemical microscopy: theory and application of the transient (chronoamperometric) secm response. *Anal Chem*, 63(13):1282–1288, Jul 1991.
- A.J. Bard, F.R.F. Fan, J. Kwak, and O. Lev. Scanning electrochemical microscopy. introduction and principles. *Analytical Chemistry*, 61(2):132–138, 1989.
- M. Bates, B. Huang, G.T. Dempsey, and X. Zhuang. Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science*, 317(5845):1749–1753, 2007.
- E. Betzig, J. K. Trautman, T. D. Harris, J. S. Weiner, and R. L. Kostelak. Breaking the diffraction barrier: optical microscopy on a nanometric scale. *Science*, 251(5000):1468–1470, Mar 1991. doi: 10.1126/science.251.5000.1468. URL <http://dx.doi.org/10.1126/science.251.5000.1468>.
- G. Binnig, C. F. Quate, and Ch. Gerber. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.*, 56:930–933, Mar 1986. doi: 10.1103/PhysRevLett.56.930. URL <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.56.930>.
- Andreas Bruckbauer, Liming Ying, Alison M. Rothery, Dejian Zhou, Andrew I. Shevchuk, Chris Abell, Yuri E. Korchev, and David Kleiner. Writing with dna and protein using a nanopipet for controlled delivery. *J Am Chem Soc*, 124(30):8810–8811, Jul 2002.

## Literaturverzeichnis

- Andreas Bruckbauer, Peter James, Dejian Zhou, Ji Won Yoon, David Excell, Yuri Korchev, Roy Jones, and David Klenerman. Nanopipette delivery of individual molecules to cellular compartments for single-molecule fluorescence tracking. *Biophys J*, 93(9):3120–3131, Nov 2007. doi: 10.1529/biophysj.107.104737. URL <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.104737>.
- Chiao-Chen Chen and Lane A. Baker. Effects of pipette modulation and imaging distances on ion currents measured with scanning ion conductance microscopy (sicm). *Analyt*, 136(1):90–97, Jan 2011. doi: 10.1039/c0an00604a. URL <http://dx.doi.org/10.1039/c0an00604a>.
- Chiao-Chen Chen, Yi Zhou, and Lane A. Baker. Scanning ion conductance microscopy. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, 5(1):207–228, Jul 2012. doi: 10.1146/annurev-anchem-062011-143203. URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-anchem-062011-143203>.
- J.X. Cheng, A. Volkmer, and X.S. Xie. Theoretical and experimental characterization of coherent anti-stokes raman scattering microscopy. *JOSA B*, 19(6):1363–1375, 2002.
- Coherent. *70c Spectrum ArKr Ion Laser*. Coherent, Santa Clara CA, USA, 2011.
- A. Donnermeyer. *Scanning Ion-Conductance Microscopy*. PhD thesis, Bielefeld University, 2007.
- M.D. Duncan, J. Reintjes, and TJ Manuccia. Scanning coherent anti-stokes raman microscope. *Optics Letters*, 7(8):350–352, 1982.
- DF Evans. Perturbation of singlet–triplet transitions of aromatic molecules by oxygen under pressure. *J. Chem. Soc.*, (0):1351–1357, 1957.
- T. Förster. Zwischenmolekularer Übergang von elektronenanregungsenergie. *Zeitschrift für Elektrochemie, Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*, 64(1):157–165, 1960.
- H.-J Galla. *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*. Thieme, Stuttgart/New York, 1988.

- J. Gorelik, A. Shevchuk, M. Ramalho, M. Elliott, C. Lei, C. F. Higgins, Max J. Lab, D. Klenerman, N. Krauzewicz, and Y. Korchev. Scanning surface confocal microscopy for simultaneous topographical and fluorescence imaging: application to single virus-like particle entry into a cell. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(25):16018–16023, Dec 2002. doi: 10.1073/pnas.252458399. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.252458399>.
- Miklós Gratzl, Chen Yi, and Gary R. Bright. Continuous and quantitative delivery of molecules into individual cells with a diffusional microburet. *Anal Chem*, 80(23):9310–9315, Dec 2008.
- 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.
- PK Hansma, B. Drake, O. Marti, SA Gould, and CB Prater. The scanning ion-conductance microscope. *Science*, 243(4891):641–643, 1989.
- Meike Heidbreder, Ulrike Endesfelder, Sebastian van de Linde, Simon Hennig, Darius Widera, Barbara Kaltschmidt, Christian Kaltschmidt, and Mike Heilemann. Subdiffraction fluorescence imaging of biomolecular structure and distributions with quantum dots. *Biochim Biophys Acta*, 1803(10):1224–1229, Oct 2010. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.06.004. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.06.004>.
- Mike Heilemann, Sebastian van de Linde, Mark Schüttpelz, Robert Kasper, Britta Seefeldt, Anindita Mukherjee, Philip Tinnefeld, and Markus Sauer. Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angew Chem Int Ed Engl*, 47(33):6172–6176, 2008. doi: 10.1002/anie.200802376. URL <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200802376>.
- S.W. Hell et al. Toward fluorescence nanoscopy. *Nature biotechnology*, 21(11):1347–1355, 2003.
- Simon Hennig, Sebastian van de Linde, Mike Heilemann, and Markus Sauer. Quantum dot triexciton imaging with three-dimensional subdiffraction resolution. *Nano Lett*, 9(6):2466–2470, Jun 2009. doi: 10.1021/nl9012387. URL <http://dx.doi.org/10.1021/nl9012387>.

## Literaturverzeichnis

- Sir JFW Herschel. On a case of superficial colour presented by a homogeneous liquid internally colourless. 1845.
- Samuel T. Hess, Thanu P K. Girirajan, and Michael D. Mason. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photo-activation localization microscopy. *Biophys J*, 91(11):4258–4272, Dec 2006. doi: 10.1529/biophysj.106.091116. URL <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.106.091116>.
- Sutter Instruments. *Pipette Puller P-2000*. Sutter Instruments Inc, Novato CA, USA, 1999.
- D.L. Jeanmaire and R.P. Van Duyne. Surface raman spectroelectrochemistry: Part i. heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 84(1):1–20, 1977.
- Antje Keppler, Maik Kindermann, Susanne Gendreizig, Horst Pick, Horst Vogel, and Kai Johnsson. Labeling of fusion proteins of o6-alkylguanine-dna alkyltransferase with small molecules in vivo and in vitro. *Methods*, 32(4):437–444, Apr 2004. doi: 10.1016/j.ymeth.2003.10.007. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2003.10.007>.
- T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, and S. W. Hell. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(15):8206–8210, Jul 2000.
- Teresa Klein, Anna Löscherger, Sven Proppert, Steve Wolter, Sebastian van de Linde, and Markus Sauer. Live-cell dstorm with snap-tag fusion proteins. *Nat Methods*, 8(1):7–9, Jan 2011. doi: 10.1038/nmeth0111-7b. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth0111-7b>.
- David Klenerman, Yuri E. Korchev, and Simon J. Davis. Imaging and characterisation of the surface of live cells. *Curr Opin Chem Biol*, 15(5):696–703, Oct 2011. doi: 10.1016/j.cbpa.2011.04.001. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.04.001>.
- Y. E. Korchev, C. L. Bashford, M. Milovanovic, I. Vodyanoy, and M. J. Lab. Scanning ion conductance microscopy of living cells. *Biophys J*, 73(2):653–658, Aug 1997. doi: 10.1016/S0006-3495(97)78100-1. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78100-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78100-1).

- Y. E. Korchev, M. Raval, M. J. Lab, J. Gorelik, C. R. Edwards, T. Rayment, and D. Klenerman. Hybrid scanning ion conductance and scanning near-field optical microscopy for the study of living cells. *Biophys J*, 78(5):2675–2679, May 2000a. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76811-1. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76811-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76811-1).
- Y.E. Korchev, Y.A. Negulyaev, C.R.W. Edwards, I. Vodyanoy, and MJ Lab. Functional localization of single active ion channels on the surface of a living cell. *Nature cell biology*, 2(9):616–619, 2000b.
- A. Kudelski and W. Hill. Raman study on the structure of cysteamine monolayers on silver. *Langmuir*, 15(9):3162–3168, 1999.
- Joseph R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, 2006.
- C. Le Grimellec, E. Lesniewska, M.C. Giocondi, E. Finot, V. Vié, and J.P. Goudonnet. Imaging of the surface of living cells by low-force contact-mode atomic force microscopy. *Biophysical journal*, 75(2): 695–703, 1998.
- RA Marcus and N. Sutin. Electron transfers in chemistry and biology. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on bioenergetics*, 811(3):265–322, 1985.
- Celeste A. Morris, Alicia K. Friedman, and Lane A. Baker. Applications of nanopipettes in the analytical sciences. *Analyst*, 135(9):2190–2202, Sep 2010. doi: 10.1039/c0an00156b. URL <http://dx.doi.org/10.1039/c0an00156b>.
- R. Morrison. Grounding and shielding techniques in instrumentation. *New York: Wiley, 1967*, 1, 1967.
- P. T. A. Gray N. B. Standen and M. J. Whitaker. *Microelectrode Techniques: The Plymouth Workshop Handbook*. The Company of Biologists Limited, 1987.
- Pavel Novak, Chao Li, Andrew I. Shevchuk, Ruben Stepanyan, Matthew Caldwell, Simon Hughes, Trevor G. Smart, Julia Gorelik, Victor P. Ostanin, Max J. Lab, Guy W J. Moss, Gregory I. Frolenkov,

## Literaturverzeichnis

- David Klenerman, and Yuri E. Korchev. Nanoscale live-cell imaging using hopping probe ion conductance microscopy. *Nat Methods*, 6(4):279–281, Apr 2009. doi: 10.1038/nmeth.1306. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1306>.
- D. Pastré, H. Iwamoto, J. Liu, G. Szabo, and Z. Shao. Characterization of ac mode scanning ion-conductance microscopy. *Ultramicroscopy*, 90(1):13–19, Nov 2001.
- James B. Pawley. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Springer, 2006.
- C.V. Raman and KS Krishnan. A new type of secondary radiation. *Nature*, 121(3048):501–502, 1928.
- J. Rheinlaender, N.A. Geisse, R. Proksch, and T.E. Scha?ffer. Comparison of scanning ion conductance microscopy with atomic force microscopy for cell imaging. *Langmuir*, 2011.
- Laurynas Riauba, Gediminas Niaura, Olegas Eicher-Lorka, and Eugenijus Butkus. A study of cysteamine ionization in solution by raman spectroscopy and theoretical modeling. *J Phys Chem A*, 110(50):13394–13404, Dec 2006. doi: 10.1021/jp063816g. URL <http://dx.doi.org/10.1021/jp063816g>.
- Kit T. Rodolfa, Andreas Bruckbauer, Dejian Zhou, Yuri E. Korchev, and David Klenerman. Two-component graded deposition of biomolecules with a double-barreled nanopipette. *Angew Chem Int Ed Engl*, 44(42):6854–6859, Oct 2005. doi: 10.1002/anie.200502338. URL <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200502338>.
- Michael J. Rust, Mark Bates, and Xiaowei Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (storm). *Nat Methods*, 3(10):793–795, Oct 2006a. doi: 10.1038/nmeth929. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth929>.
- Michael J. Rust, Mark Bates, and Xiaowei Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (storm). *Nat Methods*, 3(10):793–795, Oct 2006b. doi: 10.1038/nmeth929. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth929>.
- A. I. Shevchuk, J. Gorelik, S. E. Harding, M. J. Lab, D. Klenerman, and Y. E. Korchev. Simultaneous measurement of  $ca^{2+}$  and cellu-

- lar dynamics: combined scanning ion conductance and optical microscopy to study contracting cardiac myocytes. *Biophys J*, 81(3): 1759–1764, Sep 2001. doi: 10.1016/S0006-3495(01)75826-2. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75826-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75826-2).
- Andrew I. Shevchuk, Gregory I. Frolenkov, Daniel Sánchez, Peter S. James, Noah Freedman, Max J. Lab, Roy Jones, David Klenerman, and Yuri E. Korchev. Imaging proteins in membranes of living cells by high-resolution scanning ion conductance microscopy. *Angew Chem Int Ed Engl*, 45(14): 2212–2216, Mar 2006. doi: 10.1002/anie.200503915. URL <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200503915>.
- SRS. *SR830 Lock-In Amplifier*. Stanford Research Systems, Sunnyvale CA, USA, 2002.
- Yasufumi Takahashi, Yumi Murakami, Kuniaki Nagamine, Hitoshi Shiku, Shigeo Aoyagi, Tomoyuki Yasukawa, Makoto Kanzaki, and Tomokazu Matsue. Topographic imaging of convoluted surface of live cells by scanning ion conductance microscopy in a standing approach mode. *Phys Chem Chem Phys*, 12(34):10012–10017, Sep 2010. doi: 10.1039/c002607g. URL <http://dx.doi.org/10.1039/c002607g>.
- Russell E. Thompson, Daniel R. Larson, and Watt W. Webb. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys J*, 82(5):2775–2783, May 2002. doi: 10.1016/S0006-3495(02)75618-X. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75618-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75618-X).
- Sebastian Van de linde. *Photoswitching of Organic Dyes and Single-Molecule Based Super-Resolution Imaging*. PhD thesis, Bielefeld University, 2011.
- Sebastian van de Linde, Anna Löschberger, Teresa Klein, Meike Heidebreder, Steve Wolter, Mike Heilemann, and Markus Sauer. Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nat Protoc*, 6(7): 991–1009, Jul 2011. doi: 10.1038/nprot.2011.336. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2011.336>.
- V. Vié, M. C. Giocondi, E. Lesniewska, E. Finot, J. P. Goudonnet, and C. Le Grimellec. Tapping-mode atomic force microscopy on

## Literaturverzeichnis

- intact cells: optimal adjustment of tapping conditions by using the deflection signal. *Ultramicroscopy*, 82(1-4):279–288, Feb 2000.
- R. Winter and F. Noll. *Methoden der biophysikalischen Chemie*. Teubner, 1998.
- S. Wolter, M. Schüttpelz, M. Tscherepanow, S. VAN DE Linde, M. Heilemann, and M. Sauer. Real-time computation of subdiffraction-resolution fluorescence images. *J Microsc*, 237(1):12–22, Jan 2010. doi: 10.1111/j.1365-2818.2009.03287.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2818.2009.03287.x>.
- Liming Ying, Samuel S. White, Andreas Bruckbauer, Lisa Meadows, Yuri E. Korchev, and David Klenerman. Frequency and voltage dependence of the dielectrophoretic trapping of short lengths of dna and dctp in a nanopipette. *Biophys J*, 86(2):1018–1027, Feb 2004. doi: 10.1016/S0006-3495(04)74177-6. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74177-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74177-6).

# Abkürzungen

SICM	Scanning Ion Conductance Microscope
SPM	Scanning Probe Microscope
SECM	Scanning Electrochemical Microscope
SNOM	Scanning Nearfield Optical Microscope
SSCM	Scanning Surface Confocal Microscope
PID	Proportional Integral Differential
RTC	Real-time Computer
HPC	Host PC
MEA	Microelectrode Amplifier
LIA	Lock-In Amplifier
AFM	Atomic Force Microscope
bp	basepairs
DNA	Deoxyribonucleic acid
AOTF	Acousto-Optical Tunable Filter
SNR	Signal to Noise Ratio
EMCCD	Electron Multiplying Charge-Coupled Device
FWHM	Full Width Half Maximum
PBS	Phosphate Buffered Saline
PET	Photoinduced Electron Transfer
LED	Light-Emitting Diode
PSF	Point Spread Function



# Publikationsverzeichnis

## Publikationen

- Super-Resolution Imaging of Nanopipette-Deposited Fluorophore Structures. Simon Hennig, Sebastian van de Linde, Thomas Huser and Markus Sauer (manuscript in preparation)
- Subdiffraction fluorescence imaging of biomolecular structure and distributions with quantum dots. Meike Heidbreder and Ulrike Endesfelder and Sebastian van de Linde and Simon Hennig and Darius Widera and Barbara Kaltschmidt and Christian Kaltschmidt and Mike Heilemann *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2010 1803 (10), 1224-1229
- Quantum Dot Triexciton Imaging with Three-Dimensional Subdiffraction Resolution. Simon Hennig, Sebastian van de Linde, Mike Heilemann, and Markus Sauer *Nano Letters* 2009 9 (6), 2466-2470

## Poster

- Quantum Dot Triexciton Imaging with Three-Dimensional Subdiffraction Resolution. (science fair) im Rahmen der <perspektive>2010 Universität Bielefeld, 11 November 2010
- Quantum Dot Triexciton Imaging with Three-Dimensional Subdiffraction Resolution. 15th Anniversary International Workshop on "Single Molecule Spectroscopy and Ultra Sensitive Analysis in the Life Sciences" (Pico Quant) September 15-18, 2009.



# Anhang

## Dokumentation der Software für die hochpräzise Farbstoffablage

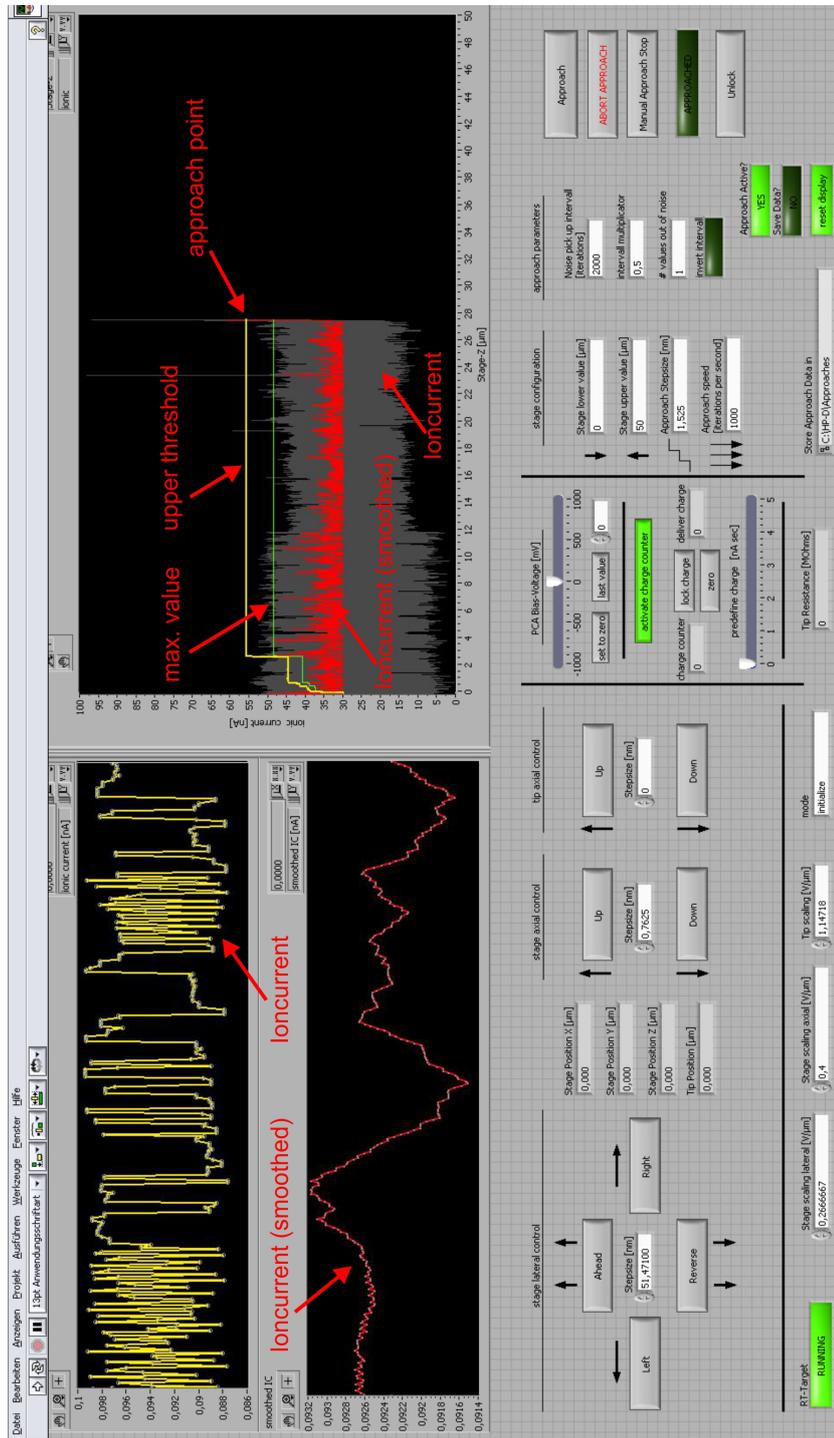
### Allgemeines

Dieser Abschnitt soll der Erklärung der einzelnen Funktionen der Software für die hochpräzise Farbstoffablage dienen. Die erste Routine entstand vor den Experimenten zur hochpräzisen Farbstoffablage. Viele Parameter und Funktionen der Software konnten zu diesem Zeitpunkt nur abgeschätzt werden, so dass einige Bedienelemente nicht optimal angeordnet, oder manche Eingabeparameter sinnlos erscheinen. Sie stellen Überbleibsel früher Entwicklungsstadien dar, die – weil sie niemanden störten – nicht entfernt wurden. Des Weiteren konnten einige Entwicklungen zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgesehen werden, so dass die Software über die Zeit immer wieder an die experimentellen Bedürfnisse der aktuellen Umstände angepasst wurde. Die aktuelle Softwareversion ist die “HP-Delivery 1\_6”. Dabei steht HP-D für “High Precision-Delivery”.

Im Folgenden wird grundlegend erklärt, wie die Software aufgebaut ist und welche Teile vorgesehen waren, aber nie implementiert wurden. Danach wird eine Anleitung gegeben, wie die Software rein praktisch gestartet wird und schließlich werden die einzelnen Einstellmöglichkeiten, und Optionen, die nach einer erfolgreichen Annäherung zur Verfügung stehen, gemacht. Für ein besseres Verständnis steht eine Abbildung der Softwareoberfläche mit grundlegenden Erklärungen der Graphen, die typischerweise zu sehen sind zur Verfügung. An dieser sollte sich der Leser orientieren, um die einzelnen Parameter und Einstellmöglichkeiten besser verstehen zu können.

### Der grundlegende Aufbau

Die Software selbst besteht aus zwei Teilen. Beide Teile sind eigenständige, ausführbare Dateien (.vi) und werden in einem LabView “Projekt”



gespeichert. Eine Routine wird auf dem Realtime Computer (RTC) (HPD-RTT.vi), die andere auf dem Host PC (HPC) (HPD-HPC.vi) ausgeführt. Dabei kann in der Software auf dem RTC vom Nutzer keine Eingaben gemacht werden. Die RTC-Software läuft in zwei Schleifen ab, die vom HPC gesteuert werden. Dabei geht die Routine auf dem RTC direkt nach dem Start in die "Status"-Schleife. Hier werden mit einer hohen Frequenz immer wieder die Daten von der Messkarte ausgelesen und Daten an die Karte gesendet. Die gelesenen Daten werden direkt an den HPC weitergegeben. Daten, die gesendet werden sollen kommen als Nutzereingabe vom HPC und werden im RTC direkt an die Messkarte und daraufhin an die Instrumente weitergegeben. Die zweite Schleife, auf dem RTC ist die Annäherungsschleife. Alle Eingabeparameter werden in diese Schleife zum Start der Annäherungsroutine vom HPC übertragen. Danach wird die Schleife ausgeführt und sendet währenddessen Daten über den aktuellen Stand des Ionenstroms u.a. Parameter an den HPC. Die Annäherungsschleife wird beendet, wenn ein Annäherungssignal erfolgt, die maximale Auslenkung der Piezostage erreicht, oder ein Abbruchbefehl vom Nutzer erfolgt ist. Auf dem HPC werden Parameter für die Annäherung eingegeben und (nach erfolgreicher Annäherung) die Piezostage bzw. die Spitze manuell schrittweise nachgeführt. Hier läuft eine Hauptschleife, mit verzweigten Nebenfällen, die durch Eingabe von Parametern aufgerufen werden. Während der RTC im Annäherungsmodus ist, geht der HPC in einen Empfangsmodus, um die Daten zu verarbeiten und visuell darzustellen.

## **Starten der Software**

Zunächst sollte vor dem Start der Software sichergestellt werden, dass der RTC eingeschaltet ist. Danach wird das Projekt (HP-Delivery 1\_6) durch Doppelklick geöffnet. Jetzt öffnet sich eine Exploreransicht des Projekts. Dann wird erst das HPC Softwarefenster (HPD-HPC) geöffnet, dann das RTC Fenster (jeweils durch Doppelklick). Durch klicken auf den weißen Pfeil links oben im Softwarefenster wird erst die "HPD-RTC", dann die HPD-HPC gestartet. Beide Softwareteile werden nun initialisiert. Es dauert einen Moment, bis sich die Teile synchronisiert haben und die ersten Daten vom Ionenstrom angezeigt werden. Die Software ist nun betriebsbereit.

## Annäherung an Oberflächen/Zellen

Nachdem die Software gestartet wurde, können Einstellungen für die Annäherung gemacht werden. Oben links im Graphen wird dabei der momentane Ionenstrom dargestellt. Dieser fluktuiert teils sehr stark, so dass es eine zusätzliche gemittelte Stromangabe unten links gibt, um Tendenzen besser erkennen zu können. Rechts im Graphen wird im Leerlaufmodus nichts angezeigt. Erst wenn die Annäherung gestartet wird, werden die Verlaufsgraphen vom aktuellen Ionenstrom, geglättetem Ionenstrom, Maximalwert und Threshold angezeigt.

*PCA Bias-Voltage*: Über diese Einstellung wird die Spannung zwischen den Elektroden eingestellt. Dabei kann die Spannung direkt über den Schieberegler, oder an der Zahlenangabe eingestellt werden. Über *set to zero* kann die Spannung schnell auf Null gesetzt werden und mit *last value* wird der letzte bekannte Wert wiederhergestellt.

*stage lateral control* bezeichnet die Sektion, mit der die Piezostage jederzeit bewegt werden kann. Die Schritte, mit der sich die Stage dabei bewegt, können in der Mitte über *Stepsize* eingestellt werden. Die Position vom Ausgangspunkt wird dabei rechts neben den Verschiebebuttons angezeigt.

Über die *stage configuration* werden die wichtigsten Annäherungsparameter für die Piezostage eingestellt. Der Startpunkt, ab dem die Stage auf die Pipette zufahren soll wird über *Stage lower value* und der Endpunkt über *Stage upper value* eingestellt. Die Schrittweite, um die die Stage pro Schleife angehoben werden soll wird über *Approach Stepsize* eingegeben. Schlussendlich kann noch die *Approach Speed* eingestellt werden, die die Schleifendurchläufe pro Sekunde regelt. Diese Einstellmöglichkeit wird deaktiviert, wenn *Save Data* eingeschaltet ist, da ansonsten die Geschwindigkeit der Schleifendurchläufe durch das zusätzliche Abspeichern nicht mehr zuverlässig funktioniert. Sollte *Save Data* eingeschaltet sein, so wird die Annäherungsschleife mit maximaler Geschwindigkeit laufen.

*approach parameters* beschreibt die Einstellungen für die Intervallbildung, die den Annäherungsstrom definieren. Dabei wird für eine gewisse Anzahl von Schleifendurchläufen (*Noise pick up intervall*) bei der Annäherung der Ionenstrom aufgezeichnet und ein Intervall mit Hilfe des maximalen Stroms gebildet. Dieses Intervall wird mit einem Faktor (*intervall multiplicator*) multipliziert. Beide Werte werden zu dem resultierenden Threshold addiert. Dieser ist dann der wirkliche Wert, der die Annäherung bestimmt. Dabei muss der Ionenstrom eine bestimmte

Anzahl von Werten hintereinander (*# values out of noise*) über dem Threshold liegen, damit die Nanopipette als angenähert definiert wird. Der Annäherungsmodus stoppt instantan, wenn alle Kriterien für die Annäherung erfüllt sind.

Die Einstellung *invert intervall* wird für die Annäherung mit einem abnehmenden Ionenstrom (z.B. für die Annäherung an eine Zellmembran) verwendet. Dabei wird das Annäherungsintervall nicht oberhalb des detektierten Ionenstroms, sondern unterhalb gebildet. Nimmt also der Ionenstrom ab und unterschreitet den Threshold für eine definierte Anzahl von Werten, so wird die Spitze als angenähert betrachtet.

Für Testzwecke, oder für die Aufnahme einer gesamten Kurve, die den Annäherungspunkt überschreiten soll, kann der Schalter *Approach Active* betätigt werden. Dieser zeigt an, ob bei erfüllten Annäherungskriterien die Annäherung anhält oder weiterläuft. Über *Save Data* werden Ionenstrom, geglätteter Ionenstrom, maximaler Wert und Threshold in eine Textdatei unter dem angegebenen Verzeichnis gespeichert. Diese Textdatei kann dann sehr einfach in z.B. Origin importiert werden, um den Annäherungsverlauf zu dokumentieren und zu analysieren. *Reset Display* schaltet das Löschen alter Annäherungskurven aus, so dass mehrere Annäherungskurven im rechten Display übereinandergelegt werden können.

In der mittleren Sektion befindet sich der Schalter für *activate charge counter*. Ist dieser aktiv, so steht der ganze umliegende Bereich für Einstellungen zur Verfügung. Ist die Pipette angenähert, so wird die Ladung (Ionenstrom·Zeit) berechnet, die ab dem Annäherungspunkt "abgelegt" wurde. Dieser Counter kann auf einen bestimmten Wert voreingestellt werden (*predefine charge*), oder es kann ein gezählter Wert vom *charge counter* mit Hilfe von *lock charge* übernommen werden. Nach Erreichen des Wertes wird die Spitze automatisch von der Oberfläche gelöst und in die Ausgangsposition für eine erneute Annäherung zurückgefahren. Der gesamte Bereich dient dazu möglichst reproduzierend einzelne Punkte auf Oberflächen erzeugen zu können.

Sind alle Einstellungen für die Annäherung an eine Oberfläche getroffen, so wird die Annäherung selbst mit dem *Approach* Button gestartet. Danach werden alle Werte an den RTC übermittelt und die Annäherungsschleife im RTC startet. Der Annäherungsprozess kann mit der Taste *ABORT APPROACH* jederzeit abgebrochen werden. Die Spitze fährt dann auf die Ausgangsposition zurück. Sollte die Annäherung aus welchen Gründen auch immer manuell gestoppt werden wollen, ohne dass die Spitze in den Ausgangszustand zurückfährt, so

## Anhang

kann der Knopf *Manual Approach Stop* verwendet werden. Die Spitze wird dann als angenähert definiert und der *APPROACHED*-Button wird hellgrün (leuchtend) hinterlegt.

### Nach der Annäherung

Nachdem die Nanopipette erfolgreich an das Ziel angenähert wurde, kann diese über *Unlock* wieder auf die Ausgangsposition zurückgesetzt werden, oder der *charge counter* setzt diese automatisch zurück. Während die Pipette angenähert ist, ist eine manuelle Nachführung der Pipettenspitze über *stage axial control* oder *tip axial control* möglich. Hierbei wird entweder die Piezostage an die Pipette gefahren (oder von dieser weg), oder die Spitze selbst über den Z-Piezoblock an die Oberfläche heran- oder weggefahren. Die Schritte können dabei jeweils zwischen den Buttons voreingestellt werden. Die aktuelle Position der Spitze oder der Stage wird dabei links neben den Einstellbereichen angezeigt. Es handelt sich bei der *Tip Position* um relative Werte.

### Feste Einstellungen

Neben den Parametern, die für jede Annäherung angepasst werden müssen, gibt es feste (oder zumindest selten geänderte) Werte.

*RT-Target* zeigt an, ob eine Verbindung zum RTC besteht, besteht diese nicht, so wird der Hintergrund von Grün auf Rot gewechselt.

*Stage scaling lateral* gibt den Umrechnungswert für die aktuelle Piezostage an. Wird eine neue Stage angeschlossen, oder die Software an einem anderen als dem ursprünglichen System betrieben, muss dieser Wert den Bereichen der neuen Stage angepasst werden. Dies gilt ebenso für *Stage scaling axial* und *Tip scaling*.

Der Wert *mode* beschreibt den Modus in dem die Software operiert. Dabei war ursprünglich zusätzlich eine automatisierte Schleife vorgesehen, die bestimmte vordefinierte Strukturen alleine, also automatisch erzeugen kann. Dieser automatische Modus wurde bis jetzt nicht verwirklicht. Wählt man diesen an, so wird die Software automatisch gestoppt. Um die Software auf eine elegante – und vom Entwickler vorgesehene – Art und Weise zu stoppen wählt man bei *mode* einfach den Wert *STOP*.





# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Personen danken, die mich die letzten Jahre auf dem Weg durch meine Promotion begleitet haben. Menschen, die mir als Freunde und wichtige Diskussionspartner immer wieder weitergeholfen und deren Art und Weise diese Arbeit in dieser Form erst ermöglicht haben.

Zuerst möchte ich Prof. Dr. Markus Sauer danken, ohne den diese Arbeit erst gar nicht möglich gewesen wäre. Für seine Unterstützung und seine tolle Art, Menschen für ihre Arbeit zu begeistern.

Außerdem möchte ich Prof. Dr. Thomas Huser danken. Für seine Hilfestellung bei komplizierten Fragestellungen, für Anregungen und Impulse, ohne die diese Arbeit nicht vollständig wäre.

Dr. Gerd Wiebusch möchte ich für seine technische Hilfestellung und kompetenten Ratschläge danken, für etliche Diskussionen und Anregungen.

Dr. Idir Yahiatene und Fabian Humpert danke ich für ihre Anregungen, kritischen Kommentare und endlosen Diskussionen, die mich immer wieder auf den richtigen Weg zurückgeführt haben.

Dr. Sebastian van de Linde danke ich ebenfalls für seine Unterstützung und unzähligen Diskussionen.

Weiterhin danke ich Dr. Martina Lummer für die Diskussionen in biologischen Fragestellungen und die etlichen Proben, die sie für diese Arbeit vorbereitet hat.

Dr. Wolfgang Hübner danke ich für das Durchsehen der einzelnen Abbildungen.

Des Weiteren möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe „Biomolecular Photonics“ und den „alten“ Bielefeldern, die mittlerweile in Würzburg sitzen für eine unglaublich gute und entspannte Arbeitsatmosphäre bedanken.

Zuletzt geht mein ganz besonderer Dank an Simone Sczepanek, die mir immer wieder geduldig zugehört hat, wenn ich die Gedanken die mich in meiner Arbeit beschäftigt haben vor ihr ausgebreitet habe und für ihre Motivation in den letzten Zügen dieser Arbeit, sowie für die sorgfältige Revision des Manuskripts.