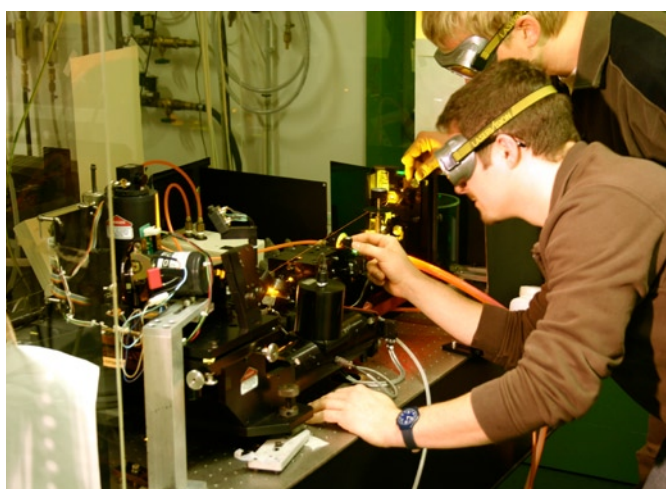


„Klar wie ein Kristall“ – Bayreuther Physiker machen komplexe molekulare Strukturen sichtbar

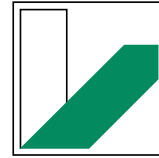
Mit dem Mikroskop in den Kosmos der Moleküle vorzudringen und die Strukturen von Festkörpern bis in den molekularen Bereich hinein sichtbar zu machen – auf dieses ehrgeizige Ziel richten sich weltweit zahlreiche Forschungsarbeiten, seit Ernst Abbe vor mehr als 130 Jahren nachgewiesen hat, dass herkömmliche Mikroskope dazu nicht imstande sind. Effekte der Lichtbeugung begrenzen die Auflösung dieser Mikroskope so stark, dass Abstände, die kleiner sind als eine halbe Lichtwellenlänge, nicht mehr erfasst werden. Die Lichtwellenlänge im sichtbaren Bereich beträgt ca. 500 Nanometer. Strukturen im molekularen Bereich entziehen sich dann dem Blick des Forschers durch das Mikroskop. In den letzten zehn Jahren sind jedoch verschiedenartige Verfahren entwickelt worden, um diese Beschränkung zu umgehen.

Bei der Aufklärung der Strukturen von transparenten Festkörpern sind Physiker der Universität Bayreuth jetzt einen bedeutenden Schritt vorangekommen. Professor Dr. Jürgen Köhler (Lehrstuhl Experimentalphysik IV) und Professor Dr. Lothar Kador (Bayreuther Institut für Makromolekülforschung) haben gemeinsam mit einem Forscherteam des Instituts für Spektroskopie an der Russischen Akademie der Wissenschaften ein neues Verfahren entwickelt, das auf der Einzelmolekülspektroskopie beruht. Es verwendet eine avancierte Lasertechnik in Kombination mit einer außerordentlich leistungsfähigen Software zur Speicherung und Weiterverarbeitung von Bild-
daten. Dadurch lassen sich die Strukturen eines Festkörpers, z.B. eines polykristallinen Materials, unter dem Mikroskop sichtbar machen. Die Proben des Festkörpers werden „klar wie ein Kristall“ – prinzipiell bis hinunter zu molekularen Strukturen, die weit unter der von Abbe definierten Beugungsgrenze liegen.



Forschungsarbeiten im Laserlabor des
Physikalischen Instituts der Universität Bayreuth

Die Forschungsarbeiten, die diese Erkenntnisse ermöglicht haben, sind insbesondere von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Russischen Stiftung für Grundlagenforschung gefördert worden. Eine detaillierte Beschreibung ist kürzlich in der Zeitschrift „Angewandte Chemie“ erschienen.



Theoretische Vorüberlegungen: Auf dem Weg zur Überwindung der Beugungsgrenze

Das neue Verfahren hat eine nahezu 20-jährige Vorgeschichte, die deutlich macht, wie sich Forschungsansätze aus unterschiedlichen Disziplinen wechselseitig befruchten können. Eric Betzig entwickelte in den neunziger Jahren in den USA die theoretischen Grundlagen dafür, dass Moleküle, die einen Abstand von weniger als einer halben Lichtwelle voneinander haben, dennoch unter dem Mikroskop unterscheidbar werden, so dass sie getrennt registriert werden können und ihr Abstand messbar ist. Um für die von ihm vorgeschlagene Messmethode geeignet zu sein, muss jedes Molekül eine zusätzliche messbare Eigenschaft aufweisen. Wenn es dank dieser Eigenschaft gelingt, jedes Molekül einzeln – also mit zeitlichem Abstand – an seiner jeweiligen Position sichtbar zu machen, lassen sich die so entstandenen Einzelbilder zu einem Gesamtbild zusammenfügen. Hier sind die Moleküle in ihrer räumlichen Anordnung klar erkennbar, obwohl ihr Abstand kleiner ist als die von Abbe definierte Beugungsgrenze.

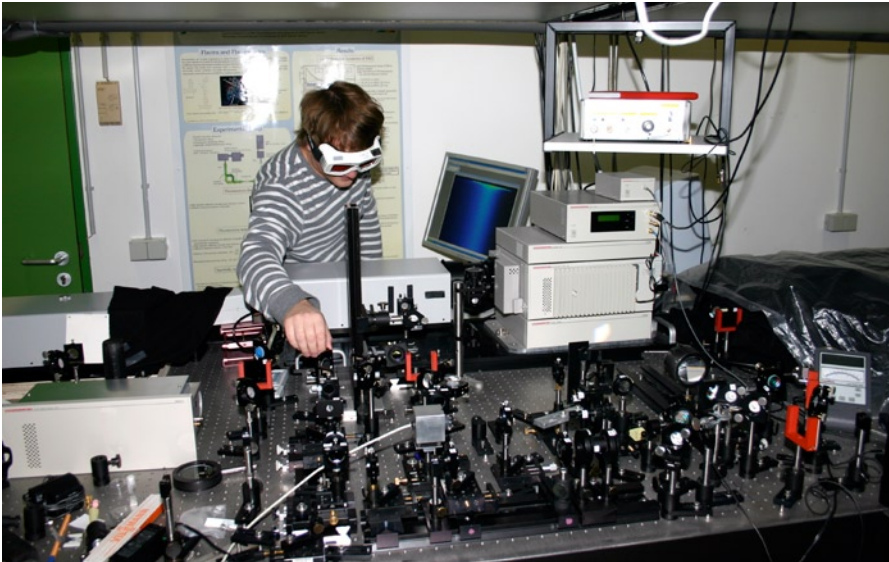
Farbstoffmoleküle als „Sonden“ für Zellstrukturen: Erfolge in den Biowissenschaften

Dieser theoretische Ansatz gab in den molekularen Biowissenschaften den Anstoß zu zahlreichen Innovationen auf dem Gebiet der Fluoreszenzmikroskopie. Um eine komplexe Zellstruktur aufzuklären, werden die biologischen Strukturen mit Farbstoffmolekülen in geringer Konzentration markiert. Die Zellstruktur wird nun einer Serie von Bestrahlungen mit Laserlicht ausgesetzt: Bei jedem Bestrahlungsvorgang werden einige wenige Farbstoffmoleküle an räumlich verschiedenen Positionen der Zellstruktur dazu angeregt, Lichtsignale auszusenden; d.h. zu fluoreszieren. Jedesmal werden die fluoreszierenden Moleküle mit der Kamera aufgenommen. Die zusammengesetzten Teilbilder lassen dann die komplexe Zellstruktur erkennbar werden – bis hin zu winzigen Abständen, die weit unterhalb der Beugungsgrenze liegen. Die eingebauten Farbstoffmoleküle wirken dank ihres Fluoreszierens gleichsam als Sonden, mit deren Hilfe diese Grenze unterlaufen wird.

Allerdings behindern zwei wesentliche Nachteile dieses Verfahrens auch weiterhin die biowissenschaftliche Forschung: Es bleibt dem Zufall überlassen, welche Farbstoffmoleküle bei einer Bestrahlung zum Fluoreszieren gebracht werden; und es vergeht sehr viel Zeit, bis die gesamte Serie der Bestrahlungsvorgänge abgeschlossen werden kann und Einblicke in die komplexe Zellstruktur gewährt.

Farbstoffmoleküle als „Sonden“ für Kristallstrukturen: Ein neuer Ansatz für die Materialwissenschaften

Die Idee, Farbstoffmoleküle als Detektoren für hochkomplexe Strukturen unterhalb der Beugungsgrenze einzusetzen, haben die Bayreuther Physiker jetzt auf die Materialwissenschaften übertragen. Dabei konnten sie Forschungsergebnisse aufgreifen, die Köhler bereits in den neunziger Jahren – damals noch an der Universität Leiden tätig – anknüpfend an Betzigs Idee erzielt hatte; jedoch nur mit weniger als zehn Molekülen, deren räumliche



Anordnung durch spektroskopische und bildgebende Verfahren bestimmt werden konnte. Rund zehn Jahre später haben erheblich leistungsfähigere Forschungstechnologien es dem Bayreuther Team und seinen russischen Partnern ermöglicht, jene früheren Ergebnisse weit zu übertreffen und molekulare Feinstrukturen innerhalb eines kristallinen Festkörpers präzise sichtbar zu machen.

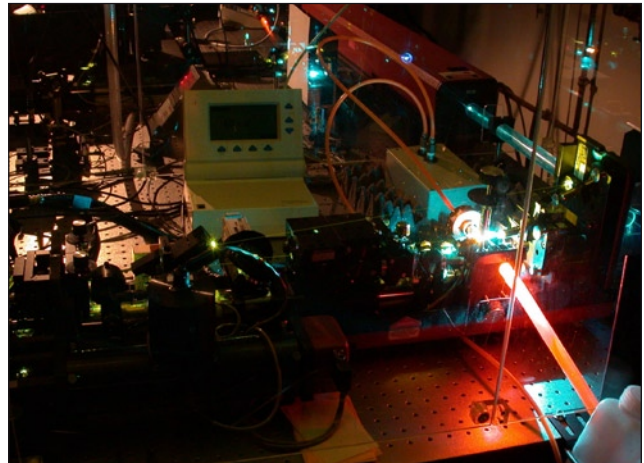
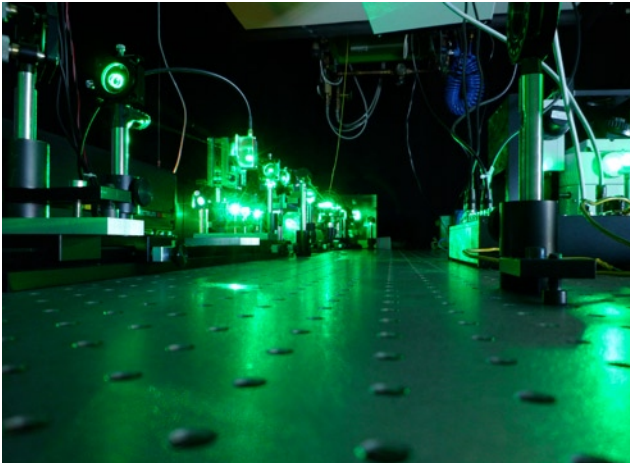
Nahezu 300.000 Moleküle des Farbstoffs Terrylen wurden in die molekularen Strukturen eines organischen Festkörpers eingelagert. Ausgangspunkt für deren spektroskopische Untersuchung ist das Phänomen der Absorption und Fluoreszenz. Jedes einzelne Farbstoffmolekül kann von einem Laserstrahl in einen energetisch angeregten Zustand versetzt werden. Dabei absorbiert es einen Teil des Lichts, genauer gesagt: Licht in einem bestimmten Frequenzbereich, dem sog. Absorptionsspektrum. Unmittelbar nach der Absorption fällt das Molekül in einen energieärmeren Zustand zurück und sendet Licht aus: Das Farbstoffmolekül fluoresziert. Beim Fluoreszieren erscheint das Molekül unter dem Mikroskop als eine punktförmige Lichtquelle. Indem der Schwerpunkt der Lichtquelle berechnet wird, lässt sich das einzelne Molekül mit einer Genauigkeit von wenigen Nanometern lokalisieren.

Hochselektive Anregung von Einzelmolekülen bei tiefen Temperaturen

Aber wie kann auf diesem Weg die räumliche Anordnung von nahezu 300.000 Farbstoffmolekülen sichtbar gemacht werden? Dafür werden die in jedem Festkörper vorhandenen Imperfektionen, d.h. Störungen, ausgenutzt: Jedes einzelne Farbstoffmolekül hat eine etwas andere Umgebung. Deshalb haben benachbarte Moleküle nicht das gleiche Absorptionsspektrum. Vielmehr sind ihre Spektren gegeneinander versetzt. Bei extrem tiefen Temperaturen verringern sich die Bandbreiten ihrer Absorptionsspektren so stark, dass sie sich nicht mehr überlappen.

Informationen der Universität Bayreuth

Forschungsergebnisse – Kompetenzen – Graduiertenausbildung – Technologietransfer

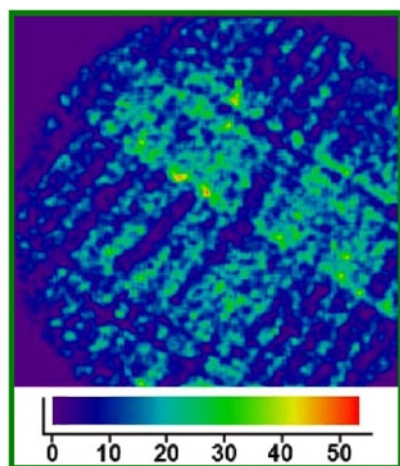
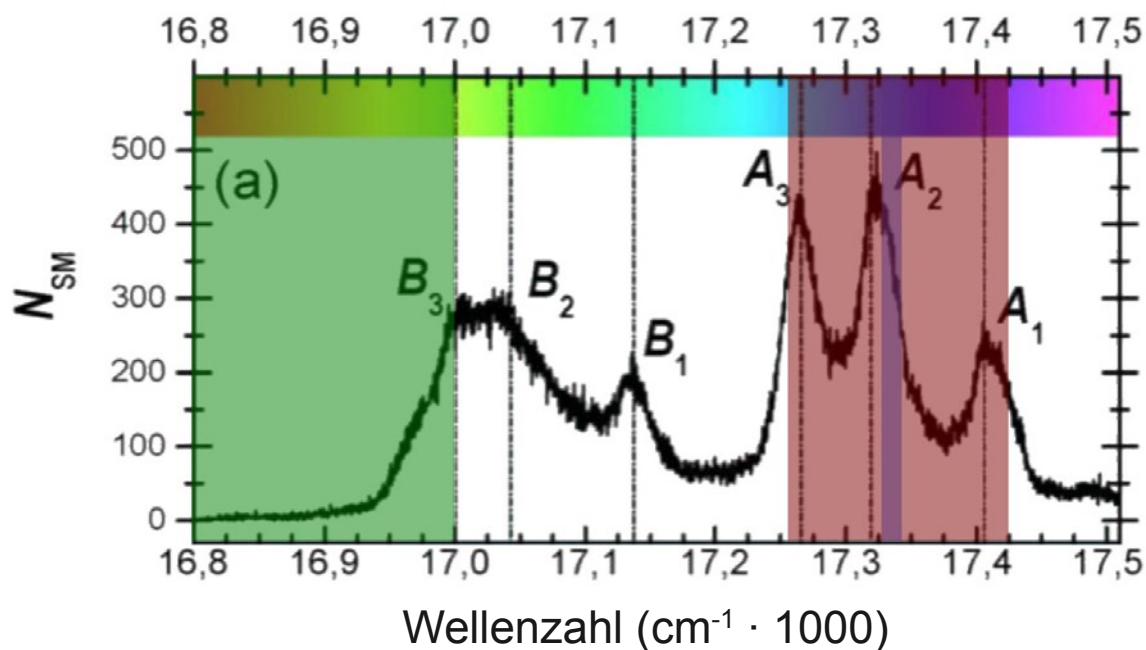


Deshalb kühlen die Bayreuther Physiker die Probe des Kristalls, das mithilfe des eingelagerten Farbstoffes auf seine molekularen Strukturen untersucht werden soll, bis auf eine Temperatur nahe dem absoluten Nullpunkt (-273 Grad Celsius) ab. Für die spektroskopische Untersuchung verwenden sie einen sehr schmalbandigen Laser, einen sog. Ein-Moden-Laser. Dieser Laser wird nacheinander auf unterschiedliche Frequenzen eingestellt. Zu jedem Zeitpunkt regt der Strahl nur einige wenige der rund 300.000 Farbstoffmoleküle an, nämlich genau diejenigen, deren Absorptionsspektrum der Frequenz des Laserstrahls entspricht. Folglich fluoreszieren zu jedem Zeitpunkt nur diese wenigen Moleküle; von benachbarten Molekülen gehen keine störenden Signale aus. Wenn die Konzentration des Farbstoffes richtig gewählt wird, sind die gleichzeitig fluoreszierenden Moleküle stets weiter als die Beugungsgrenze voneinander entfernt und können getrennt detektiert werden.

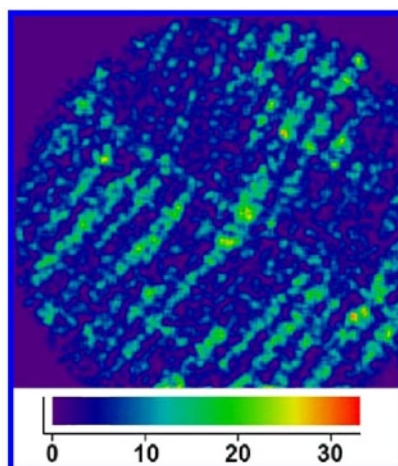
Mit einer speziellen Kamera werden die von den Einzelmolekülen ausgehenden Fluoreszenzsignale nacheinander aufgenommen. Jedes Bild gibt daher Auskunft über die räumliche Position mehrerer Farbstoffmoleküle innerhalb des molekularen Festkörpers.

Von Fluoreszenzbildern zur mikroskopischen Nanodiagnostik

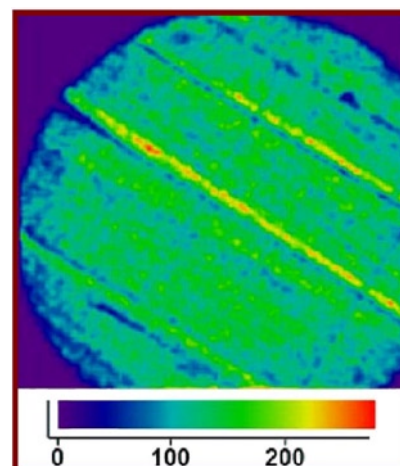
Die gesamte Abfolge der Bilder wird für die weitere Auswertung gespeichert. Diese Datenbasis liefert nun in Verbindung mit einer leistungsstarken Software ein Gesamtbild, das sich aus einer Vielzahl kleiner Bildpunkte zusammensetzt: nämlich aus den punktförmigen Fluoreszenzbildern, die die räumlichen Positionen der Farbstoffmoleküle repräsentieren. Dank ihrer spezifischen Absorptionsfrequenzen wirken diese Moleküle als Nanosonden, welche die Strukturen des Festkörpers unter dem Mikroskop präzise erkennbar machen. Die Beugungsgrenze wird unterlaufen. Auch strukturelle Besonderheiten, wie z.B. feine linienförmige Risse, werden so sichtbar.



Moleküldichte ($1/\mu\text{m}^2$)



Moleküldichte ($1/\mu\text{m}^2$)

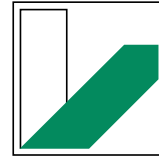


Moleküldichte ($1/\mu\text{m}^2$)

Jedes der drei unteren Bilder zeigt die räumliche Anordnung derjenigen Einzelmoleküle, die zum Fluoreszieren angeregt werden, wenn der Laser den Frequenzbereich durchläuft, der im oberen Teil der Abbildung farblich unterlegt ist:

- 16800-17000 cm^{-1} (linkes Bild)
- 17330-17345 cm^{-1} (mittleres Bild)
- 17255-17425 cm^{-1} (rechtes Bild)

Die unteren Abbildungen sind nachträglich farbkodiert, so dass die Skalen Auskunft über die Dichte der fluoreszierenden Moleküle (= Anzahl der Moleküle pro Quadratmikrometer) geben.

**Titelaufnahme:**

Andrei V. Naumov, Alexey A. Gorshelev, Yury G. Vainer, Lothar Kador, Jürgen Köhler:
Far-Field Nanodiagnostics of Solids with Visible Light by Spectrally Selective Imaging

in: Angewandte Chemie International Edition, Volume 48, Issue 51, pp. 9747-9750

DOI Bookmark: <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200905101>

Kontaktadresse für weitere Informationen:

Professor Dr. Jürgen Köhler
Lehrstuhl Experimentalphysik IV
Universität Bayreuth
D-95440 Bayreuth
Telefon: (+49) 921-55-4001 / Fax: (+49) 921-55-4002
E-Mail: juergen.koehler@uni-bayreuth.de
www.ep4.phy.uni-bayreuth.de

Text und Redaktion:

C. Wißler in Kooperation mit J. Köhler und L. Kador

Abbildungen:

Lehrstuhl für Experimentalphysik IV, Bilder zur Veröffentlichung frei.
Alle Bilder zum Download: www.uni-bayreuth.de/blick-in-die-forschung/20-2009-Bilder