

Kryo-Rasterkraftmikroskopie an biologischen Systemen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Physik
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Jens Müller
aus Hamburg

Hamburg
2000

Gutachter der Dissertation:
Prof. Dr. R. Wiesendanger
PD Dr. U. D. Schwarz

Gutachter der Disputation:
Prof. Dr. R. Wiesendanger
Prof. Dr. R. Anton

Datum der Disputation:
23.10.2000

Vorsitzender des Promotionsausschusses:
Prof. Dr. F.-W. Büßer

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsangabe	5
Abstract	7
Einleitung und Problemstellung	8
1 Rasterkraftmikroskopie	13
1.1 Prinzip der Rasterkraftmikroskopie	13
1.2 Kraftsensoren	15
1.3 Kraft-Distanz-Kurven	16
1.4 Betriebsarten der Rasterkraftmikroskopie	18
1.4.1 Kontaktkraftmikroskopie	19
1.4.2 Nichtkontaktkraftmikroskopie	21
2 Experimenteller Aufbau	23
2.1 Mikroskop	25
2.1.1 Schrittmotor zur Annäherung des Cantilevers an die Probenoberfläche	26
2.1.2 x - y -Verschiebetisch	27
2.1.3 Detektionssystem	27
2.1.4 Rastereinheit	27
2.1.5 Proben- und Spitzenwechselmechanismus	29
2.2 Vakuumsystem	30
2.2.1 Transfersystem	30
2.2.2 Präparationskammer	32
2.2.3 Hauptkammer	34
2.2.4 Dämpfungssystem	34
2.3 Elektronik	34
3 Probenpräparation	37
3.1 Grundlegende Betrachtungen	37
3.2 Wasser im biologischen System	39
3.3 Präparationsmethoden	40

3.3.1	Die chemische Fixierung	40
3.3.2	Die Kryoimmobilisierung	41
3.3.3	Probleme beim Gefriervorgang	41
3.4	Das Hochdruckgefrieren	43
3.4.1	Das Einfrieren unter hohem Druck	44
3.4.2	Die Hochdruckgefrierapparatur	45
3.5	Aufbereitung des biologischen Materials nach dem Einfrieren	48
3.5.1	Gefriertrocknung	48
3.5.2	Kryoschnitte	49
4	Strukturuntersuchungen an T4-Bakteriophagen	51
4.1	Die T4-Bakteriophage als Probensystem	51
4.2	Vorüberlegungen	52
4.3	Die Präparationsmethode	55
4.3.1	Das Substrat	55
4.3.2	Die Reinigung	57
4.3.3	Die Einfriermethode	57
4.3.4	Das Präparationsergebnis	59
4.4	Untersuchungen mit dem Rasterkraftmikroskop	61
4.4.1	Testmessungen	61
4.4.2	T4-Bakteriophagen	62
4.5	Diskussion und Ausblick	64
5	Zusammenfassung	66
	Literaturverzeichnis	68

Inhaltsangabe

Die vorliegende Dissertation entstand im Institut für Angewandte Physik der Universität Hamburg am 1996 neu gegründeten Mikrostrukturzentrum in der Arbeitsgruppe Rasterelektromethoden unter der Leitung von Prof. Dr. R. Wiesendanger. Sie wurde im Rahmen eines BMBF-Verbundprojektes in enger Kooperation mit der Analytischen Forschung der Beiersdorf AG durchgeführt. Eingebunden in die Forschungsaufgaben und Infrastruktur des Instituts war das Ziel, ein verbessertes Kryo-Rasterkraftmikroskopie-Verfahren zur Erfassung biologischer und organisch/chemischer Systeme mit einer Auflösung bis in den molekularen Bereich hinein zu entwickeln. Neben der Konzipierung und dem eigentlichen Aufbau sollte auch die Leistungsfähigkeit der Neuentwicklung an geeigneten Modellsystemen unter Beweis gestellt werden.

Entsprechend behandelt das erste Kapitel die grundlegende Methodik der Kraftmikroskopie, vor allem im Hinblick auf biologische Fragestellungen. Dabei wird deutlich, welche einzigartigen Möglichkeiten sich der Strukturbiologie durch die geschickte Kombination von Kraftmikroskopie und Kryotechnik bieten.

Im zweiten Kapitel wird der Aufbau der gesamten Messapparatur, bestehend aus UHV-Anlage, Probenschleuse, Präparationskammer und Analysechamber im Detail beschrieben. Bei der Konzipierung der Schleuse wurde insbesondere darauf geachtet, dass neben dem einfachen Spitzen- und Probentransfer auch Kompatibilität zu Kryo-REM/Kryo-TEM-Geräten gewährleistet ist, so dass Proben in kaltem Zustand entsprechend ausgetauscht werden können. In der Präparationskammer sind Optionen zur Probenpräparation durch In-situ-Gefrierbrüche oder durch Gefrierätzen vorgesehen. Im Mikroskop selbst kühlt ein Durchflußkryostat die Probe auf die Temperatur des flüssigen Stickstoffs (LN_2 - 77 K) ab, während gleichzeitig die Spitze mit einem maximalen Bildbereich von $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ über die Probe gerastert wird.

Im dritten Kapitel wird die Kryopräparation der Proben behandelt. Wie bekannt, müssen biologische Proben aufgrund ihres hohen Wassergehaltes mit großer Sorgfalt eingefroren werden, um strukturzerstörende Segregationseffekte durch die Bildung von Eiskristallen zu verhindern. Die hier verwendeten Verfahren werden erläutert, ihre Vor- und Nachteile diskutiert.

Im vierten Kapitel wird anhand von Testsystemen (Graphit und Gold) und einem biologischen Modellsystem, dem T4-Virus (Bakteriophage), die Leistungs-

fähigkeit des aufgebauten Rasterkraftmikroskops demonstriert. Die Ergebnisse wurden aus Tieftemperaturmessungen unter Einsatz der Kontakt- und Nichtkontaktkraftmikroskopie gewonnen.

Abstract

This thesis is based on the nanostructure research accomplished within the Scanning Probe Group (head: Prof. Dr. R. Wiesendanger) of the Microstructure Research Center at the Institute for Applied Physics of Hamburg University. The work was done in close cooperation with the Analytical Research Group of the Beiersdorf AG, Hamburg, within the framework of a BMBF (Federal Ministry for Education and Research) project. The overall aim of this Ph.D. study was the development of an improved low-temperature scanning force microscope (SFM) to visualize and characterize biological and organic systems down to the molecular scale. In addition to the conceptive and constructional work the capabilities of the new SFM-device were proven by application to selected model structures.

The plan of the thesis is as follows: Chapter 1 treats the fundamentals of the SFM technology with special regard to biological systems. It is elucidated, that a subtle combination of SFM and cryo techniques offers a variety of unique research possibilities in the fields of structural biology.

Chapter 2 describes the complete measuring equipment consisting of an ultra-high vacuum (UHV) system, the load lock, the preparation chamber and the analysis chamber. The load lock not only governs the simple tip-sample transfer, but also offers compatibility with cryo-scanning-electron (SEM) and cryo-transmission-electron (TEM) instrumentations so that properly cooled samples may be interchanged. The preparation chamber provides options for sample preparation by in situ freeze-fracturing and freeze-etching. In the analysis chamber a flow-cryostat cools down the sample to the temperature of liquid nitrogen (77 K), the tip is scanned with a maximum range of $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$.

In chapter 3 the cryo-preparation of the samples is addressed. Owing to the high water content, biological samples must be frozen very carefully in order to avoid any destructive segregation effects due to ice crystallization. The applied methods are discussed with special emphasis on the inherent advantages and disadvantages.

In chapter 4 the usefulness of the developed cryo SFM-device is demonstrated with the aid of test systems (graphite and gold) and a biological model system, T4-viruses. The results originate from low temperature measurements obtained by contact and noncontact scanning modes.

Einleitung und Problemstellung

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Strukturbiologie zu einem eigenständigen und aufstrebenden Zweig der modernen Biologie entwickelt. Detaillierte Untersuchungen über die Struktur von biologischen/organischen Systemen im molekularen oder sogar atomaren Bereich haben zu dem wahrhaft stürmischen Fortschritt unseres Wissens über biologische Prozesse und den Aufbau von Organismen beigetragen. Viele dieser Informationen wurden mit Hilfe von optischer Mikroskopie, Röntgenstreuung (XRD), Kernspinresonanz (NMR) oder Elektronenmikroskopie (EM) gewonnen, wobei Auflösungsvermögen und Präparationstechniken weitestgehend über die verschiedenen Einsatzmöglichkeiten bestimmen. Während die Auflösung optischer Systeme von der benutzten Wellenlänge abhängt und im Falle des Lichtmikroskops in der Größenordnung von einigen 100 nm liegt, zählen XRD und NMR zu den spektroskopischen Verfahren, welche die Mittelung über eine große Anzahl äquivalenter Moleküle voraussetzt.

Die Wellenlänge des sichtbaren Lichtes ist zu groß, um zwei Bildpunkte, die enger als ca. 200 nm nebeneinander liegen, als getrennte Bildpunkte aufzulösen. Zur Abbildung feinerer Einzelheiten sind Strahlen mit kürzeren Wellenlängen als denen des Lichtes notwendig. Die Grenzen der Lichtmikroskopie wurden 1934 mit der Entwicklung des Elektronenmikroskops überschritten. Hier arbeitet man mit Elektronenstrahlung, die eine wesentlich kürzere Wellenlänge als das sichtbare Licht aufweist. Man erreicht heute ein elektronenoptisches Auflösungsvermögen von ca. 0.3 nm. Dieser Wert übertrifft den der Lichtmikroskopie um das 1000fache. Neben dem einfachen Durchstrahlungselektronenmikroskop wird heute auch vielfach die Rasterelektronenmikroskopie eingesetzt. Mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) kann man Oberflächen dreidimensionaler Objekte untersuchen und beobachten. Der Elektronenstrahl tastet dabei die elektrisch leitende Oberfläche des Objekts Zeile für Zeile ab. Infolge des Elektronenbeschusses werden Sekundärelektronen aus der Oberfläche des Objektes emittiert, die von einem seitlich angebrachten Elektronensammelsystem aufgefangen, beschleunigt und einer Kathodenstrahlröhre zugeführt werden. Gute Einführungen in die Rasterelektronenmikroskopie finden sich bei [1, 2, 3, 4].

Die Analyse von nichtperiodischen, komplexen Makromolekülen, wie sie für die Biologie typisch sind, ist nur mit geringerer Auflösung möglich. Trotz dieser Einschränkung wurden bisher die wichtigsten Erkenntnisse über biologische

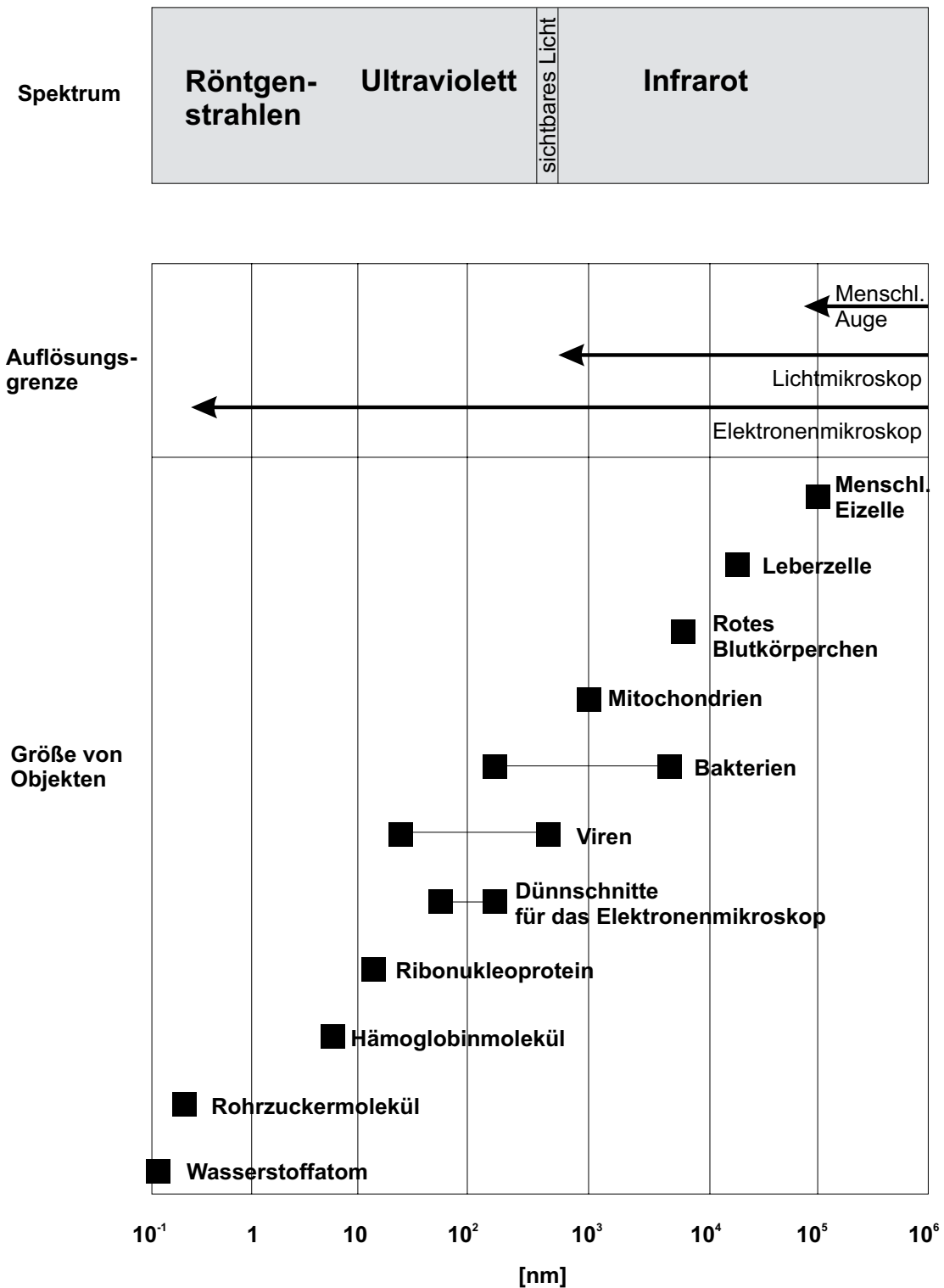


Abbildung 1: Vergleich der Auflösungsgrenze des menschlichen Auges mit dem Licht- und Elektronenmikroskop sowie vergleichende Darstellung der Größe von Atomen und Molekülen und biologischen Objekten. Nach [5], verändert.

Strukturen auf der Sub-Mikrometerskala mit Elektronenmikroskopen gewonnen. Einige Beschränkungen der EM seien erwähnt:

- Der intrinsische Kontrast biologischer Proben ist oftmals so gering, dass kontrastverstärkende Methoden wie z.B. eine Metallbeschichtung (PtC), eingesetzt wird. Selbst bei diesem sehr feinkörnigen Metallfilm werden Strukturen auf der molekularen Skala verdeckt.
- Man hat keinen direkten Zugang zu dreidimensionaler Strukturinformation. Die Höheninformation der Probe kann nur indirekt über eine Beschichtung unter einem schrägen Einfallswinkel über den Schattenwurf abgeschätzt werden.
- Nur die zweidimensionale Abbildung lässt sich gewinnen. Weitere physikalische Probeneigenschaften wie lokale Elastizität, Viskosität und Reibungseigenschaften können nicht bestimmt werden.

Für den Biologen besteht also ein großer Bedarf an einer Technik, welche höchste Auflösung auf nichtperiodischen, weichen biologischen Strukturen bietet und gleichzeitig die Beibehaltung der nativen Konfiguration während der Probenpräparation und Abbildung garantiert. Unter den verschiedenen Verfahren, welche in der Vergangenheit zur Anwendung gelangten, hat die Rastersondenmikroskopie [6] die größte Beachtung gefunden [7]. Mit ihr kann man nicht nur Proben bis in den molekularen Bereich hinein abbilden, sondern diese auch in verschiedenen Medien, wie z.B. den in der Biologie höchst bedeutsamen wässrigen Lösungen, untersuchen [8].

Die Rasterkraftmikroskopie in Flüssigkeiten steht indes vor einigen systemimmanenten Schwierigkeiten:

- Erstens wurde bisher molekulare Auflösung nur mit Makromolekülen erzielt, welche sich auf einem geeigneten Substrat als dichtgepackte, flache Strukturen mit zweidimensionaler Periodizität anordnen (für Übersichtsartikel siehe [9]). Diese Strukturen können sich aber deutlich von Nichtperiodischen, wie z.B. Biomembranen, unterscheiden. Dies liegt vermutlich an der Deformation des weichen biologischen Materials durch die Spitze des Rasterkraftmikroskops, welche auch im sog. Tapping Mode, bei dem die Spitze nur leicht gegen die Oberfläche der Probe klopft, nicht völlig verhindert werden kann.
- Zweitens stellen Membrane bei Raumtemperatur eine zweidimensionale Flüssigkeit dar, in der Diffusionsprozesse der eingelagerten Lipide und Proteine die Auflösung schmälern [10]. Ähnliches gilt für thermische Fluktuationen und Strukturänderungen bei gefalteten Makromolekülen und größeren Komplexen [11].

- Drittens kommt hinzu, dass die gezeigte atomare Auflösung im Kontaktmessbetrieb des Kraftmikroskops lediglich Aufschluss über die Potentialminima des gemittelten Spitze-Probe Wechselwirkungspotentials liefert [12, 13], d.h. es wird nur etwas über die Gitterperiodizität von Kristallstrukturen ausgesagt [14]. Im Tapping Mode wurde eine Auflösung auf atomarer Skala bisher noch gar nicht gezeigt. Für die Charakterisierung nichtperiodischer, biologischer Systeme im molekularen oder sogar atomaren Bereich ist die sog. wahre atomare Auflösung nötig, mit der die Position einzelner Atome bestimmt werden kann. Dies kann nur unter Ultrahochvakuumbedingungen und im Nichtkontaktmodus erreicht werden [15, 16, 17, 18].

Um zumindest die ersten beiden Einschränkungen zu umgehen, können die Untersuchungen bei tiefen Temperaturen durchgeführt werden. Unter Tieftemperaturbedingungen sind die strukturellen Fluktuationen der biologischen Makromoleküle signifikant unterdrückt und die Härte der Probe nimmt zu. Die erste Arbeit in dieser Richtung wurde von Prater et al. [19] publiziert, die ihr Mikroskop in einem Vakuum von ca. 5×10^{-6} Torr und bei Temperaturen von 140 K bis 200 K betrieben. Obwohl es den Autoren gelungen ist, eine Membran des Halobacterium Halobium auf der Mikrometerskala abzubilden, berichten sie über schwerwiegende Probleme mit thermischer Drift und Oberflächenkontaminationen durch Restgas in der Vakuumkammer. Ein anderer Ansatz wurde von Luo et al. [20] gewählt. Sie platzierten ein kommerziell erhältliches SFM für Umgebungsbedingungen auf einem Schwingungsisolationsystem in einem herkömmlichen Tiefkühlschrank und kühlten den gesamten Aufbau auf -25 °C. Diese Temperatur erwies sich jedoch als nicht tief genug, so dass der Anpressdruck der Spitze ein Schmelzen des Eises verursachte und dadurch die wasserhaltigen Phasen innerhalb des biologischen Materials zerstört wurden. Diese beiden Nachteile werden durch eine Konstruktion von Mou et al. [21] vermieden. Bei ihrem Aufbau befindet sich das Mikroskop direkt über der Oberfläche eines mit flüssigem Stickstoff gefüllten Kryostaten. Dadurch ist das Gerät vollständig in Stickstoffdampf gehüllt, welches die thermische Drift reduziert. Temperaturen bis hinunter zu 79 K können erreicht werden, was bei weitem für die Stabilität der Wasserphase unter der rasternden Spitze genügt. Zusätzlich wirkt die Oberfläche des flüssigen Stickstoffs als Kühlfalle und verhindert effektiv die Kontamination der Probenoberfläche. Das Gas selbst erwies sich als hochrein.

Trotz der unbestrittenen Vorzüge der Anordnung von Mou finden sich auch hier einige gravierende Nachteile: Zum einen ist die Präparation einer sauberen Probenoberfläche nahezu unmöglich. Bereits beim Einsetzen der Probe in das Gerät kann eine Kontamination nicht verhindert werden. Zum anderen verhindert die Gegenwart des Stickstoffdampfes einen Betrieb im bereits oben diskutierten Nichtkontaktmodus, der für die Rasterkraftmikroskopie die Methode mit der höchst möglichen Auflösung bietet.

In dieser Dissertation berichte ich über einen weiterführenden experimentel-

len Aufbau, der Nichtkontakt-Rasterkraftmikroskopie im Ultrahochvakuum und bei variablen Temperaturen zwischen Raumtemperatur und 60 K ermöglicht. Das Rasterkraftmikroskop wurde speziell für die Abbildung von schockgefrorenen biologischen Proben, die in situ im Vakuum präpariert werden können, konzipiert. Zusätzlich wurde ein Probentransfermechanismus entwickelt, der den Austausch der kalten Proben mit Kryo-Transmissionselektronenmikroskopen (Kryo-TEM) und Kryo- Rasterelektronenmikroskopen (Kryo-SEM) für Vergleichsmessungen erlaubt. Die Leistungsfähigkeit des Instruments demonstrierte ich anhand erster Resultate auf Graphitoberflächen und T4-Viren (Bakteriophagen).

Kapitel 1

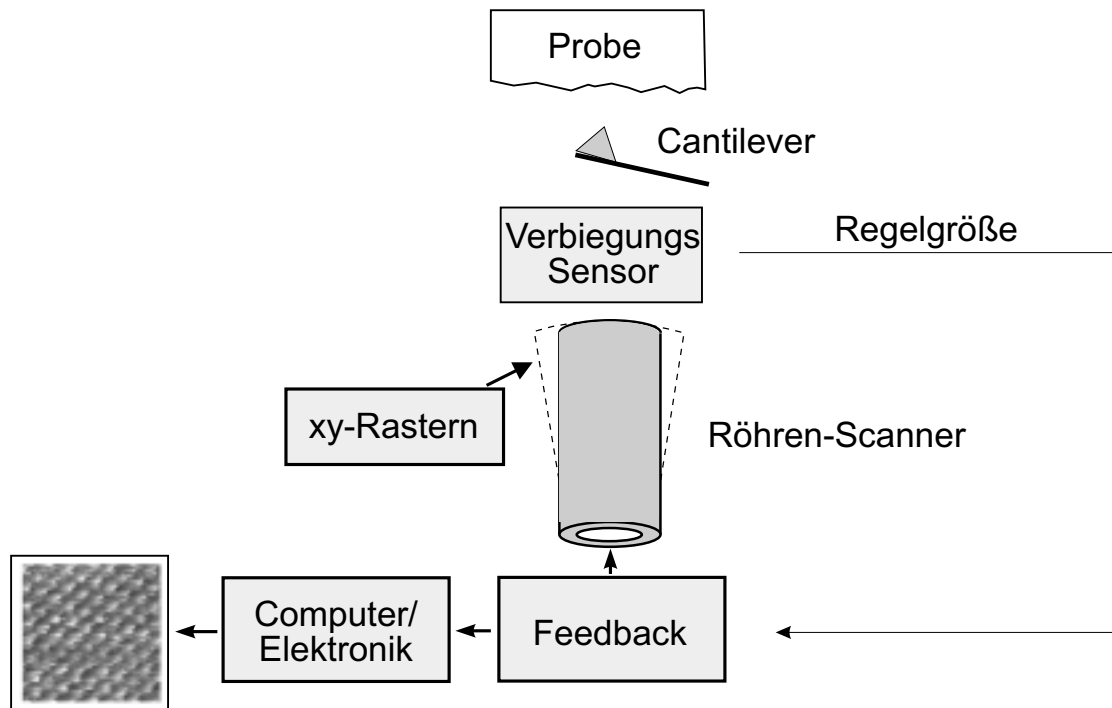
Rasterkraftmikroskopie

In diesem Kapitel wird eine Einführung in die Rasterkraftmikroskopie gegeben und die grundlegenden Betriebsarten dieser Technologie vorgestellt. Dabei werde ich mich auf die für diese Arbeit entscheidenden Techniken beschränken und eine Grundlage für das folgende Kapitel schaffen, wo detailliert der Aufbau der gesamten Messapparatur vorgestellt wird. Ich orientiere mich an Erkenntnissen, die teilweise bereits während meiner Diplomarbeit gewonnen wurden [22].

Die Rasterkraftmikroskopie wurde im Herbst '85 von G. Binnig, Chr. Gerber und C. Quate entwickelt und ergänzte die schon früher bekannte Rastertunnelmikroskopie [23] um die Fähigkeit, auch nichtleitende Proben zu charakterisieren. Die Rasterkraftmikroskopie gewinnt bei der Charakterisierung von biologischen Proben zunehmend an Bedeutung, denn neben der Möglichkeit, die reine Topographie dieser Systeme bis in den molekularen Bereich zu untersuchen, hat man mit dem Kraftmikroskop Zugang zu einer Reihe von weiteren physikalischen Kenngrößen wie zum Beispiel Elastizitäts- und/oder Reibungseigenschaften.

1.1 Prinzip der Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie basiert auf einem einfachen Funktionsprinzip, bei dem eine feine Spitze - ähnlich wie bei einem Plattenspieler - über eine Probenoberfläche gerastert wird (vgl. Abb. 1.1). Anziehende und abstoßende Kräfte dieses Spitze-Proben-Systems werden aufgezeichnet und erlauben unter anderem Rückschlüsse auf die Topographie der Probe. Es gibt heute eine Vielzahl von Betriebsarten, mit denen neben der einfachen Abbildung von Oberflächen auch magnetische und elektrostatische Kräfte sowie Reibungskräfte untersucht werden können. Insbesondere durch die komplett automatisierte Datenerfassung und Datenauswertung hat sich die Handhabung der heutigen Geräte stark vereinfacht. Das Prinzip der Rasterkraftmikroskopie beruht auf Wechselwirkungen zwischen einer feinen Sondenspitze, die an einem Federbalken angebracht ist, und einer Probenoberfläche. Nähert sich diese Sonde einer Probe, so verbiegt sie



Bildinformation

Abbildung 1.1: Prinzip der Rasterkraftmikroskopie

sich aufgrund von Anziehungskräften (Kapillar-, Adhäsions- und Van-der-Waals-Kräften) sowie von Abstoßungskräften, wie etwa Ion-Ion-Wechselwirkungen und Paulikräften. Die resultierende Verbiegung des Federbalkens lässt sich mit dem Lichtzeigerprinzip, oder auch mit dem in dieser Arbeit verwendeten interferometrischen Detektionsmechanismus, bis auf Bruchteile eines Angströms genau bestimmen.

Anhand des Schemas in Abbildung 1.2 lässt sich das Grundprinzip skizzieren. Der Laserstrahl wird über einen Strahlteiler auf die Rückseite des Federbalkens fokussiert. Das vom Federbalken und dem Spiegel reflektierte Licht wird zur Interferenz gebracht und von einer Photodiode ausgewertet. Die Periodizität des Messsignals ist mit $\lambda/2$ abhängig von der Wellenlänge des eingestrahlteten Lichtes. Begrenzt wird das Auflösungsvermögen nicht durch das Messprinzip, sondern vielmehr durch die thermische Anregung und das damit verbundene thermische Rauschen des Federbalkens. Wird die Spitze mittels eines piezoelektrischen Stellerelementes über die Probenoberfläche gerastert, so führt die auftretende Verbiegung des Federbalkens zu einer Veränderung des Interferenzsignals der Photodiode. Ein elektronischer Regelkreis gleicht diese Abweichungen aus, indem er die vertikale Auslenkung des Scanners so steuert, dass die Verbiegung des Federbalkens konstant gehalten wird. Auf diese Weise lässt sich jedem vom Piezo angefahrenen Rasterpunkt in der x - y -Ebene eine Auslenkung in z -Richtung zu-

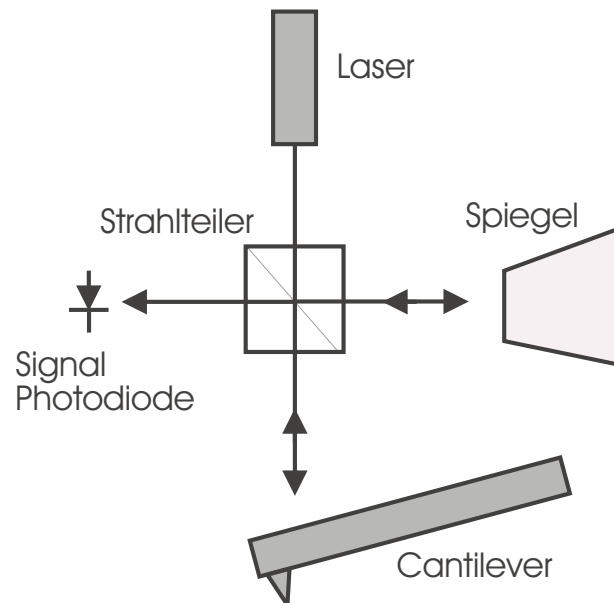


Abbildung 1.2: Rasterkraftmikroskopie mit einem interferometrischen Detektionsmechanismus

ordnen. Man erhält ein dreidimensionales Abbild der Topographie der Probe, welches farbkodiert auf dem Bildschirm dargestellt werden kann. Umfangreiche Software erlaubt schließlich eingehende Auswerteanalysen mittels Bildverarbeitung. Eine gute Übersicht der Technik der Rasterkraftmikroskopie findet sich bei [24, 25, 26].

1.2 Kraftsensoren

Bei dem Abbildungsprozess spielen die Kraftsensoren (engl. Cantilever - einseitig eingespannter Federbalken) eine zentrale Rolle. Es ist klar, dass die charakteristischen Eigenschaften der Spitze mit der die Oberfläche der Probe abgetastet wird, einen erheblichen Einfluss auf die Qualität des aufgenommenen Bildes haben. Um die Faltung der Spitzengeometrie mit der Probenoberfläche möglichst gering zu halten, werden Sensoren mit kleinem Spitzenradius und niedrigem Öffnungswinkel bevorzugt. Es gelten des weiteren zwei Anforderungskriterien an den Federbalken:

- Um eine möglichst hohe Kraftsensitivität zu erreichen (d.h. maximale Verbiegung des Federbalkens bei geringer Krafteinwirkung), ist eine niedrige Federkonstante (typischerweise im Bereich von 0.01 ... 100 N/m) erwünscht. Die Auflagekraft berechnet sich im Idealfall nach dem Hooke'schen Gesetz $F = k \times \Delta z$, wobei k die Federkonstante und Δz die Verbiegung des Balkens bedeutet. Je geringer die Auflagekraft (typischerweise < 100 nN) ist,

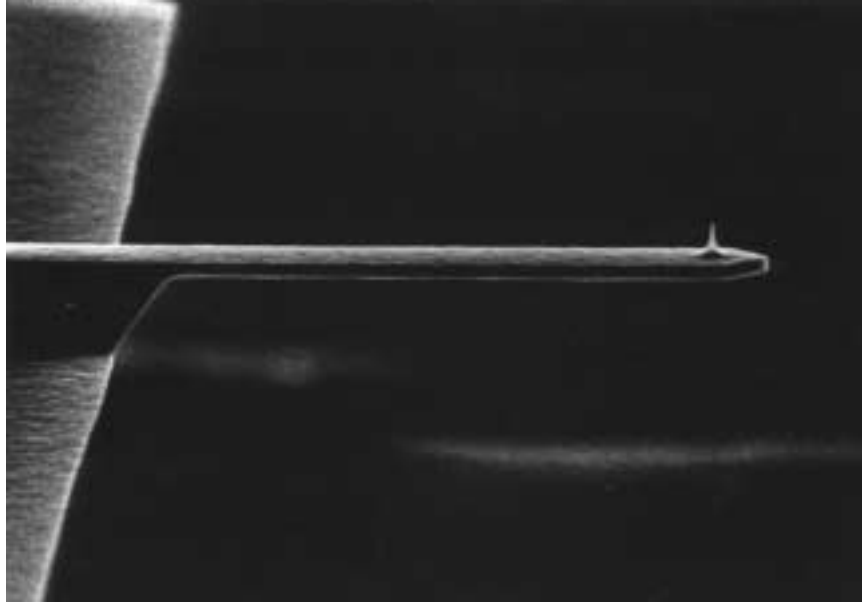


Abbildung 1.3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Silizium-Spitze mit dem Federbalken, befestigt an der Vorderseite des Trägersubstrats. Abbildung entnommen aus [42].

desto weniger strukturzerstörend ist der Abbildungsprozess.

- Gleichzeitig darf die Masse des Federbalkens einige μg nicht überschreiten, um nicht störanfällig gegenüber einkoppelnden externen Schwingungen zu werden. D.h., die Resonanzfrequenz des Federbalkens sollte mindestens einige kHz betragen.

Wenn man sich den Zusammenhang zwischen Federkonstante und Resonanzfrequenz $\omega = \sqrt{\frac{k}{m}}$ klarmacht, wird ersichtlich, dass sich diese beiden Forderungen nur kombinieren lassen, indem man den Federbalken in einem Mikrofabrikationsprozess herstellt. Mithilfe der modernen Halbleitertechnologie ist man mittlerweile in der Lage, Federbalken mit integrierter Spitze aus Si oder Si_3N_4 in einem Ätzprozess herzustellen. Die Maße dieser Federbalken betragen je nach Typ einige μm Dicke und besitzen eine Länge von mehreren $100 \mu\text{m}$ bei einer Breite von einigen $10 \mu\text{m}$. Die integrierte Spitze ist üblicherweise $5\text{-}20 \mu\text{m}$ lang (siehe Abb. 1.3).

1.3 Kraft-Distanz-Kurven

In sogenannten Kraft-Distanz-Kurven wird die Abhängigkeit der gemessenen Kräfte von dem Abstand zwischen Spitze und Probe aufgezeichnet. Untersuchungen, welche sich mit dieser Distanzabhängigkeit experimentell und theo-

retisch befassen, heißen Kraftspektroskopie. Abbildung 1.4 zeigt eine typische Kraft-Distanz-Kurve, wie sie bei Messungen unter Umgebungsbedingungen entsteht. Dargestellt ist die Verbiegung des Cantilevers (Ordinate) als Funktion der z -Auslenkung des Piezoscanners (Abszisse). Eine solche Kurve wird aufgenommen, indem der Piezo vollständig zurückgezogen wird, so dass die Spitze von der Oberfläche springt (Ausgangsstellung). Danach wird der Scanner wieder maximal ausgelenkt, während dessen das Rastern in der x - y -Ebene unterbleibt. Dieser Vorgang wird zyklisch permanent wiederholt, so dass zeitliche Veränderungen der lokal herrschenden Kräfte erfasst werden können. Jede Kraft-Distanz-Kurve lässt sich durch sechs Bereiche charakterisieren:

1. Bereich, in dem der Federbalken frei über der Probe schwebt. Der Einfluss von Anziehungskräften führt noch zu keiner oder nur einer geringen detektierbaren Verbiegung des Federbalkens.
2. Einspringpunkt in die Probe. Der Kraftgradient der langreichweitigen Kräfte übersteigt die Federkonstante des Federbalkens: Die Spitze wird nach unten gebogen und springt auf die Probe nach Punkt 3.
3. Spitze ist in Kontakt mit der Probenoberfläche. Wird die Auflagekraft erhöht, so verbiegt sich der Federbalken entsprechend dem Hooke'schen Gesetz linear in Richtung Punkt 4. Die wirkende Normalkraft lässt sich aus dem Quotienten von Federkonstante und Steigung der Geraden ermitteln.
4. Punkt mit der höchsten einstellbaren Auflagekraft. Von hier ab erfolgt ein Zurückfahren des Scanners in Richtung Punkt 5.
5. Bei Messungen an Luft befindet sich auf jeder Probenoberfläche ein dünner Wasserfilm. Taucht die Spitze in diesen ein, so bildet sich ein Meniskus aus, der die Spitze über den Einspringpunkt hinaus festhält. Erst wenn die Rückstellkräfte groß genug werden, um diese Adhäsionskräfte zu überwinden, verlässt die Spitze die Oberfläche (Abrisspunkt).
6. Ende des Kreislaufs, die Spitze hat sich gelöst. Der Abstand bis zum Abrisspunkt ist ein Maß für die Größe der wirkenden Adhäsionskräfte.

Die Aufnahme von Kraft-Distanz-Kurven dient verschiedenen Zwecken. Unter anderem lässt sich mit ihrer Hilfe vor Beginn der eigentlichen Messung die gewünschte Auflagekraft bestimmen. Dadurch ist es möglich, die Abbildungseigenschaften einer Probe in Abhängigkeit von diesem Parameter zu untersuchen. Im Falle von Kontaktmessungen spielt die Auflagekraft insbesondere bei der Charakterisierung biologischer Proben eine entscheidende Rolle. Zu hohe Auflagekräfte zerstören die empfindliche Probenstruktur, darüber hinaus wird die Spitze stärker beansprucht, und eine stumpfe Spitze bedeutet immer auch eine Abnahme des Auflösungsvermögens.

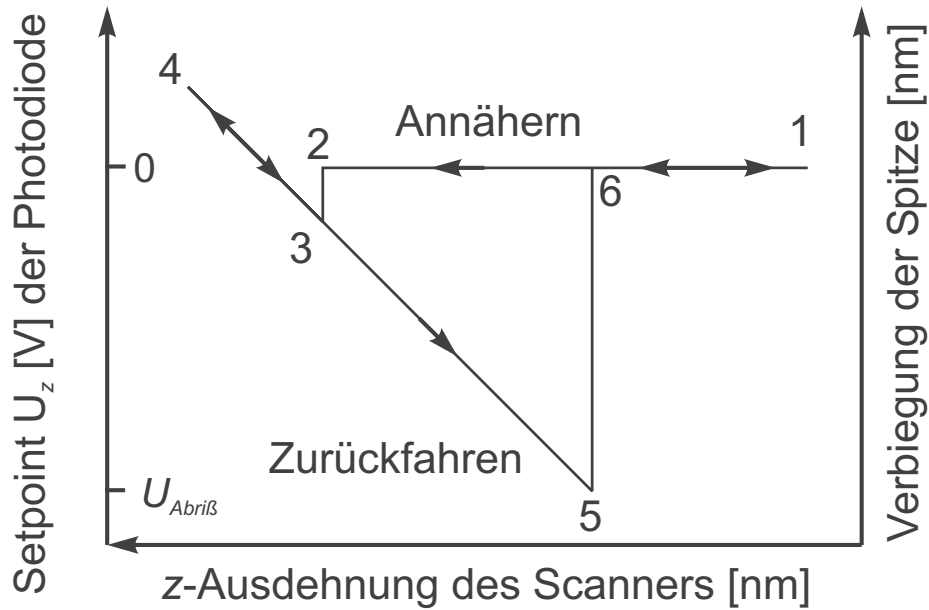


Abbildung 1.4: Schema einer Kraft-Distanz-Kurve mit sechs charakteristischen Bereichen. Abbildung entnommen aus [22].

1.4 Betriebsarten der Rasterkraftmikroskopie

Das Rasterkraftmikroskop kann in verschiedenen Betriebsarten eingesetzt werden, so dass Proben der unterschiedlichsten Art abgebildet werden können. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen Kontakt- und Nichtkontakt-Betriebsmodi, je nachdem ob die Spitze die Probe berührt, oder ob sie in einem Abstand von einigen Nanometern über die Probe gerastert wird. In der Kontaktkraftmikroskopie wird der Abbildungsmechanismus durch laterale Kräfte dominiert, und die beobachtete atomare Auflösung wird durch die Minima des Spitze-Probe-Wechselwirkungspotentials bestimmt. Die Maxima dieser Bilder auf der atomaren Skala entsprechen dadurch bedingt nicht den wahren Atompositionen. Außerdem wird im Kontakt mit der Probe die Spitze und die Oberfläche durch elastische Deformation so verändert, dass einige hundert Atome zur Kontaktfläche beitragen, was die Abbildung von Punktdefekten auf der Oberfläche oder auch die Charakterisierung von nicht periodischen Strukturen verhindert. Die beobachteten Oberflächen im Kontaktmodus spiegeln vielmehr die Periodizität und Symmetrie der Potentialminima der geordneten Oberfläche wieder [13, 14]. Es wird nur die Einheitszelle aufgelöst [27, 28]. Durch diese Überlegungen wird klar, dass die Auflösungsbegrenzung durch den direkten Kontakt mit der Oberfläche verursacht wird. Nur indem man den Abstand zwischen Probe und Spitze erhöht und sicher stellt, dass die Spitze nicht deformiert wird, kann man wahre atomare Auflösung erreichen. Da im Abstand von einigen Angström (ideale Abbildungsbedingung) über der Probe die attraktiven van-der-Waals-Kräfte die

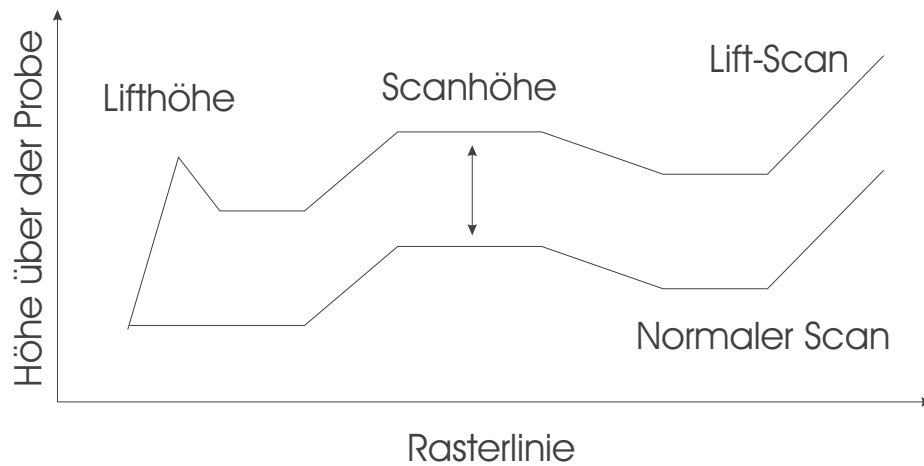


Abbildung 1.5: Prinzip des Lift-Modus, die Parameter Lifthöhe und Rasterhöhe sind frei wählbar. Abbildung entnommen aus [22].

Rückstellkraft des Federbalkens dominieren würden und die Spitze auf die Probe ziehen, lässt man im Fall der Nichtkontaktkraftmikroskopie den Federbalken oszillieren und vermeidet dadurch ein unerwünschtes Einspringen in die Oberfläche.

1.4.1 Kontaktkraftmikroskopie

In der Rasterkraftmikroskopie wird der Konstantkraftmodus am häufigsten eingesetzt. Spitze und Probe sind hier beim Abrastern der Probenoberfläche in Kontakt. Die Verbiegung des Federbalkens und damit die Auflagekraft der Spitze (vgl. Abb. 1.1) wird durch einen Regelkreis, der an den Röhrenpiezo gekoppelt ist, konstant gehalten. Das Signal an der Photodiode wird ständig mit einem vorgegebenen Sollwert (engl. Setpoint) verglichen und aufgezeichnet.

Eine weitere Messmethode, welche zu den Kontaktbetriebsarten zählt, ist die Reibungskraftmikroskopie [29]. Auch hier wird die Spitze mit einer konstanten Auflagekraft über die Probe gerastert, nur wird die Richtung um 90° gedreht (d.h. es wird jetzt senkrecht zum Federbalken gerastert). Durch den Reibungskontakt angreifende Kräfte führen zu einer Torsion des Federbalkens. Diese Verdrillung des Federbalkens kann gleichzeitig mit der vertikalen Verbiegung des Federbalkens (Topographiesignal) aufgezeichnet werden.

Kennzeichnend für den Lift-Modus (siehe Abb. 1.5) ist, dass jede Linie viermal gerastert wird. Zuerst wird wie bei den anderen Betriebsmodi die Topographie der Probenoberfläche aufgezeichnet (Hin- und Rückscan). Dann wird die Spitze um einen vorgegebenen Wert (Lifthöhe) von der Probe zurückgezogen. Diese Sprunghöhe darf nicht zu klein sein, da starke Adhäsionskräfte die Spitze auf der Probe festhalten. Danach wird die Spitze wieder etwas angenähert (auf die vorgesehene Scanhöhe) und die Linie wird zum zweitenmal aufgenommen (Hin- und Rückscan). Die Spitze fährt dabei in einem definierten Abstand

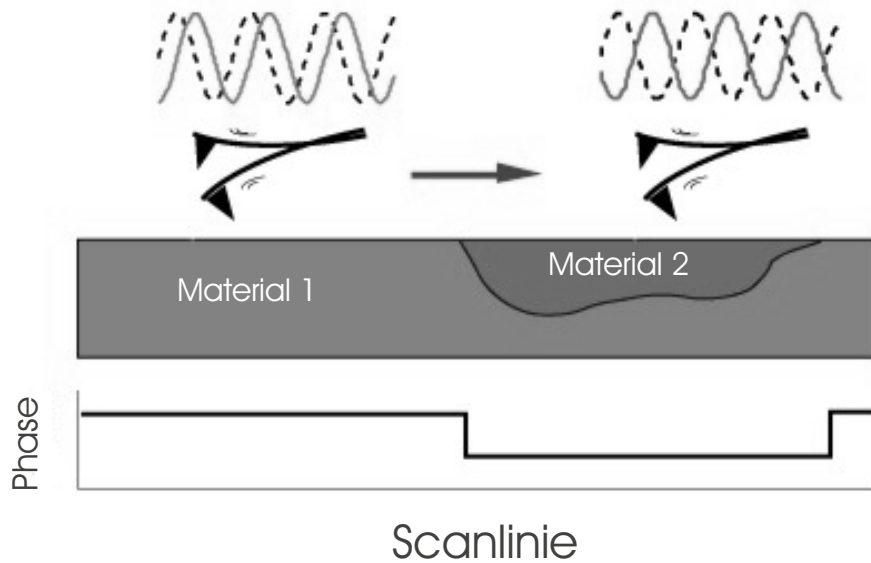


Abbildung 1.6: Prinzip des Tapping-Modus. Gezeigt wird die Anregungsamplitude des frei schwingenden Cantilevers und die phasenverschobene Reaktion des gedämpften Cantilevers auf verschiedenen Probenmaterialien. Das Phasenbild lässt Rückschlüsse auf die Elastizität der Probenoberfläche zu. Abbildung entnommen aus [34].

über der Probe die Topographie des ersten Scans ab. Während dieses zweiten Scans bleibt der elektronische Regelkreis ausgeschaltet. Durch diese Trennung der Spitze von der Oberfläche werden nur die langreichweitigen Van-der-Waals-Kräfte sowie elektrostatische [30, 31] und magnetische [32, 33] Dipolkräfte aufgezeichnet. Da der Lift-Scan der Topographie folgt, kommen Oberflächeneffekte nicht zum Tragen.

Zu den Kontaktbetriebsarten wird auch der Tappingmodus gezählt, der entwickelt wurde, um die Interaktionskräfte von Spitze und Probe zu minimieren. Hierbei wird der Federbalken zu Schwingungen im kHz-Bereich angeregt, wobei die Spitze am tiefsten Punkt der Oszillation die Probe nur leicht berührt (engl. berühren - to tap). Diese Methode führt zu einem ähnlichen Auflösungsvermögen wie der statische Kontaktmessbetrieb, nur daß hierbei die auf die Probe wirkenden Scherkräfte ausgeschlossen werden. Er wird vorwiegend bei Messungen unter Umgebungsbedingungen eingesetzt, speziell bei weichen Proben oder Proben, die nicht fest auf dem unterliegenden Substrat befestigt werden können. Der Tappingmodus liefert neben der reinen Topographieinformation durch die gleichzeitig aufgezeichnete Phaseninformation (vgl. Abb. 1.6) auch mechanische Eigenschaften der Probe wie Elastizität oder Viskosität.

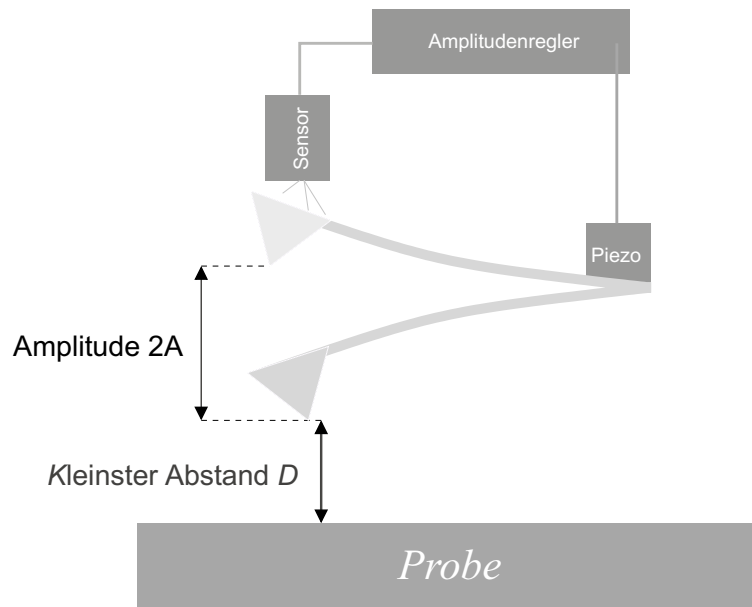


Abbildung 1.7: Prinzip des Nichtkontaktmessbetriebs.

1.4.2 Nichtkontaktkraftmikroskopie

Bei diesem Verfahren wird der Federbalken durch einen Piezokristall in eine harmonische Schwingung mit seiner Resonanzfrequenz versetzt (dynamische Rasterkraftmikroskopie, vgl. Abb. 1.7). Durch die Oszillation im Abstand von einigen Nanometern über der Probe ist die Kraftwechselwirkung mit der Oberfläche deutlich geringer als in der Kontaktkraftmikroskopie (statische Rasterkraftmikroskopie). Die Vorteile für die Abbildung biologischer Strukturen liegen auf der Hand. So wird eine Deformation der empfindlichen Probe, die im Kontaktbetrieb insbesondere durch Lateralkräfte hervorgerufen wird, vermieden. Die Spitze bleibt kontaminationsfrei, was ihrer Lebensdauer und ihren Abbildungseigenschaften zugute kommt. Nähert man die Spitze an die Probe an, so ändern die auftretenden Kräfte das Schwingverhalten des Federbalkens bezüglich Amplitude, Frequenz und Phasenlage relativ zum frei schwingenden Federbalken. Durch unsere Elektronik wird die Amplitude der Schwingung (ca. ± 10 nm) konstant gehalten (Amplitudenregelkreis), als Regelgröße dient die Frequenzverschiebung Δf . Aufgrund der hohen Sensitivität dieser Messmethode wurde wahre atomare Auflösung unter UHV Bedingungen auf verschiedensten Materialien erzielt, erstmals von Giessibl [15] auf Si(111)-(7 \times 7). Neben Ergebnissen auf Halbleitern [35, 36] konnten auch Ionenkristalle [37, 38], Oxide [39] und Edelgase [40] mit atomarer Auflösung abgebildet werden.

Betrachtet man das Wechselwirkungspotential zwischen Spitze und Probe, so wird dieses in größerem Abstand von der Probe durch die langreichweitigen Kräfte dominiert. Die Spitze bewegt sich in einem parabolischen Potential und die

Oszillation ist harmonisch. Nähert man die Spitze weiter an, so sorgt die attraktive Van-der-Waals-Kraft für eine Absenkung der Resonanzfrequenz. Dicht über der Probe kommen dann die Pauli-Abstoßungskräfte zum Tragen, die durch die Coulomb-Wechselwirkung der Ionenrümpfe entsteht. Dieser Effekt kann durch ein effektives Potential dargestellt werden, der sich aus der Summe des parabolischen Potentials und dem Spitze-Probe-Wechselwirkungspotential zusammensetzt. Dieses effektive Potential unterscheidet sich von dem ursprünglichen durch eine asymmetrische Form, im Gegensatz zu dem symmetrischen Parabelpotential des ungestörten Federbalkens. Daraus ergibt sich eine nicht-harmonische Schwingung des Federbalkens, bei dem die Resonanzfrequenz stark von der Oszillationsamplitude abhängt. Da das effektive Potential auch stark von dem Abstand zwischen Spitze und Probe bestimmt ist, wird die Frequenzverschiebung von beiden Parametern beeinflusst.

Für Nichtkontaktmessungen ist eine Vakuumumgebung zwingend notwendig. Der minimal zu detektierende Kraftgradient hängt entscheidend von der Temperatur und der Güte des Schwingers ab [41]. Erst ab einem Vakuum von ca. 10^{-3} mbar wird die Dämpfung der Schwingung durch Restgasmoleküle so gering, dass Güten von $Q > 10^4$ erreicht werden können ($Q = \frac{f_{res}}{B}$). Eine genaue Diskussion der wirkenden Kräfte und Berechnungen der Frequenzverschiebung im Nichtkontaktmodus finden sich bei [42, 43, 44].

Kapitel 2

Experimenteller Aufbau

In diesem Kapitel wird ausführlich das aufgebaute Rasterkraftmikroskop inklusive Vakuumsystem und Ansteuerelektronik beschrieben. Das Mikroskop selbst wurde nach meinen Bauplänen in der feinmechanischen Werkstatt hergestellt und von mir zusammengesetzt. Die Vakuumkammer, in der die Analysen stattfinden, wurde von mir entwickelt und bei der Firma Omicron zur Fertigung in Auftrag gegeben. Wie bereits in der Einleitung angedeutet, ist für die Abbildung biologischer Proben eine aufwendige Probenpräparation notwendig. Die Präparationskammer und der Probentransfer stammen von der Firma Bal-Tec aus Liechtenstein. Das Mikroskop selbst ist auf einem kommerziell erhältlichen Schwingungsdämpfungssystem [45] montiert und befindet sich in der UHV-Kammer. Das Vakuumsystem (vgl. Abb. 2.1) besteht aus einer Präparationskammer, in der bei tiefen Temperaturen Gefrierbrüche durchgeführt werden können, einer Analysekammer, in der sich das Mikroskop befindet, und einer Luftscheule. Während die Probe auf einem mit LN_2 (flüssiger Stickstoff) gekühlten Tisch festgeklemmt sitzt, kann eine saubere Oberfläche durch einen In-situ-Gefrierbruch erzeugt werden. Nach dem Gefrierbruch kann die Probe in das Kryo-SFM eingesetzt werden oder mit einem Kryo-SEM oder Kryo-TEM ausgetauscht werden, ohne die Kühlkette zu unterbrechen. Dieses Kapitel ist wie folgt in drei Teile gegliedert:

- Zunächst wird das neu konzipierte Kryo-Rasterkraftmikroskop mit seinen wichtigsten Komponenten vorgestellt.
- Der zweite Teil beinhaltet das Vakuumsystem und die von der Firma Bal-Tec, Liechtenstein, entwickelte Probenpräparationsstation.
- Der dritte Teil ist der Elektronik gewidmet, insbesondere werden die wichtigsten Regelkreise für den Nichtkontaktmodus beschrieben.

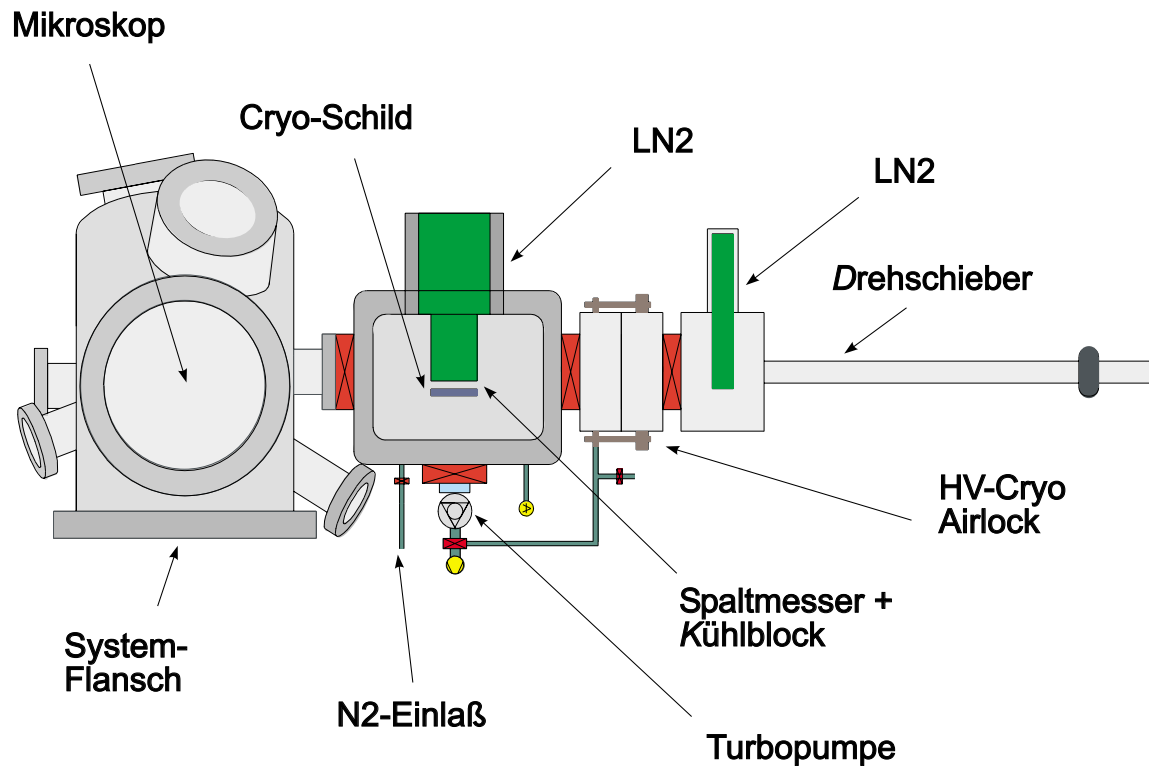


Abbildung 2.1: Schemaskizze des gesamten Messaufbaus; links im Bild befindet sich die Analysechamber, in der das Rasterkraftmikroskop untergebracht ist; in der Mitte die Präparationschamber, in der In-situ-Gefrierbrüche und Gefrietrocknen der biologischen Proben vorgenommen werden, und rechts der Drehschiebemanipulator, der dem Spitzen- und Probenwechsel dient.

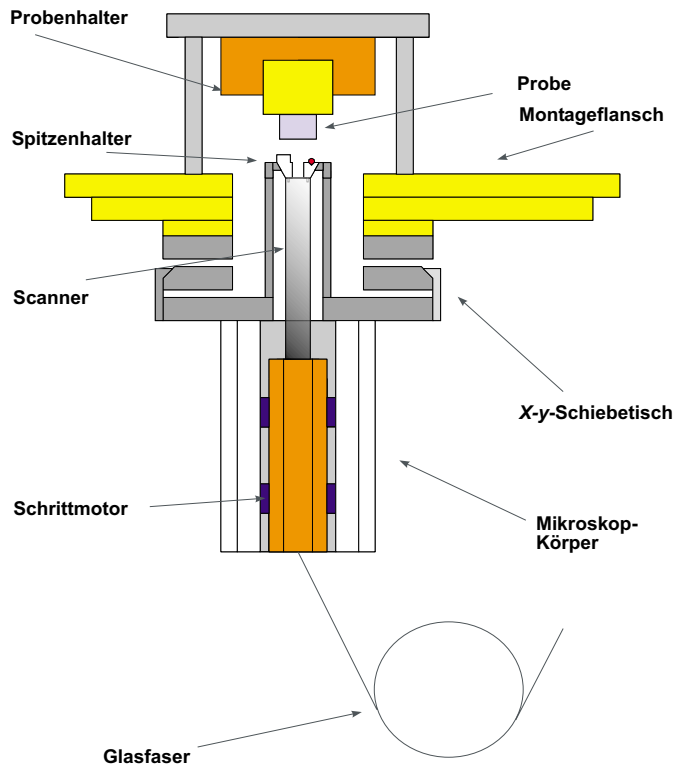


Abbildung 2.2: Schematische Zeichnung des Rasterkraftmikroskops, in der alle funktionellen Einheiten des Gerätes dargestellt sind.

2.1 Mikroskop

In Abbildung 2.2 wird eine Übersicht der wichtigsten funktionellen Einheiten des Rasterkraftmikroskops gezeigt. Die Probe wird für die Messung an einem Probenhalter aus CuBe befestigt, der über vergoldete Kupferkabel mit einem Flusskryostaten verbunden ist. Mit LN_2 als Kryogen erreicht man eine tiefste Temperatur von ca. 120 K; bei einer Kühlung mit flüssigem Helium liegt die Minimaltemperatur bei ca. 60 K. Da die Probe, um eine gute Kühlankopplung zu gewährleisten, direkt mit dem Flusskryostaten verbunden ist, wird konsequenterweise die Spitze, die sich am Ende eines Piezostapels befindet, mit einem maximalen Bereich von $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ gerastert. Bedingt durch dieses Design wird auch das Detektionssystem mitgerastert. Ich habe mich hier für ein interferometrisches System entschieden, da es sehr leicht und kompakt aufzubauen ist und zudem die Verbiegung des Federbalkens zuverlässig im Sub-Angströmbereich misst.

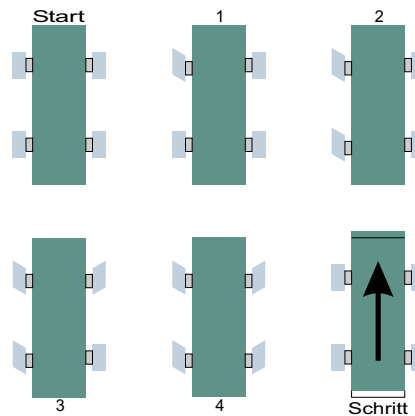
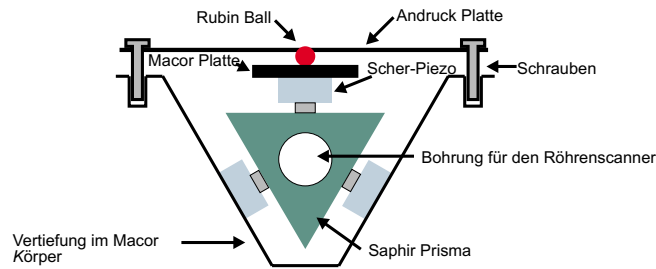


Abbildung 2.3: Prinzipskizze des auf dem Walker-Prinzip basierenden Schrittmotors

2.1.1 Schrittmotor zur Annäherung des Cantilevers an die Probenoberfläche

Abbildung 2.3 zeigt das Design des Schrittmotors, der nach dem Walker-Prinzip [46] arbeitet. Er ist in einem Körper aus Macor [47] aufgebaut, welches als Glaskeramik für seine hohe mechanische Stabilität bekannt ist, sorgt für die Grobannäherung des Cantilevers an die Probe und kann mit einem maximalen Stellweg von ca. 30 mm sowohl manuell als auch von der Steuerungssoftware des Messrechners angesprochen werden. Ein Saphirschlitten [48] wird durch die geeignete Ansteuerung von sechs aus Scherpiezos bestehenden Piezostapeln bewegt. Dabei werden die Piezos nacheinander durch das Anlegen einer Spannung ausgelenkt und dann gemeinsam relaxiert, wobei der Schlitten mitgenommen wird. Unsere Elektronik realisiert eine Schrittfrequenz von 50 Hz bei einer Schrittweite von ca. 300 nm. Die Vorteile dieses Motors gegenüber auf dem Trägheitsprinzip basierenden Motoren sind seine Zuverlässigkeit, insbesondere im Ultrahochvakuum und bei tiefen Temperaturen, sowie seine exzellente Stabilität, welche durch den relativ großen, von der oberen Andruckplatte ausgeübten Druck bewirkt wird.

2.1.2 x - y -Verschiebetisch

Ein x - y -Verschiebetisch ermöglicht die beliebige Positionierung der Spitze in einem Bereich von ca. 10 mm \times 10 mm. Dadurch ist man in der Lage, mehrere auf einem Probenhalter untergebrachte Proben simultan zu untersuchen, was zu größerer Messeffizienz führt. Auch diese Translationsbewegung wird durch jeweils drei Piezostapel für die x - bzw. y -Richtung realisiert; zwei Führungsschienen verhindern dabei ein Verkanten bei der Bewegung. Die Ansteuerung des Stelltisches erfolgt über eine Elektronik, welche baugleich zu der im vorigen Unterkapitel beschriebenen ist. Für den nötigen Andruck der Piezostapel und damit für die nötige Stabilität sorgen dabei im Gegensatz zum z -Stellmotor starke Kobalt-Samarium-Magnete [49].

2.1.3 Detektionssystem

Da, wie oben beschrieben, aus Gründen der Kälteankopplung die Probe stationär gehalten wird, muss der Cantilever und damit auch das Detektionssystem gerastert werden. Um die zu bewegende Masse des Detektionssystems möglichst klein zu halten, habe ich mich für ein Verfahren entschieden, welches auf einem Glasfaserinterferometer beruht (vgl. Abb. 2.4). Dieses bietet den Vorteil, dass nur das Faserende mitbewegt werden muss, und der Scanner daher sehr kompakt und damit stabil gebaut werden kann. Dabei wird das Licht einer Laserdiode [50] ($\lambda = 780$ nm, $P_0 = 40$ mW) durch einen nachgeschalteten Faraday-Isolator [51] (verhindert Rückstreuung des Lichtes) in eine Glasfaser eingekoppelt. Der Strahl wird sodann in einem 2×2 -Koppler [52] in einen Referenzarm und einen Messarm aufgeteilt. Am Austrittsspalt des Messarms wird ca. 4 % des Laserlichts direkt am Faserende reflektiert und interferiert mit dem Licht, welches von der Rückseite des Cantilevers zurückgeworfen wird. Das entstehende Interferenzsignal wird außerhalb der UHV-Kammer mit Hilfe einer Photodiode [53] erfasst und ermöglicht abstandssensitive Messungen im Sub-Angströmbereich [54].

2.1.4 Rastereinheit

Der Scanner (vgl. Abb. 2.5), mit dem das Abrastern der Probe realisiert wird, ist nicht nur das eigentliche Herz des Mikroskops, sondern auch sein baulich wohl kompliziertestes Teil. Der Grund dafür besteht darin, dass er nicht nur die Rasterung sowohl des Cantilevers als auch des Auslenkungssensors bei kleinsten Eigenabmessungen gewährleisten muss, sondern auch robust genug sein muss, um einen In-situ-Austausch des Cantilevers mit einem UHV-Manipulator vornehmen zu können. Aus diesem Grund soll er im Folgenden etwas genauer beschrieben werden.

Grundsätzlich besteht der Scanner aus zwei konzentrisch aufgebauten Piezoröhren [55], deren innere bei einem Außendurchmesser von 3,2 mm und einer

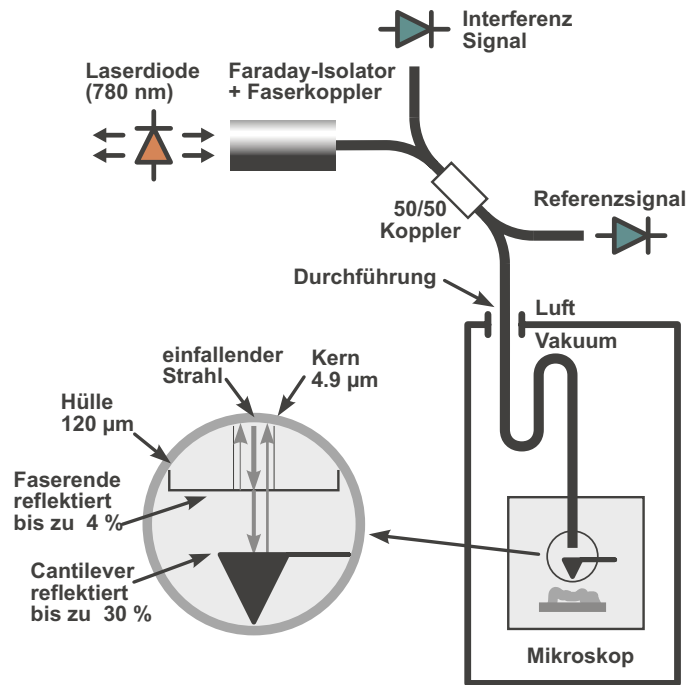


Abbildung 2.4: Detektionsmechanismus basierend auf einem Glasfaserinterferometer. Abbildung entnommen aus [43].

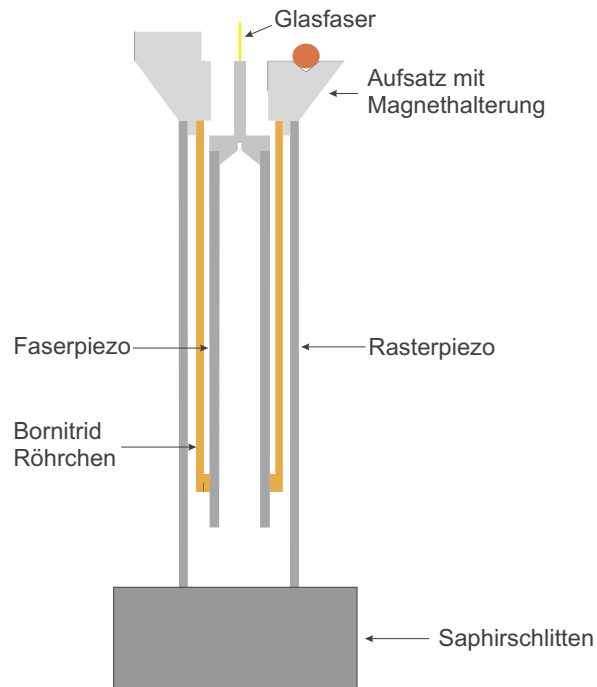


Abbildung 2.5: Schnittzeichnung durch die Rastereinheit, die aus zwei konzentrischen Piezoröhren aufgebaut ist und an deren oberem Ende die Spitzenhalter magnetisch befestigt werden.

Wandstärke von 0,5 mm das Faserende des Glasfaserinterferometers hält. Die äußere Piezoröhre weist bei gleicher Wandstärke einen Außendurchmesser von 6,25 mm auf und ist für die Rasterung der Spitze über die Oberfläche mit einem maximalen Bildbereich von $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ verantwortlich. Zwischen beiden Piezoröhren befindet sich noch ein drittes Röhrchen aus Bornitrid [56], welches das innere Piezoröhrchen hält. Da die ineinander liegenden Röhrchen teilweise über mehrere Zentimeter Länge nur einen Abstand von 0,3 mm aufweisen, ist höchste Präzision beim Verkleben als auch beim Verlöten der elektrischen Ansteuerungskontakte gefragt. Am oberen Ende des äußeren Piezoröhrchens befindet sich schließlich ein Aufsatz, auf dem magnetisch die Spitzenhalter befestigt werden. Einer der Besonderheiten dieses Mechanismus ist es beispielweise, dass während des Cantileverwechsels mit dem UHV-Manipulator der Scanner durch einen extern angebrachten Halter stabilisiert werden kann, um größere Lateralkräfte zu vermeiden, welche eventuell zu einem Abbrechen des äußeren Piezoröhrchens führen könnten.

2.1.5 Proben- und Spitzenwechselmechanismus

Der Proben- und Spitzenwechselmechanismus spielt bei der Gesamtkonzeption der Anlage eine zentrale Rolle. So muss gewährleistet werden, dass Probe und Spitze unabhängig voneinander ausgetauscht werden können. Befindet sich eine Probe im Mikroskop, sollte es möglich sein, die Spitze zu wechseln, ohne die Probe zu entfernen, damit dieselbe Probe mit verschiedenen Spitzen abgebildet werden kann. Außerdem verzichtet mein Verfahren auf einen zusätzlichen Wobblestick¹, mit dem üblicherweise so ein Wechsel vorgenommen wird. Vielmehr benutze ich für den Austausch der Spitze als auch für die Probe den bereits beschriebenen Drehschiebemanipulator.

Um mit den Kryo-REM der Firma Beiersdorf kompatibel zu sein, verwende ich ein Prinzip, das in der Elektronenmikroskopie routinemäßig eingesetzt wird. Der Probenstisch wird an die Spitze des Manipulators aufgesteckt und durch eine Drehbewegung um 90° auf dem Stab arretiert. Fährt man den Halter in die Probenaufnahme, so kann man die Probe dort durch gegenläufiges Drehen am Manipulator absetzen. Starke Federn drücken den Probenhalter kräftig gegen die Aufnahme, so dass ein hoher Anpressdruck entsteht, der für eine optimale Probenkühlung sorgt.

Wechselt man die Spitze, benutzt man im Prinzip dasselbe Verfahren; es gilt jedoch, einige Besonderheiten zu beachten. Abbildung 2.6 zeigt einen Spitzenwechselvorgang, bei dem eine Probe (links im Bild) in der Halterung sitzt (nicht eingezeichnet). Zusätzlich zu einem Probenhalter ist an den Transferklotz ein Aufsatz montiert, der über einen Federmechanismus einen Spitzenhalter klemmt.

¹Dies ist ein Bewegungsstab mit einem Pinzettengreifer an seinem Ende. Man kann mit ihm von außerhalb der UHV-Kammer Manipulationen innerhalb des Vakuumsystems durchführen.

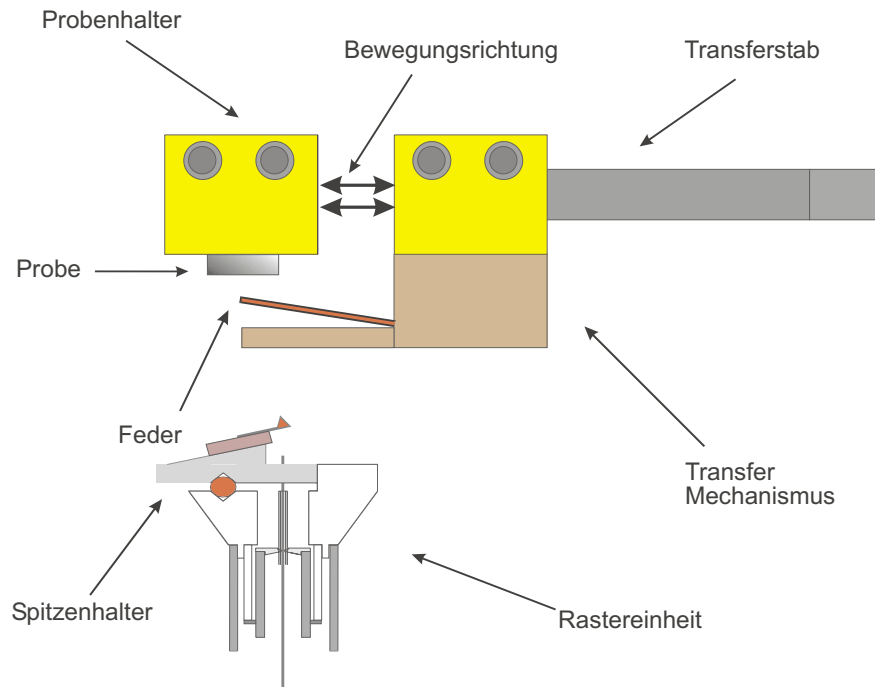


Abbildung 2.6: Schemaskizze des Proben- und Spitzenwechselmechanismus.

Diese Feder kann wiederum über eine Drehbewegung gelöst oder gespannt werden. Man verfährt den gesamten Aufbau über die Rastereinheit und entspannt die Feder. Nun kann man durch die Bewegung der Rastereinheit mittels des Schrittmotors und des x - y -Schiebetisches die Spitze in dieser Halterung ablegen. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass man nur durch die ferngesteuerte Bewegung der Rastereinheit diesen Wechsel vollziehen kann, so dass keine Gefahr besteht, durch eine unsachgemäße Handhabung des Drehschiebemanipulators die empfindliche Rastereinheit zu beschädigen. Über zwei CCD-Kameras, die aus verschiedenen Winkeln den Wechsel auch optisch beobachten, lässt sich die Spitze punktgenau positionieren.

2.2 Vakuumsystem

2.2.1 Transfersystem

Das System, mit dem der Kryotransfer der Proben realisiert wird, wurde von der Bal-Tec AG, Liechtenstein, in enger Zusammenarbeit mit Dr. Wepf (Beiersdorf AG, Hamburg) entwickelt. Es leistet den Probenaustausch zwischen der Präparationskammer, dem Rasterkraftmikroskop oder auch dem Rasterelektronenmikroskop am Standort Zentralanalytik der Firma Beierdorf in Hamburg. Die Anforderungen an ein Kryotransfersystem für den Austausch biologischer Pro-

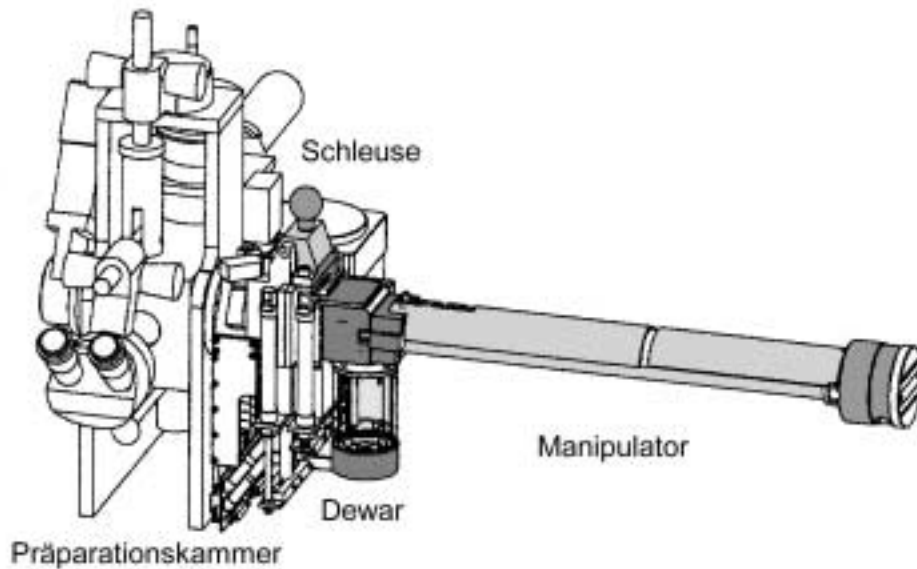


Abbildung 2.7: Übersichtsskizze von Präparationskammer, Schleuse und Drehschiebemanipulator. Abbildung entnommen aus [57].

ben sind sehr hoch. Einerseits darf die Kühlkette von der Probenpräparation (im einfachsten Fall dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff) bis zur Charakterisierung mit dem Rasterkraftmikroskop zu keinem Zeitpunkt unterbrochen werden, um die Rekristallisation des eingefrorenen Wassers (amorpher Zustand) und die damit verbundene Strukturzerstörung zu verhindern. Andererseits muss die Probenoberfläche kontaminationsfrei bleiben. Adsorbate, bestehend aus Restgasen (Kohlenstoff, Wasserstoff, etc.), wirken informationslimitierend bei der Analyse. Das entwickelte Kryotransfersystem leistet diesen beiden Anforderungen genüge. Proben werden bei tiefen Temperaturen ($< 150\text{ °C}$) und unter Vakuumbedingungen ($< 10^{-6}\text{ mbar}$) mit Hilfe eines Drehschiebemanipulators (siehe Abb. 2.7) ausgetauscht. Die Probe wird am Ende des magnetisch gekoppelten Drehschiebemanipulators befestigt und kann bis zu 290 mm axial bewegt werden. Diese Weglänge reicht bei weitem für einen Transfer in die Präparations- als auch in die Analysechamber aus. Das Shuttle inklusive Manipulator kann für den Probentransfer über pneumatisch betriebene hochwertige VAT-Ventile (Leckrate $< 10^{-9}\text{ mbar/s}$) komfortabel und vollautomatisch an die Präparationskammer als auch an das Rasterelektronenmikroskop angedockt werden. Ein in das Shuttle integrierter Stickstoffbehälter mit einer Standzeit bis zu 30 min hält die Probe auf einer Temperatur von unter 150 °C und dient gleichzeitig als Kühlfalle und Kontaminationsschutz.

Mit einem Gewicht von nur 4 kg und der langen Standzeit ist eine einfache Handhabung des Manipulators gewährleistet. Proben können problemlos zwischen den verschiedenen Standorten der Universität Hamburg und der Zentral-

analytik der Beiersdorf AG ausgetauscht werden.

2.2.2 Präparationskammer

Auch die Probenpräparationskammer (siehe Abb. 2.8), die direkt an die UHV-Kammer angeflanscht ist, wurde von der Bal-Tec AG, Liechtenstein, entwickelt. Über die oben beschriebene Schleuse können die Proben in die Kammer transferiert werden und sind dort während der Probenpräparation auf einem stickstoffgekühlten Tisch gelagert. Dort können geeignete Proben mit einem LN₂-gekühlten Mikrotom gefriergebrochen werden. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, die Oberfläche der Probe in situ mit einer speziell angefertigten Klinge freizulegen und mit einem anschließenden schnellen Transfer in die Analysekammer den Kontaminationseintrag zu minimieren. Zu den Proben, die auf diese Weise präpariert werden können, zählen Emulsionen, Flüssigkeiten, Gele und Suspensionen, die vorher durch Hochdruckgefrieren immobilisiert wurden. Die Kammer ist außerdem hervorragend für Gefrierätzen und Gefriertrocknen der Proben geeignet. Hierzu wird die Probe aufgewärmt (ca. -90 °C), während das Wasser aus der Probe heraussublimiert. Durch diesen schonenden Entzug des Wassers bei tiefen Temperaturen wird die Strukturhaltung der Probe gewährleistet. Die exakte Temperaturkontrolle übernimmt hierbei ein Peltierelement; ein Kühlblech in Probennähe dient als Kontaminationsschutz.

Technische Daten :

- Die Vakuumkammer hat ein Volumen von ca. 5 l und erreicht mit ungekühltem Probenstisch einen Enddruck von $< 10^{-7}$ mbar. Der Eingang wird durch einen pneumatisch betriebenen VAT-Schieber geschlossen; zur Analysekammer hin schottet ein UHV-Schieber der Firma VAT die Kammer ab.
- Das Pumpensystem besteht aus einer Turbomolekularpumpe inklusive Vorpumpe. Der Enddruck bei gekühltem Probenstisch liegt bei ca. 2×10^{-8} mbar.
- Das Pumpen-, Temperatur- und Schleusensystem der Präparationskammer wird von einem externen Controller vollautomatisch gesteuert.
- Für die Kontrolle von Gefrierbrüchen besitzt die Kammer ein optisches Mikroskop mit einer 7- und 14fachen Vergrößerung.
- Der Schnittmechanismus ist handgesteuert; die Höhe der Klinge (Genauigkeit ca. 1 mm) wird mit einer Mikrometerschraube eingestellt.
- Die Standzeit des LN₂-Dewars beträgt ca. 1 Stunde.

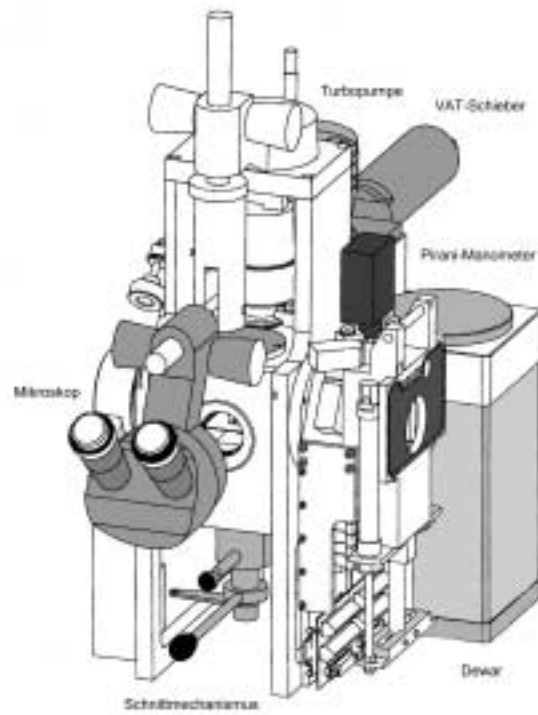


Abbildung 2.8: Schemaskizze der Präparationskammer. Abbildung entnommen aus [57].

2.2.3 Hauptkammer

Die Mikroskopkammer wurde extra für dieses Projekt bei der Firma Omicron in Auftrag gegeben. Durch eine Turbopumpe nebst Vorpumpe [58] und eine Ionengetterpumpe [59] kann nach dem Ausheizen der gesamten Anlage ein Enddruck von 1×10^{-10} mbar erzielt werden. Mit Hilfe einer Sputtergun [45] können die Spitzen nach Gebrauch wieder nachgeschärft werden. Durch den Beschuss mit Argonionen lassen sich kontaminierte Spitzen reinigen, da insbesondere biologische Proben bei einem Kontakt mit der Spitze diese leicht verschmutzen. Bei Bedarf kann eine Titansublimationspumpe und/oder ein Massenspektrometer ergänzt werden. In einem beweglichen Karussell können bis zu acht Sondenspitzen gleichzeitig im Vakuum gelagert werden.

2.2.4 Dämpfungssystem

Das Dämpfungssystem der gesamten Anlage besteht aus zwei Stufen. Zum einen ist das Mikroskop selbst in der UHV-Kammer schwingungs isoliert aufgehängt. Die Montageplatte, an der das Mikroskop befestigt ist, hängt frei an vier Federn. Die Dämpfungseigenschaften werden durch eine Wirbelstrombremse², bei der ein Kranz von Magneten in Kupferplatten eintaucht, verbessert. Als zusätzliche Dämpfungsmaßnahme lagert die gesamte UHV-Anlage auf einem Gestell, welches aus einem mit Sand gefülltem Profilrohr besteht. Dieses Gestell wiederum liegt auf externen pneumatischen Dämpfungsfüßen, so dass insgesamt eine Resonanzfrequenz des Gesamtaufbaus von ca. 1 Hz erreicht wird. Es wird durch diese Kombination der Dämpfungsmaßnahmen eine exzellente Stabilität erreicht, bei der Gebäudeschwingungen oder etwa Trittschall effektiv unterdrückt werden.

2.3 Elektronik

In diesem Unterkapitel stelle ich die für die Messungen benötigte Elektronik vor. Das Datenerfassungssystem inklusive Hochspannungsverstärker stammt von der Firma Oxford Instruments (TOPSystem II) [61], während die restlichen Komponenten in unserer Elektronikwerkstatt entwickelt wurden. Dabei beschränke ich mich auf die für den Messbetrieb wichtigen Kernbausteine, eine detaillierte Beschreibung aller Komponenten findet sich bei [43, 60]. Ich erläutere die für

²Das Wirkprinzip der Wirbelstrombremse beruht auf der Überlagerung und der daraus resultierenden Wechselwirkung von Magnetfeldern. Der Magnet erzeugt ein Primärfeld, welches durch die Relativgeschwindigkeit zwischen Magnet und Kupferplatte in diesem Wirbelströme induziert. Diese haben wiederum ein Feld zur Folge, welches sich mit dem Erregerfeld überlagert. In Abhängigkeit von der Geschwindigkeit stellt sich eine Verzerrung des resultierenden Magnetfeldes ein, die auch eine Richtungsänderung des resultierenden Kraftvektors zur Folge hat. Diese der ursprünglichen Bewegungsrichtung entgegengesetzt wirkende Kraft sorgt für zusätzliche Dämpfung.

die Kontaktkraftmikroskopie wichtigen Elemente und beschreibe die funktionalen Einheiten, die für die Nichtkontaktmikroskopie eingesetzt werden.

- **Datenerfassungssystem**

Das TOPSystem II von Oxford Instruments besteht aus zwei Komponenten: Einem Steuerungs-PC, auf dem eine in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Software [62] läuft, die eigens für diese Instrumentierung angepasst wurde, und einem Transputersystem, welches die Messdaten erfasst und die Spannungsrampen für die Rasterbewegung der Piezostellelemente erzeugt. In diesem Transputersystem sind auch die rauscharmen Hochspannungsverstärker für die Piezos, ebenso wie die Analog-Digital- (ADC) bzw. Digital-Analog-Wandler (DAC) untergebracht. Der Vorteil dieser Aufteilung in eine Steuerungs- (PC) und eine Signalerzeugungseinheit (Transputer) liegt in der Tatsache begründet, dass bei einem Absturz der Softwaresteuerung das Transputersystem autark weiter arbeitet, der Rastervorgang wird nicht unterbrochen und auch der Abstand der Spitze zur Probe variiert nicht. Man vermeidet dadurch eine Beschädigung der empfindlichen Spitze und kann durch manuelles Eingreifen die Spitze in eine gesicherte Position zurückziehen.

- **Strom-Spannungswandler**

Einer der Vorteile einer faseroptischen Detektion der Verbiegung des Federbalkens ist, dass die Signale keinerlei elektronische Störanfälligkeit besitzen. Erst außerhalb der Vakuumkammer wird das optische Signal mittels einer Photodiodeschaltung ausgelesen und in ein elektronisches umgewandelt. Der erzeugte Photostrom wird über einen Strom-Spannungswandler und eine nachfolgende Verstärkerschaltung dem Eingangsbereich des Regelkreises angepasst (± 10 V). Die für Kontakt- und Nichtkontaktbetrieb verwendeten Schaltungen unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer Bandbreite. Kommt die Kontaktschaltung mit einer Bandbreite von ca. 10 kHz aus, so benötigt die Nichtkontaktschaltung eine obere Grenzfrequenz von mindestens 500 kHz, da die Oszillationsbewegung des schwingenden Federbalkens erfasst werden muss. Um die Rauschpegel beider Schaltungen niedrig zu halten, wurden für die Rückkoppelwiderstände hochwertige Metallschichtwiderstände und rauscharme Operationsverstärker verwendet. Da die eingehende Lichtintensität, in Abhängigkeit von dem Abstand zwischen Federbalken und Glasfaserende, von Spitze zu Spitze unterschiedlich ist, wurde der Verstärkungsfaktor dieser Schaltungen regelbar ausgelegt.

- **Feedback-Regelkreis**

Wir verwenden einen externen analogen PI-Regelkreis zur Abstandsregulierung zwischen Spitze und Probe. Das Eingangssignal kann durch einen vierstufigen Verstärker bei zu schwachem Eingangssignal nochmals verstärkt

werden. Um hochfrequente Störungen von dem Regelkreis fernzuhalten, kann man bei Bedarf die Bandbreite auf 1 kHz bzw. 100 Hz begrenzen. Auf einer atomar glatten Probenoberfläche wie z.B. Graphit oder Glimmer ist die Abweichung vom Mittelwert während der Regelung extrem gering. Deshalb kann man diesen Mittelwert durch eine Sample-and-Hold-Schaltung subtrahieren und die Differenz bis zu einem Faktor 100 hochverstärken, um sie an den entsprechenden Eingang des Analog-Digital-Wandlers des Transputers anzupassen.

- **Nichtkontaktelektronik**

Die Elektronik des Nichtkontaktmessbetriebs wird im Gegensatz zu der Kontaktelektronik um einen zweiten PI-Regelkreis ergänzt. Wie bereits in den Grundlagen zur Kraftmikroskopie diskutiert, wird der Federbalken zu Schwingungen mit seiner Resonanzfrequenz angeregt (zwischen 50-500 kHz je nach Federbalkentyp). Diese Schwingung wird durch eine positive Rückkopplung erreicht, bei dem das Messsignal über eine Verstärkerschaltung wieder dem Piezo zugeführt wird. Ich verwende für die Anregung dieser Oszillation einen Piezoring, der von dem eigentlichen Scanner, der für die Rasterung der Spitze zuständig ist, absegmentiert wurde. Ein PI-Amplitudenregelkreis sorgt mit seiner Verstärkung für eine Schwingung mit konstanter Amplitude (typischerweise im Bereich von einigen 10 nm). Die Regelung der Amplitude muss schnell genug sein, um auf Änderungen während der Rasterung zu reagieren. Im Messbetrieb hat sich herausgestellt, dass die Ausgangsspannung des Amplitudenregelkreises (bis zu 10 V) für die Anregung des Piezoelementes zu groß dimensioniert wurde. Bereits Spannungen von einigen mV führen zu der gewünschten Anregungsamplitude von einigen Nanometern. Deshalb wurde an die Durchführung zur UHV-Kammer mit dem Mikroskop ein geeigneter Spannungsteiler montiert. Neben der Amplitudenregelung benötigt man für den Nichtkontaktmessbetrieb noch ein elektronisches Gerät, mit dem man die Schwingungsfrequenz des Federbalkens in eine Spannung umwandelt, den sog. Δf -U-Konverter. Dieses erzeugte Spannungssignal dient dann wiederum dem ersten PI-Regelkreis für den Kontaktmessbetrieb als Regelsignal. Die Funktionsweise des Konverters basiert auf einem Verfahren, welches in der Radiotechnik seinen Ursprung hat und ähnelt einem Quadraturdetektor.

Kapitel 3

Probenpräparation

3.1 Grundlegende Betrachtungen

Entscheidend für die Abbildung und Analyse biologischer Strukturen ist die Methode, mit der die Probe für die Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop oder Rasterkraftmikroskop vorbereitet wird. Die Auflösungsgrenze der Elektronenmikroskopie selbst liegt bei ca. 1 nm, die der Kraftmikroskopie reicht bis in den atomaren Bereich. Um eine hohe Abbildungsqualität zu gewährleisten, ist es wichtig, eine lebensnahe Abbildung zu erzielen. Die Präparationsmethode muss also das Ziel haben, die biologische Struktur zum Zeitpunkt der Probenentnahme zu fixieren und alle funktionellen Abläufe in der Probe zu unterbinden, bis diese mit den Mikroskopen charakterisiert werden kann.

Neben der (konventionellen) chemischen Fixierung bei Raumtemperatur kommen für Spezialuntersuchungen wie in dieser Arbeit, die sogenannten Kryopräparationsmethoden zur Anwendung, bei denen die Fixierung des nativen Zustands auf physikalischem Wege erfolgt. Die Hauptkomponente des Systems - das Wasser - wird innerhalb von Sekundenbruchteilen eingefroren. Dadurch erreicht man eine Fixierung der gesamten Probe, ohne dieser Zeit für strukturelle Veränderung zu erlauben. Im Gegensatz zu konventionellen Methoden, wie der chemischen Fixierung bei Raumtemperatur, bieten diese Verfahren eine 100-1000fach bessere Zeitauflösung.

Die Herausforderung der Kryomethoden besteht darin, dass biologische Material derart einzufrieren, dass keine Gefrierartefakte entstehen können. Insbesondere die Ausbildung von Eiskristallen und deren zerstörerische Auswirkung auf die Feinstruktur der Probe muss effizient unterdrückt werden. Idealerweise sollten die Wassermoleküle nach dem Einfrieren das gleiche Verteilungsmuster aufweisen wie im ungefrorenen Ausgangsobjekt. Man bezeichnet diesen Zustand als amorph, das derart eingefrorene Wasser als vitrifiziertes Wasser. Der Erfolg dieser Methoden wird entscheidend von der Abkühlrate an der Probenoberfläche, dem Gehalt an Gefrierschutzmittel in der Probe und der Probendicke bestimmt.

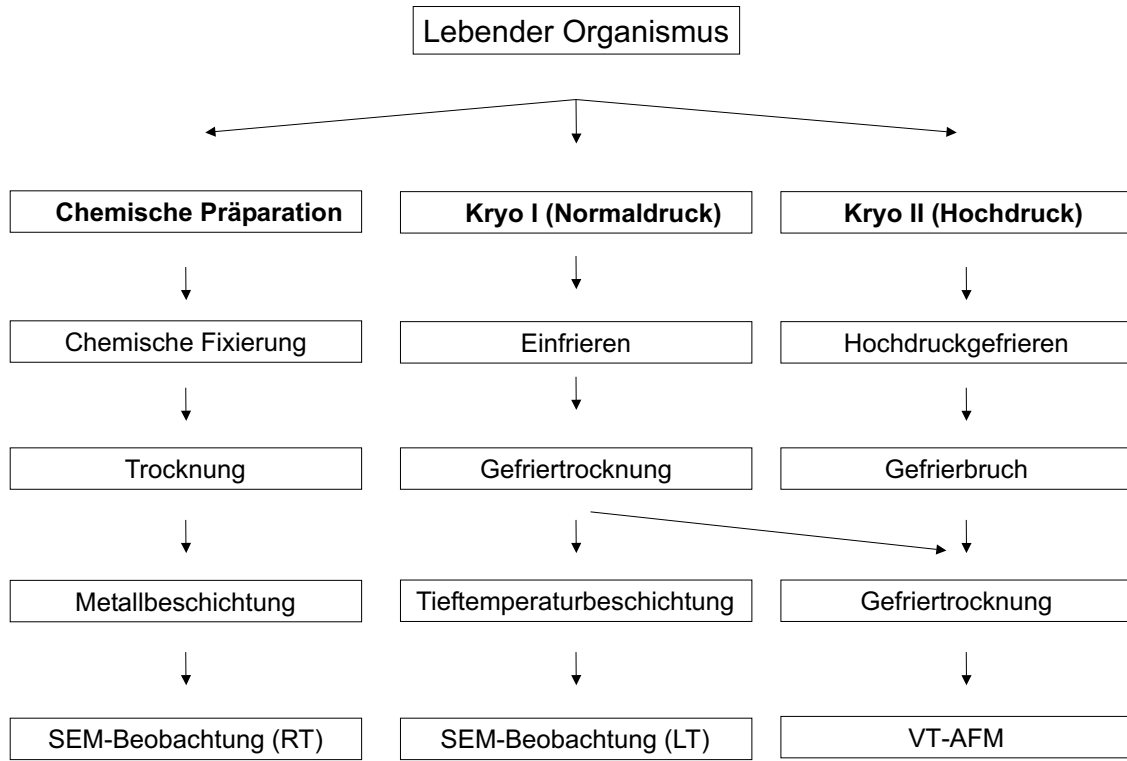


Abbildung 3.1: Schema verschiedener Präparationstechniken mit Abläufen bis zur Mikroskopiebetrachtung (SEM = Rasterelektronenmikroskopie, AFM = Rasterkraftmikroskopie, RT = Raumtemperatur, LT = Tieftemperatur).

In diesem Kapitel werden die unterschiedlichen Verfahren zur Kryopräparation erläutert und dabei besonderes Augenmerk auf die Vor- und Nachteile der Methoden gelegt. Nach der Kryoimmobilisierung der Proben eröffnen sich verschiedene Wege, diese für die Strukturanalyse im Rasterelektronenmikroskop oder auch im Rasterkraftmikroskop aufzubereiten:

- **Kryo I (Methode):** Die Entwässerung des Materials bei tiefen Temperaturen (Gefriersublimation) und im Hochvakuum, bei dem das Wasser anfangs noch im gefrorenen Zustand vorliegt, dann aber sukzessive durch Erhöhung der Temperatur aus der Probe sublimiert wird. Im Gegensatz zu einer Entwässerung bei Raumtemperatur ist jetzt die Reaktionsfähigkeit der Proben durch die tiefe Temperatur so weit reduziert, dass der lebensnahe Zustand der Proben nicht mehr beeinträchtigt werden kann. Diese Methode in Kombination mit dem Einfrieren bei Normaldruck wurde von mir für die Untersuchung der Virenstrukturen in Kapitel 4 angewendet.
- **Kryo II (Methode):** Ein anderer möglicher Weg belässt die Proben einfach im gefrorenen Zustand und bildet diese als gefroren-hydratisierten Gefrierbruch (siehe Erläuterung am Ende des Kapitels) im Kryomikroskop bei tiefen Temperaturen ab.

3.2 Wasser im biologischen System

In diesem Abschnitt wird gezeigt, warum Wasser eine einzigartige Rolle bei der Kryopräparation spielt. Diskutiert werden die grundlegenden Eigenschaften von Wasser und dessen Dynamik während des Einfrierens. Die Bedeutung dieser Substanz für die Präparation biologischer Proben wird klar, wenn man bedenkt, dass mehr als die Hälfte jeder biologischen Probe aus Wasser besteht. Will man durch die Kryopräparation einen möglichst lebensnahen Zustand der Probe erhalten, so muss man daher die grundlegenden Eigenschaften des Wassers für biologische Prozesse mit beachten. Wasser besteht aus einem Sauerstoffatom und zwei Wasserstoffatomen, die über einen Winkel von 105° miteinander verbunden sind. Diese asymmetrische Konfiguration ist für viele ungewöhnliche Eigenschaften verantwortlich, wie z.B. die Ausdehnung des Materials während des Gefrierens. Durch seine polare Struktur (die Bindungselektronen werden durch das Sauerstoffatom von den Wasserstoffatomen weggezogen), lagern sich die Wassermoleküle über Brückenbindungen zu geordneten Strukturen an. Durch diese Polarität ist es ein ausgezeichnetes Lösungsmittel für Ionen und Makromoleküle und sorgt bei biologischen Systemen für die notwendige Beweglichkeit. Das flüssige Wasser ist immer die mobilste Komponente in biologischen Systemen. Deswegen ist die Hauptaufgabe jeder Kryopräparationstechnik, das Wasser an dem Ort zu fixieren, welches es auch schon bei Raumtemperatur innehatte. Dabei ist zu berücksichtigen, dass Wasser zu den Stoffen zählt, die nur sehr schwer vom flüssigen Zustand

in einen nicht-kristallinen Zustand überführt werden können. Die Ausbildung von Eiskristallen ist der häufigste Grund für Artefaktbildung.

Prinzipiell kann man Wasser im biologischen System in drei verschiedene Gruppen einteilen. Man unterscheidet je nach Wechselwirkung mit der Umgebung das Bulkwasser (unbeeinflusst), das gebundene/vicinale Wasser, welches durch Makromoleküle beeinflusst ist, und das Wasser der primären Hydrathülle. Vicinales Wasser gefriert bei 248 K, besteht aus mehreren Moleküllagen und ist zwischen 10 nm und 1 mm dick. Bulkwasser ist z.B. leichter entfernbar als das vicinale Wasser. Der Entzug des Wassers aus der primären Hydrathülle führt zu schwerwiegenden Veränderungen wie dem Kollaps von Feinstrukturen.

Mit den Kryopräparationsmethoden wird entweder der Entzug des zellulären Wassers vollständig vermieden (man wandelt es statt dessen in eine Festkörperstruktur um), oder man entzieht es nach der Fixierung strukturschonend durch Gefriersublimation.

3.3 Präparationsmethoden

3.3.1 Die chemische Fixierung

Die chemische Fixierung von Proben war vor der Einführung der Kryotechniken das Standardverfahren zur Aufbereitung des biologischen Materials für die Abbildung mit dem Rasterelektronenmikroskop. Zu Beginn werden die Proben mit Glutaraldehyd fixiert, welches die Proteine vernetzt und das Material vor dem Angriff von Osmiumtetroxid schützt, mit dem in einem weiteren Schritt ebenfalls fixiert wird. Osmiumtetroxid (OsO_4) greift an Doppelbindungen an und verbindet so z.B. Phospholipide in Membranen. Der hohe Wassergehalt der Proben zwingt zu einer Entwässerung des biologischen Materials nach der Fixierung. Unter Hochvakuumbedingungen (z.B. in einem Rasterelektronenmikroskop) würde das Wasser verdampfen und die biologische Struktur schädigen. Man verdrängt das Wasser aus den Proben, indem man dieses durch eine aufsteigende Alkoholreihe mit 30, 50, 70 und 100 % Propanol oder Ethanol substituiert.

Im Gegensatz zu den Kryotechniken ist die chemische Fixierung ein langsamer Prozeß. Die Fixative werden durch einen Puffer transportiert und berühren als erstes die Zellmembran der Probe. Während diese quervernetzt, diffundiert die chemische Substanz weiter ins Zentrum der Probe. Je dicker die zu fixierende Probe ist, desto langsamer erfolgt die Fixierung. Die Ursachen hierfür sind:

- Konzentrationsunterschiede, die beim Eindringen des Fixativs in die Probe entstehen.
- Minderung der Diffusionsgeschwindigkeiten durch bereits erfolgte Quervernetzung.

Die konventionelle chemische Fixierung läßt nur sehr rigide Strukturen unbeschadet. Die Reaktion der Fixantien mit dem biologischen System, besitzt ein hohes Artefaktpotential. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit, in der eine möglichst hohe Auflösung erzielt werden soll, auf diese Präparationsmethode verzichtet.

3.3.2 Die Kryoimmobilisierung

Es ist nicht immer möglich, Eiskristallwachstum komplett zu verhindern. Deshalb ist es ausreichend, einen Zustand zu erreichen, bei dem die Kristallbildung keine Minderung der Abbildungsqualität zur Folge hat. Man spricht in diesem Zusammenhang von einem mikrokristallinen Stadium, in dem sich das Eis befindet, welches sich mit typischen Abkühlraten von 40.000 bis 100.000 K/s erreichen läßt. Diese hohen Abkühlraten lassen sich allerdings nur an der Probenoberfläche erzielen, da das gefrorene Wasser gegenüber dem flüssigen Wasser eine sehr viel niedrigere thermische Leitfähigkeit besitzt. Bei fortschreitender Immobilisierung wirkt die bereits eingefrorene Wasserschicht immer mehr als ein Isolator und verschlechtert den Wärmetransport aus den tieferen Schichten der Probe an die Oberfläche.

Diese physikalische Einschränkung setzt der Probendicke die amorph eingefroren werden kann eine natürliche Grenze. Unabhängig von der Kühlrate an der Oberfläche können maximal 20 μm dicke Schichten amorph verfestigt werden. Die einzige Möglichkeit, diese Grenze zu verschieben, besteht entweder in der Herabsetzung des Gefrierpunktes oder der Heraufsetzung des Rekristallisationspunktes von Wasser. Dies läßt zwei Optionen offen:

- Zugabe von Gefrierschutzmittel
- Gefrieren unter hohem Druck

Indem man die Probe mit Gefrierschutzmittel behandelt, senkt man zwar den Gefrierpunkt herab und ermöglicht dadurch das Einfrieren auch tieferer Regionen, aber gleichzeitig wird durch eine chemische Vorbehandlung der lebensnahe Zustand der Probe verändert. In diesem Fall ist ein Einfrieren unter hohem Druck vorzuziehen. Eine Druckerhöhung auf ca. 2100 bar erniedrigt den Gefrierpunkt auf 251 K und gleichzeitig wird die Unterkühlbarkeit von 233 K auf 183 K gesenkt. Dieses Verfahren ermöglicht ein eisfreies Einfrieren bis zu einer Probendicke von 200 μm .

3.3.3 Probleme beim Gefriervorgang

Einerseits stabilisiert das Einfrieren natürlich die zelluläre Struktur, indem sie in einen Festkörper transformiert wird, andererseits nützt das Schockgefrieren wenig, wenn durch Kristallisation des Wassers das biologische Material geschädigt

wird. Bilden sich Eiskristalle aus, so entsteht durch deren Wachstum eine Dynamik, die dazu führt, dass die zellulären Strukturen an den Rand gedrängt werden und mit fortschreitender Kristallisation verschoben werden. Diese Verschiebung kann im Einzelfall bis zu einigen hundert Nanometern betragen. Es entstehen sogenannte Segregationsmuster.

Der kritische Bereich für die Kristallisation liegt in dem Temperaturbereich zwischen der Devitrifikationstemperatur und dem Schmelzpunkt des Wassers. Nur innerhalb dieses Temperaturfensters ist ein Eiskristallwachstum möglich. Wird die Devitrifikationstemperatur unterschritten, so steigt die Viskosität des Wassers rapide an und verhindert eine Molekülbewegung und damit auch die Entstehung von kristallinem Eis. In reinem Wasser liegt der Schmelzpunkt bei 273 K (biologisches Objekt: 271 K) und die Devitrifikationstemperatur bei 140 K (biologisches Objekt: 193 K).

Der Wirkmechanismus des Eiskristallwachstums wird deutlich, wenn man drei unterschiedliche Gefrierbedingungen unterscheidet. Grundsätzlich gilt, je schneller unter die Devitrifikationstemperatur abgekühlt werden kann, desto weniger Zeit bleibt dem System um Eiskristalle ausbilden zu können.

- **Langsames Gefrieren**

Hier wird die Temperatur nur langsam unter den Gefrierpunkt erniedrigt. Es setzt sofort ein Eiskristallwachstum ein, welches an Verunreinigungen im System beginnt. Da im allgemeinen nicht viele dieser Kristallisationskeime vorliegen, werden die Eiskristalle sehr groß. Die Flüssigkeit ist unterkühlt und wird durch die abgegebene Kristallisationswärme wieder auf den Schmelzpunkt erwärmt. Die Temperatur kann erst dann endgültig erniedrigt werden, wenn das gesamte Wasser in Eis transformiert worden ist. Diese Form des Eiskristallwachstums wird als heterogen bezeichnet.

- **Schnellgefrieren**

Durch das Schnellgefrieren wird die Temperatur schneller verringert als die Kristallisationswärme entsteht, da die abgeführte Wärmemenge die produzierte Kristallisationswärme übersteigt. Die oben beschriebene heterogene Kristallisation findet nicht statt, sondern es tritt jetzt nur noch homogene Kristallisation auf (bei 233 K). Dabei wirken die Wassermoleküle selbst als Keime für das Kristallwachstum. Hier ist die Anzahl der potentiellen Keime sehr groß, was sich auf das Verteilungsmuster der Kristalle auswirkt; es entsteht eine große Anzahl von kleineren Eiskristallen. Die Abkühlrate, bei der diese Form der Nukleation beobachtet werden kann, wird als kritische Abkühlrate bezeichnet.

- **Ultraschnelles Gefrieren**

Erhöht man die Abkühlrate weiter, so läßt sich zeigen, dass mit der sogenannten Bare-grid-Technik eine Wasserschicht von bis zu 100 nm Dicke

amorph eingefroren werden kann. Es tritt weder heterogene, noch homogene Nukleation auf. Dieses Ergebnis kann durch ein Elektronendiffraktogramm betätigt werden; es zeigt bei Temperaturen von unter 130 K keinerlei Anzeichen einer Keimbildung.

Wendet man die Gefrierimmobilisation auf ein biologisches System an, so muss man dabei zwischen makro- und mikrokristallinem oder amorphem Eis unterscheiden. Entsteht makrokristallines Eis, so wird eine starke Beschädigung der zellulären Struktur induziert. Mikrokristallines Eis hingegen kann durchaus noch eine akzeptable Strukturerhaltung zeigen. Für unsere Untersuchungen wurde aber immer eine Kryoimmobilisierung angestrebt, bei der die biologische Probe amorph erstarrt ist, um deren natürlichen Zustand zu erhalten.

Die Vitrifikation von Wasser hängt nicht nur von der Abkühlrate an der Oberfläche der Probe ab, sondern wird entscheidend von weiteren Faktoren begrenzt: durch die Wärmekapazität und die Wärmeleitfähigkeit des Wassers sowie durch den Wärmetransport zwischen Probe und dem Kryogen oder einer Kaltfläche. In einer Tiefe von 0,1 μm kann eine Kühlrate von 10^9 Ks^{-1} erreicht werden, bei 10 μm aber nur noch 10^5 Ks^{-1} und bei 1000 μm lediglich 10 Ks^{-1} . Nimmt man eine unendlich große Erhöhung der Abkühlrate an der Probenoberfläche an, so lässt sich zeigen, dass 90 μm von der Probenoberfläche entfernt dies keine Auswirkung mehr zeigt.

Diese angegebenen Zahlen stimmen allerdings nur für reines Wasser. Macht man realistische Annahmen über den Wärmetransport in einem biologischen System, so werden die Verhältnisse noch schlechter. Reines Wasser benötigt eine Kühlrate von mehr als 10^4 Ks^{-1} , um in einer 100 nm dicken Schicht vitrifiziert zu werden, während Zellen und Gewebe, in Schichten nicht dicker als 10 μm , mehr als 10^6 Ks^{-1} brauchen, um gut gefroren werden zu können.

3.4 Das Hochdruckgefrieren

Hier stelle ich die Methode des Hochdruckgefrierens vor. Obwohl diese Technik bei der Untersuchung der T4-Bakteriophagen nicht zum Einsatz kam, spielt sie doch eine große Rolle für weitere geplante Untersuchungen. Eines der ursprünglichen Ziele, für die dieses Mikroskop entwickelt wurde, nämlich die strukturelle Untersuchung der Lipidbarriere der Haut, musste aufgeschoben werden. Die am Ende dieses Kapitels beschriebene Gefrierbruchvorrichtung (Kryoschnitte), mit der Hautproben mit einem Messer präpariert werden sollten, erfüllt noch nicht die nötigen Spezifikationen und muss nachgebessert werden. Trotz dieser Tatsache wurden einige Hautproben mittels Hochdruckgefrierens präpariert und nach dem Einschleusen in der Präparationskammer durch einen Gefrierbruch für die Abbildung mit dem Rasterkraftmikroskop aufbereitet. Es zeigte sich schnell, dass die durch den Schnitt erzeugte Oberfläche eine viel zu große Korrugation

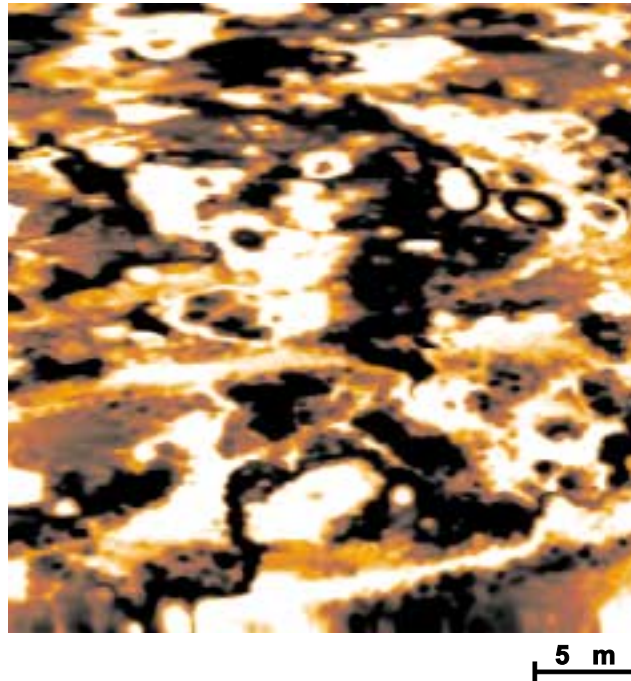


Abbildung 3.2: Rasterkraftmikroskopische Aufnahme der menschlichen Epidermis im unregelmäßigen Betrieb. Bildausschnitt: $30\ \mu\text{m} \times 30\ \mu\text{m}$

im Mikrometerbereich aufweist. Dadurch ist eine geregelte Messung mit dem Kraftmikroskop unmöglich, da der z -Stellweg der Rastereinheit nur einige wenige Mikrometer zulässt.

Die Abbildung 3.2 zeigt einen Ausschnitt der menschlichen Epidermis. Diese Aufnahme wurde aus den oben genannten Gründen im unregelmäßigen Betrieb aufgenommen. Wird die Spitze nicht durch den Regelkreis nachgeführt, sind die Auflagekräfte sehr groß, was eine hohe Auflösung verhindert.

3.4.1 Das Einfrieren unter hohem Druck

Konventionelle Einfrieremethoden, bei denen die Probe mit hoher Geschwindigkeit in das Kryogen eingeschossen wird, haben immer den Nachteil, dass aufgrund der schlechten Wärmeleitfähigkeit des Wassers, nur Proben bis zu einer Dicke von $10\ \mu\text{m}$ bis $20\ \mu\text{m}$ amorph eingefroren werden können. Dickere Proben, wie die oben erwähnten Hautproben, konnten bisher nur fixiert werden, indem man Gefrierschutzmittel hinzugab, um den Gefrierpunkt des Wassers zu erniedrigen. Dadurch treten die bereits bei der chemischen Fixierung diskutierten strukturellen Veränderungen der Proben auf. Durch den Einsatz der Hochdruckgefrieretechnik, kann diese Einschränkung aufgehoben werden. Sie beruht auf einem physikalischen Phänomen, welches den Gefrierpunkt des Wassers absenkt. Bei ca. 2100 bar wird der Schmelzpunkt des Wassers von $0\ ^\circ\text{C}$ auf $-22\ ^\circ\text{C}$ erniedrigt.

Unter Umgebungsbedingungen beginnt die Eiskristallisation (homogene Nukleation) bei etwa $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, während sie bei hohem Druck erst bei etwa $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ einsetzt. Bei 2100 bar ist Wasser 1500mal viskoser als bei atmosphärischem Druck, wodurch die Nukleation und damit das Eiskristallwachstum stark reduziert wird. Daraus folgt, dass beim Gefrieren mit hohem Druck auf eine bei herkömmlichen Verfahren nötige hohe Abkühlrate von ca. 10000 K/s verzichtet werden kann. Mit dieser Methode können Proben mit einer Dicke bis zu 0.2 mm und einem Volumen von ca. 1 mm^3 bei einer Kühlrate von nur 200 K/s eingefroren werden, ohne auf zusätzliches Gefrierschutzmittel angewiesen zu sein.

Der optimale Druckbereich kann aus dem Phasendiagramm (vgl. Abb. 3.3) abgelesen werden. Der Bereich der Unterkühlung ist ausgedehnt bis auf 182 K ; zudem kristallisiert das Wasser nicht als Eis I mit geringer Dichte, sondern als Eis II oder III mit einer höheren Dichte als flüssiges Wasser. Im genannten Druckbereich kann die Wärme im Stadium der Unterkühlung aus der Probe abgeführt werden, bis die Temperatur 183 K erreicht hat. Tritt Kristallisation auf, dann kann sie sich nur sehr langsam ausbreiten.

3.4.2 Die Hochdruckgefrierapparatur

Die für unsere Hautuntersuchungen verwendete Hochdruckgefrierapparatur ist kommerziell erhältlich (z.B. die HPM010 Bal-Tec, Liechtenstein - siehe Abb. 3.4). Die Technologie und das erste Gerät diesen Typs wurde von Moor et al [63] entwickelt, ebenso wie der technische Ablauf des Hochdruckgefrierens mit der HPM010 [64]. Im Folgenden beschreibe ich den technischen Ablauf der Probenpräparation.

1. Die Probe wird zwischen zwei Probenträger geklemmt und in einen Probenhalter montiert. Der Halter wird in die Hochdruckkammer eingeführt, so dass die Probe genau zwischen den Eingangsventilen für den flüssigen Stickstoff sitzt.
2. Dann wird ein Druckventil geöffnet, so dass Hydrauliköl unter einem Druck von 300 bar in den Niederdruckzylinder fließen kann. Ein Kolben überträgt diesen Druck an die Hochdruckkammer, wobei ein spezielles Design den Druck deutlich über den des Öls erhöht. Der flüssige Stickstoff wird in die Kammer eingeschossen und trifft den Probenhalter. In der Kammer befindet sich zu diesem Zeitpunkt bereits ein Alkohol, der erst komprimiert und aus der Kammer herausgedrückt werden muss. Diese Verzögerung gibt dem LN_2 -Strahl genügend Zeit, den optimalen Druck von ca. 2100 bar aufzubauen.
3. Der flüssige Stickstoff verläßt die Kammer durch einen Auspuff, nachdem er durch einen Schalldämpfer geführt wurde, und entweicht in die Umgebung.

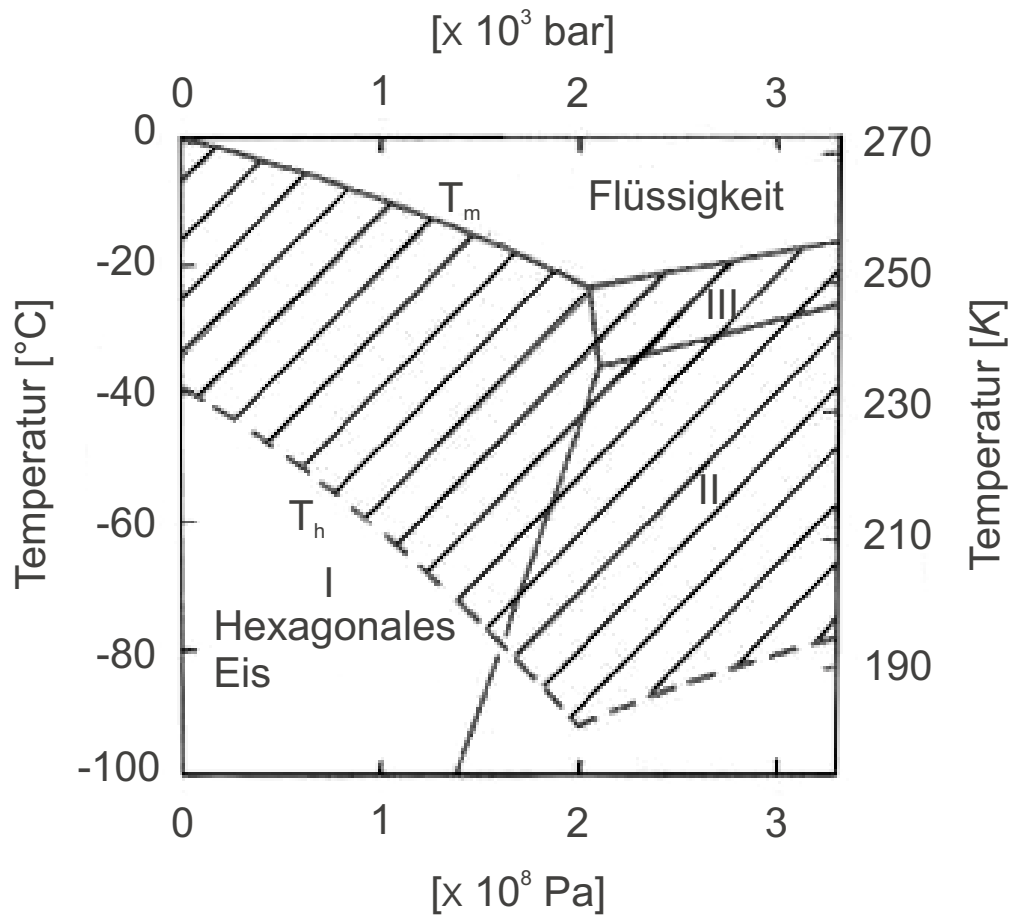


Abbildung 3.3: Temperatur-Druck-Phasendiagramm für Wasser. Schmelztemperatur T_m und Temperatur T_h für homogene Nukleation. Die römischen Zahlen entsprechen den verschiedenen stabilen Eisphasen. Der schraffierte Wertebereich zeigt die Region, in der Unterkühlung von Wasser möglich ist.

- 1- hydraulic pump
- 2- pressure accumulator
- 3- pressure valve
- 4- low pressure line
- 5- low pressure cylinder
- 6- pressure piston
- 7- high pressure cylinder
- 8- dewar flask
- 9- pressure valve

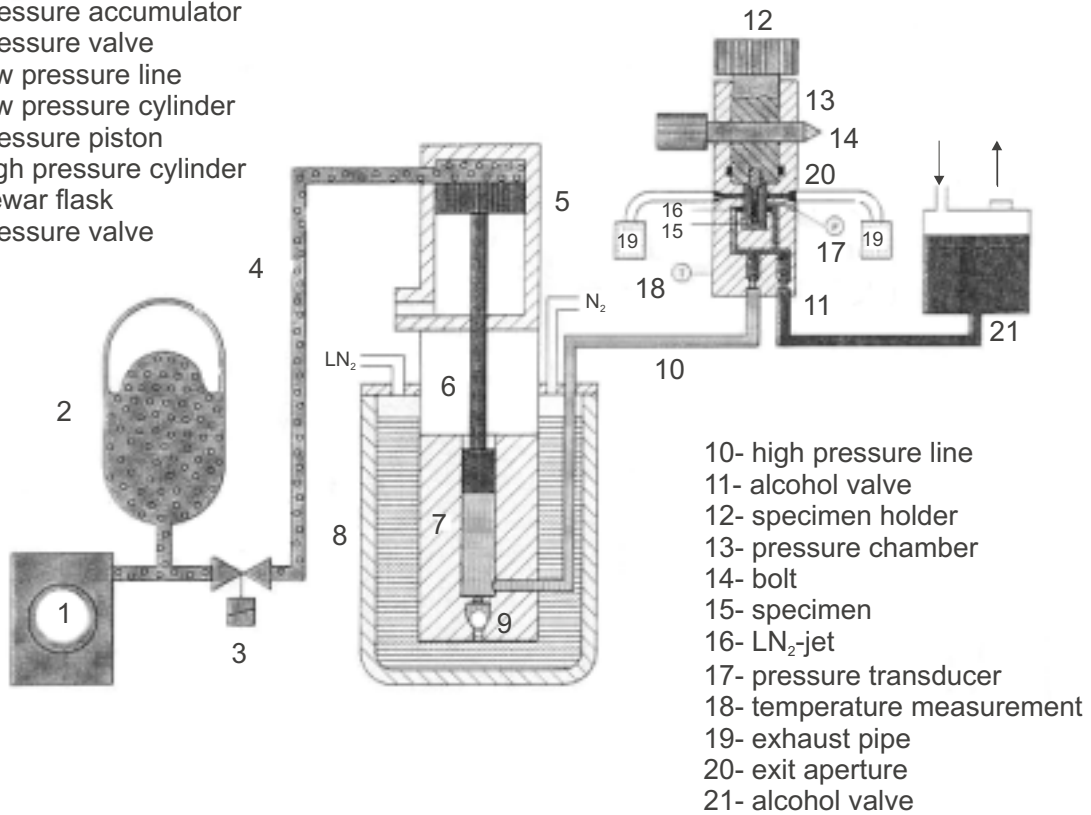


Abbildung 3.4: Diagramm der Hochdruckgefrierapparatur HPM 010 Bal-Tec GmbH, Liechtenstein. Abbildung entnommen aus [57].

Die Probe ist jetzt eingefroren und wird mit einem schnellen manuellen Transfer in flüssigem Stickstoff eingelagert.

3.5 Aufbereitung des biologischen Materials nach dem Einfrieren

Zu den weiterverarbeitenden Präparationsverfahren zählt neben den rein physikalischen Verfahren wie Gefrierbruch und Gefrierschneiden auch die Gefriertrocknung, bei der die Proben bei tiefen Temperaturen entwässert werden. Die für diese Verfahren notwendige Vorbereitung des biologischen Materials sollte möglichst unterhalb der Devitrifikationstemperatur, die für reines Wasser bei ca. 140 K und für biologische Proben schätzungsweise bei 170-190 K liegt, erfolgen, um eine Rekristallisation und damit verbundene Veränderungen der zellulären Struktur zu verhindern.

3.5.1 Gefriertrocknung

Bei der Gefriertrocknung wird das gefrorene Wasser durch Sublimation bei tiefen Temperaturen und in einer Hochvakuumkammer entfernt. Dabei muss die Temperatur so tief sein, dass die empfindliche Probenstruktur nicht durch Rekristallisation des Wassers beschädigt werden kann. Sobald die Probe getrocknet ist, kann man sie ohne strukturelle Veränderungen wieder auf Raumtemperatur aufwärmen und anschließend analysieren. Diese Technik wurde bei der Untersuchung der T4-Bakteriophagen (siehe Kapitel 4) eingesetzt.

In erster Näherung wird der Prozeß der Gefriertrocknung durch den Dampfdruck des Wassers bei der eingestellten Temperatur bestimmt. Ausgehend von der kinetischen Gastheorie lassen sich so die theoretischen Gefriertrocknungszeiten berechnen. Bei 150 K würde es 3.5 Jahre dauern, um eine 1 mm dicke Eisschicht, auch im bestmöglichen Vakuum, durch Sublimation zu entfernen. Bei 170 K würde dies 10 Tage und 18 Stunden benötigen, bei 191 K nur 5 Stunden. Es wird klar, dass nur sehr dünne Schichten bei einer Temperatur von unter 170 K in einer angemessenen Zeitspanne entwässert werden können. Hinzu kommt, dass die theoretisch berechneten Werte in der Realität meistens übertroffen werden. Erstens läßt sich Wasser aus der Tiefe der biologischen Strukturen schlechter entfernen als aus der Oberfläche, und zweitens führt die Mischung aus Makromolekülen und Salzen, im Gegensatz zum reinen Wasser, immer zu einer Erhöhung der Sublimationszeiten.

Die Gefriertrocknungsvorrichtung, die für meine Proben verwendet wurde, ist in die Präparationskammer integriert und erlaubt das kontrollierte Trocknen von biologischen Proben (siehe Kapitel 2).

Einige der wichtigsten Eigenschaften der Gefriertrocknungseinheit:

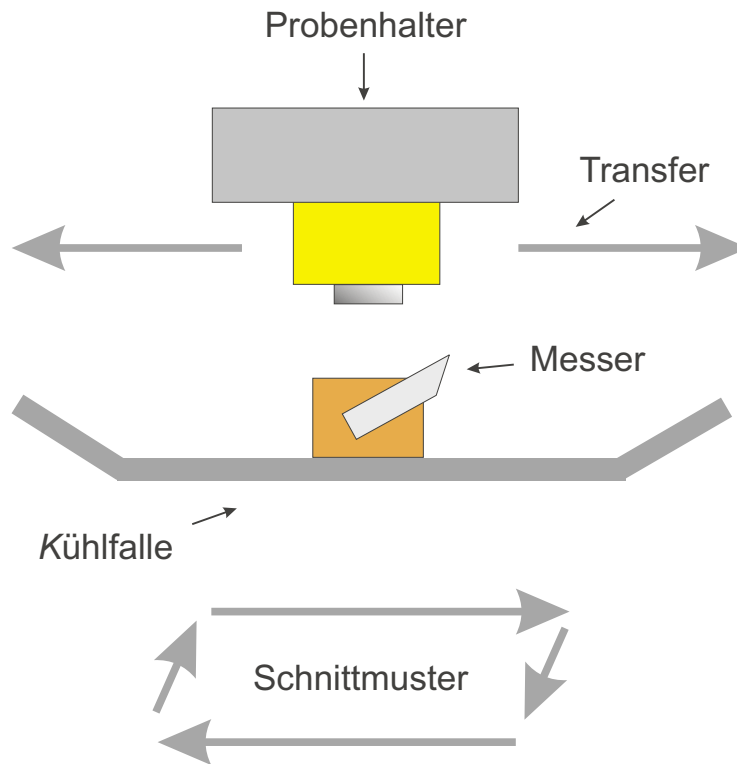


Abbildung 3.5: Diagramm des Schnittmechanismus in der Präparationskammer

- Der Kühltisch, auf dem die Proben während der Trocknung befestigt werden, wird durch einen LN_2 -Dewar und an dem Probenhalter befestigte Kühllitzen auf den niedrigen Temperaturen stabilisiert.
- Temperaturkontrolle mit einem Peltierelement; für die automatische Trocknung können beliebige Temperaturrampen eingestellt werden.
- Das Gegenheizen des Kühltisches, um die vorgewählte Temperatur einzustellen erfolgt durch einen Leistungstransistor.

3.5.2 Kryoschnitte

In der Präparationskammer besteht die Möglichkeit Kryoschnitte durchzuführen. Die zugrundeliegende Idee dieses Verfahrens ist es, nach dem Einfrieren des biologischen Materials unter Hochvakuumbedingungen eine kontaminationsfreie Oberfläche zu präparieren. Danach eröffnen sich wiederum weitere Möglichkeiten, wie z. B. ein Anätzen der Oberfläche durch Gefriersublimation, um Strukturen für die Abbildung mit dem Rasterkraftmikroskop freizulegen (vgl. Abb. 3.5).

Hierzu wird die Probenoberfläche mit einer speziell gehärteten Klinge gespalten, die Steuerung des Messers erfolgt manuell über einen Hebelarm. Als

Kontrolle der Schmitthöhe dient eine Mikrometerschraube, während die Probenoberfläche mit einem optischen Mikroskop beobachtet werden kann. Direkt am Halter des Messers ist ein großes mit LN_2 gekühltes Blech befestigt, welches als Kühlfalle dient und verhindert, dass die Oberfläche der Probe nach erfolgreichem Schnitt wieder verschmutzt. Da der Druck in der Präparationskammer deutlich über dem in der Ultrahochvakuumkammer liegt, ist es ratsam, die Probe nach dem Schneiden möglichst rasch in die Analysekammer zu transferieren. Typischerweise lassen sich mit unserem Transfersystem Zeiten von einigen Sekunden realisieren.

Kapitel 4

Strukturuntersuchungen an T4-Bakteriophagen

4.1 Die T4-Bakteriophage als Probensystem

T4-Bakteriophagen (Viren) sind kleine zelluläre Parasiten, die nicht in der Lage sind, sich selbständig zu reproduzieren. Vielmehr infizieren sie Zellen und zwingen diese, noch mehr Viren zu produzieren. Obwohl die Infektionszyklen der verschiedenen Virusarten variieren, folgen alle einem gewissen Grundschema. Als erstes injiziert der Virus seine Nukleinsäure in die Wirtszelle. Danach wird die biosynthetische Maschine der Zelle umprogrammiert: Sie produziert einzelne Virenpartikel, die sich in der Zelle zu einem neuen Virus zusammensetzen. Anschließend verlassen die Viren die Wirtszelle, um neue Zellen zu infizieren. Abb. 4.1 zeigt den schematischen Aufbau eines T4-Virus. Der Virus besteht aus einer ikosaedralen Kopfstruktur mit einer Breite von ca. 65 nm und einer Länge von ca. 95 nm und besteht aus vielen Kopien einiger verschiedener Polypeptide (Aminosäuren). In ihm ist die Virus-DNA (Desoxyribonukleinsäure) gekapselt. Der Schwanz ist ca. 120 nm lang und weist eine helikale Überstruktur auf. Mit ihm lagert sich der Virus an der Zelloberfläche an, um den Nukleinsäuretransfer zur Wirtszelle durch schraubenförmiges Zusammenziehen zu starten. Die sechs ca. 150 nm langen und 2-3 nm dicken Schwanzfasern dienen als Sensoren der Umgebung, mit ihnen hält sich der Virus an der Zelle fest. Glücklicherweise ist die Art des Wirtes, die ein Virus befallen kann, eingeschränkt und kann als Klassifizierungsschema dienen. Dementsprechend heißen die hier untersuchten Viren, die ausschließlich Bakterien infizieren, Bakteriophagen oder einfacher Phagen. Jene, die Pflanzen- oder Tierzellen infizieren, heißen konsequenterweise Pflanzenvirus bzw. Tiervirus. Eine genaue Beschreibung des Aufbaus und der Funktionsweise des T4-Bakteriophagen findet sich bei [65].

Wir haben den T4-Virus als erstes biologisches Testobjekt gewählt, da er relativ einfach zu präparieren ist und in ausreichendem Maße bei der Beiersdorf AG,

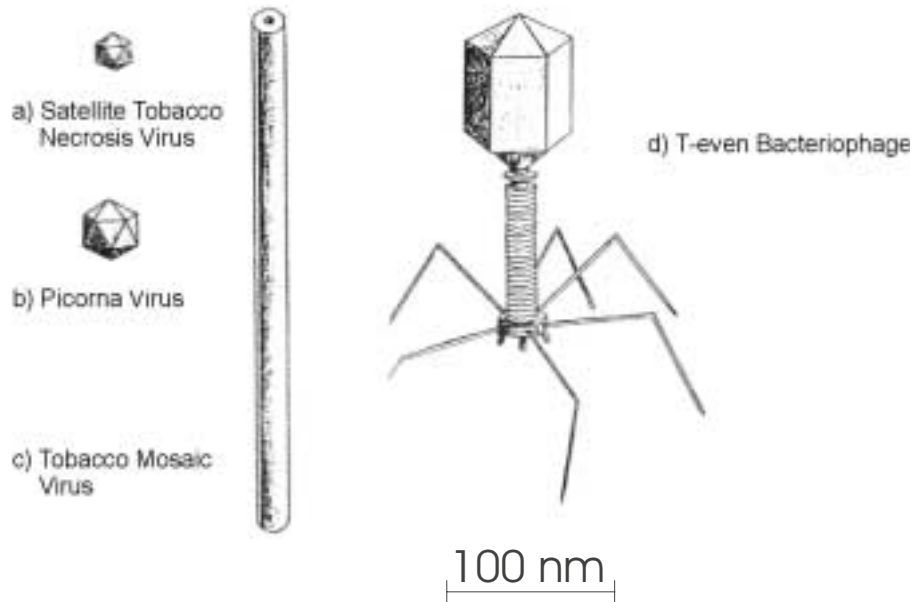


Abbildung 4.1: Viren unterscheiden sich in Größe und Form von den simplen Viren a) - c), welche andere Viren für die Replikation benötigen, bis zum T-even Bakteriophagen d), welcher hochspezialisierte Mechanismen für die Injektion von DNA in Bakterien entwickelt hat. Vier verschiedene Viren werden in ihrer korrekten relativen Größenskala gezeigt.

Hamburg, zur Verfügung stand. Der komplexe Aufbau des Virus mit den unterschiedlich großen Überstrukturen des Kopfes, der helikalen Schwanzstruktur, oder auch den Phagenschwänzen, die in ihrem Aufbau einer Perlenkette ähneln, ermöglicht das schrittweise Ausloten der Leistungsgrenze des Rasterkraftmikroskops.

4.2 Vorüberlegungen

Für eine Aufbereitung der Viren für die Abbildung mit dem Rasterkraftmikroskop müssen einige grundsätzliche Bedingungen geschaffen werden, die durch den Aufbau eines solchen Gerätes bedingt sind:

- **Vakuumtauglichkeit:** Für die Charakterisierung der Proben in einer Ultrahochvakuumkammer ist es notwendig, sie so zu präparieren, dass diese nicht ausgasen. Insbesondere muss das Wasser in der biologischen Probe so schonend entzogen werden, dass die Struktur des Systems erhalten bleibt.
- **Artefaktfrei:** Viren befinden sich während ihrer Lagerung in einer Lösung, die auch Salzurückstände beinhaltet. Diese müssen durch geeignetes Spülen

vor dem Einfrieren entfernt werden.

- **Gleichmäßige Verteilung:** Diese Forderung ist insbesondere für die Kraftmikroskopie von enormer Bedeutung. Das Kraftmikroskop hat nur ein kleines Blickfeld von einigen Mikrometern. Die Viren müssen gleichmäßig über eine große Fläche des Substrats verteilt liegen um zu gewährleisten, dass einige Strukturen in diesem Ausschnitt liegen. Für die Elektronenmikroskopie mit einer stufenlosen Zoommöglichkeit gilt diese Anforderung an die Präparation nicht, da man sehr komfortabel geeignete Probenstellen suchen kann.

Der erste Punkt ist einerseits durch die Auswahl eines geeigneten Substrates, auf dem die Viren befestigt werden, und andererseits durch Kryopräparationsmethoden (siehe Kapitel 3) leicht zu erfüllen. Es hat sich gezeigt, dass die beiden anderen Anforderungskriterien nicht so leicht beherrschbar sind. Von einigen Untersuchungen dieses Systems mit Rastertunnelmikroskopie abgesehen [66, 67], wurde bisher eine Präparation von T4-Bakteriophagen ausschließlich für die Elektronenmikroskopie entwickelt. Obwohl die Vorgehensweise in weiten Teilen übereinstimmt, sind doch einige Besonderheiten zu beachten. Diese rühren in erster Linie daher, dass die Kraftmikroskopie ein mechanisches Abtastverfahren darstellt, bei der die Sondenspitze in Wechselwirkung mit der Probenoberfläche tritt. Viren neigen bei einer einfachen Präparation zu Verklumpungen, Lösungsrückstände auf dem Substrat werden bei dem Gefriervorgang verschoben und zu hohen Strukturen aufgetürmt (siehe Abb. 4.2).

Berücksichtigt man die geringen Stellwege der Rastereinheit im Mikrometerbereich, so wird die Forderung nach einer gleichmäßigen, rückstandsfreien Präparation der Viren klar. Die Sondenspitze ist viel zu empfindlich, um einen Kontakt mit diesen Präparationsartefakten unbeschädigt zu überstehen; sie wird stumpf und/oder Restmaterial lagert sich an ihr an, was das Auflösungsvermögen deutlich begrenzt. Die Elektronenmikroskopie mit ihrem optischen Abbildungsmechanismus hat diese systemimmanenten Probleme nicht. Für sie würde selbst eine Präparation wie in Abbildung 4.2 ausreichend sein, solange noch einige Bereiche des Substrates mit den Viren frei zugänglich sind. Ausgehend von einem Übersichtsbild würde man sich an die geeigneten Stellen herantasten um die Virusstrukturen abzubilden. Diese Möglichkeit hat das Rasterkraftmikroskop nicht. Die laterale Positionierung der Spitze auf der Probenoberfläche erfolgt manuell über den Kapitel 2 beschriebenen x - y -Stelltisch mit einer Schrittweite von einigen 100 nm. Die eingeschränkte optische Zugänglichkeit der Substratoberfläche (durch zwei CCD Kameras) erlaubt es nicht, wie oben für die Elektronenmikroskopie beschrieben, eine Berührung der Spitze mit Präparationsrückständen zu vermeiden.

Im Rahmen einer Diplomarbeit wurde deshalb das Ziel gestellt, die Probenpräparation zu optimieren um die gewünschten Kriterien zu erfüllen. Es bot sich

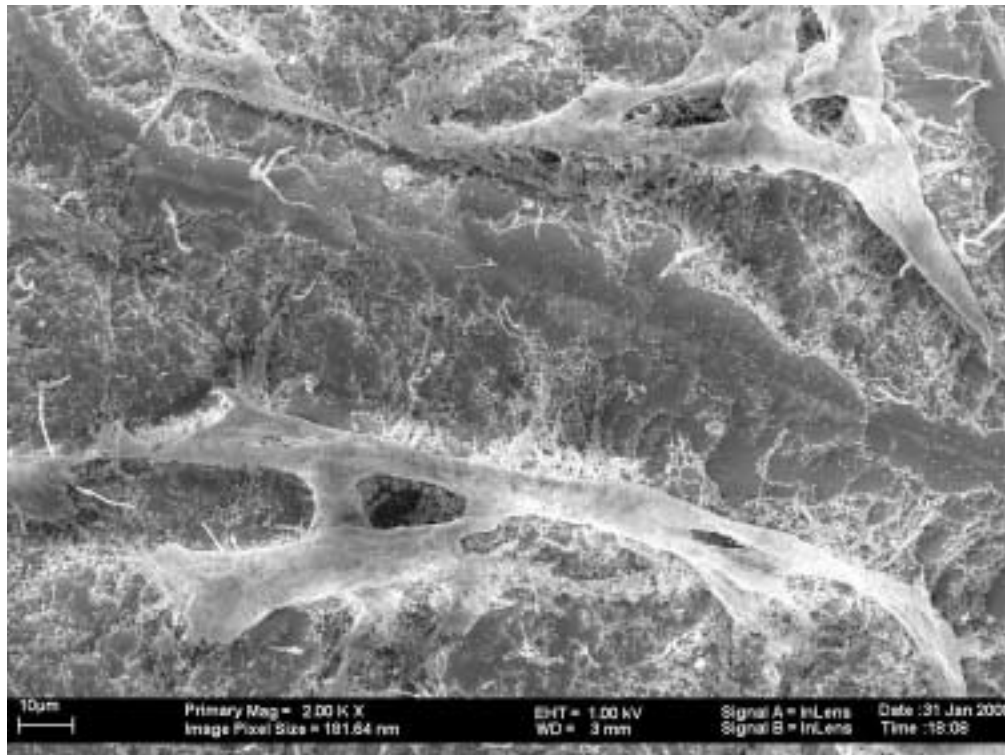


Abbildung 4.2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer eingefrorenen Lösung von T4-Bacteriophagen nach der Standardmethode. Durch den zu geringen Temperaturgradienten während des Einfriervorgangs wurden die einzelnen Viren und Lösungsreste zusammengeschoben und zu hohen Strukturen aufgetürmt. Nur noch wenige Viren liegen auf den freien Stellen des erkennbaren Silizium-Substrates. Abbildung entnommen aus [68].

an, diese umfangreichen Präparationsversuche mit dem Rasterelektronenmikroskop zu dokumentieren. Diese Experimente wurden bei der Firma Beiersdorf AG, Hamburg mit einem Gerät vom Typ LEO 1530 durchgeführt. Im Folgenden seien nun die Präparationsschritte, die letztendlich zum Erfolg führten, dargestellt; für Details sei auf die Diplomarbeit von R. Werner [68] verwiesen.

4.3 Die Präparationsmethode

Die T4-Viren wurden nach der sog. Bare-grid-Methode präpariert. Hierzu werden 2-3 μl Lösung des Virenpräparates auf ein mit 20 nm Kohlenstoff beschichtetes Saphirplättchen getropft. Es wird nach kurzer Einwirkzeit mehrfach mit destilliertem Wasser gespült, um Salzurückstände und auch überschüssige Viren zu entfernen und anschließend kurz mit Stickstoff abgeblasen. Das gut wärmeleitende Saphirstück wird dann mit hoher Geschwindigkeit in flüssiges Ethan eingeschossen, um das Abkühlen weiter zu beschleunigen. Nachdem die Probe nun erfolgreich immobilisiert wurde, folgt ein anschließendes Gefriertrocknen in der Präparationskammer. Das Gefriertrocknen ist einfach zu handhaben und ermöglicht eine langsame und kontrollierte Entwässerung der Probe.

4.3.1 Das Substrat

Die ersten Präparationsversuche wurden auf Silizium durchgeführt. Silizium schien als Substrat besonders geeignet, da es eine geringe Oberflächenkorrugation im nm-Bereich aufweist und durch Behandlung mit einem Plasmaglimmer¹ sehr leicht hydrophobisiert werden kann. Dies ist notwendig, da die Virenlösung auf die Probe aufgetropft wird und diese nur mit einer dünnen Restschicht Wasser gemeinsam eingefroren wird. Die Nachteile dieses Substrats liegen in seiner schlechten Wärmeleitfähigkeit und der relativ großen Masse (5 mm \times 5 mm \times 0.5 mm) der Stücke. Beim Einfrieren der Probe in flüssigem Stickstoff stellte sich heraus, dass der Temperaturgradient nicht ausreicht, um ein Eiskristallwachstum in der dünnen Wasserschicht zu unterdrücken. Die Konsequenzen sind sehr deutlich in Abbildung 4.3 zu erkennen.

Um die oben genannten Probleme zu umgehen, benutzen wir für die Präparation jetzt dünne Saphirplättchen mit einem Durchmesser von ca. 3 mm. Saphir besitzt sehr gute Wärmeleiteigenschaften und mit einer Dicke von nur einigen Mikrometern ist die Masse dieses Trägermaterials sehr gering. Auf diese Scheiben wird eine 20 nm dicke Kohlenstoffschicht aufgebracht und wiederum durch beglimmen in einer Plasmaanlage hydrophobisiert.

¹Das Siliziumstück wird in eine Vakuumröhre eingebracht, und es wird ein starkes elektromagnetisches Wechselfeld angelegt. Das Restgas in der Röhre wird ionisiert und Ladungen werden in die Siliziumoberfläche eingebracht. Gleichzeitig sorgen freie Radikale für eine Reinigung der Siliziumoberfläche.

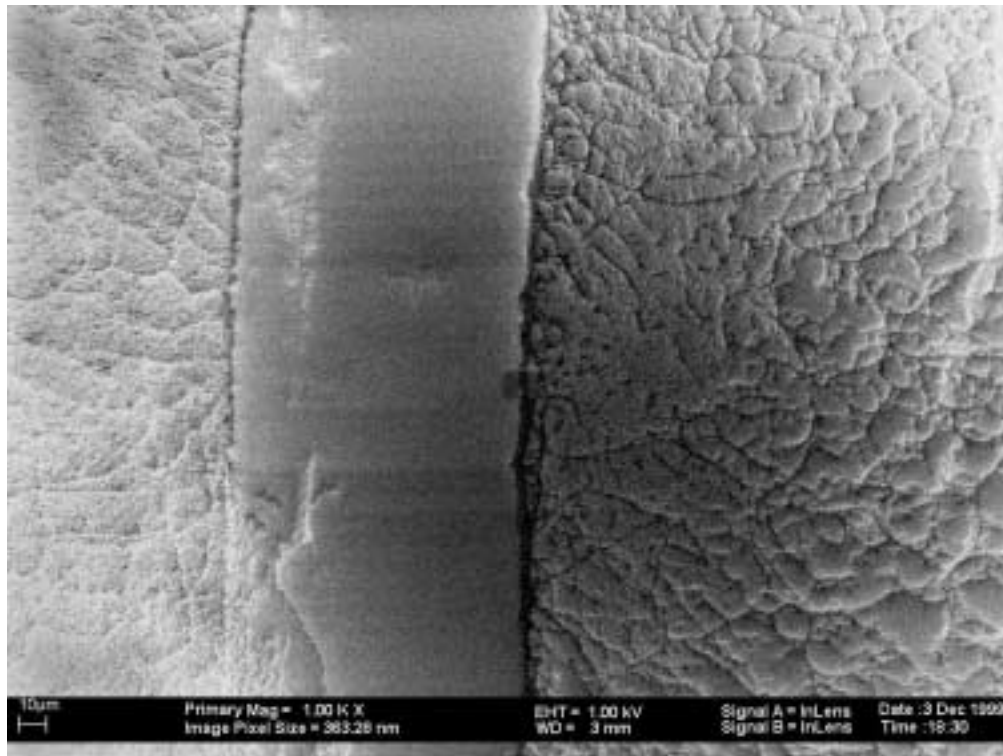


Abbildung 4.3: In dieser Abbildung erkennt man deutlich die Gefrierschäden durch Kristallisation, die bei einer Präparation auf einem Silizium-Substrat auftreten können. Man spricht von typischen Segregationsmustern, induziert durch das Eiskristallwachstum.

4.3.2 Die Reinigung

Wie in der Einleitung angedeutet, verhindern Salzurückstände und andere Verunreinigungen in der Lösung ein kontaminationsfreies Aufbringen der Viren auf den Träger. Insbesondere dienen solche Verunreinigungen beim Einfrieren der Probe als Keimzelle für den Beginn von Eiskristallwachstum. Es ist also wichtig, die aufgetropfte Lösung vor dem Einfrieren aufzureinigen. Zu diesem Zweck haben wir die Proben mehrfach mit doppelt destilliertem Wasser gespült, indem wir sie einfach über Kopf auf einen Tropfen destilliertes Wasser gelegt haben. Das überschüssige Wasser wurde dann von der Seite mit einem Filterpapier abgesaugt. Es hat sich gezeigt, dass bis zu sechs dieser Spülvorgänge nötig sind, um die gewünschte Reinheit zu erzielen. Eine Einwirkzeit von einigen Minuten nach dem Auftropfen der Lösung reicht, damit einige Viren fest mit dem Substrat verhaftet sind und sich nicht durch das Reinigen wieder lösen. Um den anschließenden Einfriervorgang zu beschleunigen, wurde zum Schluss der Lösungsrest mit einem Stickstoffstrahl kurz abgeblasen, so dass nur noch ein ganz dünner Film über den Viren liegt. Die Schwierigkeit dieser Methode besteht darin, sicherzustellen, dass nicht sämtliche Flüssigkeit vor dem Einfrieren verdampft, da dann das Wasser durch seine hohe Oberflächenspannung beim Eintrocknen alle Viren wie eine Art Walze zerdrücken würde. Dieser Effekt lässt sich sehr schön in Abbildung 4.4 beobachten.

4.3.3 Die Einfriermethode

Es hat sich herausgestellt, dass ein einfaches Eintauchen in flüssigen Stickstoff nicht ausreicht, um einen genügend hohen Temperaturgradienten während des Einfriervorgangs zu erzeugen, selbst wenn man die oben beschriebenen dünnen Saphirplättchen als Substrat verwendet. Wir verwenden als Kryogen jetzt flüssiges Ethan, welches in einem umgebenden Stickstoffbad knapp oberhalb seiner Gefriertemperatur gehalten wird. Das Substrat mit den Viren wird auf eine Pinzette montiert und am Ende eines Federarms eingespannt. Anschließend wird die Probe mit hoher Geschwindigkeit in das flüssige Kryogen eingeschossen (siehe Abb. 4.5). Die Vorteile dieser Methode liegen in der höheren spezifischen Wärmekapazität des Ethans gegenüber dem Stickstoff, d. h. die Wärme kann schneller abgeführt werden. Außerdem kommt aufgrund der niedrigen Temperatur nahe des Gefrierpunkts (Stickstoff hingegen befindet sich mit 77 K nahe des Siedepunktes) das Leidenfrostsche Phänomen, bei dem ein an der Oberfläche entstehender Gasfilm den Wärmetransport behindert, nicht zum Tragen. Da das Einfrieren ein dynamischer Prozess ist, sorgt die hohe Einschussgeschwindigkeit für ein gleichmäßigeres Einfrieren der gesamten Probenoberfläche.

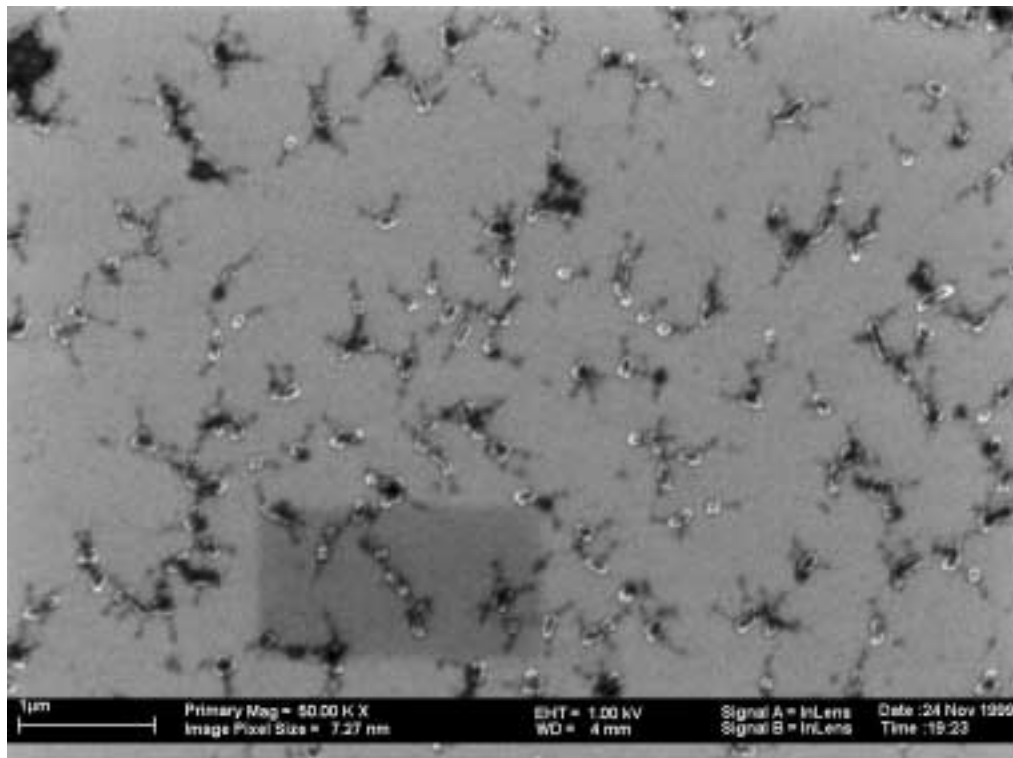


Abbildung 4.4: Wird mit dem Filterpapier sämtliches Wasser von der Substratoberfläche abgesaugt oder durch den Stickstoffstrahl weggeblasen, trocknen die Viren an Luft ein und werden von der Oberflächenspannung des Wassers zerdrückt. Abbildung entnommen aus [68].

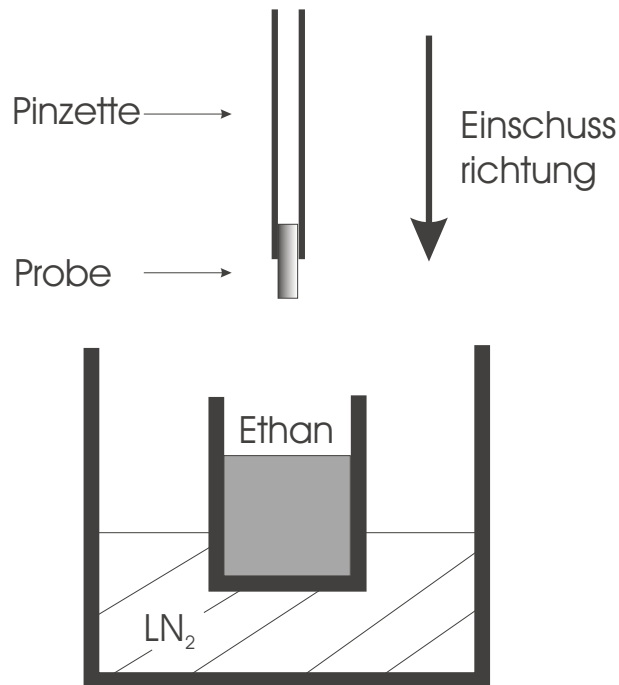


Abbildung 4.5: In dieser Abbildung wird die Einfrieremethode schematisch gezeigt. Die Probe wird mit hoher Geschwindigkeit in flüssiges Ethan eingeschossen; die Vorrichtung ähnelt der einer Guillotine.

4.3.4 Das Präparationsergebnis

Die Präparationskammer, in der die Viren nach dem Einfrieren gefriergetrocknet wurden, ist bereits in Kapitel 2 ausführlich beschrieben worden. Basierend auf Erfahrungswerten wurde eine Trocknungszeit von jeweils 15 Minuten bei 183 K und 223 K gewählt. Um das Wasser schonend zu entziehen, wurden diese Temperaturen durch ein vorsichtiges Aufheizen des Probenhalters erst nach einigen Minuten erreicht. Abbildung 4.6 zeigt das Ergebnis der vorgestellten Präparationsreihe, untersucht mit dem Rasterelektronenmikroskop. Nach mehr als 50 Versuchen wurden die gesteckten Ziele erreicht. Die Probenoberfläche ist sauber präpariert, die Viren liegen gleichmäßig auf dem Substrat verteilt, so dass einige Viren immer im Bildausschnitt der Rastereinheit liegen. Darüber hinaus wurden die Viren durch die Präparation nicht in ihrer Struktur geschädigt.

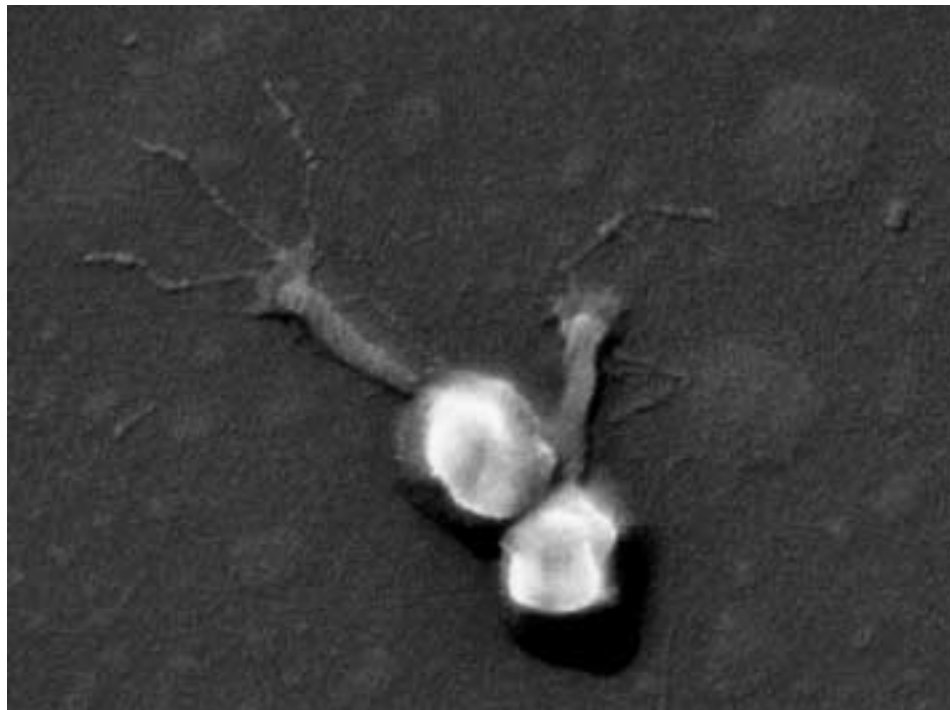
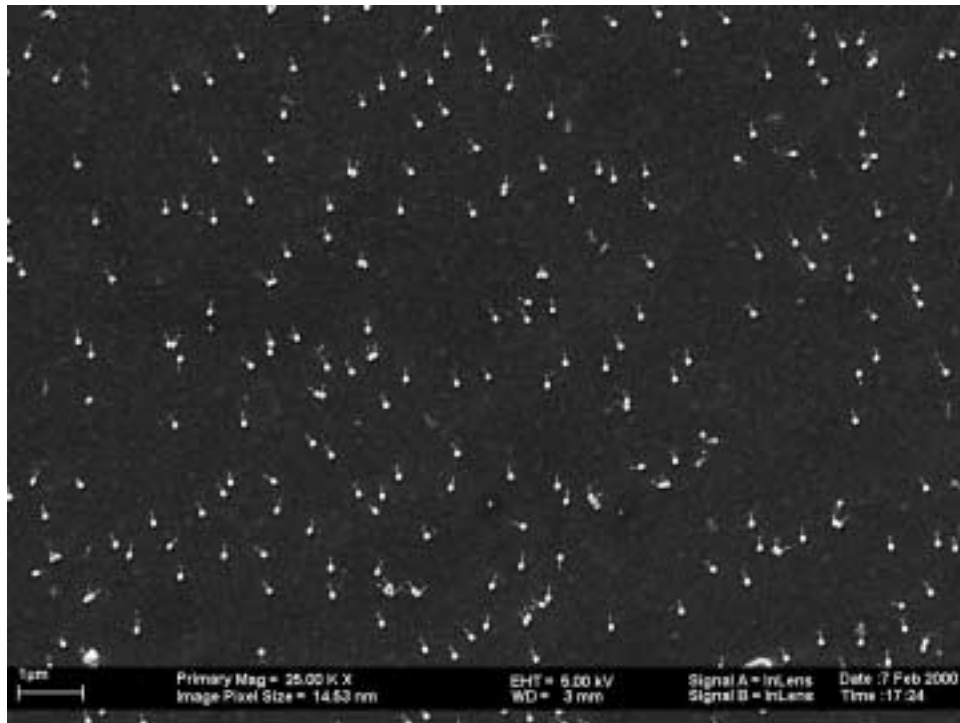


Abbildung 4.6: Oben: Übersichtsbild, welches die erfolgreiche Präparation der T4-Bakteriophagen zeigt. Unten: Hochaufgelöster Ausschnitt mit zwei Viren. Die helikale Schwanzstruktur und auch die Details der Phagenschwänze lassen sich klar erkennen. Die Präparation führt zu keinerlei Strukturschädigung. Abbildungen entnommen aus [68].

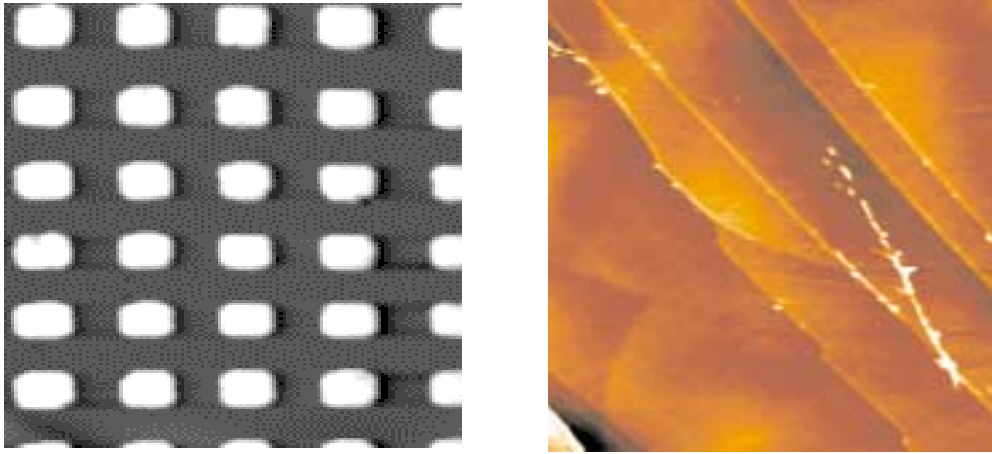


Abbildung 4.7: Erste Testmessungen. Links: Testgitter (Tiefe der hellen Strukturen: 180 nm, Gitterperiodizität: 10 nm); rechts: mono- und biatomare Spaltstufen auf Graphit (Bildgröße ca. $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$).

4.4 Untersuchungen mit dem Rasterkraftmikroskop

4.4.1 Testmessungen

Es fanden umfangreiche Testmessungen statt, um die Leistungsfähigkeit des Kryo-Rasterkraftmikroskops zu demonstrieren (vgl. Abb. 4.7). Anhand von Gitterstrukturen mit unterschiedlichen Periodizitäten ($2 \mu\text{m}$ - $10 \mu\text{m}$) fand zunächst noch unter Umgebungsbedingungen eine Eichung der piezoelektrischen Rasterseinheit statt. Der maximale Abbildungsbereich des Mikroskops konnte in diesen Messungen auf ca. $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ bestimmt werden.

Um Aussagen über die vertikale Auflösungsgrenze des Rasterkraftmikroskops im eingebauten Zustand treffen zu können, wurden Graphitproben unter UHV-Bedingungen untersucht (siehe Abb. 4.7, rechtes Bild). Die Messungen ergaben, dass monoatomare Stufen mit einer Höhe von 3.35 \AA sehr deutlich aufgelöst werden können, so dass mit einer Auflösung in z -Richtung von unter 1 \AA gerechnet werden kann. Dies stellt einerseits angesichts des sehr großen totalen Messbereichs des Mikroskops einen sehr guten Wert dar und ist andererseits auch zur Beobachtung größerer biologischer Strukturen mehr als ausreichend.

Abbildung 4.8 zeigt exemplarisch zwei Bilder aus einer Serie, die aufgenommen wurden, um den neuen Nichtkontaktbetriebsmodus zu testen. Die Graphitprobe wurde in der Präparationskammer unter Hochvakuumbedingungen frisch gespalten und nach dem Transfer in der Mikroskopkammer abgekühlt. Die UHV-Bedingungen in der Kammer ermöglichen es, die Probe über einen Zeitraum von mehreren Wochen kontaminationsfrei zu charakterisieren. Deutlich können im Nichtkontaktmodus und bei tiefen Temperaturen die atomaren Stufen (3.35 \AA)

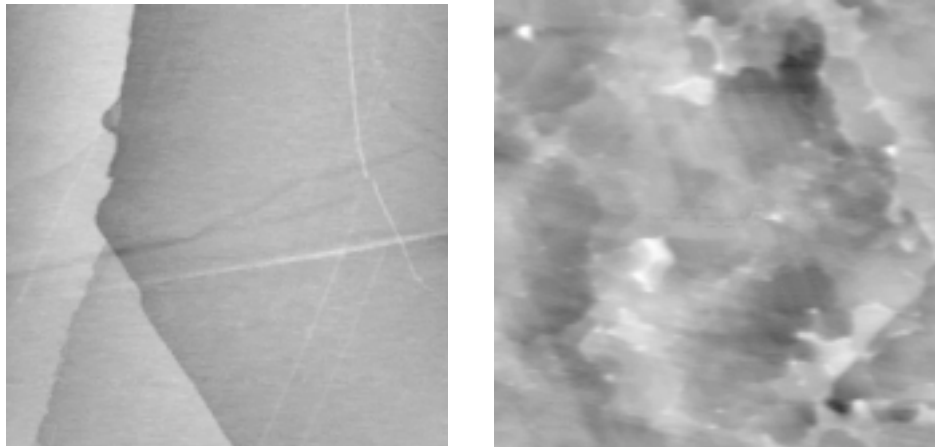


Abbildung 4.8: Links: Atomare Stufen auf Graphit (Temperatur: 120 K, Bildausschnitt: $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$, Anregungsamplitude: 15 nm, $\Delta f = 40$ Hz). Rechts: Au-Inseln auf Glimmer (Temperatur: 293 K, Bildausschnitt: $4 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$, Anregungsamplitude: 20 nm, $\Delta f = 50$ Hz)

der Spaltfläche aufgelöst werden. Der Goldfilm wurde auf frisch gespaltenem Glimmer präpariert. Hierzu wurde das Substrat in unserer Aufdampfanlage über Nacht bei ca. $500 \text{ }^\circ\text{C}$ ausgegast. Anschließend wurde ein Film von 100 nm Dicke bei einer Temperatur von ca. $300 \text{ }^\circ\text{C}$ und bei einem Aufdampfdruck von 1×10^{-6} mbar aufgebracht. Vor dem Einschleusen in die Vakuumkammer wurde die Probe für 12 Stunden bei $350 \text{ }^\circ\text{C}$ ausgeheilt. Diese Messungen erfolgten bei Raumtemperatur; man erkennt im Bild das charakteristische Inselwachstum des Au-Films mit einem durchschnittlichen Terrassendurchmesser von ca. 200-400 nm.

4.4.2 T4-Bakteriophagen

In diesem Abschnitt zeige ich erste Ergebnisse auf T4-Bakteriophagen, die mit dem von mir konstruierten Rasterkraftmikroskop erzielt wurden. Die Proben wurden nach dem obigen Verfahren präpariert und dann in einem Stickstoffbehälter zu der Präparationskammer gebracht. Sie werden unter flüssigem Stickstoff auf den Probenhalter (siehe Kapitel 2) montiert und auf der Spitze des Drehschiebemanipulators befestigt. Anschließend wird der Manipulator mitsamt Probenhalterung aus dem Stickstoffbad entfernt und an die Präparationskammer angeflanscht. Es wird sofort damit begonnen, ein Vorvakuum zu erzeugen, um die Probe möglichst schnell auf den gekühlten Tisch der Präparationskammer transferieren zu können. Diese Methode ist sehr zeitkritisch, denn ein Aufwärmen des Substrates über die Rekristallisationstemperatur von Wasser würde die Virenstruktur beschädigen. Deshalb ist die Probenaufnahme des Manipulatorstabes thermisch gut isoliert, die Zeit von der Entnahme der Probe aus dem

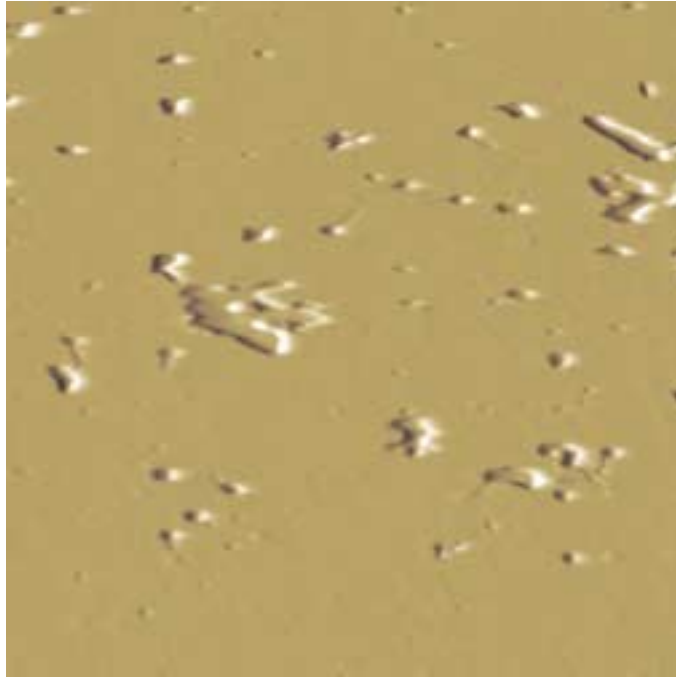


Abbildung 4.9: Dieses im Kontaktbetrieb entstandene Bild zeigt eine Übersichtsaufnahme von verteilt liegenden T4-Phagen. Deutlich zu erkennen sind die im Bildausschnitt liegenden Präparationsartefakte. (Temperatur : 293 K, Bildausschnitt: $4 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$)

flüssigen Stickstoff bis zum Transfer in die Präparationskammer beträgt nur ca. 30 Sekunden. Natürlich bildet sich trotzdem auf der Oberfläche durch Kondensation eine Eisschicht aus; diese beeinträchtigt die Virenstruktur allerdings nicht, da das bereits gefrorene Material unbehelligt bleibt. Sie lässt sich durch die anschließende Gefriertrocknung vollständig zusammen mit dem amorph gefrorenen Wasser entfernen. Nach der durchgeführten Gefriertrocknung wurden die Viren auf Raumtemperatur aufgewärmt und anschließend mit dem Rasterkraftmikroskop charakterisiert.

Die Abbildungen 4.9 und 4.10 zeigen exemplarisch die Aufnahme von mehreren T4-Bakteriophagen. Klar lassen sich die ikosahedrale Kopfstruktur und der Virusschwanz der T4-Bakteriophagen erkennen. Gerade in dem Übersichtsbild mit einem Bildausschnitt von $4 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$, werden aber auch die Schwierigkeiten der Probenpräparation deutlich. Trotz sorgfältiger Vorgehensweise bei der Herstellung der Proben lassen sich Verunreinigungen auf der Oberfläche nicht immer vermeiden. Deutlich erkennt man Rückstände auf der Substratoberfläche, die von den Salzurückständen in der Virenlösung herrühren.

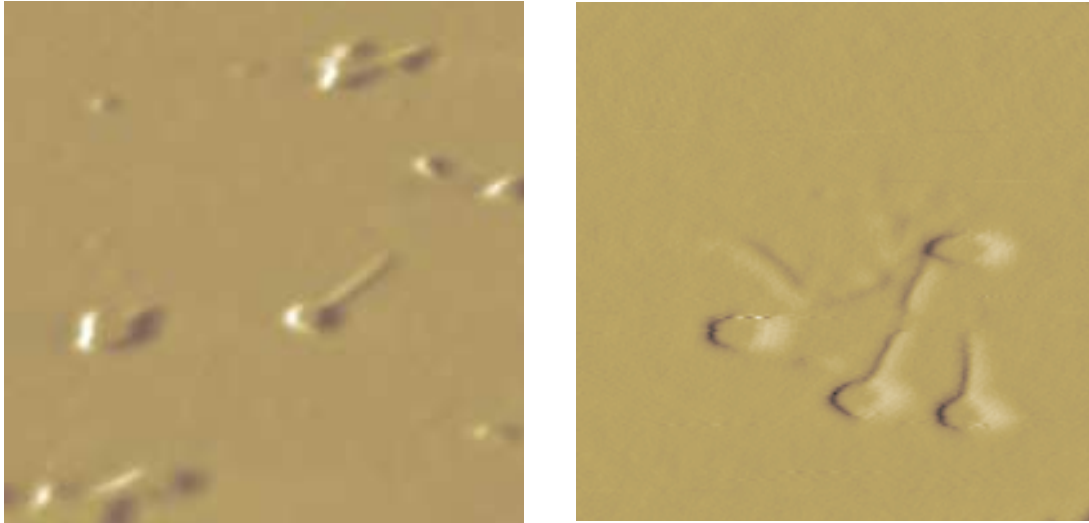


Abbildung 4.10: Kraftmikroskopische Aufnahmen des T4-Bakteriophagen im Kontaktmessbetrieb (Temperatur: 293 K, Bildausschnitt: $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$)

4.5 Diskussion und Ausblick

Zum jetzigen Zeitpunkt lässt sich die Auflösung, die mit Rasterelektronenmikroskopie auf diesem Probensystem möglich ist, noch nicht erreichen, obwohl auf den Testsystemen (z. B. Graphit) gezeigt werden konnte, dass die Stabilität des bestehenden Aufbaus ausreicht, um atomare Stufenkanten zu vermessen. Dies liegt zum einen an der Tatsache, dass die verwendete Rastereinheit des Mikroskops mit einem Bildausschnitt von ca. $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ nicht für hohe laterale Auflösung geeignet ist. Zum anderen sind die zu charakterisierenden Proben, insbesondere die Kopfstruktur mit einigen zehn Nanometern, sehr hoch, was ein Regelproblem für unsere Elektronik darstellen könnte. Als Lösung dieses Problems bietet sich an, sich zunächst nur auf die Phagenschwänze mit einer durchschnittlichen Höhe von einigen Nanometern zu konzentrieren. Präparationsmethoden, die ausschließlich der Herstellung dieser Schwanzstrukturen dienen, sind aus rastertunnelmikroskopischen Untersuchungen bekannt.

Die vorliegenden Daten der T4-Bakteriophagen wurden bisher ausnahmslos im Kontaktmodus aufgenommen, da zum Zeitpunkt der Messungen der Nichtkontaktmodus noch nicht implementiert war und dieser deshalb nur auf Graphit und Gold getestet werden konnte. Damit ergeben sich die bereits in den Grundlagen der Rastersondenmikroskopie diskutierten Schwierigkeiten, die durch einen Kontakt mit der Oberfläche der Probe entstehen und letztendlich zu einer Abstumpfung der Spitze führen.

Als weiterführende Alternative zu den Bakteriophagen kommen als Modellsystem auch 2D-Proteinkristalle in Frage, deren Präparation aus Untersuchungen in der Flüssigkeitszelle bekannt ist [69, 70, 71]. Diese kristallinen Schichten, die

sich aus einer Lage von Bakterienzellen (Protein des *Bacillus sphaericus*) aufbauen, bieten den Vorteil einer grossflächigen Verteilung auf der Probenoberfläche. Darüber hinaus liegt die Oberflächenkorrugation im Bereich von nur 1-2 nm, was insbesondere für den Nichtkontaktmessbetrieb von großem Vorteil sein wird.

Zur Zeit wird eine neue Rastereinheit aufgebaut, die mit einem Scanbereich von $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ und einigen Verbesserungen beim Design, der Problemstellung sehr viel besser angepasst sein wird. Gerade in Kombination mit dem bereits auf verschiedenen Systemen getesteten Nichtkontaktbetriebsmodus erscheint dies als Möglichkeit, die Auflösung deutlich zu steigern.

Die Leistungsfähigkeit des verbesserten Kryo-Rasterkraftmikroskopiegeräts soll dann exemplarisch an drei konkreten Problemstellungen demonstriert werden:

1. Strukturelle Untersuchung der Lipidbarriere der Haut auf molekularer Ebene.
2. Quantitative Bestimmung mikroskopischer Elastizitätsmodule von immobilisierten Hautproben.
3. Charakterisierung des Anbindeverhaltens selbstklebender Produkte an vorbehandelte Hautproben sowie deren Vernetzungsmechanismen und Homogenität.

Im Erfolgsfall eröffnet ein solches Kryo-Rasterkraftmikroskop mit molekularer Auflösung vollkommen neue Perspektiven für die Forschung im Bereich der Molekularbiologie und könnte mindestens gleich bedeutend werden wie NMR-, Röntgen- oder Elektronenstrahl-basierte Strukturaufklärungsverfahren. Dementsprechend ergäbe sich ein bedeutsames Marktpotential für ein solches Kryo-Rasterkraftmikroskop in der biologischen Forschung.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Es wird eine allgemeine Einführung in die Grundprinzipien der Kraftmikroskopie gegeben, wobei die Anwendung dieser Technik auf biologische Proben im Vordergrund steht und insbesondere der für die Abbildung auf molekularer Skala bedeutsame Nichtkontaktmessbetrieb vorgestellt wird. Der Hauptteil der Arbeit gliedert sich in drei thematische Schwerpunkte. Der erste umfasst die Instrumentierung dieser neuartigen Anlage; es werden alle funktionellen Einheiten des Mikroskops beschrieben und das für den Betrieb notwendige Vakuumsystem erläutert. Der zweite Teil ist den Präparationsverfahren gewidmet, mit denen die Proben für die Charakterisierung vorbereitet werden, und der letzte Teil beschäftigt sich schließlich mit unserem ersten biologischen Testsystem, dem T4-Bakteriophagen, einem Virus.

Instrumentierung

Es wurde ein Kryo-Rasterkraftmikroskop entwickelt, welches speziell für die Abbildung biologischer Proben optimiert wurde. Die Einheit ist in ein Vakuumkammersystem integriert, welches aus einer Schleuse, einer Präparations- und Analysekommer besteht. Die Schleuse dient dem Proben- und Spitzentransfer. Durch einen ausgeklügelten Mechanismus besteht die Option, die schockgefrorenen Proben unter Hochvakuumbedingungen und tiefen Temperaturen mit einem Kryo-Elektronenmikroskop auszutauschen. In der Präparationskommer lassen sich die biologischen Proben gefriertrocknen. Ebenso ist es möglich, in situ Gefrierbrüche vorzunehmen, um eine saubere Oberfläche zu präparieren. Während der Abbildung in der Analysekommer werden die Proben durch einen Durchflusskryostaten mit flüssigem Stickstoff auf bis zu 120 K gekühlt. Die Kryokette ist also von dem Einfrieren der Probe, über das Einschleusen und Präparieren bis zur Untersuchung geschlossen.

Das Mikroskop selbst ist durch eine Wirbelstrombremse schwingungsgedämpft in der Analysekommer aufgehängt und befindet sich auf Raumtemperatur. Da die Probe aktiv gekühlt wird und dadurch fest mit dem Flusskryostaten verbunden

ist, muss konsequenterweise die Spitze des Kraftmikroskops inklusive Detektionsmechanismus über die Probe mit einem maximalen Bildausschnitt von $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ gerastert werden. Ich benutze ein interferometrisches Detektionssystem, um die Verbiegung des Federbalkens zu messen, da dieses gegenüber anderen Verfahren, wie z.B. dem Prinzip der Laserstrahlableitung, im Ultrahochvakuum ohne zusätzliche Stellelemente auskommt. Die Grobannäherung der Spitze an die Probe wird über einen Schrittmotor, der nach dem Walker-Prinzip funktioniert, realisiert. Ein x - y -Verschiebetisch ermöglicht die laterale Verschiebung der Spitze in einem Bereich von $10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$. Dadurch ist es möglich, mehrere verschiedene Probenareale zu untersuchen und dient der Steigerung der Messeffizienz. Der Scanner besteht aus einer Anordnung zweier konzentrischer Piezoröhren, von denen die äußere die Rasterbewegung ausführt, während die innere die Glasfaser hält und für die Abstandsregelung zwischen Faserende und Federbalken verantwortlich ist.

Präparation

Grundvoraussetzung für die hochauflösende Abbildung biologischer Systeme im molekularen Bereich ist die Kryotechnik, mit der die biologischen Proben eingefroren werden, um eine festkörperähnliche Oberfläche zu erzeugen. Dadurch wird die Reduzierung der Auflösung vermieden, die bei Messungen unter Umgebungsbedingungen oder in einer Flüssigkeitszelle durch die Deformation des weichen biologischen Materials auftreten. Es werden die verschiedenen denkbaren Verfahren diskutiert, Proben mit Kryomethoden für die Abbildung vorzubereiten. Die Kryoimmobilisation (durch flüssigen Stickstoff oder Ethan) erlaubt eine schnelle Arretierung der gesamten Probe, ohne bestimmte Prozesse oder biochemische Reaktionen zu bevorzugen. Ziel dieser Fixation ist es, das Material mit hoher Kühlrate synchron einzufrieren und die Hauptkomponente - das Wasser - in einen amorphen Zustand zu überführen, um gleichzeitig Kristallisationseffekte zu unterdrücken.

T4-Bakteriophagen als biologisches Testsystem

In Kombination mit der hochauflösenden Nichtkontaktkraftmikroskopie (wahre atomare Auflösung) unter UHV-Bedingungen erhält man ein Verfahren, mit dem molekulare Strukturuntersuchungen an einer Vielzahl unterschiedlicher Proben möglich ist. Es wird die Leistungsfähigkeit des neuen Designs anhand von einigen Testsystemen (Graphit und Gold), die mit Nichtkontaktkraftmikroskopie abgebildet wurden, demonstriert. Darüber hinaus stelle ich als erstes biologisches Untersuchungsobjekt Messungen und auch die für die Kraftmikroskopie optimierte Präparation von T4-Bakteriophagen (Virus) vor.

Literaturverzeichnis

- [1] P. Fr. Schmidt, L. J. Balk, R. Blaschke, *Praxis der Rasterelektronenmikroskopie und Mikrobereichsanalyse*, Expert-Verlag (2000)
- [2] L. Reimer, *Scanning Electron Microscopy Physics of Image Formation and Microanalysis*, Springer, Berlin (1998)
- [3] K. Wetzig, D. Schulze, *In situ Scanning Electron Microscopy in Materials Research*, Wiley-VCH (1995)
- [4] L. Reimer, G. Pfefferkorn, *Raster-Elektronenmikroskopie*, Springer, Berlin (1977)
- [5] Georg Masuch, *Abiturwissen Zellbiologie*, Klett-Verlag.
- [6] G. Binnig, C. F. Quate und C. Gerber, Phys. Rev. Lett. **56**, 939 (1986).
- [7] S. Kasas, N. H. Thomson, B. L. Smith, P. K. Hansma, J. Miklossy, and H. G. Hansma, Int. J. Imaging Syst. Technol. **8**, 151 (1997).
- [8] S. A. C. Gould, B. Drake, C. B. Prater, A. L. Weisenhorn, S. Manne, H. G. Hansma, J. Massie, M. Longmire, V. Elings, B. Dixon Nothern, B. Mukergee, C. M. Peterson, W. Stoeckenius, T. R. Albrecht, and C. F. Quate, J. Vac. Sci. Technol. A **8**, 369 (1990).
- [9] Z. Shao, J. Mou, D. M. Czajkowsky, J. Yang, and J.-Y. Yuan, Adv. Phys. **45**, 1 (1996).
- [10] J. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, 2nd. edition, Academic Press, London, 1992.
- [11] M. Radmacher, M. Fritz, H. G. Hansma, and P. K. Hansma, Science **265**, 1577 (1994).
- [12] H. Hölscher, U. D. Schwarz, and R. Wiesendanger, Europhys. Lett. **36**, 19 (1996).
- [13] H. Hölscher, U. D. Schwarz, O. Zwörner, and R. Wiesendanger, Phys. Rev. B **57**, 2477 (1998).

- [14] F. Ohnesorge and G. Binnig, *Science* **260**, 1451 (1993).
- [15] F.-J. Giessibl, *Science* **267**, 68 (1995).
- [16] Y. Sugawara, M. Otha, H. Ueyama, and S. Morita, *Science* **270**, 1646 (1995).
- [17] Proceedings of the First International Workshop on Noncontact Atomic Force Microscopy, *Appl. Surf. Sci.* **140** (1999).
- [18] In Ref. [14], wurde wahre atomare Auflösung auch in Flüssigkeiten gezeigt. Dieser Betriebsmodus ist aber schwer zu stabilisieren und funktioniert nur auf ausgewählten Materialien. Daher wurde bisher nur ein weiterer Bericht über wahre atomare Auflösung in Flüssigkeiten publiziert (J. P. Cleveland, M. Radmacher, and P. K. Hansma, in: *Forces in Scanning Probe Methods*, ed. by H.-J. Güntherodt, D. Anselmetti, and E. Meyer, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995, pp. 543-549).
- [19] C. B. Prater, M. R. Wilson, J. Garnaes, J. Massie, V. B. Elings, and P. K. Hansma, *J. Vac. Sci. Technol. B* **9**, 989 (1991).
- [20] K. Luo, M. Yorgancioglu, and D. Keller, *Ultramicroscopy* **50**, 147 (1993).
- [21] J. Mou, J. Yang, and Z. Shao, *Rev. Sci. Instrum.* **64**, 1483 (1993).
- [22] J. H. Müller, Diplomarbeit, Universität Hamburg (1996).
- [23] G. Binnig und H. Rohrer; *Helv. Phys. Acta* **55**, 726 (1982)
- [24] R. Wiesendanger, *Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy*, Cambridge University Press, Cambridge (1994).
- [25] U.D. Schwarz, *Scanning Force Microscopy in Handbook of Microscopy*, S. Amelinckx, S. Van Dyck, J. Van Landuyt, G. Van Tendelor (Hrsg.), Verlag VCH, Weinheim (1996).
- [26] D. Sarid, *Scanning Force Microscopy*, Oxford University Press, New York 1991.
- [27] H. Hölscher, W. Raberg, U. D. Schwarz, A. Hasbach, R. Wiesendanger, and K. Wandelt, *Phys. Rev. B* **59**, 1661 (1999).
- [28] S. Fujisawa, Y. Sugawara, and S. Morita, *Phil. Mag. A* **75**, 1327 (1996).
- [29] C. M. Mate, G. M. McClelland et al., *Phys. Rev. Lett.* **59**, 1942 (1987).
- [30] Y. Martin, W. Abraham und H. K. Wickramasinghe. *Appl. Phys. Lett.* **52**, 1103-1105, 1988.

- [31] J. E. Stern, B. D. Terris, H. J. Mamin und D. Rugar. *Appl. Phys. Lett.* **53**, 2717-2719, 1988.
- [32] P. Grütter, H. J. Mamin und D. Rugar. Magnetic force microscopy. In: *Scanning Tunneling Microscopy II*, R. Wiesendanger und H.-J. Güntherodt, Hrsg., S. 151-208. Springer-Verlag: Heidelberg, 1992.
- [33] A. Wadas. Magnetic force microscopy. In: *Handbook of Microscopy*, S. Amelynckx, D. van Dyck, J. F. van Landuyt und G. van Tendeloo, Hrsg., S. 845-884. VCH Verlagsgesellschaft, 1997.
- [34] Nanoscope III - User Manual, Digital Instruments GmbH, Deutschland
- [35] S. Kitamura and M. Iwatsuki, *Jpn. J. Appl. Phys.* **34**, L145 (1995).
- [36] R. Lüthi, E. Meyer, M. Bammerlin, A. Baratoff, T. Lehmann, L. Howald, C. Gerber, and H.-J. Güntherodt, *Z. Phys. B* **100**, 165 (1996).
- [37] M. Bammerlin, R. Lüthi, E. Meyer, A. Baratoff, M. Guggisberg, Ch. Gerber, L. Howald, and H.-J. Güntherodt, *Probe Microscopy* **1**, 3 (1997).
- [38] K. Fukui, H. Onishi, and Y. Iwasawa, *Phys. Rev. Lett.* **79**, 4202 (1997).
- [39] W. Allers, A. Schwarz, U.D. Schwarz, and R. Wiesendanger, *Appl. Surf. Sci.* **140**, 247 (1999).
- [40] W. Allers, A. Schwarz, U.D. Schwarz, and R. Wiesendanger, *Europhys. Lett.* **48**, 276 (1999).
- [41] T. R. Albrecht, P. Grütter, D. Horne und D. Rugar, *J. Appl. Phys.* **69**(2), 668-673 (1991).
- [42] U. D. Schwarz, Habilitation, Universität Hamburg 1999.
- [43] W. Allers, Dissertation, Universität Hamburg (1998)
- [44] A. Schwarz, Dissertation, Universität Hamburg (1998)
- [45] Omicron Vakuumphysik GmbH, Taunusstein, Deutschland.
- [46] S. H. Pan; International Patent Application Number PCT/GB93/00539
- [47] Eingetragenes Warenzeichen der Firma Corning Glass Works, USA
- [48] Gebrüder Wild: Technische Steine, Idar-Oberstein, Deutschland
- [49] Berger-Bachmann AG, Schweiz

- [50] Laserdiode SLD201-V; Sony Deutschland Vertrieb: Optilas GmbH, Puchheim, Deutschland
- [51] OZ-Optics Faradayisolator und Koppler; Vertrieb: Spindler und Hoyer, Göttingen, Deutschland
- [52] Gould 2x2-Faserkoppler für 780 nm; Vertrieb: Laser Components GmbH, Olching, Deutschland
- [53] Philips Si-PIN-Photodiode BPF40; Vertrieb: Laser Components GmbH, Olching, Deutschland
- [54] Rugar, D., Mamin, H. J. and Guethner, P. (1989). *Appl. Phys. Lett.* **55**, 2588.
- [55] Staveley Sensors, INC., East Hartford, CT, USA
- [56] Sintec Keramik GmbH, Halblech, Deutschland
- [57] User-Manual, Baltec AG, Liechtenstein
- [58] Pfeiffer Vacuum Technology AG, Asslar, Deutschland
- [59] Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
- [60] S. Carstens, Diplomarbeit, Fachhochschule Hamburg (1996)
- [61] TopSystem II, Oxford Instruments, England
- [62] R. Dombrowski, Dissertation, Universität Hamburg
- [63] Moor, H., Bellin, G., Sandri, C., Akeret, K. (1980) The influence of high pressure freezing on mammalian nerve tissue. *Cell Tissue Res*, 209, 201-216
- [64] Moor, H. (1987) Theory and practice of high pressure freezing. In: *Cryotechniques in Biological Electron Microscopy* (ed. by Steinbrecht, R. A., Zierold, K.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 175-191
- [65] C. K. Mathews, E. M. Kutter, G. Mosig and P. B. Berget, *Bacteriophage T4*, American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1983).
- [66] M. Amrein, R. Dürr, H. Winkler, G. Travaglini, R. Wepf and H. Gross, *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research* **102**, 170-177 (1989).
- [67] V. Guénebaut, M. Maaloum, M. Bonhivers, R. Wepf, K. Leonard, J. K. H. Hörber, *Ultramicroscopy* **69**, 129-137 (1997).
- [68] R. Werner, Diplomarbeit, Universität Hamburg (2000)

- [69] Pum, D., Weinhandl, M., Hödl, C., and Sleytr, U. B. (1993) Large scale recrystallization of the S-layer of *Bacillus coagulans* E38-66 at the air/water interface and on lipid films, *J. Bacteriol.* **175**, 2762-2766.
- [70] Pum, D., and Sleytr, U. B. (1994) Large scale reconstitution of crystalline bacterial surface layer (S-layer) proteins at the air/water interface and on lipid films, *Thin Solid Films* **244**, 882-886.
- [71] Pum, D., and Sleytr, U. B. (1995) Monomolecular reassembly of a crystalline bacterial surface layer (S-layer) on untreated and modified silicon surfaces, *Supramol. Sci.* **2**, 193-197.

Danksagung

- Ich danke Herrn Prof. Dr. R. Wiesendanger für die Anregung und Unterstützung dieser experimentellen Arbeit und für die mir gewährte Freiheit während ihrer Durchführung.
- Herrn Dr. Udo Schwarz, meinem direkten Betreuer, möchte ich für seine ständige Hilfsbereitschaft während aller Stadien dieser Arbeit herzlich danken. Seine fachkundigen Anregungen und Ratschläge, basierend auf großer Erfahrung auf dem Gebiet der Rasterkraftmikroskopie, haben mir immer wieder weitergeholfen und mich in schwierigen Phasen neu motiviert.
- Großen Dank schulde ich auch Herrn Dr. R. Wepf von der Zentralanalytik Beiersdorf für die überaus fruchtbare Zusammenarbeit. Wohltuend seine nachsichtige Geduld angesichts gewisser Schwierigkeiten bei der Probenaufbereitung für das Kryo-Rasterkraftmikroskop!
- Tobias Richter und Richard Werner haben mich als Diplomanden ein Stück auf dem zeitweise auch etwas steinigen Entwicklungsweg begleitet. Ihre Diskussionsfreude, wissenschaftliche Neugier und Einsatzbereitschaft haben uns - trotz aller gegensätzlichen Charaktere (!) - zu einem echten Team werden lassen.
- Mit Dr. W. Allers, Dr. A. Schwarz und Dipl. Phys. Shenja Langkat hatte ich ein gemeinsames Arbeitszimmer; ich erinnere mich an eine kreative Atmosphäre mit vielen - darunter auch fachbezogenen! - Diskussionen, die den Fortgang unserer Arbeiten mitbestimmten (A.S.: Hör auf meine Worte!). Danke für die schöne Zeit!
- Allen - und besonders auch den nicht namentlich aufgeführten - Mitgliedern der Arbeitsgruppe Wiesendanger nochmals vielen Dank für ein über die Jahre hinweg angenehmes Arbeitsklima.
- Mein ganz besonderer Dank gilt schließlich meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichten und mir viele Jahre jegliche Unterstützung gewährten.