1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis 1

2 Einleitung 4

3 Holographie 7

3.1 In-line Holographie 8

3.2 Holographie mit Elektronen 10

3.3 Holographie mit niederenergetischen Elektronen 12

3.3.1 Feldemission 13

3.3.2 Ultrascharfe Feldemitter 19

3.3.3 Das Elektronen-Projektionsmikroskop 21

3.4 Theorie zur Holographie mit niederenergetischen Elektronen 23

3.4.1 Streutheorie 23

3.4.2 Rekonstruktion 26

4 Elektronen-Projektionsmikroskop 28

4.1 Aufbau der Apparatur 28

4.1.1 Vakuumanlage 28

4.1.2 Mechanischer Aufbau 29

4.1.3 Elektronischer Aufbau 34

4.2 Ultrascharfe Feldemissionsspitzen 36

4.2.1 Präparation von Spitzen 36

4.3 Objektträger für Holographie mit niederenergetischen Elektronen 38

4.3.1 Mikrostrukturen auf Siliziummembranen 38

4.3.2 Kohle-Lochfolien 40

4.3.3 Goldfolien 40

5 Phthalocyaninatopolysiloxan PcPS 42

5.1 Präparation von Phthalocyaninatopolysiloxan (PcPS) 45

5.2 Ergebnisse und Diskussion 46

6 DNA 51

6.1 Präparation von DNA 54

6.2 Ergebnisse und Diskussion 54

6.2.1 DNA auf Kohle-Lochfolien 54

6.2.2 DNA auf strukturierten Siliziummembranen 59

6.2.3 Vergleich mit anderen Arbeiten 62

7 Der Komplex von cis-Platin an DNA 64

7.1 Präparation des Adduktes von cis-Platin an DNA 66

7.2 Ergebnisse und Diskussion 68

7.2.1 Das cis-Platin-Addukt an DNA auf Kohle-Lochfolien 68

7.2.2 Das cis-Platin Addukt an DNA auf strukturierten Siliziummembranen 73

8 DNA-Nanostrukturen 76

8.1 Präparation von DNA-Nanostrukturen 78

8.1.1 Aufbringen der Lösung auf eine mit UV/Ozon behandelte mikrostrukturierte Siliziummembran und Abziehen der Lösung durch ein Filterpapier 80

8.1.2 Verwendung von SAM-modifizierten mikrostrukturierten Siliziummembranenen 81

8.1.3 UV/Ozon behandelte mikrostrukturierte Siliziummembranen und Abspülen der Lösung 82

8.2 Ergebnisse und Diskussion 83

8.2.1 Aufbringen der Lösung auf mit UV/Ozon behandelte mikrostrukturierte Siliziummembranen und Abziehen der Lösung durch ein Filterpapier 83

8.2.2 Verwendung von SAM-modifizierten mikrostrukturierten Silizium-membranen 84

8.2.3 UV/Ozon behandelte mikrostrukturierte Siliziummembranene und Abspülen der Lösung 85

9 Simulationen mit LEEPS 89

9.1 Simulationen von PcPS 89

9.2 Simulationen von DNA 94

9.3 Simulation des Addukts von cis-Platin an DNA 101

10 Die holographischen Abbildungen der verschiedenen Objekte im Vergleich .. 110

11 Zusammenfassung 114

12 Literaturverzeichnis 116

2 Einleitung

Die atomare Struktur von Molekülen ist nicht nur für Chemiker von großem Interesse. Auch für die Biologie und die Pharmazie ist die Kenntnis der Molekülstruktur zum Verständnis biochemischer Abläufe von Bedeutung.

Für Makromoleküle ist die routinemäßig angewendete Methode zur Strukturaufklärung die Kristall-Strukturanalyse. Dazu benötigt man eine translatorisch geordnete Probe, d.h. einen Einkristall. Es erfordert viel Geschick, Einkristalle von Makromolekülen mit einer Größe von 0,1 bis 0,5 mm herzustellen. Deshalb werden alternative Methoden zur Strukturaufklärung benötigt.

In den letzten Jahrzehnten sind verschiedene mikroskopische Methoden mit dem Ziel, eine atomare Auflösung zu erreichen, entwickelt worden. Die Rastertunnelmikroskopie (STM) ermöglicht die atomare Abbildung von Festkörperoberflächen. Die Oberfläche muß jedoch leitend sein, da diese Methode den Tunneleffekt ausnutzt.

Eine Modifikation des STM ist die Rasterkraftmikroskopie, welche die Federkraft ausnutzt. Da die Rasterkraftmikroskopie die direkte Abbildung von nicht leitenden Proben auch in Lösungen ermöglicht, ist sie gerade auch für biologische Moleküle interessant. Eine atomare Auflösung biologischer Objekte kann jedoch derzeit mit dieser Methode nicht erreicht werden.

Auch mit der Elektronenmikroskopie wird das Ziel der atomaren Strukturauflösung verfolgt. Man unterscheidet dabei zwischen der Rasterelektronenmikroskopie und der Transmissionselektronenmikroskopie.

Bei der Rasterelektronenmikroskopie wird die Probenoberfläche mit einem fokusierten Elektronenstrahl abgerastert. Mit dieser Methode kann eine Auflösung bis zu 1 nm erreicht werden.

Im Gegensatz dazu wird bei der Transmissionselektronenmikroskopie das Objekt großflächig beleuchtet. Die eingesetzte Beschleunigungsspannung von bis zu 1000 kV kann durch die apparativen Gegebenheiten eine Auflösung im atomaren Bereich ermöglichen. Die Schichtdicke der Probe und der geringe Kontrast von organischen

Verbindungen gegen den hochenergetischen Elektronenstrahl wirken sich jedoch negativ auf die Auflösung aus (Winter und Noll, 1998).

Eine weitere Methode zur atomaren Auflösung von Polymeren ist die Kendroskopie. Sie ist eine auf der geradeaus-Holographie basierende Mikroskopietechnik, die erstmals 1990 von Fink et. al. vorgestellt wurde (Fink et al., 1990).

Eine ultrascharfe Wolframspitze liefert dabei die zur Holographie benötigte kohärente Strahlung. Der Elektronenstrahl muß nicht fokusiert werden, da mit der ultrascharfen Wolframspitze eine Elektronenquelle in atomarer Größenordnung vorliegt. Eine Aberration durch elektrostatische oder magnetische Linsen tritt somit nicht auf.

Die Elektronenquelle wird in einem Elektronen-Projektionsmikroskop bis auf Abstände < 1 µm an ein semitransparentes Objekt angenähert. Ein Teil der aus der Punktquelle emittierten Wellenfunktion eines Elektrons wird an dem Objekt gestreut (Objektwelle). Dieser interferiert mit dem ungestreuten Anteil der Wellenfunktion (Referenzwelle) und es entsteht ein Hologramm. Um daraus Informationen über die Lage der Streuzentren zu gewinnen, muß die Wellenfront in der Objektebene rekonstruiert werden. Dazu muß das Hologramm mit kohärenter Strahlung beleuchtet werden. Dies kann numerisch mit einem Rekonstruktionsalgorithmus beruhend auf der Kirchhoff-Helmholtz-Transformation erfolgen (Kreuzer et al., 1992).

Verschiedene Arbeitsgruppen führen derzeit Experimente zur Holographie mit niederenergetischen Elektronen durch. Es ist die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit, geeignete Objektträger für die Holographie mit interessanten Objekten zu präparieren und diese holographisch abzubilden.

Für die ersten Experimente wurden Moleküle gewählt, die eine charakteristische und bekannte Struktur besitzen. Das erste Objekt war somit Phthalocyaninatopolysiloxan, ein kettensteifes Polymer, das aus aneinandergereihten Phthalocyanineinheiten besteht.

Die DNA ist in mehrfacher Hinsicht von Interesse. Diese liegt als Doppelhelix mit einer charakteristischen Furchung vor. Außerdem bietet sie die Möglichkeit, andere Moleküle anzubinden, wie z.B. das Cytostatikum cis-Platin.

Ein zweidimensionales Netzwerk aus DNA war ein weiteres Objekt. Da diese Nanostruktur aus synthetischer DNA hergestellt wird, kann die Nucleinsäuresequenz

variiert werden. DNA-bindende Proteine könnten somit gebunden an die Nanostruktur als Objektträger abgebildet werden. Dies könnte Strukturanalysen ermöglichen, ohne daß Einkristalle der Proteine gezüchtet werden müßten.

Die zur Rekonstruktion verwendete Software LEEPS bietet auch die Möglichkeit, Hologramme zu simulieren, mit denen die Abbildungen im Elektronen-Projektionsmikroskop verglichen werden können.

Die Erfahrungen, die bei den Experimenten im Rahmen dieser Arbeit gesammelt wurden, sollen der Konzeption einer verbesserten Apparatur, die an anderer Stelle vorgestellt wird, dienen (Eisele, 2001).

Im folgenden soll zunächst auf die Holographie, die Basis der Kendroskopie, eingegangen werden. Die ultrascharfen Feldemitter werden besprochen und die Theorie zur Holographie mit niederenergetischen Elektronen wird vorgestellt. Im Kapitel 5 wird das Elektronen-Projektionsmikroskop, das bei der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde, und die Präparation der Feldemitter beschrieben. Die einzelnen Objekte werden in eigenen Kapiteln vorgestellt, in denen auch deren Präparation beschrieben wird und die Ergebnisse diskutiert werden. Die Simulationen zu den Experimenten sind in Kapitel 10 zu sehen. Schließlich werden die holographischen Abbildungen der verschiedenen Objekte verglichen und in einem letzten Kapitel die Ergebnisse zusammengefaßt.

3 Holographie

Holographie, das Verfahren der Abbildung von Objekten durch Rekonstruktion von Wellenfronten, wurde bereits 1948 von D. Gabor (Gabor, 1948; Gabor, 1949) eingeführt. Diese Technik arbeitet ohne Linsen unter Ausnutzung der fundamentalen Welleneigenschaften Interferenz und Beugung. Deshalb ermöglicht die Holographie die realistische räumliche Abbildung eines Objektes.

Die holographische Abbildung verläuft in zwei Schritten:

Das Objekt wird mit monochromatischer kohärenter Strahlung beleuchtet und das Interferenzmuster aus der Überlagerung der Referenzwelle ψ_r und der am Objekt gestreuten Welle ψ_o aufgenommen. Da ψ_r und ψ_o von einer gemeinsamen Quelle ausgehende Wellen sind, ergeben sie ein Interferenzmuster mit der Intensität I

$$I = |\psi_o + \psi_r|^2 .$$

Gleichung 3-1

Aus diesem Interferenzmuster muß die Wellenfront am Objekt rekonstruiert werden. Geschieht dies mit der Referenzwelle, die bei der Aufnahme verwendet wurde, so läßt sich die transmittierte Amplitude T wie folgt beschreiben:

$$T = |\psi_o + \psi_r|^2 \psi_r = \left(|\psi_o|^2 + |\psi_r|^2\right)\psi_r + |\psi_r|^2 \psi_o + \psi_o^* \psi_r^2$$

Gleichung 3-2

Der erste Term von Gleichung 3-2 entspricht der transmittierten Welle, der zweite Term entspricht der am Objekt gestreuten Welle. Der dritte Term ist mit dem zweiten vergleichbar, aber seine Phase besitzt ein entgegengesetztes Vorzeichen. Er beschreibt das konjugierte Bild. Daraus folgt, daß das genaue Abbild des Objektes beobachtet werden kann, wenn es gelingt den zweiten Term von den beiden anderen zu separieren.

3.1 In-line Holographie

Im einfachsten Beispiel für die Holographie wird als Objektwelle ψ_o eine Kugelwelle gewählt, die von einem punktförmigen Objekt ausgeht und mit einer ebenen Welle ψ_r als Referenzwelle interferiert.

$$\psi_r = A_r$$
$$\psi_o = \frac{A_o}{r} e^{ikr}.$$

Gleichung 3-3

A_o ist dabei die Streuamplitude am punktförmigen Objekt. Daraus ergibt sich die Intensitätsverteilung I(x,y):

$$I(x,y) = |\psi_o + \psi_r|^2 = \left(\frac{|A_o|}{r}\right) + A_r^2 + \frac{A_o}{r}\exp(ikr)A_r + \frac{A_o}{r}\exp(-ikr)A_r.$$

Gleichung 3-4

Diese Verteilung entspricht der bekannten Fresnelschen Zonenfigur.

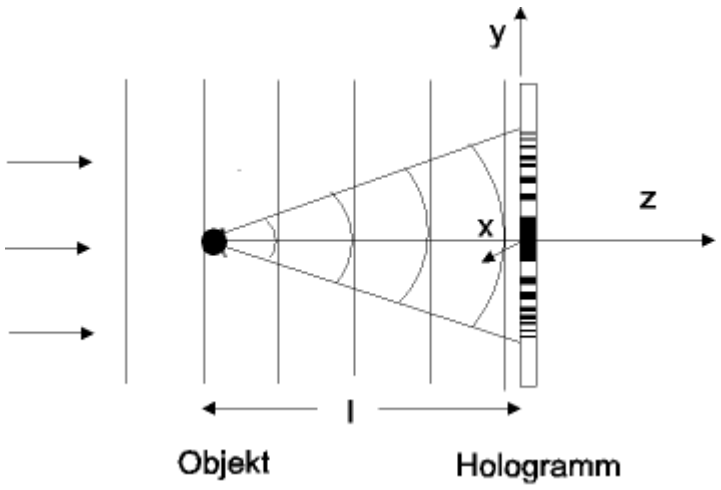


Bild 3-1 Formation des in-line Hologramms eines punktförmigen Objektes.

Die Rekonstruktion mit einer ebenen Referenzwelle läßt sich mit der transmittierten Amplitude T(x,y) wie folgt beschreiben als

$$T(x,y)=\left(\frac{|A_o|}{r}\right)A_r+A_r^3+\frac{A_o}{r}\exp(ikr)A_r^2+\frac{A_o}{r}\exp(-ikr)A_r^2.$$

Gleichung 3-5

Der erste und zweite Term der Gleichung beschreibt die transmittierten ebenen Wellen. Der dritte Term enthält die Signalwelle und der vierte Term die konjugierte Signalwelle. Daraus folgt, daß die rekonstruierten Wellen einen virtuellen Bildpunkt O und einen reellen Bildpunkt O‘ liefern (Bild 3-2).

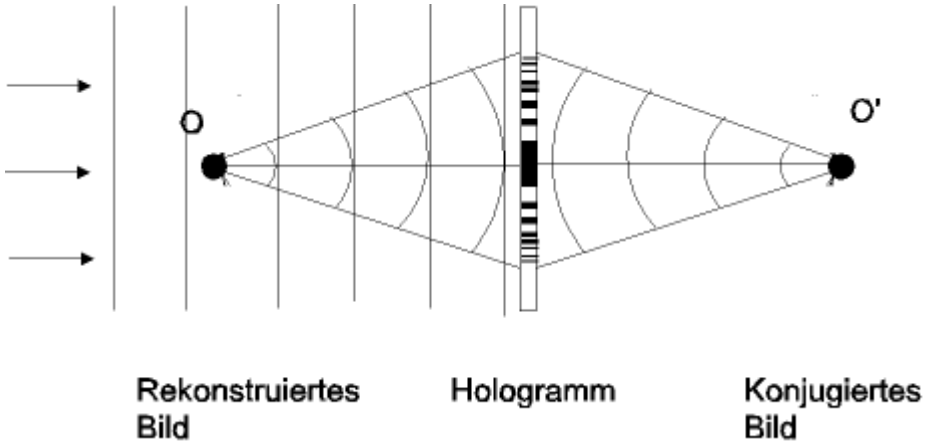


Bild 3-2 Rekonstruktion aus dem Hologramm

Diese Form der Holographie, bei der die Ausbreitungsrichtung der Referenzwelle und die mittlere Richtung der Signalwelle zusammenfallen, ist der Grundtyp der Holographie, wie er von Gabor (Gabor, 1949) beschrieben wurde. Da beide Bildpunkte auf der optischen Achse liegen, bildet der eine den Hintergrund des anderen. Dieses Problem wird zum einen in der off-axis Holographie gelöst, in der die ebene Referenzwelle um einen Winkel θ zur Hologrammnormalen einfällt (Leith und Upatnieks, 1964).

Eine andere Lösung des Problems des konjugierten Bildes ist die Fraunhofer Holographie, bei der folgende Bedingung gilt:

$$a^2 << \lambda l.$$

Gleichung 3-6

Hierbei ist a die Größe des Objektes und l der Abstand zwischen Objekt und Schirm. Unter diesen Bedingungen hat das rekonstruierte reele Bild keinen Einfluß auf das virtuelle Bild. Wird das eine Bild beobachtet, dann ist das andere verschwommen als ein konstanter Untergrund wahrnehmbar (DeVelis et al., 1966).

Da Holographie auf den Welleneigenschaften des Lichtes basiert, kann diese Technik auch mit Elektronenstrahlen durchgeführt werden.

3.2 Holographie mit Elektronen

Gabors Intention war, das Auflösungsvermögen der Elektronenmikroskope zu verbessern (Gabor, 1948). Diese ist durch die sphärische und chromatische Aberration der Elektronenlinsen begrenzt. Bei Beschleunigungsspannung von 100 kV sollte nach der Gleichung von Abbe,

$$g = 0{,}61\frac{\lambda}{n\sin\alpha},$$

Gleichung 3-7

eine Auflösung von 2Å im Transmissionselektronenmikroskop möglich sein, wobei die Wellenlänge der Elektronen 0,04 Å beträgt.

Die erreichbare Auflösung bei Elektronenmikroskopen hängt nicht zuletzt von der Dicke der Probe ab, die sich auf die chromatische Aberration auswirkt. Eine Faustregel besagt deshalb, daß die Auflösung nicht größer als ein zehntel der Probendicke sein kann (Felger et al., 1995).

Gabor baute auf dem von Bragg vorgestellten „X-ray microscope“(Röntgenstrahl-Mikroskop) (Bragg, 1942) auf. Dieses Mikroskop kann nur eingesetzt werden, wenn die Phase bekannt und konstant ist. Dies ist nur bei speziellen Kristallen der Fall, wenn diese entlang einer Kristallachse betrachtet werden.

Gabors Idee war nun, durch Einstrahlen einer kohärenten Referenzwelle die Information über die Phase mit aufzuzeichnen und in einem zweiten Schritt durch Beleuchtung des so erhaltenen Interferenzmusters mit einer kohärenten Referenzwelle die Wellenfront in der Objektebene in seiner Räumlickeit zu rekonstruieren (Gabor, 1949).

Die experimentellen Überlegungen Gabors basierten auf dem Elektronen-Schattenmikroskop von Boersch (Boersch, 1939). Bei der Schattenmikroskopie durchstrahlt ein Elektronenbündel, welches von einer punktförmigen Elektronenquelle ausgeht, das Objekt und wirft das Schattenbild eines Gegenstands auf einen Leuchtschirm (Bild 3-3). Dabei ergibt sich die Vergrößerung aus dem Strahlensatz. Das Auflösungsvermögen nimmt mit abnehmender Ausdehnung der Elektronenquelle zu.

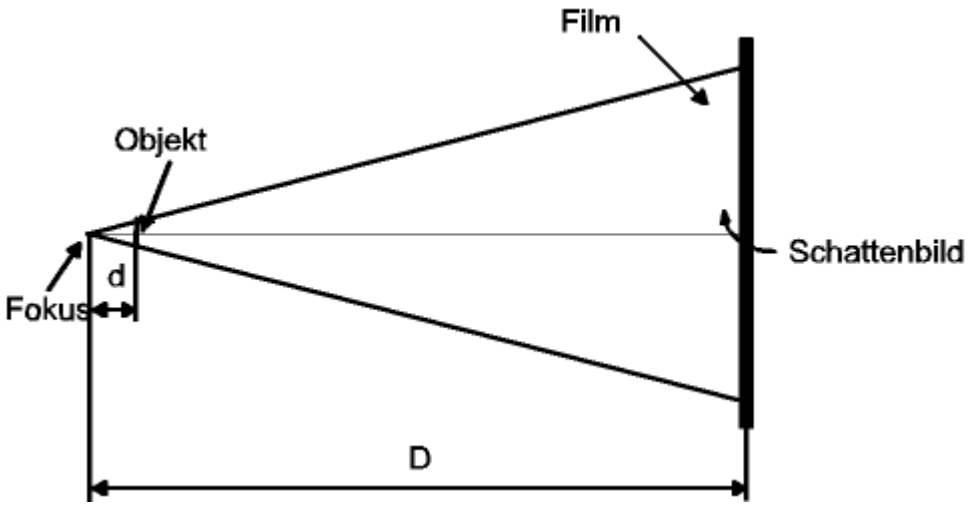


Bild 3-3 Schematische Darstellung des Schattenmikroskops von Boersch

Mit einem Schattenmikroskop konnte Boersch auch Fresnelsche Beugungs-erscheinungen beobachten (Boersch, 1940).

Diese Beugungserscheinungen entstehen, wenn die Elektronenkanone durch ein entsprechendes Blenden- und Linsensystem einen kohärenten und sphärischen Elektronenstrahl produziert. Die Quelle wird dann im Fokus als Punktquelle betrachtet.

Das Beugungsbild des hinter dem Fokus befindlichen Objektes wird auf einer Photoplatte aufgezeichnet. Bei einem solchen Aufbau werden die von Gabor beschriebenen Bedingungen erfüllt. Gabor bezeichnete solche Aufnahmen als Hologramme. Hologramm kommt von gr. „Holos“ , das Ganze, da im Hologramm die Informationen über Amplitude und Phase enthalten sind. Die kohärente Strahlung, die zur Rekonstruktion eingesetzt wird, muß dabei nicht die gleiche Wellenlänge wie der Referenzstrahl der Aufnahme besitzen.

Gabor demonstrierte in Modellversuchen mit kohärentem Licht sein Verfahren (Gabor, 1948). Um kohärentes Licht zu erhalten, beleuchtete er ein Loch von einigen µm Durchmesser mit monochromatischem Licht. Hiermit wurden transparente Mikrofilme beleuchtet und das Hologramm auf einer fotografischen Platte aufgezeichnet. Bei dieser Anordnung besitzt die Objektwelle die gleiche mittlere Ausbreitungsrichtung wie die Referenzwelle. Diese Anordnung wurde In-line Holographie genannt.

Das erste holographische Experiment mit Elektronen wurde von Haine und Mulvey (Haine und Mulvey, 1952) durchgeführt. Diese zeichneten das Hologramm eines Zinkoxid-Kristalls auf. Da das Hologramm jedoch nicht unter Fraunhofer-Bedingungen aufgenommen wurde, war das rekonstruierte Bild durch das konjugierte Bild überlagert. Dies äußerte sich in Fresnelschen Beugungserscheinungen, die das rekonstruierte Bild umgeben. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Rekonstruktion möglich ist.

Erst 40 Jahre später wurde der von Haine und Mulvey verwendete Aufbau durch stärkere Elektronenquellen und bessere Linsen erfolgreich aufgegriffen. So wurde hochauflösende Elektronenholographie mittlerweile mit hochenergetischen Elektronen demonstriert (Lichte, 1986),(Tonomura, 1994).

Während in den oben genannten Experimenten ein Elektronenstrahl über Linsen fokusiert wird, entwickelte Fink 1988 eine Quelle für niederenergetische Elektronen, die eine atomare Größe besitzt, ultrascharfe Feldemitter (Fink, 1988).

3.3 Holographie mit niederenergetischen Elektronen

Die von Fink vorgestellte Elektronenpunktquelle wird durch eine ultrascharfe Wolframspitze realisiert. Diese besitzt die Eigenschaft, unter angelegter negativer

Spannung einen kohärenten, starken Elektronenstrahl auszusenden. An diese Spitze mit atomarem Volumen müssen nur Spannungen zwischen 200 bis 20 V angelegt werden, um einen kohärenten Strahl niederenergetischer Elektronen zu erhalten. Da die Quelle eine atomare Größe besitzt, kann mit einer solchen Quelle in einem Elektronen-Projektionsmikroskop Holographie mit niederenergetischen Elektronen durchgeführt werden, ohne Linsen verwenden zu müssen (Fink et al., 1990).

Dies bietet folgende Vorteile:

- die durch Linsen verursachte Aberration fällt weg,
- leichte Atome haben bei niederenergetischen Elektronen einen ausreichend großen Streuquerschnitt, so daß organische Moleküle beobachtet werden können,
- es werden nur Spannungen zwischen 20 und 200 V benötigt.

Im folgenden sollen nun die Grundlagen der Feldemission, die Eigenschaften der ultrascharfen Spitzen und das Elektronen-Projektionsmikroskop, das für die Holographie mit niederenergetischen Elektronen eingesetzt wird, beschrieben werden.

3.3.1 Feldemission

Der Austritt von Elektronen aus der Oberfläche eines Festkörpers unter dem Einfluß eines hohen elektrischen Feldes wird Feldemission genannt. Das Feld muß dabei eine Stärke von 1 – 5 Vnm^{-1} besitzen. Im Gegensatz zur thermischen Emission, die auch aus klassischer Sicht erwartet wird, handelt es sich hierbei um einen quantenmechanischen Tunnelvorgang. Feldemission tritt dann auf, wenn der Potentialwall an der Oberfläche des Festkörpers durch das angelegte elektrische Feld ausreichend deformiert wird. In diesem Fall können die Elektronen die Barriere ohne äußere Energiezufuhr durchdringen.

Fowler und Nordheim haben bereits 1928 eine Theorie zur Feldemission bei T = 0 K entwickelt (Fowler und Nordheim, 1928). Dabei betrachteten sie einen Potentialverlauf wie er in Bild 3-4 skizziert ist.

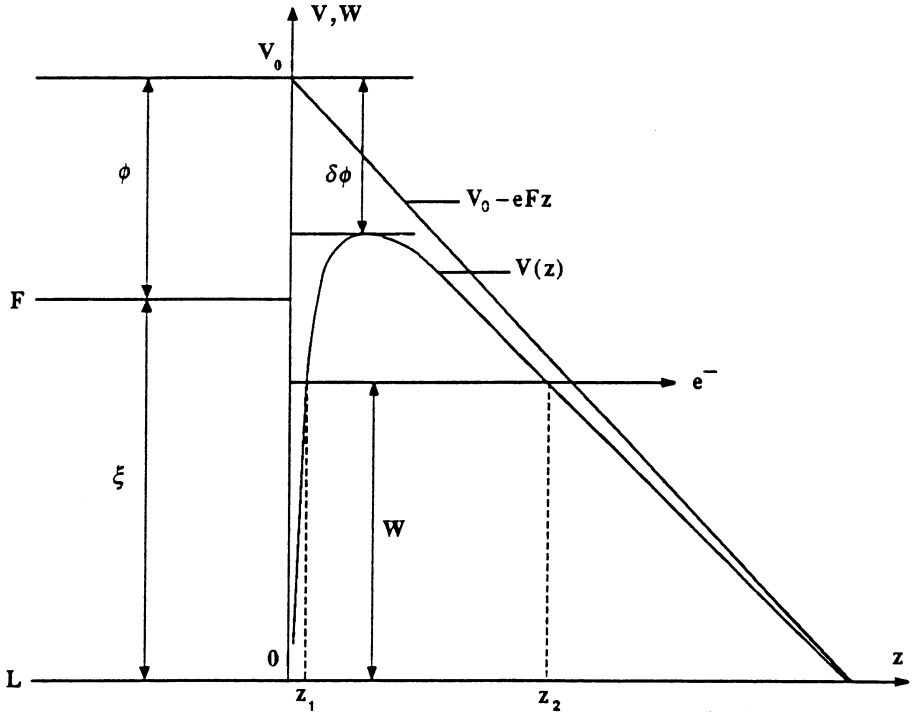


Bild 3-4 Eindimensionales Potentialmodell zur Feldemission.

Er setzt sich aus der Potentialstufe V_0, dem äußeren homogenen Feld F und dem Bildkraftpotential $e^2/16\pi\varepsilon_0 z$ zusammen. Die Potentialbarriere läßt sich daher wie folgt beschreiben

$$V(z) = 0 \qquad \text{für } z < 0,$$

Gleichung 3-8

$$V(z) = V_0 - eFz - \frac{e^2}{16\pi\varepsilon_0 z} \qquad \text{für } z < 0.$$

Gleichung 3-9

Aufgrund der Bildkraft ist die Barrierenhöhe um den Betrag $\delta\phi$ erniedrigt (Gleichung 3-10).

$$\delta\phi = \sqrt{\frac{e^3 F}{4\pi\varepsilon_0}}$$

Gleichung 3-10

Die Anzahl der Elektronen, die diese Barriere durchdringen, hängt von zwei Größen ab. Dies sind die Tunnelwahrscheinlichkeit D und eine Versorgungsfunktion N, die angibt wieviele Elektronen pro Zeit- und Flächeneinheit an den Potentialwall treffen.

Zur quantitativen Beschreibung werden dabei folgende Annahmen gemacht:

- die Gesamtenergie E des tunnelnden Elektrons bleibt erhalten (elastisches Tunneln),
- die Komponente des Wellenzahlvektors $\boldsymbol{k}$ parallel zur Oberfläche ($\boldsymbol{k}_t$) bleibt erhalten, d. h. perfekte ebene Oberflächen, keine Kräfte in andere Richtung als in Tunnelrichtung z,
- das Oberflächenpotential hängt nur von der Raumkoordinate z senkrecht zur Oberfläche ab ($W = \hbar^2/(2m)\boldsymbol{k}_z^2 + V(z)$).

Somit ist die Tunnelwahrscheinlichkeit D eine Funktion von W und die Versorgungsfunktion N eine Funktion von E und W. Kennt man diese beiden Größen, so kann man die Stromdichte j in einem Energieintervall dE mit der folgenden Gleichung beschreiben:

$$j(E)dE = \left[e\int_0^E N(W,E)D(W)dW \right] dE$$

Gleichung 3-11

Die Versorgungsfunktion erhält man aus dem Produkt von Fermiverteilung *f*(E), Zustandsdichte und der Einfallsrate.

$$N(W,E)dWdE = \frac{4\pi me}{h^3}\frac{dWdE}{\exp[(E-\xi)/kT]+1}$$

Gleichung 3-12

Unter Verwendung der Wentzel-Kramer-Brillouin-Näherung (WKB-Methode) ergibt sich die Tunnelwahrscheinlichkeit zu

$$D(W) = \exp\left[-\frac{4}{3e\hbar F}\sqrt{2m[\phi-(W-\xi)]^3}\cdot v(y)\right]$$

Gleichung 3-13

mit

$$y = \frac{\delta\phi}{V_0 - W} \quad ,$$

Gleichung 3-14

der Austrittsarbeit ϕ und der Fermienergie ξ. Der Term *v(y)* stellt den Einfluß der Bildkraft auf die Tunnelwahrscheinlichkeit dar. Hierbei ist *v* eine langsam variierende elliptische Funktion mit Werten zwischen 0 und 1, die von Good und Müller tabelliert wurden (Good und Müller, 1956).

Da der Hauptbeitrag des Tunnelstroms von Zuständen nahe der Fermikante kommt, darf man folgende Näherung mache: (W-ξ) << ϕ und Gleichung 3-13 läßt sich zu

$$D(W) = \exp\left(-c + \left[\frac{(W-\xi)}{d}\right]\right)$$

Gleichung 3-15

mit

$$c = \frac{4}{3e\hbar F} \cdot \sqrt{2m\phi^3}\, v(y)$$

Gleichung 3-16

und

$$d = \frac{e\hbar F}{2t(y)\sqrt{2m\phi}}$$

Gleichung 3-17

vereinfachen. Dabei ist *t(y)* eine weitere langsam variierende elliptische Funktion und ebenfalls in (Good und Müller, 1956) tabelliert.

Setzt man Gleichung 3-12 und Gleichung 3-13 in Gleichung 3-11 ein und führt die Integration über dE durch, erhält man folgende Formel für die totale Energieverteilung der Elektronen:

$$j(E)dE = \frac{J_0}{d} \exp\left(\frac{E-\xi}{d}\right) f(E)dE$$

Gleichung 3-18

mit

$$J_0 = \frac{4\pi med^2}{h^3} \ .$$

Gleichung 3-19

Durch Integration über alle Energien erhält man die Gesamtstromdichte J

$$J = \int_{-\infty}^{\infty} j(E)dE = J_0 \frac{\pi p}{\sin \pi p}$$

Gleichung 3-20

mit

$$p = \frac{kT}{d}.$$

Gleichung 3-21

Diese Gleichung ist die Fowler-Nordheim-Gleichung, die Standardtheorie zur Feldemission.

Die Fowler-Nordheim-Gleichung erlaubt es, die Austrittsarbeit bei bekannter Feldstärke zu bestimmen. Die Feldstärke ist jedoch keine direkt meßbare Größe. Für eine nadelförmige Spitze kann Sie aber durch folgende Gleichung genähert werden

$$F = \frac{U}{\kappa r_{tip}}.$$

Gleichung 3-22

Hierbei berücksichtigt κ den Unterschied zum Feld einer Kugel. Er wird in der Literatur mit $\kappa \approx 2{,}5.....5$ angegeben. Zur Analyse von Strom-Spannungskennlinien formt man die Fowler-Nordheim-Gleichung um und erhält durch Logarithmieren folgenden Zusammenhang:

$$\ln\left(\frac{J}{U^2}\right) = const - 0{,}6187 \frac{v(y) \cdot \phi^{3/2} \kappa R_s}{U},$$

Gleichung 3-23

wobei ϕ in eV, R_s in Å und U in V angegeben ist. Das Auftragen von $ln(I/U^2)$ gegen $1/U$ ergibt eine Gerade mit einer Steigung S, die mit dem Spitzenradius in folgender Beziehung steht:

$$R_S = -1{,}467 \cdot \frac{S}{\kappa \phi^{3/2} v(y)} \ .$$

Gleichung 3-24

Bei bekanntem ϕ und κ läßt sich mit dieser Gleichung unter der Annahme, daß *v(y)* konstant ist, die Größe R_S bestimmen.

R_s kann man als eine Näherung des Spitzenradius betrachten, da κ zumeist nicht genau bekannt ist. Zudem ist das Feld an der Spitze im wesentlichen durch die globale Struktur dominiert und erst in zweiter Linie durch die lokale Form determiniert. Als weiterführende Literatur sei (Gomer, 1961) genannt.

3.3.2 Ultrascharfe Feldemitter

Feldemission aus einer Metalloberfläche läßt sich beobachten, wenn eine Feld mit einer Stärke von 1-5 V/nm vorliegt. Aus der Gleichung 3-22 geht hervor, daß die angelegte negative Spannung an die Spitze um so kleiner sein muß, je kleiner der Radius der Spitze ist.

Die von der Spitze emittierten Elektronen können mit einem Feldemissionsmikroskop (FEM) beobachtet werden. Mit der Feldionenmikroskopie (FIM), die 1950 von Erwin W. Müller entwickelt wurde, können die Atompositionen auf der Spitzenoberfläche bestimmt werden (Müller und Tsong, 1969).

Bei der Feldionenmikroskopie wird die Spitze bei einem Edelgasdruck von 10^{-5} mbar einer hohen Feldstärke ausgesetzt. Die neutralen Gasatome werden durch das inhomogene Feld polarisiert und in Richtung auf die Spitze beschleunigt. Im optimalen Abstand von der Spitze können Elektronen der Gasatome in die Spitze tunneln. Die so entstandenen positiv geladenen Ionen werden von der Spitze weg zum Leuchtschirm beschleunigt und erzeugen dort ein um den Faktor Abstand/Krümmungsradius der Spitze vergrößertes Bild der Spitze. Die Atome sind einzeln als Kontrastpunkte zu erkennen.

Durch eine Kombination aus FEM und FIM können die Emissionseigenschaften von ultrascharfen Spitzen mit der atomaren Struktur der Spitze in Beziehung gesetzt werden.

H.-W. Fink entwickelte eine Methode mit der es möglich ist, Spitzen zu erstellen, die durch ein einzelnes Atom realisiert sind (Fink, 1986). Werden von dieser Spitze Elektronen emittiert, so besitzt diese Punktquelle atomare Dimension.

Bild 3-5 zeigt eine ultrascharfe Wolframspitze im Rasterelektronenmikroskop und FIM-Bilder von Spitzen, die in einem Trimer und in einem einzigen Atom enden.

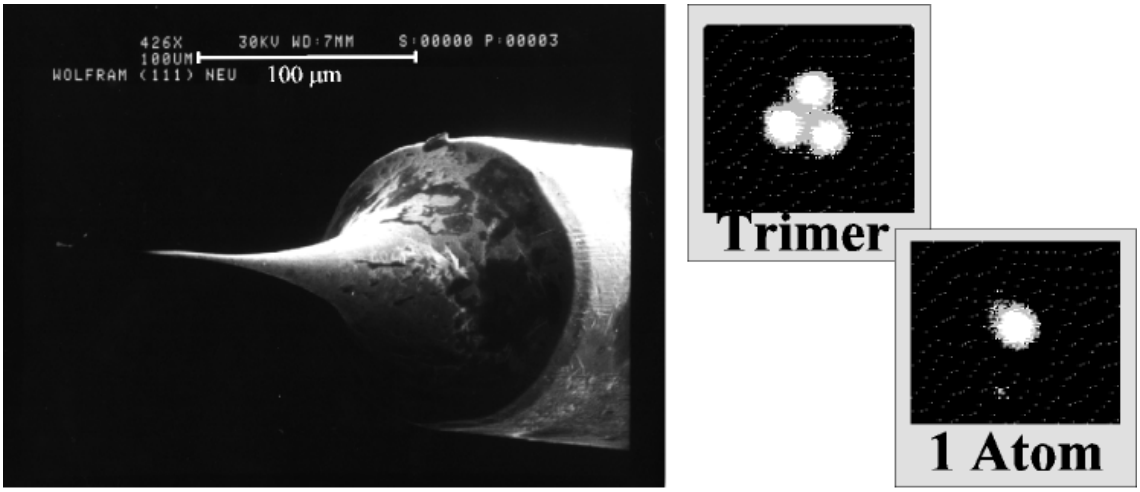


Bild 3-5 Im Bild ist eine Wolframspitze mit dem REM abgebildet. Die FIM-Bilder zeigen Spitzen, die in drei oder einem Atom enden (Völkel 92).

Spitzen, die nach der von Fink entwickelten Methode hergestellt werden, besitzen einen relativ großen globalen Spitzenradius (~ 20 nm) auf dem eine Pyramide sitzt, deren Spitze durch 7, 6, 4 oder 3 Atome gebildet wird. Durch Aufdampfen eines Wolframatoms erhält man eine einatomare Spitze (Fink, 1988).

Da diese Pyramide in einigen wenigen Atomen ausläuft, ergibt sich durch die konzentrierte Feldstärkeüberhöhung eine atomar kleine Emissionsfläche. Die hieraus emittierte Strahlung ist kohärent, da zu einem Zeitpunkt je ein Elektron aus der Spitze mit einem effektiven Spitzenradius $r_{eff} < 1$ nm emittiert wird (Scheinfein et al., 1993).

Durch die pyramidale Spitze auf einer dazu relativ breiten Unterstruktur ergibt sich zudem eine starke Kollimation der Teilchenstrahlen. Bei pyramidenförmiger Unterstruktur ist der Divergenzwinkel unabhängig davon, ob die Spitze aus einem oder 10 Atomen besteht, für Elektronenemission zwischen 3° und 5°. Bei einer runden Unterstruktur kann eine Kollimation nicht beobachtet werden (Horch und Morin, 1993).

Die Eigenschaften der Spitzen wurden von verschiedenen Gruppen untersucht. Als weiterführende Literatur seien (Silverman, 1995), (Spence et al., 1994) und (Morin, 1994) sowie (Müller, 1992)und (Völkel, 1992) genannt.

3.3.3 Das Elektronen-Projektionsmikroskop

Eine Weiterentwicklung des von Boersch verwendeten Schattenmikroskops stellt das von Stocker und Fink vorgestellte Elektronen-Projektionsmikroskop mit niederenergetischen Elektronen dar.

Die Idee, direkt Feldemission als Elektronenquelle zu verwenden, hatten bereits 1939 Morton und Ramberg (Morton und Ramberg, 1939). 1968 nutzte Melmed Nickelspitzen zur projektionsmikroskopischen Darstellung nicht-planarer Objekte (Melmed, 1968).

Durch die Kombination von ultrascharfen Feldemittern mit einer Annäherungstechnik, die in der Rastertunnelmikroskopie verwendet wird, gelang es Stocker und Fink (Stocker und Fink, 1989), ein Elektronen-Projektionsmikroskop zu erhalten, das neben der Projektionsmikroskopie auch Holographie mit niederenergetischen Elektronen ermöglicht.

Die Annäherungstechnik erlaubt es, mit der Spitze bis auf Abstände $d < 1\ \mu m$ an das Objekt heranzufahren. Bei diesen Abständen erhält man jedoch kein reines Projektionsbild mit einer Vergrößerung von $M = D/d$, sondern ein Hologramm, das durch die Interferenz der am Objekt gestreuten Welle mit dem ungestreuten Teil der Welle gebildet wird (Bild 3-6). Diese Hologramme werden, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, numerisch rekonstruiert.

Mit diesem Mikroskop ist es somit möglich, ein Objekt bei Abständen $d > 1\mu m$ zunächst projektionsmikroskopisch abzubilden und durch weiteres Annähern Details holographisch mit einer nominalen Vergrößerung von $M > 10^6$ abzubilden (Fink et al., 1990).

Mit solchen Elektronen-Projektionsmikroskopen wurde in verschiedenen Gruppen gearbeitet. Als Beispiele seien (Morin und Gargani, 1993), (Spence et al., 1993), (Binh et al., 1995)und (Shedd, 1994) genannt.

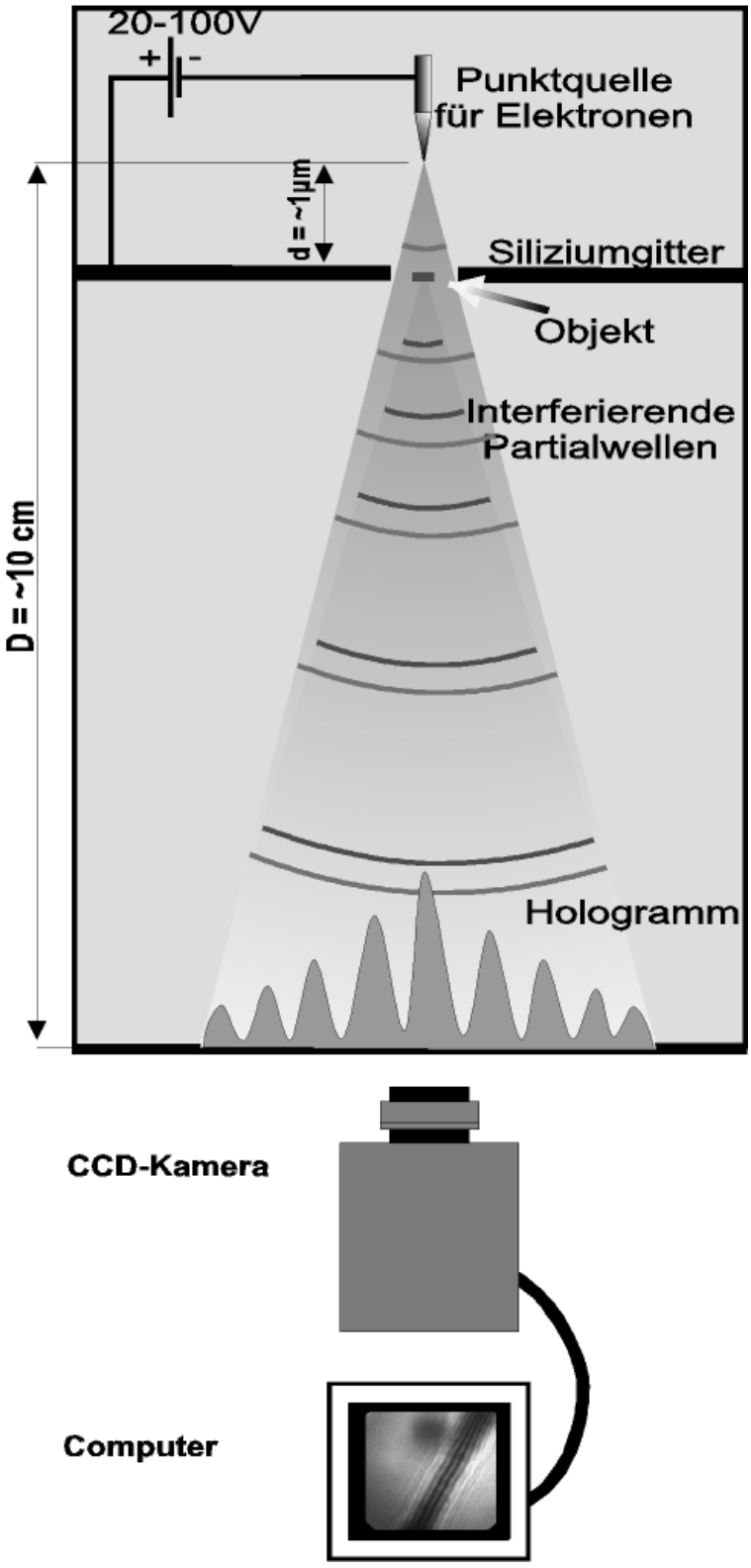


Bild 3-6 Schematische Darstellung des projektionsmikroskopischen Aufbaus zur Holographie mit niederenergetischen Elektronen

3.4 Theorie zur Holographie mit niederenergetischen Elektronen

In einer ersten theoretischen Beschreibung der Elektronen-Projektionsmikroskopie mit niederenergetischen Elektronen unter Verwendung von ultrascharfen Spitzen wurde die Elektronenquelle als punktförmig und sphärische Wellen emittierend beschrieben (Fink et al., 1991).

Kreuzer et al. entwickelte eine Theorie zur Simulation und Rekonstruktion von Bildern mit niederenergetischen Elektronen aus einer Punktquellen (Low Energy Electron Point Source Microscopy, LEEPS), die auch Mehrfachstreuung und Abweichungen der Quelle von der sphärischen Geometrie miteinbezieht (Kreuzer et al., 1992). Kreuzer nennt diese Bilder wegen der Form der Elektronenquelle Kendrogramme nach dem griechischen Wort κεντρον, was scharfer Punkt oder Stachel bedeutet. Kendrogramme sind zusammengesetzt aus dem holographischen Beugungsmuster und dem klassischen Beugungsmuster. Mit einer modifizierten Kirchhoff-Helmholtz-Transformation können die Kendrogramme rekonstruiert werden.

Eine weitere Theorie zur Holographie mit niederenergetischen Elektronen hat Spence et al. entwickelt, die in (Spence et al., 1995) und (Zhang et al., 1995) nachzulesen ist.

Im folgenden soll auf die Streutheorie, die der Simulation der Hologramme nach Kreuzer zugrundeliegt, und auf die Rekonstruktion der Wellenfronten in Objektebene eingegangen werden.

3.4.1 Streutheorie

Die Theorie zur Holographie mit niederenergetischen Elektronen verwendet eine Beschreibung der Streuung basierend auf der Lippmann-Schwinger-Gleichung. Im Modell sendet die Elektronenquelle Wellen mit überwiegend sphärischer Symmetrie bei großen Distanzen von der Quelle aus

$$\psi^{(in)}(\mathbf{r}) = r^{-1}\exp(ikr)\left[1+\sum_{l=1}^{\infty}\sum_{m=-l}^{l} c_{lm}(-i)^{l} Y_l^{m}(\mathbf{r}/r)\right].$$

Gleichung 3-25

Für das Objekt ist $\psi^{(in)}$die ankommende Welle. Die an dem Objekt gestreute Welle ist gegeben durch

$$\left|\psi^{(+)}\right\rangle = \left|\psi^{(in)}\right\rangle + G^{(+)}T\left|\psi^{(in)}\right\rangle,$$

Gleichung 3-26

dabei ist $G^{(+)}$ die Green-Funktion, und die T-Matrix erfüllt die Lippmann-Schwinger-Gleichung

$$T = V + VG^{(+)}T\,.$$

Gleichung 3-27

Das Streupotential des Objektfilms wird als ein konstantes inneres Potential V_o mit einer Summe von Pseudopotentialen an den Positionen $\mathbf{r}_i$ der Atome des Objekts betrachtet, z.B.

$$V(\mathbf{r}) = V_0 + \sum_i V(\mathbf{r} - \mathbf{r}_i)\,.$$

Gleichung 3-28

Die T-Matrix ist zusammengesetzt aus T-Matritzen T_i der einzelnen Atome. Daraus folgt als Lösung für einen Cluster aus identischen Atomen

$$\psi^{(+)}(\mathbf{r}) = \frac{\exp(ikr)}{r}\left[1 + \sum_{l=1}^{\infty}\sum_{m=-l}^{l} c_{lm}(-i)^l Y_l^m(\mathbf{r}/r)\right] + \sum_{ilm}\frac{\exp(ikr)}{\rho_i}\tau_l Y_l^m(\hat{\rho}_i)F_l^m(\mathbf{r}_i),$$

Gleichung 3-29

wobei $\rho_i = |\mathbf{r}\text{-}\mathbf{r}_i|$ und

$$\tau_l = k^{-1}\sin\delta_l \exp(i\delta_l)$$

Gleichung 3-30

die Phasenverschiebung δ_l beinhalten und F_l^mden Strukturfaktor.

Für die Kalkulation der Wellenfunktion eines Punktes **r** auf einem Schirm, der sich in einem großen Abstand zum Objekt befindet, kann man

$$\Psi^{(+)}(\mathbf{r}) = \frac{\exp(ikr)}{r}\left[1 + \sum_{l=1}^{\infty}\sum_{m=-l}^{l} c_{lm}(-i)^l Y_l^m(\mathbf{r}/r) + \overline{\Psi}_s^{(+)}(\mathbf{r})\right]$$

Gleichung 3-31

schreiben. Daraus ergibt sich das Kontrastbild I(**r**) auf dem Schirm

$$I(\mathbf{r}) = \hat{I}(\mathbf{r}) - \frac{L}{r^3} = \frac{L}{r^3}\left[2\,\mathrm{Re}\,\overline{\psi}_s^{(+)}(\mathbf{r}) + \left|\overline{\psi}_s^{(+)}(\mathbf{r})\right|^2\right] .$$

Gleichung 3-32

Der erste Term beschreibt das holographische Beugungsmuster, da es aus der Superposition der Interferenzen zwischen der Referenzwelle und der an den einzelnen Atomen des Objektes gestreuten Welle resultiert. Der zweite Term in Gleichung 3-32 beinhaltet die Interferenzen zwischen den gestreuten Wellen und wird von Kreuzer als klassisches Beugungsmuster bezeichnet. Keiner der beiden Terme ist ausschließlich. Im Falle von Objekten, die semitransparent für Elektronen sind, überwiegt die holographische Beugung. Bei dickeren Filmen wächst die gestreute Wellenfunktion stärker an, da hierbei auch Mehrfachstreuung vermehrt auftritt. In dicken Filmen dominiert somit die klassische Beugung. Die Objekte sind dann undurchlässig und Informationen über die atomare Struktur gehen verloren. Das Bild entsteht dann durch Beugung am makroskopischen Objekt. In Bild 3-7 ist ein simuliertes Hologramm des Fullerens C_{60} mit einem Abstand von Spitze zu Probe von 100 nm bei einer Energie von 200 eV auf einem Schirm von 4 x 4 cm^2 abgebildet.

Die inelastische Streuung wird bei dieser Betrachtung nicht berücksichtigt. Im Experiment können die inelastisch gestreuten Elektronen den Detektor nicht erreichen, da eine negativen Spannung vor den Detektor angelegt wird. In der Simulation wird dies durch einen Dämpfungsfaktor berücksichtigt, der die freie Weglänge miteinbezieht.

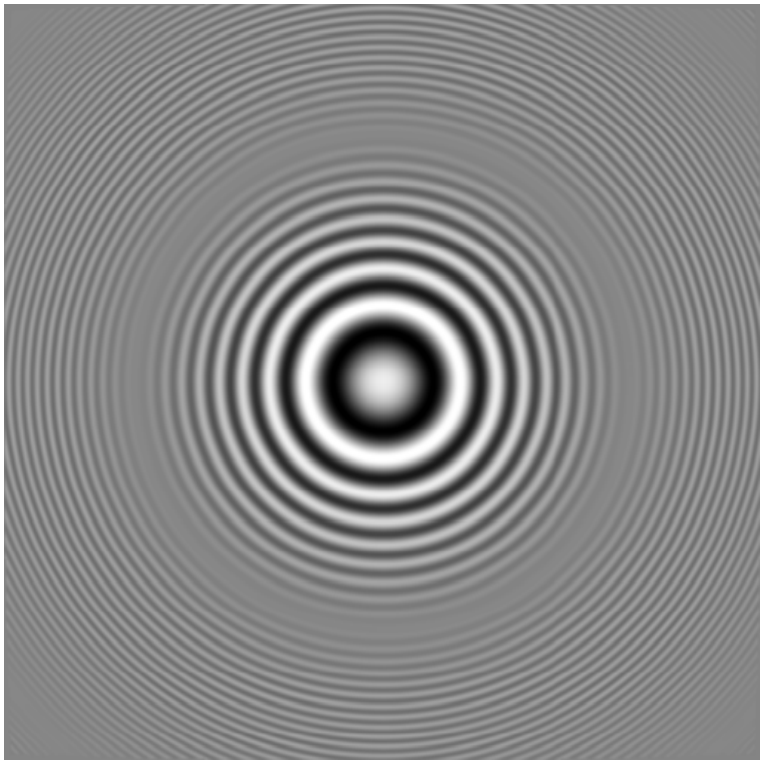


Bild 3-7 Simulation des Fullerens C_{60} bei einem Abstand von Spitze zu Objekt von 100 nm mit einer Energie von 200 eV auf einen Schirm von 4 x 4 cm^2.

3.4.2 Rekonstruktion

Da die Wellenfunktion der gestreuten Welle von r abhängt, kann die Rekonstruktion des Objektes aus dem Kendrogram über eine Kirchhoff-Helmholtz-Transformation (Born und Wolf, 1993) erfolgen (Gleichung 3-33).

$$K(\mathbf{r}) = \frac{1}{4\pi}\int_S d\boldsymbol{\xi} I(\boldsymbol{\xi}) \exp\left(ik\boldsymbol{\xi}\cdot\mathbf{r}/\boldsymbol{\xi} \right)$$

Gleichung 3-33

Die Kirchhoff-Helmholtz-Transformation integriert über die zweidimensionale Oberfläche S des Schirms mit den Koordinaten $\boldsymbol{\xi}$ = (X,Y,L) bei einem Abstand L von der Quelle. Auch in der Photoemissionselektronen-Holographie wird eine solche Transformation zur Rekonstruktion der Hologramme eingesetzt (Barton, 1988).

Wird dieser Algorithmus auf das simulierte Hologramm angewendet, so erhält man die Rekonstruktion der Wellenfronten in Objektebene wie sie in Bild 3-8 dargestellt ist.



Bild 3-8 Rekonstruktion aus dem simulierten Hologramm des Fullerens C_{60} auf 12,8 x 12,8 nm^2.

In folgenden Publikationen finden sich weitere Beispiele zu Simulationen und Rekonstruktionen nach der oben erläuterten Theorie(Kreuzer et al., 1992), (Kreuzer, 1993), (Kreuzer et al., 1993). Rekonstruktionen aus Hologrammen, die in einem Elektronen-Projektionsmikroskop erhalten wurden, sind in (Kreuzer et al., 1995), (Fink et al., 1996), (Schmid et al., 1995) zu sehen.

4 Elektronen-Projektionsmikroskop

Bei Experimenten zur Holographie mit niederenergetischen Elektronen sind ultrascharfe Feldemitter die Quelle für kohärente Elektronen. Da hierfür ein konstantes Emissionsverhalten der Elektronenquellen Voraussetzung ist, muß im Ultrahochvakuum (UHV) mit einem Druck von 10^{-9} mbar und besser gearbeitet werden. Ebenso muß die Apparatur eine in-situ Präparation und Analyse der Elektronenpunktquelle ermöglichen (Feldemissionsmikroskopie, FEM).

4.1 Aufbau der Apparatur

Die UHV-Anlage, die ursprünglich zur Abbildung und lokalen chemischen Analyse mittels Elektronen und Ionen (EELS und ISS) mit einer Auflösung im Nanometerbereich konzipiert wurde, entspricht den apparativen Anforderungen von holographischen Experimenten (Völkel, 1997)

Die nun folgende Beschreibung der Apparatur ist in drei Abschnitte, Vakuumanlage, mechanischer Aufbau und elektronischer Aufbau, gegliedert.

4.1.1 Vakuumanlage

Die Vakuumanlage besteht aus einer zylinderförmigen Hauptkammer mit einem Durchmesser von 30 cm, die an der Oberseite einen COF-Flansch mit 300 mm Nennweite besitzt. Der den Flansch abschließende Deckel trägt über drei Edelstahlsäulen eine zweistöckige Plattform, auf der die Hauptkomponenten des Elektronen-Projektionsmikroskops sitzen. Die Anlage wird von einer Ionengetterpumpe (Saugleistung: 270 l/s) und einer magnetisch gelagerten Turbomolekularpumpe (Saugleistung: 340 l/s) gepumpt, die über ein seitlich angebrachtes T-Stück 150 CF an den Zylinder geflanscht sind. Das Vorvakuum (~ 10^{-3} mbar) wird durch ein zentrales Vorpumpensystem aus Drehschieber- und Roots-Pumpe erzeugt. Durch Einsatz einer über der Turbopumpe eingebauten Kühlfalle mit Titansublimator konnte der Druck noch weiter verringert werden ($p \approx 5 \cdot 10^{-10}$ mbar).

Die mechanisch arbeitenden Pumpen verursachen Vibrationen, welche die Experimente stören. Um dies abzustellen, befindet sich ein Plattenventil an der Vakuumanlage, das bei Bedarf die Hauptkammer von der Turbopumpe und dem Vorvakuum trennt. Mittels Ionengetterpumpe und Stickstoffkühlfalle kann der Rezipient auf einem Druck von ≈ 5 x 10^{-10} mbar gehalten werden.

Die Beschickung der UHV-Kammer mit Spitzen und Proben erfolgt mittels einer Vakuumschleuse mit einer differentiell gepumpten Transferstange.

Das Gaseinlaßsystem für Neon ermöglicht das Ionensputtern der Feldemissionsspitzen.

Der gesamte Aufbau ist mit einer 120 x 90 cm^2 großen Aluminiumplatte verschraubt, deren Ecken auf einem Stahlprofilgerüst aufliegt. Zwischen Aluminiumplatte und Stahlgrüst befinden sich vier niveaugeregelte pneumatische Dämpfer zur Entkopplung niederfrequenter Bodenschwingungen.

4.1.2 Mechanischer Aufbau

Ein Elektronen-Projektionsmikroskop entspricht einem Feldemissionsmikroskop, kombiniert mit einem Annäherungsmechanismus wie bei einem Rastertunnelmikroskop (Stocker und Fink, 1989). Das heißt:

- Spitzen können mit einer Positioniereinheit in einem Volumen von 5 x 5 x 5 cm^3 bewegt werden, um die Spitzen zu transferieren, zu präparieren und zu analysieren,
- sie können bis auf einige Nanometer kontrolliert an die Proben angenähert werden,
- eine Heizvorrichtung für die Feldemitter ist vorhanden,
- die Apparatur verfügt über einen Phosphorschirm mit Mikrokanalplatte (später ein Chevron) und Kamera, was für Holographie mit niederenergetischen Elektronen entscheidend ist, ebenso wie für die Feldemissionsmikroskopie zur Charakterisierung der Spitzen.

Der Aufbau muß gegen mechanische und akustische Einkopplungen isoliert sein, da diese Bewegungen des Feldemitters gegen die Probe verursachen und die Auflösung reduzieren oder die Spitzen zerstören.

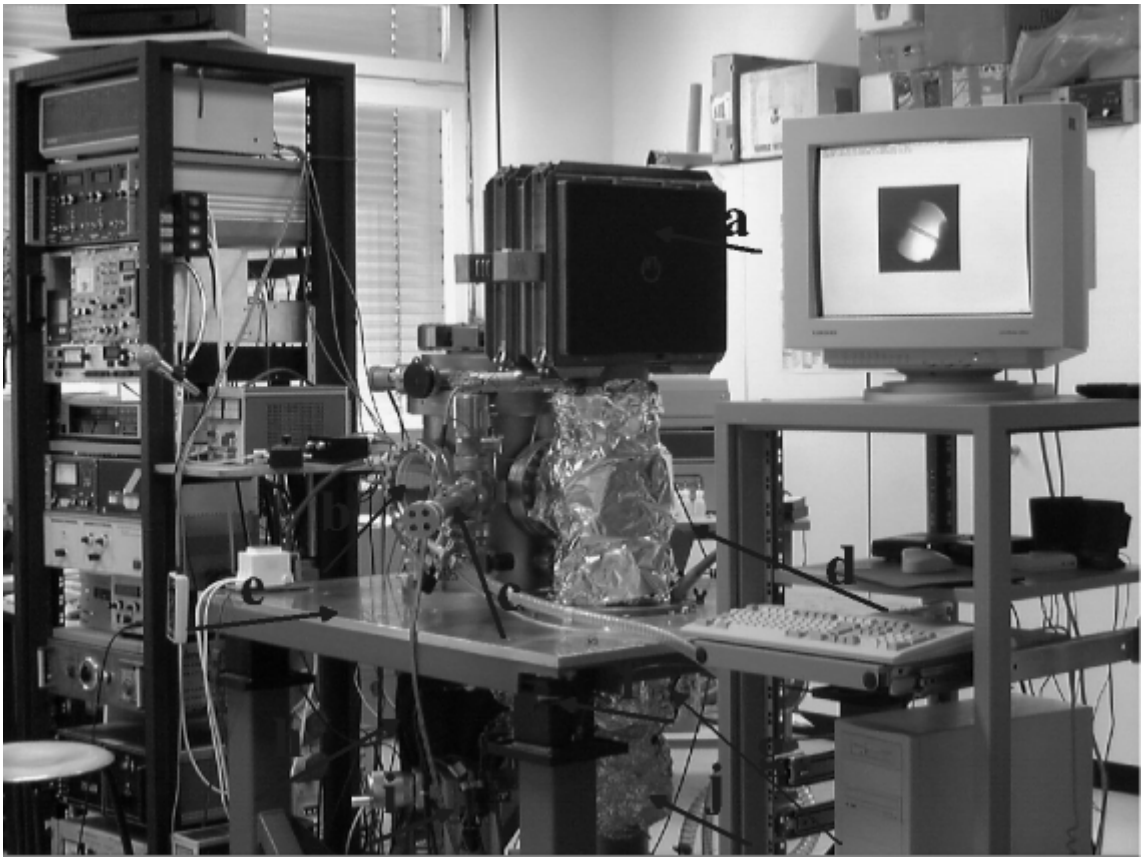


Bild 4-1 Die Vakuumanlage: a) Ionengetterpumpe, b) Fenster zur Kammer, c) Vakuumschleuse, d.) T-Stück 150 CF, e) Aluminiumplatte, f) pneumatische Dämpfer, g) Titansublimator mit Stickstoffkühlfalle, h) Kameras, i) Plattenventil, j) Turbomolekularpumpe.

4.1.2.1 Mikropositionierung

Die Positionierung wurde mittels piezoelektrischer INCHWORM®-Motoren[1] realisiert. Zwei Motoren befinden sich in der oberen Ebene der zweistöckigen Plattform auf einem xy-Verschiebetisch, der auf Kreuzrollenlagern geführt wird. Ein dritter INCHWORM®-Motor ist vertikal im Zentrum des xy-Tisches für die z-Positionierung angebracht worden. So kann die Quelle in einem Volumen von 4,5 x 4,5 x 3 cm^3 verfahren werden. Die Positioniergenauigkeit in alle drei Raumrichtungen ist besser als 100 nm. Diese Positioniereinheit ermöglicht somit den Transfer von Spitzen und Proben, das Positionieren der Spitze über der Heizvorrichtung und ist auch zur Grobannäherung der Spitze an die Probe geeignet.

[1] Burleigh Instruments, Inc., New York, USA.

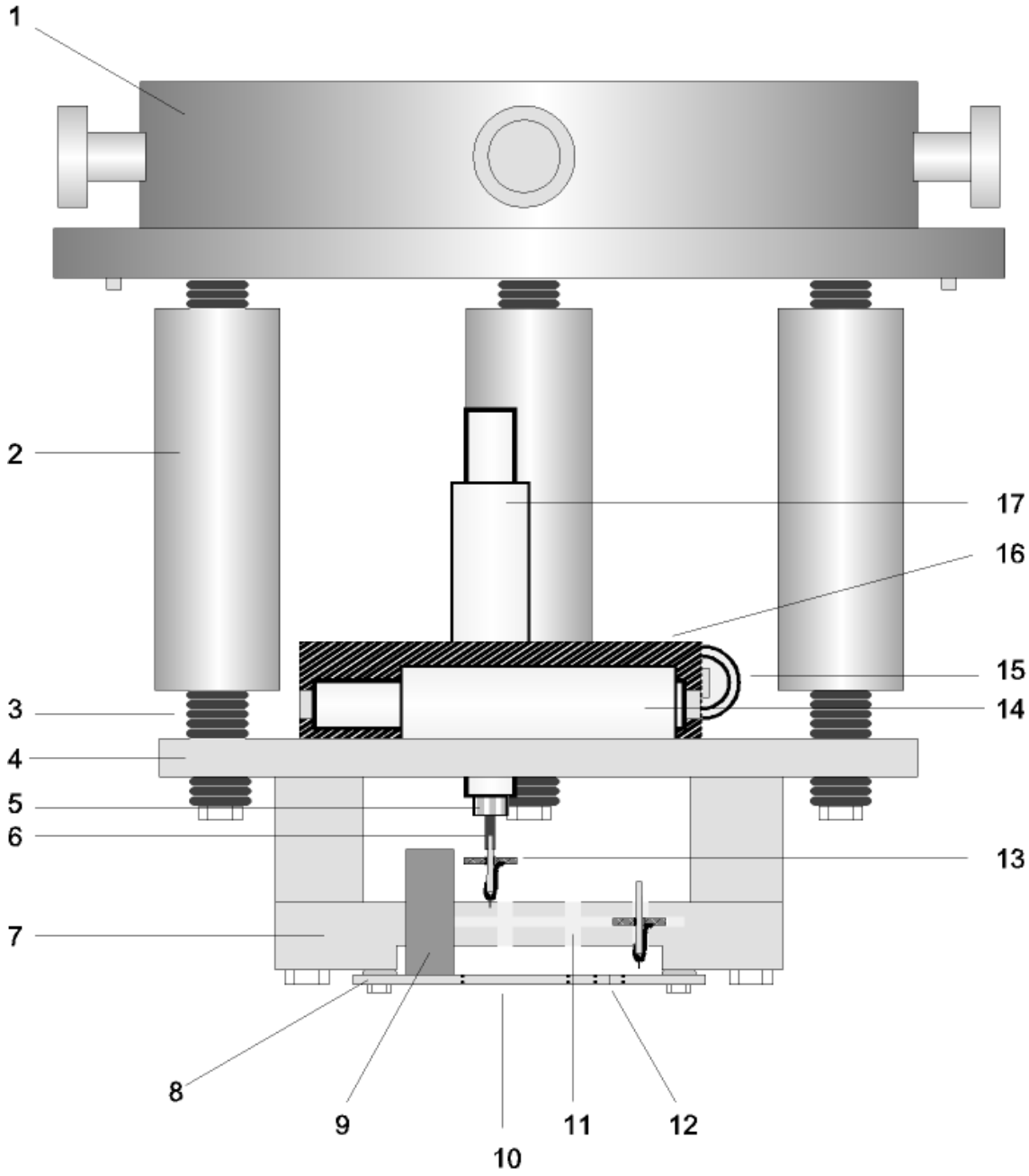


Bild 4-2 Schema des mechanischen Aufbaus:1) Deckelflansch COF300, 2) Trägersäule, 3) Dämpfungselement aus Viton, 4) obere Ebene der Plattform, 5) Scannerpiezo, 6) Stecksockel, 7) untere Ebene der Plattform, 8) Probenbrücke (elektrisch isoliert), 9) Heizvorrichtung (CuBe-Blattfeder), 10) Probenteller mit Proben, 11) Spitzenmagazin mit Ersatzspitze, 12) Blendenloch für Feldemissionsmikroskopie, 13) Spitzenhalter, 14) x-Inchworm, 15) y-Inchworm, 16) xy-Verschiebetisch, 17) z-Inchworm.

Die Feinpositionierung wird mit einem piezoelektrischen Röhrchenscanner[2] durchgeführt. Dieser sitzt im Schaft des z-INCHWORMS®. Der Röhrchenscanner verfügt bei einem Spannungshub von ± 200 V über einen lateralen Wegbereich von 15 µm und über einen vertikalen Arbeitsbereich von 52 µm.

4.1.2.2 Halterung, Tausch und Heizen der Spitzen

Die Spitzen, aber auch der Transferstift für den Probentransfer, werden durch einen metallischen Stecksockel (modifizierter Steckkontakt[3]) gehalten. Dieser befindet sich im vordersten Bereich des Scanners.

Der Halter besteht aus einem Kegelstift (DIN 1), an den eine Metallscheibe von 5 mm Durchmesser angebracht ist. Die Metallscheibe ist vom Kegelstift durch ein Aluminiumröhrchen, das einen keramischen Isolierschlauch ummantelt, elektrisch isoliert. Ein Bogen aus Wolframdraht (ø = 0,12 mm) ist durch Punktschweißen an den Kegelstift und das Aluminiumröhrchen realisiert worden. An den Bogen wird die Feldemissionsspitze geschweißt (Bild 4-3a).

Diese Konstruktion ermöglicht es, Feldemitter in der UHV-Kammer in einer Vorratshalterung zu lagern und bei Bedarf auszutauschen. Diese Vorratshalterung besteht aus zwei übereinander befindlichen U-förmigen Gabeln, die mittels der Metallscheibe des Spitzenhalters das Absetzen und Aufnehmen der Spitzen ermöglicht.

Der Aufbau der Spitzenhalter ermöglicht das elektrische Heizen der Spitzen. Der z-Inchworm drückt hierzu die Metallscheibe auf eine U-förmig ausgeschnittene Blattfeder aus Kupfer/Beryllium. Bei angelegter Spannung zwischen Blattfeder und Sockel beginnt der Drahtbogen mit dem Feldemitter zu glühen. Dieser Heizvorgang dient zur Präparation der ultrascharfen Feldemitterspitzen.

4.1.2.3 Probentransfer

Der Stecksockel ermöglicht auch das Aufnehmen des Transferstiftes, der den Probenteller trägt. Der Transferstift besteht ebenfalls aus einem Kegelstift. An diesem

---

[2] PIC 151 6,35 x 5,35 x 40 mm der Fa.PI Ceramic GmbH, 07589 Lederhose.

[3] Firma Deutsch GmbH, 82152 Martinsried.

befinden sich im Abstand von 1 cm zwei Scheiben mit einem Durchmesser von 5 mm (Bild 4-3, b). Durch die untere Scheibe wird der Probenteller gehalten, während die obere Scheibe für das Ablegen des Transferstiftes im Transferarm benötigt wird.

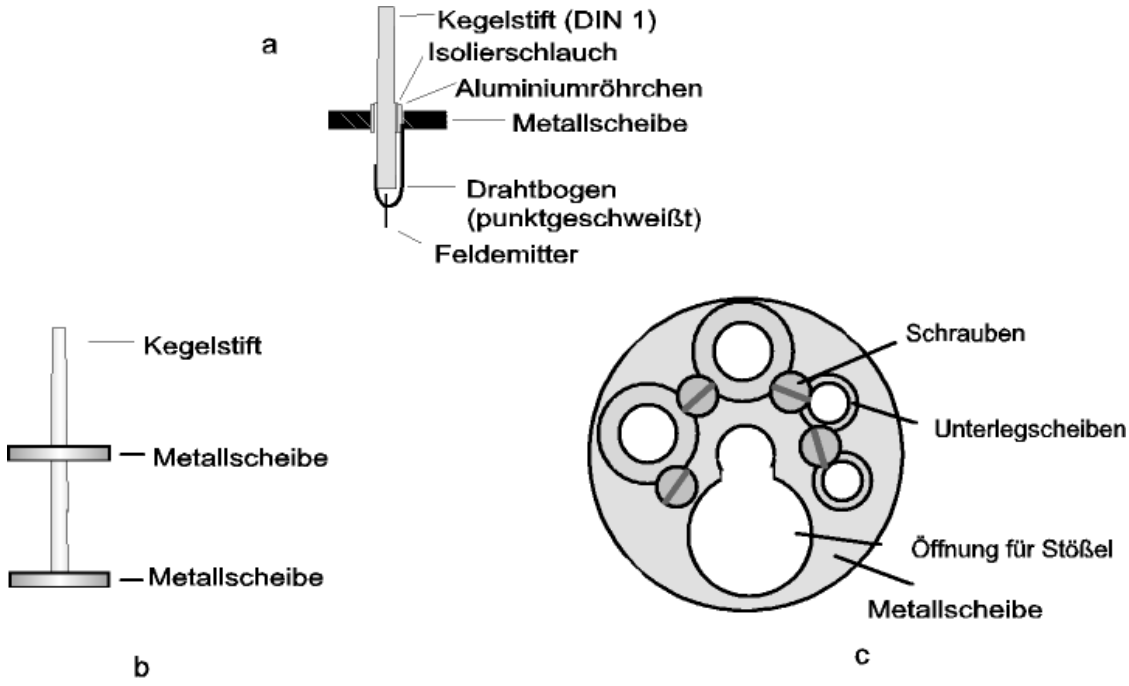


Bild 4-3 a) Spitzenhalter, b) Stößel zum Transport des Probentellers, c)Probenteller.

Auf dem Probenteller können je zwei kreisförmige Proben mit einem Durchmesser von 3 bzw. 5 mm aufgebracht werden. Er wurde aus einer Aluminiumscheibe mit einem Durchmesser von 16 mm gearbeitet, in deren Mitte sich eine Öffnung für das Aufnehmen des Tellers durch den Stößel befindet. Aluminiumringe mit V4A-Schrauben sichern die Proben, um zu verhindern, daß diese beim Transfer aus dem Probenteller fallen.

4.1.2.4 Feldemissionsmikroskopie

Die Überprüfung der Feldemitter erfolgt anhand des Feldemissionsbildes. Dazu werden die Spitzen über eine Blende (auf Massenpotential) mit einem Durchmesser von 3 mm

gefahren. Durch Anlegen einer hinreichend hohen negativen Spannung kommt es zur Feldemission von Elektronen. Diese werden durch eine 14 cm unter der Blende befindlichen Mikrokanalplatte/Phosphorschirm-Einheit[4] detektiert und durch ein Fenster in der UHV-Kammer von einer Restlicht[5]- oder CCD-Kamera[6] aufgenommen.

4.1.2.5 Schwingungsisolation

Zusätzlich zu dem bereits erwähnten Abschalten der mechanischen Pumpen während des Experiments und den niveaugeregelten pneumatischen Dämpfern zwischen Untergestell und Kammerplatte müssen noch weitere Maßnahmen zur Abschirmung gegenüber akustischen Einkopplungen getroffen werden.

Die zweigeschossige Plattform mit Mikropositioniersystem und Proben hängt an drei Säulen vom Deckel der Hauptkammer herab. Zur Entkopplung befinden sich deshalb Viton-O-Ringe als Dämpfungselemente zwischen Kammerdeckel und Säulen, bzw. Säulen und Plattform.

4.1.3 Elektronischer Aufbau

Zur Ansteuerung der Inchworm-Motoren wie auch des Röhrchenscanners ist die zugehörige Kontrollelektronik nötig. Ein Schema hierzu ist in Bild 4-4 dargestellt.

4.1.3.1 Ansteuerung der Inchworm-Motoren

Die Ansteuerung der Inchworm-Motoren erfolgt über eine von der Fa.Burleigh stammenden Kontrollelektronik UNL 6000. Sie steuert das zeitgerechte Fixieren und Lösen der Klammerelemente und die Expansion bzw. Kontraktion der Dehnungselemente. Dabei wird die Spannungsrampe für die Expansion eines Dehnungselements in 512 Einzelschritte unterteilt, so daß je nach verwendetem Inchworm-Typ minimale Schrittweiten von etwa 4 bzw. 2 nm Länge möglich sind.

---

[4] Microchannelplate CEMA 6040, Fa. Galileo/USA.

[5] Bosch TYC9A.

[6] AT200 CCD-Camera Systems ,Photometrix.

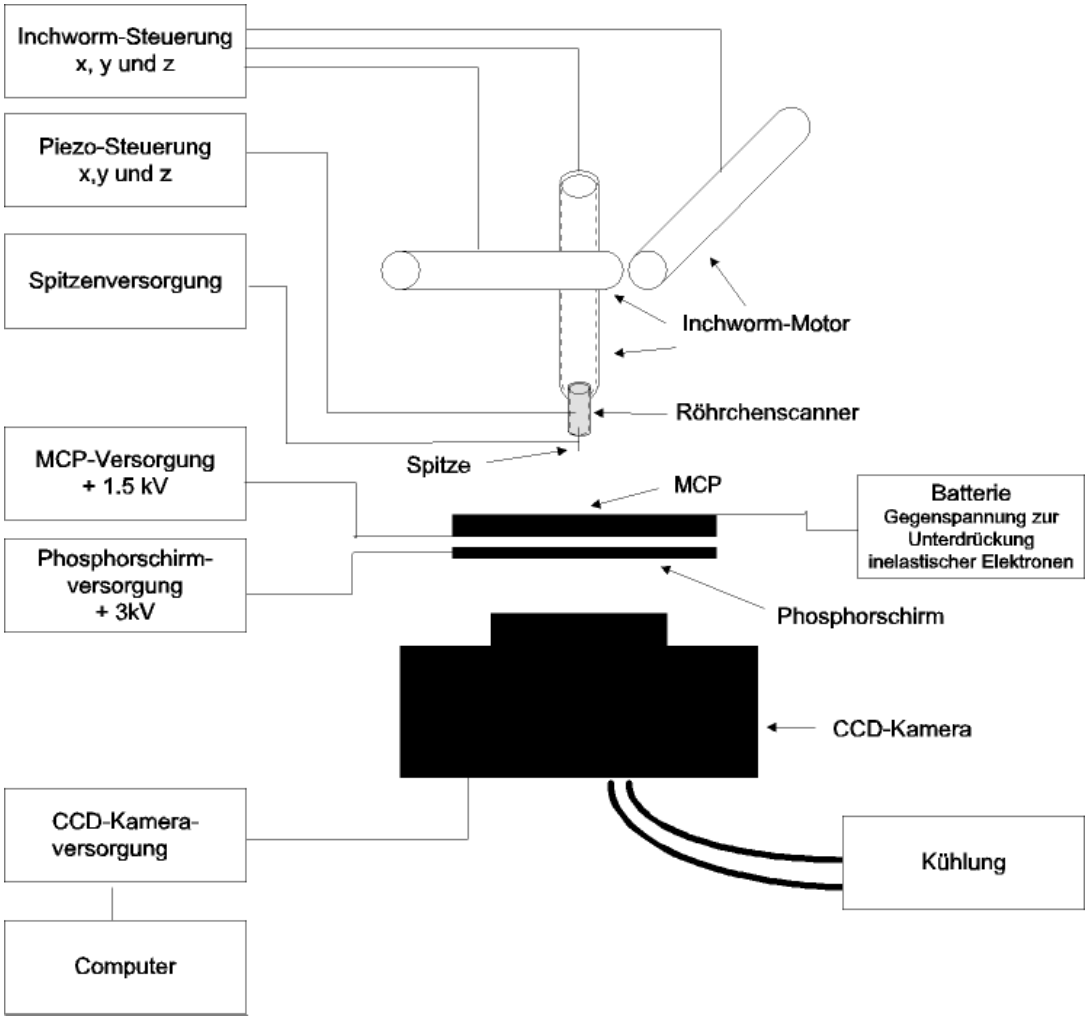


Bild 4-4 Schematischer Aufbau der Elektronik

4.1.3.2 Röhrchenscanner

Der Röhrchenscanner wird mit einer von der Elektronikwerkstatt gefertigten Kontrollelektronik in x,y und z angesteuert, die über einen Spannungsbereich von ± 200 V verfügt.

4.2 Ultrascharfe Feldemissionsspitzen

Für die Holographie mit niederenergetischen Elektronen und die Theorie der Kendroskopie, sind die ultrascharfen Feldemitter als Elektronenpunktquellen wegen deren Emissionseigenschaften von grundlegender Bedeutung.

Im folgenden Abschnitt wird die Präparation und Definition der Spitzen kurz vorgestellt. Detaillierte Ausführungen zu allen drei Punkten befinden sich in (Fink, 1988), (Müller, 1992),(Ernst et al., 1993).

4.2.1 Präparation von Spitzen

Als Ausgangsmaterial für Feldemitter dient einkristalliner, in <111>-Richtung orientierter Wolframdraht mit einem Durchmesser von 0,12 mm, aber auch polykristalliner Wolframdraht mit gleichem Durchmesser hat sich als geeignet erwiesen. Ein ca. 5 mm langes Stück Draht wird auf den Wolfram-Drahtbogen des Spitzenhalters punktgeschweißt (siehe Kapitel 4.1.2.2).

Um den Draht soweit anzuschärfen, daß er im Feldemissionsmikroskop abgebildet werden kann, wurde dieser in 2-normaler Natronlauge elektrochemisch geätzt. Seine typische Form nach dem Ätzvorgang ist in Bild 4-5 wiedergegeben. Der durchschnittliche Spitzenradius beträgt nach diesem Präparationsschritt etwa 25-50 nm.

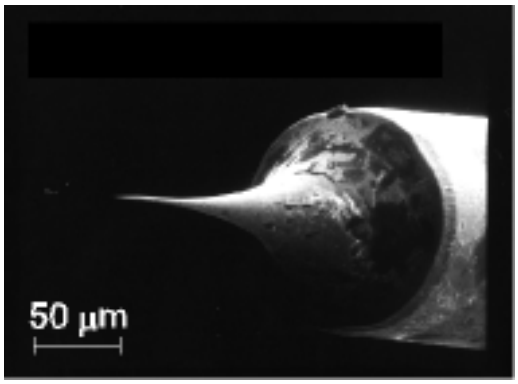


Bild 4-5 Wolframspitze direkt nach dem Ätzen.

Nach dem Transfer in die UHV-Kammer wurde zunächst die Spannung ermittelt, ab der Feldemission einsetzt. Hieraus kann auf den Spitzenradius zurückgeschlossen werden. Bei der gegebenen Geometrie der Apparatur, unter Verwendung einer Blende mit 3 mm Durchmesser, entsprachen etwa n x 100 V Einsatzspannung n x 100 Å Spitzenradius (Völkel, 1992). Die Spitze wurde durch Heizen und Sputtern weiter präpariert.

Das Heizen[7] der Spitze bewirkt zum einen eine Reinigung durch thermisches Verdampfen der Adsorbatatome auf dem Schaft. Zum anderen findet aber auch eine Umorientierung zur Minimierung der Oberflächenenergie statt, d. h. ein Anwachsen der dichtgepackten kristallographischen Flächen. Grundsätzlich vergrößert das Heizen aber auch den Spitzenradius, was bei zu langem Heizen und zu hohen Temperaturen zu einer stumpfen Spitze führen kann, mit der keine Feldemission mehr möglich ist.

Im Gegensatz zum Heizen wird beim Sputtern der Spitzenradius verkleinert, die Spitze angeschärft. Hierzu wird Neon (99,99 %-ige Reinheit) in die UHV-Kammer eingelassen, bis ein Druck von 1 x 10^{-5} mbar erreicht ist. Durch Anlegen einer entsprechend hohen Spannung wird eine Elektronenemission von der Spitze ab 1 µA eingestellt. Die emittierten Elektronen erzeugen durch Stöße mit dem gasförmigem Edelgas positive Neonionen. Diese werden durch das starke elektrische Feld auf die Spitze beschleunigt und bewirken durch Materialabtrag sowohl eine Reduktion des Spitzenradius, als auch eine Säuberung der Oberfläche von Verunreinigungen und Oxiden. Die Kristallstruktur wird durch das Sputtern gestört und durch schwaches Heizen ausgeheilt.

Heizen und Sputtern werden so lange wiederholt, bis die Spitze die gewünschten Emissionseigenschaften, d.h. eine Einsatzspannung um 200 V und Interferenzstreifen beim Annähern an fadenförmige Objekte, besitzt.

4.3 Objektträger für Holographie mit niederenergetischen Elektronen

Bei der Präparation von Makromolekülen für holographische Abbildungen mit niederenergetischen Elektronen müssen die Proben freitragend vor der abbildenden Elektronenpunktquelle aufgebracht werden.

Die Elektronen im Transmissionselektronenmikroskop erfahren eine Beschleunigungsspannung von 60-200 kV und können ein vitrifizierte Wasserschicht durchleuchten.

[7] Elektrisches Heizen des Drahtbogens bis die Spitze für ca. zwei Sekunden eine mittlere Rotglut (800 – 900 °C) zeigt.

Dies ist mit niederenergetischen Elektronen, die Energien von 20-200 eV besitzen nicht möglich. Deshalb muß für die Holographie mit niederenergetischen Elektronen eine andere Präparationstechniken entwickelt werden.

An die Objektträger, die für die Holographie mit niederenergetischen Elektronen eingesetzt werden sollen, werden besondere Anforderungen gestellt. Sie müssen Öffnungen besitzen, die klein genug sind, daß Moleküle diese überbrücken können, aber auch groß genug, um eine Abbildung des Moleküls ohne die Ränder des Substrats zu ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Objektträger auf ihre Eignung für diese Methode getestet. Sie werden im folgenden beschrieben.

4.3.1 Mikrostrukturen auf Siliziummembranen

Im Rahmen der Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. G. Schmahl (Universität Göttingen) haben wir strukturierte Siliziummembranen erhalten, die mittels hochauflösender Elektronenlithographie erstellt worden sind (Rehbein, 1997).

Für diese Objektträger werden mit Bor dotierte Siliziummembranen mit einer Dicke von 80-120 nm verwendet, die ursprünglich für die Erstellung von Zonenplatten für Röntgenmikroskopie entwickelt worden sind (Medenwaldt und Hettwer, 1995). Diese Membranen, die einen Durchmesser von ≈ 1,5 mm besitzen werden durch Elektronenstrahllithographie und reaktives Ionenätzen mit einem Tri-Level-Verfahren strukturiert (David et al., 1995).

Für unsere Anwendung wurden drei verschiedene Strukturen entworfen:

- Struktur 1: Öffnungen, deren Breite sich kontinuierlich von 50 auf 200 nm verbreitert bei konstanter Länge (Bild 4-6, a).
- Struktur 2: In einer Spalte ist jede fünfte Öffnung ein Dreieck, in jeder fünften Spalte fehlen die Dreiecke (Bild 4-6, b). Die Breiten der Spalte variieren auch hier wie in Struktur 1.
- Struktur 3: Die Spalte besitzen eine Periodizität von 200 nm (Bild 4-6, c).

Die Strukturen wurden vor Präparationen im Elektronen-Projektionsmikroskop charakterisiert. In Bild 4-7, a ist die Struktur 1 im Projektionsmodus abgebildet, in Bild 4-7, b die Struktur 2 und in Bild 4-7, c die Struktur 3.



Bild 4-6 REM-Bilder der verschieden strukturierten Siliziummembranen.

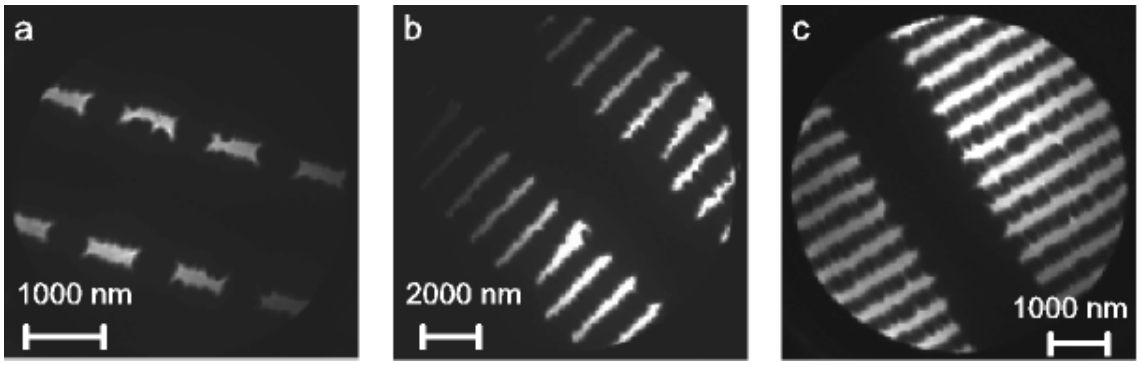


Bild 4-7 Projektionsbilder der strukturierten Siliziummembranen.

Nach der Strukturierung wurden die Membranen mit Gold/Palladium bedampft. Dies reduzierte die Aufladung während der Aufnahmen im Elektronen-Projektionsmikroskop.

4.3.2 Kohle-Lochfolien

Kohle-Lochfolien[8] sind in der Elektronenmikroskopie gebräuchliche Objektträger, die sich auch für die Elektronen-Projektionsmikroskopie eignen.

Kohle-Lochfolien zeichnen sich dadurch aus, daß sie Löcher in unterschiedlichen Größen besitzen. In großen Öffnungen befinden sich Netzwerke aus Kohlenstoffasern, die Löcher von unterschiedlicher Größe bis zu einigen nm bilden (Bild 4-8, a). Diese wurden vor einer Präparation zunächst kartiert.

Zur Präparation von DNA wurden die Kohle-Lochfolien über 1 nm Titan als Haftvermittler mit Gold/Palladium beschichtet. Die frisch aufgedampften Metalloberflächen sind hydrophil und ermöglichen die Adsorption von DNA.

4.3.3 Goldfolien

Durch Aufdampfen von Gold auf Natriumchlorid-Einkristalle erhält man löchrige Goldmembranen, die unregelmäßige Löcher besitzen (Bild 4-8, b und c). Diese Membranen müssen vor der Präparation kartographiert werden. Solche Goldmembranen haben wir von Dr. A. Carl (Mercator-Universität, Duisburg) erhalten (Carl et al., 1993). Sie haben sich jedoch nicht als Substrate bewährt, da sich bei der Präparation Teile der Membran von dem stabilisierenden Kupfergitter lösten.

Durch ein kontrolliertes Aufdampfen von 10 – 12 nm Gold können einkristalline Membranen hergestellt werden, die rechteckige (001)-orientierte Löcher besitzen. Diese wurden auch als Testobjekte für die Elektronenmikroskopie verwendet, sind aber nicht mehr käuflich zu erwerben (Scholz und Heydenreich, 1984).

[8] Kohle-Lochfilme auf 400 mesh Gold-Netzchen von 3,05 mm, S147A4, Firma Plano.

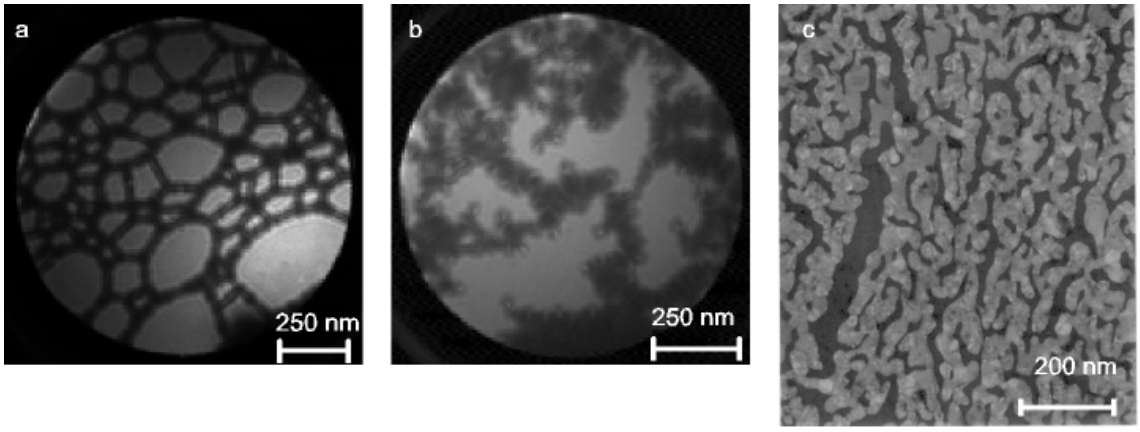


Bild 4-8 Projektionsbilder von a) Kohle-Lochfolie, b) Goldfolie und eine REM-Aufnahme einer Goldfolie, c).

Durch die rechteckige Form der Löcher wären diese Membranen ebenfalls als Objektträger geeignet. Eine Kartierung würde entfallen, und etwaiges Ablösen von Teilen der Membran wäre für die Experimente nicht entscheidend.

5 Phthalocyaninatopolysiloxan PcPS

Phthalocyaninatopolysiloxan ist ein kettensteifes Polymer, das aus Phthalocyanineinheiten aufgebaut ist.

Phthalocyanine (Bild 5-1, a) sind Heteroaromaten, die mit den in der Natur weit verbreiteten Derivaten des Porphyrins (Bild 5-1, b) strukturell verwandt sind. Ein bekannter Vertreter der Porphyrine in der Natur ist zum Beispiel die Hämgruppe (Bild 5-1, c) des Proteins Hämoglobin, das beim Sauerstofftransport im Blut eine wichtige Rolle spielt.

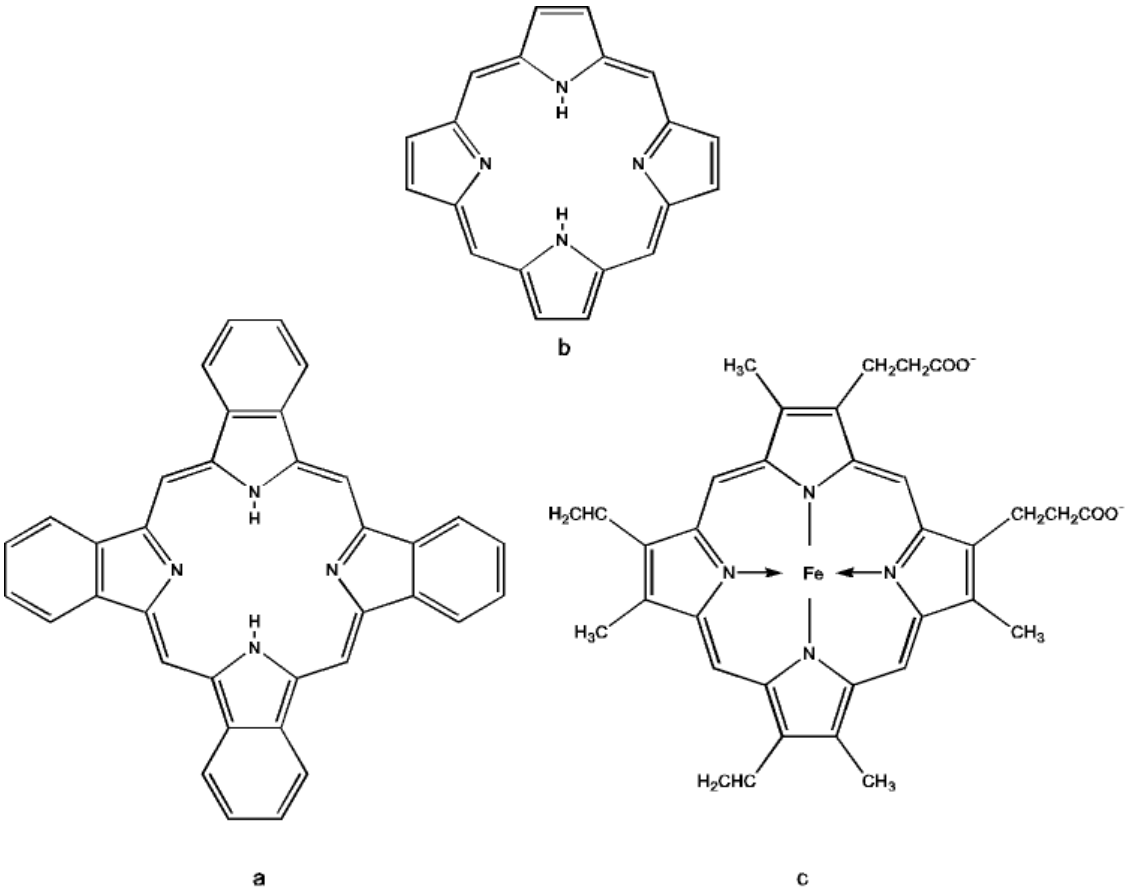


Bild 5-1 Strukturformel von Phthalocyanin (a), Porphyrin (b) und der Hämgruppe (c).

Phthalocyanin unterscheidet sich vom Porphyrin durch die annelierte Benzoleinheit und die vier Stickstoffatome, die an Stelle der Kohlenstoffatome die Pyrrolringe verbinden.

Die aromatische Struktur verleiht dem Phthalocyanin eine außerordentlich hohe thermische und chemische Stabilität (Lenzoff, 1989-1993). So zersetzt sich Phthalocyanin erst oberhalb von 550 °C und ist selbst gegen Erhitzen in konzentrierter Schwefelsäure beständig. Man unterscheidet zwischen dem metallfreien Phthalocyanin und den Metallkomplexen des Phthalocyanins. Die intensiv gefärbten Metallkomplexe sind als Farbstoffe und vor allem als Pigmente von wirtschaftlicher Beutung (Lever, 1965).

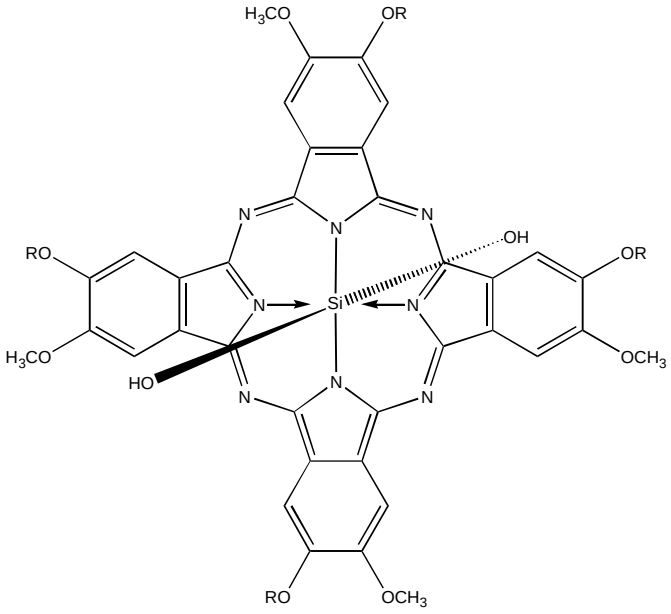


Bild 5-2 Siliziumphthalocyanin

Das Phthalocyaninatopolysiloxan wird durch Polykondensation des Siliziumphthalocyanins erhalten (Joyner und Kenney, 1962). Um eine gute Löslichkeit des Polymers zu gewährleisten, werden Alkyloxyketten peripher angebunden (Orthmann et al., 1983). Jede annelierte Benzoleinheit trägt jeweils eine kurze und eine lange Alkoxyseitenkette. Eine statistische Verteilung der Alkoxyketten resultiert aus dem statistischen Einbau der Isoindolenineinheiten in die Wiederholeinheit. Diese Unordnung verhindert eine Kristallisation in den Seitenketten.

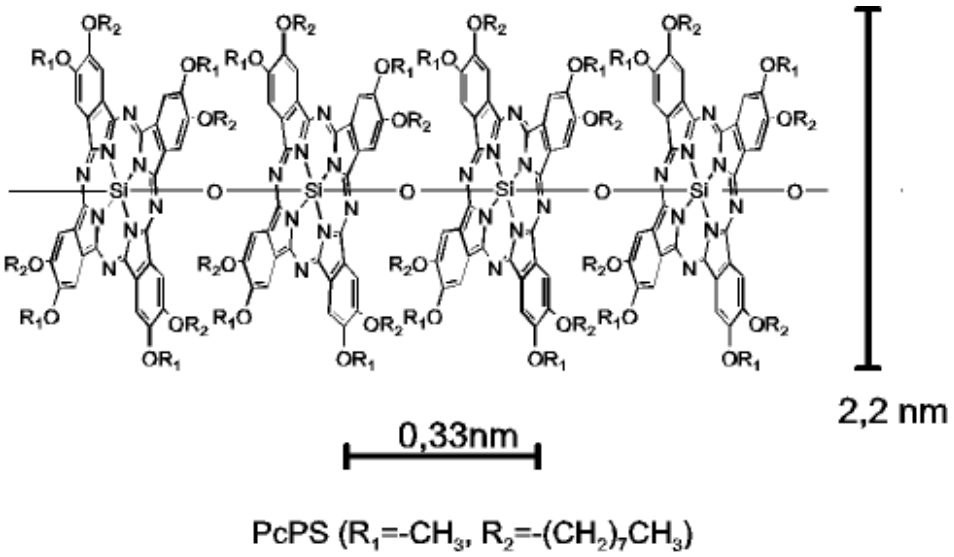


Bild 5-3 Phthalocyaninatopolysiloxan (PcPS).

Durch den sterischen Anspruch der Phthalocyaninringe beträgt der Winkel zwischen den Silizium- und Sauerstoffatomen in PcPS fast 180° (Marks et al., 1979). Dadurch erhält das Polymer ein steifes Rückgrat und kann als steifes Stäbchen beschrieben werden.

Von diesen formanisotropen steifen Stäbchen können durch die Langmuir-Blodgett-Technik anisotrope Filme hergestellt werden (Matsuyama und Kato, 1995), (Gupta et al., 1994), (Wegner, 1991), (Minari et al., 1989).

Die Periodizität der Phthalocyaninringe wird beim PcPS durch die Bindungslängen der Polysiloxankette bestimmt. Diese beträgt 3,33 Å, weshalb die π-Elektronenorbitale der Phthalocyaninringe elektromagnetisch miteinander gekoppelt sind. Hieraus resultiert die Leitfähigkeit von PcPS, die im Bereich von Halbleitern liegt (Schoch et al., 1979). Messungen zur elektrischen Leitfähigkeit wurden auch von R. Spahlinger und F. Rheiner an der Universität Heidelberg durchgeführt (Spahlinger, 1996), (Rheiner, 1997).

Für die Holographie mit niederenergetischen Elektronen ist Phthalocyaninato-polysiloxan wegen seiner Struktur als ein Testobjekt interessant. Der definierte Durchmesser der Moleküle von 2,2 nm und die periodische Anordnung der

Phthalocyaninringe mit Abständen von 3,33 Å, ermöglichen es, die Auflösung des Kendroskopes zu demonstrieren.

5.1 Präparation von Phthalocyaninatopolysiloxan (PcPS)

Das hauptkettensteife Polymer Phthalocyaninatopolysiloxan (PcPS) läßt sich mit der Langmuir-Blodgett-Technik (LB) auf die Substrate übertragen. Diese Technik wurde ursprünglich für die Übertragung von niedermolekularen Amphiphilen wie z. B. Stearinsäure auf Substrate entwickelt. Im Max-Planck-Institut für Polymerchemie in Mainz werden mit dieser Methode Oberflächen mit Multilagen aus PcPS erstellt. Für die Holographie mit niederenergetischen Elektronen werden aber einzelne Moleküle über Spalten benötigt und keine geschlossenen Filme. Da sich geordnete Monolagen aber erst durch das Ausrichten der Moleküle entlang der Strömungslinien beim Übertragungsprozeß (Schwiegk et al., 1992) ausbilden, war diese Methode auch für die Präparation von Proben für die Holographie geeignet.

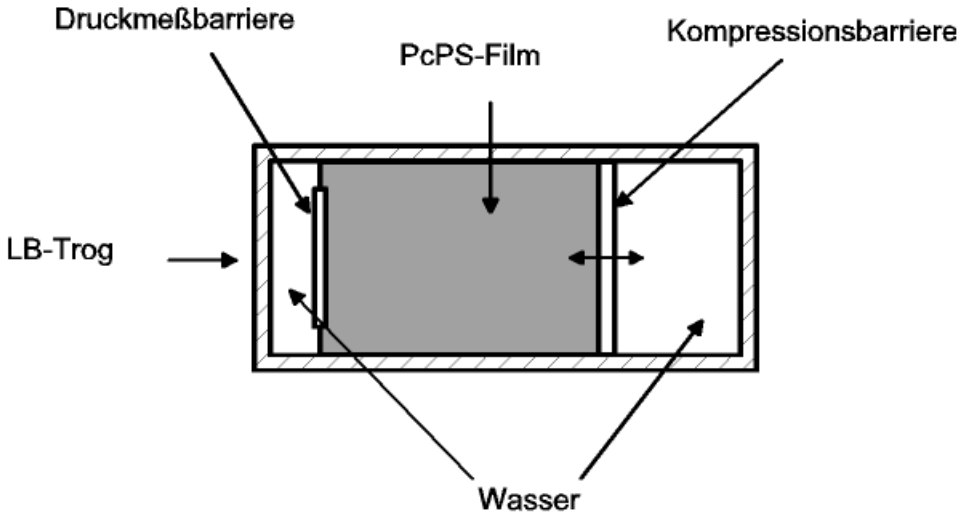


Bild 5-4 Schematischer Aufbau eines LB-Trogs.

Zur Übertragung von PcPS auf die Oberfläche wurde zunächst ein mit Teflon beschichteter Trog mit Wasser gefüllt. Das in einem mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittel gelöste PcPS wurde beim sogenannten Spreiten tropfenweise auf die Wasseroberfläche aufgebracht. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels bildete sich

auf der Wasseroberfläche ein Polymerfilm aus, der durch das Zusammenfahren der Barriere komprimiert wurde. Mit einem Drucksensor wurde der Oberflächendruck gemessen, der zur Übertragung auf 23 nN/m eingestellt wurde. Durch Ein- und Austauchen der strukturierten Siliziummembranen bei 7 °C wurde PcPS auf das Substrat übertragen.

5.2 Ergebnisse und Diskussion

Bild 5-5 zeigt eine Annäherung der Spitze an eine Mikrostruktur, die zuvor mit PcPS präparierte wurde.

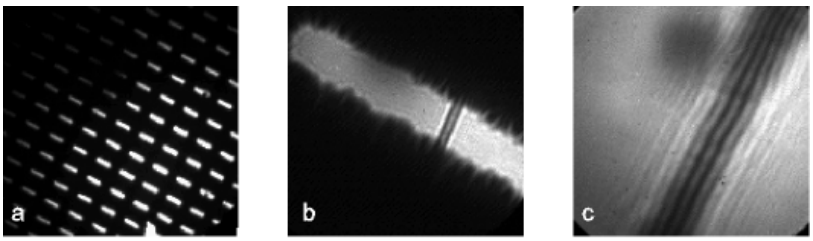


Bild 5-5 Annäherung an ein PcPS-Molekül: a) Die Spitze befindet sich in einem Abstand von 20µm vor der Probe. b) Nach einer Annäherung auf einen Abstand von 2µm an die Probe ist ein Strang zu erkennen. Wird die Spitze bis auf 0,20 µm angenähert, wird das Interferenz-muster dominant und kann als Hologramm interpretiert werden(c)(Gölzhäuser et al., 1998).

Ist die Spitze ca. 20 µm vom Objekt entfernt, so erhält man ein Projektionsbild der Mikrostruktur in dem nur die Spalten zu erkennen sind (Bild 5-5, a). Der Abstand wird dabei über die Piezo-Eichung bestimmt[9]. Bei einer weiteren Annäherung auf 2 µm ist über der Spalte ein Steg zu erkennen (Bild 5-5, b). Nähert man die Spitze bis auf einen Abstand von 0,20 µm an die Probe an, zeigt sich das Hologramm, das durch die Interferenz der am Molekül gestreuten Welle mit der Referenzwelle gebildet wurde (Bild 5-5, c).

Das Hologramm kann jedoch noch nicht direkt interpretiert werden, sondern muß rekonstruiert werden, um Aussagen über die Struktur des Moleküls treffen zu können.

[9] Die Piezo-Eichung erfolgt im EPM über eine kreisförmige Struktur mit einem Durchmesser von 500 nm. Die Spitze wird an diese Struktur angenähert, bis die Struktur das ganze Bildfeld ausfüllt. Über den Strahlensatz wird der Abstand von Spitze zu Objekt ermittelt.

Die Rekonstruktion erfolgt wie in Kapitel 3.4 beschrieben. Die Hologramme müssen dazu entsprechend bearbeitet werden.

Zunächst wird der Hintergrund, der durch die anisotrope Emission der Elektronenquelle hervorgerufen wird, abgezogen. Idealerweise könnte dies mit einer Aufnahme des Emissionsmusters ohne Objekt durchgeführt werden (vgl. Kapitel 7). Dies ist in der Praxis jedoch nicht immer möglich. Änderungen im Abstand zwischen Spitze und Probe sowie die Spitzengeometrie und das angelegte Potential haben einen großen Einfluß auf die elektrische Feldstärke am Ort der Emission und geben somit die Emissionsspannung vor. Zudem können durch Kontaminationen der Spitze durch desorbiertes Probenmaterial ihre Emissionseigenschaften geändert werden.

Aus diesem Grund wird der Hintergrund mit dem Filter „Background Subtraction“ numerisch berechnet und abgezogen, indem von jedem Pixel der Mittelwert der benachbarten Pixel subtrahiert wird. Anschließend wird mit der „Offset Subtraction“ ein Mittelwert über alle Punkte gebildet und von jedem Punkt abgezogen.

Das Kontrastbild kann jedoch nicht direkt zur numerischen Rekonstruktion eingesetzt werden, da der Rand des Bildschirms eine scharfe Kante darstellt. Diese muß über den Filter „Cosine Window“ geglättet werden, um daraus resultierende Störungen in der Rekonstruktion zu beseitigen. Dies geschieht mit einer Cosinus-Funktion, die über einen vom Benutzer definierten Bereich des Bildes angewandt wird (Kreuzer und Pawlitzek, 1998).

Aus dem auf diese Weise bearbeiteten Hologramm kann mittels der Kirchhoff-Helmholtz-Transformation die Wellenfront in Objektebene rekonstruiert werden. Als Parameter müssen die Elektronenenergie und geometrische Größen wie die Bildschirmgröße, der Abstand der Spitze zur Probe, der Abstand Probe zum Detektor und die Größe des Fensters, in das die Rekonstruktion eingefügt werden soll, angegeben werden.

In Bild 5-6 sind die Bilder nach der Anwendung der entsprechenden Filter auf die Hologramme und zur Veranschaulichung der Auswirkungen der Filter auch die Rekonstruktionen aus den so bearbeiteten Hologrammen dargestellt.

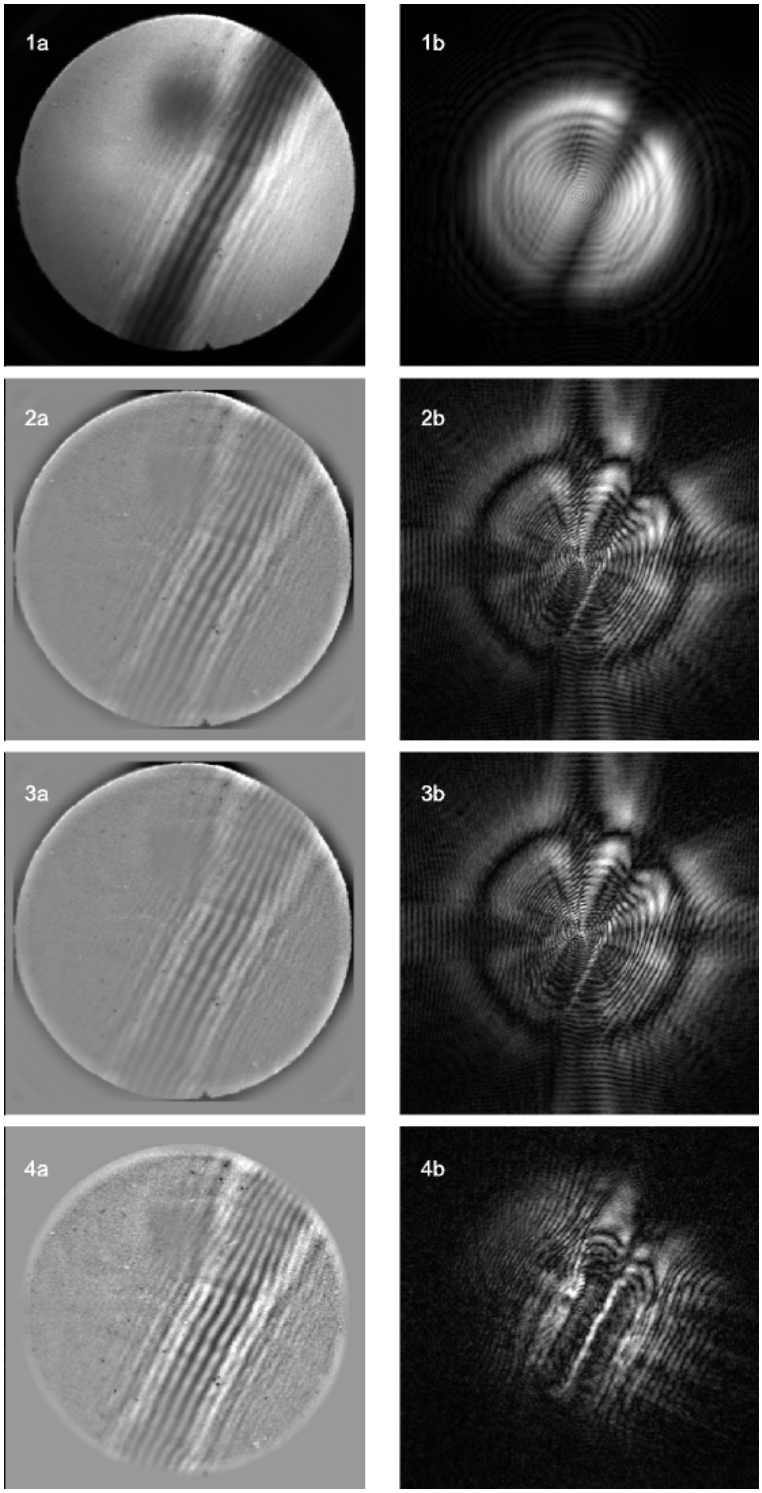


Bild 5-6 Auswirkungen der verschiedenen Filter auf die Rekonstruktion aus dem Hologramm. In 1 ist das Originalhologramm mit Rekonstruktion abgebildet. In 2 sieht man das Hologramm nach Abzug des Hintergrundes und in 3 nach der anschließend erfolgten "Offset Subtraction". In 4 ist schließlich das mit dem Cosinus Window bearbeitete Hologramm mit der daraus resultierenden Rekonstruktion zu sehen, die einen Strang zeigt.

In Bild 5-6, 1a ist die unbearbeitete Aufnahme des Hologramms zu sehen. Wird dieses direkt rekonstruiert, so erhält man ein Bild in dem ein heller Hintergrund dominiert. Das ist dadurch verursacht, daß das Hologramm durch das Feldemissionsbild der Spitze überlagert wird.

Das Bild 5-6, 2a zeigt das Hologramm nach Abzug des Hintergrundes. Durch die runde Form des Phosphorschirms und die quadratische Form des Bildes erhält man scharfe Kanten, welche die Rekonstruktion (Bild 5-6, 2b) dominieren.

Erst durch die Anwendung des Filters „Circular Cosine Window“ (Bild 5-6, 4a) nach „Offset Subtraction“ (Bild 5-6, 3a) wird die scharfe Kante entfernt und die Rekonstruktion der Wellenfront zeigt ein stäbchenförmiges Objekt.

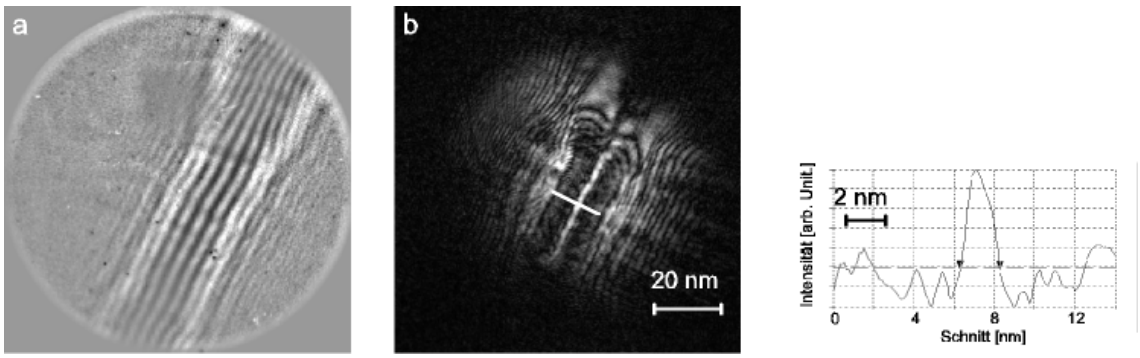


Bild 5-7Nach Abzug des Hintergrunds (a) wird PcPS aus dem Hologramm, das mit 71 eV bei einem Abstand von 200 nm aufgenommen wurde, als ein Strang mit einem Durchmesser von ca. 2 nm rekonstruiert.

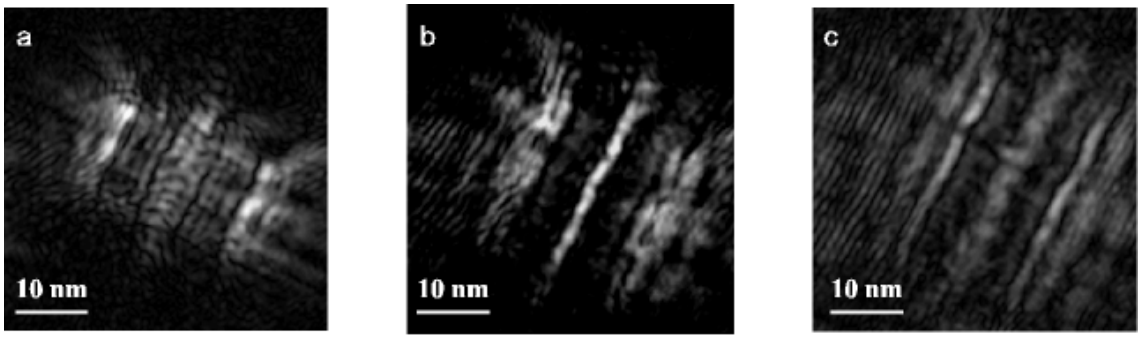


Bild 5-8 Rekonstruktionen mit unterschiedlichen Abständen von Spitze zu Objekt. In Bild a wurde bei einem Abstand von 120 nm, in b mit dem korrekten Abstand von 200 nm rekonstruiert. In Bild c wurde die Rekonstruktion mit 240 nm Abstand Spitze zu Objekt rekonstruiert (Gölzhäuser et al., 1998).

Bild 5-7 zeigt die Rekonstruktion aus dem mit 71 eV aufgenommenen Hologramm von PcPS nach der oben beschriebenen Bearbeitung auf 102,4 x 102,4 nm^2. Der Schnitt durch die Rekonstruktion zeigt, daß der helle Bereich, der einer hohen Dichte von elastisch gestreuten Elektronen entspricht, einen Durchmesser von ca. 2 nm besitzt. Das entspricht dem Durchmesser eines einzelnen PcPS-Moleküles (Tans et al., 1997). Simulationen die im Kapitel 9.1 vorgestellt werden, ergeben ein übereinstimmendes Bild.

In die Rekonstruktion geht der Abstand zwischen Spitze und Objekt ein. Die Abstandsbestimmung über die Piezoeichung weist jedoch einen Fehler von ca. 20 % auf. Aus diesem Grund wird mit verschiedenen Abständen rekonstruiert. Die Rekonstruktion besitzt in der Objektebene die höchste Intensität mit scharfen Konturen. Diese Rekonstruktion wird dann weiter betrachtet.

Rekonstruiert man mit Abständen von Spitze zu Objekt, die nicht mit der Geometrie der Aufnahme übereinstimmen, so ist in der Rekonstruktion kein Objekt zu erkennen (Bild 5-8).

In Kapitel 6.2.1 und Kapitel 9.2 wird der Einfluß von größeren Abständen auf die Auflösung besprochen. Aus Simulationen ist zu ersehen, daß bei der gegebenen Geometrie der Einfluß der Energien zwischen 30 und 100 eV auf die Rekonstruktionen nicht signifikant ist (vergleiche Kapitel 9.1).

6 DNA

Es zählt heute zum Allgemeinwissen, daß die DNA Träger der genetischen Informationen ist. Dies gilt für alle aus Zellen bestehende Lebewesen sowie für viele Viren.

Die DNA ist aus Nucleotid-Bausteinen aufgebaut, die wiederum aus einer Base, einem Zucker und einem Phosphat-Rest bestehen. Die Nukleinsäure-Basen sind aromatische Heterocyclen, die sich entweder vom Pyrimidin oder vom Purin ableiten: Cytosin (C) und Thymin (T) bzw. Adenin (A) und Guanin (G). Die Nucleinsäure-Base sind mit 2-Desoxyribose verknüpft und die 5‘-OH-Gruppe der Zuckerkomponente der Nucleoside mit Phosphorsäure verestert. Diese Nucleotide können zu Polynucleotiden über eine Veresterung des Phosphat-Restes eines Nucleotids mit der 3‘-OH-Gruppe eines weiteren Nucleotides polykondensieren. Die Polynucleotide tragen am 5‘-Ende einen freien Phosphat-Rest und am 3‘-Ende eine freie OH-Gruppe. Zur Darstellung der Struktur von Polynucleotiden verwendet man die Abkürzung der Nucleosid-Bausteine, die man in 5‘→3‘-Richtung von links nach rechts schreibt.

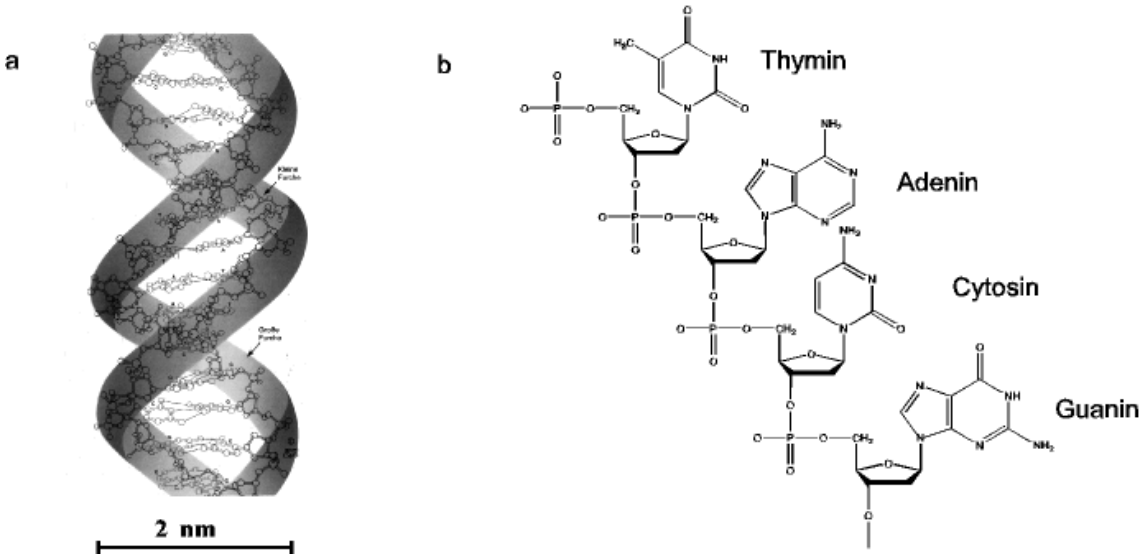


Bild 6-1 zeigt die Struktur der B-DNA (a) und einen Ausschnitt aus einer DNA (b).

In DNA ist die Anzahl von Adenin- und Thymin-Resten immer gleich; entsprechendes gilt auch für die Guanin- und Cytosin-Reste (Chargaff-Regel). Das 1953 von J. Watson und F. Crick formulierte Modell der DNA-Struktur erklärt diese konstanten Basenverhältnisse: Intakte DNA besteht aus zwei Polydesoxynucleotid-Molekülen („Strängen“). Jede Base in einem Strang ist durch eine komplementäre Base im anderen Strang durch Wasserstoff-Brücken verknüpft (Watson und Crick, 1953). In A-T-Paaren können sich zwei und in G-C-Paaren drei Wasserstoff-Brücken ausbilden. Diese Basenpaarung wird durch die unterschiedliche Polarität der beiden Stränge, die sich in Form einer Doppelhelix um eine gemeinsame Achse winden, ermöglicht. Die Basen sind ins Innere gekehrt, die Phosphorsäure- und Zuckerreste ragen nach außen.

Die Konformation der doppelsträngigen DNA ist vom Wassergehalt und der Konzentration der Ionen abhängig. Es wird zwischen A-, B-, C-, D- und Z-Konformation unterschieden.

Die Unterschiede der verschiedenen Konformationen liegen in der Höhe der Schraubenwindung p (pitch), der Höhe h eines auf die Helixachse projizierten Nucleotids, die Zahl von Nucleotiden pro Helix-Windung n und der sog. „angular twist“ 360°/n, die Rotation pro Nucleotid. Die Daten der verschiedenen Typen sind in Tabelle 6-1 aufgeführt.

Ein Charakteristikum der Nucleinsäure-Doppelhelices ist das Auftreten von Furchen auf der Mantelfläche. So ist die große Furche bei B-DNA breit und tief (w = 11,7 Å; d = 8,5 Å) und die kleine Furche eng und tief (w = 5,7 Å; d = 7,5 Å). Bei der A-Form ist die große Furche eng und tief (w = 2,7 Å; d = 13,5 Å) und die kleine Furche breit und flach (w = 11,0 Å;d = 2,8 Å).

Die D-DNA wird nur bei alternierenden Sequenzen wie bei Poly (dA-dT)·Poly(dA-dT) oder Poly(dG-dC) gefunden.

Die Z-DNA ist im Gegensatz zu den oben genannten Helices linksgängig. Ihre Struktur wurde bei Röntgenstrukturanalysen des Oligomers d(CGCGCG) erhalten. Sie besitzt nur eine kleine tiefe Furche. B-DNA mit entsprechender Sequenz kann sich bei hoher Salzkonzentration in die Z-Konformation umwandeln (Ebert, 1993), (Saenger, 1983).

Helix	A	B	C	D	Z
Schraubenrichtung	rechts	rechts	rechts	rechts	links
Rotation pro Bp	32,7°	36°	38,6°	45°	-60° pro CG-Dimer
Anzahl der Basen pro Helixwindung	11	10	9,33	8	12
Steigung der Helix	28,3Å	34 Å	30,7 Å	24 Å	44,5 Å
Steigung pro Bp	2,56 Å	3,4 Å	3,3 Å	3,0 Å	3,7 Å
Durchmesser	ca. 2,6 nm	ca. 2 nm			ca. 1.8 nm

Tabelle 6-1 Strukturparameter der DNA-Doppelhelices

Die DNA ist die Matrize zur Proteinbiosynthese. Sie wird zunächst bei der Transkription in RNA umgewandelt. Deren Basensequenz gibt bei der Translation an, in welcher Reihenfolge die verschiedenen Aminosäuren, die Bausteine der Proteine, aneinandergefügt werden (z. B. (Voet und Voeth, 1992)).

DNA liegt in der Lösung als statistischer Knäuel vor. Durch die helikale Struktur besitzt sie jedoch eine Persistenzlänge von ca. 60-80 nm. Über diese Länge verhält sie sich wie ein steifes Stäbchen und kann die Spalte der strukturierten Siliziummembran überbrücken.

Im Elektronen-Projektionsmikroskop befindet sich die DNA nach der Präparation jedoch nicht mehr im wäßrigen Medium, sondern im Ultrahochvacuum. Mit den ersten Experimenten soll überprüft werden, wie weit DNA aufgelöst werden kann und ob an Hand der Furchen Aussagen über die Konformation getroffen werden können.

6.1 Präparation von DNA

Als Objekt für die holographische Abbildung dient Desoxiribonucleinsäure vom Kalbsthymus[10].

Die DNA wird zunächst in 10 mM Natriumperchloratlösung durch mehrmalige rotierende Bewegungen über 24 h gelöst. Anschließend wird die Lösung auf 0,1 mg/ml verdünnt.

Mit DNA wurden verschiedene Substrate präpariert. Zum einen wurden Kohle-Lochfolien, die mit Gold/Palladium bedampft waren, verwendet, zum anderen aber auch mikrostrukturierte Siliziummembranen mit unterschiedlichem Design. Die Versuche mit Goldfolien zeigen jedoch , daß diese bei der Präparation zerstört werden.

Die Präparation der DNA auf die Substrate erfolgte durch Auftropfen der verdünnten Lösung. Die Lösung wurde nach zwei Minuten von einem an den Rand des Substrats gehaltenen Präzisionswischtuch aufgesaugt. Anschließend erfolgt der Transfer der Probe in das Vorvakuum und nach 10 min in die UHV-Kammer.

6.2 Ergebnisse und Diskussion

DNA wurde sowohl auf Kohle-Lochfolien als auch auf strukturierte Siliziummembranen mit unterschiedlichen Abständen von Spitze zu Objekt aufgenommen.

6.2.1 DNA auf Kohle-Lochfolien

Bei Aufnahmen von DNA auf Kohle-Lochfolien werden die Objektträger vor der Präparation genau „kartiert“, um DNA-Stränge nach der Präparation leicht erkennen zu können.

In Bild 6-2 a, b sind die „Navigationsaufnahmen“ (Aufnahmen der leeren Objektträger) im Projektionsmodus zu sehen. Unter den Navigationsbildern befinden sich die Aufnahmen der gleichen Stellen nach der Präparation (Bild 6-2 c, d). Es ist zu erkennen, daß sich ein DNA-Strang 800 nm über das Netzwerk aus Kohlenstoffasern legt.

[10] Calf thymus Deoxyribonucleic acid Sodium Salt, D1501, Sigma.

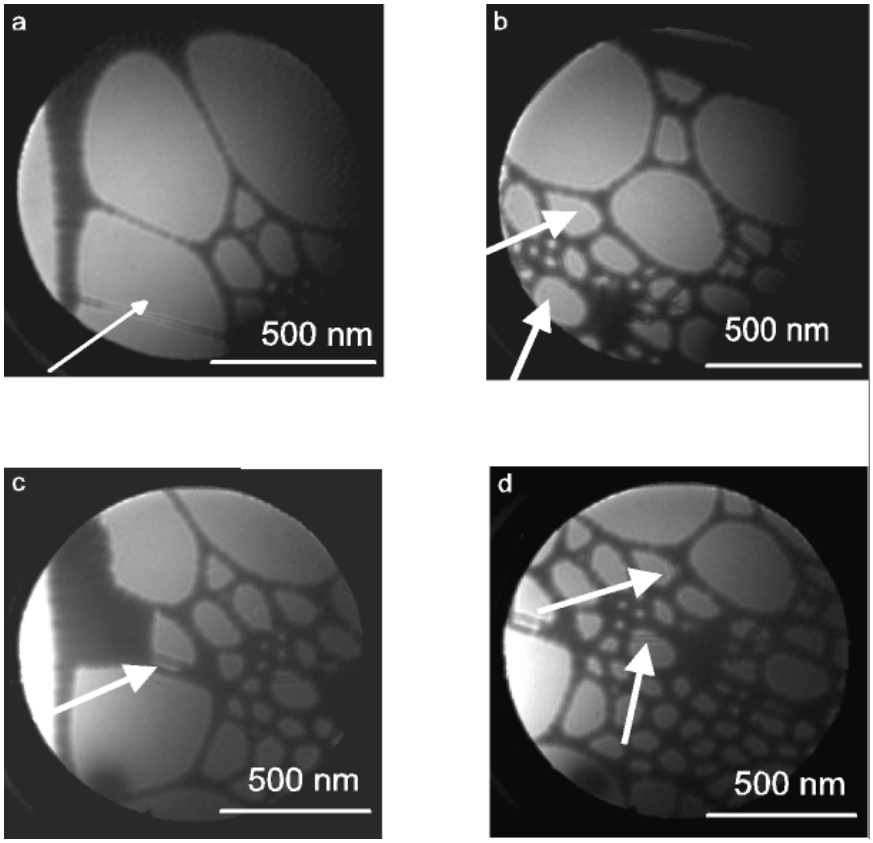


Bild 6-2 Aufnahmen des Kohle-Lochfilms vor (a und b) und nach derPräparation mit DNA (c und d). Die Pfeile markieren die Stellen, auf denen sich nach der Präparation die DNA befindet.

Bereits im Projektionsmodus sind Unterschiede zwischen den Kohlenstoffasern, die mit Gold/Palladium bedampft wurden, und dem DNA-Strang zu sehen. Die bedampften Fasern erscheinen breiter als der DNA-Strang.

Bei einer Annäherung an den Strang mit derselben Spitze wird deutlich, daß die Information von einem Abstand von 600 nm über 300 nm bis 140 nm zunimmt (Bild 6-3). Die Schnitte durch die Hologramme verdeutlichen dies. Je kleiner der Abstand zwischen Spitze und Objekt ist, desto mehr Interferenzen sind zu beobachten. Dies ist darauf zurückzuführen, daß bei einem größeren Abstand ein Einfluß des Objektträgers vorhanden ist. Zum einem werden Elektronen an den Rändern des Objektträgers gestreut, die dann ebenfalls mit dem Objektstrahl interferieren. Zum anderen wird der Objektträger als Schattenbild auf dem Detektor abgebildet, da er nicht transparent für die niederenergetischen Elektronen ist. Erst bei einem Abstand von 140 nm ist der Objektträger nicht mehr mit abgebildet.

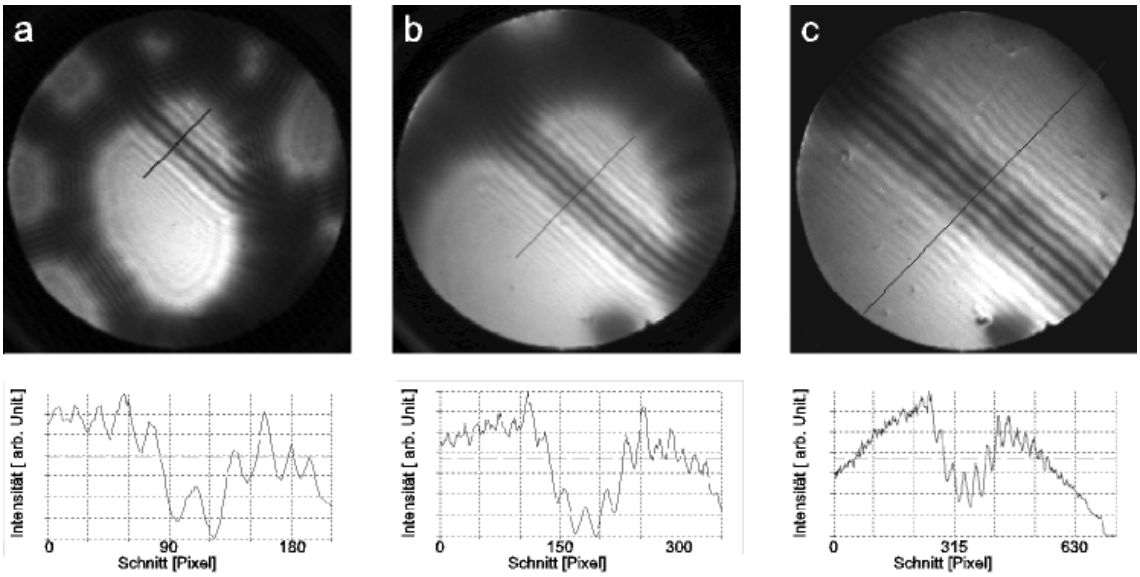


Bild 6-3 Hologramme des DNA-Strangs bei einem Abstand zwischen Spitze zur Probe von 600 nm (a), 300 nm (b) und 140 nm (c). Die zugehörigen Schnitte durch die Hologramme befinden sich jeweils unter dem Hologramm.

Nach der Bearbeitung des Hologramms wie in Kapitel 5 beschrieben kann die Wellenfront in der Objektebene aus dem Kontrastbild über den numerischen Algorithmus rekonstruiert werden.

Bei einem Abstand von 300 nm und einer Energie von 38 eV ergibt die Rekonstruktion einen Strang mit einem Durchmesser von ca. 3 nm (Bild 6-4 IIb), bei 600 nm und 33 eV sogar ca. 6 nm (Bild 6-4 Ib). Die Schnitte durch die Rekonstruktionen zeigen, daß nur bei einem Abstand von 140 nm Spitze zu Probe bei einer Energie von 32 eV DNA mit einem Durchmesser von ca. 2 nm rekonstruiert wird (Bild 6-4 IIIb). Zu diesem Experiment wurden auch Simulationen erstellt, die im Kapitel 9.2 diskutiert werden. Diese bestätigen, daß bei dem gegebenen Aufbau die beste Auflösung bei Abständen von Spitze zu Objekt von um die 100 nm erhalten werden kann. Die Ursache dafür wird dort diskutiert.

Die Rekonstruktion aus dem Hologramm bei 140 nm weist auch entlang der Molekülachse eine Periodizität auf. Ein Schnitt entlang des Strangs zeigt, daß er eine Periodizität von ca. 2 nm besitzt. Diese Periodizität ist kleiner als für B-DNA erwartet wird. Eine Ursache hierfür ist ein mögliches Durchhängen des Moleküls. DNA besitzt

zwar eine Persistenzlänge von 60-80 nm, die Öffnung des Kohle-Lochfilmes auf der die DNA aufgebracht wurde, ist jedoch größer. So ist es durchaus möglich, daß das Molekül bei der Präparation nicht über die Öffnung gespannt ist sondern durchhängt.

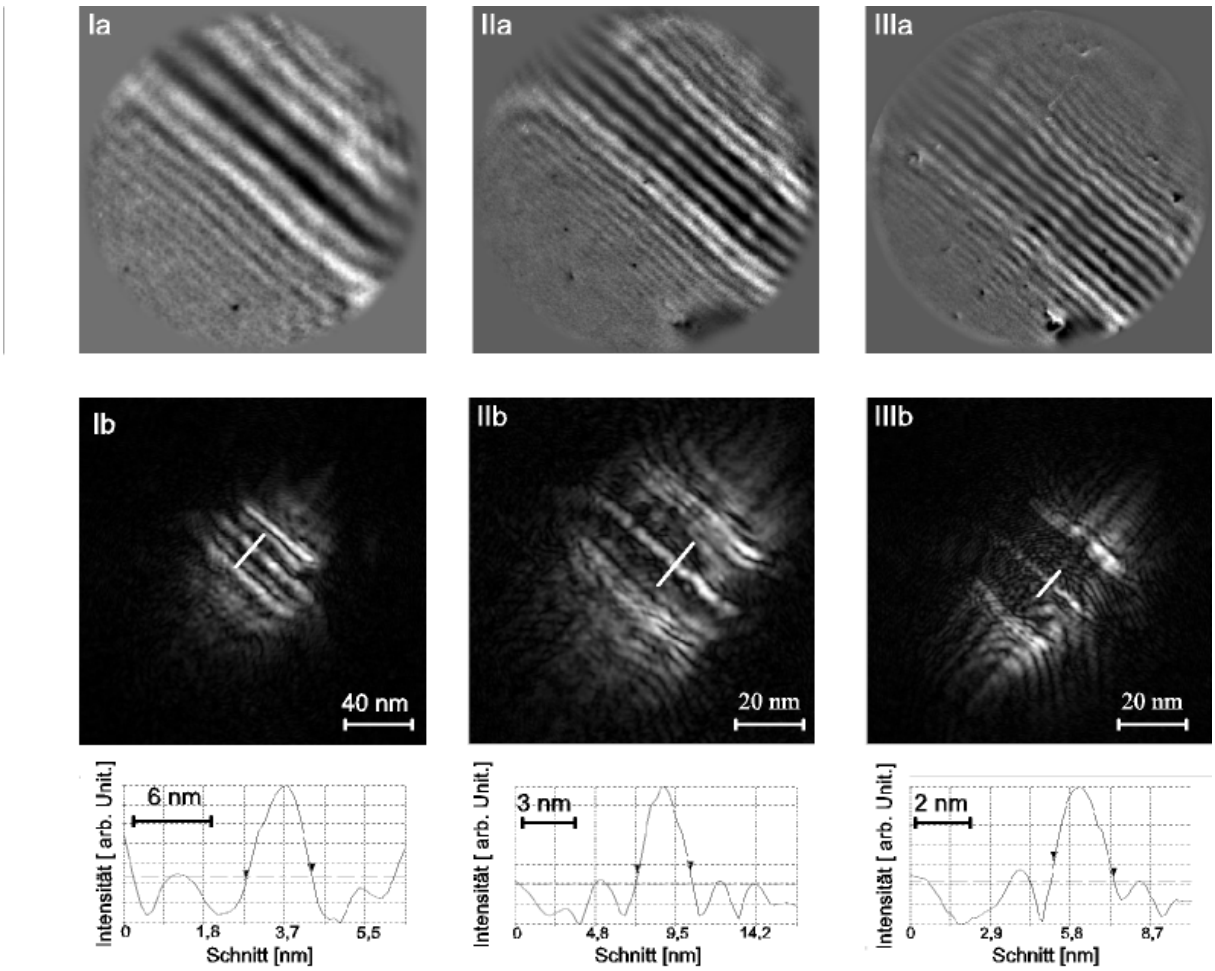


Bild 6-4 Rekonstruktionen der Hologramme bei verschiedenen Abständen. Ia zeigt das Hologramm, das mit einer Energie von 33 eV bei einem Abstand von 600 nm aufgenommen wurde nach Abzug des Hintergrundes. IIa zeigt das Kontrastbild bei einem Abstand von 300 nm und 38 eV, IIIa bei einem Abstand von 140 nm und 32 eV (Ia, IIa, IIIa). Die entsprechenden Rekonstruktionen befinden sich unter den Hologrammen (Ib, IIb, IIIb) mit einem Schnitt senkrecht zum Strang.

Die DNA befindet sich ebenfalls nicht in wäßrigem Medium, so daß auch dadurch eine andere Konformation vorliegen könnte. Die Periodizität weist jedoch auf eine Doppelhelix-Struktur hin, deren große Furche aufgelöst werden kann.

Die Periodizität konnte allerdings nur selten beobachtet werden. Dies liegt an der Schwingungsentkopplung der Apparatur. Bei Annäherungen der Spitze zum Objekt bis

auf den Abstand < 1 µm sind die Schwingungen zwischen Spitze zur Probe signifikant. Die Störungen sind häufig so stark, daß das Interferenzmuster stark verschwommen ist. In manchen Fällen sind Interferenzen noch zu erkennen, aber die Rekonstruktion zeigt, daß sich die Wellenfront in Objektebene nicht rekonstruieren läßt. In Bild 6-6 ist ein Beispiel gezeigt, in dem die Auswirkung der Schwingung auf die holographische Abbildung eines DNA-Stranges gezeigt wird.

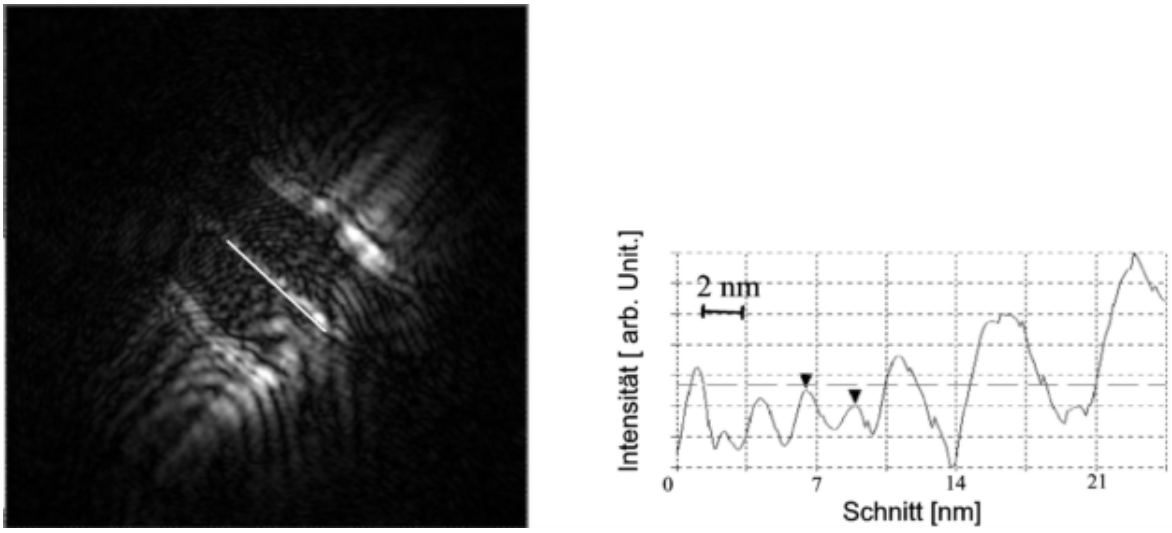


Bild 6-5 Rekonstruktion des Hologramms bei einem Abstand von 140 nm und 32V mit einem Schnitt parallel zum Strang, der die Periodizität entlang des Stranges zeigt.

Bei dem Hologramm in Bild 6-6, a beträgt der Abstand zwischen Spitze und Probe 100 nm und die Energie 29 eV. Im Vergleich der beiden Hologramme ist zu sehen, daß bei beiden ein Interferenzmuster zu erkennen ist, dessen Kontraste im Hologramm Bild 6-6, a schwächer ausgeprägt sind, was auf die Schwingungen zurückzuführen ist. Dies hat zur Folge, daß aus dem Hologramm Bild 6-6, d ein Strang mit einem Durchmesser von ca. 2 nm rekonstruiert werden kann (Bild 6-6, f), während die Rekonstruktion aus dem Hologramm Bild 6-6, a ein Muster ergibt, das auf einen Strang hinweist, der durch Störungen verzerrt ist (Bild 6-6, c). Dieses Beispiel zeigt, daß eine gute Schwingungsentkopplung für die holographische Abbildung mit niederenergetischen Elektronen ausschlaggebend ist.

In der Konzeption einer neuen Apparatur zur Holographie mit niederenergetischen Elektronen wurde dies berücksichtigt. Neben einem größeren Detektor besitzt diese Apparatur eine bessere Schwingungsisolation, die unempfindlich für akustische Einkoppelungen und Gebäudevibrationen ist.

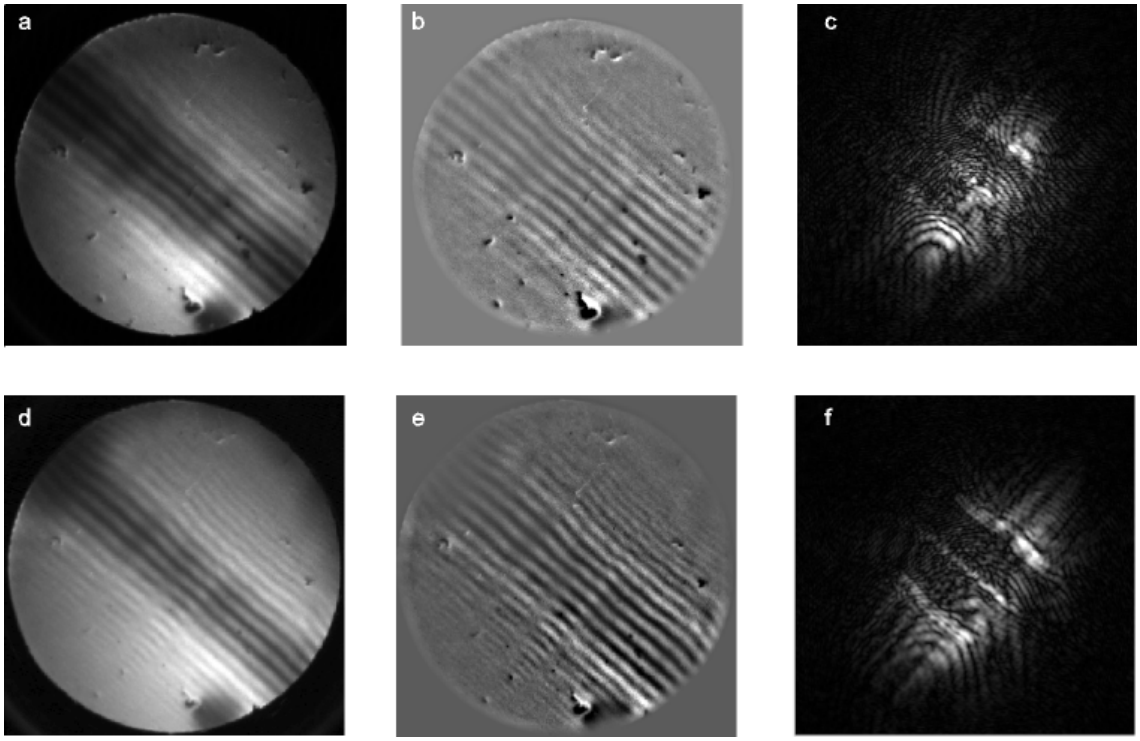


Bild 6-6 zeigt zwei Hologramme eines DNA-Strangs(a (d = 100 nm; E = 29V) und d (d = 140 nm E = 32 eV)), deren Kontrastbilder (b und e) und die Rekonstruktionen aus den Hologrammen (c und f).

Abbildungen von DNA in der neuen Apparatur zeigen ebenfalls eine Periodizität entlang des DNA-Stranges. Die DNA wurde für diese Experimente auf eine strukturierte Siliziummembran aufgebracht. Im folgenden Kapitel wird nach Aufnahmen mit der alten Apparatur eine holographische Abbildung von DNA mit der neuen Apparatur beschrieben.

6.2.2 DNA auf strukturierten Siliziummembranen

Die strukturierten Siliziummembranen zeichnen sich dadurch aus, daß sie vor der Präparation zwar im Projektionsmodus charakterisiert, aber nicht kartiert werden müssen, da sie eindeutig vom adsorbierten Material zu unterscheiden sind. So ist in Bild

6-7, a ein DNA-Doppelstrang zu sehen, der sich über mehrere Spalte der mikrostrukturierten Membran legt. Diese Abbildung wurde bei einem Abstand von 5700 nm mit 161 eV aufgenommen. Nach einer Annäherung an den Doppelstrang auf einen Abstand von 950 nm mit einer Energie von 31 eV sind Interfernzen zu beobachten. Aus dem Hologramm konnte nach Abzug des Hintergrundes ein Strang mit einem Durchmesser von 5,4 nm rekonstruiert werden.

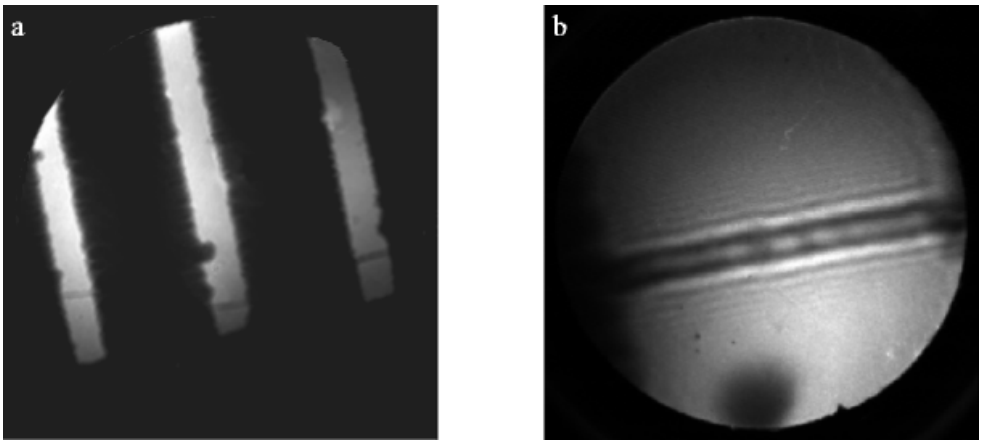


Bild 6-7 DNA auf strukturierter Siliziummembran. In a ist der DNA-Strang über meheren Spalten zu sehen (d = 5,7 µm; E = 161 eV).. Bei einem Abstand von 950 nm sind Interferenzen zu beobachten (E = 31 eV).

Ein Problem bei der Präparation auf strukturierte Siliziummembranen tritt auf, wenn die Dicke der Membran kleiner als 100 nm ist. In einem solchen Fall, wellt sich die Membran beim Bedampfen mit Gold/Palladium. Fährt man nun mit einem Abstand von einigen 100 nm über die Probe, so kann die Spitze an die Membran stoßen und beide werden zerstört. So war ein Annähern an einige Siliziummembranen nur bis auf einen relativ große Abstände von einigen 100 nm möglich.

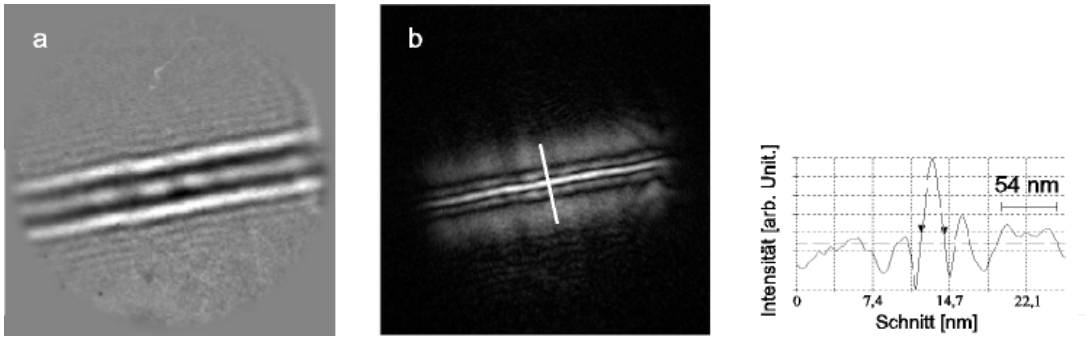


Bild 6-8 Hologramm aus Bild 6-7, b, nach Abzug des Hintergrundes (a). Die Rekonstruktion zeigt einen Strang mit einem Durchmesser von ca. 5 nm.

In Bild 6-9 ist ein Hologramm eines DNA-Strangs abgebildet, das mit der neuen Apparatur mit 40 eV bei einem Abstand von 140 nm aufgenommen worden ist (Eisele, 2001). Die Rekonstruktion aus dem Hologramm nach der Vorbereitung zur numerischen Rekonstruktion ergibt einen Strang mit einem Durchmesser von ca. 2 nm.

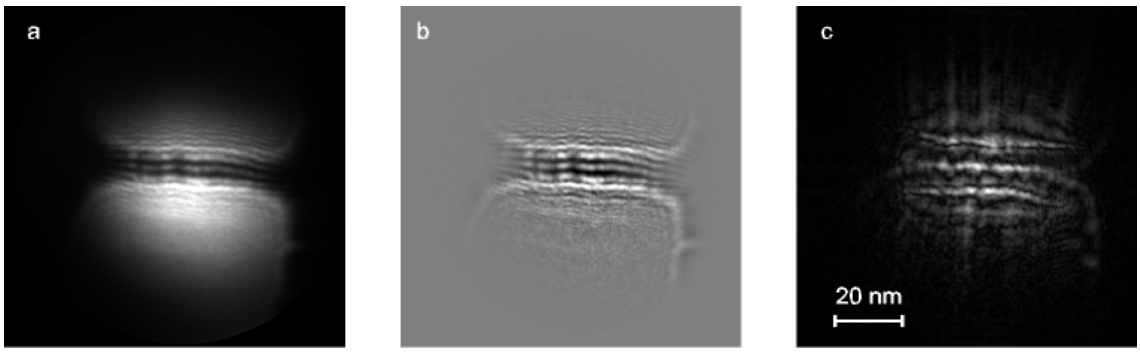


Bild 6-9 Hologramm eines DNA-Strangs, das mit einer Energie von 40 eV bei einem Abstand von 140 nm auf einem Bildschirm mit einem Durchmesser von 75 mm aufgenommen wurde(a). In b ist das Hologramm nach Abzug des Hintergrundes (b) und in c die Rekonstruktion des Stranges auf 102 x 102 nm abgebildet.

Der rekonstruierte Strang weist eine periodische Struktur entlang des Stranges auf. Der Schnitt durch die Rekonstruktion zeigt, daß diese Struktur eine Periodizität von ca. 3 nm besitzt. Diese Periodizität spricht für die Konformation der DNA-Doppelhelix.

6.2.3 Vergleich mit anderen Arbeiten

In einer Veröffentlichung von Fink et al. wurden bereits 1997 Hologramme und Rekonstruktionen von DNA gezeigt, die bei 40 und 70 eV aufgenommen wurden. Die Rekonstruktionen zeigen ein Strang mit einem Durchmesser von ca. 2 nm, aber keine Periodizität entlang des Stranges (Fink et al., 1997).

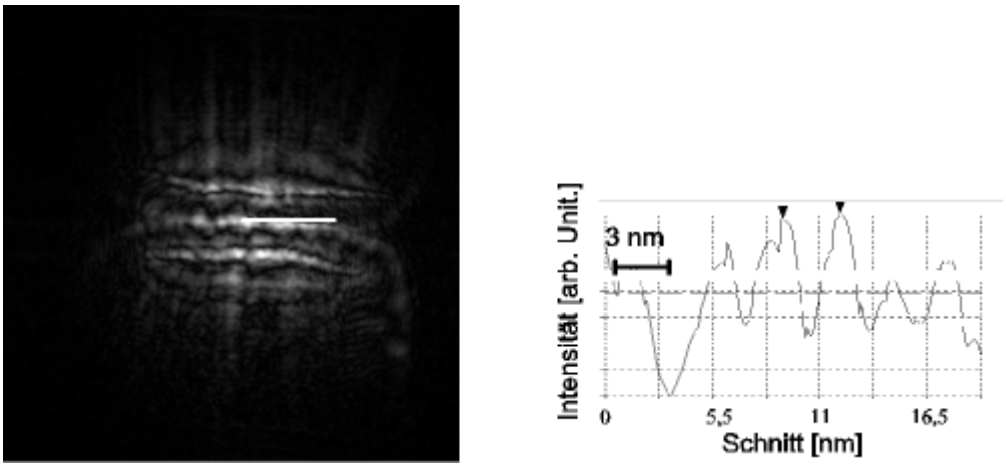


Bild 6-10 Schnitt entlang des Stranges, der aus dem Hologramm Bild 6-9 a rekonstruiert wurde. Die Periodizität des Stranges wird im Schnitt deutlich.

Ein Unterschied zwischen den Arbeitsbedingungen bei Fink und den oben vorgestellten Experimenten liegt im vorhandenen Kammerdruck. Bei Finks Aufnahmen betrug der Druck 10^{-7} mbar während wir bei einem Druck zwischen 5 x 10^{-10} bis 1x 10^{-9} gearbeitet haben. Dies ist zum einen für die Emissionsstabilität der Spitze von Bedeutung zum anderen aber auch für die Eigenschaften der Probe.

Schon bei einem Druck von 1 x 10^{-8} mbar ist im Emissionsbild der Spitze ein starkes Flackern zu beobachten, was durch Adsorption und Desorption von Restgas zu erklären ist. Bei einem Arbeitsdruck von 2 x 10^{-9} mbar kann man minutenlang ein Emissionsbild der Spitze ohne Flackern beobachten. Ein konstantes Emissionsverhalten der Spitze ist für die Aufnahme von hochauflösenden Hologrammen entscheidend.

Die frisch präparierte Probe ist mit Wasser und Puffer bedeckt, was im Vakuum zunächst desorbiert. Aufnahmen von Proben direkt nach dem Transfer in das Ultrahochvakuum weisen Aufladungen der Probe auf. Weiter ist ein starkes Flackern

der Spitze durch die Adsorption von desorbierten Adsorbaten von der Probe zu beobachten. Nach einigen Stunden im UHV zeigt sich keine Aufladung der Probe mehr.

Aber auch während der Beobachtung der Probe kann ein kurzes Aufflackern der Spitze auftreten, verursacht durch eine von der Elektronenemission stimulierte Desorption von Adsorbaten, die kurzzeitig die Spitze kontaminieren. Durch Entfernen der Spitze von der Probe und Heizen der Spitze kann diese wieder von den Adsorbaten gereinigt und erneut eingesetzt werden.

Diese Arbeitsbedingungen können zu einer Auflösung der DNA-Doppelhelix bei gleicher Detektorgröße und niedrigeren Elektronenenergien als bei Fink beschrieben beitragen. Der Druck im Rezipienten ist somit auch für eine gute Auflösung der Hologramme entscheidend.

In einem anderen experimentellen Aufbau hat T. Matsumoto et al. DNA holographisch abgebildet. Mit einem Feldemissions-Elektronenmikroskop wurden Hologramme von virtrifizierter DNA aufgenommen und numerisch rekonstruiert. Die Beschleunigungsspannung betrug dabei 100 kV, also mehr als das tausendfache als bei der Holographie mit niederenergetischen Elektronen. Die numerische Rekonstruktion aus dem Hologramm zeigt einen Strang mit einem Durchmesser von ca. 2 nm (Matsumoto et al., 1995).

Der Vorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit DNA im vitrifizierten Zustand abbilden zu können. Das Molekül wird dabei in seinem Zustand in der Lösung eingefroren. Durch den Elektronenstrahl schmilzt das gefrorene Wasser jedoch in kurzer Zeit und das Molekül wird zerstört.

Die Holographie mit niederenergetischen Elektronen ermöglicht im Gegensatz dazu ein längeres Beobachten des Stranges. Daraus ergibt sich z. B. die Möglichkeit, DNA einer radioaktiven Strahlung auszusetzen und mögliche Schäden direkt zu beobachten.

Fink et. al. haben in einem Elektronen-Projektionsmikroskop so auch Leitfähigkeitsmessungen an DNA durchgeführt (Fink und Schönberger, 1999).

7 Der Komplex von cis-Platin an DNA

Ende der 60er Jahre wurde die Antitumor-Aktivität von cis-Diammindichloroplatin(II) (cis-Platin) erkannt (Rosenberg et al., 1969). Nach dieser Entdeckung wurden eine Vielzahl von Untersuchungen zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus von cis-Platin durchgeführt (Lippard, 1987), (Reedijk, 1987). Sie zeigten, daß cis-Platin an DNA bindet und die Aktivität der DNA-Polymerase stoppt. Dadurch wird die Zellteilung, die bei Krebszellen unkontrolliert verläuft, unterbunden.

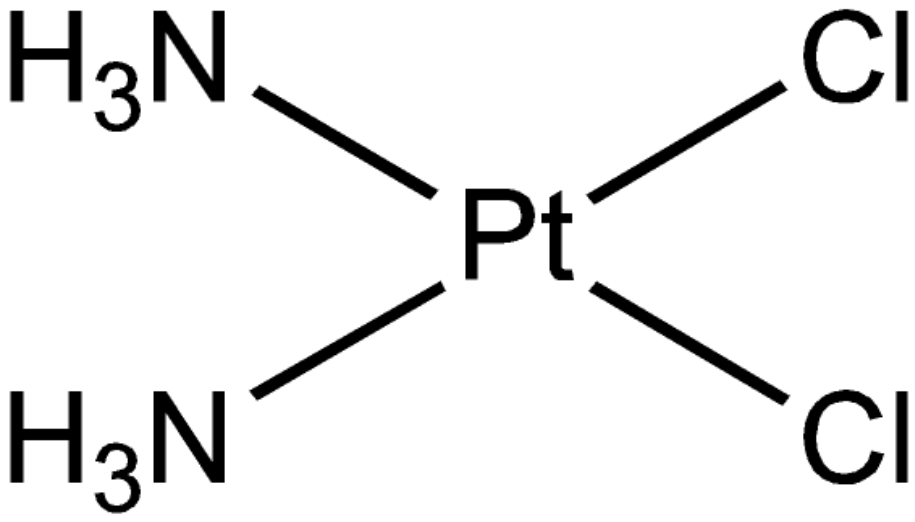


Bild 7-1 cis-Platin

Das Molekül cis-Platin ist ein planar-quadratischer Komplex. Wenn cis-Platin in Wasser gelöst wird, so werden die beiden Chlorid-Ionen des planar-quadratischen-Komplexes von cis-Diaminddichloroplatin(II) durch Wasser substituiert. Dieser Aquo-Komplex deprotoniert bei physiologischem pH-Wert und reagiert mit DNA (Lippard, 1982).

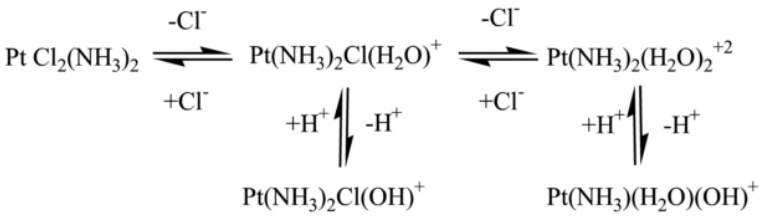


Bild 7-2 Hydrolyse von cis-Platin.

Cis-Platin bildet dabei sowohl Interstrang- und Intrastrang-Brückenbindungen aus, sowie DNA-Protein-Brückenbindungen. Für die anti-Tumoraktivität ist wahrscheinlich aber die am häufigsten gebildete Intrastrang-Brückenbindung verantwortlich (Takahara et al., 1995).

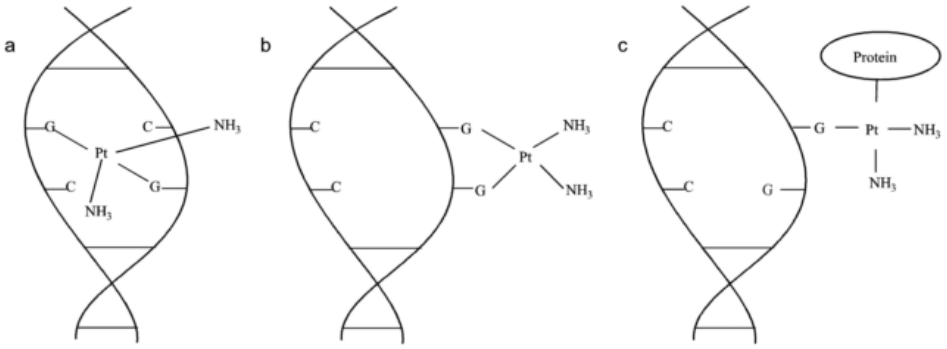


Bild 7-3 Schematische Darstellung der bevorzugten Bindungsmöglichkeiten: a Interstrang-Brückenbindung, b Intrastrang-Brückenbindung und c DNA-Protein-Brückenbindung

Die Bindungsstelle von cis-Platin an Desoxyribonukleoside sind dabei das N3-Atom von Cytosin, das N7-Atom von Guanin (vgl. Bild 7-4) und das N1-und N7-Atom von Adenin (Eastman, 1982). In der als Doppelhelix vorliegenden DNA bindet cis-Platin vor allem an die Purin-N7-Atom von Guanin und Adenin, wobei es vorwiegend an Guanin bindet (Fichtinger-Schepman et al., 1985). Diese Atome sind in der Doppelhelix am besten zugänglich. In einer großen Lücke sind sie vom Lösungsmittel umgeben und deshalb für cis-Platin gut zu erreichen. Zudem ist das Purin-N7-Atom nicht an Wasserstoff-Brückenbindungen beteiligt (Takahara et al., 1995).

An DNA gebundenes cis-Platin führt zum Aufwinden des DNA Supercoils. Bei großen Konzentrationen wird die Doppelhelix gekürzt (Cohen et al., 1979).

Seit Ende der 70-er Jahre wird cis-Platin in der Klinik eingesetzt. Cis-Platin wurde bisher erfolgreich bei der Behandlung einer Vielzahl fester Tumoren wie urogenitalen und gynäkologischen Tumoren sowie Kopf-, Hals- und Lungentumoren verwendet und ist eine der wichtigsten Verbindungen zur Krebsbehandlung (Prestayko et al., 1979), (Rozencweig et al., 1979).

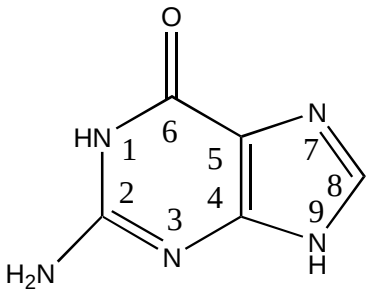


Bild 7-4 Strukturformel von Guanin

Der Komplex von cis-Platin an DNA ist als Objekt für die holographische Abbildung mit niederenergetischen Elektronen interessant, da hier eine modifizierte DNA-Doppelhelix vorliegt, an die mit Platin ein schweres Atom mit einer relativen Atommasse von 195,08 und daher mit einem größeren Streuquerschnitt gebunden ist. In den Experimenten sollte geklärt werden, ob es mit unserer Methode möglich ist, Unterschiede zwischen DNA und der modifizierten DNA beobachten zu können.

7.1 Präparation des Adduktes von cis-Platin an DNA

Zur Präparation des Komplexes von cis-Platin[11] mit DNA wurde Kalbsthymus-DNA[12] verwendet.

[11] cis-Platin, P4394, Sigma.

[12] Calf thymus Deoxyribonucleic acid Sodium Salt, D1501, Sigma.

Dazu wurden 0,2 ml wäßrige DNA-Lösung (5 mg/ml DNA in 10 mM Natriumperchlorat-Lösung) zu 0,8 ml wäßriger 10 mM Natriumperchlorat-Lösung gegeben, die 0,07 mg cis-Platin enthält, was einem r_b-Wert[13] von 0,08 entspricht. Nach 48 Stunden ist die Reaktion vollständig abgelaufen (Kim et al., 1990).

XP-Spektren dienten der Überprüfung der Reaktion. Nach der Dialyse der Reaktionslösung gegen Millipore-Wasser und anschließendem Auftropfen auf einen mit Silber bedampften Siliziumwafer wurde das Wasser im Ölpumpenvakuum verdampft. Anschließend konnte der Wafer in die XPS-Anlage überführt werden.

Die XP-Spektren sind mit einer Mg-Kα-Röntgenquelle aufgenommen worden (Bild 7-5).

[13] Der r_b-Wert gibt das Verhältnis von Platin zu Nukleotid an.

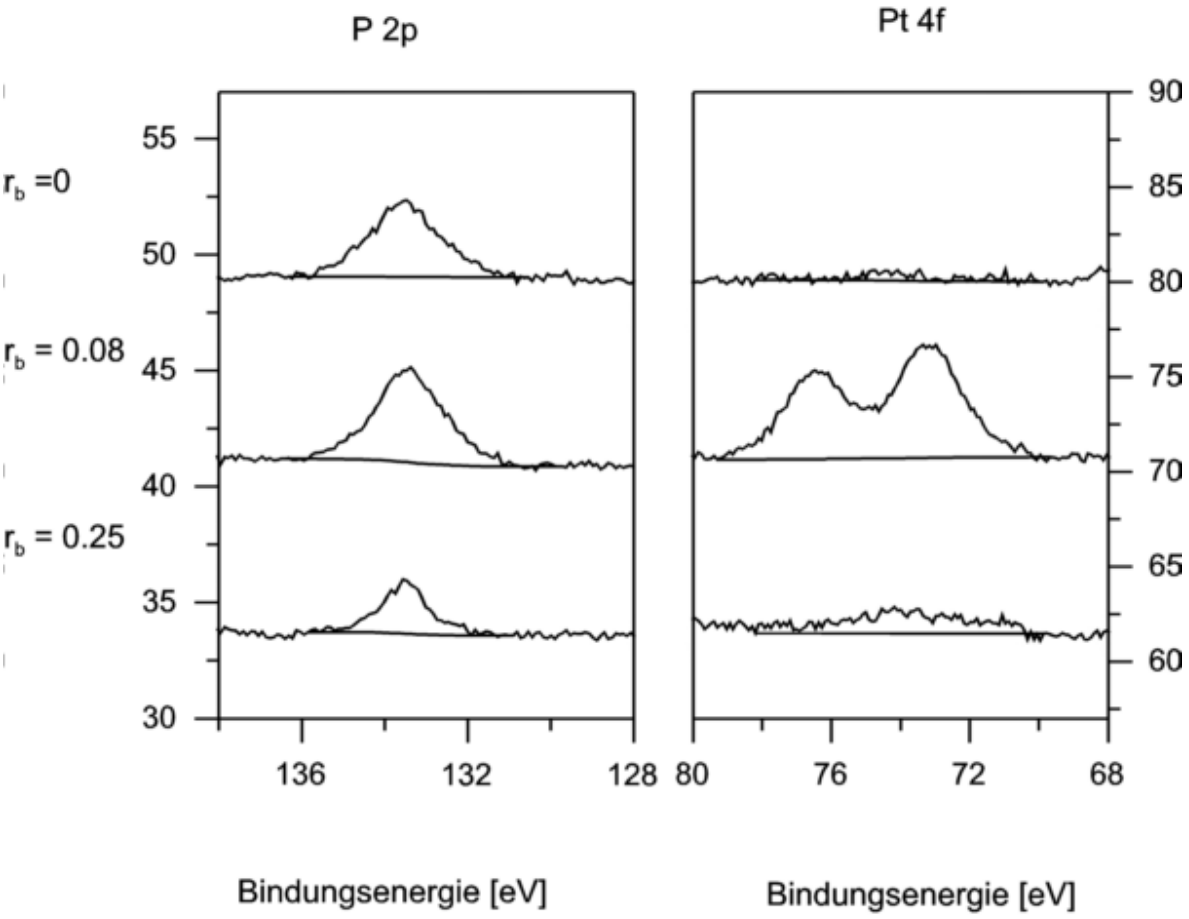


Bild 7-5 XP-Spektren des cis-Platin-Addukts an DNA bei unterschiedlichen r_b-Werten

Zur Bestimmung des Platin-Gehalts der modifizierten DNA wurde der aus dem Reaktionsansatz errechnete r_b-Werte mit den Intensitäten von Platin und Phosphor aus den XP-Spektren verglichen. In der folgenden Tabelle sind die Verhältnisse bei unterschiedlichen Ansätzen angegeben:

r_b	0	0,08	0,25
N_{Pt}/N_P	0	0,13	0,05

Tabelle 7-1 Vergleich der für den Reaktionsansatz errechneten rb-Werte mit den aus XP-Spektren errechneten Verhältnissen zwischen Platin und Phosphor.

Durch Ausbildung des cis-Platin-Addukts an DNA erfährt diese sterische Spannungen, die dazu führen, daß die DNA-Stränge gekürzt werden. Ab einem r_b-Wert von 0,25 sind

die DNA-Fragmente so klein, daß sie aus dem Dialyseschlauch diffundieren, was sich in den XP-Spektren zeigt.

Zur Präparation für das EPM wurde die Lösung auf 1 : 10 verdünnt und auf die Substrate aufgetragen. Als Substrate dienten sowohl strukturierte Siliziummembranen als auch mit Gold/Palladium bedampfte Kohle-Lochfolien.

7.2 Ergebnisse und Diskussion

7.2.1 Das cis-Platin-Addukt an DNA auf Kohle-Lochfolien

In Bild 7-6 ist das Hologramm des cis-Platin-Addukts an DNA abgebildet. Die Spitze, an die eine Spannung von 32 V angelegt ist, befindet sich in einem Abstand von 130 nm vor der Probe.

Das Hologramm wurde wie in Kapitel 5 beschrieben bearbeitet. Die numerische Rekonstruktion ergibt ein stäbchenförmiges Molekül (Bild 7-7). Der Durchmesser der Rekonstruktion beträgt ca. 2 nm, was dem Durchmesser der DNA entspricht und der Schnitt entlang der Molkülachse weist eine Periodizität von ca. 2,6 nm auf (Bild 7-8). Einzelne Platinatome können jedoch nicht lokalisiert werden. Die Auflösung der holographischen Aufnahmen ist bei der Größe des Bildschirms und der Energie der Elektronen nicht gut genug, um Unterschiede zwischen DNA mit und ohne cis-Platin ausmachen zu können. Im Kapitel 9.3 wird gezeigt, bei welchen Parametern eine Unterscheidung möglich sein kann.

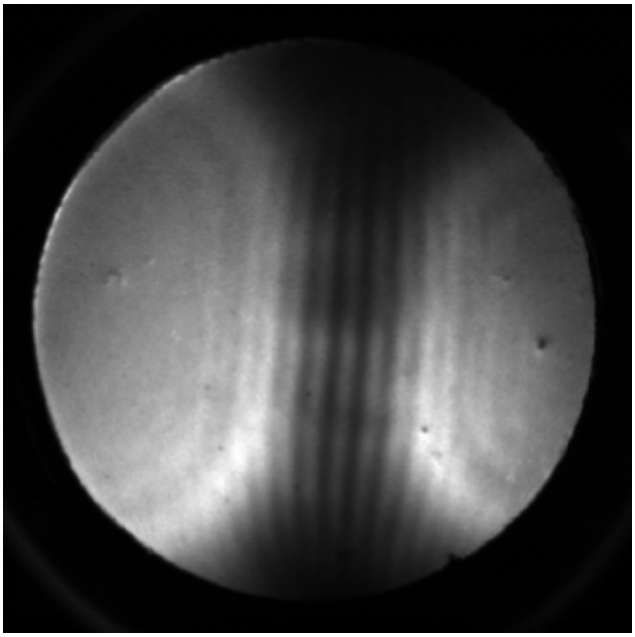


Bild 7-6 Hologramm der mit cis-Platin modifizierten DNA, das mit 32 eV bei einem Abstand von 130 nm aufgenommen wurde.

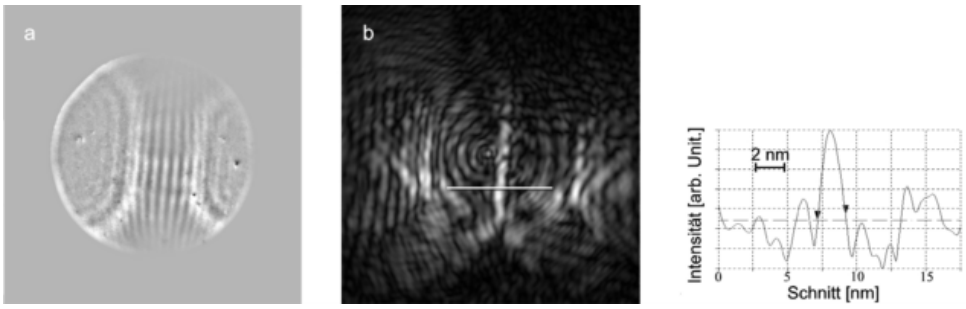


Bild 7-7 Hologramm der mit cis-Platin modifizierten DNA nach Abzug des Hintergrundes (a) und der Rekonstruktion aus dem Hologramm mit einem Schnitt durch die Rekonstruktion.

Der Objektträger Kohle-Lochfilm ermöglicht es, das Emissionsbild der Spitze aufzunehmen, ohne diese in z-Richtung verfahren zu müssen. Deshalb wird an dieser Stelle der Unterschied zwischen den verschiedenen Möglichkeiten des Hintergrundabzugs diskutiert. Dazu werden Bilder des Hintergrundes ohne das Objekt aufgenommen. Das Bild des Hintergrundes wird nun subtrahiert und mit dem Cosinus-Filter bearbeitet. Die Rekonstruktion nach der oben beschriebenen Bearbeitung der Hologramme kann mit der Rekonstruktion nach Abzug des Hintergrundes über den Filter „Background Subtraction“ verglichen werden.

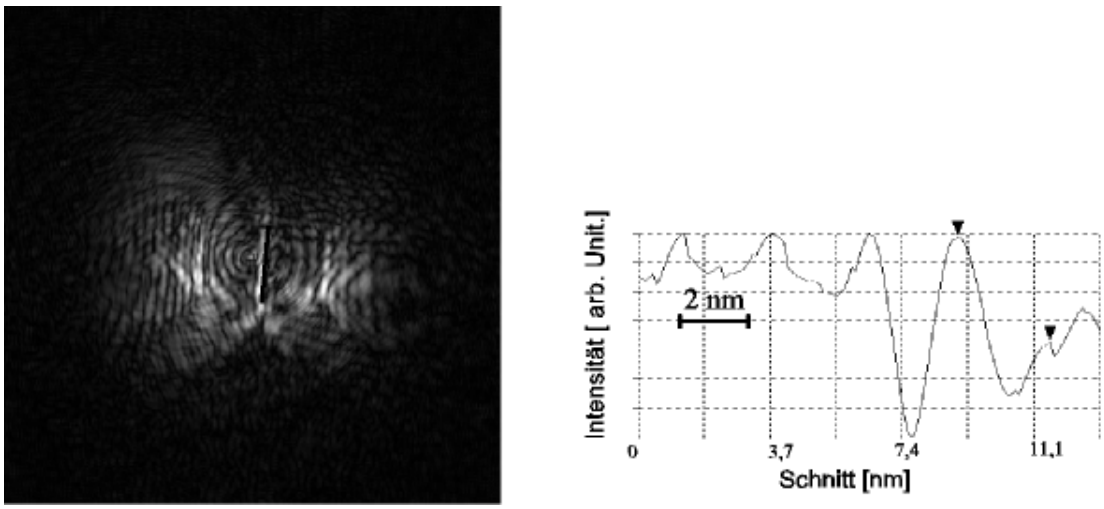


Bild 7-8 Rekonstruktion der mit cis-Platin modifizierten DNA mit einem Schnit entlang der Molekülachse.

In Bild 7-9, a ist ein Hologramm zu sehen, das mit einem Abstand von 470 nm bei 30 eV aufgenommen wurde. Der experimentell aufgenommene Hintergrund ist in Bild 7-9, b abgebildet. In c ist das Hologramm nach Abzug des Hintergrundes mittels „Background Subtraction“ zu sehen. In d ist das Hologramm nach der Bearbeitung mit „Offset Subtraction“ abgebildet. Nachdem die scharfen Kanten der Ränder mit dem Filter „Circular Cosine Window“ geglättet worden sind (Bild 7-9, e) wurde das Hologramm rekonstruiert (Bild 7-9, f).

Das Bild 7-9, g zeigt dagegen das Hologramm nach Abzug des gemessenen Hintergrundes (Bild 7-9, b). Das Bild wurde ebenfalls mit „Offset Subtraction“ (Bild 7-9, h) und „Circular Cosine Window“ bearbeitet (Bild 7-9, i). Die daraus resultierende Rekonstruktion ist in Bild 7-9, j abgebildet.

Vergleicht man das Hologramm nach Abzug des Hintergrunds durch „Background Subtraction“ mit dem Hologramm, dessen Hintergrund experimentell aufgenommen und vom Bild abgezogen wurde, so erkennt man, daß bei letzterem die Ablagerungen auf dem MCP nicht mehr zu sehen sind und es besser kontrastiert ist.

In den Rekonstruktionen liegen die Unterschiede bei der gegebenen Auflösung ebenfalls im Hintergrund. In Bild 7-10 sind beide Rekonstruktionen mit einem Schnitt durch den rekonstruierten Strang abgebildet.

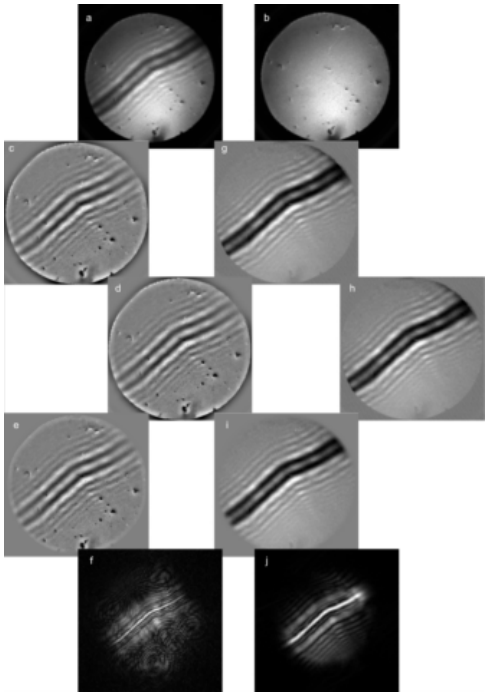


Bild 7-9 Demonstration zweier Verfahren für das Abziehen des Hintergrundes: a zeigt das Hologramm (d = 470 nm; E = 30 eV) und b den Hintergrund. In c ist das Hologramm nach Bearbeitung mit dem Filter „Background Subtraction“ zu sehen und in g nach Abzug des aufgenommenen Hintergrundes. Nach der „Offset Subtraction“ (d und h) wurde der Filter „Circular Cosine Window“ angewandt (e und i). In f und j sind die zugehörigen Rekonstruktionen abgebildet.

Beide Rekonstruktionen zeigen einen Strang mit einem Durchmesser von ca. 4 nm und einem Knick, der auf cis-Platin zurückgeführt werden kann (Onoa et al., 1998). Sie unterscheiden sich jedoch in ihrem Hintergrund. Der Hintergrund von Bild 7-10, b zeigt Streifen parallel zum Objekt, die durch das konjugierte Bild verursacht werden. Der Hintergrund von Bild 7-10, a zeigt zusätzlich dazu noch kreisförmige Linien. Diese resultieren aus Ablagerungen auf dem MCP. Der Filter „Background Subtraction“ kann diese Störungen nicht entfernen.

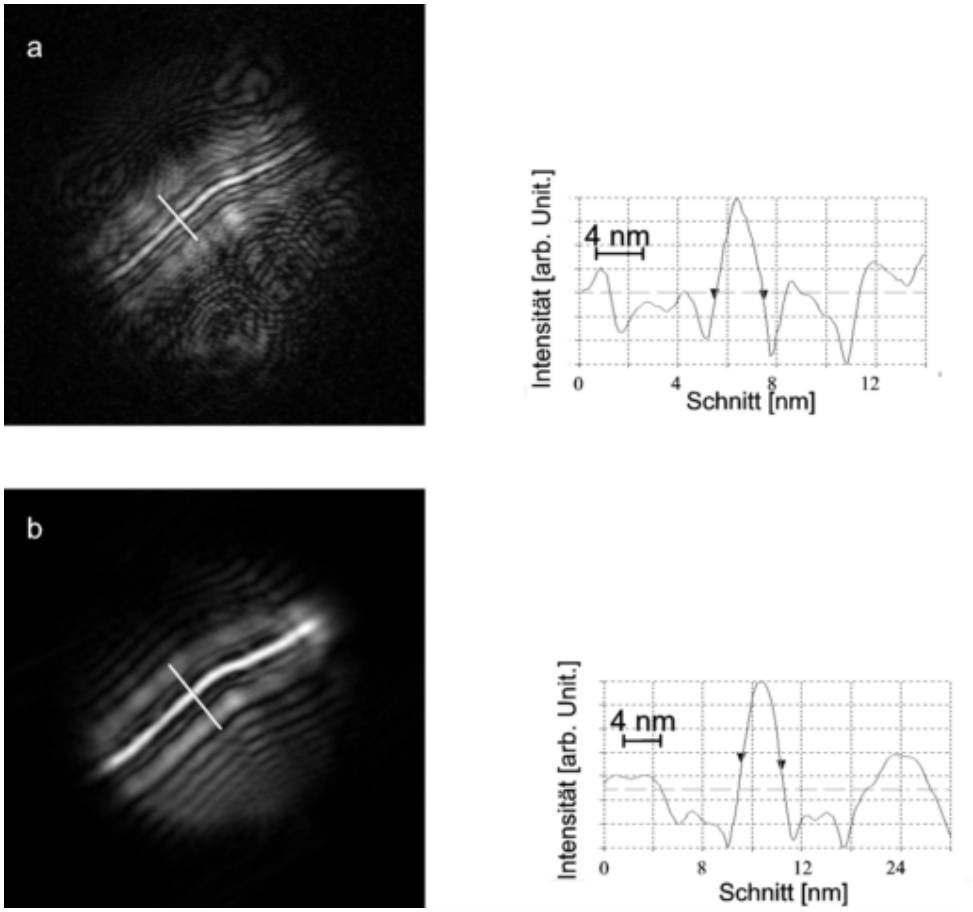


Bild 7-10 Rekonstruktionen aus Hologrammen, deren Untergrund in a mit dem Filter „Background Subtraction" und in b durch Abzug der Aufnahme des Untergrunds abgezogen wurde(d = 470 nm; E = 30 eV).

In einem Schnitt entlang der Molekülachse fällt ebenfalls auf, daß die Störungen, die durch Ablagerungen auf dem Detektor verursacht wurden, bei Verwendung des Filters „Background Subtraction" zu stärkeren nicht periodischen Intensitätsschwankungen führen als bei dem Abzug der Aufnahme des Hintergrundes (Bild 7-11).

Soll atomare Auflösung mit dieser Methode erreicht werden, muß man dies berücksichtigen. Durch Abzug des experimentell bestimmten Hintergrundes können zwar Ablagerungen eliminiert werden, das Interferenzmuster bleibt an diesen Stellen jedoch gestört. Deshalb wurde in der neuen Apparatur das MCP über den Proben angebracht, um Ablagerungen auf dem Detektor zu vermeiden.

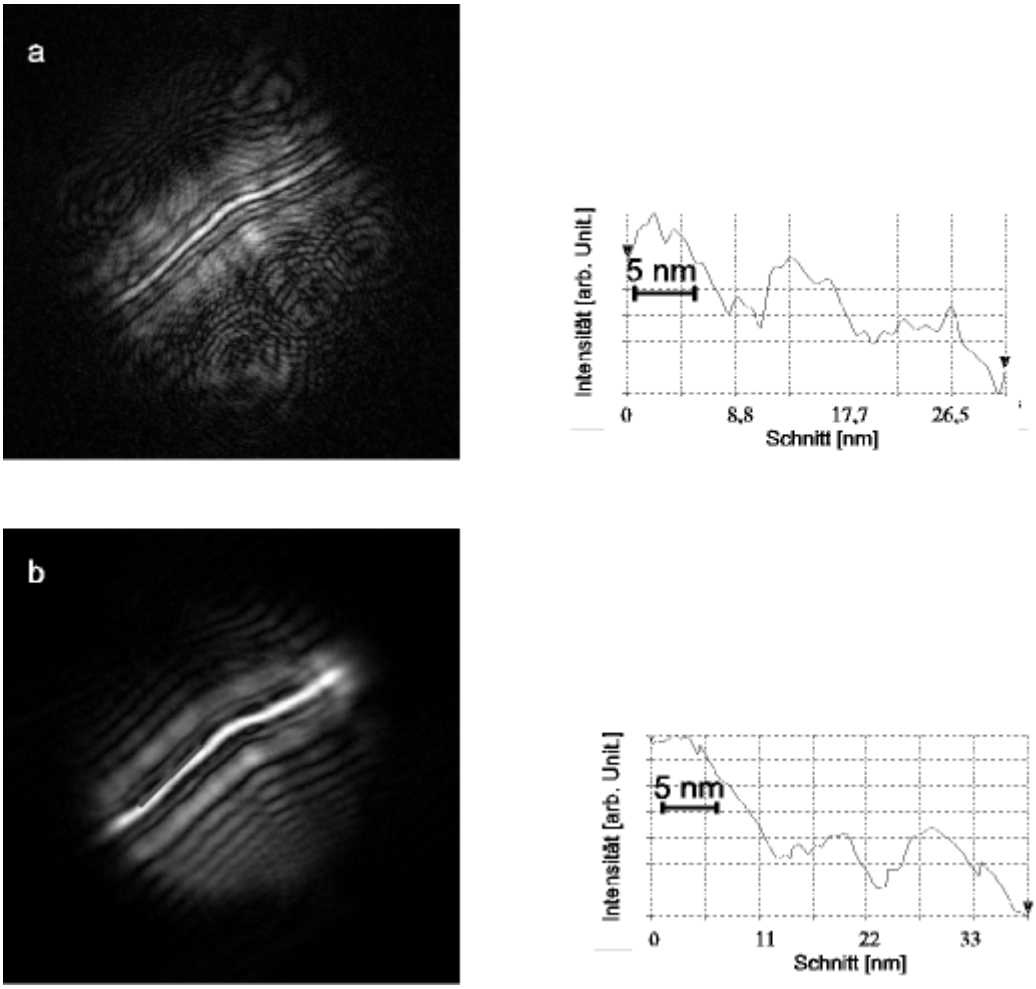


Bild 7-11 Rekonstruktionen aus Hologrammen, deren Untergrund in a mit dem Filter „Background Substraction" und in b durch Abzug der Aufnahme des Untergrunds abgezogen wurde(d = 470 nm; E = 30 eV) mit je einem Schnitt entlang der Molekülachse.

7.2.2 Das cis-Platin Addukt an DNA auf strukturierten Siliziummembranen

In Bild 7-12 ist eine Aufnahme der mit cis-Platin modifizierten DNA im Projektionsmodus und als Hologramm zu sehen. Im Projektionsmodus beträgt die Distanz zwischen Spitze zu Probe 6177 nm bei einer angelegten Spannung von 45 V. Der DNA-Strang ist über mehrere Spalte zu sehen (Bild 7-12, a). Bei einem Abstand von 800 nm und einer Energie von 38 eV wurde ein Hologramm aufgenommen (Bild 7-12, b).

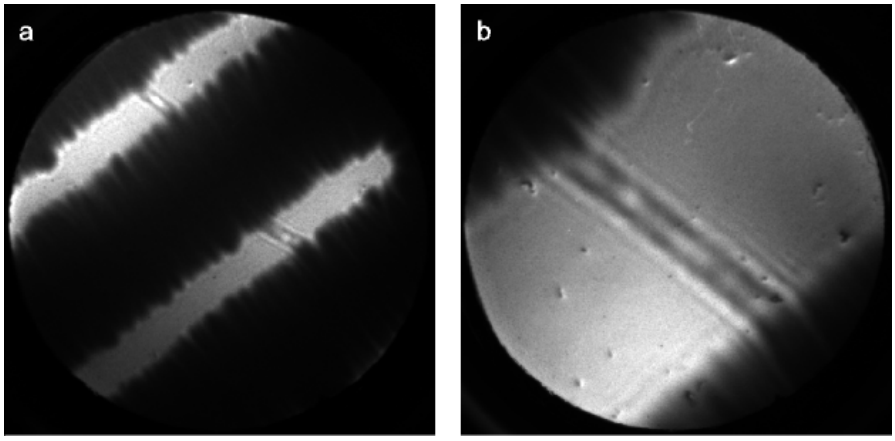


Bild 7-12 Aufnahme der Mikrostruktur, die mit durch cis-Platin modifizierter DNA präpariert wurde (d = 6177 nm; E = 45 eV), und nach einer weiteren Annäherung an das Objekt das Hologramm (d = 800 nm; E = 38 eV).

Nach dem numerischen Abzug des Hintergrundes und der Glättung der scharfen Ränder erhält man aus dem Hologramm eine Rekonstruktion der Wellenfront mit einem Durchmesser von ca 4 nm (Bild 7-13). Entlang der Molekülachse beobachtet man nicht periodische Intensitätsschwankungen (Bild 7-14). Die Auflösung ermöglicht keine Aussage über die Position von cis-Platin.

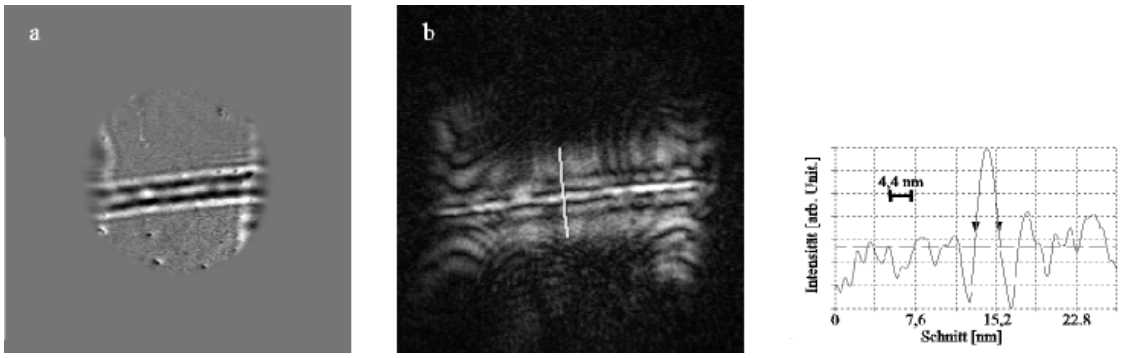


Bild 7-13 Hologramm nach Abzug des Hintergrunds(a) und der Rekonstruktion aus dem Hologramm(b) mit einem Schnitt durch den rekonstruierten Strang (d = 800 nm; E = 38 eV)

Es konnte gezeigt werden, daß die mit cis-Platin modifizierte DNA auf der strukturierten Siliziummembran haftet und mit dem Elektronen-Projektionsmikroskop untersucht werden kann. Wie Simulationen zeigen, ist für eine Auflösung des Addukts

von cis-Platin an DNA ein größerer Phosphorschirm und höhere Energien nötig (vgl 9.3).

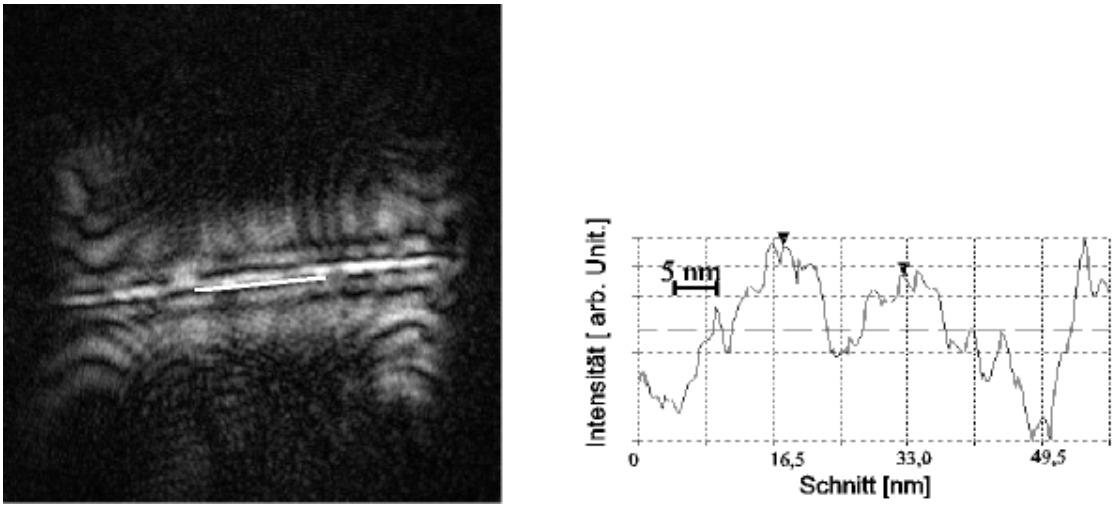


Bild 7-14 Rekonstruktion aus Bild 7-13 mit einem Schnitt entlang der Molekülachse.

8 DNA-Nanostrukturen

Doppelsträngige DNA besitzt Eigenschaften, die sie zur Konstruktion von Nanostrukturen geeignet erscheinen läßt. Der Schlüssel zu diesen Nanostrukturen liegt in den Intermediaten des DNA-Metabolismus, den viersträngigen Holliday-Strukturen (Seeman, 1982).

Die Überkreuzungsstellen der natürlichen Holliday-Strukturen sind von DNA-Sequenzen mit homologer Symmetrie umgeben. Dies führt zu einer Schenkelwanderung, d.h. die Überkreuzungsstelle wandert. Durch den Einsatz von synthetisierten DNA-Einzelsträngen, die eine Überkreuzungsstelle mit verminderter Symmetrie bilden, kann eine Schenkelwanderung der DNA-Stränge verhindert werden (Kallenbach et al., 1983), (Seeman und Kallenbach, 1994). Besitzen solche Strukturen kohäsiven Enden („sticky ends“), so können diese mit komplementären kohäsiven Enden assoziieren und Nanostrukturen bilden (Seeman, 1998), (Seeman, 1997).

Mit diesem Verfahren wurden Objekte wie ein Kubus (Chen und Seeman, 1991) und ein abgestumpfter Oktaeder (Zhang und Seeman, 1994) hergestellt. Für die Holographie mit niederenergetischen Elektronen sind zweidimensionale Netzwerke (Mao et al., 1999), die mit diesem Verfahren erzeugt werden können, sowohl als Objekte als auch als mögliche Objektträger von Interesse.

Die Vorgehensweise zur Bildung von zweidimensionalen Gittern besteht darin, zunächst mit vier Überkreuzungsstellen eine Raute zu bilden, deren vier Seiten je vier helikale Windungen der DNA enthalten (Seeman, 1997). Diese Raute besteht aus acht DNA-Einzelsträngen (Bild 8-1, c). Über eine Assoziation der vier kohäsiven Enden der Raute mit deren vier komplementären kohäsiven Enden werden diese durch Parallelogramme und kleinere Rauten verbunden (Bild 8-1, d und e). Die so gebildeten Parallelogramme bestehen aus Seiten mit zwei und vier helikalen Windungen der DNA (7 und 14 nm), während die kleineren Rauten aus Seiten mit je zwei helikalen Windungen bestehen. Die große Raute besitzt hingegen Seiten mit je vier helikalen Windungen.

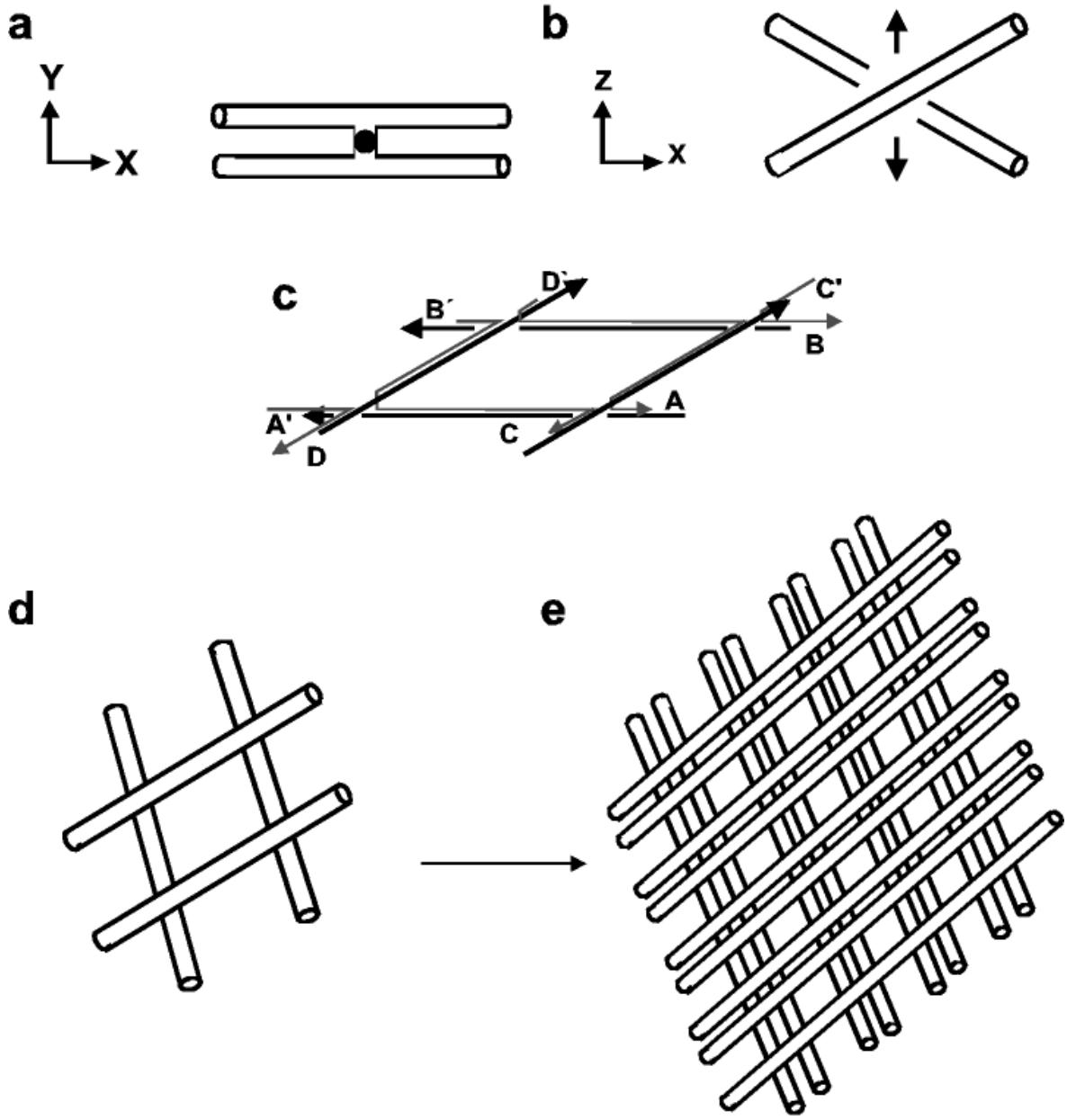


Bild 8-1 Schematische Darstellung der molekularen Komponenten und deren Assoziation zu zweidimensionalen Netzwerken.(a)Blick entlang der Symmetrieachse, die ein Kreis markiert. Die obere helikale Domäne ist 30° entlang der Vertikalen gedreht, die untere um –30°. Die x- und y-Achsen eines rechtshändigen Koordinatensystems sind zur Orientierung eingezeichnet. In b ist das Molekül um 90° entlang der x-Achse gedreht worden. Die Symmetrieachse wird durch die beiden Pfeile angedeutet. Die Zusammensetzung der DNA-Einzelstränge zum rhombischen Motiv ist in c gezeigt. In dieser Darstellung sind die kohäsiven Enden zu sehen. Durch Assoziation des rhombischen Motivs d erhält man zweidimensionale Netze (e).

Die zweidimensionalen DNA-Netzwerke bestehen aufgrund der Überkreuzungsstellen aus zwei Lagen, bei denen die obere Lage von links unten nach rechts oben orientiert ist und die untere Lage von links oben nach rechts unten (Bild 8-1, e). Dies wird

verständlich, wenn man die Überkreuzungsstellen betrachtet. In Bild 8-1, a und b ist eine Überkreuzungsstelle aus zwei Perspektiven dargestellt. In a sieht man auf die zweizählige Symmetrieachse, die durch einen Kreis symbolisiert wird. In b ist diese um 90° gedreht und mit zwei Pfeilen angedeutet.

Die Strukturen sind für die Kendroskopie interessant, da durch die Wahl entsprechender DNA-Sequenzen DNA-bindende Proteine an diese Gitter gebunden und möglicherweise holographisch abgebildet werden können.

8.1 Präparation von DNA-Nanostrukturen

DNA-Nanostrukturen (Seeman, 1997) werden aus synthetischen Oligonucleotiden gebildet, die nach einem Standardverfahren synthetisiert werden (Caruthers, 1985). Diese Oligonucleotide werden vom Arbeitskreis von Prof. N. Seeman an der New York University, New York bezogen.

Die Reinigung der synthetischen DNA-Oligonucleotide erfolgte mittels denaturierender Gelelektrophorese. Aus dem 12 – 20 % denaturierenden Gel wurden die Banden mit DNA herausgeschnitten und in einer Lösung aus 500 mM Ammoniumacetat, 10 mM Magnesiumacetat und 1 mM EDTA aus dem Gel gelöst.

Nach der Reinigung mußte überprüft werden, ob die richtigen Oligonucleotide vorlagen. Dafür wurde eines der acht verschiedenen Oligonucleotide radioaktiv markiert und acht Proben erstellt, von denen die erste nur das radioaktiv markierte Oligonucleotid enthielt und in jeder weiteren immer ein Oligonucleotid mehr. Sind alle acht Oligonucleotide vereinigt, sollten sich die Nanostrukturen bei der Hybridisierung ausbilden, was mittels Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen überprüft wurde.

Zur **Phosphorylierung** löste man 1 Oligonucleotid in 20 µl Phosphorylierungspuffer, der 66mM Tris · HCl (pH 7,6), 6,6 mM MgCl2 und 10 mM Dithiothreitol (DTT) enthält. Zu dieser Lösung gab man 0,5 µl einer 2,2 µM [γ-32P]ATP (10m-Ci/ml) und 3 u Polynukleotidkinase (Amersham). Die Lösung wurde 80 min bei 37 °C getempert. Durch zehnminütiges Erhitzen auf 90°C wurde die Phosphorylierung gestoppt.

Die **Hybridisierung** der Oligonucleotide erfolgte sowohl mit radioaktiv markiertem Oligonucleotid für den Test der Oligonucleotide als auch für die Präparation von

Nanostrukturen nach gleicher Methode. Die Oligonucleotide wurden zur Ausbildung der Nanostruktruen im stöchiometrischen Verhältnis (von jedem Oligonucleotide 50 nM) in 5mM HEPES (pH 7), 2 mM $MgCl_2$ und 0,5 mM EDTA gemischt. Die Mischung wurde zunächst in ein Wasserbad bei 90° C gegeben, welches über 48 Stunden in einer Thermobox abkühlte.

Die radioaktiven Ansätze laufen nach der Hybridisierung über ein natives Gel, von dem nach der Trocknung ein Autoradiogramm aufgenommen wird. Die DNA-Nanostrukturen bleiben in der Tasche, während die hybridisierten Oligonucleotide je nach der Anzahl unterschiedlicher Oligonucleotide verschieden weit laufen. Zeigt sich im Autoradiogramm, daß die Nanostrukturen entstanden sind, können die Oligonucleotide eingesetzt werden.

Mit dem AFM können die Strukturen auf Glimmer abgebildet werden (Mao et al., 1999). Mit einem NanoScope II (Digital Instruments) wurden die Strukturen unter Isopropanol im „contact mode“ aufgenommen. Dafür wurden 8µl der gelösten Nanostrukturen auf frisch gespaltenen Glimmer aufgetragen und nach zwei Minuten mit einem Präzisionswischtuch von der Oberfläche abgezogen. Anschließend wurde die Oberfläche mit 80 µl Millipor-Wasser abgespült, um den Puffer von der Oberfläche zu entfernen. Das Wasser wurde schnell abgeschlagen und trockengeblasen.

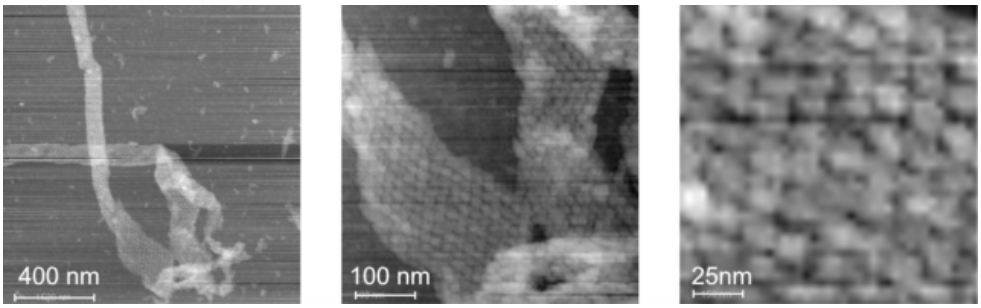


Bild 8-2 AFM-Aufnahmen der Nanostrukturen mit einem Bildfeld von 1500 nm x 1500 nm und in verschiedenen Vergrößerungen

Die AFM-Abbildung zeigt die Periodizität der Struktur (Bild 8-2). Die Doppelstränge können jedoch nicht aufgelöst werden.

Vor Präparationen für das EPM wurden AFM-Abbildungen der Nanostrukturen aufgenommen. Das Abbilden erfolgte mit einem AFM von Parker Scientific Instruments im „intermittent contact mode“ unter Verwendung von kommerziell erhältlichen Federn mit Si_3N_4 Spitzen (Bild 8-3). Die AFM-Abbildungen zeigen die Periodizität der Struktur.

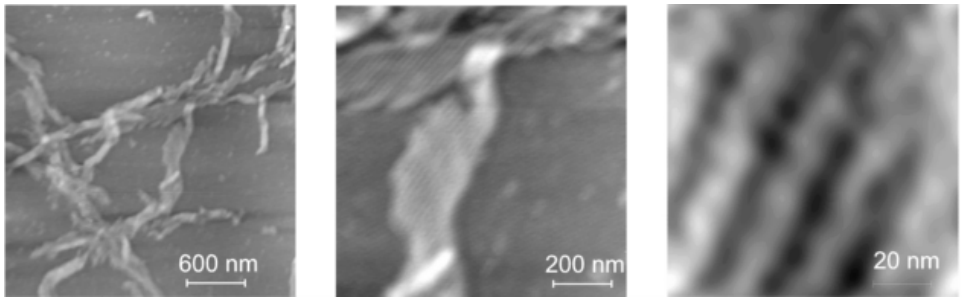


Bild 8-3 AFM-Aufnahmen von Nanostrukturen im " intermittent contact mode" mit einem Bildfeld von 3000 nm x 3000 nm, 1000 nm x 1000 nm und 100 nm x 100 nm

Zur Präparation für das EPM wurden verschiedene Wege verfolgt:

- Aufbringen der Lösung auf eine mit UV/Ozon behandelte strukturierte Siliziummembran und Abziehen der Lösung durch ein Filterpapier,
- Verwendung von SAM-modifizierten mikrostrukturierten Siliziummembranen,
- UV/Ozon behandelte mikrostrukturierte Siliziummembran und Abspülen der Lösung.

Im folgenden werden die einzelnen Verfahren beschrieben.

8.1.1 Aufbringen der Lösung auf eine mit UV/Ozon behandelte mikrostrukturierte Siliziummembran und Abziehen der Lösung durch ein Filterpapier

Die Präparation der DNA-Nanostrukturen auf die mit UV/Ozon gereinigte Gold/Palladium-Oberfläche der strukturierten Siliziummembran erfolgte durch Auftropfen von 2 µl Lösung der Nanostrukturen. Nach zwei Minuten wurde die Lösung mit einem Filtertuch abgezogen und das Präparat im Vorvakuum getrocknet. Auf ein Abspülen der Lösung wurde verzichtet, da dies direkt nach Auftropfen unter Abschlagen der Lösung geschehen muß, was die 100 nm dünnen Membranen leicht

zerstört. Dadurch verbleiben aber auch Pufferreste auf der Oberfläche, was jedoch bei der Präparation von DNA-Doppelsträngen nicht stört.

8.1.2 Verwendung von SAM-modifizierten mikrostrukturierten Siliziummembranenen

Durch Modifikation der Gold/Palladium-Oberfläche mit 16-Mercaptohexadecansäure erhält man eine hydrophile Oberfläche (Ullman, 1996). Die Präparation der Nanostrukturen auf diese Oberfläche wurde zunächst mit einem mit Gold/Palladium bedampften Silizium-Wafer getestet. Hierfür wurde der Silizium-Wafer zunächst für 24 Stunden in eine 10mM ethanolische Lösung von 16-Mercaptohexadecansäure gegeben, wobei sich eine Monolage ausbildet. Nach Abspülen der Lösung mit Ethanol und Trockenblasen wurden 8 µl der Lösung von Nanostrukturen auf die Oberfläche aufgetragen, welche zwei Minuten einwirkt. Anschließend wurde die Lösung direkt mit Millipore-Wasser abgespült und trockengeblasen. Die Oberfläche wurde dann im AFM im „intermittent contact mode“ abgebildet.

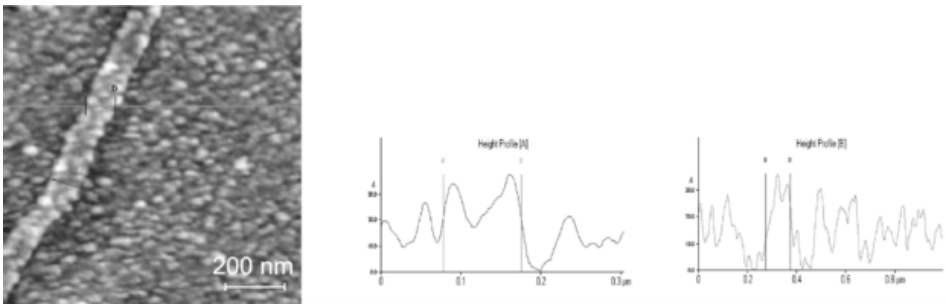


Bild 8-4 AFM-Aufnahmen auf einem SAM-modifizierten Wafer mit Schnitten durch das Netzwerk und die Oberfläche.

Da die Oberflächenrauhigkeit hier höher als bei Glimmer ist, konnte gezeigt werden, daß die DNA-Nanostrukturen auf der Oberfläche haften, das Netzwerk aber nicht aufgelöst werden.

Strukturierte Siliziummembranen wurden in gleicher Weise präpariert, wobei das Abspülen der Lösung und das anschließende Trockenblasen extrem vorsichtig erfolgen mußte, da die Membranen sehr leicht brechen. Nach der Präparation wurden die Proben sofort in das Vorvakuum gebracht und von dort in die UHV-Apparatur transferiert.

8.1.3 UV/Ozon behandelte mikrostrukturierte Siliziummembranen und Abspülen der Lösung

Da sich die Mikrostrukturen ohne Abspülen des Puffers während des Experiments im EPM stark aufladen, wurde zunächst mit AFM-Abbildungen getestet, ob die Nanostrukturen auf der Gold/Palladium-Oberfläche haften bleiben, wenn der Puffer abgespült wird.

Daher wurden zunächst 8 µl der gelösten Nanostrukturen auf die mit UV/Ozon behandelte Oberfläche gegeben und nach zwei Minuten mit Millipore-Wasser abgespült und trockengeblasen. Die Oberfläche wurde anschließend im AFM im „intermittent contact mode“ abgebildet.

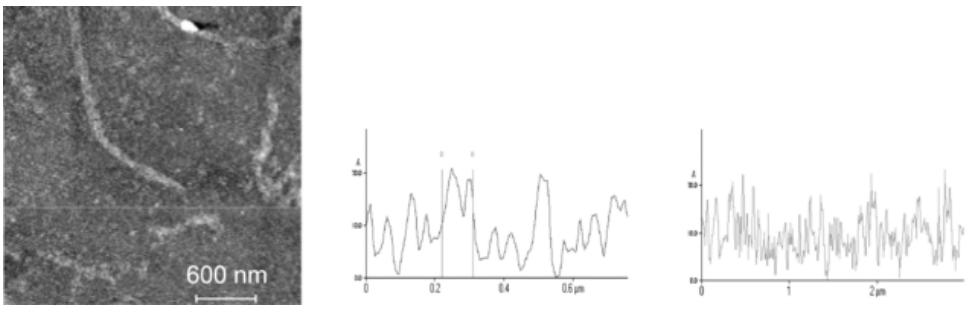


Bild 8-5 AFM-Abbildung von Nanostrukturen auf einem mit Gold/Palladium bedampften Siliziumwafer mit Schnitten durch das Netzwerk und die Oberfläche.

Die AFM-Aufnahmen zeigen, daß die Strukturen auf der Oberfläche haften. Wegen der Rauhigkeit der Oberfläche konnte jedoch das Netzwerk nicht aufgelöst werden.

Die Präparation für das EPM erfolgte in gleicher Weise, wobei das Abspülen wegen der Fragilität der Membranen sehr vorsichtig geschehen mußte.

8.2 Ergebnisse und Diskussion

8.2.1 Aufbringen der Lösung auf mit UV/Ozon behandelte mikrostrukturierte Siliziummembranen und Abziehen der Lösung durch ein Filterpapier

Präparate, die durch Auftropfen und Abziehen der Lösungen hergestellt wurden, zeigten im Elektronen-Projektionsmikroskop Bereiche, die dicht belegt und undurchlässig für den Elektronenstrahl sind, oder leere Öffnungen (Bild 8-6). Die dichten Bereiche zeigten eine starke Aufladung bei der Beleuchtung mit dem Elektronenstrahl.

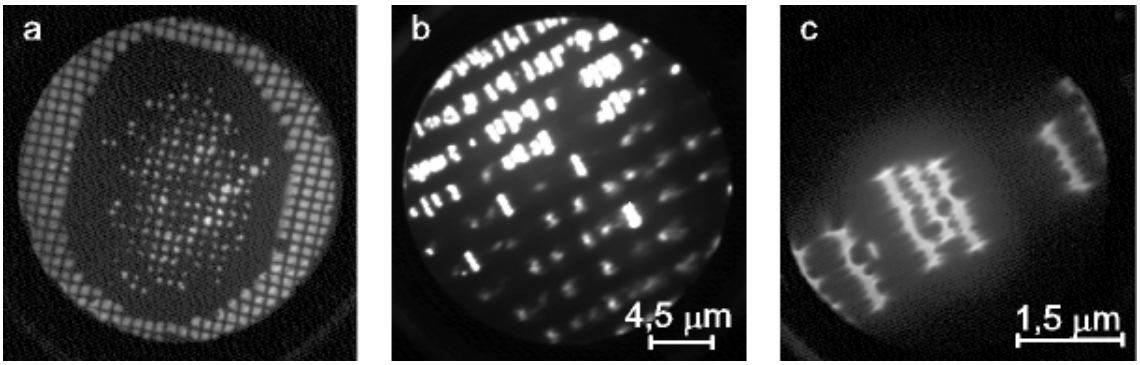


Bild 8-6 Aufnahmen der Präparate im EPM. Projektionsbild eines mit Gold/Palladium bedampften Kohle-Lochfilms (a) und von strukturierten Siliziummembranen (b und c) nach der Präparation mit Nanostrukturen.

In Bild 8-6a ist das Projektionsbild einer mit Gold/Palladium bedampften Kohle-Lochfolie nach der Präparation mit DNA-Nanostrukturen in einem sehr großen Abstand zu sehen (einige µm). Die Umrisse des Tropfens sind hier noch deutlich als undurchlässiger Bereich zu erkennen. Aufnahmen der mit DNA-Nanostrukturen präparierten strukturierten Siliziummembran zeigen, daß einige Bereiche für die Elektronen undurchlässig, aber einige Spalte auch frei sind. Neben den starken Aufladungen der Probe kam es auch zur Desorption von Material auf den Proben, was sich durch ein Flackern der Spitze bemerkbar machte. Die Proben waren zu stark mit Puffer und DNA-Nanostrukturen belegt.

AFM-Abbildungen von Nanostrukturen auf Glimmer zeigen, daß die Konzentration der Nanostrukturen für eine Präparation auf den strukturierten Membranen geeignet sein sollten.

Wird die Lösung der DNA-Nanostrukturen nach der Hybridisierung auf Glimmer aufgetragen, so sind bis zu 25% der Fläche von DNA-Nanostrukturen belegt (Bild 8-7). Diese Bedeckung wäre gut geeignet für holographische Aufnahmen.

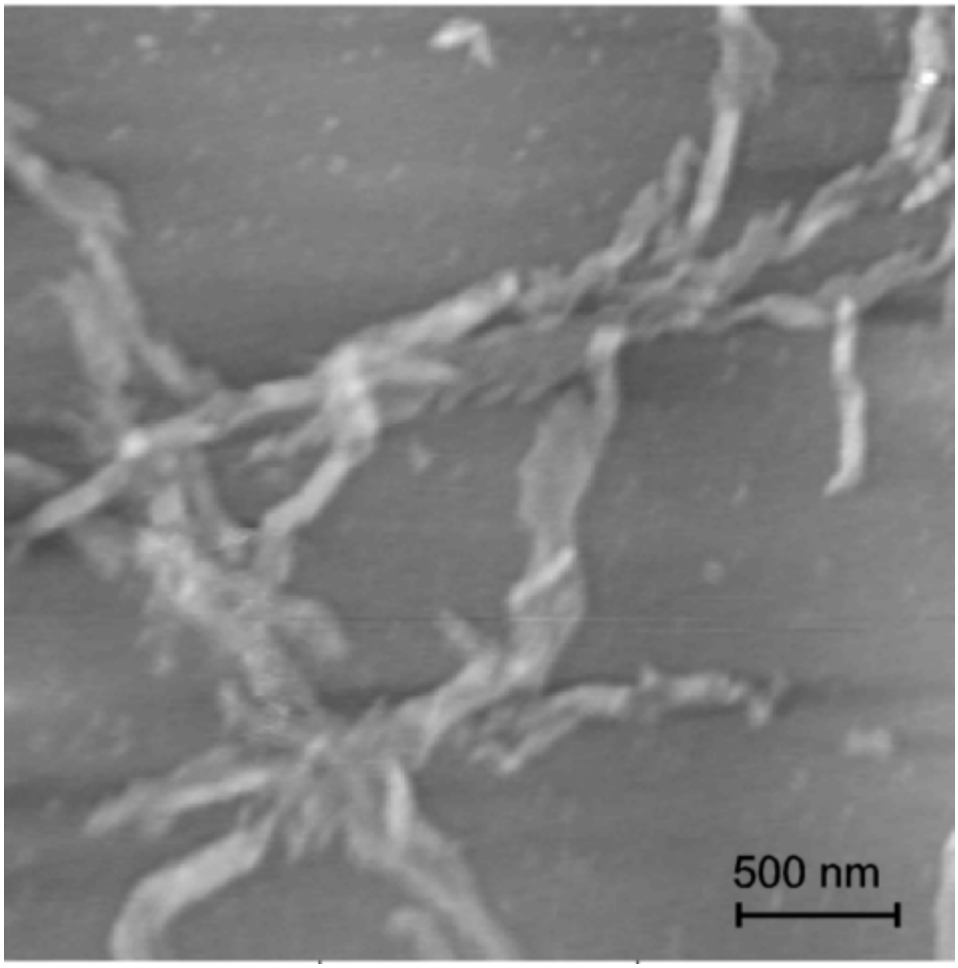


Bild 8-7 AFM-Abbildung von Nanostrukturen auf Glimmer.

Bei der Präparation der Nanostrukturen auf Glimmer wird jedoch auch überschüssiger Puffer und Nanostrukturen, die nicht auf der Oberfläche adsorbieren, durch Abspülen mit Wasser von der Probe entfernt. Auf diesen Schritt wurde zunächst bei der Präparation für das Elektronen-Projektionsmikroskop verzichtet, da die strukturierten Siliziummembranen sehr empfindlich sind und leicht zerspringen.

8.2.2 Verwendung von SAM-modifizierten mikrostrukturierten Siliziummembranen

AFM-Abbildungen zeigen, daß DNA-Nanostrukturen auf einer mit 16-Mercaptohexadecansäure modifizierten Gold/Palladium-Oberfläche auch nach Abspülen mit Millipore-Wasser auf der Oberfläche haften. Im Projektionsmikroskop hat sich diese Oberflächenmodifikation zur holographischen Abbildung von Nanostrukturen jedoch nicht bewährt. In Bild 8-8 sind Abbildungen solcher Präparate mit dem Elektronen-Projektionsmikroskop zu sehen.

Die starken Aufladungen, die ohne ein Abspülen des Puffers zu sehen waren, sind hier nicht vorhanden. Es tritt aber ein andere Störung auf. Entlang von Strukturen, die den Abmessungen der Nanostrukturen entsprechen, ist eine Aufladung auf den Objektträgern zu beobachten. Bei dieser Präparation sind die Nanostrukturen nicht mehr direkt mit der leitenden Oberfläche verbunden und laden sich daher auf. Diese Präparation ist somit nicht zur Aufnahme von Hologrammen im Elektronen-Projektionsmikroskop geeignet.

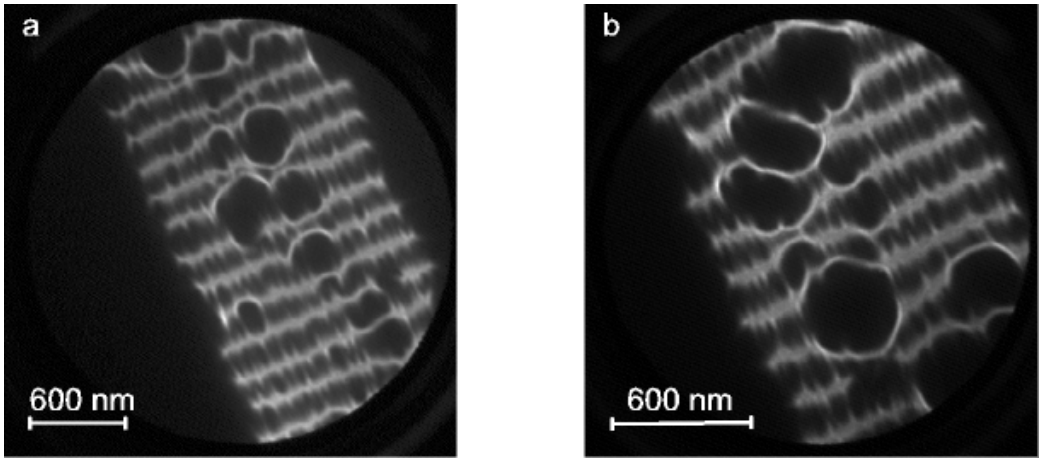


Bild 8-8 EPM-Abbildungen von Nanostrukturen auf einer mit Thiol modifizierten Oberfläche(E = 43 eV (a) und E = 38 eV (b)).

8.2.3 UV/Ozon behandelte mikrostrukturierte Siliziummembranene und Abspülen der Lösung

Auch auf einem mit UV/Ozon behandelten, mit Gold/Palladium bedampften Siliziumwaver haften die Nanostrukturen nach Abspülen der Pufferlösung durch Millipore-Wasser. Die auf diese Weise präparierten mikrostrukturierten Siliziummembranen sind in Bild 8-9 zu sehen.

Bild 8-9 a zeigt die Probe im Projektionsmodus. Es ist zu erkennen, daß hier ein Adsorbat einige Spalte überbrückt. Die Häufigkeit dieser Stränge und deren Länge entsprechen den Erwartungen für die Nanostrukturen aus AFM-Abbildungen. Diese Stränge zeigen jedoch keine periodische Struktur, wie das für Netzwerke erwartet werden könnte. Bei einer Annäherung der Spitze auf einen Abstand von 480 nm zum Objekt, ist das Hologramm des Objekts mit dem eines stäbchenförmigen Moleküls zu verwechseln. Es zeigt parallele Interferenzstreifen ohne eine Modulation entlang des Stranges.

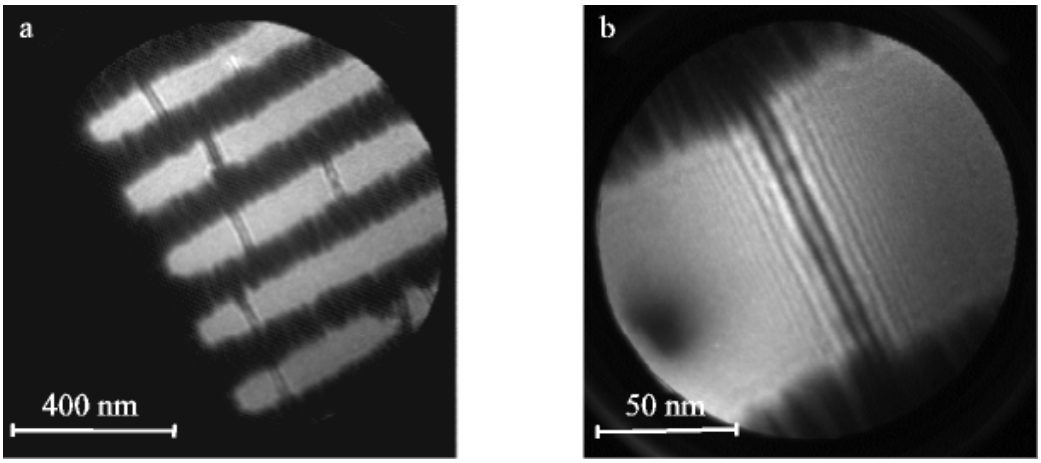


Bild 8-9 Aufnahmen von Nanostrukturen auf einer strukturierten Siliziummembran nach UV/Ozonbehandlung (E = 91 eV (a); E = 67 eV (b)).

Wird das Hologramm, das mit einer Energie von 67 eV aufgenommen wurde, zur numerischen Rekonstruktion vorbereitet wie in Kapitel 5 beschrieben, erhält man als Rekonstruktion einen Strang, der einen Durchmesser von ca. 3 nm besitzt. Die Netzwerke mit einer Breite zwischen 100 und 200 nm konnten somit nicht abgebildet werden.

AFM-Aufnahmen der Nanostrukturen auf einer Gold/Palladium-Oberfläche zeigen, daß diese auf Gold/Palladium-Oberflächen haften. Dafür spricht auch das Projektionsbild einer mit Nanostrukturen präparierten mikrostrukturierten Siliziummembran. Die im Projektionsmodus abgebildeten Bänder besitzen eine Länge, die mit der Länge der DNA-Nanostrukturen übereinstimmen. Daraus folgt, daß die Strukturen zum Zeitpunkt der Adsorption auf der Oberfläche noch intakt sind. Im Gegensatz zu den Abbildungen der Nanostrukturen mit dem AFM müssen die Nanostrukturen hier eine Spalte von 100 nm freitragend überbrücken. Der sie umgebende Puffer wird entfernt und die Moleküle in das Ultrahochvakuum transferiert.

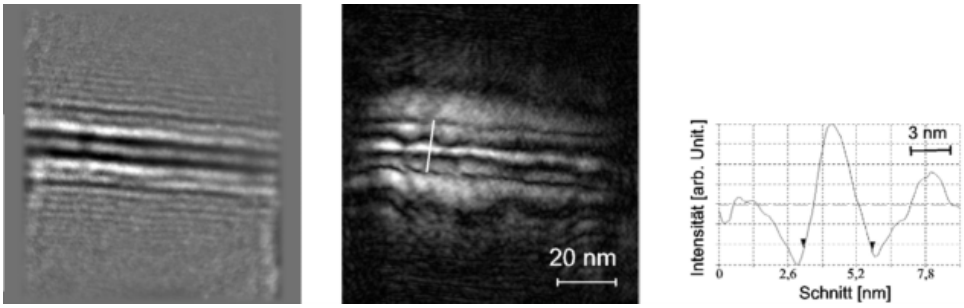


Bild 8-10 Hologramm nach Abzug des Hintergrundes (d = 480 nm; E = 67 eV) und Rekonstruktion mit Schnitt.

DNA und PcPS wurden mit dieser Methode bereits erfolgreich abgebildet, so daß der Abbildungsprozeß selbst nicht für die zerstörte Sruktur verantwortlich sein kann. DNA und PcPS waren über lange Zeit im Elektronenprojektionsmikroskop zu beobachten ohne eine sichtbare Veränderung.

Die Netzwerke stellen jedoch kompliziertere Gebilde dar. Die Stabilisierung der Netzwerke erfolgt unter Ausbildung der Basenpaarung der kohäsiven Enden. Diese sind im Puffer stabil. Wird der Puffer durch Dialyse entfernt, können auch im AFM keine Nanostrukturen mehr abgebildet werden. Bei AFM-Abbildungen auf Glimmer oder Gold/Palladium werden die Strukturen durch die Haftung an der Oberfläche noch stabilisiert, auch wenn der Puffer abgespült wird. Bei den strukturierten Siliziummembranen befindet sich das Molekül jedoch freitragend über einem Spalt, so daß diese Stabilisierung fehlt.

Eine Lösung des Problems könnte eine Gefriertrocknung von DNA-Nanostrukturen bringen. Die Nanostrukturen müssen dafür ähnlich einer Präparation für das Transmissions-Elektronenmikroskop auf Kohle-Lochfolien, die durch Glimmentladung eine hydrophile Oberfläche besitzen, aufgetragen werden. Durch ein ultraschnelles Gefrieren wird eine Eiskristallbildung, welche die Nanostrukturen zerstören würde, unterbunden. Die Proben müßten in einem Rezipienten mit einem Druck der geringer als 10^{-5} mbar ist auf – 100 °C gekühlt werden. Bei diesen Bedingungen könnte das Eis mit einer Rate von ungefähr 0,5 nm s^{-1} sublimieren und die Nanostrukturen freilegen.

Ein Problem stellt dann allerdings der Transfer aus dem Rezipienten zum Elektronen-Projektionsmikroskop dar. Gefriergetrocknete Ojekte sind sehr hygroskopisch. Der Transfer sollte daher unter Schutzgas erfolgen, um ein benetzen der Strukturen zu vermeiden.

Mit dem Transmissionselektronenmikroskop wurden Aufnahmen von vitrifizierten Nanostrukturen von der Gruppe von Prof. Seeman aufgenommen. In Bild 8-11 ist das zweidimensionale Netzwerk zu erkennen.

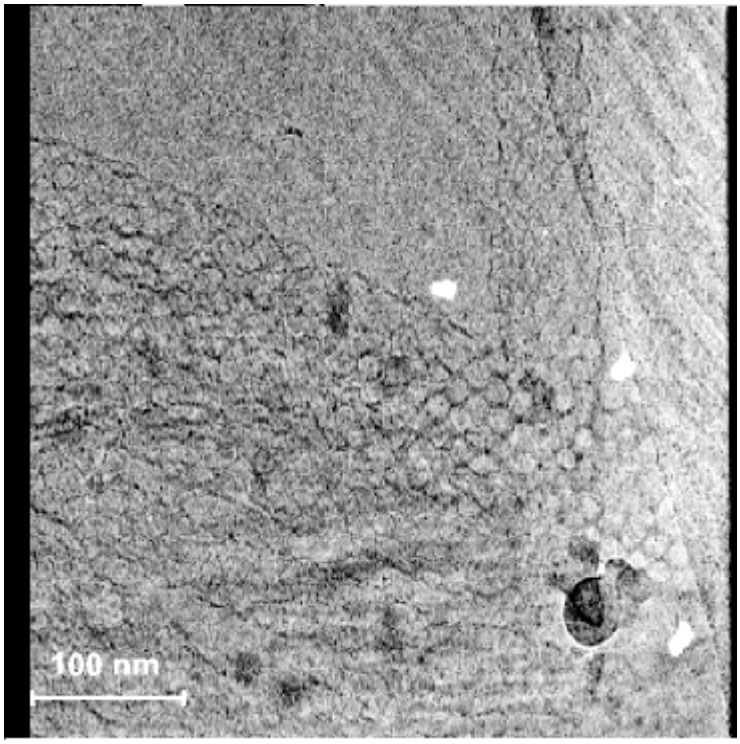


Bild 8-11 TEM-Aufnahme einer vitrifizierten DNA-Nanostruktur (Prof. Dr. N. Seeman)

Eine mögliche Vorgehensweise wäre deshalb, vitrifizierte DNA-Nanostrukturen zu präparieren, im TEM die gelungene Präparation nachzuweisen und anschließend gefrierzutrocknen. Nach einem Transfer in das Elektronen-Projektionsmikroskop sollten bei gelungener Präparation die Nanostrukturen abgebildet werden können. Erste Versuche wurden bereits unternommen.

9 Simulationen mit LEEPS

Das von Prof. Kreuzer und Dr. R. Pawlitzek entwickelte Programm zur Holographie mit niederenergetischen Elektronen ermöglicht auch die Simulation von Hologrammen basierend auf der Theorie für LEEPS-Mikroskopie. Dies eröffnet die Möglichkeit, Hologramme und deren Rekonstruktionen aus den Experimenten im EPM mit Simulationen von Hologrammen mit vergleichbaren Parametern und deren Rekonstruktionen zu vergleichen.

Die Simulationsfiles wurden aus Strukturdaten von Röntgenstrukturanalysen erstellt. Die simulierten Hologramme wurde durch „Offset-Subtraction“, „Circular Cosine Window“ und „Bispline“ für die Rekonstruktion präpariert (Kreuzer und Pawlitzek, 1998).

9.1 Simulationen von PcPS

Die Struktur von PcPS läßt sich als ein zylinderförmiges Molekül beschreiben, das aus Scheibchen aufgebaut ist. Die Strukturdaten zur Simulation wurden aus einer Röntgenstrukturanalyse von einem Bis-phthalocaninato-disiloxan entnommen (E.Ciliberto et al., 1984). Der Durchmesser bei der unsubstituierten Phtahlocyanineinheit ist dabei 15 nm im Gegensatz zu PcPS, das Seitenketten besitzt und dadurch einen Durchmesser von 2,3 nm hat (Tans et al., 1997).

Als Parameter für die Simulationen wurden Bedingungen gewählt, die den Experimenten im EPM entsprachen.

Die Simulation von PcPS bei 30 eV und 100 nm Abstand von Spitze zu Objekt ist in Bild 9-1 zu sehen.

In Bild 9-1 ist ebenfalls ein Schnitt senkrecht und parallel zum Hologramm abgebildet. Der Schnitt parallel zur Molekülachse zeigt, daß neben den starken Interferenzen parallel zur Molekülachse auch Interferenzen mit einer geringeren Modulation senkrecht dazu auftreten.

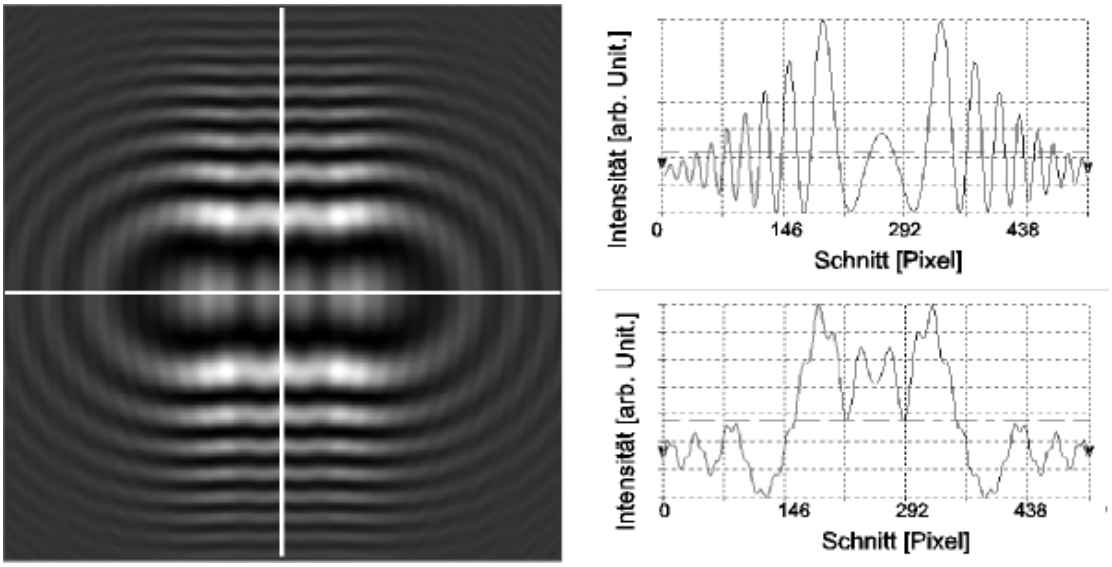


Bild 9-1 Simulation von PcPs bei 30 eV und ein Schnitt senkrecht und parallel zum Hologramm.

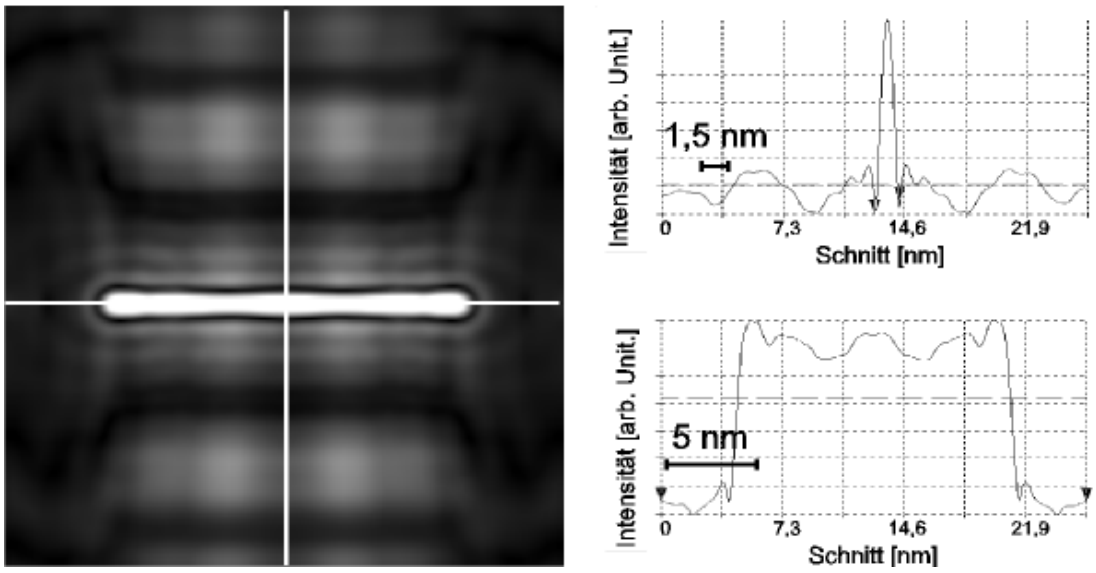


Bild 9-2 Rekonstruktion der Simulation bei 30 eV.

Die aus der Simulation erhaltene Rekonstruktion zeigt einen Strang mit einem Durchmesser von 1,5 nm, was dem Durchmesser des simulierten Moleküls entspricht. Auch entlang des Stranges ist eine schwache Modulation zu sehen, die jedoch nicht mit dem Abstand der Phthalocyanin-Einheiten übereinstimmt, sondern um mehr als eine Größenordnung darüber liegt. Der Abstand von 3,5 Å wurde nicht aufgelöst.

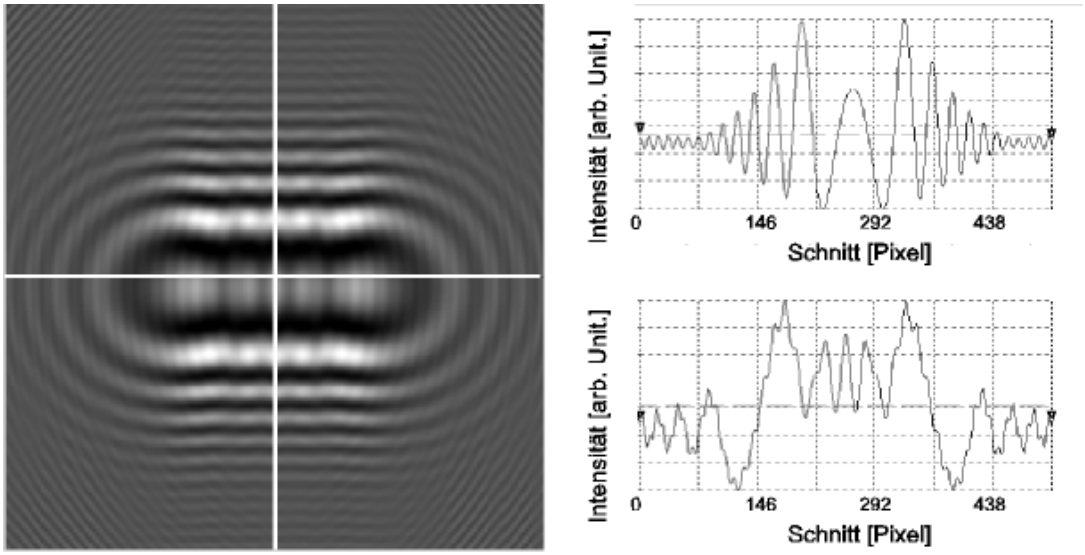


Bild 9-3 Simulation von PcPS mit Schnitten rechts oben senkrecht und unten parallel zum Hologramm.

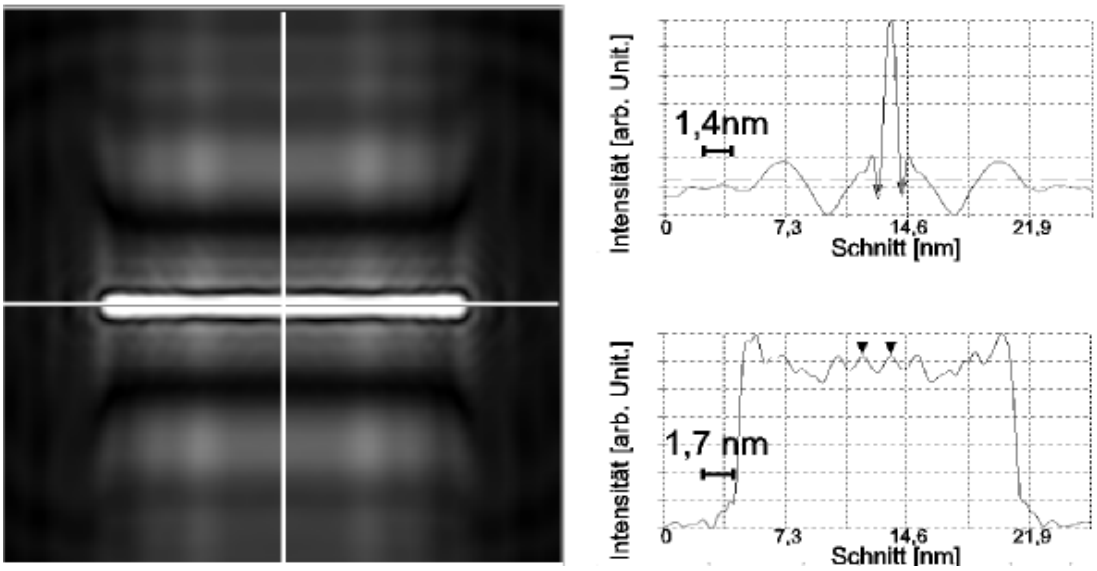


Bild 9-4 Rekonstruktion der Simulation bei 61 eV und einem Abstand von 1000 nm und die Schnitte senkrecht und parallel zum rekonstruierten Strang.

Die Simulation von PcPS bei 61 eV ist in Bild 9-3 abgebildet (Völkel, 2001) Im Schnitt durch das Hologramm ist zu erkennen, daß eine Modulation auch parallel zum Hologramm auftritt. Diese Parameter sind mit dem experimentellen Hologramm zu vergleichen.

Die Rekonstruktion des Hologramms ist in Bild 9-4 zu sehen. Das simulierte Hologramm ergibt einen Strang mit einem Durchmesser von 1,4 nm. Senkrecht zum Strang ist eine schwach ausgeprägte Modulation zu erkennen, die jedoch nicht mit der Periodizität der Stäbchen bei PcPS übereinstimmt. Die Scheibchen mit einem Abstand von 3,5 Å können wie beim Experiment im Elektronen-Projektionsmikroskop nicht aufgelöst werden.

Um auch die Periodizität entlang des Stranges auflösen zu können, muß mit einer Energie von 200 eV gearbeitet werden und ein größerer Bildschirm eingesetzt werden (Bild 9-1)(Völkel, 2001). Die Apparatur, die in dieser Arbeit verwendet wurde, erfüllte jedoch nicht diese Anforderungen.

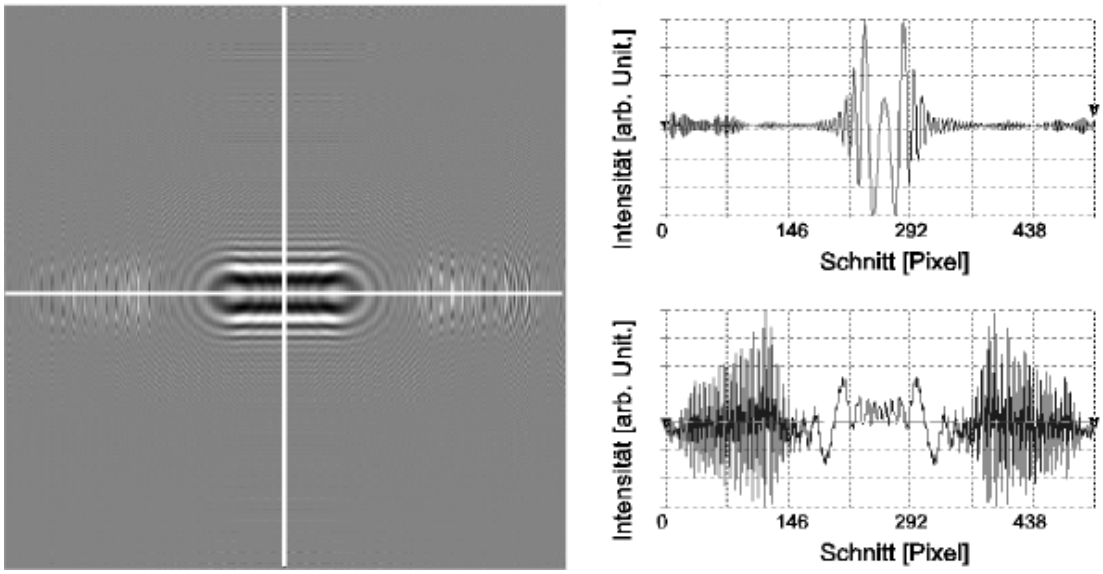


Bild 9-5 Simulation von PcPS bei 200 eV auf einen Schirm von 7,68 cm x7,68 cm.

Bei der Rekonstruktion der Simulation bei 200 eV auf einen Bildschirm von 7,68 cm x 7,68 cm ist die Scheibchen-Struktur zu erkennen. Der Durchmesser des einen Scheibchens beträgt 1,4 nm. Vergrößert man den Ausschnitt und legt einen Schnitt durch zwei weitere Scheibchen, so erkennt man, daß die Scheibchen unterschiedliche Durchmesser besitzen (Bild 9-7).

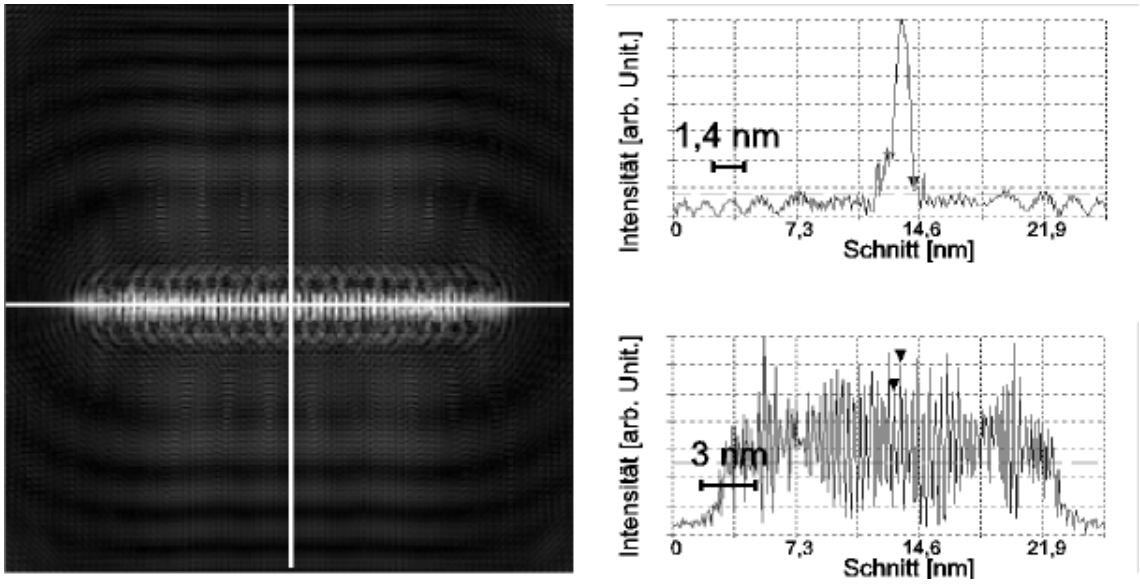


Bild 9-6 Rekonstruktion der Simulation bei 200 eV.

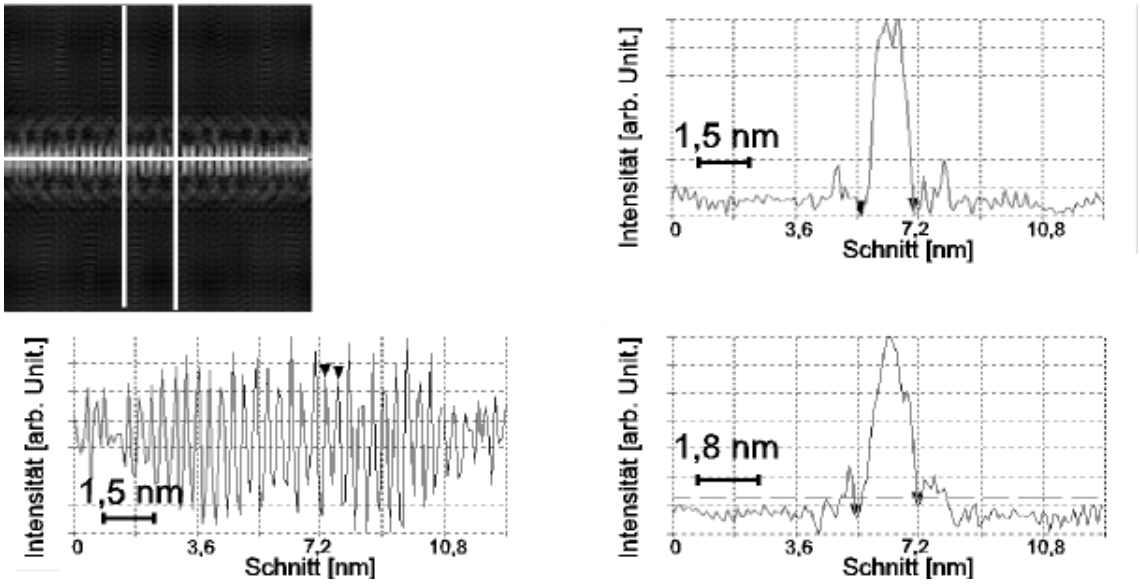


Bild 9-7 Schnitte durch verschiedene Scheibchen.

Die unterschiedlichen Durchmesser zeigen, daß die Scheibchen bei dem Dimer gegeneinander verdreht sind. Die Monomereinheit kann man als ein Kreuz abstrahieren (Bild 9-8). Ist das Kreuz um 45° gedreht, so ist der Schnitt kleiner und zeigt eine Vertiefung in der Peakmitte.

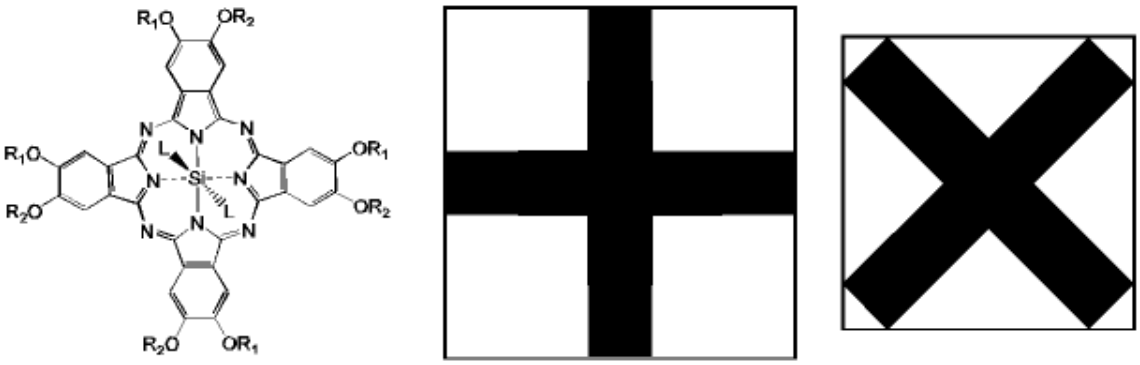


Bild 9-8 Die substituierte Phthalocanineinheit und die Abstraktion als Kreuz mit einer Drehung um 45°.

9.2 Simulationen von DNA

Für die Simulation von DNA wurden Strukturdaten eines Decamers mit der Sequenz 5‘-d(*CP*GP*AP*TP*TP*AP*AP*TP*CP*G)-3‘, das in Bild 9-9 dargestellt ist, verwendet (Quintana et al., 1992).

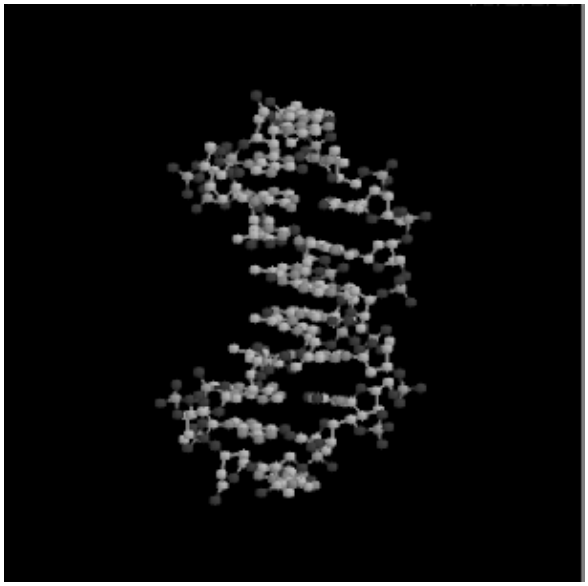


Bild 9-9 Abbildung des zur Simulation eingesetztem Decamers.

Aus diesem Decamer wurde ein 170 nm langer DNA-Strang erstellt, dessen Hologramm für unterschiedliche Abstände simuliert worden ist.

Die Simulationen auf einen Bildschirm von 4 x 4 cm^2 sind in Bild 9-10 zu sehen. In a) beträgt der Abstand Spitze zu Objekt 600 nm, in b 300 und in c 100 nm. Es ist deutlich, daß das Interferenzmuster des DNA-Doppelstrangs unterschiedlich stark vergrößert

worden ist (M = D/d). Die Maxima der Wellen liegen um so enger beieinander, je größer die Entfernung ist. Es werden in gleichem Maße auch mehr Interferenzlinien beobachtet. Die Bilder besitzen alle 512 x 512 Pixel, d.h. für die Interferenzlinien stehen bei einem größeren Abstand weniger Pixel zu Verfügung.

Bei der Rekonstruktion der simulierten Hologramme ergibt sich folgendes Bild: je größer der Abstand von Spitze zu Probe, desto breiter erscheint der Strang. Eine Helix ist in allen Fällen deutlich zu erkennen (Bild 9-11). Die geringere Auflösung der Helix ist auf die geringere Vergrößerung und geringere Anzahl von Pixel pro Interferenz zurückzuführen.

Bei Rekonstruktionen aus experimentell aufgenommenen Hologrammen ist der Unterschied bei verschiedenen Abständen jedoch größer. Dies hängt damit zusammen, daß sich die Moleküle bei den Simulationen frei im Raum befinden, also nicht an Objektträger grenzen. Abbildungen im EPM mit Abständen von Spitze zu Probe > 200 nm zeigen immer auch andere Objekte. Bei strukturierten Siliziummembranen sind dies geschlossene Ränder und bei den Kohle-Lochfilmen die mit Gold/Palladium bedampften Fasern aus Kohlenstoff. Diese führen zu zusätzlicher Streuung. Zudem werden Teile des Interferenzmusters durch den Schattenwurf des Objektträgers verdeckt.

Um diese Gegebenheiten in der Simulation zu berücksichtigen, wurden die simulierten Hologramme bearbeitet. Es wurde nur ein Ausschnitt aus dem Hologramm rekonstruiert und die Umgebung auf Null gesetzt. Die so bearbeiteten Hologramme und daraus resultierenden Rekonstruktionen sind bei einem Abstand zwischen Spitze zu Probe von 600 nm in Bild 9-12, für 300 nm in Bild 9-13 und für 100 nm in Bild 9-14 zu sehen.

Bei dem Abstand von 600 nm ist hier auch bei der Simulation keine Helix mehr zu erkennen (Bild 9-12). Der Durchmesser des rekonstruierten Stranges ist jedoch mit 3,4 nm etwa halb so groß wie aus dem experimentellen Hologramm. Aus dem Experiment ergibt sich ein Durchmesser von 6 nm, was dem dreifachen DNA-Durchmesser entspricht.

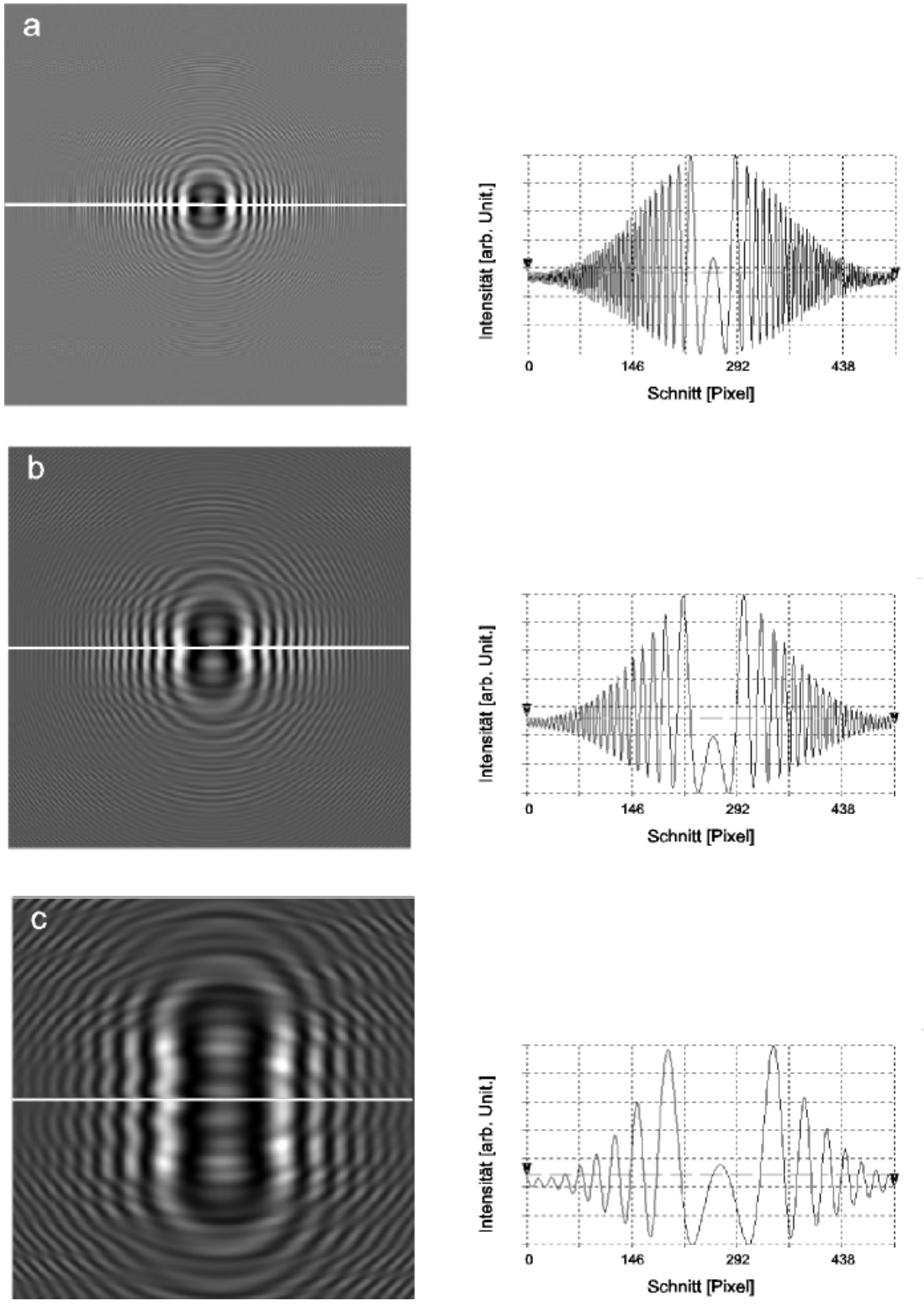


Bild 9-10 Simulierte Hologramme von DNA bei einem Abstand von Quelle zu Objekt von 600 nm (a), 300 nm (b) und 100 nm (c) mit Schnitten durch die Hologramme.

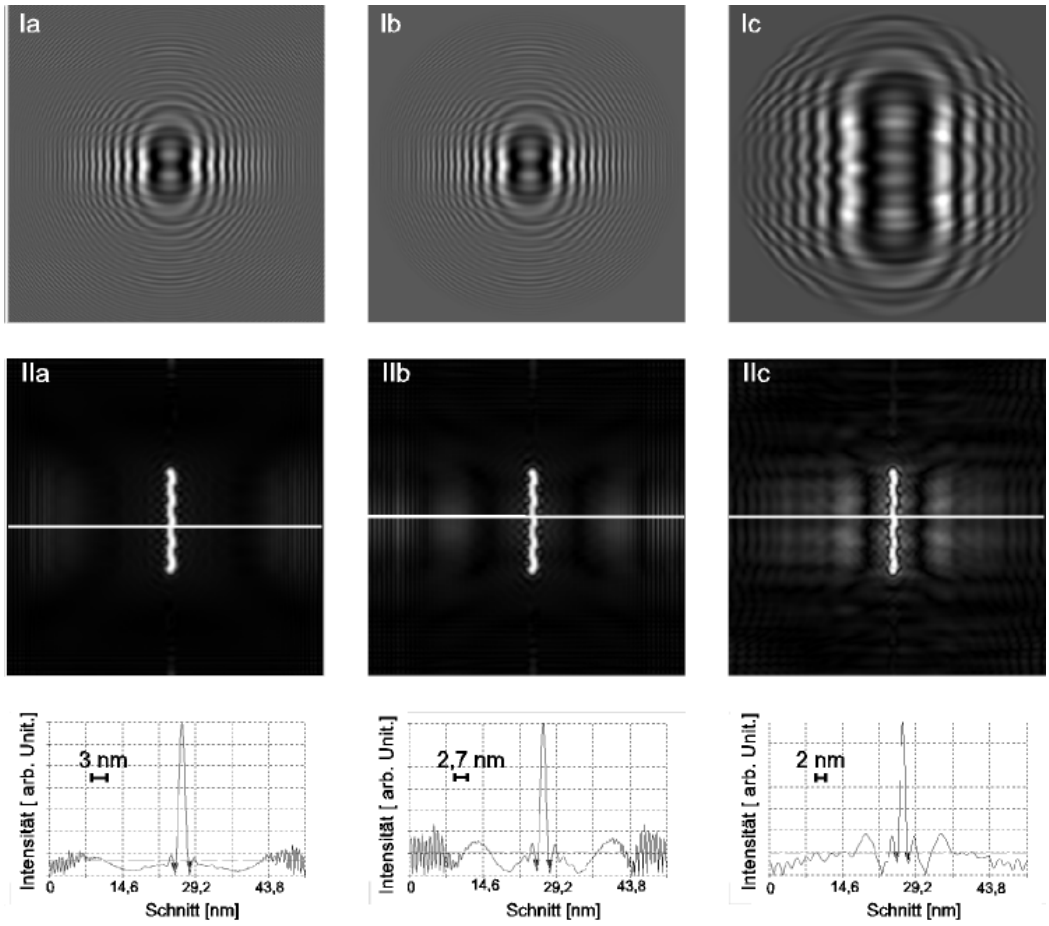


Bild 9-11 Rekonstruktionen aus den Simulationen von DNA bei einem Abstand von Quelle zu Objekt von 600 nm (a), 300 nm (b) und 100 nm (c) mit Schnitten durch die Rekonstruktionen.

Bei einem Abstand von 300 nm ist eine nur gering verminderte Auflösung nach der Bearbeitung des simulierten Hologramms zu erkennen (Bild 9-13). Die Helizität der DNA ist noch zu erkennen. Der Durchmesser beträgt ca. 2,5 nm. Der rekonstruierte Strang aus dem Experiment besitzt einen Durchmesser von ca. 3 nm.

Das experimentell erhaltene Hologramm bei einem Abstand von 140 nm ist ohne das Substrat abgebildet. Bei diesem Abstand zeigen die Rekonstruktionen aus dem experimentellen und dem simulierten Hologramm die Helizität und den Durchmesser der DNA von ca. 2 nm (Bild 9-14).

Dies zeigt, daß der Abstand zwischen Spitze und Objekt nicht alleine für die geringere Auflösung verantwortlich ist, sondern vielmehr auch die Streuung am Objektträger und der Schatten, der durch den Objektträger bedingt ist.

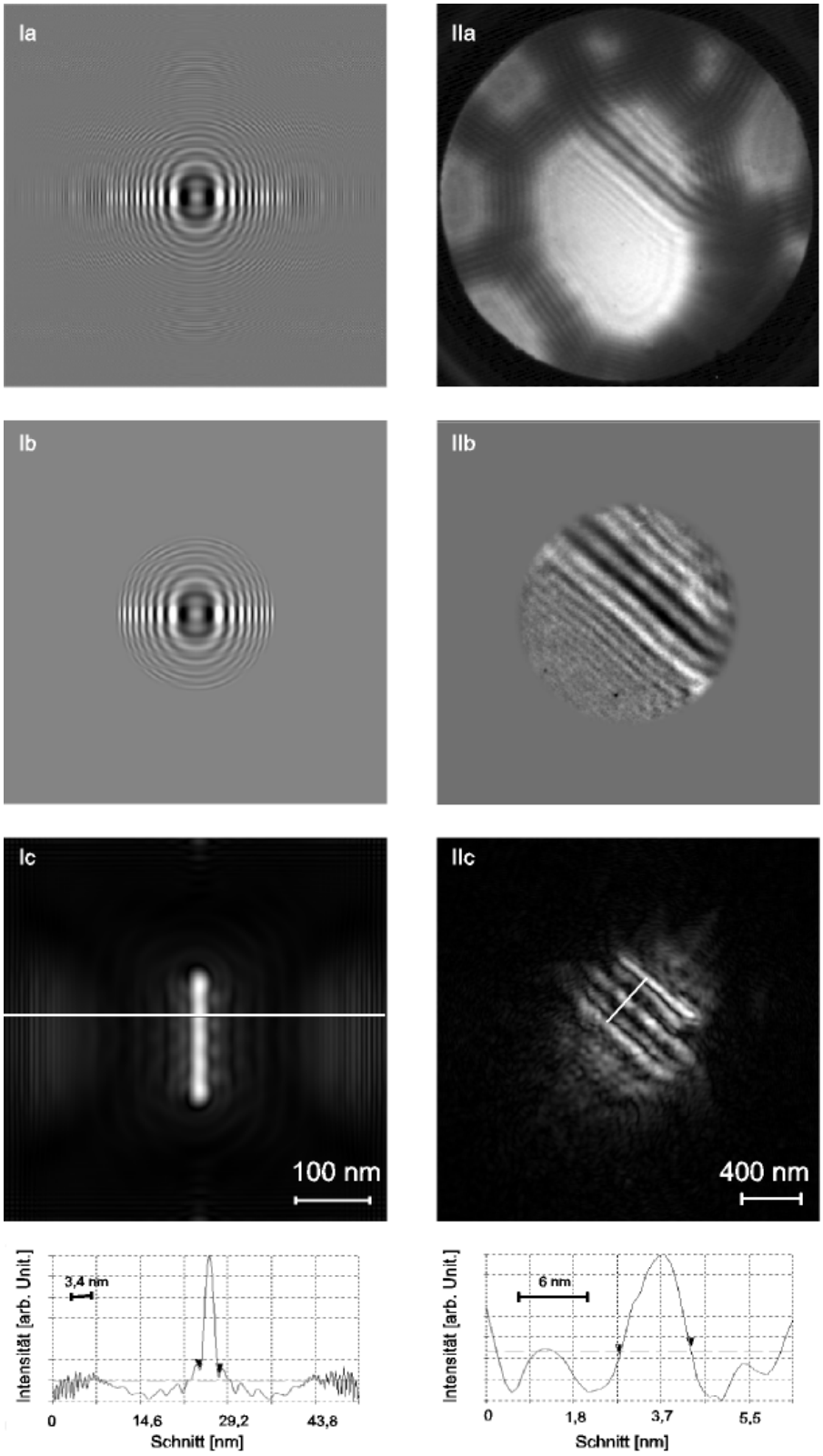


Bild 9-12 Simuliertes Hologramm (Ia, E = 30 eV) und Hologramm aus Experiment (IIa, E = 33 eV) nach der Bearbeitung (Ib und IIb) und die zugehörigen Rekonstruktionen (Ic und IIc) im Vergleich bei einem Abstand von 600 nm.

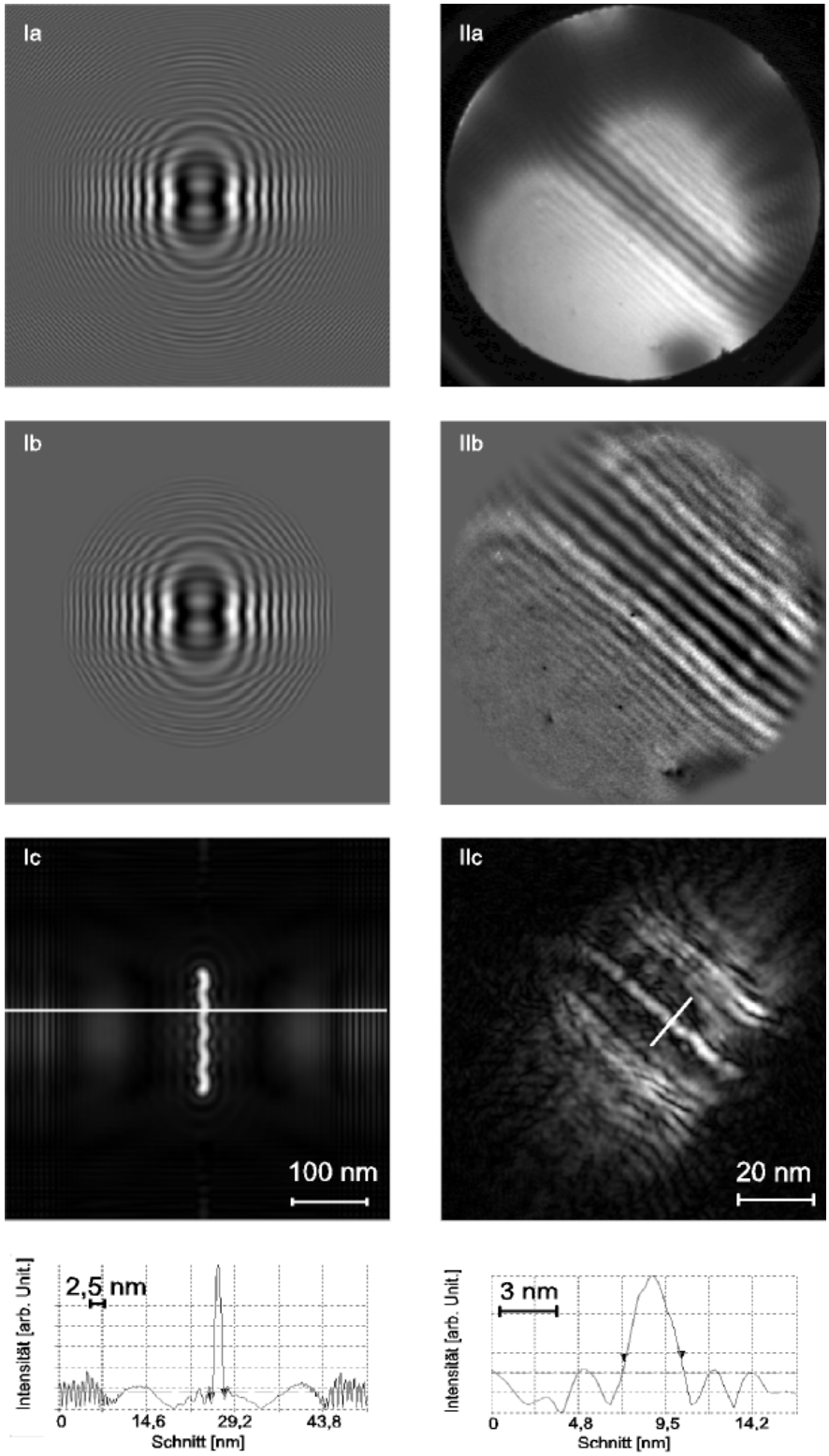


Bild 9-13 Simuliertes Hologramm (Ia, E = 30 eV) und Hologramm aus Experiment (IIa, E = 38 eV) nach der Bearbeitung (Ib und IIb) und die zugehörigen Rekonstruktionen (Ic und IIc) im Vergleich bei einem Abstand von 300 nm.

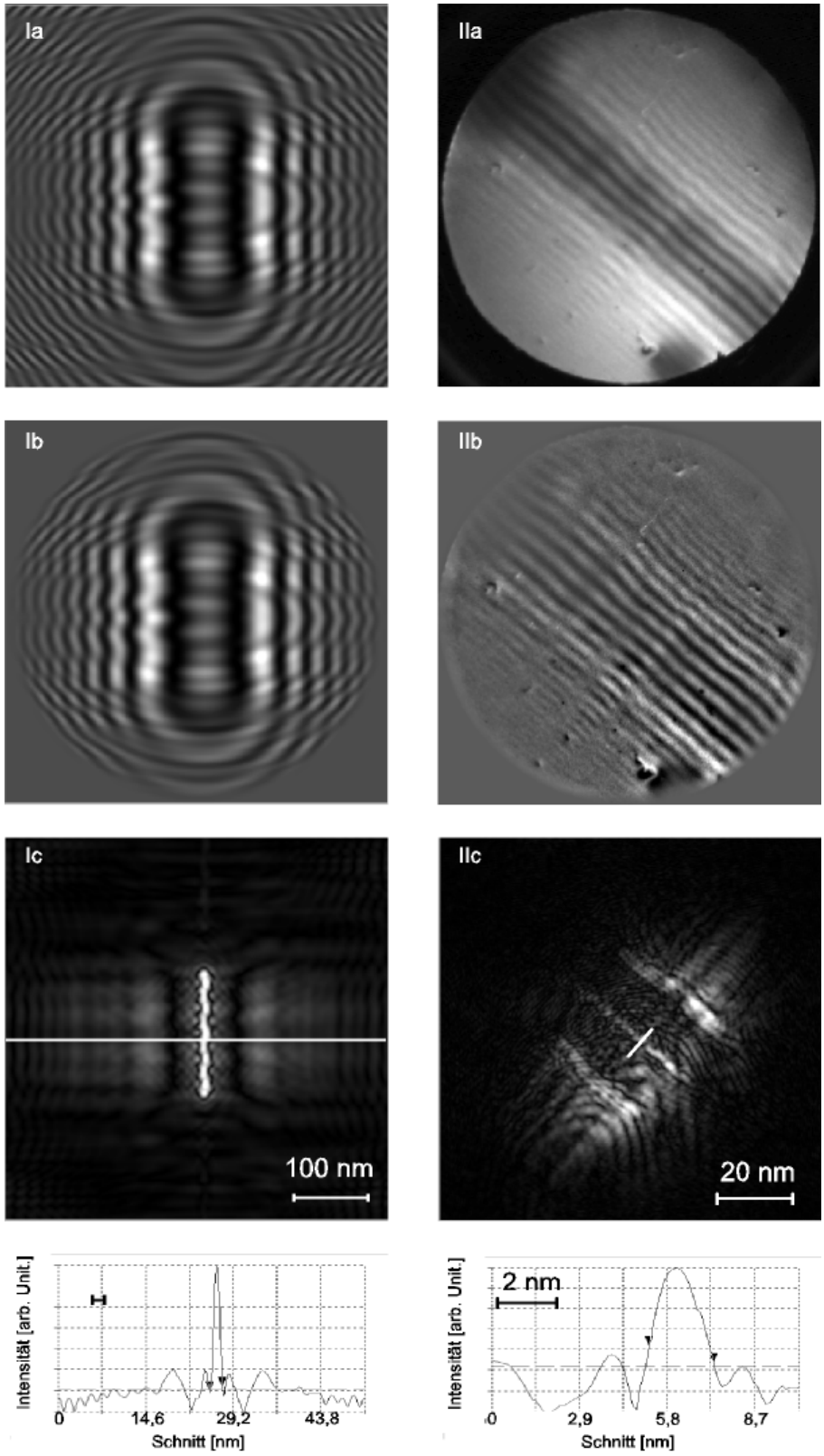


Bild 9-14 Simuliertes Hologramm (Ia) und Hologramm aus Experiment (IIa, E = 32 eV) nach der Bearbeitung (Ib und IIb) und die zugehörigen Rekonstruktionen (Ic und IIc) im Vergleich bei einem Abstand von 100 nm.

9.3 Simulation des Addukts von cis-Platin an DNA

Mit cis-Platin befindet sich ein Molekül mit einem schweren Atom an dem DNA-Strang. Die Simulationen sollen zeigen, ob dies sich signifikant auf Hologramme und Rekonstruktionen auswirkt.

Zur Rekonstruktion wurden Strukturdaten des B-DNA Dodecamer C-G-C-G-A-A-T-T-C-G-C-G mit cis-Platin aus einer Kristallstrukturanalyse (Wing et al., 1980) verwendet. Die Präparation des Komplexes von cis-Platin an DNA erfolgte durch Diffusion von cis-Platin in einen Kristall aus B-DNA. Die monofunktionalen Bindungsstellen befanden sich in großen Lücken in der Nähe von Guanosin. Das Dodecamer ist in Bild 9-15 abgebildet. Die Pfeile zeigen auf die Platinatome.

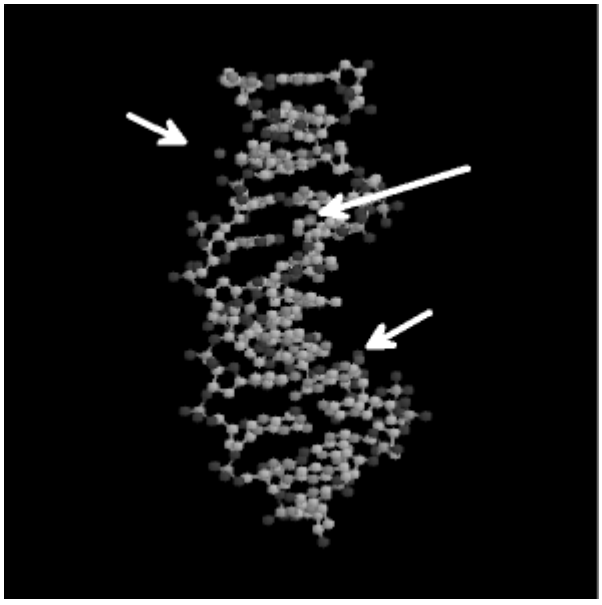


Bild 9-15 Das Dodecamer mit cis-Platin. Die Pfeile zeigen auf die Platinatome.

Die Simulationen sollten zeigen, ob das Platinatom durch eine höhere Intensität in der Rekonstruktion lokalisiert werden kann. Hierzu wurden die Daten mit den drei cis-Platinmolekülen simuliert (Simulation Pt). In einer weiteren Simulation wurden die Platinatome durch Kohlenstoffatome ersetzt (Simulation C), und in einer dritten Simulation wurde cis-Platin ganz aus dem Dodecamer entfernt (Simulation ohne). In Bild 9-15 sind die simulierten Hologramme auf einen Bildschirm von 4 x 4 cm^2 mit einem Abstand zwischen Spitze und Objekt von 100 nm bei einer Energie von 30 eV

abgebildet. In diesen Hologrammen ist auf den ersten Blick kein Unterschied zu erkennen. Legt man jedoch Schnitte durch die Hologramme so ist zu sehen, daß diese sich leicht unterscheiden. Die „Simulation Pt“ und „Simulation C“ unterscheiden sich in den Intensitäten, während die „Simulation ohne“ eine andere Form der Kurve aufweist. Die Unterschiede sind im Vergleich zu der Gesamtintensität jedoch nur gering.

Die Rekonstruktionen aus den simulierten Hologrammen sind in Bild 9-16 dargestellt.

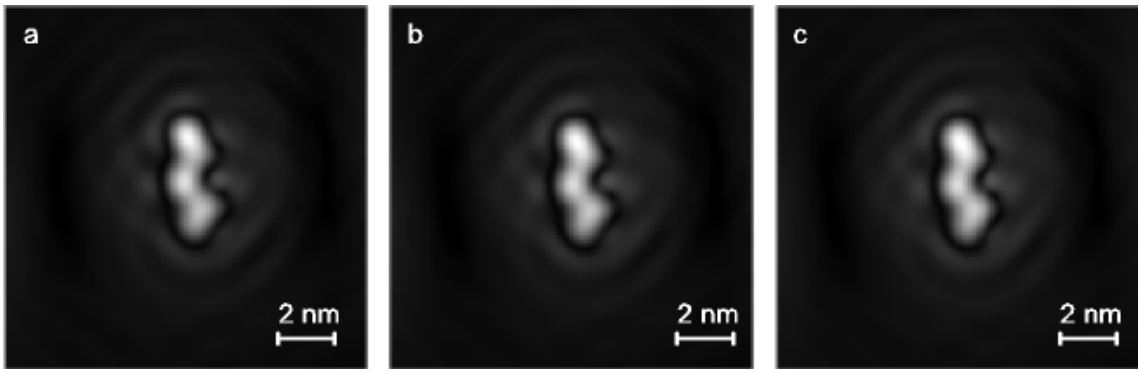


Bild 9-16 Rekonstruktionen aus den simulierten Hologrammen. In a ist die Rekonstruktion der Simulation Pt, in b der Simulation C und in c der Simulation ohne dargestellt.

In Bild 9-16 sind die Rekonstruktionen aus den verschiedenen Simulationen dargestellt („Simulation Pt“ (a), „Simulation C“ (b) und „Simulation ohne“ (c)). In Bild 9-16 ist anhand der Intensitätsverteilung zu erkennen, daß das Molekül nicht flach in einer Ebene liegt. Unterschiede aufgrund der zusätzlichen Streuzentren durch Ausbildung des cis-Platin-Adduktes sind im direkten Vergleich der Rekonstruktionen nur schwer zu erkennen. Durch Subtraktion der rekonstruierten Bilder können diese verdeutlicht werden (Bild 9-18).

In den Differenzbildern sind nur die Unterschiede aufgrund des Addukts an DNA zu sehen. Bild 9-18 Ia zeigt, daß die unterschiedlichen Streuquerschnitte von Pt in C sich in der Intensität der Rekonstruktion wiederspiegeln. Wäre alleine die Position der Streuzentren für das Hologramm relevant, so würde die Differenz Null ergeben.

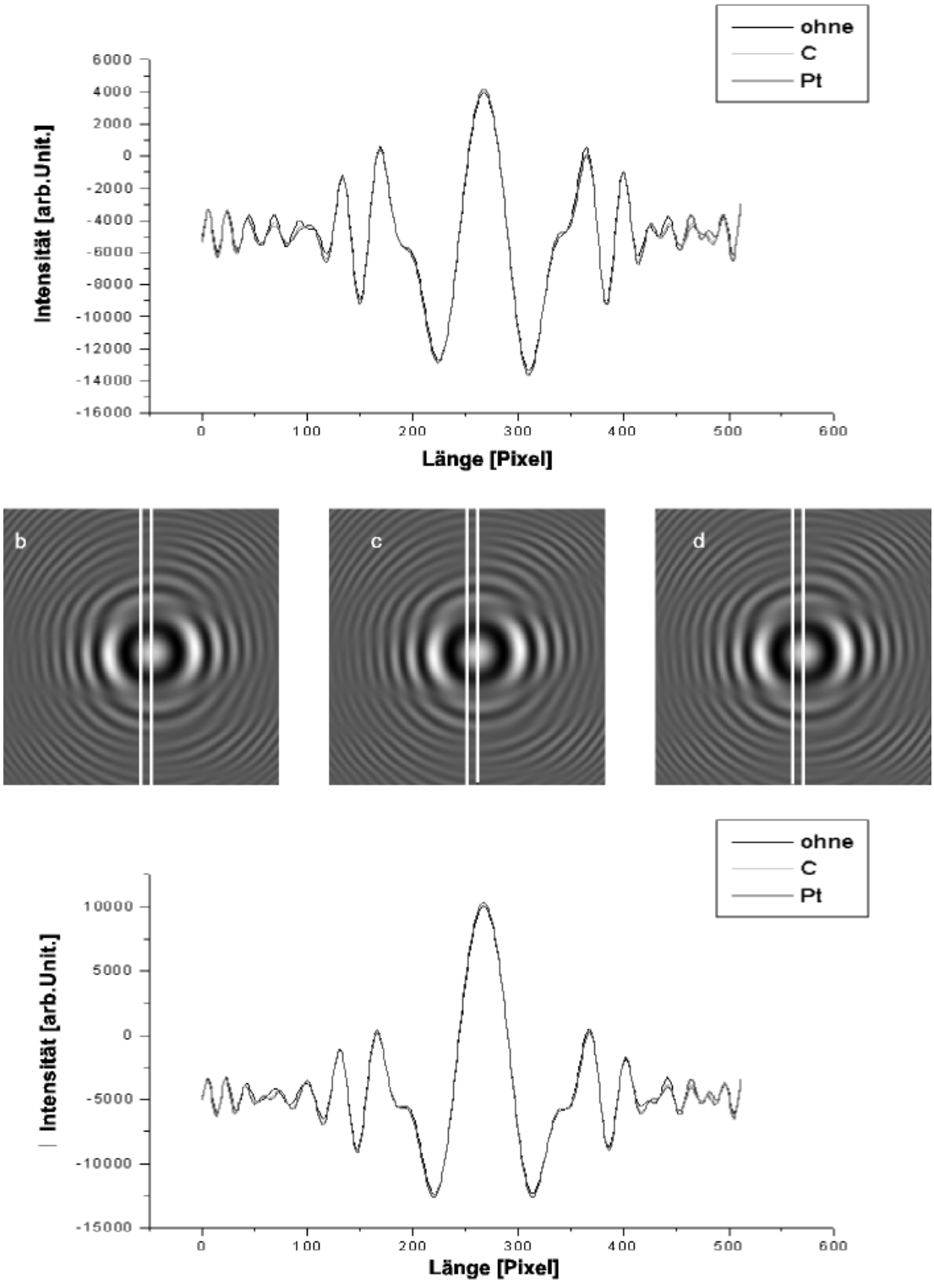


Bild 9-17 Die „Simulation Pt“ ist in b abgebildet, die „Simulation C“ in c und die „Simulation ohne“ in d. In den Graphen sind die vertikalen Schnitte an jeweils der gleichen Stelle in den drei Hologrammen dargestellt. In a ist der linke Schnitt und in e der rechte Schnitt abgebildet.

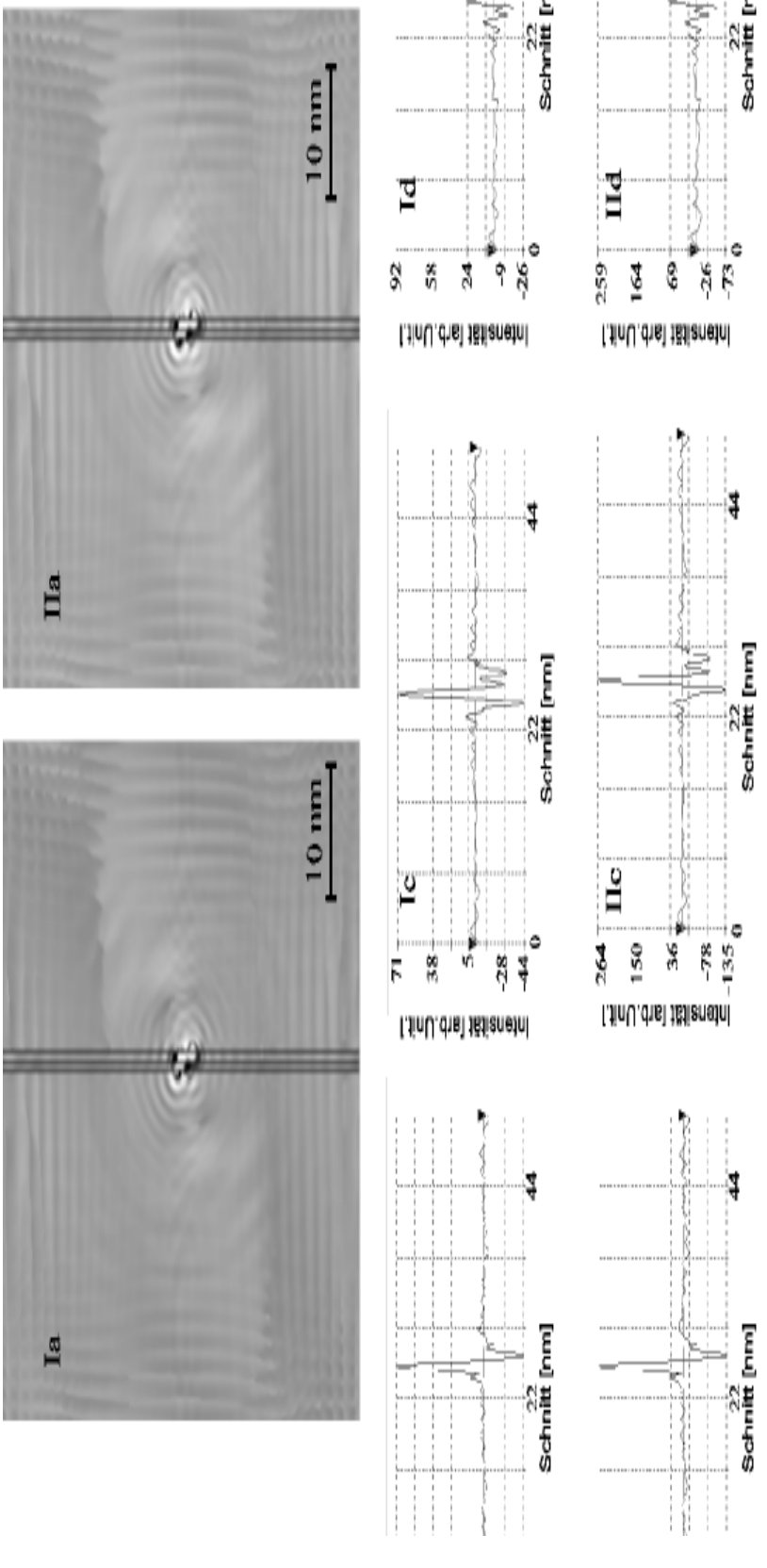

Ia
10 nm
IIa
10 nm
Ic
Intensität [arb.Unit.]
71
38
5
-28
-44
0
22
44
Schnitt [nm]
Id
Intensität [arb.Unit.]
92
58
24
-9
-26
0
22
44
Schnitt [nm]
IIc
Intensität [arb.Unit.]
264
150
36
-78
-135
0
22
44
Schnitt [nm]
IId
Intensität [arb.Unit.]
259
164
69
-26
-73
0
22
44
Schnitt [nm]

Bild 9-18 Differenzbilder der Rekonstruktionen aus der „Simulation Pt“ mit der „Simulation C“(Ia) und aus der „Simulation Pt“ mit der „Simulation ohne“ (IIa). Die Schnitte Ib, Ic, Id und IIb, IIc, IId sind von links nach rechts abgebildet. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Intensitätsunterschiede zwischen Pt und C bei 30 eV nur sehr gering sind. Der Unterschied zwischen der mit cis-Platin modifizierten DNA zur reinen DNA kann in den Differenzbildern gezeigt werden.

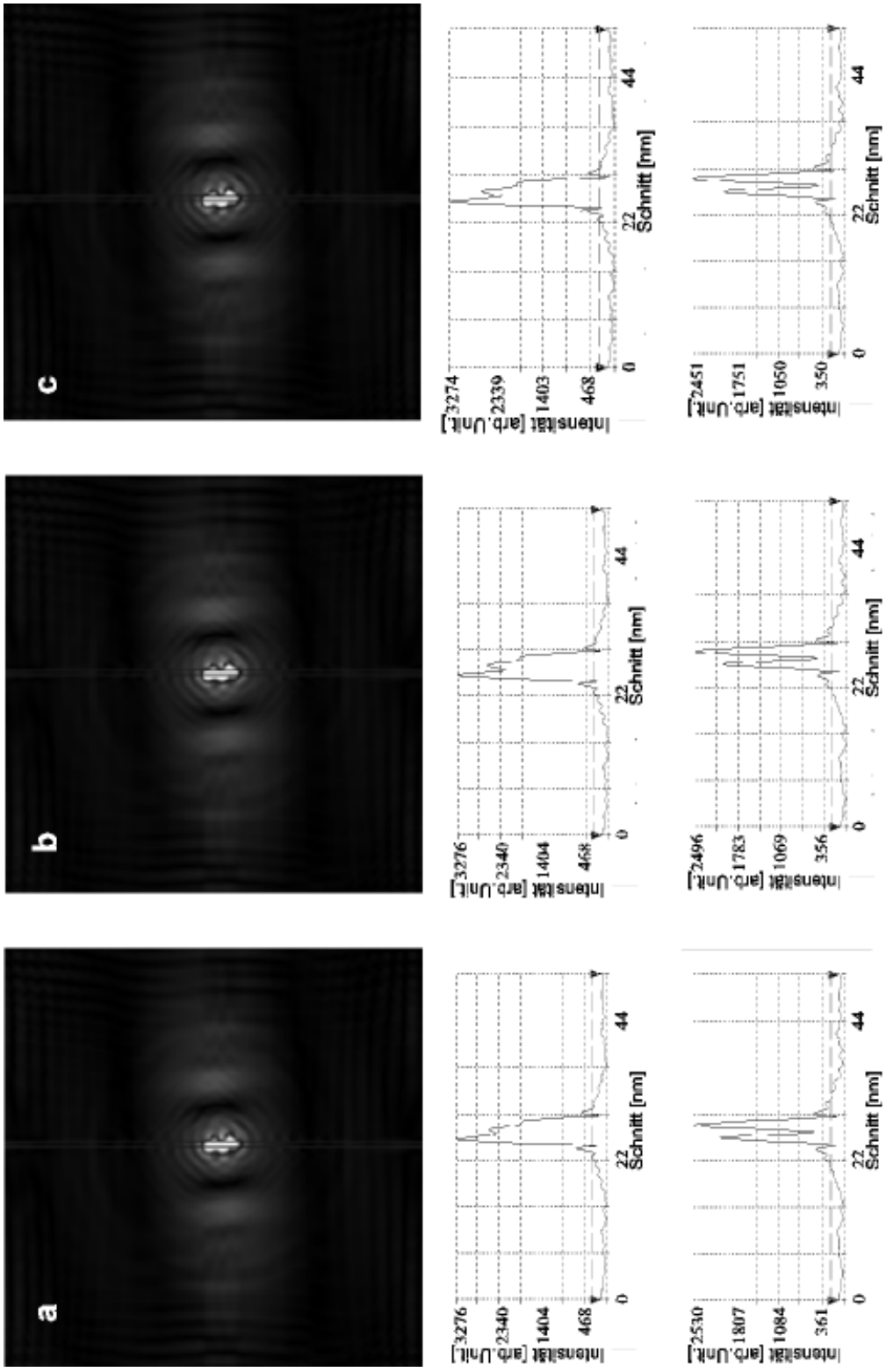


Bild 9-19 Rekonstruktionen aus den Hologrammen mit den jeweiligen Schnitten durch Positionen, an denen sich Platin befindet. Die Rekonstruktion aus „Simulation Pt" ist in a, aus „Simulation C" in b und aus „Simulation ohne" in c wiedergegeben.

Der Unterschied zwischen der Rekonstruktion aus der „Simulation Pt" und „Simulation ohne" ist wie erwartet stärker, da hier DNA ohne cis-Platin simuliert und rekonstruiert worden ist (Bild 9-18 II). Dies zeigt sich in den Schnitten durch die Rekonstruktionen. Die Schnitte durch die Differenzbilder besitzen bei Bild 9-18 II b-d eine um den Faktor drei höher Intensität als die bei Bild 9-18 I b-d.

Vergleicht man aber die Rekonstruktionen direkt, wie dies auch im Experiment möglich ist, so sind diese Unterschiede schwer zu erkennen. Der Unterschied in der maximalen Intensität beträgt zwischen der Rekonstruktion aus „Simulation Pt" und „Simulation ohne" nur ca. 3 % und zu „Simulation C" nur ca. 1 % (Bild 9-19).

Die Schnitte durch die Rekonstruktionen, an denen sich kein Platinatom bei der „Simulation Pt" befindet, zeigen, daß die maximale Intensität dieser Schnitte bei der Rekonstruktion aus „Simulation ohne" am höchsten ist (Bild 9-20). Dies ist dadurch zu erklären, daß die einzelnen Bilder jeweils das gesamte Spektrum ausnutzen.

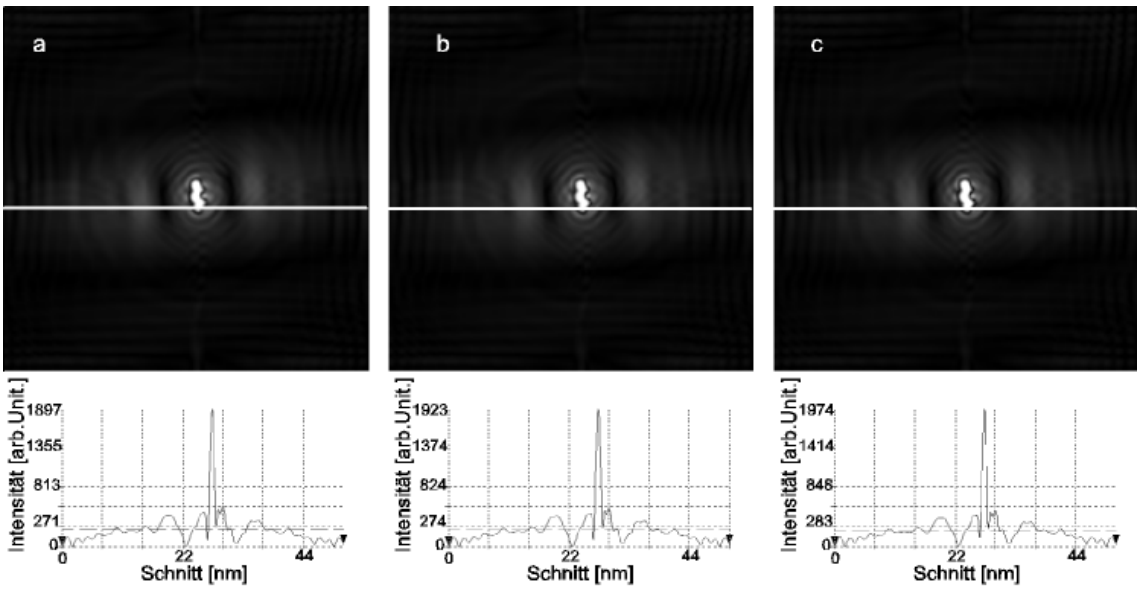


Bild 9-20 Die Rekonstruktionen aus den Simulationen „Simulation Pt" (a), „Simulation C" (b) und „Simulation ohne" mit Schnitten an Stellen ohne Addukte zeigen, daß LEEPS für jedes Bild das gesamte Spektrum ausnutzt.

Im Fall der Simulationen können die Schnitte an diesen Stellen zu einer Normierung genutzt werden. In Tabelle 9-1 sind die maximalen Intensitäten der Schnitte vor und nach der Normierung aufgeführt.

Die Intensitätsunterschiede zwischen den Rekonstruktionen aus „Simulation Pt" und „Simulation ohne" beträgt nun ca. 7 % und zwischen „Simulation Pt" und „Simulation C" ca. 3 %.

Die Simulationen für einen größeren Bildschirm (7,68 x 7,68 cm^2) und bei höheren Energien (202 eV) ergeben ein bessere Auflösung (Bild 9-21).

Bei diesen Simulationen ist nur an der Position eines cis-Platin-Adduktes ein Unterschied direkt aus der Abbildung zu erkennen.

	Intensität	Intensität normiert	Intensität	Intensität normiert
Simulation Pt	3276	3276	2530	2530
Simulation C	3276	3231	2496	2462
Simulation ohne	3274	3146	2451	2355

Tabelle 9-1 Maximale Intensitäten aus den Schnitten ohne Normierung und normiert.

Die Schnitte durch die Rekonstruktionen bei 200 eV (Bild 9-22) und großem Schirm zeigen im Vergleich mit den Rekonstruktionen bei 30 eV und kleinem Schirm, daß sich bei 200 eV der größere Streuquerschnitt von Platin stärker auswirkt als bei 30 eV. Der Unterschied in den Intensitäten zwischen „Simulation Pt" und „Simulation C" beträgt hier 5 % (anstatt 3%)und zwischen „Simulation Pt" und „Simulation ohne" 18 % (anstatt 7 %) (Tabelle 9-2).

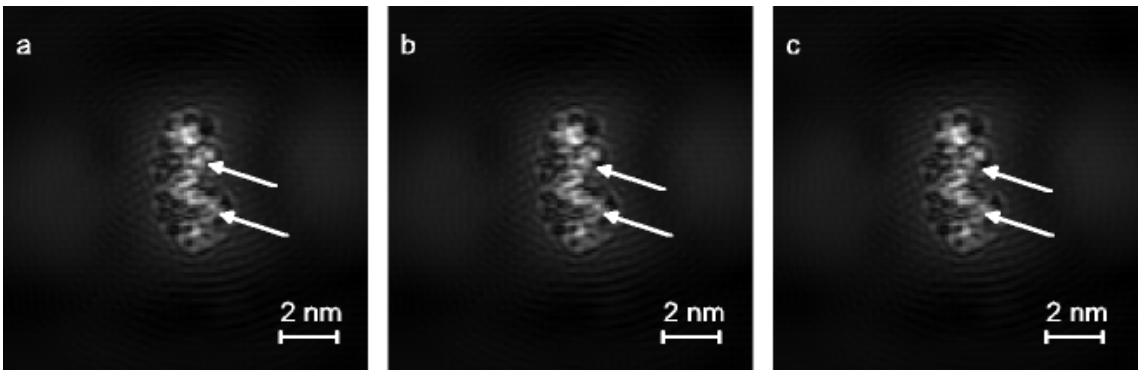


Bild 9-21 Rekonstruktionen aus „Simulation Pt" (a), „Simulation C" (b) und „Simulation ohne" bei 200 eV und einem großen Bildschirm (7,68 cm x 7,68 cm). Die Pfeile weisen auf die Stellen, an denen sich das Addukt befindet.

	Verhältnis der Intensitäten bei 30 eV	Verhältnis der Intensitäten bei 200 eV
Schirmgröße	4 x 4 cm^2	7,68 x 7,68 cm^2
Simulation Pt :Simulation C	1,03	1, 05
Simulation Pt : Simulation ohne	1,07	1,18

Tabelle 9-2 Verhältnisse der maximalen Intensitäten bei Schnitten durch die Rekonstruktion an Positionen, an denen sich Adduktatome befinden.

Diese Simulationen zeigen, daß es bei den gegebenen geometrischen Bedingungen der Apparatur schwierig ist, Unterschiede zwischen der reinen DNA und dem cis-Platin-Addukt im Experiment zu erkennen. Der Wechsel zu höheren Energien und einer Apparatur mit größerem Bildschirm bewirkt auch bei diesem Experiment eine Verbesserung der Auflösung.

c
3274
2339
1403
468
0
Intensität [arb.Unit.]
22
44
Schnitt [nm]
1631
1165
699
233
0
Intensität [arb.Unit.]
22
44
Schnitt [nm]
b
3274
2339
1403
468
0
Intensität [arb.Unit.]
22
44
Schnitt [nm]
1844
1317
790
263
0
Intensität [arb.Unit.]
22
44
Schnitt [nm]

Bild 9-22 Rekonstruktion aus der „Simulation Pt“ (a), aus der „Simulation C“ (b) und der „Simulation ohne“ mit Schnitten durch die rekonstruierten Moleküle (d = 100 nm, E = 200 eV).

10 Die holographischen Abbildungen der verschiedenen Objekte im Vergleich

In Experimenten sind Hologramme von PcPS, DNA und dem Addukt von cis-Platin an DNA aufgenommen und rekonstruiert worden. Die Energien des Elektronenstrahls variieren bei den Hologrammen zwischen 30 und 80 eV, d.h. die Strahlung besitzt eine Wellenlänge zwischen 2,2 Å und 1,4Å. Bei diesen Energien konnten sowohl von PcPS als auch von DNA und der mit cis-Platin modifizierten DNA Hologramme erhalten werden, die zu einem Strang rekonstruieren, der einen Durchmesser von ca. 2 nm besitzt, was den Durchmessern der beobachteten Moleküle entspricht.

PcPS und DNA besitzen auch entlang der stäbchenförmigen Molekülachse eine Periodizität. PcPS ist aus Phthalocyanin-Einheiten aufgebaut, die in einem Abstand von 3,3 Å angeordnet sind. DNA besitzt als doppelsträngige Helix eine große Furche mit einer Periodizität von 3,4 nm.

Die einzelnen Phthalocyanin-Einheiten konnten in den bisherigen Experimenten nicht aufgelöst werden (Bild 10-1). Dies ist in Übereinstimmung mit Simulationen, die gezeigt haben, daß eine Auflösung dieser Untereinheiten erst bei einem größeren Detektor (75 mm) und höheren Elektronenenergien (200 eV, 0,87 Å) möglich ist (vgl. Kapitel 9.1).

Die Periodizität der DNA-Doppelhelix konnte in wenigen Rekonstruktionen aufgelöst werden. Die Hologramme wurden sowohl mit der Apparatur, die einen Detektor mit einem Durchmesser von 44 mm besitzt (Bild 10-1), und mit der Apparatur, die mit einem Detektordurchmesser von 75 mm und einer verbesserten Schwingungsisolation ausgestattet ist, aufgenommen (vgl. Kapitel 6).

Die Simulationen zu diesen Experimenten bestätigen ebenfalls, daß unter idealen Bedingungen eine Auflösung der Helix möglich sein sollte (Kapitel 9.2). Die Experimente sind jedoch häufig durch akustische Einkopplungen und Gebäudeschwingungen gestört. Zudem verändert die Spitze ihre Emissionseigenschaften über der Probe, da immer wieder Partikel von der Probe desorbieren und die Spitze kontaminieren. Somit sind die Bedingungen des

Experimentes nicht über den gesamten Beobachtungszeitraum ideal und limitieren die Auflösung.

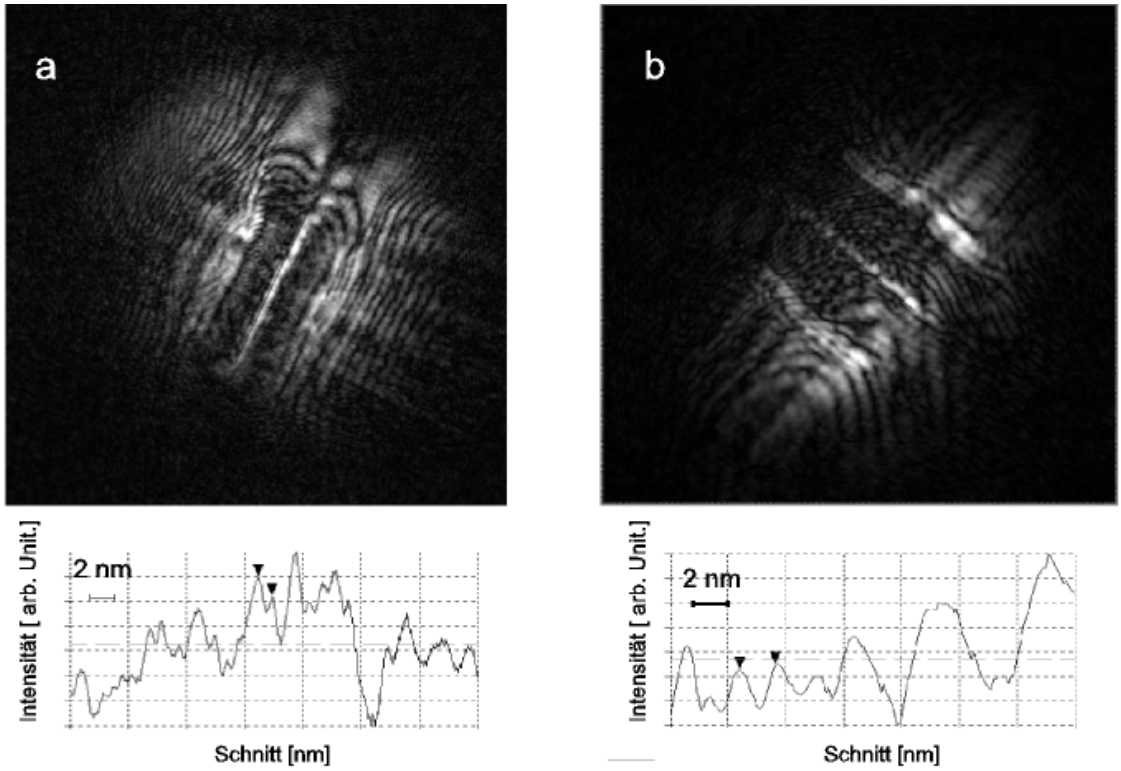


Bild 10-1 In a ist eine Rekostruktion von PcPS, (E = 71V, d =2000 nm) abgebildet, in b von DNA (E = 32 V, D = 1400 nm). Unter den Rekonstruktionen befinden sich Schnitte entlang des Stranges.

In Bild 10-1 sind die Rekonstruktionen von PcPS (Gölzhäuser et al., 1998)und DNA im direkten Vergleich abgebildet. Bei PcPS sind Modulationen in der Intensität entlang des Stranges zu sehen. Diese stimmen jedoch nicht mit der Periodizität der Phthalocyanin-Einheiten überein.

Auch die Simulationen von PcPS bei 30 eV und einem Abstand zwischen Quelle und Objekt von 100 nm zeigen leichte Modulationen entlang des Stranges (Bild 10-2).

Dies spricht dafür, daß die Modulationen im DNA-Strang keine Artefakte sind, die durch Bildschirmgröße, Energie und Störungen auf dem Detektor verursacht worden sind.

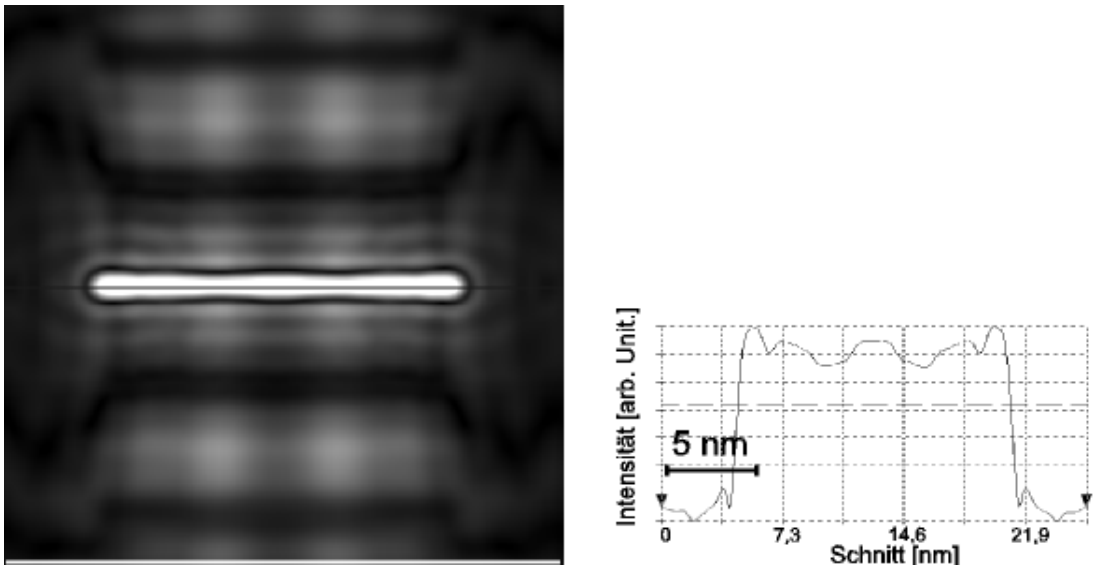


Bild 10-2 Rekonstruktion aus einem mit 30 eV simulierten Hologramm mit einem Abstand zwischen Quelle und Objekt von 100 nm auf einen Bildschirm von 4 cm x 4 cm und ein Schnitt entlang der Molekülachse.

Daß die Periodizität bei dieser Aufnahme nicht der B-DNA entspricht, kann durch ein Durchhängen des Moleküls, das eine Persistenzlänge zwischen 60 und 80 nm besitzt, erklärt werden (vgl. Kapitel 6).

Im Vergleich dazu zeigt das auf einer strukturierten Siliziummembran präparierte DNA-Moldekül eine Periodizität die in der Größenordnung der B-DNA liegt (Kapitel 6). Die Öffnung, die von der DNA überbrückt wurde, ist in diesem Fall im Bereich der Persistenzlänge der DNA.

Zur Bestimmung der Durchmesser der rekonstruierten Stränge werden Schnitte durch die Rekonstruktion gelegt. Bei atomarer Auflösung sollten die einzelnen Atompositionen durch Intensitätsmaxima gekennzeichnet sein (Kreuzer et al., 1992). Bei den gegebenen experimentellen Bedingungen können wir jedoch keine atomare Auflösung erhalten.

Aus diesem Grund wurden zur Durchmesser-Bestimmung Rekonstruktionen von Simulation und Experiment verglichen. Bei berechneten Hologrammen ist eine Übereinstimmung der Peakbreite mit dem Moleküldurchmesser auf Höhe des Rauschens zu beobachten. An diesen Stellen wurde auch in den experimentellen Rekonstruktionen die Peakbreite und somit der Moleküldurchmesser bestimmt.

Hologramme von Molekülen bei verschiedenen Abständen zwischen Spitze und Objekt haben gezeigt, daß bei Abständen zwischen 100 und 200 nm die Durchmesser der rekonstruierten Moleküle mit dem Molekül durchmesser übereinstimmen. Simulationen bestätigen auch dieses Ergebnis.

Bei größeren Abständen sind auch Interferenzen höherer Ordnung zu beobachten. Durch eine feste Anzahl an Pixel von 1024 x1024 stehen bei größeren Abständen den einzelnen Interferenzen weniger Pixel zu Verfügung, d.h. diese Interferenzen werden schlechter aufgelöst. Aber auch die Vergrößerung, die durch das Verhältnis von Detektorabstand zu Objektabstand gegeben ist, variiert bei Abständen zwischen 600 und 100 nm von 10^5 bis 10^6. Dies zeigt sich in der Rekonstruktion durch eine Verbreiterung des hellen Bereiches, der das Molekül repräsentiert. Bei experimentellen Hologrammen kommt dazu noch die Streuung an den Rändern des Objektträgers und der Schattenwurf des Objektträgers. Aus diesen Gründen ist die Auflösung bei größeren Abständen geringer.

Ein weiteres Annähern der Spitze an die Probe hat sich in der Praxis nicht verwirklichen lassen. Bei einer weiteren Annäherung nimmt die Vergrößerung zwar zu, aber es werden weniger Interferenzen aufgezeichnet, so daß auch aus diesem Grund eine weitere Annäherung nicht ratsam ist.

11 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde an der Weiterentwicklung einer neuen Methode zur Strukturaufklärung von Makromolekülen gearbeitet.

Holographie mit niederenergetischen Elektronen ist eine Mikroskopietechnik, die ohne Linsen und aus Linsen resultierenden Fehlern arbeitet. Hologramme können mit einer nominellen Vergößerung von $M > 10^6$ aufgenommen werden.

Verschiedene Moleküle wurden auf unterschiedlichen Objektträgern präpariert und holographisch abgebildet.

Als geeignete Objektträger für Makromoleküle haben sich mikrostrukturierte Siliziummembranen bewährt. Auch mit Gold/Palladium bedampfte Kohle-Lochfolien sind interessante Objektträger. Diese müssen vor einer Präparation genau kartiert werden.

Phthalocyaninatopolysioloxan (PcPS), DNA und das cis-Platin-Addukt an DNA wurden auf die oben genannten Objektträger aufgetragen und holographisch abgebildet. Zur Abbildung wurden Spannungen zwischen 30 und 80 V an eine ultrascharfe Wolframspitze angelegt. Die emittierten Elektronen besitzen dabei Wellenlängen zwischen 2,2 Å und 1,4Å.

Die Hologramme der stäbchenförmigen Moleküle rekonstruieren als Stränge mit einem Durchmesser von ca. 2 nm, was sehr gut dem Moleküldurchmesser entspricht. Diese Auflösung wurde bei Abständen zwischen Spitze und Probe von 100 bis 200 nm erreicht.

Bei größeren Abständen verschlechtert sich die Auflösung. Dies ist bedingt durch die geringere Vergrößerung, bei der zwar Interferenzen höherer Ordnung zu sehen sind jedoch weniger Pixel für die einzelnen Interferenzen zur Verfügung stehen. Außerdem wird die Streuung an den Objektträgern relevant. Diese erfüllt nicht die Bedingungen der Holographie und überlagert das Hologramm.

Die Hologramme wurden mit LEEPS, einem Programm basierend auf der Theorie zur Simulation und Rekonstruktion von Hologrammen, die mit niederenergetischen

Elektronen aufgenommen werden, rekonstruiert (Kreuzer und Pawlitzek, 1998). Die Bearbeitung der Hologramme vor der numerischen Rekonstruktion sowie die unterschiedlichen Bearbeitungsmöglichkeiten wurden vorgestellt und die daraus resultierenden Rekonstruktionen diskutiert.

Die zu den Experimenten durchgeführten Simulationen mit LEEPS bestätigten die experimentellen Ergebnisse. Weitere Simulationen zeigten, daß bei Verwendung eines größeren Bildschirms und höherer Energie eine Auflösung im Subnanometer-Bereich möglich sein sollte.

Die aus synthetisierten Oligonucleotiden hergestellten zweidimensionalen DNA-Nanostrukturen wurden auf Glimmer und Gold/Palladium-Oberflächen aufgetragen und im AFM abgebildet. Verschiedene Wege zur Präparation für das Elektronen-Projektionsmikroskop waren aber noch nicht erfolgreich. Weitere Experimente zur Gefriertrocknung von vitrifizierten Nanostrukturen sind in Vorbereitung.

Die Experimente zeigen, daß eine nicht ausreichende Schwingungsentkopplung das Auflösungsvermögen des verwendeten Elektronen-Projektionsmikroskops begrenzt. Mit einem größeren Detektor sollte eine Auflösung im Subnanometer-Bereich möglich werden. Diese Punkte wurden bei der Konzeption einer neuen Apparatur berücksichtigt, die in Zukunft zur holographischen Abbildung von Makromolekülen eingesetzt werden soll.

12 Literaturverzeichnis

Barton, J. J. 1988. Photoelectron Holography. *Phys. Rev. Lett.* 61:1356-1359.

Binh, V. T., V. Semet, und N. Garcia. 1995. Nanometric observations at low energy by Fresnel projectkon microscopy: Carbon and polymer fibres. *Ultramicroscopy.* 58:307.

Boersch, H. 1939. Das Elektronen-Schattenmikroskop I. *Zeitschrift für technische Physik.* 20:346-350.

Boersch, H. 1940. Fresnelsche Elektronenbeugung. *Die Naturwissenschaften.* 28:709-711.

Born, M., und E. Wolf. 1993. Principles of Optics. Pergamon Press, Oxford-New York-Seoul-Tokio.

Bragg, W. L. 1942. The X-Ray Microscope. *Nature.* 149:470-471.

Carl, A., G. Dumpich, C. Buchal, und B. Strizker. 1993. Anomalous electron diffusion in irradiated thin gold films. *Z. Phys. B.* 90:261-266.

Caruthers, M. H. 1985. Gene Synthesis Machines: DNA Chemistry and Its Uses. *Science.* 230:281-285.

Chen, J., und N. Seeman. 1991. Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube. *Nature.* 350:631-633.

Cohen, G. L., W. R. Bauer, J. K. Barton, und S. J. Lippard. 1979. Binding of cis- and trans-Dichlorociammineplatinum(II) to DNA: Evidence for Unwinding and Shortening of the Double Helix. *Science.* 203:1014-1016.

David, C., B. Kaulich, R. Medenwaldt, M. Hettwer, N. Fay, M. Diehl, J. Thieme, und G. Schmahl. 1995. Low-distortion electron-beam lithography for fabrication of high-resolution germanium and tantalum zone plates. *J. Vac. Sci. Technol. B.* 13:2762-2766.

DeVelis, J. B., J. G. B. Parrent, und B. J. Thompson. 1966. Image Reconstruction with Frauenhofer Holograms. *Journal of the Optical Society of America.* 56:423-427.

E.Ciliberto, K. A. Doris, W. J. Pietro, G. M. Reisner, D. E. Ellis, I. Fragalà, F. H. Herbstein, M. A. Ratner, und T. J. Marks. 1984. π–π Interactions and Bandswidth in "Molecuar Metals". A Chemical, Structural, Photoelectron Spectroscopic, and Hartree-Fock-Slater Study of Monomeric and Cofacially Joined Dimeric Silicon Phthalocyanines. *J. Am. Chem. Soc.* 106:7748-7761.

Eastman, A. 1982. Seperation and Characterization of Products Resulting from the Reaction of cis-Diamminedichloroplatinum(II) with Deoxyribonucleosides. *Biochemistry.* 21:6732-6736.

Ebert, G. 1993. Biopolymere. B. G. Teubner, Stuttgart.

Eisele, A. 2001. Promotion. Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg.

Ernst, N., J. Unger, H.-W. Fink, M. Grunze, H. U. Müller, B. Völkl, M. Hofmann, und C. Wöll. 1993. Comment on "Field-Emission Spectroscopy of Single-Atom Tips". *Physical Review Letters.* 70:2503.

Felger, S. L., J. J. W. Heckman, und K. L. Klomparens. 1995. Elektronenmikroskopie, Heidelberg-Berlin-Oxford.

Fichtinger-Schepman, A. M. J., J. L. v. d. Veer, J. H. J. Hartog, P. H. M. Lohman, und J. Reedijk. 1985. Adducts of the Antitumor Drug cis-Diamminedichloroplatinum(II) with DNA: Formation, Identification and Quantitation. *Biochemistry.* 24:707-713.

Fink, H.-W. 1986. Mono-atomic tips for: scanning tunneling microscopy. *IBM J. Res. Develop.* 30:460-465.

Fink, H.-W. 1988. Point Source for Ions and Electrons. *Physica Scripta.* 38:260-263.

Fink, H.-W., H. J. Kreuzer, und H. Schmid. 1996. State of the Art of Low-Energy Electron Holography. .

Fink, H.-W., H. Schmid, E. Ermantraut, und T. Schulz. 1997. Electron holography of individual DNA molecules. *J. Opt. Soc. Am. A.* 14:2168-72.

Fink, H.-W., H. Schmid, H. J. Kreuzer, und A. Wierzbicki. 1991. Atomic Resolution in Lensless Low-Energy Electron Holography. *Phys. Rev. Lett.* 65:1543.

Fink, H.-W., und C. Schönberger. 1999. Electronical conduction through DNA molecules. *Nature.* 398:407-410.

Fink, H.-W., W. Stocker, und H. Schmid. 1990. Holography with Low-Energy Electrons. *Phys. Rev. Lett.* 65:1204-1206.

Fowler, R. H., und L. W. Nordheim. 1928. Electron Emission in Intense Electric Fields. *Proc. Roy. Soc. London A.* 119:173-181.

Gabor, D. 1948. A New Microscopic Principle. *Nature.* 161:777-778.

Gabor, D. 1949. Microscopy by reconstructed wave-fronts. *Proc. Roy. Soc. A.* 197:454-487.

Gölzhäuser, A., B. Völkel, B. Jäger, M. Zharnikov, H. J. Kreuzer, und M. Grunze. 1998. Holographic imaging of macromolecules. *JVST A - Vacuum, Surfaces and Films.* 16:3025-3028.

Gomer, R. 1961. Field Emission and Field Ionization. Harvard University Press, Cambridge/Massachusetts.

Good, R. H., und E. W. Müller. 1956. Handbuch der Physik. Springer, Heidelberg.

Gupta, V. K., J. A. Kornfield, A. Ferencz, und G. Wegner. 1994. Controlling Molecular Order in Hairy-Rod Langmuir-Blodgett-Films. *Science.* 265:940-942.

Haine, M. E., und T. Mulvey. 1952. The Formation of the Diffraction Image with Electrons in the Gabor Diffraction Microscope. *Journal Opt. Soc. Am.* 42:763-773.

Horch, S., und R. Morin. 1993. Field emission from atomic size sources. *J. App. Phys.* 74:3652-3657.

Joyner, R., und M. Kenney. 1962. A Phthalocyaninosiloxane. *Inorg. Chem.* 1:717-718.

Kallenbach, N. R., R.-I. Ma, und N. C. Seeman. 1983. An immobile nucleic acid junction constructed fro oligonucleotides. *Nature.* 305:829-831.

Kim, S. K., O. Vrána, V. Kleinwächter, K. Niki, und V. Brabec. 1990. Polarographic Determination of Subnanogram Quantities of Free Platinum in Reaction Mixture with DNA. *Anallytical Letters.* 23:1505-18.

Kreuzer, H. J. 1993. Low Energy Point Source Electron Microscopy. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* 295:235-242.

Kreuzer, H. J., H.-W. Fink, H. Schmid, und S. Bonev. 1995. Holography of holes, with electrons and photons. *Journal of Microscopy.* 178:191-197.

Kreuzer, H. J., K. Nakamura, A. Wierzbicki, H.-W. Fink, und H. Schmid. 1992. Theory of the pointsource electron microscope. *Ultramicroscopy.* 45:381-403.

Kreuzer, H. J., und R. A. Pawlitzek. 1998. LEEPS, a software package for Low Energy Eledtron Point Source Microscopy User' s Manual, Dalhousie University Halifax.

Kreuzer, H. J., A. Wierzbicki, M. G. A. Crawford, und C. B. Roald. 1993. Lensless Low Energy Electron Point Source Microscopy. *In* Nanosources and Manipulation of Atoms Under High Fields and Temperatures: Applications 35-44. V. T. Binh, editor. Kluwer Academic Publishers. 35-44.

Leith, E., und J. Upatnieks. Waverfront Reconstruction with Diffused Illuminaation and Three-Dimensional Objects. 1964. *J. Opt. Soc. Am.* 54:1295.

Lenzoff, C. C. 1989-1993. Phthalocyanines. Verlag Chemie, Weinheim.

Lever, A. B. P. 1965. *Adv. Inorg. Chem. Radiochem.* 7:27.

Lichte, H. 1986. Electron Holography Approaching Atomic Resolution. *Ultramicroscopy.* 20:293-304.

Lippard, S. J. 1987. Chemistry and molecular biology of Platinum anticancer drugs. *Pure & Appl. Chem.* 59:731.742.

Lippard, S. L. 1982. New Chemistry of an Old Molecule: cis-[$Pt(NH_3)_2Cl_2$]. *Science.* 218:1075-1082.

Mao, C., W. Sun, und N. C. Seeman. 1999. Designed Two-Dimensional DNA Holliday Junction Arrays Visualized by Atomic Force Midroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 121:5437-43.

Marks, T. J., K. F. Schoch, und B. R. Kundalkar. 1979. New conductive polymeric materials: cofacial assembly of mixed valent metallomacromolecules. *Synthetic Metals.* 1:337-347.

Matsumoto, T., T. Tanji, und A. Tonomura. 1995. Frauenhofer in-line electron Holography of small weak-phase objects. *In* Electron Holography. A. Tonomura, L. F. Allard, G. Pozzi, D. C. Joy, und Y. A. Ono, editors. 249-256.

Matsuyama, A., und T. Kato. 1995. Theory of Surface Ordering on Solutions of Rigid-Rod-Like Molecules. *Macromolecules.* 28:131-135.

Medenwaldt, R., und M. Hettwer. 1995. Production of Ultra Thin Silicon Foils. *Journal of X-Ray Science and Technology.* 5:202-206.

Melmed, A. 1968. Field Emission Shadow Microscopy. *Appl. Phys. Letters.* 12:100-102.

Minari, N., K. Ikegami, S. Kuroda, K. Saito, M. Saito, und M. Sugi. 1989. Origin of the In-Plane Anisotropy in Langmuir-Blodgett Films. *J. Phys. Soc. Jpn.* 58:222-231.

Morin, R. 1994. Point source physics: Application to electron projection microscopy and holography. *Microsc. Microanal. Microstruct.* 5:501 - 508.

Morin, R., und A. Gargani. 1993. Ultra-low-energy-electron projection holograms. *Phy. Rev. B.* 48:6643-6645.

Morton, G. A., und E. G. Ramberg. 1939. Point Projection Electron Microscope. *Phys. Rev.* 56:705.

Müller, E. W., und T. T. Tsong. 1969. Field Ion Microscopy, Principles and Applications. Elsevier, New York.

Müller, H. U. 1992. Abbildungseigenschaften einfacher elektronenoptischer Anordnungen mit ultrascharfen Feldemitterspitzen. Institut für Angewandte Physikalische Chemie, Heidelberg.

Onoa, G. B., G. Cervantes, V. Moreno, und M. J. Prieto. 1998. Srudy of the interaction of DNA with cisplatin and other Pd(II) and Pt(II) complexes by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Research.* 26:1473-1480.

Orthmann, E., V. Enkelmann, und G. Wegner. 1983. Synthesis and Electrochemical Doping of Phthalocyaninatopolysiloxan. *Makromol. Chem. Rapid Commun.* 4:687-692.

Prestayko, A. W., J. C. D. Aoust, B. F. Issel, und S. T. Crooke. 1979. Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II). *Cancer Treat. Rev.* 6:17.

Quintana, J., K. Grezeskowiak, K. Yanagi, und R. E. Dickerson. 1992. The Structure of a B-DNA Decamer with a Central T-A Step: C-G-A-T-T-A-A-T-C-G. *J. Mol. Biol.* 225.

Reedijk, J. 1987. The mechanism of action of platinum anti-tumor drugs. *Pure & Appl. Chem.* 59:181-192.

Rehbein, S. 1997. Herstellung freitragender Strukturen mit Abmessungen im Nanometerbereich. Forschungseinrichtung Röntgenphysik der Georg-Augustus-Universität zu Göttingen, Göttingen.

Rheiner, F. 1997. Elektrische Leitfähigkeitsmessungen und elektronenspektroskopische Untersuchungen an Phthalocyaninatopolysiloxan. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Heidelberg.

Rosenberg, B., L. V. Camp, J. E. Trosko, und V. H. Mansour. 1969. Platinum compounds: A new class of potent antitumor agents. *Nature.* 222:385-386.

Rozencweig, M., D. D. V. Hoff, R. Abele, und F. M. Muggia. 1979. . *In* Cancer Chemotherapy. H. M. Pinedo und P. A. Chabner, editors. Elsevier, Amsterdam. 107.

Saenger, W. 1983. Principles of Nucleic Acid Structure. Springer Verlag, New York.

Scheinfein, M. R., W. Qian, und J. C. H. Spence. 1993. Aberrations of emission cathodes: Nanometer diameter field-emission electron sources. *J. Appl. Phys.* 73:2057-2068.

Schmid, H., H.-W. Fink, und J. Kreuzer. 1995. In-line holography using low-energy electrons and photons: Applications for manipulation on a nanometer scale. *JVAST B - Microelectronics and Nanometer Sstructures.* 13:2428-2431.

Schoch, K. F., B. R. Kundalkar, und T. J. Marks. 1979. Conductive Polymers Consisting of Partially Oxidized Face-to-Face Linked Metallomacrocycles. *J. Am. Chem. Soc.* 101:7071-7073.

Scholz, R., und J. Heydenreich. 1984. A Crystalline Test Speciem for Checking the Performance of High-Resolution Electron Microscopes. *Ultramicroscopy.* 13:407-414.

Schwiegk, S., T. Vahlenkamp, Y. Xu, und G. Wegner. 1992. Origin of Orientation Phenomena Observed in Layered Langmuir-Blodgett Structures of Hairy-Rod Polymers. *Macromolecules.* 25:2513-2525.

Seeman, N. C. 1982. Nucleic Acid Junction and Lattices. *J. Theor. Biol.* 99:237-247.

Seeman, N. C. 1997. DNA Components for Molecular Architecture. *Acc. Chem. Res.* 30:357-363.

Seeman, N. C. 1998. DNA-Nanotechnology: Novel DNA Construction. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27:225-248.

Seeman, N. C., und N. R. Kallenbach. 1994. DNA Branched Junctions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23:53-86.

Shedd, G. M. 1994. Electron interference effects in electron projection microscopy. *J. Vac. Sci. Technol. A.* 12:2595-2599.

Silverman, M. P. 1995. Microscopy and interferometry with an atomic-size electron source. *Current Science.* 68:1003-1009.

Spahlinger, R. 1996. Untersuchungen der elektrischen Leitfähigkeit an Langmuir-Blodgett-Schichten aus Phthalocyaninatopolysiloxan. Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg.

Spence, J. C. H., W. Qian, und A. J. Melmed. 1993. Experimental low-voltage point-projection microscopy and its possibilities. *Ultramicroscopy.* 52:473-477.

Spence, J. C. H., W. Qian, und M. P. Silverman. 1994. Electron source brightness and degeneracy from Fresnel fringes in field emission point projection microscopy. *JVST A - Vacuum, Surfaces and Films.* 12:542-547.

Spence, J. C. H., X. Zhang, und W. Qian. 1995. On the reconstruction of low voltage point projection holograms. *In* Electron Holography. A. Tonomura, L. F. Allard, G. Pozzi, D.C. Joy, Y. A. Ono. 267-276.

Stocker, W., und H.-W. Fink. 1989. Low-Energy Electron and Ion Projection Microscopy. *Ultramicroscopy.* 31:379-384.

Takahara, P. M., A. C. Rosenzweig, C. A. Frederick, und S. Lippard. 1995. Crystal structure of doublestranded DNA containing the major adduct of the anticancerdrug cisplatin. *Nature.* 377:649-652.

Tans, S. J., L. J. Geerlings, C. Dekker, J. Wu, und G. Wegner. 1997. Deposition and atomic force microscopy of individual phthalocyanine polymers between nanofabricatet electrodes. *J. Vac. Sci. Technol. B.* 15:586-589.

Tonomura, A. 1994. Electron Holography. Springer, Berlin-Heidelberg-New York-London-Paris-Tokyo-Hongkong- Barcelona-Budapest.

Ullman, A. 1996. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem. Rev.* 96:1533-1554.

Voet, D., und J. G. Voeth. 1992. Biochemie. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.

Völkel, B. 1992. Präparation und Charakterisierung einatomarer Feldemitter. Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg.

Völkel, B. 1997. Mikroskopie mit niederenergetischen kohärenten Elektronen- und Ionenpunktquellen. Volkswagenstiftung.

Völkel, B. e. a. 2001. in Vorbereitung. *Micron*.

Watson, J. D., und F. H. C. Crick. 1953. Molecular structure of nucleic acids. *Nature.* 171:737-738.

Wegner, G. 1991. Ultrathin Films of Polymers. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 95:1326-1333.

Wing, R., H. Drew, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, und R. E. Dickerson. 1980. Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA. *Nature.* 287:755-758.

Winter, R., und F. Noll. 1998. Methoden der Biophysikalischen Chemie. Teubner, Stuutgart.

Zhang, X., P. Kruit, W. Qian, und J. C. H. Spence. 1995. Reconstruction of Low-Voltage Point-Projection Holograms of Mask-Like Objects. *Proc. Microscopy and Microanalysis*:608-609.

Zhang, Y., und N. C. Seeman. 1994. Construction of a DNA-Truncated Octahedron. *J. Am. Chem. Soc.* 116:1661-1669.