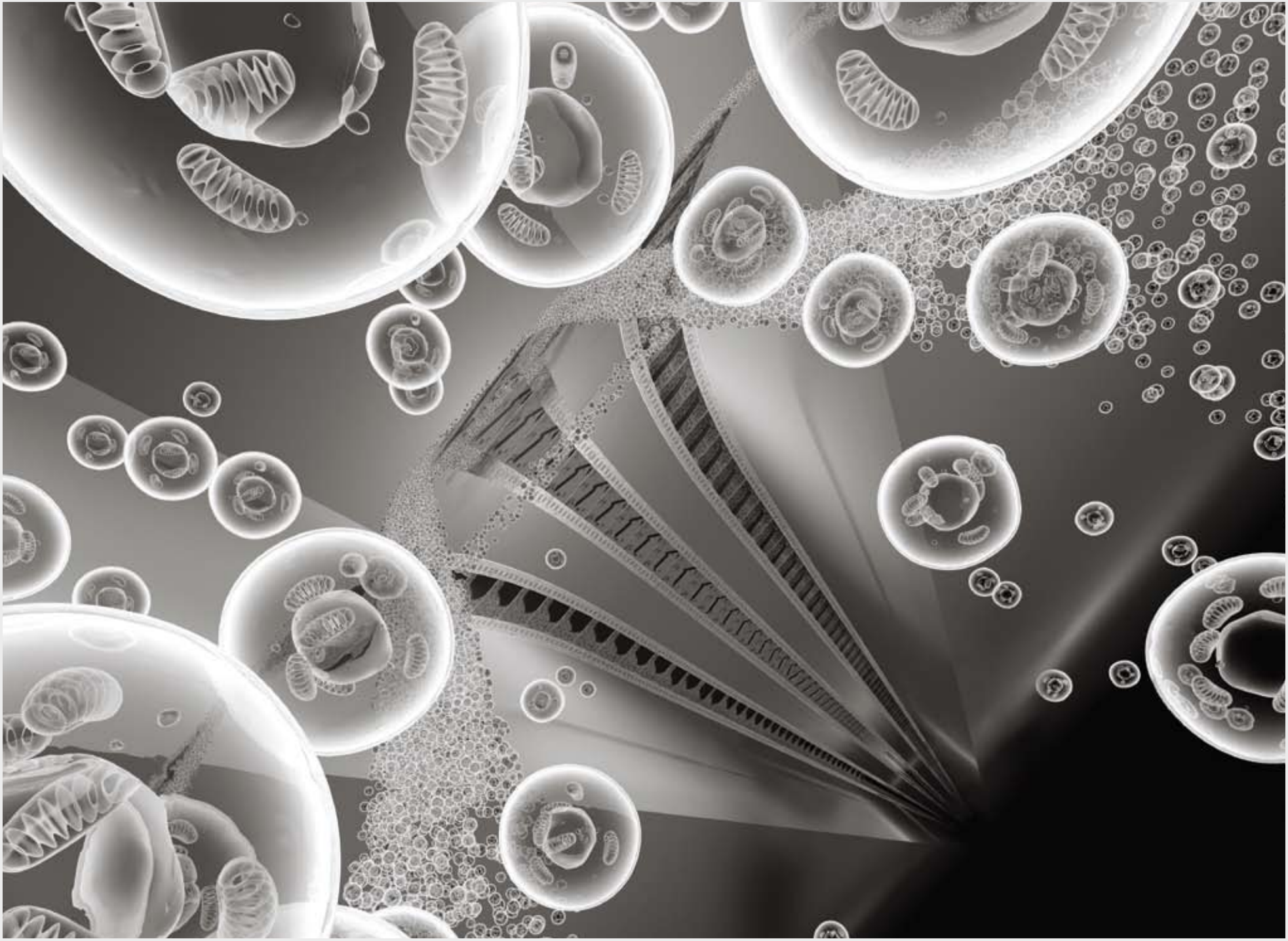


BRYAN CHRISTIE DESIGN

ELEKTRONENMIKROSKOPIE

Bewegte Bilder aus der Nanowelt

Eine neue Abbildungstechnik erweitert das Elektronenmikroskop um die vierte Dimension: Ultrakurze Elektronenpulse liefern Serien von Schnappschüssen eines Untersuchungsobjekts – und gewähren bisher ungeahnte Einblicke in extrem schnelle Abläufe im Nanoreich. Erstmals lassen sich so auch Vorgänge im Inneren einer Zelle filmen.

Von Ahmed H. Zewail

Die Welt ist mehr, als wir mit bloßem Auge sehen. Objekte, die viel dünner sind als ein Haar (ein Bruchteil eines Millimeters), können wir nicht erkennen. Und Bilder, die schneller als ein Wimpernschlag (etwa eine Zehntelsekunde) aufeinander folgen, vermögen wir nicht voneinander zu unterscheiden. Große Fortschritte in Optik und Mikroskopie im vergangenen Jahrhundert haben unsere Wahrnehmungsgrenzen zwar erheblich ausgedehnt und zuvor Verborgenes sichtbar gemacht. Man denke etwa an die mikroskopische Abbildung eines Virus oder die stroboskopisch erzeugte Fotografie einer Gewehrkugel in jener Millisekunde, in der sie eine Glühbirne durchschlägt. Trotzdem konnte man noch bis vor Kurzem bei Videos, auf denen bewegte Atome zu sehen sind, sicher sein, dass es sich entweder um einen Trickfilm oder eine Computersimulation handelt.

Das hat sich grundlegend geändert. Neue Techniken ermöglichen uns nun Einblicke in die Nanowelt, die noch vor Kurzem niemand für möglich gehalten hätte. So hat mein Team am California Institute of Technology im vergangenen Jahrzehnt eine Art von Bildgebung entwickelt, die Bewegungen im atomaren Maßstab und in Zeitintervallen von Femtosekunden (billiardstel Sekunden) sichtbar macht. Da die Methode Vorgänge in der vierdimensionalen Raumzeit wiedergibt und mit dem altehrwürdigen Elektronenmikroskop arbeitet, gaben wir ihr den Namen 4-D-Elektronenmikroskopie. Mit ihr gelang es uns, nie zuvor gesehene Phänomene zu visualisieren: etwa die Schwingungen von Graphenschichten in Graphit, die nach Anregung mit einem Laserblitz wie ein Trommelfell vibrieren. Auch die Bewegung einzelner Proteine und Zellen konnten wir hoch aufgelöst filmen.

Die vierdimensionale Elektronenmikroskopie verspricht Antworten auf Fragen aus unterschiedlichsten Forschungsgebieten – von der Werkstoffkunde bis zur Biologie. Sie ermöglicht erstmals, das Verhalten von Materialien vom makroskopischen bis hin zum atomaren Maßstab zu beobachten. So lässt sich die Funktionsweise von Nano- und Mikromaschinen damit untersuchen. Wir können sogar sichtbar machen, wie sich Proteine oder Komplexe aus biologischen Molekülen falten und zu größeren Strukturen zusammenlagern – ein entscheidender Vorgang in allen lebenden Zellen. Außerdem offenbart das Verfahren die atomaren Strukturen von Nanomaterialien, von denen wichtige Eigenschaften dieser neuartigen Werkstoffe abhängen. Künftig könnte es auch gelingen, die Bewegungen von Elektronen in Atomen und Molekülen zu verfolgen, die innerhalb von Attosekunden (trillionstel Sekunden) ablaufen. Schließlich ergeben sich in Verbindung

AUF EINEN BLICK

VIDEOCLIPS VOM ALLERKLEINSTEN

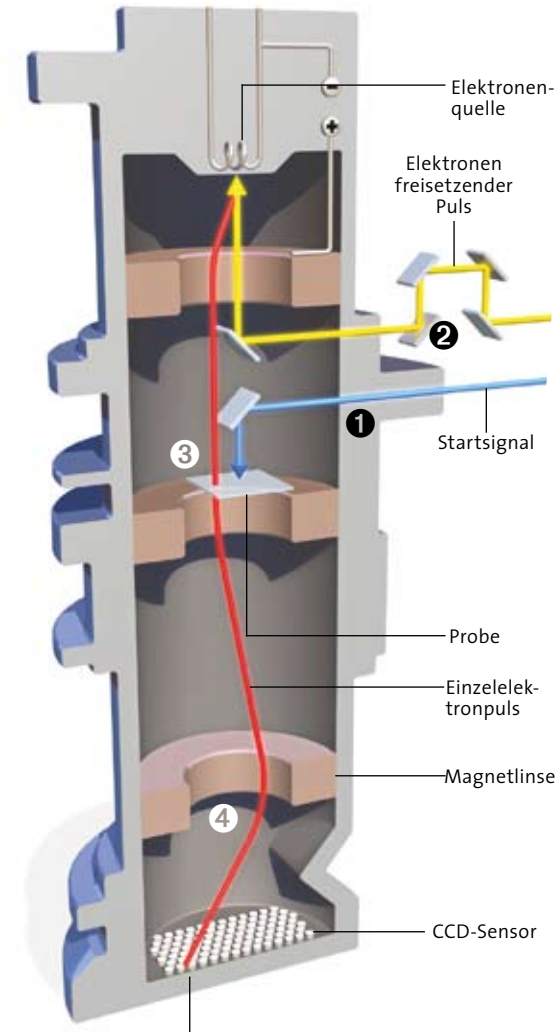
1 Das 4-D-Elektronenmikroskop erzeugt dreidimensionale Filme von Vorgängen, die im Größenmaßstab von millionstel Millimetern und auf Zeitskalen von billiardstel Sekunden ablaufen. Damit kann es Prozesse auf subzellulärer bis atomarer Ebene sichtbar machen.

2 Jedes Einzelbild eines solchen Films errechnet sich aus Tausenden von Aufnahmen, die zu präzise definierten Zeitpunkten aufgezeichnet werden.

3 Die 4-D-Elektronenmikroskopie verspricht spannende Anwendungen von der Materialforschung über die Nanotechnologie bis zur Medizin.

Das 4-D-Elektronenmikroskop

Ein herkömmliches Elektronenmikroskop nimmt unbewegte Bilder von nanoskopisch kleinen Proben auf, indem es einen Elektronenstrahl hindurchschickt und auf einen Detektor fokussiert. Ein 4-D-Elektronenmikroskop hingegen erzeugt mit Pulsen aus einzelnen Elektronen Filme, zwischen deren Einzelaufnahmen nur wenige Femtosekunden (billiardstel Sekunden) liegen.

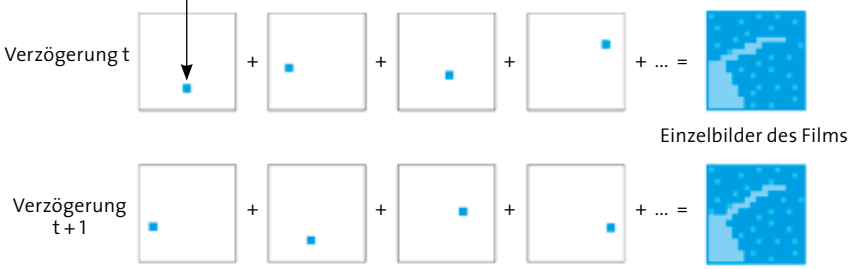


❶ Ein Startsignal – etwa ein nur wenige Femtosekunden langer Laserblitz – setzt in der Probe den beobachteten Prozess zu einem präzise definierten Anfangszeitpunkt t_0 in Gang.

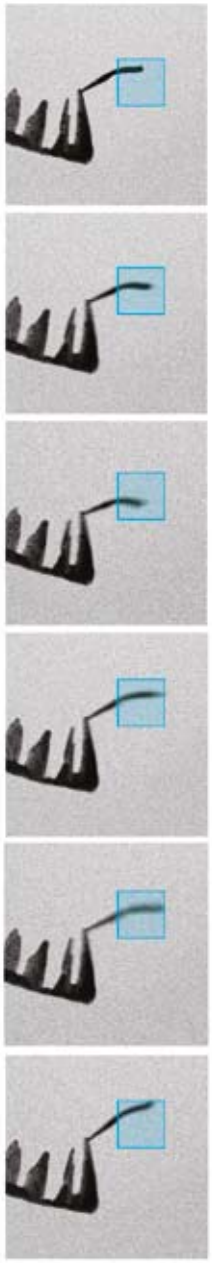
❷ Gleichzeitig mit dem Startsignal wird ein Elektronen freisetzender Laserblitz ausgelöst, aber dann um einen definierten Zeitraum t verzögert.

❸ Ein Puls, der aus nur einem einzigen Elektron besteht, durchquert die Probe zu einem genau festgelegten Zeitpunkt t.

❹ Magnetische Linsen fokussieren das Elektron auf einen CCD-Sensor, der seinen Auftreffpunkt als Pixel aufzeichnet, das in das Einzelbild Nummer t des Nanofilms integriert wird.



Jede Einzelaufnahme des Films entsteht durch vieltausendfache Wiederholung dieses Ablaufs mit der gleichen Verzögerung t und anschließende Überlagerung aller aufgezeichneten Pixel zu einem Gesamtbild. Das Mikroskop lässt sich je nach Anwendungszweck auch in anderen Betriebsarten einsetzen, etwa mit Pulsen, die aus mehreren Elektronen bestehen. Im Einzelelektronenmodus erreicht es jedoch die höchste Auflösung: Der Abstand zwischen den Bildpunkten ist hier am kleinsten und das Zeitintervall zwischen den Einzelaufnahmen am kürzesten.



Ein 50 Nanometer langer Kragbalken aus einer Nickel-Titan-Legierung oszilliert nach der Anregung durch einen Laserblitz. Die blauen Kästchen markieren den Bereich, den dieser dabei überstreicht. Der Film (online unter www.spektrum.de/artikel/1055768) besteht aus Einzelbildern, die in Abständen von zehn Nanosekunden aufgenommen wurden. Die Schwingungsdaten geben Aufschluss über Materialeigenschaften, deren Kenntnis wichtig für die Konstruktion nanomechanischer Geräte ist.

ILLUSTRATION: GEORGE RETSECK; FILMAUFNAHMEN: CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY (CALTECH)

mit Fortschritten in der Grundlagenforschung vielfältige potenzielle Anwendungen bei der Konstruktion von Nanomaschinen und dem Maßschneidern neuer Medikamente.

Die 4-D-Elektronenmikroskopie stützt sich auf modernste Lasertechnik und unanschauliche Aussagen der Quantenphysik. Dennoch lassen sich viele ihrer Prinzipien verstehen, wenn man die Entwicklung der Hochgeschwindigkeitsfotografie vor mehr als 100 Jahren betrachtet. Zu deren Vätern gehörte der französische Physiologe Étienne-Jules Marey (1830–1904). Als Professor am Collège de France machte er um das Jahr 1890 schnelle Bewegungsabläufe sichtbar, indem er eine vielfach geschlitzte rotierende Scheibe zwischen das bewegte Objekt und eine Fotoplatte oder einen Filmstreifen platzierte. Auf diese Weise produzierte er Serienaufnahmen, die vom Prinzip her modernen Filmen ähnelten.

Unter anderem untersuchte Marey, wie eine Katze es schafft, beim freien Fall immer auf den Pfoten zu landen, indem sie sich in der Luft mit akrobatischen Verrenkungen in eine aufrechte Position dreht. Wie kann sie das, ohne das Gesetz über die Erhaltung des Drehimpulses zu verletzen? Mit bloßem Auge lässt sich der Vorgang nicht detailliert genug verfolgen. Doch Mareys Hochgeschwindigkeitsaufnahmen lieferten die Antwort: Das Tier verdreht die beiden Körperhälften gegeneinander, während es die Vorder- und Hinterbeine im Gegentakt anzieht und ausstreckt. Turmspringer, Tänzer und Astronauten machen es bei ihren Drehungen im freien Raum ähnlich.

Die 4-D-Elektronenmikroskopie lässt sich durch Vergleich mit den Anfängen der **Hochgeschwindigkeitsfotografie** verstehen

Zeitdehnung nach dem Stroboskopprinzip

Auf dem gleichen Prinzip wie Mareys Verfahren beruht die Stroboskopfotografie. Dabei beleuchten Lichtblitze ein im Dunkeln bewegtes Objekt jeweils für einen kurzen Moment, der sich dann auf einem Detektor abbildet – sei es die menschliche Netzhaut, eine Fotoplatte oder ein Kamerasensor. Diese Blitze können sehr kurz sein und die Aufnahmen folglich viel schneller aufeinander folgen, als das mit Schlitzen oder mechanischen Verschlüssen möglich ist. Dadurch erfasst die Stroboskopfotografie noch wesentlich raschere Bewegungen. Mitte des 20. Jahrhunderts brachte Harold Edgerton vom Massachusetts Institute of Technology in Cambridge das Verfahren einen Riesenschritt voran, indem er eine elektronische Schaltung entwickelte, die zuverlässig und regelmäßig Lichtblitze mit einer Dauer von wenigen Mikrosekunden erzeugt.

Das Experiment mit der fallenden Katze erfordert Verschlusszeiten oder stroboskopische Blitze, die kurz genug sind, um scharfe Aufnahmen zu liefern, obwohl das Tier rasch fällt. Nehmen wir an, die Katze bräuchte eine halbe Sekunde zum Aufrichten in der Luft. In dieser Zeit erreicht sie eine Fallgeschwindigkeit von fünf Meter pro Sekunde. Bei Lichtblitzen mit einer Millisekunde Dauer ist also gewährleistet, dass das Tier während einer Aufnahme nie um mehr als fünf Millimeter fällt. Das ergibt eine kaum mehr wahrnehmbare Bewegungsunschärfe. Um das Katzenkunststück in zehn Schnappschüssen festzuhalten, müssten wir alle 50 Millisekunden eine Aufnahme machen.

Wenn wir aber nun statt einer fallenden Katze ein Molekül während einer chemischen Reaktion beobachten wollten, wie kurz müssten dann die Stroboskopblitze sein? Bei den meisten Umwandlungen von Molekül- oder Materialstrukturen bewegen sich Atome mit Geschwindigkeiten von einem Kilometer pro Sekunde, legen dabei allerdings nur eine Strecke von wenigen hundert Pikometern (billionstel Metern) zurück. Für Bilder mit einer räumlichen Auflösung von zehn Pikometern dürfen die Stroboskopblitze also nicht länger als zehn Femtosekunden dauern. Schon seit den 1980er Jahren nutzen Wissenschaftler derart kurze Laserpulse, um den Zeitverlauf chemischer Vorgänge zu ergründen. Allerdings konnten sie die räumliche Position der sich verschiebenden Atome dabei nicht bildlich darstellen; denn die Wellenlänge des Lichts ist einige hundertmal so lang wie die Atomabstände in Molekülen oder Werkstoffen (Spektrum der Wissenschaft 2/1991, S. 100).

Andererseits lassen sich schon seit Jahrzehnten mit beschleunigten Elektronen – etwa in Elektronenmikroskopen – Bilder mit Auflösungen im atomaren Bereich erzeugen. Dabei sind die Objekte jedoch unbeweglich montiert, und die Aufnahmedauer liegt im Bereich von Millisekunden oder länger, je nach Empfindlichkeit des Kamerasensors oder Filmmaterials. Unsere Idee war nun, beide Verfahren zu kombinieren, um bewegte Bilder mit atomarer Auflösung zu erhalten. Dazu muss man im Elektronenmikroskop »Belichtungszeiten« im Femtosekundenbereich realisieren. Das erfordert, immer nur extrem kurze Elektronenpakete – so genannte Sondenpulse – durch das Instrument zu schicken.

Ein weiteres Problem liegt in der Festlegung des Startzeitpunkts. Schnappschüsse vor Beginn der atomaren Bewegung oder nach ihrem Ende liefern keine verwertbare Information. Beim Fotografieren der fallenden Katze startet die Aufnahmesequenz mit dem Loslassen des Tiers. Für unsere ultraschnelle Elektronenmikroskopie brauchen wir entsprechend einen Femtosekundenblitz, der als Startpuls den zu untersuchenden Ablauf in Gang setzt.

Doch dann bleibt immer noch das Problem der Synchronisation. Und hier unterscheidet sich das ultraschnelle Experiment grundlegend von der Tierfotografie. Wenn alles glattlief, musste Marey nur eine einzige Katze genau einmal fallen lassen, und er hatte die Aufnahme im Kasten. Es spielte auch keine Rolle, ob die Fotoserie 5, 10 oder 17 Millisekunden nach dem Loslassen des Tiers begann. Bei der ultraschnellen Mikroskopie haben wir es hingegen mit Millionen von Atomen oder Molekülen zu tun und müssen das gleiche Experiment 1000-fach wiederholen, um das Bild peu à peu aufzubauen.

Man stelle sich vor, Marey hätte bei jedem einzelnen Katzensturz immer nur einen schmalen vertikalen Streifen aufnehmen können. Für eine vollständige Bilderserie des fallenden Tiers wäre es dann nötig gewesen, das Experiment viele Male zu wiederholen und dabei den Ausschnitt jeweils geringfügig zu verschieben. Um die zahlreichen Bildsequenzen anschließend sinnvoll zusammensetzen zu können, hätte Marey die Katze immer in die gleiche Startposition bringen und den Zeitpunkt, zu dem er das Tier jeweils losließ, mit der ersten Verschlussöffnung synchronisieren müssen – und das mit einer räumlichen und zeitlichen Genauigkeit, die Bruchteile der Katzenlänge beziehungsweise der Verschlusszeit betrug. (Eine weitere Bedingung wäre gewesen, dass sich die Katze in der Luft jedes Mal völlig gleich bewegt; in dieser Hinsicht verhalten sich Moleküle zum Glück vorhersagbarer als Tiere.)

In analoger Weise ist auch bei der ultraschnellen Bildgebung von Atomen und Molekülen die Startkonfiguration auf weniger als 100 Pikometer und der zeitliche Abstand zwischen Startsignal und Sondenpulsen auf einige Femtosekunden genau zu reproduzieren. Letzeres gelingt, indem man die Elektronenpakete exakt justierbare Distanzen zurücklegen lässt, bevor sie das aufzunehmende Objekt treffen. Für einen Puls, der sich mit Lichtgeschwindigkeit fortbewegt, bedeutet eine Präzision von einem Mikrometer bei der zurückgelegten Wegstrecke eine zeitliche Genauigkeit von 3,3 Femtosekunden.

Schließlich ist ein weiteres grundlegendes Problem zu lösen. Anders als Photonen sind Elektronen geladene Teilchen. Auf Grund ihrer wechselseitigen Abstoßung weitet sich ein Puls auf, wenn man zu viele von ihnen hineinpackt. Darunter leidet die räumliche und zeitliche Auflösung der Abbildung. In den 1980er Jahren gelang Oleg Bostanjoglo von der Technischen Universität Berlin zwar die Bildgebung mit Pulsen aus nur wenigen hundert Millionen Elektronen. Trotzdem kam er über Auflösungen im Bereich von Nanosekunden und Mikrometern nicht hinaus. Später schafften es Forscher am kalifornischen Lawrence Livermore National Laboratory immerhin, in den Submikrometerbereich vorzustoßen.

Meine Mitarbeiter und ich gingen das Problem an, indem wir Methoden zur Bildgebung mit einzelnen Elektronen *(Single Electron Imaging)* entwickelten. Dabei stützten wir uns auf frühere Untersuchungen zur ultraschnellen Aufzeichnung der Elektronenbeugung. Da jeder Sondenpuls nur aus einem einzelnen Elektron besteht, erzeugt er auch nur einen einzigen Fleck auf dem fertigen Film. Doch dank des sorgfältigen Timings und einer Eigenschaft der Pulse, die Physiker als Kohärenz bezeichnen, summieren sich die vielen Punkte zu einem Gesamtbild des Objekts. Dieses Verhalten erinnert an eine der Merkwürdigkeiten der Quantenmechanik: Auch wenn Photonen oder Elektronen eine Interferenzapparatur mit zwei Schlitzen einzeln passieren und jeweils einen einzigen Punkt an einer zufälligen Stelle des Detektors erzeugen, ergibt doch die Summe dieser Punkte ein vorhersagbares Hell-dunkel-Muster, das für sich überlagernde Wellen typisch ist.

Das Arbeiten mit einzelnen Elektronen erwies sich als Schlüssel zur 4-D-Darstellung atomarer Vorgänge, die inzwischen auch als ultraschnelle Elektronenmikroskopie (UEM) bekannt ist. Eines unserer ersten Beobachtungsobjekte war Graphit, der Hauptbestandteil von Bleistiftminen. Wir wählten es aus, weil es sich um ein besonderes Material handelt, das teils unter extremen Bedingungen – etwa im Kern von Atomreaktoren – zum Einsatz kommt. Außerdem hat es einige nicht weniger bemerkenswerte Verwandte wie den Diamanten, in den es sich unter extrem hohem Druck umwandelt.

Liveaufnahme der Schwingungen im Graphit

Graphit besteht aus Schichten von Kohlenstoffatomen, die in einem maschendrahtartigen Sechseckmuster angeordnet sind. Diese Schichten bilden Stapel, welche von relativ schwachen Bindungen zusammengehalten werden. Wenn man mit einem gewöhnlichen Bleistift schreibt, lösen sich Graphitschuppen ab und bleiben am Papier kleben. In Spuren enthalten Bleistiftstriche aber auch die Einzelschichten. In isolierter Form heißen sie Graphen und sind das Material mit der höchsten bekannten Festigkeit überhaupt. Wegen möglicher Anwendungen in der Elektronik werden sie derzeit intensiv erforscht.

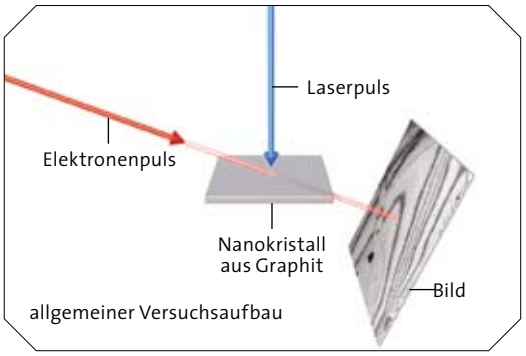
Wir interessierten uns für die Reaktion von Graphit auf mechanische Krafteinwirkungen. Dazu beschossen wir Kristalle von wenigen Nanometern Dicke, die nur aus einigen Atomschichten bestanden, mit intensiven Laserblitzen, die maximal einige Femtosekunden dauerten und als Startimpuls für unser Mikroskop dienten. Jeder einzelne Blitz drückte die Graphitschichten für einen kurzen Moment eng zusammen, so dass sie anschließend auf- und abschwangen (siehe Kasten rechts). Unser Mikroskop schickte dann seine Elektronen durch das schwingende Schichtpaket und erzeugte zwei Arten von Aufnahmen: echte räumliche Abbildungen (ähnlich einer Fotografie der Graphitoberfläche) oder ein Beugungsmuster – also eine regelmäßige Anordnung von Flecken, die Informationen über Anordnung und Abstände der Atome im Graphitgitter liefert. Besonders gut konnten wir die Oszillationen der Schichten anhand der Bewegungen der Flecken im Beugungsmuster verfolgen. Die Schwingungsfrequenz lag bei 10 bis 100 Gigahertz (Milliarden Zyklen pro Sekunde). In keinem zuvor durchgeführten Experiment konnten jemals solch hochfrequente Resonanzschwingungen im Zeitverlauf beobachtet werden.

> Das Arbeiten mit Sondenpulsen aus nur einem Elektron war der **Schlüssel zur 4-D-Darstellung** atomarer Vorgänge

Aus unseren Experimenten ließ sich die Elastizität von Graphit senkrecht zu seinen Atomschichten ableiten. Stellen

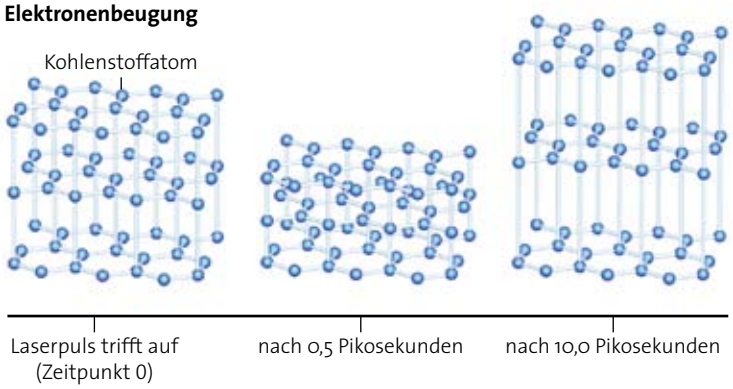
Nanoskopie in drei Varianten

An Graphit-Nanokristallen, die teils nur wenige Atomschichten dick waren, konnte das Team von Ahmed H. Zewail die drei Bildgebungsverfahren demonstrieren, die mit der vierdimensionalen Mikroskopie möglich sind. Die erhaltenen Daten zeigten unterschiedliche Aspekte im Verhalten der Proben beim Auftreffen eines Laserpulses senkrecht zu den – in isolierter Form als Graphen bezeichneten – Schichten, in denen die Kohlenstoffatome zu einem sechseckigen »Maschendraht« verknüpft sind.



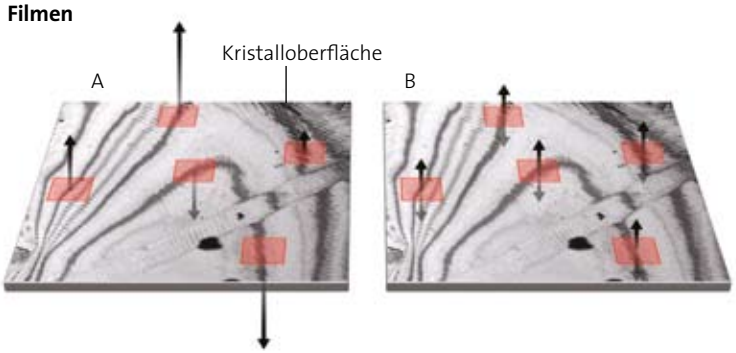
❶ Beugungsmuster ließen erkennen, wie die Graphitschichten nach dem Laserbeschuss oszillieren: Sie werden vom auftreffenden Strahlungspuls zusammengedrückt, schnellen innerhalb weniger Pikosekunden zurück und schwingen dann für einige hundert Pikosekunden nach.

Elektronenbeugung



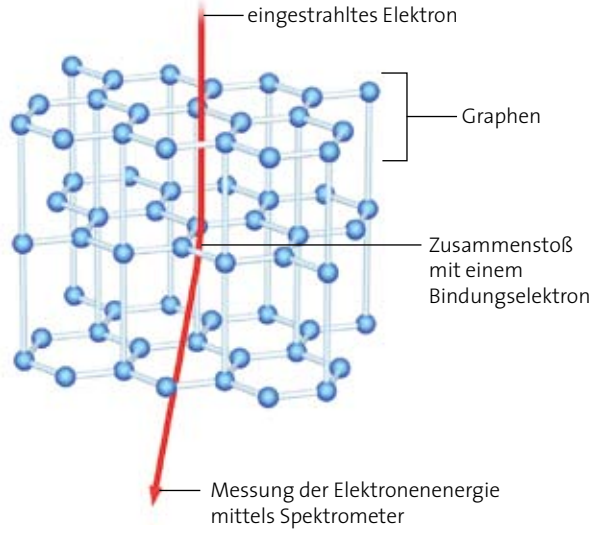
❷ Bilder der Nanokristalle zeigten, wie sich die Oszillationen wellenartig über die Oberfläche ausbreiten. Innerhalb einiger hundertstel Sekunden entwickelt sich dabei aus einer chaotischen Bewegung (A, mit Pfeilen veranschaulicht) eine koordinierte Resonanzschwingung des gesamten Kristalls, die dem Vibrieren eines Trommelfells ähnelt (B).

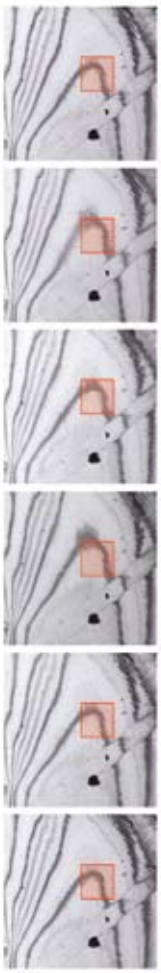
Filmen



❸ Wenn eingestrahlte Mikroskopelektronen mit Bindungselektronen des Graphits zusammenstoßen, verlieren sie einen Teil ihrer Energie. Messungen dieses Energieverlustes zeigten, dass die Bindungen im Graphit während der Oszillation abwechselnd denen im Diamanten (Kompressionsphase) und im Graphen (Dehnungsphase) ähneln.

Elektronen-Energieverlust-Spektroskopie





Graphit-Nanokristalle schwingen nach dem Auftreffen eines Laserpulses wie ein Trommelfell. Das zeigen Filmaufnahmen, deren Einzelbilder einen Bereich von 24 Mikrometer Breite in Abständen von 50 Nanosekunden wiedergeben. Hier ist nur jedes fünfte Bild dargestellt. Leichte Aufwölbungen der Graphitoberfläche erscheinen als dunkle Streifen, die sich bewegen, wenn die Oberfläche vibriert. Die roten Kästchen dienen der Orientierung für das Auge. Der ganze Film ist online unter www.spektrum.de/artikel/1055768 zu finden.

ILLUSTRATION: GEORGE RETSECK; FILMAUFNAHMEN: CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY (CALTECH)

Sie sich den Kristall als Stapel von Metallplatten vor, die über Sprungfedern verbunden sind, und den Laserpuls als Vorschlaghammer, der darauf niedersaust. In diesem Bild maßen wir somit, wie steif die Federn sind.

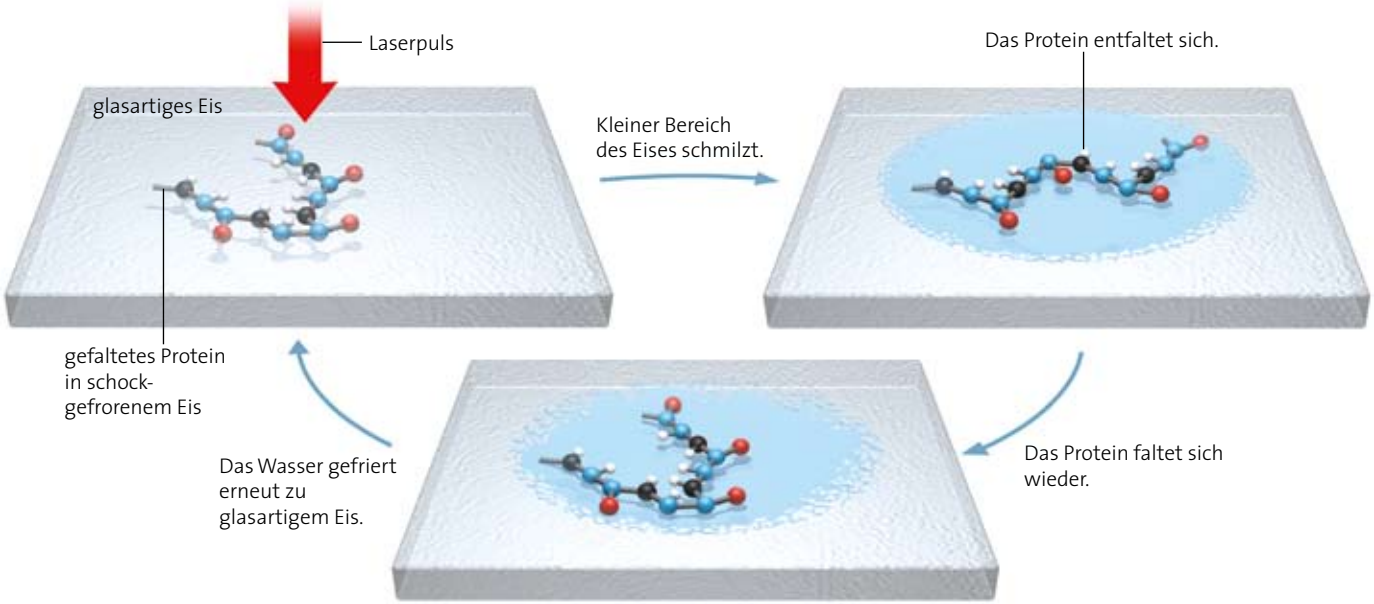
Die Metallplatten-Analogie trifft die Sache recht gut, wenn unsere »Kamera« sehr nah heranrückt. Mit zunehmender Entfernung umfasst der Bildausschnitt jedoch immer größere Teile des Kristalls. Dann sieht man, dass sich die Schichten durchbiegen und Stauchungs- und Dehnungswellen vom Aufschlagpunkt nach außen laufen.

Bei noch größerem Abstand der Kamera und reduzierter Bildfrequenz wird eine weitere Bewegungsform erkennbar: Jetzt ist zu sehen, wie der Laserpuls den gesamten nanoskopisch kleinen Kristall zum Vibrieren bringt, so dass dieser wie ein angeschlagenes Trommelfell schwingt. Unseren Untersuchungen zufolge ist die Bewegung in den ersten Mikrosekunden nach dem Auftreffen des Laserpulses noch chaotisch. Doch dann entwickelt sich eine Resonanzschwingung, die den Kristall vollständig erfasst. Deren Frequenz hängt von der Elastizität der Graphitschichten ab – also von ihrem Widerstand gegen Stauchung und Dehnung. Wie sich zeigte, kostet es sehr viel mehr Energie, den Kohlenstoffmaschendraht zu verzerren, als die einzelnen Lagen aufeinanderzupressen oder auseinanderzuziehen. Das ist kein Wunder, denn die chemischen Bindungen zwischen den Atomen des Gitters sind wesentlich stärker als die Haftkräfte zwischen den Schichten.

Zwar liefern auch Experimente mit größeren Graphitproben ähnliche Werte für die Elastizität des Materials, doch unsere Untersuchungen versprechen darüber hinaus Antworten auf zwei grundlegende Fragen zum Verhalten eines Festkörpers im Nanomaßstab. Wie klein darf er werden, bis er sich nicht mehr als Kontinuum mit kollektiven Eigenschaften wie der Elastizität beschreiben lässt? Und kann man vom Verhalten eines Materials im atomaren Maßstab auf seine makroskopischen Eigenschaften schließen? Beim Graphit stellten wir fest, dass sich selbst Proben aus nur wenigen Dut-

Proteinen bei der Faltung zusehen

Mit Hilfe der Kryobildgebung wollen Ahmed H. Zewail und seine Mitarbeiter extrem schnelle molekularbiologische Vorgänge wie die Faltung von Proteinen filmen. Der Eiweißstoff ist dabei in glasartigem (amorphem) Eis eingefroren. Für jedes Einzelbild schmilzt ein Laserpuls den Bereich um das Proteinmolekül auf, so dass es sich im erwärmten Wasser entfaltet. Aufgezeichnet wird dann seine erneute Faltung, während sich der Tropfen blitzartig wieder abkühlt und gefriert. Zusätzlich könnte das Protein an einem Substrat verankert werden, damit es für jede Aufnahme in exakt der gleichen Position bleibt.



GEORGE RETSECK

CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY

Diese Bilder des Bakteriums *Escherichia coli* entstanden mittels photoneninduzierter Nahfeld-Elektronenmikroskopie. Ein Femtosekunden-Laserblitz induzierte dabei ein so genanntes evaneszentes elektromagnetisches Feld in der Zellmembran. Indem das Mikroskop nur diejenigen Elektronen registrierte, die Energie aus diesem Feld aufgenommen hatten, erzeugte es eine hoch aufgelöste, kontrastreiche Aufnahme der Membran (links). Das farbkodierte Konturdiagramm gibt die Signalintensität wieder, die von blau über grün nach rot und gelb zunimmt. Mit dieser Methode lassen sich extrem kurzzeitige Vorgänge festhalten; denn das Feld ist schon nach 200 Femtosekunden deutlich abgeklungen (Mitte) und nach zwei Nanosekunden völlig verschwunden (rechts).

zend Atomschichten schon überraschend ähnlich verhalten wie dicke Blöcke.

Bei der Aufnahme der oben beschriebenen Filme verloren die Sondenelektronen, wenn sie auf die Probe trafen, praktisch keine Energie – ähnlich Gummibällen, die von einer harten Oberfläche abprallen. Manchmal regt ein solches Teilchen jedoch ein Elektron in einem der Kohlenstoffatome an. Dabei überträgt es Energie. Wie viel das ist, hängt davon ab, an welcher Art von Bindung das Elektron des Kohlenstoffatoms beteiligt war. Mit einer schon länger bekannten Untersuchungsmethode, der Elektronen-Energieverlust-Spektroskopie, lässt sich die bei der Wechselwirkung übertragene Energiemenge messen. Daraus ergeben sich Informationen über die Bindungen in einem Material und die chemischen Elemente, aus denen es besteht.

Als wir diese Methode mit der ultraschnellen Elektronenmikroskopie kombinierten, stellten wir fest, dass sich die Bindungen im Graphit beim Vibrieren nach dem Auftreffen des Laserpulses während der Stauchungsphase ähnlich denen im Diamant verhielten. In der Dehnungsphase dagegen nahmen sie Eigenschaften wie im Graphen an. Zum Nachweis solcher Unterschiede ist das zeitliche Auflösungsvermögen der konventionellen Elektronen-Energieverlust-Spektroskopie viel zu gering.

Inzwischen hat meine Arbeitsgruppe weitere Materialien mittels vierdimensionaler Mikroskopie untersucht. Für Eisen erstellten wir Beugungsbilder, um die Umwandlung seiner Kristallstruktur vom raum- zum flächenzentrierten kubischen Gitter zu beobachten – ein Vorgang, der bei der Stahlerzeugung und vielen anderen industriellen Verfahren zur Verarbeitung dieses Metalls bei hohen Temperaturen auftritt. Wenn wir eine Eisenprobe innerhalb einer Nanosekunde auf rund 1200 Grad Celsius erhitzten, bildeten sich inmitten des Chaos aus unzusammenhängenden Atombewegungen zunächst relativ langsam – in Zeiträumen von Nanosekunden – kleine Flecken mit der flächenzentrierten Kristallphase. Diese Keime wuchsen dann mit Schallgeschwindigkeit und breiteten sich so binnen Pikosekunden (billionstel Sekunden) über die gesamte erhitzte Eisenprobe aus. Bei einer derart raschen Transformation von einer Kristallphase in die andere müssen sich zahlreiche Atome auf koordinierte Weise verschieben – als lenke ein unsichtbarer Dirigent die ungezählten nanoskopisch kleinen Bewegungen plötzlich allesamt in eine Richtung. Ein tieferes Verständnis dieses Phänomens wäre nützlich für die industrielle Verarbeitung von Eisen, Stahl und anderen Materialien.

Die 4-D-Elektronenmikroskopie macht es möglich, **Nano- und Mikrosysteme in Echtzeit** bei der Arbeit zu beobachten

Zu den interessantesten Anwendungen der ultraschnellen Elektronenmikroskopie zählt die Möglichkeit, Nano- und Mikrosysteme in Echtzeit bei der Arbeit zu beobachten. Zum Beispiel filmten wir erstmals die hochfrequenten Resonanzschwingungen winzig kleiner Kragbalken, eine Art primitiver Miniaturkranarme. Dabei leiteten wir Messgrößen zur Beschreibung ihrer Bewegungen und Materialeigenschaften ab. Solche Daten eignen sich etwa zum Überprüfen theoretischer Modelle für die Konstruktion mikro- und nanoelektromechanischer Systeme.

Auch für Biologen dürfte die ultraschnelle Elektronenmikroskopie ein Geschenk des Himmels sein. Um Körperfunktionen zu verstehen, genügt es nämlich nicht, die Struktur der beteiligten Proteine und anderen Moleküle oder Zellbestandteile zu kennen. Man benötigt auch Informationen über deren Dynamik. Wie faltet sich ein Protein, wie erkennt es selektiv einen Rezeptor, welche Rolle spielt das umgebende Wasser? An manchen biologischen Abläufen sind ultraschnelle Zwischenschritte beteiligt. So beruht unser Sehvermögen ebenso wie die Fotosynthese der Pflanzen darauf,

dass Lichtquanten Prozesse im Zeitbereich von Femtosekunden auslösen. Zwar spielen sich die meisten zellulären Vorgänge wesentlich langsamer ab. Dennoch können zum Beispiel bei der Proteinfaltung die atomaren und molekularen Bewegungen in den ersten Femtosekunden darüber entscheiden, ob sie korrekt verläuft und zu einer sinnvollen Struktur führt – oder zu einer, die beispielsweise die Alzheimer-Krankheit verursacht.

Welche Erkenntnisse die ultraschnelle Elektronenmikroskopie dabei ermöglicht, illustriert eine Untersuchung meiner Arbeitsgruppe zur Proteinfaltung. Dabei ermittelten wir, wie schnell sich ein kurzes Proteinfragment zu einer einzelnen Helixwindung verdrillte, wenn wir das umgebende Wasser abrupt erwärmten. Dabei zeigte sich, dass sich solche schraubenförmigen Strukturen 1000-mal schneller bilden als zuvor vermutet: in einigen hundert Piko- bis zu wenigen Nano- statt in Mikrosekunden. Diese Erkenntnis könnte zu einem neuen Verständnis biochemischer Vorgänge beitragen – auch krankhafter.

Nächstes Ziel: die Faltung von Proteinen filmen

Bei biologischen Untersuchungen kombinieren wir unsere ultraschnelle 4-D-Methode gern mit der altbewährten Kryoelektronenmikroskopie. Dabei wird die in Wasser gebettete Probe in flüssiges Ethan getaucht, das bei –89 Grad Celsius siedet. Das Wasser gefriert so schlagartig zu einer glasigen Masse, die im Gegensatz zu kristallinem Eis weder Elektronenstrahlen beugt noch das biologische Material beschädigt. Auf diese Weise haben wir bereits Aufnahmen von Bakterienzellen und Proteinkristallen angefertigt. Eines unserer Ziele ist es, in glasartigem Wasser eingeschlossene Eiweißstoffe bei ihrer Faltung und Entfaltung zu beobachten. Dabei soll ein Startimpuls die Temperatur lokal gerade so weit erhöhen, dass sich der Bereich um das Protein herum verflüssigt. Dieses entfaltet sich in dem warmen Wassertröpfchen – und faltet sich beim anschließenden raschen Abkühlen prompt zurück. Sobald das Wasser erneut gefroren ist, kann der nächste Startpuls folgen.

Auf die gleiche Weise sollte es auch gelingen, die Dynamik der Geißeln von Bakterien und der Lipiddoppelschichten, aus denen Zellmembranen bestehen, sichtbar zu machen. Wie bei unseren Untersuchungen am Graphit könnten wir mit der ultraschnellen Elektronen-Energieverlust-Spektroskopie zugleich Veränderungen der chemischen Bindungen kartieren. Wenn wir es dabei schaffen, die Aufnahme zu machen, bevor das Biosystem sich bewegt oder zerfällt, sollten wir schärfere Bilder erhalten als mit der konventionellen Kryoelektronenmikroskopie.

Mit Abwandlungen der ultraschnellen Elektronenmikroskopie könnte es sogar möglich sein, bei Untersuchungen der Moleküldynamik räumliche Auflösungen unter einem Nanometer zu erzielen und bei der Abbildung der Elektronenverteilung in Materialien in den Attosekundenbereich vorzustoßen. Vor Kurzem hat meine Arbeitsgruppe zwei solche Varianten erstmals erprobt. Bei der Konvergenzstrahl-UEM wird der Elektronenpuls auf ein nanokopisch kleines Areal der Probe fokussiert. Die Nahfeld-UEM wiederum ermöglicht die Visualisierung so genannter evaneszenter elektromagnetischer Wellen (Oberflächenplasmonen), die in nanoskopisch kleinen Strukturen bei Bestrahlung mit einem intensiven Laserpuls entstehen. Dieses Phänomen bildet die Grundlage einer neuartigen Technologie, die als Plasmonik bezeichnet wird (siehe Spektrum der Wissenschaft 6/2007, S. 58). Damit sind bereits Aufnahmen von bakteriellen Zellmembranen und Proteinvesikeln mit Auflösungen im Femtosekunden- und Nanometerbereich gelungen.

In den letzten Jahren haben Ferenc Krausz von der Universität München, Paul Corkum von der University of Ottawa (Kanada) und andere Forscher den Attosekundenbereich für optische Untersuchungen erschlossen, indem sie extrem kurze Laserpulse zur Belichtung verwendeten. In meinem Arbeitskreis haben wir dagegen verschiedene ultraschnelle elektronenmikroskopische Verfahren für Aufnahmen auf derart kurzen Zeitskalen ersonnen und arbeiten nun gemeinsam mit Herman Batelaan von der University of Nebraska in Lincoln an ihrer experimentellen Umsetzung.

Von statischen Strukturen liefert das Elektronenmikroskop heute schon faszinierende Bilder, die selbst winzigste Details zeigen. Indem wir nun die Zeit als vierte Dimension integrieren, verwandeln wir diese hoch aufgelösten Schnappschüsse in bewegte Bilder, die das Verhalten der Materie auf kleinstem Raum in seiner ganzen Dynamik offenbaren.

DER AUTOR

Ahmed H. Zewail erhielt 1999 für die Untersuchung von Übergangszuständen chemischer Reaktionen mittels Femtosekundenspektroskopie den Nobelpreis für Chemie. Er ist am California Institute of Technology in Pasadena Inhaber des Linus-Pauling-Lehrstuhls für Chemie und Direktor des Physical Biology Center for Ultrafast Science and Technology. Außerdem hat der gebürtige Ägypter eine Professur für Physik.

QUELLEN

Flannigan, D.J. et al.: Biological Imaging with 4D Ultrafast Electron Microscopy. In: Proceedings of the National Academy of Sciences USA 107, S. 9933–9937, 2010

García de Abajo, F.J.: Microscopy: Photons and Electrons Team Up. In: Nature 462, S. 861, 2009

Thomas, J.M.: Ein Durchbruch in der Elektronenmikroskopie. In: Angewandte Chemie 117, S. 5699–5702, 2005

Zewail, A.H., Thomas, J.M.: 4D Electron Microscopy: Imaging in Space and Time. Imperial College Press, London 2009

Zewail, A.H.: Four-Dimensional Electron Microscopy. In: Science 328, S. 187–193, 2010

WEBLINKS

www.pro-physik.de/Phy/leadArticle.do?laid=8577
Beitrag über die ultraschnelle Elektronenmikroskopie bei »Pro Physik«

www.chemieonline.de/bibliothek/details.php?id=2674
Ultraschnelle Elektronenmikroskopie macht Nanokanäle sichtbar.