

Ein Durchbruch in der Elektronenmikroskopie**

John Meurig Thomas*

Stichwörter:

Elektronenbeugung · Elektronenmikroskopie · Femtochemie · Proteinstrukturen · Struktur-
dynamik

In einer jüngst publizierten Veröffentlichung^[1] wurde über „vierdimensionale ultraschnelle Elektronenmikroskopie“ berichtet, und die Ergebnisse sind von immenser Bedeutung für die Physik, Biologie und Materialwissenschaften. Zewail et al. beschrieben hierbei, wie man durch Verknüpfung von Zeit und Raum zu Echtzeit- und Echtraum-Verfahren gelangt. Die Kombination der drei Dimensionen des Raums, die durch hochauflösende Elektronenmikroskopie zugänglich sind, mit der vierten Dimension der Zeit eröffnet neue Anwendungsperspektiven durch zeitlich gesteuerten Einsatz von Einzelelektronenpaketen.

Die Methode beruht auf der Entwicklung von kohärenten Elektronenpaketen, die nur wenige oder gar nur ein Elektron pro Puls enthalten. Sie werden mit Femtosekunden-Laserpulsen aus einer Photokathode freigesetzt und auf eine Energie von 120 keV beschleunigt. Eine Ladungsausbreitung des Elektronenstrahls im Raum findet unter diesen Bedingungen nicht statt, und die Trajektorien der Elektronen können scharf

gebündelt werden. Die Energie der Laserpulse, mit denen die Photokathode bestrahlt wird, ist sehr niedrig (ca. 500 pJ), und die Pulsfolge ist hochfrequent (Pulsabstand ca. 12.5 ns), sodass die Pulse mit einem ultraschnellen Elektronenmikroskop (UEM) zeitaufgelöst registriert werden können. Bei einer periodisch aufgebauten Probe könnte man somit jeden Puls auf eine andere, aber äquivalente Stelle einwirken lassen. Bei hinreichend verlängerten Inter-

vallen können reversible Veränderungen durch den Elektronenpuls bei Proben aus Metallen oder anderen anorganischen Stoffen (z.B. Si, Ge, GaAs) ausheilen, sodass Wiederholungsmessungen möglich sind. Durch Anwendung dieses Verfahrens erhielten Zewail et al.^[1] Beugungsmuster mit atomarer Auflösung und mikroskopische Bilder mit einer Auflösung im Nanometerbereich.

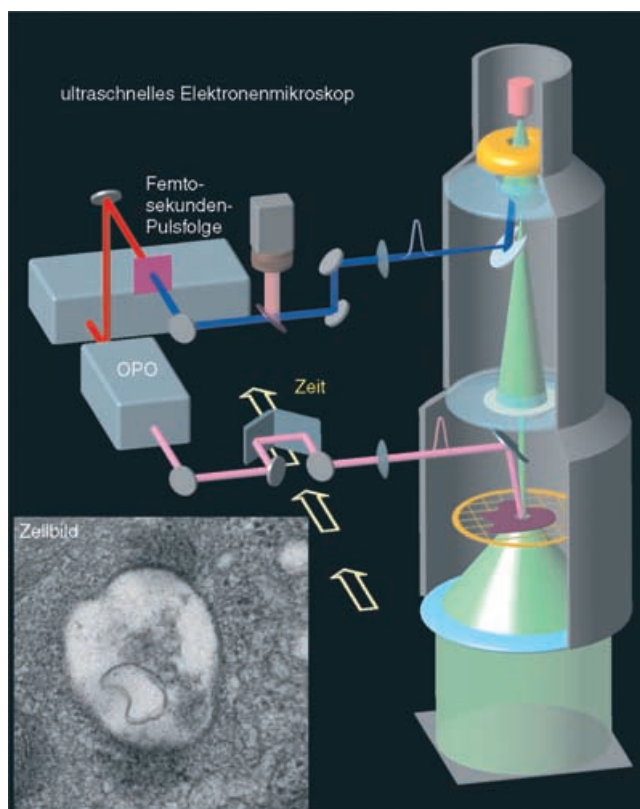


Abbildung 1. Aufbauprinzip eines UEM mit Femtosekundenoptik und hoch auflösendem Elektronenmikroskop (OPO=optisch-parametrischer Oszillator).^[1] Der Einschub zeigt ein UEM-Bild einer Rattendarmzelle. Die Abbildung wurde freundlicherweise von V. A. Lobastov zur Verfügung gestellt.

[*] Prof. Sir J. M. Thomas
Department of Materials Science
University of Cambridge
Cambridge CB230QZ (Großbritannien)
Fax: (+44) 1223-334-567
E-mail: jmt2@cam.ac.uk
und
The Davy Faraday Laboratory
Royal Institution
21 Albemarle St.
London W1S4BS (Großbritannien)
und
The NanoCenter
University of South Carolina
Columbia, SC 29208 (USA)

[**] Ich danke den Professoren K. D. M. Harris,
R. M. Glaeser und J. C. H. Spence für
anregende Diskussionen.

Das Prinzip eines UEM mit Femtosekundenoptik und hoch auflösendem Elektronenmikroskop ist in Abbildung 1 wiedergegeben. Der Laser ist ein diodengepumpter, modengekoppelter Ti:Saphir-Laser, der bei einer Wellenlänge von 800 nm und einer Pulsfrequenz von 80 MHz Pulse von weniger als 100 fs Dauer mit einer mittleren Leistung von 1 W liefert. Ein Teil des Laserstrahls kann zum Aufheizen oder Anregen der Probe und als Zeitmarkierung eingesetzt werden, die Frequenz des Reststrahls wird in einem nichtlinearen Kristall auf 400 nm verdoppelt – diese Femtosekundenpulse liefern dann die Elektronenpulsfolge. Einzelne Elektronen können mit einem Phosphorzintillator und einer CCD-Kamera nachgewiesen werden. Gepulste Strahlen aus Photoelektronen stehen seit 1990 im Arbeitskreis Zewail im Zentrum der Entwicklung ultraschneller Gasphasen-Beugungsverfahren und der ultraschnellen Kristallographie.

Der Ansatz knüpft an das durch Bostanjoglo et al.^[2–4] entwickelte Verfahren mit einzelnen intensiven Photoelektronenpulsen von einigen Nanosekunden Dauer an, mit dem die Textur dünner metallischer Filme untersucht wurde. Jeder Puls enthält dabei ca. 10^8 Elektronen, und durch die Coulomb-Abstoßung ist nur eine relativ geringe Zeitauflösung möglich. Auch die räumliche Auflösung ist auf den Mikrometerbereich begrenzt; das Verfahren beschränkt sich daher auf die Untersuchung z.B. von Schmelz- und Abtragsvorgängen. Der Ansatz von Zewail et al. unterscheidet sich auch von den grundlegenden Arbeiten von Gai und Boyes,^[5] die kontinuierliche Strahlen in einem Spezialmikroskop einsetzen. Dieses kann in einer Reaktionszelle bei erhöhten Temperaturen mit Millisekundenauflösung hoch aufgelöste Bilder von der Wanderung metallischer Katalysatoren auf oxidischen Trägermaterialien aufnehmen. Zewail et al.^[1] wiesen die Vielseitigkeit ihres 4D-UEM-Verfahrens durch die Aufnahme von Bildern und Beugungsmustern von amorphem Kohlenstoff, polykristallinem Aluminium und Gold-Einkristallen nach. Ferner gelangen Aufnahmen eingefärbter lebender Zellen bei einer Elektronendosis von einigen wenigen Elektronen pro \AA^2 .

Dieser methodische Fortschritt – und speziell die Einbeziehung einer vierten Dimension – erweitert die Perspektiven dynamischer Strukturuntersuchungen von anorganischen, organischen und biologischen Materialien. In der Vergangenheit wurde die Röntgenbeugung weit häufiger eingesetzt als Elektronenbeugung und -mikroskopie, insbesondere von Biochemikern und Biophysikern zur Strukturbestimmung von Makromolekülen. Obwohl die damit erhaltenen Strukturen nicht dynamisch sind, vermitteln sie gelegentlich weitreichende Erkenntnisse über Reaktionsmechanismen und Wirkungsweisen. Zwei herausragende Beispiele sind die Strukturen von DNA und des proteolytischen Enzyms Lysozym. Aus der statischen Struktur des Lysozyms leitete David Phillips einen plausiblen – und größtenteils immer noch gültigen – Wirkmechanismus ab.^[31] Zugleich gibt es zahlreiche Fälle, in denen zwar detaillierte kristallographische Strukturen vorliegen, sich daraus aber kein Hinweis auf den Wirkmechanismus ergibt. Ein Beispiel hierfür ist Hämoglobin: Als Max Perutz nach aufwändigen Arbeiten die Struktur des Proteins gelöst hatte, konnte er keinen Hinweis auf die Wirkungsweise erkennen, und selbst gut gesinnte Freunde, denen er sein Modell vorführte, wendeten ein, es könne sich um eine belanglose Verunreinigung handeln. Mithilfe der ultraschnellen Beugungs-^[6] und Mikroskopietechniken von Zewail kann die dynamische Entwicklung von Strukturen analysiert und die gleichzeitige Veränderung der Energiehyperflächen direkt aufgezeichnet werden. Es ist zu erwarten, dass die Anwendung des 4D-UEM-Verfahrens zu einem tieferen Verständnis biologischer Abläufe führt.

Hinsichtlich der Empfindlichkeit sind Röntgenstrahlen den Elektronenstrahlen unterlegen. Die Streuquerschnitte an Molekülen sind bei der Elektronenbeugung etwa fünf bis sechs Größenordnungen größer als bei der Röntgenbeugung. Ferner schädigen Elektronen, bezogen auf die Zahl auswertbarer Streueignisse, die Proben weniger als Röntgenstrahlen.^[7] Bei Synchrotronuntersuchungen mit intensiven Röntgenstrahlen sind diese Strahlenschäden häufig problematisch (wenngleich es mit Synchrotronstrahlung im

Prinzip möglich ist, Beugungsdaten nach dem Laue-Verfahren aufzuzeichnen). Einschränkend kommt hinzu, dass bislang nur sehr wenige Synchrotrons über eine Zeitauflösung verfügen, die es zulässt, den Bruch und die Bildung von chemischen Bindungen zu untersuchen oder Torsions- und Schwingungsamplituden zu messen. Ebenso selten findet man die Möglichkeit einer direkten Echtraum-Bildgebung. Mit einem laserinduzierten Plasma, das auf ein kleines Metalltarget einwirkt und so einen Röntgenschaer liefert, können Röntgenpulse von 1 ps Dauer erhalten werden. Diese wurden kürzlich mit so gutem Erfolg zur Untersuchung multipler Potentialtöpfe eingesetzt,^[8] dass sich hier die Möglichkeit zur Aufnahme von „Röntgenfilmen wackelnder Kristalle“ eröffnet.^[9] Simulationen deuten darauf hin, dass Strahlenschäden auf atomarer Ebene in einem typischen Protein etwa 10–20 fs nach dem Beugungsvorgang entstehen. Zur Gewinnung von Röntgenbeugungsmustern schlugen Neutze et al.^[10] daher vor, einen Strom statistisch orientierter Proteinmoleküle mit einem Röntgenstrahl zu kreuzen, wobei beide Pulse synchronisiert sind. Dieses schwierige Experiment ist noch nicht durchgeführt worden.

Seit den bahnbrechenden Befunden von Klug,^[11] der aufzeigte, wie durch Transmissionselektronenmikroskopie die Strukturen biologischer Makromoleküle abgeleitet werden können, ist dieses Verfahren, vor allem von Henderson,^[12] Unwin^[13] und anderen, zur Strukturaufklärung von Membranen und ähnlichen Materialien eingesetzt worden. Kürzlich wurde so die Struktur des Nicotinacetylcholinrezeptors mit 4 \AA Auflösung aufgeklärt.^[13] Von Spence et al.^[14,15] stammt der geniale Vorschlag, anhand der Elektronenbeugungsmuster gerichteter Molekularstrahlen die Strukturen von Proteinen, besonders von schwer kristallisierenden, zu lösen. Dieser Versuchsaufbau nutzt kontinuierliche, orthogonale, sich kreuzende Elektronen-, Molekular- und Laserstrahlen. Die Datensammlung ist hierbei viel einfacher als beim ähnlichen Verfahren von Neutze et al.^[10] mit Femtosekunden-Röntgenpulsen. Für die hinreichend genaue Bestimmung auch der Sekundärstruktur eines Enzyms wie Lysozym sind vermutlich ein

Nahinfrarot-Dauerstrichlaser mit einer Leistung von bis zu 1 kW und eine Kühlung mit flüssigem Stickstoff erforderlich.^[15]

Es ist davon auszugehen, dass die Schäden durch Elektronenbeschuss mit der oben beschriebenen Einzelpulsakkumulationsmethode vermindert werden, sodass höhere Dosisleistungen zur Aufnahme von Beugungsdaten möglich sind. Falls dies zutrifft, wird das 4D-UEM-Verfahren von Zewail ohne Zweifel neue Erkenntnisse über die Dynamik biophysikalisch wichtiger Prozesse liefern und Strukturbestimmungen mit noch höherer Auflösung als mit jüngst beschriebenen Kryoverfahren ermöglichen.^[16,17]

Schon vor der Entwicklung des 4D-UEM-Verfahrens hatten Zewail und Mitarbeiter in ultraschnellen Elektronenbeugungsexperimenten atomare Auflösung in Raum und Zeit erreicht, die sie zur Untersuchung ganz unterschiedlicher Phasen, von Gasen über Kristalle bis hin zu Grenzflächen, anwendeten.^[6,18–20] Zum Beispiel wurde die dynamische Struktur einer Fettsäureddoppelschicht kürzlich mithilfe der ultraschnellen Elektronenkrystallographie in atomarer Auflösung analysiert. Neben der Struktur der zweidimensionalen Anordnung wurde die strukturelle Dynamik durch Aufnahme der Beugungsmuster im Pikosekundenrhythmus nach einem extrem schnellen Temperatursprung im Femtosekundenbereich bestimmt, und es wurde eine kohärente, anisotrope Expansion entlang der aliphatischen Ketten der Doppelschicht (eines 50 Å dicken zweidimensionalen Kristalls) festgestellt.

Anders als Röntgen- können Elektronenstrahlen einfach fokussiert werden. Zusammen mit der hohen Empfindlichkeit und Auflösung macht dies die 4D-UEM-Technik zu einer einzigartigen Untersuchungsmethode. In Fällen, in denen Einkristall-Röntgenbeugungsexperimente nicht möglich waren, konnten durch Elektronenmikroskopie oft Strukturdetails von großer chemischer Bedeutung nachgewiesen werden. Beispielsweise wurde die Nanoporosität des wichtigen zeolithischen Katalysators und Molekularsiebs ZSM-5, eines Aluminosilicats, elektronenmikroskopisch genau bestimmt,^[21] lange bevor eine Kristallstrukturanalyse an Einkristallen

möglich wurde. Ferner wird in der Kristallographie der räumliche Mittelwert über etwa 10^{15} Elementarzellen gebildet, weshalb bestimmte strukturelle Feinheiten unerkannt bleiben – sie werden bei der Mittelwertbildung einfach verwischt. Mit hochauflösender Elektronenmikroskopie werden meist nur 10^5 Elementarzellen oder weit weniger untersucht, sodass ein Echtraumabbild der lokalen Struktur gewonnen wird. Auf diese Weise wurden zuerst periodische Verwachsungen von ZSM-5 und seinem symmetrieverwandten Analogon ZSM-11^[22] und anschließend zahlreiche weitere neuartige Strukturen entdeckt, unter anderem so exotische Proben wie unbegrenzt adaptive Strukturen, bei denen vollständig geordnete Mischoxidstrukturen beliebiger nichtstöchiometrischer Zusammensetzung entstehen können.^[23] Röntgenstrahlen sind für diese Phänomene nahezu „blind“. Weiterhin können die Strukturen hochgeordneter, mesoporöser Materialien nicht allein mit Röntgenbeugungsmustern gelöst werden, weil die Reflexe breit sind und ihre Zahl gering ist. Die Elektronenmikroskopie ist daher das einzige verlässliche Verfahren zur Lösung solcher Strukturen.^[24]

Prinzipiell sollte das nun verfügbare 4D-UEM-Verfahren bei der Untersuchung anorganischer, organischer und biologischer Materialien eine Fülle an Details liefern. Beispielsweise kann man Femtosekundenpulse zum Aufheizen und zur photochemischen Anregung einer Probe nutzen und anschließend die vielfältigen Phasenübergänge untersuchen, einschließlich solcher Phänomene wie martensitische Phasenübergänge, deren Dynamik mit anderen experimentellen Methoden bislang nur sehr schwierig zu bestimmen war. Für Festkörperchemiker und Materialwissenschaftler bieten sich Untersuchungen diffusionsloser Reaktionen^[25,26] wie Photodimerisierungen und -polymerisationen in organischen Molekülkristallen an. Aus solchen Studien lassen sich wertvolle Erkenntnisse für das Kristalldesign gewinnen. Mit der dynamischen Elektronenmikroskopie können auch Elektronenenergieverlustspektren aufgezeichnet werden,^[27] aus denen sich die Oxidationsstufen von Metallionen in aktiven Zentren von Biomolekülen ableiten lassen (obwohl die Messungen

durch die reduzierende Wirkung der Sekundärelektronen erschwert werden können). 4D-UEM sollte daher in der Lage sein, neue Erkenntnisse über Redox-Metalloenzyme wie Cytochrom P450, die Manganoxidase, Hydrogenasen und zahlreiche andere Enzyme zu liefern. Weiterhin sollte sich bei offenporigen heterogenen Einzentrenkatalysatoren^[28,29] das „Atmen“ der Nanoporen und -kämme und die Amplitude der Atombewegung in den aktiven Zentren – entscheidende Parameter für die katalytische Wirkung – direkt messen lassen. Wegen der hohen Empfindlichkeit des 4D-UEM-Verfahrens sind auch neue Befunde über die rätselhafte katalytische Aktivität von Goldnanopartikeln (auf bestimmten Trägeroxiden) zu erwarten. Massives Gold ist katalytisch inaktiv, Nanopartikel von etwa 5 nm Durchmesser auf TiO₂ katalysieren aber die Oxidation von Kohlenstoffmonoxid in Luft schon unterhalb Raumtemperatur.^[30] Die strukturelle Dynamik der Terrassen, Stufen und Vorsprünge verlangt ebenso nach Aufklärung wie die strukturelle Charakteristik von makromolekularen Aggregaten, Nano-Verbundwerkstoffen, Korngrenzen und Quantenpunkten.

Die am Caltech entwickelten vierdimensionalen Beugungs-, Kristallographie- und Mikroskopieverfahren sind wahrlich revolutionär, und unzählige Fragen in der Physik und Biologie warten nur darauf, mit diesen Techniken gelöst zu werden!

Online veröffentlicht am 26. Juli 2005

- [1] V. A. Lobastov, R. Srinivasan, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 7069.
- [2] O. Bostanjoglo, R. E. Elschner, Z. Mao, T. Nink, M. Weingärtner, *Ultramicroscopy* **2000**, *81*, 141.
- [3] H. Dömer, O. Bostanjoglo, *Rev. Sci. Instrum.* **2003**, *74*, 4369.
- [4] O. Bostanjoglo, *Adv. Imaging Electron Phys.* **2002**, *121*, 1.
- [5] P. L. Gai, E. D. Boyes, *Ultramicroscopy* **1997**, *67*, 219.
- [6] A. H. Zewail, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **2005**, *364*, 315.
- [7] R. Henderson, *Q. Rev. Biophys.* **1995**, *28*, 171.
- [8] M. Bargheer, N. Zhavoronkov, Y. Gritsai, J. C. Woo, D. S. Kim, M. Woerner, T. Elsaesser, *Science* **2004**, *306*, 1771.

- [9] P. H. Bucksbaum, *Science* **2004**, 306, 1691.
- [10] R. Neutze, R. Wouts, D. van der Spoel, E. Weckert, J. Hajdu, *Nature* **2000**, 406, 752.
- [11] A. Klug in *Nobel Lectures, Chemistry 1981–1990* (Hrsg.: B. G. Malmström), World Scientific, Singapore, **1991**, S. 77.
- [12] R. Henderson, *Q. Rev. Biophys.* **2004**, 37, 3.
- [13] N. Unwin, *J. Mol. Biol.* **2005**, 346, 967.
- [14] J. C. H. Spence, R. B. Doak, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, 92, 198102.
- [15] J. C. H. Spence, K. Schmidt, J. S. Wu, G. Hembree, U. Weierstall, B. Doak, P. Fromme, *Acta Crystallogr. Sect. A* **2005**, 61, 237.
- [16] W. Chiu, A. McGough, M. B. Sherman, M. F. Schmid, *Trends Cell Biol.* **1999**, 9, 154.
- [17] A. Sali, R. Glaeser, T. Earnest, W. Baumeister, *Nature* **2003**, 422, 216.
- [18] F. Vigliotti, S. Chen, C.-Y. Ruan, V. A. Lobastov, A. H. Zewail, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 2759; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 2705.
- [19] J. M. Thomas, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 2658; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 2606.
- [20] C.-Y. Ruan, V. A. Lobastov, F. Vigliotti, S. Chen, A. H. Zewail, *Science* **2004**, 304, 80.
- [21] J. M. Thomas, G. R. Millward, L. A. Bursill, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **1981**, 300, 43.
- [22] J. M. Thomas, G. R. Millward, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1982**, 1380.
- [23] J. S. Anderson, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1973**, 1107.
- [24] Y. Sakamoto, T. W. Kim, R. Ryoo, O. Terasaki, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 5353; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 5231.
- [25] J. M. Thomas, *Nature* **1981**, 289, 633.
- [26] J. M. McBride, B. E. Segmuller, M. D. Hollingsworth, D. E. Mills, B. A. Weber, *Science* **1986**, 234, 830.
- [27] J. M. Thomas, P. A. Midgley, *Chem. Commun.* **2004**, 1253.
- [28] T. Maschmeyer, F. Rey, G. Sankar, J. M. Thomas, *Nature* **1995**, 378, 159.
- [29] J. M. Thomas, R. Raja, D. W. Lewis, *Angew. Chem.* **2005**, 117, im Druck.
- [30] M. S. Chen, D. W. Goodman, *Science* **2004**, 306, 252.
- [31] C. C. F. Blake, D. F. Koenig, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips, V. R. Sarma, *Nature* **1965**, 206, 757.