

# **Entwicklung markerfreier Oberflächen-Analysemethoden: Kraftspektroskopie und spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie**

**DISSERTATIONSSCHRIFT**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
der Fakultät für Chemie der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Christian Budich

aus Hamm

ISAS - Institute for Analytical Sciences

März 2008

Referent: PD Dr. V. Deckert

Korreferent: Prof. Dr. C. Niemeyer



Für  
meine Eltern



## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich besonders bei Herrn PD Dr. Volker Deckert für die Möglichkeit bedanken, dieses interessante Thema bearbeiten zu dürfen. Danke auch für das Vertrauen, das er in einen Biologen gesetzt hat, ein physikochemisches Thema zu bearbeiten.

Dank an Herrn Prof. Dr. Niemeyer für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Mein Dank gilt Herrn Dr. Peter Lampen, der es mir ermöglichte, die mathematischen Voraussetzungen für diese Arbeit zu erlernen. Außerdem danke ich ihm für die Programme, die er für mich geschrieben hat und die mir das Arbeiten sehr erleichtert haben. Dank auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich recht herzlich bei den Mitgliedern der Nano-Raman-Gruppe am ISAS:

Akiko Rasmussen für die Einführung in das große Feld der Rasterkraftmikroskopie und der Raman-Spektroskopie. Weiterhin für die mütterliche Fürsorge während der ersten Zeit an einem neuen Arbeitsplatz.

Carine Julien für die vielen Tipps und Tricks beim Umgang mit den Geräten und die vielen wissenschaftlichen Gespräche während der „Raucherpausen“.

Berhard Gosciniak für die spitzen Spitzen-Spitzen, die Einführung in die Geheimnisse des Bedampfens, Spitzenziehens, Ätzens und die vielen Ideen zur Vereinfachung der Spitzen-Vorbereitung.

Helmut Herzog für die Beschaffung von Literatur, für fruchtbare Gespräche am Stickstofftank und die Hilfe bei der Beschaffung von Materialien aller Art.

Elena Bailo für die Unterstützung bei der Probenvorbereitung, die Einführung in die Geheimnisse der Laser-Justierung und Hilfe bei der Erstellung der Paper.

Erika Pulvermacher für die Entlastung am REM und bei der Herstellung von Spitzen.

Marc Richter für die Bereicherung des Büros mit einem zusätzlichen Biologen, die fruchtbaren Gespräche unter meinesgleichen und die Wissbegierde beim Erlernen der neuen Methoden. On the way to Mensa

Mein Dank gilt weiterhin den Mitarbeitern der feinmechanischen Werkstatt und der Elektronik des ISAS, die durch viele Ideen und eine schnelle und perfekte Umsetzung manchen Experimenten zum schnellen Erfolg verholfen haben.

Danken möchte ich auch den Gästen aus Jena, Ute Neugebauer und Dana Cialla, die es in langen Mess-Sitzungen geschafft haben, Ergebnisse zu produzieren und mir ein tieferes Verständnis von Raman-Spektroskopie zu vermitteln.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und Geschwistern,

danken. Sie haben immer an mich geglaubt und mir Mut gemacht, diese Arbeit zu Ende zu bringen. Außerdem möchte ich ihnen danken, dass sie in einer sehr schweren Zeit während dieser Arbeit mich nach Kräften unterstützt und aufgerichtet haben. Vielen Dank!

Es gibt noch eine Vielzahl weiterer Menschen, denen ich danken möchte, denn ohne sie wäre diese Arbeit nicht in dieser Form entstanden. Jonathan, Melissa, Lindsey, Kathrine, Jean-Philipp, Marco, Sasi, Tanja, Uwe, Sandra, Heidi, Günter, Katrin, Ralf, Gaby, Jürgen, Heike, Klaus, Katharina, Claire, Ann-Sophie. Danke!

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Theorie</b>	<b>17</b>
2.1	Rasterkraft-Mikroskopie . . . . .	17
2.2	Kraftspektroskopie . . . . .	21
2.3	Raman-Spektroskopie . . . . .	23
2.4	Oberflächenverstärkte Raman-Streuung . . . . .	26
2.5	Nahfeld-Optik . . . . .	28
2.6	Spitzenverstärkte Raman-Streuung . . . . .	31
2.7	Multivariate Datenanalyse . . . . .	32
2.7.1	Hauptkomponentenanalyse . . . . .	33
2.7.2	Clusteranalyse . . . . .	34
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>37</b>
3.1	Beschreibung der Experimente . . . . .	37
3.1.1	Kraftspektroskopie . . . . .	37
3.1.2	Spitzenverstärkte Raman-Streuung . . . . .	39
3.2	Kraftspektroskopie . . . . .	40
3.2.1	Probenpräparation . . . . .	40
3.2.2	Messung der Kraft-Distanz-Kurven . . . . .	41
3.2.3	Statistische Auswertung . . . . .	42
3.3	TERS . . . . .	46
3.3.1	Probenpräparation . . . . .	46
3.3.2	Spitzen . . . . .	46
3.3.3	Aufbau und Messung . . . . .	47
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>49</b>
4.1	Zwei-Komponenten Modellsystem - Cytochrom C auf Glimmer . . . . .	49

---

4.1.1	Topographie . . . . .	49
4.1.2	Kartierung . . . . .	50
4.1.3	Adhäsion und Steigung . . . . .	51
4.1.4	Kraft-Distanz-Kurven . . . . .	52
4.1.5	Hauptkomponentenanalyse . . . . .	54
4.1.6	Hierarchische Clusteranalyse . . . . .	59
4.1.7	K-Means Clustering . . . . .	62
4.1.8	Vergleich der Techniken untereinander . . . . .	63
4.2	Das Drei-Komponenten-System - Gold, Glas, Avidin . . . . .	64
4.2.1	Topographie . . . . .	64
4.2.2	Kartierung . . . . .	66
4.2.3	Adhäsion und Steigung . . . . .	67
4.2.4	Kraft-Distanz-Kurven . . . . .	68
4.2.5	Hauptkomponentenanalyse . . . . .	69
4.2.6	Hierarchische Clusteranalyse . . . . .	73
4.2.7	K-Means Clustering . . . . .	75
4.2.8	Zusammenfassung . . . . .	78
4.3	Realprobe eines komplexen Systems . . . . .	79
4.3.1	Art der Probe . . . . .	79
4.3.2	Topographie . . . . .	80
4.3.3	Kraft-Distanz-Kurven . . . . .	81
4.3.4	Hauptkomponentenanalyse . . . . .	82
4.3.5	Clusteranalyse . . . . .	83
4.3.6	Zusammenfassung . . . . .	85
4.4	Spitzenverstärkte Raman-Streuung an <i>Staphylococcus epidermidis</i> . . . . .	87
4.4.1	<i>S. epidermidis</i> und der Aufbau seiner Zellwand . . . . .	87
4.4.2	Referenzmessungen . . . . .	89
4.4.3	Ortsabhängige TERS-Messungen . . . . .	92
4.4.4	Berechnung der Verstärkungsfaktoren . . . . .	99
4.5	Spitzenverstärkte Raman-Streuung an Bakteriorhodopsin . . . . .	101

---

4.5.1	Bakteriorhodopsin und <i>Halobacterium salinarum</i> . . . . .	101
4.5.2	Raman-Spektren von Bakteriorhodopsin . . . . .	103
4.5.3	TERS an Purpurmembranfragmenten . . . . .	104
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>109</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>i</b>
<b>A</b>	<b>Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von TERS-Spitzen</b>	<b>i</b>
<b>B</b>	<b>Dateiformat eines kraftspektroskopischen Experiments</b>	<b>ii</b>
B.1	ASCII-Datei . . . . .	ii
B.2	Automatisiertes hierarchisches Clustern . . . . .	iv
B.3	Automatisiertes K-Means-Clustern . . . . .	iv
<b>C</b>	<b>IGOR-Prozeduren</b>	<b>v</b>
C.1	Einlesen der Daten und Erstellen eines Videos . . . . .	v
<b>D</b>	<b>Eigene Veröffentlichungen</b>	<b>ix</b>
D.1	Wissenschaftliche Artikel . . . . .	ix
D.2	Wissenschaftliche Poster . . . . .	x
<b>E</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>xi</b>



# 1 Einleitung

Oberflächen spielen eine große Rolle für die Interaktion von Lebewesen mit der Umwelt. Ähnlich der Epidermis bei Pflanzen und Tieren besitzen auch Mikroorganismen eine Hülle (Zellwand), die sie vor Umwelteinflüssen schützt. Neben dem Schutz des Organismus, ist die Wechselwirkung mit der Umwelt eine weitere wichtige Funktion der Zellwand. Über die Zellwand können Nährstoffe aufgenommen, Stoffwechselprodukte abgegeben und Umweltfaktoren analysiert werden. Für all diese Prozesse sind Proteine verantwortlich. Je nach spezifischer Funktion können diese Proteine entweder in die Zellwand eingebettet sein, ihr aufliegen oder sie durchspannen [1]. Proteine gehen über ein Schlüssel-Schloß-Prinzip eine Wechselwirkung mit ihrer Umgebung, sowohl innerhalb der Zelle wie auch mit der Außenwelt, ein. Ein Wechselwirkungspartner (Schlüssel) bindet sich an einen spezifischen Bindungsort (Domäne) des Proteins (Schloß) und aktiviert dadurch eine Reaktion des Proteins. In den Lebenswissenschaften sowie in der klinischen Diagnostik sind die Interaktionen der Wechselwirkungspartner auf der molekularen Ebene von großem Interesse. Viele Medikamente beinhalten Wirkstoffe, die solche Wechselwirkungspartner simulieren und auf diese Weise die Funktion von Proteinen blockieren oder aber verstärken können. Einige Antibiotika zum Beispiel wirken auf Proteine oder andere Bestandteile der bakteriellen Zellwand. Um geeignete Medikamente zu verabreichen, ist eine schnelle und fehlerfreie Bestimmung der Bakterien notwendig [2]. Die große Vielfalt an Größen und Formen von Bakterien macht Bestimmungsmethoden komplex und zeitintensiv. Bakterien sind in der Regel 1-5  $\mu\text{m}$  groß. Die Variationen reichen jedoch von einigen hundert Nanometern bis hin zu 10  $\mu\text{m}$ . Bis zur vollständigen Bestimmung eines Bakterienstammes mit herkömmlichen Methoden können Tage oder sogar Wochen vergehen. Es ist daher wünschenswert eine Methode einzusetzen, bei der ein einzelnes Bakterium ausreicht, eine vollständige Charakterisierung durchzuführen und schnellstmöglich eine Behandlung anzusetzen. Nicht nur im Inneren der Zelle befinden sich stammspezifische Moleküle, sondern auch in der Zellwand kommen Komponenten vor, die eine Zuordnung erlauben. So ist etwa die Gram-Färbung, benannt nach dem dänischen Arzt

Hans Christian Gram, eine schnelle Möglichkeit, anhand der Zellwandstruktur zwischen den zwei großen Gruppen der Gram-positiven und der Gram-negativen Bakterien zu unterscheiden. Mit dieser Methode kann jedoch nur zwischen diesen Gruppen unterschieden werden, eine Bestimmung einzelner Stämme ist nicht möglich. Um ganze Stämme oder einzelne Spezies zu bestimmen, können charakteristische Proteine eine große Rolle spielen. Dies gilt für Proteine in der Zelle und ebenso für Oberflächen-Proteine. Globuläre Proteine innerhalb der Zelle haben hydrophilen Charakter und lassen sich ohne großen Aufwand aus der Zelle extrahieren und spektroskopisch unter nativen Bedingungen untersuchen.

Dazu ist es notwendig zuvor charakteristische Proteine zu identifizieren und dann in ausreichender Menge zu produzieren, um als Referenzsubstanzen zu dienen. Dies bedeutet einen beträchtlichen Arbeitsaufwand.

Membranständige Proteine auf der Oberfläche von Bakterien haben einen stark hydrophoben Charakter im Bereich ihrer Helices. Bei der Extraktion aus der Membran oder der Peptidoglycan-Schicht verlieren diese Proteine ihre Tertiärstruktur oder denaturieren gänzlich. Eine Untersuchung unter nativen Bedingungen ist dann nicht mehr möglich. Um membranständige Proteine in nativer Umgebung spektroskopisch zu untersuchen, muss daher das gesamte Bakterium betrachtet werden. Dazu muss das Protein jedoch auf der Oberfläche der Zelle lokalisiert werden. Eine Möglichkeit besteht darin, das Protein mit einem Farbstoff zu markieren und mittels Fluoreszenz-Spektroskopie zu detektieren. Diese Art der Markierung setzt jedoch eine intensive Vorbereitung voraus und lässt nur eine grobe Zuordnung auf der Oberfläche zu. Auch hierbei ist es jedoch nicht möglich, zwischen mehreren verschiedenen Proteinen zu unterscheiden.

Einen Ansatz zur Untersuchung verschiedener Materialeigenschaften mit einer hohen Ortsauflösung bieten die Rastersonden-Verfahren. Ausgehend von der Rastertunnel-Mikroskopie (STM, scanning tunneling microscopy) [3, 4] bei der über die Messung von Tunnelströmen die Topographie und die Materialeigenschaften leitender und halbleitender Proben untersucht werden, wurde für nicht leitende Proben die Rasterkraft-Mikroskopie (AFM, atomic force microscopy) [5] entwickelt. Das Prinzip der Rasterkraft-Mikroskopie basiert auf der Messung der Kräfte zwischen der eingesetzten Spitze und der Probe. Im Wesentlichen wird diese Technik dazu verwendet, Topographien von Oberflächen zu erstellen. Neben der

Aufnahme von Topographien biologischer [6] wie auch nicht biologischer Proben [7, 8, 9] stellt die Kraftspektroskopie eine weitere Einsatzmöglichkeit des Rasterkraft-Mikroskops dar. Hierbei werden die Kräfte, die zwischen der Spitze und der Probe auftreten, als Funktion des Abstandes gemessen. Die typische Erscheinungsform für eine solche Messung ist die Kraft-Abstands-Kurve (force-distance-curve). Die Kraftspektroskopie kann in ihrer klassischen Anwendung Aussagen über die physikalischen Eigenschaften einer Probe liefern [10, 11]. Sie kann Aussagen über die Härte der Probe oder die Adhäsion [12, 13] treffen. Durch die Funktionalisierung einer AFM-Spitze ist es auch möglich, chemische Eigenschaften auch von biologischen Proben zu untersuchen [14]. Funktionalisieren bedeutet in diesem Fall, dass ein Molekül auf der Spitze verankert wird. Durch das Aufbringen einer Amino-Gruppe auf die Spitze kann ein einzelnes Protein gebunden werden. Durch Ziehen an der Spitze ist es somit möglich dieses Protein zu entfalten und anhand der Auswertung von Kraft-Distanz-Kurven Aussagen über die Häufigkeit und Länge einzelner Sekundärstrukturelemente (Helix, Faltblatt, Loop) zu treffen [15, 16]. Eine andere Möglichkeit, die Oberfläche von Zellen [17] oder Bakterien [18] auf bestimmte Proteine [19] zu untersuchen, ist die Funktionalisierung der Spitze mit einem bekannten Liganden. Über kinetische Analysen können auf diese Art und Weise einzelne Proteine [20]ausfindig gemacht werden. Mit dieser Technik können auch einzelne Bindungslängen biologischer Systeme untersucht werden [21, 22, 23]. Eine direkte molekülspezifische Charakterisierung ist mit der Kraftspektroskopie jedoch nicht möglich. Hierzu bedarf es weitergehender statistischer Auswertungsverfahren. Oft sind es nur kleinste Unterschiede in den Kraft-Distanz-Kurven, die dafür sorgen, dass sich zwei Moleküle unterscheiden lassen. Um solche komplexen Datensätze auszuwerten, bedarf es besonderer Methoden. In der Mathematik stehen hierfür verschiedene Verfahren [24] zur Verfügung, wie zum Beispiel die Hauptkomponentenanalyse (PCA, principal component analysis) [25], die Faktor- und Clusteranalyse [26] und die Partial Least Square Regression (PLS). Alle genannten Methoden lassen sich unter dem Begriff Multivariate Datenanalyse zusammenfassen [27, 28, 29]. Kernaufgabe der multivariaten Datenanalyse ist es, wichtige Informationen aus komplexen Datensätzen herauszufiltern, ohne dabei die Messwerte selbst zu verändern. Einsatz finden solche Methoden zum Beispiel in der Qualitätskontrolle großer Unternehmen [30]. Hier können viele Daten erhoben werden, etwa über schadhafte Produk-

te, Zulieferer und Prozessabläufe. Mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse ist es möglich, Korrelationen zwischen schadhaften Produkten und dem Zulieferer bestimmter Teile herzustellen. Solche Aussagen können oft nicht anhand der Rohdaten ausgemacht werden. Auch in die Wissenschaft haben multivariate Datenanalysemethoden Einzug gefunden. Vor allem in den Bereichen der Infrarot- und der Nah-Infrarot-Spektroskopie [31, 32] können mit der Hauptkomponentenanalyse oder verschiedener Clusterverfahren komplexe Spektren auf einzelne Moleküle untersucht und deren Vorkommen mit anderen Molekülen korreliert werden. Einsatz finden diese Methoden dann, wenn die klassische Bandenzuordnung nicht mehr möglich ist. Wichtig bei all diesen Methoden ist es, die Daten zu reduzieren, aber keine Informationen zu verlieren.

Ein weiterer Ansatz für molekülspezifische Untersuchungen mit hoher Ortsauflösung sind optische Verfahren. Besonders ist hier die Entwicklung nahfeld-optischer Methoden (SNOM, scanning near-field optical microscopy) [33] zu nennen. In der klassischen beugungsbegrenzten Mikroskopie hängt die Auflösung von der Wellenlänge des einfallenden Lichts ab. Theoretisch können so nur Objekte abgebildet werden, die größer als 200 bis 300 Nanometer sind. Mithilfe der Nahfeld-Mikroskopie kann das Abbe-Limit umgangen werden und Strukturen kleiner als 100 Nanometer können aufgelöst werden. Für diese Art der Mikroskopie werden submikroskopische Lichtquellen benutzt, die nahe an die Probe herangebracht werden. Meist handelt es sich dabei um Spitzen mit einer kleinen Öffnung (Apertur), durch die das Licht geleitet wird. Es ist jedoch auch möglich, eine Spitze ohne Apertur einzusetzen. Diese als Streu-SNOM (sSNOM, scattering near-field optical microscopy) [34] bezeichnete Methode erlaubt eine noch höhere Auflösung.

Mit nahfeld-optischen Methoden können Oberflächen jetzt mit einer hohen Ortsauflösung untersucht werden. Es besteht jedoch zunächst noch keine Möglichkeit, molekülspezifische Charakteristika zu detektieren. Dazu bieten sich spektroskopische Methoden wie etwa die Raman-Streuung an. Ein Nachteil der Raman-Spektroskopie ist das schwache Signal des emittierten Lichts. Eine Möglichkeit, das Raman-Signal zu verstärken, wurde 1974 von Fleischmann entdeckt [35]. Die Intensitäten der Raman-Signale von Pyridin waren dann stark erhöht, wenn die Moleküle auf einer rauen Silberelektrode aufgebracht waren. Erst später konnten die Gründe für die Verstärkung genau geklärt werden [36, 37]. In der Folge wurde

dieses Phänomen als oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS, surface enhanced Raman scattering) bezeichnet. Große Erfolge konnten mit Silberinseln erzielt werden, bei der kleine Silberpartikel auf einer Oberfläche verstreut vorliegen und somit eine Vielzahl aktiver Bereiche darstellen [38, 39]. Mit dieser Kombination aus Nahfeldoptik und oberflächenverstärkter Raman-Streuung wurden in der Folge viele unterschiedliche Moleküle wie etwa Kohlenstoff-Nanoröhren sowie DNA-Basen [40, 41, 42], Peptide und Bakterienzellen untersucht. Als großer Nachteil der Methode stellte sich die uneinheitliche Verstärkung der SERS-aktiven Bereiche auf der Oberfläche heraus. Gründe hierfür waren hauptsächlich die zu hohe Anzahl an Partikeln und deren unterschiedliche Größen.

Wessel machte den Vorschlag, die aktiven Partikel auf die Spitze eines Rastersonden-Mikroskops zu bringen [43]. Dieser Idee folgend konnten erste Untersuchungen mit dieser als spitzenverstärkter Raman-Streuung (TERS, tip-enhanced Raman scattering) bezeichneten Methode an Brillant-Kresyl-Blau und Buckminsterfullerenen ( $C_{60}$ ) gezeigt werden [44]. Durch Beschichtung der Spitze mit Silber konnten Partikel mit einem Durchmesser kleiner als 100 nm erreicht werden. Als limitierend für die Auflösung wirkt sich hier nur die Größe der Spitze aus. In dieser Methode vereinen sich mehrere Vorteile der Nahfeldoptik, der oberflächenverstärkten Raman-Streuung und der Rastersonden-Verfahren. Gleichzeitig können sowohl optische wie auch topographische Signale mit einer hohen Auflösung gemessen werden. Das schwache Raman-Signal wird zusätzlich von dem Silberpartikel verstärkt. Im Folgenden konnten mit TERS weitere Moleküle wie etwa Malachit-Grün [45, 46], Kohlenstoff-Nanoröhren [47] oder auch Nukleotid-Basen sowie RNA-Stränge [48, 49] untersucht werden. Doch nicht nur einzelne Moleküle, sondern auch ganze Zellen, Bakterien [50, 51, 52] oder Viren lassen sich untersuchen.

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, die Oberflächen von biologischen Proben mit rasterkraftmikroskopischen Methoden zu untersuchen und charakteristische physikalische und chemische Eigenschaften zu finden. Zwei Methoden stehen hierbei im Vordergrund. Zum einem wird eine Methode entwickelt, die auf der Kraftspektroskopie basiert und diese mit verschiedenen multivariaten Datenanalysemethoden kombiniert [53]. Es soll gezeigt werden, dass es möglich ist, chemische und physikalische Eigenschaften aus Kraft-Distanz-Kurven zu extrahieren und somit Unterschiede zwischen verschiedenen Materialien herauszufinden. Durch

die Entwicklung eines geeigneten Modellsystems soll gezeigt werden, dass zwei Materialien mit unterschiedlichen Eigenschaften durch Clusteranalyse und Hauptkomponentenanalyse voneinander getrennt werden können. Die Methode soll dann an einem komplexeren System mit mehreren Komponenten verifiziert werden.

In einem zweiten Ansatz wird die spitzenverstärkte Raman-Streuung als eine alternative Methode zur Oberflächenanalyse herangezogen. Die Untersuchungen sollen an Bakterienzellen von *Staphylococcus epidermidis* und an Fragmenten der Zellmembran von *Halobacterium salinarum* vorgenommen werden. Bei *Staphylococcus epidermidis* ist die Zusammensetzung der Zellwand wie auch charakteristische Proteine auf der Oberfläche von Interesse. Die Membran von *Halobacterium salinarum* enthält verschiedene Bereiche, die von unterschiedlichen Proteinen besetzt sind. Von Interesse ist hierbei die räumliche Verteilung der Membranbereiche.

## 2 Theorie

In dieser Arbeit wurden eine Vielzahl verschiedener Methoden verwendet, die oft nicht in direktem Zusammenhang zueinander stehen. Um einen genauen Überblick zu geben, werden die Verfahren im Folgenden besprochen.

### 2.1 Rasterkraft-Mikroskopie

Die Entwicklung der Rastertunnel-Mikroskopie (STM, scanning tunneling microscopy) durch Gerd Binnig und Heinrich Rohrer im Jahre 1981/1982 [3] legte den Grundstein zu einer Vielzahl von Rastersondenverfahren zur Analyse von Oberflächen auf der Nanometerskala. Waren bei der Rastertunnel-Mikroskopie leitfähige Materialien notwendig, um eine Abbildung der Oberfläche zu erhalten, änderte sich dieses mit der Entwicklung des Rasterkraft-Mikroskops (AFM, atomic force microscope) im Jahre 1986 [5]. Die Messung von Kräften anstatt von Tunnelströmen zwischen einer Spitze und der Probe ermöglichte auch die Untersuchung von halbleitenden und sogar isolierenden Proben. Wie bei allen Rastersondenverfahren ist auch bei der Rasterkraft-Mikroskopie die Beschaffenheit der eingesetzten Spitze von Bedeutung. Vorwiegend werden Spitzen aus Silizium oder Siliziumnitrid eingesetzt. Die Größe der Spitze liegt meist unter  $10\text{ nm}$ .

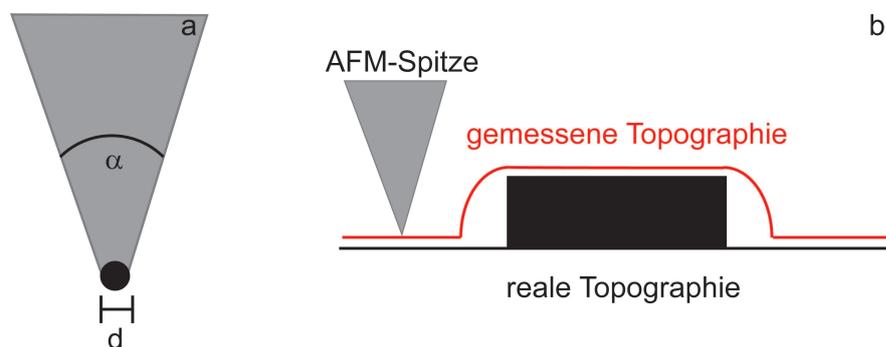


Abb. 1: Die AFM-Spitze wird über den Öffnungswinkel und den Durchmesser definiert (a). Je kleiner beide Werte sind, desto genauer können Topographien aufgenommen werden. Bei Spitzen mit großem Durchmesser und großem Öffnungswinkel treten Artefakte auf. Die gemessene Topographie weicht von der realen Topographie ab (b).

Definiert wird die Spitze über den Öffnungswinkel  $\alpha$  und den Durchmesser  $d$  (vgl. Ab-

bildung 1 a). Beide Werte müssen möglichst klein sein, um Artefakte während der Messung zu unterbinden. Abbildung 1 b zeigt schematisch den Einfluss des Winkels und des Radius der Spitze auf die topographische Messung. Deutlich ist zu erkennen, dass sich die gemessene Topographie von der realen Topographie unterscheidet. Je kleiner nun der Radius und der Winkel sind, desto genauer kann die Topographie aufgenommen werden. Die Spitzen sind auf einem Federbalken, dem sogenannten Cantilever, montiert, der durch eine Kraftkonstante ( $k$ ) charakterisiert ist. Die Annäherung der Spitze an die Probe und die Nachführung während der Messungen geschehen über einen Regelkreis (feedback-loop). Hierzu wird der Cantilever auf einem Piezoelement fixiert. Der Regelkreis, der meist über einen Proportional-Integral-Regler betrieben wird, hält die Spitze in einem definierten Abstand über der Probe. Für die Aufnahme von Topographien stehen bei der Rasterkraft-Mikroskopie verschiedene Modi zur Verfügung. Die Spitze kann sowohl in direktem Kontakt mit der Probe (Contact-Modus), nie in Kontakt mit der Probe (Attractive-force-Modus) gebracht werden oder aber soweit ange nähert werden, dass sie nur kurzen Kontakt mit der Probe hat (Intermittent-Contact-Modus/ Non-Contact) [54].

### Statische Verfahren

Im Kontakt-Modus wird die Spitze in direkten Kontakt mit der Probe gebracht. Sie wird elastisch auf die Probe gedrückt und es treten mechanische Wechselwirkungen auf. Hierbei wird der Cantilever, entsprechend der Topographie der Probe, vertikal ausgelenkt. Diese Auslenkung wird dann mit Hilfe des Lichtzeigerprinzips detektiert. Bei diesem Prinzip wird ein Laserstrahl so auf die Rückseite des Cantilevers justiert, dass der Strahl in das Zentrum einer Vier-Quadranten-Photodiode gelenkt wird (vgl. Abbildung 2).

Das Messsignal ist hierbei der Photostrom der Diode  $I_{Diode}$ . Die Differenz zwischen den beiden oberen Quadranten (A und B) und den unteren Quadranten (C und D) ist proportional zum Verfahrweg  $z$  des Piezoelementes.

$$(I_A + I_b) - (I_C + I_D) = \sigma \cdot z \quad (2.1)$$

$\sigma$  entspricht der Proportionalitätskonstante. Aus messtechnischen Gründen wird der Strom

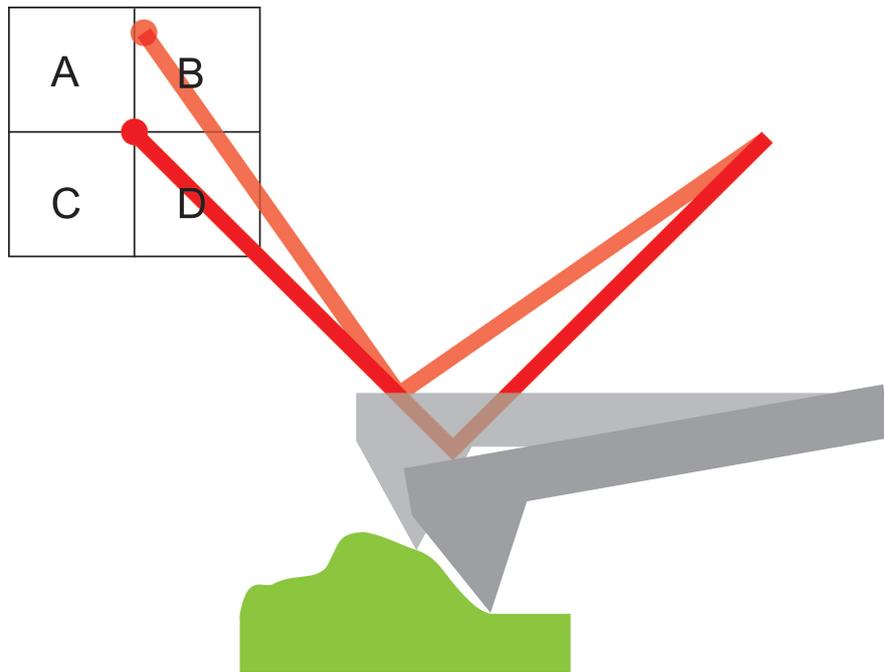


Abb. 2: Eine Vier-Quadranten-Diode wird dazu verwendet, die lateralen und vertikalen Auslenkungen des Cantilevers während der Messung zu detektieren. Die Veränderungen in den gemessenen Strömen können dann in Kräfte umgerechnet werden (siehe Text).

durch einen Strom-Spannungs-Wandler in eine Spannung überführt:

$$U = \phi \cdot I \quad (2.2)$$

$\phi$  entspricht hierbei einer Gerätekonstante. Für die auf den Cantilever wirkende Kraft folgt dann:

$$F_{Lever} = \frac{k}{\sigma \cdot \phi} \cdot U \quad (2.3)$$

Hierbei ist  $k$  die Kraftkonstante des Cantilevers. Der Vorteil einer Vier-Segment-Diode liegt darin, dass nicht nur die vertikalen Bewegungen detektiert, sondern gleichzeitig auch laterale Bewegungen dargestellt werden können. Laterale Bewegungen geben Auskunft über auftretende Reibungskräfte zwischen Spitze und Probe (Friction Force). Diese können Hinweise über chemische Unterschiede der Probe bei sonst gleicher Topographie liefern.

Die Aufnahme der Topographie kann auf zwei Arten geschehen. Bei der Messung mit konstanter Höhe (constant height) wird die Biegung des Cantilevers und damit auftretende Kräfte gemessen. Bei der am häufigsten verwendeten Messung mit konstanter Kraft (constant

force) dagegen wird der Cantilever mit Hilfe eines Piezoelement so über der Probe gehalten, dass möglichst eine konstante Kraft zwischen Probe und Spitze herrscht. Erreicht wird dies dadurch, dass das Auslenkungssignal des Cantilevers in den Regelkreis mit einfließt. Meist handelt es sich um einen Proportional/Integral-Regler (P/I-Regler), bei dem die Regelung des Abstands zwischen Probe und Spitze zum einen von einer Zeitkonstante für den integralen Wert, zum anderen von einem Wert für den proportionalen Teil abhängt. Beide Werte zusammen bestimmen die Schnelligkeit und die „Intensität“ der Antwort des Piezoelements und damit der Spitze auf die topographischen Gegebenheiten der Oberfläche und richten sich nach den speziellen Anforderungen von Probe und Spitze.

### Dynamische Verfahren

Einen anderen Ansatz verfolgen die sogenannten „Non-Contact“ und „Intermittent-Contact“ Modi. Sie gehören zu den dynamischen Verfahren, bei denen anstelle einer statischen Auslenkung des Cantilevers die Änderung erzwungener Oszillationen über der Probe gemessen wird. Hierzu wird der Cantilever durch ein Piezoelement mit einer Frequenz nahe seiner Resonanzfrequenz zur Schwingung angeregt.

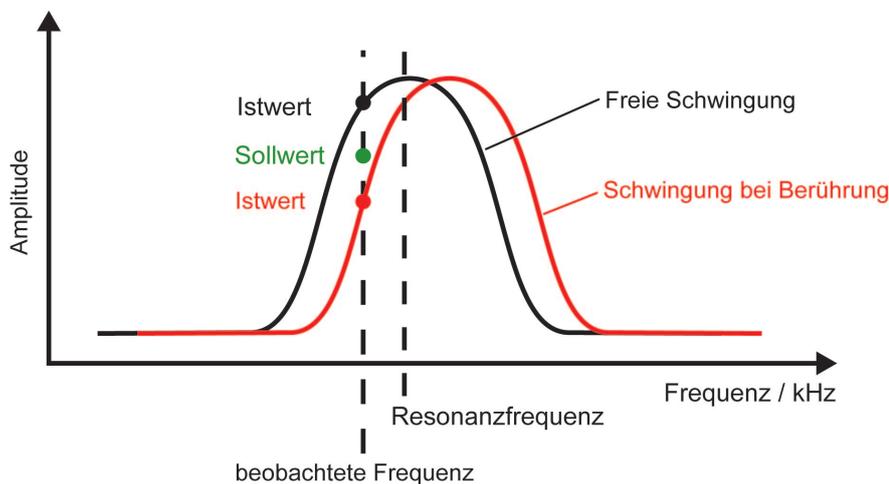


Abb. 3: Bei den dynamischen Verfahren werden die Cantilever zur Oszillation angeregt. Nahe der Resonanzfrequenz wird die Veränderung Amplitude bei Annäherung an die Probe beobachtet. Durch Wechselwirkungen wird die Amplitude gedämpft und die Resonanzfrequenz zu höheren Frequenzen verschoben (rot). Der Istwert ist dann geringer als der Sollwert (grün) und die Spitze wird so weit zurückgezogen, dass der Istwert wieder über dem Sollwert liegt.

Die Resonanzfrequenz wird dann genutzt, um einen Sollwert („Set-Point“) (vgl. Abbildung 3 grün) festzulegen, der die Dämpfung der Spitze bestimmt. Anders als im stati-

schen Modus wir hier die Änderung der Amplitude bei einer festen Frequenz beobachtet. In der Praxis wird jedoch eine Frequenz unterhalb der Resonanzfrequenz (vgl. Abbildung 3) gewählt. Zu Beginn der Messung schwingt der Cantilever frei. Wird die Spitze der Probe angenähert, treten Wechselwirkung zwischen Probe und Spitze auf und die Amplitude der Schwingung wird gedämpft. Hierbei verschiebt sich die Resonanzfrequenz des Cantilevers hin zu höheren Frequenzen (rote Kurve in Abbildung 3). Der Wert der für die Amplitude an der beobachteten Frequenz (Istwert) ist nun geringer als der vorgegebene Sollwert. Um den Ausgangszustand wieder herzustellen, wird die Spitze über das Piezoelement zurückgezogen, bis der Istwert wieder über dem Sollwert liegt.

### **Kräfte**

Die auftretenden Kräfte zwischen der Spitze und der Probe lassen sich in zwei Gruppen einteilen: anziehende (attraktive) und abstoßende (repulsive) Kräfte. Nähert sich die Spitze der Probe an, können in einer Entfernung von einigen Mikrometern zur Probe elektrostatische Kräfte auftreten. In Entfernungen von einigen Nanometern bis hin zu Atomabständen werden die elektrostatischen Kräfte durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen, Kapillarkräfte und chemische Potenziale ergänzt. Während des Kontaktes der Spitze mit der Probe treten hauptsächlich abstoßende Kräfte auf. Diese entstehen, wenn die Elektronenwolken von Spitze und Probe beginnen, sich zu überlagern. Wird die Spitze von der Probe zurückgezogen, treten starke Adhäsionskräfte auf, die den Cantilever auf der Probe zu halten versuchen.

## **2.2 Kraftspektroskopie**

Neben der topographischen Information können mit Hilfe der Rasterkraft-Mikroskopie auch weitere Informationen über die physikalischen Eigenschaften der Probe gewonnen werden. Die Kraftspektroskopie nutzt dabei die Möglichkeit, mit der kleinen Spitze auch kleinste Kräfte bis hin zu einigen Piko-Newton zu messen. Bei jedem kraftspektroskopischen Experiment entsteht durch Annäherung und Rückzug der Spitze eine Kraft-Abstands-Kurve, die die auftretenden Kräfte in Abhängigkeit von der Entfernung zur Probe darstellt. Das Aussehen dieser Kurve ist bei jedem Experiment im Grundaufbau gleich, erfährt jedoch, je nach Art und Zusammensetzung der Probe, kleine Abweichungen, die zur Bestimmung der

physikalischen Eigenschaften herangezogen werden können.

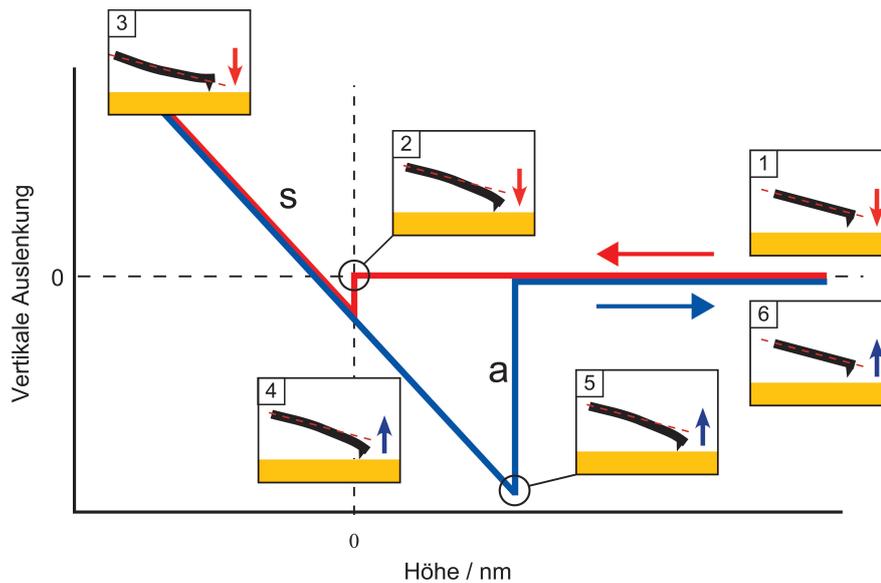


Abb. 4: Kraft-Distanz-Kurven haben eine typische Form, die durch die Wechselwirkung von Spitze und Probe auftreten. Zu Beginn der Messung befindet sich die Spitze über der Probe (1). Hierbei treten keine Kräfte auf. Bei der Annäherung an die Probe springt die Spitze, bedingt durch starke anziehende Kräfte, auf die Probe (2). Die Spitze wird nun weiter auf die Probe gedrückt, wobei starke abstoßende Kräfte wirken (3). Beim Zurückziehen der Spitze wird diese im Kontakt mit der Probe gehalten, da die anziehenden Kräfte stärker sind als die Kraft mit der am Cantilver gezogen wird (4). Wird die Zugkraft größer als die anziehenden Kräfte, löst sich die Spitze von der Probe und schnell zurück (5). Zum Ende der Kraft-Distanz-Kurve befindet sich der Cantilever wieder in der Ausgangsposition (6). Sowohl die Steigung  $s$  als auch die Adhäsion  $a$  stellen Materialeigenschaften dar.

Zu Beginn des Experimentes befindet sich die Spitze in ausreichender Distanz über der Probe (vgl. Abbildung 4.1). Die Kräfte, die auf den Cantilever einwirken, sind in dieser Höhe nicht mehr messbar. Während der Annäherung treten attraktive Kräfte auf, die die Spitze in Richtung der Probe ziehen. Werden die attraktiven Kräfte so groß, dass der Cantilever sie messen kann, wird die Auslenkung so groß, dass die Spitze in Kontakt mit der Oberfläche kommt (Abbildung 4.2). Der Cantilever wird dabei stark gebogen. Dieser Punkt wird als „Snap-In“- oder Einschnapp-Punkt bezeichnet. Zur Messung der repulsiven Kräfte wird der Cantilever weiter auf die Probe zu bewegt.

Die repulsiven Kräfte treten durch Überlagerung der Elektronenwolken von Spitze und Probe auf. Durch diese Abstoßung wird der Cantilever von der Probe weg gebogen (Abbildung 4.3). Beim Zurückziehen der Spitze (Abbildung 4.4) nehmen die repulsiven Kräfte so weit ab, dass der Cantilever keine Biegung mehr erfährt. Bei weiterem Zurückziehen nehmen die attraktiven Kräfte zu und biegen den Cantilever entgegen der Rückzugsrichtung. Wird die Kraft mit der der Cantilever zurückgezogen wird stärker als die attraktiven Kräfte zwi-

schen Probe und Spitze, springt der Cantilever von der Probe zurück (Abbildung 4.5). Dieser als „Snap-Off“- oder Abreiß-Punkt bezeichnete Bereich markiert die Stelle der Kurve, an der keine Kräfte mehr auf die Spitze wirken (Abbildung 4.6). Die beiden charakteristischen Werte von Kraft-Distanz-Kurven sind die Steigung  $s$  und die Adhäsion  $a$ . Diese Werte werden berechnet und können als Karten dargestellt werden.

### 2.3 Raman-Spektroskopie

Der Inder Chandrasekhara Venkata Raman veröffentlichte im Jahre 1928 seine Entdeckung über die modifizierte Streustrahlung an Molekülen in Lösung und begründete so die Raman-Spektroskopie. Diese beruht im Wesentlichen auf dem sogenannten Raman-Effekt.

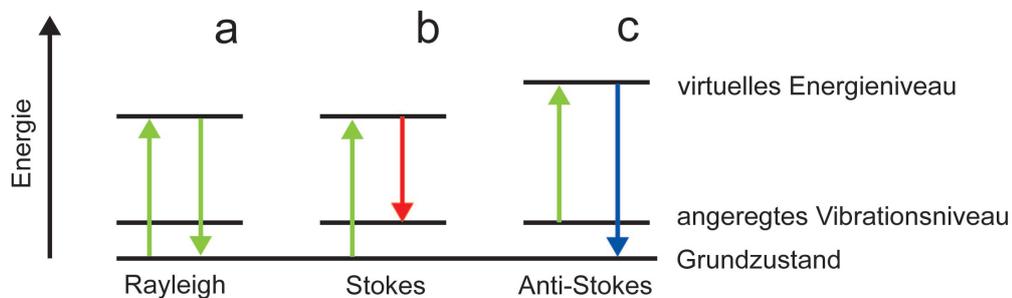


Abb. 5: Schematische Darstellung des Raman-Effektes. Frequenz und Energie des eingestrahlteten Photons (grün) werden auf das Molekül übertragen. Das gestreute Photon kann dann dieselbe Energie und Frequenz (a) haben, eine geringere Energie und Frequenz (b) oder eine höhere Energie und Frequenz (c) haben. Bleibt die Energie gleich, wird dies als Rayleigh-Streuung bezeichnet. Ist die Energie geringer, findet eine Rotverschiebung statt und die Streuung wird als Stokes-Streuung bezeichnet. Bei einer höheren Energie findet eine Blauverschiebung statt. Dies wird als Anti-Stokes bezeichnet.

Abbildung 5 skizziert den Raman-Effekt. Wird Licht als Strom von Photonen betrachtet und auf eine Probe gelenkt, so stoßen die Photonen mit den Molekülen zusammen. Dabei können drei Streu-Arten beobachtet werden, die entsprechend der Wellenlänge des emittierten Lichts unterschieden werden.

Handelt es sich dabei um einen elastischen Stoß, wird die Energie nicht verändert. Dieser Prozess wird als Rayleigh-Streuung bezeichnet. Durch die Energie eines eingestrahlteten Photons wird das Molekül in einen virtuellen Energiezustand überführt. Durch Abgabe der gesamten aufgenommenen Energie über das gestreute Photon, fällt das Molekül zurück in den energetischen Grundzustand. Die Energie des gestreuten Photons ist somit gleich der Energie des eingestrahlteten Photons (vgl. Abbildung 5 a). Bei einer Kollision zwischen Photon und

Molekül besteht eine geringe Wahrscheinlichkeit, dass eine Energieübertragung stattfindet. Es handelt sich dann um eine inelastische Streuung, die als Raman-Effekt bezeichnet wird. Hierbei gibt es zwei Möglichkeiten: Stokes- und Anti-Stokes-Streuung. Durch die Energie eines eingestrahnten Photons wird das Molekül wieder in ein virtuelles Energieniveau überführt. Fällt das Molekül auf ein angeregtes Vibrationsniveau zurück ist die Energie des abgestrahlten Photons geringer. Diese Art des Energieüberganges wird als Stokes-Streuung bezeichnet (Abbildung 5 b). Befindet sich ein Molekül in einem thermisch angeregten Vibrationsniveau und wird durch ein Photon angeregt, kann das Molekül vom virtuellen Zustand in den Grundzustand überführt werden. Die Energie des gestreuten Photons ist dann höher als die des eingestrahnten Photons. Dieser Prozess wird als Anti-Stokes-Streuung bezeichnet (Abbildung 5 c). Sowohl bei der Stokes- als auch bei der Anti-Stokes-Streuung finden, bedingt durch die Energieänderungen, Verschiebungen in den Frequenzen der Photonen statt. stokes-gestreuete Photonen haben eine geringere, anti-stokes-gestreuete Photonen haben eine höher Frequenz.

In der klassischen Sichtweise wird ein Molekül mit einem elektromagnetischen Feld  $\vec{E}$  und einer Frequenz  $\nu$  angeregt:

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \sin 2\pi\nu t \quad (2.4)$$

Dieses Feld induziert im Molekül ein Dipolmoment  $\vec{\mu}$ :

$$\vec{\mu} = \alpha \vec{E} = \alpha \vec{E}_0 \sin 2\pi\nu t \quad (2.5)$$

Hierbei ist  $\alpha$  die Polarisierbarkeit des Moleküls. Der Dipol schwingt mit der Frequenz  $\nu$  und emittiert Licht derselben Frequenz, die Rayleigh-Streuung. Schwingt der Dipol mit der Frequenz  $\nu_\nu$  einer seiner Normal-Moden, so verschiebt sich die Elektronenwolke um das Atom periodisch und ändert somit die Polarisierbarkeit:

$$\alpha = \alpha_0 + \beta \sin 2\pi\nu_\nu t \quad (2.6)$$

mit dem statischen Diolmoment  $\alpha_0$  und der Polarisierbarkeit  $\beta$ . Für das induzierte Dipolmo-

ment folgt dann:

$$\vec{\mu} = (\vec{\alpha}_0 + \beta \sin 2\pi\nu_\nu t) \vec{E}_0 \sin 2\pi\nu t \quad (2.7)$$

Durch Umforman ergeben sich drei Terme:

$$\vec{\mu} = \underbrace{\alpha_0 \vec{E}_0 \sin 2\pi\nu t}_{\text{Rayleigh}} - \frac{1}{2} \beta \vec{E}_0 \left[ \underbrace{\cos 2\pi(\nu + \nu_\nu)t}_{\text{Anti-Stokes}} - \underbrace{\cos 2\pi(\nu - \nu_\nu)t}_{\text{Stokes}} \right] \quad (2.8)$$

Der induzierte Dipol  $\vec{\mu}$  emittiert also drei Arten von Strahlung. Im ersten Term, der den Teil der Rayleigh-Streuung beschreibt, ist die Energie gegenüber dem eingestrahnten Licht unverändert. Der zweite Term beschreibt die Anti-Stokes-Streuung. Hier sind Energie und Frequenz erhöht. Der dritte Term beschreibt die Stokes-Streuung, bei der Energie und Frequenz des emittierten Lichts geringer sind als beim eingestrahnten Licht. Für den Fall, dass die Polarisierbarkeit  $\beta$  des Moleküls gleich Null ist, tritt keine Raman-Streuung auf.

Die klassische Raman-Theorie erklärt zwar die Berechnung des induzierten Dipols, jedoch nicht die Intensität der emittierten Strahlung. Hierzu ist eine quantenmechanische Betrachtung notwendig. Die Intensität der Raman-Streuung ist abhängig von der Intensität  $I_0$  und der Wellenlänge  $\nu^4$  des anregenden Lasers sowie vom Polarisierbarkeitstensor  $|\alpha|^2$  des Moleküls.

$$I_{\text{Raman}} = I_0 \nu^4 |\alpha|^2 \quad (2.9)$$

wobei der Streutensor mittels Streuungstheorie zweiter Ordnung beschrieben wird.  $I_0$  wird definiert als:

$$I_0 = EE^* \quad (2.10)$$

Hierbei ist  $EE^*$  das quadrierte elektrische Feld.

## 2.4 Oberflächenverstärkte Raman-Streuung

Im Vergleich zur Rayleigh-Streuung oder Fluoreszenz, ist die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Raman-Photons gering. Um unter normalen Bedingungen ein Raman-Spektrum aufnehmen zu können, wird eine Lichtquelle (Laser), ein empfindlicher Detektor und eine große Zahl streuender Moleküle benötigt. Gerade die Anzahl streuender Moleküle macht die Raman-Spektroskopie im Bereich der Oberflächenanalytik und der biologischen Analyse zu einer nur schwer nutzbaren Technik. In den genannten Bereichen liegen meist nur geringe Mengen an Probenmaterial vor, was die Raman-Spektroskopie zusätzlich erschwert.

Vor etwa dreissig Jahren beobachteten zuerst Fleischmann [35], dann auch Van Duyne [37] und Creighton [36] hohe Raman-Intensitäten bei Proben, die auf einer rauen Silberelektrode adsorbiert worden waren. Van Duyne folgerte, dass die Verstärkung des Raman-Signals mit der Kontaktfläche von Molekül und Silber abhängt. Diese seitdem als oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS, surface-enhanced Raman scattering) bezeichnete Technik wurde in den darauffolgenden Jahren immer weiter verbessert. Als Hauptfaktoren für die Verstärkung des Signals stellten sich der Grad der Rauigkeit der Oberfläche und die Wahl des verstärkenden Materials heraus. Je nach gewählter Anregungswellenlänge zeigten Silber, Gold oder Kupfer ausreichend große Verstärkungsfaktoren.

Heutzutage ist bekannt, dass die Verstärkung des Raman-Signals auf zwei verschiedenen Mechanismen beruht: der elektromagnetischen und der chemischen Verstärkung. In Summe können durch beide Mechanismen Verstärkungsfaktoren von  $10^6$  bis  $10^8$  oder höher erreicht werden. Diese werden benötigt, um das schwache Raman-Signal von Proben niedriger Konzentration messen zu können.

### Verstärkungsmechanismen

Bei der Betrachtung der Berechnung der Raman-Intensitäten bestehen zwei Möglichkeiten, die Intensitäten zu verstärken. Einerseits durch die Verstärkung des elektromagnetischen Feldes (a) oder durch verstärken des Polarisierbarkeits-Tensors (b) (vgl. Kapitel 2.3).

### a) Elektromagnetische Verstärkung

Der elektromagnetische Effekt beruht auf der Induktion von sogenannten lokalisierten Plasmonen auf der Oberfläche eines rauen Metalls [38]. Mit Plasmonen wird die Menge an kollektiver Oszillation freier Elektronen gegen die positiv geladenen Kerne eines Metalls bei Frequenzen im optischen Spektrum bezeichnet. Die Oberflächen-Plasmonen beschreiben somit die Fluktuationen der Elektronenwolke an der Metall-Umgebungsgrenze. Bei glatten Oberflächen breitet sich das elektrische Feld parallel zum Metall aus und strahlt deshalb nicht. Wird die Oberfläche jedoch aufgeraut, sind die Plasmonen nicht mehr nur auf eine Ausbreitungsrichtung festgelegt, sondern sie können auch senkrecht zur Oberfläche verlaufen. Aufgrund des resonanten Charakters der lokalisierten Plasmonen tritt eine Polarisierung und eine Vergrößerung des elektrischen Feldes ein. Metalle wie Gold, Silber und Kupfer haben Plasmonen-Resonanzen im Bereich des sichtbaren bzw. ultravioletten Lichts und eignen sich daher besonders für die Verstärkung. Nicht nur die Art des Metalls hat einen Einfluss auf die Verstärkung des Raman-Signals. Für die lokalisierten Plasmonen spielen hauptsächlich Größe und Form der Partikel eine Rolle. Die Verstärkungsfaktoren für oberflächen-verstärkte Raman-Streuung liegen, je nach Metall und Beschaffenheit der Oberfläche, zwischen 3 und 15 Größenordnungen höher als bei Messungen mit konventionellem Raman [55].

Die Reichweite des verstärkenden Feldes ( $E$ ) nimmt mit der Distanz  $d$  zum Partikel (Radius des Partikels  $r$ ) ab [56]:

$$E_{\text{verstaerkt}} \propto \left(\frac{r}{r+d}\right)^{12}. \quad (2.11)$$

Für eine Monolage Moleküle gilt [39]:

$$E_{\text{verstaerkt}} \propto \left(\frac{r}{r+d}\right)^{10}. \quad (2.12)$$

Neben der Distanzabhängigkeit zeigen die Formeln auch, dass je größer ein Partikel ist, die Reichweite erhöht wird. Die Verstärkung wird dagegen nicht weiter erhöht.

### (b) Chemische Verstärkung

Der Mechanismus der chemischen Verstärkung beruht auf kurzreichweitigen Wechselwirkungen zwischen Probe und Oberfläche. Durch die Art der Chemisorption des Moleküls an die Oberfläche kann die Polarisierbarkeit erhöht werden. Die Erhöhung der Polarisierbarkeit ist vermutlich auf „charge-transfer“-Effekte zurückzuführen. Da diese Verstärkung von der Bindung zwischen Molekül und Oberfläche abhängt, wird nur die erste Lage von Molekülen, die auf dem verstärkenden Partikel adsorbiert ist, einbezogen [39].

## 2.5 Nahfeld-Optik

Während seiner Forschungen über die Bildentstehung im Mikroskop und das mikroskopische Auflösungsvermögen beschrieb Ernst Abbe 1873, dass es eine Auflösungsgrenze gibt, das Beugungslimit  $d$ . Dieses hängt von der Wellenlänge  $\lambda$  des genutzten Lichts, der Brechzahl  $n$  des Mediums und dem Öffnungswinkel  $\alpha$  des Objektivs ab [57].

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} \quad (2.13)$$

Für das sichtbare Licht bedeutet dies eine maximale Auflösung von etwa 200 nm. Unter idealen Bedingungen kann so zum Beispiel für ein Objektiv mit einer numerischen Apertur von 0,9 und einer Wellenlänge von 500 nm eine Auflösung von 280 nm angenommen werden.

$$d = \frac{500nm}{2 \cdot 0,9} = 278nm \quad (2.14)$$

Rayleigh entwickelte aufbauend auf der Theorie von Abbe eine weitere Theorie. Demnach lassen sich zwei Punkt-Streuer dann noch voneinander unterscheiden, wenn im Beugungsbild das Minimum des einen Streuers auf das Maximum des zweiten Streuers fällt [58]. Dieses so genannte Rayleigh-Kriterium wird definiert als:

$$\sin \theta_R = 1,22 \frac{\lambda}{d} \quad (2.15)$$

Dies bedeutet für die Auflösung:

$$d = 1,22 \frac{\lambda}{\sin \theta_R} \quad (2.16)$$

Dabei ist  $\lambda$  die Wellenlänge des benutzten Lichts und  $n \sin \theta$  die numerische Apertur der verwendeten Linse. Das Rayleigh-Kriterium gilt dann, wenn Beugung auftritt. Dies geschieht, wenn der Abstand zwischen der Linse und der Probe wesentlich größer ist als die Wellenlänge. Das Limit der Auflösung liegt dann bei etwa  $\frac{\lambda}{2}$

Die klassische Beugungstheorie gilt dann nicht mehr, wenn der Beobachtungsabstand zu den Objekten im Bereich der Wellenlänge des genutzten Lichts liegt. Das Rayleigh-Kriterium wird somit umgangen und es kann eine Auflösung kleiner als  $\frac{\lambda}{2}$  erreicht werden.

### **Nahfeldmikroskopie**

Aufgrund des Beugungslimits und der damit verbundenen Begrenzung der Auflösung, konnten mit herkömmlichen Mikroskopen kleinere Strukturen nicht mehr beobachtet werden. Im Jahre 1928 postulierte Synge zum ersten Mal, dass es möglich ist, mit einer kleinen Apertur und geringer Distanz zur Probe, das Beugungslimit zu umgehen [33]. Zu jener Zeit standen für eine Realisierung jedoch keine Methoden zur Verfügung. Alternative Methoden wie die Rasterelektronen-Mikroskopie, die Rastertunnel-Mikroskopie oder die Rasterkraft-Mikroskopie stellten in der Folgezeit Methoden zur Verfügung, Strukturen unterhalb des Beugungslimits sichtbar zu machen. Für organische Proben wurde jedoch der Ruf nach einer optischen Methode laut, da die rasternden Techniken hierfür nur bedingt geeignet waren. Die Kombination aus optischem Nahfeld und rasternden Verfahren führte zur Entwicklung der optischen Nahfeld-Mikroskopie (SNOM, scanning near-field optical microscopy). Hierzu wird, wie bei allen rasternden Verfahren, eine kurzreichweitige Wechselwirkung zwischen Probe und Spitze ausgenutzt, die als optisches Nahfeld bezeichnet wird. Um eine solche Wechselwirkung auszubilden, ist ein sogenanntes evaneszentes Feld notwendig. Ein solches evaneszentes Feld tritt dann auf, wenn eine die Apertur der submikroskopische Lichtquelle kleiner ist als die Wellenlänge des anregenden Lichts. Klassischerweise handelt es sich bei einer solchen Lichtquelle um eine angespitzte Faser mit einer Öffnung, die kleiner ist als

die Wellenlänge des eingestrahnten Lichts. Wird diese Spitze nun in die Nähe der Probe gebracht, so bewirkt sie eine Störung im optischen Nahfeld. Dies hat zur Folge, dass von der der Spitze gegenüberliegenden Seite Licht emittiert wird. Dieses Licht kann nun detektiert werden. Die Auflösung wird bei der SNOM nicht durch die Wellenlänge begrenzt, sondern durch die Geometrie, insbesondere durch die Größe der Öffnung an der Spitze. Die Auflösung konnte mit dieser Methode bis auf  $\frac{\lambda}{20}$  verbessert werden [59, 60].

Bei den submikroskopischen Lichtquellen wird zwischen zwei Typen unterschieden: aperturbasierte SNOM und Streu-SNOM (sSNOM, scattering SNOM).

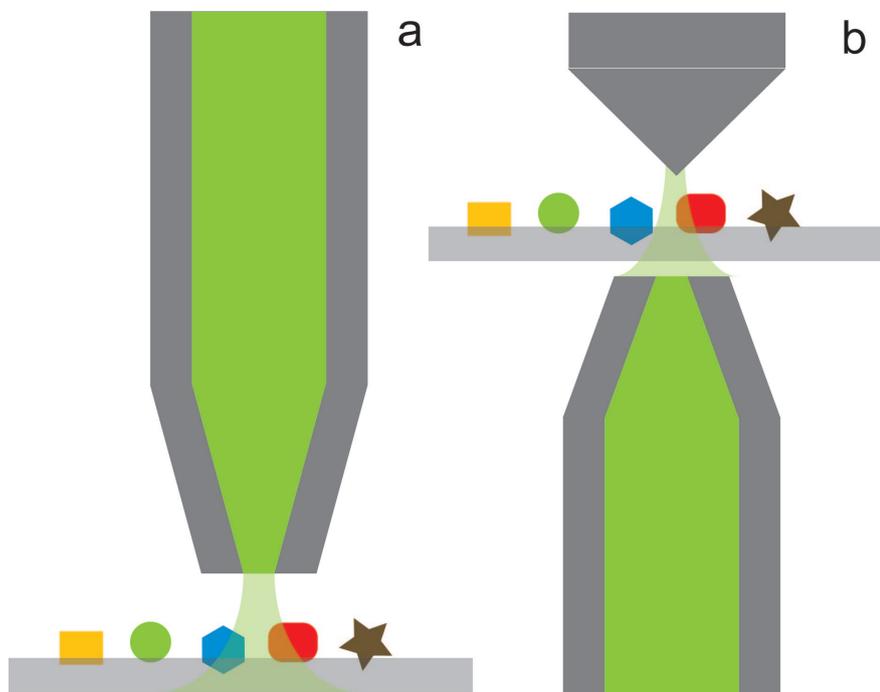


Abb. 6: Evaneszente Felder können mit zwei Arten von submikroskopischen Lichtquellen erreicht werden. Die Apertur-SNOM besteht aus einer Spitze mit einer Apertur von 30-100 *nm* (a). Alternativ hierzu kann eine Spitze ohne Apertur verwendet werden. Hierbei wird die Spitze von einer normalen Lichtquelle beleuchtet. Das evaneszente Feld entsteht dann an der kleinen (ca. 10 *nm*) Metallspitze (b).

### Apertur-SNOM

Bei der aperturbasierten SNOM wird eine optische Faser an ihrem Ende durch Ätzen oder Ziehen so verändert, dass eine Spitze von nur wenigen Nanometern Durchmesser entsteht. Diese Spitze wird mit einem Mantel aus Metall verspiegelt, wobei eine Öffnung (Apertur) von etwa 20-300 *nm* am Apex der Spitze verbleibt. Wird nun monochromatisches Licht (Laser), dessen Wellenlänge größer ist als der Aperturdurchmesser, in diese Faser eingekoppelt,

zeigt das Licht nach Durchtritt durch die Apertur die gewünschten Nahfeldeigenschaften (vgl. Abbildung 6 a). Innerhalb der Faser bricht die Lichtleitungseigenschaft zusammen, sobald die Wellenlänge des Lichts den Durchmesser überschreitet. In einem solchen Fall würde das Licht aus der Faser herausstreuen. Dies wird jedoch durch den Metallmantel verhindert. Nur ein geringer Teil des Lichts tritt durch die Öffnung, der Rest wird als Wärme abgegeben oder reflektiert.

### **Streu-SNOM (sSNOM)**

Die Streu-SNOM beruht dagegen auf einem anderen Prinzip. Anstelle einer Faser können metallbedampfte AFM-Spitzen wie auch Spitzen aus massivem Metalldraht (Silber, Gold) verwendet werden. Diese Art der Spitzen bietet die Möglichkeit, eine sehr kleine Lichtquelle herzustellen, wenn sie von außen beleuchtet werden (vgl. Abbildung 6 b). Während die Auflösung bei der Apertur-SNOM durch die Apertur begrenzt wird, ist bei der sSNOM in erster Näherung die Größe der Spitze (ca. 10 nm) der limitierende Faktor. Hier werden durch stark begrenzte Felder höhere Auflösungen erreicht. Nachteil dieser Methode ist das hohe Untergrundsignal in den Spektren, verursacht durch die Beleuchtung der gesamten Probe. Die Intensität des emittierten Lichts bei der sSNOM ist höher als bei aperturbasierter SNOM.

## **2.6 Spitzenverstärkte Raman-Streuung**

Die oberflächenverstärkte Raman-Streuung kann die schwachen Signale verstärken, indem die Probenmoleküle auf einen Silberinselfilm aufgebracht werden. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass nicht alle Silberpartikel SERS-aktiv, d.h. verstärkend, wirken. Auf der Oberfläche sind sogenannte „Hot-Spots“ zu beobachten, an denen die Verstärkung besonders hoch ist. Wessel entwickelte die Idee, den Silberpartikel in die Nähe der Probe zu bringen [43]. Zu diesem Zeitpunkt war aber keine Technik vorhanden dies zu realisieren. Später entstand die Idee, den aktiven Silberpartikel über eine Rastersondenspitze auf die Probe zu bringen. Im Jahre 2000 konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, auf diese Weise die schwachen Raman-Signale von Brilliant-Kresyl-Blau und  $C_{60}$  mit einem auf der Spitze eines Rasterkraft-Mikroskops lokalisierten Silberpartikels zu verstärken [44]. In der Folge wurde

diese Technik als spitzenverstärkte Raman-Streuung (TERS, tip-enhanced Raman scattering) bezeichnet [61, 62, 63]. Ähnlich wie bei der Herstellung von Silberinselfilmen wird auch beim TERS die Silberschicht auf die Spitze aufgedampft oder gesputtert. Zum Einsatz kommen hauptsächlich kommerzielle AFM-Spitzen aus Silizium. Es ist jedoch auch möglich, geätzte oder gezogene Glasspitzen oder massive Metallspitzen zu verwenden. Wichtig bei der Wahl der Spitze ist die Größe. Sowohl der Durchmesser als auch der Öffnungswinkel sollte klein sein, um einen kleinen Silberpartikel zu bilden. Gewöhnlich werden Spitzen mit einem Durchmesser zwischen 10 und 50 *nm* verwendet. Gegenüber der oberflächenverstärkten Raman-Streuung bietet TERS einige Vorteile. Die Lokalisierung des aktiven Partikels auf einer AFM-Spitze bietet die Möglichkeit, die Verstärkung gezielt auf die Probe zu bringen. Der durch die Größe der Spitze limitierte Silberpartikel bietet weiterhin eine höhere Auflösung. Da TERS mit einem Rastersonden-Verfahren kombiniert ist, kann mit der spektralen Information gleichzeitig auch die Topographie der Probe aufgenommen werden.

Betrieben wird TERS vornehmlich im „intermittent-contact“-Modus des Rasterkraft-Mikroskops (vgl. Kapitel 2.1). Dies hat den Vorteil, dass die Spitze in einen optimalen Abstand zur Probe gebracht werden kann, ohne das Silberpartikel zu zerstören oder zu entfernen. Die Oszillation der Spitze bewegt sich bei diesem Verfahren in einem Bereich von einigen Nanometern, sodass eine Abschwächung der Verstärkung um einen Faktor 100 bis 1000 möglich ist [64, 65]. Dies hat zur Folge, dass nur eine gemittelte Verstärkung angegeben werden kann.

## 2.7 Multivariate Datenanalyse

Für einen Menschen ist es schwierig, in einer großen Menge von Zahlenwerten, Muster zu erkennen [66]. Werden diese Zahlenwerte jedoch graphisch dargestellt, wird es wesentlich einfacher. Ein Hilfsmittel diese komplizierten Zusammenhänge einfacher darzustellen, bietet die Multivariate Datenanalyse. Unter diesem Oberbegriff wird eine Vielzahl von Methoden zur Auswertung zusammengefasst. Allen Methoden ist gemeinsam, aus einer großen Anzahl von Daten die relevanten Informationen herauszufiltern und Zusammenhänge zwischen verschiedenen Variablen herzustellen. Gängige Methoden der multivariaten Datenanalyse sind z.B. die Hauptkomponentenanalyse (PCA, principal component analysis), Clusteranalyse oder die Partial Least Square Regression (PLS) [67, 27].

Im Folgenden soll in die für diese Arbeit hauptsächlich verwendeten multivariaten Methoden, Hauptkomponentenanalyse, hierarchisches Clustern und K-Means-Clustern, eingeführt werden.

### 2.7.1 Hauptkomponentenanalyse

Im Jahre 1901 formulierte der Statistiker Karl Pearson zum ersten Mal eine Theorie zur Hauptkomponentenanalyse [24]. War diese Methode zunächst hauptsächlich im Bereich der Psychoanalyse anzutreffen, wurde sie ab den 1960er Jahren in der Biologie und der Chemie eingeführt. Die zunehmende Verbreitung, auch in den anderen Naturwissenschaften, gelang dann mit der steigenden Verfügbarkeit von Computern. Vor allem in der Spektroskopie ist die Hauptkomponentenanalyse nicht zu entbehren.

Das Prinzip der Hauptkomponentenanalyse beruht darauf, einen  $n$ -dimensionalen Datenraum auf einen  $m$ -dimensionalen Raum zu reduzieren bei dem  $m$  kleiner ist als  $n$  ist. Durch die Reduktion der Daten soll erreicht werden, dass für eine große Datenmenge ein überschaubares Modell erstellt wird, das die Daten jedoch möglichst gut beschreibt. Einfacher gesagt: Aus einem unübersichtlichen Datensatz mit versteckter Information entsteht ein Datensatz der die wichtigsten Information übersichtlich darstellt, ohne dabei relevante Informationen durch die Datenreduktion zu verlieren.

Die Reduktion der Daten erfolgt durch die Zusammenfassung stark miteinander korrelierter Variablen. Variablen, die korreliert sind führen zu weitgehend identischen Ergebnissen. Bei der Hauptkomponentenanalyse wird davon ausgegangen, dass sich hinter stark korrelierten Messgrößen eine dritte, nicht messbare Größe versteckt. Diese im Hintergrund stehenden Größen werden als Hauptkomponenten (PC, principal components) bezeichnet. Sie beinhalten die größte Varianz, die Hauptveränderungen der Daten, die ein Maß für den Informationsgehalt darstellt.

Die Hauptkomponentenanalyse arbeitet mit Daten, die als Punktwolke in einem  $n$ -dimensionalen Koordinatensystem vorliegen (Abbildung 7 a). In diese Punktwolke werden neue Koordinatenachsen gelegt und so rotiert, dass die erste Achse in Richtung der größten Varianz zeigt. Die zweite Achse ist orthogonal zur ersten und beschreibt die Richtung der

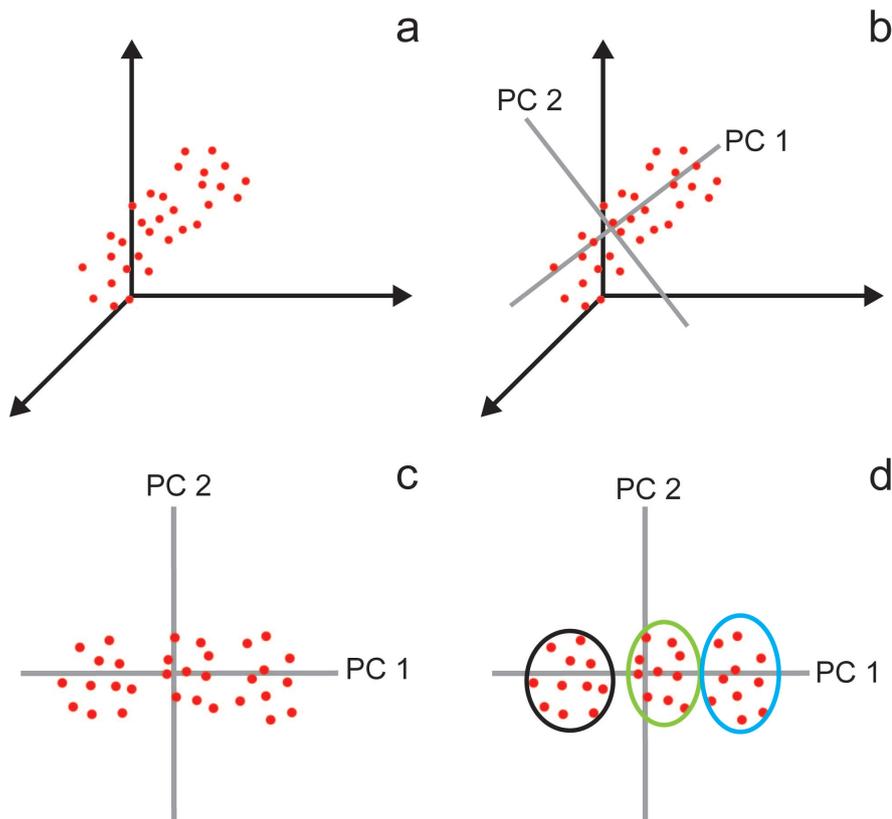


Abb. 7: In einem 3-dimensionalen Raum liegen verschiedene Daten als Punktwolke vor (a). Bei der Hauptkomponentenanalyse werden in diese Punktwolke neue Koordinatenachsen entlang der größten Varianzen gelegt (b). Werden diese Achsen (Hauptkomponenten, principal components, pc) als neue Koordinatenachsen verwendet (c) können Gruppen oder Strukturen leichter erkannt werden (d). Die Auftragung der ersten gegen die zweite (PC 1 gegen PC 2) wird als „Scores-Plot“ bezeichnet.

zweitgrößten Varianz (Abbildung 7). Für einen  $n$ -dimensionalen Raum ergeben sich somit  $n$  Achsen, die alle senkrecht aufeinander stehen.

Ein Maß für die Güte der Beschreibung der Daten ist die erklärte Varianz. Sie beschreibt die Anzahl der Datenpunkte, die mit einer Hauptkomponente erklärt werden. Die ersten fünf bis zehn Hauptkomponenten enthalten normalerweise die Informationen, während die folgenden Hauptkomponenten hauptsächlich Rauschen enthalten.

Die gängigste Darstellung einer Hauptkomponentenanalyse ist der „Scores-Plot“. Hier werden die Hauptkomponenten gegeneinander aufgetragen und Korrelationen von Datenpunkten können schnell sichtbar gemacht werden (Abbildung 7 c und d).

### 2.7.2 Clusteranalyse

Die Clusteranalyse verfolgt gegenüber der Hauptkomponentenanalyse einen anderen Ansatz. Hier werden die Daten aufgrund ihrer Distanz in der Datenwolke zusammengefasst [26]. Aus

einer Datenwolke mit einer unübersichtlichen Anzahl an Datenpunkten werden einige wenige Cluster gebildet, die die Daten optimal beschreiben .

Bei der Clusteranalyse wird zwischen hierarchischen und partitionierenden Verfahren unterschieden. Die hierarchischen Verfahren können darüber hinaus agglomerierend (Zusammenfassen einzelner Cluster zu größeren Einheiten) oder unterteilend (Unterteilung eines großen Clusters in kleinere) sein. Des Weiteren wird zwischen überwachten und unüberwachten Verfahren unterschieden.

Im folgenden Abschnitt sollen nur die für diese Arbeit genutzten Verfahren des hierarchischen Clusters [68, 69] und des K-Means-Clusters [70] beleuchtet werden.

### **Hierarchische Clusteranalyse**

Die hierarchische Clusteranalyse wird in drei Schritten durchgeführt: Im ersten Schritt wird eine Abstandsfunktion gewählt und die Distanzen der einzelnen Datenpunkte (Objekte) zueinander ausgerechnet. Gängige Abstandsfunktionen sind die euklidische Distanz, die Mahalanobis-Distanz [71] oder die Minkowski-Metrik [72]. Das Ergebnis ist eine Matrix mit den Distanzen aller Objekte zueinander.

Der zweite Schritt erstellt das Dendrogramm, die Baumstruktur. Hierzu werden die Objekte mit Hilfe eines Algorithmus nach ihrer Nähe zueinander zusammengefasst. Oft genutzte Methoden für diesen als „Linkage“ bezeichneten Schritt sind das „single linkage clustering“, mit der kleinsten Distanz zwischen den Objekten als Kriterium, das „complete linkage clustering“, das die größte Distanz der Daten nutzt, und die Methode nach Ward, bei der eine Aufsummierung der Varianzen geschieht. Das Ergebnis des „Linkage“ ist ein Dendrogramm, dessen X-Achse die Nummer des Clusters (Datenpunktes) und dessen Y-Achse die kophenetische Distanz<sup>1</sup> enthalten und die Entfernung der einzelnen Cluster zueinander zeigt. Diese Art der Darstellung ist hilfreich, um eine sinnvolle Anzahl an Clustern für den dritten Schritt zu finden.

Im dritten Schritt wird entschieden, an welcher Stelle im Dendrogramm ein Schnitt gemacht werden soll. Mathematisch heißt dies, unterhalb welcher kophenetischen Distanz die Daten-

---

<sup>1</sup>Die kophenetische Distanz zweier Objekte ist ein Maß dafür, wie ähnlich sich diese beiden Objekte sein müssen, um in den selben Cluster eingeordnet zu werden.

punkte zusammengefasst werden. Hierbei kann zwischen zwei Verfahren gewählt werden. Die natürliche Gruppierung sucht selbständig nach Strukturen innerhalb des Dendrogramms und ordnet die Objekte diesen Clustern zu. Das Vorgeben einer Anzahl von Clustern, die anhand des Dendrogramms ermittelt wurden, ist die zweite Möglichkeit, die Objekte zusammenzufassen.

### **K-Means Clusteranalyse**

Das K-Means-Verfahren beruht, anders als das hierarchische Clustern, nicht auf der Berechnung einer Baumstruktur, sondern auf der Partitionierung der Daten in eine Anzahl von  $k$  vorgegebenen Clustern [70]. Es wird hierbei nicht die Gruppierung innerhalb der Daten beschrieben, sondern eine einzige Ebene von Clustern erzeugt. Der K-Means-Algorithmus benötigt ebenfalls eine Abstandsfunktion sowie eine maximale Anzahl von Clustern, die vorgegeben wird. Der Algorithmus läuft in vier Schritten ab.

Zunächst werden  $k$  zufällige Clusterzentren in den Daten ausgewählt (Schritt 1). Die anschließende Berechnung der Distanzen der Daten zu den Clusterzentren führt zu einer Zuordnung zum nächstgelegenen Cluster (Schritt 2). Für jeden neu entstandenen Cluster wird das Clusterzentrum neu berechnet (Schritt 3). Verändern sich bei dieser Neuberechnung die Abstände zum Zentrum nicht, ist das Clustern beendet. Ändern sich die Abstände jedoch, wird mit Schritt 2 weiterverfahren (Schritt 4). Die Neuordnung der Datenpunkte zu den Clusterzentren erfolgt so lange, bis keine Veränderung mehr auftritt. Das Ergebnis ist eine kompakte Clusterzuordnung mit der bestmöglichen Separation der Daten.

Da es sich beim K-Means-Algorithmus um eine unüberwachte Methode handelt, birgt die zufällige Wahl der Startzentren, wie in Schritt 1 beschrieben, einige Risiken. Dies kann dazu führen, dass die Ergebnisse zweier Läufe mit identischen Parametern deutlich voneinander abweichen. Für einen schnellen Überblick können dennoch gute Ergebnisse erzielt werden.

# 3 Material und Methoden

## 3.1 Beschreibung der Experimente

Die Ergebnisse in dieser Arbeit beschreiben zwei verschiedene Experimente, bei denen unterschiedliche Methoden zur Analyse von Oberflächen verwendet wurden. Der erste Teil beschreibt die Entwicklung einer Methode, mit deren Hilfe eine spezifische Unterscheidung von Oberflächenkomponenten auf der Nanometer-Skala ermöglicht werden soll. Durch die Anwendung von multivariaten Verfahren auf Kraft-Distanz-Kurven soll ein chemischer Kontrast ermittelt werden. Im zweiten Teil wird die spitzenverstärkte Raman-Streuung auf Bakterienzellen angewendet, um auch hier chemische Kontraste unterschiedlicher Zellwandkomponenten zu beobachten.

### 3.1.1 Kraftspektroskopie

#### Das Zwei-Komponenten Modellsystem

Um die Anwendung multivariater Datenanalyse-Methoden auf Kraft-Distanz-Kurven zu untersuchen ist, ein einfaches aber aussagekräftiges Modell-System notwendig. Hierbei ist es wichtig, dass sich die verwendeten Materialien in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften stark voneinander unterscheiden. Zu Beginn sollte das System möglichst einfach gehalten werden, daher wird ein Zwei-Komponenten-System gewählt. Da die Eignung der Methode für biologische Problemstellungen untersucht werden soll, wurde ein System, bestehend aus einer biologischen und einer nicht-biologischen Komponente, ausgewählt.

Für die nicht-biologische Komponente wurde Glimmer, ein atomar-flaches Schichtsilikat, ausgewählt. Auf diese Oberfläche wurde dann die biologische Komponente, das Protein Cytochrom C (siehe Abbildung 8), das in den Mitochondrien der Zellen bei der oxidativen Phosphorylierung (Energiegewinnung) eine Rolle als Elektronentransporter spielt, aufgebracht.

Diese Komponenten bieten verschiedene Oberflächentypen, von einer negativ geladenen, harten Oberfläche beim Glimmer bis hin zu einer neutralen, weichen Oberfläche durch das

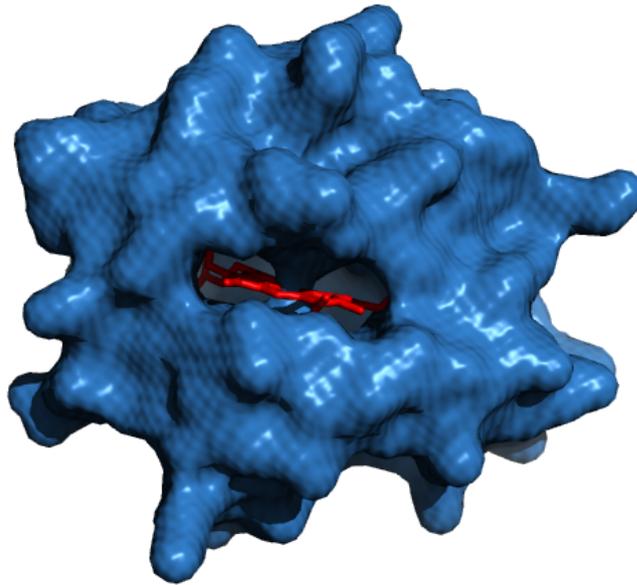


Abb. 8: 3D-Darstellung eines Cytochrom C-Moleküls. In dieser Darstellung zeigen die Oberflächen den Radius der Elektronenwolken. Im Inneren des Moleküls befindet sich der Ligand, ein Häm-Molekül.

Cytochrom C.

### Das Drei-Komponenten-System

Nachdem mit dem Zwei-Komponenten-System gezeigt werden konnte, dass mit Hilfe multivariater Datenanalyse-Methoden versteckte Information aus großen und unübersichtlichen Datensätzen dargestellt werden können, soll an einem komplexeren System aus mehreren Komponenten die Funktion der Methode bestätigt werden. In Vorversuchen stellte sich heraus, dass eine Unterscheidung von Glas und Gold möglich ist. Um ein System aus drei Komponenten zu erstellen, wurde eine Probe mit Avidin-Molekülen auf einer Oberfläche aus Gold und Glas hergestellt. Eine präzise Platzierung der Avidin-Moleküle in der Nähe der Glas-Gold-Grenze war mit der bisher verwendeten Methode nicht möglich. Durch das Aufbringen einer Proteinlösung und der anschließenden Trocknung unter Argon, konnte keine kontrollierte Verteilung der Proteine auf der Oberfläche erreicht werden. Es wurde deshalb auf ein System von Inseln aus Avidin-Molekülen, die mithilfe des „Microcontact Printing“ aufgebracht wurden, zurückgegriffen. Aufgrund der Größe der Avidin-Inseln (quadratisch, Kantenlänge  $20 \mu m$ ) und der regelmäßigen Verteilung der Inseln auf dem verwendeten Stempel war es möglich, die Avidin-Moleküle gezielt in der Nähe der Glas/Gold-Grenze zu positionieren (vgl. Kapitel 3.2.1).

### 3.1.2 Spitzenverstärkte Raman-Streuung

#### Spitzenverstärkte Raman-Streuung an Bakterienzellen

Einen anderen direkteren Ansatz zur Untersuchung der chemischen Zusammensetzung von Oberflächen biologischer Systeme auf der Nanometer-Skala bietet die spitzenverstärkte Raman-Streuung (TERS). Diese Kombination aus Raman-Spektroskopie und Rasterkraft-Mikroskopie verbindet die Vorteile beider Techniken. Gleichzeitig zur Topographie kann durch eine spezielle Behandlung derselben Spitze auch die chemische Zusammensetzung der Probe durch die Raman-Spektroskopie ermittelt werden. Beide Informationen sind vor allem im Bereich der Oberflächenanalyse in den Materialwissenschaften von Interesse. In den letzten Jahren wurde diese Technik verstärkt auch in der Chemie und den Lebenswissenschaften eingesetzt. Gerade im Bereich der Biologie spielen sich viele Prozesse in der Zellmembran ab. Aufgrund der Schwierigkeiten, die daran beteiligten membranständigen Proteine zu extrahieren, konnten viele der in der Membran stattfindenden Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Darunter fallen Proteine, die eine wesentliche Rolle bei der Signalweiterleitung, der Energiegewinnung und dem Stofftransport in die Zelle spielen. Da diese Proteine die Schlüssel zu den Zellen darstellen, sind sie auch in der pharmazeutischen Industrie von großem Interesse. Wichtig ist es, ihre Funktionsweise besser zu verstehen, um zum Beispiel Bindungsaffinitäten von Antibiotika an entsprechende Rezeptoren zu untersuchen. Eine *in-vivo*-Untersuchung kann helfen, die Vorgänge in der Membran zu klären und Wechselwirkungen zwischen Liganden und Rezeptoren auf der molekularen Ebene zu klären.

Mit der spitzenverstärkten Raman-Streuung steht ein Instrument zur Verfügung, ortsabhängige Messungen im Bereich einzelner Moleküle zu ermöglichen. Beobachtungen von Proteinen in ihrer natürlichen Umgebung sind ebenso möglich, wie die Beobachtung von dynamischen Vorgängen innerhalb der Zellmembran.

Die spitzenverstärkte Raman-Streuung konnte bisher erfolgreich an verschiedenen Modellsystemen und Einzelmolekülen gezeigt werden. Neben Rhodamin 6G [73, 62], Malachit-Grün-Isotiozyanat [46] und Kohlenstoff-Nanoröhren wurden auch Messungen an den Nukleotidbasen Guanin, Cytosin, Thymin und Adenin der DNA durchgeführt [41], um anhand von Markerbanden etwa eine Sequenzierung von DNA-Strängen zu ermöglichen.

In dieser Arbeit werden Messungen mit spitzenverstärkter Raman-Streuung an der Zelloberfläche des Gram-positiven Bakteriums *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 gezeigt. Des Weiteren wird eine Zuordnung der Banden vorgenommen, die einzelne Bestandteile der Zellwand charakterisieren.

## 3.2 Kraftspektroskopie

### 3.2.1 Probenpräparation

#### Cytochrom C auf Glimmer

Eine millimolare Cytochrom C-Lösung (Pferdeherz, Sigma, Deutschland) in bi-destilliertem Wasser wurde hergestellt.  $5\mu\text{l}$  dieser Lösung wurden auf ein Stück frisch gespaltenen Glimmer aufgebracht. Nach einer kurzen Trocknungsphase unter einem Argon-Strom im Exsikkator wurde das überschüssige Cytochrom C in zwei Waschgängen entfernt. Hierzu wurden  $100\mu\text{l}$  bi-destilliertes Wasser aufgebracht, sodass ein großer Tropfen entstand. Dieser Tropfen wurde dann wieder abgenommen und verworfen. Anschließend wurde die Probe unter einem ständigen Argon-Strom im Exsikkator vollständig aufgetrocknet.

#### Gold-Glas-Avidin

Deckgläser der Größe  $18\times 18\text{ mm}^2$  wurden in einer Lösung aus drei Teilen Salpetersäure ( $\text{HNO}_3$ ) und einem Teil Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) für zwei bis drei Stunden gereinigt. Anschließend wurde fünf bis acht mal mit bi-destilliertem Wasser gespült.

Die so vorbereiteten Deckgläser wurden anschließend unter Argon mit einer  $20\text{ nm}$  starken Lage Gold halbseitig besputtert. Zur Abschattung wurde ein halbiertes Deckglas verwendet. Die halbseitig mit Gold besputterten Deckgläser wurden Plasma-aktiviert (1 mbar, 100 W, 1 Minute) und anschließend mit Hilfe des „Microcontact Printing“-Verfahrens ( $\mu\text{CP}$ ) quadratische Inseln aus Avidin mit einer Kantenlänge von  $20\mu\text{m}$  aufgebracht (siehe Bernard et al. [74, 75]). Hierzu wurde ein Poly(Dimethylsiloxan)-Stempel (PDMS, Sylgard 184, Dow Corning) durch Kopieren eines SU-8 Masters hergestellt, der 45 min bei  $70\text{ }^\circ\text{C}$  aushärtete. Die so erstellte Oberfläche wurde dann für 30 min mit  $50\mu\text{l}$  der Avidin-Lösung ( $100\mu\text{g}/\text{mL}$  in 1 x PBS) benetzt. Der Stempel wurde anschließend mit 4 x 1 mL PBS und destilliertem

Wasser gewaschen und unter einem Stickstoff-Strom getrocknet.

### 3.2.2 Messung der Kraft-Distanz-Kurven

Die Kraft-Distanz-Kurven wurden mit einem Rasterkraft-Mikroskop des Typs NanoWizard I (JPK AG, Berlin) gemessen. Für alle kraftspektroskopischen Experimente wurden pyramidale Kontakt-Spitzen aus Silizium-Nitrit mit einer Kraftkonstanten von 0,5 N/m (MLCT-AUHW, Microscopes, USA) verwendet. Die Länge der triangulären Federarme (Cantilever) betrug etwa 85  $\mu\text{m}$ . Die Spitzen wurden montiert und mit der Probe in Kontakt gebracht. Nach Aufnahme der Topographie wurde ein Gitter mit 32x32 bzw. 40x40 Punkten über die Topographie gelegt (vgl. Abbildung 9).

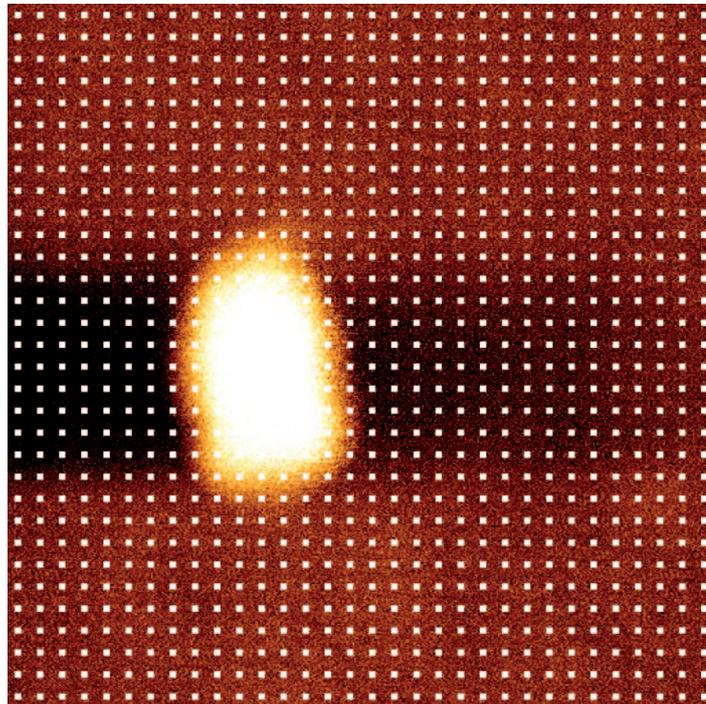


Abb. 9: Für die Messung der Kraft-Distanz-Kurven wird ein Raster über die zuvor aufgenommene Topographie gelegt. Je nach Anzahl der Messpunkte ist die Orstaufösung nur gering, so dass Details nicht immer aufgenommen werden. Bei der gezeigten Topographie handelt es sich um eine Anhäufung von Cytochrom C-Molekülen auf einer Glimmeroberfläche.

Die Kraft-Distanz-Kurven wurden im sogenannten „Absolute“-Modus aufgenommen. Hierbei wird ein Punkt „Z-Scan-End“ definiert, der die Position der Spitze beschreibt, wenn sie die Probe berührt. Des Weiteren wird eine Länge „Z-Length“ definiert, die den Bereich der Piezobewegung beschreibt. Im „Absolute“-Modus startet der Piezo an der Position „Z-Length“+„Z-Scan-End“ und nähert sich der Probe bis zum Punkt „Z-Scan-End“ an, bevor er

wieder zurückgezogen wird. Zu Beginn der Messung befindet sich die Spitze auf der Probe und wird dann in die Position „Z-Length“+„Z-Scan-End“ bewegt, um die Kraft-Distanz-Kurve aufzunehmen. Die Messungen wurden mit der „Closed-Loop“-Option durchgeführt. Dies hat eine Korrektur der Nichtlinearität und der Hysterese des Z-Piezoes zur Folge.

Die Kraft-Distanz-Kurven werden an den im Gitter festgelegten Punkten aufgenommen und die Adhäsion und die Steigung gemessen. Die gesamte Messung wird jeweils in einer ASCII-Datei abgespeichert. Diese Datei enthält Informationen über die Position der einzelnen Punkte sowie sämtliche Parameter der Messung. Ein Beispiel kann im Anhang betrachtet werden.

### 3.2.3 Statistische Auswertung

Für die Hauptkomponentenanalyse und das Clustern wurden das „Statistics“-Paket innerhalb der Matlab-Umgebung (Mathworks, USA, Version 6) sowie das Programmpaket „Unscrambler“ (Camo, Norwegen, Version 9.6) benutzt. Zur Analyse der Kraft-Distanz-Kurven wurde ferner das Programm „IGOR“ (Wavemetrics, USA, Version 4) verwendet.

Das Einladen der Daten in die Matlab-Umgebung geschah mit einem von Dr. Peter Lampen verfassten Programm. Es wurden sowohl die eigentlichen Daten (Höhe und Auslenkung des Cantilevers) wie auch die Positionsdaten der einzelnen Punkte eingelesen. In einem nächsten Schritt wurden die Kraft-Distanz-Kurven höhenbereinigt, da sie von der Topographie dominiert wurden. In einem Zwei-Schritt-Prozess wurde zunächst das Minimum jeder einzelnen Kurve ermittelt und der Median der Positionen der Minima berechnet. Anschließend wurde jede Kraft-Distanz-Kurve mit ihrem jeweiligen Minimum in Richtung des gemeinsamen Minimums, also in Z-Richtung, verschoben. Abbildung 10 zeigt verschiedene Kraft-Distanz-Kurven derselben Probe (a). Der erste Schritt der Vorverarbeitung der Daten kann auf zwei Arten durchgeführt werden. Entweder wird der Abreiß-Punkt (b) oder der Einschnapp-Punkt (c) (vergl. Abbildung 4.2 und 4.5) als gemeinsame Referenz bestimmt. Die durch die Verschiebung der Kurven auftretenden Leerräume werden entfernt.

Als zweite Regulierung wurde der Median der Kräfte  $F$  in einem Bereich der Kraft-Distanz-Kurven, wo kein Kontakt mit der Probe besteht, ermittelt und als „Null“ definiert. Hierbei werden die Kurven in der F-Richtung verschoben.

Diese Art der Vorverarbeitung hat mehrere Gründe. Zum einen werden somit nicht brauch-

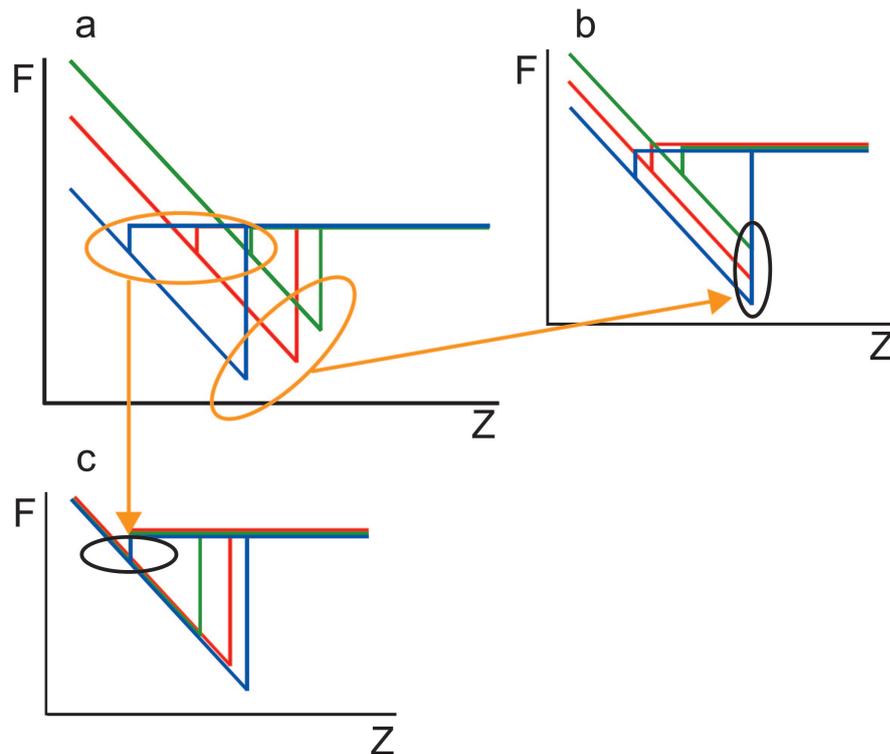


Abb. 10: Schematische Darstellung der Datenvorverarbeitung. Die gemessenen Kraft-Distanz-Kurven können sehr unterschiedliche Positionen für die Einschnapp- und Abreiß-Punkte aufweisen (a). Es besteht nun die Möglichkeit den Abreiß-Punkt als Referenzpunkt zu wählen (b). Eine weitere Wahlmöglichkeit ist der Einschnapp-Punkt (c).

bare Datenpunkte in den Start- und Endbereichen der Kurven eliminiert, die Datenmenge also reduziert, ohne dabei wichtige Informationen zu verlieren. Zum anderen wird die topographieabhängige Höheninformation herausgefiltert, sodass in den nachfolgenden Rechenschritten die topographiebereinigten Daten zur Verfügung stehen. Dies hat den Vorteil, dass nur noch chemische und physikalische Eigenschaften der untersuchten Materialien in die Berechnungen eingehen.

Ein gutes Beispiel für die Notwendigkeit einer sinnvollen Vorverarbeitung der Daten zeigt Abbildung 11. Hier werden Kraft-Distanz-Kurven auf verschiedenen Stellen der Glimmeroberfläche miteinander verglichen. Die Kraft-Distanz-Kurven wurden an Punkten im unteren (rot und grün) sowie im oberen Bereich der Probe (schwarz und blau) aufgenommen. Es zeigt sich, dass an verschiedenen Stellen derselben Oberfläche die Kurven nahezu identisch sind. Sowohl die Steigung als auch die Adhäsion liegen bei allen Kurven in ähnlichen Größenordnungen. Der größte Unterschied in den Kurven ist die Lage der Kurve über der Probe. Die in

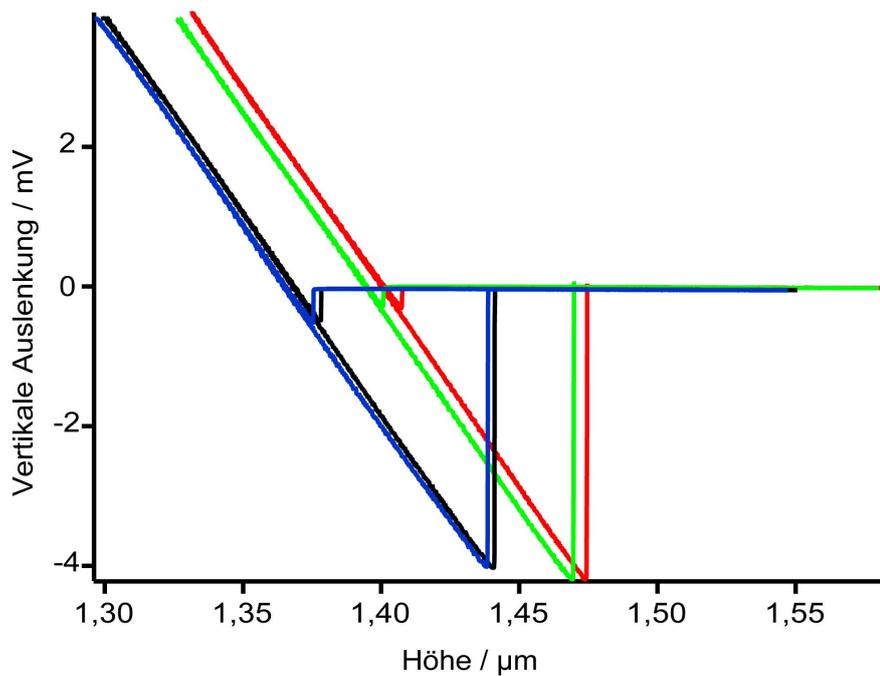


Abb. 11: Kraft-Distanz-Kurven auf Glimmer an verschiedenen Punkten. Die hier dargestellten Rohdaten ohne Vorverarbeitung zeigen an verschiedenen Punkten der Probe große Ähnlichkeiten. Die Unterschiede in der Lage der Einschnapp-Punkte entstehen durch die Messmethode (vgl. Text).

diesem Fall angewendete Methode der Datenaufnahme stützt sich auf die in der Topographie gemessenen Höhe der Probe. Dies bedeutet, dass zwar die Länge der Fahrwege bei jeder Kurve gleich sind, Start- und Endwert der Messung für jeden Punkt von der gemessenen Höhe abhängen. Die rote und grüne Kurve liegen im unteren Drittel der Probe und sind von der Lage her näher beieinander als die schwarze und die blaue Kurve. Diese befinden sich im oberen Drittel der Probe und liegen im Kurvenbild sehr dicht beieinander. Dies deutet auf eine Verkippung der Probe hin. Im unteren Bereich scheint die Probe höher zu liegen als im oberen Bereich. Auch hier zeigt sich die Notwendigkeit der Datenvorverarbeitung. Um möglichst vergleichbare Daten zu erhalten, können durch eine sinnvolle Vorverarbeitung Artefakte und Verkippungen der Probe ausgeglichen werden.

Die Auswahl der Parameter für die Vorverarbeitung der Daten ist wichtig, da die Ergebnisse maßgeblich hiervon beeinflusst werden. Im Folgenden werden die Vorgehensweise der Datenvorverarbeitung und die möglichen Probleme aufgezeigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde als Referenzpunkt der Einschnapp-Punkt als gemeinsames Minimum definiert (siehe Abbildung 4 in Kapitel 2.2). Begründet werden kann dies damit, dass hier der einzige Punkt der Kurve liegt, bei dem die Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe am wenigsten von Artefakten oder der Probenbeschaffenheit beeinflusst werden.

An diesem Punkt fühlt die Spitze zum ersten Mal die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Probe. Zur Nivellierung auf einen gemeinsamen Null-Punkt wird zunächst der Median der Kräfte aller Kurven in einem Bereich bestimmt, in dem die Spitze keinen Kontakt zur Probe hat. Anschließend wird dieser Median von allen Kurven subtrahiert. Dieser Schritt ist nicht unbedingt notwendig, da die Kurven in diesem Bereich immer auf der Nulllinie liegen sollten. Zur Sicherheit können so eventuell auftretende Artefakte beseitigt werden.

Neben dem Einschnapp-Punkt als Referenz könnte auch der Abreiß-Punkt genutzt werden. Dies führte im Vergleich jedoch zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen, weshalb hiervon abgeraten werden sollte. Abbildung 10 zeigt in a das Ergebnis der hierarchischen Clusteranalyse mit der Verschiebung in Richtung des Abreiß-Punktes, während b die gleiche Analyse mit der Verschiebung in Richtung des Einschnapp-Punktes beschreibt.

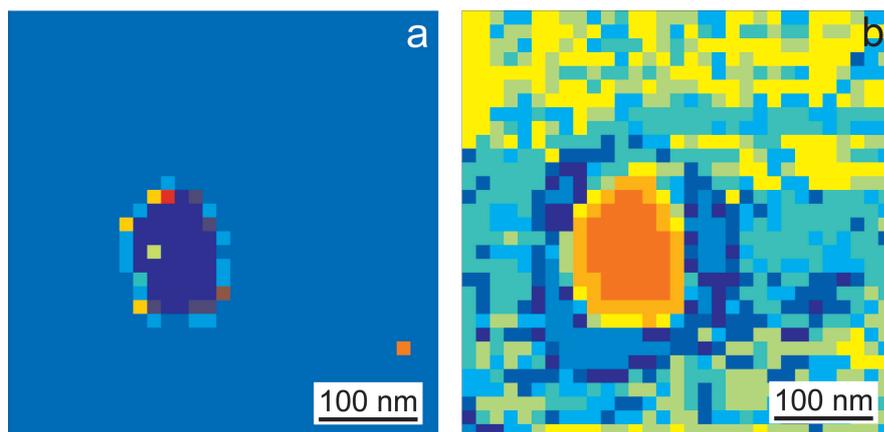


Abb. 12: Je nach Wahl des Referenzpunktes für die Vorverarbeitung der Daten können unterschiedliche Ergebnisse erzielt werden. Beide Darstellungen zeigen die erste Hauptkomponente einer Messung von Cytochrom C auf Glimmer. Hierbei wurden der Abreiß-Punkt (a) und der Einschnapp-Punkt (b) als Referenzpunkte für die Vorverarbeitung der Daten verwendet. Deutlich ist ein Unterschied der beiden Bilder zu erkennen.

Die Unterschiede sind schon auf den ersten Blick ersichtlich. Bei der Verschiebung in Richtung des Abreiß-Punktes wird die Proteinoberfläche nur unzureichend beschrieben. Die Diskrepanz zwischen beiden Punkten liegt vor allem in der größeren Flexibilität des Abreiß-Punktes. Während der Einschnapp-Punkt aufgrund der Annäherung an die Probe in den meisten Fällen an derselben Stelle liegt, ist der Abreiß-Punkt durch die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Probenoberfläche weitaus flexibler. Das Abreißen der Spitze kann, je nach Untergrund, früher oder später erfolgen. Dies bedeutet für eine Verschiebung

in Richtung des Abreiß-Punktes, dass einige der Kraft-Kurven sehr stark geschoben werden müssen. Dies kann zu einem Verlust relevanter Datenpunkte im Bereich der Steigung führen. Die Datenreduktion hätte dann negative Begleiterscheinungen, die das Ergebnis verfälschen würden.

Der Einschnapp-Punkt als Minimum ist somit die bessere Wahl. Für jeden Bereich der Kraft-Distanz-Kurve (Annäherungsweg, Steigungsast) werden so etwa gleich viele Datenpunkte pro Kurve bereitgestellt.

Die Hauptkomponentenanalyse wurde mit dem Programm „princomp“ durchgeführt. Als Datensatz wurden die vorverarbeiteten Daten übergeben. Die Clusteranalyse wurde mit den in Matlab implementierten Programmen „pdist“, „linkage“, „dendrogram“ und „cluster“ für die hierarchische Clusteranalyse und „kmeans“ für die Analyse mit dem K-Means-Algorithmus durchgeführt (vgl. Anhang B.2).

### 3.3 TERS

#### 3.3.1 Probenpräparation

Eine Kolonie von *Staphylococcus epidermidis* wurde mit einer Impföse aufgenommen und in 1 ml  $H_2O$  suspendiert. Anschließend wurden 100  $\mu L$  der Suspension abgenommen und auf 1 ml aufgefüllt und gut resuspendiert. 20  $\mu L$  dieser Bakteriensuspension wurden auf ein gereinigtes Deckglas mit einem Durchmesser von 10 mm aufgebracht und im Vakuum getrocknet. Das Deckglas wurde in einer Lösung aus drei Teilen Salpetersäure ( $HNO_3$ ) und einem Teil Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), wie oben beschrieben, gereinigt.

#### 3.3.2 Spitzen

Für die TERS-Messungen wurden kommerzielle AFM-Spitzen (NSG-10, NT-MDT, Russland) verwendet. Diese Non-Contact-Spitzen haben eine pyramidale Form und sind am Ende der Spitze etwa 10 nm groß. Die Resonanzfrequenz des Cantilevers liegt bei etwa 255 kHz. Die Kraftkonstante der Spitze ist typischerweise 11,5 N/m. Die Spitzen wurden mit einer 20 nm Silberschicht bedampft (BALTEC, Liechtenstein). Zum Schutz vor Oxidation und Verschmutzung wurden die Spitzen unter Reinst-Argon (Argon 6.0, AirLiquide) aufbewahrt.

### 3.3.3 Aufbau und Messung

Für die TERS-Messungen wurde ein kombiniertes System, bestehend aus einem Rasterkraft-Mikroskop (NanoWizard I, JPK AG, Berlin) montiert auf einem inversen Mikroskop (IX71, Olympus, Japan) und einem Raman-Spektrometer (LabRam HR, JobinYvon, Frankreich) verwendet. Abbildung 13 zeigt den schematischen Aufbau des Systems in Anlehnung an [41].

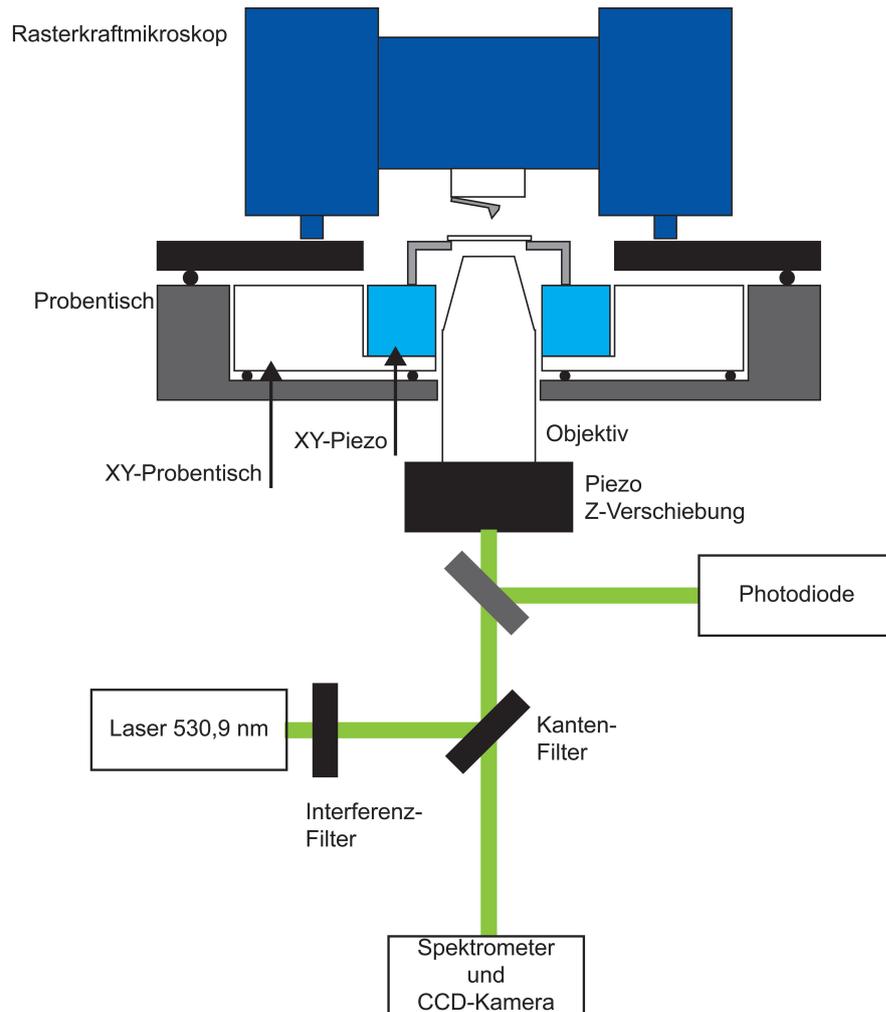


Abb. 13: Die schematische Darstellung eines TERS-Aufbaus zeigt die wichtigen Komponenten sowie den Weg des einstrahlenden und emittierten Laserlichts. Der Messkopf des AFM steht auf einer Dreipunktlagerung. Die Probe kann über eine Grobjustierung und eine Feinjustierung über Piezoelemente unter der Spitze bewegt werden. Der Laserstrahl wird über eine Faser in das Spektrometer eingekoppelt und über ein Mikroskopobjektiv auf die Spitze fokussiert. Das emittierte Licht wird durch dasselbe Objektiv gesammelt und durch einen Filter in das Spektrometer geführt.

Der AFM-Messkopf steht mit einer Dreipunktlagerung auf dem Verfahrstisch des Mikroskops, um eine grobe Justierung (Genauigkeit  $10\text{-}20\ \mu\text{m}$ ) der Spitze über der Probe zu erlauben. Die Probe wird auf einem Probenhalter platziert, bestehend aus einer Kombination

von grobem XY-Verfahrtisch und XY-Piezotisch. Der Strahl des anregenden Lasers (Innova 300c, Krypton-Ionen, Coherent, Wellenlänge 530,9 nm, USA) wird von unten durch ein Ölimmersionsobjektiv (60fache Vergrößerung, numerische Apertur (NA) 1,45, Olympus, Japan), welches auf einem in Z-Richtung verschiebbaren Piezo (PIFOC, Physik Instrumente GmbH & Co. KG, Deutschland) montiert ist, auf die AFM-Spitze fokussiert. Das emittierte Licht wird über dasselbe Objektiv gesammelt und über einen Filter in das Spektrometer geleitet. Dort werden die Spektren von einer stickstoffgekühlten CCD-Kamera detektiert und am Computer ausgewertet.

Nach der Montage der AFM-Spitze, wird diese mit der Grobjustierung des Rasterkraft-Mikroskops in die Nähe des Laserfokus gebracht. Nach der Justierung des Lichtzeigersystems wird die Resonanzfrequenz der Spitze bestimmt. Über die Resonanzfrequenz wird dann der „Set-Point“ festgelegt und anschließend die Spitze der Probe angenähert. Nachdem die Spitze im Regelkreis ist, wird der Laser auf die Spitze fokussiert und eine Messung durchgeführt. Während dieser Messung wird über einen Seitenausgang des Mikroskops das von der Spitze reflektierte Licht des Lasers von einer Photodiode detektiert (vgl. Abbildung 13). Der gemessene Strom der Photodiode wird anschließend umgerechnet und dann als Hell-Dunkel-Bild dargestellt. Theoretisch befindet sich die Spitze am Ort der höchsten Reflexion, da sie sich dann optimal im Fokus des Lasers befindet. Die Position der Spitze wird auf dem Bildschirm markiert und anschließend das System so umgestellt, dass nicht mehr die Spitze über der Probe, sondern vielmehr die Probe unter der Spitze bewegt wird. Dies hat den Vorteil, dass die Spitze optimal im Fokus des Lasers verbleibt, gleichzeitig aber auch die Aufnahme einer Topographie möglich ist, bzw. der gesamte Arbeitsbereich des Rasterkraft-Mikroskops zur Verfügung steht.

Nachdem die Probenoberfläche abgerastert und eine geeignete Stelle auf der Probe gefunden wurde, wird die Spitze auf die gewünschte Position gebracht und ein Raman-Spektrum aufgenommen.

Die Auswertung der Spektren wurde mit „IGOR“ (Wavemetrics, USA, Version 4) durchgeführt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Zwei-Komponenten Modellsystem - Cytochrom C auf Glimmer

#### 4.1.1 Topographie

Für die Untersuchung der Kraft-Distanz-Kurven ist es notwendig, Vergleichsdaten der Probenoberfläche bereitzustellen. Eine Möglichkeit bietet die Aufnahme der Proben-Topographie. Abbildung 14 zeigt einen linienkorrigierten Ausschnitt von etwa  $450\text{ nm}$  mal  $450\text{ nm}$  der Probe. Bei der Linienkorrektur wird ein Polynom für jede einzelne Linie berechnet und unabhängig von der Umgebung die Schräglage der Probe abgezogen. Dies hat zur Folge, dass kleine Objekte stärker hervorgehoben werden können.

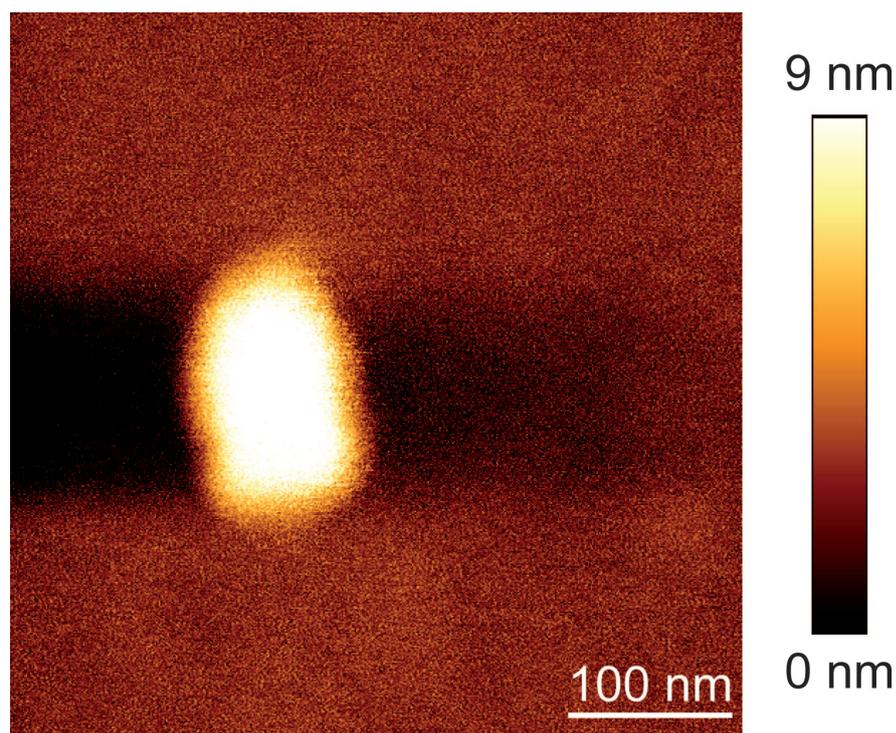


Abb. 14: Die linienkorrigierte Topographie zeigt eine runde Struktur mit einer Höhe von etwa  $9\text{ nm}$  und einem Durchmesser von  $90\text{ nm}$ . Wird die Größe eines einzelnen Cytochrom C-Moleküls ( $3\text{ nm}$ ) einbezogen, so handelt es sich bei der Struktur um eine Akkumulation von Molekülen auf der Glimmer-Oberfläche.

Auf der homogenen und glatten Oberfläche ist eine elliptische Erhöhung in der Mitte zu beobachten. Da sich auf der Probe nur Cytochrom-C-Moleküle befinden, handelt es sich bei der elliptischen Struktur um Cytochrom-C-Moleküle. Bei einer Größe der Struktur von etwa

100 *nm* mal 70 *nm* und einer Höhe von etwa 9 *nm* muss es sich um eine Anhäufung von Proteinen handeln. Da ein einzelnes Cytochrom-C-Molekül einen Durchmesser von etwa 3-4 *nm* hat, liegen auch mehrere Lagen von Proteinen übereinander vor.

Dies ist bei der Auswertung der Daten zu beachten, da zwischen einem System aus Spitze-Cytochrom C-Glimmer und einem System Spitze-Cytochrom C-Cytochrom C-Glimmer Unterschiede bestehen können.

#### 4.1.2 Kartierung

Für die der Kraft-Distanz-Kurven wurde ein Gitter von 32 mal 32 Punkten über die Topographie gelegt. Die Dichte an Punkten ist geringer als etwa bei der Aufnahme der Topographie (512 mal 512 Pixel). Dies führt dazu, dass nicht die gesamte, sondern nur etwa 25 % der Oberfläche (Annahme bei einer Spitzengröße von etwa 50 *nm*) mit den Kraft-Distanz-Kurven abgedeckt wird. Gründe für die geringere Dichte der Kraft-Distanz-Kurven finden sich im bereitgestellten Messprogramm. Die Speicherung der Daten im „ASCII“-Format fordert einen hohen Bedarf an Speicherplatz. Bei einer Anzahl von 32x32 Kraft-Distanz-Kurven mit je 4096 Datenpunkten und einer Bit-Zahl von 16 pro Datenpunkt ergibt sich eine Speichergröße von:

$$16\text{bit} \cdot 4096\text{Datenpunkte} \cdot 1024\text{Messpunkte} \cdot 5\text{Spalten} \cdot 0,125\text{Bits/Byte} = 41\text{Mbyte} \quad (4.1)$$

Eine Erhöhung der Anzahl der Datenpunkte in den Bereich der Topographie (512 mal 512) vergrößert die Dateien derart, dass sie schwer zu handhaben sind (bis zu 10 GByte). Ein weiterer Grund für diese geringe Punkteanzahl ist die Erhöhung der Anzahl an Datenpunkten pro Kurve. Da während der Vorverarbeitung der Daten die Anzahl der Datenpunkte bei der Verschiebung in Z-Richtung reduziert wird, ist eine möglichst hohe Zahl an Datenpunkten für eine qualitativ hochwertige Kurve notwendig. Es muss also ein Kompromiss zwischen der Qualität der Daten und der durch Kraft-Distanz-Kurven abgedeckten Probenoberfläche gefunden werden. Für ein Modell-System ist eine hohe Qualität der Daten wichtig, da nicht absehbar ist, wie sich die Daten während der folgenden Analyseschritte verhalten.

### 4.1.3 Adhäsion und Steigung

Während der Messung werden zwei Kenngrößen für Kraft-Distanz-Kurven an den einzelnen Gitterpunkten gezeigt. Es handelt sich hierbei um die Steigung im repulsiven Teil der Kurve und die Adhäsion (siehe Kapitel 2.2).

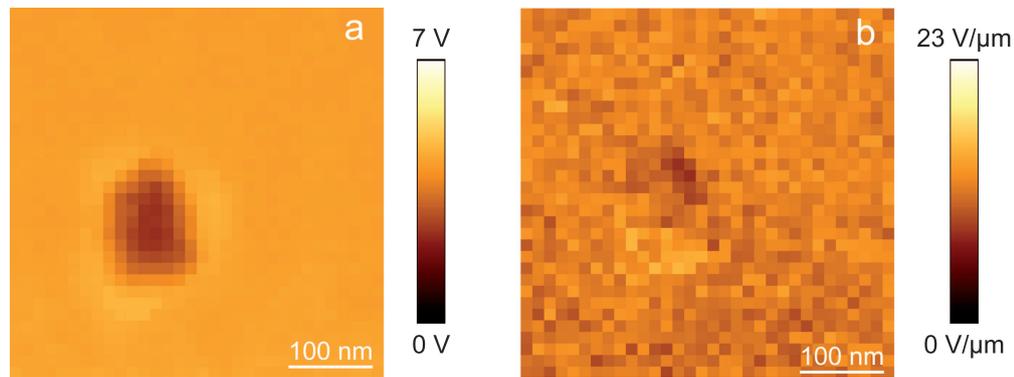


Abb. 15: Adhäsion (a) und Steigung (b) der Kraft-Distanz-Kurven. Die Adhäsion (a) zeigt eine der Topographie vergleichbare Strukturierung. Es handelt sich hierbei um die Rohdaten, bei der die Höheninformationen dominieren. Im Gegensatz zur Adhäsion zeigt die Steigung (b) keinerlei Hinweise auf unterschiedliche Komponenten auf der Probe.

Abbildung 15 zeigt Adhäsion (a) und Steigung (b) der Kraft-Distanz-Kurven, so wie sie vom Messprogramm gespeichert werden. Die Adhäsion wird dabei als Distanz zwischen dem absoluten Minimum der Kurve und dem letzten gemessenen Wert der Kurve definiert. Die Steigung wird ebenfalls zwischen dem absoluten Minimum und dem Punkt „Z-Scan-End“ der Kurve berechnet. Die Adhäsion zeigt wegen des verwendeten Algorithmus eine gute Übereinstimmung mit der Topographie. Die Steigungen geben keine signifikante Aussage über die Probe ab.

Neben den vom Messprogramm vorgegebenen Werten, wurden Steigung und Adhäsion auch von den vorverarbeiteten Daten berechnet. Abbildung 16 zeigt die Adhäsion (a) und die Steigung (b) nach dieser Berechnung. Im Gegensatz zu den vom Messprogramm bereitgestellten Daten finden sich hier keine Höheninformationen mehr. Auch bei der Adhäsion ist hier keine Unterscheidung zwischen Glimmer und Cytochrom C möglich. Durch die Vorverarbeitung der Daten und die anschließende Berechnung von Steigung und Adhäsion führt zu einem Verlust der topographischen Informationen. Es stehen nun nur noch chemische Informationen zur Verfügung. Diese sind scheinbar so gering, dass eine einfache Berechnung

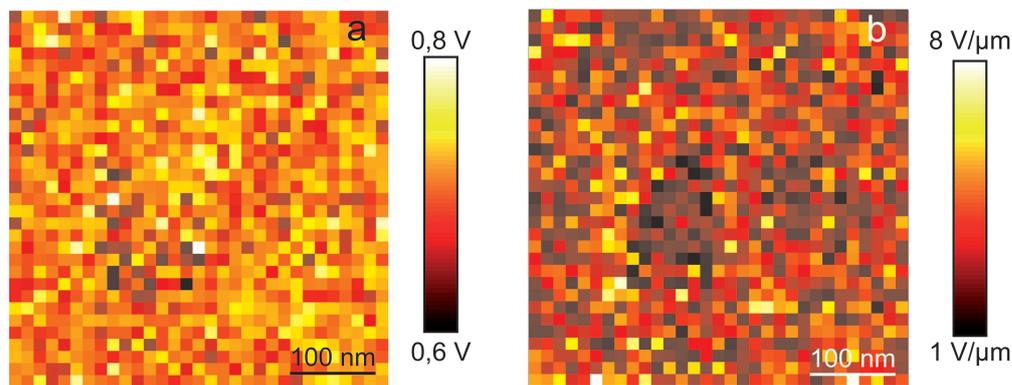


Abb. 16: Adhäsion (a) und Steigung (b) der Kraft-Distanz-Kurven. In dieser Darstellung sind die Höheninformationen durch die Vorverarbeitung der Daten eliminiert worden. Sowohl die Adhäsion (a) als auch die Steigung (b) zeigen keine Hinweise auf oberflächliche Strukturen.

dieser Parameter nicht ausreicht, Unterschiede sichtbar zu machen.

Die gute Übereinstimmung der gemessenen Adhäsion mit der Topographie weisen darauf hin, dass hier die topographischen Informationen eine große Rolle spielen und die chemischen Informationen überlagern. Die Steigung in den Kraft-Distanz-Kurven zeigt bei den gemessenen Werten ein homogenes Bild. Es ist nicht zwischen Glimmer und Cytochrom C zu unterscheiden. Nach der Vorverarbeitung der Daten entfallen die Höheninformationen, sodass die Adhäsion keine Unterscheidung mehr zwischen den untersuchten Materialien zulässt. Sie zeigt eine ebenso homogene Verteilung wie die Steigung. Anhand der vorliegenden Daten können Cytochrom C und Glimmer nicht aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften voneinander unterschieden werden.

#### 4.1.4 Kraft-Distanz-Kurven

Kraft-Distanz-Kurven von verschiedenen Materialien haben oft ein sehr ähnliches Aussehen. Abbildung 17 zeigt Kraft-Distanz-Kurven, die sowohl auf Glimmer (blau) als auch auf Cytochrom C (rot) aufgenommen wurden.

Die blaue Kurve zeigt einen typischen Kurvenverlauf mit dem Einschnapp-Punkt bei etwa  $1,41 \mu\text{m}$ . Der „Z-Scan-End“-Punkt wurde für diese Messungen bei  $1,35 \mu\text{m}$  gesetzt. Bei einer Höhe über der Probe von  $1,475 \mu\text{m}$  werden die Kräfte, mit denen an der Spitze gezogen wird, größer als die adhäsiven Kräfte des Glimmer, sodass die Spitze den Kontakt zur Probe verliert. Die Kurve gemessen auf dem Cytochrom C hat im Vergleich dazu einen späteren „Einschnapp-Punkt“. Der „Abreiß-Punkt“ ist dafür etwas früher. Auffällig ist, dass sich

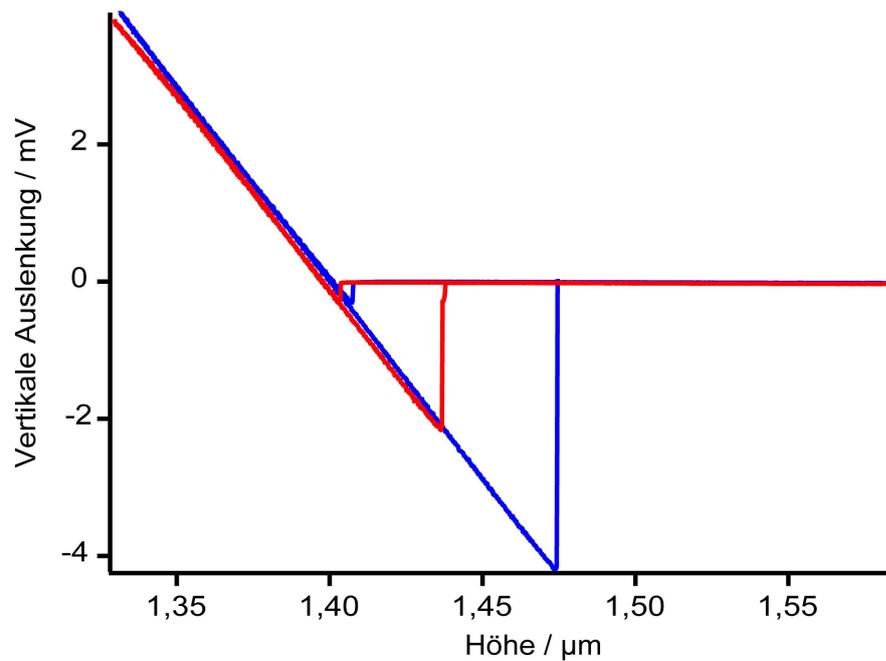


Abb. 17: Kraft-Distanz-Kurven, die auf Glimmer (blau) und Cytochrom C (rot) gemessen wurden zeigen offensichtliche Unterschiede in der Lage des Einschnapp-Punktes, der Steigung und der Adhäsion.

die Steigungen der beiden Materialien nur wenig unterscheiden, die Adhäsion aber deutlich verschieden ist. Anhand dieser beiden Kurven und den Unterschieden in der Adhäsion ist zu sehen, dass Kraft-Distanz-Kurven Informationen über die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der untersuchten Materialien liefern.

Die in Abbildung 18 dargestellten Kraft-Distanz-Kurven, sind an verschiedenen Punkte auf der Anhäufung von Cytochrom C gemessen worden (Punkte 338 (rot), 429 (grün), 492 (blau) und 532 (schwarz)). Alle vier Kurven zeigen einen nahezu identischen Verlauf. Sowohl in der Steigung als auch in der Adhäsion sind nur geringe Unterschiede auszumachen. Es ist jedoch zu erkennen, dass auch über die kurze Distanz eine Verkipfung der Probe zu beobachten ist.

Eine Beurteilung der Kurven auf eventuelle Unterschiede ist mit den Rohdaten kaum möglich. Es ist hierbei nicht klar ersichtlich, ob die Einschnapp-Punkte, die Steigungen oder die Adhäsion wirklich von Kurve zu Kurve verschieden sind, oder ob die in den oben gezeigten Daten vorhandenen Höheninformationen Einfluss auf die Interpretation der Daten nehmen. Nach der Vorverarbeitung der Daten ergibt sich eine andere Sichtweise auf die Daten.

Abbildung 19 zeigt dieselben Kraft-Distanz-Kurven wie Abbildung 11 jedoch nach der Vorverarbeitung. Die Vorverarbeitung bedeutet in diesem Fall eine Verschiebung aller Kraft-

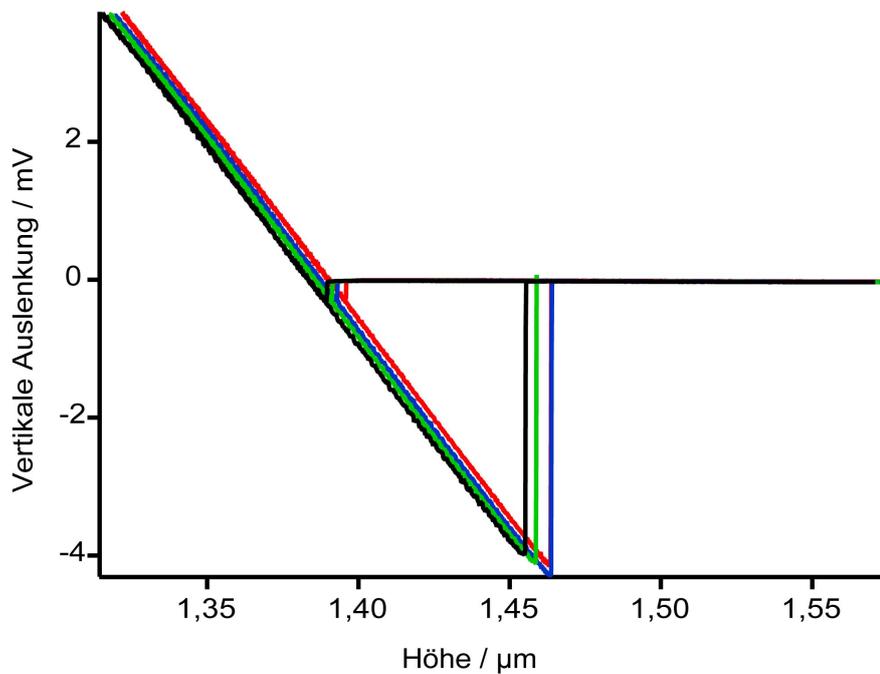


Abb. 18: Kraft-Distanz-Kurven der Akkumulation von Cytochrom C-Molekülen. Kurven an verschiedenen Stellen des Cytochrom C gleichen einander sehr stark.

Distanz-Kurven hin zu einem gemeinsamen Einschnapp-Punkt. Aufgrund dieses Vorganges wird die Höheninformation aus den Daten entfernt, sodass diese sich nicht mehr dominierend auf die weiteren Berechnungen auswirken können. Des Weiteren wurden die Daten auch in F-Richtung verschoben. Hierzu wurde der Median von den Bereichen der Kurve berechnet, an denen kein Kontakt mit der Probe besteht. Dieser Wert wurde dann auf Null gesetzt und somit ein konstanter Wert von allen Kurven subtrahiert. An den Abreiß-Punkten der schwarzen und roten Kurven sind auch Werte oberhalb der Null-Linie zu beobachten. Dieses können Überschwinger sein, die durch das Zurückschnellen des Schwingungsarms entstanden sind. Diese Werte beeinflussen das Ergebnis jedoch nicht.

#### 4.1.5 Hauptkomponentenanalyse

Die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse werden klassischerweise in Form der sogenannten Scores-Plots dargestellt. Hierbei werden die einzelnen Hauptkomponenten gegeneinander aufgetragen, sodass eventuelle Korrelationen einfach zu beobachten sind. Abbildung 20 zeigt den Scores-Plot der Hauptkomponente 1 (PC 1) gegen Hauptkomponente 2 (PC2).

Im Bereich des Nullpunktes zeigt sich die größte Ansammlung von Datenpunkten. Nur

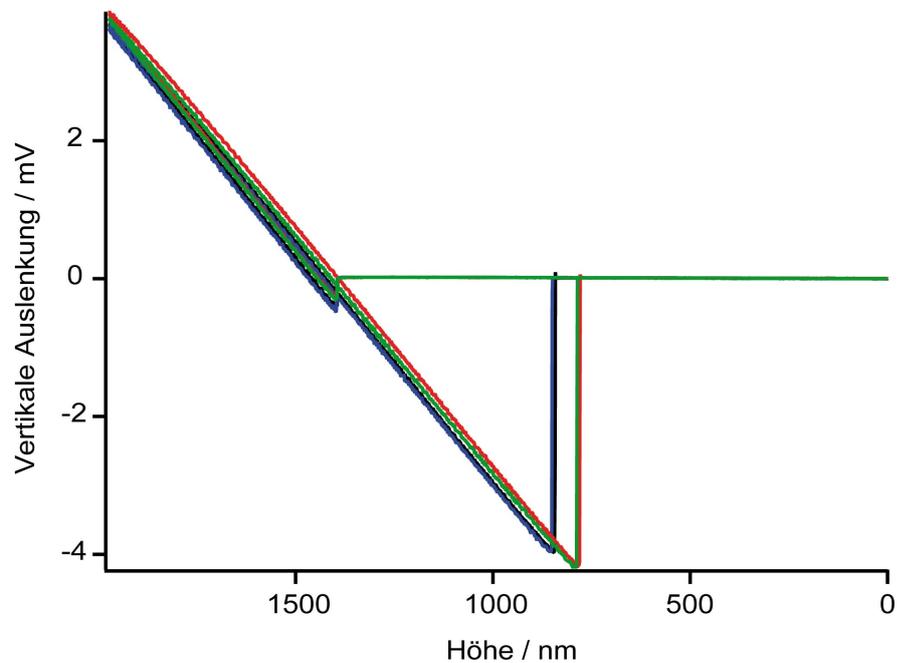


Abb. 19: Kraft-Distanz-Kurven auf Glimmer und Cytochrom C nach der Vorverarbeitung. Hier wurde der Einschnapp-Punkt als Referenz gewählt.

wenige Datenpunkte liegen weiter vom Ursprung entfernt. Es können mit dieser Darstellung zwei Bereiche unterschieden werden, auch wenn keine deutlich sichtbare Trennung auftritt.

Abbildung 21 a zeigt die Hauptkomponente 1 mit der farblichen Zuordnung wie oben gezeigt. In Abbildung 21 b zeigt die Hauptkomponente 2. Für diese Darstellungen werden den Werten der Hauptkomponenten einzelne Farben zugeordnet. Die erste Hauptkomponente zeigt eine deutliche Übereinstimmung mit der Topographie (vgl. Abbildung 14). In Blautönen ist die Glimmeroberfläche, in Orange- und Rottönen ist die Ansammlung von Cytochrom C zu sehen. Mithilfe dieser Informationen ist es nun möglich, den Scores-Plot zu interpretieren. Die Datenpunkte im Bereich des Koordinatenursprungs sind der Glimmeroberfläche zuzuordnen, während die Ansammlung an Datenpunkten im rechten Randbereich dem Cytochrom C zugeordnet werden kann. Die Punkte zwischen diesen beiden größeren Ansammlungen stellen die Randbereiche des Cytochrom C dar und können sowohl der Glimmeroberfläche als auch dem Cytochrom C zugeordnet werden, was darauf hindeutet, dass sich hier beide Materialien vermischt sind. Die zweite Hauptkomponente zeigt zwar ein ähnliches Bild, es kann jedoch nicht zwischen der Glimmeroberfläche und dem Cytochrom C unterschieden werden. Dies bestätigt auch der Scores-Plot. Die zweite Hauptkomponente zeigt keine Zweiteilung. In der zweiten Hauptkomponente sind die Randbereiche der Cy-

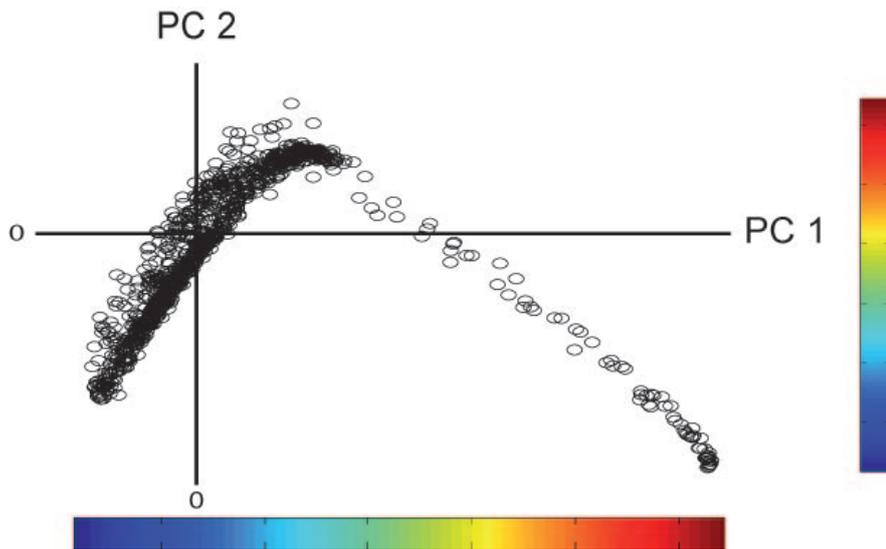


Abb. 20: Scores-Plot des Zwei-Komponenten-Systems. Hauptkomponente 1 (PC 1) und Hauptkomponente 2 (PC 2) werden gegeneinander aufgetragen und zeigen zwei Bereiche mit hoher Punktdichte, sowie einen Zwischenbereich mit einer geringeren Anzahl an Datenpunkten.

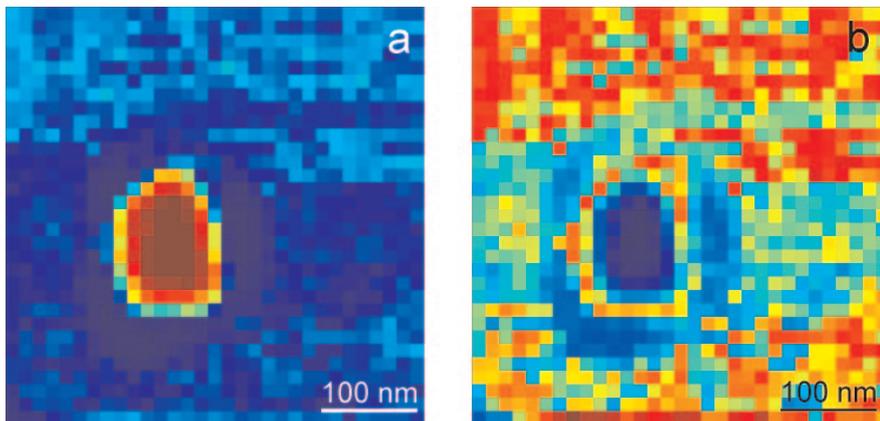


Abb. 21: Die Umsetzung Hauptkomponentenanalyse mit einer Farbkodierung in Bezug auf die Lage im vermessenen Bereich. Die Hauptkomponenten 1 (a) und 2 (b) zeigen Unterschiede zwischen dem Cytochrom C und der Glimmeroberfläche.

tochrom C-Akkumulation ähnlichen Farben zugeordnet wie den Glimmer-Oberflächen im unteren und oberen Drittel der Probe. Es ist möglich, dass hier eine dünne Lage von Cytochrom C-Molekülen vorliegt, die die gesamte Oberfläche bedeckt. Somit sind in der zweiten Hauptkomponente Informationen über Mischungen der beiden Materialien abgelegt.

Werden nun die weiteren Hauptkomponenten im Scores-Plot gegeneinander aufgetragen (Abbildung 22), so zeigt sich, dass bei der Auftragung von Hauptkomponente zwei gegen Hauptkomponente drei (Abbildung 22 a) und Hauptkomponente drei gegen Hauptkomponente vier (Abbildung 22 b) durchaus Gruppen beobachtet werden können.

Die Scores-Plots von Hauptkomponente 5 gegen Hauptkomponente 6 (Abbildung 22 c)

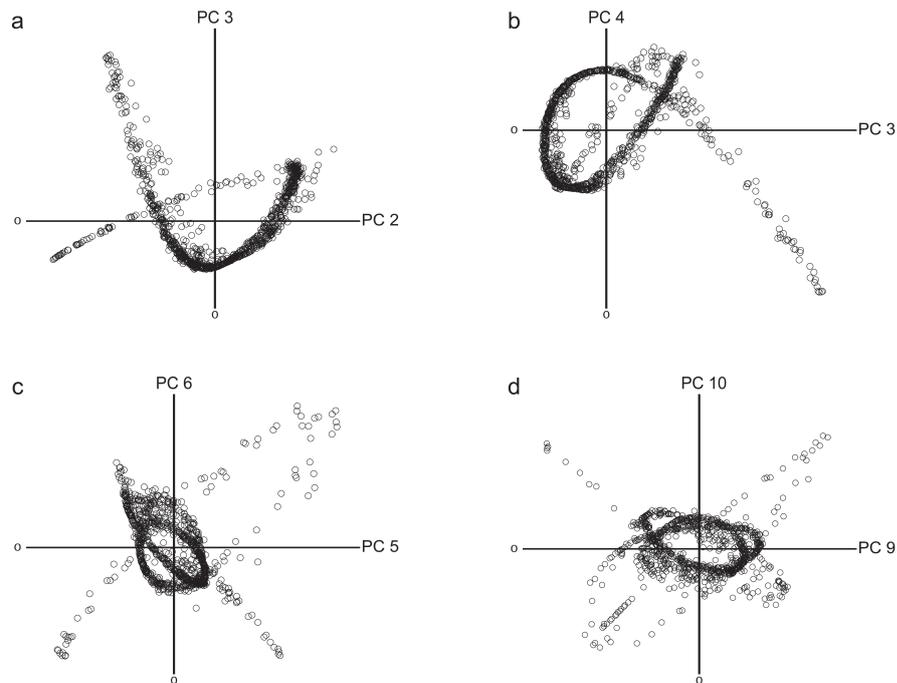


Abb. 22: Die Scores-Plots von verschiedenen Hauptkomponenten zeigen Informationen in den Hauptkomponenten 2, 3 und 4 (a und b), während die Hauptkomponenten 5, 6, 9 und 10 hauptsächlich Rauschen beinhalten.

und Hauptkomponente 9 gegen Hauptkomponente 10 zeigen nur einige wenige verstreut liegende Punkte außerhalb des Koordinatenursprunges. Hier zeigt sich, dass in den höheren Hauptkomponenten hauptsächlich das Rauschen dargestellt wird, also keine Information vorhanden ist.

Abbildung 23 zeigt die Hauptkomponenten 1-8 in der farblichen Zuordnung. Es zeigt sich, dass die Hauptkomponente 1 in erster Linie zwischen Glimmer und Cytochrom C unterscheidet. Die zweite Hauptkomponente dagegen zielt auf den Unterschied zwischen Glimmer und dem Glimmer in direkter Umgebung des Cytochrom C. Die Hauptkomponenten 3 und 4 beschreiben die kleineren Spots in den Randbereichen des Cytochrom C, während die Hauptkomponenten 5 und 6 die Randbereiche des Cytochrom C selbst beschreiben. In den Hauptkomponenten 7 und 8 stecken offensichtlich keine Informationen mehr.

Ein weiteres Kriterium zur Kontrolle der Daten bei der Hauptkomponentenanalyse ist die Beschreibung der erklärten Varianzen jeder einzelnen Hauptkomponente. Hierbei handelt es sich um einen Prozentsatz, der beschreibt, wie viel Varianz mit der Hauptkomponente erklärt werden kann. Für die Hauptkomponenten 1 bis 8 ergeben sich die in Tabelle 1 aufgezeigten Verteilungen.

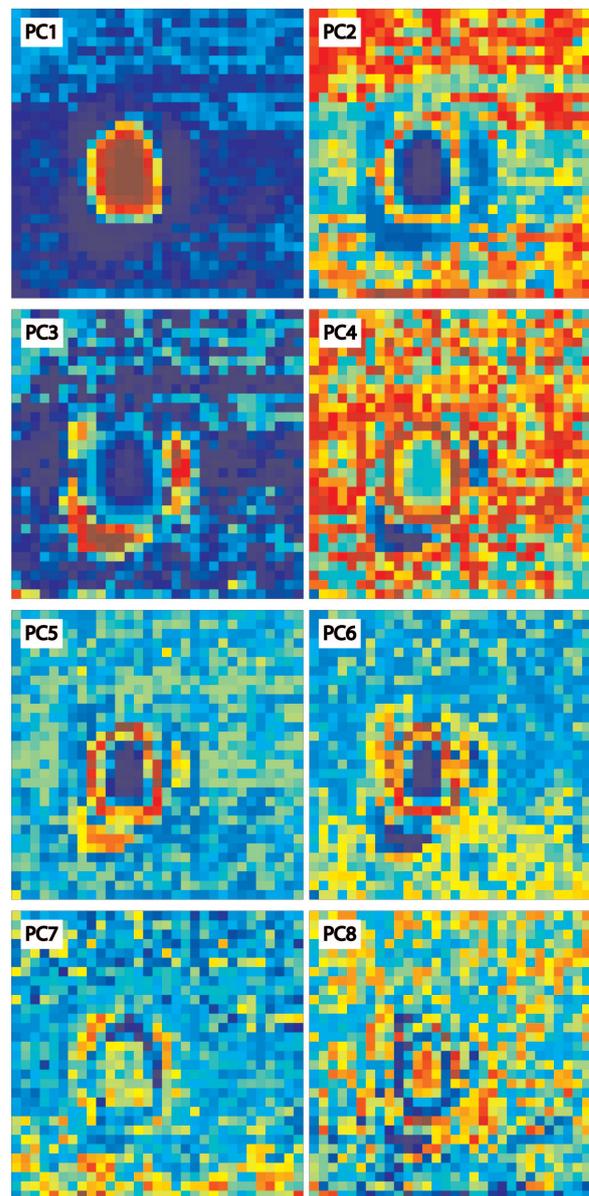


Abb. 23: Die Hauptkomponenten 1-8 (PC 1-8) beinhalten unterschiedliche Informationen über den vermessenen Bereich. Die meisten Informationen über die Probe stecken in den Hauptkomponenten 1 bis 3.

Dies bedeutet, dass mit der ersten Hauptkomponente 40,8% der Varianz in den Daten erklärt wird. Die zweite Hauptkomponente erklärt einen weiteren Anteil von 24,8% der Varianz. Auch die dritte Hauptkomponente ist mit einem Anteil von 10% noch stark an der Beschreibung der Daten beteiligt. Ab der vierten Hauptkomponente werden die Beteiligungen zur Beschreibung der Varianzen weniger. Dies bedeutet, dass in diesen Hauptkomponenten nur noch wenige Informationen stecken. Wie auch in Abbildung 23 zu sehen ist, stellen die Hauptkomponenten 7 und 8 nur noch Rauschen in den Daten dar.

Tabelle 1: Prozentuale Anteile der einzelnen Hauptkomponenten sowie Gesamtvarianz der erklärten Daten.

Hauptkomponente	erklärte Varianz (%)	Gesamtvarianz (%)
1	40,8	40,8
2	24,8	65,6
3	10,0	75,6
4	4,7	80,3
5	3,5	83,8
6	2,1	85,9
7	1,8	87,7
8	1,6	89,3

#### 4.1.6 Hierarchische Clusteranalyse

Bei der hierarchischen Clusteranalyse können, wie oben beschrieben (vgl. Kapitel 2.7.2), verschiedene Verfahren angewendet werden. In einem ersten Schritt werden die Distanzen zwischen den einzelnen Punkten in der Datenwolke berechnet. Hierbei kann auf die unterschiedlichsten Funktionen zurückgegriffen werden. Als standardmäßige Funktionen haben sich die euklidische Distanz, die Mahalanobis-Distanz und verschiedene Metriken etabliert. Die hierarchischen Cluster-Verfahren in dieser Arbeit wurden mit euklidischen Distanzen gerechnet. Ein Versuch mit Mahalanobis-Distanzen schlug fehl, da die in dieser Berechnung notwendige Transformation der Datenmatrix aufgrund der zu homogenen Daten nicht einwandfrei funktionierten.

Nach der Berechnung der euklidischen Distanzen der einzelnen Datenpunkte zueinander, werden diese mithilfe eines weiteren Algorithmus in Clustern zusammengefasst. Hierzu gibt es wieder verschiedene Möglichkeiten (vgl. Kapitel 2.7.2). In dieser Studie wurde die Ward-Methode verwendet. Das Ergebnis ist ein sogenanntes Dendrogramm, eine baumähnliche Struktur, die Beziehungen der einzelnen Cluster zueinander grafisch darstellt.

Abbildung 24 zeigt das vollständige Dendrogramm nach Berechnung der euklidischen Distanzen und der Clustereinteilung nach der Ward-Methode. Hier sind die Beziehungen aller 1024 Datenpunkte zueinander aufgeführt. Die X-Achse repräsentiert die einzelnen Datenpunkte in einer Reihenfolge, die vom Programm so gewählt wird, dass die Cluster entsprechend ihren Verwandtschaftsverhältnissen zueinander passen. Auf der Y-Achse sind die kophenetischen Distanzen aufgetragen. Diese beschreiben die Beziehung zweier Punkte zu-

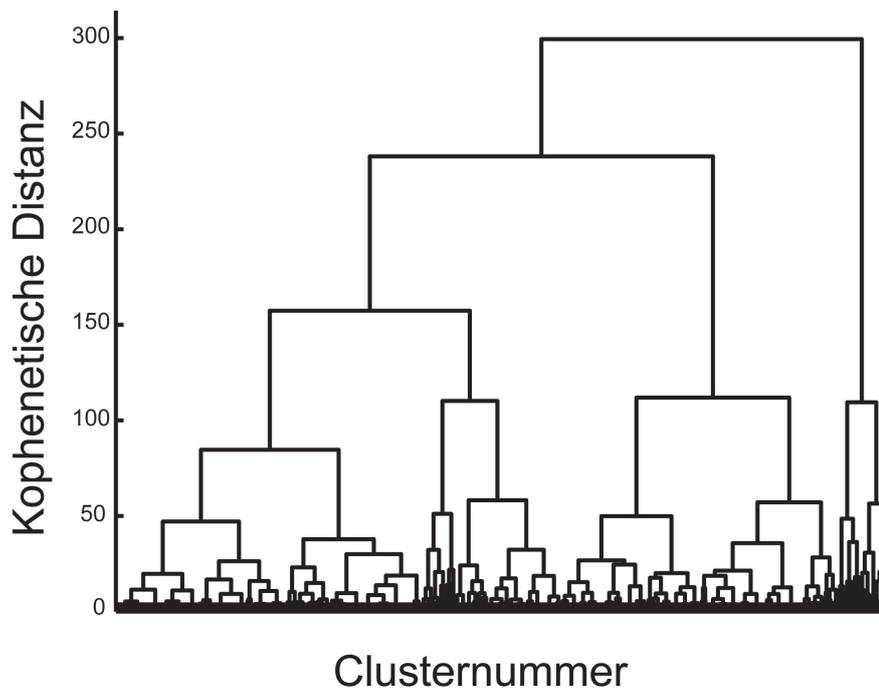


Abb. 24: Das Dendrogramm einer hierarchischen Clusteranalyse zeigt den Grad der Ähnlichkeit zwischen jedem einzelnen Datenpunkt.

einander und werden durch die Länge der Striche dargestellt. Je länger ein solcher Strich ist, desto weiter sind die Punkte voneinander entfernt. Auf den ersten Blick sieht man in Abbildung 24 eine Baumstruktur, die sich in zwei große Äste teilt. Bis zu einer kophenetischen Distanz von 25 sind einzelne Äste noch gut voneinander zu unterscheiden. Darunter ist nicht mehr eindeutig zu erkennen, welche Beziehungen zwischen einzelnen Punkten bestehen. Aus diesem Grund sollte das Dendrogramm dahingehend verändert werden, dass eine Auswahl der Cluster einfacher wird. Eine reduzierte Anzahl von 30 Clustern, wie sie vom Programm vorgeschlagen wird, ist in den meisten Fällen ausreichend und lässt genug Interpretationsmöglichkeiten, ohne zu sehr in die Entscheidungen des Wissenschaftlers einzugreifen.

Abbildung 25 zeigt daher nicht die Beziehung einzelner Datenpunkte zueinander, sondern vielmehr die Beziehung von dreißig Clustern, welche die Datenpunkte enthalten. Anhand dieser Darstellung ist es nun möglich, eine Mindestanzahl an Clustern zu bestimmen, die für die Beschreibung der Daten erforderlich ist. Hierbei sollten nicht nur die Anzahl der untersuchten Materialien, sondern auch Cluster für das Rauschen und Artefakte mit in die Überlegungen einbezogen werden. Das Dendrogramm in Abbildung 25 legt eine Einteilung

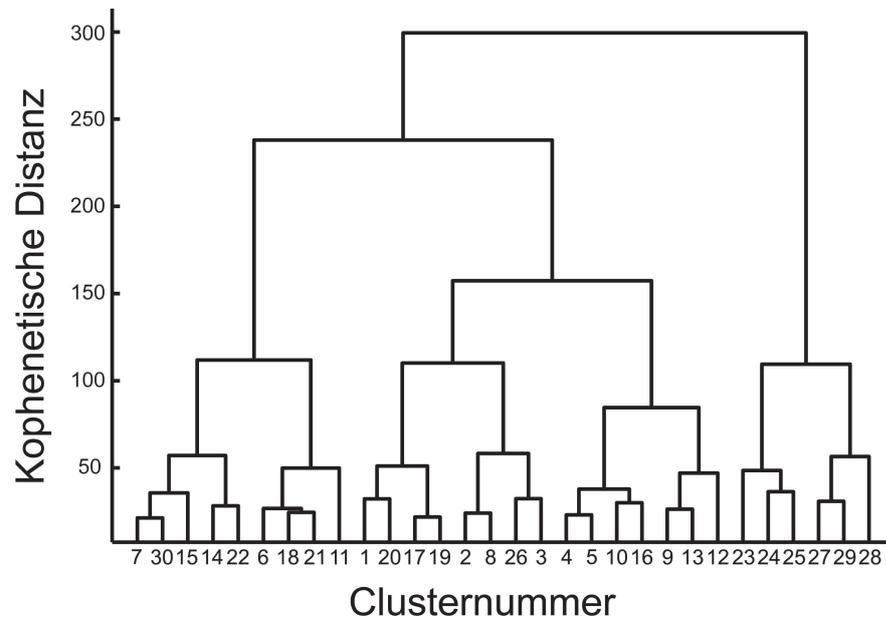


Abb. 25: Die Darstellung von einer geringeren Anzahl von Clustern in Dendrogrammform erleichtert die Suche nach einer optimalen Anzahl von Clustern für die endgültige Einteilung.

in neun Cluster nahe.

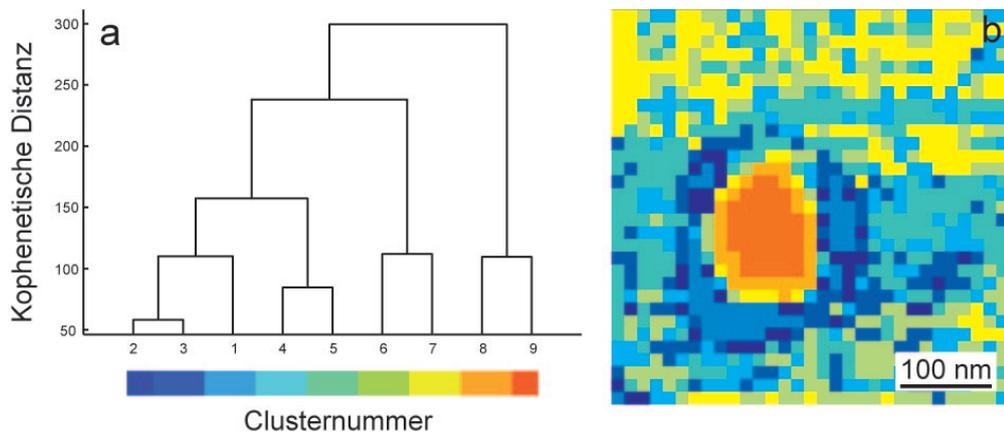


Abb. 26: Eine Einteilung in neun Cluster erscheint für die vorliegenden Daten sinnvoll. Das Dendrogramm (a) gibt Hinweise auf eine Zweiteilung der Daten. Erst die „Übersetzung“ in eine Farbkodierung zeigt eine eindeutige Identifizierung der unterschiedlichen Materialien (b).

In Abbildung 26 a ist zu erkennen, dass sich das Dendrogramm sehr schnell in zwei große Äste aufteilt. Der linke Ast enthält etwa 94% der Datenpunkte (957 von 1024), während der rechte Ast lediglich 67 Datenpunkte repräsentiert. Der linke Ast teilt sich in zwei weitere Äste, so dass drei Cluster (A, B und C) entstehen, die etwa gleich weit voneinander entfernt sind. Werden nun den Datenpunkten der einzelnen Cluster Farben zugeordnet und diese Werte in das Gitter übertragen, ergibt sich das in Abbildung 26 b gezeigte Bild. Die Farben Blau bis Cyan werden Cluster A zugeordnet. Die Datenpunkte hier repräsentieren

die Oberfläche direkt in der Nähe des Cytochrom C. Grün und Gelb werden Cluster B zugeordnet. Diese Datenpunkte liegen vor allem im oberen und unteren Drittel der Probe, sowie in den Randbereichen des Cytochrom C. Cluster C (orange und rot) beinhaltet Datenpunkte des Cytochrom C. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass in den blau eingefärbten Bereichen eine Monolage von Cytochrom vorliegt, während die orange und rot gefärbten Bereiche auf eine mehrere Lagen von Cytochrom C-Molekülen beschreiben. Die gelb gefärbten Bereiche schließlich repräsentieren die Glimmeroberfläche. Der Farbgebung folgend ist die Anhäufung an Cytochrom C weitaus größer als die Topographie vermuten lässt. Auch die Fläche neben der sichtbaren Anhäufung scheint Cytochrom C-Moleküle zu enthalten.

#### 4.1.7 K-Means Clustering

Eine weitere Clusteranalyseverfahren stellt der K-Means-Algorithmus dar. Hier handelt es sich um eine unüberwachte Clustermethode (vgl. Kapitel 2.7.2). Als Vorgabe dient lediglich die Anzahl der maximal möglichen Cluster.

Wegen der Anzahl der auf der Probe vorhandenen Materialien, sollten zwei Cluster für eine Beschreibung der Daten ausreichend sein. Durch die Datenvorverarbeitung und die damit verbundene Entfernung der Höheninformationen sollte für die beiden Materialien nur noch die chemischen Information vorliegen. Aufgrund der dominierenden Adhäsion in den Kraft-Distanz-Kurven, die sich stark unterscheiden, sollte die Anzahl von zwei Clustern ausreichend sein, die Materialien mit dieser Methode zu trennen. Abbildung 27 a zeigt, dass bei einer Einteilung der Daten in zwei Cluster durchaus zwischen Cytochrom C (violett) und dem Glimmer (braun) unterschieden werden kann.

Möglich ist die Identifizierung in dieser Abbildung jedoch nur mit Kenntnis der Topographie. Anhand der Zuordnung der Datenpunkte zu einzelnen Clustern ist zu erkennen, dass Bereiche im oberen wie auch im unteren Drittel der Probe in demselben Cluster zugeordnet werden wie das Cytochrom C. Für eine genauere Beschreibung der Daten reichen zwei Cluster demnach nicht aus. Es gibt in den Daten keinerlei Hinweise, warum auch Bereiche außerhalb des Cytochroms diesem Cluster zugeordnet werden. Wie schon bei der hierarchischen Clusteranalyse müssen daher weitere Cluster berücksichtigt werden, die sowohl die Randbereiche des Cytochrom C wie auch weitere Artefakte einbeziehen. Eine Anzahl von

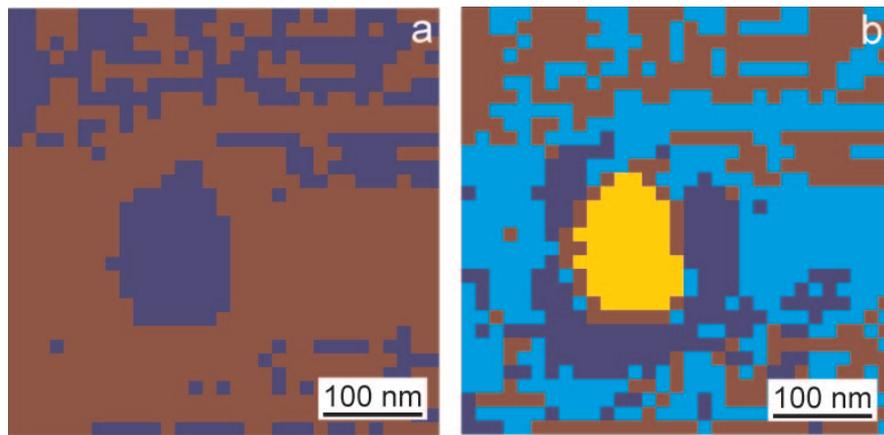


Abb. 27: Eine Analyse der Daten mit dem K-Means-Algorithmus zeigt bei zwei vorgegebenen Clustern (a) keine eindeutige Unterscheidung zwischen den verwendeten Materialien. Erst mit vier Clustern (b) ist es möglich, Cytochrom C (gelb) und Glimmer (braun-blau) zu unterscheiden.

vier Clustern scheint hier ausreichend zu sein. Die Zuordnung der einzelnen Kraft-Distanz-Kurven in vier vorgegebene Cluster zeigt ein detaillierteres Bild der Probe (Abbildung 27 b). Zum einen kann zwischen Cytochrom C (gelb) und Glimmer (blau) unterschieden werden. Die Kraft-Distanz-Kurven im Randbereich des Cytochrom C (braun) haben Ähnlichkeit mit Bereichen auf dem Glimmer. Ebenso deutlich ist die direkte Umgebung des Cytochrom C (violett) zu erkennen.

Die Einteilung der Daten in Cluster mit dem K-Means Algorithmus zeigt recht gute Ergebnisse. Eine Unterscheidung zwischen Cytochrom C und Glimmer ist ebenso möglich, wie die Bestimmung der Randbereiche des Proteins oder die mögliche Protein-Monolage im oberen und unteren Drittel der Probe. Für eine schnelle Beurteilung der Daten ist dieser Algorithmus durchaus geeignet, ein simples System zu beschreiben.

#### 4.1.8 Vergleich der Techniken untereinander

Das Modellsystem mit zwei verschiedenen Komponenten kann mit allen drei verwendeten multivariaten Analysemethoden hinreichend gut beschrieben werden. Die Hauptkomponentenanalyse kommt mit einem geringen Aufwand an Rechenleistung und Vorarbeiten zu einem Ergebnis, mit dessen Hilfe die Unterscheidung zwischen zwei verschiedenen Materialien möglich ist. Hierbei ist jedoch die Interpretation der Daten nur dann möglich, wenn sie grafisch umgesetzt werden. Trotz der geringen erklärten Varianzen in den ersten drei Hauptkomponenten (75%) ist es möglich, die Hauptinformationen aus den Daten herauszufiltern.

Das hierarchische Clustern erfordert einen höheren Rechenaufwand. Eine sorgfältige Auswahl der Distanzfunktionen wie auch der Cluster-Algorithmen ist essenziell, da sonst sehr unterschiedliche und damit schwer interpretierbare Ergebnisse erzielt werden. Oftmals reicht es nicht aus, nur die Standardwerte für die Abstandsfunktion und den Algorithmus zu nutzen. Ein zweiter wichtiger Punkt in diesem Zusammenhang ist die Wahl der Clusteranzahl. Nur anhand eines Übersichts dendrogramms ist es möglich, eine optimale Anzahl von Clustern für das System zu finden. Die Zahl von neun Clustern in diesem Beispiel bietet ausreichend Möglichkeiten, eventuelles Rauschen in den Daten zu berücksichtigen. Das Ergebnis des hierarchischen Clusters beschreibt die Daten präziser als die Hauptkomponentenanalyse. Besonders die Randbereiche des Cytochrom C werden beim hierarchischen Clustern einheitlicher dargestellt, während bei der Hauptkomponentenanalyse die Unterschiede einzelner Punkte in diesem Bereich deutlicher herausgestellt werden.

Der K-Means Algorithmus gibt, obwohl unüberwacht, ein zufrieden stellendes Ergebnis. Die einzelnen Komponenten werden ebenso herausgearbeitet wie die Randbereiche des Cytochrom C. Die Ergebnisse sind mit denen des hierarchischen Clusters vergleichbar, obwohl der Aufwand an Vorarbeiten wesentlich geringer ist. Auch im Hinblick auf die in Kapitel 3.2.3 gewonnenen Erkenntnisse über den Einfluss der Datenvorverarbeitung auf die Art der Ergebnisse bei diesem Algorithmus, scheint das K-Means Clustern nur bedingt einsetzbar zu sein. Für einen schnellen Überblick über die Daten ist diese Methode jedoch durchaus hilfreich.

Allen vorgestellten Methoden ist gemeinsam, dass sie eine mögliche Unterscheidung von Einfach- und Mehrfach-Lagen an Protein aufzeigen. In allen drei Verfahren werden die Bereiche um die Cytochrom C-Anhäufung ähnlich dargestellt und sind somit identifizierbar.

## **4.2 Das Drei-Komponenten-System - Gold, Glas, Avidin**

### **4.2.1 Topographie**

Wie schon bei dem Zwei-Komponenten-System wurde auch hier zunächst die Topographie der Probe aufgenommen, um ein Vergleichsmuster für die anschließenden Berechnungen bereitzustellen. Abbildung 28 zeigt einen 100  $\mu\text{m}$  mal 100  $\mu\text{m}$  großen Ausschnitt der Probe.

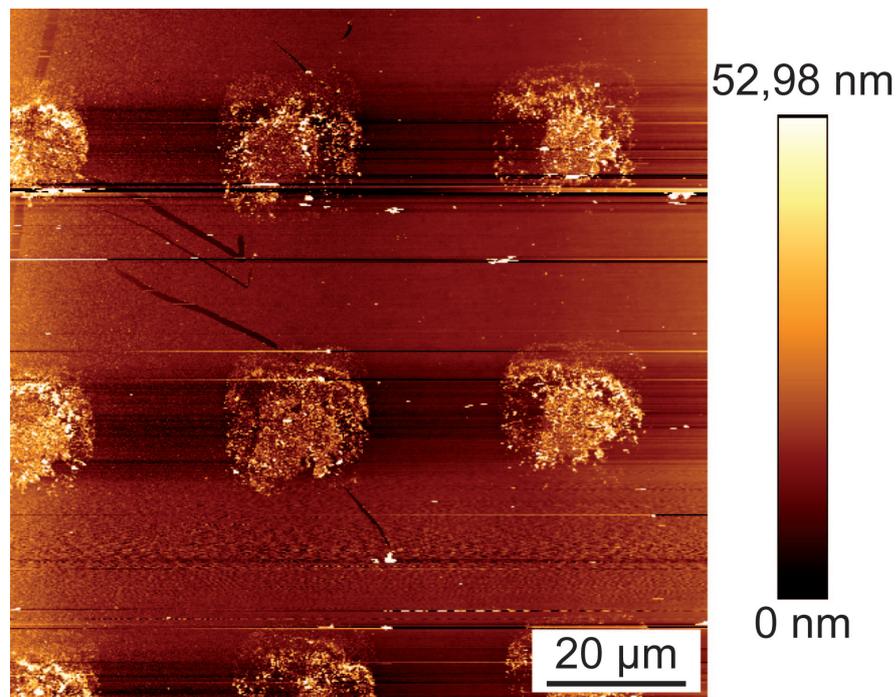


Abb. 28: Linienkorrigierte Topographie des Systems mit drei verschiedenen Komponenten. Die Avidin-Moleküle liegen als inselförmige Strukturen mit einer Kantenlänge von etwa  $20 \mu m$  vor. Die Grenze von Glas und Gold ist in dieser Darstellung nicht sichtbar.

Diese linienkorrigierte Abbildung zeigt deutlich die einzelnen Avidin-Inseln auf der Oberfläche. Die Kantenlänge der Inseln beträgt etwa  $20 \mu m$ . Die Inseln scheinen jedoch keine homogene Fläche zu bilden, sondern zeigen Bereiche mit unterschiedlich großer Proteindichte. Dies ist vermutlich auf den verwendeten Stempel zurückzuführen, oder aber die Avidin-Moleküle konnten aufgrund der Oberflächenbeschaffenheit an einigen Stellen besser haften als an anderen.

In dieser Darstellung ist kein Unterschied zwischen der Gold- und der Glasoberfläche zu beobachten. Der hier gewählte Ausschnitt der Probe ist mit einer Kantenlänge von  $100 \mu m$  sehr groß und umfasst den gesamten Bereich, den der X-Y-Piezo des AFM abdecken kann. Auf einer so großen Probe spielt die Verkippung eine nicht zu vernachlässigende Rolle. Bei einer Linienkorrektur werden für jede aufgenommene Linie die Verkippung berechnet und von den Daten abgezogen. Befinden sich auf der Linie hohe Strukturen, werden diese hervorgehoben, während niedrigere Strukturen verschwinden. Da es sich bei der Grenze zwischen Gold und Glas um eine Stufe von  $20 nm$  handelt, teilweise aber größere Objekte vorhanden sind, ist es möglich, dass die Grenze quasi „herausgerechnet“ wurde. Eine zweite Möglichkeit für das Verschwinden der Grenze auf dieser Abbildung besteht in der Probenvorbereitung. Ver-

mutlich lag während des Aufbringens der Goldschicht auf die Oberfläche die abdeckende Maske nicht eben auf dem Glasträger. Dies hat zur Folge, dass keine scharfe Kante, sondern vielmehr eine keilförmige Abnahme der Schichtdicke entsteht, da das Gold unter die Maske wandern kann.

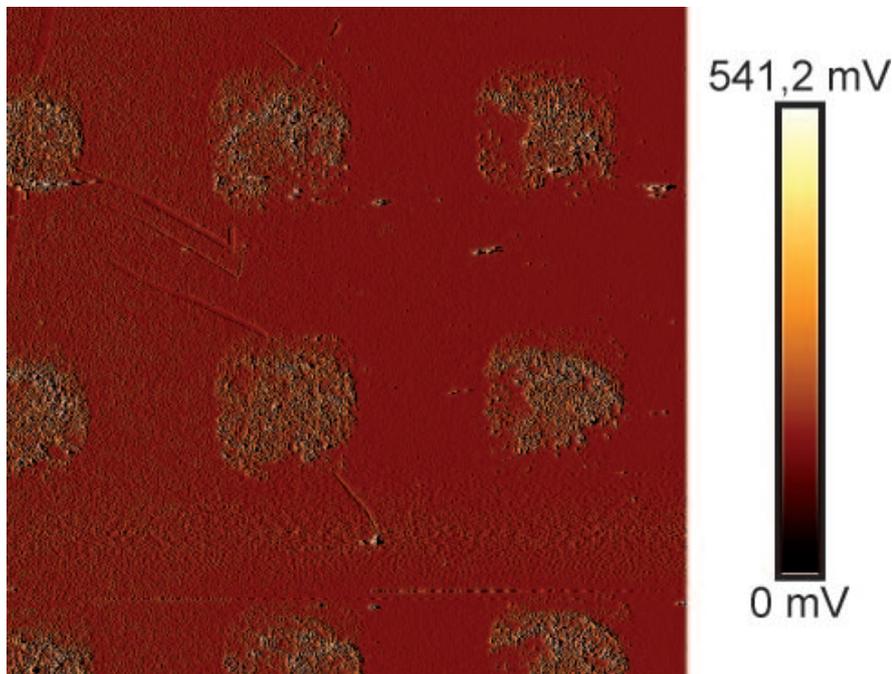


Abb. 29: Die seitliche Auslenkung des Schwingungsarms (laterale Deflektion) zeigt im linken Bereich der Probe eine raue Struktur der Oberfläche. Hier ist die Grenze zwischen Gold und Glas sichtbar.

Die Darstellung der lateralen Auslenkung, also der direkt gemessenen Auslenkung des Cantilevers, wird in Abbildung 29 gezeigt. Auf der linken Seite der Probe ist eine strukturelle Veränderung der Oberfläche zu beobachten. Dies deutet auf den Bereich hin, auf dem sich das Gold befindet.

#### 4.2.2 Kartierung

Wie auch im vorherigen System wurde ein Gitter über die Oberfläche gelegt, an dessen Punkten Kraft-Distanz-Kurven gemessen wurden. Die Anzahl der Punkte betrug 40 mal 40 (Abbildung 30).

Der Abstand zwischen den einzelnen Punkten beträgt  $2,5 \mu\text{m}$ . Dies bedeutet, dass für jede der Avidin-Inseln eine maximale Anzahl von 64 Kraft-Distanz-Kurven möglich ist. Die geringe Punktdichte hat Einfluss auf die Genauigkeit der späteren Berechnungen. Aufgrund

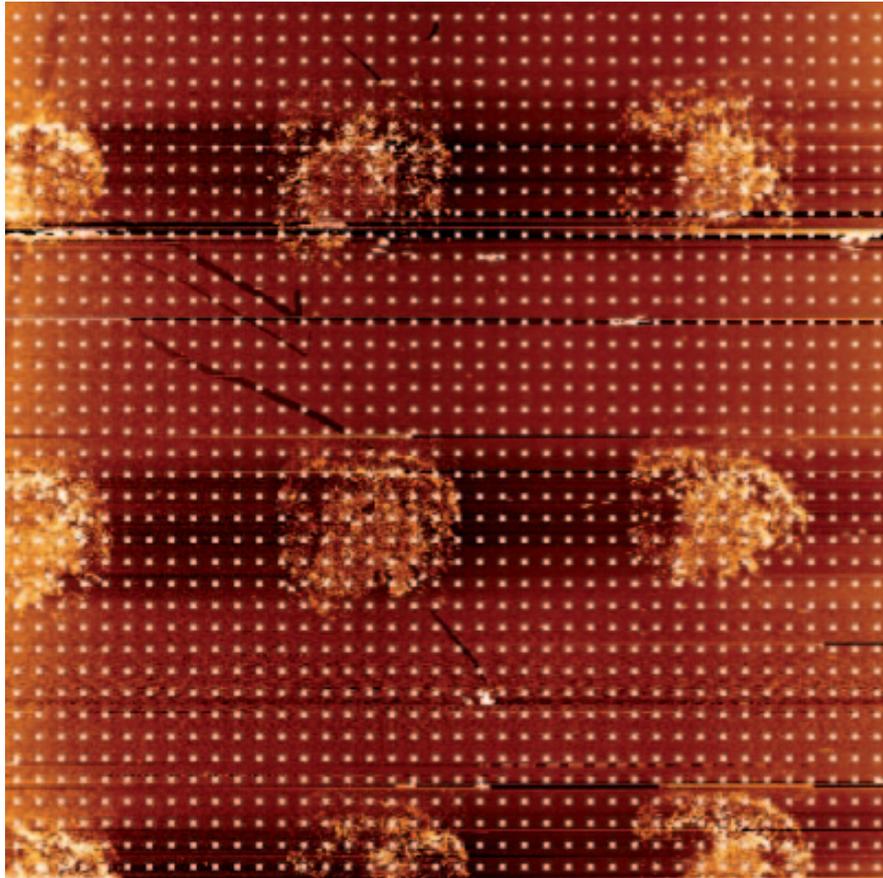


Abb. 30: Über die Topographie des Drei-Komponenten-Systems wird ein Gitter von 40 x 40 Punkten gelegt. Die Punktdichte lässt einen Überblick über die verschiedenen Bereiche der Probe zu, kann aber nicht alle Details erfassen.

der Größe der entstehenden Datei wurde auf eine Erhöhung der Anzahl der Punkte auf der Probe verzichtet. Vielmehr war es wichtig, die Anzahl der Datenpunkte pro Kraft-Distanz-Kurve zu erhöhen. Bei einer Probe dieser Größe ist eine Verkippung unter dem Rasterkraft-Mikroskop von einigen Mikrometern möglich. Der Absolut-Modus bei der Aufnahme der Kraft-Distanz-Kurven führt dabei zu einer großen Streuung über die Höhenachse. Bei der Datenvorverarbeitung können aus diesem Grund einige Datenpunkte entfernt werden. Um diesen Verlust möglichst klein zu halten, ist eine hohe Anzahl von Datenpunkten pro Kurve notwendig.

### 4.2.3 Adhäsion und Steigung

Die Abbildung 31 stellt die aus den Rohdaten berechnete Adhäsion (a) und Steigung (b) dar. Die Adhäsion zeigt einen einheitlich gelben Hintergrund mit einigen einzelnen roten Bereichen. Die Gelbtöne sind auf der linken Seite der Abbildung etwas dunkler als auf der rechten

Seite. In Kenntnis der Topographie und der hier nicht gezeigten mikroskopischen Aufnahme ist eine Abgrenzung von Glas und Gold anhand dieser Abbildung möglich. Demnach entsprechen die roten Bereiche den Avidin-Inseln.

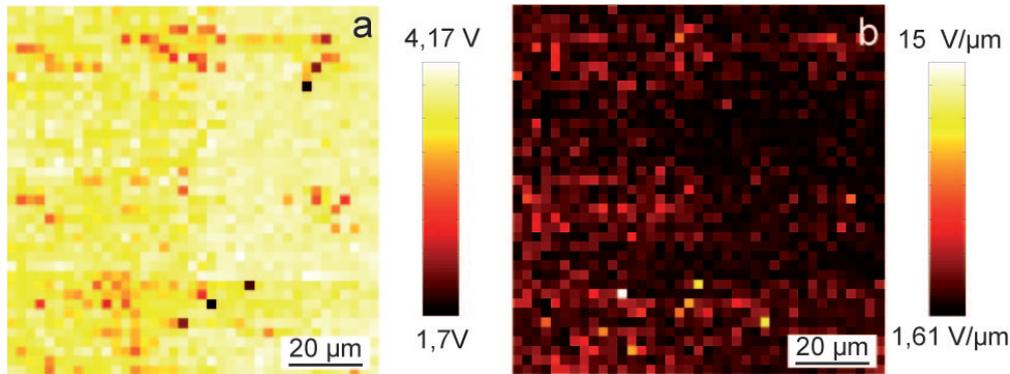


Abb. 31: Nach der Vorverarbeitung der Daten zeigen sowohl Adhäsion (a) als auch Steigung (b) lediglich Hinweise auf unterschiedliche Komponenten. Klar erkennbare Strukturen fehlen jedoch.

Die Steigung zeigt ein einheitlich rot eingefärbtes Bild. Hier ist es sehr schwer, Strukturen zuzuordnen. Mit Kenntnis der Topographie ist es jedoch möglich, auch hier Strukturen zu erkennen. So zeigen heller rot eingefärbte Bereiche die Positionen der Avidin-Inseln an. Es ist auch eine Farbänderung zwischen der linken und der rechten Bildhälfte zu erahnen, die eine Unterscheidung von Gold und Glas möglich macht. Ohne Kenntnis der topographischen Information ist eine Identifizierung einzelner Strukturen anhand von Steigung und Adhäsion in diesem Beispiel nicht möglich. Lediglich einige Hinweise auf verschiedene Strukturen können beobachtet werden.

#### 4.2.4 Kraft-Distanz-Kurven

Die Kraft-Distanz-Kurven auf den unterschiedlichen Materialien zeigen sowohl in der Adhäsion als auch in der Steigung keine signifikanten Unterschiede.

Abbildung 32 zeigt drei Kraft-Distanz-Kurven der unterschiedlichen Materialien Glas (rot), Gold (grün) und der Avidin-Insel (schwarz). In der Steigung der Kurven sind kaum Unterschiede zu beobachten. Die Adhäsion zeigt geringe Unterschiede in den Kurven von Avidin und Gold. Deutlicher hebt sich die Adhäsion des Glases (rot) ab. Auffällig bei diesen Kurven ist das starke Rauschen im Bereich der Steigungsäste. Bei allen drei Materialien taucht eine Art Sägezahnmuster in diesen Bereichen auf. Eine mögliche Erklärung für das

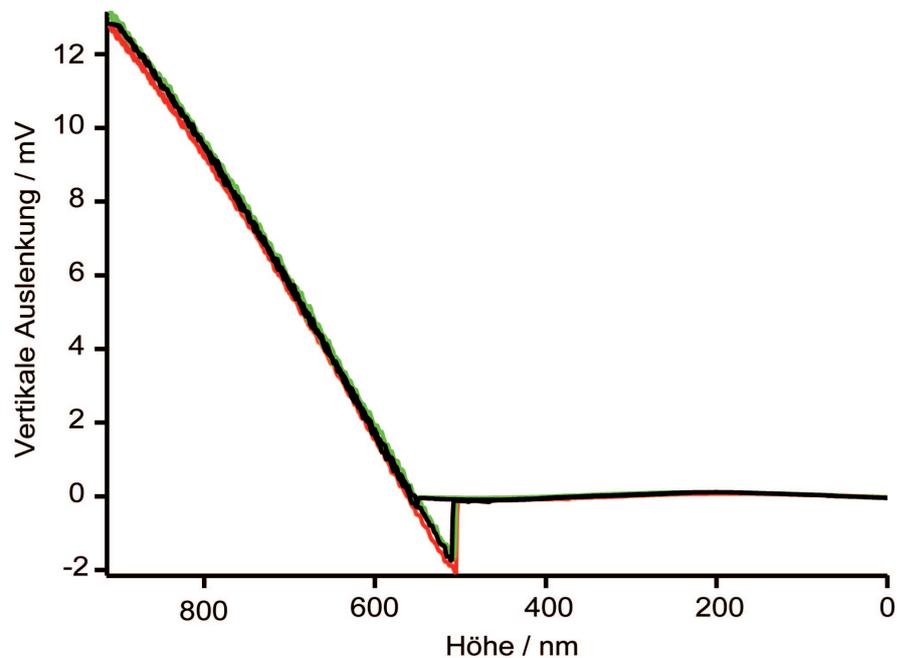


Abb. 32: Kraft-Distanz-Kurven von verschiedenen Bereichen der Probe.

Auftreten dieser Artefakte könnte die Probenvorbereitung oder die Probe selbst sein. Da die Probenoberfläche während der Vorbereitung mit einer Vielzahl von Chemikalien behandelt wurde, ist es vorstellbar, dass sich Verunreinigungen auf der Oberfläche absetzen konnten, die durch Wechselwirkungen die Messungen der eigentlichen Materialien verhindern. Denkbar ist jedoch auch, dass schon zu Beginn der Messung Material, etwa Avidin, von der Spitze aufgenommen wurde.

Bei der Berechnung von Steigung und Adhäsion spielt das Rauschen in den Daten keine große Rolle, da hier feste Werte für die Berechnung herangezogen werden, die nicht in diesem Bereich liegen.

#### 4.2.5 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse mit den vorverarbeiteten Kraft-Distanz-Kurven zeigt ein eher uneinheitliches Bild. Der Scores-Plot für die Hauptkomponenten 1 (PC 1) und 2 (PC 2) in Abbildung 33 zeigt eine starke Konzentrierung der Datenpunkte im Koordinatenursprung. Es gibt nur einige wenige Datenpunkte, die weiter entfernt im positiven Bereich lokalisiert sind.

Die „Übersetzung“ dieser Daten mithilfe der Farbskala führt zu einem einheitlichen blau-

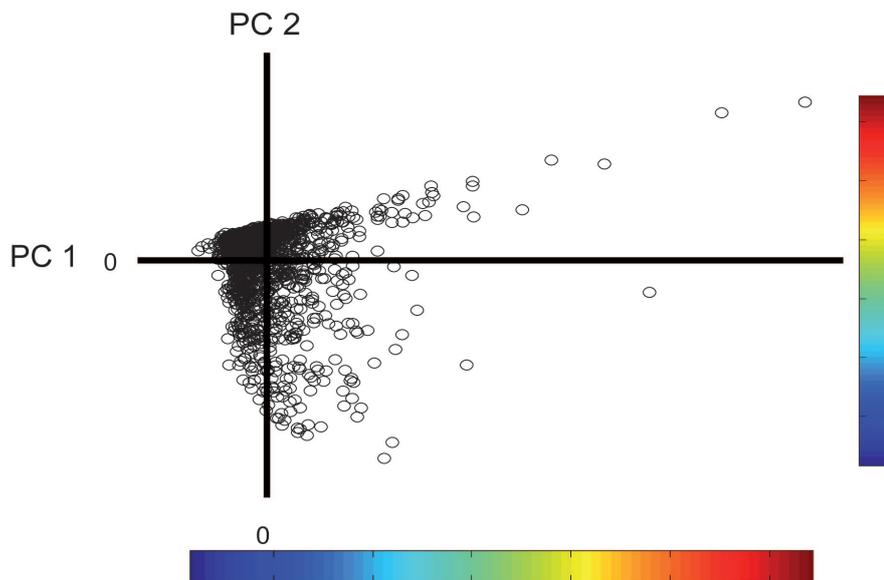


Abb. 33: Der Scores-Plot der Hauptkomponenten 1 und 2 zeigt keine klare Struktur in der Anordnung der Datenpunkte.

en Teppich für die erste Hauptkomponente (Abbildung 34 a). Angedeutet ist eine Unterscheidung von Gold und Glas (in verschiedenen Blautönen). Die Avidin-Inseln werden in dieser Hauptkomponente nicht berücksichtigt.

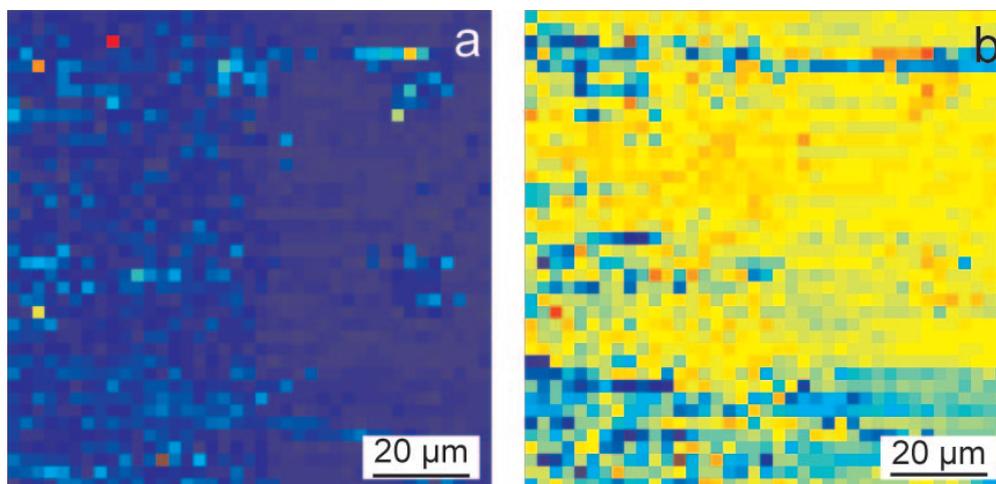


Abb. 34: Die Farbkodierung der Daten zeigt in der ersten Hauptkomponente (a) Andeutungen für eine Teilung zwischen Glas (rechts) und Gold (links). Die zweite Hauptkomponente (b) zeigt Hinweise auf die Avidin-Inseln.

Die Varianz im Bereich der zweiten Hauptkomponente (PC 2) ist noch geringer. Jedoch zeigt sich hier, dass die Avidin-Inseln in dieser Hauptkomponente beschrieben werden. Der größte Teil der Datenpunkte bezieht sich auch hier auf die Oberfläche aus Gold und Glas (gelb). Die blauen Bereiche lassen jedoch auf die Avidin-Inseln schließen, wenn diese auch nicht eindeutig identifizierbar sind.

Im unteren Drittel der Abbildung ist ein Bereich in Grün- und Blautönen zu sehen, der sich vom restlichen Hintergrund unterscheidet. Der farblichen Zuordnung folgend müsste es sich hierbei um Avidin handeln. Im Vergleich mit der Topographie ist jedoch keine Anhäufung von Avidin-Molekülen zu beobachten. Es könnte sich hierbei um Artefakte handeln, die während der Probenvorbereitung oder während der Messung selbst aufgetreten sind.

In Abbildung 35 sind verschiedene Hauptkomponenten gegeneinander aufgetragen. Die Scores-Plots der Hauptkomponenten 2 gegen 3 (a) und 3 gegen 4 (b) zeigen geringe Strukturen, bei denen man von Gruppen sprechen kann. In diesen Hauptkomponenten sind Informationen über die Beschaffenheit der Probe zu finden.

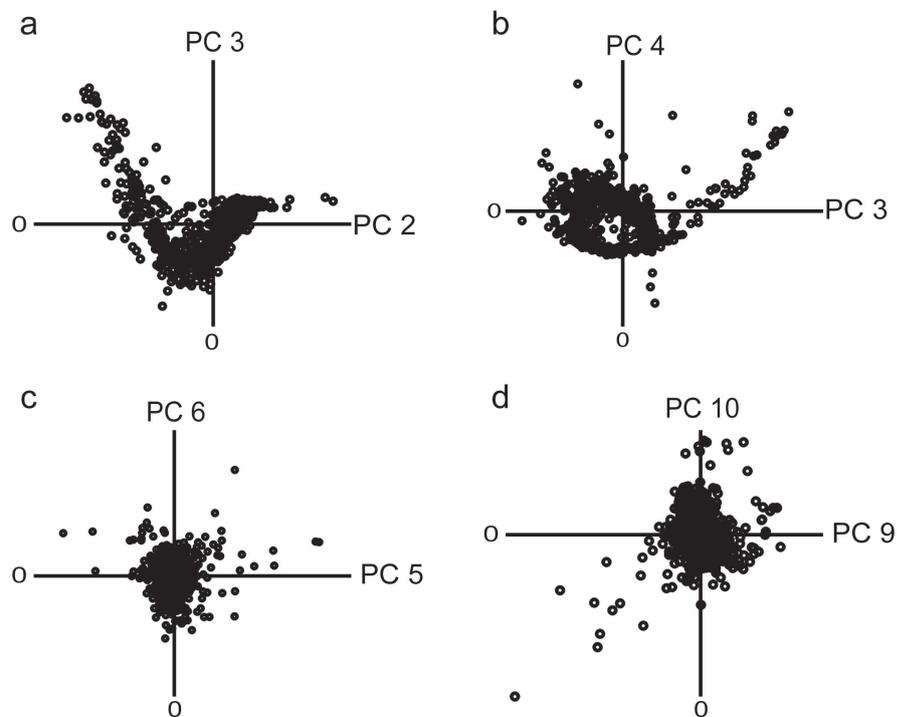


Abb. 35: Die Scores-Plots der höheren Hauptkomponenten zeigen keine signifikanten Gruppierungen. Lediglich in den Hauptkomponenten 2, 3 und 4 sind Strukturen zu erkennen.

Die Scores-Plots der Hauptkomponenten 5 gegen 6 (c) und 9 gegen 10 (d) zeigen, bis auf einige Ausnahmen, alle Punkte im Koordinatenursprung. Dies bedeutet, dass in diesen Hauptkomponenten keine Informationen über die Probe mehr zu finden sind. Ab der fünften Hauptkomponente ist nur noch Rauschen in den Daten zu finden. Dies zeigen auch die Varianzen (vgl. Tabelle 2). Die fünfte Hauptkomponente trägt nur noch 2,5% zur Gesamtvarianz bei.

Abbildung 36 zeigt die Hauptkomponenten 1-8 für diese Probe. Die erste Hauptkomponente

zeigt, wie oben beschrieben, die Unterscheidung von Gold und Glas, während die zweite Hauptkomponente die Avidin-Inseln zeigt. PC 3 und PC 4 zeigen ein ähnliches Bild wie PC 2. Auch hier werden Informationen über das Avidin bereitgestellt. PC 5 scheint aufgrund der Farbgebung die Komponente zu sein, die hauptsächlich Informationen über das Avidin beinhaltet. Die Hauptkomponenten 6 bis 8 steuern nur noch wenige Informationen zum Gesamtbild bei und zeigen vermutlich das Rauschen in den Daten.

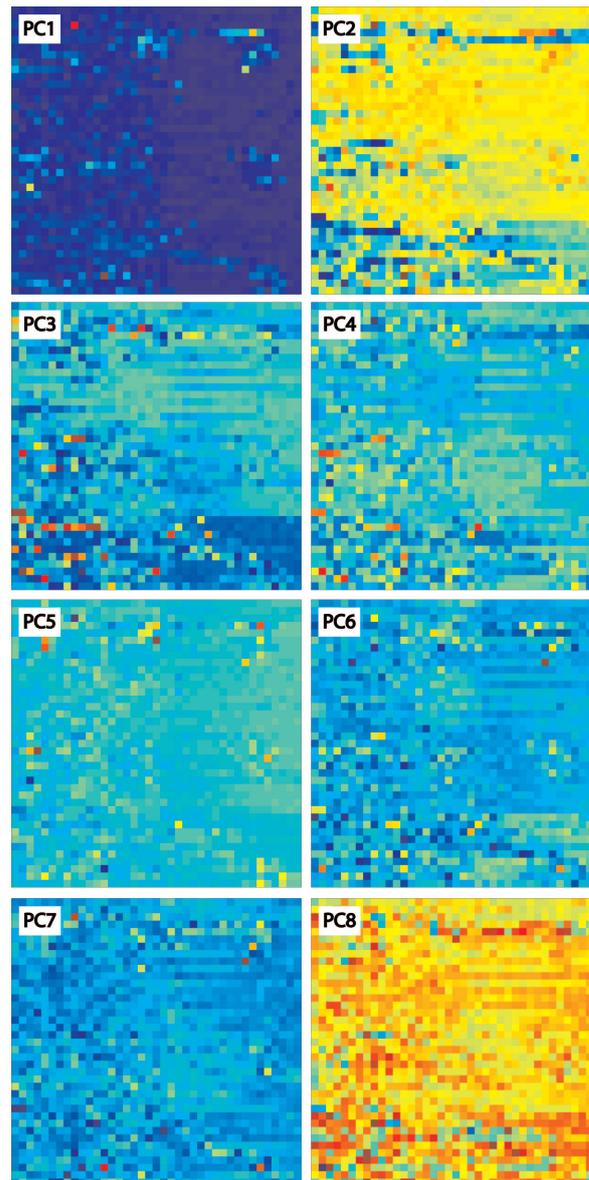


Abb. 36: Die Hauptkomponenten 1-8 enthalten jeweils nur wenige Informationen.

Ein ähnliches Bild zeigt sich auch in der Verteilung der erklärten Varianz. Die folgende Tabelle zeigt die prozentuale Verteilung der Varianz auf die einzelnen Hauptkomponenten.

Mit der ersten Hauptkomponente werden 56,9 % der Varianz erklärt. Mit der zweiten

Tabelle 2: Prozentuale Anteile der einzelnen Hauptkomponenten sowie Gesamtvarianz der erklärten Daten des Drei-Komponenten-Systems.

Hauptkomponente	erklärte Varianz (%)	Gesamtvarianz (%)
1	56,9	56,9
2	20,5	77,4
3	5,5	82,9
4	3,1	86,0
5	2,5	88,5
6	1,4	89,9
7	1,7	91,6
8	0,7	92,3

Hauptkomponente werden der Varianz weitere 20 % hinzugefügt, sodass über 77 % der Varianz allein mit den ersten beiden Hauptkomponenten erklärt werden. Die nachfolgenden Hauptkomponenten steuern nur noch wenig zur Gesamtvarianz bei. Auffällig ist, dass mit der achten Hauptkomponente nur etwas mehr als 90 % der Gesamtvarianz erklärt sind. Nahezu 10 % der Varianzen stehen noch für weitere Hauptkomponenten zur Verfügung. Dies bedeutete, dass durchaus noch wesentliche Informationen in den restlichen Hauptkomponenten verborgen sein können.

#### 4.2.6 Hierarchische Clusteranalyse

Die Clusteranalyse wurde wie beim Zwei-Komponenten-Modellsystem durchgeführt. Nach der Berechnung der euklidischen Distanzen für die einzelnen Punkte, wurden anschließend mit der Ward-Methode [76] die Cluster erstellt. Zunächst wurde hierbei eine Anzahl von dreißig Clustern gewählt.

Es ist deutlich eine Zweiteilung des Dendrogramms (vgl. Abbildung 37) zu beobachten. Der linke Ast des Dendrogramms teilt sich in dieser Darstellung in zwei weitere größere Äste, sodass der Eindruck einer Dreiteilung der Daten entsteht. Die Anzahl der Cluster wurde aufgrund dieses Dendrogramms auf acht festgelegt.

Abbildung 38 a zeigt die Einteilung der Daten in acht vorgegebene Cluster. Deutlich ist in dieser Darstellung die Teilung in zwei große Gruppen zu erkennen. Gruppe eins umfasst die Cluster 1, 7, 8, 2 und 3, während in Gruppe zwei die Cluster 5, 6, und 4 zusammengefasst sind. Gruppe eins teilt sich in zwei weitere Cluster. Die kophenetische Distanz zeigt, dass

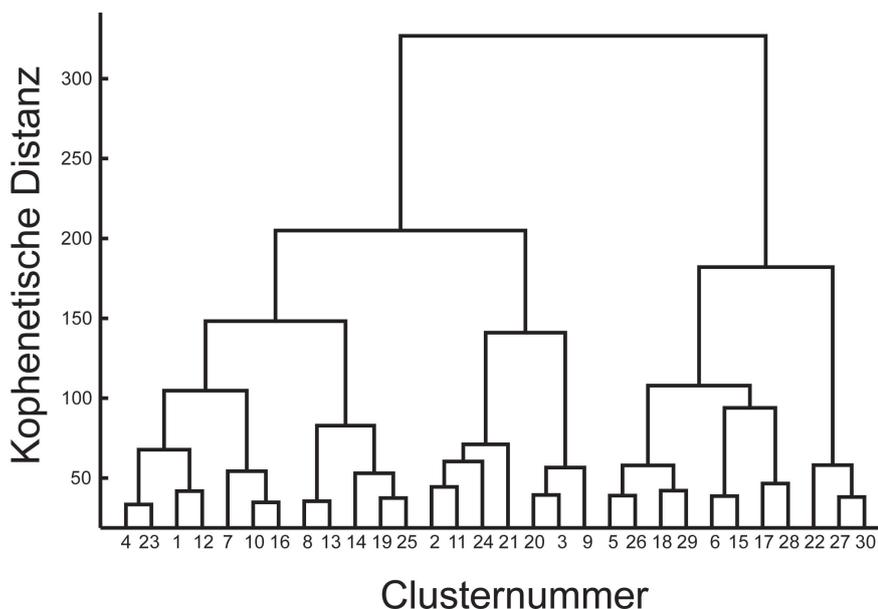


Abb. 37: Die Übersicht über die Clusterzuordnung mit 30 Clustern zeigt eine sinnvolle Einteilung in acht Cluster.

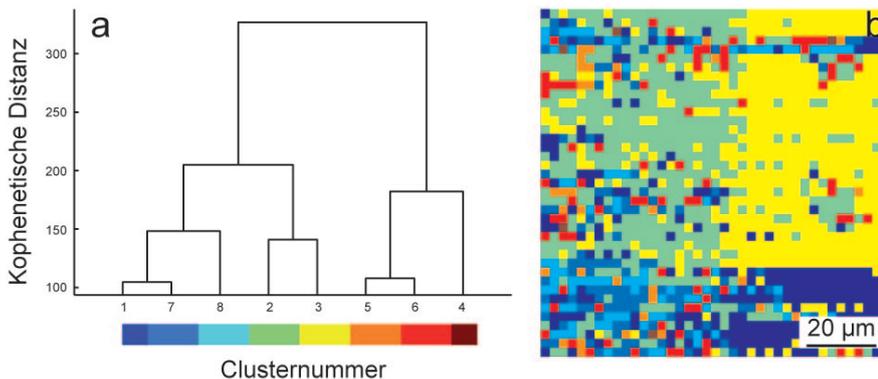


Abb. 38: Das Dendrogramm für acht Cluster (a) zeigt eine Dreiteilung der Daten. Mithilfe der Farbkodierung (b) kann sowohl zwischen Glas (gelb), Gold (grün) und den Avidin-Inseln (rot) unterschieden werden. Im unteren Drittel der Probe sind Artefakte zu beobachten.

diese nicht sehr eng miteinander verbunden sind. Es entstehen somit drei etwa gleich weit voneinander entfernte Cluster. Mithilfe der Farbkodierung ist es möglich, das Dendrogramm zu übersetzen. Abbildung 38 b zeigt, wie sich die einzelnen Cluster über die vermessene Fläche verteilen. Es zeigt sich ein unerwartetes Bild. Das hierarchische Clustern unterscheidet zwar zwischen Glas (gelb), Gold (grün) und Protein (rot), jedoch nicht in der erwarteten Weise. Der Farbkodierung folgend liegen die Kraft-Distanz-Kurven von Glas und Gold so dicht beieinander, dass sie eine gemeinsame Gruppe bilden. Diese Gruppe unterscheidet sich von derjenigen, die die Protein-Inseln beschreibt (rot). Auffällig ist jedoch der in verschiedenen Blautönen eingefärbte Bereich im unteren Viertel des Bildes. Die Kraft-Distanz-Kurven scheinen sich in diesem Bereich der Probe sehr stark von denen der restlichen Probe zu

unterscheiden. Im Vergleich mit der Topographie sind in diesem Bereich keine Unregelmäßigkeiten zu erkennen. Lediglich in der Darstellung der lateralen Deflektion, sind in diesem Teil der Probe Strukturen zu erkennen. Worum es sich hierbei handelt kann abschließend nicht geklärt werden.

Eine weitere Auffälligkeit in dieser Abbildung ist die geringe Anzahl an Kurven, die dem Protein zugeordnet werden. Eine mögliche Begründung liegt in der Verteilung des Proteins auf der Probe und der Punktdichte an Kraft-Distanz-Kurven in diesen Bereichen. Die Topographie zeigt, wie oben beschrieben, eine inhomogene Verteilung des Proteins innerhalb der Inseln. Es ist zu vermuten, dass sowohl Monolagen als auch Mehrfachlagen von Proteinen vorkommen. Dies führt dazu, dass im Fall einer Monolage nicht nur Interaktionen von Spitze und Protein gemessen werden, sondern auch Interaktionen von Spitze, Protein und Untergrund auftreten. Auf Monolagen gemessene Kurven ähneln in ihren Eigenschaften möglicherweise Kurven, die auf Gold gemessen wurden. Bei der Clusteranalyse würden diese Kurven in einem Cluster zusammengefasst und bekämen bei der bildlichen Darstellung dieselbe Farbe. Dies würde die grünen Flächen im rechten Bilddrittel von Abbildung 38 b erklären. Die Kraft-Distanz-Kurven auf Mehrfachlagen von Proteinen dagegen würden nur die Wechselwirkungen von Spitze und Protein beschreiben. Bei der Clusteranalyse werden diese Kurven in einem eigenen Cluster zusammengefasst, das sich von anderen Clustern mit Proteinbeteiligung unterscheidet.

#### **4.2.7 K-Means Clustering**

Ebenso wie das Zwei-Komponenten-System wurde auch das Drei-Komponenten-System mit dem K-Means-Algorithmus untersucht. Nachdem das Zwei-Komponenten-System mit diesem Algorithmus nur unzureichend beschrieben werden konnte, wurde dennoch nicht auf diese Cluster-Methode verzichtet. Abbildung 39 zeigt die Einteilung der Daten in drei Cluster.

Es ist zu sehen, dass zwischen der Gold- und Glas-Oberfläche und den Proteininseln nicht unterschieden werden kann. Zwar ist es mithilfe der Topographie möglich, die rot eingefärbten Bereiche als Protein zu identifizieren, jedoch würde dies bedeuten, dass nur sehr wenig Protein in den Inseln zu finden ist und auch Protein auf der gesamten Fläche verteilt

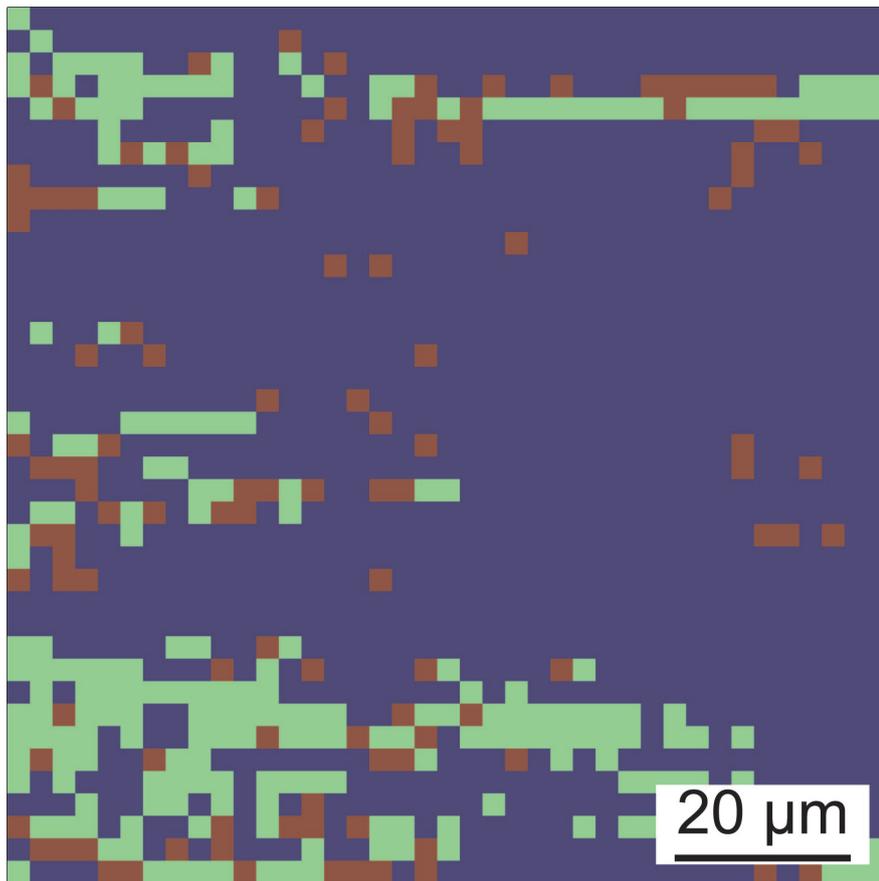


Abb. 39: Bei einer vorgegebenen Anzahl von drei Clustern kann mit dem K-Means-Algorithmus zwar zwischen der Oberfläche und den Avidin-Inseln unterschieden werden, jedoch nicht zwischen Glas und Gold.

wurde. Ebenso ist eine eindeutige Unterscheidung von Glas und Gold nicht möglich. Verwendet man die Farbgebung und ordnet Gold die Farbe Grün zu, so würde dies bedeuten, dass sich nur im unteren Drittel des Bildes und in der oberen linken Ecke Gold befinden würde, die restliche Oberfläche aus Glas bestehen würde. Dieses konnte jedoch schon mit dem hierarchischen Clustern widerlegt werden.

Wird die Anzahl der Cluster auf fünf erhöht (vgl. Abbildung 40), so zeigt sich, dass eine Unterscheidung getroffen wird zwischen Protein (Blautöne), der Probenoberfläche (grün) und den oben genannten Artefakten im unteren Drittel des Bildes (orange). Abbildung 41 zeigt das Ergebnis nach Einteilung in zehn Cluster.

In dieser Abbildung ist erstmalig eine Unterscheidung zwischen der Goldoberfläche (dunkelblau) und dem Glas (hellblau) zu sehen. Auch scheinen, insbesondere im Bereich des Glases, die Proteine eindeutig identifizierbar zu sein (dunkelblau-gelb). Die farbliche Zuordnung allerdings würde bedeuten, dass in diesem Bereich auch Gold zu finden ist.

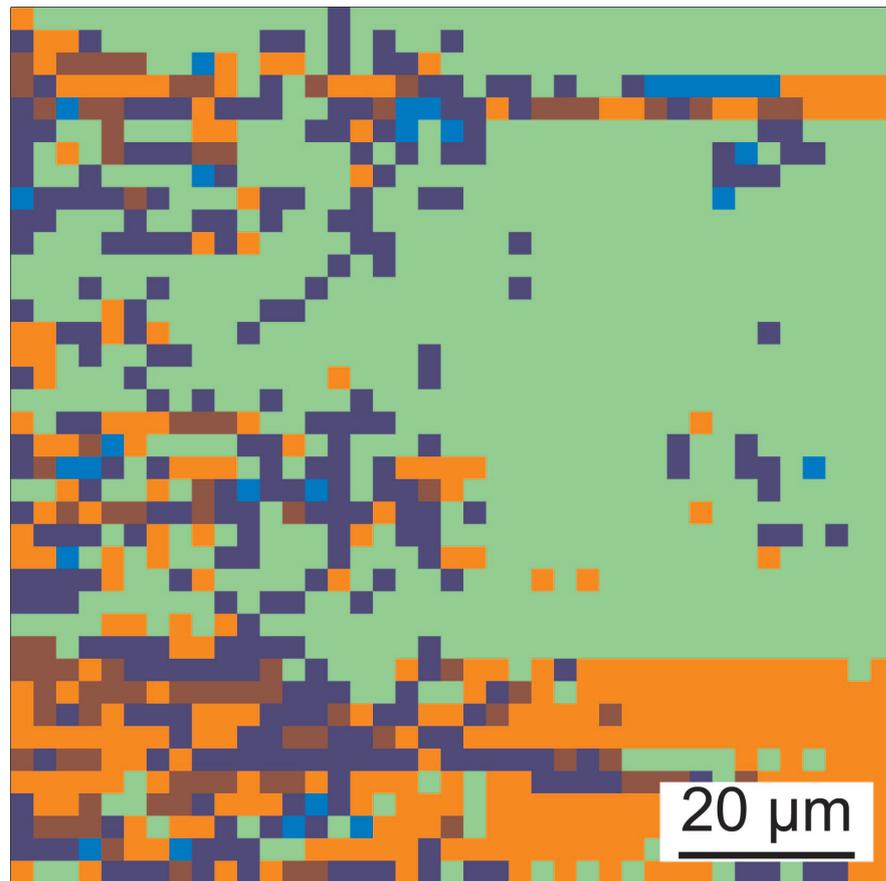


Abb. 40: Bei fünf vorgegebenen Clustern wird mit dem K-Means-Algorithmus zwischen den Artefakten im unteren Drittel der Probe (orange), der restlichen Oberfläche (grün) und den Avidin-Inseln (blau) unterschieden.

Das K-Means-Clustering ist auch für dieses System nur wenig erfolgreich. Durch den unüberwachten Charakter ist es nicht möglich herauszufinden, welche Anzahl an Clustern geeignet ist, das System zu beschreiben. Zwar ist es dieser Methode gelungen, zwischen Glas und Gold zu unterscheiden, jedoch ist eine eindeutige Zuordnung der Proteine nicht möglich. Weiterhin ist zu beobachten, dass bei einer Anzahl von zehn Clustern die Darstellung vor allem im Bereich der Goldoberfläche unübersichtlich wird. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Vielfalt an Materialmischungen, die mit der Spitze interagieren. Durch das Auftragen der Proteine entstehen, je nach Schichtdicke, Mischungen aus Gold und Protein, Gold und Glas und Gold, Glas und Protein. Da diese jeweils andere Eigenschaften besitzen, werden bei einer erhöhten Anzahl an Clustern auch diese Feinheiten berücksichtigt, je nachdem, wie die Startpunkte der Cluster gesetzt werden.

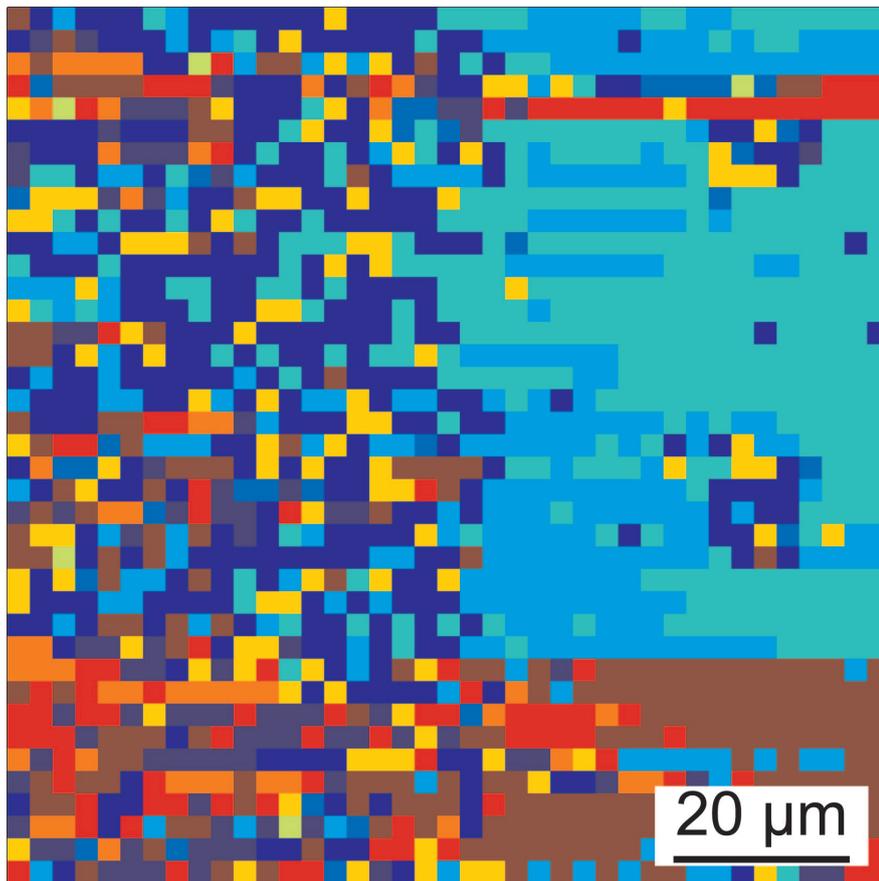


Abb. 41: Die Vorgabe von zehn Clustern zeigt ein ähnliches Bild wie die K-Means-Analyse mit fünf Clustern. Es treten jedoch hier einige weitere Details auf.

#### 4.2.8 Zusammenfassung

Sowohl die Hauptkomponentenanalyse wie auch das hierarchische Clustern führt in diesem komplexen System zu guten Ergebnissen. Mit beiden Methoden ist es möglich, die drei Materialien auf der Probe zu unterscheiden, obwohl in der Topographie keine Unterscheidung zwischen Gold und Glas möglich ist. Das hierarchische Clustern zeigt hier das beste Ergebnis. Die Daten werden mit dieser Methode besser strukturiert und zeigen schon im Dendrogramm eine beobachtbare Dreiteilung. Das genaue Studium des Dendrogramms ist jedoch weiterhin notwendig, um die geeignete Anzahl von Clustern zu finden. Eine automatisierte Suche würde hierbei zu einer Vielzahl von Artefakten und einer damit verbundenen Überinterpretation der Daten führen.

Die Hauptkomponentenanalyse dagegen zeigt kein eindeutiges Ergebnis. Eine Unterscheidung der einzelnen Komponenten entsteht nur durch Kombination mehrerer Hauptkomponenten. So ist eine erklärte Varianz von 77 % in den ersten beiden Hauptkomponenten nur so

zu interpretieren, dass über 20 % der Informationen noch nicht erfasst wurden. Diese befinden sich also in den weiteren Hauptkomponenten. Werden die Varianzen dieser Hauptkomponenten betrachtet, so fällt auf, dass diese oft nur unter einem Prozent zur Gesamtvarianz beitragen. Somit werden in den höheren Hauptkomponenten nur einzelne Details der Oberfläche erfasst. Dies führt dazu, dass vor allem im Bereich des Proteins keine einheitliche Zuordnung festzustellen ist.

Eine große Unsicherheit bringt die Größe der Probenoberfläche in diese Daten ein. Aufgrund der komplexen Daten und der Größe der Dateien sind auf einer Fläche von  $100 \times 100 \mu\text{m}$  nur eine begrenzte Anzahl von Kraft-Distanz-Kurven möglich. Damit verbunden ist eine uneinheitliche Verteilung der Messpunkte auf die verschiedenen Komponenten. Dies führt dazu, dass Bereiche, wie etwa die Proteininseln, gegenüber der größeren Fläche des Glases oder des Goldes mit nur wenigen Daten beschrieben werden. Dass diese Inseln mit den verwendeten Methoden keine einheitliche Struktur zeigen, weist darauf hin, dass auch die Probenpräparation optimiert werden muss. Im Bereich des Avidins scheinen unterschiedlich dicke Lagen von Proteinen aufgebracht worden zu sein, so dass, je nach Schichtdicke, die Kraft-Distanz-Kurven unterschiedlich aussehen und somit bei der Auswertung eigenen Clustern zugeteilt werden. Wahrscheinlich ist die Haftfähigkeit der Proteine stark von den verwendeten Materialien abhängig.

## 4.3 Realprobe eines komplexen Systems

### 4.3.1 Art der Probe

Bei der hier untersuchten Probe handelt es sich um eine Realprobe, die freundlicherweise von Prof. Dr. Friedbacher (TU Wien) zur Verfügung gestellt wurde. Die Probe besteht aus einer Mischung von Silizium und n-Octadecylsilan (OTS). Entsprechend der Herstellung sollen beide Materialien in unregelmäßiger, aber planer Form vorkommen. In ersten Versuchen zeigten sich jedoch kugelförmige Strukturen, die nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Eine Analyse der chemischen Zusammensetzung dieser Strukturen mithilfe von Kraftspektroskopie und multivariater Datenanalyse sollte klären, ob es sich um einen der verwendeten Stoffe oder um ein völlig anderes Material handelt.

### 4.3.2 Topographie

Zur Bestimmung einer geeigneten Position auf der Probe, bei der alle Komponenten sichtbar sind, wurde zunächst eine topographische Übersicht erstellt. Die Abbildung 42 zeigt drei kugelförmige Strukturen mit einer Höhe von etwa sieben Nanometern auf einer ebenen Fläche. Diese wurden beobachtet, konnten aber mit herkömmlichen Methoden keiner der beiden aufgetragenen Substanzen zugeordnet werden.

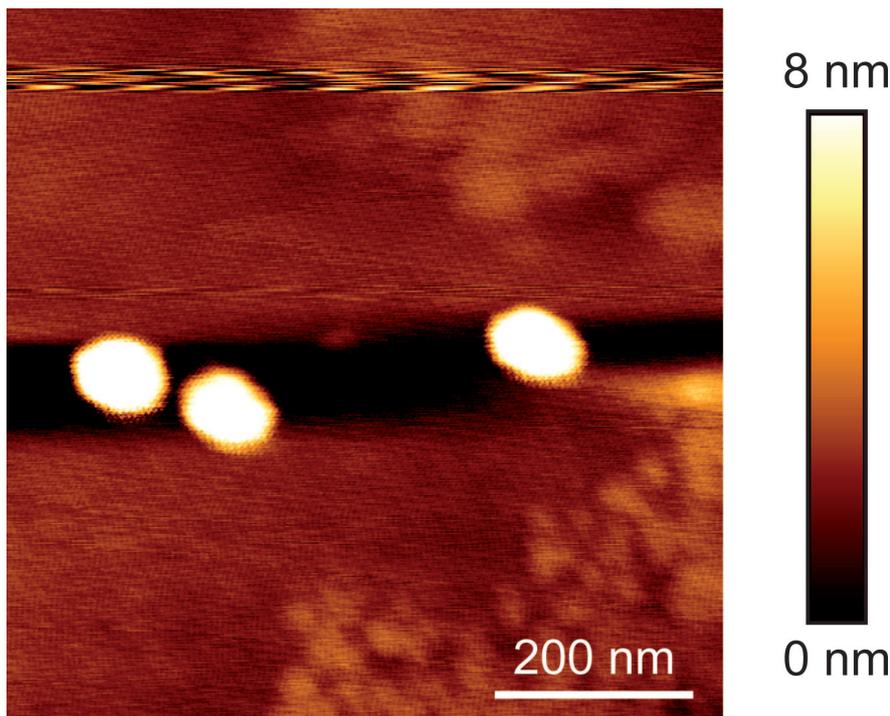


Abb. 42: Die linienkorrigierte Topographie zeigt unterschiedlich raue Strukturen, sowie die unbekanntes kugelförmigen Strukturen. Im oberen Teil der Topographie ist eine Störung zu erkennen. Diese ist auf eine unkontrollierte Bewegung des Rasterkraft-Mikroskopes während der Messung zurückzuführen.

In der rechten oberen sowie der rechten unteren Ecke lassen sich weitere, jedoch niedrigere Strukturen erkennen. Eine Unterscheidung der beiden aufgetragenen Komponenten Silizium und n-Octadecylsilan ist also, anhand der unterschiedlichen Rauigkeit der Komponenten, schon in der Topographie möglich. Es sind jedoch keine Hinweise auf die Beschaffenheit der kugelförmigen Strukturen zu erkennen.

Im oberen Bereich der Topographie ist eine Störung zu beobachten, die während der Messung aufgetreten ist. Hierbei handelt es sich um ein Artefakt, das zum Beispiel durch einen Luftzug oder eine Erschütterung des Rasterkraft-Mikroskopes hervorgerufen wurde. Dieses Artefakt hat keinerlei Auswirkungen auf die Messung von Kraft-Distanz-Kurven, da diese

unabhängig von der Topographie aufgenommen wurden.

### 4.3.3 Kraft-Distanz-Kurven

Zur weiteren Bestimmung der chemischen Zusammensetzung der unbekannt, kugelförmigen Strukturen wurden Kraft-Distanz-Kurven aufgenommen. Hierzu wurde ein Gitter von 32 x 32 Messpunkten über die Topographie gelegt.

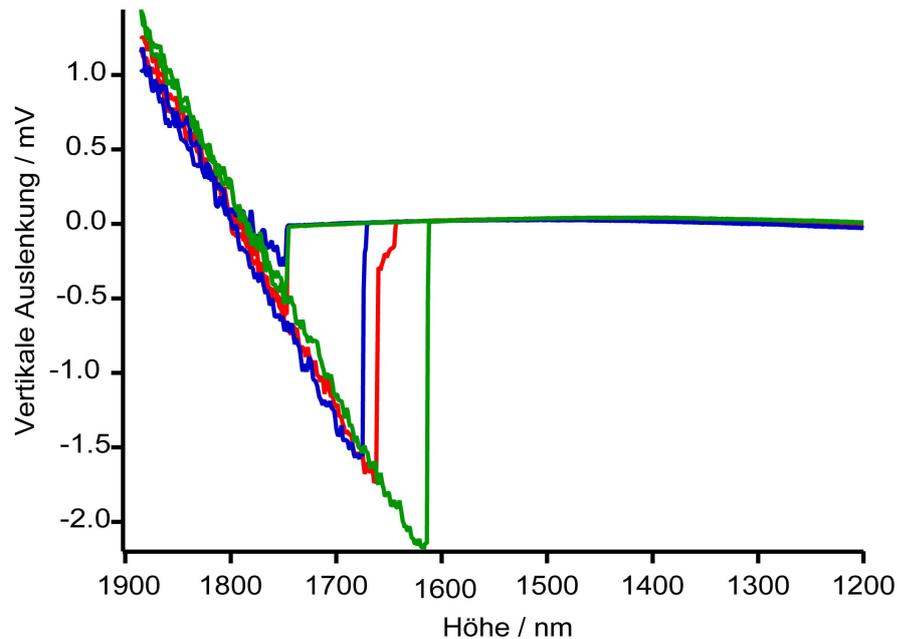


Abb. 43: Anhand der Kraft-Distanz-Kurven der verschiedenen Materialline kann eine Aussage über die unbekannte kugelförmige Struktur getroffen werden. Kraft-Distanz-Kurven auf der sichtbaren Struktur in der rechten unteren Ecke der Probe (rot) zeigt große Ähnlichkeiten mit Kurven, die auf der unbekannt Struktur gemessen wurden (blau). Unterschiedlich dagegen ist die Kraft-Distanz-Kurve auf dem Substrat (grün).

Abbildung 43 zeigt Kraft-Distanz-Kurven nach der Vorverarbeitung. Die Kurven stammen von unterschiedlichen Punkten auf der Probe. Die rote Kurve wurde in der unteren rechten Ecke aufgenommen, die blaue Kurve repräsentiert einen Punkt auf der linken unbekannt Struktur, während die grüne Kurve im linken oberen Bereich der Probe aufgenommen wurde, wo keine Struktur zu erkennen ist. Es ist zu sehen, dass rote und blaue Kurve sowohl in der Steigung wie auch in der Adhäsion Ähnlichkeiten aufweisen. Der Abreiß-Punkt dieser beiden Kurven liegt im selben Bereich. Die grüne Kurve dagegen weist in der Position des Abreiß-Punktes einen deutlichen Unterschied auf. Ebenso ist im Vergleich mit den beiden anderen Kurven die Steigung unterschiedlich. Anhand dieser Kurven ist es möglich eine Beziehung zwischen der blauen und roten Kurve herzustellen. Dies bedeutet, dass

die unbekannte Struktur dem Material auf der rechten Seite der Probe zugeordnet werden könnte.

#### 4.3.4 Hauptkomponentenanalyse

Nachdem die Daten mit der beschriebenen Methode vorverarbeitet wurden, wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Abbildung 44 zeigt den Scores-Plot, bei dem die erste Hauptkomponente (PC 1) gegen die zweite Hauptkomponente (PC 2) aufgetragen wurde.

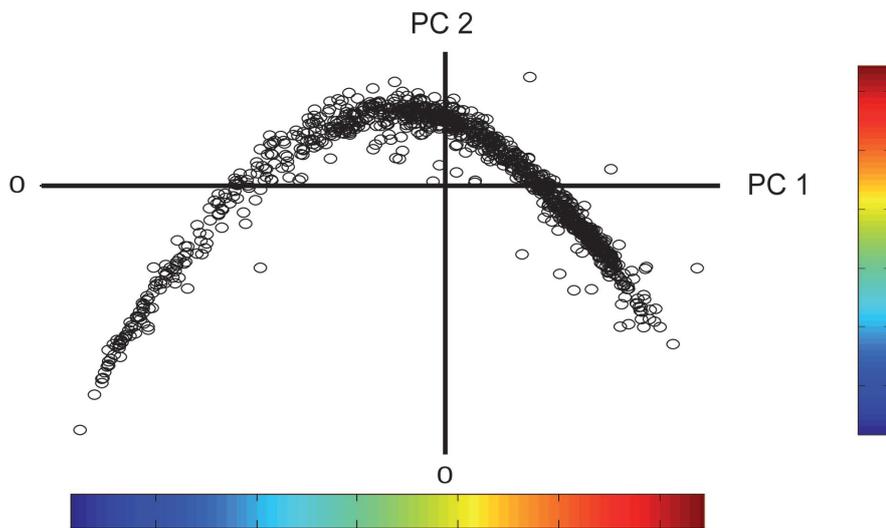


Abb. 44: Der Scores-Plot der ersten (PC1) und zweiten (PC2) Hauptkomponente deutet eine Zweiteilung der Daten an.

Die Datenwolke beschreibt einen Bogen mit einer größeren Anzahl Datenpunkte an den beiden Enden. In der Mitte der Kurve sind nur wenige Datenpunkte verteilt. Es ist keine deutliche Einteilung in zwei oder mehrere Gruppen zu erkennen. Jedoch kann aufgrund der Anordnung der Datenpunkte von zwei verschiedenen Materialien ausgegangen werden.

Die Umrechnung der Datenpunkte auf die vermessene Fläche zeigt in der ersten Hauptkomponente (Abbildung 45 a) eine deutliche Unterscheidung zwischen zwei Bereichen der Probe. Die farbliche Kodierung weist Material 1 eine bläuliche Färbung zu (rechte obere und rechte untere Ecke), während Material 2 mit rot und gelb markiert wird. Die unbekannt kugelförmigen Strukturen erhalten blaue Farbtöne. Dies lässt die Vermutung zu, dass es sich bei den kugelförmigen Strukturen um Material 1 handelt. Ähnliches lässt auch die zweite Hauptkomponente vermuten (Abbildung 45 b). Die Dichte an Informationen ist hier zwar

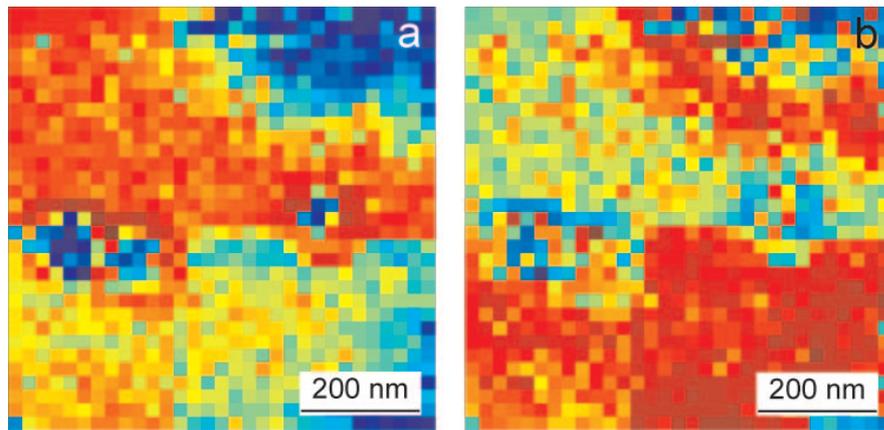


Abb. 45: Die erste Hauptkomponente (a) zeigt Strukturen vergleichbar der Topographie. Der Farbkodierung zufolge sind die unbekannt kugelförmigen Strukturen einem der beiden vorhandenen Materialien zuzuordnen. Auch die zweite Hauptkomponente (b) zeigt ein ähnliches Bild.

nicht mehr so hoch, jedoch können auch hier die kugelförmigen Strukturen dem Material 1 zugeordnet werden.

#### 4.3.5 Clusteranalyse

Bei der hierarchischen Clusternanalyse wurde die euklidische Distanz als Distanzfunktion und die Ward-Methode für die Einteilung in die einzelnen Cluster verwendet.

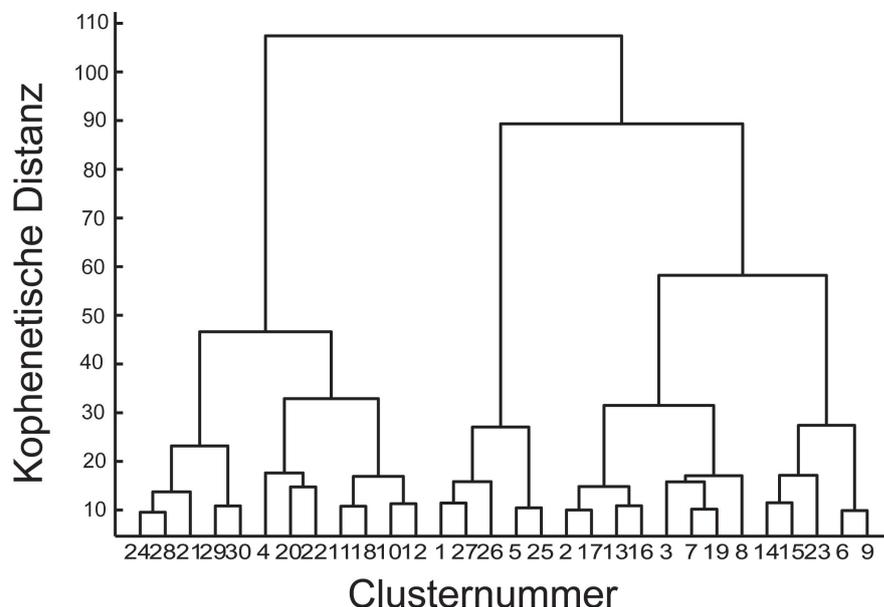


Abb. 46: Die hierarchische Clusteranalyse mit 30 vorgegebenen Clustern zeigt eine Dreiteilung der Probe.

Abbildung 46 zeigt das Dendrogramm mit 30 vorgegebenen Clustern. Auffällig ist, dass sich das Dendrogramm in zwei fast identisch lange Äste spaltet, die weit voneinander entfernt sind. Dies deutet darauf hin, dass auf der Probe zwei sehr unterschiedliche Materialien

vorliegen. Einer der Äste spaltet sich danach in zwei weitere auf. Dies legt das Vorhandensein eines weiteren Materials nahe. Anhand dieses Dendrogramms wurde eine maximale Clusteranzahl von vier festgelegt, um neben den beiden bekannten Materialien einen Cluster für eine eventuelle dritte Komponente und einen vierten Cluster für Rauschen in den Daten bereitzustellen.

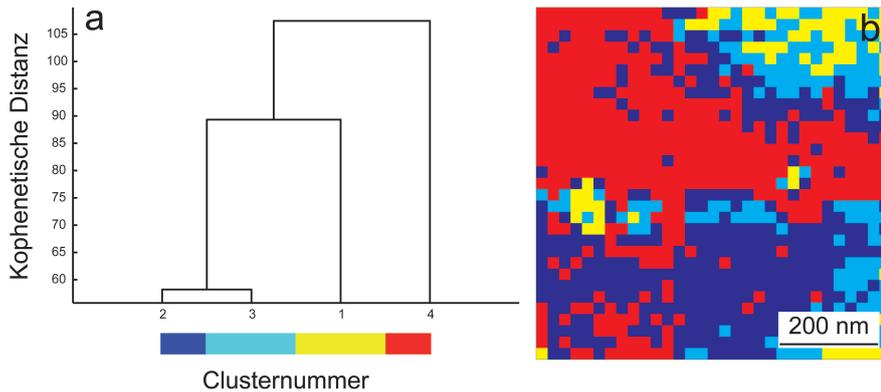


Abb. 47: Die hierarchische Clusteranalyse mit vier Clustern zeigt im Dendrogramm (a) eine Dreiteilung der Daten. In der farbkodierten Darstellung wird zwischen zwei Materialien (1 (hellblau/gelb) und 2 (dunkelblau/rot)) unterschieden. Die unbekannt Strukturen werden auch hier einem der Materialien (1) zugeordnet.

Diese Einteilung bestätigt auch Abbildung 47 a. Dieses Dendrogramm zeigt die Aufteilung in zwei Bereiche, die sehr weit voneinander entfernt sind. Abbildung 47 b zeigt die Umsetzung der Clusteranalyse projiziert auf die vermessene Fläche. Hier ist zu sehen, dass zwischen den beiden bekannten Materialien unterschieden werden kann. Material 1 ist hauptsächlich im oberen Drittel der Abbildung und in Ansätzen in der rechten unteren Bildecke zu finden (gelb), während Material 2 (rot) die restliche Fläche bedeckt. Das Hauptaugenmerk ist auf die kugelförmige Struktur gerichtet. Anhand der farblichen Zuordnung und der kophenetischen Distanz handelt es sich bei diesen kugelförmigen Strukturen um Material 1. Zur Validierung dieses Ergebnisses wurde auch eine Clusteranalyse mit dem K-Means-Algorithmus durchgeführt. Hierzu wurde eine maximale Clusteranzahl von vier gewählt.

Abbildung 48 zeigt eine Unterscheidung zwischen Material 1 (rot) und Material 2 (gelb). Die kugelförmigen Strukturen werden bei dieser Cluster-Methode ebenfalls in braun eingefärbt. Es zeigt sich, dass die unbekannt Strukturen auch mit dem K-Means-Algorithmus dem Material 1 zugeordnet werden können.

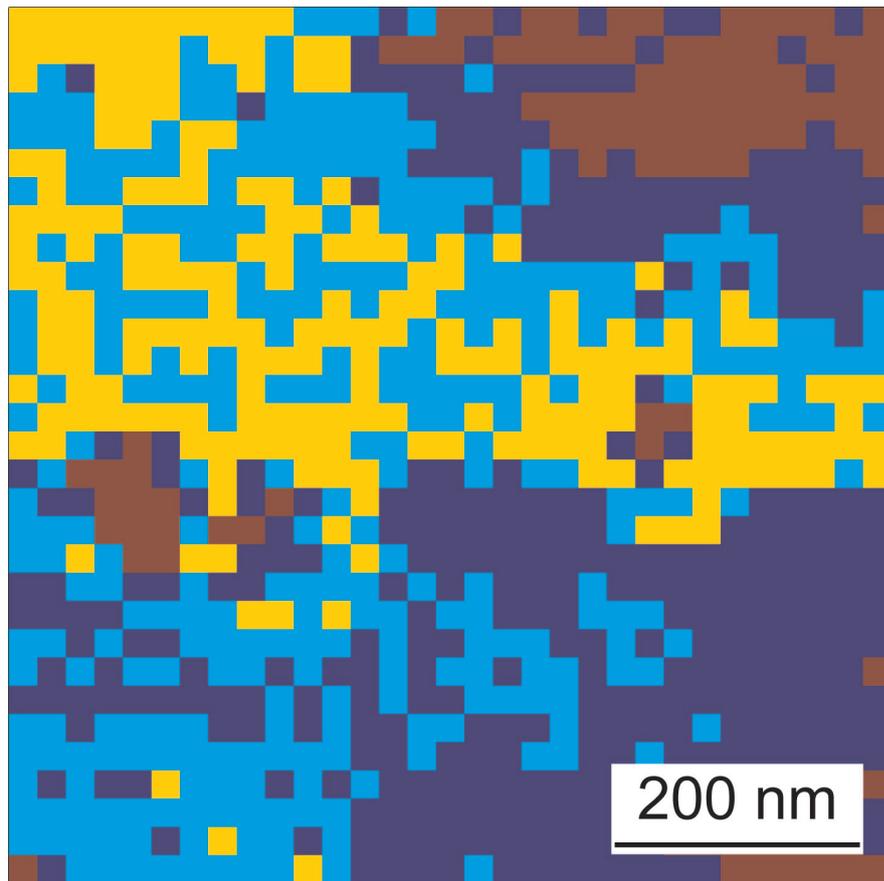


Abb. 48: Mit dem K-Means-Algorithmus kann bei einer Anzahl von vier Clustern sowohl zwischen den beiden Materialien (1 (dunkelblau/braun) und 2 (hellblau/gelb)) unterschieden, als auch die unbekannte Struktur dem Material 1 zugeordnet werden.

#### 4.3.6 Zusammenfassung

Im Falle dieser Probe konnte die Frage nach der chemischen Zugehörigkeit der unbekanntem kugelförmigen Strukturen mithilfe der Kraftspektroskopie geklärt werden. Nach Auswertung der Kraft-Distanz-Kurven mit der Hauptkomponentenanalyse und den verschiedenen Clusterverfahren konnte die chemische Zusammensetzung eindeutig einem der auf der Probe vorhandenen bekannten Materialien zugeordnet werden. Es handelt sich demnach nicht, wie zunächst vermutet, um eine Verunreinigung der Probe, sondern vielmehr um einen Artefakt, der auf ein Problem bei der Probenpräparation hindeutet.

Dieses Beispiel zeigt die Vorteile der Kraftspektroskopie in Kombination mit Methoden der multivariaten Datenanalyse gegenüber der Raster-Kraft-Mikroskopie. Während bei der Raster-Kraft-Mikroskopie lediglich das Auftauchen unbekannter Strukturen beobachtet werden kann, kann mithilfe der Kraftspektroskopie auch die chemische Zusammensetzung untersucht werden. Allerdings führt erst der Einsatz verschiedener multivariater Datenanaly-

semethoden zu einer eindeutigen Beantwortung der Fragestellung. Eine Auswertung von Adhäsion und Steigung auf den verschiedenen Materialien reicht nicht aus.

## 4.4 Spitzenverstärkte Raman-Streuung an *Staphylococcus epidermidis*

### 4.4.1 *S. epidermidis* und der Aufbau seiner Zellwand

Das Gram-positive Bakterium *Staphylococcus epidermidis* besiedelt vorwiegend die menschliche Haut (Epidermis), ist aber auch auf den Schleimhäuten zu finden. Für Menschen mit intaktem Immunsystem stellt dieses Bakterium keinerlei Gefahr dar. *S. epidermidis* ist jedoch ein Auslöser für nosokomiale (Krankenhaus-) Infektionen vor allem im Bereich der Implantationsmedizin.

Im Allgemeinen lassen sich Bakterienstämme in zwei große Gruppen unterteilen, die sich hauptsächlich im Aufbau ihrer Zellwände unterscheiden. Eine Möglichkeit für eine schnelle Unterscheidung zwischen beiden Gruppen geht auf ein Färbeverfahren zurück, welches der dänische Arzt und Bakteriologe Hans Christian Gram Ende des 19. Jahrhunderts entwickelte. Die Methode beruht auf der Möglichkeit zur Färbung und Entfärbung einer als Peptidoglycan-Schicht bezeichneten Struktur der Zellwand, die bei den auftretenden Zellwandtypen unterschiedlich dick ist. Mit der von Gram entwickelten Methode kann durch Färbung und anschließende Entfärbung zwischen den verschiedenen Typen unterschieden werden. Durch Behandlung der Bakterien mit einer Lösung von Karbol-Gentianaviolett werden beide Typen eingefärbt. Der Farbstoff dringt in die vernetzte Struktur der Peptidoglycan-Schicht ein. Bei weiterer Behandlung mit Alkohol lassen sich bei Gram-negativen Bakterien die Farbkomplexe auswaschen, während bei Gram-positiven Bakterien der Alkohol nicht in die der Zellmembran aufliegende Peptidoglycan-Schicht eindringen kann. Dies hat zur Folge, dass diese Bakterien gefärbt bleiben. Das Unterscheidungsmerkmal, die Peptidoglycan-Schicht, hat bei Gram-positiven Bakterien eine Dicke von etwa 20-28 nm. Dies entspricht etwa vierzig Schichten von Peptidoglycanen. Die Peptidoglycan-Schicht umgibt die Plasmamembran der Zelle und bildet eine Hauptstrukturkomponente der bakteriellen Zellwand.

Die Peptidoglycan-Schicht besteht aus einem Netz miteinander verbundener einzelner Makromoleküle. Hauptsächlich bestehen diese aus einer Vielzahl von Zuckerpolymeren (Glycanketten), die durch Oligopeptide, also kurze Aminosäuresequenzen, quervernetzt sind. Die Glycanketten bestehen vorwiegend aus alternierenden Einheiten von N-Acetyl-Glucosamin (NAG) und N-Acetyl-Muraminsäure (NAM). Eine weitere Quervernetzung dieser Einheiten

geschieht durch D- und L-Aminosäuren, die als Tetrapeptide (kurze Ketten aus vier Aminosäuren) an die Muraminsäuren kovalent gebunden sind. Eingelagert in die Peptidoglycan-Schichten finden sich große Mengen an Teichonsäuren. Diese kettenartigen Moleküle aus Ribitol-Phosphat- und Glycerol-Phosphat-Polymeren können entweder kovalent an die Peptidoglycane gebunden sein oder aber an Glycolipide der Plasmamembran. In letzterem Fall werden sie als Lipoteichonsäuren bezeichnet. Eingelassen in dieses dichte Netzwerk aus Peptidoglycan und Teichonsäuren sind auch eine Reihe von Oberflächen-Proteinen, die verschiedene Funktionen im Bereich der Zellerkennung und der Bindung von Molekülen erfüllen.

Abbildung 49 zeigt die schematische Darstellung einer Zellwand eines Gram-positiven Bakteriums mit den wichtigsten Strukturen.

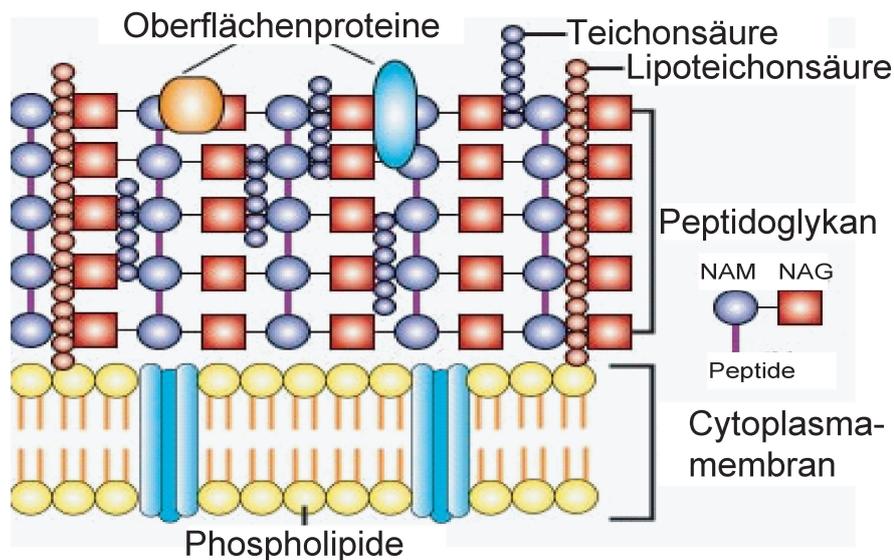


Abb. 49: Die Zellwand eines Gram-positiven Bakteriums besteht zum größten Teil aus einer Peptidoglycan-Schicht, die der Lipid-Doppelmembran aufliegt. In das Netzwerk aus kovalent miteinander verknüpften Zucker-Ketten sind Proteine, Glycolipide und weitere Zucker eingelagert. (Graphik entnommen aus: [77])

Nach neueren Ergebnissen ist bei *S. epidermidis* zusätzlich, je nach Wachstumsbedingungen, die Ausbildung eines Biofilms um die Zellen herum zu beobachten. Dieser besteht hauptsächlich aus Polysacchariden, Teichonsäuren und einer als PIA (Polysaccharid Inter-cellular Adhäsion) bezeichneten Substanz.

#### 4.4.2 Referenzmessungen

Eine häufig gestellte Frage bei TERS-Messungen ist die nach dem Zustand der Spitze während der Messung. Im Vorfeld und auch während der Messung ist zu klären, ob das beobachtete Raman-Signal von der Probe oder einer möglichen Kontamination der Spitze stammt. Gerade bei weichen Proben (z. B. Zellen) ist es möglich, dass Material an der Spitze hängen bleiben kann. Solche Kontaminationen sind ein nicht zu vernachlässigender Faktor während einer TERS-Messung. Spektren, die mit einer kontaminierten Spitze aufgenommen wurden, führen zu fehlerhaften Zuordnungen auftretender Banden und damit zu falschen Schlüssen bezüglich der Fragestellung. Um eine Fehlinterpretation der Spektren zu verhindern, sind Kontrollexperimente zwingend notwendig, um auf einfache Art und Weise Kontaminationen der Spitze auszuschließen.

Für ein solches Kontrollexperiment stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Die einfachste Methode besteht darin, die Spitze nach den TERS-Experimenten im Rasterelektronenmikroskop zu untersuchen. Hier können Kontaminationen direkt beobachtet werden (vgl. Anhang A). Es ist jedoch unklar, ob hierbei beobachtete Verschmutzungen schon während der AFM-Messung oder erst danach aufgetreten sind. Es bedarf also eines Kontrollexperimentes, welches während der Messung durchgeführt werden kann. Eine Möglichkeit kann sein, ein Spektrum der Probe aufzunehmen, wenn sich die Spitze nicht in unmittelbarer Nähe der Probe befindet, das evaneszente Feld also keinen Einfluss auf die Probe an der Oberfläche hat. Im Idealfall, also ohne Kontamination, sollte nur bei angenäherter Spitze ein Spektrum zu sehen sein. Bei zurückgezogener Spitze ist die Reichweite des evaneszenten Feldes nicht groß genug, das Raman-Signal an der Oberfläche zu verstärken. Sollte jedoch auch bei zurückgezogener Spitze ein Spektrum sichtbar sein, so kann von einer Kontamination der Spitze ausgegangen werden. Diese Spitze wäre dann für weitere Messungen unbrauchbar. Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass nicht gewährleistet ist, dass sich die Spitze nach der Entfernung von der Probe im Fokus des anregenden Lasers befindet. Würde der Laserfokus nicht nachjustiert, würde auch auf einer kontaminierten Spitze kein Spektrum zu beobachten sein. Ein solches Kontrollexperiment ist nur am Ende eines TERS-Experimentes möglich, da durch das Zurückziehen der Spitze eine Dejustierung auftreten kann. Ein erneutes Annähern

an die Probe macht eine Neujustierung notwendig, bevor ein TERS-Experiment durchgeführt werden kann.

Eine weitere einfache Möglichkeit für ein Kontrollexperiment ist die Aufnahme eines Referenzspektrums auf einer probefreien Stelle des Substrates. Vorteil dieser Methode ist, dass die Spitze hierbei ständig im Kontakt mit der Probe bleibt. Über den Regelkreis des Rasterkraftmikroskops wird gewährleistet, dass sich die Spitze ständig optimal im Fokus des Lasers befindet und der vorgegebene Abstand zur Probe beibehalten wird. Für alle Spektren gelten daher identische Bedingungen.

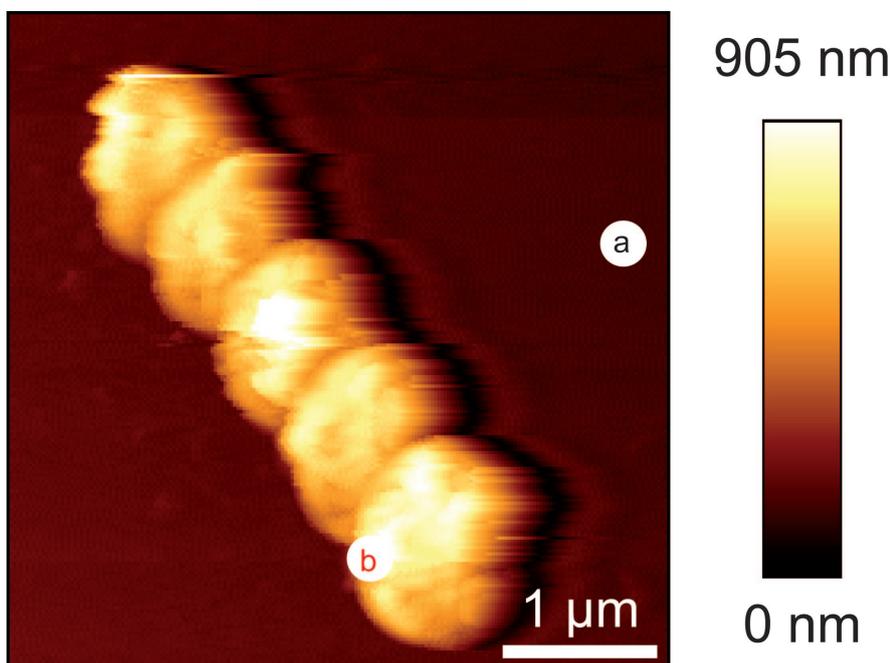


Abb. 50: 2D-Darstellung einer Topographie von fünf in Reihe angeordneter *S. epidermidis*-Zellen. Der Durchmesser der Zellen beträgt etwa  $1 \mu\text{m}$ , bei einer Höhe von etwa  $900 \text{ nm}$ . Die Punkte markieren Orte, an denen TERS-Spektren sowohl auf der Zelle (b) als auch auf einer Stelle der Umgebung (a) aufgenommen wurden.

Während der TERS-Experimente an *S. epidermidis*-Zellen wurden Kontrollexperimente mit der beschriebenen Methode durchgeführt. Exemplarisch soll der Einfluss der Kontamination auf Spektren von *S. epidermidis* gezeigt werden. Abbildung 50 zeigt eine Reihe von fünf *S. epidermidis*-Zellen auf einem Glas-Substrat. Der Durchmesser der Zellen beträgt je etwa  $1 \mu\text{m}$  bei einer Höhe von etwa  $900 \text{ nm}$ . An den markierten Punkten wurden TERS-Spektren aufgenommen.

Abbildung 51 zeigt das Referenzspektrum auf dem Substrat (a) und das Zell-Spektrum (b). In beiden Spektren sind Banden um  $1100 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1300 \text{ cm}^{-1}$  und  $1500 \text{ cm}^{-1}$  mit ver-

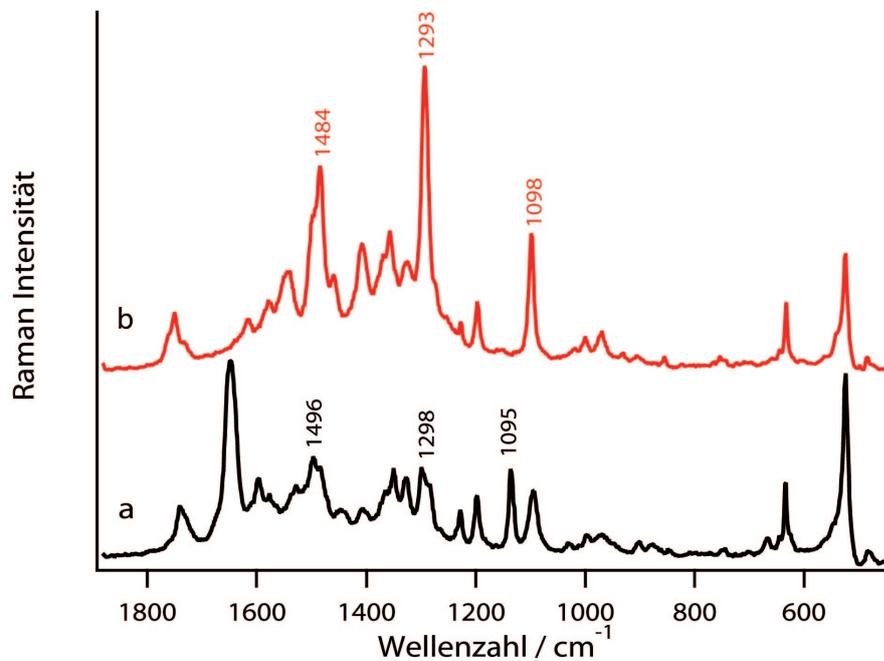


Abb. 51: Die Spektren wurden an den in Abbildung 50 markierten Punkten aufgenommen. Spektrum a zeigt erwartete Banden, die Zellwand-Komponenten entsprechen. Spektrum b ist nahezu identisch, obwohl es an einem Ort ohne Topographie aufgenommen wurde. Dies spricht für eine Kontamination der Spitze.

gleichbaren Intensitäten zu beobachten. Dieses Ergebnis überrascht, da an der Position b in Abbildung 50 außer dem Substrat-Spektrum keine anderen Banden erwartet wurden.

Die ähnlichen Spektren lassen zwei mögliche Erklärungen zu. Zum einen könnte auf der Stelle des Substrates auch ohne direkte topographische Beobachtung Zellmaterial vorhanden sein. Dieses könnte von einer beschädigten Zelle herrühren. Diese Erklärung erscheint jedoch nicht plausibel, da in der Umgebung keine beschädigten Zellen oder Zelltrümmer zu finden sind. Eine wahrscheinlichere Erklärung ist die Kontamination der Spitze mit Zellmaterial. Wann und wo diese Kontamination genau aufgetreten ist, lässt sich nicht mehr nachverfolgen. Sicher ist jedoch, dass alle nachfolgend oder schon vorher gemessenen Spektren starke Ähnlichkeiten aufweisen. Dies bedeutet, dass diese Spitze für weitere Experimente unbrauchbar geworden ist. Da nicht genau benannt werden kann, wann zum ersten Mal während der Messung die Kontamination aufgetreten ist, sind auch alle bis zu diesem Kontroll-Experiment aufgenommenen Spektren unbrauchbar. Der Wechsel der Spitze ist für eine erfolgreiche Durchführung weiterer TERS-Experimente unvermeidlich.

Um die Messungen mit einer kontaminierten Spitze schon im Vorfeld eines Experimentes zu vermeiden, sollte jede Spitze vorher auf einem sauberen Substrat getestet werden. Treten schon während dieses Tests Spektren auf, kann von einer Kontamination der Spitze ausge-

gangen werden und die Auswechselung der Spitze ist unvermeidlich. Weitere Kontrollen müssen auch während und am Ende jedes TERS-Experimentes auf einer probefreien Stelle des Substrates durchgeführt werden, um eine ständige Überwachung zu gewährleisten.

#### 4.4.3 Ortsabhängige TERS-Messungen

##### Positionierung der Spitze

Bei der oberflächenverstärkten Raman-Streuung werden die zu untersuchenden Moleküle auf einen Silberinsel-Film aufgebracht. Anschließend wird die Probe dann in den Fokus eines anregenden Laser-Strahls gebracht, um die Moleküle optimal anzuregen.

Bei der spitzenverstärkten Raman-Streuung dagegen, muß vor der eigentlichen Messung die mit Silber bedampfte AFM-Spitze in den Fokus des anregenden Lasers gebracht und dort festgehalten werden. Hierzu ist es notwendig, die Position der Spitze auf dem Schwingungsarm möglichst genau zu bestimmen, um diese dann optimal im Laserfokus zu halten. Eine Möglichkeit, die Position der Spitze auf dem Schwingungsarm zu lokalisieren, ist die Aufnahme eines Reflexionsbildes der Spitze. Über ein Lichtmikroskop kann die Position des Schwingungsarms in der Nähe des Laserfokus grob positioniert werden. Wird nun der Schwingungsarm durch den Laserstrahl bewegt, wird das Licht reflektiert. Über einen Seitenausgang des Mikroskops wird das reflektierte Licht von einer Photodiode gemessen. Dieses wird dann in Abhängigkeit von der Position auf der Probe dargestellt.

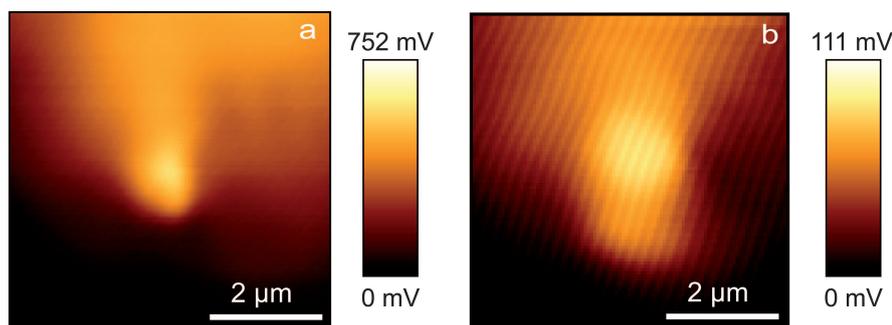


Abb. 52: Zur optimalen Positionierung der Spitze im Laserfokus werden Reflexionsbilder der jeweiligen TERS-Spitzen aufgenommen. Die dargestellten Reflexionsbilder repräsentieren die Spitzen für die TERS-Messungen an *S. epidermidis* (a) und der Kontrollmessung für die Kontaminationen (b). Der hellste Punkt zeigt jeweils die Position des Silberpartikels an, der am stärksten reflektiert und somit die Position der Spitze auf dem Cantilever.

Abbildung 52 zeigt die Reflexionsbilder der bei den beschriebenen TERS-Experimenten verwendeten Spitzen. Das in Abbildung 52 a gezeigte Reflexionsbild spiegelt annähernd die

Form der verwendeten AFM-Spitze wider. Aufgrund der pyramidalen Form der Spitze sind sowohl helle als auch dunkle Flanken auszumachen. Dies ist eine Folge der Position der Spitze im Rasterkraft-Mikroskop bzw. eine Folge der Ausrichtung der Spitze über der Probe. Ist die Spitze nicht parallel über der Probe positioniert, entstehen durch die Verkippung Interferenzmuster mit hellen und dunklen Streifen. Anhand des Reflexionsbildes kann jedoch recht gut eingeschätzt werden, an welcher Stelle des Schwingungsarmes sich die Spitze befindet. Der Durchmesser der Reflexion beträgt im Falle der in Abbildung 52 a gezeigten Spitze etwa 500 nm. Im Vergleich zur Spitzengröße von etwa 10 nm zeigt sich ein großer Unterschied. Dieser Unterschied ist darauf zurückzuführen, dass eine Faltung von Laserfokus und Spitze vorliegt. Dies bedeutet, dass sowohl die Größe der Spitze (10 nm) wie auch die Größe des Laserfokus einen Einfluss auf das Reflexionsbild haben. Da hierbei die Größe des Reflexionsdurchmessers von der Größe des Laserfokus als limitierendem Faktor bestimmt wird, kann bei einem Spot von 500 nm von einer guten Auflösung ausgegangen werden. Das in b gezeigte Reflexionsbild wurde in einem ähnlichen Maßstab aufgenommen. Der Durchmesser hier beträgt jedoch annähernd 1  $\mu\text{m}$ . Der Unterschied in der Größe der Reflexionsbereiche lässt sich mit der unterschiedlichen Fokussierung zwischen beiden Aufnahmen begründen. Nach der Suche der Spitze wird der Fokus auf das höchste Raman-Signal optimiert. Je nach Art der Probe und der Bedeckung sowie der Oszillation der Spitze über der Probe, kann die Fokushöhe von Spitze zu Spitze stark variieren. Mit dieser Methode kann recht schnell und einfach die Position der Spitze bestimmt werden. Störend auf die Positionsbestimmung können sich große Silberpartikel an den Flanken der Spitzen auswirken. Hierbei können diese Reflexionen aufgrund der Partikelgröße wesentlich stärker sein als die Reflexionen direkt auf der Spitze, auf der sich im Vergleich kleinere Silberpartikel befinden können.

Ist die Position der Spitze im Laserfokus anhand des Reflexionsbildes bestimmt worden, wird die Spitze an dieser Position fixiert. Für die Messungen mit spitzenverstärkter Raman-Streuung wird das System so verändert, dass die Position der Spitze ortsfest bleibt, während die Probe mithilfe eines Piezo-Tisches (vgl. Abbildung 13) bewegt wird. Des Weiteren wird das Mikroskop-Objektiv mit der Z-Bewegung des Cantilevers synchronisiert. Durch diese Umstellungen wird erreicht, dass sich die Spitze zu jedem Zeitpunkt der Messung optimal im Laserfokus befindet.

### Topographie

Nachdem die Spitze im Laserfokus fixiert ist, wird die Oberfläche der Probe auf einzeln vorliegende Bakterienzellen untersucht. Hierzu steht eine Fläche von etwa  $100 \times 100 \mu\text{m}$  zur Verfügung. Die Art der Probenvorbereitung (vgl. Kapitel 3.3.1) bedingt eine inhomogene Verteilung der Bakterien auf der Oberfläche. Während des Auftrocknens sammeln sich viele Zellen an den Trocknungsrändern. Nur eine geringe Anzahl Bakterien verbleibt in der Tropfenmitte und ist für AFM-Messungen verfügbar.

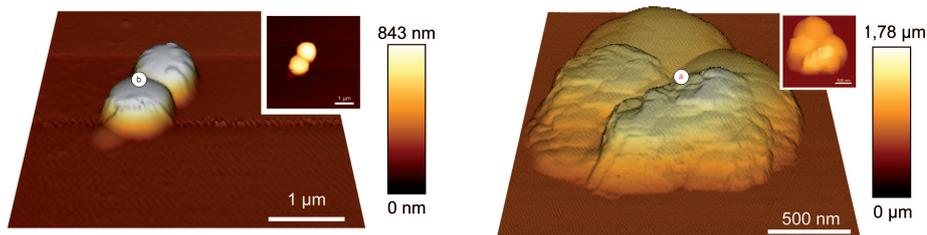


Abb. 53: An zwei aufeinanderfolgenden Tagen wurden Topographien von *S. epidermidis*-Zellen aufgenommen. Die Pseudo-3D-Darstellung zeigt einen Durchmesser der Zellen von etwa  $1 \mu\text{m}$ , bei einer Höhe von etwa  $850 \text{ nm}$ . Zur besseren Übersicht wurden 2D-Darstellungen der Topographien eingearbeitet. Die mit a und b gekennzeichneten Orte repräsentieren die Positionen, an denen Spektren aufgenommen wurden.

Abbildung 53 zeigt Pseudo-3D-Bilder der Topographien der für die TERS-Experimente verwendeten Zellen. Um einen besseren Überblick zu geben, wurden die 2D-Topographien als kleine Einschübe in die Abbildung eingefügt.

In Abbildung 53 a liegen auf einer Fläche von  $4 \times 4 \mu\text{m}$  zwei *S. epidermidis*-Zellen als runde Strukturen mit einem Durchmesser von je etwa  $1 \mu\text{m}$  vor. Die Höhe der Zellen beträgt etwa  $850 \text{ nm}$ . Auf der zweiten Probe befinden sich auf einer vermessenen Fläche von etwa  $2 \times 2 \mu\text{m}$  vier Zellen, die dicht beieinander liegen. Auch hier beträgt der Durchmesser jeder einzelnen Zelle etwa  $1 \mu\text{m}$ . Auffällig in dieser Topographie ist jedoch die Höhe der Zellen. Im Gegensatz zu den in Abbildung 53 a gezeigten Zellen scheinen diese doppelt so hoch zu sein. Dies lässt den Schluss zu, dass die Zellen nicht einzeln nebeneinander, sondern als Folge des Trocknungsvorganges teilweise übereinander liegen. Ebenfalls auffällig ist die Form der beiden Zellen im Vordergrund der Abbildung. Die beobachtbaren Abstufungen der Zelloberfläche können auf eine mögliche Beschädigung oder eine Zerstörung der Zelle hindeuten, durch die Zellflüssigkeit in die Umgebung abgegeben wurde. Es ist durchaus möglich, dass

Zellen während der Probenpräparation Schaden genommen haben, etwa durch Scherkräfte während der Resuspendierung oder während des Pipettierens.

### TERS-Spektren

Die Abbildungen 54 und 55 (entnommen aus [78]) zeigen TERS-Spektren, die auf der Oberfläche von *Staphylococcus epidermidis* aufgenommen wurden. Abbildung 53 zeigt die Spektren, die an den markierten Punkten in Abbildung 53 aufgenommen wurden. Bei den in Abbildung 55 gezeigten Spektren handelt es sich um Spektren vergleichbarer Experimente. Die Aufnahmezeit für alle Spektren betrug eine Sekunde, bei einer Laserleistung auf der Probe von 1 mW. Diese Parameter sind für ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis ausreichend. Referenzmessungen zeigten keine Kontamination der Spitze.

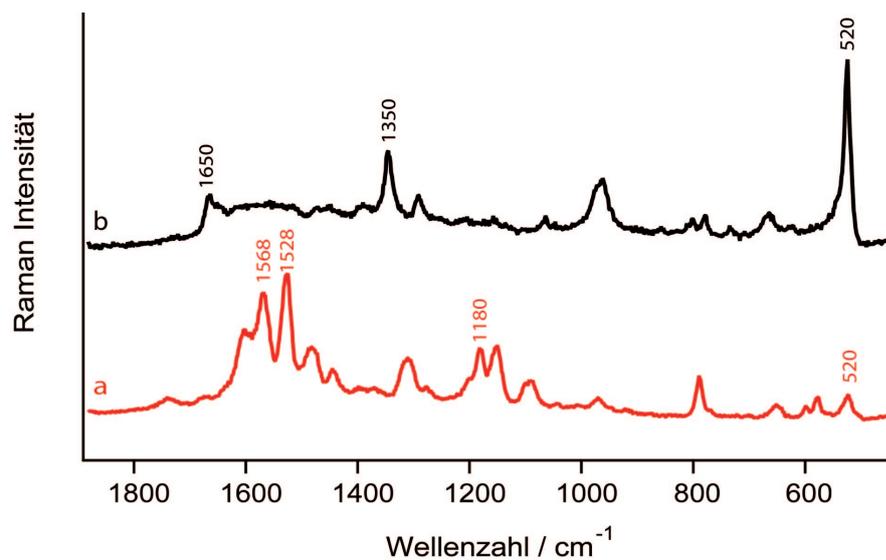


Abb. 54: TERS-Spektren von zwei verschiedenen *S. epidermidis*-Zellen (vgl. Positionen in Abbildung 53). Deutlich sind Unterschiede in den Banden und Intensitäten zu erkennen.

Alle hier gezeigten Spektren zeigen eine Bande bei  $520 \text{ cm}^{-1}$ . Es handelt sich hierbei um ein Silizium-Signal. Dieses stammt von der AFM-Spitze und ist in allen TERS-Experimenten zu beobachten.

Das Spektrum in Abbildung 54 a, aufgenommen am Rand einer der Zellen mit auffälliger Oberflächenstruktur, zeigt Banden in den Bereichen  $1100 \text{ cm}^{-1}$  bis  $1200 \text{ cm}^{-1}$  sowie  $1500 \text{ cm}^{-1}$  bis  $1600 \text{ cm}^{-1}$ . Spektrum b dagegen, aufgenommen im Randbereich zwischen den beiden einzeln liegenden Zellen, zeigt Banden in den Bereichen um  $1350 \text{ cm}^{-1}$  und  $1650$

$\text{cm}^{-1}$ .

Die Spektren in Abbildung 55 zeigen ähnliche Ergebnisse.

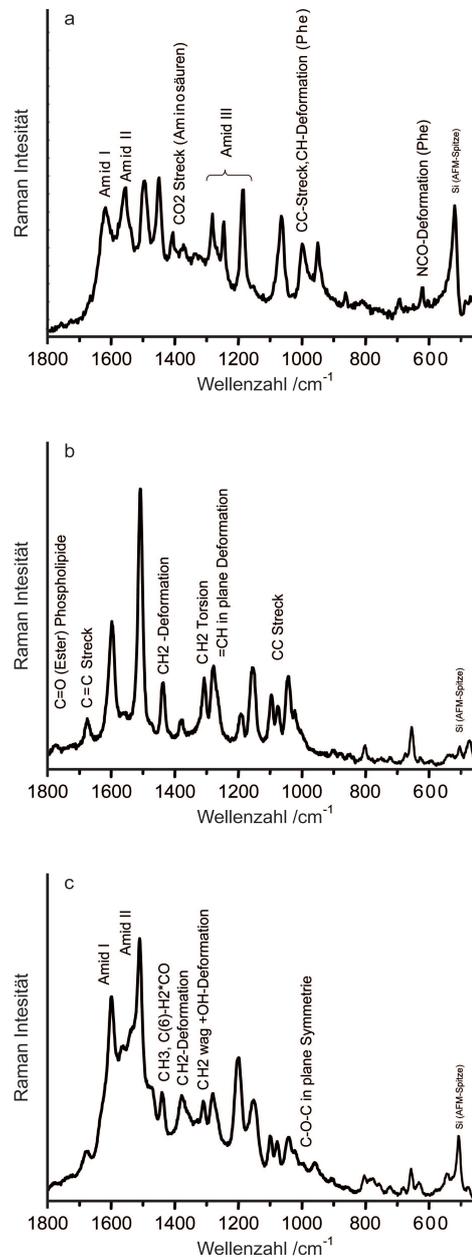


Abb. 55: TERS-Spektren auf einer Zelle können unterschiedlich aussehen. Auftretende Banden können einzelnen Bestandteilen der bakteriellen Zellwand zugeordnet werden. So sind Spektren von Proteinen (a), Lipiden (b) und Kohlenhydraten (c) voneinander unterscheidbar.

Die Ergebnisse aus über 80 verschiedenen TERS-Messungen auf *S. epidermidis* wurden in einer Tabelle zusammengefasst (vgl. Tabelle 3). Anhand der gemessenen Spektren konnte eine Vielzahl der in der Zellwand vorkommenden Bestandteile wie Proteine, Lipide und Zucker identifiziert werden. Die Zuordnungen konnten anhand verschiedener Literaturstellen bestätigt werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei den gemessenen

Spektrern um die eines Bakteriums handelt.

Tabelle 3: Bandenzuordnungen von über 80 TERS-Messungen an *S. epidermidis* und vergleichbare Literaturwerte. Tabelle entnommen aus [78].

Fig. 5.2		Fig. 5.3		Fig. 5.4		Fig. 5.5		Fig. 5.6		Fig. 5.7		TERS	Lit.-bands	Assignment		
B	C	B	C	A	cell 1	cell 2	cell 3	cell 4	cell 5	6s	1s	3s	5s	NAC		
1605	1597	1607	1607	1600	1668	1602	1589	1600	1603	1679	1629	1604	1595	1682	1777	C=O ester
1551	1553	1565	1557	1576	1591	1551	1555	1564	1552	1603	1601	1604	1595	1596	1629	C-O aliphatic
		1522		1485	1567	1551		1541	1552	1560	1541	1555	1555	1576	1601	C=C aromatic, olefinic, Phe, Tyr [65, 243]
		1462		1456	1471	1471		1444	1439	1514	1505	1514	1512	1532	1554	NH and C-N amide II [65]
		1427		1413	1411	1419	1422	1444	1439	1514	1505	1514	1512	1532	1554	N acetyl-related bands (amide I)
		1380		1383	1375	1337	1367	1383	1387	1410	1373	1379	1376	1480	1459	amide II [243]
		1337		1334	1375	1337	1367	1383	1387	1410	1373	1379	1376	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
		1287		1281	1298	1276	1286	1315	1342	1315	1335	1337	1337	1480	1459	(mono-, oligosaccharides) [61]
		1245		1245	1248	1240	1243	1276	1286	1286	1286	1281	1287	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
		1184		1184	1184	1198	1189	1159	1148	1166	1163	1179	1147	1480	1459	(mono-, oligosaccharides) [61]
		1138		1122	1133	1113	1110	1110	1114	1107	1107	1114	1147	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
		1073		1085	1071	1113	1110	1110	1114	1107	1107	1114	1147	1480	1459	(mono-, oligosaccharides) [61]; amide III, Trp [243]
		1039		1065	1071	1042	1045	1045	1044	1086	1083	1087	1047	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
		1002		989	1005	1002	1005	1005	1003	1086	1083	1087	1047	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
		944		974	944	964	964	964	968	1201	1213	1208	1242	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
		909		950	944	933	933	933	933	917	958	958	970	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
		863		866	863	833	836	815	815	917	958	958	970	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
		798		798	909	839	836	815	815	917	958	958	970	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
		742		688	708	795	772	786	786	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
		703		691	715	703	703	703	703	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
		643		640	684	640	646	646	646	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
		619		619	684	640	646	646	646	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
		519		519	601	589	559	559	559	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
		476		476	531	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874	1480	1459	CH <sub>2</sub> scissoring [106]; CH <sub>3</sub> , C(O)-H <sub>2</sub> , COH
					523	527	523	523	520	874	874	874	874			

sind eher typisch für ein Lipid. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit eines Gemisches aus verschiedenen Zuckern und Proteinen. Eine eindeutige Zuordnung des hier vorliegenden TERS-Spektrums ist nicht möglich, da Vergleichsspektren von Einzelmolekülen der in der Zellwand vorkommenden Substanzen nicht vorliegen.

Auch die Spektren aus Abbildung 55 lassen sich mithilfe der Referenzdaten in Tabelle 3 einzelnen Zellwandkomponenten zuordnen. Abbildung 55 a zeigt demnach ein Spektrum, das von Proteinen dominiert wird. So lässt sich die Gruppe um  $1300\text{ cm}^{-1}$  der Amid-III-Schwingung zuordnen. Weitere Banden, wie etwa die Amid-I-Bande, die Amid-II-Bande und C-C- und N-O-C-Schwingungen der Aminosäure Phenylalanin, lassen sich ebenfalls zuordnen. Dass es sich nicht um ein reines Proteinspektrum handelt, legt das Auftreten von weiteren Banden nahe. Viele Banden des in Abbildung 55 b gezeigten Spektrums lassen sich ebenfalls zuordnen. So zeigen die Banden bei  $1100\text{ cm}^{-1}$  (C-C-Streckschwingung),  $1680\text{ cm}^{-1}$  (C=C-Streckschwingung) und bei  $1790\text{ cm}^{-1}$  (C=O-Schwingung eines Phospholipids) Hinweise auf ein Lipid-Spektrum. Eine genaue Zuordnung des Spektrums in Abbildung 55 c ist nicht möglich. In diesem Spektrum sind Banden von Proteinen (Amid-I, Amid-II) sowie von Zuckermolekülen zu beobachten. Dieses Spektrum entspricht entweder einer Mischung aus Zucker und Proteinen oder glykolisierten Proteinen.

Alle Spektren zeigen Komponenten, die in der bakteriellen Zellwand vorkommen. Lipid-Signale etwa können von den Phospholipiden der Plasmamembran stammen. Die Amid-Banden weisen auf Proteine hin, wie sie in der Zellwand von Bakterien in großer Menge vorkommen. Es ist jedoch auch möglich, dass es sich hierbei um die Peptidoglycan-Schicht selbst handelt, in der die Glycan-Stränge durch kurze Peptid-Sequenzen stabilisiert werden. Auch sind in den Spektren Banden von Zuckermolekülen zu sehen. Diese stammen vermutlich von den Teichonsäuren oder den Glycanen.

Mit TERS besteht somit die Möglichkeit, einzelne Komponenten der bakteriellen Zellwand zu messen und zuzuordnen. Alle erwarteten Strukturen (Proteine, Zucker, Lipide), wie sie aus der Literatur bekannt sind, konnten mit einer hohen Ortsauflösung gezeigt werden. Aufgrund der aufgetretenen Misch-Spektren ist jedoch von einer Einzelmolekül-Detektion nicht auszugehen. Das Fehlen von Banden, die für Nucleobasen charakteristisch sind, lassen darauf schließen, dass Komponenten aus dem Zellinneren nicht gemessen wurden. Die bakteri-

elle Zellwand ist demnach zu dick, um auch Signale aus dem Inneren der Zelle zu verstärken. Des Weiteren konnten mit den in Abbildung 55 gezeigten Spektren weitere Aussagen über die Bakterienzellwand gemacht werden. Da die Spektren zwar auf derselben Stelle der Probe, aber zu unterschiedlichen Zeiten aufgezeichnet wurden, liegt der Schluss nahe, dass es sich bei der bakteriellen Zellwand um ein dynamisches System handelt. Die schnellen Wechsel der einzelnen Zellwandkomponenten unter der Spitze lassen sich über Diffusions- und Sprung-Prozesse der Moleküle in der Lipidschicht und Brown'scher Molekularbewegungen erklären. Messungen mit Protein, die mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert wurden, bestätigen diese Aussage [79, 80, 81, 82].

#### 4.4.4 Berechnung der Verstärkungsfaktoren

Zur Einordnung der aufgenommenen Spektren und zur Charakterisierung der Effektivität der Spitze ist es notwendig, den Verstärkungsfaktor zu berechnen. Hierbei handelt es sich um einen Wert, der angibt, um wie viel stärker das Raman-Signal im Vergleich zu einer Messung ohne verstärkende Spitze ist.

Die Berechnung der Verstärkungsfaktoren soll exemplarisch am Beispiel der TERS-Spektren von *Staphylococcus epidermidis* aus Abbildung 54 durchgeführt werden.

Im Vorfeld müssen zunächst zwei Begriffe geklärt werden, die nachfolgend von großer Bedeutung für das Verständnis der Faktorbestimmung sind. Im Folgenden ist sowohl von relativer als auch von absoluter Verstärkung die Rede. Die relative Verstärkung bezieht sich in erster Linie auf die Verstärkung, die in den Spektren direkt zu beobachten ist. Im Gegensatz dazu beschreibt die absolute Verstärkung die Gesamtverstärkung der Spitze nach der Einbeziehung aller Faktoren.

Zur Berechnung der Verstärkungsfaktoren wird zunächst die Standardabweichung der spektralen Basislinie in einem signalfreien Bereich des Spektrums, hier bei  $1800\text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 54 a) bestimmt. Im gewählten Beispiel beträgt die Standardabweichung etwa 3,5 Einheiten. Damit werden 65 % der Abweichung beschrieben. Für die weiteren Berechnungen wird zur Sicherheit die doppelte Standardabweichung zur Berechnung genutzt. Dies entspricht etwa 95 % der Abweichung. Als Signal zur weiteren Berechnung wurde das Ma-

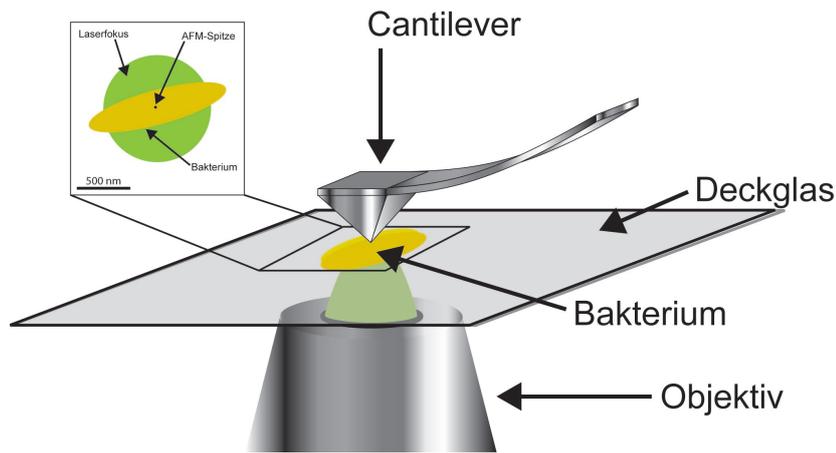


Abb. 56: Zur Berechnung der Verstärkungsfaktoren ist es notwendig, die Verhältnisse von Laser-Durchmesser zum Durchmesser der verwendeten TERS-Spitze mit einzubeziehen. Die Abbildung zeigt einen schematisierten TERS-Aufbau. Im Einschub sind die Größe des Bakteriums (gelb) in Relation zum Durchmesser des Laser-Spots (grün) und dem Durchmesser der verstärkenden Spitze (schwarz) gezeigt.

ximum bei  $1528 \text{ cm}^{-1}$  mit einer Intensität von 600 Einheiten gewählt, bezogen auf das Minimum dieses Signals. Daraus ergibt sich ein Signal-Rausch-Verhältnis von etwa 60. Die relative Verstärkung ist demnach mindestens 60, da keine Spektren bei zurückgezogener Spitze und einer Messzeit von einer Sekunde beobachtet werden konnten. Zur Berechnung der absoluten Verstärkung müssen unterschiedliche Wechselwirkungs-Bereiche der Probenbeleuchtung mit einbezogen werden. Der Durchmesser des Laserstrahls auf der Probe ist, wie Abbildung 56 zeigt, etwa  $1 \mu\text{m}$  (grün). Im Gegensatz dazu hat die silberbeschichtete AFM-Spitze einen Durchmesser von etwa  $20 \text{ nm}$  (schwarz). Dies bedeutet, dass der verstärkte Bereich etwa 2500 mal kleiner ist als die vom Laser beleuchtete Fläche. Die absolute Verstärkung beträgt nun  $60 * 2500 = 1,5 * 10^5$ . Selbst unter der Annahme eines Spitzendurchmessers von  $50 \text{ nm}$  ist immerhin ein Verstärkungsfaktor von  $2,4 * 10^4$  zu erreichen. Da zur Messung im „Intermittent Contact“-Modus des Rasterkraft-Mikroskops gemessen wurde, oszilliert die Spitze über der Probe, ist also nicht ständig in Kontakt. Bei einer Entfernung der Spitze von  $5\text{-}10 \text{ nm}$  von der Probe nimmt die Verstärkung um das 10- bis 1000-fache ab [64, 65]. Durch die Messung der sogenannten Sensitivität kann durch die Messung einer Kraft-Distanz-Kurve und die Berechnung der Steigung eine Umrechnung der Oszillations-Amplitude von Volt in Nanometer erfolgen [83]. In diesem Experiment betrug die Oszillations-Amplitude der Spitze etwa  $6 \text{ nm}$ . Wird dieser Faktor in die Berechnung einbezogen, ergibt dies immerhin eine absolute Verstärkung von etwa  $10^6 - 10^8$ .

Bei dieser Berechnung wurden noch keine chemischen Verstärkungsfaktoren in Betracht ge-

zogen, da hierzu eine besondere Betrachtung der wirklichen Interaktionsflächen zwischen Probe und Spitze notwendig wären. Dies ist jedoch nicht möglich, da weder bestimmt werden kann, wo der aktive Silberpartikel lokalisiert ist, noch wie groß dieser Partikel ist. Des Weiteren wurde auch die Schichtdicke der Probe außer Acht gelassen. Das Signal im Fernfeld-Raman wird von der gesamten Zelle aufgenommen, während beim TERS nur ein kleiner Bereich mit einer geringen Eindringtiefe ein Signal liefert. Werden diese Faktoren noch in die Berechnungen mit einbezogen, würde sich der Verstärkungsfaktor weiter erhöhen. Die gezeigte Abschätzung der Verstärkungsfaktoren ist eher konservativ. Die Einbeziehung weiterer Faktoren würde die absolute Verstärkung in der Folge noch weiter erhöhen.

## 4.5 Spitzenverstärkte Raman-Streuung an Bakteriorhodopsin

### 4.5.1 Bakteriorhodopsin und *Halobacterium salinarum*

Ein weiteres TERS-Experiment wurde an dem Protein Bakteriorhodopsin durchgeführt. Bei Bakteriorhodopsin handelt es sich um ein Membranprotein des Prokaryonten *Halobacterium salinarum*. Dieses stäbchenförmige Bakterium trägt an jedem seiner Enden zwei Flagellen zur Fortbewegung und lebt in Habitaten mit hoher Lichtintensität, geringer Sauerstoffkonzentration und einer über drei molaren Salzkonzentration (z.B. Owenslake, Kalifornien). In besonderen Bereichen der Zellmembran, der sogenannten Purpurmembra, sind Trimere des Proteins Bakteriorhodopsin (bR) eingelagert. Die Purpurmembra kann bis zu 70 % der gesamten Zelloberfläche ausmachen und verdankt ihren Namen dem Chromophor Retinal, einem Carotin-Derivat, das in jedem der Monomere kovalent über eine Schiff'sche Base an die Aminosäure Lysin 216 gebunden ist. Bakteriorhodopsin besteht insgesamt aus 248 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 26,8 kDa. Es durchspannt die Zellmembran mit sieben Helices (vgl. Abbildung 57).

Die Funktionsweise des Proteins ist mit verschiedenen Techniken bestens untersucht. In erster Linie dient das Bakteriorhodopsin der Energiegewinnung. Bei Aussetzen der oxidativen Phosphorylierung in der Bakterienzelle wird vermehrt Bakteriorhodopsin synthetisiert, das dann als einfaches Photosynthese-System fungiert. Hierbei wird durch absorbierte Lich-

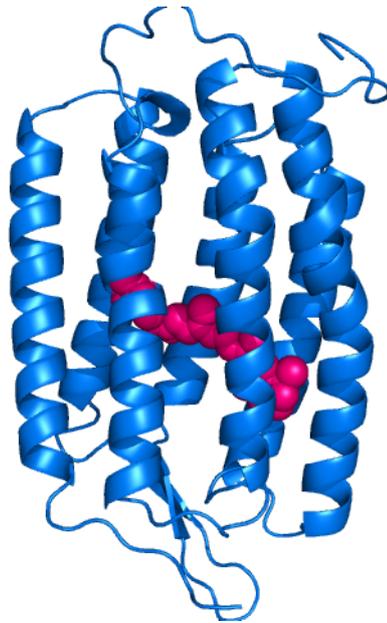


Abb. 57: Bakteriorhodopsin ist ein membranständiges Protein, das mit seinen sieben Helices die Membran durchspannt. Es bildet so einen Kanal, in dessen Mitte der Chromophor (Retinal) kovalent gebunden ist.

tenergie ein Protonengradient über der Zellmembran aufgebaut. Bei dieser simplen Art der Photosynthese wird für jedes gesammelte Photon genau ein Proton vom Zellinneren nach außen transportiert. Man spricht deshalb von einem Ein-Photon-Ein-Proton-Prozess.

Abbildung 58 zeigt den Zyklus, den das Bakteriorhodopsin nach der Belichtung durchläuft. Hierbei wird das zunächst im dunkeladaptierten Zustand vorliegende Molekül durch Licht angeregt. Im Weiteren durchläuft das Molekül einen Zyklus mit unterschiedlichen Intermediat-Formen. Während dieses Zyklus wird ein Proton aus dem Zellinneren aufgenommen und über einzelne Aminosäuren sowie den Chromophor Retinal zur Zellaußenseite transportiert und an das umgebende Medium abgegeben. Der Vorgang ist reversibel. Die Überführung in den dunkeladaptierten Zustand geschieht mit einer Halbwertszeit von etwa 20-30 Minuten. Eine genaue Beschreibung des Zyklus sowie der beteiligten Aminosäuren kann z. B. in [84] nachgelesen werden.

Der Zyklus des Bakteriorhodopsin ist hinlänglich bekannt. Für die Forscher des Instituts für Biophysik in Bochum ist vorrangig die Verteilung der verschiedenen Membranbereiche auf der Zelloberfläche von *Halobacterium salinarum* von Interesse.

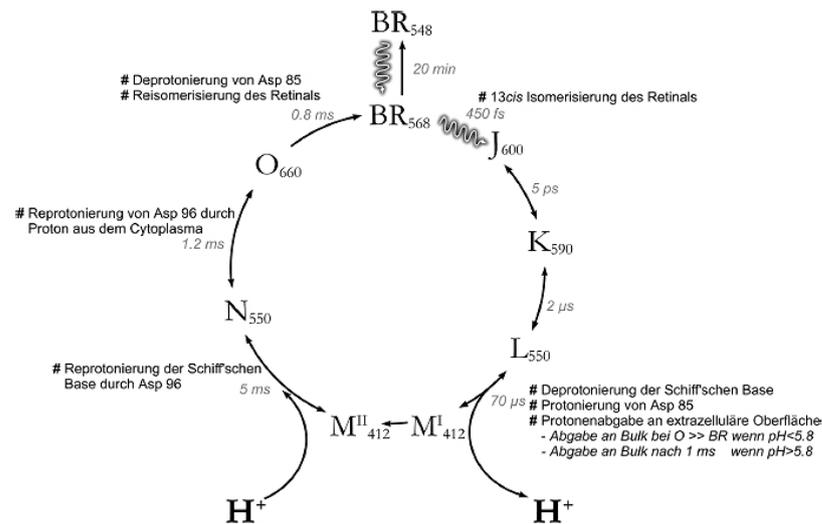


Abb. 58: Zyklus des Bakteriorhodopsins nach der Belichtung. Aus dem dunkeladaptierten Zustand (BR<sub>548</sub>) wird das Molekül durch die Energie eines Photons in einen lichtadaptierten Zustand (BR<sub>568</sub>) überführt und durchläuft einen Zyklus mit Zwischenzuständen (Intermediaten). Im Verlauf des Zyklus wird ein Proton vom Zellinneren nach Außen transportiert. Wird das Protein unter Lichtabschluss beobachtet, so kehrt es nach einer Halbwertszeit von etwa 30 Minuten in den dunkeladaptierten Zustand zurück. Die Buchstaben kennzeichnen die Namen der Intermediate, die Nummern geben das Absorptionsmaximum des jeweiligen Intermediates in Nanometern an.

#### 4.5.2 Raman-Spektren von Bakteriorhodopsin

Die vermessenen Bakteriorhodopsin-Moleküle wurden vom Institut für Biophysik der Ruhr-Universität Bochum unter Prof. K. Gerwert zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um aufgereinigte Proteine eines Wildtyp-Stammes von *Halobacterium salinarum*. Die verwendete Lösung hatte eine Konzentration von 260 ng/ml. Ein Tropfen einer Suspension von Bakteriorhodopsin in stark salzhaltiger Lösung wurde bei einer Laserleistung von 2 mW auf der Probe 10 s lang gemessen.

Das Spektrum in Abbildung 59 zeigt starke Banden um  $1000\text{ cm}^{-1}$ ,  $1200\text{ cm}^{-1}$  und  $1500\text{ cm}^{-1}$ . Besonders auffällig ist hier die Bande bei  $1526\text{ cm}^{-1}$ . Mithilfe der Referenz [85] konnten die auftretenden Banden den in Tabelle 4 gezeigten Schwingungen zugeordnet werden.

Den größten Anteil des Spektrums machen die Banden des Chromophors Retinal aus. Da es sich beim Retinal aufgrund der großen Zahl an C-C-Einfach- und C-C-Doppelbindungen um einen sehr guten Raman-Streuer handelt, war dieses Ergebnis zu erwarten. Charakteristische Schwingungsbanden für Proteine, wie etwa die verschiedenen Amid-Banden, sind nicht

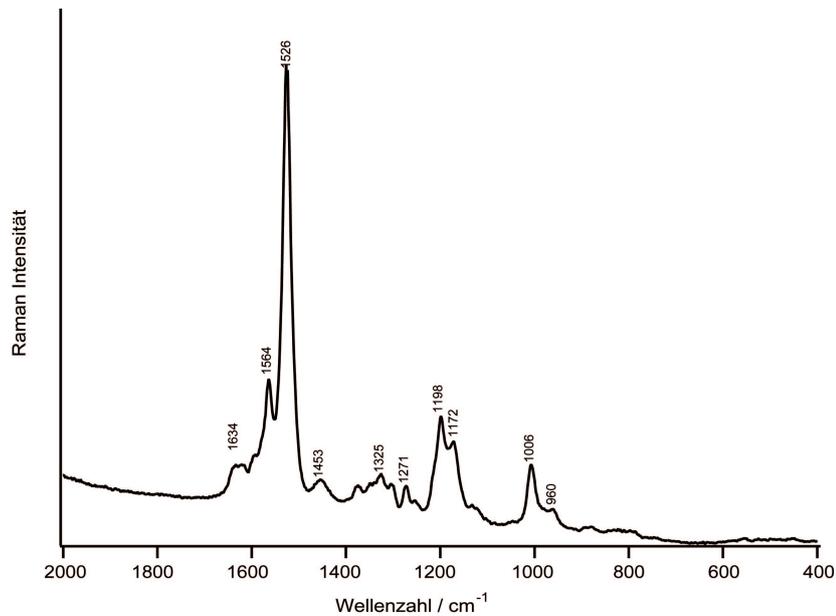


Abb. 59: Das Übersichtsspektrum einer Bakteriorhodopsin-Lösung zeigt typische Banden für den Chromophor Retinal. Die Laserleistung betrug für dieses Spektrum etwa 2 mW bei einer Aufnahmezeit von 10 s.

Tabelle 4: Zuordnung der Banden im Übersichtsspektrum von Bakteriorhodopsin. Nach Referenz [85].

Wellenzahl $cm^{-1}$	Schwingung
960	Biegeschwingung der H-Atome zwischen C11 und C12
1006	In-phase-Schwingung der Methylgruppen an C9 und C13
1172	all-trans Retinal
1198	all-trans Retinal
1526	Streckschwingung C9 bis C14 im all-trans Retinal
1564	C=C-Streckschwingung
1634	Streckschwingung der protonierten Schiff-Base

zu sehen, da die Schwingungen des Chromophors diese überdecken. Aufgrund der gewählten Anregungswellenlänge von 530,9 nm wird das Molekül nahe seines Absorptionsmaximums (lichtadaptierter Zustand: 568 nm) abgeregt. Dies führt Resonanz-Raman-Effekt, bei dem die Moleküle das Erregerlicht absorbieren und somit viel mehr Energie aufnehmen als bei herkömmlichen Raman-Messungen. Dies führt zu einem Übergang auf ein höheres elektronisches Niveau und eine Intensitätssteigerung.

### 4.5.3 TERS an Purpurmembranfragmenten

Die Purpurmembran von Bakteriorhodopsin hat einen quasi-kristallinen Charakter. Es ist somit möglich, neben einzelnen Proteinen, ganze Membranfragmente zu untersuchen. Mem-

branfragmente aus dem Wildtyp-Stamm von *Halobacterium salinarum* wurden auf einem Deckglas aufgetrocknet. Die Laserleistung bei diesen Messungen betrug etwa  $150 \mu W$  auf der Probe, die Messzeit betrug 10 s für jedes Spektrum bei einer Wellenlänge von  $530,9 \text{ nm}$ .

### Reflexionsbild

Wie oben beschrieben wurde auch bei diesem Experiment zunächst die genaue Position der Spitze auf dem Cantilever gesucht. Hierzu wurde ein Reflexionsbild der Spitze erstellt.

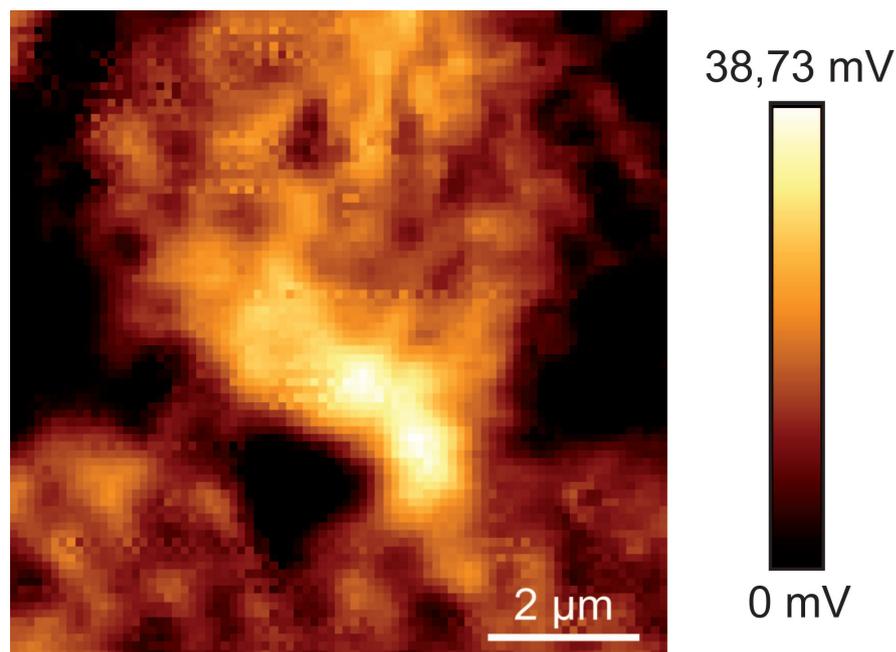


Abb. 60: Das Reflexionsbild für die bei diesem Experiment verwendeten Spitze weist zwei Punkte mit starker Reflexion auf. Dies deutet auf die Anwesenheit zweier Silberpartikel im Bereich der Spitze hin.

Abbildung 60 zeigt zwei helle Stellen in der Nähe der zu erwartenden Spitzenposition. Diese Punkte liegen dicht beieinander. Anhand des Reflexionsbildes allein kann nicht auf die genaue Position der Spitze geschlossen werden. Es ist zu vermuten, dass die nahezu gleich hellen Reflexionen größere Silberpartikel auf der Spitze oder an den Flanken darstellen. Für dieses Experiment wurde daher aufgrund der größeren Nähe zur eigentlichen Spitze der obere Partikel als Spitzenposition gewählt.

### Topographie

Die Topographie der Probe zeigte einige Strukturen, die aufgrund ihrer Größe Membranfragmenten zugeordnet werden konnten. Es wurde ein Fragment ausgewählt, das etwa 10

$\mu\text{m}$  mal  $5 \mu\text{m}$  groß und etwa  $300 \text{ nm}$  hoch ist.

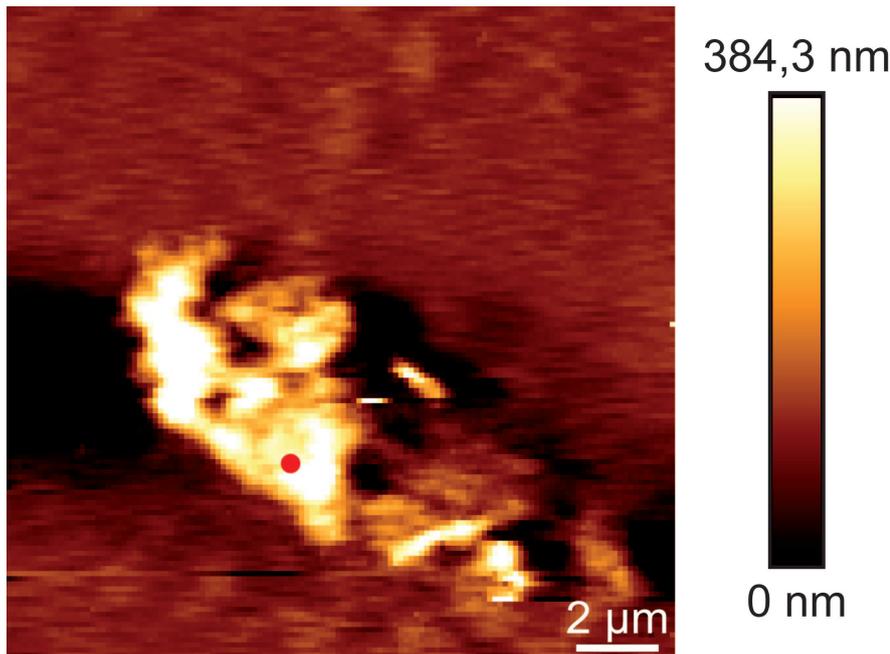


Abb. 61: Durch die Zerstörung von *H. salinarum*-Zellen lassen sich Membranfragmente gewinnen. In diesen Fragmenten liegen Proteine in nahezu natürlicher Umgebung vor. Die Abbildung zeigt ein solches Fragment, auf dem TERS-Experimente (roter Punkt) durchgeführt wurden.

Aufgrund der Größe des Fragments und seiner Höhe ist davon auszugehen, dass es sich hierbei nicht um das Fragment einer einzelnen Zelle, sondern vielmehr um mehrere Fragmente verschiedener Zellen handelt. Die Oberfläche weist eine raue Struktur auf, die auf eine Faltung der Fragmente hindeutet. Innerhalb des Membranfragments sind keine Strukturen zu erkennen. Anhand der Topographie kann nicht bestimmt werden, ob es sich um ein Stück Purpormembran handelt.

### TERS-Spektrum

An der in Abbildung 61 markierten Stelle wurden Spektren aufgenommen.

Die Spektren in Abbildung 62 sind sowohl mit Kontakt zur Probe (a), als auch mit um  $7,5 \mu\text{m}$  weit zurückgezogener Spitze (b) aufgenommen worden. Die Bande bei  $518 \text{ cm}^{-1}$  ist der Siliziumspitze zuzuordnen.

Das Referenzspektrum (Abbildung 62 b) zeigt, obwohl sich die Probe nicht im Bereich des evaneszenten Feldes der Spitze befindet, deutliche Banden bei  $518 \text{ cm}^{-1}$ ,  $626 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1079 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1302 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1344 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1380 \text{ cm}^{-1}$  und  $1663 \text{ cm}^{-1}$ . Diese Banden sind hauptsäch-

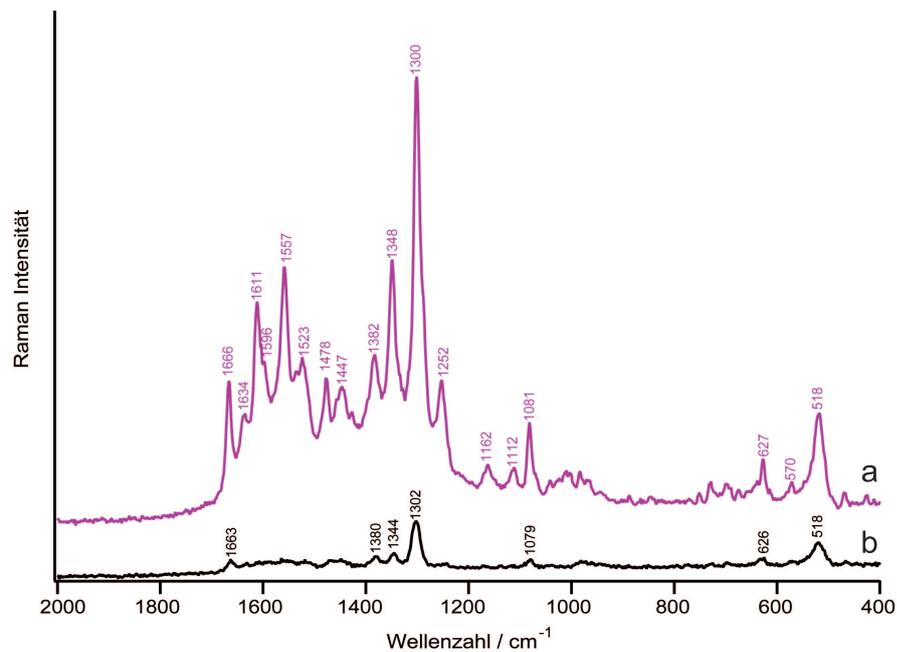


Abb. 62: Durch den Einfluss der Silberspitze wird ein Raman-Spektrum (b) verstärkt (a). Bei der Verstärkung werden Banden, die im normalen Raman nicht zu sehen sind, sichtbar. Das TERS-Spektrum (a) zeigt Banden von Protein und Retinal, während im Referenzspektrum nur schwache Banden von Retinal zu beobachten sind.

lich dem Chromophor Retinal zuzuordnen (vgl. auch Tabelle 5). Es sind jedoch auch Banden vorhanden, die Proteinschwingungen darstellen (etwa Amid-I-Bande bei  $1663\text{ cm}^{-1}$ ). Da es sich bei diesem Spektrum um das Referenzspektrum handelt, sollten keine Banden zu beobachten sein. Dieses Spektrum würde dafür sprechen, dass es sich um eine Kontamination der Spitze handelt (vgl. Kapitel 4.4.2). Aufgrund der anregenden Wellenlänge und der eindeutigen Zuordnung der Banden zum Chromophor Retinal kann jedoch davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesem Spektrum um ein Resonanz-Raman-Spektrum des Chromophors und nicht um eine Kontamination handelt.

Das Spektrum bei angenäherter Spitze (Abbildung 62 b) zeigt eine Vielzahl neuer Banden vor allem im Bereich zwischen  $1100\text{ cm}^{-1}$  und  $1700\text{ cm}^{-1}$ . Anhand der Referenzen [85, 78] konnten diese Banden zugeordnet werden. Neben den Banden des Chromophors ( $1003\text{ cm}^{-1}$ ,  $1523\text{ cm}^{-1}$ ,  $1596\text{ cm}^{-1}$ ) konnten auch charakteristische Proteinbanden, etwa die Amid-III-Bande bei  $1252\text{ cm}^{-1}$  oder C=C-Schwingungen einzelner Aminosäuren ( $1611\text{ cm}^{-1}$ ), beobachtet werden. Des Weiteren zeigt das Spektrum Banden, die für Lipide charakteristisch sind ( $1448\text{ cm}^{-1}$ ). Eine detaillierte Zuordnung wurde in Tabelle 5 vorgenommen. Hierbei wurde hauptsächlich auf die Referenzen [85, 78, 86, 87, 88] Bezug genommen.

Anhand der Zuordnung ist zu sehen, dass hauptsächlich das Retinal zum TERS-Spektrum

Tabelle 5: Bandenzuordnung der TERS-Spektren von Bakteriorhodopsin nach Referenzen [85, 78, 86, 87, 88]

Wellenzahl $cm^{-1}$	Schwingung
518	Silizium-Spitze
1003	In-Phase-Schwingung der Methylgruppen an C9 und C13
1081	Asymmetrische C-O-C-Schwingung aliphatischer Ester
1112	C-C-Schwingung
1162	Tyrosin, Phenylalanin, Amid-III
1252	Amid-III
1300	$\rho CH_2$
1348	In-plane Biegeschwingung der protonierten Schiff-Base
1448	CH <sub>2</sub> (Fettsäuren, Phospholipide, Protein-Seitenketten)
1523	C9-C14 Streckschwingung des all-trans Retinals
1596	C5-C6-Streckschwingung
1611	C=C-Schwingung Tyrosin, Phenylalanin
1634	Streckschwingung der protonierten Schiff-Base

beiträgt, jedoch auch Banden anderer Bestandteile der bakteriellen Zellmembran zu beobachten sind. Demnach handelt es sich bei dem untersuchten Membranfragment um einen Teil der Membran von *Halobacterium salinarum* mit eingelagerten Bakteriorhodopsin-Molekülen.

Des Weiteren zeigen die beobachteten Retinal-Banden, dass es sich um den lichtadaptierten Zustand des Bakteriorhodopsins handelt (vgl. Abbildung 58). Dies ist auf die Wellenlänge des anregenden Lasers zurückzuführen. Zwar liegt das Absorptionsmaximum des dunkeladaptierten Zustandes näher an der anregenden Wellenlänge, jedoch ist dieser Zustand nicht stabil. Durch die Bestrahlung mit Licht wird das Molekül sofort aktiviert. Auch andere Intermediate innerhalb des Zyklus haben Absorptionsmaxima nahe der anregenden Wellenlänge. Diese sind jedoch nicht zeitstabil.

Die Untersuchung der Membranfragmente ist ein erster Schritt hin zu einer Kartierung der Oberfläche von *Halobacterium salinarum*. Durch den Einsatz der Silberspitze ist es möglich, die dominierenden Signale des Chromophors zu unterdrücken und die schwächeren Raman-Signale des Proteins oder der Lipid-Umgebung zu verstärken. Es ist somit möglich, mit hoher räumlicher Auflösung eine Untersuchung der verschiedenen Membranareale durchzuführen. Weitere Experimente hierzu sind in Planung.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Oberflächen biologischer Systeme sind von großem Interesse für viele Bereiche der Lebenswissenschaften und der Medizin. Besonderes Augenmerk wird auf membranständige Proteine gelegt, die, nicht wie globuläre Proteine, leicht aus der Zelle zu extrahieren sind. Um die membranständigen Proteine in nativer Umgebung untersuchen zu können, müssen neue Methoden entwickelt und ihr Potenzial erfasst werden.

In dieser Arbeit wurden Methoden entwickelt bzw. eingesetzt, die helfen können, die Oberflächen von Bakterien, Viren oder menschlichen Zellen zu untersuchen. Mit den ausgewählten Methoden sollen Aussagen über die Struktur, die Verteilung von Proteinen auf der Oberfläche oder ihre Funktionsweise getroffen werden.

Die Methoden Schwingungs- und Kraftspektroskopie wurden zur Charakterisierung biologischer Oberflächen eingesetzt. Dabei wurde die Kraftspektroskopie zum ersten Mal mit multivariaten Datenanalyse-Methoden gekoppelt.

### **Kraftspektroskopie und multivariate Datenanalyse**

Hauptkomponentenanalyse (PCA), hierarchische Cluster-Methoden und der Einsatz des K-Means-Algorithmus wurden genutzt, um die komplexen Daten der Kraft-Distanz-Kurven auszuwerten und wichtige Informationen sichtbar zu machen. Die Ergebnisse zeigen, dass die gängigen Darstellungsmethoden kraftspektroskopischer Experimente in Form von Steigung und Adhäsion nur bedingt Aussagen über die chemischen Eigenschaften der Probe zulassen. Durch die Auswertung der Daten mit multivariater Datenanalyse konnten die Informationen aus komplexen Datensätzen kraftspektroskopischer Experimente einfach sichtbar und interpretierbar gemacht werden. Zur Entwicklung der Methode wurde ein Modellsystem aus einer biologischen (Cytochrom C) und einer nichtbiologischen Komponente (Glimmer) eingesetzt. Mithilfe der Hauptkomponentenanalyse konnte bei diesem System schon in der ersten Hauptkomponente deutliche zwischen den Komponenten unterschieden werden. Die zweite bis vierte Hauptkomponente gab Details der vermessenen Oberfläche wieder, wäh-

rend ab der fünften Hauptkomponente nur noch Rauschen zu beobachten war. Die Hauptkomponentenanalyse stellt somit eine geeignete Methode dar, Korrelationen in den Daten zu finden und auf einfache Art sichtbar zu machen.

Ähnliche Ergebnisse wurden mit der hierarchischen Cluster-Analyse erzielt. Hier führten die euklidische Distanz als Abstandsfunktion und die Cluster-Methode nach Ward zu einer Unterscheidung zwischen den Materialien der Probe. Es zeigte sich jedoch, dass ein vollständig automatisierter Prozess wie bei der Hauptkomponentenanalyse nicht möglich war. Die Interpretation der Dendrogramme war notwendig, um die bestmögliche Anzahl von Clustern zu ermitteln. Erst durch diesen Schritt war es möglich, die Daten optimal auszuwerten. Eine zu hohe Clusteranzahl führte zu einer Überinterpretation der Daten. Für das Zwei-Komponenten-System war eine Anzahl von neun Clustern ausreichend, um die Daten zu beschreiben. Es stellte sich jedoch heraus, dass mit der hierarchischen Clusteranalyse nicht nur zwischen Cytochrom C und Glimmer unterschieden werden konnte, sondern gleichzeitig auch detailliertere Informationen über Mischbereiche oder andere, nicht sichtbare Strukturen, möglich waren. Auch mit der hierarchischen Clusteranalyse war eine Interpretation der Daten möglich. Der K-Means-Algorithmus dagegen war nicht zu verwenden. Diese unüberwachte Clustermethode war aufgrund der willkürlichen Auswahl der Clusterzentren nicht geeignet, die Daten zu beschreiben. Für einen schnellen und groben Überblick ließ sich diese Methode dennoch einsetzen.

Aufgrund der für das Zwei-Komponenten-Modellsystem erzielten Ergebnisse, konnte die Kopplung von Kraftspektroskopie und multivariater Datenanalyse als eine erfolgversprechende Methode zur Untersuchung von Oberflächen hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung angesehen werden. Bestätigt wurde dies auch durch die Anwendung der Methode auf ein komplexeres System aus mehreren Komponenten. Dieses System bestand aus einer Glas- und Goldoberfläche mit Inseln aus Protein. Sowohl die Hauptkomponentenanalyse als auch die hierarchische Cluster-Analyse konnte die drei Materialien voneinander unterscheiden. Es zeigte sich jedoch, dass speziell bei der Hauptkomponentenanalyse mehrere Hauptkomponenten in die Interpretation der Daten einfließen mussten, um das System zu beschreiben. Aufgrund der Präparation der Oberfläche traten viele Mischbereiche auf, die eigene Hauptkomponenten beanspruchten. Ebenso verhielt es sich mit der hierarchischen

Cluster-Analyse. Es war eine deutliche Unterscheidung der Komponenten möglich. Der erfolgreiche Einsatz der Methode zeigte sich nicht zuletzt daran, dass durch die Datenanalyse die Grenze zwischen Gold und Glas sichtbar gemacht werden konnte, obwohl sie in der topographischen Aufnahme nicht zu sehen war. Somit konnte bewiesen werden, dass mit dieser Methode auch versteckte Informationen sichtbar gemacht werden. Die Experimente zeigen weiterhin, dass eine hohe Ortsauflösung mit dieser Methode möglich ist. Diese hängt im Wesentlichen von der Größe der verwendeten Spitzen und der Anzahl gemessener Punkte ab. Je kleiner die Spitze war und je enger die Punkte beieinanderlagen, an denen Kraft-Distanz-Kurven gemessen werden konnten, desto höher wurde die Auflösung der Oberfläche. Somit war es möglich, chemische Eigenschaften sogar einzelner Moleküle zu untersuchen.

Des Weiteren wurde die Notwendigkeit einer geeigneten Datenvorverarbeitung gezeigt, um auftretende Artefakte oder dominierende Höheninformationen vor der eigentlichen Analyse zu eliminieren. Als wichtiges Kriterium stellte sich die Wahl des Referenz-Punktes heraus. Je nach Wahl der Punkte wurden unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Die Wahl des Einschnapp-Punktes als Referenz stellte sich als sinnvoll heraus, da hier der erste Kontakt mit der Probe hergestellt wird.

Die Kombination kraftspektroskopischer Experimente mit multivariater Datenanalyse hat das Potenzial, chemische Informationen von Oberflächen zu erhalten und stellt eine Alternative zu optischen Spektroskopie-Methoden dar. Hierbei ist eine hohe Ortsauflösung wie auch die Darstellung versteckter Informationen möglich. Die Auflösung kann mit dem Einsatz geeigneter Spitzen und der Anzahl untersuchter Punkte auf der Probe noch weiter erhöht werden. Eine Ausweitung der Experimente auf lebende Zellen ist durchaus denkbar. Hierbei ist jedoch notwendig, Vergleichsdaten von Bestandteilen der Membran zu sammeln, um eine genaue Interpretation der Ergebnisse gewährleisten zu können.

### **TERS an biologischen Systemen**

Neben der Kraftspektroskopie lieferte auch die spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie chemische Informationen über die untersuchte Oberfläche. Die *in-vivo*-Beobachtungen der bakteriellen Zellwand von *Staphylococcus epidermidis* ließen Aussagen über deren Zusammensetzung und die dynamischen Prozesse zu. Anhand von Zeitmessreihen konnte gezeigt wer-

den, dass die Zellwand kein statisches, sondern vielmehr ein hochdynamisches System ist. In kurzer Zeit wechselten sich Spektren von Zucker, Proteinen und Lipiden ab. Des Weiteren konnten einzelne Zellwandkomponenten wie etwa Teichonsäuren oder Peptidoglykane identifiziert werden. Als ein wichtiger Aspekt bei der Messung von TERS-Spektren stellte sich die Beschaffenheit der Spitze während der Messung heraus. Wichtig war die Kontrolle der Spitze vor, während und nach der Messung auf mögliche Kontaminationen. Solche Kontrollexperimente waren notwendig, um die Sauberkeit der Spitze fortwährend zu beobachten und Artefakte in den Raman-Messungen durch aufgesammeltes Material auszuschließen.

Durch den Einsatz silberbedampfter Spitzen konnte eine Verstärkung der Raman-Signale bis zu  $10^8$  beobachtet werden. Die Methode erlaubte somit kurze Messzeiten bei einem ausreichenden Signal-Rausch-Verhältnis.

Die TERS-Messungen an Membranfragmenten von Bakteriorhodopsin zeigten ähnliche Ergebnisse. Durch die verstärkende Spitze konnten Banden sichtbar gemacht werden, die bei klassischen Raman-Messungen von den starken Banden des Retinals überlagert wurden. Ebenso wie bei *Staphylococcus epidermidis* war auch hier bei kurzer Messzeit ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu beobachten. Die erhaltenen Spektren ließen sich einzelnen Bestandteilen der Purpurmembran zuordnen. Neben dem Retinal konnten sowohl Protein- als auch Lipid-Banden beobachtet werden.

Neben den spektroskopischen Informationen konnte mit dieser Methode auch eine Topographie der untersuchten Probe aufgenommen werden, die zusätzliche Informationen lieferte.

Die spitzenverstärkte Raman-Streuung bietet die Möglichkeit, mit kurzen Messzeiten und hoher Ortsauflösung, chemische Informationen über biologische Oberflächen zu erzielen. Hierbei ist aufgrund der Verstärkung des Raman-Signals durch die silberbedampfte Spitze ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis möglich. Diese Methode kann durchaus auf andere Bakterien-Stämme ausgeweitet und deren Oberflächenproteine untersucht werden. Eine Datenbank mit Vergleichsspektren ist jedoch notwendig, um eine genaue Charakterisierung zu gewährleisten. Der Einsatz dieser Technik ist auch in anderen Bereichen denkbar. So ist etwa eine direkte und hochortsaufgelöste Sequenzierung unbekannter DNA-Stränge möglich, wie sie durch Bailo et al. [49] vorbereitet wurde.

# Literatur

- [1] M. G. Bowden, W. Chen, J. Singvall, Y. Xu, S. J. Peacock, V. Valtulina, P. Speziale, and M. Hook. Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of staphylococcus epidermidis. *Microbiology*, 151:1453–1464, 2005.
- [2] E. Mutschler. *Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 7th edition, 1996.
- [3] G. Binnig and H. Rohrer. Scanning tunneling microscopy. *Helvetica Physica Acta*, 55(6):726–735, 1982.
- [4] G. Binnig and H. Rohrer. Scanning tunneling microscopy. *Surf. Sci.*, 126(1-3):236–244, 1983.
- [5] G. Binnig, C. F. Quate, and C. Gerber. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.*, 56(9):930–933, 1986.
- [6] F. Gaboriaud and Y. F. Dufrene. Atomic force microscopy of microbial cells: Application to nanomechanical properties, surface forces and molecular recognition forces. *Colloids Surf., B*, 54(1):10–19, 2007. 0927-7765.
- [7] S. Garcia-Manyes, O. Domenech, F. Sanz, M. T. Montero, and J. Hernandez-Borrell. Atomic force microscopy and force spectroscopy study of langmuir-blodgett films formed by heteroacid phospholipids of biological interest. *Biochim. Biophys. Acta*, 1768(5):1190–1198, 2007. 0005-2736.
- [8] M. E. R. Dotto, S. S. Camargo, and C. M. Ziglio. Study of force curves on paraffin deposits using atomic force microscopy. *Energy & Fuels*, 21(3):1296–1300, 2007.
- [9] J. Long, Z. H. Xu, and J. H. Masliyah. Single molecule force spectroscopy of asphaltene aggregates. *Langmuir*, 23(11):6182–6190, May 2007.

- [10] K. Feldman, T. Tervoort, P. Smith, and N. D. Spencer. Toward a force spectroscopy of polymer surfaces. *Langmuir*, 14(2):372–378, 1998.
- [11] H. Clausen-Schaumann, M. Seitz, R. Krautbauer, and H. E. Gaub. Force spectroscopy with single bio-molecules. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4(5):524–530, 2000.
- [12] E. A. Evans and D. A. Calderwood. Forces and bond dynamics in cell adhesion. *Science*, 316(5828):1148–1153, 2007. 0036-8075.
- [13] M. Benoit. Cell adhesion measured by force spectroscopy on living cells. *Methods Cell Biol*, 68:91–114, 2002.
- [14] A. Noy. Chemical force microscopy of chemical and biological interactions. *Surf. Interface Anal.*, 38(11):1429–1441, 2006.
- [15] M. Kessler and H. E. Gaub. Unfolding barriers in bacteriorhodopsin probed from the cytoplasmic and the extracellular side by AFM. *Structure*, 14(3):521–7, 2006.
- [16] D. J. Mueller, M. Kessler, F. Oesterhelt, C. Moller, D. Oesterhelt, and H. Gaub. Stability of bacteriorhodopsin alpha-helices and loops analyzed by single-molecule force spectroscopy. *Biophys. J.*, 83(6):3578–3588, 2002.
- [17] Y. F. Dufrene. Recent progress in the application of atomic force microscopy imaging and force spectroscopy to microbiology. *Curr. Opin. Microbiol.*, 6(3):317–323, 2003.
- [18] A. Ebner, J. Madl, F. Kienberger, L. A. Chtcheglova, T. Puntheeranurak, R. Zhu, J. L. Tang, H. J. Gruber, G. J. Schutz, and P. Hinterdorfer. Single molecule force microscopy on cells and biological membranes. *Current Nanoscience*, 3(1):49–56, 2007. 1573-4137.
- [19] T. E. Fisher, M. Carrion-Vazquez, A. F. Oberhauser, H. B. Li, P. E. Marszalek, and J. M. Fernandez. Single molecule force spectroscopy of modular proteins in the nervous system. *Neuron*, 27(3):435–446, 2000.
- [20] O. K. Dudko, J. Mathe, A. Szabo, A. Meller, and G. Hummer. Extracting kinetics from single-molecule force spectroscopy: Nanopore unzipping of DNA hairpins. *Biophys. J.*, 92(12):4188–4195, 2007.

- [21] R. W. Friddle, T. A. Sulchek, H. Albrecht, S. J. De Nard, and A. Noy. Force spectroscopy of single and multiple biological bonds. *Biophys. J.*, pages 523A–523A, 2007.
- [22] R. W. Friddle, T. A. Sulchek, H. Albrecht, S. J. De Nardo, and A. Noy. Counting and breaking individual biological bonds: Force spectroscopy of tethered ligand-receptor pairs. *Current Nanoscience*, 3(1):41–48, 2007. 1573-4137.
- [23] B. Colombini, M. A. Bagni, G. Romano, and G. Cecchi. Characterization of actomyosin bond properties in intact skeletal muscle by force spectroscopy. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 104(22):9284–9289, 2007.
- [24] K. Pearson. On lines and planes of closest fit to a system of points in space. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 6(2):559–572, 1901.
- [25] B. G. De Grooth, G. J. Postma, W. J. Melssen, L. M. C. Buydens, V. Deckert, and R. Zenobi. Application of principal component analysis to detect outliers and spectral deviations in near-field surface-enhanced Raman spectra. *Anal. Chim. Acta*, 446:71–83, 2001.
- [26] L. Kaufmann and P.J. Rousseeuw. *Finding Groups in Data - An Introduction to Cluster Analysis*. Wiley, 1990.
- [27] M. Otto. *Chemometrics*. Wiley, Weinheim; New York; Chichester; Brisbane; Singapore; Toronto, 1999.
- [28] P. Geladi. Chemometrics in spectroscopy - part 1. classical chemometrics. *Spectrochim. Acta, Part B*, 58(5):767–782, 2003.
- [29] P. Geladi, B. Sethson, J. Nystrom, T. Lillhonga, T. Lestander, and J. Burger. Chemometrics in spectroscopy - part 2. examples. *Spectrochim. Acta, Part B*, 59(9):1347–1357, 2004.
- [30] E. K. Kemsley, R. R. Swinhoe, A. C. Smith, M. C. McCann, and T. L. Wang. Chemometrics can be applied to mechanical testing data to characterise stem toughness and stiffness in crop plants. *J. Sci. Food Agricul.*, 84(9):966–976, 2004.

- [31] Y. Ozaki and K. Murayama. Infrared and Raman spectroscopy and chemometrics of biological materials. In H. Gremlich and B. Yan, editors, *Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials*. Marcel Dekker, New York, 2001.
- [32] V. R. Kondepati, T. Oszinda, H. M. Heise, K. Luig, R. Mueller, O. Schroeder, M. Keese, and J. Backhaus. Ch-overtone regions as diagnostic markers for near-infrared spectroscopic diagnosis of primary cancers in human pancreas and colorectal tissue. *Anal. Bioanal. Chem.*, 387(5):1633–1641, 2007. 1618-2642.
- [33] E. H. Synge. A suggested model for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region. *Philos. Mag.*, 6(2):356–362, 1928.
- [34] D. W. Pohl, U. C. Fischer, and U. T. Durig. Scanning near-field optical microscopy (snom). *J. Microsc.*, 152:853–861, 1988.
- [35] M. Fleischmann, P. J. Hendra, and A. J. McQuillan. Raman-spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chem. Phys. Lett.*, 26(2):163–166, 1974.
- [36] M. G. Albrecht and J. A. Creighton. Anomalously intense Raman-spectra of pyridine at a silver electrode. *J. Am. Chem. Soc.*, 99(15):5215–5217, 1977.
- [37] D. L. Jeanmaire and R. P. Van Duyne. Surface Raman spectroelectrochemistry .1. heterocyclic, aromatic, and aliphatic-amines adsorbed on anodized silver electrode. *J. Electroanal. Chem.*, 84(1):1–20, 1977.
- [38] M. Moskovits. Surface-enhanced spectroscopy. *Rev. Mod. Phys.*, 57(3):783–826, 1985.
- [39] A. Otto, I. Mrozek, H. Grabhorn, and W. Akemann. Surface-enhanced Raman-scattering. *J. Phys.*, 4(5):1143–1212, 1992.
- [40] S. E. J. Bell and N. M. S. Sirimuthu. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) for sub-micromolar detection of DNA/RNA mononucleotides. *J. Am. Chem. Soc.*, 128(49):15580–15581, 2006.
- [41] A. Rasmussen and V. Deckert. Surface- and tip-enhanced Raman scattering of DNA components. *J. Raman. Spectrosc.*, 37(1-3):311–317, 2006.

- [42] V. Deckert, D. Zeisel, R. Zenobi, and T. Vo-Dinh. Near-field surface enhanced Raman imaging of dye-labeled DNA with 100-nm resolution. *Anal. Chem.*, 70(13):2646–2650, 1998.
- [43] J. Wessel. Surface-enhanced optical microscopy. *J. Opt. Soc. Am. B*, 2(9):1538–1541, 1985.
- [44] R. M. Stöckle, Y. D. Suh, V. Deckert, and R. Zenobi. Nanoscale chemical analysis by tip-enhanced Raman spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.*, 318(1-3):131–136, 2000.
- [45] B. Pettinger, B. Ren, G. Picardi, R. Schuster, and G. Ertl. Nanoscale probing of adsorbed species by tip-enhanced Raman spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.*, 92(9), 2004.
- [46] B. Pettinger, B. Ren, G. Picardi, R. Schuster, and G. Ertl. Tip-enhanced Raman spectroscopy (TERS) of malachite green isothiocyanate at au(111): bleaching behavior under the influence of high electromagnetic fields. *J. Raman. Spectrosc.*, 36(6-7):541–550, 2005.
- [47] N. Hayazawa, T. Yano, H. Watanabe, Y. Inouye, and S. Kawata. Detection of an individual single-wall carbon nanotube by tip-enhanced near-field Raman spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.*, 376(1-2):174–180, 2003.
- [48] K. F. Domke, D. Zhang, and B. Pettinger. Tip-enhanced Raman spectra of picomole quantities of DNA nucleobases at au(111). *J. Am. Chem. Soc.*, 129(21):6708, 2007.
- [49] E. Bailo and V. Deckert. Tip-enhanced Raman spectroscopy of single RNA strands: towards a novel direct sequencing method. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47(9), 2008.
- [50] U. Neugebauer, P. Rosch, M. Schmitt, J. Popp, C. Julien, A. Rasmussen, C. Budich, and V. Deckert. On the way to nanometer-sized information of the bacterial surface by tip-enhanced Raman spectroscopy. *Chemphyschem*, 7(7):1428–1430, 2006.
- [51] U. Neugebauer, U. Schmid, K. Baumann, W. Ziebuhr, S. Kozitskaya, V. Deckert, M. Schmitt, and J. Popp. Towards a detailed understanding of bacterial metabolism - spectroscopic characterization of staphylococcus epidermidis. *Chemphyschem*, 8(1):124–137, 2007. 1439-4235.

- [52] C. Budich, U. Neugebauer, J. Popp, and V. Deckert. Cell wall investigations utilizing tip-enhanced Raman scattering. *J. Microsc.*, 229(3):533–539, 2008.
- [53] C. Budich, J. West, P. Lampen, and V. Deckert. Force microscopy analysis using chemometric tools. *Anal. Bioanal. Chem.*, 390(5):1253–1260, 2008.
- [54] Y. F. Dufrene. Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *J. Bacteriol.*, 184(19):5205–13, 2002.
- [55] K. Kneipp, A. S. Haka, H. Kneipp, K. Badizadegan, N. Yoshizawa, C. Boone, K. E. Shafer-Peltier, J. T. Motz, R. R. Dasari, and M. S. Feld. Surface-enhanced Raman spectroscopy in single living cells using gold nanoparticles. *Appl. Spectrosc.*, 56(2):150–154, 2002.
- [56] S. L. McCall, P. M. Platzman, and P. A. Wolff. Surface enhanced Raman scattering. *Phys. Lett.*, 77A(5):381–383, 1980.
- [57] E. Abbe. Beiträge zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung. *Archiv Mikroskop*, 9:413–468, 1873.
- [58] L. Rayleigh. Investigations in optics with special reference to the spectroscopy. *Philos. Mag.*, 8:261–274/403–411/477–486, 1879.
- [59] D. W. Pohl, W. Denk, and M. Lanz. Optical stethoscopy - image recording with resolution  $\lambda/20$ . *Appl. Phys. Lett.*, 44(7):651–653, 1984.
- [60] A. Lewis, M. Isaacson, A. Haroontunian, and A. Muray. Development of a 500 angstrom spatial resolution light microscope. *Ultramicroscopy*, 13(3):227–231, 1984.
- [61] M. S. Anderson. Locally enhanced Raman spectroscopy with an atomic force microscope. *Appl. Phys. Lett.*, 76(21):3130–3132, 2000.
- [62] N. Hayazawa, Y. Inouye, Z. Sekkat, and S. Kawata. Metallized tip amplification of near-field Raman scattering. *Opt. Commun.*, 183(1):333–336, 2000.

- [63] B. Pettinger, G. Picardi, R. Schuster, and G. Ertl. Surface-enhanced and STM-tip-enhanced Raman spectroscopy at metal surfaces. *Single Molecules*, 3(5-6):285–294, 2002.
- [64] D. Richards, R. G. Milner, F. Huang, and F. Festy. Tip-enhanced Raman microscopy: practicalities and limitations. *J. Raman. Spectrosc.*, 34(9):663–667, 2003.
- [65] I. Notinger and A. Elfick. Effect of sample and substrate electric properties on the electric field enhancement at the apex of spm nanotips. *J. Chem. Phys. B*, 109(33):15699–15706, 2005.
- [66] Kim H. Esbensen. *Multivariate Data Analysis in practice*. Camo Process As, 5th edition, 2002.
- [67] K. R. Beebe, R. J. Pell, and M. Seasholtz. *Chemometrics A Practical Guide*. Wiley, Weinheim; New York; Chichester; Brisbane; Singapore; Toronto, 1998.
- [68] S. C. Johnson. Hierarchical clustering schemes. *Psychometrika*, 32(3):241–241, 1967.
- [69] F. J. Rohlf. Adaptive hierarchical clustering schemes. *Systematic Zoology*, 19(1):58, 1970.
- [70] J. A. Hartigan and M. A. Wong. A k-means clustering algorithm. *Appl. Stat.*, 28:100–108, 1979.
- [71] P. C. Mahalanobis. On the generalised distance in statistics. *Proc. Nat. Inst. Sci. India*, 12:49–55, 1936.
- [72] H Minkowski. Raum und zeit. *Jahresbericht der Deutschen Mathematiker-Vereinigung*, pages 75–88, 1909.
- [73] N. Hayazawa, Y. Inouye, Z. Sekkat, and S. Kawata. Near-field Raman scattering enhanced by a metallized tip. *Chem. Phys. Lett.*, 335(5-6):369–374, 2001.
- [74] A. Bernard, E. Delamarche, H. Schmid, B. Michel, H. R. Bosshard, and H. Biebuyck. Printing patterns of proteins. *Langmuir*, 14(9):2225–2229, 1998.

- [75] A. Bernard, J. P. Renault, B. Michel, H. R. Bosshard, and E. Delamarche. Microcontact printing of proteins. *Adv. Mater.*, 12(14):1067–1070, 2000.
- [76] J. H. Ward. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *JASA*, 58(301):236, 1963.
- [77] <http://www.uccs.edu/rmelamed/MicroFall2002/Chapter2006>.
- [78] U. Neugebauer. *Characterization of bacteria, antibiotics of the fluoroquinolone type and their biological targets DNA and gyrase utilizing the unique potential of vibrational spectroscopy*. PhD thesis, 2007.
- [79] T. Schmidt, G. J. Schutz, W. Baumgartner, H. J. Gruber, and H. Schindler. Imaging of single molecule diffusion. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 93(7):2926–2929, 1996.
- [80] P. I. H. Bastiaens and A. Squire. Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell. *Trends in Cell Biology*, 9(2):48–52, 1999.
- [81] A. K. Kenworthy, B. J. Nichols, C. L. Remmert, G. M. Hendrix, M. Kumar, J. Zimmerberg, and J. Lippincott-Schwartz. Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface. *J. Cell Biol.*, 165(5):735–746, 2004.
- [82] T. Kobayashi, M. Murakami, Y. Takeda, A. Kusumi, and A. Yoshimura. Membrane dynamics and cell signaling as studied by single molecule imaging. *Seikagaku*, 76(2):91–100, 2004.
- [83] *The NanoWizard AFM User Manual*.
- [84] J.K. Lanyi. Bacteriorhodopsin. *Annu. Rev. Physiol.*, 66:665–88, 2004.
- [85] M. Kolbe. *Röntgenographische und spektroskopische Charakterisierung der lichtgetriebenen Ionenpumpe Halorhodopsin aus Halobacterium salinarum*. PhD thesis, 2001.

- [86] I. R. Nabiev, R. G. Efremov, and G. D. Chumanov. The chromophore-binding site of bacteriorhodopsin - resonance Raman and surface-enhanced resonance Raman-spectroscopy and quantum chemical study. *J. Biosci.*, 8(1-2):363–374, 1985.
- [87] A. B. Myers, R. A. Harris, and R. A. Mathies. Resonance Raman excitation profiles of bacteriorhodopsin. *J. Chem. Phys.*, 79(2):603–613, 1983.
- [88] M. Stockburger, W. Klusmann, H. Gattermann, G. Massig, and R. Peters. Photochemical cycle of bacteriorhodopsin studied by resonance Raman-spectroscopy. *Biochemistry*, 18(22):4886–4900, 1979.

## 6 Anhang

### A Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von TERS-Spitzen

Eine Möglichkeit die Sauberkeit von TERS-Spitzen zu überprüfen ist die optischen Untersuchung in einem Rasterelektronen-Mikroskop. Die Abbildung zeigt im oberen Bereich REM-Aufnahmen von 16 Spitzen, die mit Kontaminationen behaftet sind, während im unteren Bereich 12 REM-Aufnahmen von unkontaminierten Spitzen zu sehen sind.

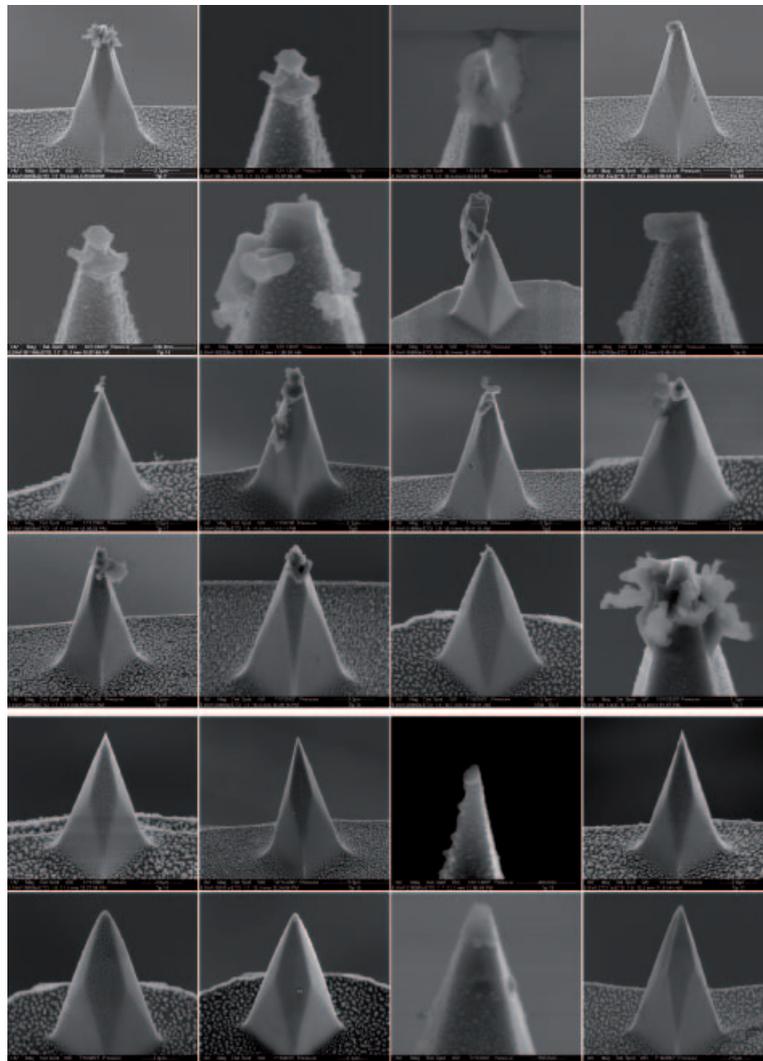


Abb. 63: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von 16 kontaminierten und 12 unkontaminierten TERS-Spitzen.

## B Dateiformat eines kraftspektroskopischen Experiments

Jedes kraftspektroskopische Experiment wird in einer ASCII-Datei in einem definierten Format gespeichert. Jede Kraft-Distanz-Kurve wird hierzu in zwei Teile geteilt, *trace* und *retrace*. Im Kopfteil jeder Datei werden Informationen über den verwendeten Scanner-Typ (*scanner*), die Größe des vermessenen Feldes (*fastSize*, *slowSize*), den Ort der Messung im Bereich des Scanners (*xOffset*, *yOffset*) und weitere Parameter des Experiments abgelegt. Wichtig für die Auswertung der Daten sind die Anzahl der Punkte in X- und Y-Richtung (*iLength*, *jLength*), die Anzahl der Datenpunkte pro Kurve (*kLength*) sowie die Richtung der Messung (*direction*). Es folgt weiterhin eine Definition der gespeicherten Daten (*columns*, *fancyNames*) und die Einheiten der jeweiligen Spalten (*calibrationSlots*, *units*). Anschließend folgen die Daten.

### B.1 ASCII-Datei

```
# scanner: false
# gridPattern backAndForth
# fastSize: 4.5E-7
# slowSize: 4.5E-7
# xOffset: 1.5162666022844816E-5
# yOffset: -1.3520182022458967E-5
# iLength: 32
# jLength: 32
# theta: 0.0
# reflect: false
# numPoints: 1024
# forceSettings: relative
# zRelativeStart: 3.0E-7
# zRelativeEnd: -1.0E-7
# setpoint: 0.2
# kLength: 2048
# zStartPauseOption: constantHeight
# zEndPauseOption: constantHeight
# tipsaverPauseOption: constantHeight
# feedbackMode: contact
# traceScanTime: 0.5
# retraceScanTime: 0.5
# pauseAtStart: 0.0
# pauseAtEnd: 0.0
# pauseOnTipsaver: 0.0
# scanner: false
# date: Mon Sep 26 13:20:09 CEST 2005
```

```
#
#
# index: 0
# iIndex: 0
# jIndex: 0
# xPosition: 1.4944697272844816E-5
# yPosition: -1.3738150772458967E-5
# direction: trace
# columns: smoothedStrainGaugeHeight vDeflection
           strainGaugeHeight height hDeflection
# fancyNames: "Height (measured & smoothed)" "Vertical
              deflection" "Height (measured)" "Height" "Lateral deflection
              "
# heightMultiplier: 0.6
# heightOffset: 0.0
# calibrationSlots: nominal volts nominal nominal volts
# units: m V m m V
#
1.5845125E-6 -0.021087436 1.5853286E-6 1.2860152E-6 -0.23108786
1.584404E-6 -0.022421218 1.5843791E-6 1.285832E-6 -0.23207998
1.5842955E-6 -0.022421218 1.5829548E-6 1.2856032E-6 -0.2327414
1.5841869E-6 -0.022421218 1.5839043E-6 1.28542E-6 -0.23174928
1.5840782E-6 -0.023088109 1.5843791E-6 1.2852369E-6 -0.23174928
1.5839694E-6 -0.022087771 1.5843791E-6 1.2850538E-6 -0.23141858
1.5838605E-6 -0.022754664 1.5843791E-6 1.2848249E-6 -0.23141858
1.5837516E-6 -0.022087771 1.5829548E-6 1.2846418E-6 -0.23141858
1.5836424E-6 -0.022754664 1.5824801E-6 1.2844587E-6 -0.23207998
1.5835333E-6 -0.022754664 1.5834296E-6 1.2842755E-6 -0.23207998
1.5834239E-6 -0.023421554 1.5829548E-6 1.2840467E-6 -0.23174928
1.5833145E-6 -0.022754664 1.5829548E-6 1.2838636E-6 -0.23174928
1.5832051E-6 -0.022087771 1.5843791E-6 1.2836805E-6 -0.23108786
1.5830956E-6 -0.022754664 1.5829548E-6 1.2834973E-6 -0.23141858
1.5829859E-6 -0.023421554 1.5829548E-6 1.2832685E-6 -0.23141858
1.5828762E-6 -0.023754999 1.5820053E-6 1.2830853E-6 -0.23340282
1.5827663E-6 -0.022754664 1.5820053E-6 1.2829023E-6 -0.23141858
1.5826564E-6 -0.024088446 1.5820053E-6 1.2826733E-6 -0.23141858
1.5825464E-6 -0.022754664 1.5820053E-6 1.2824903E-6 -0.23108786
1.5824362E-6 -0.023754999 1.5824801E-6 1.2823072E-6 -0.2324107
1.582326E-6 -0.023754999 1.5829548E-6 1.282124E-6 -0.23108786
1.5822158E-6 -0.022754664 1.5820053E-6 1.2818952E-6 -0.23108786
```

## B.2 Automatisiertes hierarchisches Clustern

```
%Skript erstellt am 10.02.06 von cb
%
%Diese Skript fuehrt eine hierarchische Clusteranalyse durch.
%Als Input werden die Daten (X)und die Anzahl der Cluster (
    cutoff)
%verlangt.
%Der Output (J) ist ein Vektor, der jedem Spektrum ein Cluster
%zuweist.
function [T5,T6] = cbclusterh(X,cutoff)
T=[]; T1=[]; T2=[]; T3=[]; T4=[]; T5=[]; T6=[];
T1 = pdist(X);
T2 = squareform(T1);
T3 = linkage(T1, 'single ');
[T4,U] = dendrogram(T3,0);
T5 = cophenet(T3,T1);
T6 = cluster(T3,cutoff);
```

## B.3 Automatisiertes K-Means-Clustern

```
%Skript erstellt am 10.02.06 von cb
%
%Diese Skript fuehrt eine kmeans-Clusteranalyse durch.
%Als Input werden die Daten (X)und die Anzahl der Cluster (
    cutoff)
%verlangt.
%Der Output (J) ist ein Vektor, der jedem Spektrum ein Cluster
%zuweist.
function [J]=cbclusterk(X,cutoff)
J=[]; %T1=[]; T2=[];
J=kmeans(X,cutoff);
```

## C IGOR-Prozeduren

Die folgenden Prozeduren beschreiben die Bearbeitung gemessener Daten im Auswertungsprogramm IGOR.

Das Macro *Load\_Data\_1* lädt die kraftspektroskopischen Daten ein. Mit dem Macro *MakeMovieTest\_1* wird aus den eingelesenen Daten ein Video erstellt, das die Kraft-Distanz-Kurven jedes gemessenen Punktes zeigt.

### C.1 Einlesen der Daten und Erstellen eines Videos

```
#pragma rtGlobals=1           // Use modern global access
    method.

Macro Start_cb ()
    Load_Data_1 ()
End

Macro Movie_cb ()
    MakeMovieTest_1 ()
End

Macro Movie_cb2 ()
    MakeMovieTest_2 ()
End

Function Load_Data_1 ()
    LoadWave/G/D/W/A/E=1/L={36,42,0,0,0}/N
End

// *****
// Initialize graph for movie
// *****
// Parameters:
//
// *****
// base version: 30.6.05 - 14:00 vd
// *****

Proc Movie() : GraphStyle
    String name, tracex, tracey, retracex, retracexy

    PauseUpdate; Silent 1           // modifying window...
    ModifyGraph width=624,height=369
    // ModifyGraph margin=40
    ModifyGraph margin(left)=50,margin(bottom)=50
EndMacro
```

```

// *****
// Convert waves m -> nm
// dedicated to jpk files
// *****
// Parameters:
//
// *****
// base version: 30.6.05 - 15:30 vd
// *****
Macro Rescale_x_axis()
    Variable i
    String x_wave
    PauseUpdate; Silent 1           // modifying window...

    i = 0
    do
        x_wave = "wave" + num2str(i+2)
        \$x_wave *= 10e9 // 10-9
        i += 5
    While(i < 10239)
End

// *****
// Making a movie out of jpk map.txt-data
// to have a short overview over the force curves
// *****
// Parameters:
//
// *****
// base version: 14.06.05 - 15:30 cb
// modifications: 15.06.05 - 11:00 cb
//                  30.06.05 - 09:30 cb
// *****
Function MakeMovieTest_1()
    String name, tracex, tracey, retracex, retracey
    Variable i, j
    //variable screenRes = 72/ScreenResolution
    Display/1/b wave1 vs wave0; AppendToGraph/1/b wave6 vs
        wave5
    Execute "Movie()"

    RemoveFromGraph/Z wave1
    RemoveFromGraph/Z wave6

    // NewMovie/Z/I/O/P=home as ""
    NewMovie/Z/O as "D:\Budich\Eigene Dateien\ muell.mov"
    i = 0
    j = 0
    do
        tracex = "wave" + num2str(i)

```

```

    tracey = "wave" +num2str(i+1)
    retracex = "wave" +num2str(i+5)
    retracey = "wave" +num2str(i+6)
    AppendToGraph/1/b $tracey vs $tracex
    AppendToGraph/1/b $retracey vs $retracex
// Execute "Movie()"
// ModifyGraph/Z width=340,height={Aspect,0.7}
// ModifyGraph width=550,height=520
ModifyGraph width=624,height=369
ModifyGraph rgb($retracey)=(0,15872,65280)
ModifyGraph rgb($tracey)=(65280,0,0)
ModifyGraph lsize=3
ModifyGraph grid=1,gridRGB=(0,0,0)
ModifyGraph grid=1,gridRGB=(0,0,0)
// ModifyGraph grid=1,nticks=30,minor(bottom)=1,
    gridRGB=(0,0,0)
// ModifyGraph grid=1,nticks=30,minor(left)=1,
    gridRGB=(0,0,0)
// ModifyGraph lsize=2.5
// ModifyGraph width=567,height=475
SetAxis bottom 4.78873e-06,6.71101e-06
// SetAxis/A/N=1 bottom
Label bottom "\\Z12Piezo movement / nm"
SetAxis left -9.81525,15.9902
Label left "\\Z12Displacement / V"
// SetAxis/A/N=1 left

name = num2str(j+1)
TextBox/C/N=text0 /F=2/S=1/D=1.5/A=RB/X=2.31/Y
    =13.27 name
TextBox/C/N=t1 /F=0/S=1/D=1.5/A=RT/X=1.31/Y
    =3.27/G=(65280,0,0) "Approach"
TextBox/C/N=t2 /F=0/S=1/D=1.5/A=RT/X=1.31/Y
    =10.27/G=(0,15872,65280) "Retract"

DoUpdate
AddMovieFrame

RemoveFromGraph/Z \ $tracey ,\ $retracey

i = i + 10
j += 1
while(i<10239) //12287
    CloseMovie
    PlayMovie as "D:\Budich\Eigene Dateien\ muell.mov"
End MakeMovieTest
// Function ButtonProc_9(ctrlName) : ButtonControl
// String ctrlName
// MakeMovieTest()
End

```

```

Function MakeMovieTest_2()
  String name, tracex , tracey , retracex , retracey
  Variable i, j
  //variable screenRes = 72/ScreenResolution
  Display/1/b wave0
  Execute "Movie()"

  RemoveFromGraph/Z wave0

  // NewMovie/Z/I/O/P=home as ""
  NewMovie/Z/O as "D:\Budich\Eigene Dateien\ muell.mov"
  i = 0
  j = 0
  do
    tracey = "wave" + num2str(i)
    AppendToGraph/1/b \$tracey
    // Execute "Movie()"
    //ModifyGraph/Z width=340,height={Aspect,0.7}
    //ModifyGraph width=550,height=520
    ModifyGraph width=624,height=369
    ModifyGraph lsize=3
    ModifyGraph grid=1,gridRGB=(0,0,0)
    ModifyGraph grid=1,gridRGB=(0,0,0)
    SetAxis bottom -224.774,3645.77
    Label bottom "\\Z12Piezo movement / nm"
    SetAxis left -4.77512,4.15891
    Label left "\\Z12Displacement / V"

    name = num2str(j+1)
    TextBox/C/N=text0 /F=2/S=1/D=1.5/A=RB/X=2.31/Y
      =13.27 name

    DoUpdate
    AddMovieFrame

    RemoveFromGraph/Z \$tracey

    i = i + 1
    j += 1
  while(i<1024) //12287
  CloseMovie
  PlayMovie as "D:\Budich\Eigene Dateien\ movie.mov"
End MakeMovieTest

```

## D Eigene Veröffentlichungen

### D.1 Wissenschaftliche Artikel

U. Neugebauer, P. Rösch, M. Schmitt, J. Popp, C. Julien, A. Rasmussen, C. Budich, V. Deckert:

On the way to nanometer-sized information of the bacterial surface by means of tip-enhanced Raman spectroscopy (TERS).

ChemPhysChem, 7, (2006), 1428-1430

Rasmussen, A.; Budich, C.; Deckert, V.:

Tip-enhanced Raman scattering of a DNA binding compound

Proc. of SPIE, Biomedical Vibrational Spectroscopy III: Advances in Research and Industry Progress in Biomedical Optics and Imaging, 7(16), (2006), 60930Z

Bailo, E.; Budich, C.; Deckert, V.:

Molekülspektroskopie auf der Nanometerskala

Nachrichten aus der Chemie, 54, (2006), 999-1002

Budich, C.; Bailo-Mur, E.; Neugebauer, U.; Popp, J.; Deckert, V.:

Nanoscale investigations of cell surfaces

Journal of Microscopy, 229,(2008), 533-539

Budich, C.; Bailo-Mur, E.; Deckert, V.:

Raman-Spektroskopie im optischen Nahfeld

GIT, 11, (2006), 1014-1016

Budich, C.; Lampen, P.; West, J.; Deckert, V.:

Force microscopy analysis using chemometric tools

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 390, (2008), 1253-1260

## D.2 Wissenschaftliche Poster

JPK 4th International Workshop „Scanning Probe Microscopy In Life Sciences“, 2005, Berlin, Deutschland

C. Budich, P. Lampen and V. Deckert:

*Applying Multivariate Data Analysis to Atomic Force Microscopy*

Photonics West, 2006, San Jose, USA,

Akiko Rasmussen, Christian Budich and Volker Deckert:

*Tip-Enhanced Raman Scattering (TERS) of DNA binding molecule*

9th International Conference on Near-field Optics, Nanophotonics & Related Techniques „NFO<sup>-9</sup>“, 2006, Lausanne, Schweiz,

Budich, C; Bailo, E; Neugebauer, U; Popp, J; Deckert, V:

*TERS on living bacteria cells*

ANAKON, 2007, Jena, Deutschland

Christian Budich, Peter Lampen und Volker Deckert:

*Einsatz multivariater Datenanalyse bei der Rasterkraftmikroskopie*

## E Lebenslauf

08/1988-06/1997 06/1997	Beisenkamp-Gymnasium Hamm Allgemeine Hochschulreife
08/1997-03/1999	Universität Bielefeld Lehramtsstudium Sekundarstufe I, Biologie und katholische Theologie
03/1999-08/1999	Ruhr-Universität Bochum Lehramtsstudium Sekundarstufe II, Biologie und katholische Theologie
08/1999-11/2004 11/2004	Ruhr-Universität Bochum Diplomstudiengang Biologie Diplom (gut) am Institut für Biophysik, Ruhr-Universität Bochum unter PD Dr. Jürgen Schlitter, Thema der Diplom- arbeit: "Dynamische Optimierung von GPCR-Modellen"
10/2004-02/2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Biophysik, Ruhr-Universität Bochum
seit 02/2005	Promotionsarbeit am ISAS - Institute for Analytical Sciences, Dortmund unter PD Dr. Volker Deckert und der Fakultät für Chemie der Technischen Universität Dortmund