

Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen
an nativen biologischen Membranen
und Sucroseporin als Beispiel
eines rekonstituierten Membranproteins

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
am Fachbereich Biologie der Universität Konstanz

vorgelegt von

Ulrich Michael Weiland

Konstanz 2001

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Juli 2001

Referent: Prof. Dr. Hans-Jürgen Apell

Referent: Prof. Dr. Wolfram Welte

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	5
GRUNDLAGEN UND METHODEN	7
1 RASTERKRAFTMIKROSKOPIE	7
1.1 GRUNDLAGEN	7
1.1.1 MESSPRINZIP	7
1.1.2 KRAFTSENSOREN UND DETEKTION	7
1.1.3 SENSORGEOMETRIE UND ABBILDUNGSCHARAKTERISTIK	8
1.1.4 WECHSELWIRKUNGEN SENSORSPITZE-OBJEKT	13
1.1.5 SCANNER	16
1.1.6 BETRIEBSMODI	17
1.2 KALIBRATION	18
1.2.1 EICHSTANDARDS FÜR LATERALE KALIBRATION	19
1.2.2 EICHSTANDARDS FÜR AXIALE KALIBRATION	20
1.3 INSTRUMENTE UND VERSUCHSAUFBAUTEN	23
1.3.1 KRAFTMIKROSKOPE UND SENSOREN	23
1.3.2 REDUKTION VON AKUSTISCHEM UND OPTISCHEM RAUSCHEN	29
1.3.3 VISUALISIERUNG DES OBJEKTS	30
1.3.4 MESSUNGEN IN FLÜSSIGKEIT	30
2 SUBSTRATE FÜR SFM AN BIOLOGISCHEN MATERIALIEN	32
2.1 GLIMMER	32
2.2 GLAS	32
2.3 POLYMERSUBSTRATE FÜR BIOLOGISCHE MATERIALIEN	33
2.3.1 SUBSTRATE AUS POLYVINYLPHENYLKETON (PVPK)	33
2.3.2 SUBSTRATE AUS FURAN-POLYMER (FP)	33
3 ZELLKULTUR	37
3.1 GOLDFISCH-OLIGODENDROZYTEN	37
3.2 GOLDFISCH-FIBROBLASTEN	37
3.3 GOLDFISCH-EPITHELIOMZELLEN (EPC)	38

3.4 MAUS-3T3-ZELLEN	38
4 REINIGUNG, REKONSTITUTION UND ZWEIDIMENSIONALE KRISTALLISATION VON SUCROSEPORIN	38
4.1 REINIGUNG	38
4.2 REKONSTITUTION UND 2D-KRISTALLISATION	39
4.3 ELEKTRONENMIKROSKOPIE	41
5 VORBEREITUNG VON PRÄPARATEN FÜR DAS SFM	42
5.1 ZELLEN	42
5.2 ADSORPTION VON PROTEIN AUS LÖSUNG	42
5.2.1 IMMUNOGLOBULIN M	42
5.2.2 COLLAGEN	43
5.3 ADSORPTION VON MEMBRANPRÄPARATIONEN	43
5.3.1 PURPURMEMBRAN	43
5.3.2 MEMBRANFRAGMENTE MIT Na,K-ATPASE	43
5.3.3 REKONSTITUIERTES SUCROSEPORIN	43
6 MESSUNGEN AM SFM	44
6.1 VORBEREITUNG DER FLÜSSIGKEITMESSZELLE	44
6.2 EINBAU DES PRÄPARATS UND ÄQUILIBRIEREN	45
6.3 MESSUNG	45
7 DATENAUFBEREITUNG UND -ANALYSE	47
7.1 ANALYSE DER ROHDATEN UND DATENEXPORT	47
7.2 MITTELUNGSVERFAHREN	48
7.2.1 IMPORT DER ROHDATEN	48
7.2.2 SELEKTION VON EINZELPARTIKELN	49
7.2.2.1 AUTOMATISCHE PARTIKELAUSWAHL	49
7.2.2.2 REFERENZGESTÜTZTE AUTOMATISCHE PARTIKELAUSWAHL	51
7.2.3 AUSRICHTUNG DER PARTIKEL („ALIGNMENT“)	51
7.2.3.1 REFERENZGESTÜTZTE SUCHE UND ALIGNMENT MITTELS TRANSLATIONALER KREUZKORRELATIONSFUNKTION	52
7.2.3.2 REFERENZFREIES ROTATIONALES UND TRANSLATIONALES ALIGNMENT	54

7.2.4 MITTELUNG UND ABSCHÄTZUNG DER AUFLÖSUNG	59
7.2.4.1 MITTELUNG UND STATISTIK	59
7.2.4.2 KRITERIEN FÜR DIE LATERALE AUFLÖSUNG	60
PROJEKTE UND ERGEBNISSE	63
1 ALLGEMEINE EINFÜHRUNG	63
2 SUBSTRATE	66
2.1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	66
2.2 RAUHIGKEIT VERSCHIEDENER SUBSTRATE IM VERGLEICH	67
2.3 POLYMERSUBSTRATE FÜR DIE KULTIVIERUNG UND ABBILDUNG VON ZELLEN	69
2.3.1 TESTS MIT GOLDFISCH-OLIGODENDROZYTEN	69
2.3.2 ABBILDUNG VERSCHIEDENER TYPEN LEBENDER ZELLEN AUF POLYMERSUBSTRATEN	76
2.4 POLYMERSUBSTRATE FÜR DIE ADSORPTION VON PROTEINEN UND MEMBRANPRÄPARATIONEN	81
2.5 DISKUSSION	86
3 SUCROSEPORIN	88
3.1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	88
3.2 REKONSTITUTION VON SUCROSEPORIN MIT LIPIDEN UND ZWEIDIMENSIONALE KRISTALLISATION	91
3.3 ABBILDUNG VON SUCROSEPORIN AM RASTERKRAFTMIKROSKOP	94
3.3.1 ABBILDUNGSBEDINGUNGEN	94
3.3.2 ORIENTIERUNG DES REKONSTITUIERTEN PROTEINS	95
3.3.3 CHARAKTERISIERUNG AMORPH REKONSTITUIERTEN SUCROSEPORINS	101
3.3.4 CHARAKTERISIERUNG DER PERIPLASMATISCHEN SEITE	105
3.3.5 CHARAKTERISIERUNG DER EXTRAZELLULÄREN SEITE	113
3.4 DISKUSSION	126
3.4.1 ABBILDUNG AM SFM	126
3.4.2 REKONSTITUTION	128
3.4.3 BILDVERARBEITUNG	130
3.4.4 AUSBLICK	131

ANHANG	133
1 ABKÜRZUNGEN	133
2 SKRIPTE FÜR SPIDER	134
2.1 DATENIMPORT	134
2.2 AUTOMATISCHE PARTIKELSELEKTION	134
2.3 REFERENZFREIES ALIGNMENT	138
2.4 KORRELATIONSMITTELUNG	141
2.5 AUFLÖSUNG	143
3 MATERIAL- UND CHEMIKALIENLISTE	146
3.1 VERBRAUCHSMATERIAL	146
3.2 CHEMIKALIEN	147
LITERATURVERZEICHNIS	149
DANKSAGUNG	158

Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit ist ein Beitrag zum Einsatz der Rasterkraftmikroskopie bei der Untersuchung biologischer Oberflächen in physiologischer Umgebung. Sie gliedert sich in ein erstes, methodisches sowie ein zweites, anwendungsorientiertes Teilprojekt.

Das erste Teilprojekt beschäftigte sich mit methodischen Aspekten der Immobilisierung *nativer biologischer Membranen*. Es wurden modifizierbare Substrate für die Rasterkraftmikroskopie an biologischen Objekten untersucht, wobei eine mittlere Oberflächenrauigkeit (R_{rms}) von deutlich weniger als 1 nm (bezogen auf eine Fläche von $500 \times 500 \text{ nm}^2$) angestrebt wurde. Die Möglichkeit, ausreichend glatte Oberflächen beliebiger Eigenschaften herzustellen zu können, stellt eine wichtige Voraussetzung dar, um die Rasterkraftmikroskopie für die Untersuchung eines breiten Spektrums biologischer Materialien routinemäßig nutzen zu können. Die möglichst weitgehende Abwesenheit von Material, das zur Verunreinigung der Sensorspitze führt, ist eine weitere wichtige Voraussetzung dafür. Als geeignete Substrate haben sich Polyvinylphenylketon (PVPK) und verschiedene Varianten von Furanpolymeren (FP) erwiesen, die eine R_{rms} von etwa 0,3 nm bzw. 0,15 nm aufweisen.

An die Oberfläche beider Materialien kann beispielsweise das wachstumsfördernde Protein Laminin stabil und mit akzeptabler geringfügiger Erhöhung der Rauigkeit adsorbiert werden. Zellen zeigen auf diesen Substraten normales Wachstumsverhalten, haften stabil darauf während mehrerer SFM-Messungen und ihre natürliche Motilität scheint nicht eingeschränkt zu sein. Auf diese Weise können insbesondere bei filigranen und dünnen Strukturen wie Lamellipodien Details der Membranoberfläche ohne störenden Beitrag der Substrat-Textur aufgelöst werden. Die Eignung insbesondere von PVPK wurde anhand von Primärkulturen aus Fisch-Oligodendrozyten, deren periphere Lamellipodien nur 20 bis 30 nm dick sind, und Fibroblasten sowie Zell-Linien verschiedener Typen (Fisch-Fibroblasten und -Epitheliumzellen, Maus-3T3-Zellen) gezeigt.

Substrate aus Furan-Polymeren (bzw. Modifikationen derselben mit verschiedenen Ko-Monomeren) erwiesen sich als besonders geeignet für die Immobilisierung von Membranpräparationen wie Purpurmembran aus *Halobacterium salinarium* oder Membranfragmenten mit Na,K-ATPase. Es konnte außerdem am Beispiel von Immunoglobulin M gezeigt werden, dass bestimmte Modifikationen dieses Materials auch für die Adsorption von Makromolekülen aus wässriger Lösung und deren Abbildung am SFM geeignet sind.

Die untersuchten Materialien ermöglichen also sowohl eine Funktionalisierung als spezifisches Zellkultursubstrat (PVPK, FP) als auch die Variation von Oberflächenladung, Polarität und chemischer Funktionalisierbarkeit (FP) für die Immobilisierung verschiedener Membran- bzw. Proteinpräparationen.

Insbesondere bei *wohldefinierten, gereinigten Proteinpräparationen* ausreichender mechanischer Stabilität steht mit der Rasterkraftmikroskopie inzwischen eine verlässliche Methode hochauflösender Abbildung zur Verfügung. In einem zweiten Teilprojekt wurde dies genutzt, um Sucroseporin aus der Außenmembran des gram-negativen Bakteriums *Salmonella typhimurium* zu untersuchen. Hierfür wurde gereinigtes Protein mit Lipiden rekonstituiert und zweidimensional kristallisiert. Sowohl die zum extrazellulären Medium als auch die zum Periplasma hin exponierten Oberflächen des Proteins konnten mit submolekularer Auflösung abgebildet werden, mit der Einschränkung, dass die Abbildung der periplasmatischen Seite durch die hohe Flexibilität des N-Terminus erschwert wurde. Die Optimierung der Rekonstitution wurde jedoch so weit vorangetrieben, dass die an den Vesikelfragmenten gemessenen kraftmikroskopischen Daten nach verschiedenen Verfahren der Einzelpartikelmittelung analysiert werden konnten. Anhand der Rohdaten und der gemittelten Daten war es möglich, die Topographie der elektrolytexponierten Oberflächen zu unterscheiden und jeweils Domänen unterschiedlicher Flexibilität zu charakterisieren. Im Fall der periplasmatischen Seite kam es, je nach Auflagekraft, entweder zu einem dominierenden Einfluss des flexiblen N-Terminus auf die Abbildung oder aber zur Abbildung des starren β -Barrel-Trimers, wobei sich der N-Terminus dann nur noch in Form erhöhten Rauschens bemerkbar machte. Dieser Befund steht in Einklang mit bisherigen Annahmen zu den Abmessungen und Eigenschaften der flexibel verankerten N-terminalen Coiled-Coil-Struktur. Bei der Abbildung der extrazellulären Seite konnte der kraftabhängige Beitrag externer Loops an der peripheren Wand des β -Barrels gezeigt werden.

Insgesamt zeigte sich mit Lipiden rekonstituiertes Sucroseporin einer kraftmikroskopischen Untersuchung unter quasi-nativen Bedingungen in wässriger Lösung sehr gut zugänglich, was eine vertiefte Untersuchung mit dieser Methode erfolgversprechend erscheinen lässt. Die bereits erreichte laterale Auflösung der Größenordnung 2 nm dürfte sich nach weiterer Optimierung der Rekonstitution problemlos in den üblichen Subnanometer-Bereich steigern lassen.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in Weiland et al., 1998 (Abstract), Linder et al., 1999, ferner in Giebel et al., 1999.

Grundlagen und Methoden

1 Rasterkraftmikroskopie

1.1 Grundlagen

1.1.1 Messprinzip

Die Verfahren der Rasternahfeldmikroskopie (oder Rastersondenmikroskopie), zu denen auch die Rasterkraftmikroskopie (Binnig et al., 1986) gehört, beruhen auf der Messung lokaler Wechselwirkungen einer Mess-Sonde, die in geringem Abstand über eine Probenoberfläche geführt wird. Charakteristisch ist hierbei, dass die laterale Auflösung nicht durch die Wellenlänge des Austauschteilchens (z. B. Elektron, Photon) limitiert wird, wenn der Abstand Sonde-Objekt wesentlich kleiner als diese Wellenlänge gewählt wird (Messung im Nahfeld). Das Wechselwirkungsprofil und damit die charakteristische Interaktionslänge (Abfalllänge) hängt von der jeweiligen Art der Wechselwirkung ab (z. B. Tunnelstrom bei der Rastertunnelmikroskopie, optische Transmission im Nahfeld und Fluoreszenz einzelner Chromophore bei der optischen Nahfeldmikroskopie). Bei der Kraftmikroskopie spielen Beiträge von verschiedenen Kräften eine Rolle, so z. B. die Pauli-Repulsion, van-der-Waals-Kräfte, elektrostatische Kräfte. Bei der abbildenden (Raster-) Nahfeldmikroskopie wird die Mess-Sonde Zeile für Zeile über die Objektoberfläche geführt. Die Auflösung der Rasternahfeldmikroskopien wird vom jeweiligen Wechselwirkungsprofil, dem Abstand und der Geometrie der Mess-Sonde sowie von der Präzision der Detektionseinheit und der Rasterungseinheit bestimmt.

1.1.2 Kraftsensoren und Detektion

Für die Rasterkraftmikroskopie werden Sensoren verwendet, die aus einem Federbalken bestehen (Cantilever, meist in Form einer einarmigen oder triangelförmigen Blattfeder), an dessen Ende sich eine pyramidenförmige oder konische Sensorspitze befindet. Inzwischen werden überwiegend kommerziell verfügbare Sensoren verwendet, die nach den in der Halbleiterfertigung üblichen Verfahren aus Silizium- oder Siliziumnitrid-Wafern geätzt werden. Für Messungen im Kontaktmodus und auch im oszillierenden Modus (s. 1.1.6) in Flüssigkeit an empfindlichen biologischen Materialien werden meist Siliziumnitridsensoren mit Federkonstanten von $0,01 \frac{N}{m}$ bis $1,0 \frac{N}{m}$ verwendet, für Messungen im oszillierenden Modus an Luft (z. B. auf Festkörperoberflächen) härtere Siliziumsensoren mit Federkonstanten von ca. $20 \frac{N}{m}$ bis $200 \frac{N}{m}$.

Für die Detektion der Sensor-Auslenkung hat sich bei kommerziellen Kraftmikroskopen das Lichtzeigerprinzip durchgesetzt, das auf der Messung eines auf der Rückseite des Federbalkens reflektierten Lichtstrahls mittels einer Photodiode beruht (eine ausführlichere Behandlung ist zu finden in: Colchero in Colton et al., 1998). Handelsübliche Siliziumnitridbalken sind zur Verbesserung der Reflexivität daher auf der Rückseite mit Gold beschichtet. Wird der Balken ausgelenkt, so ändert sich die Richtung des Normalenvektors relativ zum einfallenden Strahl und der reflektierte Strahl bewegt sich auf der Photodiode. Für die Messung dieses Versatzes wird das Differenzsignal zweier Photodiodensegmente aufgezeichnet. Man erreicht mit dieser Methode eine für hochauflösende Messungen ausreichend große geometrische Verstärkung der Auslenkung. Hohe Auflösung ist daneben bei den verwendeten Laserdioden mit einer Leistung der Größenordnung 1 mW dadurch gewährleistet, dass unter diesen Bedingungen das Schrotrauschen des Lasers niedriger ist als thermisches Rauschen des Federbalkens und Rauschen aufgrund technischer Störungsquellen. Höhere Laser-Leistungen führen unter Umständen zu erhöhtem thermischen Rauschen. Durch Verwendung einer Viersegment-Photodiode können überdies auch die Torsion des Federbalkens und damit Lateralkräfte aufgezeichnet werden.

Die Amplitude thermischen Rauschens der Sensoreinheit als prinzipielle Begrenzung der Messgenauigkeit beträgt beispielsweise für einen Sensorbalken der Federkonstanten $0,1 \frac{N}{m}$ unter typischen Bedingungen in Luft 16 pm, für den aufliegenden Balken 3 pm (Colchero, 1993; s. auch Butt und Jaschke, 1995). Bei Messung in Flüssigkeit und mit etwas weicheren Balken kommt man jedoch leicht zu Werten der Größenordnung 100 pm für den aufliegenden Balken. In Flüssigkeit ist die Resonanzgüte des Balkens bedeutend geringer (das Rauschen verteilt sich auf ein breiteres Frequenzband), außerdem ist die Resonanzfrequenz niedriger (Butt et al., 1993).

1.1.3 Sensorgeometrie und Abbildungscharakteristik

Da die Sensorspitze eine endliche Größe besitzt und die Messung im Nahfeld stattfindet, ist die Wechselwirkungslänge und damit der Abstand Sensor-Objekt klein gegen die Abmessungen der Spitze. Damit ist die Geometrie der Sensorspitze von entscheidender Bedeutung für die Übertragungscharakteristik des Abbildungsprozesses. Die Abbildung ist, vereinfacht ausgedrückt, eine Faltung der mit der Spitze erreichbaren Bereiche der Objekt-oberfläche und der Oberfläche der Spitze, wenn man elastische Eigenschaften mancher Objekte, lokal unterschiedliche Oberflächenladungsdichten etc. vernachlässigt. Ein einfaches geometrisches Modell der rastersondenmikroskopischen Abbildung macht qualitativ deutlich, dass es sich um einen nichtlinearen Prozess handelt: eine Protrusion erscheint im Bild breiter, eine Vertiefung schmaler als das tatsächliche Objekt (Abb. 1 A). Die Höhen der Korrugationen werden in diesem Fall dagegen richtig wiedergegeben. In Abb. 1 B erscheint außerdem die kleine Kugel neben der großen überhaupt nicht im Bild, da sie

vom Sensor nicht erreicht wird, sie wird aber sehr wohl abgebildet, wenn sie nicht „im Schatten“ der großen liegt. Rücken Oberflächenstrukturen enger zusammen, wird nicht die tatsächliche Korrugation gemessen, vielmehr gehen hier neben der Abmessung (r) der Oberflächenstruktur sowohl der Spitzenradius R als auch der Abstand D der einzelnen Strukturen zueinander in die Modulation der vertikalen Sensorposition ein (Abb. 1 C). Für den Fall dichter Packung ($D = 2r$, Abb. 1 D) gibt Engel (1991) für einen solchen „Kristall“ (Raumfrequenz $\nu = \frac{1}{D}$) eine einfache Abschätzung bezüglich des Spitzenradius: Unter der Annahme, dass das Mikroskop nur Korrugationen $h \geq 0,01$ nm auflösen kann und $2r = 0,5$ nm ist, so muss der Spitzenradius R kleiner als 3 nm sein, um das Gitter auflösen zu können. (Zur lateralen Auflösung s. auch Rohrer in Behm et al. eds., 1990).

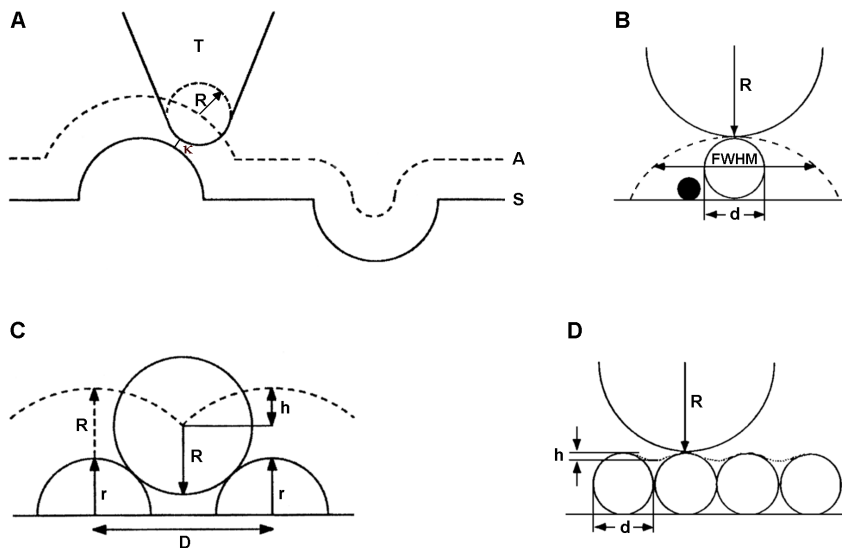


Abbildung 1: Auswirkungen der Geometrie der Sensorspitze und der Wechselwirkungslänge auf die Abbildung (sphärische Approximation von Sensorgeometrie und Oberflächenkorrugationen). **A:** Mit einem Sensor T des Spitzenradius R erhaltene apparente Topographie A (gestrichelt) der Oberfläche S. κ : Wechselwirkungslänge. **B:** Apparente Topographie eines sphärischen Objekts des Durchmessers d , apparenter Durchmesser auf halbmaximaler Höhe: $FWHM = 2\sqrt{Rd + \frac{d^2}{4}}$. Die Höhe des großen Objekts wird richtig wiedergegeben, das kleinere Objekt wird allerdings überhaupt nicht abgebildet. **C:** Apparente Topographie bzw. gemessene Korrugation h von Objekten des Radius r , die im Abstand D zueinander angeordnet sind, $h \leq r + R - \sqrt{(r + R)^2 - \frac{D^2}{4}}$. **D:** Spezialfall dichter Packung der Objekte, $D = 2r$: apparente Korrugation $h \leq \frac{D^2}{8R}$ ($R \gg D$). A, C aus Stemmer und Engel (1990); B, D aus Engel et al. (1997).

Die im obigen Modell verwendete sphärische Approximation der Sensorspitze (R fest) ist nur bei entsprechend kleinen Korrugationen sinnvoll (Größenordnung kleiner R), der Wirklichkeit kommt eine sphärisch-konische oder paraboloidale Form näher. Dies wird bei größeren Korrugationen relevant, wo der „effektive Radius“ mit der Höhe der abzubildenden Stufen wächst. Die Charakterisierung von individuellen Sensorspitzen muss sich daher an den Dimensionen der abzubildenden

Oberflächeneigenschaften orientieren. Abb. 2 A zeigt eine atomar aufgelöste Abbildung der Oberfläche des Schichtkristalls ReSe_2 (s. auch unter 1.2 Kalibration). Atomare Auflösung (Binnig et al., 1987; Marti et al., 1987; Giessibl et al., 2000) beruht auf einer Nahfeld-Wechselwirkung eines oder weniger Atome an der Spitze des Sensors mit den jeweiligen Atomen des Kristallgitters. Die bisweilen zu beobachtende scheinbare Variabilität atomar abgebildeter Kristallstrukturen kann neben Verzerrungen durch Drifteffekte auch die Ursache haben, dass „Mehrfachspitzen“ aus einer unterschiedlichen Anzahl von Atomen zu vielfältigen Überlagerungen der Elementarzellenstruktur führen können (Abraham u. Batra, 1989, Gould et al., 1989, zit. nach Marti und Amrein, 1993).

Mit der selben Spitze (Olympus OMCL-RC800, $k = 0,09 \text{ N/m}$) wurde anschließend an Messung Abb. 2 ein Eichstandard abgebildet, der speziell für die Charakterisierung von Kraftmikroskopspitzen konzipiert ist. Abb. 3 A, B zeigt das gemessene Bild des Standards TGT01 (Silicon-MDT, Moskau) und ein Linienprofil daraus. Zum Vergleich ist darunter (Abb. 3 C) ein entsprechendes Linienprofil der tatsächlichen Topographie gezeigt, das anhand der wirklichen Abmessungen des Standards sowie der lokalen Maxima des gemessenen Profils mit der Software *Deconvo* (Silicon-MDT, Moskau) erzeugt wurde. Da die 600 - 800 nm hohen konischen Spitzen des Standards vergleichsweise schärfer (Öffnungswinkel weniger als 20°) und rotationssymmetrisch sind, kommt es damit praktisch - entgegen der Konvention - zu einer Abbildung der vordersten 600 - 800 nm der pyramidalen Sensorspitze, deren Winkel aufgrund des Schärfungsprozesses etwas kleiner ist als der nominale Pyramidenwinkel von 70° . Nur im unmittelbaren Apexbereich ist mit einem deutlichen Effekt der Faltung von Sensorspitze und Standard zu rechnen, da die Spitzenradien von vergleichbarer Größenordnung sind (nominaler Spitzenradius Eichstandard: $R < 10 \text{ nm}$, Sensorspitze: $R < 20 \text{ nm}$, Herstellerangaben). Durch Deconvolution lässt sich hier die Spitzenform rekonstruieren (Abb. 3 D, erzeugt mit der Software *Deconvo*). Man erhält für die Abbildung von Strukturen dieser Dimension relevante Spitzenradien von $R_1 = 28 \text{ nm}$, $R_2 = 41 \text{ nm}$ (minimaler und maximaler Krümmungsradius der ellipsoidalen Oberfläche nahe der Spitze). Diese Abschätzung der Spitzengeometrie beruht auf einer Behandlung der Interaktion Spitze-Oberfläche als einfache geometrische Exklusion nach Villarrubia (1997). Die entsprechenden morphologischen Algorithmen bestehen aus einer Reihe iterativer Rechnungen anhand eines rastersondenmikroskopisch aufgenommenen Bildes. Die Methode basiert auf einer Bestimmung der Beschränkungen, die sich aus den Korrugationen eines gegebenen Bildes ergeben, womit eine Berechnung der wahrscheinlichsten Form der Spitze erfolgt (natürlich auf die maximale Höhe der im Bild enthaltenen Korrugationen beschränkt). Das Ergebnis ist eine Abschätzung der Form der stumpfsten Spitze, mit der das gemessene Bild aufgenommen werden kann. Enthält die gerasterte Oberfläche „schärfere“ Strukturen als die Spitze, ist das Resultat relativ verlässlich. Der Vorteil gegenüber anderen Methoden, z. B. elektronenmikroskopischer Abbildung der Spitze nach Gebrauch, besteht in der Abschätzung der Spitzenform, wie sie während der jeweiligen Abbildung bestand (ein Ver-

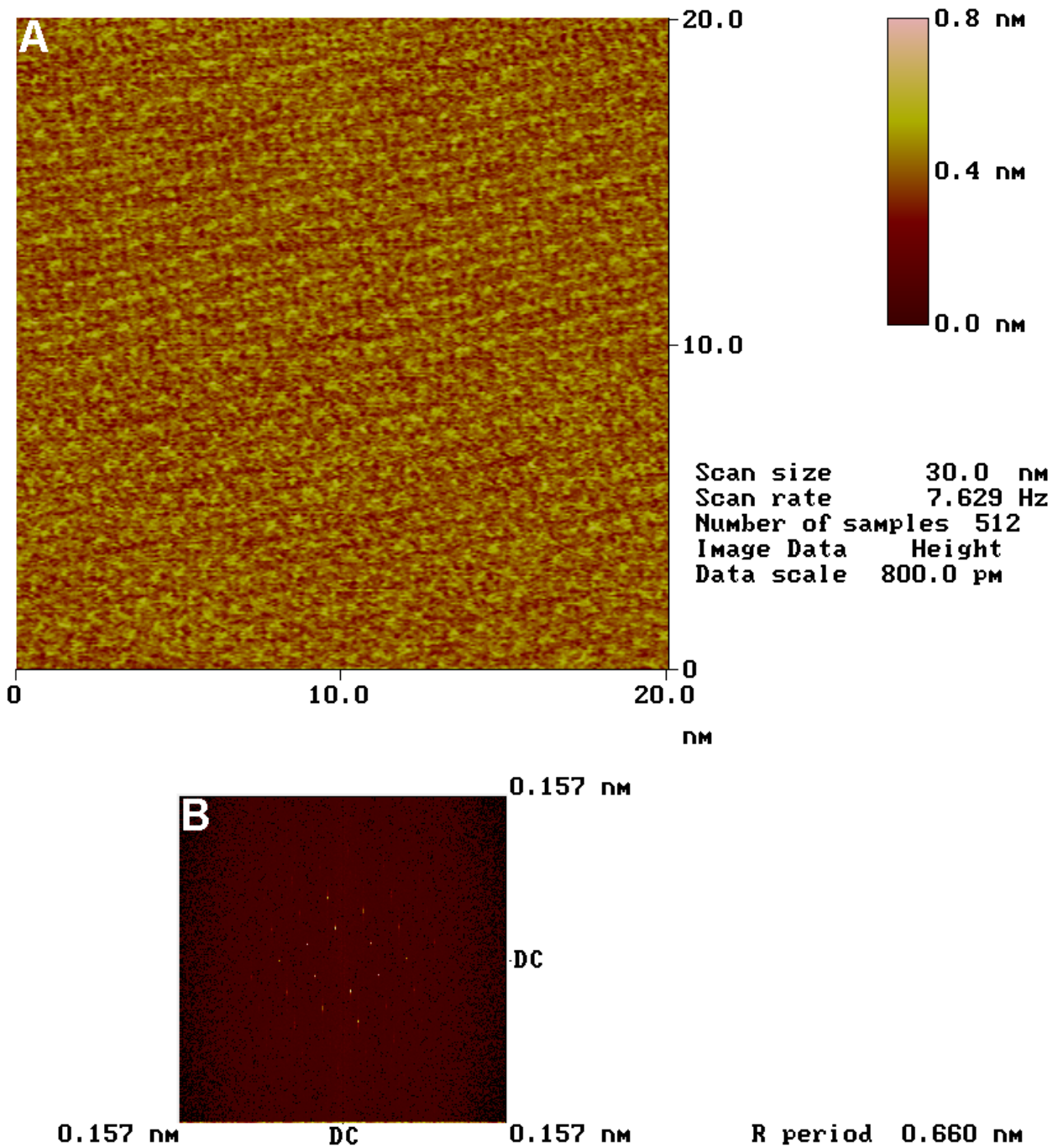


Abbildung 2: Rheniumdiselenid (ReSe_2), **A**: atomar aufgelöste Aufnahme (Ausschnitt) in 100 mM KCl. **B**: FFT-Spektrum: ein Paar von Reflexen 1. Ordnung (Vorzugsrichtung mit nur kleinem Winkel zur Rasterungsrichtung) liegt bei $(6, 6 \text{ \AA})^{-1}$, also im Bereich der Gitterkonstanten der Chalkogenatome der (0001)-Oberfläche ($a = 6,72 \text{ \AA}$; $b = 6,60 \text{ \AA}$). In der anderen Vorzugsrichtung ist die Abweichung aufgrund Piezodrift bedeutend größer (Werte über $7,5 \text{ \AA}$).

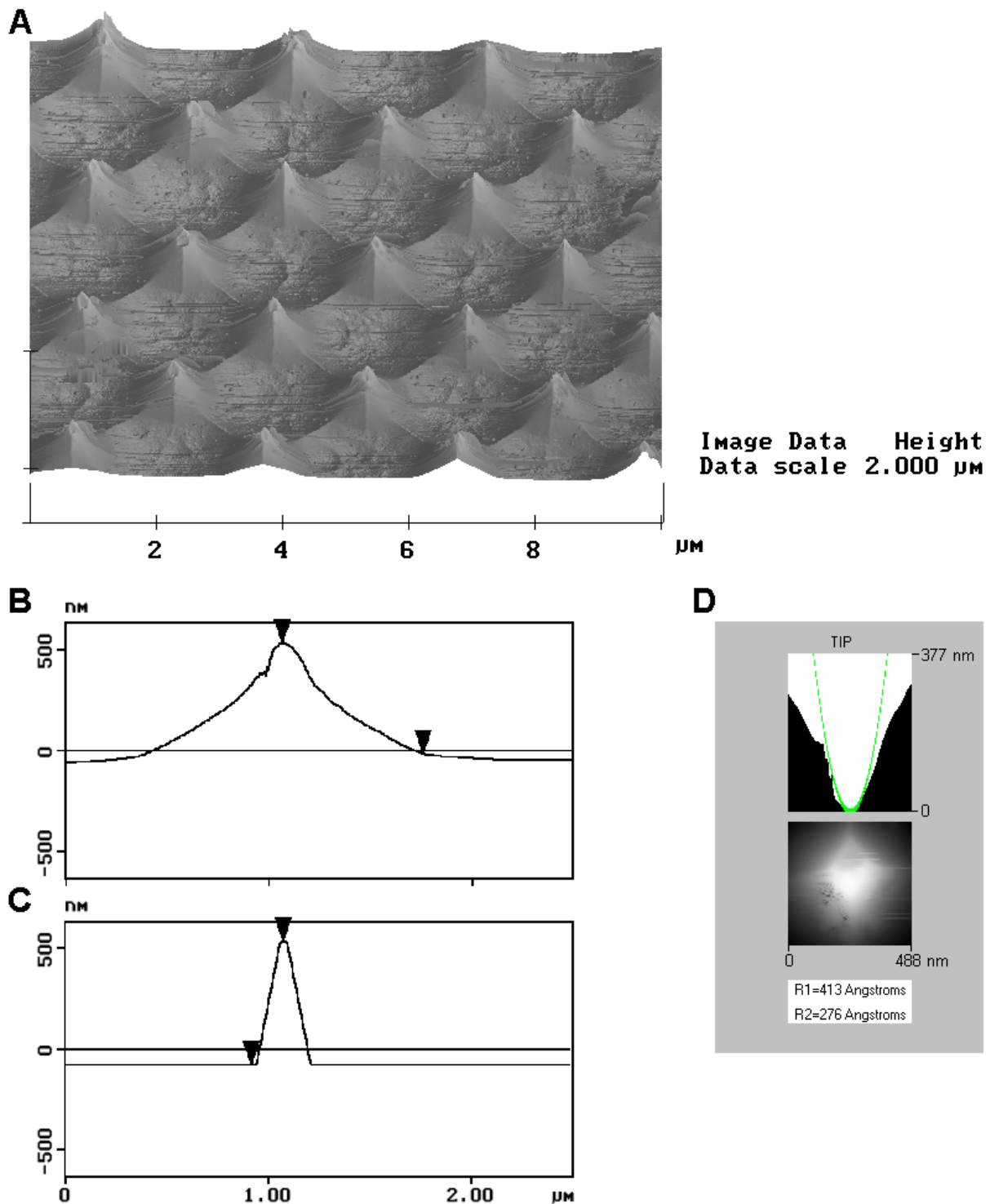


Abbildung 3: **A:** Bild eines Silizium-Standardes für die Spitzencharakterisierung (TGT01, Silicon-MDT, Moskau), **B:** Linienprofil einer Zoomaufnahme. **C:** Linienprofil der tatsächlichen Topographie, **D:** Rekonstruktion der vordersten 377 nm der Spitze durch Deconvolution; oben: Längsschnitt mit paraboloidem Fit für die Bestimmung des Spitzenradius (Fit gestrichelt), unten: Topographiebild. Partielle blinde Rekonstruktion nach Villarrubia, 1997, berechnet mit der Software *Deconv* (Silicon-MDT). Der angewandte *partielle* Algorithmus verwendet nur einen Teil der Bilddaten, nämlich die Bereiche lokaler Maxima, da hierin bei dem verwendeten Eichstandard die meiste Information über die Spitze enthalten ist.

gleich der beiden Methoden wird in Dongmo et al., 2000, gegeben). Es ist also nicht unbedingt notwendig, wie hier geschehen, eine vorherige oder nachträgliche Charakterisierung der Spitze anhand eines speziellen Standards vorzunehmen, das jeweilige Bild kann als unbekannter Standard zur Spitzencharakterisierung dienen. Ein Problem der Algorithmen „blinder Rekonstruktion“ stellt allerdings die Anfälligkeit gegenüber den Einflüssen elektronischen und mechanischen Rauschens während der Aufnahme dar: die davon herrührenden scharfen Spikes können zu einer völlig falschen Einschätzung des Sensorradius führen (da die Abbildung „scharfer“ Korugationen eine entsprechend scharfe Spitze impliziert), die sich im Lauf der Iterationen fortpflanzt. Die Wahl eines in die Berechnung eingehenden Schwellenwerts ist daher kritisch.

Das Beispiel in Abb. 2 und 3 zeigt die unterschiedlichen Aspekte der Geometrie ein und derselben Sensorspitze, die für die Abbildung von Strukturen verschiedener Größenordnungen relevant sind: eine pyramidale Spitze der Höhe $2,8 \mu\text{m}$ mit relativ stumpfem Pyramidenwinkel für Korugationen von mehreren 100 nm bis in den μm -Bereich, ein durch das Oxidschärfungsverfahren erhaltener schärferer Apex mit Krümmungsradius von ca. 20 bis 40 nm für Korugationen dieser Größenordnung und eine „Spitze“ atomarer Abmessungen für die Auflösung im Angström-Bereich.

Für den Bereich makromolekularer bis molekularer Größenordnung wurde eine Abschätzung des Spitzenradius sowohl anhand eines einfachen geometrischen Modells (kugelförmige Spitze auf konischer Basis) als auch mittels „blinder Rekonstruktion“ nach Villarrubia (1997) von Sheng et al. (1999) vorgenommen: Die Autoren fanden, dass manche Spitzen, mit denen F-Actin-Filamente gut aufgelöst wurden, einen Spitzeradius von ca. 1 nm und einen Konuswinkel von 30° bis 40° aufweisen müssen. Dies gilt für den Bereich der „vordersten“ ca. 5 nm bis 10 nm (entsprechend dem Durchmesser der gemessenen Filamente von ca. 7 nm. Damit zeigt sich, dass auf handelsüblichen Si_3N_4 -Spitzen, für die globale Krümmungsradien von meist über 10 nm angegeben werden, bisweilen Protrusionen bzw. Kontaminationen aufsitzen müssen, die beträchtlich „schärfer“ sind.

1.1.4 Wechselwirkungen Sensorspitze-Objekt

Da in dieser Arbeit alle Messungen in Flüssigkeit durchgeführt wurden, konzentriert sich die folgende Darstellung auf diese Bedingung. Die bei Messungen an Luft relevanten Kapillarkräfte des sich zwischen Spitze und Unterlage bildenden Flüssigkeitsmeniskus (Adsorbatfilme auf den Oberflächen) müssen also nicht berücksichtigt werden (Weisenhorn et al., 1989; Apell et al., 1993). In wässriger Lösung sind relevante Wechselwirkungen zum einen die im Wesentlichen attraktive van-der-Waals-Kraft

$$F_{vdW} = \frac{H R}{6z^2}$$

(hier formuliert für die Wechselwirkung einer kugelförmigen Sensorspitze des Radius R mit einer ebenen Fläche; z : Abstand Spitze-Fläche, H : Hamaker-Konstante, abhängig von den dielektrischen Eigenschaften der interagierenden Materialien und des Mediums dazwischen) und zum anderen elektrostatische Wechselwirkungen, die aufgrund der Überlappung der elektrischen Doppelschichten der beiden mit einem Elektrolyt in Kontakt stehenden geladenen Oberflächen entstehen:

$$F_{el} = \frac{4\pi R\sigma_1\sigma_2 l_D}{\epsilon\epsilon_0} e^{-\frac{z}{l_D}}$$

(σ_1, σ_2 : Oberflächenladungsdichten, ϵ_0 : elektrische Feldkonstante, ϵ : Dielektrizitätskonstante, Debye-Länge: $l_D = \sqrt{\frac{\epsilon\epsilon_0 kT}{e^2 \sum c_i q_i^2}}$ als Maß für die Dicke der elektrischen Doppelschicht, Ionenstärke: $I = \frac{1}{2} \sum c_i q_i^2$). Die Beschreibung des Zusammenwirkens dieser beiden wichtigsten Oberflächenkräfte ist unter dem Begriff DLVO-Theorie bekannt (Derjaguin und Landau, 1941; Verwey und Overbeek, 1948; Israelachvili, 1992). Sterische und Solvatations-Wechselwirkungen etc., die auf der diskreten Natur der Flüssigkeit beruhen, werden hier vernachlässigt. Oberflächenkräfte spielen etwa in einem Bereich von 0,1 bis 100 nm eine Rolle (Butt et al. 1995). Abhängig von den Oberflächenladungsdichten und deren Polarität sowie der Elektrolytkonzentration ist die resultierende Wechselwirkung repulsiv oder attraktiv. Bei sehr kleinen Abständen wird diese (DLVO-) Kraft attraktiv, da die van-der-Waals-Kraft proportional zu $\frac{1}{z}$ bis $\frac{1}{z^2}$ fällt, während die elektrostatische Kraft etwa exponentiell abfällt, und sofern man die unterhalb von etwa 2 nm im Prinzip zu berücksichtigende repulsive Hydratationskraft vernachlässigen kann (Butt, 1991a). Bei weiterer Annäherung der Oberflächen kommt es schließlich zu einer starken, repulsiven Kraft aufgrund der Überlappung der Elektronenorbitale von Atomen des Sensors und des Objekts (Pauli-Abstoßung). Durch den pH des Elektrolyten kann in vielen Fällen (z. B. bei Proteinen) die Oberflächenladungsdichte sowie deren Polarität beeinflusst werden. Die Wahl der Elektrolytkonzentration bestimmt, wie obige Beziehung zeigt, die Debye-Länge, also die Dicke der elektrischen Doppelschicht (Butt, 1991b&1992). Sensorspitzen aus Siliziumnitrid besitzen unterhalb von etwa pH 6 eine positive Oberflächenladung und sind oberhalb davon negativ geladen, die Ladungsdichte ist abhängig vom pH (Butt, 1992; Lin et al., 1993).

Wie im vorhergehenden Abschnitt ausgeführt, darf der Abstand der für die Abbildung relevanten Spitze des Sensors aus geometrischen Gründen nicht zu groß werden, um eine Abbildung mit der gewünschten Auflösung zu erreichen. Es muss also beispielsweise bei abstoßender elektrostatischer Wechselwirkung eine bestimmte Federkraft (Auslenkung des Cantilevers) aufgebracht werden, um den Abstand klein zu halten. Wird dadurch (oder durch entgegengesetzte elektrische Polarität) andererseits der Abstand der Sensorspitze zum Objekt zu klein, überwiegen die kurzreichweitigen Wechselwirkungen (wie z. B. die attraktive van-der-Waals-Kraft und die Pauli-Abstoßung), die unter Umständen zu einer Beschädigung des Objekts führen können. Durch Ein-

stellen von pH und Ionenstärke kann man hier für die notwendige Balance sorgen, wie Müller et al. (1999) unter der Annahme einer kleinen Protrusion auf einer stumpfen globalen Spitze vorgeführt haben: die Bedingungen (pH, Salzkonzentration, Auflagekraft) sind so zu wählen, dass durch die längerreichweitige elektrostatische Abstoßung der globalen Spitze (Wechselwirkung mit einer größeren Fläche) der Abstand der für die Abbildung relevanten Protrusion des Sensors zum Objekt (WW mit einzelnen Molekülen) einerseits groß genug bleibt, um zerstörungsfreie Abbildung zu gewährleisten, andererseits klein genug zur Sicherstellung hoher Auflösung ist. Das Optimum für zerstörungsfreie Abbildung wurde für realistische Randbedingungen auf die Größenordnung 1 nm geschätzt (Müller et al., 1999). Die effektive Kraft an der Sensorspitze kann bei ausreichender Kompensation der attraktiven van-der-Waals-Kraft und der durch den ausgelenkten Federbalken ausgeübten Auflagekraft durch eine repulsive elektrostatische Kraft der globalen Spitze dabei unter den Wert der Auflagekraft gebracht werden. Unter ungünstigeren Umständen kann die effektive Kraft aber auch deutlich größer als die Auflagekraft sein. Dies zeigt auch, dass die bloße Kenntnis der Auflagekraft (aus Cantilever-Auslenkung und Federkonstante) noch keine Aussage darüber erlaubt, wie groß die tatsächlichen Wechselwirkungen sind. Das beschriebene Modell vernachlässigt außerdem ja etliche Arten relevanter Wechselwirkungen (Butt, 1995). Ein weiteres Problem besteht darin, dass pH und Elektrolyt bei empfindlichen biologischen Materialien nicht beliebig variierbar sind, also die gewünschte Polarität und Ladungsdichte nicht völlig frei wählbar sind. Grundbedingung bei der Untersuchung biologischer Moleküle ist ja oft die Einhaltung nativer Bedingungen. Dies ist natürlich insbesondere bei unter „Normalbedingungen“ positiv geladenen Materialien ein Problem (wenn man von negativ geladenen Siliziumnitrid-Sensorspitzen ausgeht).

Praktisch erfolgt die Kontrolle der relevanten Abbildungsbedingungen über die Messung von Kraftdistanzkurven. Da jede Sensorspitze eine individuelle Geometrie und Ladungsdichte aufweist, ganz abgesehen von der Variabilität bei biologischen Präparaten, empfiehlt es sich, diese Kontrolle vor jeder Messung durchzuführen und ggf. den Messpuffer anzupassen. Die Auflagekraft bei der Messung (Sollwert der Federbalkenauslenkung) wird meist so eingestellt, dass mit minimaler Kraft gerade noch optimaler Kontrast erhalten wird.

Bei Kraftmessungen ist zu beachten dass die experimentell bestimmten Kraftdistanzkurven die Auslenkung des Cantilevers in Abhängigkeit vom Abstand des Objekts zur starren Basis des Cantileves angeben (Bewegung des Piezos-Scanners in z-Richtung). Es ist nicht möglich, direkt den Abstand Spitze-Objekt experimentell vorzugeben, entsprechende Kraftabstandskurven können aber aus den gemessenen Kurven berechnet werden (Apell et al., 1993; Butt, 1995). Zur Diskussion der Stabilitätsbedingungen für die Wechselwirkung von Sensorspitze und Objekt (inkl. Diskontinuitäten und Hysterese-Effekte der Kraftabstandskurven) siehe auch Apell et al. (1993).

1.1.5 Scanner

Die Kontrolle der relativen Position von Sensor und Objekt geschieht mit Hilfe von piezoelektrischen Aktuatoren, die eine sehr hohe (subatomare) Präzision bieten (ausführlichere Darstellung: Amrein in Colton et al., 1998). Entweder wird der Sensor in der Ebene des Präparates bewegt und gleichzeitig dessen vertikale Position zum Präparat kontrolliert oder aber das Präparat wird auf einem Aktuator montiert und relativ zum Sensor bewegt. Die Aktuatoren beruhen auf dem Prinzip des inversen piezoelektrischen Effekts und werden daher durch Anlegen einer Spannung betrieben. Sie sind aus Piezoelementen aufgebaut, die meist aus einem speziellen keramischen Material, beispielsweise Blei-Zirkonat-Titanat, bestehen. Die Abhängigkeit der Verformung von der angelegten Spannung ist nicht exakt linear und folgt außerdem einer Hysteresekurve. Hinzu kommt, dass die Verformung eine charakteristische Zeitabhängigkeit zeigt. Eine plötzliche Spannungsänderung führt in einem gewissen Ausmaß zu einer schnellen Verformung, danach erreicht das Piezoelement nach einer annähernd logarithmischen Beziehung langsam seine endgültige Position, was sich als „Kriechen“ bemerkbar macht.

Bei der Nutzung der spannungsabhängigen Verformung von Piezoelementen für die Positionskontrolle in allen drei Raumrichtungen sind folgende Aufbauprinzipien gebräuchlich: Entweder ein Aufbau nach dem Dreibein-Prinzip (für jede Raumrichtung ein Piezoelement bzw. ein „Stack“ hintereinander angeordneter Elemente) oder aber ein Aufbau aus röhrenförmigen Piezos (siehe Abb. 9 D). Die Röhrenpiezos sind radial polarisiert und innen und außen jeweils mit einem Elektrodenmaterial beschichtet. Bei dem in x- und y-Richtung rasternden Modul ist die äußere Elektroden-schicht vierfach segmentiert und damit ist dieses in zwei Richtungen anzusteuern. Die Bewegung in z-Richtung wird entweder durch eine zusätzlich an allen vier Segmenten angelegte Spannung oder aber durch ein separates unsegmentiertes Modul erreicht. Bei der zeilenweise rasternden Bewegung des Scanners (abbildende Messung mit dem SPM) ist eine schnelle Rasterungsrichtung (x, Zeilenrichtung) und eine langsame Rasterungsrichtung (y, senkrecht dazu) zu unterscheiden. Die mechanische Resonanzfrequenz des Piezo-Aktuators setzt der Rasterungsgeschwindigkeit eine prinzipielle Obergrenze, da in der Nähe der Resonanzfrequenz die Beziehung zwischen angelegter Spannung und Verformung nicht mehr gilt. In der Praxis der Rasterkraftmikroskopie sind für die Rasterungsgeschwindigkeit allerdings Parameter des Federbalkens (Federkonstante und effektive Masse), des ihn umgebenden Mediums (Dämpfung) und des Objekts (Elastizität) begrenzend (Butt et al., 1993).

1.1.6 Betriebsmodi

Bei dauerhaftem Kontakt der Sensorspitze mit dem Präparat (Kontaktmodus) sind zwei Betriebsmodi zu unterscheiden. Bei dem einen wird die Auslenkung des Federbalkens und damit die Auflagekraft durch Nachregeln des Abstands zwischen dem Präparat und der Balkenaufhängung konstant gehalten (constant force - Modus), was die Möglichkeit der Begrenzung der Belastung empfindlicher Präparate bietet. Ein Schema der Regelung des Piezohubs im Kontaktmodus mittels eines digital implementierten Regelkreises ist in Abschnitt 1.3.1 (Abb. 8) dargestellt. Die Information über die Topographie ist bei guter Regelung überwiegend in dem Steuerungssignal für den axialen Piezohub enthalten. Bei sehr unempfindlich eingestelltem Regelkreis bleibt dagegen der Abstand Balkenaufhängung-Präparat nahezu konstant (constant height - Modus), womit fast die gesamte Information über die Topographie im Sensorsignal enthalten ist. Dabei kommt es aber unter Umständen zu erheblichen Auslenkungen und damit zu Schwankungen in der Auflagekraft. In dieser Arbeit wurde überwiegend der Kontaktmodus bei konstanter Auflagekraft angewendet.

Beim oszillierenden Modus (Non Contact Mode an Luft, Intermittent Contact Mode/„Tapping Mode“ an Luft und in Flüssigkeit) wird der Federbalken mechanisch angeregt, so dass er relativ zum Objekt oszilliert, die Regelung erfolgt auf konstante Phasenverschiebung oder konstante Amplitudendämpfung. Dem Vorteil einer weitgehenden Abwesenheit von Lateralkräften beim oszillierenden Modus stehen Höhenanomalien durch Adhäsionseffekte in Luft (van Noort et al., 1997) entgegen, bei Arbeiten in Flüssigkeit verbleibt zumindest das Problem der Nichtlinearität der Scanner bei höheren Anregungsfrequenzen (im Fall der Anregung über den Präparatescanner), was insbesondere bei großem z-Arbeitsbereich (Zellen) zu falschen Höheninformationen führt (Hansma et al., 1994; Schabert und Rabe, 1996). Letzteres kann allerdings durch Verwendung eines separaten Anregungsmoduls überwunden werden (Schabert und Rabe, 1996). Außerdem ist mit dem Tapping Mode unter Umständen, abhängig von der Frequenz und der Amplitudendämpfung, ein beträchtlicher Energieeintrag in das Präparat verbunden. Eine Minimierung desselben hat bei den Vorversuchen zu dieser Arbeit auf Zellen eine Tendenz zur Kontrastumkehr ergeben (Adhäsionseffekte bei lediglich schwacher Amplitudendämpfung). Als nützlich bei der Abbildung von Zellen hat sich allerdings eine Ausnutzung der viskoelastischen Eigenschaften biologischer Objekte erwiesen (Objekte sind bei höheren Frequenzen „härter“, Putman et al., 1994). Bei hochauflösender Messung an (rekonstituierten) Proteinen ist eine Anwendung des oszillierenden Modus ohne Vorhandensein einer speziellen Fragestellung bzw. Notwendigkeit (z. B. Minimierung der Lateralkraft bei sehr flexiblen Objekten oder bei schwacher Immobilisierung) wegen der generell geringeren lateralen Auflösung nicht empfehlenswert. Allerdings sind hier noch Fortschritte zu erwarten (Möller et al., 1999), auch aufgrund neuer apparativer Entwicklungen wie etwa einer magnetischen Anregung der Federbalken-Oszillation (Schindler et al., 2000).

1.2 Kalibration

Die Kalibration des Rasterkraftmikroskops umfasst die Messung von geeigneten Eichstandards und damit die Einstellung der Werte für die Empfindlichkeit des Scanners (x-, y-, z-Empfindlichkeit in nm/V) sowie die Bestimmung diverser Parameter für die Korrektur von Nichtlinearitäten etc. (1.1.5). Zur Bestimmung der Parameter für die laterale Kalibration steht eine automatische Prozedur in der Betriebssoftware des SFM zur Verfügung. Empfindlichkeit und Linearisierungsparameter für die axiale Kalibration werden aus der bei unterschiedlichen Ausgangspositionen (Spannungen) des z-Piezos gemessenen Stufenhöhe eines Standards bestimmt. Eine Kalibration sollte in regelmäßigen Abständen erfolgen, da sich die Empfindlichkeit der Piezo-Scanner im Laufe der Zeit ändert.

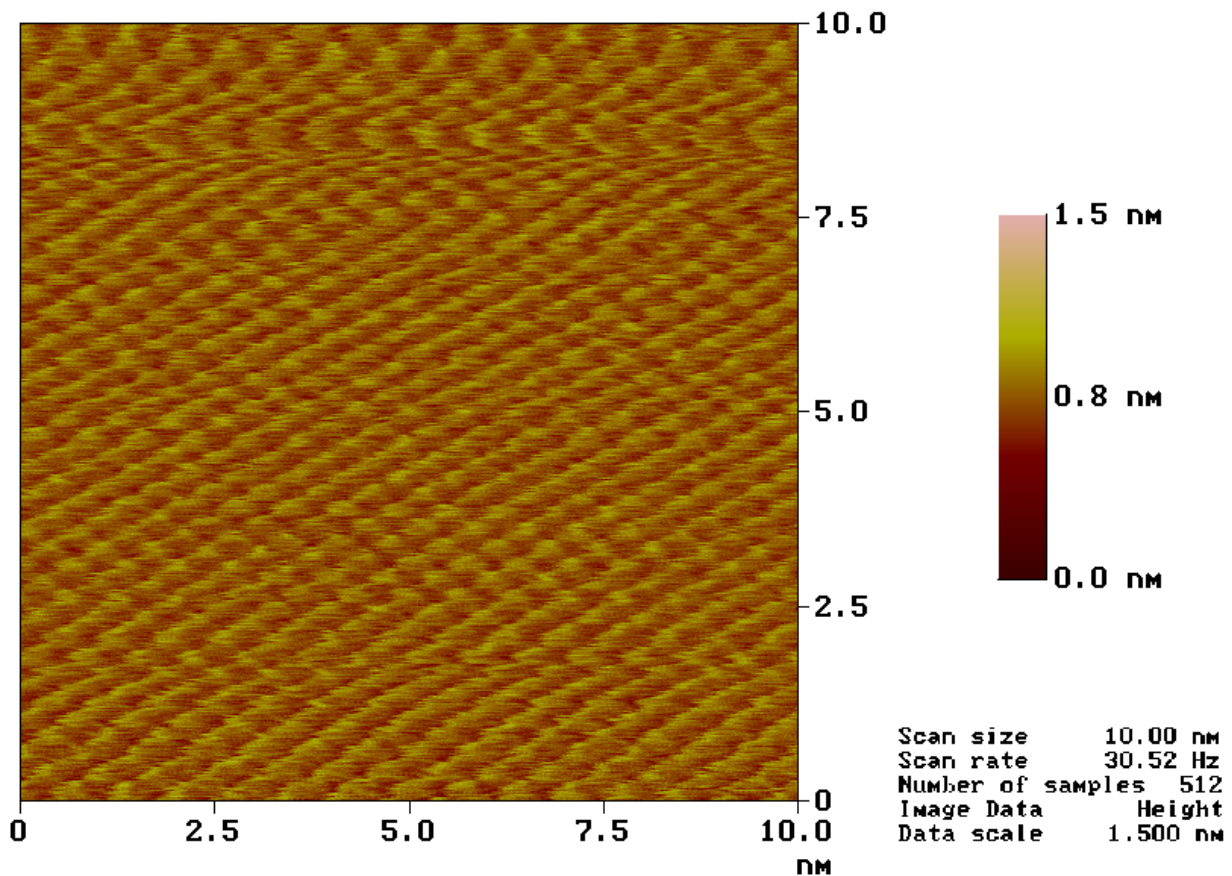


Abbildung 4: Wolframdiselenid (WSe_2), atomar aufgelöste Aufnahme in 100 mM KCl (auch nach Stunden waren in Übersichtsaufnahmen keine Anzeichen von Korrosion zu erkennen). Periodizitäten liegen nach FFT-Spektrum bei $3,4 \text{ \AA}$ und $3,75 \text{ \AA}$ (Gitterwert lt. Literatur: $a = 3,29 \text{ \AA}$). Auch bei einer Zeilenfrequenz von 30 Hz (10 nm Zeilenlänge) machen sich noch Drifteffekte bemerkbar, wie hier gut an den Verzerrungen des abgebildeten Gitters zu erkennen ist.

1.2.1 Eichstandards für laterale Kalibration

Periodische Teststrukturen sind hier besonders geeignet, da sie auch eine Kontrolle von lateralen Verzerrungen der Abbildung aufgrund der Nichtlinearität bzw. Hysterese des Scanners sowie eine Kontrolle der X-Y-Orthogonalität der Rasterung erlauben. Die SFM-Hersteller (TopoMetrix, Digital Instruments) stellen *mikrostrukturierte Halbleiterstandards* zur Verfügung, die jeweils dem maximalen Arbeitsbereich des Scanners angepasst sind (z. B. 1 μm -Periodizität für 10 μm -Scanner). Außerdem wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Silizium-Eichstandards der Firma Silicon-MDT (Moskau) verwendet (auch für axiale Kalibration). Als weitere Standards wurden kolloidale Monolagen von Polystyrolkugeln (kolloidale Masken) mit einer Periodizität von 800 nm verwendet (Fachbereich Physik, LS Prof. Leiderer, Universität Konstanz).

Für die Kontrolle bzw. Feinjustierung im (Sub)Nanometer-Bereich werden kristalline Strukturen verwendet, z. B. *Schichtminerale wie Glimmer oder Übergangsmetallchalkogenide*. Dies ist insbesondere dann sinnvoll, wenn im Bereich molekularer bzw. submolekularer Auflösung mit einem Scanner gemessen werden soll, dessen maximaler Arbeitsbereich um Größenordnungen darüber liegt und der nur im maximalen Arbeitsbereich vorjustiert wurde. Glimmer (s. 2.1) ist ohnehin als Substrat für SFM-Präparate weit verbreitet und wird auch als Teststruktur für Hochauflösung verwendet. Übergangsmetallchalkogenide MX_2 (z. B. M: Mo, W, Re; X: S, Se, Te) sind ebenfalls schichtartig aufgebaut (Lieth, 1977). Innerhalb der einzelnen Schichten bilden Metallatome starke kovalente Bindungen mit den Chalkogenatomen, zwischen den Schichten wirken nur van-der-Waals-Kräfte. Aus diesem Aufbau resultiert eine gute Spaltbarkeit entlang der van-der-Waals-Lücke. Bei der typischen Molybdänitstruktur (auch bei WSe_2) sind die Metallatome trigonal prismatisch von den Chalkogenatomen umgeben (z. B. Heckl in Colton et al., 1998), bei anderen liegt eine etwas verzerrte Gitterstruktur vor (Metall-Untergitter mit anderer Symmetrie als das Chalkogen-Untergitter, auch bei ReSe_2 und WTe_2). Übergangsmetallchalkogenide können je nach chemischer Zusammensetzung metallische oder halbleitende Eigenschaften aufweisen (Lieth, 1977). Außer zu Kalibrationszwecken finden Übergangsmetallchalkogenide in der Rastersondenmikroskopie auch Verwendung als inertes Substrat unter anderem für dünne organische Filme (Colton et al., 1998).

Übergangsmetallchalkogenide (Quelle: Fachbereich Physik, LS Prof. Leiderer, Uni Konstanz) wurden wie Glimmer (s. 2.1) aufgeklebt und saubere Oberflächen durch Spalten mittels Klebefilm präpariert (hier angegebene Gitterwerte aus Parkinson in Colton et al., 1998; Lieth, 1977). Aufgrund der regelmäßigen Gitterstruktur der van-der-Waals-Oberfläche ist WSe_2 (Schimmel et al. in Colton et al., 1998) besonders geeignet (Abb. 4). Bei der Verwendung zur lateralen Kalibration sollte das Präparat allerdings so montiert sein, dass eine Vorzugsrichtung des Kristalls parallel zur Rasterungsrichtung liegt, da Piezodrift zu einem verzerrt abgebildeten Gitter führen

kann (Abb. 2, 4). Dieser Effekt ist abhängig von der Rasterungsgeschwindigkeit. Will man ihn ähnlich gering halten wie bei der Abbildung von Proteinkristallen (Zeilenfrequenz der Größenordnung 5-10 Hz), kommt man bei dem kleineren Rasterungsbereich bei atomarer Auflösung schnell in Größenordnungen über 50 Hz für die Zeilenfrequenz, was unter Umständen bereits Artefakte (Oszillationen) zur Folge haben kann.

1.2.2 Eichstandards für axiale Kalibration

Neben speziellen Halbleiter-Eichstandards mit Stufenhöhen von 25 bis 500 nm (z. B. von Silicon-MDT) stehen atomare Stufen (bzw. deren Vielfache) von Glimmer (1,0 nm) und Übergangsmetall-dichalkogeniden (Abb. 5, 6) zur Verfügung. Beim Spalten der Schichtkristalle erhält man atomar glatte van-der-Waals-Oberflächen mit gelegentlichen atomaren Stufen.

Korrosionsdefekte auf Kristallen von Übergangsmetall-dichalkogeniden eignen sich sehr gut für die vertikale Kalibration des Scanners (z. B. MoTe_2 , Müller und Engel, 1997). Misst man auf diesen Oberflächen in Elektrolytlösung, so zeigen sich nach Stunden Defekte wachsenden Ausmaßes, die Stufen einer oder weniger Kristall-Schichtdicken bilden. Bei den drei hier verwendeten Substanzen (ReSe_2 , WSe_2 , WTe_2) zeigte sich dieser Korrosionseffekt in Elektrolytlösung nur bei WTe_2 (Abb. 5). Dies ist dadurch zu erklären, dass sowohl WTe_2 als auch MoTe_2 von ihren elektronischen Eigenschaften her metallischer Natur sind, während ReSe_2 und WSe_2 Halbleiter-Eigenschaften aufweisen (Parkinson in Colton et al., 1998).

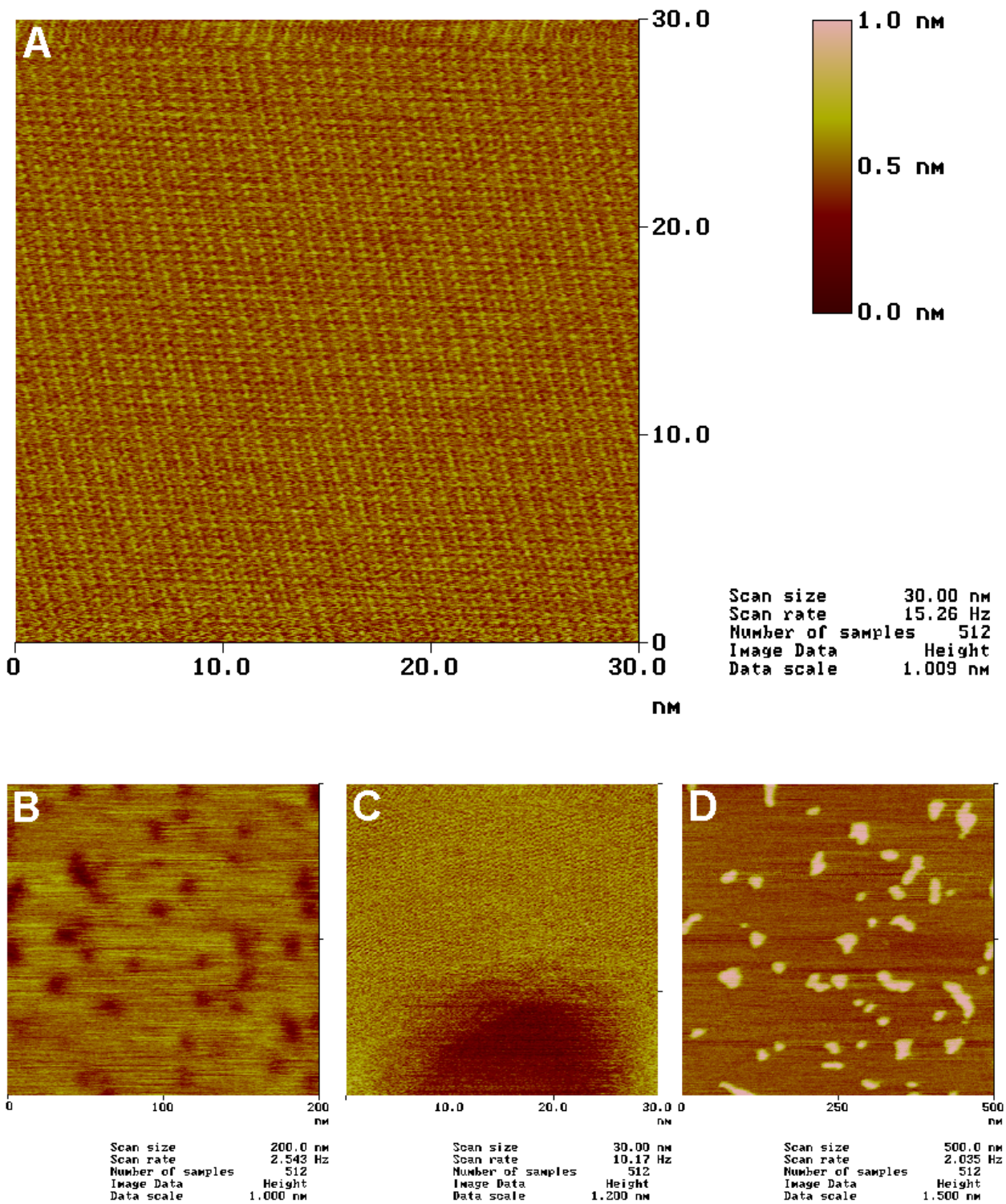
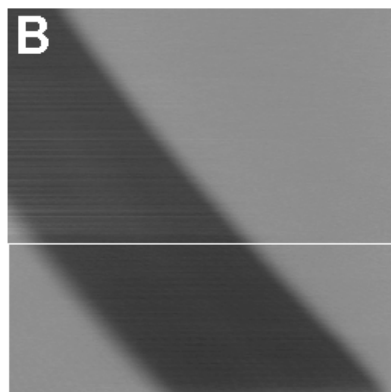
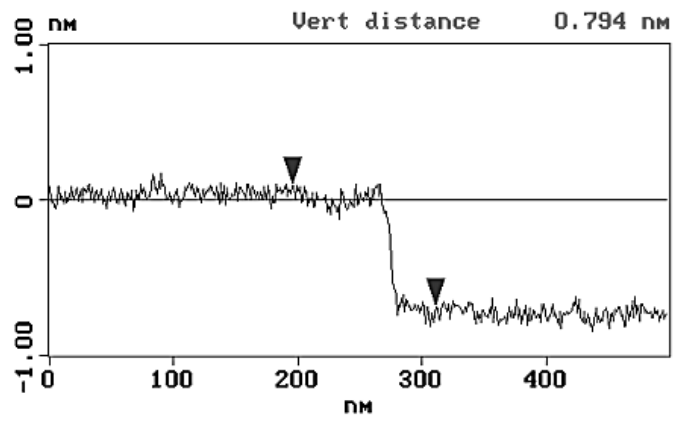
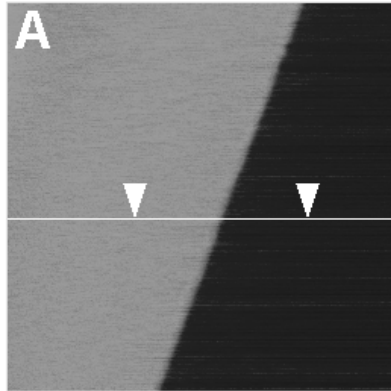
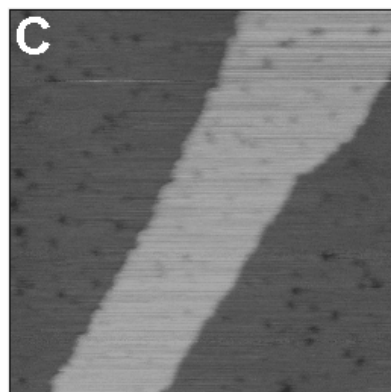
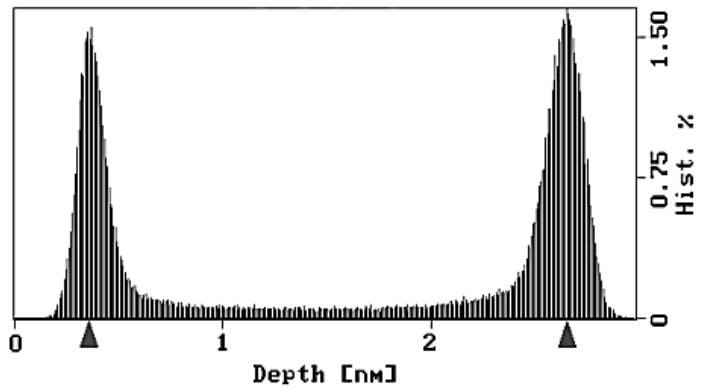


Abbildung 5: Wolframditellurid (WTe_2). **A**: atomar aufgelöste Aufnahme in 100 mM KCl. **B**: Oberfläche nach 24 h Inkubation in KCl-Lösung (4 °C), Übersichtsaufnahme: deutliche Defekte durch Korrosion, **C**: höher aufgelöste Aufnahme am Rand eines solchen Defekts mit erkennbarer Auflösung des Kristallgitters auf der Fläche. **D**: Oberfläche nach 4 h Inkubation in KCl-Lösung (26 °C): es sind nur noch kleine Inseln der korrodierten Schicht übrig, deren Höhe der Schichtdicke von einer van-der-Waals-Lücke zur nächsten entspricht (7,04 Å).



Box area 140075 nm²
Hist rel depth 2.298 nm



Box area 248050 nm²
Hist rel depth 0.831 nm

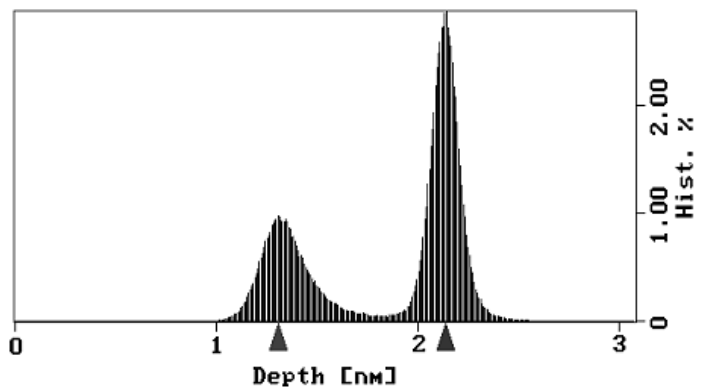


Abbildung 6: Stufen verschiedener Schichtalbleiter, aufgenommen mit einem ziemlich dekalibrierten Scanner (DI). **A:** ReSe_2 , SFM-Bild und Linienprofil daraus, aufgenommen in 100 mM KCl nach 6 h Inkubation im Elektrolyten (Raumtemperatur). Keine Anzeichen von Korrosion. Messwert Stufenhöhe: 7,9 Å (Lit.: $c = 6,72$ Å). **B:** WSe_2 , SFM-Bild und Histogramm der Topographiewerte, aufgenommen in Luft. Stufenhöhe (Mittel): 23 Å, also 3 Schichten (Lit.: $c = 6,48$ Å). **C:** WTe_2 , SFM-Bild und Histogramm, in 100 mM KCl gemessen nach 24 h Inkubation (4 °C), mit atomarer Stufe entsprechend einer Schicht sowie deutlichen kleinen Korrosionsdefekten. Stufenhöhe (Mittel): 8,3 Å (Lit.: $c = 7,04$ Å). Kantenlänge SFM-Bilder: A: 500 nm, B: 600 nm, C: 500 nm. Die Abweichung von den jew. Literaturwerten liegt bei allen drei Messungen bei etwa 18 % (Messung A allerdings zu verrauscht für eine statistische Auswertung). Der neue Scanner war nach der Lieferung nur grob justiert worden und wurde vor dieser Messung fast ein Jahr lang nicht benutzt bzw. nachkalibriert.

1.3 Instrumente und Versuchsaufbauten

1.3.1 Kraftmikroskope und Sensoren

Die in dieser Arbeit gezeigten SFM-Aufnahmen wurden mit zwei verschiedenen Instrumenten aufgenommen (Kapitel Grundlagen & Methoden 1, Projekte & Ergebnisse 3: *Digital Instruments Multimode*, Kapitel P&E 2: *TopoMetrix Discoverer*).

Das System TopoMetrix TMX 2010 mit Elektronikeinheit ECU-Plus (damals Topometrix, Darmstadt) stand mit zwei verschiedenen Kraftmikroskopen zur Verfügung: Ein Messkopf mit Rasterung des Sensors („Explorer“) für sperrige Präparate und ein Messkopf mit separater Scanner-Einheit für Rasterung des Präparats („Discoverer“). Der *Explorer* war mit einem Scanner für Messungen in Flüssigkeit ausgerüstet (Modell 5550-00, x,y: 130 μm , z: 12 μm) und wurde nur für Vorversuche eingesetzt (s. 1.3.2). Für den *Discoverer* standen ein für hochauflösende Messungen bestimmter Scanner auf der Basis eines segmentierten Röhrenpiezos (Modell 5310-00, x,y: 7 μm , z: 2 μm), sowie zwei Scanner nach dem Dreibein-Prinzip zur Verfügung (Modell 5590-00, x,y: 70 μm , z: 12 μm ; Modell 5320-00 TrueMetrix, x,y: 70 μm , z: 10 μm). Letzterer ist mit Linearisierung (automatischer Korrektur der Piezodrift) ausgerüstet, die über Dehnungsmessstreifen funktioniert. Die Abtastfrequenz des DSP-Boards im Messrechner beträgt etwa 50 kHz, dessen Auflösung 16 bit. Die Software für den Messrechner, SPMLab Version 4.0, läuft unter Windows 3.1. Die Kontrollelektronik ECU-Plus wurde mit einer Platine ausgestattet, auf der eine analoge PID-Regelung (Proportional-Integral-Differenzial-Regler) für den Piezohub integriert ist. Alternativ konnte aber auch die in der Mess-Software (ältere Version 3.06) implementierte digitale Regelung eingesetzt werden. Angesichts der Mängel bezüglich Rauschen und Schwingungsanfälligkeit war die Regelung hinsichtlich der Auflösung nicht begrenzend, so dass hier kein großer Unterschied festzustellen war.

Die erhöhte Schwingungsempfindlichkeit des *Discoverer* ist teilweise durch das Gehäuse bedingt

(mehrere großflächige dünne Bleche) sowie durch die Aufhängung (drei Flachstahl-Stäbe), wodurch Gebäudevibrationen eingekoppelt werden (Resonanzmaxima zwischen 0,8 und 3 kHz). Die kurzen und starren Gummiseile der Aufhängung führen zu keiner ausreichenden Abkopplung. Außerdem liegen die Piezoscanner (Röhrenpiezos) frei, die Stack-Piezos sind nur unvollständig und dünnwandig gekapselt, was erhöhtes breitbandiges Grundrauschen zur Folge hat. Trotz schwingungsgedämpfter Arbeitsplatte und Schallschutz hat das Sensorrauschen bei aufliegender Spitze fast dieselbe Amplitude wie beim freien Balken. Für molekulare Auflösung ist erfahrungsgemäß eine Dämpfung auf ca. ein Drittel der freien Amplitude erforderlich. Weitere Quellen mechanischer Instabilität sind in der teilweise mangelhaften Präzision feinmechanischer Teile zu sehen: Die Mikrometerschrauben für manuelles und automatisches Herunterfahren des Messkopfs sowie die Einstellschraube für den Photodiodenschlitten leiern leicht aus, da hier verschieden harte Materialien verwendet wurden (Stahlschrauben in Messinggewinden ohne weitere Führung bzw. Stabilisierung). Dies hatte nach etwa zwei Betriebsjahren auch ruckartige Bewegungen bei der automatischen Annäherung des Messkopfs an das Präparat zur Folge. Der Photodiodenschlitten besitzt nur auf einer Seite eine Schwalbenführung, wird aber von der Feststellschraube von dieser weg gegen die Gehäusewand gedrückt, so dass die Führung so gar keinen Sinn hat. Der Schlitten läuft entsprechend unsauber und scheint überdies nach der Justierung zu kriechen (Feder und nicht besonders präziser „Feintrieb“). Der über piezogetriebene Schrittmotoren bewegte Verschiebetisch für den Scanner leiern nach kurzer Zeit aus und wackelt dann fast im Millimeter-Maßstab, musste daher häufig komplett zerlegt und neu justiert werden. Der Motorbetrieb bringt hier also nur Nachteile gegenüber einem manuell zu justierenden Kreuztisch üblicher Bauart.

Rauschen in der Detektionseinheit entsteht zum einen in dem roh in VA-Stahl gefrästen Kanal für den Laser-Strahlengang, hier war ein hoher Streulichtpegel festzustellen. Weiterhin tritt Modenrauschen der Laserdiode bei Temperaturen über 30 °C auf. Die im Messkopf befindliche Beleuchtung (Glühlampen!) für die eingebaute Videokamera führte leider zu einer beträchtlichen Aufheizung des Messkopfs über 30 °C und konnte nicht völlig abgeschaltet werden, was im übrigen auch erhebliche thermische Drifteffekte nach sich zog. Da außerdem der Laser-Strahl nach der Reflexion nochmal am Strahlteiler umgelenkt wird (einmal mehr als beim DI MMAFM-2), geht sehr viel Intensität verloren, was sich ebenfalls ungünstig auf das Signal-Rausch-Verhältnis auswirkt. Lichtstreuung an Inhomogenitäten des Puffers schließlich stellte angesichts des langen Lichtweges in der mitgelieferten Flüssigkeitsmesszelle (s. 1.3.4) eine weitere Quelle für Rauschen dar.

Bei digitaler Regelung war die maximale Piezospaltung in axialer Richtung nicht beliebig einstellbar, es konnte nur zwischen „low gain“ und „high gain“ (Faktor 2) gewählt werden. Die Skalierung der 16 Bit Auflösung des A/D-Wandlers auf einen derart großen maximalen Hub bedeutet gerade bei kleinen Korruptionen oder Scannern mit großem maximalem Hub eine Ver-

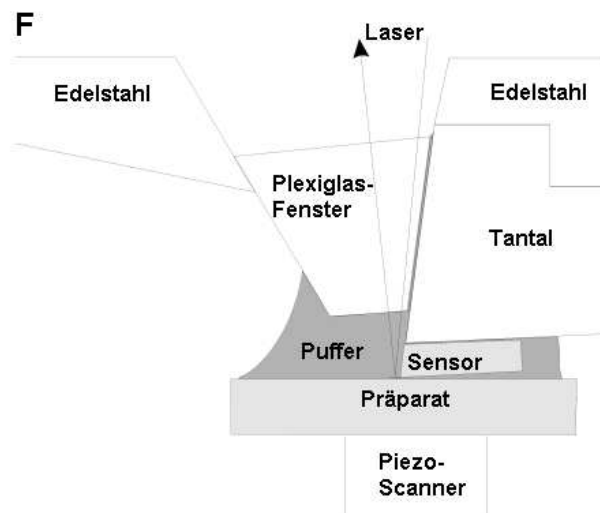
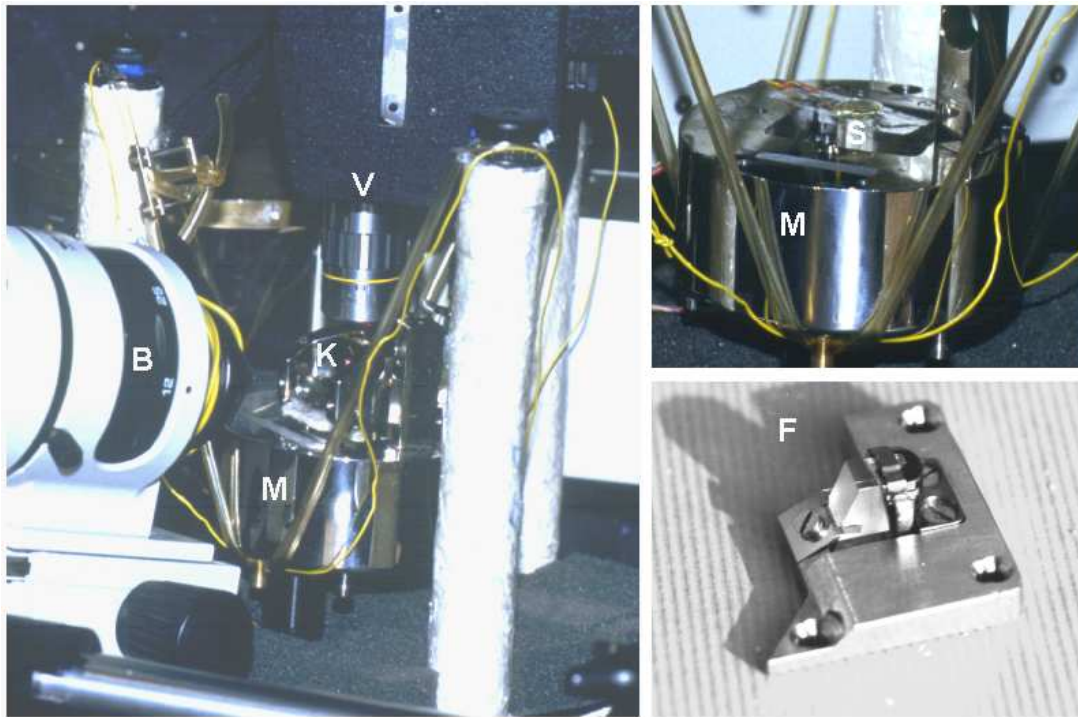


Abbildung 7: Versuchsaufbau mit *Topometrix Discoverer*. Oben links: geänderte Aufhängung des Kraftmikroskops mittels Silikonschlauch an mit Plastillin schwingungsgedämpften Möbelbeinen, **B**: Binokular für Justierungsarbeiten, **K**: Messkopf, **M**: Metallblock als Basis für Scanner und Messkopf (oben rechts ist der Metallblock bei abgenommenem Messkopf mit dem fest montierten Scanner sichtbar), **S**: Scanner mit Präparat, **V**: Videomikroskop für die Betrachtung des Präparats. **F**: Aufbau der in den Messkopf passenden Sensorhalterung für Messungen in Flüssigkeit (Eigenbau A. Linder). Photos: U. Weiland, A. Linder; Zeichnung: A. Linder.

schwundung und es ergeben sich deutliche Quantelungsartefakte. Nach Umrüstung auf die analog regelnde ECU-Platine wurde der maximale Hub und damit die Ausnutzung der 16 Bit Auflösung automatisch eingestellt (optimal wäre eine manuelle Einstellbarkeit gewesen, da für die automatische Einstellung eine nicht kontrollierbare diagonale Rasterungsbewegung ausgeführt wird, die u. U. das empfindliche Präparat bereits vor der eigentlichen Rasterung beschädigen kann).

An dem *Discoverer*-Aufbau wurden umfangreiche Umbauten vorgenommen, damit konnte aber lediglich ein Teil dieser Mängel beseitigt werden (Abb. 7, s. auch 1.3.2 - 1.3.4).

Der *Topometrix Explorer* hat sich als zu anfällig gegen Vibrationen erwiesen und war unter den gegebenen Bedingungen nicht sinnvoll einsetzbar. Da hier teilweise grundsätzliche bauartbedingte Mängel eine Rolle spielen (z. B. große schwingende Masse, da die Laseroptik beim Rastern des Sensors mitbewegt wird), wurde auf weitere Optimierungen verzichtet und dieser Messkopf nur für Vorversuche eingesetzt.

Das System *Nanoscope* (Digital Instruments, Mannheim) besteht aus einem Kraftmikroskop mit Rasterung des Präparats, Modell „Multimode“ MMAFM-2 (Abb. 9), und dem Nanoscope IIIa Controller (Elektronikeinheit). Der Messrechner ist mit zwei Monitoren ausgestattet (für SFM-Bild bzw. Steuerungsparameter), die Mess-Software Nanoscope, Version 4.31r6, läuft direkt unter dem Betriebssystem MS-DOS. Die PI-Regelung des Piezohubs ist digital implementiert (vgl. auch Flussdiagramm Abb. 8). Die Abtastrate der Analog/Digital- bzw. Digital/Analog-Wandler des DSP-Boards beträgt 62,5 kHz, die Auflösung 16 bit. Es standen zwei Scanner zur Verfügung, die beide jeweils aus zwei Röhrenpiezos aufgebaut sind (ein segmentierter Piezo für x,y und ein unsegmentierter für z, Abb. 9 D). Der E-Scanner (AS-12, x,y: 10 μm , z: 2,5 μm) ist für hochauflösende Messungen an rekonstituierten Proteinen besonders geeignet, sein lateraler Hub ist aber noch groß genug für Übersichtsaufnahmen der jeweiligen Präparation; die Scannereinheit ist mit zwei justierbaren Auflageschrauben für den Messkopf sowie einer dritten für Motorbetrieb ausgestattet. Der JV-Scanner (mit „vertical engage“, AS-130, x,y: 125 μm , z: 5 μm) ist universell einsetzbar, die Scannereinheit besitzt eine Mechanik für exaktes automatisches Herunterfahren auf die gewünschte Stelle des Präparats ohne seitlichen Versatz, daher ist auch keine manuelle Justierung der Neigung des Messkopfes nötig. Beide Scanner sind gekapselt und gegen das Gehäuse mit Silicon gedämpft. Für die Auswertung der Bilddaten steht zusätzlich eine spezielle Version der *Nanoscope*-Software (Workstation-Version 4.42r1) zur Verfügung, die nur die Offline-Bildverarbeitungsfunktionen enthält und die bei Bedarf auf einem separaten Rechner unter Windows NT 4.0 betrieben werden kann.

Für die Messungen an Zellen wurden oxidgeschärfte *Sensorspitzen* aus Siliziumnitrid von Park Scientific Instruments (MSCT-AUNM, ATOS, Pfungstadt) an triangelförmigen goldbedampften Federbalken (Länge: 320 μm , Dicke: 600 nm) mit einer Federkonstanten von 0.01 N/m verwen-

det. Für die meisten anderen Messungen wurden oxidgeschärfte pyramidenförmige Siliziumnitridspitzen an einarmigen goldbedampften Federbalken (OMCL-RC800PSA, Länge: $200\ \mu\text{m}$, Dicke $800\ \text{nm}$, Federkonstante: $0.05\ \text{N/m}$; Olympus, Japan) verwendet. Lediglich für Messungen an Membranpräparationen (Purpormembran) wurden Sensorspitzen an triangelförmigen Federbalken (OMCR-TR400PSA, Länge: $100\ \mu\text{m}$ und $200\ \mu\text{m}$, Dicke: $400\ \text{nm}$, Federkonstante: $0.02\ \text{N/m}$ und $0.09\ \text{N/m}$, Olympus) verwendet.

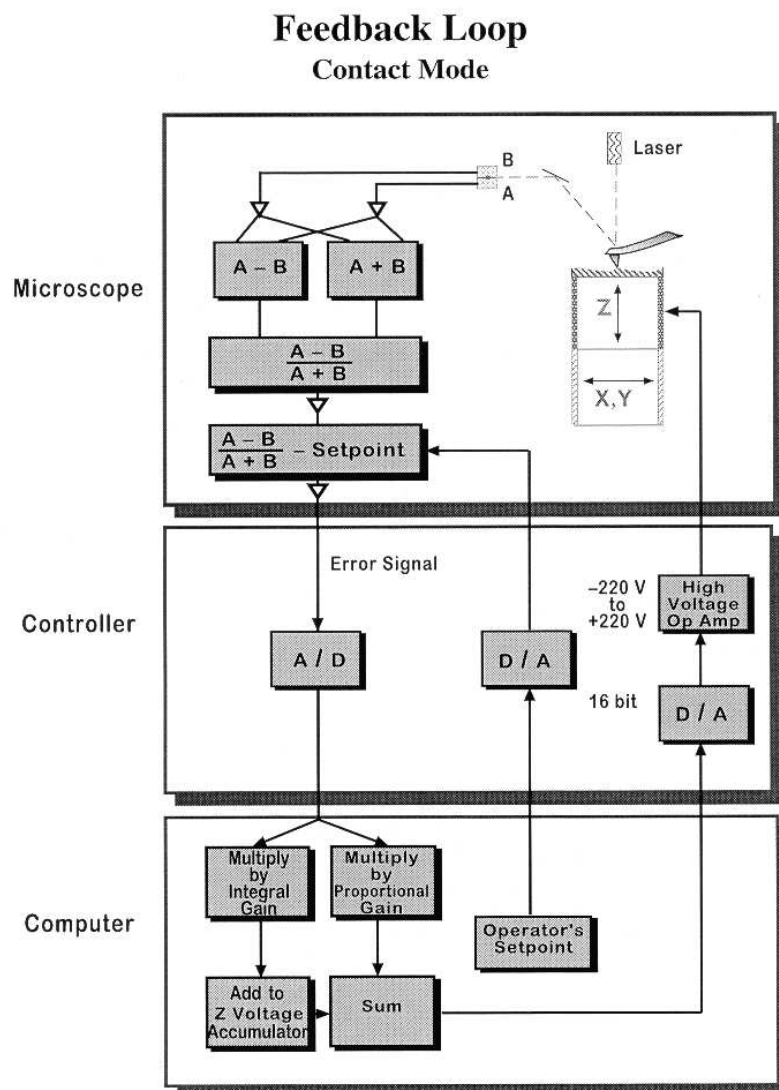
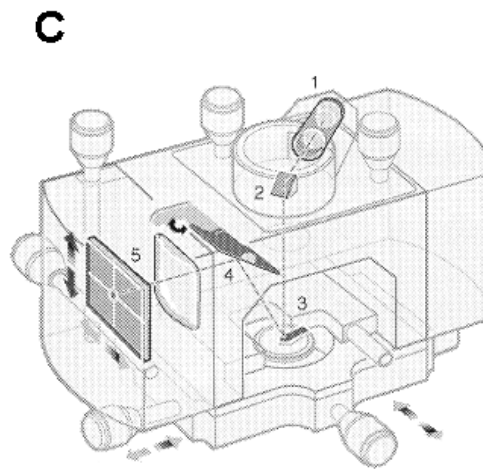
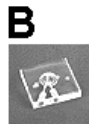


Abbildung 8: Flussdiagramm der digitalen PI-Regelung des Piezohubs. A, B (Signale der) Segmente des Photodetektors (Quelle: Digital Instruments, SPM Training Notebook).

Scanned Sample SPM (DI MultiMode SPM)



- Labels**
 1 - Laser
 2 - Mirror
 3 - Cantilever
 4 - Tilt Mirror
 5 - Photodetector

D Typical scanner piezo tube and X-Y-Z configurations. AC signals applied to conductive areas of the tube create piezo movement along the three major axes.

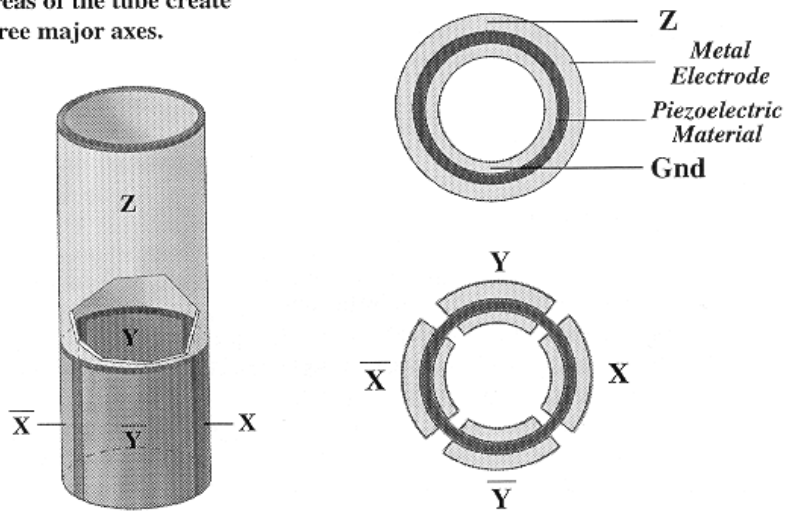


Abbildung 9: **A:** Digital Instruments Multimode-SFM, **B:** Sensorhalterung aus Glas für Messungen in Flüssigkeit, **C:** Aufbau Messkopf, **D:** Schemazeichnung Scanner. Quelle: Digital Instruments, SPM Training Notebook.

1.3.2 Reduktion von akustischem und optischem Rauschen

Der Dämpfung bzw. Abkopplung von Gebäudevibrationen und Schall, die durch Aufzüge, Zentrifugen, Ventilatoren, Umluft, Menschen etc. verursacht werden, kommt bei einem hochauflösenden mechanischen Messverfahren wie der Kraftmikroskopie zentrale Bedeutung zu.

Da kein ruhiger Raum im Keller zur Verfügung stand und da der originale Aufbau des *Topometrix Discoverer* ziemlich anfällig für akustisches Rauschen bzw. Gebäudevibrationen ist, waren insbesondere bei diesem Instrument umfangreiche Maßnahmen zur Vibrationsdämpfung erforderlich (Abb. 7). Der Stahlklotz, der Scanner und Messkopf trägt, wurde aus der zugehörigen Aufhängung an drei Flachstahl-Stäben im Originalgehäuse genommen und stattdessen an drei fest auf der Arbeitsplatte verschraubten Möbelbeinen (Heimwerkermarkt Obi) aufgehängt. Letztere wurden innen und außen mit einer massiven Schicht Knetmasse gedämpft. Die ursprünglichen Hartgummi-Riemen der Aufhängung wurden durch Siliconschlauch ersetzt, der durch seine viskoelastischen Eigenschaften eine bessere Schwingungsdämpfung leistet. Auf diese Weise konnten zwei Resonanzmaxima bei 1,0 - 1,2 kHz gegenüber dem ursprünglichen Aufbau um zwei Größenordnungen verringert werden. Bei dem völlig ungeschützten Röhrenscanner konnte eine gewisse Verbesserung der Rauschanfälligkeit durch einen zwischen Basis und Scannerkopf eingeklemmten dicken Siliconschlauch erreicht werden. Als Arbeitsplatte für den *Discoverer*- und *Explorer*-Messplatz wurde ein schwingungsgedämpfter Lasertisch auf Druckluftbasis verwendet. Zur Verbesserung der Schallisolierung wurde der Metallkäfig, in dem der Lasertisch stand, innen mit Noppenschäumstoff ausgeschlagen sowie vorne ein „Vorhang“ aus einer Lage Noppenschäumstoff und einer Lage Linoleum angebracht. Die Blechverkleidung des Käfigs wurde außen flächendeckend mit 1 cm dicker Wellpappe beklebt.

Zur Verringerung des Rauschens der Detektionseinheit beim *Topometrix Discoverer* wurden alle reflektierenden Oberflächen in der Umgebung des Laserstrahls schwarz lackiert. Damit konnte das Hintergrundrauschen im Photodetektorsignal beträchtlich verringert werden, ebenso das Rauschen der Laserdiode aufgrund von Rückkopplungseffekten des Streulichts. Außerdem wurde der Lichtweg in Flüssigkeit verkürzt (s. 1.3.4). Die Glühlampen im Messkopf, die zu einer inakzeptablen Aufheizung führten (s. o.), wurden entfernt, die eingebaute Videokamera durch ein Binokular ersetzt (letzteres wurde mit einer Filterscheibe zum Schutz vor austretender Laserstrahlung ausgestattet).

Das *Digital Instruments Multimode* ist bauartbedingt weniger anfällig gegen mechanische Störungen. Es wurde ebenfalls auf Ebene 9 des Labortraktes betrieben und ermöglichte im Gegensatz zum *TopoMetrix Discoverer* zuverlässige und reproduzierbare hochauflösende Messungen. Hier wurde die Abkopplung von Gebäudevibrationen durch folgenden Aufbau bewerkstelligt: Auf einen ca. 1 m³ großen Styropor-Block wurde eine passende Sperrholzplatte gelegt und darauf eine

Sandkiste aus Holz auf vier kleinen Fahrradschläuchen gelagert. In der Sandkiste befand sich eine massive Arbeitsplatte aus Stein. Auf dieser Arbeitsfläche konnte das Multimode auf zwei Arten gelagert werden: Zum einen stand hier der mitgelieferte Aufbau mit dem Videomikroskop zur Beobachtung des Präparats (kleine Steinplatte auf Silikonfüßen als Unterlage für das Kraftmikroskop mit einem Stativ für die Videokamera). Waren das Präparat und der Messlaser justiert, konnte das ganze Kraftmikroskop vorsichtig in eine daneben auf vier Füßen aus Knetmasse aufgebaute Styroporkiste gestellt werden (Kühl-Versandkiste für Laborchemikalien). Darin befand sich unten eine Lage Quarzsand und darauf der mitgelieferte silikongelagerte Untersatz für das Mikroskop. Wurde die Kiste während der Messung mit einem Deckel verschlossen, bedeutete dies eine wirksame Abschirmung von Schall sowie eine zusätzliche Vibrationsdämmung.

1.3.3 Visualisierung des Objekts

Sowohl für den *T.-Discoverer* als auch für das *DI-Multimode* stehen Videomikroskope zur Verfügung, mit denen jeweils durch ein Fenster im Messkopf Sensorchip und Präparat von oben betrachtet werden können (*Discoverer*: A-Zoom, Ready Products Corp., USA mit 10x Apochromat-Objektiv, Mitutoyo, Japan; *Multimode*: 10x Objektiv und CCD-Kamera, Nikon, Japan). Die zusätzlich im ursprünglichen Aufbau integrierte kleine Videokamera für schräg seitliche Kontrolle der Justierung beim *Discoverer* wurde nicht verwendet. Da die Videomikroskope mit Aufsichtbeleuchtung funktionieren, wurde eine verspiegelte Unterlage für die Visualisierung von Zellen verwendet (5.1). In Verbindung mit der linsenförmigen PVPK-Schicht des Substratplättchens und einer über dem Objektiv behelfsweise eingeführten Blende konnte beim *Discoverer*-Messplatz ein für die Visualisierung lebender Zellen befriedigender Kontrast erreicht werden.

Der *Topometrix Explorer* kann auf einem inversen Mikroskop (Axiovert, Zeiss) gelagert werden (Betrachtung des Präparats von unten) und besitzt zusätzlich eine eingebaute Videokamera für Justierungszwecke.

1.3.4 Messungen in Flüssigkeit

Beim *Topometrix Discoverer* besteht die mitgelieferte geschlossene Flüssigkeits-Messzelle aus rostfreiem Stahl, die mit Gold beschichteten Sensor-Chips sind mit leitfähigem Kleber auf Stahlplättchen befestigt und werden damit an einem Magneten fixiert. Die verstärkte Korrosion aufgrund der leitenden Verbindung mehrerer mit wässriger Pufferlösung in Kontakt stehender Metalle kann zur Ausfällung von Eisen(III)-Verbindungen niedrigen Löslichkeitsprodukts führen, wie zum Beispiel Eisen-Hydroxid, -Karbonat, -Phosphat, die sich als Niederschlag auf der Oberfläche des

Objekts bemerkbar machen können und damit die Auflösung der Messung heruntersetzen. Außerdem führt die erhöhte Konzentration streuender Partikel in der Lösung zu erhöhtem Rauschen in der Laser-Detektionseinheit für die Federbalken-Auslenkung. Aus diesen Gründen wurde eine völlig neu konstruierte Flüssigkeitszelle notwendig (Konzeption: Achim Linder, Ausführung: Feinmechanikwerkstatt der Universität Konstanz; Abb. 7). Alle Stahlteile wurden durch optimierte Teile aus Tantal ersetzt. Dieses Metall ist billiger als Platin, einfacher zu verarbeiten als Quarz und hat eine sehr viel geringere Korrosionsrate als der „rostfreie“ Stahl und die anderen Metalle (z. B. Magnet für die Halterung des Sensorchips) in der mitgelieferten Flüssigkeitszelle. Der Sensor-Chip wurde mittels einer Klammer aus $127\ \mu\text{m}$ dickem Tantalblech an den aus Tantal bestehenden Sensorträger befestigt. Der Träger wurde an der Kontaktfläche mit Furfurylalkohol-Harz beschichtet, um eine leitende Verbindung Gold-Tantal zu verhindern. Das Quarz-Fenster für den Eintritt des Laserstrahls der Detektionseinheit wurde durch ein Prisma aus Plexiglas ersetzt. Damit ist der Puffer nur noch in Kontakt mit Tantal, Plexiglas, dem Sensor und dem Präparat. Verglichen mit dem Original-Aufbau wurde damit auch die Länge des Laser-Lichtweges im Puffer um eine Größenordnung verkürzt und somit durch Lichtstreuung an Inhomogenitäten des Puffers verursachtes Rauschen reduziert. Es ist nur noch ein kleiner Tropfen Puffer zwischen Präparat und Sensorhalterung/Fenster notwendig (Messung am „hängenden Tropfen“), was auch die Gefahr von Kurzschlüssen am Piezoscanner durch auslaufenden Puffer deutlich herabsetzte. Bei Bedarf konnte mit Hilfe einer über den Scanner zu stülpenden becherförmigen Flüssigkeitszelle (Eigenbau A. Linder) aber auch in größeren Volumina bzw. in Flüssigkeiten niedriger Oberflächenspannung gemessen werden. Letztere besteht aus zwei Polycarbonatzylindern und einer dazwischengeklemmten flexiblen Membran, so dass das eigentliche Gefäß nicht auf dem Scannerkopf gelagert werden muss und damit nicht zu einer Vergrößerung der Masse desselben beiträgt.

Der *Topometrix Explorer* war mit Flüssigkeitsscannern mit integrierter Sensorhalterung und Laser-Fenster ausgerüstet.

Die Flüssigkeitszelle des *Digital Instruments Multimode* (Abb. 9 B) besteht im wesentlichen aus einer Glasplatte, in die ein Haltebügel mit Feder (vergoldet) für den Sensorchip sowie Kanäle für Zufuhr und Absaugen von Flüssigkeit integriert sind. Sie kann in Verbindung mit einem Dichtungsring und einer ebenen Unterlage als geschlossene Flüssigkeitszelle oder alternativ ohne die Dichtung als Sensorhalterung mit Laser-Fenster für offene Messung im „hängenden Tropfen“ verwendet werden.

2 Substrate für SFM an biologischen Materialien

2.1 Glimmer

Das Schichtmineral Glimmer (siehe z. B. Colchero in Colton et al., 1998) ist ein sehr weit verbreitetes Substrat für kraftmikroskopische Untersuchungen, da es sich sehr einfach spalten lässt, wodurch eine saubere und atomar glatte Fläche freigelegt wird, auf der das zu untersuchende Material adsorbiert werden kann. Die in neutraler wässriger Lösung negative Oberflächenladung von Glimmer kann Probleme bei der Adsorption negativ geladener Materialien bereiten. In gewissen Grenzen (Empfindlichkeit biologischer Materialien) lässt sich dieses Problem durch Anwesenheit divalenter Kationen oder durch Modulierung des elektrostatischen Terms der DLVO-Kraft durch Erhöhung der Ionenstärke auch mit monovalenten Kationen bis zur Dominanz der van-der-Waals-Attraktion überwinden (z. B. Müller et al., 1997; Butt, 1991a,b & 1992).

Als Unterlage für Glimmer wurde in dieser Arbeit eine teilkristalline Polyetheretherketon-Folie (PEEK) verwendet. Dieses relativ harte, chemikalien- und hydrolyseresistente sowie thermisch stabile Material stellt sicher, dass keine Kontaminationen in den Messpuffer gelangen und kein nennenswertes Kriechen durch thermische Ausdehnung auftritt. Außerdem ist die mit Detergenz gereinigte Folie einigermaßen hydrophob (Puffertropfen läuft nicht über den Rand des Substratplättchens). Ein passendes Stück wurde auf ein zur magnetischen Fixierung auf dem Scanner benötigtes Stahlplättchen geklebt (Heißkleber, System Micromot, Proxxon). Glimmerscheiben wurden mit einer scharfen Schere in Stückchen von maximal 5 mm Kantenlänge zugeschnitten. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Schnittkanten zwecks guter Spaltbarkeit glatt und nicht zerfrant oder eingerissen waren. Der Glimmer wurde mit Zweikomponentenkleber auf den PEEK-Film geklebt. Durch Spalten des Glimmers mit Klebefilm erhält man ein sauberes, adsorbatfreies und atomar glattes Substrat.

2.2 Glas

Glas (siehe auch Butt in Colton et al., 1998) wurde in dieser Arbeit nur für Zellkulturen verwendet. Runde Deckgläschen mit einem Durchmesser von 9 mm wurden zum Zweck der Reinigung 20 min lang in rauchender Salpetersäure gekocht, nach dem Abkühlen mehrmals in Wasser gespült und in ddH₂O autoklaviert. Vor Gebrauch wurde die benötigte Anzahl an Deckgläsern aus dem Gefäß genommen, getrocknet, einzeln in eine Halterung gesteckt und so nochmals autoklaviert. Die Standard-Beschichtung erfolgte durch Aufbringen eines Tropfens einer Polylysin-Lösung (200 µg/ml in PBS) auf jedes zweite Deckglas, darauf wurde ein zweites Deckglas gelegt (Sandwich). Nach Inkubation für 1 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer wurden die Deckgläser mit ddH₂O

aufgeschwemmt, danach auf gleiche Weise mit Laminin beschichtet (Lamininlösung 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 0,8 mM Tris; 2,4 mM NaCl; pH 7,4) und wieder für 1 h bei 37 °C inkubiert. Dann erfolgte Waschen in PBS und Aufbringen der Zellsuspension (s. Zellkultur). Für einige Messungen wurden nur mit Laminin beschichtete sowie unbeschichtete Deckgläser verwendet (s. Ergebnisse).

2.3 Polymersubstrate für biologische Materialien

2.3.1 Substrate aus Polyvinylphenylketon (PVPK)

PVPK ist ein amorpher Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 74 - 84 °C (Angabe des Herstellers). Festes und gelöstes PVPK wird gewöhnlich als polymerer Photosensitizer verwendet (Daly, 1987). Als Unterlage für PVPK wurden zunächst dünne Plättchen aus Polystyrol mit einer Dicke von etwa 0,5 mm hergestellt, indem geschmolzenes Polystyrol zwischen zwei Deckgläsern gequetscht wurde. Diese etwa 1 cm^2 großen Plättchen wurden nach Abnehmen des oberen Deckgläschens abermals, zusammen mit einem kleinen Stück PVPK auf der Mitte des Plättchens, geschmolzen. Das ziemlich spröde PVPK erfordert als stabilisierende Unterlage ein Material mit ähnlichem thermischem Ausdehnungskoeffizienten. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur bildet das PVPK mit Polystyrol ein festes Verbundmaterial und die PVPK-Oberfläche kann direkt mit Laminin beschichtet werden. Dies geschah durch Aufbringen eines Tropfens einer wässrigen Lamininlösung (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 0,8 mM Tris; 2,4 mM NaCl; pH 7,4) und Inkubation für 1 h bei 37 °C. Danach konnten auf diesem Substrat Zellkulturen angelegt werden. Für die kraftmikroskopische Untersuchung wurden die Substratplättchen auf den verspiegelten Präparateträger (siehe 5.1) oder nur auf eine Unterlage aus Stahl geklebt, um deren Befestigung am Scanner zu ermöglichen (Abb. 10).

2.3.2 Substrate aus Furan-Polymer (FP)

Harze aus 2-Furanmethanol sind besonders geeignet zur Herstellung von Substraten für rasterkraftmikroskopische Untersuchungen. Das Monomer polymerisiert spontan bei Säurekatalyse (Gandini, 1987). Die hierfür verwendete Säure sollte gut in dem Harz lösbar sein und darf bei der Reaktionstemperatur nicht verdampfen. Die Verwendung halogenhaltiger Säuren muss vermieden werden, da in dem Harz Formaldehyd als Zwischenprodukt gebildet wird. 2-Furanmethanol ist eine Flüssigkeit (und ein gutes Lösungsmittel), so dass die Kondensationsreaktion ohne Zusatz eines weiteren Lösungsmittels durchgeführt werden kann. Das bei der Polymerisation entstehende Wasser verdampft während des Prozesses, vorausgesetzt der Polymerfilm ist dünn genug. Durch das schnelle Entweichen von Wasser wird das Polymer sehr kompakt und bildet eine sehr glatte

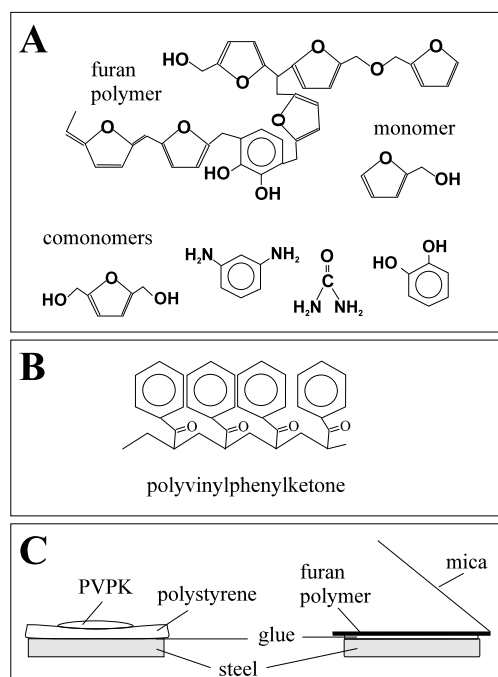


Abbildung 10: Polymer-Substrate: **A:** Chemische Struktur der Furanharz-Monomere und des Furanpolymers (FP). Monomer: 2-Furanmethanol. Ko-Monomere: 2,5-Furandimethanol, Phenylendiamin, Harnstoff, Brenzkatechin. **B:** Chemische Struktur von Polyvinylphenylketon (PVPK). **C:** Skizze der Polymer-Substratplättchen. (Zeichnung: A. Linder, H.-J. Apell).

Oberfläche, wenn man den Polymerfilm auf Glimmer als Unterlage herstellt. Die Chemie der Polymerisation von Furanharzen ist ziemlich komplex und wurde in mehreren Arbeiten beschrieben (Übersicht in Gandini, 1987; McKillip, 1989). Die Stabilität des Rückgrats des Homopolymers von 2-(Hydroxymethyl)-Furan (Furfurylalkohol) erklärt sich aus den ausgedehnten Systemen konjugierter Doppelbindungen, die sich bei der Polymerisation bilden und die auch die dunkle Farbe des Produkts erklären. Eine hohe Konzentration des bifunktionellen Monomers führt zu einer höheren Anzahl an Etherbrücken, was die Stabilität des Grundgerüsts und die Polarität des Harzes verändert. Während des Aushärtungsvorgangs werden einige der Etherbrücken bei Abspaltung von Formaldehyd in Methylenbrücken umgewandelt. Das Formaldehyd kann zusätzliche Quervernetzungen bilden und wird auch zur Integration der Ko-Monomere in das Harz benötigt. Durch die dichte Vernetzung ist das Polymer in den meisten Lösungsmitteln unlöslich und zeigt kein Quellen in wässriger Lösung wie viele andere Polymere, die für die Immobilisierung von Proteinen verwendet werden. Die Oberfläche kann durch Behandlung in einer Glimmentladungsröhre hydrophil gemacht werden, ohne dass sich die Rauigkeit erhöht. Darüber hinaus können Ladungsdichte und Polarität durch Einführung einer Vielzahl verschiedener Ko-Monomere wie Phenylendiamin, Harnstoff, Aceton, Brenzkatechin, Resorcin oder Aminophenole eingestellt werden. Verbleibende Hydroxyl-, Amino- oder Furfurylgruppen an der Oberfläche können für kovalente Modifikation

genutzt werden. Damit kann die laterale Mobilität adsorbierter Materialien im Vergleich zu Glimmer beträchtlich verringert werden, was für die SFM-Abbildung im Kontaktmodus von großem Vorteil ist. Brenzkatechin ist deswegen ein interessantes Ko-Monomer, weil es sich sehr gut in Furfurylalkohol löst und weil es sich zu dem sehr reaktiven 1,2-Benzochinon oxidieren lässt, das in gepufferten Salzlösungen zu vielen Aminosäureresten kovalente Bindungen bilden kann. Dieser Mechanismus ist von dem Polyphenolischen Protein bekannt, das marine Muscheln als Kleber verwenden, um sich im Meerwasser an Felsen zu befestigen. Das o-Chinon, das durch Oxidation von 3,4-Dihydroxyphenylalanin entsteht, verstärkt die kohäsiven Eigenschaften des Klebers, da es Querverbindungen mit Lysin und Cystein bildet. Die nicht oxidierte Katecholgruppe des Polyphenolischen Proteins ist ein wirkungsvoller Metallionenchelator (Waite et al., 1985). Im Gegensatz zu Silanen oder Polylysin-Schichten auf Glas, die hydrolysiert bzw. durch Desorption verändert werden können, sind die Ko-Monomere für die in dieser Arbeit verwendeten Furan-Polymere fest in das Substrat eingebunden. Die Monomere sind billig und für die Herstellung der Polymerfilme wird keine spezielle Ausrüstung benötigt.

Zur Herstellung von SFM-Substraten wurden 0,25 mmol 2,5-Furandimethanol unter Rühren in 1 mmol Furfurylalkohol gelöst. Dann wurden 3 μl einer wässrigen 2 M Toluolsulfonsäurelösung zugegeben. Ein Tropfen der Mischung wurde auf eine frisch gespaltene Glimmeroberfläche aufgebracht. Überflüssige Lösung wurde wieder abgesaugt, bis ein dünner Film von etwas weniger als 1 cm^2 Größe auf dem Glimmerstückchen verblieb. Das Ganze wurde unter einem Abzug auf einer Heizplatte bei 90 °C behandelt, bis sich die Flüssigkeit zu einem harten, schwarzen Polymerfilm umgewandelt hatte. Das bei der Kondensationsreaktion entstehende Wasser verdampft schnell aus dem dünnen Film (Dicke kleiner 100 μm), was über die Kondensation an einer darüber gehaltenen kalten Glasfläche beobachtet werden kann.

Nützliche Modifikationen des Furanpolymers wurden entwickelt, um ebenso glatte Flächen mit höherer Polarität oder höherer Reaktivität für kovalente Immobilisierung zu bekommen:

(1) Phenylendiamin-modifiziertes FP: 0,2 mmol 2,5-Furandimethanol wurden in 1 mmol 2-Furandimethanol gelöst. Danach wurden 0,1 mmol 1,3-Phenylendiamin und 0,1 mmol DL-Äpfelsäure (α -Hydroxybernsteinsäure) darin gelöst. 5 μl einer 2 M wässrigen Toluolsulfonsäurelösung wurden zugefügt und das Ganze gemischt. Ein Tropfen des Harzes wurde auf ein Stück frisch gespaltenen Glimmer aufgebracht und 10 min lang auf 90 °C erhitzt. Die Verarbeitung des Films erfolgte wie oben beschrieben.

(2) Harnstoff-modifiziertes FP: 0,25 mmol 2,5-Furandimethanol wurden in 1 mmol 2-Furandimethanol gelöst, 15 mg Harnstoff und 10 μl Formalin (37 %) wurden zugesetzt und gelöst. Schließlich wurden 3,5 μl einer 4,45 M Toluolsulfonsäurelösung zugesetzt und dieses Harz wie oben auf einem Glimmerplättchen polymerisiert.

(3) **Brenzkatechin-modifiziertes FP:** 0,5 mmol 2,5-Furandimethanol wurden in 1 mmol 2-Furanmethanol gelöst, 0,5 mmol Brenzkatechin wurden zugesetzt und gelöst. Schließlich wurden 3 μ l einer 4,45 M Toluolsulfonsäurelösung zugesetzt, die Mischung sofort gerührt und auf Glimmer polymerisiert (Polymerisation 1 h bei 90 °C).

Der FP-Film wurde jeweils mit Epoxidharz-Kleber (Zweikomponentenkleber) auf ein Stahlplättchen geklebt (Abb. 10). Für Messungen im „hängenden Tropfen“ bzw. zur Verhinderung eines Kontakts von Puffer und Stahl wurde zwischen Stahlplättchen und FP-Film ein Stück Polypropylen-Folie oder PEEK-Film geklebt. Danach wurde der Glimmer vorsichtig heruntergezogen und damit die sehr glatte Polymeroberfläche freigelegt (Abb. 10 C). Gelegentlich verblieb eine Glimmerschicht auf dem Polymerfilm; diese wurde mit einer sauberen scharfen Klinge an den Rändern umschnitten und mit einem scharfen Wasserstrahl (doppelt destilliertes Wasser oder hochreines Wasser) aus einer Spritze mit hohem Druck entfernt. Die erfolgreiche Entfernung des Glimmers kann leicht durch vorsichtiges Kratzen mit der Klinge am Rand des Plättchens unter dem Binokular getestet werden. Membranpräparationen oder Proteine konnten dann durch Aufbringen eines Tropfens einer wässrigen Suspension bzw. Lösung adsorbiert werden.

3 Zellkultur

3.1 Goldfisch-Oligodendrozyten

Zellkulturen wurden aus regenerierendem Tractus opticus adulter Goldfische hergestellt. (Bastmeyer et al., 1989 & 1994). Zerkleinerte Gewebestückchen wurden in Leibovitz's L-15-Medium mit 0,03 % Collagenase und 0,1 % Dispase dissoziiert. Nach Inkubation (20 min, 37 °C) wurde die Suspension zentrifugiert (200 g, 5 min), in L-15-Medium resuspendiert, nochmal zentrifugiert und schließlich in Ham's F-12-Zellkulturmedium suspendiert, das 10 % foetales Kälberserum (FCS) und 0,4 % Methylzellulose enthielt. Die Zellsuspension wurde dann auf Laminin-beschichteten PVPK- und FP-Plättchen oder auf den üblichen mit Polylysin-Laminin beschichteten Deckgläschen ausplattiert. Nach einigen Wochen der Proliferation bei 28 °C konnte die dicht gewachsene Schicht von Gliazellen geerntet und erneut auf Glas- oder Polymerplättchen ausplattiert werden. Für Untersuchungen am SFM wurden lebende Zellen aus Kulturen verschiedenen Alters in reinem F-12-Medium gewaschen und in dem gleichen Medium gerastert.

Fixierung: Ein Zellkulturplättchen wurde in L-15-Medium gespült, dann in phosfatgepufferter Salzlösung (PBS), und 3 bis 5 Minuten lang in 1 % Glutaraldehydlösung (in PBS) fixiert. Unter diesen Bedingungen blieb die Form der Zelle vollständig erhalten, wurde aber so steif gemacht, dass wiederholtes Rastern unter dem SFM mit reproduzierbarem Ergebnis möglich war. Üblicherweise werden für die Fixierung von auf einem Substrat haftenden Zellen Inkubationszeiten von bis zu 1 h in 1 % Glutaraldehydlösung (in PBS) empfohlen (z. B. Harlow, 1988), daher handelte es sich hier um eine relativ sanfte Fixierung.

Zur Entfernung der oberen Membran von Lamellipodien wurde eine „härtere“ Fixierung in 2,5 % Glutaraldehyd in PBS (länger als 30 min) vorgenommen. Durch diese Behandlung kam es aufgrund der höheren Membransteifheit und osmotischen Effekten aufgrund des Fixans zum Aufbrechen der Membranen, so dass alle Zellbestandteile, die nicht fest an das Substrat gebunden waren, durch Spülen mit Puffer entfernt werden konnten. Die osmotischen Eigenschaften der Membran bleiben nämlich auch nach der Fixierung teilweise erhalten, so dass die Membranen auch dann noch empfindlich gegen Änderungen der Osmolarität bleiben (Hayat, 1981). Da aber nach Fixation die Elastizität der Membran deutlich geringer ist (Hoh und Schoenenberger, 1994), kommt es u. U. zu einem Aufbrechen der Zellen, spätestens beim Spülen mit PBS nach der Fixation.

3.2 Goldfisch-Fibroblasten

Frische Zellkulturen, die wie oben beschrieben aus dem Tractus opticus hergestellt wurden, enthielten gelegentlich einige Fibroblasten. Diese können bereits unter dem Lichtmikroskop von Glia-

zellen unterschieden somit gezielt mit dem SFM gerastert werden.

Zusätzlich wurde eine Goldfisch-Fibroblastenzelllinie (CAR) aus der „European Collection of Animal Cell Cultures“ (ECACC; Salisbury, GB) in L-15 medium mit 10 % FCS auf Laminin-beschichtetem PVPK kultiviert (bei Raumtemperatur). Lebende Zellen wurden in serumfreiem Medium mit dem SFM abgebildet.

3.3 Goldfisch-Epitheliumzellen (EPC)

Zelllinie aus der ECACC. Die Zellen wurden unter denselben Bedingungen kultiviert wie die CAR-Zellen. Lebende Zellen wurden in serumfreiem Medium mit dem SFM abgebildet.

3.4 Maus-3T3-Zellen

Fibroblasten-Zelllinie aus der ECACC. Die Zellen wurden in DMEM-Zellkulturmedium mit 10 % FCS auf Laminin-beschichtetem PVPK kultiviert (37 °C). Lebende Zellen wurden in serumfreiem Medium mit dem SFM abgebildet.

4 Reinigung, Rekonstitution und zweidimensionale Kristallisation von Sucroseporin

4.1 Reinigung

Die Expression und Reinigung von Sucroseporin (ScrY) erfolgte weitgehend nach Forst et al. (1993). Die wichtigsten Schritte:

Kultur: Für die Expression wurden *E. coli* -Kulturen des Stamms KS 26 verwendet, dem die Außenmembran-Proteine OmpF, OmpC und LamB fehlen, und der mit dem Plasmid PKS 112, das die Strukturgene von ScrY und OmpA enthält, transfiziert worden war. Die Expression von ScrY in der Hauptkultur wurde durch Zugabe von Isopropyl- α -D-Thiogalactosid und D-Fructose induziert.

Isolierung der Gesamt-Membranfraktion: Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation, Waschen in Präparationspuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,7; 10 mM MgSO₄) und nochmalige Zentrifugation. Danach erfolgte Resuspendierung in Präparationspuffer und Zellaufschluss in der French Press, Zentrifugation. Das Sediment I enthält die äußere Membran, die innere Membran und das Peptidoglykan.

Extraktion: Homogenisierung und Extraktion der Membranfraktion erfolgte mit 0,1 % (m/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) in Präparationspuffer (zweimal): Sediment II. Dieses wird wiederum homogenisiert und mit 2 % (m/v) Genapol X80 in Präparationspuffer extrahiert (zweimal): Sediment III. Wiederum Homogenisierung und Extraktion mit 0,2 % (m/v) Lauryldimethylaminoxid (LDAO) in Präparationspuffer: Sediment IV, Überstand I (enthält ScrY). Homogenisierung und Extraktion des Sediments IV mit 0,6 % (m/v) LDAO in Präparationspuffer (ScrY-haltiger Überstand II).

Anionenaustausch-Chromatographie der beiden Überstände: Auftrag auf eine Anionenaustauscher-Säule (DEAE EMD Fractogel 650 M, Merck). Waschen mit 0,6% LDAO in Präparationspuffer: im Gegensatz zu früheren Protokollen (z. B. Forst et al., 1993) wurde eine viel größere Menge Waschpuffer verwendet, nämlich statt dem 6- bis 8-fachen Säulevolumen das 60-fache, um Verunreinigungen durch andere Proteine und Restlipid zu entfernen. Danach Detergenzaustausch von LDAO zu β -D-Octylglucopyranosid (β -OG) mit 1,2 % β -OG in Präparationspuffer. Die Elution des Porins erfolgt mit einem linearen Salzgradienten 0 bis 250 mM LiCl (1,2 % β -OG in Präparationspuffer sowie LiCl, 8-faches Säulenvolumen). ScrY eluierte bei ca. 125 mM LiCl. Die Überprüfung der Qualität der Fraktionen mit gereinigtem ScrY erfolgte mittels SDS-PAGE (Gradienten-Gel, System Phast, Pharmacia). Die Bande von ScrY liegt bei ca. 53 kDa, wenn die Probe gekocht wird. Die porinhaltigen Fraktionen wurden in einer Ultrafiltrationszelle aufkonzentriert. Somit erhielt man etwa 5 bis 10 mg/ml Protein in 20 mM Tris / pH 7,7 / 10 mM MgSO₄ / 125 mM LiCl / 1,2 % β -OG / 3 mM NaN₃.

4.2 Rekonstitution und 2D-Kristallisation

Der Puffer zur Verdünnung der Proteinlösung ist bei erhöhtem Detergenzanteil an den Elutionspuffer der ScrY-haltigen Fraktionen aus der Proteinreinigung angelehnt: 20 mM Tris (pH 7,7), 10 mM MgSO₄, 100 mM LiCl, 2 % β -OG.

Die Lipide wurden in vorher ausgeglühte Schliff-Röhrchen eingewogen und Stammlösungen in Methanol (10 mg/ml) angesetzt (Dimyristoyl-L- α -Phosphatidylcholin, C14:0, $T_{trans} = 23$ °C, DMPC und β -Palmitoyl- γ -Oleoyl-L- α -Phosphatidylcholin, C16:0/C18:1, $T_{trans} = -2$ °C, POPC). Zur Herstellung der Lipid-Detergenz-Lösungen wird jeweils eine entsprechende Menge davon in ein frisches, ausgeglühtes Glasröhrchen gegeben und im Rotationsverdampfer bei etwa 20 Torr und 30 - 40 °C getrocknet. Anschließend wird der Lipidfilm in Proteinpuffer, allerdings mit 20 % β -OG, gelöst und anschließend mit detergenzfreiem Puffer auf 1 mg/ml Lipid bzw. 2 % β -OG verdünnt.

Die Proteinlösung wurde zunächst durch einen Filter der Ausschlussgröße 100 nm gereinigt, um

Proteinaggregate und Verunreinigungen, die die Rekonstitution stören können, auszuschließen (Hamilton-Spritzenfilter, Bonaduz, Schweiz; Filterscheiben von Whatman, England). Die Rekonstitutionsansätze wurden dann aus Protein-Detergenz-Lösung, dem o.g. Puffer und den Lipidlösungen so gemischt, dass sich eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml ergab. Ebenso wurden die jeweils gewünschten Massenverhältnisse Lipid-Protein (LPR, wurde von 0 bis 1 variiert), sowie die jeweiligen Anteile der beiden Lipide an der Gesamt-Lipidmasse eingestellt (DMPC/POPC, DMPC-Anteil wurde variiert von 100 % bis 40 %). Die Ansätze wurden vor Beginn der Dialyse mindestens eine Stunde lang bei Raumtemperatur äquilibriert.

Die Ansätze konnten nun in Mikrodialyse-Buttons (Hampton Research, Laguna Hills, CA, USA) gefüllt werden. Es handelt sich hierbei um kleine zylindrische Kunststoffblöckchen mit einer Vertiefung für das Dialysat. Diese werden nach dem Befüllen mit einem Stück Dialysemembran vorsichtig bedeckt (möglichst ohne Blasen), welche mit Hilfe eines O-Rings fixiert und damit abgedichtet wird (Rille seitlich). Es hat sich bewährt, statt des mitgelieferten Holzstempels die Membran bzw. den Dichtungsring mittels einer vorne abgeschnittenen Plastikspritze mit Gummikolben aufzubringen (Membran leicht „ansaugen“, auf befüllten Button drücken und O-Ring von der Spritze auf den Button rollen). Die Buttons wurden in Schnappdeckel-Gefäße mit Dialysepuffer (ca. 10 ml, anfänglich noch detergenzhaltiger Proteinpuffer) getaucht, in die jeweils Schläuche für Unterschichtung mit neuem Dialysepuffer und Abführung von Puffer durch den Deckel geführt wurden.

Alternativ zu den Buttons wurden Durchflusszellen (Eigenbau AG Welte, modifiziert) verwendet (Prinzip vergleichbar Jap et al., 1992). Diese bestehen aus jeweils zwei Plexiglas-Blöcken, die gegeneinander geklemmt werden können (auf einem Edelstahlblock mit Edelstahlschrauben). Der untere Block enthält die (drei) Durchflusskammern für den Dialysepuffer mit jeweils zwei abschraubbaren Schlauchstutzen. Der obere enthält passgenau dazu die (drei) Kammern für das Dialysat. Die Dialysemembran wird zwischen die beiden Blöcke gespannt, bevor diese gegeneinander verschraubt werden und trennt so Durchflusskammer und Dialysatkammer. Beim Montieren wird darauf geachtet, dass alle Teile sauber sind und die Membranen nicht austrocknen können. Es werden daher bereits vorher die Schläuche für den Dialysepuffer angeschlossen und (anfänglich noch mit detergenzhaltigem Proteinpuffer) durchspült. Sind die Kammern dicht verschraubt, wird über die obere Öffnung jeweils Dialysat zugegeben, die Kammer mit sauberem Laborfilm abgedeckt und mit einem Plexiglasdeckel mittels zweier Schrauben fest verschlossen. Von diesen Dialyseblocks standen vier zur Verfügung, es konnten also 12 Ansätze gleichzeitig dialysiert werden.

Die verwendete Dialysemembran hatte eine Ausschlussgröße von 25 kDa. Sie wurde jeweils durch kurzes Kochen in 10 mM NaHCO₃-Lösung und dann in 10 mM Na₂EDTA sowie mehrmaliges

Waschen in ddH₂O vorbehandelt (Lagerung danach in 20 % Ethanol).

Bei der Durchflussapparatur wurden jeweils 50 μ l Dialysat pro Kammer eingesetzt, die Buttons wurden mit 30 bis 50 μ l Dialysat befüllt. Die Blöcke wurden seitlich in ein thermostatisierbares Wasserbad gelegt (Membran senkrecht), damit sich evtl. Gasblasen in den Durchflusskammern nicht unter der Membran sammeln konnten. Die Gefäße mit den Buttons wurden ebenfalls in das Bad gestellt. Das Wasserbad, ein ausrangiertes PCR-Gerät (Autogene II, Grant Instruments, UK), ist programmierbar, das heißt durch Verkettung von Einzelprogrammen kann der komplette benötigte Temperaturverlauf samt den Temperaturrampen zusammengestellt werden. Die Dialyse wurde bei 20 °C gestartet (12 h), dann erfolgte eine Temperaturrampe nach 37 °C (8,5 h), dann Dialyse bei 37 °C (20 h), eine Temperaturrampe nach 20 °C (8,5 h), und schließlich wieder Dialyse bei 20 °C (etwa 20 h). Der Temperaturverlauf wurde zu Kontrollzwecken über einen Temperaturfühler mittels eines Schreibers aufgezeichnet. Es wurde außerdem die Auswirkung eines zweiphasigen Temperaturverlaufs (20 ° → 37 ° → 20 ° → 37 ° → 20 °C; 70 h) auf Rekonstitution und Kristallisation getestet.

Der Dialysepuffer wurde über peristaltische Pumpen (Gilson Miniplus 2) aus dem Depotgefäß zugeführt. Er enthielt zuletzt 20 mM MES/pH 6, 100 mM LiCl, 80 mM MgCl₂ und 3 mM NaN₃. Im Laufe dieser Arbeit wurde der pH-Wert zwischen pH 6 (20 mM MES), pH 7 (20 mM HEPES) und pH 8 (20 mM Tris) variiert, die Konzentration von MgCl₂ zwischen 2 mM und 80 mM. Die Durchflussrate pro Zelle bzw. Button (50 μ l) betrug 0,1 bis 0,15 ml/min (also 2 bis 3 μ l/min pro 1 μ l Dialysat), zuletzt 0,13 ml/min.

4.3 Elektronenmikroskopie

Zur schnellen Qualitätskontrolle der verschiedenen Rekonstitutionsansätze wurden direkt nach der Dialyse Proben nach dem Negativkontrastierungsverfahren präpariert und am Transmissionselektronenmikroskop durchgesehen (Kühlbrandt, 1992). Dabei wurden die Größe der Vesikel, die Dichte an Protein in der Membran (reine Lipidvesikel oder dicht mit Protein bepäckte?), Anwesenheit von „Zwiebelschalenstrukturen“ (zu viel Lipid?), Anwesenheit von Verunreinigungen, kleinen Partikeln bzw. Mizellen (Dialyse vollständig?) und Proteinaggregaten registriert. Auch das gereinigte und in Detergenzlösung aufbewahrte Protein wurde auf Aggregate untersucht, die die Rekonstitution stören könnten.

Für die Adsorption der Vesikel wurden mit Formvar befilmte und mit Kohlenstoff bedampfte Netzchen verwendet. Da der Kohlefilm mit der Zeit hydrophob wird, wurden die Netzchen vor Gebrauch 15-30 s in einer teilevakuierten Glimmentladungskammer behandelt (Plasma Cleaner/-Sterilizer PDC-3XG, Harrick). 1,5 μ l Dialysat wurden zur Adsorption auf das Netzchen gegeben,

nach 45 s wurde das Netzchen mit dieser Oberfläche über zwei Tropfen Wasser und einen Tropfen Uranylacetatlösung (2 %) gezogen (Waschen). Danach wurde das Netzchen auf einem zweiten Tropfen Uranylacetatlösung 10 bis 20 s lang inkubiert. Restliche Kontrastierungslösung wurde dann auf einem Filterpapier abgesogen. Die abgetrockneten Präparate wurden an einem Elektronenmikroskop (Zeiss EM 900) bei 50 kV und 12000- bis 50000-facher Vergrößerung mikroskopiert und photographiert.

5 Vorbereitung von Präparaten für das SFM

5.1 Zellen

Zellkulturen (s. o.) wurden aus der Zellkulturschale genommen und in dem jeweiligen Medium (frisch, ohne Serum und ohne Methylzellulose) gewaschen. Kulturen auf Deckgläschen wurden auf einen Spiegel gleichen Durchmessers (siehe 1.5) gelegt und zusammen mit diesem mittels einer Klemmhalterung aus Federblech (Edelstahl) auf dem Scanner fixiert (Topometrix Discoverer mit becherförmiger Wasserzelle auf dem Scanner). Alternativ dazu wurde das (feuchte) Deckglas mit Gewebekleber auf einen verspiegelten Präparateträger geklebt. Dieser wurde aus einem etwa $12 \times 12 \text{ mm}^2$ großen Glasplättchen (aus Objektträger geschnitten) hergestellt, auf das von unten ein verspiegeltes Deckglas sowie ein Stahlplättchen zur magnetischen Fixierung geklebt wurde (mit Epoxidharz-Zweikomponentenkleber). Auch Zellkulturen auf PVPK-Substratplättchen wurden auf diesem Präparateträger fixiert, entweder mit Gewebekleber, oder, nach vorherigem Abtrocknen der Unterseite, mit zwei bis drei kleinen Tropfen Zweikomponentenkleber am Rand des Plättchens. Mit diesem Träger konnte im „hängenden Tropfen“ (s. 6.) gemessen werden. Lebende Zellen wurden in jeweils serumfreiem, methylzellulosefreiem Medium gerastert, fixierte Zellen in PBS.

5.2 Adsorption von Protein aus Lösung

5.2.1 Immunoglobulin M

Eine IgM-Lösung (0,08 mg/ml) wurde $1:10^6$ in PBS verdünnt. Ein Tropfen dieser Lösung wurde auf Harnstoff-modifiziertes FP-Substrat aufgebracht und nach 15 s mit PBS gespült.

5.2.2 Collagen

Säurelösliches Collagen (Typ I) wurde aus einer „gesättigten“ Lösung in PBS 30 min lang bei 4 °C auf Brenzkatechin-FP adsorbiert und die Probenplättchen danach mit PBS gespült. Collagen-Präparationen dieses Typs zeigen eine Löslichkeit von 0,1 bis 1 mg/ml nach vielen Stunden der Inkubation (Gallop et al., 1957; Gallop und Seifter, 1963). Die hier verwendete Lösung wurde aus gefriergetrocknetem Collagen durch lösen in PBS über Nacht bei 4 °C hergestellt. Als Kontrolle wurde dieselbe Lösung auf Glimmer adsorbiert. Messung in PBS.

5.3 Adsorption von Membranpräparationen

5.3.1 Purpurmembran

Kontrollexperimente mit Purpurmembran wurden durchgeführt, da zweidimensionale Kristalle dieses Proteins bereits eingehend am SFM untersucht wurden (z. B. Müller et al., 1995) und damit die auf FP-Substrat erreichbare Auflösung anhand bekannter Strukturdetails geprüft und verglichen werden kann. Ein Tropfen einer Suspension von Purpurmembran (Müller et al., 1995) in Pufferlösung (10 mM Tris, 200 mM KCl, pH 8) wurde auf eine frisch präparierte FP-Oberfläche (Brenzkatechin- oder Phenylendiamin-FP) aufgebracht, mindestens 30 min inkubiert und danach mit demselben Puffer heruntergespült. Diese und alle anderen Präparate wurden in einer wassergesättigten Atmosphäre inkubiert, um Austrocknen und damit Artefakte zu verhindern.

5.3.2 Membranfragmente mit Na,K-ATPase

Eine Membransuspension wurde hergestellt wie in Apell et al. (1993) beschrieben (ohne Verwendung von Phospholipase). Ein Tropfen dieser Suspension wurde auf ein Substratplättchen aus Brenzkatechin-FP oder Glimmer aufgebracht, 30 min inkubiert und danach mit Puffer gespült. Kristallisations- und Messpuffer: 5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 5 mM H₃PO₄, 20 mM Tris pH 7,2 (modifiziert nach Linder, 1995). Einwertige Ionen sind unerwünscht, da sie die Pumpe in einen anderen Zustand bringen. Alternativer Messpuffer: 20 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 20 mM Tris pH 7,2.

5.3.3 Rekonstituiertes Sucroseporin

Je nach Sauberkeit der Präparation (Kontrolle am Elektronenmikroskop, s. 4.3) wurde zuvor noch ein Reinigungsschritt vorgenommen: Die Vesikelsuspension wurde 5 min bei 4000 Umdrehungen

pro Minute in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, das Pellet in Dialysepuffer ohne Azid (bildet schwerlösliche Niederschläge) resuspendiert und das Ganze nochmal wiederholt. Dann wurden ca. 10 μl Adsorptionspuffer auf eine frisch gespaltene Glimmerfläche pipettiert. In diesen Puffertropfen wurde 1 μl Vesikelsuspension gegeben und vorsichtig, ohne den Glimmer mit der Pipette zu berühren, gemischt. Dieses Mischungsverhältnis musste bisweilen leicht angepasst werden, da die Vesikelkonzentration von Ansatz zu Ansatz variierte. Der Adsorptionspuffer war in pH und Ionenstärke an den jeweiligen Dialysepuffer angelehnt, $[\text{Mg}^{2+}]$ mindestens auf 20 mM verringert. Inkubation erfolgte 1 h bei Raumtemperatur (Messlabor), danach wurde mit Messpuffer gespült. Es wurde auch in Messpuffer angelagert, reproduzierbare Unterschiede zur Adsorption in Anlagerungspuffer konnten nicht festgestellt werden. Für die Messung musste die Konzentration an zweiwertigen Ionen drastisch verringert werden. Gute Ergebnisse wurden mit einem Messpuffer der Zusammensetzung 250 mM LiCl, 2 bis 0 mM MgCl_2 , 20 mM Tris/HCl/pH 7,6 erzielt. Im Lauf der Untersuchungen wurde die Konzentration von LiCl zwischen 100 und 300 mM variiert, der pH zwischen pH 6 und pH 8 (MES, HEPES, Tris). Alle Reinigungs-, Adsorptions- und Messpuffer wurden mit hochreinem Wasser hergestellt.

6 Messungen am SFM

6.1 Vorbereitung der Flüssigkeitsmesszelle

Die Flüssigkeitszellen (Sensorhalterungen) und ihre Bestandteile wurden in Spülmittellösung (in ddH₂O) gewaschen, nach längerer Inkubation in der Spüllösung wurde das Gefäß mit der Flüssigkeitszelle eine bis wenige Minuten in ein Ultraschallbad gehalten. Es wurde hierfür ein Kunststoffbecher verwendet, da die Wasserzelle für das *DI-Multimode* aus Glas besteht (Gefahr der Beschädigung). Danach wurde mehrmals in ddH₂O gespült, dann in reinem Ethanol (hochrein), wässriger Ethanolösung und ddH₂O oder hochreinem Wasser. Bei der Reinigung wurden die Flüssigkeitskanäle der DI-Wasserzelle mehrmals mit Hilfe einer Pipette durchgespült. Das Fenster-Prisma der Wasserzelle/Sensorhalterung für den *Topometrix-Discoverer* wurde nur mit Seifenlauge, nicht aber mit Alkohol behandelt (Ethanol greift Plexiglas an). Das Fenster für den Mess-Laser wurde unter einem Binokular auf verbliebene Kontaminationen untersucht, die mit einem alkoholgetränktem weichen Linsenpapier vorsichtig entfernt wurden (bei dem Plexiglas-Prisma mit Spülmittellösung), danach wurde die Reinigungsprozedur ggf. nochmal wiederholt.

6.2 Einbau des Präparats und Äquilibrieren

Das Messlabor (*DI Nanoscope*, Messungen an Sucroseporin) wurde auf 20 °C thermostatisiert. Die Präparate wurden nach dem Spülen mit einem Tropfen Messpuffer bedeckt und auf den Scanner montiert. Die Sensorhalterung wurde mit einem Sensorchip bestückt und eingebaut. Dann wurde der Messkopf dem Präparat so weit angenähert, bis sich ein Flüssigkeitsmeniskus zwischen Laser-Fenster/Sensorhalterung und Präparatplättchen bilden konnte. Diese Art der Messung im „hängenden Tropfen“ war sowohl mit der Sensorhalterung (Eigenbau Tantal-Plexiglas) für den *Topometrix-Discoverer* als auch mit der Flüssigkeitszelle für das *DI-Multimode* möglich (bei letzterem Verwendung der Wasserzelle ohne den mitgelieferten Dichtungsring). Es war dabei also keine becherförmige Flüssigkeitszelle nötig, der Scanner wurde aber zur Sicherheit zusätzlich jeweils mit einem Stück Folie, Parafilm oder Latex gegen eindringende Flüssigkeit geschützt. Zellen wurden entweder im hängenden Tropfen oder in der über den Scanner zu stülpenden becherförmigen Flüssigkeitszelle (für *Topometrix-Discoverer*, s. 1.3.4) gemessen.

Nach Justierung des Messlasers auf die Rückseite des Federbalkens wurde so lange äquilibriert, bis die anfangs schnelle Drift des Differenzsignals (Bimetalleffekt des goldbeschichteten Federbalkens und andere Ausgleichsvorgänge) einigermaßen abgeklungen war.

6.3 Messung

Nach einem ersten erfolgreichen Versuch, den Sensor in Kontakt mit dem Substrat zu bringen (Federbalkenauslenkung im Kontakt gemäß vorgegebenem Sollwert bei eingestellter Regelung) wurden Kraftdistanzkurven aufgenommen, zunächst möglichst auf dem harten Substrat. Diese dienen der Kalibration der Federbalkenauslenkung in nm (nur *Multimode*) und auch der Funktionskontrolle des Federbalkens (manche Balken erweisen sich dabei als defekt). Außerdem kann damit eine erste Abschätzung des Ausmaßes adhäsiver und/oder repulsiver Wechselwirkungen bei Annäherung und Rückbewegung von Sensorchip und Substrat vorgenommen werden (sowohl auf hartem Substrat als auch auf Zellen bzw. Membranfragmenten). Eventuelle (visko)elastische Eigenschaften des Objekts (Zellen!) können ebenfalls visualisiert werden. Dann werden die Regelungsparameter (P, Proportional und I, Integral, bei *Topometrix* zusätzlich D, Differenzial) so optimiert, dass es noch nicht zu Regelkreis-Oszillationen kommt (Kontrolle des Signals im Oszilloskop-Modus). Erst dann wird die Rasterungsbreite von 0 auf den gewünschten Wert hochgesetzt. Der Winkel der schnellen Rasterungsrichtung (Rasterungszeilen) in Relation zur Achse des Federbalkens wurde meist auf 90 ° eingestellt und ggf. variiert, um richtungsabhängige Abbildungseffekte bzgl. der gemessenen Oberflächen zu testen. Nach Aufnahme eines ersten Übersichtsbildes kann die maximale Piezospannung (max. Piezohub) eingestellt werden (nur *Nanoscope*). Die Auflösung von

16 bit wird dann auf den maximal notwendigen Hub kalibriert, womit die tatsächliche axiale Messgenauigkeit jeweils optimiert wird. Für Übersichtsaufnahmen wird meist das Topographiesignal (Piezobewegung) und das Fehlersignal (Federbalkenauslenkung, zur Kontrolle der Regelungsgüte) sowie evtl. das Reibungssignal (Torsionsauslenkung des Federbalkens) aufgezeichnet. Bei hochaufgelösten Zoomaufnahmen empfiehlt sich die simultane Aufnahme des Topographiesignals von Hin- und Rückrasterung zur Kontrolle richtungsabhängiger Effekte/Artefakte (z. B. kraftinduzierte Verformung). Die Zeilenfrequenz wird jeweils optimiert, um Verzerrungen durch laterale Piezodrift zu minimieren. Durch Einstellung des Sollwerts der Federbalkenauslenkung wird die Auflagekraft minimiert. Es wird die eine minimale Differenz des Sollwerts zum Wert des freien Balkens eingestellt, bei der noch guter Bildkontrast bei minimaler Beschädigung des Objekts zu erreichen ist. Aufgrund der thermischen Drift des Federbalkens muss der Sollwert während der Messung ständig manuell nachgestellt werden. Alle in dieser Arbeit gezeigten Messungen erfolgten im Kontaktmodus.

Der oszillierende Modus (1.1.6) wurde in dieser Arbeit nicht angewendet. Während der Vorversuche hatte sich ergeben, dass der für die Anregung zur Verfügung stehende Frequenzbereich bei dem zunächst zur Verfügung stehenden System (*TopoMetrix*) unzureichend war. Daher wurde auch davon abgesehen, durch einen Umbau den Mangel zu beseitigen, dass bei Arbeiten in Flüssigkeit eine Anregung nur über das Oszillieren des Präparate-Scanners möglich war, nicht aber durch Anregung des Sensors oder des Sensorchips.

7 Datenaufbereitung und -Analyse

7.1 Analyse der Rohdaten und Datenexport

Die Messprogramme der Kraftmikroskope (Versionen Nanoscope 4.31r6, 4.42r1, Digital Instruments; SPMLab 4.0, TopoMetrix) bieten, neben der Ansteuerung des Instruments, „offline“ eine Reihe von allgemeinen Bildverarbeitungsfunktionen, die der *Korrektur* und Filterung von Bilddaten dienen und diverse *Messfunktionen* bzw. Funktionen zur Berechnung quantitativer Parameter sowie Funktionen zur anschaulichen *Präsentation* der Bilder beinhalten.

Unter den Möglichkeiten zur Korrektur der Messdaten (Topographie) war hier hauptsächlich die Option „Flatten“ von Bedeutung: dabei wird von jeder Bildzeile eine jeweils einzeln angepasste, lineare Funktion subtrahiert. Sowohl eine durch ein nicht ideal in der Rasterungsebene montiertes Präparat oder durch Drifteffekte in z-Richtung verursachte lineare Neigung in Scanrichtung (x) als auch ein durch die zeilenweise Bildgeneration bedingter häufiger relativer Offset von Bildzeilen werden so korrigiert (Guckenberger in Colton et al., 1998). Letzteres sowie die Korrektur einer Neigung in y-Richtung gelingen mit dieser Methode nur, wenn alle Bildzeilen unter der Annahme vorheriger „idealer“ Korrektur im Prinzip den selben Mittelwert aufweisen. Dies ist aber bei Vorhandensein „großer“ Oberflächeneigenschaften nicht der Fall, hier ist der jeweils aus dem Zeilenmittel berechnete subtrahierte konstante Anteil größer. Idealerweise beschränkt man die Berechnung des zeilenweisen Flattening daher auf bestimmte Bildbereiche, z. B. das als eben zu definierende Substrat (praktisch geschieht das interaktiv durch Ausschluss abgebildeter „großer Partikel“). Problematisch ist die zeilenweise Korrektur nur bei exakt in y-Richtung orientierten Periodizitäten oder Stufen, diese werden nivelliert. Bei nicht vorhandenem Zeilen-Offset kann hier auch von dem gesamten Bild eine Fläche 1. Ordnung subtrahiert werden (entweder „Plane Fit“ also durch Berechnung einer zweidimensionalen Fitfunktion oder durch „manuelle“ Definition dreier Punkte der Substratebene, die die Fläche aufspannen sollen). Bei diesen Methoden linearer Driftkorrektur geht mit genannter Einschränkung keine Information über Korrugationen verloren. „Flattening“ oder „Plane Fit“ höherer Ordnung wurden nicht angewandt.

Für die schnelle Evaluation der Rohdaten ist die Erzeugung von Linienprofilen beliebiger Richtung nützlich, verbunden mit der Möglichkeit der Messung von Abständen, Höhen, Winkeln, eindimensionalen FFT-Spektren und Rauigkeitswerten. Für den gesamten Bildbereich bzw. für Ausschnitte daraus können statistische Eigenschaften berechnet werden wie Histogramme der Messdaten oder die *Rauigkeit*, beispielsweise als Standardabweichung mit \bar{Z} , Mittelwert, $i = 1, \dots, N$: $R_{rms} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum (Z_i - \bar{Z})^2}$ (rms, „root mean square“). Eine zweidimensionale FFT-Funktion (Fast Fourier Transform, z. B. Russ 1999) mit entsprechenden Analyse- und Filterfunktionen ist ebenfalls implementiert.

Der Daten-Export kann im ASCII-Format erfolgen (Rohdaten für Verarbeitung in externen Bildverarbeitungssystemen), die Ausgabe der intern verarbeiteten bzw. anschaulich dargestellten Bilddaten in diversen Bitmap-Formaten (z. B. BMP, TIFF).

7.2 Mittelungsverfahren

Einzelpartikelsuche, Alignment und Mittelung wurden mit dem Bildverarbeitungssystem SPIDER gerechnet (System for Processing Image Data from Electron microscopy and Related fields, Health Research Inc., Rensselaer, NY). Dieses System wurde speziell für Verfahren der Einzelpartikelmitteilung von Makromolekülen sowie multivariate statistische Klassifikation und 3D-Rekonstruktion in der Elektronenmikroskopie entwickelt (Frank, Radermacher et al., 1996). Aus Programmmodulen verschiedener Hierarchieebenen sind komplexe vorgefertigte Bildverarbeitungsfunktionen aufgebaut, die einzeln als sogenannte SPIDER-Operationen interaktiv per Kommandozeile abrufbar sind. Aus verschiedenen einzelnen Operationen können wiederum individuelle Batch-Skripte bzw. Prozeduren zusammengestellt werden, um die gesamte Prozessierung von Bilddaten in der gewünschten Weise zu bewerkstelligen. Eine Manipulation des Fortran-Quellcodes der Operationen ist im Normalfall nicht notwendig, gleichwohl ist dieser transparent und daher im Prinzip auch veränderbar. Dieser modulare Aufbau sowie mitgelieferte Musterprozeduren und eine gute Dokumentation (http://www.wadsworth.org/spider_doc/spider/docs/spider.html) ermöglichen auch die unproblematische Erstellung von Prozeduren für die Verarbeitung rasterkraftmikroskopischer Aufnahmen. SPIDER wurde unter Irix 6.5 auf einer SGI-Workstation (Silicon Graphics) betrieben. Neben dem rationellen Zugang zum eigentlichen Bildverarbeitungssystem über Kommandozeile bzw. Skripte werden die Visualisierung sowie interaktive Funktionen wie Wahl von Bildausschnitten, manuelle Kategorisierung und dergleichen über das selbständige zugehörige Programm "WEB" ausgeführt, das eine graphische Benutzeroberfläche basierend auf dem Motif/XWindow-System bietet.

Die folgende knappe Darstellung der Grundlagen hier angewandter Bildverarbeitungsfunktionen orientiert sich vorwiegend an Frank (1996). Die für die entsprechende Bearbeitung der Rohdaten jeweils erstellten oder modifizierten Skripte unter SPIDER sind im Anhang abgedruckt.

7.2.1 Import der Rohdaten

In SPIDER wurden ausschließlich Rohdaten aus *Nanoscope* verarbeitet (nach vorherigem Flattening erster Ordnung). Da hier in der Regel zwei Kanäle (Topographie und Fehlersignal) aufgenommen wurden, diese aber in einer Datei abgespeichert sind, muss zunächst in *Nanoscope*

eine getrennte Abspeicherung erfolgen (Image - Split Images), danach erfolgt der Export der ursprünglich als Binary (16 Bit pro Pixel) abgespeicherten Rohdaten (Topographie) in ASCII-Format (Utility - ASCII-Export). Der Header der Datei kann gleich hier oder später in einem Zeileneditor entfernt und separat abgespeichert werden. Dieser enthält wichtige Daten über Skalierung bzw. Scanner-Eichung sowie weitere Aufnahme-Parameter. In SPIDER erfolgt der Import von ASCII-Datensätzen (Operation CP FROM ASCII), eine Spiegelung an der x-Achse zur Wiederherstellung der ursprünglichen Orientierung (MI), die Skalierung in nm und die Subtraktion einer Ebene mit dem Wert des Bildminimums zur Herstellung positiver Pixelwerte (AR). Dies geschieht alles mit der Prozedur DIconv.sys (oder integriert in Skript b00.*). Dabei muss der axiale Kalibrationswert des Scanners $[\frac{nm}{V}]$ und der bei der Aufnahme eingestellte maximale Piezohub [V] eingegeben werden (letzterer wird bei der Messung mit 16 Bit Auflösung skaliert).

7.2.2 Selektion von Einzelpartikeln

Neben einer bei der vorliegenden Größe von Datensätzen durchaus noch vertretbaren manuellen Selektion zu mittelnder Partikel wurden zwei automatisierte Verfahren angewandt:

7.2.2.1 Automatische Partikelauswahl

Zum einen ist das ein Verfahren auf Grundlage einer mit Hilfe texturaler Parameter gewonnenen „Unterscheidungsfunktion“ (Lata et al. 1995). Dieses erfolgt in drei Phasen, einer vorbereitenden Phase, einer Trainingsphase und schließlich der automatischen Selektion. In der Vorbereitungsphase (Batch-Programm b00.*) werden zunächst Partikel einer vorgegebenen Größe ausgesucht. Dabei wird die Verwendung eines Referenzbildes vermieden, die Suche nach den Objekten erfolgt unter deren Näherung in Form einer Gaussfunktion passender Breite $\sigma_x = \frac{d}{2}$ (d: Partikeldurchmesser, σ_x : Standardabweichung Gaussfunktion), und zwar durch vorherige Gauss-Tiefpassfilterung im Fourierraum mit dem entsprechenden Filterradius $\sigma_\kappa = \frac{1}{\pi d}$ ihrer Transformierten. Die eigentliche Detektion der Objekte folgt als Suche nach den höchsten Maxima in Umgebungen, die jeweils der Partikelgröße entsprechen. - Auf die nach Lata et al. (1995) dem Ganzen noch vorausgehende Reduktion der Bildgröße/Pixelanzahl konnte aufgrund der geringeren Größe und des besseren Kontrasts der SFM-Bilder verzichtet werden. - In der folgenden Trainingsphase werden aus dem ursprünglichen Bild gemäß den Koordinaten der erhaltenen Maxima ausgeschnittene kleine Datenfenster manuell kategorisiert. Dies erfolgt in „WEB“ (Funktion Command - Categorize, danach SPIDER-Operation AT IT zur sortierten Speicherung der Ergebnisse in einer Datei). Dabei wird eine Zuordnung zu den drei Gruppen „Partikel“, „Rauschen“ (entsprechend dem die Partikel umgebenden Hintergrund) und „Junk“ (für Partikelaggregate, Artefakte etc.), vorgenommen. Die Eigenschaften der kategorisierten Bildfenster gehen in Form von „Feature-Vektoren“ in

die Discriminant-Analyse ein (SPIDER-Operation AT SA), deren Ergebnis, die Unterscheidungsfunktion (discriminant function), die Grundlage für die spätere automatische Selektion darstellt. Diese Vektoren bestehen aus jeweils neun Komponenten, von denen sieben die statistische Verteilung von Pixeln im Datenfenster beschreiben. Drei davon beschreiben globale, vier weitere lokale Variationen, hierzu werden die Datenfenster nochmals mittels eines „Hopping Window“ unterteilt. Ein weiterer Parameter ist die globale statistische Entropie und der neunte schließlich liefert eine Abschätzung der von dem jeweiligen Objekt eingenommenen Fläche. Man erhält für die drei hier definierten Kategorien zwei lineare Unterscheidungsfunktionen. Diese maximieren das Verhältnis der Varianz der Eigenschaften zwischen den Gruppen zu derjenigen innerhalb der Gruppen. Repräsentiere $X^T = (X_1, \dots, X_9)$ den zu einem Datenfenster gehörigen Feature-Vektor und $Y = \hat{b}^T X$ die lineare Unterscheidungsfunktion, dann ist \hat{b} so zu wählen, dass das Verhältnis der Quadratsummen (zwischen den Gruppen versus innerhalb der Gruppen)

$$\hat{\lambda} = \frac{\hat{b}^T B \hat{b}}{\hat{b}^T W \hat{b}}$$

maximal wird. (B: Matrix der Quadratsummen und Kreuzprodukte zwischen den Gruppen, W: Matrix der Quadratsummen innerhalb der Gruppen, das Caret symbolisiert messungsbasierte Abschätzung). Partielle Differenziation von $\hat{\lambda}$ nach \hat{b} gleich null gesetzt ergibt nach Umformung:

$$(W^{-1}B - \hat{\lambda}I)\hat{b} = 0.$$

($\hat{\lambda}$ größter Eigenwert, \hat{b} der zugehörige Eigenvektor von $W^{-1}B$, I Einheitsmatrix). Die Komponenten von \hat{b} entsprechen der Gewichtung der einzelnen Parameter in der Unterscheidungsfunktion. Die relative Größe der Eigenwerte $\hat{\lambda}_j$ stellt einen Index der Wichtigkeit der einzelnen Achsen im „Discriminant Space“ (aufgespannt von den j linearen Unterscheidungsfunktionen) dar. Näheres zur Mathematik der Discriminant Analysis in Dillon und Goldstein (1984). Das Ergebnis lässt sich als Verteilungskarte der in die Analyse eingegangenen Datenfenster im „Discriminant Space“ darstellen (Koeffizienten, Anteil korrekter Zuordnung in der Trainingsphase und Verteilungskarte: s. Projekte und Ergebnisse, 3, Abb. 31). Die Trainingsphase muss nur einmal mit einer geeigneten Anzahl einzelner Datenfenster bzw. einem kleinen Teil eines größeren Datensatzes einheitlicher statistischer Eigenschaften durchlaufen werden. Die letzte Phase, die automatische Selektion, beinhaltet die Partikelsuche im gesamten Datensatz, also einen nochmaligen Lauf des Programms b00.* (evtl. mit einem höheren Schwellenwert für die anfängliche Suche nach Maxima) und anschließend die automatische Auswahl „echter“ Partikel mit Hilfe der zuvor ermittelten Unterscheidungsfunktion (SPIDER-Operation AT WN).

7.2.2.2 Referenzgestützte automatische Partikelwahl

Die zweite Methode zur automatischen Partikelselektion basiert auf einer referenzgestützten Suche mittels Kreuzkorrelationsfunktion, CCF, (Frank und Wagenknecht, 1984), beruht also auf demselben Prinzip wie die klassische Korrelationsmittelung von nicht idealen Kristallen (s. Abschnitt 7.2.3.1, Prozedur corrav1.* zur Ermittlung der Korrelationsmaxima, SPIDER-Operation WV zum Ausschneiden von Bildfenstern um die ermittelten Partikel). Das Problem der im allgemeinen Fall (im Gegensatz zum Kristall) zufälligen Orientierung der Partikel in der Bildebene wird hier durch die Verwendung eines rotational gemittelten Bildes eines Partikels gelöst (Ausschneiden eines Fensters mit zentriertem Partikel in WEB und SPIDER-Operation RO I, evtl. vorher Zentrieren mittels CG und SH). Damit ist sichergestellt, dass Partikel unabhängig von ihrer Orientierung dieselben Werte in der Kreuzkorrelationsfunktion ergeben. Im übrigen ähnelt diese CCF in der Umgebung eines Partikels seiner Autokorrelationsfunktion. Dies wurde von Frank und Wagenknecht (1984) zur Ermittlung der Orientierung des Partikels ausgenutzt. In vorliegender Arbeit wurden allerdings nach beiden hier genannten Methoden ausgewählte Partikelserien einem referenzfreien rotationalen und translationalen Alignment unterworfen (s. 7.2.3).

7.2.3 Ausrichtung der Partikel („Alignment“)

Die zu mittelnden Strukturen müssen zunächst zur Deckung gebracht werden, um ein sinnvolles Mittel bilden zu können, ein Vorgang, der als „Alignment“ bezeichnet wird. Im Falle eines homogenen Datensatzes geht man davon aus, dass ein Satz von Bildern ein gemeinsames Motiv enthält, das sich von Bild zu Bild im Wesentlichen nur in einer Rauschkomponente unterscheidet. Ein Satz von N digitalisierten „Bildern“ eines Partikels $\{p_{ij}; i = 1 \dots N; j = 1 \dots J\}$ (Pixelzahl $J = L \cdot M$) muss dann durch entsprechende Koordinatentransformationen T_i so zur Deckung gebracht werden, dass jeder Pixel in dem so transformierten Satz p'_{ij} demselben Punkt im Koordinatensystem der 2D-Projektion des Partikels entspricht. Das Mittel nach Alignment des homogenen Datensatzes ist dann:

$$\bar{p}_j = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N p'_{ij}$$

Im allgemeineren Fall eines heterogenen Datensatzes, bestehend beispielsweise aus Projektionen unterschiedlicher Ansichten oder Konformationen eines Partikels oder ganz unterschiedlicher Partikel, wird Alignment definiert als eine Transformation, die die Minimierung eines Funktionals wie z. B. des euklidischen Abstands impliziert. Eine Eigenschaft des Alignments besteht hier darin, dass Objekte einer homogenen Untergruppe des Datensatzes in derselben Weise zur Deckung gebracht werden, wie für den homogenen Fall beschrieben, während Objekte aus verschiedenen Untergruppen in eine bestimmte konsistente geometrische Konstellation zueinander gebracht wer-

den. Letztere Eigenschaft kann für die Klassifikation in verschiedene Untergruppen herangezogen werden.

7.2.3.1 Referenzgestützte Suche und Alignment mittels translationaler Kreuzkorrelationsfunktion

Interpretiert man die durch J diskrete Messungen repräsentierten beiden Bilder

$$\{f_1(r_j), j = 1 \dots J\}, \{f_2(r_j), j = 1 \dots J\}$$

als Vektoren eines J -dimensionalen kartesischen Koordinatensystems, dann kann man den Betrag des Differenzvektors (euklidischer Abstand E_{12}) als inverses Maß für die Ähnlichkeit der beiden Bilder heranziehen. Unter Verwendung der Rotation (Rotationsmatrix R_α) und der Translation (Vektor r') als Parameter für die Positionssuche beim Alignment gilt:

$$\begin{aligned} E_{12}^2(R_\alpha, r') &= \sum_{j=1}^J [f_1(r_j) - f_2(R_\alpha r_j + r')]^2 \\ &= \sum_{j=1}^J [f_1(r_j)]^2 + \sum_{j=1}^J [f_2(R_\alpha r_j + r')]^2 - 2 \sum_{j=1}^J f_1(r_j) f_2(R_\alpha r_j + r'). \end{aligned}$$

Die ersten beiden Terme bleiben unter der Koordinatentransformation $r_j \rightarrow R_\alpha r_j + r'$ konstant, der dritte wird im Minimum von E_{12} maximal. Dieser dritte Term entspricht der (diskreten) Kreuzkorrelationsfunktion von f_1 und f_2 :

$$C_{12}(R_\alpha, r') = \sum_{j=1}^J f_1(r_j) f_2(R_\alpha r_j + r').$$

(in dieser Formulierung ohne Normierung, also nur für Bilder desselben Experiments). Die Korrelationsanalyse besitzt große Bedeutung bei der Untersuchung der Ähnlichkeit von Signalen und im Bereich optischer Strukturerkennung. Sie ermöglicht gutes Alignment auch bei sehr hohem Rauschanteil (Saxton, 1978) und ist mittels Fouriertransformation schnell zu berechnen. Bei der Bestimmung des Maximums der Kreuzkorrelationsfunktion $C_{12}(R_\alpha, r')$ bedient man sich in der Praxis einer getrennten translationalen und rotationalen Suche. Die translationale Kreuzkorrelationsfunktion lautet allgemein (Translationsvektor $r_k = (X, Y)$):

$$C_{12}(X, Y) = \int \int_{-\infty}^{+\infty} f_1(x, y) f_2(x + X, y + Y) dx dy$$

Im hier interessierenden diskreten Fall (translationale Kreuzkorrelation zweier digitalisierter Bilder):

$$C_{12}(r_k) = \frac{1}{J'} \sum_{j=1; (r_j+r_k \in A)}^J [f_1(r_j+r_k) - \langle f_1 \rangle] [f_2(r_j) - \langle f_2 \rangle].$$

$\langle f_1 \rangle, \langle f_2 \rangle$: die Mittelwerte von f_1, f_2 , die keinen Einfluss auf ein Ähnlichkeitsmaß haben sollten und daher subtrahiert werden. Für alle $r_k \neq 0$ findet keine komplette Überlappung der beiden Bilder statt, so dass die Summierung nur noch über J' statt J Elemente erfolgt (also nur für solche j , für die der Summenvektor $r_j + r_k$ noch innerhalb des Bildes liegt), entsprechend erfolgt die Normierung auf J' . Eine Vereinfachung und damit Beschleunigung des Verfahrens erreicht man durch Übergang in den Fourierraum. Aufgrund der Eigenschaft des Fourierintegrals, dass die jeweilige Funktion als zylindrisch kontinuierlich oder endlos repetitiv angenommen wird, so dass der rechte Rand des Bildes mit dem linken kontinuierlich ist und der untere in den oberen übergeht, kann bei der Berechnung der CCF im Fourierraum die Normierung auf ein festes J erfolgen. Es muss lediglich durch n -fache Vergrößerung des Bildes und Ausfüllen dieses äußeren Rahmens („Padding“) mit dem jeweiligen Bildmittelwert oder dem Mittel der Pixel des Bildrandes dafür gesorgt werden, dass es bei der Korrelation zu keiner unerwünschten rückwärtigen Überlappung der eigentlichen Bilder kommt (Normierung dann $\frac{1}{n^2 J}$). Die Berechnung im Fourierraum beruht auf einer Anwendung des Faltungstheorems (z. B. Hecht, 1999) auf die Kreuzkorrelationsfunktion, die ergibt, dass

$$C_{12}(r_k) = F^{-1} \{ F \{ f_1 \} F^* \{ f_2 \} \}$$

($F \{ \}$: Fouriertransformation, $F^{-1} \{ \}$: inverse Fouriertransformation, $*$: konjugiert komplex).

Die translationale Kreuzkorrelation wird bei der Mittelung nicht idealer Kristalle benutzt („Korrelationsmittelung“, Frank und Goldfarb, 1980; Saxton und Baumeister, 1982; Saxton, 1978). Eine klassische kristallographische Analyse (optische/quasioptische Filtration von Reflexen im Raumfrequenzspektrum), die größere perfekte Kristalle erfordert, nutzt die Redundanz struktureller Information aufgrund der exakten translationalen Wiederholung einer strukturellen Einheit direkt, um ein gemittelttes Abbild des Objekts zu erhalten. Im weniger idealen Fall, mit dem man sehr häufig bei der zweidimensionalen Rekonstitution von Membranproteinen konfrontiert ist, sind die einzelnen Partikel zwar in einer Vorzugsrichtung einigermaßen orientiert, Kristalldefekte, Verzerrungen des Gitters bzw. Vorliegen nur kleiner kristalliner Fragmente erfordern jedoch ein Alignment von Einzelpartikeln vor der Mittelung. In diesem speziellen Fall annähernder Kristallinität kann ein ausschließlich translationales Alignment, zumindest in einer ersten Stufe, ausreichen. Ein Bild eines solchen „Kristalls“ sowie als Referenz ein Ausschnitt, der etwas mehr als eine Elementarzelle enthält, werden beide in ein größeres Bild eingebettet (Padding, s. o., Operation PD). Aus den so erhaltenen beiden Bildern gleicher Größe wird die translationale Kreuzkorrelationsfunktion be-

rechnet und in Form einer Karte (in Ortsraumkoordinaten) gespeichert. Nach Hochpass-Filtration dieser CCF-Karte (Operation FQ NP) mit einem Filterradius entsprechend etwas weniger als der Hälfte der ersten Beugungsordnung erfolgt die Suche nach den Korrelationsmaxima (Operation PK DC). Darin integriert ist eine Schwerpunktsbestimmung in einem Bereich mit dem Radius von etwa einem Drittel des Gittervektors sowie der Ausschluss weiterer Maxima im Bereich einer Einheitszelle sowie am Bildrand (Artefakte!). Die Koordinaten und (normierten) Pixelwerte dieser Maxima werden nach deren Größe geordnet gespeichert sowie zur Visualisierung/Evaluation in eine Karte eingetragen. Diese Operationen sind in der SPIDER-Prozedur `corrav1.sys` integriert. Nach Evaluation der Maxima kann ein Schwellenwert für die Einbeziehung der den Maxima entsprechenden Partikeln in die Mittelung gesetzt werden. Danach werden Bildausschnitte aus dem ursprünglichen Bild um die Positionen der relevanten Maxima gebildet (Operation WV) und anschließend gemittelt (s. u.).

Bei der Korrelationsmittelung musste die CCF-Karte nur mit einem Hochpass gefiltert werden, es war keine Kappung sehr hoher Raumfrequenzen nötig, wie es bisweilen bei elektronenmikroskopischen Daten praktiziert wird (Saxton und Baumeister, 1982). Tests ergaben keinen Unterschied, bei diesen SFM-Datensätzen waren also keine hochfrequenten Störungen anwesend, die das Alignment beeinträchtigten.

Eine Möglichkeit der iterativen Verfeinerung des Alignments besteht bei vorliegender Methode darin, das Mittel aus dem ersten Lauf als Referenz für einen weiteren Durchgang zu nutzen usw., außerdem kann zusätzlich eine referenzgestützte, rotationale Verfeinerung durchgeführt werden. Da die Rohdaten in dieser Arbeit, insbesondere die Abbildung der periplasmatischen Seite des Sucroseporins, teilweise eine klare Aussage über die jeweils zu wählende Referenz nicht zulassen, wurde zur Verfeinerung des einstufigen translationalen Alignments ein referenzfreier rotationaler und translationaler Algorithmus angewandt (nächster Abschnitt). Da der Input aus der beschriebenen translationalen Stufe hier aus Rohdaten-Bildausschnitten besteht, wird durch diese Kombination kein zusätzlicher Fehler durch Interpolation eingeführt. Für iterative Verfeinerung gilt der Grundsatz, Rotations- und Translationsparameter aus jedem Schritt vektoriell zu addieren und damit die zur Deckung gebrachten Bilder direkt aus den Rohdaten zu bilden, um keine unnötigen Interpolationsschritte und damit eine graduelle Abnahme der Auflösung zu bewirken.

Auf eine Symmetrisierung der gemittelten Bilder (Saxton und Baumeister, 1982) wurde im Interesse der Visualisierung richtungsabhängiger Effekte verzichtet.

7.2.3.2 Referenzfreies rotationales und translationales Alignment

Referenzgestützte Algorithmen sind mit dem Problem behaftet, dass die anfängliche subjektive Auswahl einer Referenz das Ergebnis beeinflusst. Dies ist besonders dann gravierend, wenn das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) klein ist und bei der Auswahl lokaler Korrelationsmaxima kein

Schwellenwert gesetzt wird bzw. kein objektives Kriterium verfügbar ist, wie hoch ein solcher zu wählen wäre. Im Extremfall kann ein durch die Referenz vorgegebenes Muster auch bei Alignment von aus purem Rauschen ausgewählten Bildausschnitten (um Korrelationsmaxima) ein Mittel ergeben, das diesem Referenzmuster ähnlich sieht (Lit. in Frank, 1996).

In dieser Arbeit wurde ein referenzfreier iterativer Algorithmus nach Penczek et al. (1992) angewandt, der für Daten niedrigen SNR's, Objekte verschiedener Orientierungen und bei Unsicherheit über zu wählende Referenz(en) geeignet ist. Ausgehend von einer Definition für das Alignment, wonach *ein Satz von Bildern dann zur Deckung gebracht ist, wenn alle Bilder paarweise zur Deckung gebracht wurden*, ist das Alignment dieses Satzes von Bildern $P = \{p_i(r); i = 1, \dots, N\}$ erreicht, wenn das Funktional

$$L(P, S) = \int_{-\infty}^{+\infty} \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{k=i+1}^N [p_i(r; s_{\alpha}^i, s_x^i, s_y^i) - p_k(r; s_{\alpha}^k, s_x^k, s_y^k)]^2 dr$$

minimiert wird durch die Wahl eines Satzes von $3N$ Parametern $S = \{s_{\alpha}^i, s_x^i, s_y^i; i = 1, \dots, N\}$. Die Bilder werden hier als kontinuierliche Funktionen der Variable r (Argumentvektor) behandelt, die Position jedes Bildes bezüglich seiner anfänglichen Position wird durch die drei Parameter s_{α}^i (Rotation um den Ursprung) und s_x^i, s_y^i (Translation in x, y) beschrieben. Der Nachteil dieser Formulierung besteht neben einem erheblichen Rechenaufwand darin, dass ein paarweises Alignment, bei dem jeder Term aus zwei Bildern niedrigem SNR gebildet wird, ein hohes Fehlerrisiko bezüglich der erhaltenen Positionsparameter impliziert. Obige Formulierung ist aber äquivalent zu einer Minimierung von

$$\bar{L}(P, S) = \int_{-\infty}^{+\infty} \sum_{i=1}^N [p_i(r; s_{\alpha}^i, s_x^i, s_y^i) - \bar{p}_i(r)]^2 dr$$

wobei

$$\bar{p}_i(r) = \frac{1}{N-1} \sum_{k=1; k \neq i}^N p_k(r; s_{\alpha}^k, s_x^k, s_y^k)$$

Hier wird jedes Bild mit einem partiellen Mittel aller Bilder zur Deckung gebracht (globales Mittel abzüglich des jeweils aktuell zur Deckung zu bringenden Bildes, SNR sollte hier erheblich besser sein als bei einzelnen Bildern/Rohdaten).

Eine Approximation der Lösung dieses Alignment-Problems wird durch folgenden *zweistufigen Algorithmus* ermittelt:

I. Näherungsweise Bestimmung des globalen Mittels ohne Vorgabe einer Referenz:

- i. zufällige Auswahl zweier Bilder p_i und p_k aus P

- ii. p_i und p_k werden zur Deckung gebracht (Minimierung von $\|p_i - p_k\|$ durch beliebiges Verfahren)
- iii. Ansatz zur näherungsweise Bestimmung des globalen Mittels (a_m): $a_2 = (p_i(+))p_k)/2$, (+) symbolisiert die algebraische Summe zweier Bilder nach Alignment
- iv. Laufvariable $m = 3$
- v. nächstes Bild p_l aus den $N - m + 1$ verbliebenen Bildern (zufällige Auswahl)
- vi. p_l und a_{m-1} werden zur Deckung gebracht
- vii. aktualisierter Wert für das globale Mittel: $a_m = (p_l(+))(m - 1)a_{m-1})/m$
- viii. m wird um 1 erhöht. Falls $m = N$, Ende. Sonst zurück zu Schritt v.

Es wird zwar in jedem Schritt dieser ersten Stufe ein optimales Alignment zweier Bilder vorgenommen sowie eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses des Mittels erreicht. Jedoch wird mit dem Einschluss jedes weiteren Bildes zu der bereits zur Deckung gebrachten Serie im Prinzip eine Korrektur der Positionen bereits im Mittel enthaltener Bilder notwendig, um im Minimum des obigen Funktionals zu bleiben. Daher ist eine zweite Stufe nötig, die dies iterativ korrigiert. Das wird ebenfalls mit Hilfe des Alignments einzelner Bilder (diesmal sequenziell) mit dem jeweils komplementären partiellen Mittel erreicht.

2. Iterative Verfeinerung des Mittels $A = a_N$:

- i. Laufvariable $m = 1$
- ii. modifiziertes Mittel durch Subtraktion des Bildes p_m (in seiner aktuellen Position): $A' = (NA(-))p_m)/(N - 1)$
- iii. p_m und A' zur Deckung bringen (Minimierung von $\|p_m - A'\|$ durch beliebiges Verfahren)
- iv. Aktualisierung des globalen Mittels: $A = (p_m(+))(N - 1)A')/N$
- v. m um 1 erhöhen. Falls $m \leq N$: zurück zu ii.
- vi. Falls in iii. eines der Bilder seine Position signifikant verändert hat, zurück zu i. Sonst Ende.

Die *Konvergenz* der Prozedur ergibt sich daraus, dass \bar{L} aufgrund der Schritte ii. und iii. der Stufe 2. nur abnehmen oder konstant bleiben kann, außerdem ist \bar{L} eine nicht negative Funktion, so dass der Algorithmus irgendwann zu einem Ende kommen muss. Die Frage der Bestimmbarkeit des gesuchten *Minimums von \bar{L}* führt über die notwendige Bedingung $\frac{\partial}{\partial s_o^i} \bar{L}(s_o^i) = 0$ für alle i (s_o^i der i -te Positionsparameter, o steht für α , x oder y) zu der hierzu äquivalenten Bedingung für ein Maximum eines Funktionals \bar{L}' :

$$\frac{\partial}{\partial s_o^k} \int_{-\infty}^{+\infty} \left\{ p_k(r - s_o^k) \left[\sum_{i=1; i \neq k}^N p_i(r - s_o^i) \right] \right\} dr = 0$$

(vgl. Penczek et al., 1992). Darin erkennt man gleichzeitig die notwendige Bedingung für das Maximum der Kreuzkorrelation des k -ten Bildes und der Summe aller anderen Bilder bezüglich des Positionsparameters s_o^k . Die noch zu wählende Methode für die Bestimmung der Positionsparameter beim paarweisen Alignment wird daher am Ende der Prozedur immer ein lokales Minimum des Funktionals \bar{L} ergeben, wenn sie diese Bedingung erfüllt (s. Kriterium für Beendigung der Prozedur in Schritt vi. der 2. Stufe). Es wird aber auch klar, dass dies im allgemeinen nicht das absolute Minimum ist, denn es wurde durch sequenzielles Alignment einzelner Bilder mit einem komplementären partiellen Mittel gewonnen, während man mit gleichzeitiger Positionskorrektur von dreien oder mehr Bildern grundsätzlich durchaus in ein niedrigeres Minimum von \bar{L} gelangen kann.

Der Algorithmus ist also im Prinzip suboptimal und das Ergebnis wird von der anfänglichen zufallsbedingten Abschätzung des Mittels beeinflusst. Das ist der Preis, den man letztlich für die Freiheit von der subjektiven Auswahl einer Referenz bezahlen muss. Für die Praxis bedeutet dies, dass man u. U. durch mehrmaliges Durchspielen der Prozedur testen muss, ob das im Einzelfall gefundene Ergebnis stabil ist bzw. eine gute Approximation darstellt.

Eine weitere Eigenschaft liegt darin, dass die Annahme einer Ähnlichkeit unter den Bildern nicht benutzt wird, so dass auch bei Anwendung auf einen heterogenen Satz von Bildern mit einem nur geringen Maß gemeinsamer Eigenschaften diejenigen jeder Untergruppe untereinander zur Deckung gebracht werden und ggf. danach einer Klassifikationsanalyse unterworfen werden können.

Oben beschriebener Algorithmus lässt die Wahl einer konkreten Methode für das Alignment zweier einzelner Objekte offen. Da eine Suche im Ortsraum bei hohem Rauschanteil unzuverlässig ist, beruht die praktische Implementierung auf der Bestimmung der Positionsparameter mit Hilfe der translationalen und der rotationalen Kreuzkorrelationsfunktionen. Alle Operationen erfolgen nach Einlesen der Bilder und FFT im Fourierraum. Die translationale Kreuzkorrelation wurde bereits beschrieben. Für das rotationale Alignment müssen die translational zur Deckung gebrachten Ob-

jekte jeweils im Ursprung des für die Rotation verwendeten Koordinatensystems zentriert werden (Zentrierung des Mittels aus translationalem Alignment als Grundlage für entsprechende Korrektur der Positionsparameter aller einzelnen Objekte). Es ist dann jeweils die rotationale Kreuzkorrelationsfunktion der beiden durch f_1, f_2 (in Polarkoordinaten) repräsentierten Objekte zu berechnen:

$$c(\phi) = \int_{r_1}^{r_2} \int_0^{2\pi} f_1(r, \theta) f_2(r, \theta + \phi) |r| d\theta dr$$

Die Integrationsgrenzen r_1, r_2 sind abhängig von der Partikelgröße bzw. der Größe des für das Alignment der Objekte relevanten Bereichs zu wählen. Im hier interessierenden diskreten Fall

$$c(k \Delta\phi) = \sum_{l=n_1}^{n_2} \sum_{m=1}^M f_1(l \Delta r, m \Delta\theta) f_2(l \Delta r, m \Delta\theta + k \Delta\phi) \Delta\theta |l \Delta r|$$

entsprechend n_1, n_2 („Ringnummern“). M , analog der Obergrenze der rotationalen Integration, entspricht hier der Anzahl der Bildwerte in dem betreffenden Ring und ist mit l zu variieren, etwa $M_l \approx \text{int}(2\pi l)$. Damit ist die l -te eindimensionale Kreuzkorrelationsfunktion:

$$c_l(k \Delta\phi_l) = \sum_{m=1}^{M_l} f_1(l \Delta r, m \Delta\theta_l) f_2(l \Delta r, m \Delta\theta_l + k \Delta\phi_l) \Delta\theta_l$$

Die praktische Berechnung der Summe aller c_l erfolgt, nachdem diese im Fourierraum auf die einheitliche Länge $M = 2 \max\{M_l\}$ gebracht werden (Fourier-Interpolation, Faktor 2 zur Erhöhung der Genauigkeit des bestimmten Maximums im Ortsraum), wodurch man mit einer inversen FFT der Länge M das Ergebnis erhält. Unter Berücksichtigung des Faltungssatzes bzw. Verwendung der Fourier-Transformierten F_1, F_2 (F'_1, F'_2 mit einheitlich M Komponenten) und Umkehr der Summationsreihenfolge ergibt sich:

$$c(k \Delta\phi) = \sum_{m=0}^{M-1} \exp[2\pi i(m \Delta\theta_M k \Delta\phi)] \Delta\theta_M \sum_{l=n_1}^{n_2} F'_1(l \Delta r, m \Delta\theta_M) F_2^*(l \Delta r, m \Delta\theta_M) |l \Delta r|$$

Um die Abhängigkeit des Verfahrens von der jeweiligen zufälligen Auswahlsequenz zu mindern, wird die erste Stufe mit einer anderen zufälligen Sequenz wiederholt und die beiden approximierten Mittel abschließend zur Deckung gebracht und gemittelt (vgl. SPIDER-Dokumentation: [reffreealign.html](#)). Die SPIDER-Operation AP SR integriert den gesamten Algorithmus und vereint translationales und rotationales Alignment, nämlich durch jeweils alternierendes translationales und rotationales Alignment zweier Objekte, bis die relative Positionänderung kleiner 0.5 Pixel (s. oben) beträgt. Sie hat nur wenige freie Parameter, nämlich die Partikelgröße als obere Grenze

für die Translation und die Integrationsgrenzen für das rotationale Alignment, und zwar sinnvollerweise der äußere Radius entsprechend dem Partikelradius, der innere meist mit dem Wert fünf, da bei Wahl kleinerer Radien Interpolationsfehler auftreten können. Nach jedem Iterationsschritt wird das globale Mittel über eine näherungsweise Schwerpunktsbestimmung zentriert bzw. die Positionsparameter aller Bilder entsprechend korrigiert und gespeichert (optional Vorgabe einer rotationssymmetrischen Referenz ausschließlich für die Zentrierung, vgl. Prozedur aliavg2.sys). Die in dieser Arbeit eingesetzte Prozedur aliavg1.sys/aliavg2.sys (s. Anhang) integriert die Operation AP SR, die Generierung einer Serie zur Deckung gebrachter Partikel (Datenfenster) aus den Rohdaten mit Hilfe der Positionsparameter aus AP SR durch die Operation RT SQ, schließlich die eigentliche Mittelung sowie die Abschätzung der Auflösung (s. u.).

Nur bei sehr niedrigem SNR, Mischungen von komplett unterschiedlichen Formen und sehr kleinen Datensätzen wird die Verwendung der für Translation und Rotation getrennten Operationen mit mehr freien Parametern oder aber Multireferenz-Alignment empfohlen.

7.2.4 Mittelung und Abschätzung der Auflösung

7.2.4.1 Mittelung und Statistik

Nach erfolgtem Alignment von N Bildern hat man für jedes Bildelement j im Koordinatensystem des Partikels eine Messreihe $\{p_i(r_j); i = 1 \dots N\}$. Das Mittel beträgt

$$\bar{p}_{(N)}(r_j) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N p_i(r_j),$$

die Varianz

$$v_{(N)}(r_j) = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N [p_i(r_j) - \bar{p}_{(N)}(r_j)]^2.$$

Mittel und Varianz können für alle j als gemittelttes Bild bzw. Varianzkarte dargestellt werden: $\{\bar{p}_{(N)}(r_j); j = 1 \dots J\}$, $\{v_{(N)}(r_j); j = 1 \dots J\}$ (SPIDER-Operation AS R). Entsprechend ergibt sich daraus die Standardabweichung $\sigma(r_j) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [p_i(r_j) - \bar{p}_{(N)}(r_j)]^2}$ als häufig verwendetes Maß für die Genauigkeit der im Mittel erhaltenen Pixelwerte (hier zur Abschätzung der axialen Auflösung der Topographiedaten).

Außerdem gibt SPIDER noch die mittlere Varianz pro Punkt sowie die Varianz des gemittelten Bildes aus.

7.2.4.2 Kriterien für die laterale Auflösung

Gemäß dem Whittaker-Shannon-Theorem (zit. in Frank, 1996) erfordert die diskrete Darstellung einer kontinuierlichen Funktion begrenzter Bandbreite eine Schrittgröße von wenigstens $\frac{1}{2B}$ bei Annahme eines Bandlimits B im Frequenzraum. Die erforderliche kritische Pixelauflösung (Pixelgröße) bei der Aufnahme der Daten wäre für eine laterale Auflösung von $\frac{1}{10} \text{ \AA}^{-1}$ also 5 \AA . Zur Kompensation von Verlust an Auflösung durch Interpolationen im Laufe des Alignments ist eine um einen Faktor 2 größere Anzahl an Messpunkten (im Bsp. also Pixelgröße von $2,5 \text{ \AA}$) sinnvoll. Hier und im Folgenden wird die Auflösung als eine Größe im Frequenzraum behandelt (Einheit \AA^{-1}). Der Begriff der *kristallographischen Auflösung* orientiert sich an den für die Fouriersynthese des Bildes verfügbaren Fourierkomponenten, die auf dem regelmäßigen *reziproken Gitter* angeordnet sind. Man ermittelt also den Radius von Reflexen der höchsten Ordnung, die noch vom Hintergrund signifikant zu unterscheiden sind.

Bei der *Einzelpartikelmittlung* steht für die Untersuchung der Transformierten kein den Reflexen des reziproken Gitters vergleichbares Kriterium zur Unterscheidung von Signal und Rauschen zur Verfügung. Die hier angewandten Tests zur Abschätzung der Auflösung beruhen entweder auf der Untersuchung der spektralen Konsistenz der Fouriertransformierten zweier statistisch unabhängiger Mittel (Differenzieller Phasenunterschied und Fourier-Ringkorrelationsfunktion) oder auf dem Vergleich der Transformierten aller einzelnen zum Mittel beitragenden Bilder (Spektrales Signal-Rausch-Verhältnis). Lit. in Frank (1996). SPIDER-Operationen: RF, RF SN.

Differenzieller Phasenunterschied (DPR)

Hierfür werden nach dem Alignment neben dem globalen Mittel zwei statistisch unabhängige Mittel $\overline{p_1}(r)$, $\overline{p_2}(r)$ (z. B. aus geradzahligem und ungeradzahligem Bildern) gebildet. $F_1(k)$ und $F_2(k)$ seien deren diskrete Fouriertransformierte. Mit der Phasendifferenz $\Delta\phi(k)$ zwischen den zwei Transformierten ist der Differenzielle Phasenunterschied:

$$\overline{\Delta\phi}(k, \Delta k) = \sqrt{\frac{\sum_{[k, \Delta k]} [\Delta\phi(k)]^2 [|F_1(k)| + |F_2(k)|]}{\sum_{[k, \Delta k]} [|F_1(k)| + |F_2(k)|]}}$$

Es erfolgt jeweils eine Summierung über Komponenten innerhalb von Ringen der Raumfrequenz-Radien $|k| + \Delta k$; $|k|$. Damit ist $\overline{\Delta\phi}(k, \Delta k)$ ein Maß für die nach Amplituden gewichtete Phasenkonsistenz als Funktion der Raumfrequenz. Als sinnvolle Grenze zur Inkonsistenz und damit für die Abschätzung der Auflösung nimmt man hier k_{45} mit $\overline{\Delta\phi}(k_{45}, \Delta k) = 45^\circ$ (analog zum Übergang konstruktive-destruktive Interferenz bei phasenverschobenen Sinusfunktionen).

Fourier-Ringkorrelationsfunktion (FRC)

Auch hier erfolgt ein Vergleich über Ringe der Weite Δk im Frequenzraum, nämlich die differenzielle (normierte) Kreuzkorrelation der beiden Fouriertransformierten als Funktion der Raumfrequenz:

$$FRC(k, \Delta k) = \frac{\operatorname{Re} \left| \sum_{[k, \Delta k]} F_1(k) F_2^*(k) \right|}{\sqrt{\sum_{[k, \Delta k]} |F_1(k)|^2 \sum_{[k, \Delta k]} |F_2(k)|^2}}$$

(*Re*: Realteil; $-1 \leq FRC \leq 1$). Kein gemeinsamer Signalanteil und damit keine Korrelation, also nur noch unkorreliertes Rauschen würde einen Wert $FRC(k, \Delta k) = 0$ ergeben. Als Schwellenwert nimmt man üblicherweise die zweifache Standardabweichung der normierten Kreuzkorrelationsfunktion $2\sigma = \frac{2}{\sqrt{N_{[k, \Delta k]}}}$ (Saxton, 1978; Saxton und Baumeister, 1982); $N_{[k, \Delta k]}$ ist die Anzahl der Komponenten in dem jeweiligen Ring. Die FRC ist grundsätzlich etwas optimistischer als der DPR, bessere Übereinstimmung ergibt die Erhöhung des Faktors von 2 auf 3 (Frank, 1996, in der SPIDER-Operation RF wird $\frac{3}{\sqrt{N_{[k, \Delta k]}}}$ als Kriterium verwendet).

Spektrales Signal-Rausch-Verhältnis (SSNR)

(Unser et al., 1987; Unser et al., 1989). Individuelle Bilder eines Satzes von N Bildern eines Partikels können als Summe einer gemeinsamen Signalkomponente und einer Rauschkomponente dargestellt werden:

$$p_i(r_j) = p(r_j) + n_i(r_j) \quad (i = 1 \dots N), (j = 1 \dots J)$$

Entsprechendes gilt im Fourierraum:

$$P_i(k_l) = P(k_l) + N_i(k_l) \quad (i = 1 \dots N)$$

Eine Abschätzung für die Signalkomponente stellt das jeweilige Mittel dar:

$$\bar{p}(r_j) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N p_i(r_j) \quad \bar{P}(k_l) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N P_i(k_l)$$

Für einen lokalen Bereich B im Fourierraum ist das Signal-Rausch-Verhältnis gemäß seiner allgemeinen Definition: $\alpha_B = \frac{\sigma_{Bs}^2}{\sigma_{Bn}^2}$. Hierbei sind $\sigma_{Bs}^2, \sigma_{Bn}^2$ die über B gemittelten Varianzen von Signal und Rauschen. Gemäß dem Zusammenhang für die Varianz $\sigma(p_i) = \int_{B_{\odot}} |P_i(k)|^2 dk$ (Parseval-Theorem, zit. nach Frank, 1996) und mit Hilfe des Mittels $\bar{p}(r_j)$ bzw. dessen Fouriertransformierter $\bar{P}(k_l)$ lassen sich die beiden Varianzen wie folgt abschätzen:

$$\hat{\sigma}_{Bs}^2 = \frac{1}{n_B} \sum_B |\overline{P}(k_l)|^2$$

$$\hat{\sigma}_{Bn}^2 = \frac{\sum_B \sum_{i=1}^N |P_i(k_l) - \overline{P}(k_l)|^2}{(N-1)n_B}$$

(in $\hat{\sigma}_{Bn}^2$ gehen die Rauschkomponenten aller Bilder ein). Die Abschätzung für das Signal-Rausch-Verhältnis $\alpha_{B,N}$ des Mittels ist damit:

$$\hat{\alpha}_{B,N} = \frac{\hat{\sigma}_{Bs}^2}{\hat{\sigma}_{Bn}^2/N} - 1$$

Hierbei ist berücksichtigt, dass der Beitrag des Rauschens bei der Mittelung um den Faktor $\frac{1}{N}$ reduziert wird. Die Tatsache, dass das Mittel als Schätzwert für das Signal im Gegensatz zu letzterem immer noch einen Rauschterm enthält, ist mit der Subtraktion von eins berücksichtigt (Unser et al., 1987).

Für das SSNR (SNR als Funktion der Raumfrequenz) werden die Bereiche B wieder als konzentrische Ringe gleicher Weite gewählt und damit $\alpha_N(k, \Delta k)$ bestimmt. k_{crit} wird üblicherweise so gewählt, dass $\alpha_N(k_{crit}) = 4$, was etwa äquivalent zu $\overline{\Delta\phi}(k_{45}, \Delta k) = 45^\circ$ ist.

Ein Vorteil des SSNR besteht darin, dass dieses im Gegensatz zu DPR und FRC nahe verwandt ist zum klassischen Kriterium der kristallographischen Auflösung, indem hier wie dort letztlich ein Schwellenwert bezüglich des Signal-Rausch-Verhältnisses im Frequenzraum gesetzt wird. Näheres zum Vergleich der drei Auflösungskriterien in Unser et al. (1987).

DPR, FRC und SSNR wurden jeweils zunächst für die gesamten Bildfenster berechnet. Insbesondere bei Mittelung nach rotationalem Alignment sind die Mittel aber außerhalb des für die rotationale Suche relevanten Radius (entspricht dem Partikelradius) beliebig unbestimmt, weshalb üblicherweise eine Maske angewendet wird, um diese Bereiche auszublenden. Dies ist durchaus problematisch, da durch eine einheitliche Maske unerwünschte Korrelationen erzeugt werden können, im Extremfall einer binären Maske wären das Korrelationen höchstmöglicher Auflösung (gerät man mit einem zu knappen Falloff an diese Grenze, sieht man bei höheren Raumfrequenzen bei FRC und SSNR ein lokales Maximum bzw. bei DPR ein lokales Minimum entstehen). Die Maske muss deshalb, gemessen an der Größenordnung der ohne Maske gefundenen Auflösung, so „weich“ sein, dass nur Korrelationen niedriger Auflösung entstehen, die nicht den letztlich ermittelten Wert beeinflussen. Es besteht eine Art „Unschärferelation“ bezüglich der Lokalisation der für die Auflösungsbestimmung herangezogenen Bildelemente versus der Genauigkeit der Auflösungsbestimmung (Frank, 1996). Aufgrund dieser Schwierigkeit sind die Werte für die Auflösung bei referenzfreiem Alignment bei derselben Rohdatenserie meist etwas schlechter, was neben Verlust an Auflösung durch zusätzlich nötige Interpolationen während des (auch rotationalen) Alignments wohl durch am Rand der Maske aufgrund Rotationsalignment verursachte und nicht völlig ausgeblendete Unschärfe erklärt werden kann.

Projekte und Ergebnisse

1 Allgemeine Einführung

Seit seiner Erfindung durch Binnig et al. (1986) wurde das Rasterkraftmikroskop (SFM) zu einem vielseitig einsetzbaren Instrument für die Untersuchung biologischer Oberflächen entwickelt. Die Erreichbarkeit einer Auflösung im submolekularen Bereich mit hohem Signal-Rausch-Verhältnis und die Möglichkeit des Betriebes unter quasi-physiologischen Bedingungen in wässriger Lösung ließen die Kraftmikroskopie als ideale Methode erscheinen, um Topographie und Struktur-Funktions-Beziehungen biologischer Moleküle sowie Struktur und Dynamik biologischer Membranen, sogar lebender Zellen, zu studieren.

Die Methode wurde eingesetzt, um lebende und fixierte Zellen abzubilden, wie Neuronen und Gliazellen (Papura et al., 1993, Haydon et al., 1996), wandernde Epithelzellen (Oberleithner et al., 1993, 1994), MDCK-Zellen (Hoh und Schoenenberger, 1994; Schoenenberger und Hoh, 1994), basophile Leukämiezellen (Spudich and Braunstein, 1995), Karzinomzellen (Ushiki et al., 1996), Makrophagen oder Fibroblasten (Braet et al., 1998), um nur einige Beispiele zu nennen (siehe auch Kapitel 2). In diesen Experimenten konnte die Anwendung der Rasterkraftmikroskopie auf lebende Zellen unter physiologischen Bedingungen überzeugend mit Auflösungen der Größenordnung von etwa 20 - 200 nm gezeigt werden. Bei der Abbildung von Strukturen der Größenordnung der Sensor Spitze sind allerdings Beschränkungen aufgrund der Sensorgeometrie (siehe Grundlagen und Methoden, Kapitel 1.1.3) sowie die relativ hohen Lateralkräfte (Benoit et al., 1997) zu beachten. Da Zellmembranen fluide Phasen sind, ist überdies die Auflösung von Einzelheiten auf lebenden Zellen im Nanometerbereich begrenzt. Fixierte Zellmembranen erlauben im Prinzip eine höhere Auflösung unter der Annahme, dass der Fixationsprozess die physiologischen Strukturen konserviert (Hoh und Schoenenberger, 1994; Weyn et al., 1998).

Auch Strukturen wie Organellen oder Zytoskelett, die unter der Membran im Innern der Zelle liegen, können mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie abgebildet werden (Henderson et al., 1992; Braet et al., 1998). Mechanische Eigenschaften lebender und fixierter Zellen wurden eingehend untersucht (Radmacher et al., 1996; Rotsch et al., 1997; Rotsch et al., 1999). Über die reine Abbildung von Zelloberflächen hinaus wurden außerdem bei lebenden Zellen langsame dynamische Vorgänge wie Bewegung von Ausläufern, Dynamik des Zytoskeletts sowie Volumendynamik ganzer Zellen beobachtet (Henderson et al., 1992; Schoenenberger und Hoh, 1994; Rotsch et al., 1999; Schneider et al., 1997; Schneider et al., 2000). Für schnellere zelluläre Prozesse ist die abbildende Kraftmikroskopie (Dauer für die Aufnahme eines Bildes in der Größenordnung von Minuten) allerdings zu langsam. Im nicht abbildenden Modus kann aber durchaus eine Untersuchung schnellerer

Prozesse erfolgen, wie zum Beispiel das kontraktile Verhalten von Kardiomyozyten an ausgewählten Stellen auf zuvor abgebildeten einzelnen oder konfluent gewachsenen Zellen (Domke et al., 1999).

Proteine bzw. makromolekulare Strukturen auf biologischen Membranen konnten bislang vorwiegend bei Präparationen mit dichtgepackter, kristalliner oder quasikristalliner Anordnung von (Membran-)Proteinen hochaufgelöst gemessen werden, wie z. B. im Fall des Bakteriorhodopsins (Butt et al., 1990; Müller et al., 1995), der Na,K-ATPase (Apell et al., 1993; Linder und Apell, 1994), zweidimensional kristallisierten Proteinpräparationen von OmpF-Porin (Schabert et al., 1995), der HPI-Schicht von *Deinococcus radiodurans* (Karrasch et al., 1994; Müller, Baumeister und Engel, 1996), oder dicht gepackt adsorbierter Proteine wie dem Ko-Chaperonin GroES (Mou et al., 1996). Der Vorteil all dieser Präparate im Gegensatz zu einzeln adsorbierten Makromolekülen ist die relativ höhere Stabilität der adsorbierten dichtgepackten Arrays von Proteinen gegenüber den hohen vertikalen Kräften im Kontaktbereich Sensor-Objekt und den Lateralkräften der Rasterungsbewegung. Das repetitive Muster von strukturellen Einheiten erlaubt es überdies, diese Strukturen besser vom Hintergrund zu unterscheiden und erleichtert die Anwendung von Mittelungsverfahren mit Hilfe digitaler Bildverarbeitung (siehe Kapitel 3). Bei diesen Präparaten war teilweise eine laterale Auflösung im Subnanometer-Bereich sowie eine vertikale Auflösung im Bereich 1 - 2 Å möglich. Die in „nativer Umgebung“ gemessenen Daten können als Ergänzung zur röntgen- und elektronenkristallographischen Strukturbestimmung angesehen werden, beispielsweise hinsichtlich der Frage der nativen Topographie und Dynamik flexibler Domänen sowie der Messung pH-, potential-, elektrolyt- oder kraftabhängiger Konformationsänderungen. Es wurde auch von einigen Gruppen versucht, die Aktivität von Enzym-Molekülen nachzuweisen (z. B. RNA-Polymerase im Tapping-Mode, Kasas et al., 1997). Für submolekular aufgelöste Messungen an einzeln adsorbierten Proteinen wurden spezielle Verfahren wie die Kryo-Kraftmikroskopie entwickelt (Han et al., 1995; Shao, 1999). Bei den bisher am Kraftmikroskop untersuchten biologischen Makromolekülen lag das Schwergewicht allerdings letztlich noch auf exemplarischen Objekten, deren Struktur schon mit anderen, kristallographischen und spektroskopischen Methoden gelöst worden war.

Neben der abbildenden Kraftmikroskopie haben intramolekulare kraftspektroskopische Messungen an einzelnen Makromolekülen (Rief et al., 1997a,b und 1999) und die Untersuchung spezifischer intermolekularer Wechselwirkungen, z. B. an Rezeptor-Ligand-Paaren (Florin et al., 1994) das Anwendungsspektrum der Kraftmikroskopie erheblich erweitert. Beide Ansätze sind inzwischen auch mit der Lokalisierung der jeweiligen Effekte auf biologischen Oberflächen kombiniert worden (Müller, Baumeister, Engel, 1999 und Oesterhelt et al., 2000 bzw. Hinterdorfer et al., 1996).

Die Kraftmikroskopie ist immer noch ein gutes Stück davon entfernt, eine Routinemethode für die Untersuchung biologischer Oberflächen zu sein (Wagner, 1998). Neben instrumentellen Weiterentwicklungen hängt sehr viel von Fortschritten bei der Entwicklung geeigneter Präparationstechniken ab, insbesondere auch hinsichtlich der verwendeten Substrate (siehe Kapitel 2). Nur dann wird sich die Anwendbarkeit dieser Methode, über die bisher vielfach noch exemplarischen Präparate hinaus, auf ein breites Spektrum von Fragestellungen bzw. Untersuchungsobjekten ausdehnen lassen. Im übrigen wird sich die Kraftmikroskopie allerdings auch mit anderen Methoden der Einzelmolekülmikroskopie (Übersicht in Schütz et al., 2000) messen müssen.

2 Substrate

2.1 Einleitung und Zielsetzung

In vielen Fällen ist Glimmer das ideale Substrat für SFM-Untersuchungen an biologischen Materialien. Allerdings erfordert die Adsorption saurer Biopolymere auf der negativ geladenen Glimmeroberfläche einen Puffer hoher Ionenstärke oder einen sehr niedrigen pH (Müller, Amrein, Engel, 1997). Aufgrund der Homogenität der Glimmeroberfläche muss die Normalkraft (Auflagekraft) so hoch gewählt werden, dass eine laterale Bewegung des Objekts verhindert wird, was aber andererseits ungünstig für mechanisch empfindliche biologische Präparate sein kann. Kovalente Immobilisierung auf einem geeigneten Material kann eine Lösung dieser Probleme darstellen (Linder, 1995; Wagner, 1998). Schichtstrukturen sind einfach zu präparieren, aber es ist schwierig, kovalente Bindungen in einem ausreichenden Maß zwischen Substrat und Objekt einzuführen, ohne die ganze Schicht zu zerstören. Derivatisierung von in Gasphase silanisierendem Glimmer für Messungen an Luft wurde von Shlyakhtenko et al. (1999) beschrieben, es liegen aber keine detaillierten Ergebnisse hinsichtlich der Stabilität dieser Oberflächen in Flüssigkeit vor. Das Quellen des Schichtminerals Glimmer bei längerer Inkubation in feuchter Atmosphäre bzw. in wässriger Lösung macht dieses Material generell ungeeignet als Substrat für Zellkulturen. Das in dieser Hinsicht besser geeignete Glas kann mit Hilfe von Alkoxysilanen modifiziert werden, allerdings bilden polyvalente Silane Polymere, die zu einer erhöhten Oberflächenrauigkeit führen (Mitt. A. Linder), während Filme aus monovalenten Silanen empfindlich gegen Hydrolyse sind. Thiol-modifizierte Goldoberflächen erlauben eine verlässliche kovalente Immobilisierung, wie mit der Herstellung bioreaktiver Monoschichten nach diesem Prinzip gezeigt wurde (Wagner et al., 1994 und 1996), aber die Herstellung von über die Größenordnung von Mikrometern glatten Goldoberflächen erfordert eine teure Ausrüstung (Aufdampfanlage). Für die Immobilisierung von Proteinen üblicherweise verwendete lineare Polymere sind schwierig zu modifizieren, ohne dass verstärkt Quellungseffekte auftreten, die zu rauen Oberflächen führen (Linder, 1995).

Um Strukturen auf lebenden oder fixierten Zellen zu identifizieren, insbesondere solche peripherer Zellausläufer, hat es sich als günstig erwiesen, über Substrate zu verfügen, die eine mittlere Rauigkeit (R_{rms} , Standardabweichung der Topographiewerte) von weniger als etwa 1 nm aufweisen, um den störenden Einfluss der Substrat-Textur gering zu halten. Außerdem dürfen die Materialien für Zellen nicht toxisch sein und sollten eine Oberfläche aufweisen, auf der Zellen bzw. unter Umständen benötigte wachstumsfördernde Proteine stabil haften bleiben, wenn sie mit dem SFM abgebildet werden. Zellkultur ohne spezifisches wachstumsförderndes Substrat ist zwar bei manchen Zellsorten möglich, die mechanische Stabilität solcher Präparate wurde mit dem SFM von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt (siehe Kapitel 1). Allerdings handelte es sich durchweg um

spezielle, verhältnismäßig anspruchslose Zell-Linien wie Fibroblasten oder epitheliale Zellen, die einigermaßen problemlos auf unbeschichtetem Substrat adhäreren.

Für Untersuchungen an Proteinaggregaten oder Membranpräparationen wird ein Substrat benötigt, das sehr glatt, stabil in Pufferlösungen und einfach herzustellen ist. Weiterhin sollten seine Polarität und Oberflächenladungsdichte variierbar sein, um den Erfordernissen des jeweiligen Objekts gerecht zu werden und stabile Adsorption oder sogar kovalente Immobilisierung zu erlauben.

Als Ergebnis umfangreicher Tests erwiesen sich Polyvinylphenylketon (PVPK) und Furan-Polymere (FP) als geeignete Substanzen, die sich entsprechend präparieren ließen (Abb. 10). Diese von Achim Linder entwickelten Materialien wurden im Rahmen dieser Arbeit eingehend getestet sowie deren Verarbeitung zu praktikablen und in den jeweiligen SFM-Systemen montierbaren Substratplättchen optimiert.

2.2 Rauigkeit verschiedener Substrate im Vergleich

Zu Vergleichszwecken wurde die mittlere Rauigkeit (R_{rms}) verschiedener potenzieller Substrate für Zellkultur und Protein-Immobilisierung bestimmt (s. Tabelle). Der gemessene Wert für die atomar glatte Oberfläche von Glimmer, dem Standard-Substrat für die Adsorption zum Zwecke der Untersuchung mit dem SFM im submolekularen Auflösungsbereich, ist erwartungsgemäß am kleinsten. Bei den potenziellen Zellkultursubstraten ohne spezielle wachstumsfördernde Beschichtung ist gereinigtes Glas am günstigsten, spezielle Zellkultur-Kunststoffplättchen sind deutlich rauher, geringfügig günstigere Werte als die der hier aufgeführten *Thermanox*-Plättchen zeigen allerdings diverse Typen von Zellkulturschalen aus Polystyrol. Aluminium als Zellkultursubstrat ist hier aufgeführt, da im Rahmen dieser Arbeit Vergleichsdaten (Dicke von Lamellipodien auf Aluminium mit dem SFM) für eine Untersuchung von Zell-Substrat-Kontakten mittels Oberflächenplasmonresonanz-Mikroskopie erhoben wurden (Giebel et al., 1999).

Die Kultivierung anspruchsvollerer Zellsorten (insbesondere Primärkulturen hochspezialisierter Gewebe) erfordert häufig eine spezielle Beschichtung, die sich unter Umständen ungünstig auf die kraftmikroskopische Abbildung auswirken kann. Exemplarisch hierfür wurden Oligodendrozyten des Goldfischs untersucht (s. 2.3.1), die Laminin als Substrat benötigen und die auf unbeschichtetem Substrat entweder überhaupt nicht oder nur sehr schlecht haften bzw. wachsen (mit Ausnahme des getesteten relativ rauhen Aluminiums). Das aus drei Polypeptidketten aufgebaute Glykoprotein Laminin ist ein Hauptbestandteil von Basalmembranen (Beck et al., 1990). Es besitzt vielfältige Funktionen, die durch Wechselwirkung mit anderen Komponenten der Basalmembran vermittelt werden (Chen et al., 2000). Als Zelladhäsionsfaktor fördert Laminin Neuritenwachstum und beeinflusst Wanderung, Wachstum, Morphologie und Adhäsion von verschiedenen Zellsorten,

Substrat	Rauigkeit R_{rms}/nm ($500 \times 500 nm^2$)
Glas (Deckgläschen)	0,2 - 0,9
Glas mit Polylysin-Laminin-Beschichtung	> 2,2
Thermanox Kunststoff-Deckgläser (für Zellkultur)	2,2
Aluminium, auf Glas aufgedampft	2 - 3
Glimmer	< 0,1
Polyvinylphenylketon, an Luft geschmolzen (PVPK)	0,3
PVPK mit Laminin-Beschichtung	0,6 - 0,7
Furan-Polymer, gegen Glimmer polymerisiert (FP)	0,13-0,16
FP mit Laminin-Beschichtung	0,4

beispielsweise olfaktorischen Neuronen (Calof et al., 1991). Neben der Bereitstellung einer Substratstruktur für Zellen spielt Laminin auch eine Rolle als Wachstumsfaktor (Übersicht in Timpl, 1996; Aumaillet und Gayraud, 1998).

Auf dem Standardsubstrat für Oligodendrozyten-Kulturen, nämlich mit Polylysin und Laminin beschichteten Deckgläschen, wurden Rauigkeitswerte von mindestens 2,2 nm gefunden (typisches Höhenprofil Abb. 11 A). Die weiche und adhäsive Konsistenz (positiv geladenes Polylysin!) der Polylysin-Laminin-Beschichtung bewirkt oft „verschmierte“ Bilder. Einen größeren Bildausschnitt von beschichtetem Glas zeigt Abb. 12 B. Die mittlere Rauigkeit beträgt hier 2,6 nm innerhalb des eingezeichneten Rahmens und 3,8 nm auf der Gesamtfläche.

Zum Vergleich zeigt Abb. 11 B ein Höhenprofil der Oberfläche des Polymer-Substrats Polyvinylphenylketon mit Laminin-Beschichtung. Nach der Beschichtung mit Laminin und gründlichem Spülen zeigten beide Polymer-Substrate (PVPK und FP) eine hydrophile Fläche an der Stelle, wo sich der Tropfen mit der Proteinlösung befand. Die mittlere Rauigkeit des Substrats nach Beschichtung mit Laminin stieg bei PVPK von 0,3 nm auf 0,6 nm - 0,7 nm und bei FP von 0,16 nm auf 0,4 nm, alle Werte beziehen sich auf eine Fläche von $500 \times 500 nm^2$. Frisch präpariertes Furfurylalkohol-Phenylendiamin-Polymer zeigte bei Messung an Luft eine R_{rms} von etwa 0,15 nm, was auch dem Mittel für die übrigen Furanpolymere, sowohl bei Messung an Luft als auch in wässriger Lösung, entspricht. Mit Brenzkatechin modifiziertes FP zeigte eine etwas höhere Rauigkeit (0,2 - 0,5 nm).

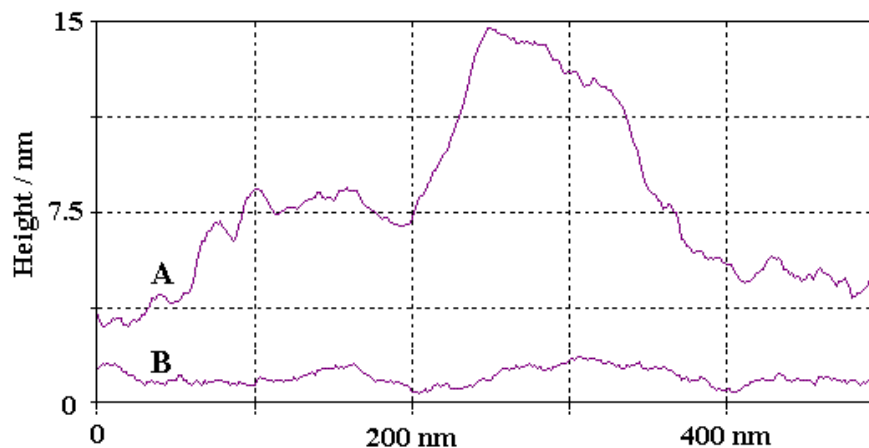


Abbildung 11: Repräsentative Linienprofile der Oberflächen von mit Polylysin-Laminin beschichtetem Glas und nur mit Laminin beschichtetem PVPK, gemessen in PBS. Die Oberflächenrauigkeit R_{rms} des gesamten Bildes ($500 \times 500 \text{ nm}^2$) betrug (A) 2,2 nm auf mit Polylysin-Laminin beschichtetem Glas und (B) 0,64 nm auf mit Laminin beschichtetem PVPK.

2.3 Polymersubstrate für die Kultivierung und Abbildung von Zellen

2.3.1 Tests mit Goldfisch-Oligodendrozyten

Bei den hier untersuchten Goldfisch-Gliazellen, bei denen die peripheren Bereiche der Lamellipodien gerade mal 20 - 30 nm dick sind, wird in besonderem Maße die Notwendigkeit deutlich, die Zellen auf einem sehr glatten und gleichzeitig wachstumsfördernden Substrat zu kultivieren. Nur dann ist es möglich, die Topographie der Zelle von der Textur des Substrats zu unterscheiden, die Rauigkeit des Standard-Zellkultursubstrats für Fisch-Oligodendrozyten ist viel zu hoch (Abb. 11 und 12). Im Gegensatz zu anspruchloseren Zellsorten wachsen Fisch-Oligodendrozyten aber nur sehr schlecht auf völlig unbeschichtetem Glas. Die Haftung auf der proteinfreien „inerten“ Oberfläche erwies sich besonders am SFM als mechanisch sehr instabil. Im übrigen ist die mechanische Stabilität auch auf beschichtetem Glas (Glas/Polylysin/Laminin) nicht ausreichend. Dies gilt besonders für lebende Zellen, teilweise aber auch für fixierte Zellkultur-Präparate, und äußert sich darin, dass die Zellen durch die Lateralkräfte, die bei der Rasterung im Kontaktmodus auftreten, verschoben bzw. vom Substrat gerissen werden. Dieser Effekt war noch ausgeprägter bei ausschließlicher Beschichtung von Glas mit Laminin, um die Kontamination der in Lösung über pH 6 negativ geladenen Sensorspitze mit dem positiv geladenen Polylysin und damit eine herabgesetzte Auflösung zu vermeiden. Allerdings wirkt Polylysin bei der Standardbeschichtung als „Kleber“ zwischen Glas und Laminin, so dass ohne Polylysin das Lebendpräparat noch instabiler adhäriert. Es konnte gezeigt werden, dass die Lamininbeschichtung von wachsenden Zellen

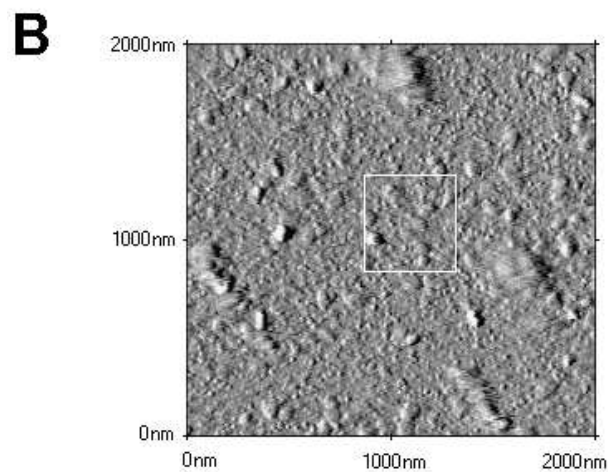
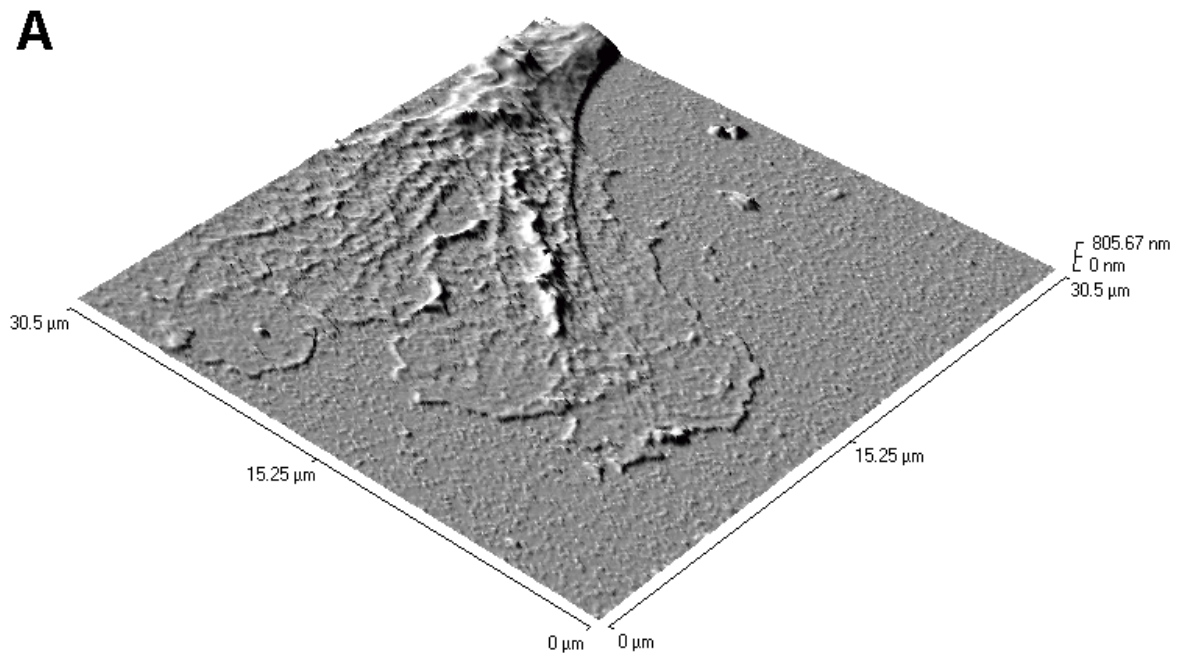


Abbildung 12: Goldfisch-Oligodendrozyt, kultiviert auf Standardsubstrat Glas-Polylysin-Laminin, fixiert mit Glutaraldehyd und in PBS gerastert. **A:** Detail eines Wachstumskegels. Es sind nur größere Strukturen des Zytoskeletts von der Textur des Substrats zu unterscheiden. **B:** Oberflächenstruktur des Substrats. Die Rauigkeit ($R_{rms} = 3,8 \text{ nm}$) ist aufgrund der Polylysin-Laminin-Beschichtung aufgrund großer Proteinaggregate vergleichsweise hoch (sauberes Glas: $R_{rms} < 1 \text{ nm}$). Der Bildausschnitt (Rahmen: $500 \times 500 \text{ nm}^2$) zeigt einen „glatteren“ Teilbereich des Substrats ohne ganz große Proteinaggregate ($R_{rms} = 2,6 \text{ nm}$).

zur Seite geschoben wird. Nach Rückzug oder Entfernung der Zellausläufer blieb eine Spur, bei Rückzug flächiger Strukturen wie Lamellipodien eine Art „Endmoräne“ aus aggregiertem Laminin zurück (Abb. 13). Chen et al. (1998) berichten über die bei SFM-Untersuchungen gefundene vergleichsweise schwache Adsorption von Laminin auf Glimmer in physiologischen Puffern und dessen Tendenz zur Aggregation in PBS-Puffer. Fest adsorbierte Lamininmoleküle zeigten in physiologischen Puffern immerhin noch eine beträchtliche intramolekulare Flexibilität (Chen et al., 1998 und 2000). Aus diesen Gründen ist eine stabilere Adsorption von Laminin als spezifisches Zellkultursubstrat unerlässlich.

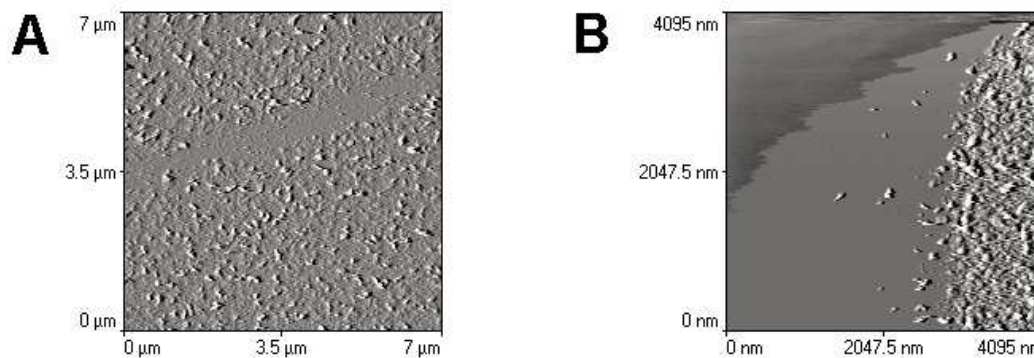


Abbildung 13: Mit Laminin beschichtetes Deckglas als Zellkultursubstrat (ohne Polylysin). Laminin adsorbiert nur sehr instabil ohne Polylysin als Kleber. Zurückgezogene Ausläufer einer lebenden Gliazelle hinterlassen eine Spur (A), eine nach einiger Zeit sich abkugelnde Gliazelle hinterlässt am Rand eine „Endmoräne“ aus aggregiertem Laminin (B).

Auf PVPK-Laminin-Substrat hafteten die kultivierten Zellen während der Messungen deutlich stabiler. Wie bereits aus den Linienprofilen und Rauheitswerten (s. Abb. 11 B) ersichtlich ist, wird durch die stabilere Adsorption auf dem Substrat die Tendenz zur Aggregation von Laminin deutlich herabgesetzt. PVPK erfüllt also sowohl die Notwendigkeit einer geringen Oberflächenrauigkeit als auch das Erfordernis einer (mechanisch) stabilen Adsorption wachstumsfördernder Substanzen. Die Oberfläche von festem PVPK ist glatt und stabil in wässriger Lösung. Ähnlich wie Polylysin kann es als Chelator von Metallionen agieren. Das wachstumsfördernde Protein Laminin adsorbiert direkt an die Polymeroberfläche, wobei die mittlere Oberflächenrauigkeit in einem tolerierbaren Ausmaß erhöht wird (Abb. 11 B).

Glia-Zellkulturen, die auf den beiden mit Laminin beschichteten Polymersubstraten (PVPK, FP-Normalrezeptur) kultiviert worden waren, zeigten das gleiche Wachstumsverhalten bzw. Erscheinungsbild wie Kontroll-Kulturen auf dem üblichen Glas-Polylysin-Laminin-Substrat. Die Zellen wuchsen vorzugsweise auf der mit Laminin beschichteten Teilfläche des Plättchens. Ihre Ausläufer waren am Rand der kreisförmigen, beschichteten Fläche konzentrisch orientiert und bildeten zunächst einen scharfen Rand zur unbewachsenen, unbeschichteten Fläche außerhalb davon.

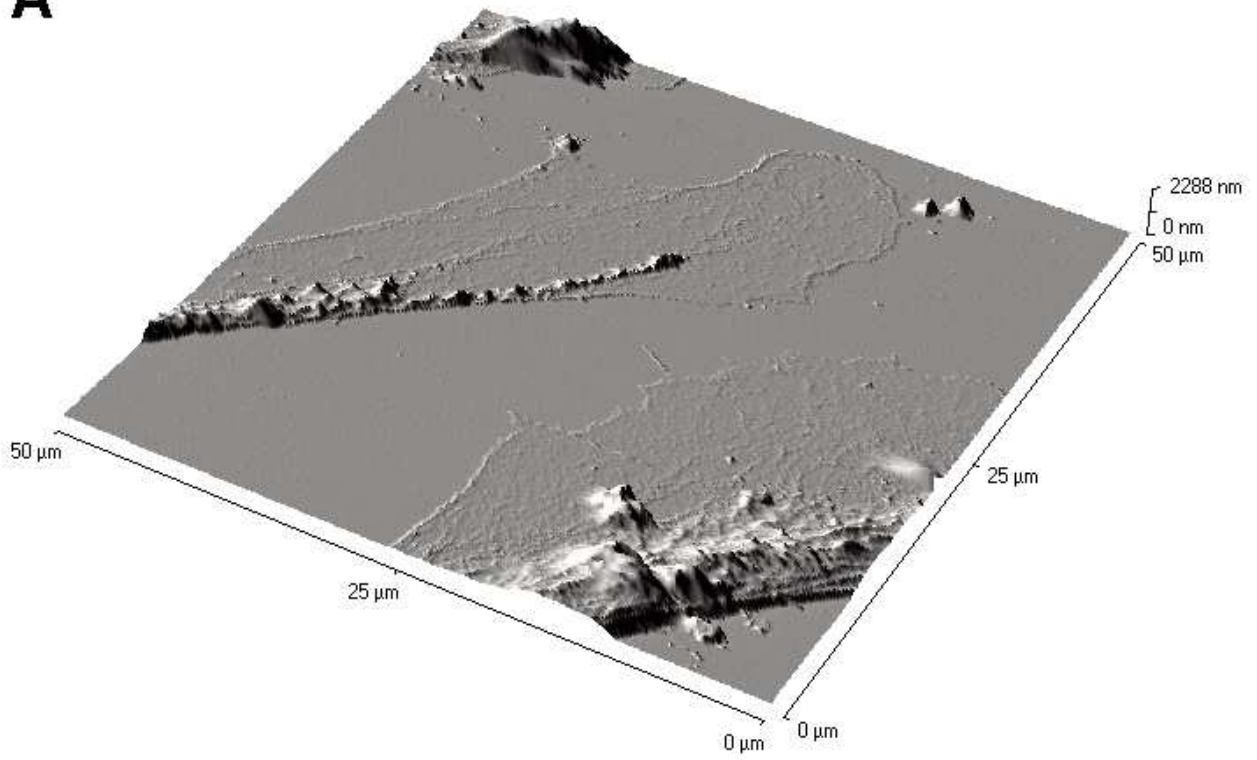
Auf einer frisch präparierten, unbeschichteten PVPK-Oberfläche war überhaupt keine Adhäsion bzw. kein Wachstum von Zellen zu beobachten. Erst nach einigen Tagen bis Wochen in Kultur breiteten sich die Zellen auch auf den zunächst unbeschichteten Bereichen der PVPK-Oberfläche aus. Nach gewisser Zeit können durchaus von der Zelle sezernierte Proteine oder Komponenten des Zellkulturmediums an das Substrat adsorbiert haben. Langgestreckte Zellen mit langen Ausläufern und membranösen Ausstülpungen (Lamellipodien), die von Bastmeyer et al. (1989, 1991, 1994) als Oligodendrozyten identifiziert worden waren, wurden mit dem SFM abgebildet. PVPK ist wegen seiner Transparenz besonders gut für die Abbildung von Zellen geeignet, da es dadurch die lichtmikroskopische Kontrolle der Positionierung des Sensors und die Beobachtung des Abbildungsvorganges erleichtert.

Auf PVPK war es möglich, die Topografie peripherer Lamellipodien von fixierten Zellen abzubilden (Abb. 14 A). Der Rand des Lamellipodiums ist sehr gut vom Substrat zu unterscheiden (Abb. 14 B). Die Lamellipodien weisen eine minimale Höhe von etwa 20 nm auf und konnten ohne dominierenden Einfluß der Substrat-Textur abgebildet werden (Abb. 15). Die dabei aufgelösten Strukturen zeigen ein komplexes Netzwerk zytoskelettaler Elemente. Der Rand des Lamellipodiums wird von nur wenigen Filamenten aufgespannt.

Die Abbildung von mechanisch empfindlichen lebenden Oligodendrozyten, insbesondere ihrer Lamellipodien, war auch auf PVPK schwierig, ohne dass ihre Membranen beschädigt wurden oder sie veranlasst wurden, ihre Lamellipodien zurückzuziehen und sich abzukugeln. Allerdings wurden sie nicht so leicht vom Substrat heruntergerissen wie oben für unbeschichtetes und beschichtetes Glas beschrieben.

Nach „harter Fixierung“ der Lamellipodien von Fisch-Oligodendrozyten konnte ein überwiegender Teil der Zelle durch intensives Spülen entfernt werden und es verblieben adhäsive Membranflecken auf dem Substrat in einem unregelmäßigen Muster, das aber die Umrisse des Lamellipodiums erkennen ließ (Abb. 16 A). Diese Flecken konnten sehr gut von dem vergleichsweise sauberen und glatten Substrat unterschieden werden (Abb. 16 B). Es handelt sich dabei möglicherweise um die von Giebel et al. (1999) näher untersuchten „Close Contacts“, da Fokalkontakte bei dieser Zellsorte offenbar nicht vorkommen. Die Tatsache, dass diese Flecken eine höhere Dicke aufweisen, als man es für eine normale biologische Membran erwarten würde (Abb. 16 B), legt nahe, dass sie aus einem Membranfleck mit daran gebundenen intrazellulären Strukturen und/oder Protein als „Spacer“ zwischen Substrat und Membran bestehen. Ein Hinweis darauf, dass zusätzliches, von den Zellen sezerniertes Material in den Bereichen vorhanden ist, die zuvor von ihnen bedeckt waren, ist die deutlich erhöhte Rauigkeit solcher Bereiche im Vergleich zu der Substratfläche, die nur mit Medium in Kontakt stand. Der kleinste Abstand Zelle-Substrat im Bereich der Lamellipodien (Close Contacts) wurde bei diesem Zelltyp mittels Oberflächenplasmonresonanzmikroskopie zu

A



B

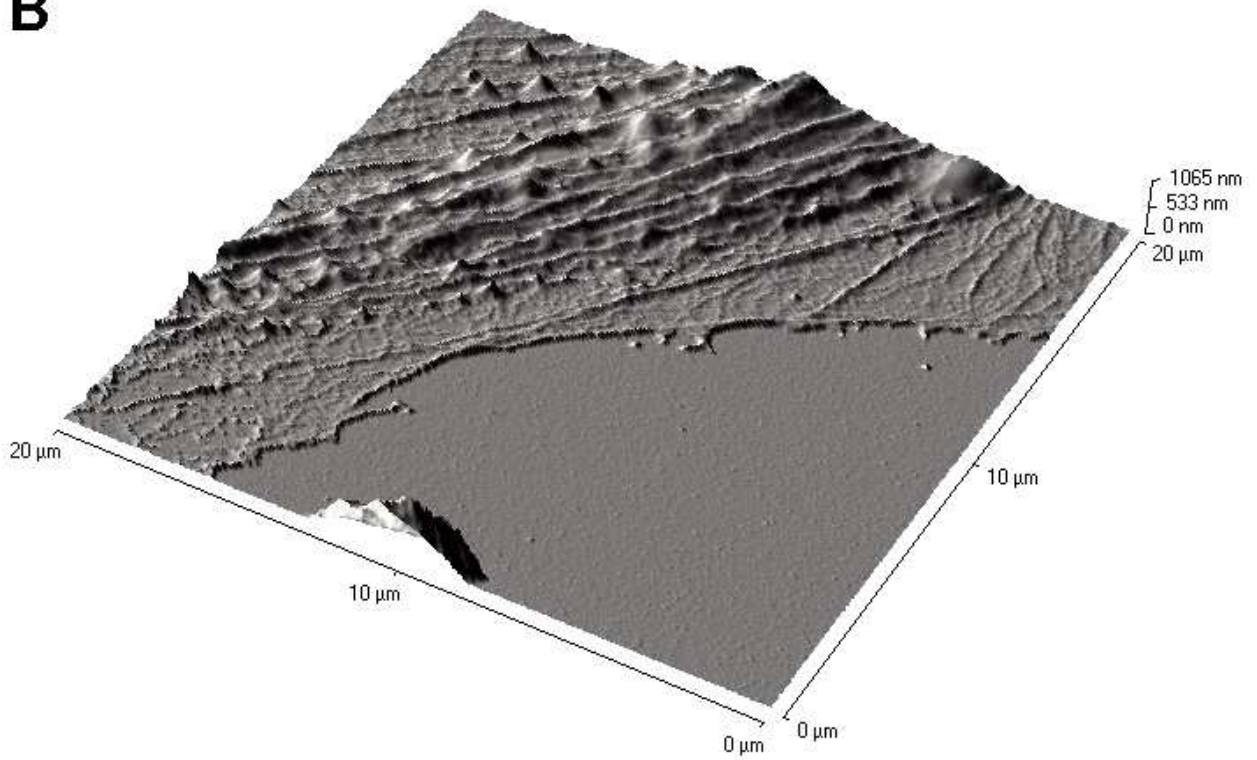


Abbildung 14: (vorherige Seite) Goldfisch-Oligodendrozyten, kultiviert auf mit Laminin beschichtetem PVPK, fixiert mit Glutaraldehyd und in PBS gerastert. Die langgestreckten Zellen bilden lange Ausläufer und große membranöse Ausstülpungen. Diese flachen Lamellipodien können klar von der Textur des Substrats unterschieden werden. **A:** Übersichtsaufnahme mit Ausläufern zweier Zellen. **B:** Zoomaufnahme eines Teils eines Ausläufers. Es sind zytoskelettale Strukturen und Organellen zu erkennen, die Zelle erhebt sich in diesem Bereich um bis zu 1 μm über das Substrat. Am Rand ist der Übergangsbereich zu einem Lamellipodium mit filigraneren Zytoskelettstrukturen zu erkennen.

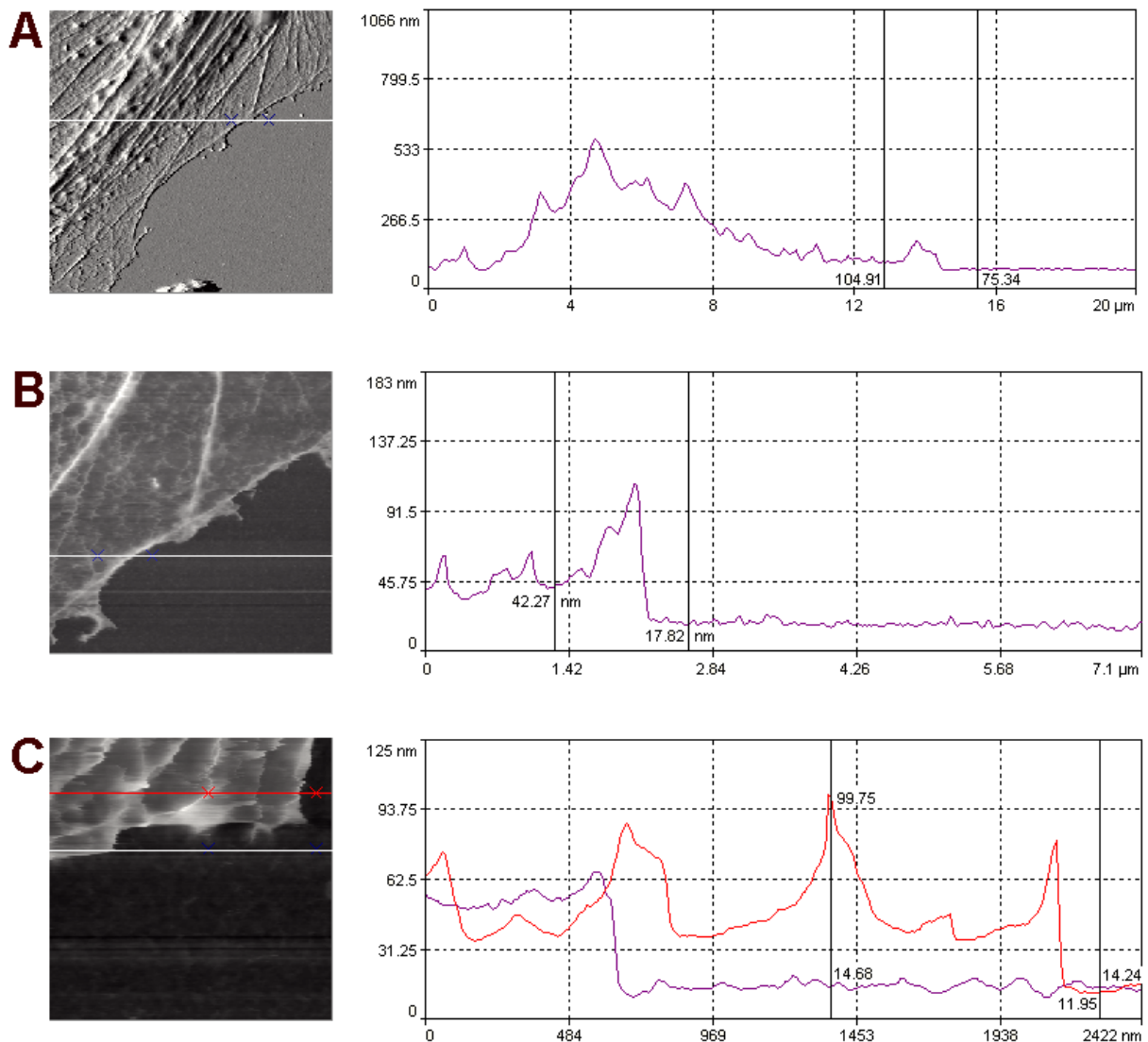


Abbildung 15: Repräsentative Höhenprofile am Rand des Ausläufers aus Abb. 14 B. Während der Ausläufer im Bereich von Filamenten mehrere 100 nm hoch ist (A), beträgt die Dicke des peripheren Lamellipodiums in den Bereichen ohne sichtbare Zytoskelettstrukturen etwa 20 - 30 nm (B, C).

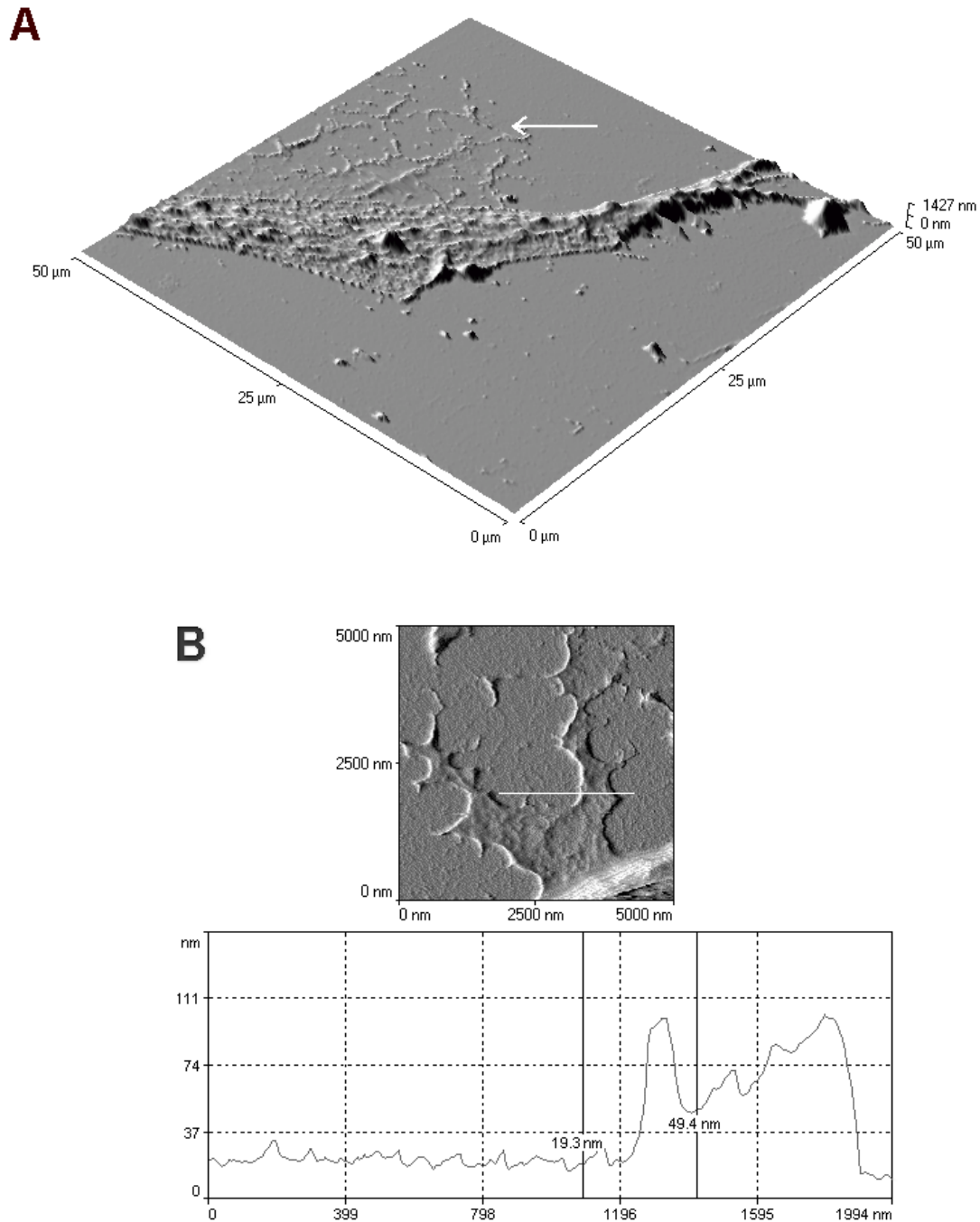


Abbildung 16: **A:** Osmotisch aufgebrochener Teil eines Goldfisch-Oligodendrozyten auf PVPK-Laminin. Die obere Membran wurde osmotisch nach „harter Fixierung“ in Glutaraldehyd entfernt. Der Pfeil markiert Fragmente der auf dem Substrat haftenden Membran eines Lamellipodiums, in den übrigen Bereichen sind nach dem Spülen noch Zytoskelettstrukturen und Organellen verblieben. **B:** Detailaufnahme eines solchen Membranfragments und repräsentatives Höhenprofil. Rechts unten im Bild ist noch ein Teil des Zytoskeletts sichtbar. Die Höhenprofile dieser Strukturen legen nahe, dass die adhäsiven Flecken aus der Zellmembran plus sezernierten Substanzen zwischen Membran und Substrat und/oder intrazellulär anhaftenden Komponenten bestehen.

25 ± 10 nm bestimmt (Giebel et al., 1999), was mit den hier gemessenen Höhenprofilen durchaus in Einklang steht. Eine andere Art adhäsiver Membranbereiche, die sogenannten Fokalkontakte, wurden bereits bei Hühnerembryo-Fibroblasten mittels SFM und Fluoreszenzmikroskopie charakterisiert (Dunlap et al., 1996): Plasmalemma und Substrat hatten ebenfalls einen gewissen Abstand zueinander und die Struktur des Fokalkontaktes reichte in das Zytoplasma hinein.

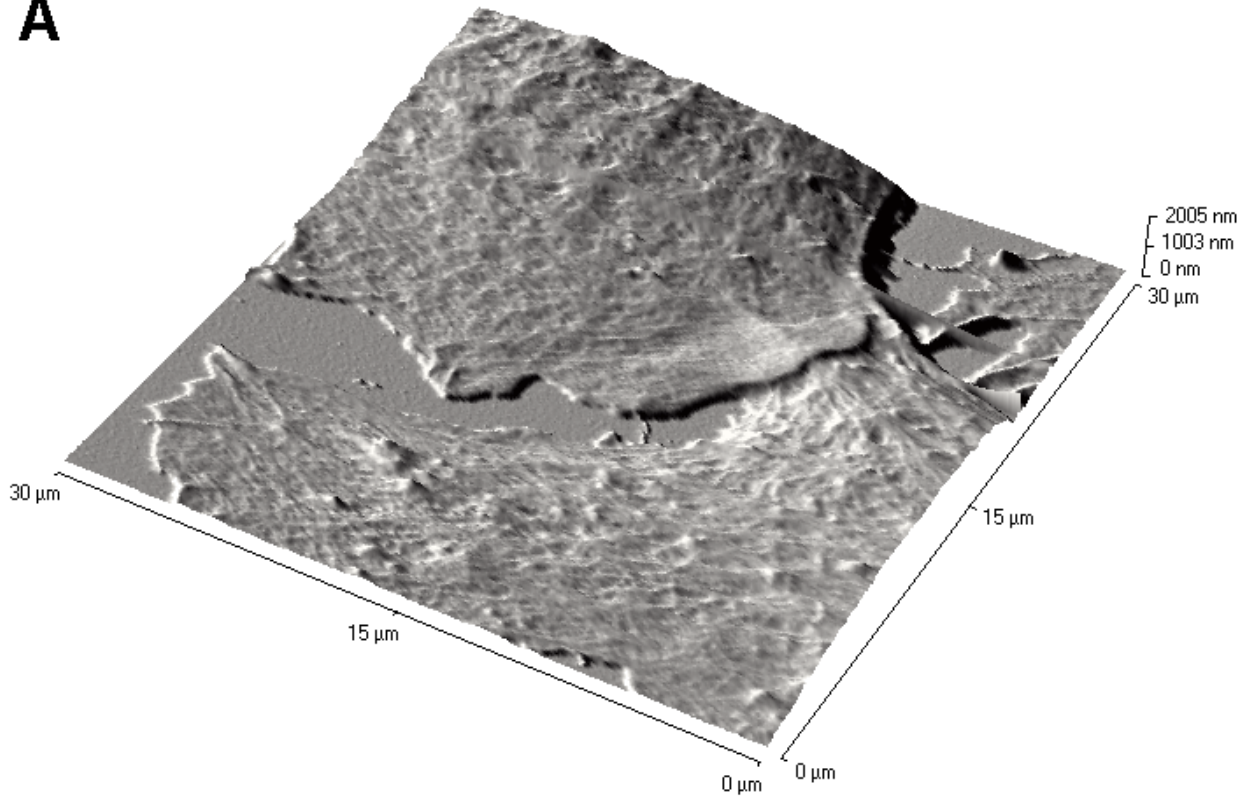
2.3.2 Abbildung verschiedener Typen lebender Zellen auf Polymersubstraten

Mechanisch stabilere Zelltypen wie Fibroblasten und Epitheliumzellen aus Fisch sowie Maus-3T3-Zellen (Abb. 17) konnten ohne besonderen Schaden an der Zelloberfläche lebend abgebildet werden. Dies gilt auch für Fibroblasten, die gelegentlich in den Glia-Primärkulturen (s. oben) vorkommen (ohne Abbildung). Die Zellen hafteten stabil auf dem beschichteten PVPK-Substrat und es waren jeweils mehrere Scans auf denselben Bereichen möglich. Die vergleichsweise anspruchslosen 3T3-Zellen wuchsen zwar im Gegensatz zu den übrigen Typen von Anfang an sowohl auf beschichtetem als auch auf unbeschichtetem PVPK mit gleicher Dichte, hafteten aber stabiler auf Laminin-beschichtetem PVPK (nach dem Spülen und während der Messung!).

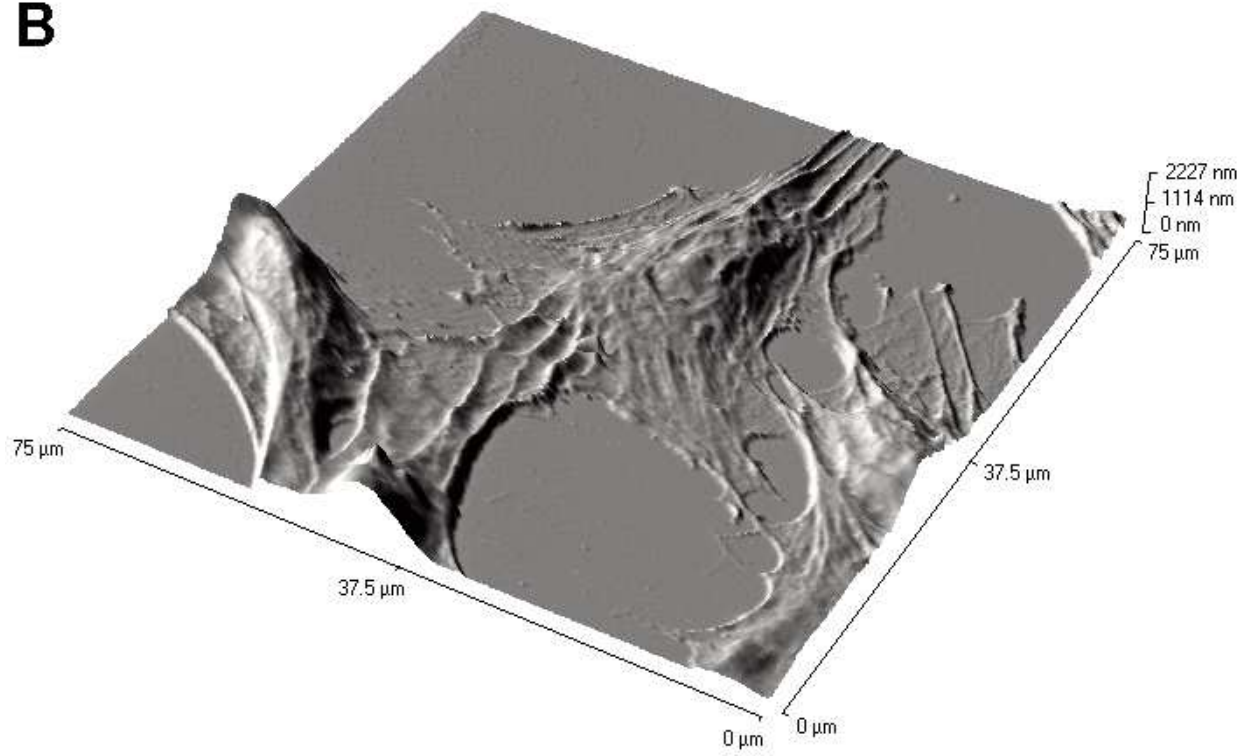
Lebende Zellen zeigten bisweilen eine auffällige Reaktion: Nach wiederholtem Rastern derselben Region von Epitheliumzellen, Oligodendrozyten oder (seltener) von Fibroblasten wurden die Lamellipodien oder sogar große Teile der Zelle (Abb. 18) zurückgezogen, Lamellipodien verschwanden manchmal komplett, was bereits für andere Zelltypen beschrieben worden war (Schoenenberger and Hoh, 1994). Die Zelle bewegt sich im Zeitmaßstab der Aufnahme (eine höhere Rasterungsrate führt zu einer noch schnelleren Degeneration der Zelle). Dieser Effekt wurde auch bei der kleinstmöglichen Auflagekraft, die noch einen Kontrast lieferte, beobachtet. Andererseits legen solche Aufnahmen nahe, dass die natürliche Motilität lebender Zellen auf dem PVPK-Laminin-Substrat erhalten bleibt.

Für höher aufgelöste Zoomaufnahmen in Details der Zelle müssen zumindest bei motilen Zelltypen mild fixierte Präparate herangezogen werden, um Bewegungen der Zelle auszuschließen. Bei sessileren Typen, wie zum Beispiel Fibroblasten, gelingt dies auch bei lebenden Zellen. Allerdings ist hier ein linearisierter Scanner sehr nützlich (Abb. 19), da die Piezodrift bei schrittweiser drastischer Verkleinerung des Rasterungsbereichs sonst die Treffsicherheit für den gewünschten Scanbereich stark herabsetzt. Ein anderer Effekt, der beim Rastern lebender Zellen auftritt, ist die Abbildung des unter der Zellmembran liegenden Zytoskeletts durch Verformung der flexiblen Membran (Abb. 19, vgl. Henderson et al., 1992; Haydon et al., 1996; Braet et al., 1998). Dies kann bei zu hoher Auflagekraft zu einem Durchbruch durch die Membran führen (Henderson et al., 1992), wie es möglicherweise der deutliche Artefakt in Abb. 19 B zeigt (unten und unterstes Linienprofil).

A



B



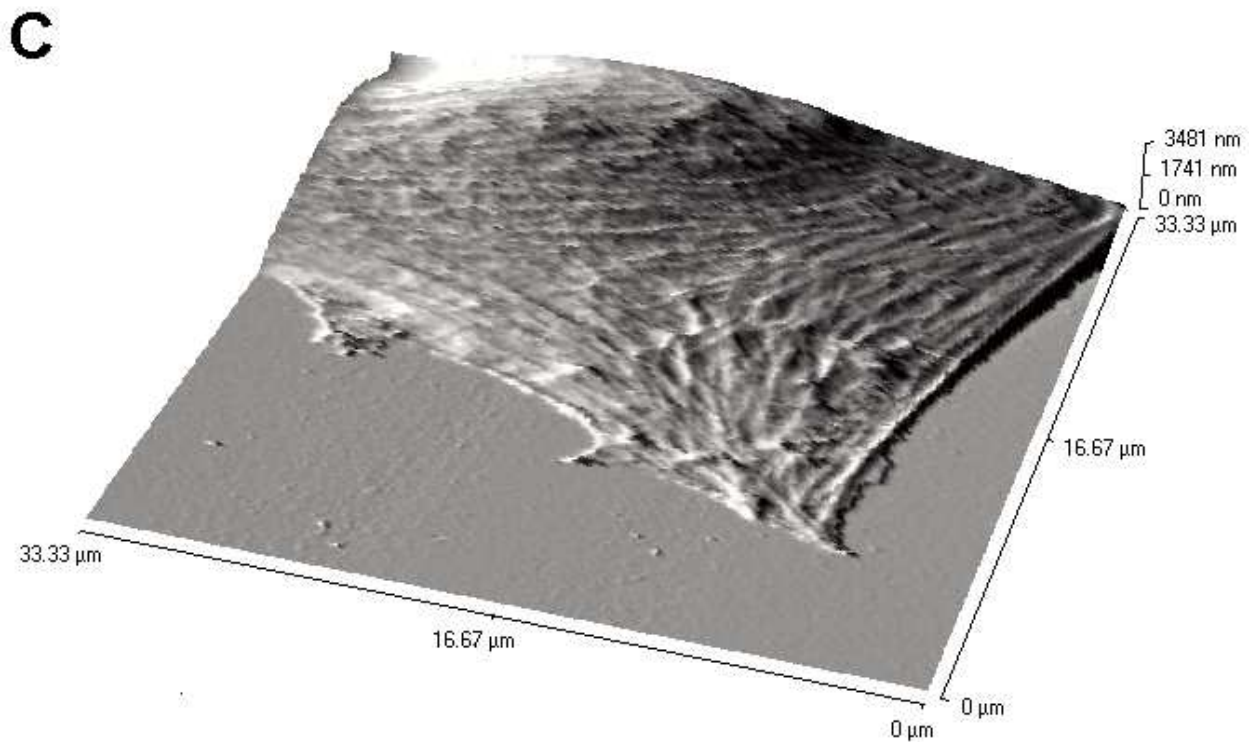


Abbildung 17: Bilder verschiedener auf Laminin-beschichtetem PVPK kultivierter Typen von Zellen. Die Zellen wurden lebend in dem jeweiligen Zellkulturmedium abgebildet. **A:** Goldfisch EPC-Zelllinie (Epithelium-Zellen, ECACC). Die Ränder zweier Zellen bilden gerade den für diesen epithelialen Zelltyp typischen konfluenten Monolayer. **B:** Goldfisch CAR-Zelllinie (Fibroblasten, ECACC). **C:** Rand einer Maus-3T3-Zelle (Typ Fibroblast, ECACC).

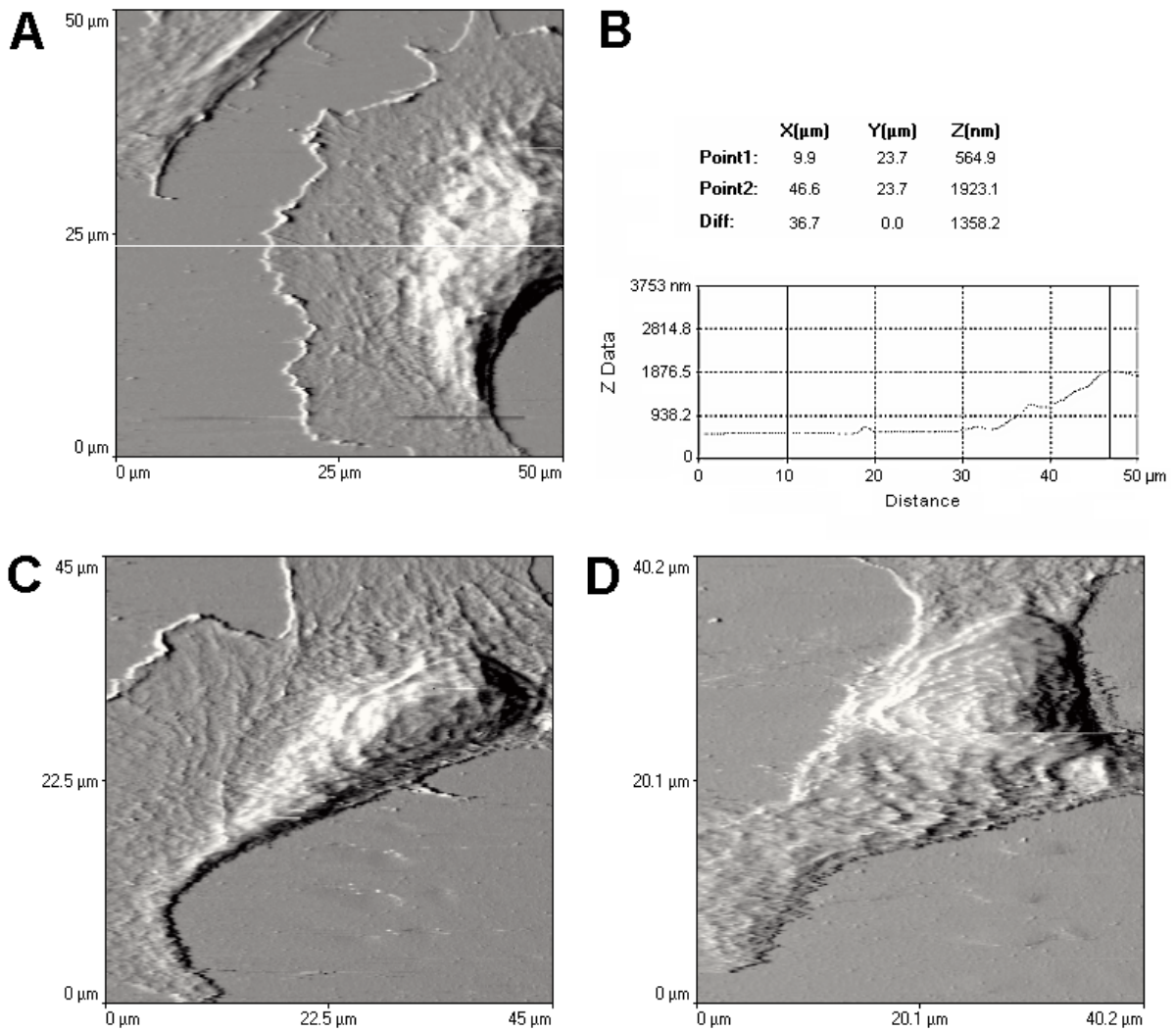


Abbildung 18: **A, C, D:** Lebende EPC-Epitheliumzelle, aufgenommen im Abständen von etwa 20 min, **B:** repräsentatives Höhenprofil aus A. Rasterungsgeschwindigkeit 40 bis 50 $\frac{\mu m}{s}$. Für eine Aufnahme wurden etwa 10 min benötigt. Die im Zeitmaßstab der Aufnahme zu beobachtende Bewegung der Zelle stellt eine Reaktion auf die mechanische Reizung durch die Sensorspitze dar.

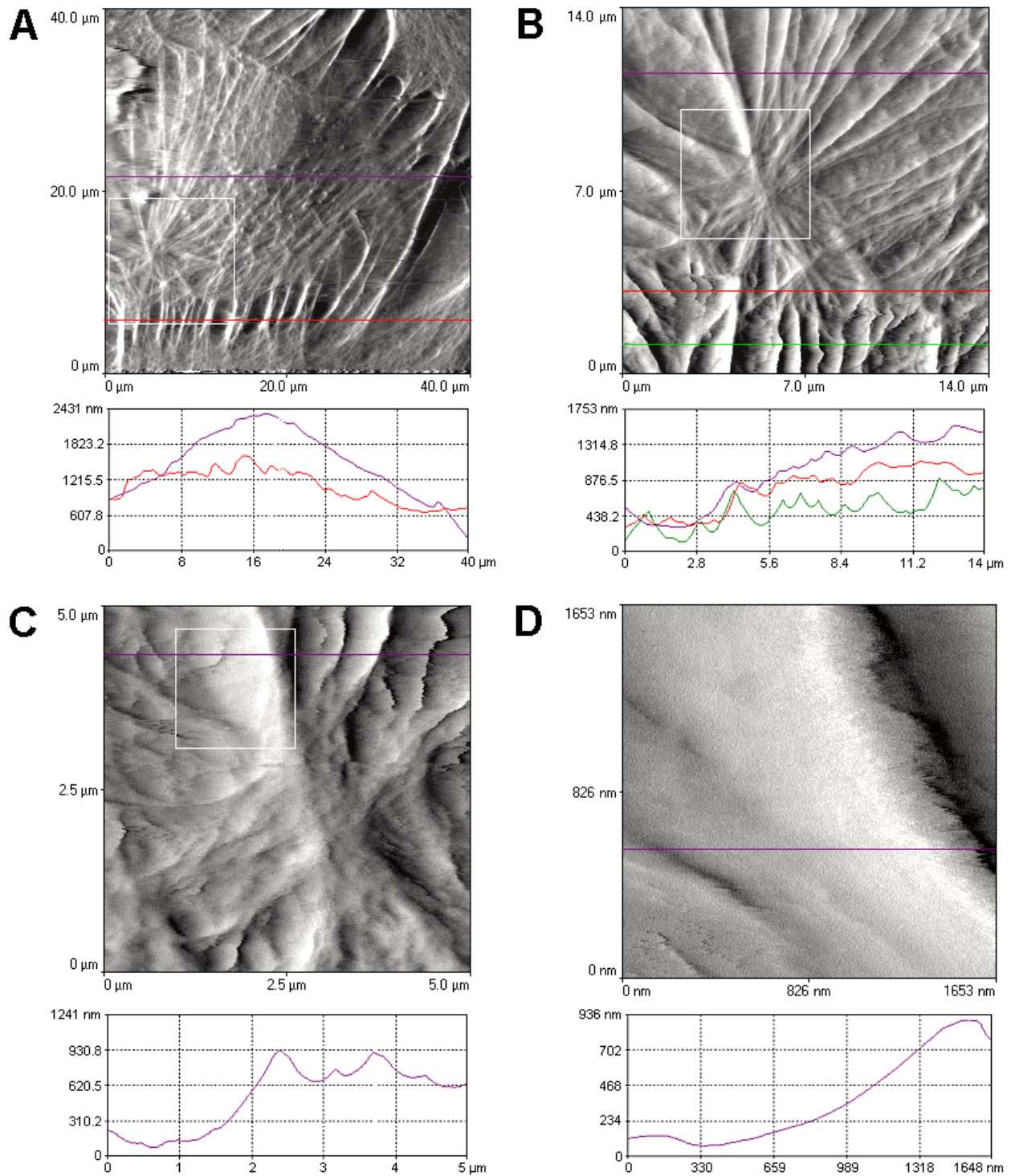


Abbildung 19: Konfluent gewachsene Kultur von Goldfisch CAR-Zellen, lebend abgebildet. **A-D:** Zoom-Serie einer unter der Zelloberfläche liegenden Zytoskelettstruktur, Bilder jeweils mit charakteristischen Höhenprofilen. Aufgenommen mit einem linearisierten Scanner (TopoMetrix).

2.4 Polymersubstrate für die Adsorption von Proteinen und Membranpräparationen

Purpurmembran (Abb. 20 A-D) wurde als Testpräparat gewählt, da die Struktur des kristallinen Bakteriorhodopsins gut untersucht ist und die Korrugationen klein genug sind, um eine Herausforderung für die zu testenden FP-Substrate zu sein. Die Dichte adsorbierter Purpurmembran-Fragmente auf Phenylendiamin-modifiziertem und auf Brenzkatechin-modifiziertem FP war vergleichbar zu derjenigen auf der Kontrolle (Glimmer). Das geordnete zweidimensionale Gitter von Bakteriorhodopsin konnte mit submolekularer Auflösung abgebildet werden, die Auflösung war vergleichbar oder besser als auf Glimmer mit derselben Apparatur. Fragmente auf nicht vollständig durchgehärtetem Harz erwiesen sich als stabiler gegen die Lateralkräfte der rasternden Sensorspitze als auf Glimmer, wohingegen die Adsorption auf gut durchgehärtetem Harz nicht so gut war wie auf Glimmer. Dies lag wahrscheinlich an der bei gut durchgehärtetem Harz hydrophoberen Oberfläche und der reduzierten Anzahl kovalenter Bindungen zu dem Polymer.

Adsorptionsdichte und Stabilität von Membranfragmenten mit *Na,K-ATPase* (Abb. 20 E) auf Furan-Polymer waren vergleichbar zur Adsorption auf Glimmer (Apell et al., 1992).

Collagen: Nach Inkubation einer frisch präparierten Glimmerfläche in Collagenlösung bei 4 °C waren im kraftmikroskopischen Bild ausgedehnte filamentöse Strukturen erkennbar (Abb. 21), ähnlich den von Chernoff und Chernoff (1992) beschriebenen Oligomer-Fasern (letztere waren allerdings nicht in gleicher Weise geordnet). Die hier gefundenen Strukturen wiesen dagegen eine Vorzugsrichtung auf. Die Adsorption des Proteins an Glimmer war also nicht so stark, um ein geordnetes Arrangement der Oligomere auf der Oberfläche zu verhindern. Auch war das Collagen leicht mit der Sensorspitze vom Substrat zu wischen (Abb. 21 D, E). Dagegen war im Falle von Brenzkatechin-FP unter den gleichen Bedingungen keine derartige geordnete Adsorption zu beobachten (Abb. 22 A). Möglicherweise sind die Wechselwirkungen zwischen dem Protein und dem Polymer stärker, so dass es zu einer ungeordneten Adsorption kam. Brenzkatechin-FP zeigte auch mit anderen Proteinen und Membranprotein-Präparationen sehr gute Immobilisierungseigenschaften. Die bei adsorbiertem Kollagen gemessenen Korrugationen (Abb. 21 C, 22 A) stimmen gut mit der Dicke der Tripelhelix des Collagen-Monomers (Typ I) überein, die 1,5 nm beträgt (die Länge der Monomere beträgt 300 nm; Gallop und Seifter, 1963). - Bei Raumtemperatur auf Glimmer adsorbiertes Collagen (Typ I) liegt ebenfalls deutlich ungeordneter vor (Monomere ineinander verwoben und verknäuel, vgl. Lin et al., 1999) als bei 4 °C angelagertes (Abb. 21). Dies kann als Hinweis darauf verstanden werden, dass eine Veränderung der Kinetik der Adsorption für die Art der Assoziation der Monomere untereinander tatsächlich kritisch sein kann.

Die hier beschriebene geordnete Adsorption von Collagen auf Glimmer ähnelt im übrigen etwas

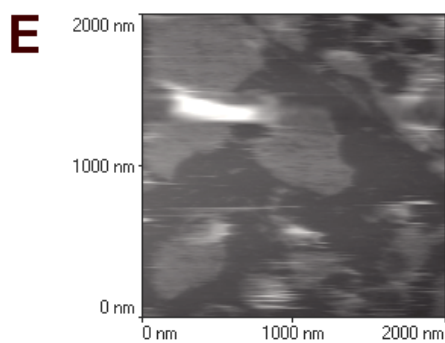
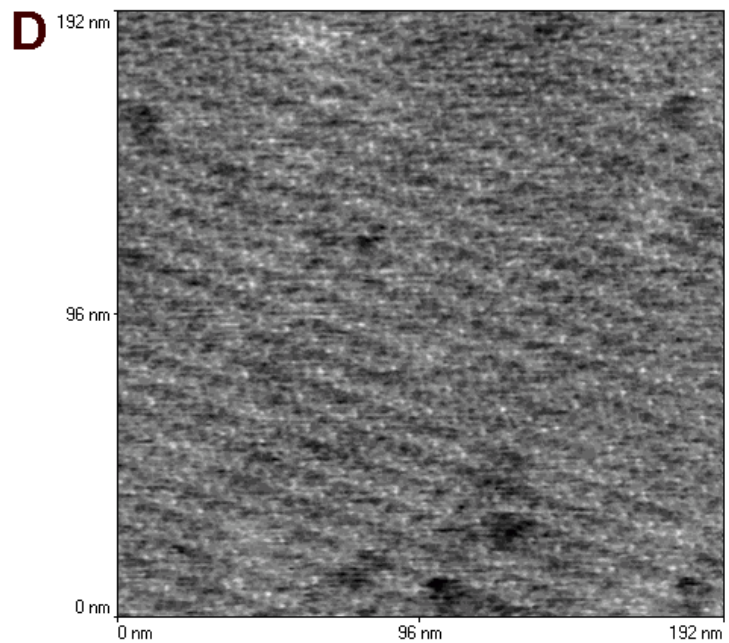
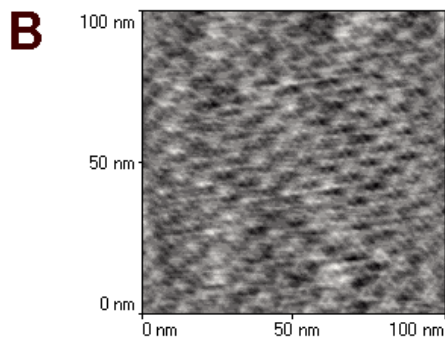
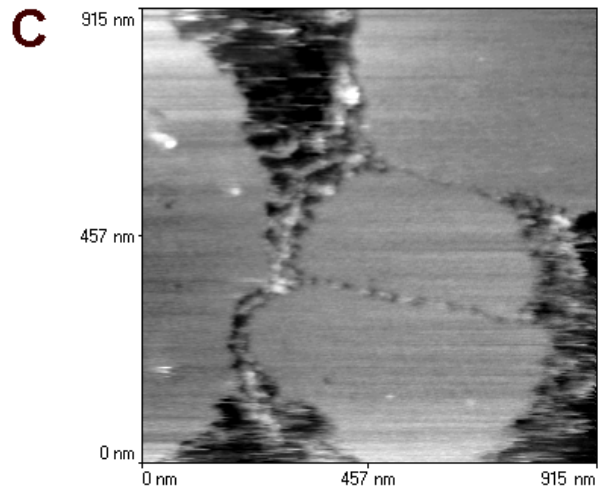
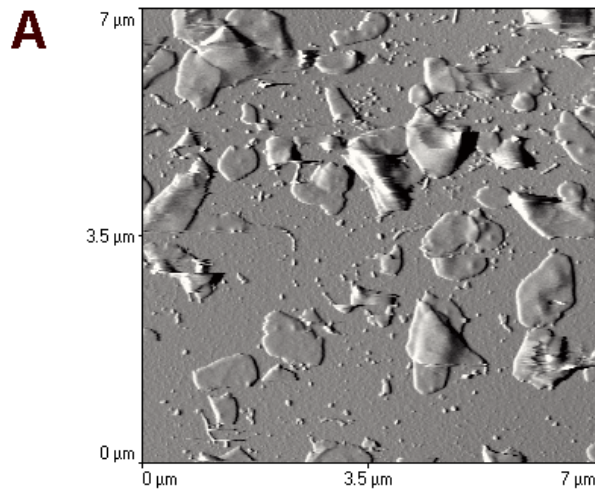


Abbildung 20: Membranpräparationen auf Furanpolymer-Substrat (FP), abgebildet in Puffer. **A:** Native Purpormembran-Fragmente, auf Brenzkatechin-FP adsorbiert. Die Fragmentdichte war vergleichbar mit Kontrollen auf Glimmer unter den gleichen Bedingungen (schattiertes Bild aus den Topographiedaten). **B:** Molekular aufgelöste Abbildung der Oberfläche eines Purpormembran-Fragments auf Brenzkatechin-FP. Sensorsignalbild, nach Fourier-Filterung. Typischerweise war bei Aufnahmen mit dem *TopoMetrix-Discoverer* ein derart hoher Rauschpegel auf dem Sensorsignal, dass auch bei optimierten Regelungsparametern fast keine Information im Topographiebild (Piezohub) erhalten wurde. In solchen Fällen wurde die Regelung zurückgestellt und im constant height-Modus gemessen. **C, D:** Aufnahme einer Purpormembran, adsorbiert auf Phenylendiamin-FP (Topographiebilder). **D:** Molekular aufgelöstes Topographiebild (ungefiltert). Diese Aufnahme mit dem modifizierten *TopoMetrix-Discoverer* entstand unter sehr vibrationsarmen Bedingungen bei Nacht während der Urlaubszeit. **E:** Membranfragmente mit Na,K-ATPase, auf Brenzkatechin-FP adsorbiert. (Messungen: C, D: A. Linder, Rest: U. Weiland).

den Befunden von Paige et al. (2001). Dort wurde Collagen (Typ I) bei Raumtemperatur angelagert, getrocknet und an Luft abgebildet. In Übersichtsaufnahmen waren nur Teilbereiche mit geordneten Strukturen belegt und mit ungeordnet adsorbiertem Material überlagert, ansonsten wurde völlig ungeordnete Adsorption gefunden. Allerdings deuteten auch bei Paige et al. (2001) Höhenprofile auf adsorbierte Monomere bzw. Oligomere. Dieses „Netzwerk collagenösen Gerüstmaterials“ wies in den geordneten Teilbereichen ebenfalls eine Periodizität der Größenordnung 300 nm auf und wurde als Frühstadium der Assoziation von FLS-Fibrillen (Fibrous Long Spacing Collagen) interpretiert. Die Ansätze enthielten für die Bildung von FLS-Fibrillen nötiges α_1 -Säureglykoprotein, das aber, wie hier (Abb. 21) gezeigt wird, offenbar in dem frühen Stadium, bei der Bildung des „Netzwerks collagenösen Gerüstmaterials“, keine Rolle spielt.

Immunoglobulin M: Offenbar waren die IgM-Moleküle so stabil an das Substrat adsorbiert, dass kraftmikroskopische Abbildung im Kontaktmodus in wässriger Lösung bei Raumtemperatur möglich war (Abb. 22 B). Höhenwerte und Durchmesser auf halbmaximaler Höhe der einzelnen Partikel (Linienprofil in Abb. 22 B) stimmen gut mit den Werten für einzelne IgM-Moleküle überein, die in einer Untersuchung im oszillierenden Modus von Schneider et al. (1998) gefunden worden waren ($\Delta z = 3,3$ nm, $\Delta x = 35,2$ nm). Die submolekulare Struktur ist in diesen Aufnahmen mit dem *TopoMetrix Discoverer* nicht aufgelöst. Submolekulare Auflösung bei IgM gelingt bei tiefen Temperaturen mit Kryo-SFM (s. Arbeiten von Han et al., 1995; Shao, 1999).

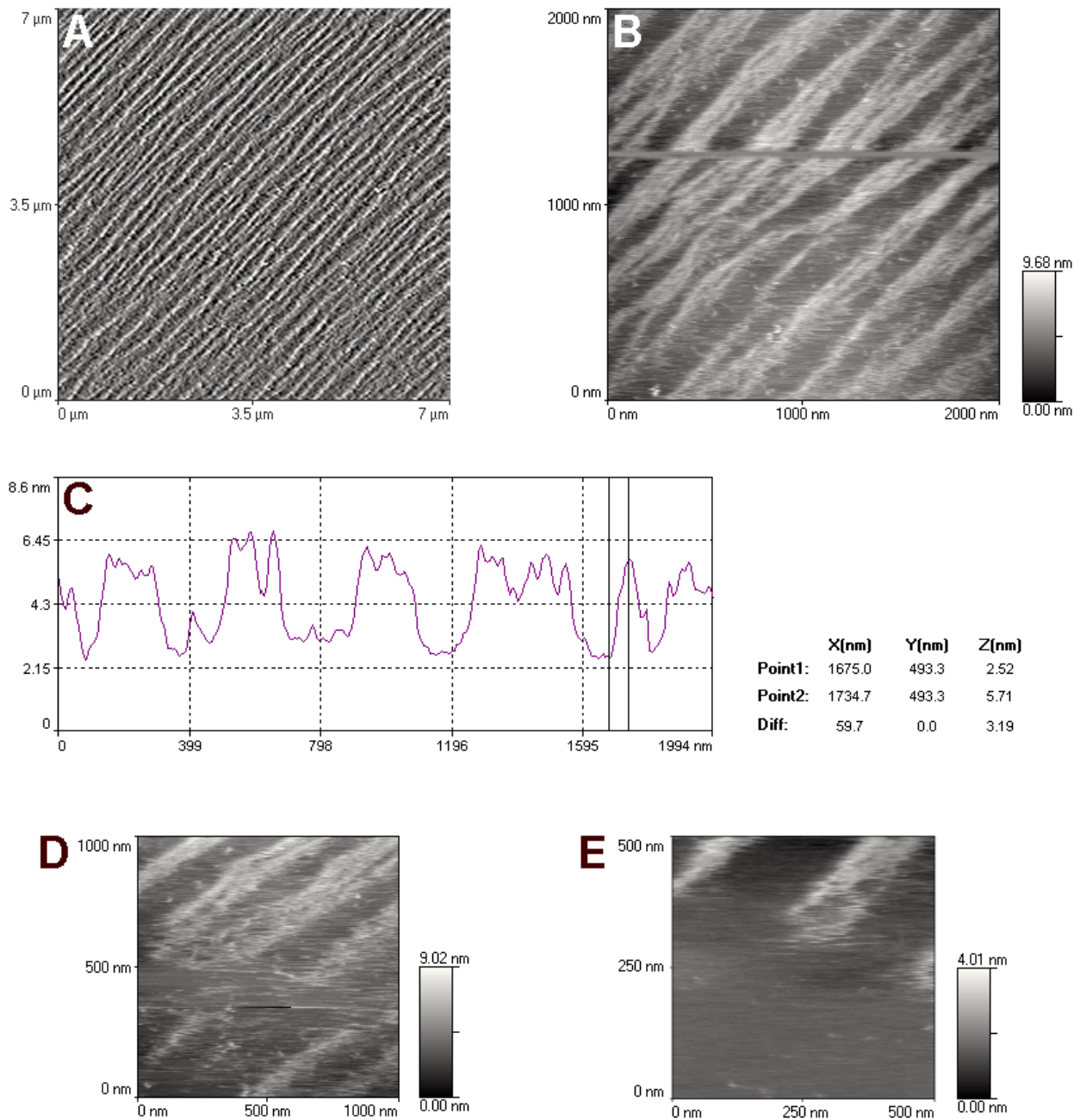


Abbildung 21: Collagen (Typ I), aus einer Lösung in PBS bei 4 °C auf Glimmer adsorbiert und in PBS abgebildet. **A**: Übersichtsaufnahme der geordnet adsorbierten Oligomer-Fasern (schattiertes Bild aus Topographiedaten). **B**: Topographiebild und **C**: charakteristisches Linienprofil daraus (in Rasterungsrichtung, die Periodizität senkrecht zur Ausrichtung der Oligomerfasern beträgt dagegen etwa 250 -300 nm). **D, E**: bei Erhöhung der Auflagekraft lässt sich das adsorbierte Collagen vom Substrat wischen.

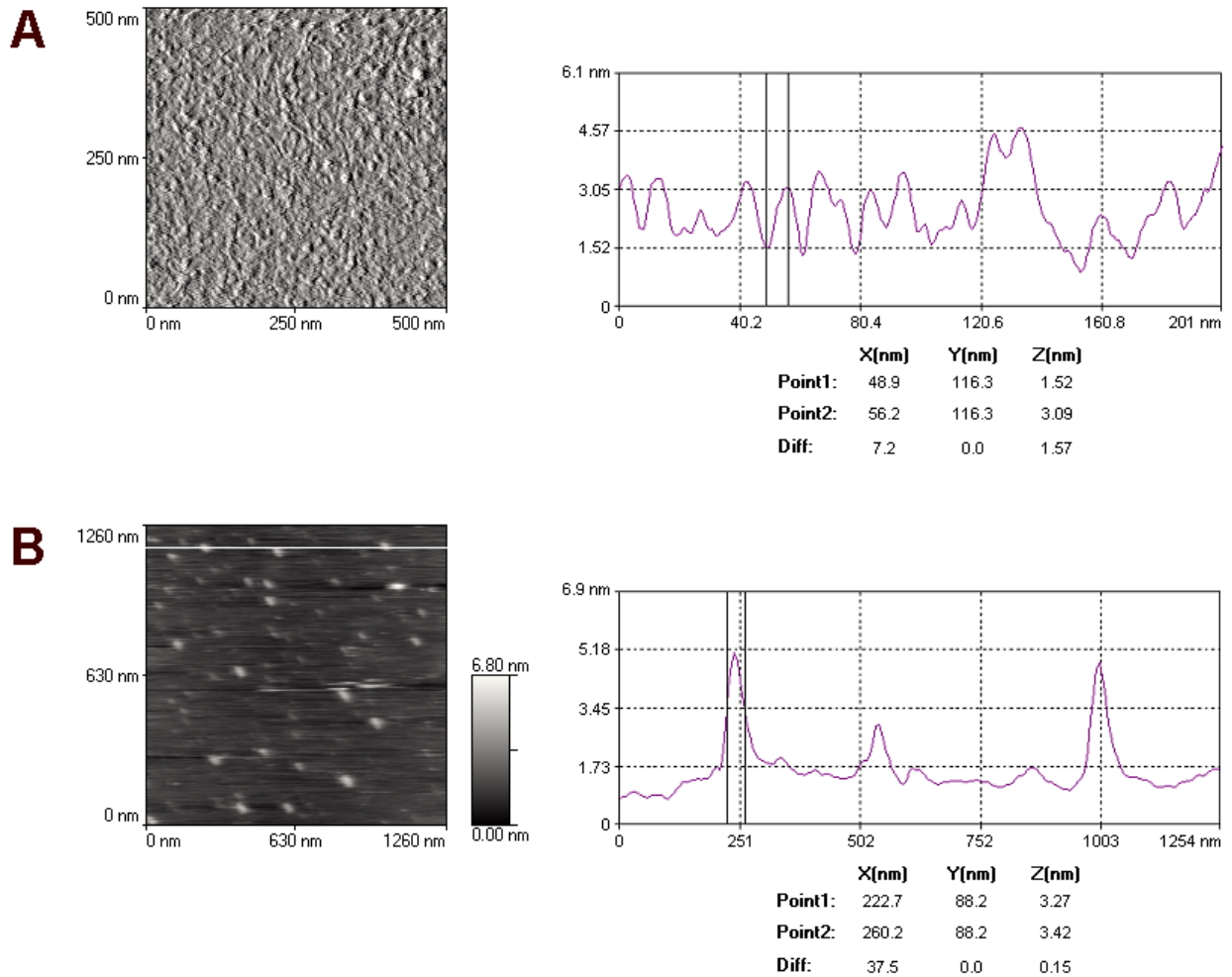


Abbildung 22: Proteinpräparationen auf Furanpolymer-Substrat, abgebildet in Puffer. **A:** Collagen (Typ I), aus einer Lösung in PBS bei 4 °C auf Brenzkatechin-FP adsorbiert und in PBS abgebildet. Übersichtsbild (schattiert, aus Topographiedaten) und repräsentatives Höhenprofil eines höher aufgelösten Topographiebilds. **B:** IgM auf Harnstoff-FP. Die Abmessungen der adsorbierten Partikel sind in den zugehörigen Linieneprofilen zu sehen.

2.5 Diskussion

Die Verwendung von Polymer substraten für rasterkraftmikroskopische Untersuchungen eröffnet ein breites Spektrum von Möglichkeiten, die spezifischen Anforderungen der Immobilisierung verschiedener biologischer Untersuchungsobjekte zu erfüllen. Es konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Polymer substrate im (Sub-)Nanometer-Maßstab glatt sind und dass sie so beschichtet oder modifiziert werden können, dass ein mechanisch stabiles Substrat für die Kultivierung von Zellen entsteht bzw. die Immobilisierung von Membranpräparationen und isolierten Proteinen möglich wird. Mit einer niedrigen mittleren Oberflächenrauigkeit (R_{rms}) von 0.3 - 0.6 nm (PVPK ohne/mit Lamininbeschichtung) und 0.13 - 0.16 nm (Furan-Polymer) ist eine wichtige Grundlage geschaffen, um rasterkraftmikroskopische Untersuchungen auf Zelloberflächen und an Membranpräparationen durchführen zu können. Die dabei erreichte Auflösung ist hoch genug, um eine Visualisierung von Proteinen bzw. Proteinkomplexen in nativen Membranen zu bewerkstelligen. Es wurde gezeigt, dass auf dem Standard-Präparat Purpurmembran die übliche submolekulare Auflösung erreicht wird.

Im Gegensatz zu Glas mit einer Polylysin-Laminin-Beschichtung, die üblicherweise für Primärkulturen der empfindlichen Fisch-Oligodendrozyten verwendet wird, ist das lediglich mit Laminin beschichtete *PVPK*-Substrat im Hinblick auf kraftmikroskopische Untersuchungen mechanisch stabil. Der Verzicht auf Polylysin bedeutet außerdem eine erhebliche Verminderung möglicher Kontaminationen der Sensorspitze. Hier eröffnet sich auch für andere empfindliche Zellsorten, die auf unbeschichtetem Glas oder sonstigen, kommerziell verfügbaren Zellkultursubstraten nicht wachsen, die Möglichkeit, ein sowohl auf die Erfordernisse der Zellkultur als auch auf die kraftmikroskopische Untersuchung der Zellen abgestimmtes Substrat herzustellen. Auf Laminin-beschichtetem *Furan-Polymer* (Normalrezeptor) zeigten Goldfisch-Oligodendrozyten ebenfalls normale Morphologie und Wachstumsverhalten. Die Abbildung am SFM wurde lediglich dadurch erschwert, dass aufgrund der dunklen Farbe des Polymerfilms die Visualisierung und gezielte Abbildung ausgewählter Zellen erschwert wurde. Aus diesem Grunde sollte dieses Substrat bei Zellen nur Verwendung finden, wenn eine besonders glatte Oberfläche erforderlich ist oder die visuelle Auswahl (z. B. bei einer dicht gewachsenem Kultur) nicht so wesentlich ist.

Die *Furan-Polymer*e bieten mit ihren variierbaren Eigenschaften eine echte Alternative zu Glimmer, falls die experimentellen Bedingungen weniger polare oder positiv geladene Oberflächen erfordern. Außerdem sind die Nachteile von Glimmer wie das Quellen in wässriger Lösung, sich ablösende und umherschwimmende Glimmerflocken sowie fehlende Möglichkeiten der chemischen Modifizierung der Oberfläche nicht vorhanden. Bei der Eignung von Modifikationen des Furan-Polymer ist allerdings zu beachten, dass Ko-Monomere unter Umständen die Rauigkeit des Substrats beeinflussen können. So besitzt insbesondere das Brenzkatechin-modifizierte FP

zwar hervorragende Adsorptionseigenschaften, weist aber eine leicht erhöhte R_{rms} (0,2 - 0,5 nm) auf, so dass dieses Material eher für die Adsorption von größeren Proteinen oder Membranpräparationen geeignet ist und ansonsten als mit Protein beschichtetes Zellkultursubstrat eingesetzt werden kann. Bei der Adsorption der zwar ausgedehnten, aber im Durchmesser vergleichsweise dünnen Collagen-Moleküle, ist dessen Rauigkeit beispielsweise bereits an der Obergrenze. Für Untersuchungen an einzelnen Proteinmolekülen sind die anderen Modifikationen geeigneter.

Die hier beschriebenen Materialien sind preisgünstig und die Substrate aus ihnen mit einfachen Mitteln zu präparieren. Die Präparation der Furan-Polymere ist allerdings aufwändiger als die Vorbereitung von Glimmer als Substrat und erfordert etwas Übung, da die Polymerfilme sehr dünn sein müssen, um eine erhöhte Rauigkeit aufgrund des Kondensationsprodukts Wasser auszuschließen.

Als möglicherweise praktikable Alternative zu der apparativ aufwändigen Herstellung glatter Goldoberflächen einerseits und den hier vorgestellten Polymer-Substraten andererseits bieten sich funktionalisierbare atomar glatte Oberflächen auf frisch geätzten Halbleiter-Wafern an. Hier hat sich beispielsweise Siliziumcarbid als geeignetes Material erwiesen, das bereits ohne Funktionalisierung interessante Adsorptionseigenschaften aufwies (A. Linder, unveröffentlichte Ergebnisse).

Daneben wurde auch die Herstellung bioreaktiver Monoschichten auf Wasserstoff-passiviertem Si(111) beschrieben (Wagner et al., 1997). In diesem Bereich ist daher ebenfalls mit weiteren Entwicklungen zu rechnen.

Wünschenswert für die Weiterentwicklung der beschriebenen Polymer-Substrate wären eingehendere vergleichende Untersuchungen an modifizierten FP-Substraten hinsichtlich der erreichten Oberflächenladungsdichten sowie der unterschiedlichen Immobilisierungseigenschaften. Substanzen wie Collagen, die bei der Adsorption zu geordneter Assoziation neigen, können hierfür unter Umständen als Testsubstanzen eingesetzt werden.

Gerade das Beispiel des Collagens zeigt aber auch, dass je nach Fragestellung ein unterschiedlicher Grad an Immobilisierung wünschenswert sein kann, sofern man etwa an Effekten wie der auf Glimmer gefundenen geordneten Selbstassoziation interessiert ist. Die noch weiter zu entwickelnden Möglichkeiten der gezielten Einstellung von Oberflächeneigenschaften des Substratmaterials sind deshalb von großem Interesse.

3 Sucroseporin

3.1 Einleitung und Zielsetzung

Gramnegative Bakterien besitzen zusätzlich zur Zytoplasmamembran eine äußere Membran, die asymmetrisch aus Lipopolysacchariden (außen) und Phospholipiden (innen) aufgebaut ist. Außerdem enthält diese Membran eine Reihe porenbildender Proteine. Hieraus lassen sich bereits zwei hauptsächliche Funktionen der Außenmembran erkennen, nämlich einerseits der Schutz der Zelle vor schädlichen Einflüssen (Außenmembran zusammen mit der Peptidoglykanschicht im periplasmatischen Raum) sowie andererseits die Aufnahme von kleinen Nahrungsmolekülen und Ionen durch wassergefüllte Kanäle (Schirmer, 1998; Forst et al., 1998; Dumas et al., 2000). Die sogenannten Porine stellen den hauptsächlichen Anteil der Proteinkomponente der Außenmembran. Während der Transport von Zuckermolekülen, Ionen etc. über die Zytoplasmamembran aktiv erfolgt und damit deren Konzentration im Periplasma niedrig gehalten wird, erfolgt der Transport über die Außenmembran rein passiv. Man unterscheidet unspezifische und spezifische Porine. Porinartige Moleküle finden sich im übrigen auch in Mitochondrien und Chloroplasten.

Die unspezifischen Porine stellen die „Grundausstattung“ zur Bewerkstelligung einer ausreichenden Permeabilität unter Normalbedingungen dar. Unter wachstumslimitierenden Bedingungen ist u. U. eine Erhöhung der Permeabilität für bestimmte Substanzen erforderlich, die aber nicht mit einer Verminderung der schützenden Funktion der Außenmembran, also etwa einer generellen Erhöhung der Ausschlussgröße, einhergehen darf. Daher werden unter diesen Bedingungen Porine exprimiert, die eine höhere Permeabilität für bestimmte Substanzen besitzen. Diese höhere Permeabilität kann durch spezifische Bindungsstellen erreicht werden, die entlang der Innenwand des Kanals angeordnet sind (Forst et al., 1998).

Beispiele für solche spezifischen Porine sind einmal das für Maltose und Maltooligosaccharide spezifische Maltoporin, das zusammen mit einem Transportsystem vom ABC-Typ (ATP Binding Cassette) und einem periplasmatischen Bindeprotein vom mal-Regulon kodiert wird. Des Weiteren wurde in *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli* (später auch in *Klebsiella pneumoniae*) ein Saccharose-Aufnahmesystem entdeckt, das es den Zellen ermöglicht, auf Saccharose als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Das auf einem Plasmid liegende scr-Regulon kodiert für einen Saccharose-spezifischen Transportkomplex vom PTS-Typ (Phosphoenoltransferase-System) in der Zytoplasmamembran und ein Porin, ScrY, das für Saccharose und Maltooligosaccharide spezifisch ist. Ein periplasmatisches Bindeprotein ist nicht bekannt (Schmid et al., 1991; Hardesty et al., 1991; Schüle in et al., 1995; Forst et al., 1993; Forst et al., 1998).

Die unspezifischen Porine sind Homotrimere aus 16-strängigen antiparallelen β -Barrels, wobei die einzelnen Stränge auf der extrazellulären Seite durch Schleifen (Loops) verschiedener Länge und

auf der periplasmatischen Seite überwiegend über kurze Haarnadelschleifen verbunden sind. Der dritte externe Loop faltet sich ins Innere des Barrels und verengt damit das Lumen des Kanals im Bereich der Membranmitte.

Im Gegensatz hierzu weisen Maltoporin und Sucroseporin 18 Stränge auf. Die Struktur von Sucroseporin wurde röntgenkristallographisch mit einer Auflösung von 2,4 Å bestimmt (Forst et al., 1998), dies bezieht sich auf die Aminosäurenreste 71 bis 483, die die Pore bilden. Das im Querschnitt nierenförmige β -Barrel selbst misst etwa 50 Å x 28 Å und hat eine Höhe von 25 Å in der Nähe des Zentrums des Trimers und 50 Å an der Peripherie des Trimers. Die externen Loops (Loops 4 bis 9, Abb. 23 B) neigen sich teilweise über das gemeinsame Vestibül der drei Monomere, Loop 1 faltet sich nach innen zu der Konstriktionsstelle und bildet Wasserstoffbrücken zu Loop 3. Loop 2 füllt eine Lücke oberhalb des Loops 3 eines benachbarten Monomers und trägt damit zur Stabilisierung des Trimers bei, das ansonsten über polare Wechselwirkungen am oberen und unteren Rand des Barrels und mittels hydrophober Wechselwirkungen dazwischen zusammengehalten wird. Die hydrophobe Kontaktzone mit den Membranlipiden besteht aus aliphatischen Resten und ist bis zu 33 Å breit. Sie wird wie bei anderen Porinen von zwei Kränzen aus amphiphilen aromatischen Resten im Übergangsbereich von der apolaren zur polaren Zone der Membran begrenzt (s. auch Abb. 29). Eine Reihe aromatischer Reste im Innern des Kanals von Maltoporin und Sucroseporin wird als Kette von Bindungsstellen (bzw. als „Rutschbahn“) für Zuckermoleküle angenommen, deren Pyranosylringe mit den aromatischen Ringen wechselwirken, während mit benachbarten ionisierbaren Resten H-Brücken gebildet werden können („greasy slide“ und „ionizable track“). Kokristallisation mit Saccharose ergab, dass Sucroseporin zwei distinkte spezifische Saccharosebindungsstellen im Innern des Kanals besitzt.

Sequenzhomologie zu Maltoporin besteht für 411 Reste, die N-terminalen 72 Reste finden keine Entsprechung bei Maltoporin. Die N-terminalen 70 Reste der Struktur konnten röntgenkristallographisch nicht gelöst werden. Aus der Sequenz erkennt man jedoch für die Reste 1-42 ein Muster von wiederkehrenden Heptaden, aus dem sich bereits ein linksdrehendes paralleles Coiled Coil als Tertiärstruktur vermuten ließ (Lupas, zit. nach Forst et al., 1998; Lupas, 1996). Dieses wird aus drei α -Helices mit je zwölf Windungen gebildet, eine Helix von jedem Monomer. Die Länge dieser Struktur wurde von den Autoren auf 65 Å, der Durchmesser auf 23 Å geschätzt (Abb. 23A). Mit Hilfe von Circular dichroismus-Spektroskopie und analytischer Zentrifugation konnte diese Annahme bezüglich der Tertiärstruktur bestätigt werden (Dumas et al., 2000). Dieselben Autoren fanden eine Saccharose-Affinität des isolierten N-terminalen Peptids (Gleichgewichtsdialyse) und führten funktionelle Tests mit einem Fusionsprotein aus diesem Peptid und Maltoporin durch (Transport in Proteoliposomen). Dabei zeigte sich eine verbesserte Translokation längerer Malto-oligosaccharide, ganz im Gegensatz zu Wildtyp-Maltoporin, außerdem höhere Dissoziationsraten derselben. Insgesamt stützen diese Ergebnisse ein Modell, das dem N-Terminus den funktionellen

Ersatz eines spezifischen periplasmatischen Bindeproteins zuweist (Forst et al., 1998): Die über die Bindungsstellen in der Pore ins Periplasma gelangenden Zuckermoleküle binden an die Coiled-Coil-Struktur und gelangen über diese „verlängerte Zuckerrutschbahn“ schneller und zielgerichteter vom Kanal in der Außenmembran zum Translokationssystem in der Zytoplasmamembran.

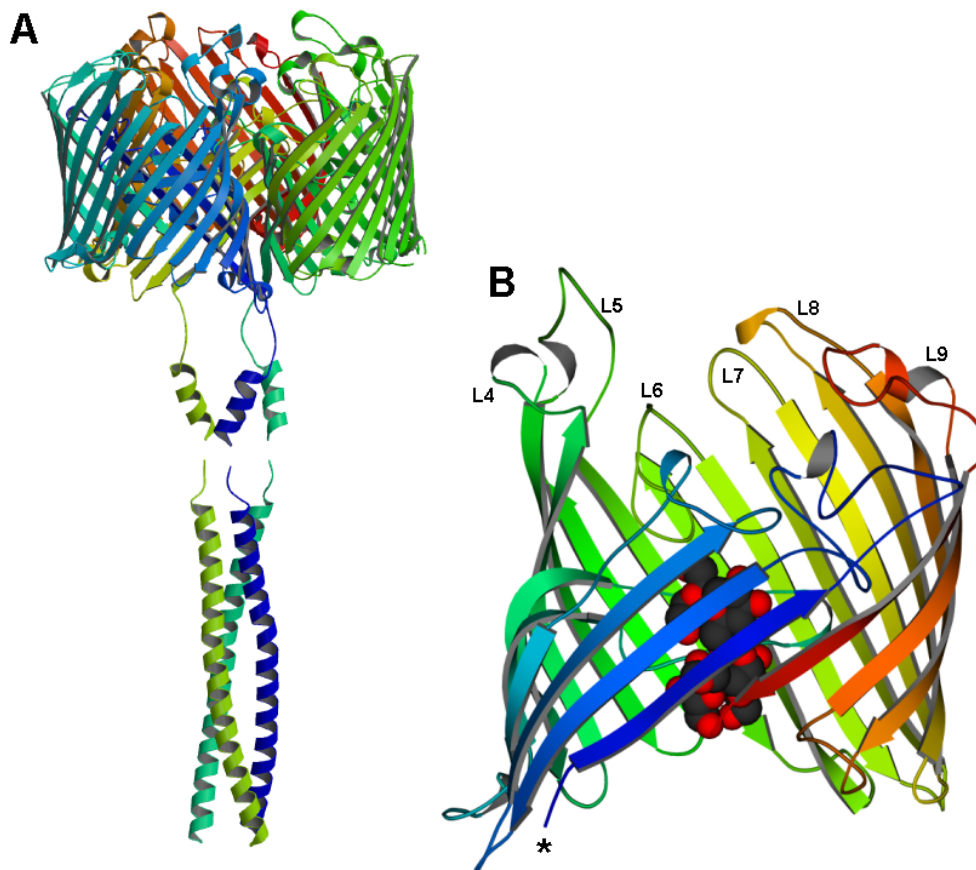


Abbildung 23: **A:** Modell des Sucroseporintrimers aus Röntgenstrukturdaten mit einer Skizze der putativen Coiled-Coil-Struktur des N-Terminus (unten). Extrazelluläre Seite oben, periplasmatische unten (Eckhard Hofmann). **B:** Monomer ohne N-Terminus mit zwei gebundenen Saccharosemolekülen. Extrazelluläre Loops: L4-L9, Stern: N-Terminus (AG Welte).

Die Zielsetzung des vorliegenden Projekts bestand zum einen in der zweidimensionalen Rekonstitution von Sucroseporin mit Lipid. Dies war die Voraussetzung für die Durchführung rasterkraftmikroskopischer Untersuchungen der zum extrazellulären Medium und zum Periplasma hin exponierten Seiten des Proteins. Die Tatsache, dass mit dieser Methode eine Abbildung von Einzelmolekülen mit submolekularer Auflösung in quasi nativer Umgebung möglich ist, das Trimer also gleichzeitig in einer Lipidphase eingebettet ist und ansonsten mit einem Elektrolyten in Kontakt steht, ermöglicht es im Prinzip, Domänen der elektrolytexponierten Oberflächen abzubilden

und nach ihrer Topographie und Flexibilität zu unterscheiden. Insbesondere war der Versuch eines Nachweises des als sehr flexibel anzunehmenden N-Terminus von Interesse. Eine dicht gepackte Rekonstitution des Proteins bei geringem Lipidanteil erweist sich aufgrund der dann höheren mechanischen Stabilität von auf einem Substrat adsorbierten Vesikelfragmenten als Vorteil für kraftmikroskopische Untersuchungen. Zweidimensionale Kristallisation des dicht gepackten Proteins wurde angestrebt, um mit Hilfe von Mittelungsverfahren Daten höherer statistischer Zuverlässigkeit und Auflösung zu erhalten.

3.2 Rekonstitution von Sucroseporin mit Lipiden und zweidimensionale Kristallisation

Das gereinigte Sucroseporin ist über lange Zeit (Wochen bis Monate) stabil und kann daher ohne weiteres einem 72-stündigen Rekonstitutionsexperiment unterworfen werden. Ein quantitativ nennenswerter Abbau des interessierenden N-Terminus nach Lagerung konnte bei dem gereinigten Protein nicht gefunden werden. Neben der Bande des Wildtyp-Monomers (ca. 53 kD) kann im Gel (Abb. 24) eine nur schwache Bande des möglichen N-terminalen Abbauprodukts knapp unterhalb davon festgestellt werden (vielleicht auch bedingt durch hohe Temperatur und Denaturierung bei SDS-PAGE!). Lediglich bei fast zwei Jahre altem ScrY war diese Bande etwas deutlicher, darüber hinaus sind dann auch Abbauprodukte des Barrels selbst erkennbar. Ein schnellerer N-terminaler Abbau bei Lagerung in Detergenz-Lösung wurde anhand nicht denaturierender Gelelektrophorese und Massenspektroskopie bislang nur für das Detergenz Dodecylmaltosid beschrieben, nicht jedoch für das hier verwendete β -Octylglucosid (Michels, 1999).

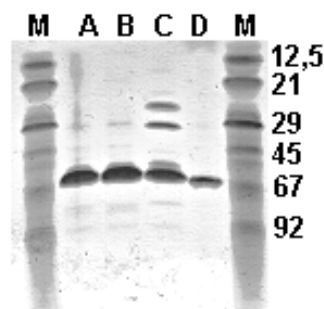


Abbildung 24: SDS-PAGE: ScrY nach Reinigung, bei 4 °C gelagert. **A, B:** ScrY, 3 Monate alt, **C:** ScrY, 22 Monate alt, **D:** 5 Monate alt. Kein nennenswerter Abbau des N-Terminus nach Lagerung bzw. Gelelektrophorese feststellbar (nur schwache Banden bei zu erwartender Masse von ca. 46 kD). **M:** Marker [kDa].

Die Stabilität der N-terminalen *Tertiärstruktur* (Coiled-Coil) hingegen ist, verglichen mit dem Barrel-Trimer, deutlich geringer, diese denaturiert bereits bei 44 °C (Dumas et al., 2000). Die maximale Temperatur von 37 °C bei der Rekonstitution lag allerdings noch deutlich darunter.

Unter den Bedingungen für die Rekonstitution wurden im Dialysepuffer die Konzentration der zweiwertigen Ionen ($[MgCl_2]$ zwischen 2 und 80 mM) sowie der pH (zwischen 6 und 8) variiert. Beste Ergebnisse ergaben sich bei einem pH 6 und hoher $[MgCl_2]$ von 50 bis 80 mM. Zweimaliges Durchlaufen der Temperaturstufen 20 °C → 37 °C → 20 °C und damit zweimaliges Durchschreiten der Phasenumwandlung des Lipids von flüssig nach quasikristallin (Jap et al., 1992) während der 72-stündigen Rekonstitution erbrachte gegenüber einem entsprechenden einphasigen Temperaturprofil keine Vorteile. Ein signifikanter Unterschied bei den Ergebnissen der Dialyse in der optimierten Durchflussapparatur gegenüber den in einem möglichst kleinen Flüssigkeitsvolumen (mit gleicher Pufferaustauschrate) eingetauchten Dialyse-Buttons war nicht festzustellen.

Unter diesen Bedingungen ergibt sich bei Variation des Massenverhältnisses Lipid zu Protein (LPR) ein deutlicher Übergang von großen Vesikeln mit einem Durchmesser von mehreren μm bei LPR = 0,1 zu kleineren Vesikeln (wenige 100 nm bis 1 μm Durchmesser) bei LPR > 0,15 (Abb. 25). Über einem LPR von 0,3 sieht man alle Zeichen von Lipidüberschuss, nämlich kleine Lipidvesikel, mehrschalige Vesikel („Onion-Struktur“, Lorenz Hasler, pers. Mitt.) sowie „milchiges“ Erscheinungsbild derselben im Elektronenmikroskop. Bei höherem LPR ist außerdem die mechanische Stabilität der Präparationen bei SFM-Messungen deutlich geringer. Wie gezeigt wurde (s. unten), handelt es sich bei den großen Vesikeln um amorph und bidirektional rekonstituiertes Sucroseporin, bei den kleineren finden sich unidirektional-kristallin rekonstituierte Anteile. Näheres zum Einbau des Proteins bei den beiden Typen von Vesikeln siehe unter 3.3.2. Bei kleinem LPR beginnen offenbar Protein-Protein-Wechselwirkungen die Interaktionen des Proteins mit dem Lipid zu überwiegen. Auch die Fluidität des Lipids spielt hier eine Rolle, mischt man bei einem Gesamt-LPR von 0,15 - 0,2 das Lipid DMPC zu gleichen Teilen mit dem fluideren POPC, so erhält man einen vergleichsweise hohen Anteil unidirektional mit ScrY gepackter und teils kristalliner Vesikelfragmente (kristalline Areale mit bis zu ca. 400-500 nm maximaler Ausdehnung, in Ausnahmefällen bis 700 nm). Bei geringerem POPC-Anteil (10 - 20% der Lipidmasse) erhält man auch bei diesem LPR noch einen höheren Anteil amorph-bidirektionalen Einbaus und manchmal auch einen höheren Anteil größerer Vesikel. Bei verschwindendem Lipidanteil kommt es zu schwer definierbaren Proteinaggregaten und nur sehr wenigen kleinen Vesikeln durch Restlipid von der Proteinreinigung. Rekonstituiertes ScrY lag praktisch durchgehend in Form gewöhnlicher Vesikel vor, röhrenförmige Vesikel oder mehrschichtige Stapel waren nicht zu beobachten. Lediglich in den Fraktionen mit besonders großen Vesikeln waren (teils doppellagige) Fragmente enthalten, deren vesikulärer Ursprung auch im Elektronenmikroskop nicht immer eindeutig nachgewiesen werden konnte (wahrscheinlich aber kollabierte große Vesikel).

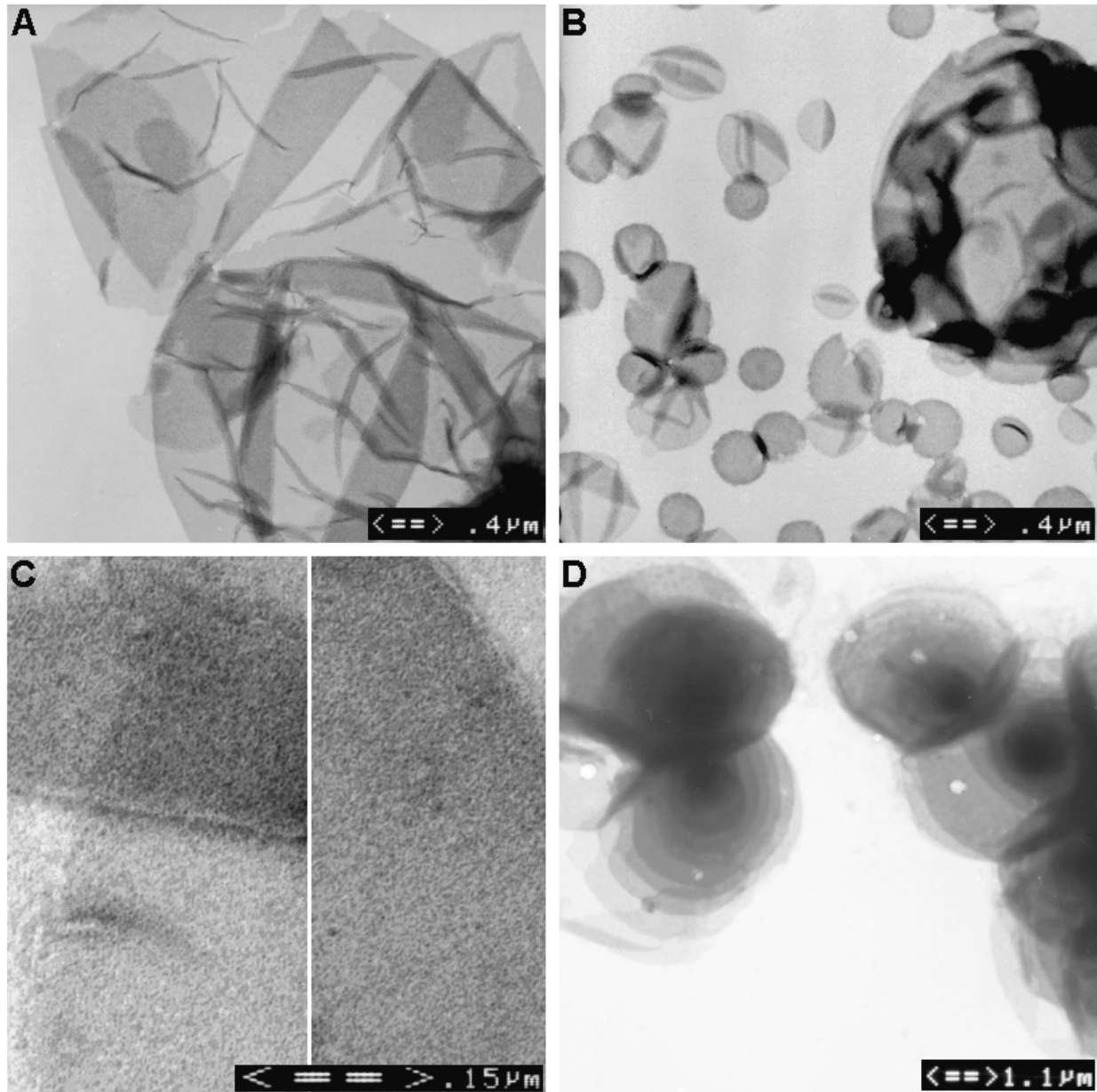


Abbildung 25: Elektronenmikroskopische Aufnahmen (Negativkontrastierung mit Uranylacetat): **A:** $LPR = 0,1$; Lipid: DMPC/POPC (1:1): große Vesikel, Übersicht 20000x. **B:** $LPR = 0,2$; Lipid: DMPC/POPC (1:1): überwiegend kleinere Vesikel, Übersicht 20000x. **C:** $LPR = 0,15$; Lipid: DMPC/POPC (8:2): amorph gepackte Fragmente, 50000x. **D:** $LPR = 1,0$; Lipid: DMPC, „Zwiebelschalenstruktur“, zuviel Lipid, Übersicht 7000x.

3.3 Abbildung von Sucroseporin am Rasterkraftmikroskop

3.3.1 Abbildungsbedingungen

Die Adsorption von rekonstituiertem Sucroseporin in Form von meist einlagigen Vesikelfragmenten auf frisch gespaltenem Glimmer hat sich als ausreichend stabil für hochauflösende kraftmikroskopische Untersuchungen erwiesen, eine aufwändigere Immobilisierung war bei diesen Präparaten also nicht notwendig. Die Messungen erfolgten bei einer Raumtemperatur, die nicht über 23 °C lag, was sich günstig auf den Erhaltungszustand der Präparate über mehrere Stunden auswirkte. Diese Größenordnung ist angesichts einer Phasenumwandlungstemperatur von 23 °C für das hauptsächlich verwendete Lipid DMPC auch sinnvoll. Die Lüftung des thermostatisierbaren Labors musste allerdings während der Messung jeweils abgeschaltet werden, um störende Vibrationen zu vermeiden.

Ein Messpuffer (in seiner Zusammensetzung angelehnt an Reinigungs- und Dialysepuffer, Konzentration zweiwertiger Ionen allerdings verringert) mit 250 mM LiCl, 2 mM MgCl₂, 20 mM Tris/HCl/pH 7,6 liefert meist guten Kontrast auf der extrazellulären Seite des rekonstituierten Proteins. Der Kontrast auf der periplasmatischen Seite war ausreichend, die Abbildungsbedingungen für diese Seite wurden aber noch nicht optimiert. Geringere Ionenstärken lieferten meist keinen ausreichenden Kontrast für hochauflösende Abbildung, bei höheren Konzentrationen war zerstörungsfreie Abbildung der extrazellulären Seite nicht mehr einwandfrei gewährleistet (Variation von [LiCl] zwischen 100 und 300 mM). Es wurden auch Messpuffer mit niedrigerem pH-Wert getestet (siehe auch 3.3.5, Abb. 40).

Als Sensoren haben sich die oxidgeschärften Siliziumnitridspitzen an 200 μm langen Rechteck-Federbalken (Olympus, $k = 0,05 \frac{\text{N}}{\text{m}}$) bewährt. Die Auflagekraft (Federkraft durch Auslenkung des Sensorbalkens) wurde während des Experiments durch Nachstellen des Sollwerts auf einem minimalen Niveau gehalten, das gerade noch hochauflösenden Kontrast lieferte. Eine Abschätzung der Auflagekraft anhand von Kraftdistanzkurven (extrazelluläre Seite, Bsp. Abb. 30) bei Annahme eines Abstands Sensor-Objekt der Größenordnung 1 nm für zerstörungsfreie Abbildung (Müller et al., 1999) ergab Werte von weniger als 200 pN, was auch etwa der jeweils experimentell eingestellten optimalen Differenz des Sollwerts zum Photodioden-Differenzsignal des freien Balkens entspricht.

Alle nachfolgend gezeigten Messungen wurden mit dem *Multimode/Nanoscope III* (Digital Instruments) in wässrigem Elektrolyt aufgenommen.

3.3.2 Orientierung des rekonstituierten Proteins

Den oben beschriebenen beiden Typen von Vesikeln entsprechen in der kraftmikroskopischen Abbildung zwei hinsichtlich ihrer Morphologie zu unterscheidende Oberflächenstrukturen. Die aufgeplatzten und einschichtig adsorbierten Vesikelfragmente weisen auf der Vesikel-Innenseite entweder eine amorph erscheinende Oberfläche mit maximalen Korrugationen von deutlich über 1 nm oder aber gleichmäßigere Korrugationen der Größenordnung 0,5 nm auf, letztere aus - bisweilen mehr oder weniger kristallin geordneten - Protrusionen, deren Abstand zueinander in der Größenordnung 5 nm liegt. Die amorphe Oberflächenstruktur kommt durchgehend bei den beschriebenen sehr großen Vesikeln vor, mittlere bis kleinere Vesikel des Durchmessers 1 μm und kleiner haben öfter die gleichmäßigere Morphologie aufzuweisen. Abb. 26 zeigt diese beiden Typen in der Übersicht. Beim glatteren Typus ist bereits in dieser Aufnahme kristalline Ordnung zu erkennen. Die maximalen Korrugationen sind aus den Höhenschnitten Abb. 27 ersichtlich.

Die kleineren Vesikel platzen meist nicht schon bei der Adsorption auf, sondern oft erst nach mechanischer Belastung durch die Rasterbewegungen der Sensorspitze. Kommt es zu zweilagiger Adsorption von Vesikelfragmenten, die nur selten zu beobachten ist, so liefert die Abbildung der Oberfläche der oberen Lage, also der Außenseite der Vesikel, meist einen nur schwachen Kontrast. Außerdem ist zweilagige Adsorption mechanisch vergleichsweise instabil.

Die Höhe einlagig adsorbierter Vesikelfragmente (Abstand der Maxima im Histogramm der Topographiewerte als Mittelwert) ist mit etwa 5,5 nm beim amorphen Typ etwas geringer als beim glatteren mit 6,2 nm (Abb. 28). Das Histogramm zeigt jedoch zwei Maxima auf der Oberfläche der amorphen Membranen, deren Abstand ungefähr dieser Differenz entspricht.

Eine Erklärungsmöglichkeit für das bei amorphen Membranen erkennbare Auftreten zweier deutlich unterschiedlich hoher Bereiche rekonstituierten Porins wäre ein Einbau *etwa gleicher Mengen* (vgl. auch Höhenhistogramm Abb. 28 B) intakten Porins bzw. durch oben erwähnten Abbau am N-Terminus verkürzten Proteins. Dies kann aber schon aufgrund der am Elektrophoresegel halbquantitativ erkennbar viel geringeren Menge eines möglichen Abbauprodukts nahezu ausgeschlossen werden. Eine andere Möglichkeit bestünde in einem Lipidüberschuss, der zur Separation von reinen Lipidomänen (niedrige Bereiche) führen könnte. - Die beschriebene Morphologie tritt aber gerade bei niedrigem LPR auf! Der Höhenunterschied ist aber auch erklärbar, wenn man einen bidirektionalen Einbau von ScrY bei diesem Typ von Vesikeln annimmt (Abb. 29). Die deutlich unterscheidbaren Bereiche unterschiedlicher Höhe sind im Gegensatz zum anderen Typus nämlich in ihrer Ausdehnung mindestens so breit bzw. ausgedehnter als der sich aus der Röntgenstruktur ergebende Durchmesser des Trimers von etwa 8 nm. Unter dieser Annahme beträgt der anzunehmende Höhenunterschied im Modell etwa 1,2 nm (relativ starrer exponierter Loop 8 extrazellulär - starre Barrelwand periplasmatisch), wenn man die membrandurchspannenden hydrophoben Zonen

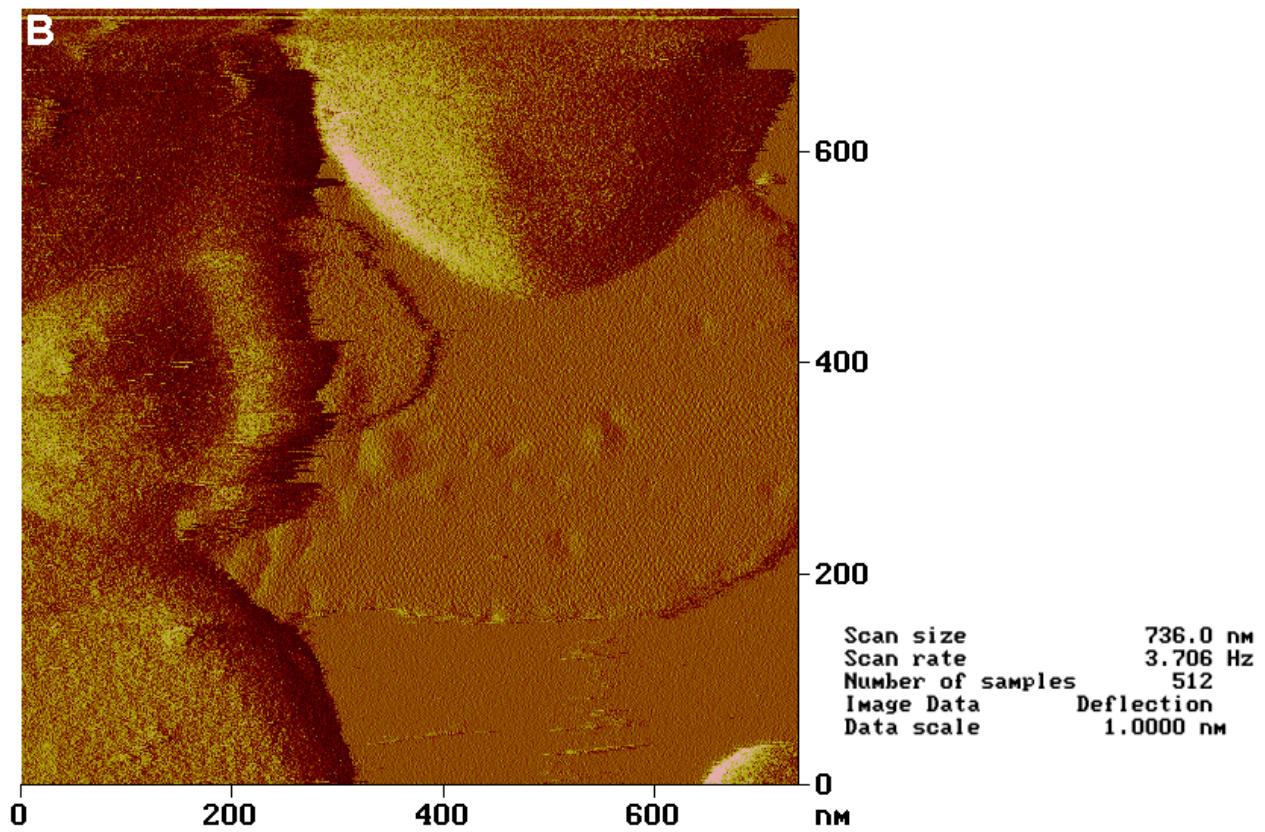
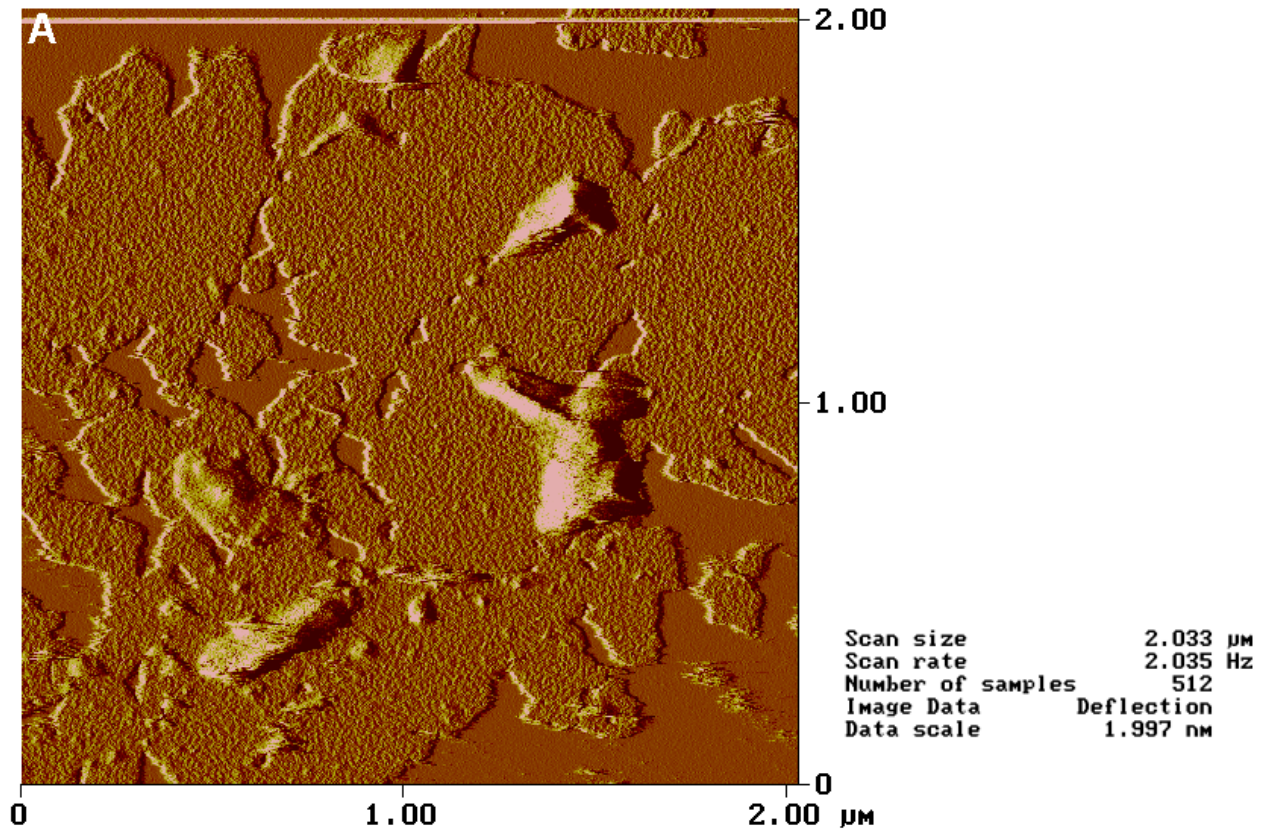


Abbildung 26: (vorherige Seite) Adsorption von rekonstituiertem Sucroseporin auf Glimmer. **A:** Vollständig geplatzt und einlagig adsorbiertes großes Vesikel ($d > 1\mu m$) mit bidirektional amorph rekonstituiertem Porin ($LPR = 0,2$; Lipid: DMPC/POPC (9:1); Messpuffer: 250 mM LiCl, 2 mM $MgCl_2$, 20 mM Tris/HCl pH 7,6). Fehlersignalbild (Cantileverauslenkung). **B:** Kleinere Vesikel ($d < 1\mu m$) mit unidirektional orientiertem Porin ($LPR = 0,15$; Lipid: nur DMPC; Messpuffer: 250 mM LiCl, 2 mM $MgCl_2$, 20 mM Tris/HCl pH 7,6), nur teilweise unter Einwirkung der Sensorspitze geplatzt, davon nur ein kleiner Teil zweilagig adsorbiert, intakte Vesikel nicht vollständig kollabiert. Fehlersignalbild.

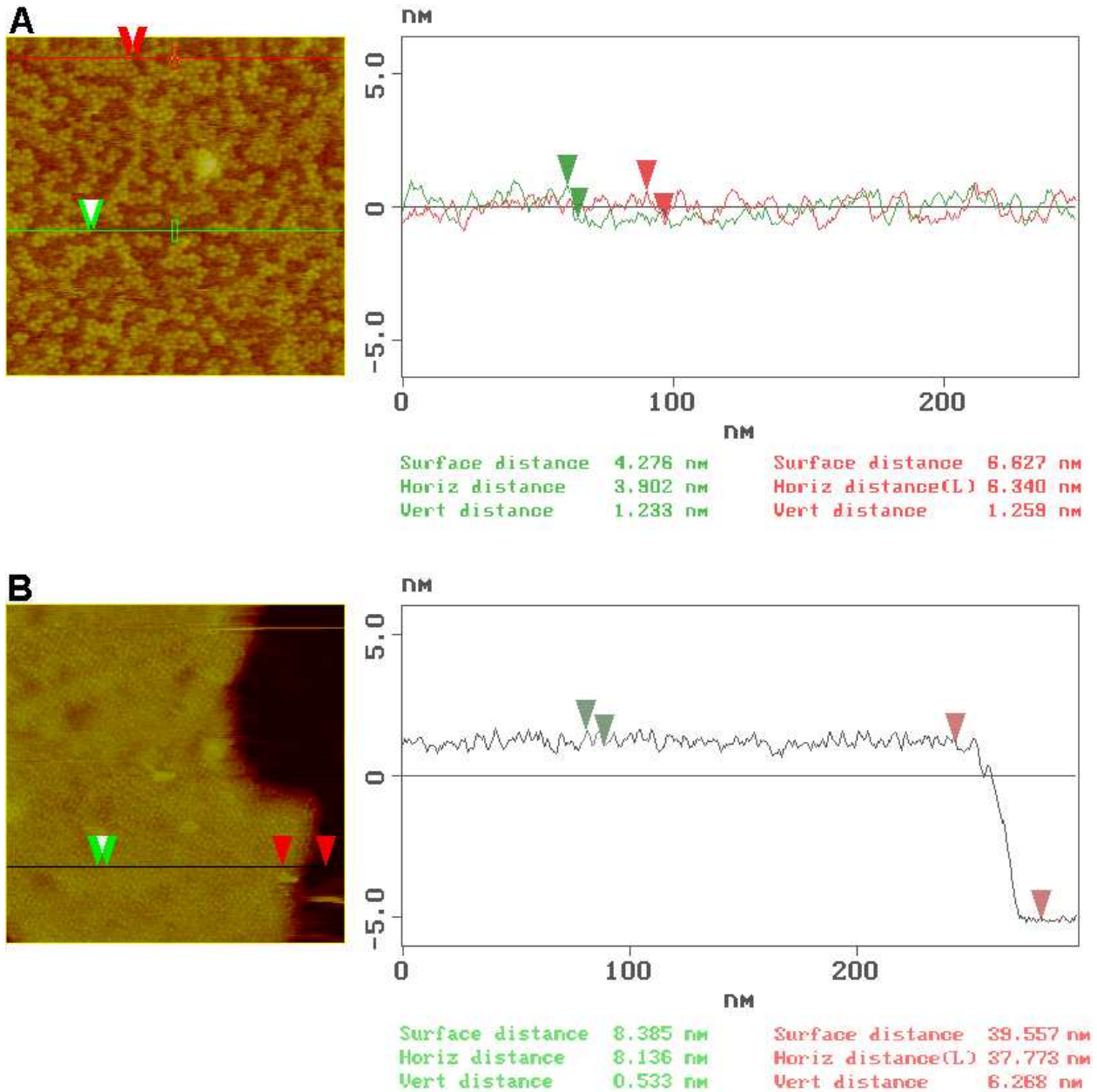


Abbildung 27: Höhengschnitte (Rasterungszeilen) Messungen vgl. Abb. 28 B, C. **A:** auf bidirektional rekonstituiertem ScrY mit maximalen Korngurationen von ca. 1,2 nm. **B:** auf unidirektional rekonstituiertem ScrY. Fragmenthöhe und typische Korngurationen von maximal ca. 0,5 nm auf dem Fragment.

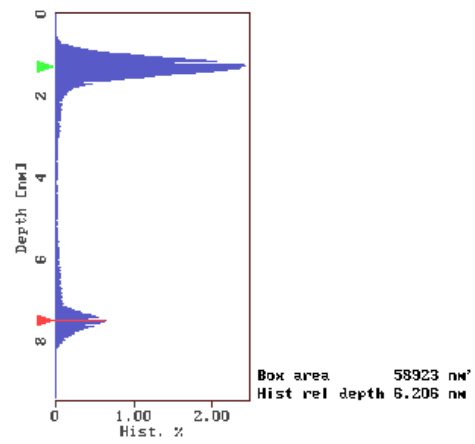
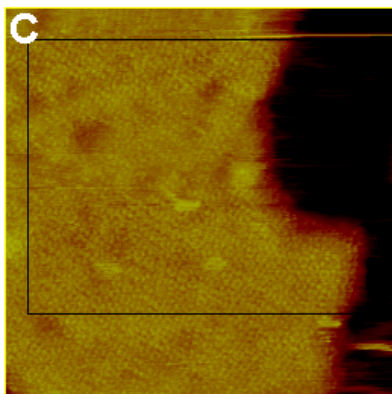
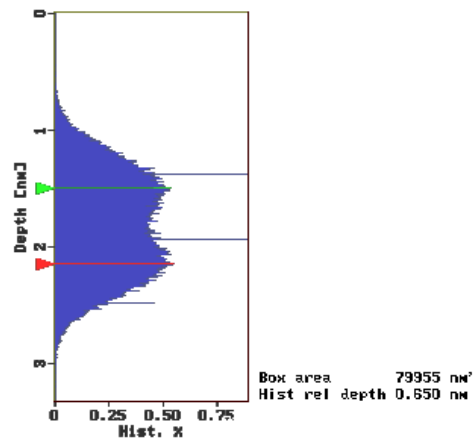
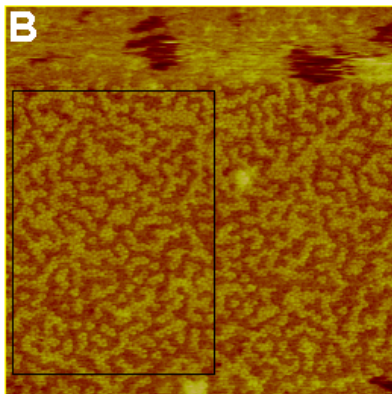
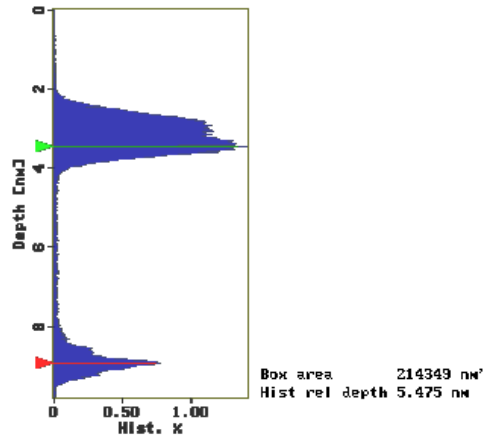
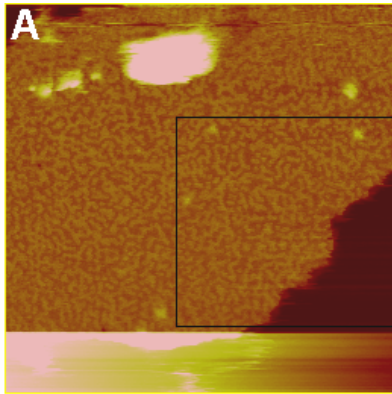


Abbildung 28: (vorherige Seite) Höhenbestimmung adsorbierter Vesikelfragmente mit rekonstituiertem ScrY: **A:** Bidirektional rekonstituiertes ScrY, Histogramm der Höhenwerte (innerhalb des eingezeichneten Rahmens) von Vesikelfragment und Substrat ($LPR = 0,2$, Lipid: DMPC/POPC (9:1), Messpuffer: 250 mM LiCl, 2 mM MgCl₂, 20 mM Tris/HCl pH 7,6). **B:** Verteilung der Höhenwerte auf bidirektional rekonstituiertem ScrY, dasselbe Präparat wie A. **C:** Unidirektional rekonstituiertes Porin, Histogramm der Höhenwerte von Vesikelfragment und Substrat ($LPR = 0,15$; Lipid: DMPC/POPC (1:1); Mg-haltiger Adsorptionspuffer, Messpuffer: 250 mM LiCl, 10 mM MES pH 6). Für C erhält man bei Messung in pH 7,7 leicht (0,1 bis 0,2 nm) höhere Werte, also im Bereich des aus dem Histogramm abschätzbaren Fehlers.

entsprechend aneinanderlegt (Abb. 29). Bei kompletter Deformation aller Loops hätte man immer noch eine Höhendifferenz (β -Barrel extrazellulär - β -Barrel periplasmatisch) von ca. 0,75 nm. Dies setzt jeweils voraus, dass die Sensorspitze den starren Kernbereich der periplasmatischen Seite erreicht und nicht von dem als sehr flexibel anzunehmenden N-Terminus daran gehindert wird. Auch die gemessene Höhe der Vesikelmembranen passt gut mit diesem Modell zusammen:

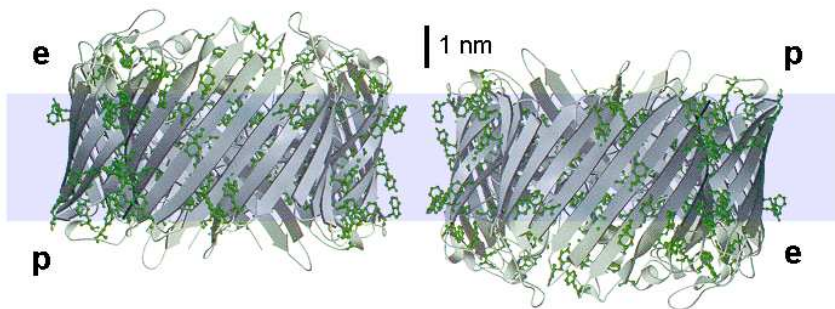


Abbildung 29: Modell bidirektionaler Rekonstitution von ScrY anhand der Röntgenstruktur des Trimers. Hier wurden die membrandurchspannenden hydrophoben Oberflächen beider Moleküle aneinandergelagt. Aromatische Reste grün; hydrophobe Zone (etwa 3 nm hoch) blau hinterlegt; p: periplasmatische, e: extrazelluläre Seite. (Quelle: Wolfram Welte, verändert).

das Barrel ist etwa 5 nm hoch, Werte dieser Größenordnung (etwas höher durch externe Loops) erhält man in den niedrigeren (im Modell mit periplasmatischer Seite nach oben exponierten) Bereichen. Die umgekehrt in der Membran orientierten Trimere liegen dagegen gut einen nm höher über dem Substrat, im Modell ist die extrazelluläre Seite exponiert. Bei unidirektionalem Einbau misst man typischerweise ebenfalls Werte von deutlich über 6 nm, was ebenfalls nahelegt, dass die extrazelluläre Seite nach oben orientiert ist; hier muss nämlich noch der zwischen dem Substrat und dem gut 5 nm hohen Trimer unterzubringende N-Terminus berücksichtigt werden. Dass bidirektionaler Einbau zu größeren Vesikeln führt ist unmittelbar verständlich, wenn man bedenkt, dass bei unidirektionalem Einbau eventuell mit einer durch die Geometrie des Proteins bedingten Krümmung des Bilayers zu rechnen ist.

Eine andere Möglichkeit der Charakterisierung von unterschiedlich orientiertem rekonstituiertem ScrY besteht in der Aufnahme von Kraftdistanzkurven. Im eher seltenen Fall eines flach kollabier-

ten bzw. zweischichtig adsorbierten Vesikels mit überwiegend unidirektional orientiertem Porin ist eine gezielte Ansteuerung der jeweiligen Seiten gut möglich (Abb. 30). Die Oberfläche der unteren Membran (Vesikelinnenseite, Abb. 30 B) zeigt das in den nächsten Abschnitten näher charakterisierte typische Muster extrazellulär orientierten Sucroseporins. Ein Vergleich der Kraftdistanzkurven

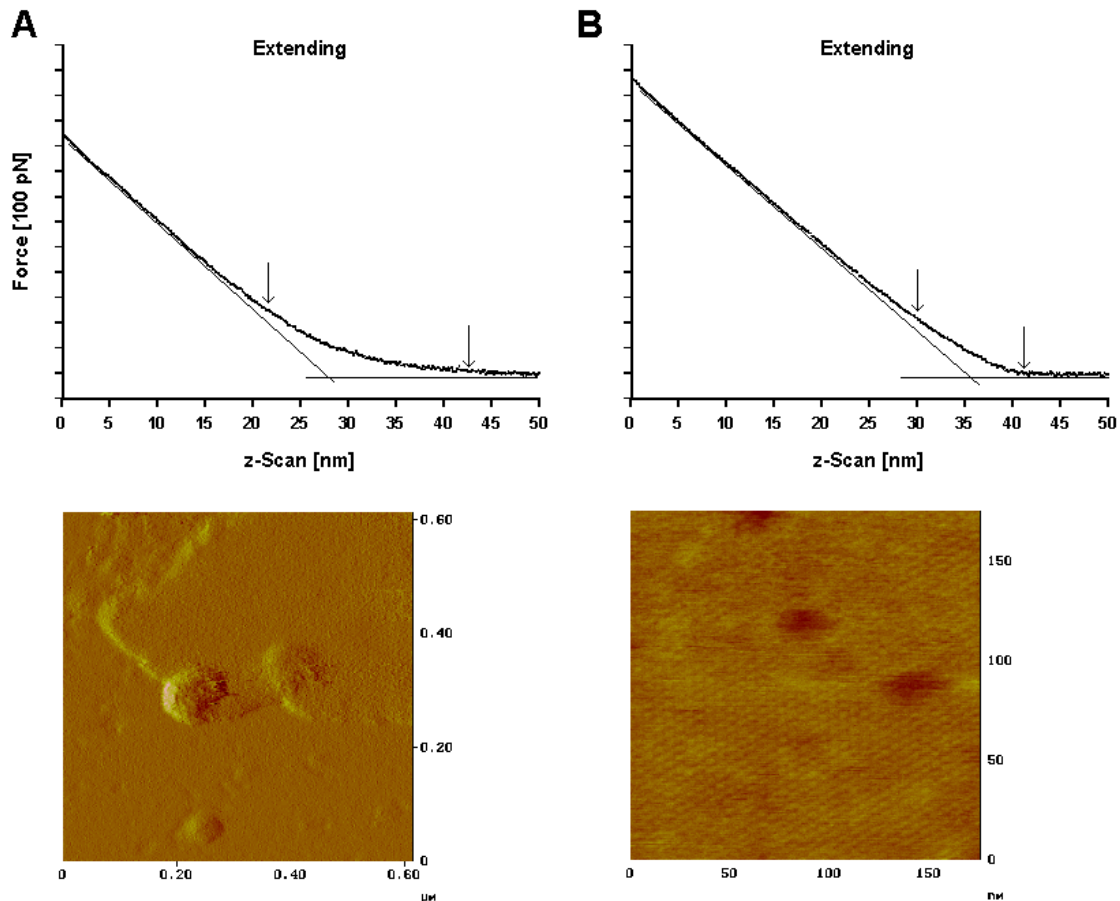


Abbildung 30: Kraftdistanzkurven bei Annäherung von Sensorbasis und Präparat auf rekonstituiertem ScrY (vollständig kollabiertes Vesikel) ($LPR = 0,2$; Lipid: DMPC; Messpuffer: 250 mM LiCl, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris/HCl pH 7,6). **A**: Periplasmatisch orientierte Seite der oberen Membran (sichtbar im darunter gezeigten Fehlerbild, oben rechts), **B**: extrazellulär orientierte untere Membran (Topographiebild identifiziert extrazelluläre Seite eindeutig). Pfeile markieren jeweils den Bereich langreichweitiger (abstoßender) Wechselwirkungen vor dem Kontaktpunkt (ab da reflektiert die Auslenkung des Balkens die lineare Piezobewegung).

auf periplasmatischer und extrazellulärer Seite zeigt eine deutlich unterschiedliche Tiefe langreichweitiger Wechselwirkungen vor dem eigentlichen Kontaktpunkt bei Annäherung von Sensorbasis und Objekt. Elektrostatische Effekte sind die wahrscheinlichste Erklärung hierfür, ein Hinweis auf unterschiedliche Oberflächenladungsdichte der beiden Seiten (Butt, 1991b und 1992; s. auch Kap. G&M 1.1). Ein entsprechender Unterschied zwischen extrazellulärer und periplasmatischer Seite wurde auch bei dem Porin OmpF gefunden (Müller et al., 1999). Eine höhere Verformbarkeit

der Doppellage spielt eine untergeordnete Rolle angesichts der gemessenen Größenordnung dieses Effekts einerseits und der Membrandicke andererseits. Die Schichten liegen dicht aufeinander, die Höhendifferenzen (oben-unten, unten-Substrat) unterscheiden sich nur um wenige Angström (6,2 bis 6,6 nm bzw. 6,2 nm). Verformbarkeit von Strukturen wäre allenfalls vom N-Terminus zu erwarten, dessen Deformation (ausgestreckte Länge: ca. 6,5 nm) einen gewissen Beitrag zu dem Effekt leisten könnte. Eine entsprechend eindeutige Zuordnung von Kraftdistanzkurven zu einem bestimmten Bereich auf dem Fragment ist bei dem bidirektional rekonstituierten Typus schwieriger (aufgrund der niedrigen Treffsicherheit angesichts lateraler Piezodrift).

3.3.3 Charakterisierung amorph rekonstituierten Sucroseporins

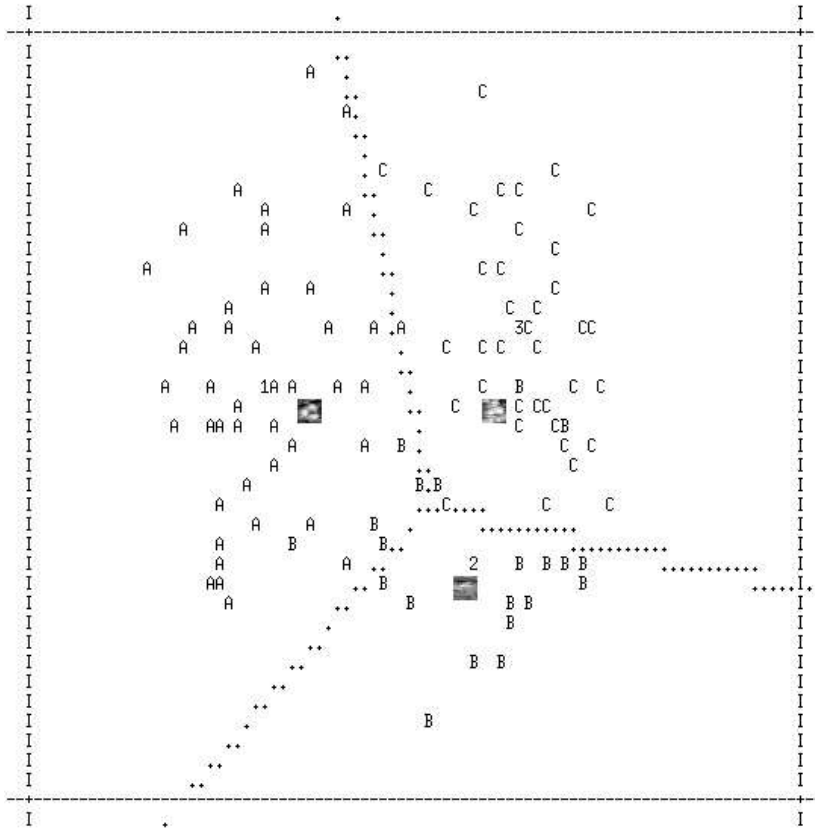
Eine Zuordnung der gefundenen Protrusionen submolekularer Größenordnung zur Struktur des ScrY-Trimers ist in den höheren und kontrastreicheren Bereichen der abgebildeten amorphen Vesikelfragmente möglich. Bereits die Rohdaten (Abb. 27 A und 28 B) lassen vereinzelte Triaden von Protrusionen als Grundstruktur erkennen.

Vor der Mittelung von abgebildeten Einzelpartikeln ist hier eine Selektion der ungeordnet verteilten Partikel und translationales sowie rotationales Alignment vonnöten. Abb. 31 zeigt das Ergebnis eines Trainingslaufs automatischer Partikelselektion nach Lata et al. (1995), vgl. Kapitel G&M 7.2.2.1. Die gefundene Rate korrekter Zuordnung der in der Trainingsphase vorgegebenen Partikel von 91,5 % entspricht den in der Literatur (Lata et al., 1995) angegebenen Werten. Das Mittel nach referenzfreiem Alignment ($N = 50$) zeigt die Triade von Protrusionen mit einem Durchmesser von etwa 10 nm. Ein Vorteil dieser Selektionsmethode ist die Anwendbarkeit der in einem Trainingslauf gefundenen Unterscheidungskriterien auf größere Datensätze einheitlicher statistischer Eigenschaften (Messreihen aus SFM-Bildern derselben Struktur mit gleicher Pixelauflösung) sowie die bevorzugte Selektierung einzelner Partikel, was störende Aggregate aus dem Alignment ausschließt. Im vorliegenden Fall wäre z. B. eine Auswahl von Triaden im falschen Raster der in Aggregaten dichtgepackten Protrusionen ein Problem. Andererseits ist diese Methode hier jedoch insofern problematisch, da die Grundstruktur jeweils kleinere Bereiche dichter Packung bildet und somit ein großer Teil echter Partikel nicht selektiert wird. Die Methode wäre also erst bei streng alternierendem Einbau der Moleküle, wie er bei Rekonstitution von anderen Proteinen bisweilen vorkommt, optimal anwendbar.

Deshalb wurde ein weiteres Verfahren angewendet, das auf referenzgestützter Suche mit Hilfe eines rotationalen Mittels der Grundstruktur als Referenz basiert (Kap. G&M 7.2.2.2). Ein Vergleich beider Selektionsverfahren am Beispiel derselben SFM-Aufnahme ist in Abb. 32 zu sehen. Es zeigt sich, dass bei dieser Aufnahme höherer Pixelauflösung nur $N = 19$ Partikel mit der statistischen Selektions-Methode ausgesucht werden, während die referenzgestützte Suche $N = 85$ Partikel

A TERRITORIAL MAP OF STANDARDIZED DISCRIMINANT SPACE

HORIZONTAL 1-FUNCTION VERTICAL 2-FUNCTION



1, A = 1 PRT
 2, B = 2 NSE
 3, C = 3 JNK

C PREDICTION RESULTS

ACTUAL GRP. N OF CASES PREDICTION GROUP MEMBERSHIP

1 PRT	47	15	44
	44,3 %	14,2 %	41,5 %

ACTUAL GRP.	N OF CASES	1 PRT	2 NSE	3 JNK
1 PRT	44	43 40,6 %	0 0,0 %	1 0,9 %
2 NSE	21	4 3,8 %	14 13,2 %	3 2,8 %
3 JNK	41	0 0,0 %	1 0,9 %	40 37,7 %

B STANDARDIZED DISCRIMINANT FUNCTION COEFFICIENTS

	1-FUNCTN	2-FUNCTN
10 VV	-.5751E-01	0,1666
2 VAR	0,1054	0,6229
3 SKEW	-.2876	-.5730
4 KURT	0,5176	1,084
5 ENTP	0,2854	0,6589
6 AVAV	-1,043	0,8919
7 AVVR	-.7337	-.9266
8 SDAV	0,4146	-.7487E-01
9 SDVR	0,3665	-.2883

CHI-SQUARE TEST OF THE CLASSIFICATION PROBABILITY
 CHI-SQR.= 4,232 WITH 3 NDF, SGFN=0,2442
 NUMBER OF PROPERLY CLASSIFIED CASES IS 97
 THIS IS 91,5% OF THE TOTAL NUMBER (106) OF CASES

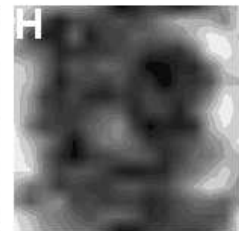
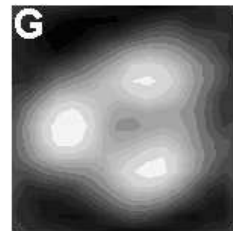
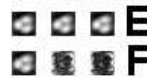
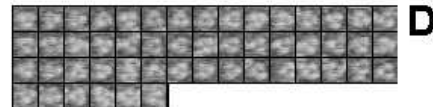


Abbildung 31: Automatische Partikelselektion: Test der Unterscheidungsfunktionen anhand der Zuordnung der vorgegebenen Partikel der Trainingsphase, **A**: Karte: Bereiche der drei versch. Kategorien (Partikel, PRT; Rauschen, NSE; Schrott, JNK) im Discriminant Space **B**: Koeffizienten der Unterscheidungsfunktionen, **C**: Angaben über Anteil der korrekt zugeordneten Partikel, **D**: Aus Rohdaten (vgl. Abb. 28B, $x_p = 9,0 \text{ \AA}$) selektierte Partikelseerie nach Entfernung verbliebener Fehlzuordnungen, $N = 50$, **E**: Zwischenergebnisse (Mittel) nach drei Iterationsschritten referenzfreien Alignments, **F**: Das dritte Mittel (Wertebereich: $11,3 \text{ \AA}$) mit Standardabweichungskarte (Wertebereich: $1,7 - 3,7 \text{ \AA}$) und Varianzkarte, **Maßstab D-F**: vgl. Kantenlänge Bildfenster: $14,3 \text{ nm}$. **G, H**: Mittel und SD-Karte vergrößert, Bildfenstergröße: $14,3 \text{ nm}$.

bringt, bei dichter Packung also geeigneter ist. Ein Vergleich der selektierten Partikel bzw. der erhaltenen Mittel mit der ersten Methode zeigt, dass die ausgewählten Triaden überwiegend im richtigen Raster liegen. Das Mittel Abb. 32 G/H hat etwa eine laterale Auflösung von $\frac{1}{23} - \frac{1}{27} \text{ \AA}^{-1}$ (DPR, FRC) bis $\frac{1}{33} \text{ \AA}^{-1}$ (SSNR), axial findet man im Bereich der Protrusionen typische Werte für die Standardabweichung von $1,5$ bis 2 \AA .

Die Tatsache, dass die in der amorphen Membran gefundenen höheren Bereiche aus Triaden von einzelnen Protrusionen des Abstands von ca. $5-6 \text{ nm}$ bestehen und dass der Durchmesser dieser Triaden mit gut 10 nm etwas über dem Durchmesser des ScrY-Trimers liegt (bedingt durch die Faltung von Topographie und Sensorgeometrie bei der Abbildung, s. G&M Kap. 1.1), legt nahe, dass diese Grundeinheit tatsächlich das Porintrimer darstellt. Die Höhendifferenzen zwischen Protrusion und Zentrum der Triade von 4 bis 5 \AA im Mittel entsprechen den gemessenen Korugationen auf unidirektional eingebautem ScrY (Höhenprofil Abb. 27 B), mit Ausnahme von Messungen mit geringerer Auflagekraft (3.3.5). Der Befund mehr oder weniger geordneter Protrusionen derselben Abstände in den noch näher zu charakterisierenden Abbildungen typischer unidirektional gepackter Vesikelfragmente (3.3.5) sowie der Vergleich mit AFM-Studien an Porin OmpF (Schabert und Engel, 1994) zeigen, dass der gemessene Kontrast hier wohl ebenfalls von den erhöhten peripheren Barrelwänden der drei Monomere bzw. den dort exponierten extrazellulären Loops herrührt.

Bidirektionaler Einbau ermöglicht andererseits einen einfachen Zugang zu der periplasmatischen Seite, die bei unidirektional mit ScrY gepackten Vesikeln aufgrund mangelnder Stabilität zweilagiger Adsorption bedeutend schwieriger zugänglich ist. Die kontrastreichere Abbildung der extrazellulären Seite in derselben Messung ermöglicht jeweils außerdem eine Überprüfung der Qualität der Abbildung bzw. des Sensors. Damit waren erste höher aufgelöste Messungen der periplasmatischen Seite möglich. Die zwischen den erhöhten Bereichen liegenden putativen periplasmatisch orientierten Zonen des dicht gepackten rekonstituierten Proteins sind überdies erkennbar kontinuierlich mit größeren und teilweise annähernd kristallinen Bereichen dieser Orientierung. Diese werden im nächsten Abschnitt näher beschrieben.

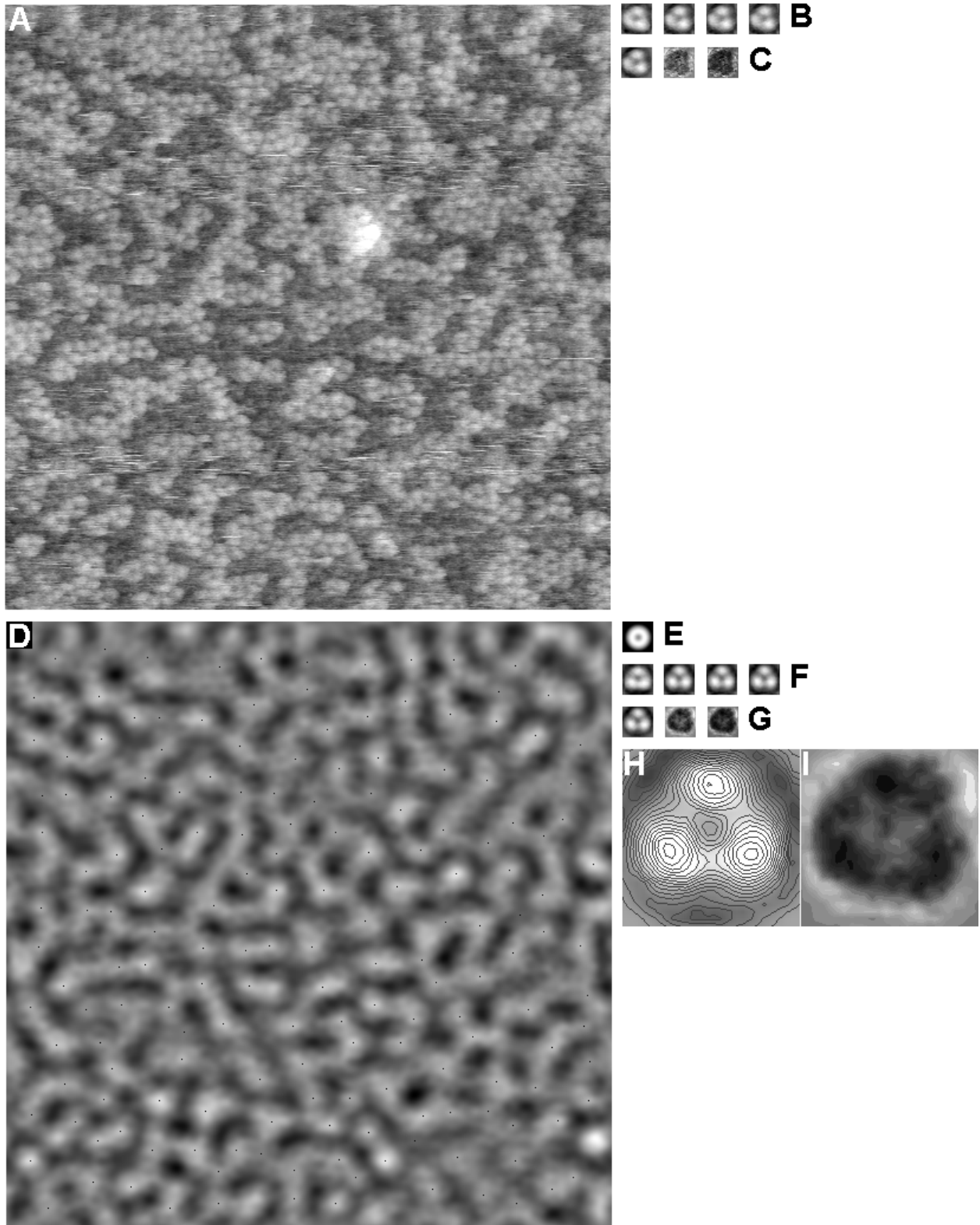


Abbildung 32: Vergleich Partikelselektion mit Hilfe von Discriminant Analysis bzw. Kreuzkorrelationsfunktion mit rotationalem Mittel. **A:** Aufnahme eines Fragments mit bidirektional rekonstituiertem ScrY ($LPR = 0,2$; Lipid: DMPC/POPC (9:1); Messpuffer: 250 mM LiCl, 2 mM MgCl₂, 20 mM Tris/HCl pH 7,6; $x_p = 4,9$ Å). **B:** Zwischenergebnisse (Mittel) von 4 Iterationen referenzfreien Alignments der mit Discriminant Analysis ermittelten Partikelseerie, **C:** viertes Mittel (Wertebereich: 10,7 Å) mit Standardabweichungskarte (Wertebereich: 0,8 - 3,7 Å) und Varianzkarte, $N = 19$. **D:** Gefilterte Kreuzkorrelationsfunktion mit markierten Korrelationsmaxima (schwarze Punkte). **E:** Rotationales Mittel als Referenz, **F:** Zwischenergebnisse von 4 Iterationen referenzfreien Alignments der mittels Korrelationsfunktion selektierten Partikel, **G:** viertes Mittel (Wertebereich: 8,3 Å) mit Standardabweichungskarte (Wertebereich: 1,4 - 4,0 Å) und Varianzkarte, $N = 85$, **Maßstab A-G:** Kantenlänge Bildfenster B, C, E-G: 12,7 nm. **H, I:** konturiertes Mittel (Höhen-Inkrement: 0,5 Å) und SD-Karte vergrößert, Bildfenstergröße: 12,7 nm.

3.3.4 Charakterisierung der periplasmatischen Seite

Bereits bei niedriger Auflösung sind hier distinkte Strukturen erkennbar (Abb. 33), die trotz geringeren Kontrasts von den oben beschriebenen extrazellulär orientierten Trimeren unterscheidbar sind. Diese und die beiden weiteren Messungen an demselben Präparat (Abb. 34 und 35) erfolgten jeweils mit einer Auflagekraft, die einen ausreichenden Kontrast sowohl für die Charakterisierung der periplasmatisch als auch der extrazellulär orientierten Trimere lieferte (s. oben). Dies, sowie die Ionenstärke des Messpuffers, sind also noch Kompromissbedingungen, die nicht für die Abbildung der periplasmatischen Seite optimiert sind (vgl. auch Kraftdistanzkurven Abb. 30).

Abb. 34 zeigt das Ergebnis der Mittelung einer Messung bei höherer Auflösung. Translationales Alignment und Mittelung (Abb. 34 B-D) lassen deutlicher ein annähernd regelmäßiges Gitter erkennen. Die Partikel haben im Gitter Abstände von etwa 10 nm zueinander, was mit dem oben bestimmten Radius des umgekehrt eingebauten Trimers übereinstimmt. Die Standardabweichungskarte zeigt minimale Werte im Zentrum des Partikels. Erst ein referenzfreies rotationales und translationales Alignment der so gewonnenen Bildausschnitte um die Partikel (Rohdaten) enthüllt eine distinktere Struktur der Einzelpartikel (unter Vermeidung der Voreingenommenheit referenzgestützten Alignments), der „Kristall“ enthält also unterschiedlich um die Trimerenachse rotierte Moleküle. Die erhaltene sternartige Struktur ist bereits bei anderen Porinen (OmpF, Schabert und Engel, 1994; Schabert et al., 1995) mit dem SFM gefunden worden und konnte dort eindeutig den aneinanderliegenden Wänden der drei faßförmigen Monomere (β -Barrels) auf der periplasmatischen Seite zugeordnet werden. Es handelt sich also um den starren Kernbereich der mit dem SFM zugänglichen periplasmatischen Seite des ScrY, die drei Poren sind deutlich sichtbar. Die mittleren mit dem SFM-Sensor gemessenen Höhendifferenzen zwischen erhöhtem Zentrum des Trimers und Pore betragen im Mittel 3 - 4 Å.

Bei noch höher aufgelöster Messung eines Teilbereichs (Abb. 35) erkennt man bereits nach nur translationalem Alignment die sternartige periplasmatisch exponierte Struktur des Trimers, hier

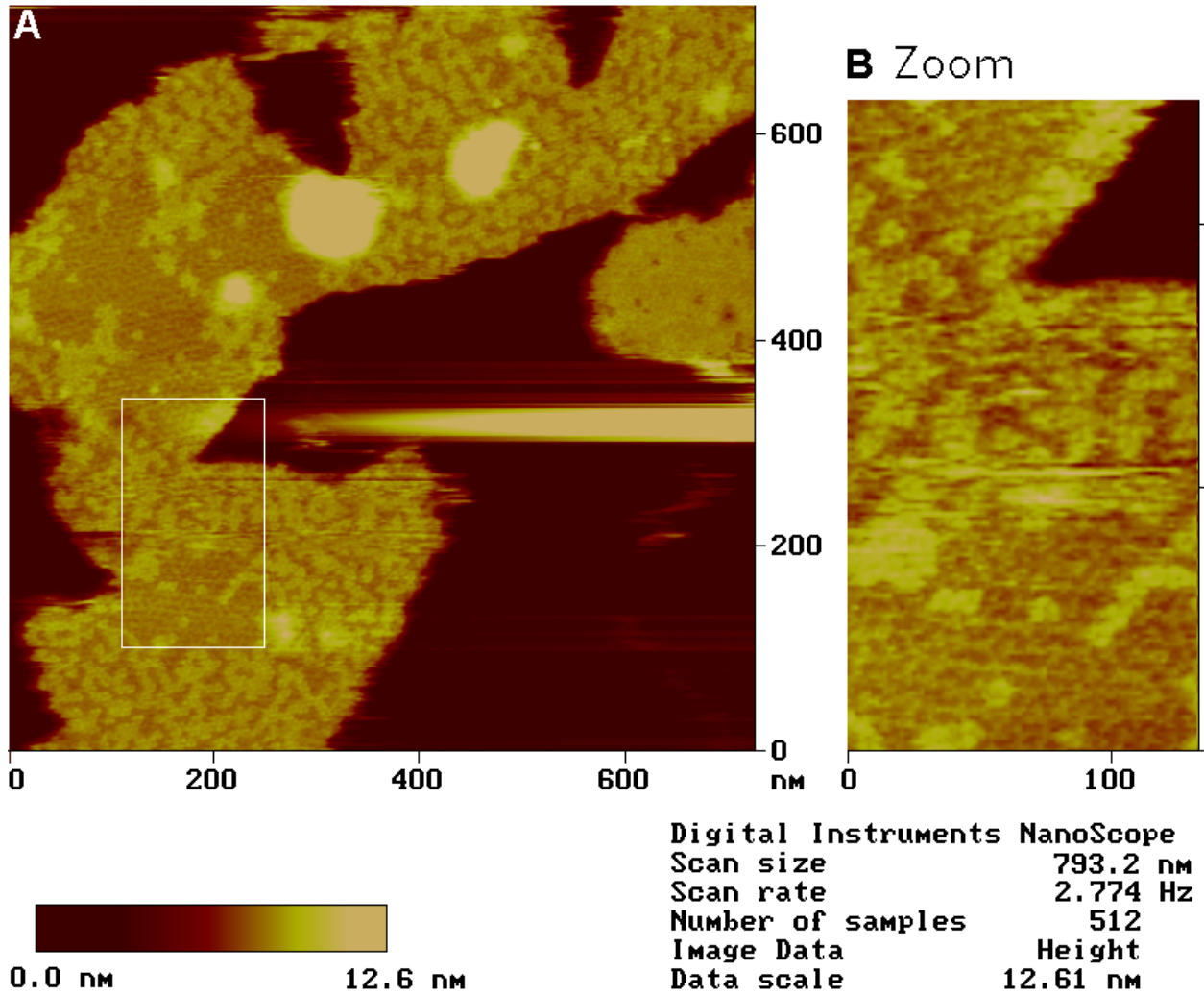


Abbildung 33: Einschichtig adsorbiertes Vesikelfragment mit bidirektionalem Einbau von ScrY ($LPR = 0,2$; Lipid: DMPC/POPC (9:1); Messpuffer: 250 mM LiCl, 2 mM MgCl₂, 20 mM Tris/HCl pH 7,6; $x_p = 15,4 \text{ \AA}$). Neben alternierendem Einbau im Abstand von wenigen Trimeren sind auch größere unidirektionale Bereiche der Größenordnung über 100 nm erkennbar. **A**: Übersichtsaufnahme, **B**: Ausschnitt daraus (gleiche Messung, nur vergrößert/interpoliert).

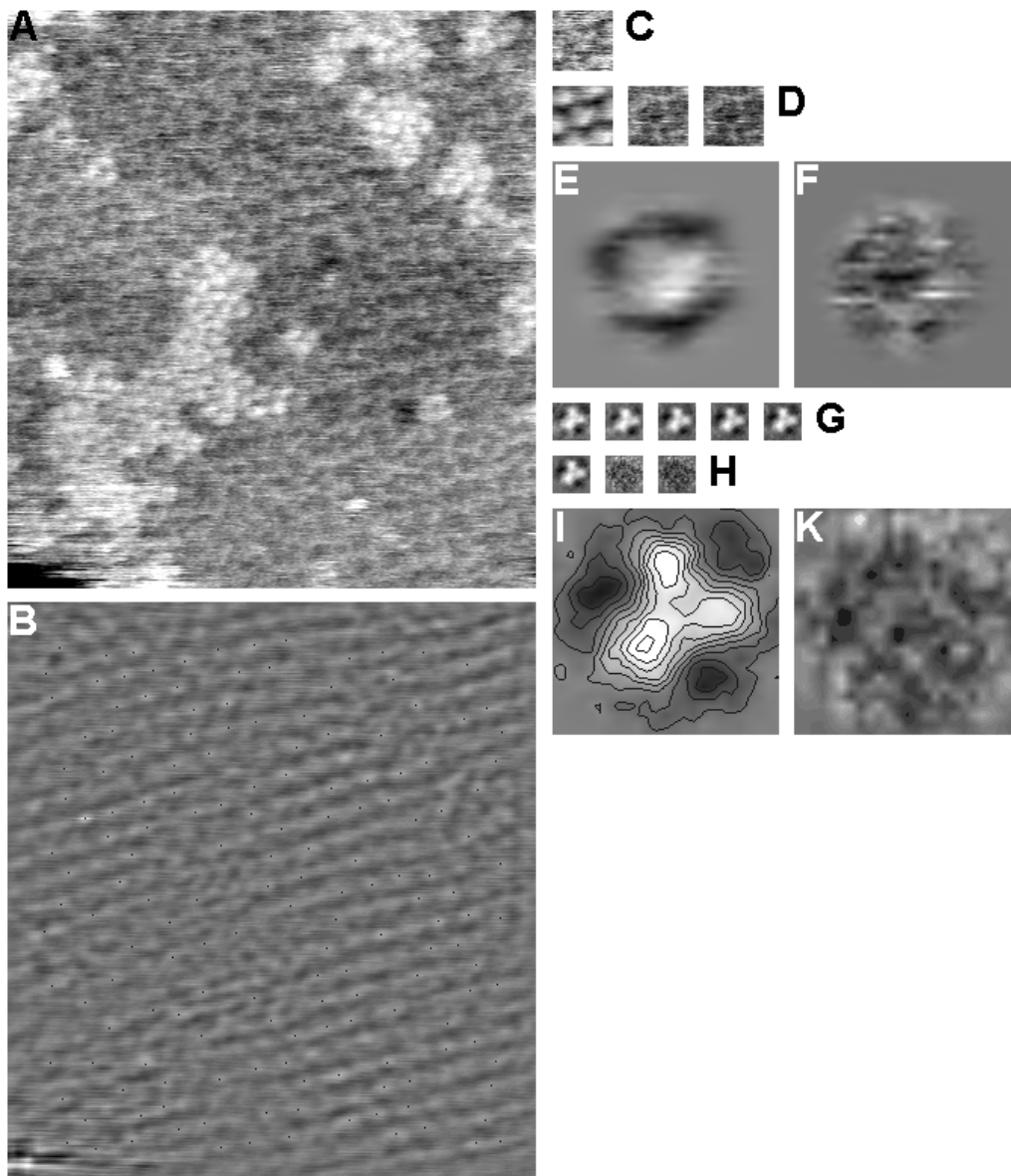


Abbildung 34: Messung Präparat Abb. 33 ($LPR = 0, 2$; Lipid: DMPC/POPC (9:1); Messpuffer: 250 mM LiCl, 2 mM $MgCl_2$, 20 mM Tris/HCl pH 7,6; $x_p = 5,0 \text{ \AA}$). **A**: Ausschnitt SFM-Rohdaten, **B**: Gefilterte Kreuzkorrelationsfunktion mit markierten Korrelationsmaxima (schwarze Punkte), **C**: Referenz, **D**: Mittel nach translationalem Alignment, SD-Karte und Varianzkarte, $N = 97$, **E**, **F**: Mittel (Wertebereich: $3,8 \text{ \AA}$) und SD-Karte (Wertebereich: $2,0 - 3,6 \text{ \AA}$) vergrößert, Kantenlänge Bildfenster E, F: 20 nm, **G**: Mittel nach jeweiligen Iterationsschritten referenzfreien Alignments, **H**: 4. Mittel daraus (Wertebereich: $4,7 \text{ \AA}$) mit SD-Karte (Wertebereich: $1,9 - 3,2 \text{ \AA}$) und Varianzkarte, **I**, **K**: Mittel konturiert (Höheninkrement: $0,5 \text{ \AA}$) und SD-Karte, vergrößert, Kantenlänge I, K: 12,5 nm. **Maßstab A-D, G, H**: vgl. Kantenlänge C, D: 20 nm, G, H: 12,5 nm.

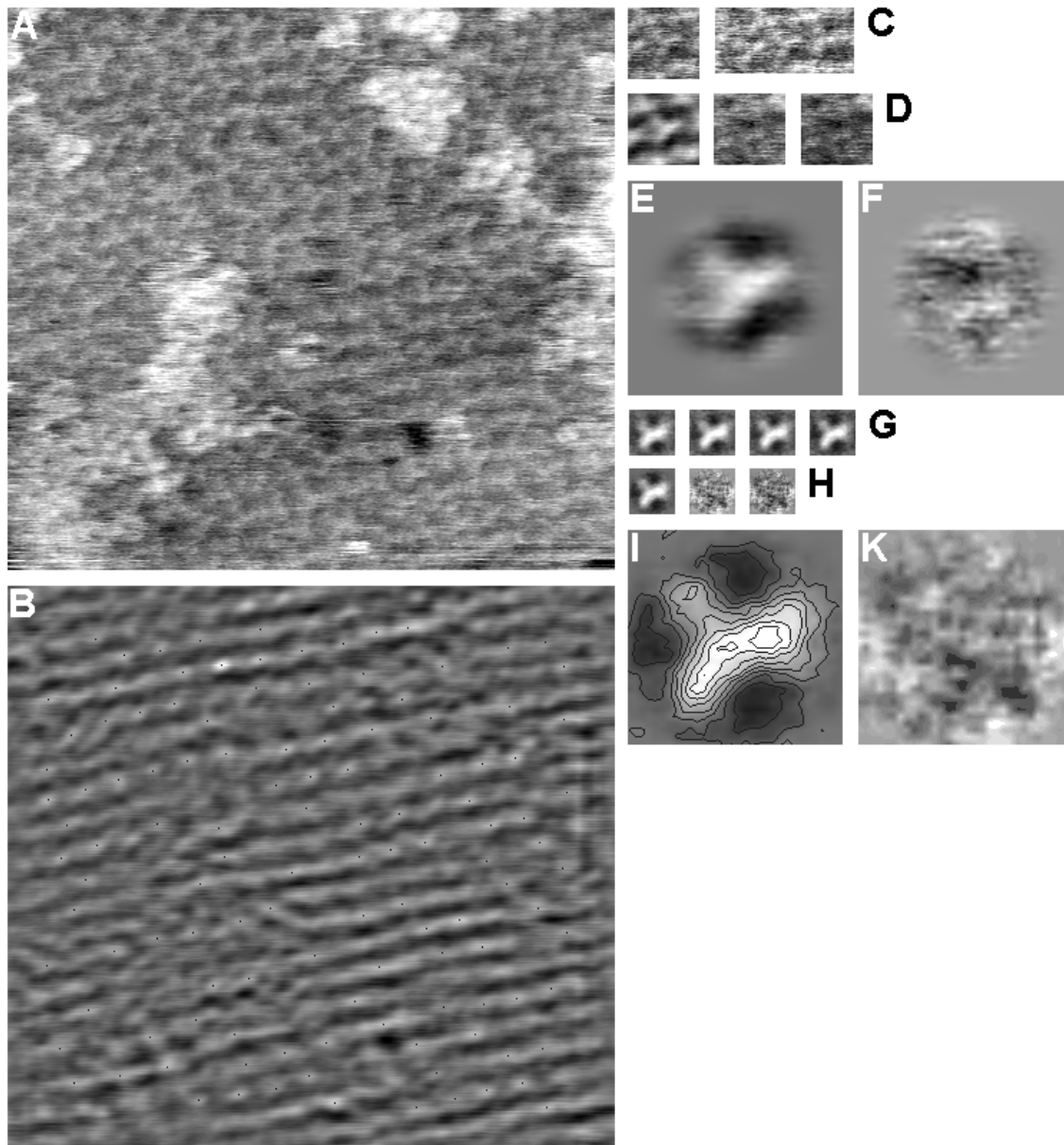


Abbildung 35: Messung Präparat Abb. 33 ($LPR = 0,2$; Lipid: DMPC/POPC (9:1); Messpuffer: 250 mM LiCl, 2 mM $MgCl_2$, 20 mM Tris/HCl pH 7,6; $x_p = 4,0 \text{ \AA}$). **A:** Ausschnitt SFM-Rohdaten, **B:** Gefilterte Kreuzkorrelationsfunktion mit markierten Korrelationsmaxima (schwarze Punkte), **C:** Referenz und Ausschnitt Rohdaten mit einheitlich orientierten Partikeln, **D:** Mittel nach translationalem Alignment, SD-Karte und Varianzkarte, $N = 82$, **E, F:** Mittel (Wertebereich: $4,1 \text{ \AA}$) und SD-Karte (Wertebereich: $1,8 - 3,2 \text{ \AA}$) vergrößert, Kantenlänge Bildfenster E, F: 20,2 nm, **G:** Mittel nach jeweiligen Iterationsschritten referenzfreien Alignments, **H:** 4. Mittel daraus (Wertebereich: $4,3 \text{ \AA}$) mit SD-Karte (Wertebereich: $1,9 - 3,0 \text{ \AA}$) und Varianzkarte, **I, K:** Mittel konturiert (Höheninkrement: $0,5 \text{ \AA}$) und SD-Karte, vergrößert, Kantenlänge I, K: 12,9 nm. **Maßstab A-D,G,H:** vgl. Kantenlänge C_1 , D: 20,2 nm, G, H: 12,9 nm.

nehmen die Monomere also eine bevorzugte Orientierung ein. Referenzfreie rotationale und translationale Verfeinerung resultiert hier in einem gegenüber Abb. 34 deutlicher asymmetrischen Mittel. Eine solche Lösung ist stabil, das heißt sie wurde durchgehend jeweils bei mehreren unabhängigen Durchgängen des Alignment-Programms erhalten, hängt also nicht von der zufällig erzielten ersten Approximation des Mittels ab (vgl. Kap. G&M 7.2.3.2).

Die laterale Auflösung beträgt hier etwa $\frac{1}{32}; \frac{1}{29}; \frac{1}{42} \text{ \AA}^{-1}$ (DPR, FRC, SSNR, Abb. 34) bzw. $\frac{1}{33}; \frac{1}{32}; \frac{1}{50} \text{ \AA}^{-1}$ (Abb. 35), und ist gegenüber den Werten derselben Messreihe für die extrazelluläre Seite deutlich schlechter. Die axiale Auflösung ist gegenüber den Werten für die extrazelluläre Seite (Abschnitt 3.3.3) bei gleichen experimentellen Bedingungen mit 2,2 - 2,6 Å im Bereich der eigentlich als vergleichsweise starr anzunehmenden Barrelwände ebenfalls ungünstiger. (Alle vorstehenden Werte sind für die nach referenzfreiem rotational-translationalem Alignment erzielten Mittel bestimmt worden.) Dies deutet auf eine insgesamt höhere Unschärfe von Teilstrukturen bei der Messung hin, als dies auf der extrazellulären Seite der Fall ist. Auch die Asymmetrie in Rasterungsrichtung (Abb. 35 I) könnte durch Überlagerung der starren Grundstruktur mit einer bei der Abbildung bevorzugt in Rasterungsrichtung verformten, prinzipiell aber völlig flexiblen Struktur, erklärt werden. (Diese bleibt auch im verfeinerten Mittel aufgrund einheitlicher Ausrichtung des starren Kernbereichs erhalten). Die erkennbaren Höhendifferenzen liegen allerdings knapp unter der Standardabweichung und sind damit nicht signifikant, allenfalls die Verbreiterung der Struktur in Rasterungsrichtung sowie die Stabilität dieser Lösung im referenzfreien Alignment können unter Berücksichtigung der lateralen Auflösung als Effekt einer solchen Überlagerung gedeutet werden. Das deutliche Minimum der Standardabweichung des translationalen Mittels von 2,1 Å (Abb. 34) und 1,8 Å (Abb. 35) im Zentrum des Trimers, wo das Coiled Coil verankert ist, könnte ebenfalls als Bestätigung der Annahme geringerer Auflösung aufgrund der flexiblen Struktur des N-Terminus angesehen werden. Allerdings wäre ein entsprechendes Bild auch nach rotationalem Alignment zu erwarten gewesen, hier müssen jedoch anhand größerer Datensätze statistisch besser abgesicherte Werte erhoben werden.

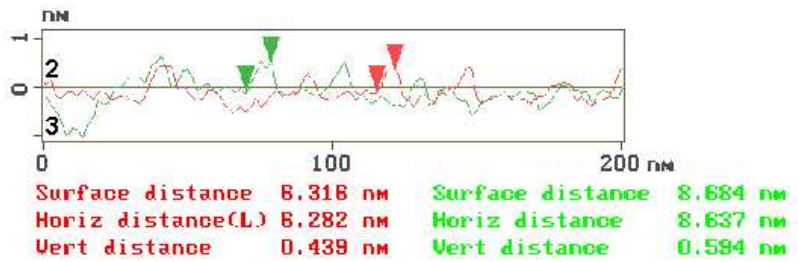
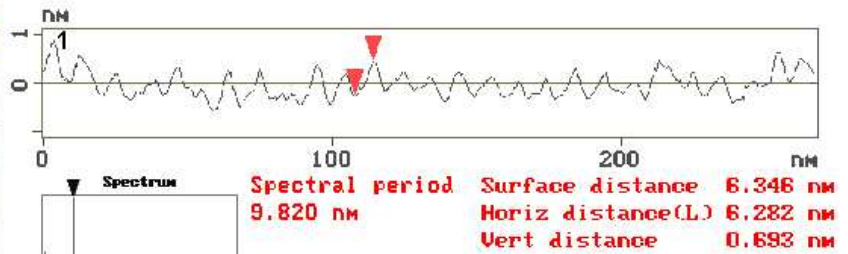
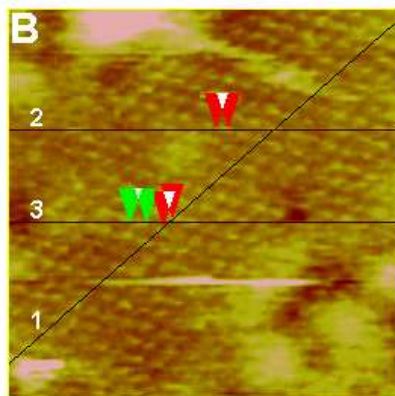
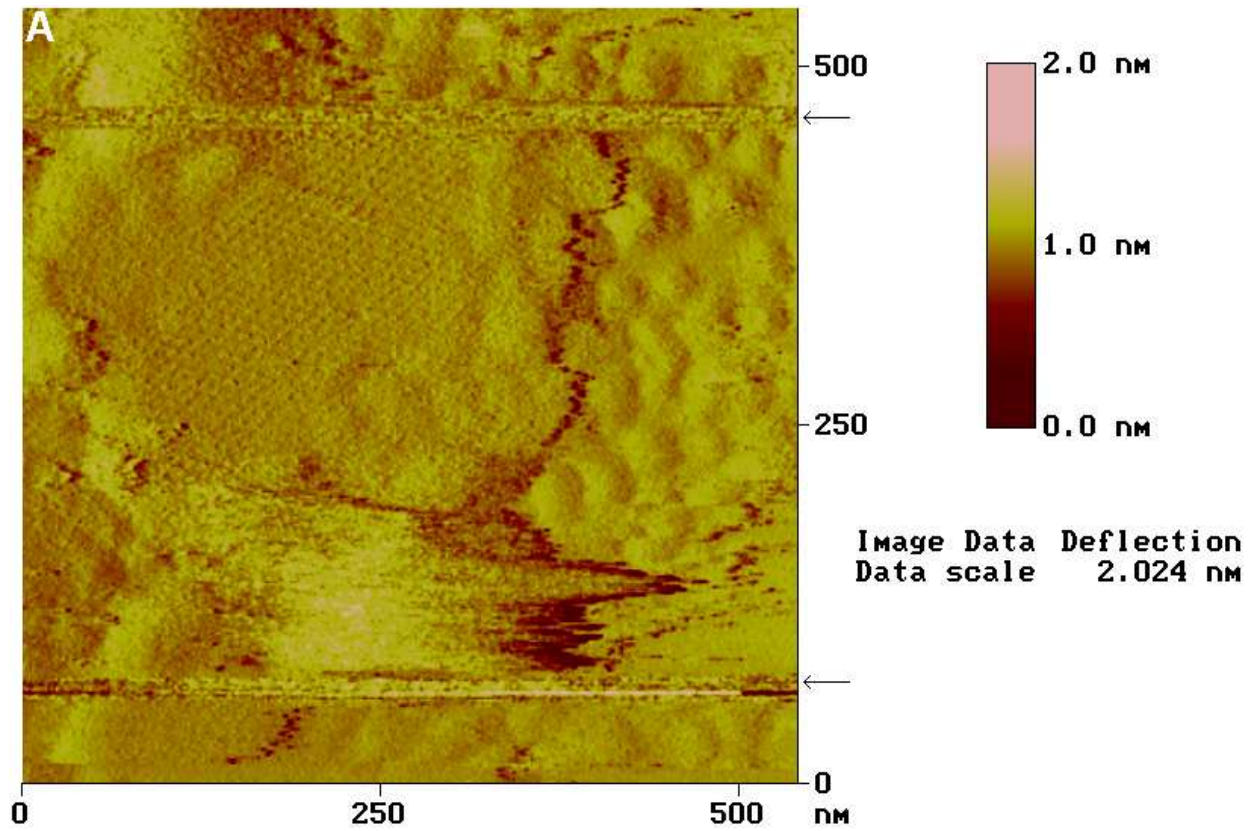


Abbildung 36: Abbildung der oberen Membran zweischichtig adsorbierter Vesikelfragmente mit minimaler Kraft ($LPR = 0,5$; Lipid: DMPC/POPC (9:1); Messpuffer: 250 mM LiCl, 2 mM MgCl₂, 20 mM Tris/HCl pH 7,6; $x_p = 18 \text{ \AA}$, Zeilenfrequenz: 2,5 Hz bei 923 nm Zeilenlänge). **A:** Übersicht (Fehlersignalsbild). Pfeile: „Abheben“ des Sensors von der Oberfläche durch Betrieb nahe des Photodiodensignals des freien Cantilevers (minimale Auflagekraft). **B:** Topographiebild, Höhenprofile: 1) Profil entlang einer Symmetrieachse des trigonalen Gitters. Das zugehörige 1D-FFT-Spektrum zeigt eine Periodizität von 9,8 nm. 2), 3) Profile in SFM-Rasterungsrichtung mit Abmessungen der in Rasterungsrichtung (von links nach rechts) „gekämmten“ Struktur. Die Höhenwerte liegen allesamt deutlich unter dem Durchmesser des N-Terminus.

Die Informationen aus den beschriebenen Messungen, die primär eine Abbildung des starren Kerns der periplasmatischen Seite des Barrel-Trimers liefern, lassen also bereits darauf schließen, dass der flexible N-Terminus bei der Messung von der Sensorspitze zur Seite geschoben bzw. „hin- und hergekämmt“ wird. Es ist daher von großem Interesse, welche Auswirkungen eine Variation bzw. Verringerung der Auflagekraft zeigt. Dies geschieht notwendigerweise bei gleichzeitigem Verlust an Auflösung, da dabei ein geringerer Teil langreichweitiger elektrostatischer Wechselwirkungen kompensiert wird und folgedessen der Abstand Sensor-Molekül größer wird (vgl. Diskussion der Kraftdistanzkurven Abb. 30 und Kap. G&M 1.1). Ebenso ist zu erwarten, dass u. U. der starre Bereich überhaupt nicht mehr von der Sensorspitze „erreicht“ wird. In Abb. 36, aufgenommen bei minimaler Kraft mit einem Sollwert nahe dem Photodiodendifferenzsignal des freien Cantilevers, erkennt man auf einem Fragment der oberen Membran eines vollständig kollabierten Vesikels ein regelmäßiges (trigonales) Gitter. (Bei Berücksichtigung einer Übersichtsaufnahme sowie angesichts des hohen LPR kann es sich hier auch um ein Fragment eines mehrschaligen Vesikels, oben erwähnte „Onion-Struktur“, handeln). Der Gitterabstand der regelmäßigen Korruptionen von knapp 10 nm entspricht dem anzunehmenden Abstand von ScrY-Trimeren im Gitter. Die kristallin angeordneten Erhöhungen erscheinen zum Teil deutlich in Rasterungsrichtung „gekämmt“. Die Pixelgröße bei dieser Aufnahme liegt in der Größenordnung des Durchmessers des putativen N-terminalen Coiled-Coil, in Übereinstimmung damit sind die orientierten Streifen im Bild meist eine bis zwei Zeilen breit. Deren Länge liegt in der Größenordnung 6 - 8 nm, was im Rahmen der Auflösung mit der angenommenen Länge des N-Terminus übereinstimmt. Die in beiden Richtungen gemessenen Werte der maximalen Höhendifferenzen von ca. 5 - 7 Å zeigen, dass diese keineswegs dem gesamten Durchmesser des Coiled-Coil entsprechen. Dies gilt auch unter Berücksichtigung des gemessenen Fehlersignals mit einer Amplitude von maximal 2 Å im Bereich der relevanten Korruptionen. Es liegt daher die Annahme nahe, dass hier tatsächlich bei minimaler Kraft lediglich der N-Terminus touchiert bzw. bewegt wurde, während der Kernbereich der Barrelwände mit der Sensorspitze nicht erreicht wurde. Abb. 37 zeigt denselben Effekt bei dreifach höherer Pixelauflösung, deutlich erkennbar an einem einschichtigen Membranfragment aufgenommen, das am Rand auch die andere Orientierung des eingebauten Proteins enthält. Hier

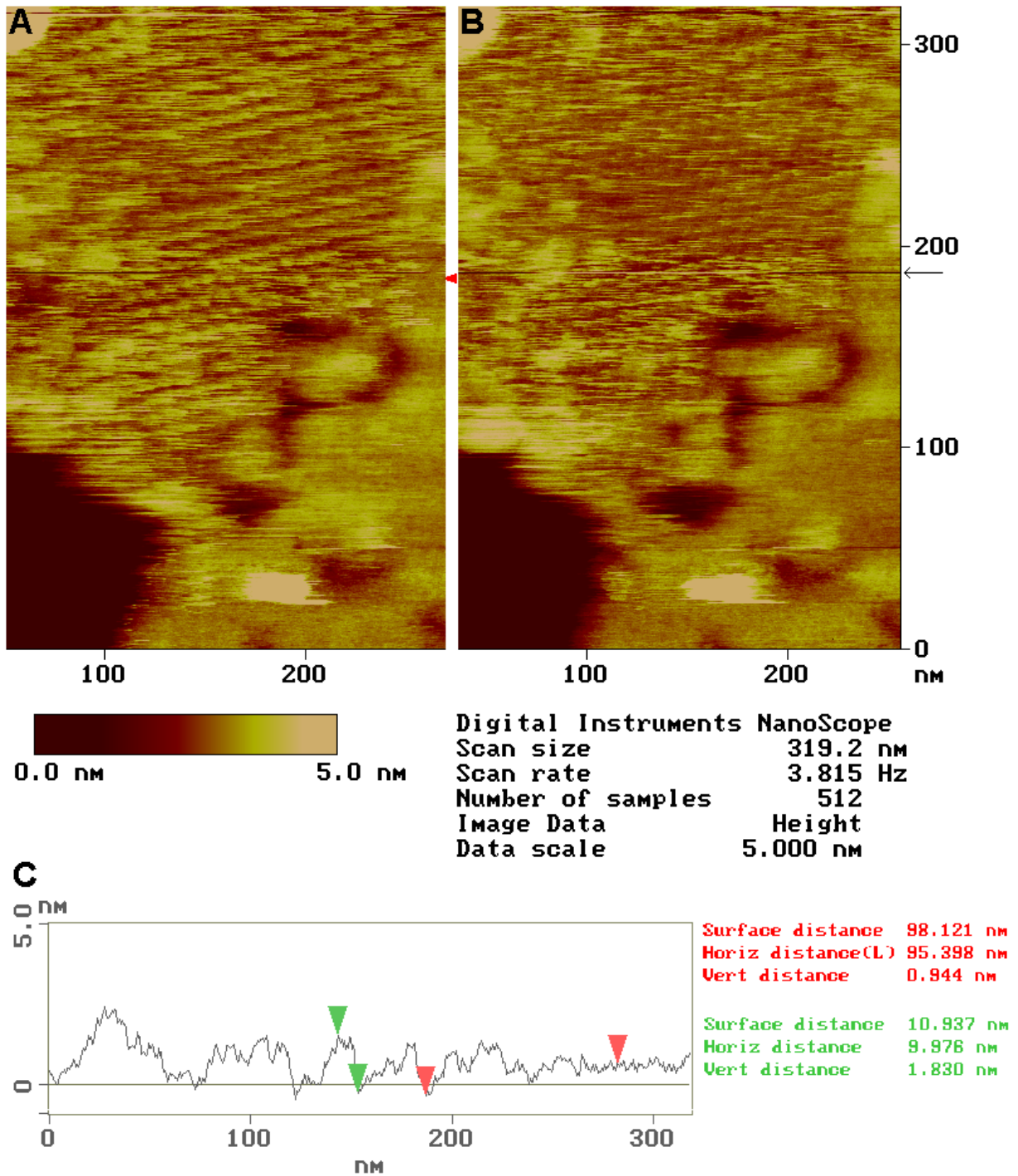


Abbildung 37: Simultane Aufnahme von Hin- und Rückraasterung auf periplasmatisch orientiertem („niedrigeren“) Bereich eines mit ScrY dicht gepackten Membranfragments, das einschichtig adsorbiert ist und Bereiche beider Orientierungen aufweist ($LPR = 0,2$; Lipid: DMPC/POPC (9:1); Messpuffer: 250 mM LiCl, 2 mM MgCl₂, 20 mM Tris/HCl pH 7,6; $x_p = 6,2 \text{ \AA}$). **A**: Rasterungsrichtung von links nach rechts, **B**: Rasterungsrichtung von rechts nach links, Pfeil: Verringerung Auflagekraft; roter Keil: Lage des Höhenprofils **C**.

wurde außerdem simultan die Rückbewegung des Scanners aufgenommen. Die Gitterabstände entsprechen Abb. 36, das Höhenprofil zeigt maximale Korrugationen von 1,8 nm, was dem geschätzten Durchmesser des Coiled Coil näher kommt, sowie die bekannten Höhendifferenzen von ca. 1 nm von den Minima der periplasmatisch orientierten Zone zum Mittel der extrazellulär orientierten Bereiche. Die simultanen Aufnahmen unterschiedlicher Scanrichtung unterscheiden sich deutlich, was als Folge der „gekämmten“ flexiblen Struktur zu deuten ist: die Wechselwirkungen Sensor-Objekt sind als Folge der „Verformung“ auf dem Hinweg sterisch bedingt anders als auf dem Rückweg (also nicht nur streng spiegelbildlich zueinander). Eine Verringerung der Auflagekraft verkleinert etwas die Diskrepanz zwischen Hin- und Rückrasterung und zeigt die einzelnen Partikel deutlicher unterscheidbar. Bei höherer Kraft ist der Kontaktbereich der Sensorspitze mit der Struktur dagegen wohl größer, was einen durchgehenden „Fransenteppich“ zur Folge hat. Dieser „Trace-Retrace-Effekt“ konnte über mehrere Messungen an derselben Stelle beobachtet werden. Eine weitere Erhöhung der Auflagekraft im Sinne der Erzielung höheren (submolekularen) Kontrasts ergäbe ein Bild entsprechend Abb. 33, also das „Verschwinden“ des flexiblen Teils der Struktur, wie es sich bei der Rückrasterung (Abb. 37 B) bereits andeutet.

3.3.5 Charakterisierung der extrazellulären Seite

Bei der kraftmikroskopischen Abbildung der extrazellulären Seite sind zwei Formen zu unterscheiden. Eine besteht nur aus mehr oder weniger gleichartigen Protrusionen, die die Lage der Trimerenachse nicht immer unmittelbar erkennen lässt, die andere aus einer eher ringartig zusammengeneigt erscheinenden Form des Trimers. Abb. 38 zeigt eine typische unidirektional mit ScrY gepackte Membran, die einen kleinen kristallinen Bezirk enthält. Dort ist vorwiegend erstere Variante zu sehen. Die ringförmige Variante tritt bisweilen am Beginn von Messungen an extrazellulär exponiertem ScrY auf, bevor die Auflagekraft optimiert bzw. minimiert worden ist. In Abb. 39 erkennt man diese daher jeweils bevorzugt im oberen Teil der Bilder.

Abb. 40 zeigt überwiegend die mehr ringförmige Variante in einem nicht ideal kristallinen Bezirk, der aber Tendenzen zu kristalliner Ordnung, allerdings scheinbar unterschiedlich um die Trimerenachse rotierter Porine, aufweist. Das Mittel wurde nach dreimaligem Durchlaufen translationalen Kreuzkorrelationsalignments mit jeweiliger Verwendung des gebildeten Mittels als Referenz für die nächste Iteration und anschließendem referenzfreiem Alignment gewonnen. Die Mittel nach den ersten beiden translationalen Iterationsschritten (Abb. 40 C₂, C₃) zeigen die nicht einheitliche azimutale Orientierung der drei Protrusionen der Trimere, das Mittel entspricht fast einem rotationalen Mittel. Das dreifache translationale Alignment erhöhte die Anzahl der korrekt aus der dichten Packung selektierten Partikel, so dass die ersten 72 Bildfenster anschließend ohne manuelles Screening referenzfreiem, rotationalem Alignment unterzogen werden konnten. Die

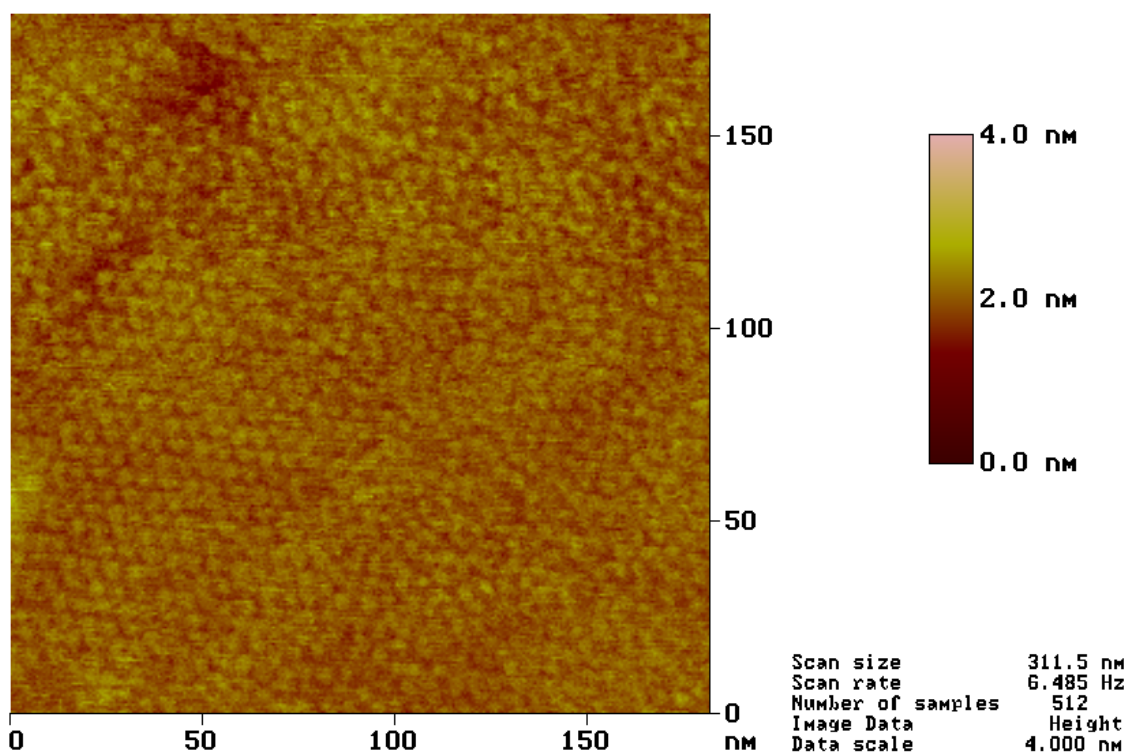


Abbildung 38: Unidirektional rekonstituiertes ScrY, extrazelluläre Seite exponiert. ($LPR = 0,25$; Lipid: DMPC; Messpuffer: 250 mM LiCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM Tris/HCl pH 7,6).

Aufnahme erfolgte bei pH 6, was insofern von Belang ist, da die Oberflächenladungsdichte von Siliziumnitrid-Spitzen pH-abhängig ist (s. 3.4.1). Die Auflagekraft wurde ebenso minimiert wie bei den übrigen Messungen. Die Höhendifferenz von den Protrusionen zum Trimerzentrum beträgt hier etwa 3,5 Å.

Näheren Aufschluss über die Beziehungen der beiden auf der extrazellulären Seite abgebildeten Varianten liefern Messungen wie Abb. 41, wo in demselben Membranfragment in unmittelbar benachbarten Domänen einer kristallin mit ScrY gepackten Membran beide Formen abgebildet wurden. Die beiden Bereiche können als unidirektional extrazellulär exponiert betrachtet werden, da die für bidirektionalen Einbau beobachtete und auch dem Modell entsprechende typische Stufe von über 1 nm fehlt und beide Varianten sich deutlich von der oben beschriebenen periplasmatischen Seite unterscheiden. Es handelt sich in Abb. 41 um die einschichtig adsorbierte Membran eines für dieses LPR typischen, relativ kleinen und unidirektional mit ScrY gepackten Vesikels.

Translationales Korrelationsalignment mit einer Referenz, die eine Triade von nahe beieinanderliegenden Protrusionen im Zentrum enthält, ergab bei der Mittelung zweier Untergruppen (SPIDER: Funktion WV P „patch averages“) aus den in Abb. 41 A umrahmten Bereichen deutliche Unterschiede. Der linke Bereich ergibt ein mit der Referenz konsistentes Mittel (Abb. 41 D₁), während im rechten Mittel (Abb. 41 D₂) sich dies mit Bildern der ringartigen Form überlagert. Typisch ist

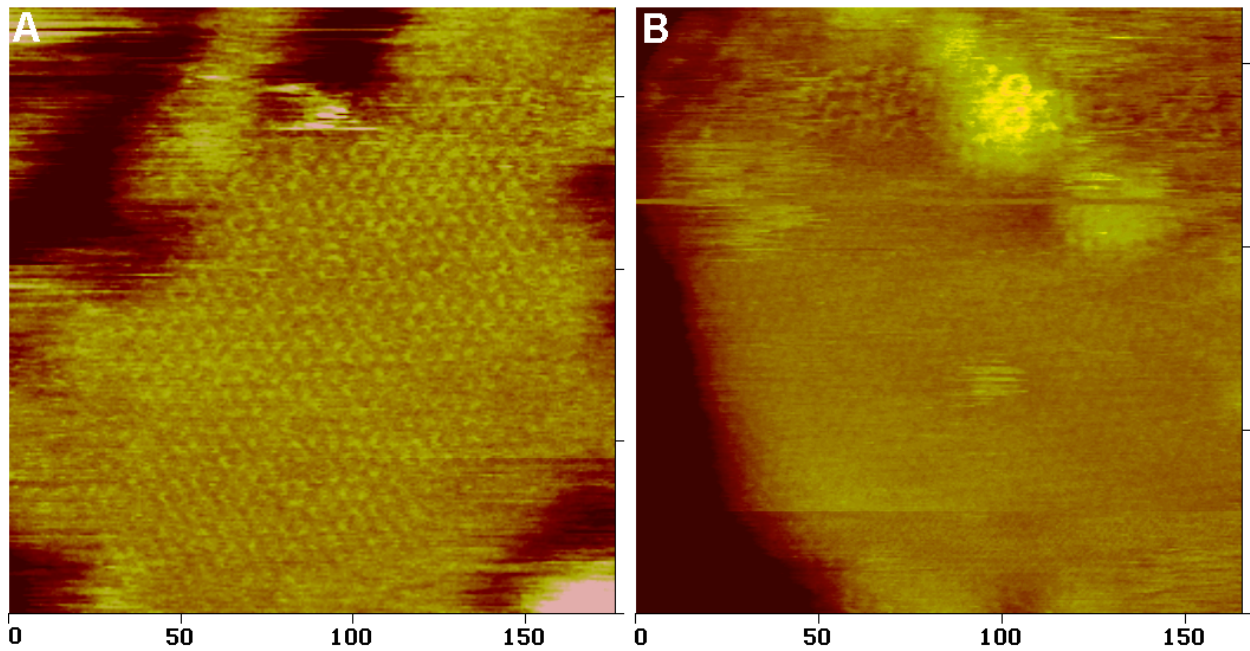


Abbildung 39: Extrazellulär exponiertes ScrY, im Lauf der Messungen wurde jeweils die Auflagekraft minimiert, daher ist die ringartige Form vorwiegend zu Beginn der Messung (oben im Bild) sichtbar. **A:** $LPR = 0, 2$; Lipid: DMPC/POPC (1:1); Messpuffer: 250 mM LiCl, 2 mM $MgCl_2$, 20 mM Tris/HCl pH 7,6). **B:** $LPR = 0, 15$; Lipid: DMPC; Messpuffer: 250 mM LiCl, 2 mM $MgCl_2$, 20 mM Tris/HCl pH 7,6). **Graukeil A:** 4,2 nm, **B:** 15 nm.

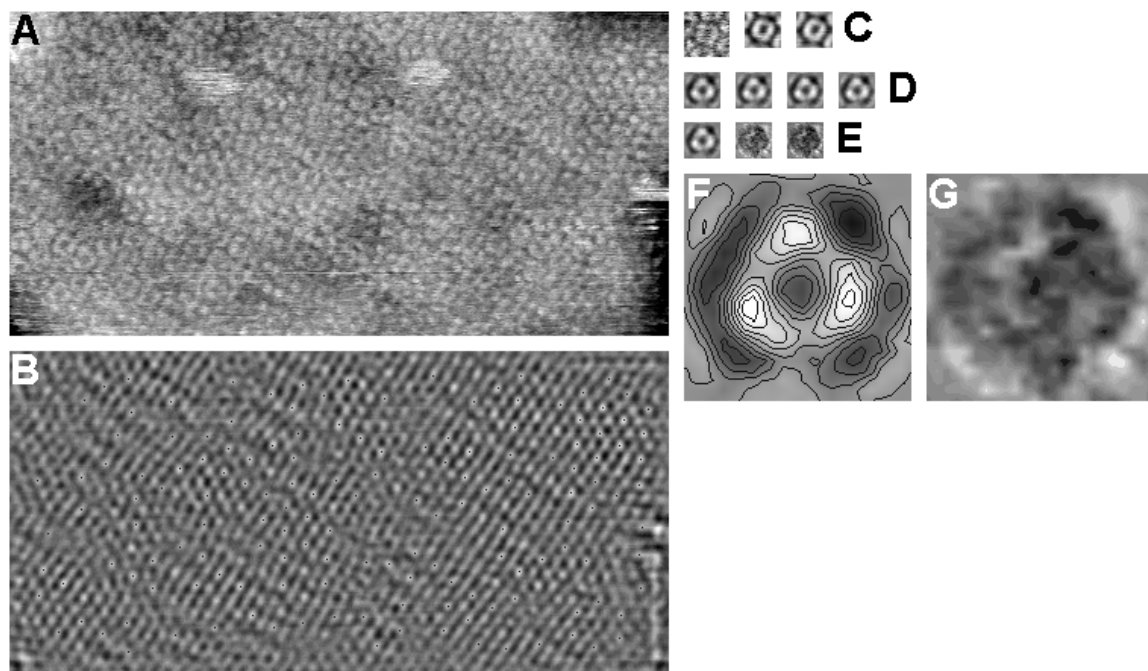


Abbildung 40: Extrazellulär exponiertes ScrY: vorwiegend ringförmige Variante, aufgenommen bei pH 6 ($LPR = 0,15$; Lipid: DMPC/POPC (1:1); Mg^{2+} -haltiger Adsorptionspuffer, Messpuffer: 250 mM LiCl, 10 mM MES; $x_p = 5,8 \text{ \AA}$). **A**: Rohdaten, **B**: Korrelationsfunktion mit markierten Korrelationsmaxima (schwarze Punkte). **C**: Referenz für erste translationale Korrelation, Mittel nach den beiden ersten Iterationen als Referenz für zweite und dritte Iteration. **D**: Mittel nach den Iterationen referenzfreien Alignments. **E**: Das letzte Mittel (Wertebereich $4,9 \text{ \AA}$) mit Standardabweichungskarte (Wertebereich: $1,2 - 2,4 \text{ \AA}$) und Varianzkarte. $N = 72$. **F**: Mittel vergrößert und konturiert (Inkrement Höhenwerte: $0,5 \text{ \AA}$), **G**: zugehörige SD-Karte, vergrößert. **Maßstab A-E**: vgl. Kantenlänge der Bilder C₂ bis E: 13,9 nm; **F, G**: Kantenlänge: 13,9 nm. Auflösungsabschätzung des Mittels: $\frac{1}{34} - \frac{1}{28} \text{ \AA}^{-1}$.

hier die „Voreingenommenheit“ des Alignmentprozesses bei Verwendung einer Referenz (s. Kapitel G&M 7.2.3.2), die Referenz tendiert dazu, das Mittel (Abb. 41 D₂) zu dominieren, obwohl in diesem Bereich tatsächlich eine zweite Variante in der Überzahl vorliegt. Homogene Teilbereiche wurden daher jeweils mit Referenzen aus demselben Bereich korreliert und gemittelt (Abb. 41 E/N, K/P). Die selben Rohdatenfenster wurden außerdem referenzfreiem, rotationalem und translationalem Alignment unterworfen (Abb. 41 F, G, H, I, L, M, R-W), um das Ergebnis ohne Verwendung einer Referenz zu überprüfen und durch rotationales Alignment zu verfeinern. Die Homogenität der gemittelten Serien von Rohdatenfenstern wurde jeweils überprüft.

Es stellt sich hier die Frage, welche Konstellation von Protrusionen im linken Bereich einem Trimer entspricht. Die in Abb. 41 F, G, R und Abb. 42 E, F, G zentrierte Triade entspräche sehr gut den Strukturdaten, wenn man davon ausginge, dass der am höchsten nach oben ragende der relativ starren Loops (Loop 8) an der peripheren Wand des Barrels wesentlich zu dem erhaltenen Kontrast beiträgt. In Abb. 41 R ist ein gleichseitiges Dreieck zwischen die Protrusionen gelegt, dessen Seitenlänge dem Abstand der äußersten Atome dieses Loops von einem Monomer zum nächsten von $41,5 \text{ \AA}$ entspricht (kleineres Dreieck, das größere entspricht den Abständen der Außenseite benachbarter Barrels, vgl. Abb. 43). Dazwischen läge dann der von diesen Loops begrenzte gemeinsame Vorhof der drei Poren des Trimers. Im übrigen passt diese Annahme sehr gut zu kraftmikroskopischen Daten bzw. deren Interpretation von der extrazellulären Seite des ähnlichen Porins OmpF (z. B. Müller und Engel, 1999). Mehrere Gründe sprechen gegen diese Annahme: Erstens liegt diese Triade nicht im richtigen Raster mit den deutlicher erkennbaren Trimeren auf der rechten Seite, es müsste also eine nicht sauber abgebildete Verwerfung zwischen zwei kristallinen Bereichen angenommen werden. Die Rohdaten sprechen aber dafür, dass links eine Triade von scheinbar enger zusammenstehenden Protrusionen (Abb. 41 H, I, T) ein Trimer repräsentieren, denn diese Partikel bilden eine durchgehende Reihe entlang einer Symmetrieachse des Kristalls über beide Bereiche, wie in Abb. 41 C gezeigt ist. Zweitens müsste der in der Röntgenstruktur noch weiter nach oben ragende Loop 5 hier stabil zur Seite gebogen und damit unsichtbar sein.

Abb. 42 zeigt eine Aufnahme desselben Präparats bei höherer Pixelauflösung.

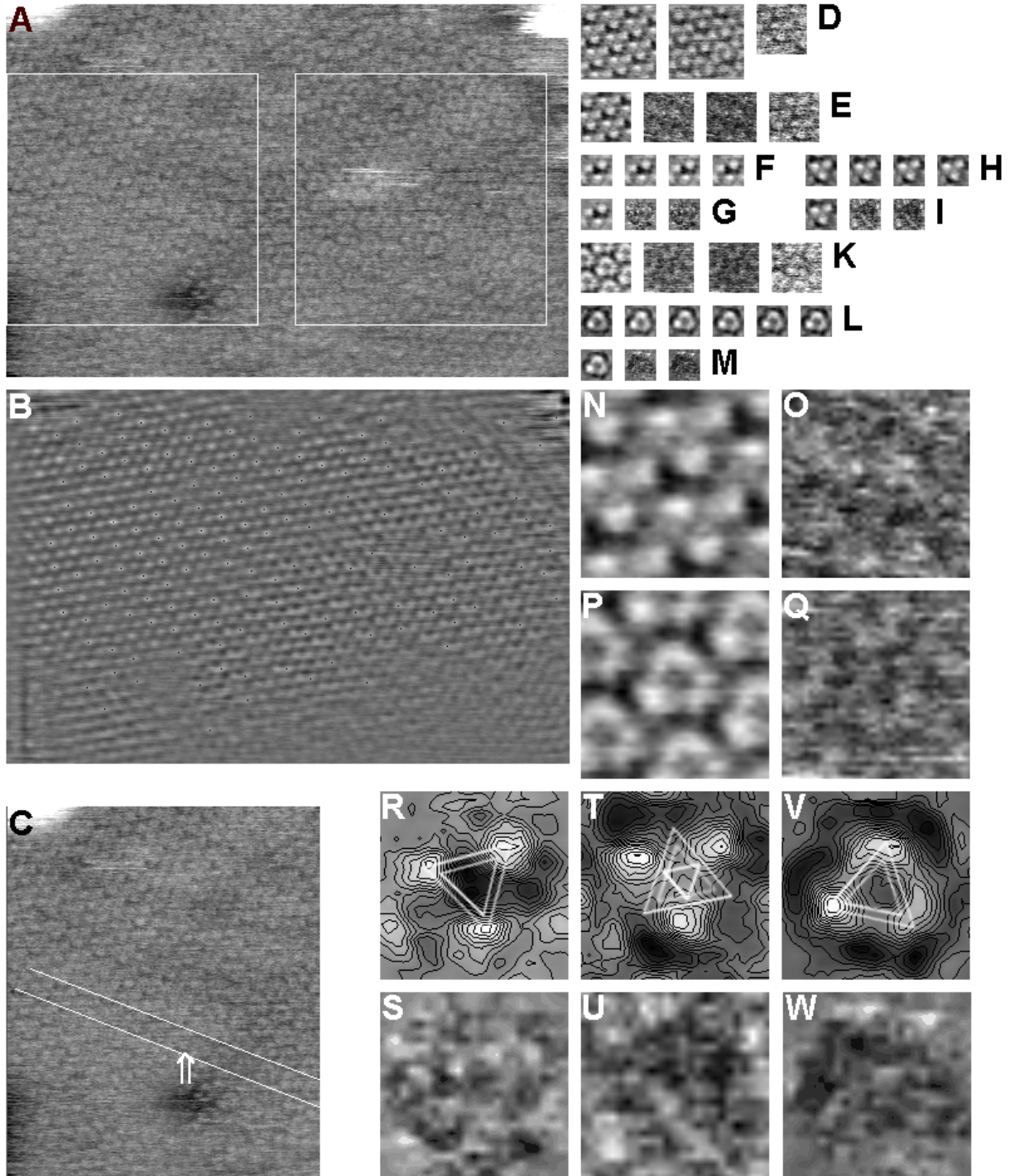


Abbildung 41: Extrazellulär exponiertes ScrY ($LPR = 0,2$; Lipid: DMPC/POPC (4:6); Messpuffer: 250 mM LiCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,6; $x_p = 5,14 \text{ \AA}$). **A**: Rohdaten, **B**: Translationale Korrelationsfunktion (zu D) mit markierten Korrelationsmaxima (schwarze Punkte). **C**: Rohdaten mit markiertem Übergang von der einen Form zur anderen (Pfeil) entlang einer Symmetrieachse des trigonalen Gitters. **D**: D_1, D_2 : Translationale Korrelationsmittelung, Mittel der beiden in A umrahmten Bereiche bei Korrelation von A mit einer Referenz (D_3). **E**: Translationale Korrelationsmittelung, Mittel mit Standardabweichungs- und Varianzkarte sowie Referenz des Bereichs links. $N = 85$. **F**: Referenzfreies Alignment der in E selektierten Rohdaten, vier Iterationsmittel, **G**: letztes Mittel daraus mit SD- und V-Karte. **H, I**: Entsprechendes referenzfreies Alignment mit alternativer Annahme bzgl. Trimerenachse. **K**: Translationale Korrelationsmittelung, Mittel mit Standardabweichungs- und Varianzkarte sowie Referenz des Bereichs rechts. $N = 97$. **L, M**: Referenzfreies Alignment der in K selektierten Rohdaten, sechs Iterationsmittel, letztes Mittel daraus mit SD- und V-Karte. **Maßstab A-M**: vgl. Kantenlänge E: 20,6 nm, F: 12,9 nm. **N, O**: Mittel (Wertebereich: 3,1 \AA) und SD-Karte (Wertebereich: 0,8 - 1,6 \AA) aus E, vergrößert. **P, Q**: Mittel (Wertebereich: 3,1 \AA) und SD-Karte (Wertebereich: 0,9 - 1,7 \AA) aus K, vergrößert. **Maßstab N-Q**: Kantenlänge der Bilder: 20,6 nm. **R**: Mittel G (Wertebereich: 2,9 \AA) vergrößert und konturiert (Inkrement Höhenwerte: 0,2 \AA), **S**: zugehörige SD-Karte (Wertebereich: 0,8 - 1,3 \AA). **T**: Mittel I (Wertebereich: 2,9 \AA) vergrößert und konturiert (0,2 \AA), **U**: zugehörige SD-Karte (Wertebereich: 0,8 - 1,4 \AA). **V**: Mittel M (Wertebereich: 2,7 \AA) vergrößert und konturiert (0,2 \AA), **W**: zugehörige SD-Karte (Wertebereich: 0,8 - 1,5 \AA). **Maßstab R-W**: Kantenlänge der Bilder: 12,9 nm. **Dreiecke R, T, V**: klein: Abstand L5-L5, mittel: L8-L8, groß: periphere Barrelwand benachbarter Monomere, vgl. Abb. 43.

Eine Besonderheit dieser beiden Messungen bestand darin, dass in Rasterungsrichtung aufgrund des nicht optimal montierten Präparats eine ansteigende Rampe von insgesamt etwa 4 nm auf einer Rasterlinienlänge von 260 nm (3 nm auf 200 nm bei Messung Abb. 42) gefahren wurde. Bei einer Zeilenfrequenz von 5 Hz und einer Abtastrate der Analog-Digitalwandlung von 62,5 kHz pro Kanal ist es durchaus möglich, dass der z-Piezo hier nicht optimal nachgeregelt wurde und damit der Höhenrampe eine leichte Rampe ansteigender Auflagekraft in Rasterungsrichtung entspricht. Der digital implementierte Regelkreis merkt eine Höhenänderung hier erst etwa ein halbes \AA später, das Regelungssignal erreicht den Scanner erst nach etwa 1 \AA . Entsprechend erkennt man im Fehlersignal (Auslenkung des Cantilevers) Abb. 44 signifikant erhöhte maximale Spikes auf der rechten Seite, was bedeutet, dass dort in dem jeweiligen Zeitfenster vor Wirksamwerden der Nachregelung des Piezohubs größere Fluktuationen auftreten. Das Fehlerbild zeigt, dass rechts unten (im Bereich der ringförmigen Variante) deutlichere strukturkorrelierte Fluktuationen vorliegen, was gegen höheres Rauschen als Ursache spricht. Bei Annahme einer durchgehend gleichartigen periodischen Struktur bzw. angesichts der Tatsache zumindest etwa gleich hoher Korrugationen im Topographiesignal über die gesamte Rasterungslänge kann dies kraftinduzierte dynamische Effekte widerspiegeln. Der langsame Anstieg der Auflagekraft aufgrund mangelnder Regelungsgüte ist hier nicht aufgezeichnet, nur Fluktuation um ein Mittel. Ein hieraus abzuleitender kraftabhängiger Effekt als Erklärung der beiden Abbildungsvarianten würde aber implizieren, dass der sehr viel flexiblere Loop 5 eher links einen Beitrag zum Kontrast liefern müsste. Tatsächlich lässt sich ein

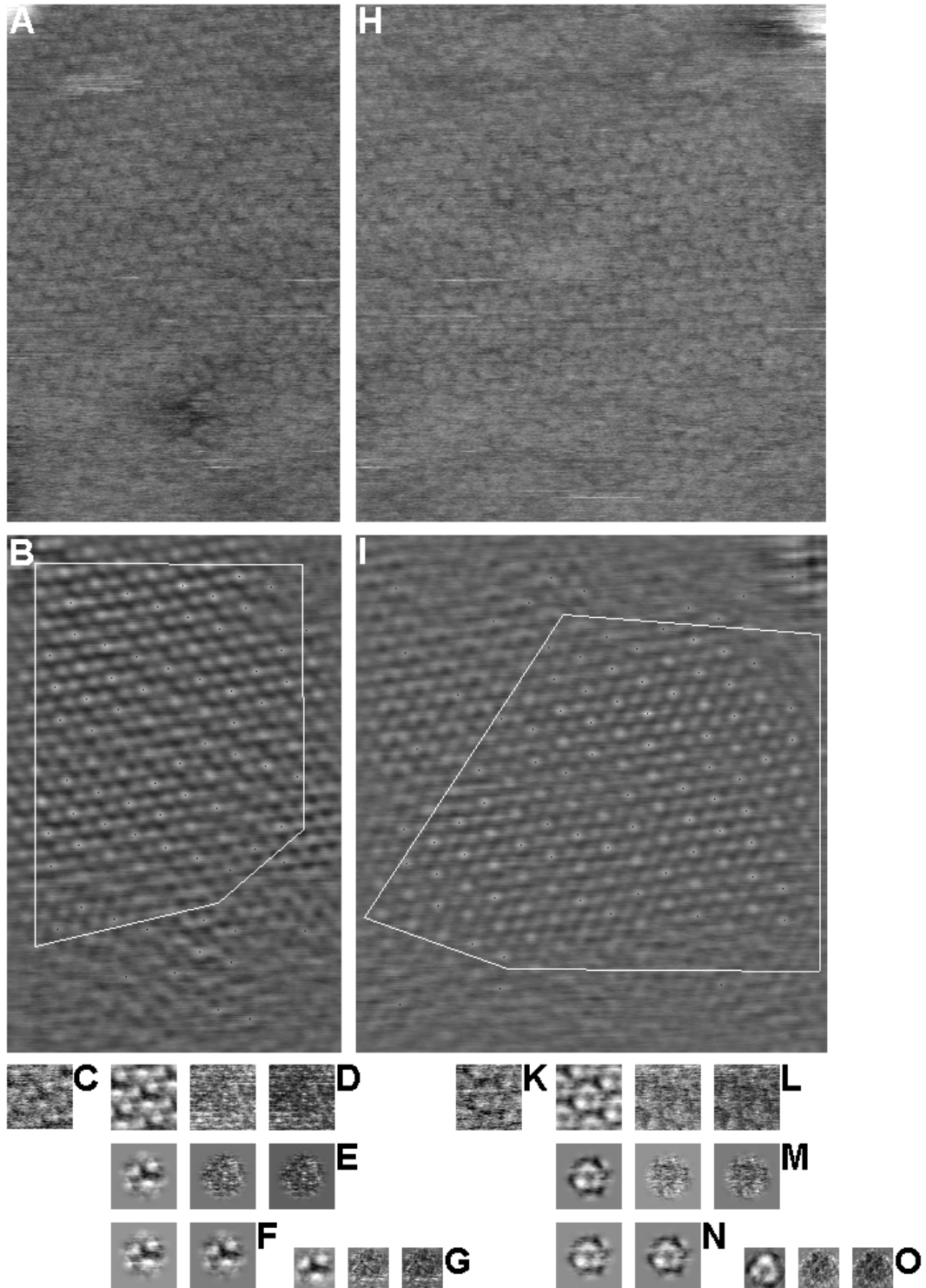


Abbildung 42: (vorherige Seite) Dasselbe Präparat wie Abb. 41, $x_p = 4,06 \text{ \AA}$. **A:** Rohdaten links, **B:** Translationale Korrelationsfunktion (zu A, C) mit markierten Korrelationsmaxima (schwarze Punkte). **C:** Referenz zu A, B. **D:** Mittel (Wertebereich: $3,4 \text{ \AA}$) aus A, B, C mit Standardabweichungskarte (Wertebereich: $0,8 - 1,7 \text{ \AA}$) und Varianzkarte. $N = 53$. **E:** D, maskiert. **F:** geradzahliges und ungeradzahliges Mittel aus D für Abschätzung der Auflösung. **G:** Referenzfreies Alignment der vorselektierten Rohdaten, letztes Mittel daraus (Wertebereich: $3,4 \text{ \AA}$) mit SD-Karte (Wertebereich: $0,7 - 1,5 \text{ \AA}$) und Varianzkarte. **H:** Rohdaten rechts, **I:** Translationale Korrelationsfunktion mit markierten Korrelationsmaxima (zu H, K). **K:** Referenz zu H, I. **L:** Mittel (Wertebereich: $3,2 \text{ \AA}$) aus H, I, K mit Standardabweichungs- (Wertebereich: $0,7 - 1,6 \text{ \AA}$) und Varianzkarte. $N = 60$. **M:** L, maskiert. **N:** geradzahliges und ungeradzahliges Mittel aus M. **O:** Referenzfreies Alignment der vorselektierten Rohdaten, letztes Mittel daraus (Wertebereich: $3,1 \text{ \AA}$) mit SD-Karte (Wertebereich: $0,8 - 1,6 \text{ \AA}$) und Varianzkarte. **Maßstab A-O:** vgl. Kantenlänge C-F, K-N: $20,3 \text{ nm}$, G, O: $12,6 \text{ nm}$.

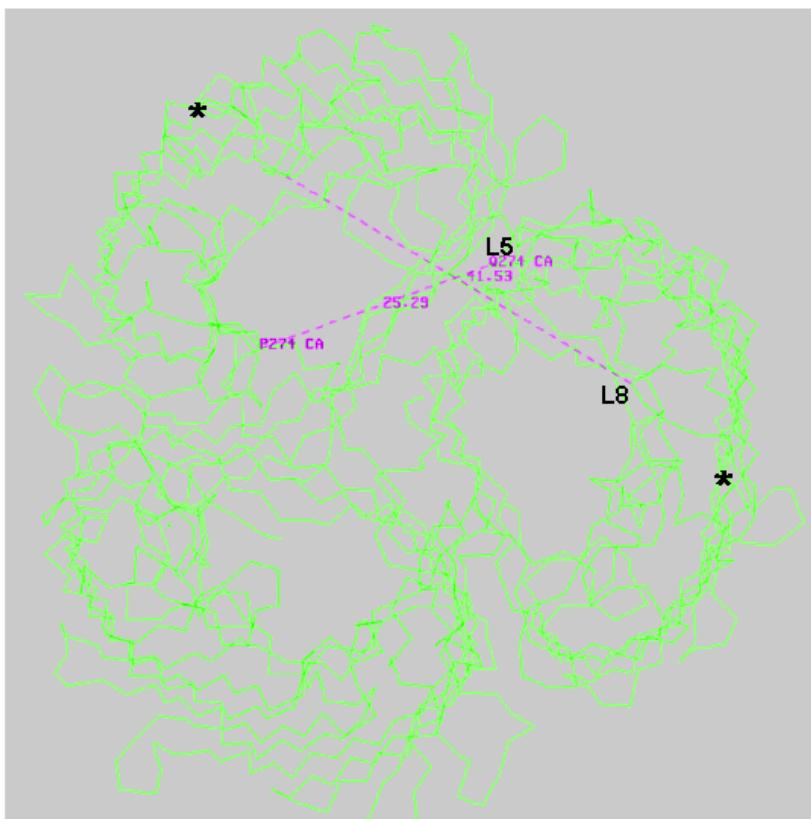


Abbildung 43: Abstände zwischen den exponiertesten extrazellulären Loops benachbarter Monomere innerhalb des Trimers (Röntgenstruktur): starrer Loop 8 an der peripheren Wand des Barrels ($41,5 \text{ \AA}$) und flexibler Loop 5 ($25,3 \text{ \AA}$). Die Sterne markieren den oberen Rand der peripheren Wand des Barrels (Abstand der $C_{\alpha}371, \beta14$: $62,7 \text{ \AA}$). Die grau hinterlegte Fläche hat eine Kantenlänge von 85 \AA . Erzeugt mit O (K. Diederichs).

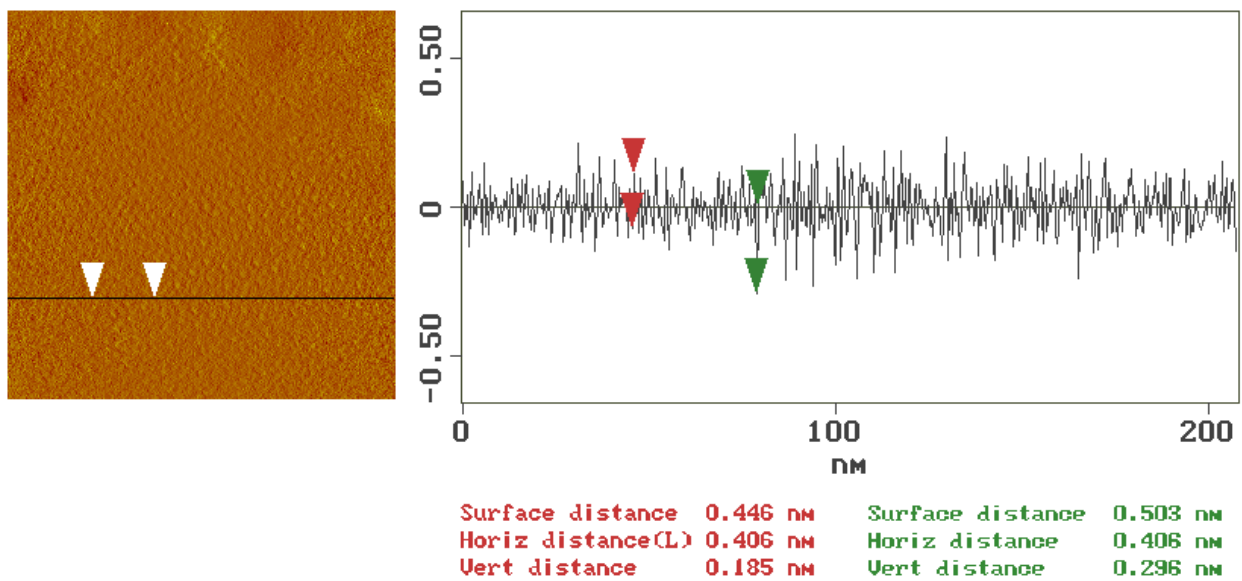


Abbildung 44: Fehlersignal (Auslenkung des Cantilevers trotz Regelung auf konstante Auflagekraft), Bild und eine Zeile daraus zur Messung Abb. 42.

Dreieck mit den Abmessungen des Abstands der obersten Atome der „entspannten“ Loops 5 von 25,3 Å (Röntgenstruktur, vgl. Abb. 43) passend zwischen die Protrusionen der enger zusammenstehenden Triade legen (Abb. 41 T, kleinstes Dreieck). Die gemessene Lage des Loops 5 links muss allerdings nicht exakt dieser Ruhelage (Röntgenstruktur) entsprechen. Dass die Loops 5 bei steigender Auflagekraft irgendwann nach unten bzw. zur Seite gedrückt werden, ist aufgrund der Werte des Temperaturkoeffizienten sehr wahrscheinlich (Abb. 45). Dann müsste der wenig kürzere Loop 8 (und evtl. Loop 9) zum Vorschein kommen, die bedeutend weniger flexibel sind, und einen wesentlichen Teil des Kontrasts verursachen („rechte Variante“) oder aber Loop 5 wird stabil zur Seite bzw. gegen diese starreren Loops gedrückt, was ebenfalls zum Bild einer verdrehten Triade führen könnte.

Im Molekülmodell Abb. 45 ist der Temperaturkoeffizient („B-Faktor“) als Maß für die Flexibilität farbkodiert dargestellt. - Bei der Modellierung von Röntgenstrukturdaten wird die Verminderung der Beugungsamplituden durch thermische Bewegung der einzelnen Atome i und statische Unordnung innerhalb und zwischen den Einheitszellen durch einen Korrekturfaktor berücksichtigt: $T = \exp \left[-B_i \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2} \right]$ (isotroper Fall, θ : Winkel des Reflexes, λ : Wellenlänge). Der Temperaturkoeffizient $B_i = 8\pi^2 \langle u_i^2 \rangle$ hängt hierbei von dem mittleren Abweichungsquadrat $\langle u_i^2 \rangle$ des Atoms bezüglich seiner Ruhelage ab (Buerger, 1977; Creighton, 1983). - Am flexibelsten ist der exponentierte Loop 5 (Maximalwert für B_i : 82 Å²), gefolgt von dem kürzeren Loop 4 (57 Å²) und den peripheren Loops Nr. 9 (56 Å²) und Nr. 8 (45 Å²). Im Modell Abb. 45 B und C sind zwei mögliche Positionen des Loops 5 dargestellt, die durch Auslenkung um nur ein Scharnier am Rand des β -

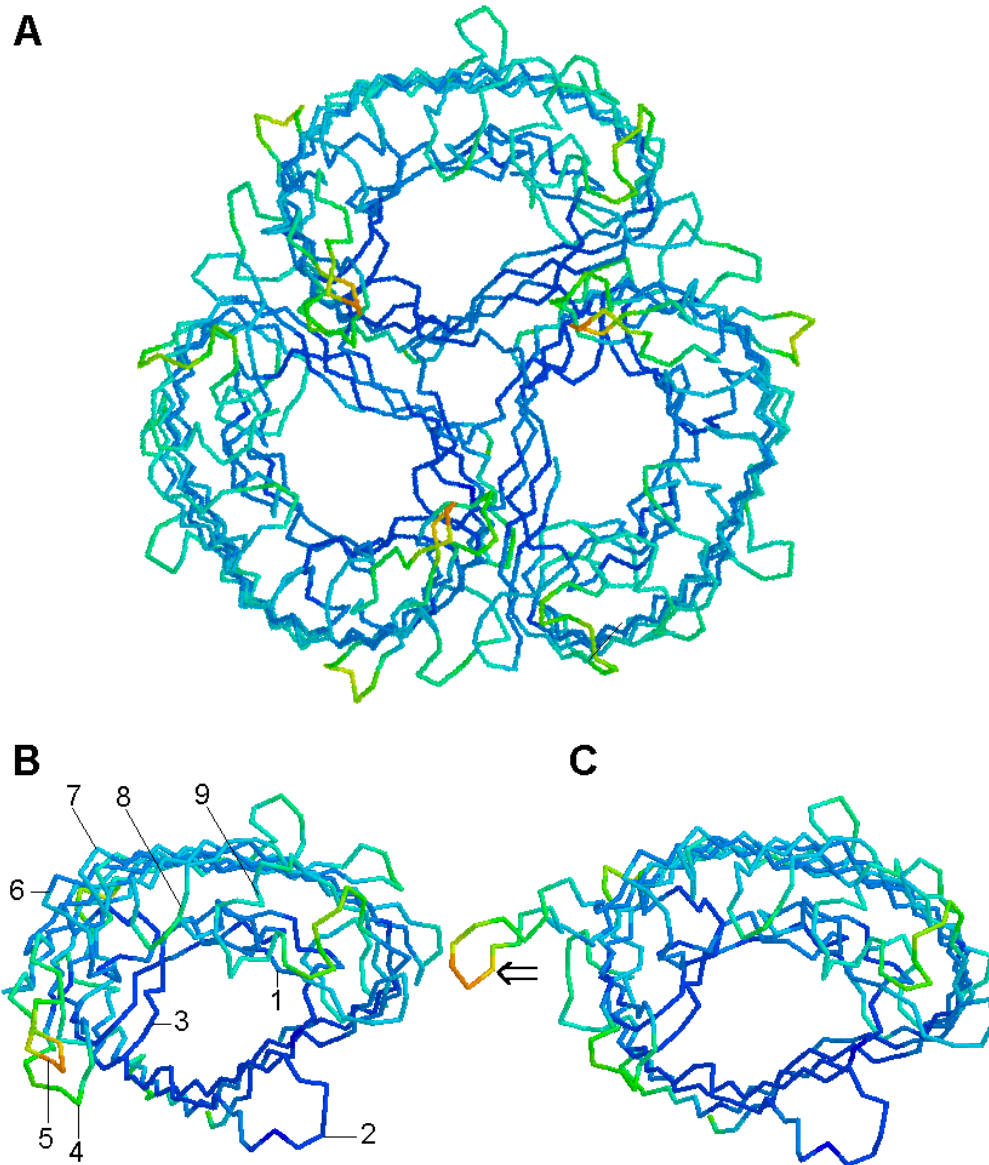


Abbildung 45: Flexible extrazelluläre Loops: Molekülmodell, Temperaturkoeffizient (B-Faktor) farbko-
diert (Mittelwert: 29 \AA^2): Wertebereich 6 \AA^2 (blau) bis 100 \AA^2 (orange). Loop 5 (82 \AA^2) hat den höchsten
Wert (jew. Maximalwert innerhalb des Loops), Loop 4 (57 \AA^2) den zweithöchsten. Peripherer Loop 8:
 45 \AA^2 , Loop 9: 56 \AA^2 .

A: ScrY-Trimer, **B:** Monomer, Loops 1-9, **C:** Monomer, Loop 5 nach Auslenkung um ein „Scharnier“ am
Rand des starren β -Barrels (Pfeil). Mit Rasmol erzeugt (K. Diederichs).

Barrels aus der „Ruhelage“ (Röntgenstruktur Abb. 45 B) erhalten wurden. Viele andere Positionen sind ebenfalls denkbar. Tatsächlich sieht man die Protrusionen des Trimers auf der rechten Seite „auf Lücke stehend“ gegenüber denen auf der linken Seite (um etwa 60° „verdreht“, was grob dem Winkel zwischen den Loops 4/5 einerseits und dem peripheren Barrel-Rand, also Loops 8/9, entspricht). Auch lässt sich der Abstand der Loops 8 im Trimer in dieses Bild legen (Abb. 41 V, kleineres Dreieck). Bei den beiden scheinbar unterschiedlichen kristallinen Domänen handelt es sich also wohl nur um kraftabhängige Varianten der Abbildung eines Einkristalls, wobei jeweils unterschiedliche Strukturen (Loops) zum Kontrast beitragen. Dies wird auch durch oben genannte Messungen gestützt, wo die Auflagekraft nicht in der schnellen Scanrichtung, sondern in y variiert wurde (Abb. 39). Das Auftreten der beiden Varianten in derselben Messung und auf demselben Fragment bzw. Kristall lässt sonstige Unterschiede bei den Abbildungsbedingungen wie Spitzengeometrie, Ionenstärke des Puffers etc. als Erklärung ausscheiden.

Eine gewisse durchaus zu erwartende Richtungsabhängigkeit der vermuteten kraftinduzierten Verformung der Loops 5 (und evtl. 4) bei der rechten Variante zeigt sich in der Asymmetrie der abgebildeten bzw. gemittelten Trimere, die auch nach rotationaler Verfeinerung erhalten bleibt. Die Protrusion links unten sieht denen der anderen Variante gleich, hier könnte der Loop 5 noch einigermassen aufrecht stehen („gegen den Strich gebürstet“). Denkbar wäre auch, dass die Trimere der rechten Seite generell leicht gekippt sind.

Die maximalen Höhendifferenzen der Protrusionen (jeweils zum Zentrum) liegen bei nur $2,6 \text{ \AA}$ (Abb. 41 R), $1,2 \text{ \AA}$ (Abb. 41 T), $1,0 - 1,9 \text{ \AA}$ (Abb. 41 V) und damit wenig über der Standardabweichung in diesen Bereichen. Die Parameter des PI-Reglers waren optimal eingestellt, mangelnde Regelungsgüte als Grund für vergleichsweise niedrige Werte scheidet also aus. Die gemessenen kleinen Korrugationen zeigen eher, dass hier bei geringer Auflagekraft wohl nur die exponiertesten Loops zum Kontrast beitragen, wohingegen bei Aufnahmen bidirektional eingebauten Sucroseporins in Übereinstimmung mit dem Modell auch die auf der extrazellulären Seite peripher erhöhten Wände des Barrels noch von der Sensorspitze erreicht werden dürften. Bei oben gezeigten Messungen (3.3.3, 3.3.4) war die Auflagekraft nämlich immerhin so groß, dass eine Abbildung der niedriger liegenden periplasmatischen Seite bei praktisch völliger Verdrängung des N-Terminus möglich war.

Der Gitterabstand, der aus dem Abstand der Maxima der Kreuzkorrelationsfunktion bestimmt wurde, beträgt jeweils $9,9 \pm 0,1 \text{ nm}$.

Die Werte für die Abschätzung der lateralen Auflösung der Mittel nach translationalem Alignment (Abb. 42 und 46) zeigen, dass signifikante Information unterhalb von etwa $\frac{1}{20} \text{ \AA}^{-1}$ vorliegt. Für die vermutlich weniger verformten Trimere auf der linken Seite des Kristalls sind die Werte etwas besser (DPR: $\frac{1}{23} - \frac{1}{20} \text{ \AA}^{-1}$; FRC: $\frac{1}{18} - \frac{1}{15} \text{ \AA}^{-1}$; SSNR: $\frac{1}{21} \text{ \AA}^{-1}$) als bei stärkerer Verformung rechts

($\frac{1}{27} \text{ \AA}^{-1}$; $\frac{1}{26} - \frac{1}{15} \text{ \AA}^{-1}$; $\frac{1}{30} - \frac{1}{20} \text{ \AA}^{-1}$). Der Kurvenverlauf bzw. das Auftreten teils mehrerer Schnittpunkte zeigt allerdings, dass man sich bei dieser gemessen an der Partikelgröße groben Pixelauflösung sowie einer Stichprobengröße von $N = 53$ bzw. $N = 60$ an der Grenze der Aussagekraft dieser statistischen Auflösungskriterien bewegt. (Unser et al., 1987, gibt einen Erfahrungswert von $N = 100$ für die asymptotische Optimierung des erhaltenen Werts für das SSNR.) Ein etwas klarerer Verlauf (ohne Abb.) ergibt sich bereits bei der Messung Abb. 41 ($N = 85$ bzw. $N = 97$; $\frac{1}{27}$; $\frac{1}{21}$; $\frac{1}{24}$ bzw. $\frac{1}{26}$; $\frac{1}{17}$; $\frac{1}{31} - \frac{1}{25} \text{ \AA}^{-1}$; FFT: $\frac{1}{21} \text{ \AA}^{-1}$). Bei dieser Aufnahme beträgt der Pixelabstand allerdings $5,1 \text{ \AA}$ gegenüber $4,1 \text{ \AA}$ oben, daher sind die Werte für die Auflösung hier generell schlechter. - Werte für die laterale Auflösung in derselben Größenordnung liefern auch die noch vom Rauschen unterscheidbaren (wegen der Heterogenität des Kristalls aber verschmierten) Reflexe höchster Ordnung im FFT-Spektrum. - Wie bereits in Kapitel G&M 7.2.4.2 erläutert, ist die in SPIDER eingesetzte kritische Funktion $FRC_{krit} = \frac{3}{\sqrt{N_{[k, \Delta k]}}}$ besser mit den Schwellenwerten der beiden anderen Auflösungskriterien kompatibel als die üblicherweise angewandte vergleichsweise optimistische $FRC_{krit} = \frac{2}{\sqrt{N_{[k, \Delta k]}}}$ (Abb. 46).

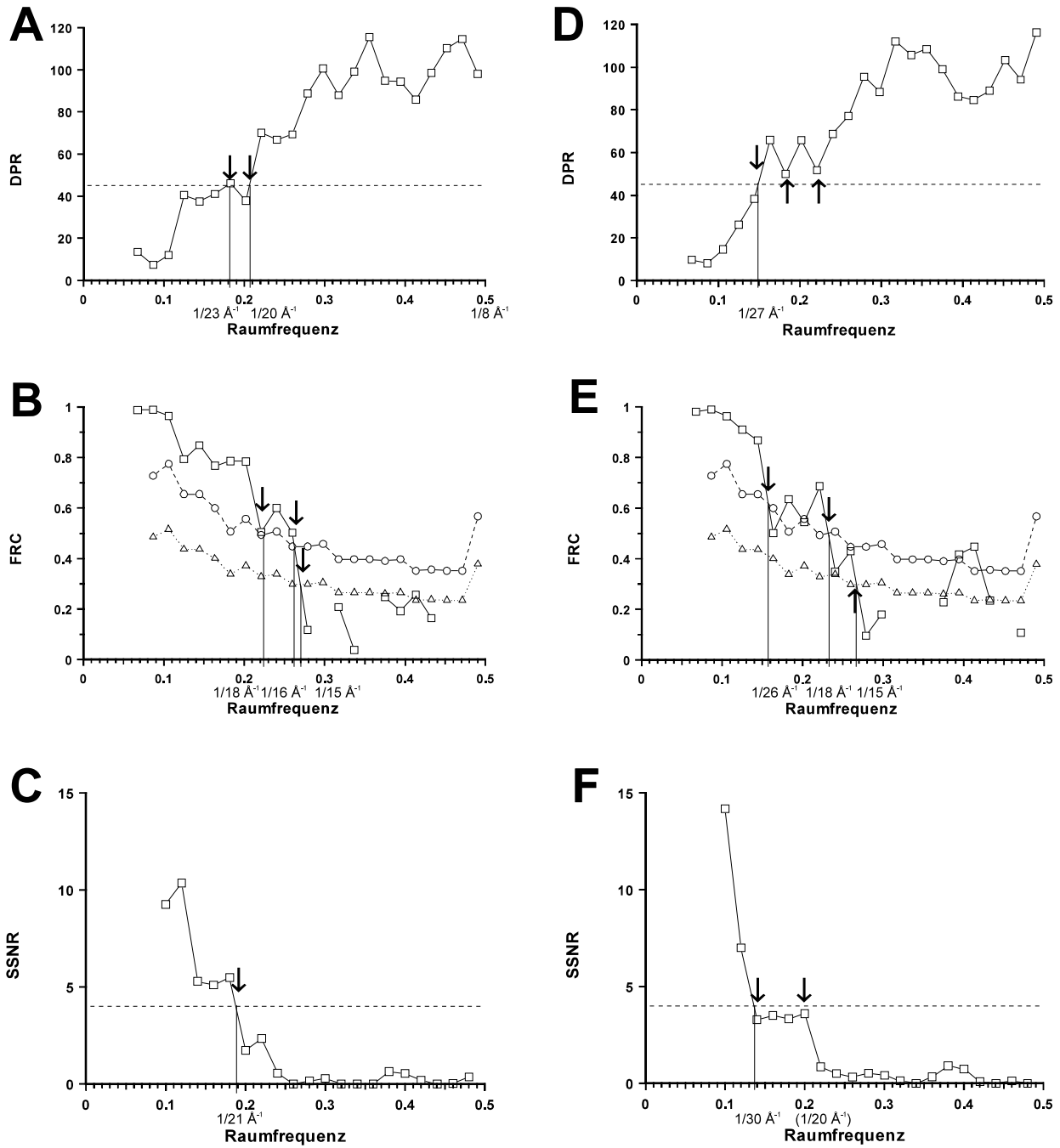


Abbildung 46: Auflösungsabschätzung korrelationsgemittelter Daten. **A, B:** Differenzieller Phasenunterschied (DPR) und Fourierringkorrelationsfunktion (FRC) der unabhängigen Mittel Abb. 42 F₁, F₂, **C:** Spektrales Signal-Rausch-Verhältnis (SSNR) der zum Mittel Abb. 42 E gehörigen Rohdatenfenster. **D, E:** DPR und FRC der unabh. Mittel Abb. 42 N₁, N₂, **F:** SSNR der zu Abb. 42 M gehörigen Rohdatenfenster. Die Ordinate (Raumfrequenz) ist in absoluten Einheiten skaliert. Da $x_p = 4,06 \text{ \AA}$, entspricht der Maximalwert von 0,5 etwa $\frac{1}{8} \text{ \AA}^{-1}$. Pfeile: Schnittpunkte mit den jew. Schwellenwerten / krit. Funktionen (gestrichelt). DPR: $\Delta\phi(k_{krit}, \Delta k) = 45^\circ$, FRC: obere Kurve $\frac{3}{\sqrt{N_{[k, \Delta k]}}}$, untere: $\frac{2}{\sqrt{N_{[k, \Delta k]}}}$, SSNR: $\alpha_N(k_{krit}) = 4$. Zugehörige Achsenabschnitte jeweils auch in \AA^{-1} .

3.4 Diskussion

3.4.1 Abbildung am SFM

Die Untersuchungen an rekonstituiertem Sucroseporin haben gezeigt, dass sich mit abbildender Kraftmikroskopie im Kontaktmodus sowohl die extrazelluläre als auch die periplasmatische Seite des Trimers mit submolekularer Auflösung abbilden lassen. Auf beiden Seiten können bei Variation der Abbildungsbedingungen Domänen unterschiedlicher Flexibilität unterschieden werden.

Wie bereits in Abschnitt 3.3.5 dargelegt wurde, handelt es sich bei den unterschiedlichen Varianten der abgebildeten *extrazellulären Seite* um einen kraftabhängigen Effekt, der sowohl bei Variation der Auflagekraft in der langsamen (y) als auch in der schnellen Rasterungsrichtung (x) auftritt. Eine Betrachtung der unterschiedlichen Flexibilität der beiden exponierten Gruppen von Loops L4/L5 versus L8/L9, die durch die deutlich kürzeren L6, L7 getrennt sind (Abb. 23 B), lässt das Ergebnis auch unmittelbar plausibel erscheinen. Zu diskutieren ist weiterhin, warum bei pH 6 generell bevorzugt die Loops in ihrer „kollabierten“ Form abgebildet wurden. Hier ist zu beachten, dass die an der Oberfläche oxidierten Siliziumnitrid-Spitzen unterhalb etwa pH 6 positiv und oberhalb davon negativ geladen sind bzw. die Ladungsdichte vom pH abhängt (Butt, 1992; Lin et al., 1993). Die elektrostatische Kraft bei Überlagerung der elektrischen Doppelschichten der in Kontakt zur Elektrolytlösung befindlichen geladenen Oberflächen (Abstoßung und damit gleichnamige Ladung bei pH 7,6; vgl. Abb. 30) ist proportional zu den jeweiligen Oberflächenladungsdichten. Eine Verminderung der Ladungsdichte und damit eine geringere elektrostatische Abstoßung der globalen Oberflächen führt bei gleicher Auflagekraft zu einem geringeren Abstand zwischen der äußersten Protrusion des Sensors und dem Objekt und damit sowohl zu einer Veränderung der Geometrie der Abbildung (Einfluss der Spitzengeometrie) als auch zum Anwachsen kurzreichweitiger Wechselwirkungen wie der van-der-Waals-Kraft etc. zwischen Protrusion und Objekt (s. G&M, Kap. 1.1).

Ähnliche Varianten der extrazellulären Seite wurden bei dem Porin OmpF gemessen (Müller und Engel, 1999) und als pH- und potentialabhängige Offen- bzw. Geschlossenzustände des Kanals charakterisiert. Dabei stellt sich aber die Frage, ob der dort angenommene Kollaps der Loops in den Vorhof direkt potentialinduziert ist, oder ob es sich nicht letztlich, wie oben skizziert, zumindest teilweise um eine Folge der drastisch veränderten elektrostatischen Wechselwirkungen des Sensors mit dem Objekt handelt. Die „kollabierende Konformation“ bei OmpF könnte also zum Teil durch eine veränderte effektive Wechselwirkung Sensor-Protein verursacht sein, die aufgrund des drastisch variierten elektrostatischen Anteils entsteht, denn sie trat bei sehr niedrigem pH oder Erhöhung des Membranpotentials auf.

Ein Vergleich mit den Daten der OmpF-Studie erscheint andererseits insofern problematisch, als

die gemessenen Höhenänderungen bei ScrY bei weitem nicht so drastisch waren wie die bei OmpF gemessenen 7 Å. Allerdings wurden bei ScrY bisher nur die Auswirkungen vergleichsweise subtiler Variationen von Auflagekraft und pH untersucht. Hinzu kommt, dass bei ScrY zwei nahezu gleich exponierte, aber in ihrer Flexibilität deutlich unterschiedene Gruppen von externen Loops für den Kontrast verantwortlich sind und daher bei Verdrängung der flexibleren immer noch etwa dieselbe maximale Höhe gemessen wird, allerdings mit dem Unterschied, dass bei höherer Kraft der Sensor deutlich weiter in den Vorhof eindringt. Bei OmpF wird dagegen von einem potentialinduzierten generellen Kollaps aller peripheren Loops in das Vestibül ausgegangen. Es wurde allerdings gezeigt, dass sich experimentell bestimmte Topographiewerte bei großer Variation von pH und Ionenstärke erheblich unterscheiden können (Müller und Engel, 1997). Eine Stütze der Annahme eines potentialinduzierten Schließmechanismus bei OmpF ist jedoch das nachgewiesene Schließen (verzögerte Desorption, Müller und Engel, 1999) nach plötzlicher Einstellung eines starken Kationengradienten, also ohne Einwirkung der Sensorspitze. Der Nachweis einer direkten Korrelation des Schließens und des Kollaps' der externen Loops mit dem SFM ist aber aufgrund oben genannter Effekte zumindest problematisch, für den Schließmechanismus wurden im übrigen auch schon andere Strukturen in der Pore selbst diskutiert (ref. in Müller und Engel, 1999). Es wird außerdem noch die geringe Auflagekraft von 100 pN angeführt, die deutlich unter den für erzwungene Konformationsänderungen einzelner Loops bei Bacteriorhodopsin erforderlichen 200 pN (Müller et al., 1995) liege, während bei OmpF mehrere höhere Loops am peripheren Rand des Barrels (vgl. Cowan et al., 1992) zu verformen wären. Zum einen sieht man aber schon bei Vergleich der B-Faktoren der externen Loops von ScrY untereinander, dass hier erhebliche Unterschiede bestehen können (Abb. 45), zum anderen liefert die Auflagekraft nur einen Teil der effektiven Wechselwirkung (Müller et al., 1999).

Die als sehr flexibel anzunehmende Coiled-Coil-Struktur auf der *periplasmatischen Seite* des Trimers, die aus den N-Termini der ScrY-Monomere gebildet wird, führt nur bei sehr kleiner Auflagekraft zu einem Kontrast bei der kraftmikroskopischen Abbildung. Dabei zeigt sich eine deutliche, reproduzierbar richtungsabhängige Verformung. Für eine bessere Abschätzung der Abmessungen und der Flexibilität dieser Struktur wären größere kristallin geordnete Bereiche von Vorteil. Sowohl anhand von Rohdaten als auch im gemittelten Bild wären dann insbesondere auch die richtungsabhängigen Wechselwirkungen der N-terminalen Domäne mit der Sensorspitze klarer darstellbar. Kommt es bei höherer Auflagekraft zu einer Abbildung der starren periplasmatischen Seite des Barrel-Trimers, kann zumindest die Standardabweichungskarte aussagekräftige Informationen über den N-Terminus liefern (vgl. Müller et al., 1998), und zwar umso mehr, je besser die kristalline Ordnung der Trimere ist. Bei nur translationalem Alignment war in dieser Arbeit ein Minimum der SD-Karte im Zentrum des Trimers erkennbar. Der Fehler außerhalb davon ist wegen der nicht ganz einheitlichen azimuthalen Orientierung der Trimere aber wohl nicht allein dem

N-Terminus zuzuschreiben. Hier können erst gute Kristalle zuverlässigere Information bringen. Die Zugänglichkeit der periplasmatischen Seite war im Lauf dieser Untersuchungen noch ein Problem, da bei unidirektional gepackten Vesikeln die extrazelluläre Seite bevorzugt innen und damit bei einlagiger Adsorption oben lag. Mechanisch stabile zweilagig adsorbierte Vesikelfragmente bzw. stabile zweischichtige Kristalle wie bei OmpF (Schabert und Engel, 1994) waren unter dem SFM bei rekonstituiertem ScrY aber nicht zu beobachten. Möglicherweise bilden die extrazellulären Loops von ScrY keine entsprechenden Wechselwirkungen miteinander (Schabert et al., 1995). Bei amorph-bidirektionalen Fragmenten sind beide Seiten zwar gleichermaßen zugänglich, aber eben nicht in kristalliner Form, zudem ist hier wegen geringeren Kontrasts der periplasmatisch orientierten Trimere eine gezielte Partikelselektion für referenzfreies Alignment schwierig. Größere Bilayer mit rekonstituiertem Protein gleichmäßiger Qualität erleichtern die praktische Optimierung der Abbildungsbedingungen, insbesondere der Auflagekraft, während der Messung bzw. dem schrittweisen Übergang von der Übersichtsabbildung zur hochaufgelösten Messung. Dieser Prozess kann nämlich nicht gänzlich zerstörungsfrei erfolgen, so dass die Möglichkeit, auf unmittelbar benachbarte brauchbare Areale ausweichen zu können, von großem Vorteil ist. Eine unidirektionale Packung über größere Bereiche ermöglicht auch die Optimierung der Pufferbedingungen für die jeweilige Seite, der bisher verwendete Messpuffer schuf lediglich Kompromissbedingungen für die Abbildung beider Seiten. Die gemessenen Kraftdistanzkurven legen aber einen höheren Anteil langreichweitiger Wechselwirkungen auf der periplasmatischen Seite nahe, so dass hier noch eine bessere Abschirmung der Oberflächenladung erforderlich sein dürfte.

3.4.2 Rekonstitution

Ein bei der zweidimensionalen Rekonstitution von ScrY auffälliges Phänomen war die Tendenz zu bidirektionalem Einbau. Unter Umständen besteht hier ein Zusammenhang mit der Tendenz zur Bildung von Zwillingkristallen bei der 3D-Kristallisation (Forst et al., 1998). Die quasyndrische Form des Monomers bietet eine Erklärung für den Umstand, dass die Wechselwirkungen der Moleküle bei der Kristallisation nicht unbedingt zu einer bevorzugten Orientierung der Polarität der Trimer-Achsen zueinander führen. Immerhin können durch Variation des LPR die Protein-Protein-Wechselwirkungen so weit beeinflusst werden, dass der Anteil unidirektionaler Rekonstitution höher wird. Bidirektionale Rekonstitution zeigte in keinem Fall irgendwelche Tendenzen zu kristalliner Ordnung.

Daher und aufgrund der Erfordernisse aus der kraftmikroskopischen Untersuchung sollte eine weitere Optimierung der Rekonstitution von ScrY größere unidirektional gepackte Vesikelfragmente mit möglichst großen kristallin geordneten Bereichen zum Ziel haben. Unidirektional-kristalline Bereiche, durchaus beider Orientierungen in demselben Vesikel, waren am ehesten bei einem LPR

von 0,15 bis 0,2 und einem Verhältnis DMPC:POPC von 1:1 zu erhalten und konnten teils aufgrund knapper Messzeit noch nicht eingehend am SFM untersucht werden. Auf der Grundlage dieser bisher ermittelten optimalen Rekonstitutionsbedingungen sind weitere Parameter zu variieren: so können durch Erhöhung der absoluten Proteinkonzentration im Rekonstitutionsansatz unter Umständen größere Vesikel erzielt werden (Mitteilung L. Hasler). Die Geschwindigkeit der Entfernung des Detergenz sollte ebenfalls noch optimiert werden. Dies geschieht entweder durch Variation der Durchflussrate des Puffers in der Dialyseapparatur, hierzu müssten noch genauer einstellbare Pumpen verwendet werden, oder, bei Verwendung von Dialysebuttons, evtl. durch zusätzliche Maßnahmen: Beispielsweise kann die Dialysegeschwindigkeit durch Einsatz eines größeren Puffervolumens, das anfänglich Detergenzpuffer enthält und langsam mit Dialysepuffer unterschichtet (Rate varriieren) oder durch zusätzliches Rühren gemischt wird, variiert werden. Eine andere Möglichkeit ist Dialyse mit Buttons in einem größeren Volumen Dialysepuffer ganz ohne Durchfluss und Rührer. Man kann zwar davon ausgehen, dass die Dialysebedingungen in der Durchflussapparatur besser kontrollierbar und damit reproduzierbarer sind, Buttons haben jedoch den Vorteil, dass kein Unterdruck wie bei Durchflusszellen entsteht sowie nicht notwendigerweise ein maximaler Konzentrationsgradient des Detergenz über die Membran vorliegt. Damit kann der Übergangszeitraum, in dem gemischte Mizellen und Bilayer koexistieren (Dolder et al., 1996; Hasler et al, 1998), beliebig verlängert werden. Die gängige Vorstellung der noch wenig verstandenen Prozesse der Rekonstitution und zweidimensionalen Kristallisation besteht nämlich darin, dass die Schlüsselereignisse in diesem Übergangsbereich stattfinden: durch graduelle Absenkung der Detergenzkonzentration kommt es bei Erreichen eines Werts der Konzentration an freiem Detergenz nahe dessen kritischer Mizellenkonzentration zur Aggregation der gemischten Lipid-Detergenz- und Protein-Detergenz-Mizellen bzw. zu Protein-Lipid- und Protein-Protein-Wechselwirkungen. Bei passender Balance dieser Wechselwirkungen erfolgt der Einbau des Proteins in einen Lipid-Bilayer (Jap et al., 1992). Das LPR muss dabei so groß sein, dass amorphe Aggregation von Protein verhindert wird (der Lipid-Bilayer hält die Proteinmoleküle in einer Ebene), andererseits darf es nicht so groß sein, dass die für die Bildung von Kristallkontakten nötigen Protein-Protein-Wechselwirkungen unterbunden werden. Für letztere ist auch die Temperatur bedeutend, die sowohl die Stärke hydrophober Wechselwirkungen der Proteinmoleküle untereinander als auch deren zweidimensionale Diffusionsrate im Bilayer beeinflusst (Kühlbrandt, 1992). Zumindest eine Variation von T_{max} der Rekonstitution ist daher durchaus noch eine sinnvolle Möglichkeit, diese Vorgänge zu beeinflussen. Die Vorstellung hingegen, man könnte durch mehrphasige Temperaturprofile während der Rekonstitution und damit *mehrmaliges* Durchlaufen der Phasenumwandlung flüssig-quasikristallin die Proteine aus der quasikristallinen Phase des Lipids austreiben und so in Bereichen geringerer Lipidkonzentration in eine dichtgepackte und zunehmend kristalline Packung zwingen (Jap et al., 1992), hat sich eher nicht bestätigt (vgl. auch Engel und Hefti, zit. in Hasler et

al., 1998). Für eine bessere Beobachtung des Rekonstitutionsprozesses wären Probenentnahmen während des Experiments und deren Analyse am Elektronenmikroskop sinnvoll, hierzu müsste die verwendete Apparatur noch modifiziert werden. Ferner könnten noch andere divalente Ionen im Dialysepuffer getestet sowie der pH noch in weiteren Bereichen variiert werden (pH 5 bis pH 10), außerdem wäre auch der Einsatz anderer Detergenzien zu erwägen.

3.4.3 Bildverarbeitung

Automatische Partikelselektion und referenzfreies rotationales und translationales Alignment haben sich als erfolgreiche Methoden für eine erste Charakterisierung amorph oder nur ansatzweise geordnet rekonstituierter und am AFM abgebildeter ScrY-Trimere erwiesen (vgl. auch Seelert et al., 2000). Im vorliegenden Fall war dies für Vergleich bzw. Unterscheidung der unter denselben Bedingungen abgebildeten beiden Seiten des Proteins von Bedeutung. Insbesondere die Abbildung der periplasmatischen Seite war von ungünstigem Signal-Rausch-Verhältnis, womit für einen streng referenzgebundenen Algorithmus, auch bei Einschluss rotationalen Alignments, die Auswahl einer bestimmten Referenz problematisch gewesen wäre. Für die Partikelselektion wurden hier zwar überwiegend Korrelationsverfahren herangezogen (mindestens mit rotationalem Mittel eines Partikels als Referenz), das eigentliche Alignment der selektierten Rohdaten erfolgte aber referenzfrei.

Soweit bei guten Kristallen bereits translationale Korrelationsmittelung ein befriedigendes Ergebnis erbrachte, wurde dennoch auf die ansonsten übliche iterative Verfeinerung mit dem erhaltenen Mittel als jeweils neuer Referenz verzichtet (ebenso auf eine Symmetrisierung der Mittel; s. G&M Kap. 7.2.3.1). Die homogenen kristallinen Bereiche waren noch so klein, dass auch hier ein Vergleich mit dem iterativen referenzfreien (translational-rotationalen) Algorithmus vorgezogen wurde, um den Einfluss der subjektiven Auswahl einer Referenz zu überprüfen. Ein Nachteil dieses Algorithmus besteht zwar in dessen Abhängigkeit von der zufälligen ersten Approximation des Mittels. Ganz abgesehen davon, dass die in SPIDER implementierte Operation über zwei zufällige anfängliche Approximationen mittelt und daher verhältnismäßig robust ist, kann die Stabilität einer Lösung zusätzlich durch mehrere unabhängige Läufe überprüft werden. Diese können aufgrund der zufälligen anfänglichen Approximationen durchaus eine unterschiedliche Anzahl von Iterationsschritten bis zur erfolgreichen Beendigung der Prozedur erfordern (s. G&M Kap. 7.2.3.2). Die hier präsentierten Ergebnisse referenzfreien Alignments erwiesen sich nach dieser Prüfung alle als stabil.

Die für die laterale Auflösung nach translationaler Korrelationsmittelung der relativ kleinen Kristalle erreichten Werte (Abb. 46) lassen erwarten, dass mit größeren Datensätzen dieser Güte und ggf. mit Verfeinerung die übliche laterale Auflösung im Subnanometerbereich (vgl. z. B. Möller et

al., 1999; Müller et al., 1999) ohne Probleme zu erreichen sein dürfte. Dies gilt insbesondere bei Berücksichtigung der Tatsache, dass die meisten veröffentlichten Arbeiten etwa für die FRC das optimistischere Kriterium anwenden. Die Werte für die Standardabweichung als Maß der axialen Auflösung entsprechen bereits dem in der Literatur zu findenden Niveau. Bei höherem Anteil größerer kristalliner Fragmente sind künftig Messungen mit noch kleinerem Pixelabstand möglich, bei den bisherigen Aufnahmen war dieser Wert noch am oberen Rand dessen, was gewöhnlich als hochauflösend bezeichnet wird (zu kleine Arrays für Identifikation und „Hineinzoomen“). Verlust an Auflösung durch Interpolationen im Laufe des Alignments können dann besser kompensiert werden (Kap. G&M 7.2.4.2).

Bei größeren Datensätzen kann künftig die Analyse und Unterscheidung verschiedener Zustände eines Moleküls mit Hilfe der in SPIDER verfügbaren Funktionen multivariater statistischer Analyse und Klassifikation (Frank, 1996) automatisiert werden, insbesondere bei Abbildungen räumlich nicht so deutlich abgrenzbarer homogener Bezirke. Dies bezieht sich sowohl auf die verschiedenen Zustände der extrazellulären Loops als auch auf Abbildungen der periplasmatischen Seite mit mehr oder weniger ausgeprägtem Beitrag des N-Terminus zum Kontrast.

Für die Analyse von SFM-Daten wurde das Bildverarbeitungssystem SPIDER bisher in nur einer anderen dokumentierten Arbeit eingesetzt (Zuber und Barklis, 2000), nämlich zur Korrelationsmittelung von in SPIDER importierten TIFF-Bilddaten.

3.4.4 Ausblick

Für weiterführende Untersuchungen an diesem Protein mit kraftmikroskopischen Verfahren wäre vor allem ein Vergleich mit der Abbildung der Deletionsmutante von Interesse, der 70 Aminosäuren im Bereich des N-Terminus fehlen (Schülein et al., 1995). Diese stand während der experimentellen Phase dieser Arbeit nicht zur Verfügung. Außerdem könnte eine Variante ohne den N-Terminus auch in situ durch enzymatischen Verdau erzeugt und unmittelbar abgebildet werden (Scheuring et al., 1999). Die zur Optimierung des Messpuffers für die periplasmatische Seite ohnehin noch nötigen empirischen Tests könnten um eine explizite Bestimmung der Oberflächenladungsdichten beider Seiten des rekonstituierten Proteins (Butt, 1992) erweitert werden.

Eine Immobilisierung des mittlerweile rekombinant verfügbaren Coiled-Coil-Peptids (Dumas et al., 2000) auf den in Kapitel 2 beschriebenen Furanpolymer-Substraten und die Analyse der Abbildungen mit Hilfe von Einzelpartikelmittelungsverfahren kann detailliertere Informationen über dessen tatsächliche Abmessungen liefern.

Systematischere Untersuchungen bei Variation der Auflagekraft im Kontaktmodus müssen noch zur näheren Charakterisierung der Eigenschaften des N-Terminus und der Flexibilität der extra-

zellulären Loops vorgenommen werden. Messungen im oszillierenden Modus („Tapping Mode“) könnten bei Variation der Amplitudendämpfung ebenfalls einen Beitrag dazu bringen. Entsprechende Untersuchungen wurden an dem Porin P100 aus *Thermus thermophilus* gemacht, dessen N-Terminus allerdings viel größer ist als derjenige von ScrY (Kornelius Zeth, pers. Mitt.); es wurde dort ebenfalls je nach Amplitudendämpfung (und damit Energieeintrag) entweder die N-terminale flexible Struktur oder aber die Geometrie der Pore selbst abgebildet. Eine Erweiterung dieses Aspekts kraftabhängiger Verformung wären kraftspektroskopische Messungen (Rief et al., 1997) an der Coiled-Coil-Struktur, zum Beispiel zur Bestimmung der Stabilität derselben bzw. des gesamten Trimers, auch in Verbindung mit abbildender Messung (Müller, Baumeister, Engel, 1999; Oesterhelt et al., 2000).

Anhang

1 Abkürzungen

CCF	Kreuzkorrelationsfunktion
DMPC	Dimyristoyl-Phosphatidylcholin
DPR	Differenzieller Phasenunterschied
DLVO	Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek(-Theorie)
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
ECACC	European Collection of Animal Cell Cultures (Salisbury, GB)
FCS	Foetales Kälberserum
FFT	Fast Fourier Transform
FP	Furan-Polymer
FRC	Fourier-Ringkorrelationsfunktion
G&M	Kapitel „Grundlagen und Methoden“
LPR	Lipid-Protein-Massenverhältnis bei der Rekonstitution
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
P&E	Kapitel „Projekte und Ergebnisse“
POPC	Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholin
PVPHK	Polyvinylphenylketon
R_{rms}	Rauhigkeit $R_{rms} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_i (Z_i - \bar{Z})^2}$ (Standardabweichung, „root mean square“)
ScrY	Sucroseporin (Wildtyp)
SD-Karte	Standardabweichungs-Karte
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SFM	Scanning Force Microscopy, Rasterkraftmikroskopie
SPM	Scanning Probe Microscopy, Rastersondenmikroskopie
(S)SNR	(Spektrales) Signal-Rausch-Verhältnis
T_{trans}	Phasenübergangstemperatur (Lipide)
V-Karte	Varianz-Karte
x_p	Pixelgröße bei der Messung (Abstand der Messpunkte)

2 Skripte für SPIDER

2.1 Datenimport

;Diconv.sys: Conversion of AFM-data (Ascii, DI-Nanoscope) to SPIDER format

```

;Uli Weiland 10/2000
;convert images in ascii format to spider images
cp from ascii
?name of ascii image file?
N
?enter nsam, nrow?
1
_1
;mirror at x axis (ASCII mirrored)
mr
_1
_2
X
;scale AFM raw data in nm: converted binary * hardscale[V/LSB] * softscale[nm/V]
RR x33
?x33 - z scale in Volts (see image file header)?
RR x34
?x34 - sensitivity z scan in nm/V (corr. value E-Scanner calibrated June 2000: 7.653)?
ar
_2
_3
p1*(x33/65536)*x34
;subtract constant plane of image minimum value (to get positive file values):
fs x35,x36
_3
ar
_3
topobild
((p1-x36)*1.0)
RE

```

2.2 Automatische Partikelselektion

; b00.*: Automatic particle picking, (batch b66.aps/p_pick2, modified for AFM-images)

```

;(DI Nanoscope 4.3x,4.4x), data import incl., Uli Weiland 10/2000
;parameters :
; x91 - the number of the first particle, see p_picneu
; x39 - pixel size
; x44 - compression of the mic for peak search, see p_picneu
; x92 - window size of particles
; x27 - actual size of particles
; x51 - the number of the first micrograph file
; x52 - the number of the last micrograph file
; x67 - width of micrograph in pixels
; x68 - width of micrograph in pixels
; rawx55 - the scanned micrograph file
; outx55 - the SPIDER micrograph file
; ndcx55 - the output document file from peak search
; ser***** - the output serial files for automatically selected particles
; sndcx55 - the output document file contained upperleft corner coordinates for particles
; if pixel size different than ?,
; need to change x39, x92, and x27 only
; außerdem x33, x34, x52, x67, x68, (x44, x31), x55: mask radius,
; und threshold für at pk (<0.5 f. training part, <0.75 f. Normallauf)
md

```

```

set mp
2
x33=54.99916
;x33 - z scale in Volts (see image file header)
x34=7.653
;x34 - sensitivity z scan in nm/V(...)
x91=0
;x91 is the first particle number (= 0 or last picked before)
x51=1
; 1st mic
x52=1
; last mic
x39=8.96
; pixel size
x92=14
; window size for particles
x27=10
;actual size of particles
x67=512
;width of micrograph in pixels
x68=512
;height of micrograph in pixels
;
; DO NOT CHANGE BELOW (unless you have to)
x31= 0.035*(x39/8.96)
; low pass filter radius
;frequency=2*pixel size/filt.rad.=const: x31=0.075*(x39/5.34)
;approxim.(particle size/2)+1/interpolated x dimension
; or ((x92/2)+1)/x71 - corrected for better res.
x44=1
; compression of the mic for peak search, eher unnötig da Bilder klein!
x79=INT(x27/x44)
;x79 - actual size of a particle divided by x44=width of peaks
;for pixel size = 4.78, was 52/4
;act. for all mics the best value is 13 (52/4) (?)
; Range of CCC in center step.
x27=int(x27/x44)+1
x93 = 1
;x93: number of slices per image
do lb51 x55=x51,x52
;micrograph number x55
;convert images in ascii format to spider images
cp from ascii
raw{***x55}.dat
N
x67,x68
1
ou{***x55}
;mirror at x axis
mr
ou{***x55}
out{***x55}
X
;p_picneu:
x99=0
fi x23,x24
out{***x55}
(12,2)
x73=INT(x92/2)
x63=INT(x92/x44)+1
;window size/x44
;subtract constant plane of image minimum value (to get positive file values) and
;scale AFM raw data in nm: converted binary * hardscale[V/LSB] * softscale[nm/V] :
fs x35,x36
out{***x55}
ar
out{***x55}
_1

```

```

(p1-x36)*(x33/65536)*x34
;decimate by x44
;DC S
;_1
;_5
;x44,x44
CE
_1
_6
L
G
(30,30)
;_5 statt _1, falls decimate enabled!!
;de
;_5
fq np
_6
_4
(3)
x31
;filter radius ~ (particle size/2)+1/interpolated x dimension
at pk
_4
x79
(0.60)
x63,x63
ndc{***x55}
de
_4
;1/x44 of particle size and window size
;LB27
ud -1,x81
ndc{***x55}
ms
_6@
x92,x92,x93
x81
if(x81.eq.0) goto lb1
sd E
ndc{***x55}
do lb2 x77=1,x81
ud ic,x77,x21,x22
ndc{***x55}
x21=x21*x44-x73
x22=x22*x44-x73
;subtract half particle size
; selected particles are put in stack for alignment
wi
_1
_9
x92,x92
x21,x22
;window size is particle size
x99=x99+1
cp
_9
_6@{****x99}
lb2
;
do lb4 x41 = 1, x81
cp
_6@{****x41}
_2
x21=0
x22=0
do lb21 x81=1,100
sh
_2

```

```

_5
-x21,-x22
ro i
_5
_4
cc n
_5
_4
_3
pk x11,x12
_3
(1,0)
if(x11.ne.0.0) goto lb41
if(x12.eq.0.0) goto lb31
lb41
x21=x21+x11
x22=x22+x12
lb21
lb31
if(x21.gt.x27) then
x21=0
x22=0
endif
if(x22.gt.x27) then
x21=0
x22=0
endif
ud ic,x41, x48, x49
ndc{***x55}
x61 = x48*x44 - x73 + x21
x62 = x49*x44 - x73 + x22
sd x41, x61, x62
sndc{***x55}
wi
_1
_9
x92,x92
x61,x62
x91 = x91 +1
cp
_9
ser{*****x91}
lb4
de
_6
ud ice
ndc{***x55}
sd e
sndc{***x55}
cp
_1
topo{***x55}
;in nm scaliertes Bild abspeichern!
lb1
;delete spider files
;de
;out{***x55}
;de
;ou{***x55}
lb51
en d

```

2.3 Referenzfreies Alignment

;aliavg0: create continuous series of selected images (e.g. after manual screening of automatically preselected image series)

```
;Uli Weiland 10/2000
fr
?input file template:?

```

; aliavg1.sys: Apply reference-free alignment to the particles series (AP SR),

```
;no PCA, RF/RF SN without mask; Uli Weiland 10/2000 (SPIDER batch b06.aps mod.)
```

```
RR x91
? Number of images of continuous series to be included in alignment: ?
```

```
RR x20
? Expected size of the particle:?
```

```
RR x21
? Max radius for rotational alignment:?
```

```
; Prepare selection document file with particle numbers for AP SR
DOC CREATE
select
1
1-X91
```

```
ap sr
?template 2-D image file:?
select
x20
5,x21
*
apsr***
apdo***
```

```
; Find out how many apdo files were made and pick the last one.
DO LB12 I=1,9999
X71=X0
IQ FL,X11
apdo{***X71}
IF(X11.EQ.0.0) THEN
X71=X71-1
GOTO LB13
ENDIF
LB12
LB13
```

```
; Align all the particles according to the parameters from the
; document file produced by AP SR
do lb1 x90=1,X91
ud ic,x90,x41,x42,x43
apdo{***X71}
rt sq
```

```

<4>x90
rtsq{****x90}
x41
X42,X43
lb1

; Calculate global averages
AS R
rtsq****
select
A
avg001
var001

; SD-Map
ar
var001
sde001
SQR((p1*(x91-1.0))/X91)

; Calculate the resolution
AS R
rtsq****
select
O
avgodd
varodd
avgevn
varevn
RF
avgodd
avgevn
(1.0)
(0.2,2.0)
dres001

; pseudo mask for spectral signal to noise ratio
FI X41,X42
rtsq0001
12,2
BL
_2
X41,X42
N
1.0

;SSNR
RF SN
rtsq****
select
_2
(1.0)
ssnr001

RE

```

; aliavg2.sys: Apply reference-free alignment to the particles series (AP SR),

```

;AP SR with reference pattern to center averages, no PCA, RF without mask
;Uli Weiland 10/2000 (SPIDER batch b06.aps mod.)

```

```

RR x91
? Number of particles: ?

```

```

RR x20
? Expected size of the particle:?

```

```

RR x21
? Max radius for rotational alignment:?

; Prepare selection document file with particle numbers for AP SR
DOC CREATE
select
1
1-X91

ap sr
?template 2-D image file:?
select
x20
5,x21
?reference pattern to center the averages during iterations?
apsr***
apdo***

; Find out how many apdo files were made and pick the last one.
DO LB12 I=1,9999
X71=X0
IQ FL,X11
apdo{***X71}
IF(X11.EQ.0.0) THEN
X71=X71-1
GOTO LB13
ENDIF
LB12
LB13

; Align all the particles according to the parameters from the
; document file produced by AP SR
do lb1 x90=1,X91
ud ic,x90,x41,x42,x43
apdo{***X71}
rt sq
<4>x90
rtsq{***x90}
x41
X42,X43
lb1

; Calculate global averages
AS R
rtsq***
select
A
avg001
var001

; SD-Map
ar
var001
sde001
SQR((p1*(x91-1.0))/X91)

; Calculate the resolution
AS R
rtsq***
select
O
avgodd
varodd
avgevn
varevn
RF
avgodd

```

```

avgevn
(1.0)
(0.2,2.0)
dres001

; pseudo mask for spectral signal to noise ratio
FI X41,X42
rtsq0001
12,2
BL
_2
X41,X42
N
1.0

;SSNR
RF SN
rtsq****
select
_2
(1.0)
ssnr001

RE

```

2.4 Korrelationsmittelung

; corrav1.sys

```

; modified 10/2000 Uli Weiland (incl. pk dc/center of gravity calc., variable HP filter radius)
; CORAV1.CAV 3/3/93 updated 9/98,12/98; last update 1/26/99 av
; Compute CCF, Peak List and Peak Map
; Pad Raw Field and Reference
RR X20
?WORKING DIM (square, neednt be power of 2)?
X21=X20/2
FI
?RAW FIELD (DIM'S .LE. WORKING DIM)?
X10=X1/2
X11=X2/2
X12=X21-X10+1
X13=X21-X11+1
FI
?REFERENCE IMAGE?
X30=X1/2
X31=X2/2
X32=X21-X30+1
X33=X21-X31+1
PD
<3>
_2
X20,X20
B
X32,X33
PD
<2>
PIC999
X20,X20
B
X12,X13
; Make copy of padded raw file for use
; in CC operation. PIC999 to be used in WV later.
CP
PIC999
_3

```

```

; Cross Correlate
CC
_2
_3
?NAME OF CCF?
; restore HP filtration of CCF
fq np
<4>
?HP filtered ccf?
2
?HP filtration of CCF, filter radius:?
;
; Peak Search
RR X34
?MAX NO. PEAKS EXPECTED?
X35=1
X36=X12+X30+1
X37=X13+X31+1
pk dc
<5>
X34,X35
0,0
1
?ellipse axes x,y for cgr calculation:?
N
?nearest neighborhood exclusion:?
X36,X37
?NAME OF PEAK FILE?
;
; Make Point Maps
fs X91,X92
<5>
AR
<5>
?NAME OF CCF/PEAK MAP?
((P1-X92)*1.0)
PP L
<11>
<10>
1,2
4
1,1
0,0
?PEAK RANGE IN MAP (E.G. 1-500)?
BL
?NAME OF PLAIN PEAK MAP?
X20,X20
N
0.
pp 1
<13>
<10>
1,2
4
1,1
0,0
<12>
RE

```

; avgrfl.sys: Averaging (AS R) and resolution assessment

```

;(using aligned control windows from WV), RF/RF SN without mask
;Uli Weiland 10/2000

```

```

FR
?image series template:??<1>

```

```

RR x91
? Number of particles: ?

; Prepare selection document file with particle numbers for AP SR
DOC CREATE
select
1
1-X91

; Calculate global averages
AS R
<1>
select
A
avg001
var001

; SD-Map
ar
var001
sde001
SQR((p1*(x91-1.0))/X91)

; Calculate the resolution
AS R
<1>
select
O
avgodd
varodd
avgevn
varevn
RF
avgodd
avgevn
(1.0)
(0.2,2.0)
dres001

; pseudo mask for spectral signal to noise ratio
FI X41,X42
<1>x91
12,2
BL
_2
X41,X42
N
1.0

;SSNR
RF SN
<1>
select
_2
(1.0)
ssnr001

RE

```

2.5 Auflösung

; rmask.sys: Resolution assessment of aligned/averaged particle series

; RF/RF SN with smooth mask applied before (after @aliavg1, @avgrf1)

```
; Uli Weiland 11/2000

FR
?aligned image series template:?
```

```
RF
avmodd
avmevn
(1.0)
(0.2.2.0)
dres002

;pseudo mask for spectral signal to noise ratio

BL
_2
X41,X42
N
1.0

;mask image series
UD N x91
select
DO LB1 x46=1,x91
MA
<1>x46
mask{***x46}
x40
G
A
x43,x44
x45
LB1

;Calculate SSNR
RF SN
mask***
select
_2
(1.0)
ssnr002

RE
```

3 Material- und Chemikalienliste

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien und Chemikalien bzw. deren Bezugsquellen aufgeführt. Standard-Labormaterialien sind hier nicht enthalten; Standard-Chemikalien (Salze, Säuren, Laugen und Puffer der Qualität pro analysis) wurden, soweit sie hier nicht angegeben sind, von den Firmen Merck, Riedel-de Haen und Roth bezogen. Bezugsquellen und Hersteller von Geräten, Messapparaturen und deren Bestandteilen sind im Teil „Grundlagen und Methoden“ jeweils im Text angegeben. Lösungen und Puffer wurden mit zweifach destilliertem Wasser (ddH₂O) aus der laboreigenen Quarz-Destille (Aquatron, Bibby) hergestellt, mit Ausnahme der SFM-Messpuffer für hochauflösende Messungen, die mit hochreinem Wasser angesetzt wurden.

3.1 Verbrauchsmaterial

Deckgläschen	rund, Durchmesser 9 mm, Menzel
Deckgläser aus Kunststoff für Zellkultur	Thermanox, Miles
Dialysemembran	Spectra/Por MWCO 25000, Roth
Gewebekleber	Histoacryl blau, B. Braun Melsungen
Glimmer-Scheiben	F-20x20-1 (Dicke: 120 μm), R. Jahre GmbH (Wilhelmshafen)
Klebefilm	Tesafilm, Beiersdorf
Laborfilm	Parafilm, American National Can (Chicago)
Linsenpapier	Kodak
Netzchen für Elektronenmikroskopie	mit Formvar befilmt und mit Kohlenstoff bedampft (200-Mesh), Plano
Polyetheretherketon-Folie	(PEEK, teilkristallin) Lite TK, Lipp-Terler (Waidhofen, Österreich)
Pumpenschläuche (f. Peristaltik-Pumpen)	Abimed (Langenfeld)
Stahlplättchen (Präparatunterlagen)	passend zu den jeweiligen SFM-Scannern, Digital Instruments und TopoMetrix
Sterilfilter (für Medien und Puffer)	Nalgene und Millipore
Zweikomponentenkleber	Uhu Plus Schnellfest, Uhu (Bühl)

3.2 Chemikalien

(Qualität, soweit nichts anderes vermerkt ist: *pro analysi*.)

Brenzkatechin (1,2-Dihydroxybenzol)	99+ %, Aldrich
Collagen Typ I	Sigma-Klassifikation: Typ III, säurelöslich, aus Kalbs- haut, Sigma
Collagenase	Biochrom/Seromed (Berlin)
Dimyristoyl-L- α -Phosphatidylcholin (DMPC)	C14:0, $T_{trans} = 23$ °C, Sigma
Dispase	Boehringer (Mannheim)
DL-Äpfelsäure (α -Hydroxybernsteinsäure)	Merck (Darmstadt)
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)	Zellkulturmedium, Gibco
Ethanol	technisch, unvergällt, Chemikalienlager der Univer- sität Konstanz
Ethanol	hochrein (für Spektroskopie), Uvasol, Merck (Darm- stadt)
Foetales Kälberserum (FCS)	Gibco
Formalinlösung	37 %, Merck (Darmstadt)
D-Fructose	Serva
2,5-Furandimethanol	The Sigma-Aldrich Library of Rare Chemicals (Milwaukee)
2-Furanmethanol (Furfurylalkohol)	Aldrich
Genapol X80	Detergenz, Fluka
Glutaraldehydlösung	Grade I, 25 %, Sigma
Ham's F-12-Zellkulturmedium	Gibco
Harnstoff	Sigma
N-[2-Hydroxyethyl]-Piperazin-N'-[Ethansulfonsäure] (HEPES)	Sigma
Isopropyl- α -D-Thiogalactopyranosid	Sigma
Laminin	Gibco
Lauryldimethylaminoxid (LDAO)	Detergenz, Fluka
Leibovitz's L-15-Medium	Gibco

β -Morpholino-Ethansulfonsäure (MES)	Sigma
Methanol	für Spektroskopie, Uvasol, Merck (Darmstadt)
Methylzellulose	Sigma
Na ₂ EDTA	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
n-Octyl- β -D-glucopyranosid (β -OG)	Calbiochem
β -Palmitoyl- γ -Oleoyl-L- α -Phosphatidylcholin	(POPC) C16:0/C18:1, $T_{trans} = -2$ °C, Sigma
1,3-Phenylendiamin	Aldrich
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	(pH 7,4 / 1 mM KH ₂ PO ₄ / 3 mM Na ₂ HPO ₄ / 155 mM NaCl) Gibco
Poly-L-Lysin	Sigma
Polystyrol	Pellets, Aldrich
Polyvinylphenylketon (PVPK)	Pellets, Aldrich
Spülmittel	M 14, Martin & Co. (Freiburg)
Toluolsulfonsäure	Baker (Deventer, Holland)
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan	research grade, ICN
Tris/HCl	ultra pur, Serva
Wasser	hochrein, A.C.S.-Reagenz, Aldrich

Literaturverzeichnis

- Abraham, F. F. and I. P. Batra. 1989. Theoretical interpretation of atomic force microscope images of graphite. *Surf. Sci.* 209: L125-L132.
- Apell, H. J., J. Colchero, A. Linder, O. Marti, and J. Mlynek. 1992. Na, K-ATPase in crystalline form investigated by scanning force microscopy. *Ultramicroscopy* 42-44 (Pt B): 1133-1140.
- Apell, H. J., J. Colchero, A. Linder, and O. Marti. 1993. Investigation of the Na, K-ATPase by SFM. In *STM and SFM in Biology*. M. Amrein and O. Marti, editors. Academic Press, San Diego. 275-308.
- Aumailley, M. and B. Gayraud. 1998. Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J. Mol. Med.* 76: 253-265.
- Bastmeyer, M., M. Beckmann, S. M. Nona, J. R. Cronly-Dillon, and C. A. Stuermer. 1989. Identification of astrocyte- and oligodendrocyte-like cells of goldfish optic nerves in culture. *Neurosci. Lett.* 101: 127-132.
- Bastmeyer, M., M. Beckmann, M. E. Schwab, and C. A. Stuermer. 1991. Growth of regenerating goldfish axons is inhibited by rat oligodendrocytes and CNS myelin but not by goldfish optic nerve tract oligodendrocytelike cells and fish CNS myelin. *J. Neurosci.* 11: 626-640.
- Bastmeyer, M., G. Jeserich, and C. A. Stuermer. 1994. Similarities and differences between fish oligodendrocytes and Schwann cells in vitro. *Glia* 11: 300-314.
- Beck, K., I. Hunter, and J. Engel. 1990. Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J.* 4: 148-160.
- Behm, R. J., N. Garcia, H. Rohrer, editors. 1990. *Proc. NATO Meeting "Basic concepts and applications of the STM and related techniques"*, Eric, 1989. Kluwer Academic, London.
- Benoit, M., T. Holstein, and H. E. Gaub. 1997. Lateral forces in AFM imaging and immobilization of cells and organelles. *Eur. Biophys. J.* 26: 283-290.
- Binnig, G., C. F. Quate, and C. Gerber. 1986. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* 56: 930-933.
- Binnig, G., Ch. Gerber, E. Stoll, T. R. Albrecht, and C. F. Quate. 1987. Atomic resolution with the atomic force microscope. *Europhys. Lett.* 3: 1281-1286.
- Braet, F., C. Seynaeve, R. De Zanger, and E. Wisse. 1998. Imaging surface and submembrane structures with the atomic force microscope: a study on living cancer cells, fibroblasts and macrophages. *J. Microsc.* 190: 328-338.
- Buerger, M. J. 1977. *Kristallographie*. Walter de Gruyter, Berlin.
- Butt, H. -J., K. H. Downing, and P. K. Hansma. 1990. Imaging the membrane protein bacteriorhodopsin with the atomic force microscope. *Biophys. J.* 58: 1473-1480.
- Butt, H. -J. 1991a. Electrostatic interaction in atomic force microscopy. *Biophysical Journal* 60: 777-785.

- Butt, H. -J. 1991b. Measuring electrostatic, van der Waals, and hydration forces in electrolyte solutions with an atomic force microscope. *Biophysical Journal* 60: 1438-1444.
- Butt, H. -J. 1992. Measuring local surface charge densities in electrolyte solutions with a scanning force microscope. *Biophys. J.* 63: 578-582.
- Butt, H. -J., P. Siedle, K. Seifert, K. Fendler, T. Seeger, E. Bamberg, A. L. Weisenhorn, K. Goldie, and A. Engel. 1993. Scan speed limit in atomic force microscopy. *J. Microscopy* 169: 75-84.
- Butt, H. -J., M. Jaschke, and W. Ducker. 1995. Measuring surface forces in aqueous electrolyte solution with the atomic force microscope. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 38: 191-201.
- Butt, H. -J. and M. Jaschke. 1995. Calculation of thermal noise in atomic force microscopy. *Nanotechnology* 6: 1-7.
- Calof, A. L. and A. D. Lander. 1991. Relationship between neuronal migration and cell-substratum adhesion: laminin and merosin promote olfactory neuronal migration but are anti - adhesive. *J. Cell Biol.* 115: 779-794.
- Chen, C. H., D. O. Clegg, and H. G. Hansma. 1998. Structures of dynamic motion of Laminin-1 as observed by atomic force microscopy. *Biochemistry* 37: 8262-8267.
- Chen, C. H. and H. G. Hansma. 2000. Basement membrane macromolecules: insights from atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.* 131: 44-55.
- Chernoff, E. A. G. and D. A. Chernoff. 1992. Atomic force microscope images of collagen fibers. *J. Vac. Sci. Technol. A* 10: 596-599.
- Colchero, J. 1993. *Reibungskraftmikroskopie*. Hartung-Gorre Verlag, Konstanz.
- Colton, R., A. Engel, J. E. Frommer, H. Gaub, A. A. Gewirth, R. Guckenberger, J. Rabe, W. Heckl, B. Parkinson, editors. 1998. *Procedures in scanning probe microscopies*. John Wiley & Sons, Chichester.
- Cowan, S. W., T. Schirmer, G. Rummel, M. Steiert, R. Ghosh, R. A. Pauptit, J. N. Jansonius, and J. P. Rosenbusch. 1992. Crystal structures explain functional properties of two E. coli porins. *Nature* 358: 727-733.
- Creighton, T. E. 1983. *Proteins - Structures and Molecular Principles*. W. H. Freeman and Co., New York.
- Daly, W. H. 1987. *Vinyl ketone polymers*. John Wiley & Sons, New York. 548-67.
- Derjaguin, B. V. and L. Landau. 1941. *Acta Physicochim. URSS* 14: 633.
- Dillon, W. R. and M. Goldstein. 1984. *Multivariate Analysis - Methods and Applications*. John Wiley & Sons, New York.
- Dolder, M., A. Engel, and M. Zulauf. 1996. The micelle to vesicle transition of lipids and detergents in the presence of a membrane protein: towards a rationale for 2D crystallization. *FEBS Lett.* 382: 203-208.
- Domke, J., W. J. Parak, M. George, H. E. Gaub, and M. Radmacher. 1999. Mapping the mechanical pulse of single cardiomyocytes with the atomic force microscope. *Eur. Biophys. J.* 28: 179-186.

- Dongmo, L. S., J. S. Villarrubia, S. N. Jones, T. B. Renegar, M. T. Postek, and J. F. Song. 2000. Experimental test of blind tip reconstruction for scanning probe microscopy. *Ultramicroscopy* 85: 141-153.
- Dumas, F., S. Frank, R. Koebnik, E. Maillet, A. Lustig, and P. Van Gelder. 2000. Extended sugar slide function for the periplasmic coiled coil domain of ScrY. *J. Mol. Biol.* 300: 687-695.
- Dunlap, D., A. Cattelino, I. de Curtis, and F. Valtorta. 1996. Cytoplasmic topography of focal contacts. *FEBS Letters* 382: 65-72.
- Engel, A. 1991. Biological applications of scanning probe microscopes. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 20: 79-108.
- Engel, A., C. -A. Schoenenberger, and D. J. Müller. 1997. High resolution imaging of native biological sample surfaces using scanning probe microscopy. *Current Opinion in Structural Biology* 7: 279-284.
- Engel, A., C. -A. Schoenenberger, and D. J. Müller. 1997. High resolution imaging of native biological sample surfaces using scanning probe microscopy. *Current Opinion in Structural Biology* 7: 279-284.
- Florin, E. L., V. T. Moy, and H. E. Gaub. 1994. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science* 264: 415-417.
- Forst, D., K. Schulein, T. Wacker, K. Diederichs, W. Kreutz, R. Benz, and W. Welte. 1993. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of ScrY, a specific bacterial outer membrane porin. *J. Mol. Biol.* 229: 258-262.
- Forst, D., W. Welte, T. Wacker, and K. Diederichs. 1998. Structure of the sucrose-specific porin ScrY from *Salmonella typhimurium* and its complex with sucrose. *Nat. Struct. Biol.* 5: 37-46.
- Frank, J. and W. Goldfarb. 1980. Methods for averaging of single molecules and lattice fragments. In *Electron Microscopy at Molecular Dimensions*. W. Baumeister and W. Vogell, editors. Springer, Berlin. 261.
- Frank, J. and T. Wagenknecht. 1984. Automatic selection of molecular images from electron micrographs. *Ultramicroscopy* 12: 169-176.
- Frank, J., M. Radermacher, P. Penczek, J. Zhu, Y. Li, M. Ladjadj, and A. Leith. 1996. SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *J. Struct. Biol.* 116: 190-199.
- Frank, J. 1996. *Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies*. Academic Press, San Diego.
- Gallop, P. M., S. Seifter, and E. Meilman. 1957. The solubility and properties of a purified ichthyocol in salt solutions of neutral pH. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 3: 545-557.
- Gallop, P. M. and S. Seifter. 1963. Preparation and properties of soluble collagens. *Meth. Enzymol.* VI: 635-641.
- Gandini, A. 1987. *Furan Polymers*. John Wiley & Sons, New York. 454-73.

- Giebel, K., C. Bechinger, S. Herminghaus, M. Riedel, P. Leiderer, U. Weiland, and M. Bastmeyer. 1999. Imaging of cell/substrate contacts of living cells with surface plasmon resonance microscopy. *Biophys. J.* 76: 509-516.
- Giessibl, F. J., S. Hembacher, H. Bielefeldt, and J. Mannhart. 2000. Subatomic Features on the Silicon (111)-(7x7) Surface Observed by Atomic Force Microscopy. *Science* 289: 422-426.
- Gould, S. A. C., K. Burke, and P. K. Hansma. 1989. Simple theory for the atomic force microscope with a comparison of theoretical and experimental images of graphite. *Phys. Rev. B* 40: 5366.
- Han, W., J. Mou, J. Sheng, J. Yang, and Z. Shao. 1995. Cryo atomic force microscopy: a new approach for biological imaging at high resolution. *Biochemistry* 34: 8215-8220.
- Hansma, P. K., J. P. Cleveland, M. Radmacher, D. A. Walters, P. E. Hillner, M. Bezanilla, M. Fritz, D. Vie, H. G. Hansma, C. B. Prater, J. Massie, L. Fukunaga, J. Gurley, and V. Ellings. 1994. Tapping mode atomic force microscopy in liquids. *Appl. Phys. Lett.* 64: 1738-1740.
- Hardesty, C., C. Ferran, and J. M. DiRienzo. 1991. Plasmid-mediated sucrose metabolism in *Escherichia coli*: characterization of *scrY*, the structural gene for a phosphoenolpyruvate- dependent sucrose phosphotransferase system outer membrane porin. *J. Bacteriol.* 173: 449-456.
- Harlow, E. and D. Lane. 1988. *Antibodies: a laboratory manual.* Cold Spring Harbour Laboratory.
- Hasler, L., J. B. Heymann, A. Engel, J. Kistler, and T. Walz. 1998. 2D crystallization of membrane proteins: rationales and examples. *J. Struct. Biol.* 121: 162-171.
- Hayat, M. A. 1981. *Fixation for electron microscopy.* Academic Press, New York.
- Haydon, P. G., R. Lartius, V. Parpura, and S. P. Marchese-Ragona. 1996. Membrane deformation of living glial cells using atomic force microscopy. *Journal of Microscopy* 182: 114-120.
- Hecht, E. 1999. *Optik.* R. Oldenbourg, München.
- Henderson, E., P. G. Haydon, and D. S. Sakagushi. 1992. Actin filament dynamics in living glial cells imaged by atomic force microscopy. *Science* 257: 1944-1946.
- Hinterdorfer, P., W. Baumgartner, H. J. Gruber, K. Schilcher, and H. Schindler. 1996. Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 3477-3481.
- Hoh, J. H. and C. -A. Schoenenberger. 1994. Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy. *Journal of Cell Science* 107: 1105-1114.
- Israelachvili, J. N. 1992. *Intermolecular and surface forces.* Academic Press, Ltd., London.
- Jap., B. K., M. Zulauf, T. Scheybani, A. Hefti, W. Baumeister, U. Aebi, and A. Engel. 1992. 2D crystallization: from art to science. *Ultramicroscopy* 46: 45-84.
- Karrasch, S., R. Hegerl, J. H. Hoh, W. Baumeister, and A. Engel. 1994. Atomic force microscopy produces faithful high-resolution images of protein surfaces in an aqueous environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 836-838.

- Kasas, S., N. H. Thomson, B. L. Smith, H. G. Hansma, X. Zhu, M. Guthold, C. Bustamante, E. T. Kool, M. Kashlev, and P. K. Hansma. 1997. Escherichia coli RNA polymerase activity observed using atomic force microscopy. *Biochem.* 36: 461-468.
- Kühlbrandt, W. 1992. Two-dimensional crystallization of membrane proteins. *Quart. Rev. Biophys.* 25: 1-49.
- Lata, K. R., P. Penczek, and J. Frank. 1995. Automatic particle picking from electron micrographs. *Ultra-microscopy* 58: 381-391.
- Lieth, R. M. A., editor. 1977. Preparation and crystal growth of materials with layered structures. D. Reidel Publ. Company, Dordrecht.
- Lin, H., D. O. Clegg, and R. Lal. 1999. Imaging real-time proteolysis of single collagen I molecules with an atomic force microscope. *Biochemistry* 38: 9956-9963.
- Lin, X. Y., F. Creuzet, and H. Arribart. 1993. Atomic force microscopy for local characterization of surface acid-base properties. *J. Phys. Chem.* 97: 7272-7276.
- Linder, A. and H. -J. Apell. 1994. Scanning force microscopical studies of the Na, K-ATPase. In *The Sodium Pump, Structure Mechanism, Hormonal Control and its Role in Disease*. E. Bamberg and W. Schoner, editors. Steinkopff Verlag, Darmstadt. 346-9.
- Linder, A. 1995. Kraftmikroskopische Untersuchungen an der Na, K-ATPase. Hartung-Gorre Verlag, Konstanz.
- Linder, A., U. Weiland, and H. J. Apell. 1999. Novel polymer substrates for SFM investigations of living cells, biological membranes, and proteins. *J. Struct. Biol.* 126: 16-26.
- Lupas, A. 1996. Coiled coils: new structures and new functions. *TIBS* 21: 375-382.
- Marti, O., B. Drake, and P. K. Hansma. 1987. Atomic force microscopy of liquid-covered surfaces: atomic resolution images. *Appl. Phys. Lett.* 51: 484-486.
- Marti, O., M. Amrein, editors. 1993. *STM and SFM in Biology*. Academic Press, San Diego.
- McKillip, W. J. 1989. Chemistry of furan polymers. In *Adhesives from renewable resources*. R. W. Hemingway, A. H. Conner, and S. J. Branham, editors. American Chemical Society, Washington, DC.
- Michels, J. 1999. Struktur-Funktionscharakterisierung von Ionenkanal-Proteinen mit proteinchemischen, biophysikalischen und massenspektrometrischen Methoden. Dissertation Universität Konstanz.
- Mou, J., D. M. Czajkowsky, S. J. Sheng, R. Ho, and Z. Shao. 1996. High resolution surface structure of E. coli GroES oligomer by atomic force microscopy. *FEBS Lett.* 381: 161-164.
- Möller, C., M. Allen, V. Elings, A. Engel, and D. J. Müller. 1999. Tapping-mode atomic force microscopy produces faithful high-resolution images of protein surfaces. *Biophys. J.* 77: 1150-1158.
- Müller, D. J., F. A. Schabert, G. Büldt, and A. Engel. 1995. Imaging purple membranes in aqueous solutions at sub-nanometer resolution by atomic force microscopy. *Biophys. J.* 68: 1681-1686.

- Müller, D. J., G. Büldt, and A. Engel. 1996. Force-induced conformational change of Bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* 249: 239-243.
- Müller, D. J., W. Baumeister, and A. Engel. 1996. Conformational change of the hexagonally packed intermediate layer of *Deinococcus radiodurans* monitored by atomic force microscopy. *J. Bacteriol.* 178: 3025-3030.
- Müller, D. J. and A. Engel. 1997. The height of biomolecules measured with the atomic force microscope depends on electrostatic interactions. *Biophys. J.* 73: 1633-1644.
- Müller, D. J., M. Amrein, and A. Engel. 1997. Adsorption of biological molecules to a solid support for scanning probe microscopy. *J. Struct. Biol.* 119: 172-188.
- Müller, D. J., D. Fotiadis, and A. Engel. 1998. Mapping flexible protein domains at subnanometer resolution with the atomic force microscope. *FEBS Letters* 430: 105-111.
- Müller, D. J., W. Baumeister, and A. Engel. 1999. Controlled unzipping of a bacterial surface layer with atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96: 13170-13174.
- Müller, D. J. and A. Engel. 1999. Voltage and pH-induced channel closure of porin OmpF visualized by atomic force microscopy. *J. Mol. Biol.* 285: 1347-1351.
- Müller, D. J., D. Fotiadis, S. Scheuring, S. A. Müller, and A. Engel. 1999. Electrostatically balanced subnanometer imaging of biological specimens by atomic force microscope. *Biophys. J.* 76: 1101-1111.
- Oberleithner, H., G. Giebisch, and J. Geibel. 1993. Imaging the lamellipodium of migrating epithelial cells in vivo by atomic force microscopy. *Pflügers Arch* 425: 506-510.
- Oberleithner, H., A. Schwab, W. Wang, G. Giebisch, F. Hume, and J. Geibel. 1994. Living renal epithelial cells imaged by atomic force microscopy. *Nephron* 66: 8-13.
- Oesterhelt, F., D. Oesterhelt, M. Pfeiffer, A. Engel, H. E. Gaub, and D. J. Müller. 2000. Unfolding pathways of individual bacteriorhodopsins. *Science* 288: 143-146.
- Paige, M. F., J. K. Rainey, and M. C. Goh. 2001. A study of fibrous long spacing collagen ultrastructure and assembly by atomic force microscopy. *Micron.* 32: 341-353.
- Parpura, V., P. G. Haydon, and E. Henderson. 1993. Three-dimensional imaging of living neurons and glia with the atomic force microscope. *J. Cell Sci.* 104: 427-432.
- Penczek, P., M. Radermacher, and J. Frank. 1992. Three-dimensional reconstruction of single particles embedded in ice. *Ultramicroscopy* 40: 33-53.
- Putman, C. A. J., K. O. van der Werf, B. G. de Groot, N. F. van Hulst, and J. Greve. 1994. Viscoelasticity of living cells allows high resolution imaging by tapping mode atomic force microscopy. *Biophys. J.* 67: 1749-1753.
- Radmacher, M., M. Fritz, C. M. Kacher, J. P. Cleveland, and P. K. Hansma. 1996. Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope. *Biophys. J.* 70: 556-567.

- Rief, M., M. Gautel, F. Oesterhelt, J. M. Fernandez, and H. Gaub. 1997. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science* 276: 1109-1112.
- Rief, M., F. Oesterhelt, B. Heymann, and H. E. Gaub. 1997. Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by atomic force microscopy. *Science* 275: 1295-1297.
- Rief, M., H. Clausen-Schaumann, and H. E. Gaub. 1999. Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules. *Nat. Struct. Biol.* 6: 346-349.
- Rotsch, C., F. Braet, E. Wisse, and M. Radmacher. 1997. AFM imaging and elasticity measurements on living rat liver macrophages. *Cell Biology International* 21: 685-696.
- Rotsch, C., K. Jacobson, and M. Radmacher. 1999. Dimensional and mechanical dynamics of active and stable edges in motile fibroblasts investigated by using atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96: 921-926.
- Russ, J. C. 1999. *The Image Processing Handbook*. CRC Press, Boca Raton.
- Saxton, W. O. 1978. *Computer Techniques for Image Processing in Electron Microscopy*. Academic Press, New York.
- Saxton, W. O. and W. Baumeister. 1982. The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein. *J. Microsc.* 127 (Pt 2): 127-138.
- Schabert, F. A. and A. Engel. 1994. Reproducible acquisition of Escherichia coli porin surface topographs by atomic force microscopy. *Biophysical Journal* 67: 2394-2403.
- Schabert, F. A., C. Henn, and A. Engel. 1995. Native Escherichia coli OmpF porin surfaces probed by atomic force microscopy. *Science* 268: 92-94.
- Schabert, F. A. and J. P. Rabe. 1996. Vertical dimension of hydrated biological samples in tapping mode scanning force microscopy. *Biophys. J.* 70: 1514-1520.
- Scheuring, S., P. Ringler, M. Borgnia, H. Stahlberg, D. J. Müller, P. Agre, and A. Engel. 1999. High resolution AFM topographs of the Escherichia coli water channel aquaporin Z. *EMBO J.* 18: 4981-4987.
- Schindler, H., D. Badt, P. Hinterdorfer, F. Kienberger, A. Raab, S. Wielert-Badt, and V. P. Pastushenko. 2000. Optimal sensitivity for molecular recognition MAC-mode AFM. *Ultramicroscopy* 82: 227-235.
- Schirmer, T. 1998. General and specific porins from bacterial outer membranes General and specific porins from bacterial outer membranes. *J. Struct. Biol.* 121: 101-109.
- Schmid, K., R. Ebner, K. Jahreis, J. W. Lengeler, and F. Titgemeyer. 1991. A sugar-specific porin, ScrY, is involved in sucrose uptake in enteric bacteria. *Mol. Microbiol.* 5: 941-950.
- Schneider, S. W., K. C. Sritharan, J. P. Geibel, H. Oberleithner, and B. P. Jena. 1997. Surface dynamics in living acinar cells imaged by atomic force microscopy: Identification of plasma membrane structures involved in exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 316-321.

- Schneider, S. W., J. Larmer, R. M. Henderson, and H. Oberleithner. 1998. Molecular weights of individual proteins correlate with molecular volumes measured by atomic force microscopy. *Pflugers Arch.* 435: 362-367.
- Schneider, S. W., P. Pagel, C. Rotsch, T. Danker, H. Oberleithner, M. Radmacher, and A. Schwab. 2000. Volume dynamics in migrating epithelial cells measured with atomic force microscopy. *Pflugers Arch.* 439: 297-303.
- Schoenenberger, C. A. and J. H. Hoh. 1994. Slow cellular dynamics in MDCK and R5 cells monitored by time-lapse atomic force microscopy. *Biophysical Journal* 67: 929-936.
- Schulein, K., C. Andersen, and R. Benz. 1995. The deletion of 70 amino acids near the N-terminal end of the sucrose-specific porin ScrY causes its functional similarity to LamB in vivo and in vitro. *Mol. Microbiol.* 17: 757-767.
- Schütz, G. J., M. Sonnleitner, P. Hinterdorfer, and H. Schindler. 2000. Single molecule microscopy of biomembranes (review). *Mol. Membr. Biol.* 17: 17-29.
- Seelert, H., A. Poetsch, N. A. Dencher, A. Engel, H. Stahlberg, and D. J. Müller. 2000. Proton-powered turbine of a plant motor. *Nature* 405: 418-419.
- Shao, Z. and A. P. Somlyo. 1995. Stereo representation of atomic force micrographs: optimizing the view. *J. Microsc.* 180: 186-188.
- Shao, Z. 1999. Probing nanometer structures with atomic force microscopy. *News Physiol. Sci.* 14: 142-149.
- Sheng, S., D. M. Czajkowsky, and Z. Shao. 1999. AFM tips: how sharp are they? *J. Microsc.* 196 (Pt 1): 1-5.
- Shlyakhtenko, L. S., A. A. Gall, J. J. Weimer, D. D. Hawn, and Y. L. Lyubchenko. 1999. Atomic force microscopy imaging of DNA covalently immobilized on a functionalized mica substrate. *Biophys. J.* 77: 568-576.
- Spudich, A. and D. Braunstein. 1995. Large secretory structures at the cell surface imaged with scanning force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6976-6980.
- Stemmer, A. and A. Engel. 1990. Imaging biological macromolecules by STM: quantitative interpretation of topographs. *Ultramicroscopy* 34: 129-140.
- Timpl, R. 1996. Macromolecular organization of basement membranes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 618-624.
- Unser, M., B. L. Trus, and A. C. Steven. 1987. A new resolution criterion based on spectral signal-to-noise ratios. *Ultramicroscopy* 23: 39-51.
- Unser, M., B. L. Trus, J. Frank, and A. C. Steven. 1989. The spectral signal-to-noise ratio resolution criterion: computational efficiency and statistical precision. *Ultramicroscopy* 30: 429-433.
- Ushiki, T., J. Hitomi, S. Ogura, T. Umemoto, and M. Shigeno. 1996. Atomic force microscopy in histology and cytology. *Arch. Histol. Cytol.* 59: 421-431.

- Van Noort, S. J. T., K. O. van der Werf, B. G. de Grooth, N. F. van Hulst, and J. Greve. 1997. Height anomalies in tapping mode atomic force microscopy in air caused by adhesion. *Ultramicroscopy* 69: 117-127.
- Verwey, E. J. W. and J. T. G. Overbeek. 1948. *Theory of the stability of lyophobic colloids*. Elsevier Publishing Company, New York.
- Villarrubia, J. S. 1997. Algorithms for scanned probe microscope image simulation, surface reconstruction, and tip estimation. *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* 102: 425-454.
- Wagner, P., P. Kernen, M. Hegner, E. Ungewickell, and G. Semenza. 1994. Covalent anchoring of proteins onto gold-directed NHS-terminated self-assembled monolayers in aqueous buffers: SFM images of clathrin cages and triskelia. *FEBS Letters* 356: 267-271.
- Wagner, P., M. Hegner, P. Kernen, F. Zaugg, and G. Semenza. 1996. Covalent immobilization of native biomolecules onto Au(111) via N-Hydroxysuccinimide ester functionalized self-assembled monolayers for scanning probe microscopy. *Biophysical Journal* 70: 2052-2066.
- Wagner, P., S. Nock, J. A. Spudich, W. D. Volkmuth, S. Chu, R. L. Cicero, C. P. Wade, M. R. Linford, and E. D. Chidsey. 1997. Bioreactive self-assembled monolayers on hydrogen-passivated Si(111) as a new class of atomically flat substrates for biological scanning probe microscopy. *J. Struct. Biol.* 119: 189-201.
- Wagner, P. 1998. Immobilization strategies for biological scanning probe microscopy. *FEBS Lett.* 430: 112-115.
- Waite, J. H., T. J. Housley, and M. L. Tanzer. 1985. Peptide repeats in a mussel glue protein: theme and variations. *Biochemistry* 24: 5010-5014.
- Weiland, U., Linder, A., and Apell, H. -J. 1998. Development of polymer substrates for SFM investigations of living cells (Abstract). *Biophys. J.* 74, A187.
- Weisenhorn, A. L. and P. K. Hansma. 1989. Forces in atomic force microscopy in air and water. *Appl. Phys. Lett.* 54: 2651-2653.
- Weyn, B., W. Kalle, S. Kumar-Singh, E. van Marck, H. Tanke, and W. Jacob. 1998. Atomic force microscopy: influence of air drying and fixation on the morphology and viscoelasticity of cultured cells. *Journal of Microscopy* 189: 172-180.
- Zuber, G. and E. Barklis. 2000. Atomic force microscopy and electron microscopy analysis of retrovirus Gag proteins assembled in vitro on lipid bilayers. *Biophys. J.* 78: 373-384.

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen Betreuern. Achim Linder hat mich in die Geheimnisse und Tücken der Kraftmikroskopie eingeführt und mir die anfängliche Scheu, an teuren Instrumenten herumzuschrauben, nachhaltig ausgetrieben. Mit seinem Ideenreichtum hat er wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Bei meinem Doktorvater Hans-Jürgen Apell bedanke ich mich für die Aufnahme in seinem Labor, die jederzeit vorhandene Bereitschaft, unsere Laborausstattung zu optimieren und das große Verständnis für die Extravaganzen seiner Kraftmikroskopiker.

Glücklicherweise war es möglich, hochauflösende Messungen an einem Kraftmikroskop des Lehrstuhls von Prof. Leiderer (Fachbereich Physik) durchführen zu können. Besonders danken möchte ich Claudia Schäfle und Clemens Bechinger für die freundliche Aufnahme und Unterstützung, Michael Rauch für die Mithilfe bei der Optimierung des vibrationsgedämpften Versuchsaufbaus, Jörg Zimmermann für die zur Verfügung gestellten Übergangsmetallchalkogenide und Kalli Giebel für die Aluminium-Bedampfung von Deckgläsern.

Zellkulturen wurden im Labor von Prof. Claudia Stürmer mit Unterstützung von Ulrike Binkle hergestellt und gehalten. EPC-, CAR- und 3T3-Zellen wurden von Dirk Lang kultiviert und für die Ausplattierung auf Polymersubstraten zur Verfügung gestellt. Eine Präparation von Purpurchromophoren wurde freundlicherweise von der Gruppe Prof. Andreas Engel (Biozentrum, Universität Basel) zur Verfügung gestellt, eine IgM-Präparation von der Gruppe Prof. Ulrich Krawinkel.

Gabi Witz von der Arbeitsgruppe Prof. Welte danke ich für die Reinigung des Sucroseporins. Lorenz Hasler (Arbeitsgruppe Engel, Biozentrum der Universität Basel, jetzt Harvard Medical School, Boston) hat uns in die Kunst der Rekonstitution und zweidimensionalen Kristallisation von Membranproteinen eingeführt und mit vielen Tips und Diskussionen zum Gelingen der Rekonstitution von Sucroseporin beigetragen. Prof. Helmut Plattner und Claudia Braun danke ich für die Einführung in das Negativkontrastierungsverfahren sowie erste elektronenmikroskopische Aufnahmen, Christine Dittrich für die Betreuung am Elektronenmikroskop und die Entwicklung meiner Aufnahmen. Kay Diederichs, Eckhard Hofmann und Wolfram Welte danke ich für Abbildungen zur Struktur von Sucroseporin, Kornelius Zeth (MPI für Biochemie, Martinsried) für interessante Informationen zur SFM-Abbildung von Porin P100.

Allen Kolleginnen und Kollegen der Ebene M12 danke ich für die freundschaftliche Atmosphäre und vielfältige Diskussionen und Zerstreungen.

Dieses Projekt wurde zum Teil von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.