

Carl-Philipp Heisenberg und Daniel J. Müller

Beobachten und Ertasten zellulärer Maschinen

1 Einführung

Biologisch gesehen können Lebewesen als eine Ansammlung von Zellen aufgefasst werden. Zellen sind an ihre spezifischen Aufgaben angepasst und enthalten zum überwiegenden Teil nur wässrige Flüssigkeit, Desoxyribonucleinsäure (DNA), Proteine und Lipide. Würde man die DNA als den Bauplan der Zellen aller Lebewesen bezeichnen, so wären die Proteine die Arbeiter, welche hochspezifisch und -effizient ihre Aufgaben erledigen. Diese zellulären Maschinen sind beispielsweise dafür verantwortlich, dass transiente in speicherbare Energieformen umgewandelt, Signale übermittelt, zelluläre Strukturen auf- und abgebaut, Moleküle transportiert, Nahrungsmittel aufgenommen und verarbeitet sowie Verbrauchsmaterialien entsorgt werden. Aber wie erledigen diese zellulären Maschinen ihre Aufgaben? Wie funktionieren sie? Um diese Fragen zu beantworten, werden in unserer wissenschaftlichen Arbeitsgruppe bionanotechnologische Methoden entwickelt und angewandt, die es ermöglichen, diese nur wenige Nanometer großen Maschinen bei der Ausübung ihrer Funktionen zu beobachten. Gleichzeitig liefern diese Methoden auch Einblicke in die Arbeitsabläufe der Zelle. Beispielsweise können damit die molekularen Wechselwirkungsmechanismen nachgewiesen werden, welche die einzelnen Maschinen der Zelle steuern. Dadurch sind einzigartige Möglichkeiten für neue Wege gegeben, um die molekularen Schalter zellulärer Maschinen zu erkennen und zu betätigen, womit wiederum sehr präzise zelluläre Prozesse in Gang gesetzt und reguliert werden können. Erste Beispiele zeigen, wie diese bionanotechnologischen Methoden eingesetzt werden können, um die Wirkung pharmazeutischer Wirkstoffe zur Regulierung der Proteinfunk-

tion im molekularen Detail zu entschlüsseln. Hierdurch ergeben sich ungeahnte Perspektiven für die Entwicklung und Optimierung pharmazeutischer Wirkstoffe zur gezielten Steuerung zellulärer Funktionen.

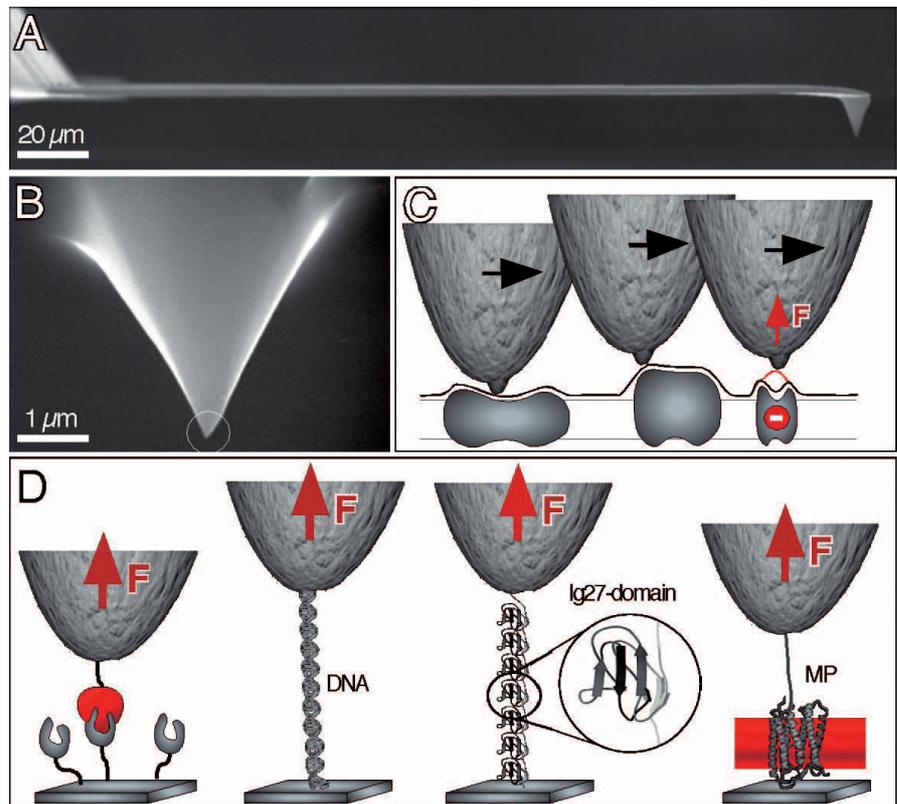
2 Die Rasterkraftmikroskopie – ein „molekulares Labor auf der Spitze“

Das Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscope/AFM) [2] besitzt ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis, welches allen konventionellen optischen Mikroskopen überlegen ist [3]. Die hohe räumliche Auflösung von bis zu 0,6 nm, die an biologischen Objekten in Pufferlösung bei Raumtemperatur erreicht werden kann, bietet die Möglichkeit, völlig neuen Fragestellungen in der Biologie und Medizin nachzugehen. So konnten bisher einzigartige Einsichten in die Struktur- und Funktionsbeziehungen von Zellen, Zellmembranen und Zellkompartimenten bis hin zur DNA und einzelnen Proteinen in der für ihre Funktion wichtigen natürlichen Umgebung erzielt werden. Das zentrale Element des AFM besteht aus einer äußerst sensiblen Feder (Bild 1a), an der eine molekular scharfe Spitze befestigt ist (Bild 1b). Über eine piezoelektrische Konstruktion kann diese Spitze im Subnanometerbereich präzise geführt werden, um ganze Zellen bis hin zu ihren einzelnen Molekülen gezielt zu manipulieren oder ihre biomolekularen Wechselwirkungen nachzuweisen (Bild 1) [5]. Dabei kann die AFM-Spitze (bio-) chemisch so modifiziert werden, dass sie völlig unterschiedliche Eigenschaften aufweist, die zur Vermessung molekularer Wechselwirkungen genutzt werden. Solche (bio-) chemischen Modifikationen ermöglichen es beispielsweise, ein einzelnes Protein gezielt mit der Spitze zu greifen und mit diesem Experimente durchzuführen. Zur Anwendung

Wie erledigen zelluläre Maschinen ihre Aufgaben? Wie funktionieren sie? Zur Beantwortung dieser Fragen werden in unserer wissenschaftlichen Arbeitsgruppe bionanotechnologische Methoden entwickelt, die es ermöglichen, diese nur wenige Nanometer großen Maschinen bei der Ausübung ihrer Arbeiten zu beobachten. Gleichzeitig detektieren diese Methoden molekulare Wechselwirkungsmechanismen, die die einzelnen Maschinen der Zelle steuern. Erste Beispiele zeigen den Einfluss pharmazeutischer Wirkstoffe zur Regulierung der Proteinfunktion im molekularen Detail. Hierdurch werden völlig neue Möglichkeiten geschaffen, um molekulare Schalter zellulärer Maschinen zu finden und zu betätigen.

How do cellular machines function to fulfil their specific tasks so efficiently? How are they regulated? We apply and develop bio-nanotechnological approaches to directly observe these nanoscale cellular machines while they are at work. At the same time, we can gain insights into the working schedule of a cell, and can detect molecular mechanisms which drive and direct single cellular machines. With this unique possibility to reveal the switching mechanisms of the cellular machines, we could apply these switches to purposefully direct and regulate cellular processes. First examples follow the actions of pharmacological compounds on the function of a cellular machine at molecular resolution, and provide hitherto unexpected perspectives to develop and optimise such compounds to precisely target the function of cellular processes.

Bild 1. Das AFM, ein „Labor auf der Spitze“. A) Die AFM-Spitze (B) ist an einer 20 bis 200 μm langen Blattfeder befestigt. C) Um beispielsweise zelluläre Maschinen abzubilden, wird diese Feder im Subnanometerbereich präzise über das Objekt geführt. Dies wird am linken und mittleren Beispiel veranschaulicht, wo die AFM-Spitze die Oberflächen der zellulären Maschinen (graue Objekte) nachzeichnet (schwarze Linie). Die rechte Spitze detektiert neben der Topographie auch elektrostatische Wechselwirkungen, welche zwischen der molekularen Maschine und der geladenen AFM-Spitze auftreten. Diese elektrostatische Wechselwirkung resultiert in einer örtlich aufgelösten abstoßenden Kraft (roter Pfeil). Wird nun die gleiche zelluläre Maschine mit (rote Linie) und ohne (schwarze Linie) elektrostatische Abstoßung aufgenommen, so ergibt die Differenz beider Topographien die reine elektrostatische Wechselwirkung. D) Das AFM kann auch eingesetzt werden, um molekulare Kräfte einzelner biologischer Moleküle und Maschinen nachzuweisen. Diese Anwendung wird oftmals „Einzelmolekülkraftspektroskopie“ genannt. Durch (bio-)chemische Modifikationen der AFM-Spitze werden zunächst einzelne biologische Moleküle angebunden, mit deren Hilfe zelluläre Maschinen gezielt manipuliert werden können. Im ersten Beispiel (links) werden Wechselwirkungskräfte zwischen zwei Proteinen gemessen. Die AFM-Feder, an welcher die Spitze befestigt ist, wird so lange gespannt, bis die entstandene Kraft genügend groß ist, um beide Moleküle voneinander zu trennen. Im zweiten Beispiel von links wird eine DNA gedehnt, um deren Elastizität zu messen. Im dritten Beispiel von links werden einzelne Proteine eines oligomeren Konstrukts (Ig27) einer äußeren Kraft ausgesetzt, bis sie entfalten. Im Beispiel rechts wird das Polypeptidende eines Membranproteins mit der Spitze gegriffen, um molekulare Kräfte der befestigten zellulären Maschine nachzuweisen.



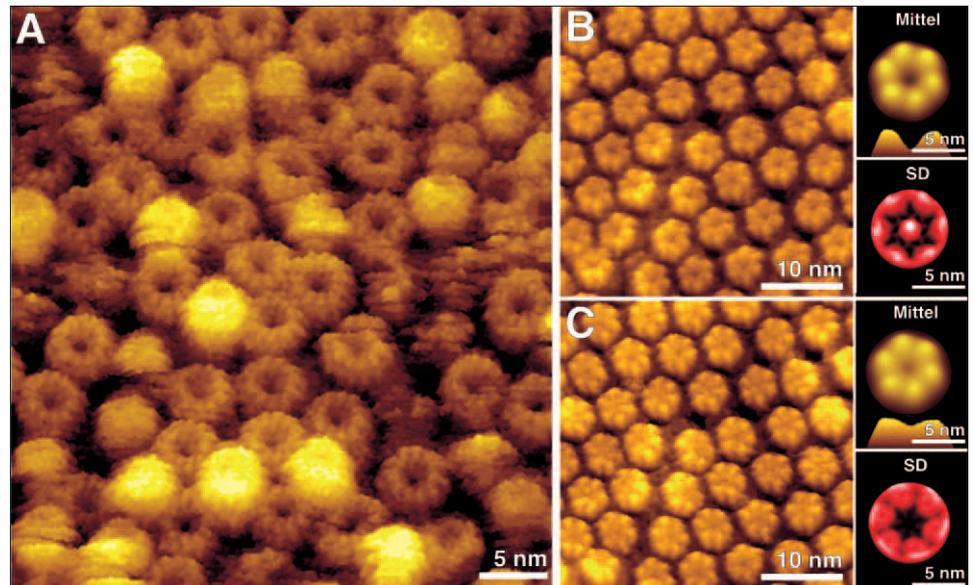
kommt diese Technik unter anderem bei der Vermessung molekularer Beiträge einzelner Proteine zur Zell-Zelladhäsion [1]. Andere Beispiele zeigen, dass es möglich ist, die Wechselwirkungen der molekularen Erkennung zwischen zwei einzelnen Molekülen nachzuweisen und zu charakterisieren (Bild 1d). Andere Weiterentwicklungen in der Rasterkraftmikroskopie ermöglichen den Nachweis funktionsrelevanter Wechselwirkungen, welche den funktionellen Zustand einer einzelnen zellulären Maschine bestimmen. Dadurch kann man herausfinden, welche molekularen Mechanismen betätigt werden müssen, um die Funktion der zellulären Maschine gezielt zu lenken [7]. Mehr als die Hälfte aller pharmakologischen Wirkstoffe haben das Ziel, solche funktionellen Zustände zellulärer Maschinen zu korrigieren und damit den Krankheitszustand eines Organismus zu beheben. Derzeit bewegt sich der weltweite pharmakologische Markt zur Lenkung zellulärer Maschinen pro Jahr im Bereich mehrerer hundert Milliarden Euro.

3 Hochauflösende Abbildung einzelner zellulärer Maschinen

Die hochauflösende Abbildung einzelner Proteine in ihrer natürlichen Umgebung mit dem AFM wurde seit der Einführung des Mikroskops vor beinahe 20 Jahren systematisch vorangetrieben [4]. Dabei wurde an einer eindrucksvollen Anzahl unterschiedlicher Membranproteine, d. h. zel-

lulärer Maschinen, die sich in der Zellmembran befinden, eine räumliche Auflösung von weniger als einem Nanometer erzielt [12]. Diese Erfolge lagen vor allem darin begründet, dass AFM-Präparationsmethoden und -Abbildungsbedingungen entwickelt und gezielt verbessert wurden, mit denen die Struktur und Funktionalität eines zellulären Objektes vollständig erhalten bleibt. Vergleiche zwischen den AFM-Abbildungen einzelner Membranproteine und ihrer dreidimensionalen Struktur zeigten, dass das AFM nicht nur die supramolekulare Anordnung unterschiedlicher Proteine zuverlässig abbilden kann, sondern auch die Stöchiometrie einzelner Maschinen der Zellmembran (Bild 2) [17]. Bei optimalen Abbildungsbedingungen können an einem einzelnen Protein selbst kleinste strukturelle Details, wie Poren und Kanäle, bis hin zu Oberflächenstrukturen, die durch nur wenige Aminosäuren gebildet sind, beobachtet werden [11]. Da das AFM die Beobachtung biologischer Systeme unter physiologisch relevanten Bedingungen ermöglicht, konnte durch die Etablierung der Hochoflösung auch Fragestellungen nach den Struktur-Funktionsbeziehungen individueller zellulärer Maschinen nachgegangen werden. So wurden mit dem AFM funktionell bedingte Konformationsänderungen direkt beobachtet, wie das reversible Öffnen und Schließen einzelner Poren einer bakteriellen Oberflächenschicht und eines diffusionsgetriebenen Kanals des Membranproteins OmpF Porin [4] sowie das reversible Schließen (Bild 2) einzelner Kommunikationskanäle („Gap Junctions“) der Leberzelle [10].

Bild 2. Beobachten der Struktur und Funktion molekularer Maschinen der Zellmembran. Die AFM-Aufnahmen wurden in wässriger Lösung durchgeführt, sodass die Membranproteine ihre Funktionalität beibehalten. A) Einzelne natriumgetriebene Rotoren der F-ATP-Synthase aus *I. tartaricus* aufgenommen in Puffer (300 mM KCl, 10 mM Tris, pH 7,8). B und C) Extrazelluläre Oberfläche der Kommunikationskanäle (Connexone) aus Epithelzellen der Rattenleber. B) Kommunikationskanäle aufgenommen in Abwesenheit divalenter Ionen. Der zentrale Kanal der hexameren Poren ist deutlich erkennbar. C) Unter Beigabe von 0,5 mM Kalzium schließen die Poren ihren Kanal. Das reversible Öffnen des zentralen Kanals konnte nach Entfernen des Kalziums aus der Pufferlösung beobachtet werden. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden in 1 mM phenyl methylsulfonylfluoride (PMSF), 0,5 mM CaCl₂ (für C) und 5 mM Tris bei Raumtemperatur erzielt. Insets in B und C stellen korrelationsgemittelte Bilder (Mittel) der unverarbeiteten Daten dar, welche perspektivisch dargestellt sind (5° Kippung). Die unteren Insets sind die entsprechenden Karten der Standardabweichungen (SD). Maxima der SD-Karten repräsentieren solche strukturellen Regionen des Proteins, welche eine erhöhte Flexibilität aufweisen.



4 Vermessung der molekularen Wechselwirkungen einzelner zellulärer Maschinen

Neben der Beobachtung einzelner zellulärer Maschinen kann das AFM auch die Wechselwirkungen der molekularen Kräfte zwischen und in diesen Proteinen messen. In diesem Betriebsmodus, der als Einzelmolekülkraftspektroskopie bezeichnet wird (Bild 3), konnte für Aquaporin-1, den menschlichen Wasserkanal, Bakteriorhodopsin, eine lichtgetriebene Protonenpumpe, Halorhodopsin, eine lichtgetriebene Chloridpumpe, Rhodopsin, das Sehpigment des Auges, sowie für einen Natrium-Proton-getriebenen Transporter gezeigt werden, dass deren Entfaltung nicht als spontaner, sondern als schrittweiser Prozess beschrieben werden kann [6, 13]. Dabei bilden die einzelnen Bausteine (Sekundärstrukturelemente) der Proteine Entfaltungsbarrieren (Bild 3a) und entfalten sich, sobald deren Stabilität von der extern applizierten Kraft des Kraftspektroskops überschritten wird. Die Genauigkeit der Einzelmolekülkraftspektroskopie ermöglicht es aber auch, weitere molekulare Wechselwirkungen innerhalb einer zellulären Maschine nachzuweisen und diese auf wenige Aminosäuren genau zu lokalisieren. Solche intramolekularen Wechselwirkungen können auf sehr unterschiedliche Mechanismen zurückzuführen sein und völlig verschiedene Auswirkungen auf die Funktion der zellulären Maschine haben. So konnte bisher gezeigt werden, wie physiologisch relevante Temperaturänderungen die Wechselwirkungen innerhalb eines Proteins verschieben oder wie Mutationen den funktionellen Zustand zellulärer Maschinen verändern. Erst kürzlich konnten wir zeigen, wie ein bestimmter Wirkstoff auf das Sehpigment des Auges (Rhodopsin) wirkt und damit dessen Destabilisierung verhindert, die wiederum zum Sehverlust des Auges und zur Degeneration des Sehapparates führt. Diese als *Retinitis Pigmentosa* bezeichnete Krankheit tritt immerhin bei etwa 0,1% der Bevölkerung auf. Dem entsprechen allein in Dresden etwa 500 Personen.

5 Beobachtung molekularer Mechanismen der Ligandenbindung und Proteinaktivierung

Ebenso können Einsichten in molekulare Wechselwirkungsmechanismen, die zur Aktivierung zellulärer Maschinen führen, gewonnen werden. Kürzlich wurde die Bindung eines Liganden (Aktivator) an eine zelluläre Maschine beobachtet, welche Protonen gegen Natriumionen tauscht (Bild 3b) [7]. Dabei wurde die Polypeptidregion der zellulären Maschine lokalisiert, an die der Ligand bindet, die Wechselwirkung zwischen Ligand und Polypeptid gemessen sowie die Wahrscheinlichkeit bestimmt, mit der der Ligand bindet (Bilder 3c und d). Neue technologische Entwicklungen der Kraftspektroskopie werden es in Kürze ermöglichen, die Bindungsstellen, Bindungsstärken, Energielandschaften und Bindungskonstanten pharmakologischer Wirkstoffe an einem pharmakologischen Target, also dem Protein, das während einer Medikation adressiert wird, zu bestimmen. Als ein wichtiger Schritt dahin konnte bereits beobachtet werden, wie ein Inhibitor an eine zelluläre Maschine bindet, den aktivierenden Wirkstoff (Ligand) verdrängt und dabei die Maschine an der Ausübung ihrer Arbeit hindert [9]. In naher Zukunft kann diese an der TU Dresden entwickelte Methode in der medizinischen und pharmakologischen Forschung eingesetzt werden, um die Funktion von Membranproteinen gezielt zu steuern [8].

6 Detektion fast beliebiger molekularer Wechselwirkungen im Protein

Durch die Einzelmolekülkraftspektroskopie können die Veränderungen der molekularen Wechselwirkungen zellulärer Maschinen in Abhängigkeit von nahezu beliebigen Umgebungsbedingungen erfasst werden. Diese Veränderungen können verbunden sein mit einer funktionellen Aktivierung bzw. Deaktivierung der Maschine, mit Konfor-

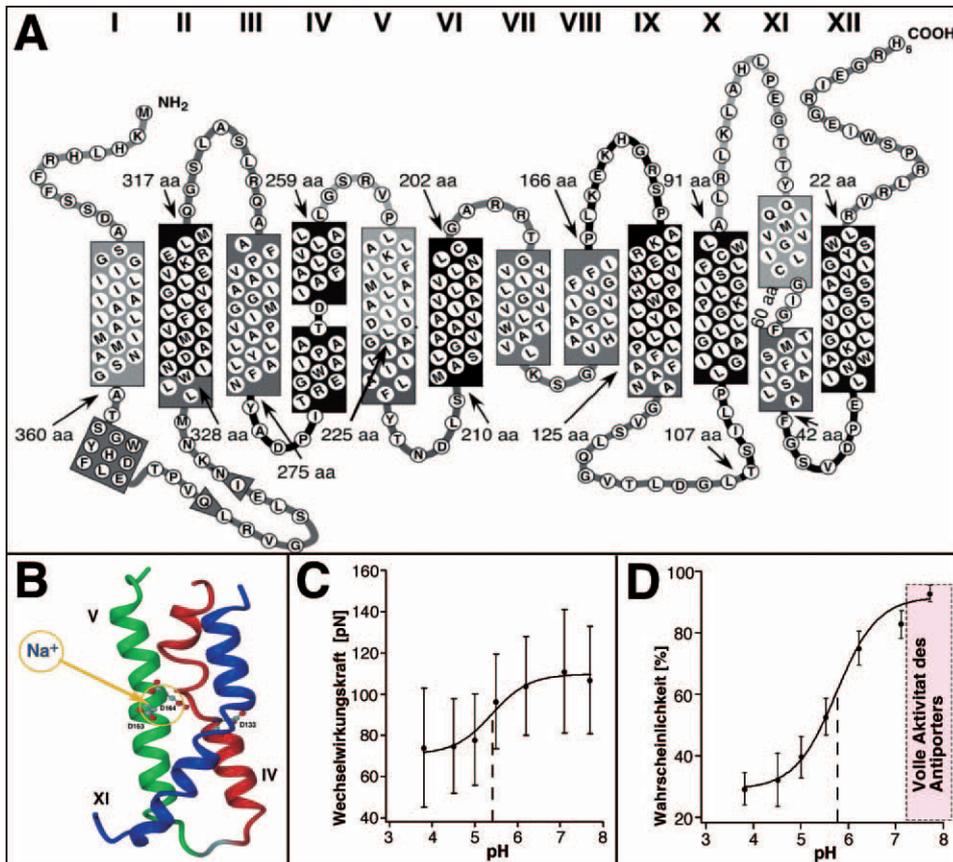


Bild 3. Detektieren der Aktivierung eines Natrium-Proton-getriebenen Antiporters durch einen Liganden. A) Sekundärstrukturmodell des Na⁺-H⁺-getriebenen Antiporters NhaA von *Escherichia coli*. Die Polypeptidkette faltet sich in zwölf alpha-helikale Strukturelemente in der zellulären Membran. Mittels der Einzelmolekülkraftspektroskopie wurden molekulare Wechselwirkungen des Antiporters nachgewiesen, wobei Regionen einheitlicher Wechselwirkungen in einheitlichen Graustufen dargestellt sind. Die eingetragenen Nummern kennzeichnen die Aminosäuren (aa), welche sich am Anfang bzw. Ende der Regionen molekularer Wechselwirkungen befinden. B) Modell der transmembranen alpha-Helix V. Aminosäuren der Natrium-Bindungsstelle (D163 und D164) wurden explizit dargestellt. Die durch ein einzelnes Natriumion verursachte Ligandenbindung erzeugt eine Wechselwirkungskraft. Mit steigendem pH steigt diese Kraft und erreicht eine Sättigung bei etwa pH 7 (C). D) Wahrscheinlichkeit, mit der ein Natriumion an den Antiporter bindet. Im Vergleich zur Wechselwirkungskraft (C) wird die Wahrscheinlichkeit (D) der Ligandenbindung bei einem etwas höheren pH-Wert von 7,5 gesättigt. Erst ab diesem Wert haben alle Antiporter ihre volle Aktivität entwickelt.

mationsänderungen, Temperaturänderungen, pH-Variationen, spezifischen Ionen, Wechselwirkungen zwischen mehreren zellulären Maschinen oder Punktmutationen. Aufgrund dieser vielfältigen Möglichkeiten stellt die Rasterkraftspektroskopie eine einzigartige Methode dar, die Destabilisierung einzelner Regionen einer zellulären Maschine unter pathologischen Bedingungen detailliert zu beobachten und zu untersuchen, welche zur Fehlfunktion der Maschine führen. Diese Fehlfunktionen zellulärer Maschinen bilden die molekularen Ursachen zahlreicher heute bekannter Krankheiten.

7 Charakterisierung zellulärer Wechselwirkungen mit molekularer Auflösung

Die auf dem AFM basierende Kraftspektroskopie kann ebenfalls eingesetzt werden, um molekulare Adhäsionsmechanismen lebender Zellen zu charakterisieren [15]. Dazu wird eine Zelle mit der AFM-Feder aufgegriffen und an eine andere Zelle (oder Gewebe) angenähert. Nach einer wählbaren Wechselwirkungszeit wird die Zelle wieder entfernt und die Wechselwirkungskräfte werden gemessen. Die Methode ist dabei sensibel genug, um sowohl die Gesamtkraft der Zelladhäsion als auch die Beiträge einzelner Adhäsionsmoleküle festzustellen. Da man die Umgebungsbedingungen des Experiments flexibel gestalten kann, können mit dieser Methode in Zukunft zahlreiche zellbiologische und medizinische Fragestellungen der Wechselwirkungsmechanismen von Zellen beantwortet werden.

Die Zelladhäsion multizellulärer Organismen kann in zwei Hauptkategorien unterteilt werden: erstens in die Zell-

Zelladhäsion und zweitens in die Adhäsion von Zellen an Komponenten der extrazellulären Matrix. Ein solches Beispiel für den Nachweis molekularer Wechselwirkungskräfte der Keimblatt-Zellen von Zebrafischen mit einer mit Proteinen (Fibronectin) bedeckten Oberfläche ist in Bild 4 gezeigt [16]. Während der Entwicklung der Zelle übernimmt die Zelladhäsion eine tragende Rolle in der Formierung des mesodermalen Keimblatts, wobei zelluläre Maschinen wie Integrine, Fibronectin und signalgebende Proteine für diesen Adhäsionsprozess verantwortlich sind. So konnten die Beiträge eines wichtigen *wnt11*-Gens zur Zelladhäsion charakterisiert werden, indem die Adhäsion der normalen Zellen mit Zellen verglichen wurde, in denen das *wnt11*-Gen mutiert und damit inaktiviert ist [19]. Dieses Beispiel zeigt, dass die Kraftspektroskopie angewandt werden kann, um den Beitrag einzelner Moleküle der Zelloberfläche zur Zelladhäsion in Abhängigkeit genetischer Defekte zu beschreiben.

8 Kombinierte Rasterkraft- und Lichtmikroskopie an Zellen

Ein Vergleich der AFM-Abbildungen von Zelloberflächen gesunder Melanozyten mit den von einem Tumor isolierten Krebszellen (Melanom-Zellen) zeigt, dass ausschließlich auf den Melanom-Zellen stark korrigierte, flexible Oberflächenstrukturen zu finden sind. Durch die gleichzeitige Kombination von AFM und hochauflösender Lichtmikroskopie konnte außerdem gezeigt werden, dass diese flexiblen Strukturen das strukturgebende Protein Aktin enthalten. Das Zelladhäsionsmolekül beta1-Integrin konnte ebenfalls in

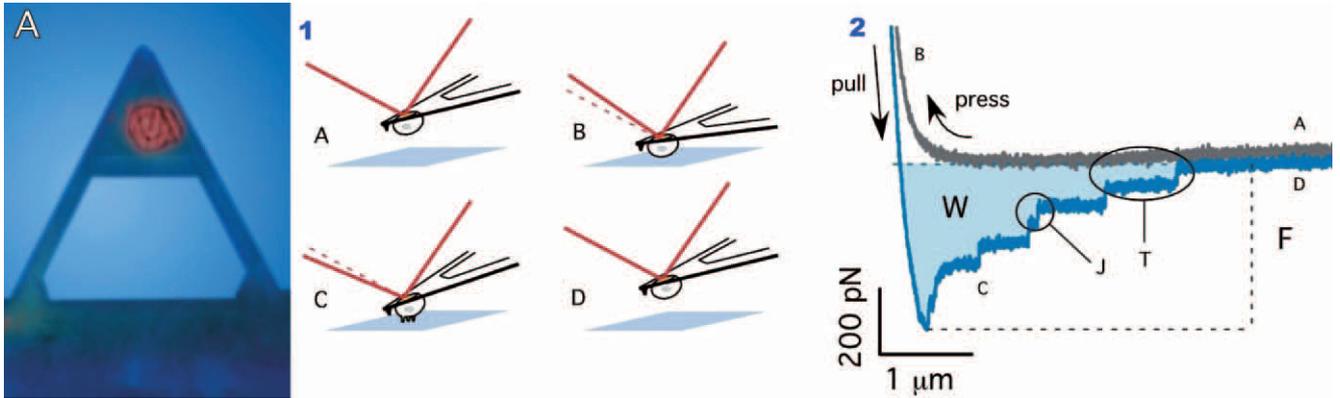


Bild 4. Vermessung molekularer Wechselwirkungskräfte zwischen mesodermalen Zebrafischzellen und Fibronectin-beschichteten Oberflächen. Eine Zebrafischzelle wird an eine Concanavalin-A-beschichtete AFM-Feder geheftet (A und 1A). Diese hochempfindliche Feder besitzt eine Länge von $\approx 200 \mu\text{m}$ und eine Dicke von $\approx 500 \mu\text{m}$. 1) Schematische Darstellung der experimentellen Anordnung und ein mit dieser Anordnung aufgenommenes Kraftspektrum (2), welches molekulare Adhäsionskräfte der Zelle registriert. 1A) Nach dem Anheften an die AFM-Feder wird die Zelle so lange in die Richtung der Fibronectin-beschichteten Oberfläche bewegt (2A), bis beide Oberflächen in Kontakt treten (1B und 2B). Die Zelle wird mit einer Kraft von $\approx 400 \text{ pN}$ auf die Fibronectin-Oberfläche gedrückt (1B und 2B). Nach einem gewissen Zeitraum (0,1 s – 100 s) formt die Zelle erste Wechselwirkungen mit der Oberfläche. Danach wird die AFM-Feder (1C) von der Oberfläche entfernt, um Dissoziationskräfte aufzuzeichnen (2C). Die resultierende Kraftkurve zeigt neben einer anfänglichen maximalen Dissoziationskraft (F) auch diskrete Sprünge auf, von denen einige durch das lokale Ausstülpfen der Zellmembran unmittelbar vor dem Verlust der Rezeptor-Liganden-Bindung verursacht werden (T). Andere Sprünge entstehen durch Auflösen der Rezeptor-Liganden-Bindung ohne vorherige Membranverformung (J). Nach dem vollständigen Ablösen der Zelle von der Fibronectin-beschichteten Oberfläche (1D) kann keine Auslenkung der AFM-Feder mehr nachgewiesen werden (2D). Alle Experimente wurden mit einem JPK-NanoWizard[®] (JPK Instruments, Berlin), welches auf einem inversen Zeiss Axiovert 200M (Carl Zeiss, Jena) montiert wurde, durchgeführt.

diesen Strukturen auf den Melanom-Zellen lokalisiert werden [14]. Die Erkenntnisse über Zelloberflächenstrukturen können durch kraftspektroskopische Messungen ergänzt werden, bei denen die Adhäsion der Melanom-Zellen zu anderen Zellen oder zu Oberflächen bestimmt wird. So zeigte ein Vergleich mit der Adhäsion der Krebszellen zu einer mit der zellulären Maschine Fibronectin beschichteten Oberfläche, dass das Blockieren der beta1-Integrine die Zahl diskreter Adhäsionsereignisse reduziert.

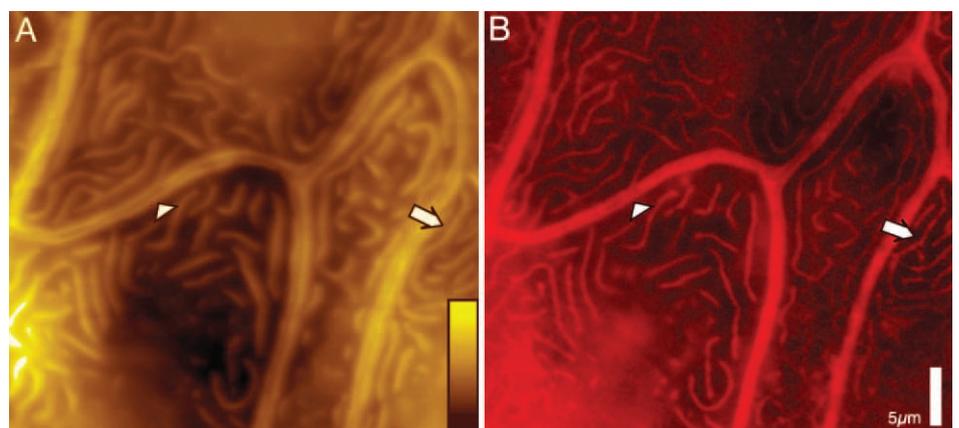
Eine Kombination von AFM und Fluoreszenzmikroskopie wurde auch bei der Untersuchung der Oberflächenstruktur von Zellen (Keratozyten) aus der Schuppe des Zebrafisches angewandt. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Zellen aktinhaltige, kammartige Erhöhungen auf ihrer Oberfläche aufweisen, welche einerseits zur Vergrößerung der mechanischen Stabilität der Zellmembran beitragen,

andererseits aber auch als Speichermöglichkeit für die zelluläre Maschine „Aktin“ dienen (Bild 5). Beide Abbildungsmethoden lieferten dabei weitgehend komplementäre Bilder, jedoch überstieg die Auflösung der AFM-Abbildungen die der Lichtmikroskopie [18].

9 Ausblick

Die Vielseitigkeit des Rasterkraftmikroskops ermöglicht das Abbilden und die gleichzeitige kraftspektroskopische Untersuchung biologischer Objekte unter physiologisch relevanten Bedingungen. Gerade die Kombination von hochauflösender Abbildung und Kraftspektroskopie bei der Untersuchung von Zellmembranen und ihrer Kompartimente stellt eine vielversprechende Erweiterung des An-

Bild 5. Beobachten aktinhaltiger Strukturen auf der Zellmembran von Zebrafisch-Keratozyten. Keratozyten wurden aus Zebrafischschuppen isoliert, fixiert und aktinhaltige Strukturen fluoreszent markiert. Das AFM-Höhenbild (A) zeigt fibrilläre Erhöhungen der Zelloberfläche (Pfeil). Der Farbkeil (rechts unten) reflektiert die Höhenkalibrierung des Bildes, welche sich zwischen 0 (Schwarz) und 500 nm (Hellgelb) bewegt. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie kann demonstriert werden, dass diese Strukturen F-Aktin enthalten (B). Im Bereich der Zell-Zell-Kontakte zeigt das AFM-Höhenbild deutlich zwei diskrete Erhöhungen (Dreieck), jede zu jeweils einer Zelle gehörend, während das Fluoreszenzbild nur eine kontinuierliche, aktinhaltige Struktur anzeigt. Die AFM-Abbildung weist damit die höhere Auflösung im Bereich der Zell-Zell-Kontakte auf, wobei die strukturelle Identifizierung mittels optischer Mikroskopie durchgeführt wird.



wendungsbereiches der Rasterkraftmikroskopie dar. Im Hinblick auf die sich stetig erhöhende Komplexität der untersuchten biologischen Systeme bietet sich daneben eine Kombination von AFM und modernen optischen Abbildungstechniken an, welche in der Zellbiologie und Medizin routinemäßig zum Einsatz kommen. In Zukunft können so biologische und medizinische Objekte mit einer Auflösung weit unter der des Lichtmikroskops beobachtet und präzise manipuliert werden. Die Möglichkeit, zugleich die molekularen Wechselwirkungen zahlreicher molekularbiologischer Prozesse zu „ertasten“, eröffnet in Zukunft einen direkten Zugriff auf die „Sprache“ der fundamentalen molekularbiologischen Vorgänge, die jegliche Prozesse des Lebens steuern.

Literatur

- [1] Benoit, M.; Gabriel, D.; Gerisch, G.; Gaub, H. E.: Discrete interactions in cell adhesion measured by single-molecule force spectroscopy. In: *Nat Cell Biol* **2** (2000), S. 313 – 317
- [2] Binnig, G.; Quate, C. F.; Gerber, C.: Atomic force microscope. In: *Phys. Rev. Lett.* **56** (1986), S. 930 – 933
- [3] Drake, B.; Prater, C. B.; Weisenhorn, A. L.; Gould, S. A. C.; Albrecht, T. R. et al.: Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope. In: *Science* **243** (1989), S. 1586 – 1588
- [4] Engel, A.; Müller, D. J.: Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope. In: *Nat Struct Biol* **7** (2000), S. 715 – 718
- [5] Frederix, P. L.; Akiyama, T.; Stauffer, U.; Gerber, C.; Fotiadis, D. et al.: Atomic force bio-analytics. In: *Curr Opin Chem Biol* **7** (2003), S. 641 – 647
- [6] Janovjak, H.; Kedrov, A.; Cisneros, D. A.; Sapra, K. T.; Struckmeier, J.; Müller, D. J.: Imaging and detecting molecular interactions of single transmembrane proteins. In: *Neurobiol Aging* **27** (2006), S. 546 – 561

- [7] Kedrov, A.; Krieg, M.; Ziegler, C.; Kuhlbrandt, W.; Müller, D. J.: Locating ligand binding and activation of a single antiporter. In: *EMBO Rep* **6** (2005), S. 668 – 674
- [8] Kedrov, A.; Müller, D. J.: Characterizing folding, structure, molecular interactions and ligand gated activation of single sodium/proton antiporters. In: *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **372** (2006), S. 400 – 412
- [9] Kedrov, A.; Ziegler, C.; Müller, D. J.: Differentiating ligand and inhibitor interactions of a single antiporter. In: *J Mol Biol* **362** (2006), S. 925 – 932
- [10] Müller, D. J.; Hand, G. M.; Engel, A.; Sosinsky, G.: Conformational changes in surface structures of isolated Connexin26 gap junctions. In: *EMBO J* **21** (2002), S. 3598 – 3607
- [11] Müller, D. J.; Janovjak, H.; Lehto, T.; Kuerschner, L.; Anderson, K.: Observing structure, function and assembly of single proteins by AFM. In: *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **79** (2002), S. 1 – 43
- [12] Müller, D. J.; Sapra, K. T.; Scheuring, S.; Kedrov, A.; Frederix, P. L. et al.: Single-molecule studies of membrane proteins. In: *Curr Opin Struct Biol* **16** (2006), S. 489 – 495
- [13] Oesterhelt, F.; Oesterhelt, D.; Pfeiffer, M.; Engel, A.; Gaub, H. E.; Müller, D. J.: Unfolding pathways of individual bacteriorhodopsins. In: *Science* **288** (2000), S. 143 – 146
- [14] Poole, K.; Müller, D. J.: Flexible, actin-based ridges co-localize with the beta1 integrin on the surface of melanoma cells. In: *British Journal of Cancer* **92** (2005), S. 1499 – 1505
- [15] Puech, P. H.; Poole, K.; Knebel, D.; Müller, D. J.: A new technical approach to quantify cell-cell adhesion forces by AFM. In: *Ultramicroscopy* **106** (2006), S. 637 – 644
- [16] Puech, P. H.; Taubenberger, A.; Ulrich, F.; Krieg, M.; Müller, D. J.; Heisenberg, C. P.: Measuring cell adhesion forces of primary gastrulating cells from zebrafish using atomic force microscopy. In: *J Cell Sci* **118** (2005), S. 4199 – 4206
- [17] Seelert, H.; Poetsch, A.; Dencher, N. A.; Engel, A.; Stahlberg, H.; Müller, D. J.: Proton powered turbine of a plant motor. In: *Nature* **405** (2000), S. 418 – 419
- [18] Sharma, A.; Anderson, K.; Müller, D. J.: Actin microridges characterized by laser scanning confocal and atomic force microscopy. In: *FEBS Lett.* **579** (2005), S. 2001 – 2009
- [19] Ulrich, F.; Krieg, M.; Schotz, E. M.; Link, V.; Castanon, I. et al.: Wnt11 functions in gastrulation by controlling cell cohesion through Rab5c and E-cadherin. In: *Dev Cell* **9** (2005), S. 555 – 564

Manuskripteingang: 27.10.2006
 Angenommen am: 10.1.2007



Heisenberg, Carl-Philipp

Dr. rer. nat.

Studium Biologie bis 1993 an der LMU München und der University of Cambridge ♦ 1996 Promotion zum Dr. phil. ♦ seit 2001 Gruppenleiter am Max-Planck-Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik in Dresden



Müller, Daniel J.

Prof. Dr. habil. phil.

Studium Physik bis 1993 an der TU Berlin ♦ 1997 Promotion zum Dr. phil. ♦ 2001 Habilitation zum Dr. habil. ♦ seit 2002 Professor für Zelluläre Maschinen am Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik, Fakultät Maschinenwesen und am Biotechnologischen Zentrum (BIOTEC) der TU Dresden