

# Molekulare Abbildung und Quantifizierung chemischer und physikalischer Eigenschaften nativer Proteine mit Kraftvolumen-Rasterkraftmikroskopie\*\*

Izhar Medalsy, Ulf Hensen und Daniel J. Muller\*

Das Rasterkraftmikroskop (AFM) hat die Tür zur Nanowelt geöffnet und entwickelt sich zum multifunktionalen Nanowerkzeug in den Biowissenschaften.<sup>[1]</sup> Routinemäßig wird das AFM zur hochauflösten Bildgebung nativer Proteine unter physiologischen Bedingungen angewendet.<sup>[1b]</sup> Ein Video-AFM ermöglicht die Beobachtung einzelner arbeitender,<sup>[2]</sup> rotierender<sup>[3]</sup> oder diffundierender<sup>[4]</sup> Membranproteine. In der kraftspektroskopischen Anwendung kann das AFM die Wechselwirkungen einzelner Peptide, Proteine und lebender Zellen charakterisieren.<sup>[1b,5]</sup> In der kombinierten kraftspektroskopischen und bildgebenden Anwendung kann das AFM chemische und physikalische Wechselwirkungen biologischer Objekte kartieren.<sup>[5a,c]</sup> Indessen ist die Auflösung solcher AFM-basierter Kombinationen auf ca. 50 nm beschränkt, was für die strukturelle Abbildung und Quantifizierung physikalischer und chemischer Eigenschaften einzelner Proteine nicht ausreicht. Unlängst wurde das Kraftvolumen-AFM entscheidend verbessert,<sup>[6]</sup> indem Matrizen von Kraft-Abstands(F-D)-Kurven ca. 4000-mal schneller bei ausreichender Auflösung (0.5 nm) aufgenommen werden können. Die dabei erreichte Kraftempfindlichkeit (ca. 10 pN) ermöglicht die störungsfreie Messung chemischer und physikalischer Eigenschaften weicher biologischer Materialien. Bis jetzt konnten jedoch keine hochauflösten Kraftvolumenbilder nativer Proteine erzielt werden.

Verglichen mit Oszillations-AFM<sup>[7]</sup> können durch F-D-Kurven (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen) die lokalen Wechselwirkungen komplexer Proteingruppen besser analysiert werden,<sup>[1b,5a,c,6b]</sup> weil elektrostatische, chemische und mechanische Kräfte auf der molekularen Skala unterschiedliche Ortsabhängigkeiten aufweisen.<sup>[8]</sup> Wegen ihrer einfacheren Interpretierbarkeit werden F-D-Kurven bereits seit 1990 verwendet, um spezifische und unspezifische Wechselwirkungen molekularer Systeme zu untersuchen.<sup>[6b,9]</sup> Hier zeigen wir am Beispiel der nativen Purpurnembran (PM) von *Halobacterium salinarum*, dass Kraftvolumen-AFM für die hochauflösende quantitative Bildgebung nativer Proteine verwendet werden kann. PM besteht aus der licht-

getriebenen Protonenpumpe Bacteriorhodopsin (BR) und Lipiden. Während des Photozyklus erzeugt BR durch Konformationsänderungen Protonengradienten über die Zellmembran, die als Energiequelle für zelluläre Prozesse wirken.<sup>[10]</sup> Der Protonentransfer der PM ist wegen asymmetrischer physikalischer und chemischer Eigenschaften auf der PM-Oberfläche deutlich schneller als der Protonentransfer in die wässrige Lösung.<sup>[11]</sup> PM wird als Referenzsystem für das AFM verwendet, weil es käuflich zu erwerben und außerordentlich stabil ist.<sup>[12]</sup> Hochauflöste (0.5 nm) AFM-Aufnahmen an BR brachten erstmals Konformationsänderungen extrazellulärer und kraftinduzierter Konformationsänderungen zytoplasmatischer Polypeptidschleifen zum Vorschein.<sup>[13]</sup>

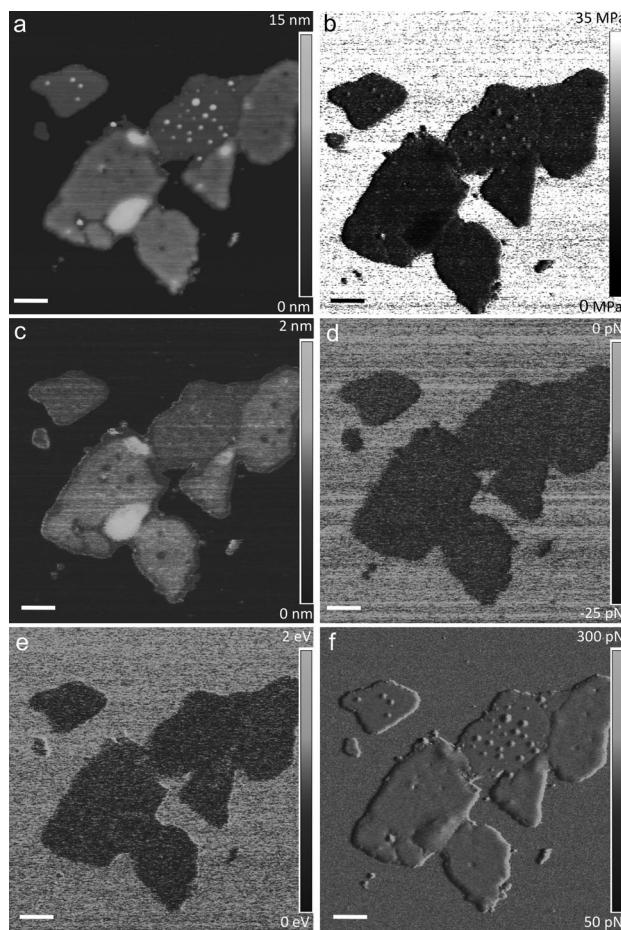
Wir haben Kraftvolumen-AFM zur Abbildung von PM verwendet, die in Puffer auf frischgespaltenem Glimmer adsorbiert wurde. Für jedes Pixel der AFM-Topographie wurde eine F-D-Kurve aufgenommen (Hintergrundinformation 1). Die Maximalkraft, mit der die AFM-Spitze auf die Probe drückt, wurde auf 100 pN begrenzt. Bei Erreichen dieser Kraft wurde die von AFM-Spitze und Probe zurückgelegte Strecke aufgenommen und zur Rekonstruktion der Topographie verwendet. Die Bild- und Regelkreisparameter des AFM wurden gewählt, wie unter *Experimentelles* beschrieben. Die zytoplasmatische Seite der PM zeigte eine Höhe von  $(7.5 \pm 0.5)$  nm und die extrazelluläre Seite eine Höhe von  $(8.3 \pm 0.5)$  nm ( $n = 20$ ;  $n$ : Anzahl der Messungen) (Abbildung 1a). Aus der Gesamtmenge aller F-D-Kurven wurden Elastizitätsmodul (E-Modul),<sup>[14]</sup> Probendeformation, Adhäsionskraft, Energiedissipation und Fehler der Maximalkraft (Abbildung 1 b–f) abgeleitet (Hintergrundinformation 1). Der E-Modul beider PM-Seiten (Abbildung 1b) betrug  $(10 \pm 5)$  MPa ( $n = 20$ ) und stimmte mit Vergleichswerten für die zytoplasmatische Seite (7 MPa) relativ gut und für die extrazelluläre Seite (35 MPa) weniger gut überein.<sup>[7b]</sup>

Der Deformationskanal zeigt die mechanische Antwort der PM auf die AFM-Spitze (Abbildung 1c). Im Unterschied zum E-Modul, der aus der Rückbewegung der AFM-Spitze stammt, wird die Deformation aus der Annäherung der Spitze an die Probe berechnet (Hintergrundinformation 1). Übersichtsbilder bei einer Maximalkraft von etwa 100 pN zeigen eine Deformation von  $(1.0 \pm 0.5)$  nm ( $n = 40$ ) beider PM-Seiten. Zytoplasmatische und extrazelluläre Höhen von PM überschreiten die strukturell bestimmte Dicke nativer PM (Abbildung 1a; 5.6–6.0 nm) um 1.9–2.6 nm.<sup>[15]</sup> Aufgrund weitreichender elektrostatischer Abstötungen zwischen AFM-Spitze und PM kann die mit dem AFM gemessene Höhe größer sein als die tatsächliche Dicke der PM.<sup>[15a]</sup> Bei Elektrolytkonzentrationen von 150 mM KCl (pH 7.6) im

[\*] Dr. I. Medalsy, Dr. U. Hensen, Prof. Dr. D. J. Muller  
ETH Zürich, Dept of Biosystems Science and Engineering  
4058 Basel (Schweiz)  
E-Mail: daniel.mueller@bsse.ethz.ch

[\*\*] Für Unterstützung durch ELSO, EMBO, KTS und SNF wird gedankt.  
Ferner danken wir C. Bippes, M. Pfreundschuh und G. Büldt für ihre  
Unterstützung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201103991> zu finden.



**Abbildung 1.** Native Purpurmembran (PM) in Puffer, aufgenommen mit Kraftvolumen-AFM. a) Topograph der extrazellulären und zytoplasmatischen (weiße Flecken) Oberfläche von PM. b) E-Modul, c) Deformation, d) Adhäsionskraft, e) Energiedissipation und f) Fehler der Maximalkraft. Maßstab 200 nm.

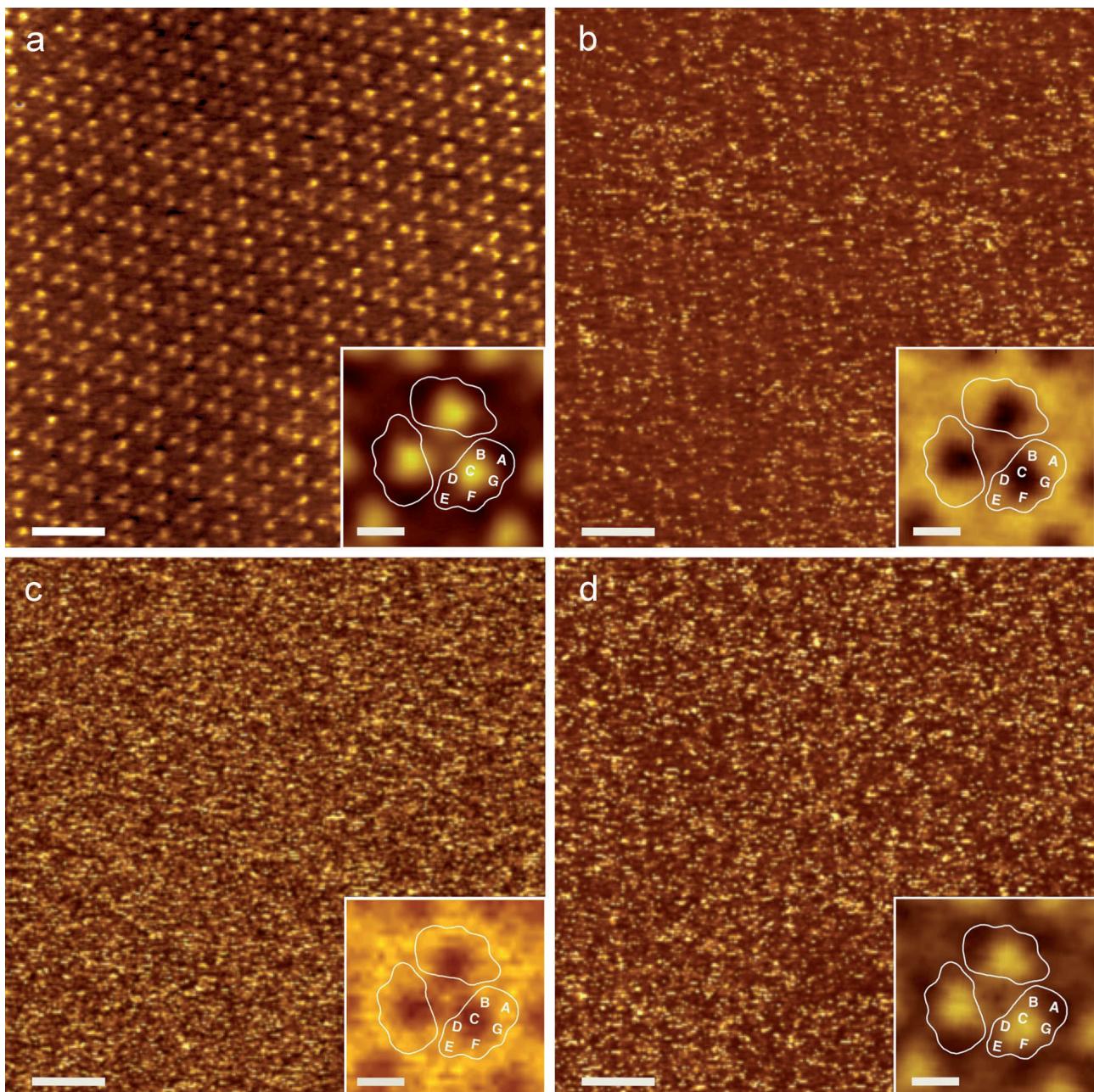
Puffer können diese Abstössungen ca. 100 pN erreichen, wenn AFM-Spitze und PM 2–3 nm voneinander entfernt sind,<sup>[15a]</sup> bei größerer Ladungsdichte auf Spitze oder Membran auch deutlich mehr.<sup>[15a, 16]</sup> Da die Dichte der negativen Ladungen auf der extrazellulären PM-Oberfläche höher ist als auf der Zytosolseite, wird die Spitze auf der extrazellulären Seite stärker abgestoßen, und das AFM registriert eine etwas größere scheinbare Höhe. Bei gesteigerter Maximalkraft wird die elektrostatische Abstössung überwunden, und die scheinbare Höhe und strukturelle Membrändicke nähern sich an; gleichzeitig steigt die gemessene Deformation (Hintergrundinformation 2) auf  $(1.9 \pm 0.5)$  nm für die zytosolische und  $(2.3 \pm 0.5)$  nm für die extrazelluläre Seite. Also zeigt der Deformationskanal im wesentlichen elektrostatische Abstössung zwischen AFM-Spitze und Membran statt Strukturdeformation. Indessen wird bei Maximalkräften, die signifikant höher als elektrostatische Abstössungskräfte liegen, die Strukturdeformation prominent.

Der Adhäsionskanal zeigte eine attraktive Kraft von  $(-10 \pm 5)$  pN ( $n = 20$ ) zwischen AFM-Spitze und beiden PM-Oberflächen (Abbildung 1d). Diese Kraft ist kleiner als jene, die zum Trennen der meisten Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen benötigt wird.<sup>[5c]</sup> Die zwischen AFM-Spitze und

Membran dissipierte Energie von ca. 1 eV ( $n = 20$ ; Abbildung 1e) befindet sich im Bereich einzelner Wasserstoffbrücken (80–430 meV).<sup>[8]</sup> Der Fehler der Maximalkraft (Abbildung 1f) war über den gesamten Bereich der PM in etwa konstant, außer an der Kante, wo sich die Wechselwirkungen von Spitz und Probe drastisch ändern.

Um die zusätzlich gemessenen Parameter strukturell zu ordnen zu können, haben wir höher aufgelöste Kraftvolumen-AFM-Aufnahmen erstellt. Bei einer Lateralauflösung von 1–1.5 nm wurden BR-Trimere in den AFM-Topographien der extrazellulären Oberfläche klar sichtbar (Abbildung 2a). Das Mittel dieser Topographien zeigt die typische Unterstruktur der BR-Trimere, die durch drei größere und drei kleinere Wölbumungen charakterisiert ist.<sup>[13]</sup> Die Übereinstimmung mit vorherigen AFM-, Röntgenkristallographie- und Elektronenmikroskopiedaten von BR zeigt, dass das Kraftvolumen-AFM geeignet ist, native Proteinstrukturen abzubilden.<sup>[15b]</sup> Gleichzeitig mit der Topographie konnten physikalische Eigenschaften aus den F-D-Kurven abgeleitet werden (Hintergrundinformation 1). Auf den ersten Blick enthielt der Deformationskanal keine Informationen (Abbildung 2b). Wir verwendeten Position und Orientierung jedes einzelnen BR-Trimers der Topographie, um definierte „Elementarzellen“ aus dem Deformationskanal zu extrahieren (Hintergrundinformation 3). Diese „Elementarzellen“ wurden überlagert und ihr Mittelwert (Abbildung 2b) durch Addition der Elementarzellen berechnet. Dieser „referenzfrei“ berechnete Mittelwert zeigt die vorher maskierten Informationen des Deformationskanals und belegt, dass BR-Trimere weniger deformiert [ $(0.2 \pm 0.1)$  nm] sind als das umliegende Lipid [ $(1.0 \pm 0.1)$  nm;  $n = 200$ ]. Der Deformationskanal könnte aber auch hier, wie schon bei den AFM-Übersichtsaufnahmen, eine Mischung von elektrostatischer Abstoßung und Strukturdeformation enthalten. Alle aufgenommenen Kanäle zeigten ein starkes Rauschen und wurden mit dem beschriebenen Ansatz gemittelt, um ihre Informationen sichtbar zu machen (Abbildung 2c,d). Abgebildet auf die in Lipiden eingebettete Röntgenkristallstruktur von BR (Abbildung 4a–c) lokalisieren diese Mittelwerte experimentell bestimmte Parameter. Der Adhäsionskanal legt nahe, dass Lipide stärker an der AFM-Spitze haften [ $(-10 \pm 5)$  pN] als BR [ $(0 \pm 5)$  pN;  $n = 200$ ]. Dieser Unterschied kann der asymmetrischen Verteilung von Van-der-Waals-Kräften zugeschrieben werden. Normalerweise sind Van-der-Waals Kräfte stärker, wenn eine Spitze eine flache Oberfläche (Lipide) berührt als bei Berührung der korrigierten Oberfläche (BR), die kleinere Kontaktflächen darbietet.<sup>[8]</sup> Der E-Modul zeigt, dass PM-Lipide deutlich weicher sind [ $(10 \pm 5)$  MPa;  $n = 200$ ] als BR [ $(30 \pm 5)$  MPa; Abbildung 2d, 4c].

Der Fehler der Maximalkraft war dann am größten, wenn sich die AFM-Spitze der höchsten Wölbung der extrazellulären BR-Oberfläche näherte (Abbildung S4e in den Hintergrundinformationen) und den AFM Regelkreis beanspruchte. Da diese Fehler recht klein waren [ $\pm (8 \text{--} 10)$  pN], kann ihr Anteil an der Bildgebung vernachlässigt werden. Dies unterstreicht die Empfindlichkeit des Kraftvolumen-AFM bei der Abbildung von Proteinoberflächen. Zur weiteren Erhöhung der Auflösung könnte der Regelkreis verbessert werden. Der Energiedissipationskanal (Abbildung S4f in



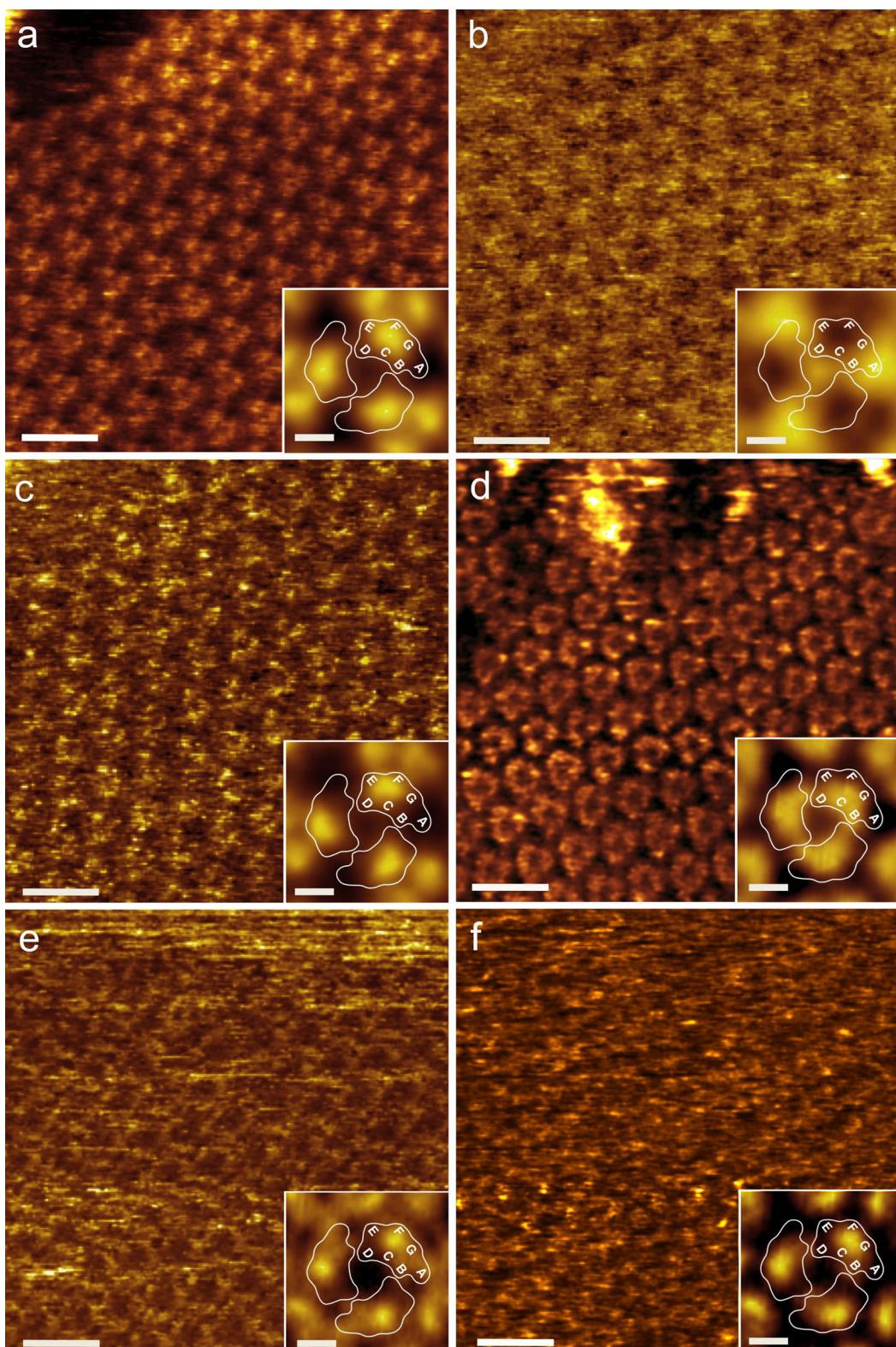
**Abbildung 2.** Hochauflöste Kraftvolumen-AFM-Aufnahmen der extrazellulären PM-Oberfläche. a) Topograph und Abbildungen von b) Deformation, c) Adhäsionskraft und d) E-Modulkanal. Die Vergrößerung in (a) zeigt einen dreifachen, symmetrisierten Kreuzkorrelationsmittelwert ( $n=200$ ) des BR-Trimmers. Die Vergrößerungen in (b)–(d) zeigen Kanalmittelwerte (Abbildung S3 in den Hintergrundinformationen). Umrandungen zeigen die BR-Kontur (weiße Striche und  $\alpha$ -Transmembranhelices A–G angezeigt) aus Röntgen- und Elektronenklassallographie.<sup>[15b]</sup> Die Farbspektren entsprechen einer vertikalen Skala von a) 1.0 nm, b) 1.2 nm, c) 55 pN und d) 4 MPa, die Maßstäbe 10 (Rohdaten) und 2 nm (Vergrößerungen).

den Hintergrundinformationen) zeigt, dass die zwischen AFM-Spitze und PM übertragene Energie an der höchsten BR-Wölbung maximal [ $(600 \pm 200)$  meV;  $n = 500$ ] und an der Lipidoberfläche minimal [ $(200 \pm 200)$  meV] ist.

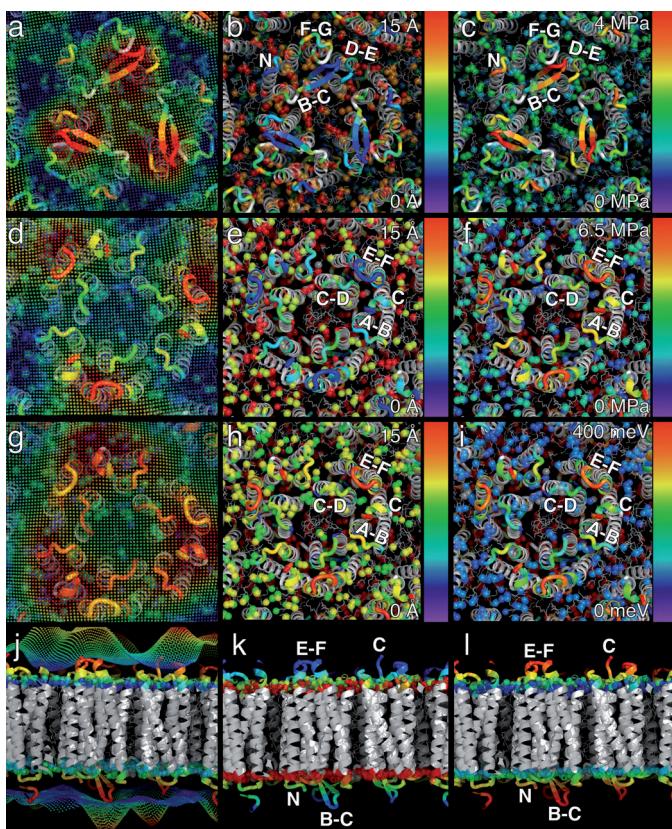
Bei hoher Auflösung zeigte die zytoplasmatische PM-Oberfläche zwei Konformationen (Abbildung 3). Bei einer Maximalkraft von 75 pN ragte eine Polypeptidschleife von jedem BR-Molekül hervor (Abbildungen 3 a, 4 d;  $n = 500$ ). Diese Schleifen waren bei höherer Maximalkraft von 125 pN unsichtbar; stattdessen wurde das darunter liegende Gerüst der BR-Moleküle abgebildet (Abbildungen 3 d, 4 g). Dieser

vollständig reversible kraftinduzierte Konformationswechsel der Polypeptidschleife (EF-Schleife), die die  $\alpha$ -Helices E und F von BR verbindet, wurde bereits beobachtet.<sup>[2a, 13]</sup> Die anderen Kanäle quantifizieren die chemischen und physikalischen Parameter dieser Konformationen (Abbildungen 3, 4 d–i). Bei kleiner Kraft hatte die EF-Schleife einen bedeutend höheren E-Modul [ $(30 \pm 5)$  MPa] als die umliegenden Lipide [ $(10 \pm 5)$  MPa;  $n = 500$ ; (Abbildungen 3 c, 4 f)].

Bei niedriger Maximalkraft wurden Deformationen von  $(0.4 \pm 0.2)$  nm über der EF-Schleife bis hin zu  $(1.0 \pm 0.2)$  nm über Lipiden ( $n = 500$ ; Abbildungen 3 b, 4 e) gemessen. Wie



**Abbildung 3.** Hochauflöste Kraftvolumen-AFM-Aufnahmen der zytoplasmatischen PM-Oberfläche. a) Topograph bei niedriger Kraft) und Abbildung von b) Deformations- und c) E-Modulkanal. d) Topograph bei höherer Kraft sowie Abbildungen des e) Deformations- und f) Energiedissipationskanals. Die Vergrößerungen zeigen dreifach symmetrisierte Mittelwerte jedes Kanals. Die weißen Linien mit gekennzeichneten Transmembranhelices A–G zeigen BR-Konturen nahe der zytoplasmatischen Oberfläche, die aus Röntgen- oder Elektronenkristallographie erhalten wurden.<sup>[15b]</sup> Die Farbskalen entsprechen vertikalen Werten von a) 1.2 nm, b) 0.8 nm, c) 6.5 MPa, d) 1.0 nm, e) 1.1 nm und f) 400 meV. Maßstäbe 10 (Rohdaten) und 2 nm (Vergrößerungen).



**Abbildung 4.** Abbildung der AFM-Parameter auf die PM. a) AFM-Topograph, b) Deformationskanal und c) E-Modul (Abbildung 2) der extrazellulären Oberfläche. d) Topograph, e) Deformationskanal und f) E-Modul der zytoplasmatischen Oberfläche bei geringer Kraft (Abbildung 3). g) Topograph, h) Deformationskanal und i) Energiedissipation der zytoplasmatischen Oberfläche bei höherer Kraft (Abbildung 3). j–l) Seitenansichten des PM-Modells und j) AFM-Topographen, k) Deformationskanäle und j) E-Moduln.  $\beta$ -Schleifen zwischen Transmembranhelices A–G sowie C- und N-Terminus sind angezeigt. Färbungen von BR und Lipiden gemäß den AFM-Kanälen. Quantifizierung der Signale durch Farbbalken. Die PM-Struktur wurde erzeugt, wie in den Hintergrundinformationen beschrieben.

erwähnt, enthalten diese Werte Beiträge von elektrostatischer Abstoßung und Strukturdeformation. Die AFM-Topographen zeigen gegenüber dem Modell kaum eine Deformation der EF-Schleifen (Abbildung 4j). In diesem Fall scheint der Deformationskanal eher die elektrostatische Abstoßung zwischen Spitze und PM aufzuzeichnen. Weil die AFM-Spitze leicht negativ geladen ist, legt die „Deformationskarte“ nahe, dass PM-Lipide negativer geladen sind als BR.<sup>[9,15a]</sup> Dies änderte sich bei höherer Maximalkraft, wo die EF-Schleife um  $(0.9 \pm 0.2)$  nm deformiert wurde, während die Lipideformation bei  $(1.0 \pm 0.2)$  nm ( $n = 500$ ) blieb (Abbildungen 3e, 4h). In diesem Fall zeichnete der Kanal die reversible kraftinduzierte Deformation der EF-Schleife auf.<sup>[13]</sup>

Die Deformation von zytoplasmatischem BR und PM-Lipiden bei gegebener Maximalkraft ermöglicht die Abschätzung ihrer Federkonstante  $k$  als  $0.14\text{--}0.19\text{ N m}^{-1}$  bzw.  $0.75\text{--}1.25\text{ mN m}^{-1}$ . Die extrazelluläre Oberfläche zeigt  $k$ -Werte von  $0.50\text{ N m}^{-1}$  für BR und  $1.00\text{ mN m}^{-1}$  für Lipide. Diese Werte stimmen gut mit Schätzungen von  $k = 0.12\text{ N m}^{-1}$  für die zytoplasmatische und von  $0.33\text{ N m}^{-1}$  für die extrazelluläre BR-Oberfläche überein, die auf elastischer Neu-

tronenstreuung basieren.<sup>[17]</sup> Folglich zeigen PM-Lipide auf beiden Seiten ähnliche mechanische Eigenschaften, wogen die Protonenpumpe auf der zytoplasmatischen Seite weicher ist. Die mechanische Anisotropie von BR könnte Konformationsänderungen auf der zytoplasmatischen Seite begünstigen, die mit dem Protontransfer durch die Membran zusammenhängen.<sup>[10b,17]</sup> Der steifere Kern der extrazellulären BR-Hälfte könnte die Isomerisierung des Retinals beeinflussen und zur einer Ventilfunktion des Protontransfers beitragen. Ergänzend geben die niedrigeren Federkonstanten der Lipide einen flexiblen Rahmen für funktionelle Konformationsänderungen der Protonenpumpe. Zusammengenommen legt die mechanische Anisotropie von BR und Lipiden eine evolutionäre Strukturauswahl im Zusammenhang mit der Funktion der Protonpumpe nahe.<sup>[17]</sup>

Übereinstimmend mit den Deformationskarten (Abbildung 4b,e) zeigen die E-Moduln beider Seiten, dass PM-Lipide deutlich weicher sind als BR (Abbildungen 2–4). Die Frage, ob sich flexibles Lipid einem steiferen Membranprotein oder umgekehrt ein flexibleres Membranprotein sich dem Lipid anpasst,<sup>[18]</sup> muss für jedes System neu beantwortet werden. Die unterschiedlichen elastischen Eigenschaften von Lipid und BR (Abbildung 4c,f) zeigen, dass sich im Fall der PM die Lipide dem BR anpassen. Tatsächlich ergeben hochauflöste BR-Modelle, dass sich PM-Lipide strukturell den Protonpumpen anpassen.<sup>[19]</sup>

Aus Deformations- und E-Modulkarten der PM war ersichtlich, dass die EF-Schleifen das stiefste Strukturelement der zytoplasmatischen Oberfläche bilden (ca.  $25\text{ MPa}$ ; Abbildung 3c). Dies änderte sich, sobald die Maximalkraft ausreichte, um einen Kollaps der Schleife zu bewirken (Abbildung 3d).<sup>[13]</sup> Die beim Abbilden dieser Konformation dissipierte Energie betrug etwa  $400\text{ meV}$  (Abbildungen 3f, 4i), was der Energie von einer bis vier intramolekularen H-Brücken entspricht.<sup>[8]</sup> Im kollabierten Zustand zeigte die EF-Schleife wieder die niedrigste Deformierbarkeit der ganzen PM-Oberfläche (Abbildungen 3e, 4h). Wir folgern daraus, dass die EF-Schleife recht steif ist und bei Kraftanwendung in eine ebenfalls relativ steife Konfiguration kollabiert (Abbildung S4k in den Hintergrundinformationen).

Vorangegangene AFM-Experimente ergaben, dass die EF-Schleife viele Konformationen zwischen beiden Zuständen annehmen kann.<sup>[13,20]</sup> Diese Vielfalt weist auf eine strukturelle Flexibilität hin. Wir haben in unserer Arbeit die einzigartige mechanische Stabilität der gestreckten und kollabierten Zustände der EF-Schleife bestimmt, die erklärt, weshalb die EF-Schleife in den meisten Strukturuntersuchungen von BR gut aufgelöst ist.<sup>[10b]</sup> Diese Struktureigenschaft hat Folgen für die BR-Funktion: Bei kleinen Störungen bleibt die EF-Schleife steif und stabilisiert die funktional wichtigen  $\alpha$ -Helices E und F. Sobald die Störung stark genug wird, z. B. bei Photoisomerisierung des *trans*-Retinals, kann die EF-Schleife eine Alternativkonfiguration annehmen, die die Krümmung der  $\alpha$ -Helices E und F und damit den Protontransport ermöglicht.<sup>[10,21]</sup>

Am Beispiel von PM haben wir hier gezeigt, dass das Kraftvolumen-AFM in der Lage ist, hochauflöste (1–

1.5 nm) Topographien nativer Membranoberflächen aufzunehmen. Die Strukturdetails stimmen mit den über Diffraktion und Mikroskopie bestimmten Strukturen überein.<sup>[13,15b]</sup> Die Vergleiche von PM-Strukturen und AFM-Topographie (Abbildung 4) legen nahe, dass die PM durch das Kraftvolumen-AFM nicht gestört wurde. Im Unterschied zu anderen AFM-Bildgebungsverfahren ermöglicht das Kraftvolumen-AFM jedoch die zusätzliche Aufnahme chemischer und physikalischer Eigenschaften bei ebensolcher hoher Auflösung. Zunächst zeigten die zusätzlich aufgenommenen AFM-Kanäle im wesentlichen Rauschen. Durch Mittelung konnten wir die quantitativen Informationen aus diesen Kanälen hervorheben. Die Abbildung dieser Zusatzinformationen auf ein Strukturmodell der PM (Abbildung 4) ermöglicht es zum ersten Mal, experimentell bestimmte chemische und physikalische Parameter mit Strukturmodellen zu korrelieren. E-Modulkarten zeigen elastische Eigenschaften von Lipiden und BR, die den lichtgetriebenen Protonpumpen funktional wichtige Konformationsänderungen ermöglichen. Deformationskarten erlauben die Messung struktureller Deformierbarkeit weicher biologischer Materialien und die Bestimmung mechanischer Eigenschaften von Proteinen und Lipiden bei molekularer Auflösung. Unsere experimentellen Daten legen nahe, dass elektrostatische Wechselwirkungen zu der gemessenen Deformation beitragen. Wie elektrostatische Wechselwirkungen und strukturelle Deformierbarkeit voneinander getrennt werden können, wird zu untersuchen sein. Adhäsionskarten detektieren attraktive Wechselwirkungen zwischen AFM-Spitze und Probe.

Da die AFM-Spitze ein multifunktionales makroskopisches Werkzeug ist,<sup>[1]</sup> wird die chemische Funktionalisierung es in Zukunft gestatten, chemische Gruppen und ihre adhäsive Wechselwirkungskräfte, -energien und -kinetik auf die Proteinoberfläche abzubilden. Die Untersuchung der Zeitabhängigkeit dieser Wechselwirkungen könnte Einblicke in die Bindungskinetik und -energetik beispielsweise von Liganden mit einem Membranrezeptor geben. Das hochauflösende Kraftvolumen-AFM erlaubt die Quantifizierung und Abbildung (mit lateraler Auflösung von nahezu 1 nm) mehrerer chemischer und physikalischer Eigenschaften nativer biologischer Proben. In Zukunft wird diese Eigenschaft zur Abbildung und der Parametrisierung spezifischer chemischer und physikalischer Informationen nativer Proteine und biomolekularer Komplexe verwendet werden können.

## Experimentelles

Probenbereitung: PM aus *H. Salinarum* wurde präpariert, wie beschrieben.<sup>[12]</sup> PM in Puffer [150 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, nanoreines Wasser (18 MOhm cm<sup>-1</sup>)] wurde auf frisch gespaltenem Glimmer adsorbiert. Nach 15 min Adsorptionszeit wurde die Probe mit dem gleichen Puffer gespült, um schwach adsorbierte PM zu entfernen. Danach wurde die Probe mit dem AFM abgebildet.

Kraftvolumen-AFM: Es wurde ein Nanoscope Multimode 8 (Bruker) mit einem 120 µm piezoelektrischen Scanner, einer 70 µm langen, V-förmigen Siliciumnitridspitze (Bruker) mit nomineller Federkonstante von 0.4 N m<sup>-1</sup> und Siliciumspitzen mit nominellem Apex von 2 nm verwendet. Das AFM wurde im Kraftvolumenmodus bei einer Abtastrate von 0.8–1 Hz betrieben. Für jeden Bildpunkt der 512 × 512 Tomographen wurden F-D-Kurven (Abbildung S1 in den

Hintergrundinformationen) bei einer Frequenz von 2 kHz über Gesamtdistanzen von ca. 16 nm aufgenommen. Die Maximalkraft wurde auf einen vordefinierten Wert mit einer Genauigkeit von ±(7–8) pN begrenzt. Der Regelkreis zur Kontrolle der AFM-Spitze wurde so eingestellt, dass die Auflösung der Topographie optimal und der Fehler der Maximalkraft minimal wurden. Mehr Informationen finden sich in den Hintergrundinformationen.

Eingegangen am 10. Juni 2011,  
veränderte Fassung am 7. September 2011  
Online veröffentlicht am 17. Oktober 2011

**Stichwörter:** Bacteriorhodopsin · Lipide · Membranproteine · Molekulare Wechselwirkungen · Rastersondenverfahren

- [1] a) C. Gerber, H. P. Lang, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *1*, 3–5; b) D. J. Müller, Y. Dufrene, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 261–269.
- [2] a) A. Engel, D. J. Müller, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 715–718; b) J. Yu, C. A. Bippes, G. M. Hand, D. J. Muller, G. E. Sosinsky, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 8895–8904.
- [3] D. J. Muller, A. Engel, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2008**, *13*, 338–350.
- [4] a) D. J. Müller, A. Engel, U. Matthey, T. Meier, P. Dimroth, K. Suda, *J. Mol. Biol.* **2003**, *327*, 925–930; b) H. Yamashita, K. Voitchovsky, T. Uchihashi, S. A. Contera, J. F. Ryan, T. Ando, *J. Struct. Biol.* **2009**, *167*, 153–158.
- [5] a) P. Hinterdorfer, Y. F. Dufrene, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 347–355; b) A. Engel, H. E. Gaub, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 127–148; c) D. J. Müller, J. Helenius, D. Alsteens, Y. F. Dufrene, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 383–390.
- [6] a) A. Rosa-Zeiser, E. Weilandt, S. Hild, O. Marti, *Meas. Sci. Technol.* **1997**, *8*, 1333–1338; b) H. J. Butt, B. Cappella, M. Kappl, *Surf. Sci. Rep.* **2005**, *59*, 1–152.
- [7] a) M. Stark, C. Moeller, D. J. Müller, R. Guckenberger, *Biophys. J.* **2001**, *80*, 3009–3018; b) M. Dong, S. Husale, O. Sahin, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 514–517.
- [8] J. Israelachvili, *Intermolecular & surface forces*, 2. Aufl., Academic Press Limited, London, **1991**.
- [9] H.-J. Butt, *Biophys. J.* **1991**, *60*, 1438–1444.
- [10] a) M. H. J. Koch, N. A. Dencher, D. Oesterhelt, H.-J. Plöhn, G. Rapp, G. Büldt, *EMBO J.* **1991**, *10*, 521–526; b) T. Hirai, S. Subramaniam, J. K. Lanyi, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 433–439.
- [11] J. Heberle, J. Riesle, G. Thiedemann, D. Oesterhelt, N. A. Dencher, *Nature* **1994**, *370*, 379–382.
- [12] D. J. Müller, A. Engel, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2191–2197.
- [13] D. J. Müller, H.-J. Sass, S. Müller, G. Büldt, A. Engel, *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 1903–1909.
- [14] B. V. Derjaguin, V. M. Müller, Y. P. Toropov, *J. Colloid Interface Sci.* **1975**, *53*, 314.
- [15] a) D. J. Müller, A. Engel, *Biophys. J.* **1997**, *73*, 1633–1644; b) J. B. Heymann, D. J. Müller, E. Landau, J. Rosenbusch, E. Pebay-Peroulla, G. Büldt, A. Engel, *J. Struct. Biol.* **1999**, *128*, 243–249.
- [16] D. J. Müller, D. Fotiadis, S. Scheuring, S. A. Müller, A. Engel, *Biophys. J.* **1999**, *76*, 1101–1111.
- [17] G. Zaccaï, *Science* **2000**, *288*, 1604–1607.
- [18] D. M. Engelman, *Nature* **2005**, *438*, 578–580.
- [19] a) H. Luecke, B. Schobert, H. T. Richter, J. P. Cartailler, J. K. Lanyi, *J. Mol. Biol.* **1999**, *291*, 899–911; b) J. P. Cartailler, H. Luecke, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2003**, *32*, 285–310.
- [20] D. J. Müller, D. Fotiadis, A. Engel, *FEBS Lett.* **1998**, *430*, 105–111.
- [21] M. Shibata, T. Uchihashi, H. Yamashita, H. Kandori, T. Ando, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4502–4505; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4410–4413.