

## Atomic Force Microscope

# Molekulare Kraftmikroskopie und Kraftspektroskopie

ANDREAS EBNER, HERMANN J. GRUBER, PETER HINTERDORFER  
INSTITUT FÜR BIOPHYSIK, JOHANNES KEPLER UNIVERSITÄT LINZ

Inter- und intramolekulare Kräfte spielen eine entscheidende Rolle im Aufbau und in der Regulation von biologischen Systemen. Im einfachsten Fall handelt es sich um die molekulare Erkennung zwischen Rezeptor und Ligand (z.B. Antikörper und Antigen), welche oft in eine Kaskade von weiteren Reaktionen eingebunden ist. Im Atomkraftmikroskop (**A**tomic **F**orce **M**icroscope, AFM) lassen sich die Bindungskräfte solcher Interaktionen auf molekularer Ebene, d. h. zwischen einzelnen Molekülen messen.

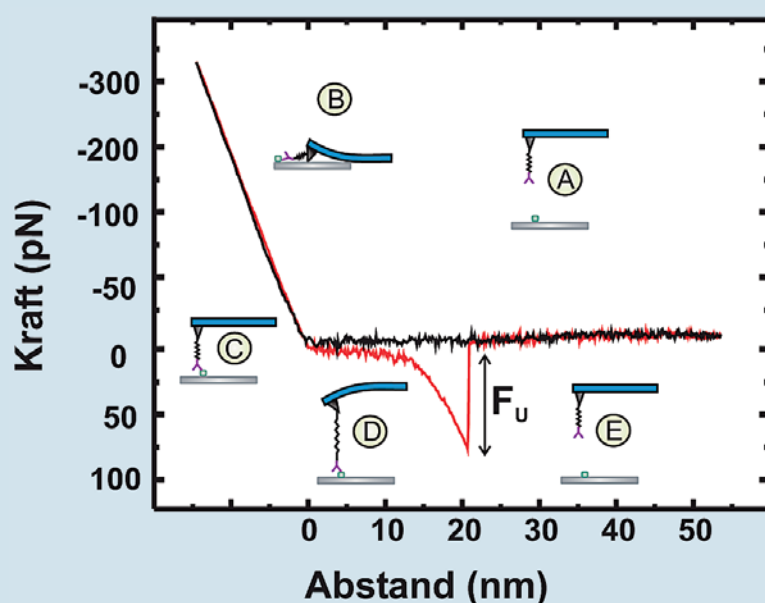
■ Das AFM wurde in den 80er Jahren von Binnig et al.<sup>[1]</sup> entwickelt. In der ursprünglichen Version wurden Oberflächen mit einer sehr dünnen Nadel (AFM-Spitze) abgerastert, um eine Abbildung der Oberflächenrauigkeit zu gewinnen. Eine Weiterentwicklung dieser Technologie ist die Molekulare Erkennungs-Kraft-Mikroskopie (**M**olecular **R**ecognition **F**orce **M**icroscopy, MRFM). Diese erlaubt die Messung der Wechselwirkungskraft zwischen zwei Molekülen (z.B. Rezeptor

und Ligand). Zu diesem Zweck wird ein Bindungspartner an die AFM Spitze gebunden, während der entsprechende andere Partner auf der zu untersuchenden Oberfläche fixiert sein muss. Durch kontrolliertes Wegfahren der mit Liganden besetzten Messspitze von der Oberfläche, wird eine steigende Zugkraft auf den gebildeten Rezeptor-Liganden-Komplex ausgeübt, bis es zur Dissoziation kommt. Durch solche Abrisskraftmessungen können Bindungsraten und -Affinitäten bestimmt,

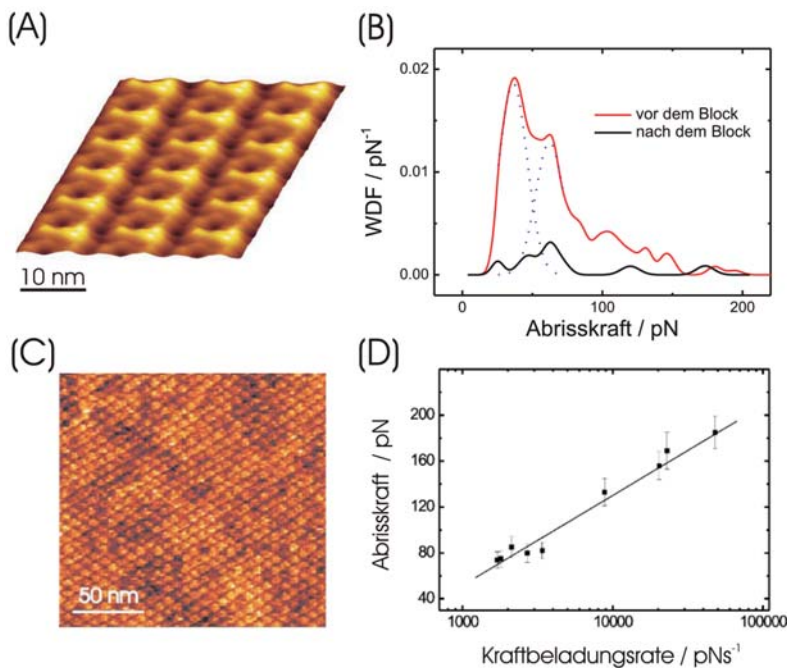
sowie strukturelle Daten der Bindungssequenz gewonnen werden. Darüber hinaus kann die Dynamik des Bindungsverhaltens auf molekularer Ebene durch die Kraftspektroskopie analysiert werden. Der Anwendungsbereich der MRFM sowie der Kraftspektroskopie reicht von der Untersuchung isolierter Proteine über natürliche Membranen bis hin zu ganzen Zellen. In den nachfolgenden Kapiteln ist die Anwendung der MRFM anhand konkreter Beispiele an Membranen und Zellen gezeigt.

### Messung von „Kraft-Abstands-Zyklen“ auf Einzelmolekülebene

Um biologische Wechselwirkungen untersuchen zu können, muss die AFM Spitze mit einem Liganden versehen werden. Zuerst wird die Spitze, die üblicherweise aus Silizium oder Siliziumnitrid besteht mit reaktiven chemischen Gruppen versehen („funktionalisiert“). Dies kann in Lösung mittels Ethanolaminhydrochlorid erfolgen oder aus der Gasphase mittels APTES (Aminopropyltriethoxysilan). Auf dem vorher inerten Spit-



◀ **Abb. 1:** Kraft-Abstands-Zyklus: In der Hinbewegung (schwarze Linie) nähert sich die mit einem Biomolekül funktionalisierte AFM-Spitze der Oberfläche (**Abb. 1A**). Ab dem Zeitpunkt der Berührung kommt es zu einer Verbiegung, welche linear ansteigt (**Abb. 1B**), bis ein vorgegebener Maximalwert erreicht ist. Von dort an wird die Spitze wieder wegbewegt (rote Linie). Während der gesamten Kontaktzeit hat der Ligand an der Spitze die Möglichkeit, an eine Rezeptorstelle an der Oberfläche zu Binden (**Abb. 1C**). Durch weiteres Entfernen der Spitze von der Oberfläche kommt es zur Dehnung der PEG-Kette (**Abb. 1D**). Bei einer bestimmten Zugkraft wird der Rezeptor-Liganden-Komplex zerstört, die Spitze gibt sich wieder in ihre Ruhelage (**Abb. 1E**).



▲ **Abb. 2:** Untersuchung biologischer Membranen: **(A)** An der Oberfläche eines mit Streptavidin fusionierten bakteriellen S-Schicht Proteingitters sind morphologische Details erkennbar. **(B)** Die Wahrscheinlichkeitsdichtfunktion (WDF) der Abrisskraft (rote Linie) zeigt ein Maximum bei 37 pN sowie ein weiteres Maximum bei 62 pN. In einem Kontrolllexperiment mit einem blockierten Liganden (schwarze Linie) sinkt die Wahrscheinlichkeit der molekularen Erkennung von 20 % auf 4 %. Entnommen aus Ebner et al.<sup>[3]</sup>. **(C)** Das Oberflächenrauhigkeitsbild einer Purpurchromatium-Membran zeigt das typische hexagonale Gitter. **(D)** In der Kraftspektroskopie wird die wahrscheinlichste Abrisskraft gegen die Kraftsteigerungsrate semilogarithmisch aufgetragen. Entnommen aus Kienberger et al.<sup>[4]</sup>.

zenmaterial hat man dadurch eine reaktive Oberfläche mit primären Amingruppen geschaffen. An diese Amine werden lange, dehnbare Polyethylenglykol-Ketten (PEG) gebunden<sup>[2]</sup>, welche genau ein reaktives Ende für Aminogruppen besitzen und nur mit diesem Ende an die Spitze binden. Am zweiten (freihängenden) Ende besitzen die PEG-Ketten eine andere reaktive Gruppe, an die Proteine oder andere Liganden gebunden werden. Die mit Liganden funktionalisierte Spitze wird der Oberfläche angenähert. Dabei wird die Verbiegung der Spitze in Abhängigkeit des Abstandes zwischen Spitze und Oberfläche gemessen. Als Ergebnis erhält man Kraft-Abstands-Zyklen (**Abb. 1**). Vor der Berührung zwischen Spitze und Oberfläche kommt es zu keiner Verbiegung (**Abb. 1A**). Ab dem Berührungspunkt wird die Spitze sukzessiv nach oben verbogen (**Abb. 1B**) bis eine vorgegebene Maximalkraft erreicht ist. Während der Kontaktzeit hat der über die PEG-Kette „angeseilte“ Ligand die Möglichkeit, an eine Rezeptorstelle zu binden. Dann wird die Spitze von der Oberfläche weggefahren, wobei beim Berührungsverlust zwischen Spitze und Oberfläche die Verbiegung vollständig zur Ruhelage zurückgeht (**Abb. 1C**). Ist es wäh-

rend der Kontaktzeit zur Ausbildung eines Komplexes gekommen, so bewirkt das weitere Wegfahren eine Dehnung der PEG-Kette und es kommt zur Verbiegung der AFM Spitze nach unten (**Abb. 1D**). Auf den Komplex wird dabei eine immer größere Zugkraft ausgeübt, bis es zur Dissoziation zwischen Ligand und Rezeptor kommt. Dies ist in der Kraft-Abstands-Kurve als spontaner Abriss, d. h. als Sprung in die Ruhelage erkennbar. Auch während des weiteren Wegfahrens bleibt die Spitze in dieser Ruhelage (**Abb. 1E**). Als Ergebnis einer solchen Messung erhält man die charakteristische Verbiegung der Spitze unmittelbar vor der Dissoziation zwischen Ligand und Rezeptor. Mithilfe der Federkonstante (von PEG und Spitze) kann die Spitzenverbiegung in jene Kraft ( $F_u$ ) umgerechnet werden, welche im Moment des Abrisses auf den Komplex gewirkt hat.

### Kraftmikroskopie und Kraftspektroskopie auf biologischen Membranen

Neben der Untersuchung isolierter Proteine können MRFM Experimente auch auf biologischen Membranen durchgeführt werden, wobei Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen direkt in ihrer nativen Umgebung studiert

werden. Im Folgenden wird dies an zwei Beispielen gezeigt, an Oberflächen von bakteriellen S-Schichten<sup>[3]</sup> sowie auf Membranen von Purpurbakterien, welche großteils aus zweidimensional kristallisiertem Bakteriorhodopsin bestehen<sup>[4]</sup>.

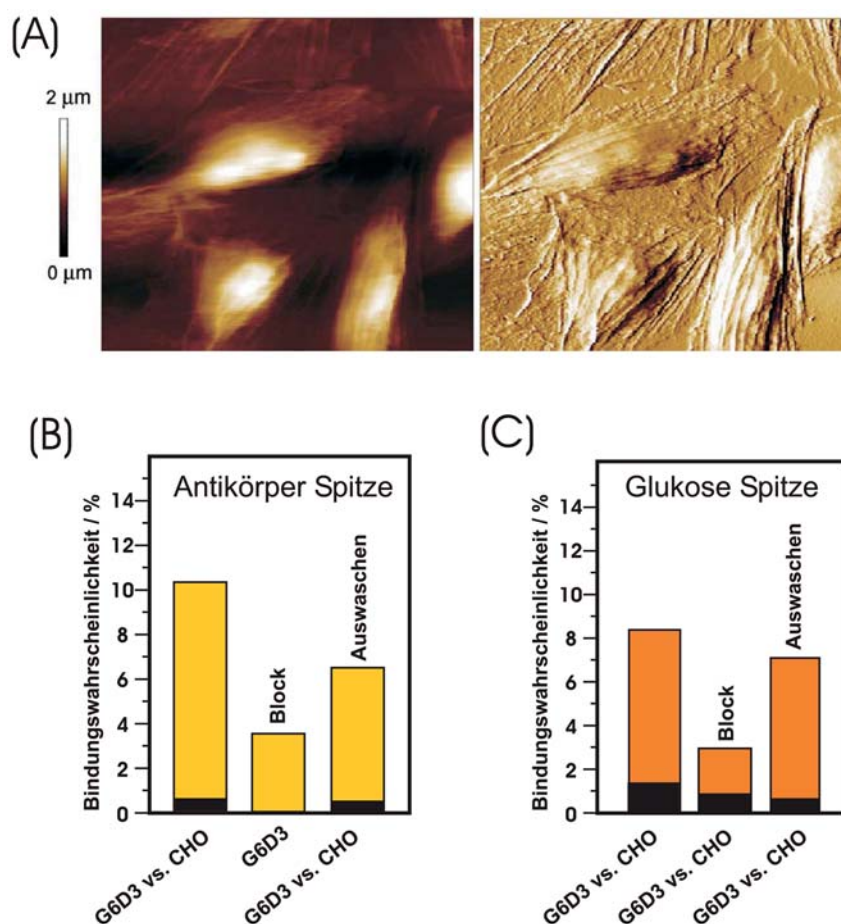
Bakterielle Hüllproteine (S-Schicht-Proteine) lassen sich in Lösung zu zweidimensionalen Kristallen assemblieren. Werden diese Proteine zuvor genetisch mit einer Rezeptorsequenz versehen, dann erhält man nach erfolgter Kristallisation ein funktionelles Gitter der Rezeptororte mit Maschenweiten im Bereich weniger Nanometer. In der vorgestellten Studie wurde chimäres Protein verwendet, ein Fusionsprodukt aus S-Schicht-Protein und Streptavidin. Die Struktur des kristallinen Gitters dieses Fusionsproteins ist in **Abbildung 2A** gezeigt. Die Funktionalität der Streptavidin-Rezeptorstellen gegenüber dem hochaffinen Bindungspartner Biotin (Vitamin H) wurde mithilfe der Kraftmikroskopie untersucht. Mehrere Biotinmoleküle wurden an ein Antikörpermolekül, und dieses wiederum über PEG-Ketten an die AFM Spitze gebunden. Nach einigen hundert Kraft-Abstands-Zyklen wurde die Wahrscheinlichkeitsdichtfunktion (WDF) der Abrisskraft errechnet (**Abb 2B**). Das Maximum in dieser Kurve (rote Linie) spiegelt die wahrscheinlichste Abrisskraft unter den gegebenen Bedingungen wieder. Um die Spezifität der Wechselwirkung zu überprüfen, wurde in einem Kontrolllexperiment Streptavidin in den Messpuffer gegeben. Dadurch wurden die Biotinmoleküle an der Spitze unter Ausbildung eines Streptavidin-Biotin-Komplexes blockiert. Daraufhin sank die Bindungswahrscheinlichkeit, also die Zahl der Kraft-Abstands-Kurven mit molekularer Erkennung bezogen auf alle Kurven, von 20 % (rote Linie) auf 3 % (schwarze Linie). Eine Besonderheit dieses Experiments ist das ausgeprägte zweite Maximum (rechte blaue Linie) in der WDF. Dies resultiert aus gleichzeitigen Abrissen von jeweils zwei Biotinmolekülen in einem Kraft-Abstands-Zyklus und zeigt daher auch eine annähernd doppelte Abrisskraft (62 statt 37 pN).

Neben den zuvor beschriebenen Abrisskraftmessungen bei nur einer Zuggeschwindigkeit lassen sich zusätzliche Informationen durch die Variation der Zuggeschwindigkeit gewinnen. In der als Kraftspektroskopie bezeichneten AFM-Technik wird die Änderung der wahrscheinlichsten Abrisskraft als Funktion der Zuggeschwindigkeit, d. h. der Kraftsteigerungsrate untersucht. Kraftspek-

troskopische Untersuchungen zwischen Antikörper und Antigen wurden in der Studie von Kienberger et al.<sup>[4]</sup> angestellt. Dort wurden Bindungsepitope einer Purpurchromophore untersucht, welche aus hexagonal angeordneten Bakteriorhodopsin-Proteinen besteht (**Abb. 2C**). Die mittleren Wechselwirkungskräfte zwischen einem an die AFM Spitze gebundenen gerichteten Antikörper und den Bindungsepitopen der Membran wurden bei unterschiedlichen Kraftsteigerungsraten bestimmt (**Abb. 2D**). Mit Hilfe dieser Daten konnten die Energielandschaft und die kinetischen Raten der Wechselwirkung errechnet werden.

### Kraftmikroskopie auf lebenden Zellen

Ein großer Vorteil von AFM Messungen besteht darin, dass sie unter physiologischen Bedingungen möglich sind. Dies kommt v. a. bei Untersuchungen von Zellen zum Tragen. So können lebende Zellen unter dem Einfluss verschiedener Faktoren (pH-Wert, Temperatur, Inhibitoren, etc.) untersucht und gesunde mit kranken Zellen verglichen werden. In einer Studie von Puntheeranurak et al.<sup>[5]</sup> wurden mit einem Natrium-Glukose-Kotransporter transfizierte CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary Cells, **Abb. 3A**) untersucht und mit Kontroll-CHO-Zellen ohne Kotransporter verglichen. Gegen den Transporter gerichtete Antikörpermoleküle bzw. die vom Transporter zu transportierenden Glukosemoleküle wurden über PEG-Ketten an verschiedene AFM-Spitzen gebunden und ihre Wechselwirkungskräfte mit dem in der Zellmembran befindlichen Kotransporter gemessen. Die Bindungswahrscheinlichkeit zwischen dem Transportkanal des Proteins und dem Antikörpermolekül (**Abb. 3B**) sank bei Zugabe von ungebundenem Antikörper von 11 % auf 4 %, was die Spezifität der Bindung belegt. Durch Auswaschen des Antikörpers kam es wiederum zu einer Erhöhung der Bindungswahrscheinlichkeit. Analoge Resultate wurden auch bei der Wechselwirkung zwischen Glukose und dem Kotransporter und durch Blockierung mit dem Inhibitor Phlorozin (**Abb. 3C**) erhalten. Messungen an nicht transfizierten CHO-Zellen (schwarze Balken) zeigten hingegen keine spezifische Wechselwirkung.



▲ **Abb. 3:** Molekulare Erkennung auf Zellen: **(A)** Topographische Details der Oberfläche von lebenden Zellen sind in AFM-Bildern erkennbar (links Topographie, rechts Fehlerbild). **(B)** Kraftmikroskopische Untersuchungen mit einem Antikörper oder **(C)** mit Glukose als Ligand an der Mess-Spitze zeigen spezifische Wechselwirkungen mit dem Natrium-Glukose-Kotransporter in den Zellmembranen. Die Bindungswahrscheinlichkeit verringert sich durch Zugabe von ungebundenen Antikörpern (bei Antikörper besetzter Spitze) oder durch Zugabe des Inhibitors Phlorozin (bei Glukose besetzter Spitze). Auswaschen der zugegebenen Antikörper bzw. des Phlorozins erhöht die Bindungswahrscheinlichkeit wieder. Entnommen aus Puntheeranurak et al.<sup>[5]</sup>.

### Literatur

- [1] Binnig, G., Quate, C.F. and Gerber, C., (1986): Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* 56: 930-933.
- [2] Riener, C.K., Stroth, C.M., Ebner, A., Klampfl, C., Gall, A.A., Romanin, C., Lyubchenko, Y.L., Hinterdorfer, P., Gruber, H.J., (2003): Simple test system for single molecule recognition force microscopy. *Analytica Chimica Acta* 479: 59-75.
- [3] Ebner, A., Kienberger, F., Huber, C., Kamruzzahan, A.S.M., Pastushenko, V.P., Tang, J., Kada, G., Gruber, H.J., Sleytr, U.B., Sara, M. and Hinterdorfer, P. (2006): Atomic-force-microscopy imaging and molecular-recognition-force microscopy of recrystallized heterotetramers comprising an S-layer-streptavidin fusion protein. *ChemBiochem: a European Journal Of Chemical Biology* 7: 588-591.
- [4] Kienberger, F., Kada, G., Mueller, H. and Hinterdorfer, P., (2005): Single molecule studies of antibody-antigen interaction strength versus intra-molecular antigen stability. *Journal of Molecular Biology* 347: 597-606.
- [5] Puntheeranurak, T., Wildling, L., Gruber, H.J., Kinne, R.K.H. and Hinterdorfer, P., (2006): Ligands on the string: single-molecule AFM studies on the interaction of antibodies and substrates with the Na<sup>+</sup>-glucose co-transporter SGLT1 in living cells. *Journal Of Cell Science* 119: 2960-2967.



**Korrespondenzadresse:**  
 Prof. Dr. Peter Hinterdorfer<sup>1</sup>  
 Dr. Hermann J. Gruber<sup>2</sup>  
 Andreas Ebner<sup>3</sup>  
 Institut für Biophysik  
 J. Kepler Universität Linz  
 Altenbergerstraße 69  
 A-4040 Linz  
 Tel.: 0043-732 2468 9265  
 Fax: 0043-732 2468 9270  
 peter.hinterdorfer@jku.at  
 hermann.gruber@jku.at  
 andreas.ebner@jku.at