

Manipulation und Analyse der Topographie von Proteinstrukturen in Flüssigkeit mit dem Rasterkraftmikroskop

Von der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von
Dipl. Phys. Frank Leisten
geboren am 12.10.1974 in Großburgwedel

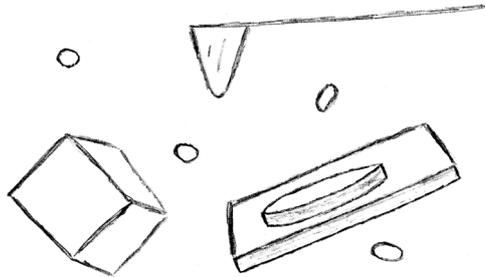
2008

Referent: Prof. Dr. Hans-Albert Kolb

Korreferent: PD Dr. Carsten Zeilinger

Tag der Promotion: 27.06.2008

Manipulation und Analyse der Topographie von Proteinstrukturen in Flüssigkeit mit dem Rasterkraftmikroskop



Von der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Phys. Frank Leisten

geboren am 12.10.1974 in Großburgwedel

2008

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Kurzbeschreibung	4
Abstract	5
1 Einleitung	6
1.1 Proteine.....	6
1.2 Proteinadsorption.....	6
1.3 Proteinkristallisation.....	10
2 Materialien und Methoden	17
2.1 Rasterkraftmikroskop	17
2.1.1 Messprinzip	17
2.1.2 Kraft-Distanz-Modus.....	18
2.1.3 Kontakt-Modus.....	19
2.1.4 Tapping-Modus	20
2.1.5 Linescan-Variation	20
2.1.6 Gleitstrecke im Kraft-Distanz-Modus	21
2.1.7 Das Veeco-AFM.....	21
2.1.8 AFM-Spitzen	22
2.1.9 Regelung der Proben temperatur	23
2.1.10 Bildbearbeitung	25
2.1.11 Volumenmessung	25
2.2 Rasterelektronenmikroskop.....	26
2.3 Probenträger	26
2.3.1 Gold-Probenträger	26
2.3.2 Muskovit-Probenträger.....	27
2.4 Lysozym	27
2.5 Lösungen mit Lysozym	28
2.6 Omp32.....	29
2.7 Lösungen mit Omp32	29
2.8 Kristallisation von Omp32	29
3 Resultate	31
3.1 Generation von Lysozym-Muster auf Muskovit in Flüssigkeit.....	31
3.1.1 Erzeugung rechteckiger Lysozym-Monoschichten im Kontakt-Modus	31
3.1.2 Erzeugung linienförmiger Lysozym-Muster im Kontakt-Modus.....	34
3.1.3 Sind die Muster wirklich aus Lysozym?	36

3.1.4	Lysozym-Muster durch stationären Kontakt?	37
3.1.5	Erzeugung von Lysozym-Muster im Kraft-Distanz Modus	37
3.1.6	Erzeugung von Lysozym-Monoschichten im Tapping-Modus	42
3.1.7	Veränderung einer Lysozym-Monoschicht im Tapping-Modus	44
3.1.8	Erzeugung von 3D-Lysozym-Aggregaten im Tapping-Modus	44
3.1.9	Unterschiede im Schreibverhalten individueller AFM-Spitzen	46
3.1.10	Variation der NaCl-Konzentration	48
3.2	3D-Kristalle von Omp32 in Flüssigkeit	49
3.2.1	Vorhergehende AFM-Messungen auf Omp32-Kristallen	50
3.2.2	Suche nach geeigneten "Lösungsbedingungen"	52
3.2.3	AFM Messungen auf Omp32-Kristallen	56
3.2.4	Auswahl analysierbarer Kristallformen	59
4	Diskussion	62
4.1	Erzeugung von Lysozym-Muster in Flüssigkeit	62
4.1.1	Die erzeugten Muster bestehen aus Lysozym	62
4.1.2	Proteinkonzentration und Ionenstärke	63
4.1.3	Elektrostatische Potentiale	65
4.1.4	Spontane Adsorption von Lysozym	71
4.1.5	Erzeugung von Lysozym-Monoschichten im Kontakt-Modus	74
4.1.6	Erzeugung von 3D-Lysozym-Aggregaten	79
4.1.7	Erzeugung von Lysozym-Muster im Tapping-Modus	80
4.1.8	Anwendbarkeit der Erzeugungsmethode für weitere Substanzen	82
4.1.9	Ausblick	83
4.2	3D-Kristalle von Omp32 in Flüssigkeit	86
4.2.1	Zuordnung der Kristallebenen	86
4.2.2	Wachstum der Omp32-Kristalle	89
4.2.3	Ausblick	90
5	Zusammenfassung	93
	Index	96
	Literaturverzeichnis	98
	Erklärung zur Dissertation	109
	Lebenslauf des Autors	110
	Danksagung und Widmung	112
	Publikationen des Autors	114

Kurzbeschreibung

In der vorliegenden Dissertation wurden mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie Proteinstrukturen in wässriger Lösung untersucht und erzeugt. Dabei konnte die Oberfläche dreidimensionaler Kristalle des transmembranen Proteins Omp32 in molekularer Auflösung untersucht werden. Im Gegensatz zu anderen Arbeiten, bei denen die Oberfläche von dreidimensionalen Membranprotein-Kristallen mit dem Rasterkraftmikroskop untersucht worden sind, konnten die Omp32-Kristalle in dem selben Medium untersucht werden, in dem sie zuvor gewachsen sind. Die Ergebnisse werden als Schritt zur Untersuchung des wenig verstandenen, aber für die Röntgenstrukturanalyse wichtigen Wachstumsprozesses dreidimensionaler Membranprotein-Kristalle diskutiert. Zudem wurden mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie Muster des löslichen Proteins Lysozym auf einer festen Oberfläche (Muskovit) in wässriger Lösung erzeugt. Es konnten dabei sowohl Lysozym-Monoschichten als auch 3D-Lysozym-Aggregate erzeugt werden. Damit wurde eine neue Art der Sondenlithographie entwickelt. Die neue Sondenlithographie wird mit bereits bekannten Lithographie-Methoden, vor allem aber mit der Dip-Pen Nanolithographie (DPN), verglichen. Sie kann, ähnlich der DPN, Proteinmuster mit einer Punktdichte und einer Lagegenauigkeit im nm-Bereich auf einer festen Oberfläche erzeugen. Im Gegensatz zur DPN arbeitet die hier vorgestellte Lithographie-Methode in Flüssigkeit und nicht an Raumluft. Vor- und Nach-Teile der neuen Lithographie-Methode werden erläutert. Die damit erzeugbaren 3D-Lysozym-Aggregate werden als künstliche Keime für die Proteinkristallisation diskutiert.

Schlagwörter: *Rasterkraftmikroskop, Lithographie, Proteinkristallisation*

Abstract

In the presented doctoral thesis, supported protein structures were generated and examined by atomic force microscopy in aqueous solution. Thereby, the surface of three-dimensional crystals of the membrane protein Omp32 could be analyzed at molecular resolution. In contrast to previous publications, in which surfaces of three-dimensional crystals of membrane proteins were studied with atomic force microscopy, the Omp32 crystals were analyzed in the same medium in which they were grown. The results are discussed as an important step for elucidating the process of membrane protein crystal growth, which is poorly understood and important for X-Ray structure analysis. Furthermore, mica supported patterns of the water soluble protein lysozyme were generated in aqueous solution by atomic force microscopy. Lysozyme monolayers as well as lysozyme 3D-aggregates could be generated on mica. Thereby, a new approach of probe-related patterning technique was developed. This patterning technique is compared with known patterning techniques, first of all the dip-pen nanolithography (DPN). The method allows, like DPN, to write nanometer-scaled protein pattern directly on a solid surface. In contrast to DPN, the presented patterning technique works in aqueous solution and not in air. The advantage of the new patterning technique is discussed. The 3D-aggregates of lysozyme, which were generated in aqueous solution, are discussed as artificial nuclei for protein crystal growth.

Keywords: *Atomic force microscopy, lithography, protein crystallization*

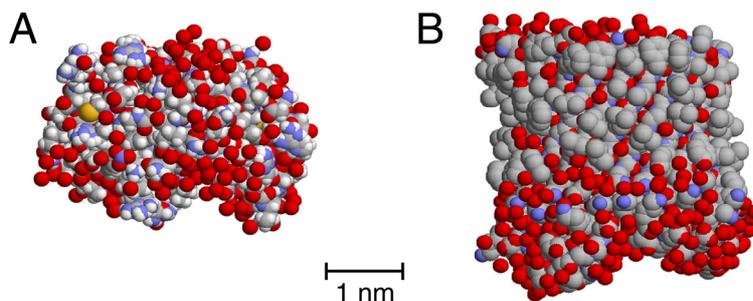


Abb. 1 Kalottenmodelle der in dieser Arbeit verwendeten Proteine Lysozym (**A**) und Omp32 (**B**). Jede gezeigte Kugel stellt dabei ein einzelnes Atom dar. Der Radius der Kugeln ist der Van-der-Waals-Radius. Die Farben der Kugeln orientieren sich am CPK-Modell [Kol65]. Beide Proteinmodelle wurden mit Hilfe der Software RASMOL (Bernstein + Sons, Bellport, NY 11713-2803, USA) und mit in der "RSCB Protein Data Bank" [RCS] von Wang et al., 2007 [Wan07] (A) bzw. [Zac06] Zachariae et al., 2006 (B) zur Verfügung gestellter Daten visualisiert.

1 Einleitung

1.1 Proteine

Proteine [Cam06] sind organische Moleküle [Mor03]. Ihre typische Masse beträgt 5 ku bis 200 ku [Cam06] ($u = 1,66 \cdot 10^{-27}$ kg = atomare Masseneinheit). Mit dieser Größe gehören die Proteine zur Klasse der *Makromoleküle*. Proteine sind aus Aminosäuren [Mor03] zusammengesetzt. Die Aminosäuren bilden mittels Peptidbindungen eine 1D-Kette, *Polypeptidkette* genannt [Str03]. Unter physiologischer Umgebung [Cam06] unterliegen diese Polypeptidketten einer 3D-Kneulbildung, *Faltung* genannt. Erst die Faltung macht aus einer Polypeptidkette ein funktionsfähiges Protein. In Abb. 1 sind die Kalottenmodelle zweier Proteine zu sehen.

Proteine werden von biologischen Organismen [Cam06] mittels der *Proteinbiosynthese* [Jos03] gebildet. Sie tragen maßgeblich zu den chemischen Prozessen innerhalb der biologischen Organismen bei. So dienen sie u. a. als Botenstoff, Stofftransporter, Katalysator, Ionenpumpe, oder als selektiver Kanal [Cam06]. Proteine werden deshalb auch als "molekulare Maschinen" oder "biologische Nanomaschinen" bezeichnet [Ser07, Gro06]. Bei der Verrichtung Ihrer Arbeit können die Proteine ihre Form ändern. Dies wird *Konformationsänderung* genannt [Cam06].

Man unterscheidet zwischen *globulären Proteinen* und *Membranproteinen*. Unter physiologischen Bedingungen befinden sich globuläre Proteine in wässriger Lösung, wohingegen sich Membranproteine auf der Oberfläche oder innerhalb einer Lipid-Doppelschicht [Cam06] befinden. Deshalb sind Membranproteine, im Gegensatz zu den globulären Proteinen, in der Regel nicht wasserlöslich.

1.2 Proteinadsorption

Die Adsorption von Proteinen auf festen Oberflächen ist ein fundamentales Phänomen, welches sowohl in der Biologie als auch für viele technische Anwendungen von Bedeutung ist [Cze06, Gra04, Nak01, Hla96].

In biologischen Organismen können adsorbierte Proteine die Mineralisierung [Bel96] und die Verknöcherung [Pai03] von Oberflächen beeinflussen, oder im Fall von sog. "Anti-Frost-Proteinen" auf Eiskristallen adsorbieren und so deren Vergrößerung verhindern [Lio00]. Bei der Entwicklung von biokompatiblen Oberflächen, wie sie z.B. bei Prothesen gebraucht werden, spielt die Proteinadsorption eine entscheidende Rolle [Rat04]. So gilt die Proteinadsorption als der erste Schritt bei der Inkorporation einer Prothese in einen biologischen Organismus. Diesem Schritt folgen die Zelladsorption und die Bildung einer Kollagenschicht, welche die Prothese ein Leben lang umgibt [Rat04]. In der analytischen Medizin nehmen adsorbierte Proteine in der Form von Protein-Biochips [Rus07, Wil03] ihren Platz ein. Auf diesen Chips befinden sich in Form einer Punkt-Matrix sortierte Proteine, welche durch Kontakt mit einer Probenlösung spezifische Bindungen mit dort vorkommenden Proteinen eingehen können. Durch die Analyse der Punktmatrix kann dann auf die Zusammensetzung der Probenlösung rückgeschlossen werden. Aufgrund des ähnlichen Prinzips, werden Protein-Biochips auch gerne als "die logische Nachfolge der DNA-Chips" bezeichnet [Rus07, Wil03]. Auf (Halb-) Leiter adsorbierte Proteine finden als Sensoren in der Bioelektronik Anwendung [Wil02, Dav05]. Bei so adsorbierten Proteinen können Konformationsänderungen als elektrischer Strom detektiert werden. Durch Wechselwirkungen von Proteinen und Nanopartikel, können sowohl Proteine dazu benutzt werden, Nanopartikel zu strukturieren, als auch Nanopartikel dazu benutzt werden, Proteine zu strukturieren [Kan07]. In der pharmazeutischen Forschung werden Zusammensetzungen aus Proteinen und Nanopartikel dazu benutzt, Medikamente innerhalb biologischer Organismen örtlich gezielt zu positionieren [Sut07]. Die Proteine können dabei die Organismen anregen, die Medikamente gezielt zu transportieren. Da die Proteinadsorption als der erste Schritt bei der Bildung von (in der Technik oft ungewollten) Biofilmen gilt [Nor07, Cze06], spielt die Proteinadsorption bei der Lebensmittelverarbeitung [Nor07, Nak01] als auch bei der Bekämpfung des "Biofouling" z. B. an Schiffsrümpfen [Whe06, Mor00ii] eine Rolle. Die Keimbildungsphase von auf Oberflächen adsorbierter Proteinkristalle, dessen Bedeutung in Abschnitt 1.3 erläutert wird, kann ebenfalls von der Proteinadsorption beeinflusst werden [Fer01, Schap97], da die Proteinadsorption die Orientierung der Proteine auf den Oberflächen bestimmen kann.

Die Proteinadsorption ist ein vielfach untersuchtes Phänomen. Da bei diesem Prozess aber viele treibende Kräfte wirken (Elektrostatik, Van-der-Waals, hydrophobe Wechselwirkung), die Proteine durch unterschiedliche Mechanismen miteinander in Wechselwirkung treten können und zudem bei der Adsorption etwaige Konformationsänderungen durchleben können, gilt die Proteinadsorption als kompliziert, schlecht verstanden und bleibt Gegenstand der aktuellen Forschung [Nak01, Gra04].

Bei der Untersuchung der Proteinadsorption diente das globale Protein Lysozym (siehe Abschnitt 2.4) schon seit vielen Jahren als Modellprotein [Ara90]. Mit dem "Surface Force Apparatus" wurden dabei die attraktiven, treibenden Kräfte zwischen Lysozym und der festen Oberfläche Muskovit (siehe Abschnitt 2.3.2) vermessen [Blo98, Blo94, Til93]. Spektroskopische Methoden wurden benutzt, um die Menge von adsorbierten Lysozym auf festen Oberflächen in Abhängigkeit von der Ionenstärke zu untersuchen [Rot95]. Mit numerischen Methoden wurde die Lysozymadsorption auf geladenen Oberflächen anhand der hauptsächlich dort wirkenden Kräfte (Elektrostatik und Van-der-Waals) simuliert [Car04, Obe97, Rot93]. Das *Rastertunnelmikroskop (STM)* und das *Rasterkraftmikroskop (AFM)* (siehe jeweils Abschnitt 2.1) wurden benutzt, um Anordnung [Kim02, Schap97, Hag93], biologische Aktivität [Rad94] und Menge in Abhängigkeit der Ionenstärke [Cza03, Rot95] von spontan adsorbierten Lysozym zu untersuchen. Dabei stellte sich u. a. heraus, dass die Menge von adsorbierten Lysozym auf negativ geladenen Oberflächen (wie z. B. Muskovit) mit der Ionenstärke stark variiert

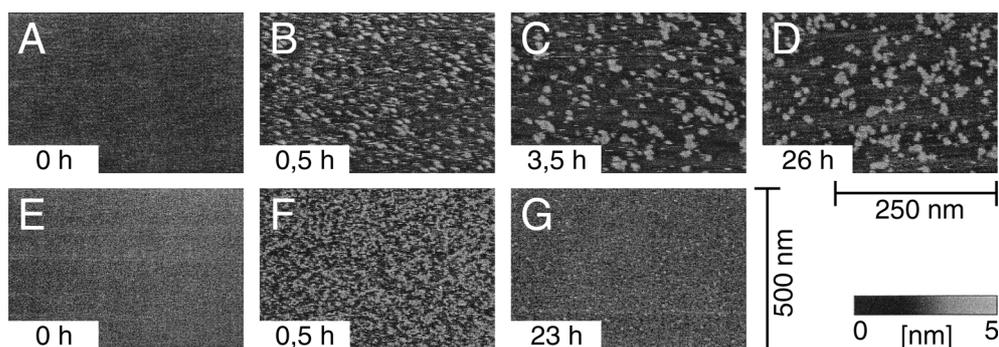


Abb. 2 Proteinadsorption: **A-D**: AFM-Topographiebildfolge (siehe Abschnitt 2.1.3) von verschiedenen 250 nm x 380 nm großen Ausschnitten ein und der selben Muskovit-Oberfläche (siehe Abschnitt 2.3.2) in einer Proteinlösung ("Kim-Lysozymbilösung", siehe Abschnitt 4.1.3). Jeweils links unten in den Bildern ist die Zeit t angegeben, die zwischen Bildaufnahme und Kontakt der Oberfläche mit der Proteinlösung vergangen ist. Bei $t = 0$ hatte das Muskovit noch keinen Kontakt zur Proteinlösung. Die hellen Punkte (B-D) sind adsorbiertes Protein (hier Lysozym). Man sieht, dass sich die Struktur des adsorbierten Proteins mit der Zeit ändert (Clusterbildung, siehe Abschnitt 4.1.4). Bei $t \geq 3,5$ h ist keine wesentliche Veränderung der Proteinstruktur mehr zu erkennen (vgl. C mit D). **E-G**: AFM-Topographiebildfolge von 500 nm x 760 nm großen Ausschnitten ein und der selben Muskovit-Oberfläche. Alle sonstigen Parameter wie bei A-D, aber mit 2,5-facher Proteinkonzentration (343 nM Lysozym). Bei $t = 23$ h ist die Oberflächenstruktur ähnlich der, wie bei $t = 0$. Eine lückenlose Lysozym-Monoschicht hat sich auf dem Muskovit gebildet [Kim02]. Der angegebene Farbcode rechts unten gilt für alle Bilder. Aus Kim et al., 2002 [Kim02].

[Rot93, Rot95]. In Abb. 2 ist als Beispiel die Adsorption von Lysozym auf einer Muskovit-Oberfläche anhand einer Rasterkraftmikroskop-Bildfolge dargestellt.

Bei Bestrebungen, die Adsorption von Proteinen und anderen Molekülen örtlich gezielt zu steuern (z. B. zur Herstellung von Proteinchips), sind viele unterschiedliche Druck- und Schreib-Techniken entwickelt worden [Bar06]. Jede von ihnen ermöglicht es jeweils auf ihre Weise, auf ebenen und teilweise auch gebogenen Oberflächen Proteilmuster von einer und teilweise auch von mehreren Proteinarten zu erzeugen. Die verwendeten Techniken reichen von "Photo-Lithography" [Moo96] über "Microstamping" [Xia98] und "Pin-Printing" [Wan03] bis hin zum "Inkjet-Printing" [All01].

Bei der Herstellung von Molekülmustern wird u. a. versucht, eine möglichst hohe *Punktdichte* (Anzahl unterscheidbarer Punkte im gedruckten Muster pro Fläche) zu erreichen, um möglichst präzise Druckmuster zu erzeugen, möglichst viele Reaktionen auf einem Proteinchip gleichzeitig auswerten zu können [Gin04], oder den Weg zur molekularen Elektronik [Dav05] zu ebnen. Dabei stellte die Entwicklung der *Sondenlithographie* [Wou04] einen wichtigen Schritt dar. Bei Sondenlithographien können mit Rasterkraft- oder Rastertunnel-Mikroskopen Oberflächen mit Punktgrößen von weniger als 10 nm chemisch oder physikalisch verändert werden [Wou04]. Im Hinblick auf biologische Makromoleküle ist dabei die 1999 erstmals vorgestellte *Dip-Pen Nanolithographie* (DPN) [Pin99, Gin04] besonders hervorzuheben.

Die Dip-Pen-Nanolithographie funktioniert ähnlich wie ein Stift ("Pen"), welcher in eine Tinte eingetaucht ("Dip") wird, um diese dann beim Schreiben ("Lithographie") auf einem Blatt Papier abzugeben. Da der "Stift" bei der DPN durch eine *AFM-Spitze* (siehe Abschnitt 2.4) repräsentiert wird, und diese mit einem AFM mit einer Lagegenauigkeit von ca. 1 nm über ein Substrat ("Blatt Papier") geführt werden kann, sind bei dieser Sondenlithographie Punktgrößen von bis zu 15 nm möglich [Gin04] (siehe Abb. 3 B). Die DPN arbeitet bei Raumluft. Der Molekültransport ("Tintentransport") von der AFM-

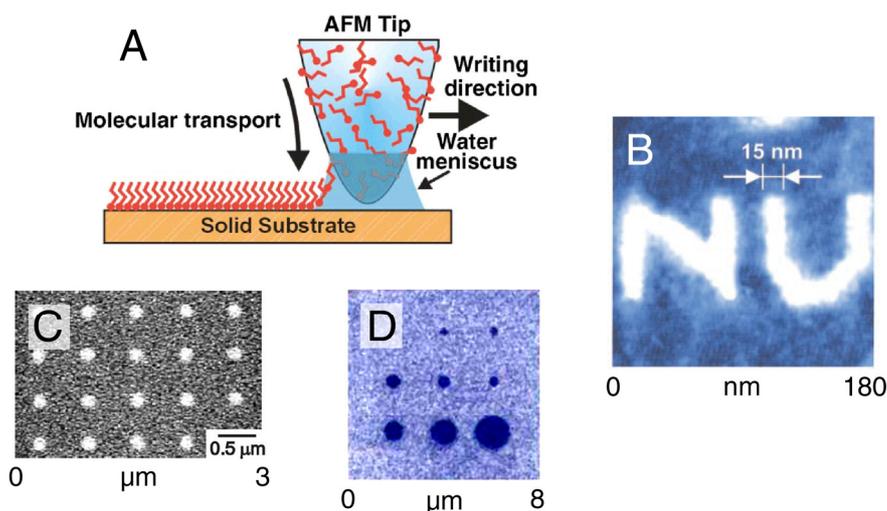


Abb. 3: Dip-Pen Nanolithographie (DPN): **A:** Mechanismus der DPN. Mit Molekülen (rot) benetzte AFM-Spitze wird nach rechts bewegt. Durch einen sich ausbildenden Wassermeniskus werden die Moleküle von der Spitze auf das Substrat transportiert. Aus Ginger et al., 2004 [Gin04]. **B-D:** AFM-Topographiebilder von mit DPN erzeugten Nanostrukturen. **B:** MHA-Thiole (16-mercaptohexadecanoic acid) auf Gold. Aus Hong et al., 1999 [Hon99]. **C:** Lysozym auf Gold. Aus Lee et al., 2002 [Lee02]. **D:** ODT-Moleküle (octadecane thiol) auf Gold. Kreisförmige ODT-Spots entstanden durch stationären Kontakt zwischen AFM-Spitze und dem Goldsubstrat. Kreisradius nimmt mit zunehmender Kontaktdauer zu. Aus Manandhar et al., 2003 [Man03].

Spitze auf das Substrat erfolgt bei der DPN über einen Wassermeniskus, welcher sich, abhängig von der relativen Luftfeuchtigkeit, aufgrund von Kapillarkräften zwischen der AFM-Spitze und dem Substrat ausbildet [Dem02]. In Abb. 3 A ist das Prinzip der DPN schematisch dargestellt. Die DPN wird in Ginger et al., 2004 als die vielleicht einzige Lithographie-Methode bezeichnet, welche sich anbietet, Muster aus biologischen und weichen organischen Strukturen bei hoher Punktdichte und Lagegenauigkeit (im nm-Bereich) auf Oberflächen zu erzeugen [Gin04].

Die DPN hat sich seit ihrer ersten Vorstellung 1999 weit entwickelt [Gin04]. So konnten mit der DPN unterschiedlichste Moleküle, wie z. B. Alkanthiole [Pin99, Hon99] (siehe Abb. 3 B+D), DNA [Dem02], magnetische Nanopartikel [Liu02], Polymere [Lim02], und Proteine [Lee03, Lim03] (siehe Abb. 3 C) auf Substrate wie z. B. Gold, Muskovit oder Silizium [Gin04] aufgebracht werden. Die Schreibgeschwindigkeit der DPN ist, wie bei allen Sondenlithographien, relativ langsam. Um diese zu erhöhen, konnten erfolgreich Methoden entwickelt werden, bei denen mehrere AFM-Spitzen parallel Moleküle auf Oberflächen übertragen [Hon00]. Durch die hohe Schreibdichte der DPN wäre es z. B. denkbar das gesamte menschliche Genom auf einem nur 4 cm^2 großen Chip zu adsorbieren (gerechnet bei einer Punktgröße von 150 nm). Mit den heutigen Methoden (Punktgröße von $20 \text{ }\mu\text{m}$) würde dies noch 10000 konventionelle Gen-Chips erfordern [Gin04].

In der vorliegenden Arbeit wird eine neue Methode der Sondenlithographie vorgestellt, mit der das Modellprotein Lysozym auf Muskovit als Substrat örtlich gezielt adsorbiert werden kann. Diese wurde in der Diplomarbeit [Lei04] erstmals vorgestellt und ist im Rahmen dieser Dissertation weiterentwickelt worden. Als Sonde dient bei dieser neuen Lithographie-Methode, ähnlich der DPN, eine AFM-Spitze. Dabei konnten Linien aus Lysozym-Monoschichten erzeugt werden, welche nicht breiter als 60 nm sind (siehe Abb. 12). Weiter können mit der neuen Methode auch 3D-Lysozym-Aggregate erzeugt werden (siehe Abb. 15 und Abb. 20).

Im Gegensatz zur DPN arbeitet die hier vorgestellte Methode in Flüssigkeit und nicht in Raumluft. Die Proteine, welche bei der hier vorgestellten Lithographie auf dem Substrat örtlich gezielt adsorbieren, befinden sich dabei auch innerhalb dieser Flüssigkeit. Durch den letztgenannten Umstand konkurriert die hier vorgestellte Lithographie-Methode mit der spontanen Proteinadsorption. Es mussten Bedingungen gefunden werden, welche die spontane Proteinadsorption benachteiligt und gleichzeitig die gezielte Proteinadsorption begünstigt. Deshalb nimmt die Betrachtung der spontanen Proteinadsorption in dieser Arbeit einen breiten Raum ein. Aber auch bei der Diskussion des der hier vorgestellten Lithographie-Methode zugrunde liegenden Mechanismus, spielt die Betrachtung der Proteinadsorption eine entscheidende Rolle: Nach einer hier diskutierten Theorie, adsorbieren die Proteine zunächst aus der umgebenden Flüssigkeit an die AFM-Spitze und werden dann, durch gleitenden Kontakt mit dem Substrat, an das Substrat abgegeben. Dieser Mechanismus ist in Abb. 34 schematisch dargestellt.

Die hier vorgestellte Lithographie-Methode besitzt all jene Eigenschaften, welche auch die DPN so besonders machen: Bei einer *Punktdichte* und einer *Lagegenauigkeit* im nm-Bereich können Moleküle *direkt* zu einer Oberfläche *hinzugefügt* werden. Die Vorteile der neuen Methode gegenüber der DPN werden diskutiert. Diese ergeben sich z. B. aus dem Umstand, dass die Moleküle, welche auf dem Substrat adsorbieren, zu keinem Zeitpunkt den flüssigen Aggregatzustand verlassen müssen oder an einer Grenzfläche mit Luft in Kontakt geraten. Zudem kann die hier vorgestellte Lithographie-Methode aus einem großen Reservoir an Molekülen schöpfen und muss nicht, wie es bei der DPN der Fall ist, regelmäßig in eine "Tinte" eingetaucht werden. Aber auch die Nachteile, welche sich vor allem durch die spontane und örtlich nicht gezielte Adsorption der Moleküle ergeben, werden kritisch erläutert.

Zudem werden mögliche Anwendungen der neuen Methode diskutiert. So könnten mit Hilfe dieser Methode Proteinstrukturen geschaffen werden, die es erlauben, die physikalischen Eigenschaften von Proteinfilmen an einer flüssig-festen Grenzfläche in Bezug auf ihre laterale Verschiebbarkeit zu vermessen. In Hinblick auf eine Anwendung im Bereich der Bioelektronik konnte in Wiechnann et al., 2006 [Wie06] gezeigt werden, dass mit der neuen Lithographie-Methode auch Muster von Gold-Nanopartikeln (Nanogold[®]) und Lysozym-Nanogold[®] Konjugat [Wie06] jeweils auf Muskovit erzeugt werden können. Es wird diskutiert, inwiefern sich die neue Lithographie-Methode auch auf noch weitere Substanzen ausweiten lässt. Mit der Beschreibung einer Methode, mit der Proteine durch den Scanprozess einer AFM-Spitze additiv auf eine feste Oberfläche in Flüssigkeit hinzugefügt werden können, ist zudem ein Effekt beschrieben worden, welcher bei zukünftigen Untersuchungen der Proteinadsorption mit dem AFM herangezogen werden kann. Weiter wird die mit dieser Methode mögliche Erzeugung von 3D-Proteinaggregaten in Flüssigkeit diskutiert, für die örtlich gezielte Keimung von Proteinkristallen dienen zu können.

1.3 Proteinkristallisation

Viele Proteine sind wasserlöslich. Selbst Membranproteine, deren Oberflächen in großen Teilen hydrophob sind, können mit Hilfe von Detergenz in Wasser gelöst werden. Die Löslichkeit eines Proteins in einer Lösung misst man durch die *Sättigungskonzentration* c_p^∞ . Sie beschreibt jene Proteinkonzentration, bei welcher ein Protein durch *Zugabe* dieses Proteins gerade noch gelöst werden kann [McP99]. Die Sättigungskonzentration hängt bei Proteinen von vielen Lösungsparametern ab. Besonders ausgeprägte Abhängigkeiten werden dem pH-Wert [Moh07], der Temperatur [Gui92], dem Zusatz von

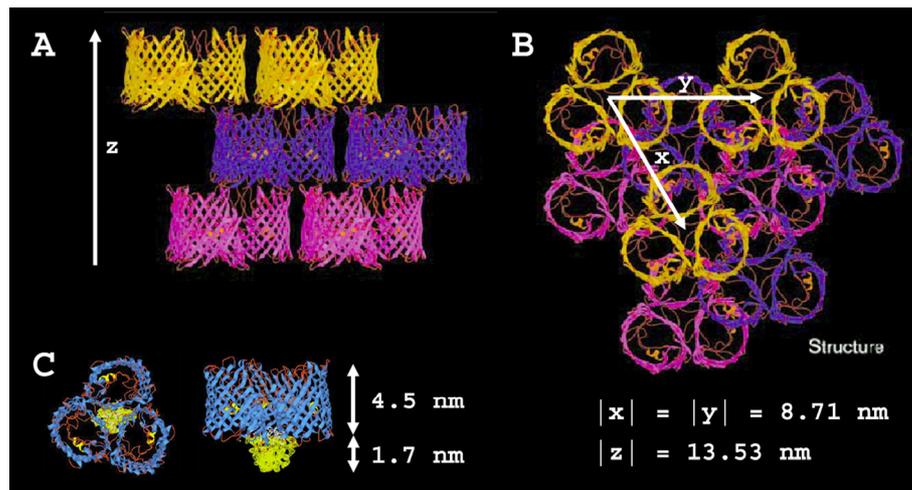


Abb. 4 Anordnung von Omp32-Trimeren innerhalb eines Proteinkristalls der rhombohedrischen "Kristallform 2". **A:** Sechs Trimere aus einer senkrecht zur z-Achse stehenden Richtung betrachtet. Zur besseren Orientierung wurden die drei sichtbaren, lateral zueinander verschobenen Kristallebenen jeweils einer eigenen Farbe zugeordnet. **B:** Drei Trimere pro Kristallebene aus Richtung der z-Achse. Die drei sichtbaren Kristallebenen wurden mit dem aus (A) bekannten Farb-Code versehen. **C:** Ein einzelnes Trimer aus zwei unterschiedlichen Orientierungen. In dieser Teilabbildung wurde das Co-kristallisierte Peptid nicht versteckt und farblich grün markiert. Das Peptid formt einen auf der periplasmatischen Seite entlang der z-Achse 1.7 nm überhängenden Cluster. Aus Zeth et al., 2000 [Zet00]. Die Gitterachsen und deren Längen wurden der Grafik hinzugefügt.

Ionen [Gui92] und, bei den nicht wasserlöslichen Membranproteinen, dem Zusatz von Detergenz [Gar90] zugeschrieben.

Sei c_p die Proteinkonzentration einer Lösung. Dann ist das dimensionslose Maß der *Übersättigung* β definiert als

$$\beta = \frac{c_p}{c_p^{\infty}}. \quad (1)$$

(Anmerkung: In der Literatur wird als Maß für die Übersättigung auch gerne $\sigma = \ln(\beta)$ verwendet [Mal94]).

In Lösung können sich Proteine flüchtig zu Oligomeren und Clustern zusammenfügen [McP99]. Erst ab einer bestimmten Größe mit einem Radius, welcher der *kritische Radius* genannt wird, haben diese flüchtigen Verbindungen Bestand und können sich kristallin zu einem Kristallkeim anordnen [McP99]. Aus diesen kann dann ein Proteinkristall entstehen. Mit zunehmender Übersättigung gewinnen diese flüchtigen Cluster an Größe [Mal94], der kritische Radius nimmt ab [Mal94], und die Wahrscheinlichkeit, dass aus den flüchtigen Verbindungen ein Kristallkeim entsteht, nimmt zu [Gar03]. Proteinkristallkeime bilden sich für gewöhnlich erst bei $\beta > a$ mit $a > 1$ [Gar03]. Hat eine Lösung eine Übersättigung von $1 < \beta < a$, so befindet sie sich in der sog. *metastabilen Phase* [Gar03]. In dieser Phase können bereits vorhandene Kristalle weiterwachsen, aber keine neuen entstehen.

Mit einem Kristall aus Makromolekülen kann man mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse [Cam06] (siehe Abb. 5) die atomare, dreidimensionale Struktur des durchschnittlichen, den Kristall bildenden Makromoleküls erhalten (siehe Abb. 1). Hat man die Struktur eines solchen Moleküls atomar aufgelöst, so kann versucht werden seine biologische Funktion auf atomarer Ebene zu verstehen. Dies ist in vielen Fällen gelungen. So konnte mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse, um nur zwei Beispiele zu nennen, die Struktur der

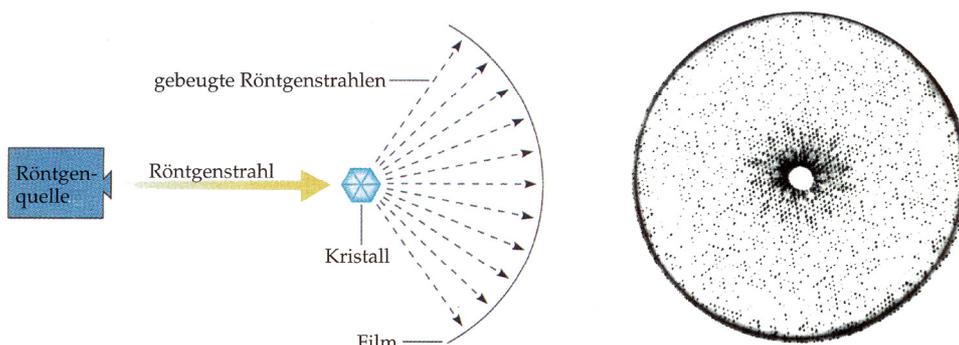


Abb. 5 Schematische Darstellung der Röntgenstrukturanalyse. Eine Röntgenquelle (links) sendet Röntgenstrahlen durch einen Kristall. Dort werden die Strahlen gebeugt. Auf einem sich dahinter befindlichen Röntgen-Film (Mitte) ergibt sich ein Beugungsmuster (rechts). Daraus lassen sich Rückschlüsse auf das Kristallgitter, als auch auf die atomare Struktur der durchschnittlichen Einheitszelle des Kristalls machen [Cam06]. Aus Campbell et al., 2006 [Cam06].

DNA entschlüsselt werden, mit deren Hilfe auf den Vervielfältigungsmechanismus der genetischen Erbsubstanz geschlossen werden konnte [Wat53] und es konnte die Struktur des Proteins Rhodopsin entschlüsselt werden, wodurch seine Funktion als Photosensor (z. B. im menschlichen Auge) auf molekularer Ebene verstanden werden konnte [Pal00].

Um die Röntgenstrukturanalyse anwenden zu können, müssen sich die zu untersuchenden Makromoleküle zu möglichst reinen, homogenen und großen dreidimensionalen Kristallen zusammenfügen [McP04]. Dies stellt auf dem Weg der Strukturaufklärung mittels der Röntgenstrukturanalyse einen der schwierigsten Schritte dar [Qut04, McP01]. Um diesen Schritt zu umgehen, wurden weitere Methoden der Strukturaufklärung entwickelt, welche ohne einen Kristallisationsschritt auskommen. Dabei gilt die Kernspinresonanz-Spektroskopie, welche auch *NMR*-Spektroskopie (**N**uclear **M**agnetic **R**esonance) genannt wird, als größter Konkurrent der Röntgenstrukturanalyse. Die NMR-Spektroskopie ist aber auf kleinere Makromoleküle beschränkt und löst die Struktur dieser Moleküle in der Regel geringer auf, als es die Röntgenstrukturanalyse vermag [Lac07]. Damit bleibt die Röntgenstrukturanalyse mit bis heute insgesamt 38638 aufgeklärten Proteinstrukturen (gegenüber ca. 6088 durch NMR) und allein 6300 Strukturaufklärungen im Jahr 2007 (gegenüber von 970 durch NMR) das wichtigste Verfahren zur Strukturanalyse von Proteinen. Andere Verfahren, mit denen insgesamt bis heute 211 Proteinstrukturen aufgeklärt werden konnten, werden hier vernachlässigt ([RCS] stand: 5. Februar 2008).

Um das für die Röntgenstrukturanalyse nötige Kristallwachstum besser verstehen und dadurch optimieren zu können, sind zahlreiche Versuche unternommen worden [McP04, McP00]. Neben interferometrischen Methoden stellte sich dabei das AFM als besonders hilfreich heraus [McP00]. Zwar konnten mit dem AFM nur die Oberflächen der Kristalle untersucht werden, und es konnte das Kristallgitter auch nur in molekularer und nicht in atomarer Auflösung untersucht werden, dafür konnten Defekte und Abweichungen zur idealen Kristallstruktur *einzelner Moleküle* untersucht werden, während die Röntgenstrukturanalyse über den gesamten Kristall mittelt und dadurch nur Informationen über das *durchschnittliche* im Kristall vorkommende Molekül untersuchen kann.

Mit dem AFM konnten so z. B. die Oberflächen von zweidimensionalen Kristallen aus wasserlöslichen Proteinen wie z.B. Ferritin und Catalase [Fur98] und von zweidimensionalen Kristallen aus Membranproteinen, wie z.B. OmpF [Schab95], Bacteriorhodopsin [Mül95] und Connexin26 [Mül02] mit molekularer und teilweise auch in sub-

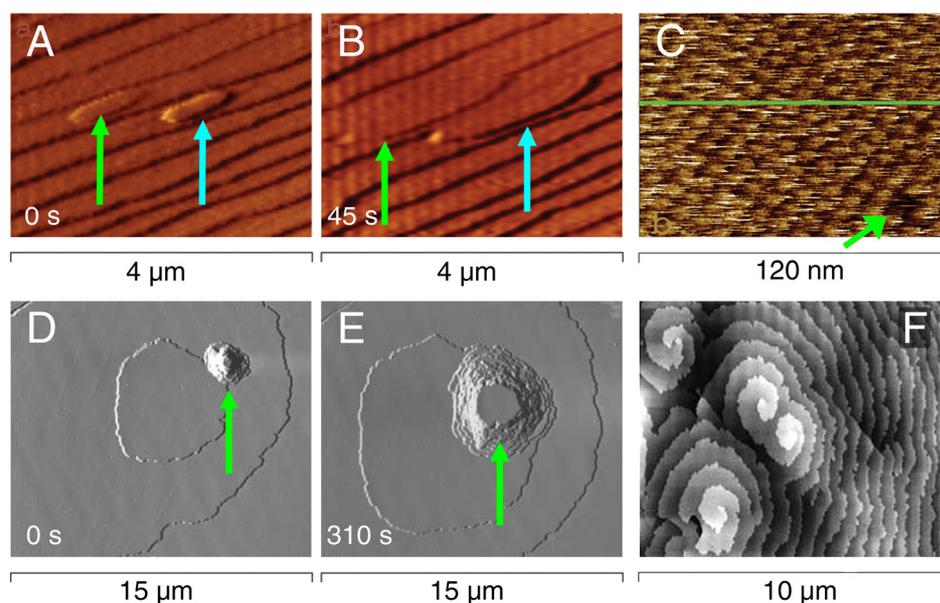


Abb. 6 A+B AFM-Deflektionsbildfolge, welche das Wachstum der (110)-Ebene eines tetragonalen Lysozym-Kristalls zeigt. A und B zeigen beide den selben Ausschnitt einer Kristalloberfläche. B wurde 45 Sekunden nach A aufgenommen. Schwarze (weiße) Linien entsprechen Kristallstufen, welche von links nach rechts gesehen in die Bildebene hinein (hinaus) zeigen. Die beiden Pfeile zeigen auf zwei Kristallschichten, welche durch die sog. 2D-Keimbildung initiiert worden sind. **C:** AFM-Topographiebild der (110)-Ebene eines tetragonalen Lysozym-Kristalls in molekularer Auflösung. Der Pfeil zeigt auf eine Fehlstelle des Kristallgitters. **D+E:** AFM-Deflektionsbildfolge, welche das Wachstum der (111)-Ebene eines kubischen STMV-Kristalls zeigt (STMV steht für Sattelite Tobacco Mosaic Virus). D und E zeigen den selben Ausschnitt einer Kristalloberfläche. E wurde 310 Sekunden nach D aufgenommen. Es gilt der gleiche Farbcode, wie er zu A+B beschrieben worden ist. Der Pfeil zeigt auf Kristallschichten, welche durch die sog. 3D-Keimbildung initiiert worden sind. **F:** AFM-Topographiebild der Oberfläche eines Canavalin-Kristalls. Es sind sog. Schraubenversetzungen zu sehen. A-C: Aus Wiechmann et al., 2001 [Wie01]. D-F: Aus McPherson et al., 2003 [McP03].

molekularer Auflösung samt Konformationsänderung [Mül02] untersucht werden. Bei den für die Röntgenstrukturanalyse notwendigen dreidimensionalen Kristallen konnten die Oberflächen vieler Kristalle aus wasserlöslichen Proteinen mit molekularer Auflösung untersucht werden [McP01]. Dabei konnten verschiedenartige Kristalldefekte, welche die Homogenität und die Reinheit der Kristalle und damit auch die Röntgenstrukturanalyse negativ beeinflussen, gefunden werden. So sind mit dem AFM auf den Oberflächen von Proteinkristallen u. a. Schraubenversetzungen (siehe Abb. 6 F), Stapelversetzungen, Fremdkörpereinschlüsse, molekulare Fehlstellen (siehe Abb. 6 C) und in den Kristall eingebettete Mikrokristalle beobachtet worden [McP00].

In vielen Fällen konnte mit dem AFM das Wachstum von dreidimensionalen Kristallen löslicher Proteine zeitaufgelöst beobachtet werden [Wie01, McP03]. Einige Proteinkristalle, wie z. B. Kristalle aus Lysozym und Ferritin, etablierten sich aufgrund ihrer Stabilität gegenüber dem Scanvorgang der AFM-Spitze als Modellsysteme für diese Untersuchungen [McP03]. Es konnte dabei das sog. *normale Kristallwachstum* beobachtet werden, bei dem sich gelöste Proteine zufällig an beliebiger Stelle der Kristalloberfläche anlagern [Mal95]. Zudem konnte das sog. *laterale Stufenwachstum* (siehe Abb. 6) beobachtet werden, welches für Proteinkristalle der am häufigsten vorkommende Wachstumsprozess ist [McP99]. Bei diesem Prozess lagern sich die Proteine vorzugsweise an den Kristallstufen an. Die Kristallstufen entstehen durch zwei- oder dreidimensionaler Keimbildung auf den Kristalloberflächen, welches ebenfalls mit dem AFM beobachtet werden konnte [McP03, Wie01, Mal95] (siehe Abb. 6 A, B, D und E). Die Häufigkeit

dieser Keimbildung und die Geschwindigkeit, mit welcher die Kristallstufen durch das Wachstum der Kristallschichten über die Kristalloberfläche wandern, konnte in Abhängigkeit von der Übersättigung β mit dem AFM untersucht werden [Gor05, Lan97, Mal96].

Zudem konnte unter der Anwendung der Linescan-Variation gezeigt werden, dass sich die Proteine entweder stoßweise oder in Form von Proteinclustern an die Kristallstufen anlagern [Li99ii]. Die Größe dieser Wachstums-"Stöße" konnte dabei in Abhängigkeit der Kristalloberfläche, als auch in Abhängigkeit der Wachstumsrichtung beobachtet werden [Li99ii]. Des Weiteren wurde mit dem AFM beobachtet, dass unterschiedliche Lösungsbedingungen unterschiedliches Wachstumsverhalten der Kristalle zur Folge haben kann [Hei06, Lan97]. Unterschiedliches Wachstumsverhalten wiederum kann unterschiedliche Fehlerdichten im Kristallgitter zur Folge haben [Yos02, McP99]. In Arbeiten, welche AFM- und Röntgen-Daten miteinander kombinierten, konnte gezeigt werden, dass die Güte von Proteinkristallen bzgl. der Röntgenstrukturanalyse umso größer ist, je langsamer die Kristalle wachsen [Kad06, Yos02].

Es wird geschätzt, dass 20%-30% der Information von typischen Genomen für die Beschreibung von Membranproteinen genutzt wird [Kro01]. Membranproteine übernehmen für biologische Zellen wichtige Funktionen. So dienen sie z. B. als Rezeptor, Transporter (für Ionen, Wasser, Peptide oder Medikamente) oder als selektiver Kanal durch die Membran. Dadurch gelten sie für Medikamente als ein extrem interessantes Ziel [Lac07]. Dennoch sind von den bislang 38638 aufgeklärten 3D-Protein-Strukturen bis heute erst 621 Strukturen von Membranproteinen ermittelt worden ([RCS] stand: 5. Februar 2008). Anmerkung: Die meisten dieser Strukturen sind Folge-Strukturen (höhere Auflösung, Mutation) von weit weniger wirklich neu gefundenen Protein-Strukturen. Das Missverhältnis der Anzahl aufgeklärter Proteinstrukturen insgesamt zu der Anzahl aufgeklärter Membranprotein-Strukturen liegt nicht etwa daran, dass es nur wenige Bemühungen gegeben hätte, die Strukturen der Membranproteine zu entschlüsseln, sondern begründet sich vielmehr in der Tatsache, dass die 3D-Strukturen von Membranproteinen relativ schwer zu bekommen sind [Gra07]. Die Hauptschwierigkeiten für die Strukturklärung dieser Proteine liegen in der Beschaffung ausreichender Proteinmengen und in dem für die Röntgenstrukturanalyse nötigen Kristallisationsschritt [McP07, Gra07]. Gelingt es dennoch, eine noch nicht bekannte Struktur eines Membranproteins zu erhalten, so wird dem Ergebnis in der Regel eine große Aufmerksamkeit geschenkt. 47 von 51 neu gefundenen Strukturen von Membranproteinen konnten in den einflussreichen Zeitschriften "Nature", "Science" oder "Cell" veröffentlicht werden [Gra07]. Vier dieser Strukturaufklärungen halfen, den Nobelpreis zu gewinnen [Gra07].

1985 gelang es erstmals ein Membranprotein erfolgreich für die Röntgenstrukturanalyse zu kristallisieren [Dei85]. Benutzt wurde dafür eine Detergenz-basierte Methode. Dabei werden die Membranproteine durch Detergenz-Mizellen umschlossen und dadurch in wässriger Lösung gelöst. Bei der darauf folgenden Kristallisation können sich die Proteine samt dem Detergenz in das Kristallgitter einbauen [Hun03]. Die dafür nötige Übersättigung wird für gewöhnlich durch die Methoden der "hanging-drop-" oder "sitting-drop-vapor diffusion" [McP99] erreicht (siehe Abschnitt 2.8), durch welche sich die Proteinkonzentration in der Proteinlösung erhöht. Diese Methoden werden auch zur Kristallisation von löslichen Proteinen angewendet. Auch sonst gilt das Kristallwachstum bei der Detergenz-basierten Methode als ähnlich dem Kristallwachstum von löslichen Proteinen [Hun03]. Ersteres konnte allerdings bis jetzt noch nicht in molekularer Auflösung untersucht werden.

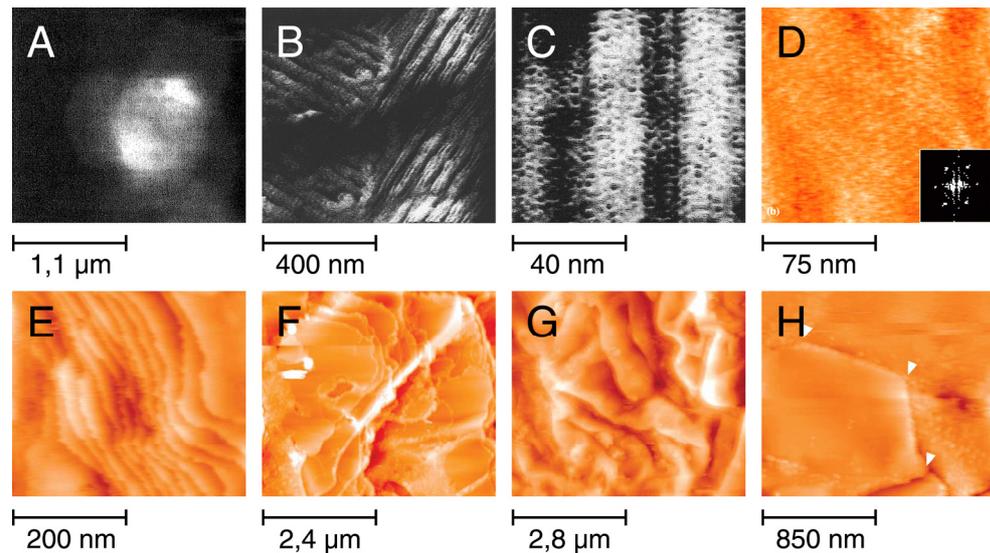


Abb. 7 AFM-Topographiebilder aus drei Arbeiten, welche bisher die Oberflächen von 3D-Kristallen aus Membranproteinen untersucht haben: **A**: Kristall aus Ca-ATPase in wässriger Lösung (Lacapère et al., 1992 [Lac92]). Bei dieser Arbeit konnte keine molekulare Auflösung erzielt werden. **B+C**: Kristall aus OmpC (Kim et al., 2000 [Kim00]). In dieser Arbeit wurden die Kristalle nur luftgetrocknet untersucht. Molekulare Auflösung konnte erreicht werden (C). Zwei ineinander geschachtelte, um 90° zueinander verdrehte Kristallgitter sind zu sehen (B). **D-H**: Kristall aus Rhodopsin in wässriger Lösung (Qutub et al., 2004 [Qut04]). Kristallisiert "in cubo". Molekulare Auflösung konnte erreicht werden (D). Als Inset ist rechts unten in D die Fourier-Analyse [Mor00] von D gezeigt. Stufen zwischen aufeinanderliegenden Kristallschichten konnten beobachtet werden (E+F). Ein kleinerer Protein-Kristall ist in einen größeren hineingewachsen (H). Die Oberfläche des Kristalls wird in Qutub et al., 2004 [Qut04] als "rau" bezeichnet (E-G). Die Farb-Skalierungen der Z-Achsen betragen "keine Angabe" (A), 1 nm (B+C), 10 nm (D), 50 nm (E), 350 nm (F), 1600 nm (G) und 250 nm (H). Bilder wurden im Kontakt-Modus (A, B, C, E) oder im Tapping-Modus (D, F, G, H) aufgenommen.

Ca. 12 Jahre später wurden zwei völlig neue Methoden der Kristallisation von Membranproteinen entwickelt [Caf03]. Eine Methode, welche anstatt der Detergenz-Vesikel aus Lipiden bestehende Doppelschicht-Vesikel benutzt [Tak98] und eine andere Methode, in der die Proteine sich innerhalb eines großen, dreidimensionalen Gitters einer Lipid-Doppelschicht befinden [Lan96]. Letztere Methode wird auch "Kristallisation in kubischer Lipidphase", oder kurz *in cubo* genannt. Dabei sind die Proteine so in die Lipid-Doppelschicht eingebaut, wie sie es auch in der Natur der Fall ist. Die Proteine können sich, wie in der Natur, in der Doppelschicht frei bewegen und sich so innerhalb des zusammenhängenden, dreidimensionalen Lipid-Gitters zu einem dreidimensionalen Kristall formen. Die großen Hoffnungen, welche in beide neuen Kristallisationsmethoden gesteckt worden sind, wurden enttäuscht [Caf03]. Die zuerst gefundene, Detergenz basierte Kristallisationsmethode blieb bis heute die erfolgreichste Kristallisationsmethode bei der Strukturaufklärung von Membranproteinen [Caf03].

Ebenso selten wie die Strukturdaten der Membranproteine, so selten sind auch die Untersuchungen des für die Röntgenstrukturanalyse nötigen Wachstumsprozesses der Membranprotein-Kristalle. So konnten nur drei Publikationen gefunden werden, bei denen die Oberflächen von Membranprotein-Kristallen mit einem Rasterkraftmikroskop untersucht werden konnten: [Qut04, Kim00, Lac92]. Alle drei Publikationen finden ihre jeweiligen Vorgänger-Publikationen ebenfalls nur innerhalb der Menge von Publikationen {[Qut04], [Kim00], [Lac92]}. AFM-Bilder aus allen drei Arbeiten sind in Abb. 7 gezeigt.

In Lacapère et al., 1992 [Lac92] konnte bei den dort in Flüssigkeit untersuchten dreidimensionalen Ca-ATPase-Kristallen keine molekulare Auflösung erreicht werden. Auch die Kristallstufen waren dort nicht zu erkennen (Abb. 7 A). In Kim et al., 2000 [Kim00] konnten die untersuchten OmpC-Kristalle in molekularer Auflösung im luftgetrockneten Zustand untersucht werden (Abb. 7 B+C). Im luftgetrockneten Zustand ist eine zeitaufgelöste Beobachtung des Kristallwachstums nicht möglich. Es konnten so nur Momentaufnahmen des Wachstums analysiert werden, aus denen dann auf ein Kristallwachstum mittels lateralen Stufenwachstums spekuliert worden ist. Erst in Qutub et al., 2004 [Qut04] konnte die Oberfläche dreidimensionaler Kristalle eines transmembranen Proteins erstmals in Flüssigkeit *und* in molekularer Auflösung dargestellt werden (Abb. 7 D-H). Dabei wurden Kristalle aus Bacteriorhodopsin verwendet. Diese wurden jedoch "in cubo" kristallisiert, wodurch die Kristalloberflächen dem AFM während des Kristallwachstums nicht zugänglich waren. Die Oberflächen wurden nach der Entfernung der umgebenden kubischen Lipidphase untersucht.

Die drei genannten Arbeiten zeigen demnach kein System auf, welches die Möglichkeit bieten würde, das Wachstum der Membranprotein-Kristalle zeitaufgelöst in molekularer Auflösung mit einem AFM untersuchen zu können, wie es zuvor bei etlichen Kristallen aus löslichen Proteinen gelungen ist.

In der vorliegenden Dissertation wurden dreidimensionale Kristalle des integralen Membranproteins Omp32 (siehe Abschnitt 2.6) mit einem Rasterkraftmikroskop in Flüssigkeit *und* in molekularer Auflösung untersucht. Im Gegensatz zu den in Qutub et al., 2004 [Qut04] untersuchten Kristallen, wurden die Omp32-Kristalle durch eine Detergenz-basierte Methode kristallisiert. Somit wäre an diesen Kristallen die Untersuchung des Wachstumsprozesses mit dem AFM in molekularer Auflösung prinzipiell möglich.

Die in dieser Dissertation präsentierten Untersuchungen an den Omp32-Kristallen (siehe Abschnitte 3.2.2 bis 3.2.4) basieren auf einer Vorarbeit von Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie] (siehe Abschnitt 3.2.1). Sowohl die von Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie] erhaltenen Daten, als auch die im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Daten werden in Abschnitt 4.2 gemeinsam diskutiert. Dabei konnten drei Kristalloberflächen eines Omp32-Kristalls einer bereits aus der Röntgenstrukturanalyse bekannten Kristallform [Zeth2000] zugeordnet werden. Durch die ebenfalls gefundenen Kristallstufen konnte auf das laterale Stufenwachstum als möglichen Wachstumsmechanismus geschlossen werden. Zudem wird das gefundene System diskutiert, als Modellsystem zur Untersuchung des Wachstumsprozesses von dreidimensionalen Membranprotein-Kristallen dienen zu können.

2 Materialien und Methoden

2.1 Rasterkraftmikroskop

Das *Rasterkraftmikroskop* (Abk.: *RKM*) [Bin86, Mor00] wird im englischen Sprachraum *Scanning Force Microscope* (Abk.: *SFM*) oder *Atomic Force Microscope* (Abk.: *AFM*) genannt. Die Abkürzung AFM ist auch in Deutschland üblich und wird im vorliegenden Schriftstück benutzt.

Das AFM ist ein Mikroskop [Ame98] und gehört zu den Rastersondenmikroskopen [Hie05]. Diese Mikroskope tasten die zu untersuchende Probe mit einer Sonde zeilenweise ab und zeichnen eine mikroskopabhängige Messgröße ortsabhängig auf. Beim AFM wird die Sonde durch eine harte und atomar feine Spitze (siehe Abschnitt 2.1.8) repräsentiert. Solche Spitzen werden hier *AFM-Spitzen* genannt. Die Messgröße des AFMs ist die Kraft zwischen der AFM-Spitze und der Probe. Dadurch kann z.B. auf die Topographie, die Elastizität oder die elektrische Ladung der Probe rückgeschlossen werden (siehe Abschnitte 2.1.2 und 2.1.3). Die maximale Ortsauflösung heutiger Rasterkraftmikroskope liegt bei 1 nm lateral und 0,1 nm vertikal. (Vergleich: Bei gewöhnlichen Lichtmikroskopen liegt die maximale Ortsauflösung bei 200 nm [Abb73].)

Im Gegensatz zu anderen hoch auflösenden Mikroskopen, wie z.B. dem *Rastertunnelmikroskop* [Bin82] oder dem *Transelektronenmikroskop* [Wil96], kann das AFM in Flüssigkeit messen und ist unabhängig von der Leitfähigkeit der Probe. Daher können mit einem AFM auch biologische Proben unter physiologischen Bedingungen bis in den molekularen Bereich aufgelöst werden. Das AFM ist im Gegensatz zu Transmissionsmikroskopen, wie z.B. dem Lichtmikroskop, auf die Untersuchung von Oberflächeneigenschaften beschränkt.

2.1.1 Messprinzip

In Abb. 8 A ist das Prinzip des AFMs dargestellt. Mit *Substrat* wird dort die Probenoberfläche bezeichnet. Sie ist der AFM-Spitze zugewandt. Die Probe ist am *Probentisch*, der Oberseite des *Scanners*, befestigt (nicht gezeigt). Der Scanner, welcher ein Teil des AFMs ist, ermöglicht die Position des Probentisches, und damit auch die des Substrates, in alle drei Raumrichtungen zu bewegen. Dafür werden *Piezo-Kristalle* benutzt, welche durch Anlegen elektrischer Spannungen ihre Form verändern können [Ger95]. Das AFM steuert diese elektrischen Spannungen und kann dadurch die Position des Substrates mit einer Genauigkeit von weniger als 1 Å bestimmen.

Das Substrat kann unter einer Wechselwirkungskraft Kontakt zur AFM-Spitze aufbauen. Diese Kraft wird *loading force* F_l bezeichnet. Die AFM-Spitze ist an einer (hier) dreieckigen Feder befestigt. Diese Feder wird *Cantilever* genannt. Der Cantilever wiederum ist am *Cantileverträger* befestigt. Das System aus AFM-Spitze, Cantilever und Cantileverträger ist in Abb. 8 A eingezeichnet. Beschriftet ist dort aber nur der grau unterlegte Cantileverträger.

Die Auslenkung des Cantilever verhält sich, bei den benutzten, kleinen Auslenkungen, nach dem Hookeschen Federgesetz [Kuc96]. Damit ist die Auslenkung proportional zur *loading force* F_l . Ein Laserstrahl wird auf den Cantilever so fokussiert, wie es in Abb. 8 A dargestellt ist. Der vom Cantilever reflektierte Laserstrahl erfährt bei einer Auslenkung des Cantilevers eine Richtungsänderung. Der Winkel dieser Richtungsänderung ist

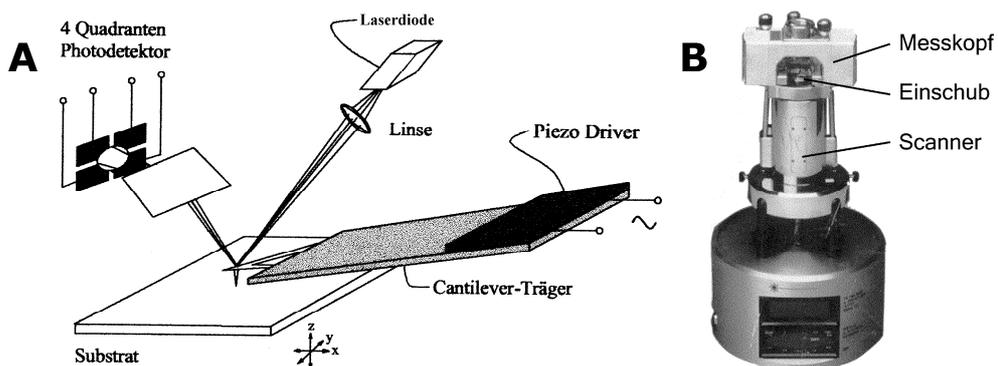


Abb. 8 A Das Arbeitsprinzip des Rasterkraftmikroskops ist schematisch dargestellt. Am Cantileverträger ist links der dreieckige Cantilever befestigt. Er übt eine Federkraft auf die unten an seiner Spitze befestigten AFM-Spitze aus. Das Substrat bezeichnet hier die Oberseite der Probe. Es ist am Scanner befestigt. Durch den Scanner kann das Substrat in alle drei Raumrichtungen bewegt werden. Der am Cantilever reflektierte Laserstrahl detektiert über den Fotodetektor die Verbiegung des Cantilevers. In **B** ist ein AFM des hier benutzen Typs "Veeco Multimode" abgebildet. Bei diesem Typ sind, abgesehen von dem am Scanner fixierten Substrat, alle in (A) bezeichneten Elemente am Messkopf befestigt. Dieser lässt sich über Mikrometerschrauben relativ zum Scanner bewegen. Über den Einschub kann man die Probe am Scanner und die AFM-Spitze am Messkopf befestigen. A ist aus Schauer et al., 2001 [Schau01] entnommen. B ist aus der Betriebsanleitung für das "Veeco Multimode", 1997 [DI97] entnommen.

bei den benutzten, kleinen Auslenkungen zur Auslenkung des Cantilevers proportional. Der reflektierte Strahl wird in einer solchen Weise durch einen Spiegel auf vier Fotodioden gelenkt, dass alle vier einen Teil des Lichtstrahls detektieren. Die vier Fotodioden werden in Abb. 8 A als "Vier-Quadranten-Photodetektor" zusammengefasst. Jede Fotodiode erzeugt bei entsprechender elektrischer Beschaltung einen zur einfallenden Lichtintensität proportionalen Strom. Aus den Stromdifferenzen der Fotodioden kann ein zu F_l proportionaler Strom ermittelt werden, der dem AFM zur Verfügung steht.

Da mit dem AFM sowohl die Position des Substrates bestimmt, als auch F_l vermessen werden kann, ist es möglich, F_l in Abhängigkeit des Ortes der AFM-Spitze auf dem Substrat aufzuzeichnen.

2.1.2 Kraft-Distanz-Modus

Im *Kraft-Distanz-Modus* des AFMs wird die Probe durch den Scanner bei einer festen x - und y -Position mit einer Frequenz f wiederholt durch einen vorgegebenen Bereich ΔZ der z -Position befördert (x , y und z orientieren sich am in Abb. 8 A eingezeichneten Koordinatensystem). Dabei kann sich der Cantilever verbiegen. In dem hier beschriebenen Betriebsmodus gibt das AFM auf seinem Ausgabebildschirm eine Kurve aus, bei dem die Cantileververbiegung auf der z -Position der Probe aufgetragen ist. Eine solche Kurve wird *Kraftkurve* genannt.

Sei s_d die *Deflektionsstrecke*, welche der Cantilever in z -Richtung von seiner Ruhelage ausgelenkt ist. Die Verbiegung wird in der Kraftkurve zunächst in einer zu s_d proportionalen Spannung U_d angegeben. In einem Höhenbereich ΔZ steigt die Verbiegung s_d mit der Probenhöhe z proportional an. Dies ist auch in der Kraftkurve sichtbar. Anhand dieses Anstieges kann die Verbiegung kalibriert werden. Nach der Kalibrierung wird die Verbiegung nicht mehr entsprechend U_d in Volt, sondern entsprechend s_d in

nm angegeben. Als Beispiel ist in Abb. 27 A eine Kraftkurve mit bereits kalibrierter Verbiegungs-Skala gezeigt.

Anders als in den weiter unten beschriebenen Betriebsmodi des AFMs, in denen die AFM-Spitze über weit längere Zeit auf dem Substrat verweilt, gibt es im Kraft-Distanz Modus die Möglichkeit in besonders kleinen Zeitintervallen T ($T = 1/f$, für gewöhnlich ist $T < 1$ s) die Ruheposition des Cantilevers jeweils neu zu bestimmen. Dadurch kann man im Kraft-Distanz Modus die wirkende loading force besonders gut kontrollieren.

2.1.3 Kontakt-Modus

Im *Kontakt-Modus* wird mit der AFM-Spitze auf der Probenoberfläche ein Rechteck \mathbf{F} zeilenweise abgefahren. Dies geschieht unter Bewegung der Probe durch den Scanner. Anzahl der Zeilen, Abtastgeschwindigkeit, Breite, Länge und Lage von \mathbf{F} sind durch die AFM-Software einstellbar. Die Anzahl der Zeilen, die pro Sekunde abgefahren werden, wird *Scannrate* genannt. Die Achse, die in Richtung der Zeilen zeigt nennt sich *Fast Scan-Axis*. Die auf der Ebene von \mathbf{F} senkrecht dazu liegende Achse nennt sich *Slow Scan-Axis*. Die Höhe der Probe z wird vom AFM durch eine PID-Reglung (siehe Abschnitt 2.1.9) so eingestellt, dass die Probe mit möglichst konstanter Verbiegung s_d^{soll} abgetastet wird. s_d^{soll} ist einstellbar. Aus dem Abtastvorgang folgt, über den abgetasteten Zeilen von \mathbf{F} , die Information von $z(x, y)$. Daraus erstellt die DI-Software ein *Topographiebild*. Jeder abgetastete Punkt $(x; y)$ erscheint in einem solchen Topographiebild an der entsprechenden Stelle in einer mit einer Farbskala $Farbe(z)$ der Höhe z zugeordneten Farbe. In Abb. 11 E ist ein solches Topographiebild zu sehen. \mathbf{F} ist dort eine quadratische Fläche von $3 \times 3 \mu\text{m}^2$. Die dazugehörige Farbskala $Farbe(z)$ ist unter Abb. 11 C eingezeichnet.

Bei einer Regelung kann die Regelgröße s_d vom Sollwert s_d^{soll} abweichen. Sind die Parameter der PID-Reglung angemessen eingestellt, so gilt:

Bei bzgl. der Abtastrichtung ansteigender Probenoberflächenhöhe ist $s_d > s_d^{soll}$. Bei abfallender Probenoberflächenhöhe ist es umgekehrt. $s_d - s_d^{soll}$ entspricht dem *Fehler* den z gegenüber der Probenoberflächenhöhe aufgrund einer nicht unendlich schnellen PID-Höhenregelung hat.

Ein Bild, in dem man $s_d(x, y) - s_d^{soll}(x, y)$ ähnlich wie in dem zuvor beschriebenen Topographiebild darstellt, nennt man deshalb auch *Deflektionsbild*. Da in dieser Dissertation diskutierte Höhenunterschiede von Proben nur aus den Topographiebildern gewonnen werden, wurde bei den Deflektionsbildern auf die Darstellung der Farbskala $Farbe(s_d - s_d^{soll})$ verzichtet. Eine hellere (dunklere) Farbe bedeutet dort grundsätzlich ein Anstieg (Abfall) der Höhe in Richtung der "Fast Scan-Axis". Ein Beispiel eines Deflektionsbildes ist in Abb. 6 A dargestellt. Dort läuft die "Fast Scan-Axis" nach rechts. Demnach stellt eine helle (dunkle) Farbe eine von links nach rechts ansteigende (abfallende) Stufe dar. Der Vorteil in der Deflektionsbild-Darstellung liegt im Vergleich zur Darstellung durch ein Topographie-Bild darin, dass sich benachbarte Objekte mit geringer Höhendifferenz, auch bei einer über das Bild verteilten großen Höhendifferenz, noch gut voneinander unterscheiden lassen.

2.1.4 Tapping-Modus

Beim Kontakt-Modus besteht während des Abtastens instabiler Proben die Gefahr der Materialmitnahme durch die AFM-Spitze. Hier ist es besser nur punktwise in das Kraftfeld der Probe "einzutauchen". Genau dies geschieht beim *Tapping-Modus*. Hierzu wird der Cantilever mit Hilfe eines Piezzo-Kristalls zum Schwingen gebracht (getriebener, gedämpfter, harmonischer Oszillator. In Enders et al., 2004 [End04ii] wird eine alternative Methode zur Cantileveranregung beschrieben). Frequenz f und Amplitude A der Schwingung ist über die Wechsellspannung, welche an dem Piezzo-Kristall anliegt, einstellbar.

Um hinreichend große Amplituden A zu erzielen, muss f in der Nähe der Resonanzfrequenz des Cantilevers f_{res} liegen. Befindet sich der Cantilever noch nicht im Kontakt mit der Probe, so wird die Amplitude des Cantilevers *freie Amplitude* A_f genannt. Bei Probenkontakt verringert sich A . Die Differenz $d = A_f - A$ wird *Dämpfung* genannt.

Bei der rasterförmigen Bildabtastung wird hier nicht wie beim Kontakt-Modus auf die Verbiegung des Cantilevers s_d , sondern auf die Amplitude A geregelt. Der Sollwert A_{soll} ist einstellbar. Der Stellwert der Regelung ist wie beim Kontakt-Modus die Höhe der Probe z . Auch beim Tapping-Modus ergibt sich sowohl ein Topographiebild aus $z(x, y)$ als auch ein Deflektionsbild, allerdings aus $A(x, y) - A_{soll}(x, y)$. $A - A_{soll}$ kann man mit Hilfe einer Tapping-Modus-Kraftkurve einer Höhe z_{Fehler} zuordnen. z_{Fehler} entspricht dem *Fehler*, den z gegenüber der Probenoberflächenhöhe aufgrund nicht unendlich schneller PID-Höhenregelung hat. In Abb. 18 A ist eine im Tapping-Modus aufgenommene Topographie zu sehen. Die zugehörige Farbskala $Farbe(z)$ (siehe Abschnitt 2.1.3) ist rechts neben der Topographie zu sehen.

Im Tapping-Modus ist es schwer, die zwischen Probe und AFM-Spitze wirkenden Kräfte abzuschätzen. Sie resultieren aus der Trägheit des Cantilevers und, im Falle einer Flüssigmessung, aus den Verwirbelungen der Flüssigkeit. Die Wechselwirkungskraft zwischen AFM-Spitze und Probe nimmt mit zunehmender Dämpfung d ausgehend vom Startpunkt $d = 0$ zu. Es ist jedoch nicht davon auszugehen, dass jegliche weitere Erhöhung von d eine Erhöhung der Wechselwirkungskraft zur Folge hat.

2.1.5 Linescan-Variation

Die von der DI-Software zur Verfügung gestellte *Linescan-Variation* kann sowohl den Kontakt-Modus als auch den Tapping-Modus in seiner Funktion variieren. Anstatt eine auf der Probenoberfläche befindliche Fläche F mit der AFM-Spitze zeilenförmig abzutasten, wird in der Linescan-Variation wiederholt die selbe Zeile abgetastet. Die Frequenz f , mit der dies geschieht, kann ebenso wie Lage und Länge der Zeile über die AFM-Software eingestellt werden. Am bildgebenden Monitor des AFMs kann sowohl aus den Topographie- ($z(x)$) als auch aus den Fehlerinformationen ($s_d(x)$) ein Bild erstellt werden. Diese Bilder ähneln den entsprechenden Bildern der Betriebsmodi ohne Linescan-Variation. Ihr Unterschied liegt darin, dass auf der y -Achse die Dimension der Zeit aufgetragen wird. Entlang der y -Achse lässt sich so die zeitliche Veränderung der abgetasteten Zeile verfolgen. Solche Bilder werden in dieser Arbeit *Linescanbilder* genannt.

- **Nachteil:** Es wird keine Fläche, sondern nur eine einzige Zeile dargestellt.

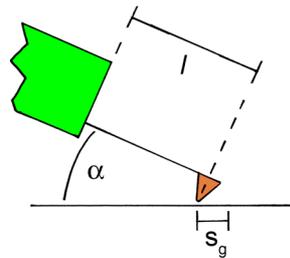


Abb. 9 Dargestellt ist der Cantileverträger (grün), die AFM-Spitze (orange) und der Cantilever (schwarzes Verbindungsstück) mit Länge l . Der Cantilever bildet mit dem Substrat (schwarze Linie am unteren Bildrand) den Winkel α . Hebt der Scanner das Substrat an, so verbiegt sich bei Kontakt der AFM-Spitze mit dem Substrat der Cantilever. Dabei "gleitet" die AFM-Spitze über eine Strecke s_g . Aus Leisten, 2004 [Lei04].

- **Vorteil:** Für ein Bild ohne Linescan-Variation müssen n Zeilen aufgenommen werden (bei den in dieser Dissertation gewonnenen AFM-Bildern ist $n \in \{256; 512\}$). Eine Bildfolge hätte also einen Zeitabstand zwischen zwei Bildern von $\Delta t = n/f$. Der Zeitabstand in der Linescan-Variation ist n -mal kleiner. Daher bietet die Linescan-Variation eine höhere Zeitauflösung.

In Abb. 12 B ist ein Linescan-Topographiebild, welches im Kontakt-Modus aufgenommen wurde, dargestellt.

2.1.6 Gleitstrecke im Kraft-Distanz-Modus

Fährt im Kraft-Distanz Modus nach Erstkontakt der AFM-Spitze mit dem Substrat das Substrat weiter in Richtung der AFM-Spitze, so fährt der Kontaktpunkt zwischen Spitze und Probe horizontal eine gerade Strecke ab. Die Spitze "gleitet" über die Oberfläche. Daher wird die angesprochene Strecke hier als *Gleitstrecke* s_g bezeichnet. In Abb. 9 ist sie skizziert.

Sei l die Länge des Cantilevers und α der Winkel zwischen Probe und Cantilever. Nimmt man die Verkrümmung des Cantilevers vereinfachend als Veränderung des Winkels α durch ein gedachtes Scharnier zwischen Cantilever und Cantileverträger an, so ergibt sich für s_g :

$$s_g = l \left(\cos \left[\sin^{-1} \left(\sin(\alpha) - \frac{s_d}{l} \right) \right] - \cos(\alpha) \right) \quad (2)$$

2.1.7 Das Veeco-AFM

Benutzt wurde ein AFM vom Typ "Veeco Multimode" der Firma Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA. Es besteht aus einer Mikroskop- und einer Steuer- und Anzeigeeinheit. Die Mikroskopeinheit eines solchen AFMs ist in Abb. 8 B zu sehen. Die Steuer- und Anzeigeeinheit besteht aus einem Controller ("Nanoscope IIIa") und einem handelsüblichen IBM-kompatiblen PC. Die zugehörige Software, welche u.a. die Funktionen des AFMs steuert, wird hier *DI-Software* genannt. Sie lag in der Version 4.43r6 vor.

Der benutzte Scanner, ebenfalls von Digital Instruments, kann die Proben in einem Bereich von $(100 \times 100) \mu\text{m}^2$ (horizontal) und $5 \mu\text{m}$ (vertikal) bewegen. Bevor dem Scanner für die oben beschriebenen Betriebs-Modi die Positionierung des Substrates übertra-

gen wird, kann die AFM-Spitze manuell über Mikrometerschrauben über dem Substrat positioniert werden.

Proben können an Luft oder unter Flüssigkeit vermessen werden. Für beide Medien wurde jeweils ein extra dafür vorgesehener *Cantilever-Halter* (Digital Instruments) benutzt. Beide Cantilever-Halter enthalten einen Piezzo-Kristall, den das AFM steuern und dadurch zum Schwingen anregen kann. So ist es sowohl an Luft als auch in Flüssigkeit möglich, im Tapping-Modus zu messen (siehe Abschnitt 2.1.4). Der für Flüssigmessungen vorgesehene Cantilever-Halter bringt den Cantilever zu der Ebene des Probenstückes in einen Winkel von $\alpha = 11^\circ$ [DI97] (siehe Abb. 9).

Bei Messungen in Flüssigkeit wird in der *AFM-Flüssigkammer* gemessen. Diese hat ein Volumen von ca. 50 μl und wird durch den Cantilever-Halter für Flüssigkeiten, dem Substrat und einen abdichtenden *O-Ring* (Digital Instruments) begrenzt. Über Kanäle, welche sich im Cantilever-Halter für Flüssigkeiten befinden, besteht die Möglichkeit, die Flüssigkeit in der AFM-Flüssigkammer während der Messung auszutauschen.

Cantilever und Substrat können an Luft als auch während der Messung in Flüssigkeit (durch den weitgehend aus Glas bestehenden Cantilever-Halter für Flüssigkeit) mit einem Aufricht-Mikroskop beobachtet werden (siehe Abb. 26 A). Dies geschieht hier mittels einer 10fach-Optik von Nikon Corp., Tokio, Japan und einer CCD Kamera des Typs "XC999P" von Sony Corp., Tokio, Japan.

Vor jeder Messung wurden alle Komponenten, welche mit der Flüssigkeit in der AFM-Flüssigzelle in Kontakt treten, gereinigt. Der Cantilever-Halter für Flüssigkeiten wurde dafür in folgender Reihenfolge mit warmen Wasser gespült, mit Ethanol gespült, mindestens 30 Minuten in eine warme, Detergenz-haltige Reinigungslösung ("Mucosol", Merz Consumer Care GmbH, Frankfurt, Deutschland) gelegt, mit einem Schaumstoff-Tuch und der Detergenz-haltigen Lösung abgewaschen, mindestens 10 Minuten mit warmen Wasser gespült, mit deionisiertem Wasser gespült und getrocknet. Der O-Ring wurde in dieser Reihenfolge mit warmen Wasser gespült, mindestens einen Tag in Isopropanol gelegt, mindestens einen Tag in deionisiertes Wasser gelegt und getrocknet.

2.1.8 AFM-Spitzen

AFM-Spitzen sind zum Gebrauch als Einheit aus Cantileverträger, Cantilever und AFM-Spitze zu erwerben. Für die vorliegende Arbeit wurde eine Einheit benutzt, an dessen Cantileverträger sich jeweils zwei unterschiedliche Cantilever samt AFM-Spitzen befinden (Typ: "OMCL TR400 PSA" von Olympus Corp., Tokio, Japan). Die beiden Cantilever haben unterschiedliche Federkonstanten von $k = 0,08 \text{ N/m}$ bzw. $k = 0,02 \text{ N/m}$. Diese relativ kleinen Federkonstanten sind für die Analyse von biologischem Material geeignet. Die Cantilever und die AFM-Spitzen bestehen aus Siliziumnitrid (Si_3N_4). Die Oberseiten dieser Cantilever sind mit Gold beschichtet, damit der darauf fokussierte Laserstrahl mit hinreichender Intensität reflektiert werden kann. Der nominale Spitzenradius wird mit 15 nm angegeben.

Mehrfach verwendete AFM-Spitzen wurden zwischen zwei Messungen gereinigt. Sie wurden dazu in folgender Reihenfolge in deionisiertes Wasser gelegt, in eine Detergenz-haltigen Lösung ("Mucosol", Merz Consumer Care GmbH, Deutschland) gelegt, in Ethanol gelegt, nacheinander in drei Bäder mit deionisiertem Wasser gelegt und getrocknet.

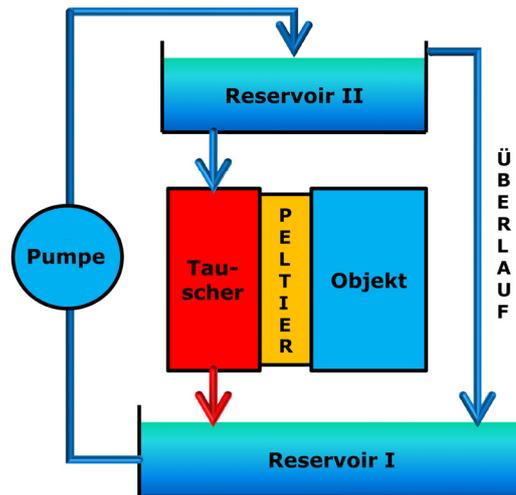


Abb. 10 Schematische Darstellung der für die Regelung der Proben temperatur benutzte Wärmeabfuhr. Das "Objekt" wird mit Hilfe eines Peltier-Elementes ("Peltier") temperiert. Die am Peltier-Element dadurch anfallende Wärme wird an den "Tauscher" abgegeben. Durch die Gravitation der Erde fließt Wasser von "Reservoir II" durch den Tauscher nach "Reservoir I". Dabei leitet das Wasser die Wärme des Tauschers nach Reservoir I ab. Da die Zuleitungen sehr flexibel sind, werden keine mechanischen Schwingungen von Reservoir I an das "Objekt" weitergeleitet. Auch der Wasserfluss ist gleichmäßig und wird nicht durch die "Pumpe" beeinflusst. Reservoir II wird ständig durch die Pumpe mit Wasser aus Reservoir I beliefert. Da die Pumpe nicht genau auf die benötigte Wassermenge eingestellt werden kann, pumpt sie mehr Wasser als nötig von Reservoir I nach Reservoir II. Überschüssiges Wasser in Reservoir II kann über den "Überlauf" nach Reservoir I zurückfließen. Reservoir I ist so groß, dass die Temperaturerhöhung durch die Wärmeeinleitung keinen Einfluss auf das System hat.

Da der Cantilever aus zwei verschiedenen Materialien (Gold und Siliziumnitrid) besteht, welche beide einen unterschiedlichen Wärmeausdehnungskoeffizienten besitzen, hängt seine Ruheposition von der Temperatur ab. Um bei der AFM-Messung mit einer möglichst konstanten loading force messen zu können, wurden diese Messungen erst durchgeführt, nachdem die Temperatur der AFM-Flüssigkammer konstant war. Dies war ca. 30 Minuten nach Einsetzen der Proben in das AFM der Fall.

2.1.9 Regelung der Proben temperatur

Bei einigen Versuchen musste die Proben temperatur des AFMs genau eingestellt werden (siehe Abschnitt 3.2.2). Dies geschah mit einer selbstgebauten Regelung der Proben temperatur. Diese Regelung besaß viele Komponenten der bereits in Leisten, 2004 [Lei04] beschriebenen und in Enders et al., 2004 [End04] verwendeten Regelung, welche vom Autor dieser Dissertation und Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie] gemeinsam entwickelt worden ist. Die Regelung wurde inzwischen von Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie] weiterentwickelt. Die weiterentwickelte Regelung hat folgende Eigenschaften:

- Die Temperatur konnte bei Proben in Flüssigkeit in einem Bereich von ca. 10°C bis 40°C geregelt werden.
- Eine Kühlung der Probe gegen eine höhere Raumtemperatur ist möglich.
- Der Betrieb der Regelung beeinträchtigt die hochempfindlichen Messeigenschaften des AFMs nicht.

- Der Betrieb der Regelung beeinträchtigt weder die optische noch die mechanischen Zugänglichkeit zum AFM und zur AFM-Flüssigkammer.

Im Folgenden wird der Aufbau der Regelung beschrieben:

Das Flüssigkeitsvolumen der Probe des AFMs hat Wärmkontakte zum Messkopf und zum Scanner des AFMs (siehe Abb. 8 B). Ferner gibt es einen Wärmkontakt zur Raumluft und eine Wärmeeinstrahlung durch den Laserstrahl (siehe Abb. 8 A). Die Proben-temperatur wurde indirekt reguliert, indem die Temperatur von Messkopf und Scanner reguliert wurde. Die eigentliche Proben-temperatur wurde über ein Thermoelement (Type T Thermocouple Probes & Wire IT-23, Physitemp Instruments Inc., Clifton, New Jersey, USA) mit passendem Auslesegerät (GMH 3203, Greisinger electronic GmbH, Regenstauf, Deutschland) bestimmt. Obwohl sich die Proben-temperatur um bis zu 2°C von der regulierten Temperatur von Messkopf und Scanner unterscheiden konnte, konnte die Proben-temperatur mit diesem Verfahren bis auf 0,1°C genau eingestellt werden.

Die Temperatur von Messkopf und Scanner wurde mit Hilfe von Peltier-Elementen reguliert. *Peltier-Elemente* nutzen den Peltier-Effekt [Ger95]. Sie bestehen aus zwei elektrisch isolierenden Wärmekontaktflächen zwischen denen Halbleiterelemente untergebracht sind. Legt man an den elektrischen Eingängen eines Peltier-Elementes eine elektrische Spannung an, so leistet das Peltier-Element zusätzlich zur ungewollten Wärmediffusion einen gerichteten Wärmetransport von einer Wärmekontaktfläche zur anderen. So wird die eine Wärmekontaktfläche kalt und die andere warm. Für die Regulierung wurden Scanner und Messkopf jeweils mit einer Wärmekontaktfläche zweier Peltier-Elemente (Peltron GmbH, Fürth, Deutschland) in Wärmekontakt gebracht. Die elektrischen Eingänge der Peltier-Elemente wurden über einen selbstgebauten Leistungsverstärker [Lei04] mit einem PID-Regler [Tie02] angesteuert.

Ein *PID-Regler* hat, wie alle Regler, die Aufgabe eine *Regelgröße* mittels einer *Stellgröße* auf einen *Sollwert* zu bringen und dort zu halten. Im Fall des **PID**-Reglers wird die Stellgröße mit Hilfe des **Proportional**-, **Integral**- und **Differential**-Anteils der Funktion *Regelgröße(t)* bestimmt [Tie02].

Beim dem hier benutzten PID-Regler stellte die Temperatur von Messkopf bzw. Scanner die Regelgröße dar. Sie wurde jeweils mit entsprechend beschalteten Thermistoren ausgelesen, welche direkten Wärmekontakt zum Messkopf bzw. zum Scanner hatten. Die Stellgröße des PID-Reglers war die Spannung, mit der die Leistungsverstärker der Peltier-Elemente angesteuert wurden. Der PID-Regler wurde durch ein mit der Software LabView (National Instruments Corp., Austin, Texas, USA) selbstgeschriebenes Programm simuliert. Das Programm lief auf einem handelsüblichen IBM-kompatiblen PC. Stell- und Regel-Größe konnten von dem Programm über eine in den PC eingebaute **DAQ**-Karte (**Data Acquisition**) (National Instruments Corp., Austin, Texas, USA) ausgegeben bzw. ausgelesen werden.

Da der gerichtete Wärmetransport durch den Peltier-Effekt nur in einem begrenzten Bereich des Temperaturgradienten zwischen den Wärmekontaktflächen wirksam ist, muss die Wärmekapazität des zu regulierenden Objektes wesentlich kleiner sein als die Wärmekapazität des sog. "Tauschers", der an der gegenüberliegenden Wärmekontaktfläche des Peltier-Elementes angebracht ist. Um dies zu erreichen, wird durch den Tauscher Wasser mit Raumtemperatur hindurch geleitet. In Abb. 10 ist dieser Wärmetransport schematisch dargestellt. Das dort eingezeichnete "Objekt" steht stellvertretend für den Messkopf bzw. für den Scanner. In der zu Abb. 10 zugehörigen Legende wird deutlich wie es möglich war, Wasser durch den Tauscher zu leiten, ohne das AFM mechanischen Schwingungen auszusetzen. Diese hätten die Messeigenschaften des AFMs verschlechtert.

Beim Betrieb der Temperaturregulierung wurde darauf geachtet, dass die Temperatur von Messkopf und Scanner nicht unterhalb des Taupunktes [Kuc96] fällt. Kondenswasser hätte Elektronik von Messkopf und Scanner beschädigen können. Deshalb wurde während des Betriebs der Temperaturregulierung permanent die Lufttemperatur und die Luftfeuchtigkeit überwacht.

2.1.10 Bildbearbeitung

Auf alle in dieser Dissertation gezeigten AFM-Bilder ist nur eine einzige Art der Bildbearbeitung angewendet worden: Die unten beschriebene *Ebenenangleichung*. Auf andere übliche Bildbearbeitungsverfahren, wie z.B. Hoch- und Tief-Passfilter [DI97] sowie der zur Findung periodischer Strukturen oft kritisch bewertete Fourier-Filter [Mor00], wurde bewusst verzichtet.

Um in einem AFM-Topographiebild Strukturen oder einzelne Objekte von geringer Höhe möglichst kontraststark darstellen zu können, wird der dargestellte z -Bereich möglichst klein gewählt. Befinden sich die Objekte von Interesse auf einer glatten, aber schiefen Ebene, so wird mit dem Verfahren der Ebenenangleichung die schiefe Ebene so gekippt, dass ihre Topographie in einem möglichst kleinen z -Bereich dargestellt werden kann. Einige der für die Ebenenangleichung üblichen Verfahren sind hier angewendet worden. Sie werden im Folgenden beschrieben:

- Das Bildbearbeitungsverfahren *Plane Fit* addiert zu der ursprünglichen Topographie eine schiefe Ebene. Das Verfahren ist in der dem AFM beigelegten Software "DI-Software" enthalten.
- Das Bildbearbeitungsverfahren *Flatten* arbeitet zeilenweise. Jeder in Richtung der "Fast Scan Axis" aufgenommene Zeile wird separat eine schiefe Ebene hinzuaddiert. Einzelne Bereiche können ausgewählt und von der Berechnung ausgenommen werden. Das Verfahren ist in der dem AFM beigelegten Software "DI-Software" enthalten.
- Die Bildbearbeitungsverfahren *Flatten* und *Plane Fit* können nicht die geometrischen Verzerrungen ausgleichen, welche sich durch die Projektion einer schiefen Probenebene auf die vom AFM aufgenommene Ebene ($x; y$) ergeben. Um diese Verzerrungen auszugleichen, wurden die Topographien von Abb. 30 und Abb. 29 mit der Software Photoshop (Adobe Inc. San Jose, Ca, USA) gestreckt. Auf die Topographien von Abb. 22 bis Abb. 25 wurden für den selben Zweck weder das Verfahren *Flatten* noch *Plane Fit* angewendet. Sie wurden zur Ebenenangleichung *vektoriell gedreht*. Dadurch glichen sich die genannten Verzerrungen automatisch aus. Das vektorielle Drehen wurde durch eine nicht kommerziell erhältliche, von Dr. A. Scheibe (Institut für physikalische Chemie und Elektrochemie, Leibniz Universität Hannover) geschriebene Software durchgeführt. Durch beide hier genannten Verfahren können sich undefinierte Gebiete an den Rändern der rechteckigen Bildausschnitte ergeben. Diese wurden schwarz gekennzeichnet.

2.1.11 Volumenmessung

Um die Volumina kleiner Objekte zu bestimmen, welche in einem AFM-Topographiebild zu sehen sind, wurde die von Dr. O. Enders (Institut für Biophysik, Leibniz Universität Hannover) entwickelte Software "di-viewer 3" benutzt. Diese er-

möglicht es, Topographiebilder im Datenformat der zum AFM gehörenden Software zu bearbeiten und zu analysieren. Eine Funktion dieses Programms ermöglicht es, Volumina von Objekten innerhalb eines wählbaren Rechtecks und oberhalb einer wählbaren Grundhöhe zu vermessen (ausführlich beschrieben in Leisten, 2004 [Lei04]). Die Fehler der Volumenbestimmung ergeben sich aus den üblichen AFM-Abbildungsfehlern [Bin86] und der Unsicherheit das Objekt vom Untergrund unterscheiden zu können.

2.2 Rasterelektronenmikroskop

Bei einem *Rasterelektronenmikroskop* (Abk.: *REM*) [Ard38, Dyk03] wird die zu untersuchende Probe mit einem Elektronenstrahl zeilenweise gescannt. Wenn der Elektronenstrahl auf die Probe trifft, sind verschiedene Wechselwirkungsmechanismen zwischen den Elektronen und der Probe möglich. Die Stärken dieser Wechselwirkungen können mit Hilfe von Detektoren jeweils einem Signal zugeordnet werden. Ordnet man der Auslenkung des Elektronenstrahls eines dieser Signale zu, so entsteht ein Abbild der Probe.

Das hier benutzte REM ("LEO 1530", Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) hatte eine Auflösung von bis zu 0,1 nm. Bei den für diese Dissertation gewonnenen Aufnahmen (siehe Abb. 21) wurden die Elektronen des Elektronenstrahls auf 10 keV beschleunigt. Elektronen, die von der Probe reflektiert worden sind, wurden mit einem "Inlense-Detektor" detektiert. Das benutzte REM wurde von Institut für Festkörperphysik der Leibniz Universität Hannover, Abteilung Nanostrukturen durch Prof. Dr. R. Haug (Institut für Festkörperphysik, Leibniz Universität Hannover) zur Verfügung gestellt. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe von Dipl. Phys. J. M. Meyer (Institut für Festkörperphysik, Leibniz Universität Hannover) durchgeführt.

2.3 Probenträger

Für diese Arbeit wurden verschiedenartige *Probenträger* benutzt. Sie dienten den eigentlichen Proben (z.B. Lysozym oder Omp32) bei der Untersuchung mit dem AFM als Unterlage. Die der Probe zugewandte Oberfläche des Probenträgers wird in dieser Arbeit auch *Substrat* genannt.

Die Probenträger haben folgende, gemeinsame Eigenschaften:

- Die Probenträger waren so dimensioniert, dass sie auf dem Probentisch des AFMs Platz fanden. Sie ähnelten daher Scheiben mit ebener Ober- und Unterseite und waren nicht höher als 5 mm. Die Flächen von Ober- und Unterseite hatten einen Durchmesser von unter 2 cm.
- Die Probenträger setzten sich aus mehreren Lagen zusammen. Die unterste Lage bestand aus einem ferromagnetischen Edelstahl. Durch diesen konnten die Probenträger am magnetischen Probentisch des AFMs befestigt werden. Die Lagen wurden durch einen Zwei-Komponenten-Kleber ("Pattex", Henkel KG, Düsseldorf, Deutschland) zusammengehalten.

2.3.1 Gold-Probenträger

Die hier benutzten Gold-Probenträger bestanden neben dem oben erwähnten Edelstahl als unterste Lage aus einer weiteren Lage. Diese bestand aus einem Stück eines einseitig

thermisch oxidierten, p-dotierten Silizium-Wafers (4" Wafer, SICO Wafer GmbH, Jena, Germany). Die oxidierte Seite des Wafers wurde mit einer 7 nm dicken Schicht aus Chrom und danach mit einer 93 nm dicken Schicht aus Gold beschichtet. Letztere Schicht wurde als Substrat für das Wachstum der Omp32-Kristalle genutzt (siehe Abschnitt 3.2). Die Beschichtung wurde mit Hilfe der Elektronenstrahle vaporation [Sze95] durchgeführt. Die dafür benutzten Geräte wurden vom Institut für Festkörperphysik der Leibniz Universität Hannover, Abteilung Nanostrukturen, durch Herrn Prof. Dr. R. Haug zur Verfügung gestellt. Die Beschichtung wurde mit Hilfe von Herrn Dipl. Phys. Jörg Michael Meyer durchgeführt.

2.3.2 Muskovit-Probenträger

Die hier benutzten Muskovit-Probenträger bestanden neben dem oben erwähnten Edelstahl als unterste Lage aus zwei weiteren Lagen. Die mittlere Lage bestand aus Glas. Die dritte, direkt der Probe zugewandten Lage, bestand aus *Muskovit* (engl.: *Mica*) ("muscovite mica, V1", Structure Probe Inc., West Chester, PA, USA). Muskovit ist ein Schichtsilikat. Es gehört zur Gruppe der Glimmer und damit zu den Mineralien. Mit Hilfe eines Klebefilm-Streifens ("Tesa-Film", Beiersdorf AG, Hamburg, Deutschland) wurden von dem Muskovit in solcher Weise Schichten abgehoben, dass mehrere, einige μm^2 große Teilstücke auf der Probenträgeroberfläche zurückblieben, welche eine atomar glatte Mineralschicht aufwiesen. Dieser Vorgang nennt sich *Brechen des Glimmers*. Diese atomar glatten Oberflächen des Muskovits wurden als Substrat genutzt. Auf ihnen lassen sich auch kleinste adsorbierte Objekte, wie z.B. Proteine, mit dem AFM erkennen.

2.4 Lysozym

Lysozym [Jol69] ist ein Protein [Cam06] und gehört zur Gruppe der Enzyme [Cam06]. Es wurde 1922 von A. Fleming entdeckt [Fle22]. Es kommt vor allem im Speichel, im Schweiß und in der Tränenflüssigkeit von Tieren und Menschen vor. Lysozym wirkt antibakteriell, indem es die Zellwand von Bakterien abbaut [Jol69]. Es besteht aus einer Sequenz von 129 Aminosäuren und besitzt eine Masse von 14600 Dalton [Bla65]. Lysozym war das erste Enzym, dessen atomare 3D-Struktur durch die Röntgenstrukturanalyse entschlüsselt werden konnte [Jol69]. Aus diesen Untersuchungen konnte für Lysozym eine elliptische Form von $3 \times 3 \times 4,5 \text{ nm}^3$ ermittelt werden [Bla65]. In einem tetragonalen Proteinkristall hingegen nimmt Lysozym ein Volumen entsprechend eines Quaders von $2,8 \times 2,8 \times 3,79 \text{ nm}^3$ ein [Li99]. In Abb. 1 ist ein 3D-Modell von Lysozym abgebildet.

Lysozym wird industriell aus dem Eiklar des Hühnereis gewonnen. Dieses "**Henn Egg White Lysozyme**" (Abk.: HEWL) wird u.a. zur Konservierung von Lebensmitteln verwendet. In der Europäischen Union trägt es in der Liste der "erlaubten Lebensmittelzusatzstoffe" die "E-Nummer" E1105. In der Wissenschaft wird es häufig als Modellprotein verwendet, da es relativ kostengünstig zu erwerben ist und viele wissenschaftliche Vergleichsdaten existieren [Jol84]. So ist u.a. das für diese Arbeit interessierende Adsorptionsverhalten (siehe Abschnitt 1.2) von Lysozym bereits vielfach untersucht worden [u.a. in Cza03, Kim02, Rot95, Blo94, Rad94, Hag93]. Ebenfalls ist das Kristallwachstum (siehe Abschnitt 1.3) von Lysozym-Kristallen [u.a. in Pus02, Wie01, Li99], als auch die Keimungsphase dieser Kristalle [u.a. in Nan07, Vek04, Schap97] oft Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchung gewesen.

2.5 Lösungen mit Lysozym

Für diese Arbeit wurden wässrige Lösungen mit Lysozym benutzt. Sie bestanden aus deionisiertem Wasser, Lysozym mit variabler Konzentration c_p , NaCl mit variabler Konzentration c_p , 50 mM NaAc, HCl und hatten einen pH von 4,5. Sie wurden wie folgt hergestellt:

- Es wurde ein 50 mM NaAc Puffer angesetzt. Der Puffer wurde mit HCl auf einen pH-Wert von 4,5 eingestellt. Er sei hier *Puffer A* genannt.
- Ein Dialyseschlauch (MWCO = (8 bis 10) k, "ZelluTrans", Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurde wie folgt gebrauchsfertig gemacht. Er wurde 30 min in deionisiertem Wasser eingeweicht. Dann wurde er 30 min in einer 80°C warmen 5 mM EDTA-Lösung gespült und weitere 30 min in 80°C warmen, deionisiertem Wasser gespült. All diese Vorgänge fanden unter ständigem Rühren statt.
- Lysozym (dreifach kristallisiert, dialysiert, lyophilisiert aus Hühnereiweiß "L-6876", Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) wurde mit einer Konzentration von $c_p = 10\%$ w/v in Puffer A gelöst. Die Lösung wurde mit dem vorbereiteten Dialyseschlauch gegen deionisiertes Wasser dialysiert. Nach jeweils zwei und vier Stunden wurde das deionisierte Wasser gewechselt. Nach weiteren zwölf Stunden wurde gegen Puffer A dialysiert. Nach jeweils zwei und vier Stunden wurde der Puffer A gewechselt. Nach weiteren zwölf Stunden wurde c_p mit einer Zentrifuge und einem Zentrifugalfilter (MWCO = 3 k, "Amicon® Centricon® YM-3", Millipor, Billerica, MA, USA) erhöht.
- Zur Bestimmung von c_p wurde ein optisches Spektrometer ("Uvicon 932, Bio-Tek", Kontron Instruments, Neufarm, Deutschland) benutzt. Hierbei wurde bei einer Lichtwellenlänge von 280 nm ein Extinktionskoeffizient von $e_{280} = 37935,1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ angenommen [Gil89]. Mit einem angenommenen Molekulargewicht von 14600 Dalton [Bla65] wurde c_p von "% w/v" in "mM" umgerechnet.
- Eine Lösung *Puffer B* und eine Lösung *Puffer C* wurden hergestellt. Sie ergaben sich aus Puffer A, welcher mit NaCl zu $c_s = 10\%$ NaCl w/v bzw. $c_s = 30\%$ NaCl w/v aufgefüllt wurde.
- Die Lysozymlösung, steril filtrierter Puffer A, B und C wurden im Kühlschrank aufbewahrt. Zur Verwendung wurden die Lösungen {Lysozymlösung, Puffer A+B für $c_p < 10\%$ } bzw. {Lysozymlösung, Puffer A+C für $c_p > 10\%$ } frisch so miteinander vermischt, dass sich eine Lösung mit gewünschtem c_p und c_s ergab. Da die Puffereigenschaften der Lösungen identisch sind, ändern sich diese beim Vermischen nicht.

Die genannten Verfahren zur Herstellung der Lysozymlösungen und die benutzten Pufferlösungen sind aus der Proteinkristallisation bekannt. So kann in einer wie oben beschriebenen hergestellten Lysozymlösung bei $c_p = 2,5\%$ und $c_s = 4\%$ das Wachstum von tetragonalen Lysozym-Kristallen beobachtet werden [Wie01].

2.6 Omp32

Omp32 ist ein bakterielles Porin [Nik03, Koe00, Nik94] und somit ein Porenprotein der äußeren Bakterienmembran. Wie alle "klassischen" Porine (darunter OmpF und OmpC) [Nik1994] liegt *Omp32* als stabiles Trimer vor [Zet00], wobei jede Untereinheit einen eigenen Kanal bildet, der für Anionen stark selektiv ist [Mat98]. 1998 konnten zwei Kristallformen für *Omp32* gefunden werden [Zet98]. Die zwei Kristallformen wurden in Zeth et al., 1998 [Zet98] *Kristallform 1* und *Kristallform 2* genannt. Diese Namen finden auch in der vorliegenden Arbeit Verwendung. Zwei Jahre später konnte die dreidimensionale Struktur von *Omp32* mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse aufgelöst werden [Zet00, Zac06]. In dieser Arbeit sind 3D-Modelle eines *Omp32*-Moleküls (Abb. 1 B), eines *Omp32*-Trimers (Abb. 4 C) und eines *Omp32*-Kristalls der Kristallform 2 (Abb. 4 A+B) abgebildet. In Abb. 4 C ist ein Peptid zu sehen, welches sowohl bei der Kristallform 1, als auch bei der Kristallform 2 im Zentrum der *Omp32*-Trimere co-kristallisiert [Zet00].

2.7 Lösungen mit Omp32

Omp32 von *C. acidovorans* (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellen, DSMZ, No.39) wurde mit Hilfe des Detergenz octyl-polyoxyethylene in wässriger Lösung gelöst und gereinigt, so wie es in Zeth et al., 1998 [Zet98] beschrieben steht. Dieser Schritt wurde von Dr. K. Zeth (MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen) und Dr. H. Engelhardt (MPI für Biochemie, Martinsried) durchgeführt, welche eine fertig aufbereitete Proteinlösung zur Verfügung stellten. Die Proteinlösung wurde bei $T = 8^{\circ}\text{C}$ gelagert. Bei mancher Proteinkonzentration kam es dabei zu einem festen, zusammenhängenden Ausfall in der Lösung. Zur Weiterverarbeitung der Lösung wurde dieser Ausfall aufgelöst. Dazu wurde die Lösung 2-3 Stunden bei 30°C gelagert. Dadurch verschwand der zusammenhängende Ausfall. Ein andersartiger, pulverförmiger Ausfall entstand. Dieser wurde durch Lagerung bei Raumtemperatur (23°C) innerhalb von 24 Stunden aufgelöst.

Die so behandelte Proteinlösung wurde dreimal mindestens 18 Stunden lang gegen einen das Detergenz β -D-Octylglucosid enthaltenen Puffer dialysiert (2% β -D-Octylglucosid ($\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_6$, "O8001", Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), 20 mM Tris, pH 8. Dialysiert in: Float-A-Lyzer[®], MWCO 100000 Daltons, Spectrum Europe B.V., Breda, The Netherlands). Der erste Dialyseschritt fand bei Raumtemperatur statt. Die nachfolgenden beiden Dialyseschritte bei 8°C . Die so erhaltene Proteinlösung sei hier *Omp32-Stammlösung* genannt. Es wurde eine resultierende Proteinkonzentration c_p von ca. 2 bis 10 mg ml^{-1} gemessen (photometrische Bestimmung mit angenommenen [Gil89] Extinktionskoeffizienten von $e_{280} = 31860 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Die Lösung blieb für diesen Schritt unbehandelt und wurde nicht etwa für eine Denaturierung der Proteine erhitzt). Um die kritische Detergenz-Konzentration nicht zu verändern, wurde die Proteinkonzentration zur Kristallisation beibehalten. Die *Omp32*-Stammlösung wurde bei 8°C gelagert. Ausfälle jeglicher Art konnten in dieser Lösung unabhängig von der erhaltenen Proteinkonzentration nicht beobachtet werden.

2.8 Kristallisation von Omp32

Zur Kristallisation von *Omp32* wurden zwei weitere Lösungen verwendet. Die *Omp32-Reservoirlösung* (2 M bis 2,3 M Ammoniumsulfat $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$, 100mM Natriumcitrat,

pH 5,6, 200 mM K/Na-Tartrat) und die *Omp32-Spüllösung* (Omp32-Messlösung, welcher 0,2 % β -D-Octylglucosid hinzugefügt worden ist).

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Omp32-Kristalle wurden mit Hilfe der "Sitting-Drop Vapor Diffusion"-Methode [McP99] angesetzt. Dazu wurde 1,5 ml Omp32-Reservoirlösung in einen zylindrischen Behälter mit einer Höhe von 1,9 mm und einem Kreisdurchmesser von 1,6 mm gefüllt. Über der Flüssigkeitsgrenze wurde in dem Zylinder ein kreuzförmiger Steg geklemmt. Auf diesen wurde ein Gold-Probenräger (siehe Abschnitt 2.3.1) gelegt. In die Mitte auf dessen goldbeschichteter Oberseite wurde ein Tropfen von 2,5 μ l Omp32-Reservoirlösung platziert und danach mit einem weiteren Tropfen von 2,5 μ l Omp32-Stammlösung vereint. Durch das in dieser Flüssigkeit enthaltene Detergenz verteilt sich die Flüssigkeit über die gesamte Gold-Oberfläche. Damit die Flüssigkeit nicht am Rand des Gold-Probenrägers herunter tropft, musste darauf geachtet werden, dass die Gold-Oberfläche möglichst waagrecht zur Erdanziehung positioniert wurde und den Rand des Zylinders nicht berührt. Der Zylinder wurde mit einem Klebefilm-Streifen ("Tesa-Film", Beiersdorf AG, Hamburg, Deutschland) verschlossen und bei 8°C gelagert. Die so durchgeführte Kristallisationsmethode entspricht dem "Kristallansatz 14" aus dem kommerziell erwerbbaeren "Cristal-Screen II" von Hampton Research, Aliso Viejo, CA 92656-3317, USA.

Um etwaige Unregelmäßigkeiten im Kristallisationsprozess auszugleichen, wie z. B. die von der Stammlösung abhängige Proteinkonzentration (siehe Abschnitt 2.7), wurden jeweils mehrere, wie oben beschriebene Kristallansätze gleichzeitig hergestellt. Dabei wurde die *Ammoniumsulfat-Konzentration* c_A der Omp32-Reservoirlösung von 2 M bis 2,3 M in Schritten von 0,1 M variiert. Die Omp32-Kristalle zeigten sich nach einigen Tagen auf ein bis zwei der so variierten Kristallansätze. Die Omp32-Kristalle waren für gewöhnlich auf der Gold-Oberfläche adsorbiert.

Spülprozess: *Bevor die Omp32-Kristalle mit dem AFM untersucht wurden, wurde der im Folgenden beschriebene "Spülprozess" durchgeführt. Dazu wurde die Gold-Oberfläche in dieser Reihenfolge zweimal mit ca. 15 μ L der Omp32-Reservoirlösung gespült, 8 mal mit ca. 15 μ l der Omp32-Spüllösung gespült und weitere 8 mal mit ca. 15 μ l Omp32-Reservoirlösung gespült. Ein Spülvorgang bestand jeweils aus der Benetzung der Goldoberfläche mit der jeweiligen Lösung, ca. 30 s Warten und aus der Abnahme des Großteils der Lösung von der Oberfläche, ohne jedoch, dass die Oberfläche dabei austrocknen konnte. Beim jedem Spülvorgang wurde darauf geachtet, die Lösung möglichst so aufzutragen, dass sich die Kristalle nicht von der Gold-Oberfläche lösten. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Kristalle weiterhin bei einer Temperatur von ca. 8°C behandelt wurden. So wurden die Kristalle in einer Kühlbox in einen Kühlraum gebracht, wo bereits vorgekühlte Lösungen und ebenfalls vorgekühlte Pipettenspitzen für den oben genannten Spülprozess bereit lagen.*

Die Omp32-Kristalle wurden jeweils in einer solchen Omp32-Reservoirlösung mit dem AFM untersucht, mit welcher sie zuvor kristallisiert worden sind. Da die Omp32-Messlösung kein Protein enthält, können die Kristalle nicht weiterwachsen. Da die Omp32-Messlösung kein Detergenz enthält, sollten sich die Kristalle nicht auflösen. Letzteres wird sich in Abschnitt 3.2.2 bestätigen. Auch für die Röntgenstrukturanalyse [Zet00] sind die Omp32-Kristalle in einer solchen Omp32-Messlösung aufbewahrt worden.

Für die AFM-Untersuchungen wurde die AFM-Flüssigzelle auf ca. 12°C gekühlt. Es wurde darauf geachtet, dass die Kristalle beim Einsetzen in die AFM-Flüssigzelle so kurz wie möglich mit Raumtemperatur in Kontakt traten. Etwaige Abweichungen von dem hier genannten Kristallisationsprozess werden in Abschnitt 3.2 deutlich gemacht.

3 Resultate

3.1 Generation von Lysozym-Muster auf Muskovit in Flüssigkeit

In Leisten, 2004 [Lei04] wurde erstmals eine Lithographie-Methode vorgestellt, die es erlaubt in wässriger Lösung mit Proteinen auf einer festen Oberfläche zu "schreiben". Als Protein diente dabei Lysozym. Die feste Oberfläche bestand aus Muskovit. Der Begriff "schreiben" bedeutet, dass ein auf Muskovit adsorbiertes Proteinmuster der Linie folgt, mit der eine AFM-Nadel über die Muskovit-Oberfläche geführt wird. Dabei konnten Proteinmuster im Nanometerbereich erzeugt werden.

Die in Leisten, 2004 [Lei04] durchgeführten Messungen sind im Rahmen der vorliegenden Dissertation so erweitert worden, dass aus den gesammelten Resultaten, wiederum im Rahmen dieser Dissertation, eine Interpretation über den zugrunde liegenden Lithographie-Mechanismus entwickelt werden konnte (siehe Diskussion). Da für diese Interpretation sowohl die Resultate aus Leisten, 2004 [Lei04] (Abb. 11, Abb. 15, Abb. 16, Abb. 17 und Abb. 20) als auch die hier neu gewonnenen Resultate (Abb. 12, Abb. 13, Abb. 14, Abb. 18, Abb. 19 und Abb. 21) von Bedeutung sind, werden im folgenden all diese Resultate präsentiert.

3.1.1 Erzeugung rechteckiger Lysozym-Monoschichten im Kontakt-Modus

Mit einer AFM-Spitze wurde auf Muskovit eine rechteckige Fläche von $1,5 \mu\text{m} * 1 \mu\text{m}$ wiederholt im Kontakt-Modus abgefahren. Die Fläche wurde mit 256 Linien bei 9 Hz und einer loading force von $f_l = 9 \text{ nN}$ gescannt. Dadurch konnte ca. jede Minute ein Topographiebild der gescannten Fläche erhalten werden. Die Messung wurde in einer wässrigen Lysozymbilösung durchgeführt, welche eine Lysozym-Konzentration von $c_p = 6,9 \mu\text{M}$ und eine NaCl-Konzentration von $c_s = 680 \text{ mM}$ besaß. Die Lösung wurde mit 50 mM NaAc und HCl auf einen pH-Wert von 4.5 gepuffert (siehe Abschnitt 2.5). Da diese Lysozymbilösung im Folgenden sehr häufig verwendet wird, wird sie hier *Standard-Lysozymbilösung* genannt.

Einige Topographiebilder der so erhaltenen Bildfolge sind in Abb. 11 A-D zu sehen. Unten links ist jeweils die Zeit bei Fertigstellung des Topographiebildes zu sehen. Beim Startpunkt $t = 0$ kam die gescannte Fläche das erste Mal mit der AFM-Spitze in Kontakt. Dort wurde die Aufnahme des ersten Bildes der Bildfolge begonnen. Man kann in der Bildfolge erkennen, wie sich mit zunehmender Zeit längliche, topographisch erhöhte Domänen ausbilden. Diese Domänen bilden sich quer zur "Fast Scan-Axis" aus (siehe Abschnitt 2.1.3), welche in Abb. 11 A-D horizontal verläuft.

Unmittelbar nachdem die Aufnahme von Abb. 11 D abgeschlossen war, wurde ein weiteres Topographiebild im Kontakt-Modus aufgenommen (Abb. 11 E). Hierzu wurden die selben Parameter verwendet, die für die Abb. 11 A-D verwendet worden sind, bis auf den Unterschied, dass eine größere Fläche des Substrates aufgenommen wurde, die in ihrem Zentrum die Fläche von den Abb. 11 A-D enthält. Man sieht an Abb. 11 E, dass sich die topographisch erhöhten, länglichen Domänen nur in der zuvor wiederholt gescannten Fläche gebildet haben.

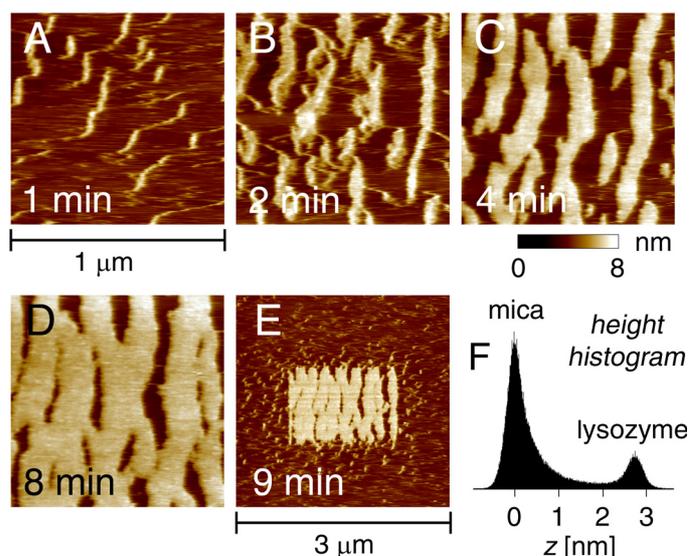


Abb. 11 In der hier gezeigten AFM-Topographiebildfolge ist die Erzeugung eines Musters einer Lysozym-Monoschicht auf Muskovit zu sehen (A-D). Die Bilder wurden im Kontakt-Modus in einer Lysozym-haltigen Lösung aufgenommen (s. u.) und nach einer jeweils unten links angegebenen Zeit abgeschlossen. Bei $t = 0$ wurde mit der Aufnahme von A begonnen. Die Bilder stellen einen Bildausschnitt von $(1 \mu\text{m})^2$ des für die Aufnahmen gescannten Bereiches von $1,5 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ dar. Dabei wurde jeweils der selbe Bereich einer Muskovit-Oberfläche gescannt. Man erkennt, wie sich quer zur der hier horizontal verlaufenden "Fast Scan-Axis" (siehe Abschnitt 2.1.3) längliche Domänen ausbilden, welche als Lysozym-Monoschichten identifiziert werden konnten (siehe Text). Danach wurde eine größere Fläche für eine weitere Bildaufnahme gescannt (E), welche in ihrem Zentrum die in A-D gezeigte Fläche enthält. In F ist das Höhenhistogramm der Topographie von E gezeigt. Die Höhen, welche der blanken Muskovit-Schicht bzw. der adsorbierten Lysozym-Monoschicht zugeordnet werden konnten (siehe Text), wurden mit "mica" bzw. mit "lysozyme" gekennzeichnet. Alle Bilder wurden bei einer loading force von $F_l = 9 \text{ nN}$ und in einer Lösung mit 50 mM NaAc , 680 mM NaCl , $\text{pH} = 4.5$ und $6.9 \mu\text{M Lysozym}$ ($\approx 0.1 \text{ mg / ml}$) aufgenommen (*Standard-Lysozymlösung*). Die Abb. ist aus Leisten et al., 2006 [Lei06] entnommen.

In Abb. 11 F ist das Höhenhistogramm der in Abb. 11 E gezeigten digital gerasterten Topographie zu sehen. Darin wurde die Anzahl der Pixel, welche in einen bestimmten Höhenbereich passen, auf den zugehörigen Höhenbereichen mit aufsteigender mittlerer Höhe z aufgetragen. Um zwei Höhenbereiche ist eine Häufung der zugeordneten Pixel zu erkennen: Dem einen Höhenbereich wurde eine mittlere Höhe von 0 nm zugeordnet. Diese Höhe entspricht der Höhe des Substrates und wurde mit "mica" gekennzeichnet. Der andere auffällige Höhenbereich liegt höher und wurde mit "lysozyme" gekennzeichnet. Um beide Höhenbereiche gibt es eine ca. Gauß-verteilte Häufung, die darauf schließen lässt, dass der höhere Höhenbereich um ca. $2,7 \pm 0,18 \text{ nm}$ über dem Substrat liegt. Es sei angemerkt, dass die Höhe von $2,7 \text{ nm}$ der kurzen Seite eines adsorbierten Lysozym-Moleküls entspricht [Blom94, Mül97]. In der Diskussion wird sich zeigen, dass es sich bei den länglichen Domänen um auf dem Muskovit adsorbierte *Lysozym-Monoschichten* handelt (siehe Abschnitt 4.1.1).

Die bisher in diesem Abschnitt beschriebenen Messungen wurden bereits in Leisten, 2004 [Lei04] beschrieben.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte das obige Experiment sieben weitere Mal an verschiedenen Messtagen, mit neu angesetzten Lysozym-Lösungen und anderen aber gleichen AFM-Spitzen bestätigt werden. Dabei bildeten sich die länglichen Domänen stets quer zur "Fast Scan-Axis" aus. Es gab weitere Messversuche, bei denen das

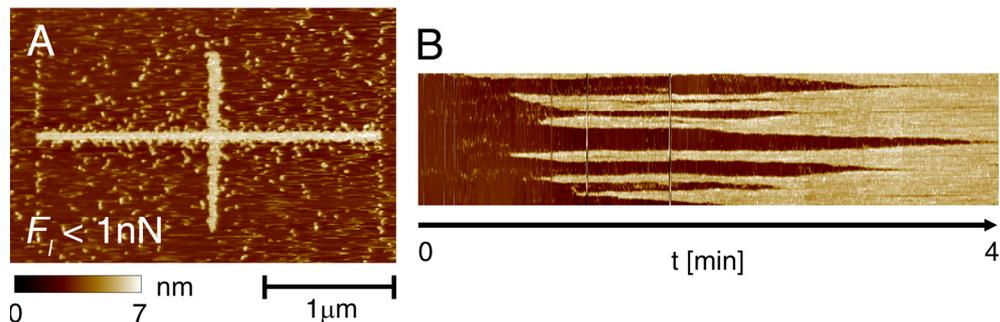


Abb. 12 **A** zeigt ein AFM-Topographiebild zweier linienförmiger, sich kreuzenden Lysozym-Monoschichten, welche auf Muskovit adsorbiert sind. Beide Monoschichten wurden zuvor mit Hilfe von Line-Scans entlang der Monoschichten erzeugt. Die Line-Scans wurden jeweils 4 Minuten lang bei 6,1 Hz und $F_l < 1$ nN durchgeführt. In **B** ist das Linescan-Topographiebild (siehe Abschnitt 2.1.5) zu sehen, welches während der Erzeugung der vertikalen Lysozym-Monoschicht aus **A** aufgenommen wurde. **A** und **B** wurden im Kontakt-Modus bei $f = 6,1$ Hz und $F_l < 0,1$ nN in der Standard-Lysozymlösung aufgenommen. Die Abb. ist aus Leisten et al., 2006 [Lei06] entnommen und wurde von Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie] durchgeführt.

Experiment *nicht* bestätigt werden konnte. In diesen Fällen konnte keinerlei Lysozym-Muster auf dem Muskovit erzeugt werden. Dies wird auf den Einfluss der individuellen Form der AFM-Spitze zurückgeführt (siehe Abschnitt 3.1.9).

Auf der dem erhöhten Rechteck umgebenden Muskovit-Oberfläche sind weitere kleine Bereiche zu sehen, welche sich vom Substrat abheben (Abb. 11 E). Diese Bereiche sind in allen AFM-Topographien beobachtet worden, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit von Muskovit-Oberflächen in der Standard-Lysozymlösung aufgenommen worden sind. Sie stellen sich in den AFM-Topographien von unterschiedlich lateraler Ausdehnung und bis zu ca. 2,7 nm hoch dar (siehe Abb. 15 C). In der Diskussion werden sich auch diese Erhöhungen als adsorbiertes Lysozym herausstellen. Da in dieser Arbeit nur das AFM zur Untersuchung von adsorbierten Lysozym benutzt worden ist, und sich oben herausgestellt hat, dass der Scanprozess des AFMs die Adsorption von Lysozym auf Muskovit positiv beeinflussen kann, ist bei den kleinen erhöhten Bereichen schwer zu entscheiden, welcher Anteil von ihnen spontan adsorbiert ist, und welcher durch den Scanprozess des AFMs erzeugt worden ist. Im Folgenden werden diese unvermeidbaren kleinen erhöhten Bereiche vereinfacht als *spontan adsorbiertes Lysozym* zusammengefasst.

Das spontan adsorbierte Lysozym zeigte sich in der Standard-Lysozymlösung auch noch nach sechsständiger Inkubationszeit und wurden nicht durch die Bildung einer kompletten Lysozym-Monoschicht (siehe Abschnitt 3.1.5.1) aufgrund der dadurch fehlenden Höhenunterschiede zur Muskovit-Oberfläche für das AFM "unsichtbar" (vgl. Abb. 2 E-G). Über diesen Zeitrahmen hinaus liegen keine Messergebnisse vor. Die Muskovit-Oberflächen mit dem spontan adsorbierten Lysozym wurden bei allen in dieser Arbeit präsentierten Topographien dem Scan-Prozess der AFM-Spitze so wenig wie möglich ausgesetzt. Dadurch sollten diese Oberflächen möglichst unverändert dargestellt werden um die in dieser Arbeit betrachteten, durch die AFM-Spitze erzeugten Lysozym-Muster möglichst gut von ihrer Umgebung unterscheiden zu können.

Weder bei dem spontan adsorbierten Lysozym, noch bei den mit der AFM-Spitze erzeugten Lysozym-Monoschichten, konnte in dieser Arbeit kristalline Strukturen des Lysozyms nachgewiesen werden.

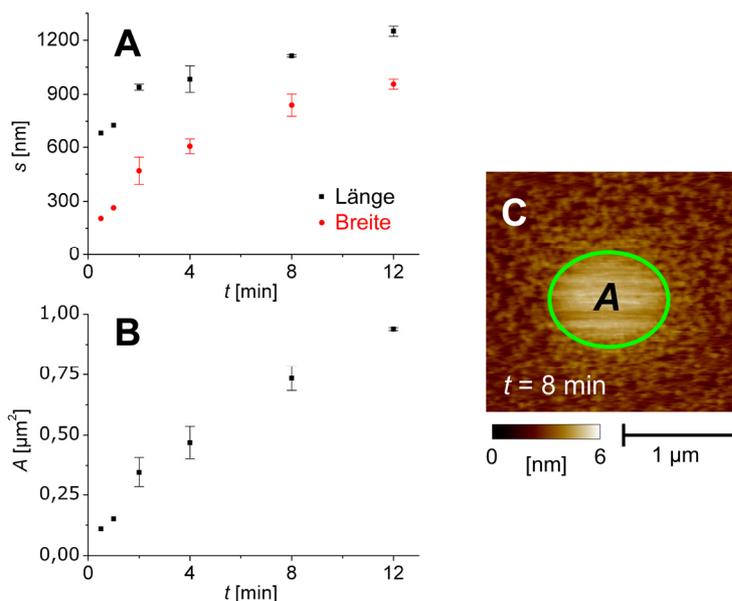


Abb. 13 **A** Länge und Breite von im Kontakt-Modus mit Linescan-Variation erzeugter linienförmiger Lysozym-Muster in Abhängigkeit ihrer Erzeugungsdauer t . Für die Line-Scans wurde jeweils mit 4,75 Hz wiederholt eine 500 nm breite Linie abgefahren. Die loading force konnte während der gesamten Erzeugung bei $F_l = 3 \pm 0,6$ nN konstant gehalten werden. Direkt nach der Erzeugung eines Musters wurde jeweils bei $F_l = 3$ nN ein AFM-Topographiebild von dem Muster aufgenommen, aus der Länge (Durchmesser entlang der gescannten Linie) und Breite (Durchmesser quer zur gescannten Linie) der Lysozym-Monoschicht ermittelt wurde. Bei $t \in \{0,5 \text{ min}; 1 \text{ min}\}$ konnte jeweils nur ein Muster erzeugt werden. Bei allen anderen Messpunkten wurde der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung aus zwei unabhängig voneinander erzeugten Mustern angegeben. Um die Fläche der Muster abzuschätzen zu können (**B**), wurden den jeweils ovalen Mustern Ellipsen angenähert, deren Flächen A hier angegeben sind. In **C** ist ein für diese Messreihe typisches Muster ($t = 8$ Minuten) anhand des dazugehörigen AFM-Topographiebildes samt seiner Ellipse (grün) und der darin befindlichen Fläche A zu sehen. Die Lysozym-Muster entstanden auf Muskovit in der Standard-Lysozymlösung.

3.1.2 Erzeugung linienförmiger Lysozym-Muster im Kontakt-Modus

In der Standard-Lysozymlösung wurden mit der AFM-Spitze im Kontakt-Modus mit Linescan-Variation (siehe Abschnitt 2.1.5) wiederholt einzelne Linien auf dem Muskovit abgefahren. Auch dabei konnte beobachtet werden, wie sich Lysozym-Muster auf dem Muskovit bildeten.

In einem der Versuche wurden nacheinander zwei Linien so abgefahren, dass sich die Linien jeweils in ihrem Zentrum unter einem Winkel von 90° schnitten. Die eine Linie hatte eine Länge von $1,5 \mu\text{m}$, die andere eine Länge von $2,5 \mu\text{m}$. Beide Linien wurden 4 Minuten lang mit 6,1 Hz und bei einer so klein wie möglich eingestellten loading force von $F_l < 0,1$ nN wiederholt abgefahren. Danach wurde von einem Bereich des Muskovits, welcher die beiden zuvor gescannten Linien enthielt, ein Topographiebild erstellt. Dieses ist in Abb. 12 A gezeigt. Man erkennt darin zwei, sich unter einem Winkel von 90° kreuzende, linienförmige Erhöhungen. Diese Erhöhungen sind auf genau den Linien entstanden, auf denen zuvor die Linescans durchgeführt worden sind. Ihre Höhe entspricht den in Abschnitt 3.1.1 erzeugten länglichen Domänen. Sie sind bis zu 60 nm

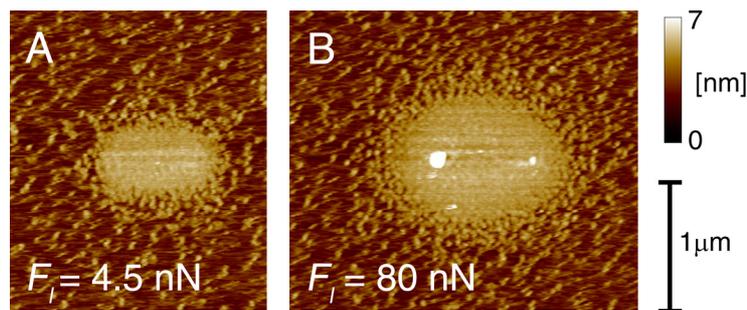


Abb. 14 A und B zeigen AFM-Topographiebilder von auf Muskovit adsorbierten, ovalen Lysozym-Mustern. Die Muster wurden jeweils durch einen zuvor durchgeführten Linescan erzeugt, welcher die AFM-Spitze jeweils 3 Minuten bei 18 Hz über eine 600 nm lange, horizontal im Zentrum der ovalen Muster verlaufende Linie geführt hat. Die dabei benutzte loading force F_l ist jeweils unten links angegeben. In **B** sind an den Umkehrpunkten des Linescans Erhöhungen zu sehen, welche aus dem Oval, welches die Höhe einer Lysozym-Monoschicht hat, hervorstechen. **A und B** wurden im Kontakt-Modus bei $f = 6,1$ Hz und $F_l = 4,5$ nN in der Standard-Lysozymlösung aufgenommen. Die Abb. ist aus Leisten et al., 2006 [Lei06] entnommen.

schmal. In der Diskussion wird sich herausstellen, dass es sich bei den hier erzeugten Erhöhungen ebenfalls um Lysozym-Monoschichten handelt. Um die linienförmigen Lysozym-Muster herum ist das spontan adsorbierte Lysozym zu sehen.

Abb. 12 B zeigt ein Linescan-Bild (siehe Abschnitt 2.1.5), welches während der Erzeugung der vertikalen linienförmigen Erhöhungen aufgenommen worden ist. Man erkennt, dass sich die Erhöhungen mit der Zeit entlang der "Fast Scan Axis" ausbreiten und sich erst nach 4 Minuten zu einer einzigen Erhöhung zusammenschließen.

In vielen ähnlichen Versuchen konnte die oben beschriebene Erzeugung linienförmiger Lysozym-Monoschichten auf Muskovit wiederholt werden. So wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation etliche Linien an über zehn verschiedenen Messtagen erzeugt. In allen diesen Versuchen ähnelte das Linescan-Bild dem von Abb. 12 B.

Bei den Messungen zu Abb. 12 war es das Ziel, möglichst schmale aber zusammenhängende Linien zu erzeugen. Deshalb wurden die Linescans zu einem Zeitpunkt gestoppt, als sich im zugehörigen Linescan-Topographiebild (Abb. 12 B) eine zusammenhängende Linie andeutete. Um zu untersuchen, welche Form die erzeugten Lysozym-Monoschichten annehmen, wenn der Linescan darüber hinaus fortgesetzt wird, wurde eine Messreihe durchgeführt, in welcher die Form der Monoschichten in Abhängigkeit ihrer Erzeugungsdauer beobachtet wurde. Das Ergebnis ist in Abb. 13 gezeigt. In der dortigen Messreihe konnten schon bei einer Erzeugungsdauer von 0,5 Minuten zusammenhängende Linien mit einer Breite von ca. 200 nm erzeugt werden. Die Länge der bei 0,5 Minuten erzeugten Linie von 680 nm orientierte sich an der Länge des für die Erzeugung durchgeführten Linescans, durch welchen bei 4,75 Hz wiederholt eine 500 nm lange Linie auf dem Muskovit mit der AFM-Spitze abgefahren wurde. Man sieht in Abb. 13 A, dass die Breite der Linien, als auch deren Länge, mit der Erzeugungsdauer zunimmt. Die Linien verbreitern sich mit der Zeit so stark, dass sie die Form eines Ovals annehmen (Abb. 13 C). Mit zunehmender Erzeugungsdauer wird die Fläche dieses Ovals größer (Abb. 13 B).

Um den Einfluss der loading force zu untersuchen wurden zwei linienförmige Lysozym-Muster, ähnlich wie in Abb. 12, aber unter Variation der loading force erzeugt. So wurden die beiden Linien unmittelbar nacheinander und mit der selben AFM-Spitze erzeugt. Sie wurden beide 3 Minuten lang durch Linescans bei 18 Hz über Linien von 600 nm Länge erzeugt.

Das Resultat ist in den jeweils nach der Erzeugung der Linien aufgenommenen Topographiebilder in Abb. 14 gezeigt. Die Bilder beinhalten die zuvor gescannten Linien horizontal in ihrem Zentrum. Beide hier erzeugten Linien sind so breit, dass ihre Form jeweils eher einem Oval als einer Linie ähnelt (Abb. 14). Die Linie, welche bei $f_l = 4,5$ nN erzeugt worden ist (Abb. 14 A), ist weniger breit und lang als die, welche bei $f_l = 80$ nN erzeugt worden ist (Abb. 14 B). Zusätzlich sind bei der Linie, welche bei $f_l = 80$ nN erzeugt worden ist, zwei punktförmige Erhöhungen zu sehen, welche aus der Lysozym-Monoschicht herausragen. Diese befinden sich genau an den Umkehrpunkten des zuvor durchgeführten Linescans. Sie bestehen ebenfalls aus Lysozym (siehe Diskussion, Abschnitt 4.1.1). Lysozym-Gebilde, welche eine größere Höhe als Lysozym-Monoschichten einnehmen, werden im Folgenden *3D-Lysozym-Aggregate* genannt.

Es sei angemerkt, dass beide Topographiebilder aus Abb. 14 bei genau der loading force ($F_l = 4,5$ nN) aufgenommen worden sind, bei der auch die Linie von Abb. 14 A generiert worden ist. Die Tatsache, dass die Lysozym-Monoschichten in den so aufgenommenen Topographien zu sehen sind, gibt einen Hinweis darauf, dass die AFM-Nadel bei dieser loading force die Monoschicht nicht durchdringt.

In einem weiteren Versuch (nicht gezeigt) wurde die Messung von Abb. 14 wiederholt. Dabei wurden bei ähnlichen Parametern wie zu Abb. 14 erneut zwei Lysozym-Muster im Kontakt-Modus mit Linescan-Variation bei unterschiedlicher loading force erzeugt (Muster **A** bei $F_l = 1$ nN, Muster **B** bei $F_l = 20$ nN). Im Gegensatz zu der in Abb. 14 gezeigten Messung wurde hier die Erzeugungsdauer von **A** so erhöht (Muster **A** bei $t = 6$ min, Muster **B** bei $t = 1$ min), dass die zu **A** zugehörige Lysozym-Monoschicht in allen lateralen Dimensionen größer war als die von **B**. Dennoch beinhaltet **A** im Gegensatz zu **B** keine 3D-Lysozym-Aggregate. Dies ist ein Indiz dafür, dass das Entstehen von 3D-Lysozym-Aggregaten von einer genügend hohen loading force abhängt und nicht etwa von der Größe der zusammenhängenden Lysozym-Monoschicht, auf der die 3D-Lysozym-Aggregate entstehen.

Alle in diesem Abschnitt erwähnten Messungen sind im Rahmen dieser Dissertation entstanden.

3.1.3 Sind die Muster wirklich aus Lysozym?

Um sicher zu gehen, dass die erzeugten Muster aus Lysozym sind, wurden die Versuche aus den Abschnitten 3.1.1 und 3.1.2 ohne Lysozym wiederholt. Es wurde dazu mit einer Variation der Standard-Lysozylösung gearbeitet, welche kein Lysozym enthielt. Um Reste von Lysozym aus vorhergehenden Messungen zu vermeiden, wurden neue, frisch gebrochene Muskovit-Oberflächen verwendet und alle mit der Flüssigkeit der AFM-Flüssigkammer in Kontakt stehenden Objekte gründlich gespült. Dazu wurde die in Abschnitt 2.1.7 beschriebene Reinigung mehrfach durchgeführt. In diesen Messungen konnten keinerlei Strukturen auf Muskovit erzeugt werden. Auch konnte kein "spontan adsorbiertes Lysozym" beobachtet werden. In den Topographien zeigte sich die atomar glatte Muskovit-Oberfläche (nicht gezeigt).

Nach diesem Test wurde eine identische, wässrige Lösung, jedoch mit $c_p = 6.9$ μ M (Standard-Lysozylösung) in die AFM-Flüssigkammer eingefüllt. Dabei wurde weder die AFM-Spitze oder das Muskovit ausgetauscht. Sofort ließen sich wieder Strukturen erzeugen, die denen aus den Abschnitten 3.1.1 und 3.1.2 glichen. Auch das "spontan adsorbierte Lysozym" war sofort wieder sichtbar. Dieser Versuch konnte vielfach und mit verschiedenen AFM-Spitzen wiederholt werden.

In Abschnitt 2.5 wurden die drei Komponenten beschrieben, aus denen die eigentliche Arbeitslösung (z. B. die Standard-Lysozymlösung) zusammengesetzt ist. Die Komponente "Lysozym-Lösung" wurde einem Dialyseverfahren unterworfen, welche sich zur Herstellung von Lysozym-Proteinkristallen bewährt hat. Um auszuschließen, dass das Material der erzeugten Strukturen durch eine in diesem Prozess systematisch vorkommende Verunreinigung zu Stande kommt, wurde der Versuch aus den Abschnitten 3.1.1 und 3.1.2 mit einer einfacher hergestellten Lysozym-Lösung wiederholt. Dabei wurden die in Abschnitt 2.5 beschriebenen Dialyseschritte und der darauf folgende Konzentrations-schritt zur Erhöhung von c_p weggelassen. So wurde eine Lösung hergestellt, die ausschließlich die Komponenten "Puffer A", "Puffer B" beinhaltet und in der dann unmittelbar das erworbene, kommerzielle Lysozym gelöst worden ist. Mit dieser Lösung ließen sich die gleichen Strukturen erzeugen, wie sie in den Abschnitten 3.1.1 und 3.1.2 beschrieben worden sind (nicht gezeigt).

Alle in diesem Abschnitt erwähnten Messungen sind im Rahmen dieser Dissertation entstanden.

3.1.4 Lysozym-Muster durch stationären Kontakt?

In den Abschnitten 3.1.1 und 3.1.2 ist beschrieben, wie sich Lysozym-Strukturen auf Muskovit durch eine über Muskovit gleitende AFM-Spitze erzeugen lassen. Zusätzlich sollte geklärt werden, ob sich ähnliche Strukturen durch eine AFM-Spitze erzeugen lassen, welche sich im stationären Kontakt mit Muskovit befindet. Dazu wurde eine AFM-Spitze mehrere Minuten dauerhaft mit dem Muskovit an einem Punkt P in Kontakt gebracht. Dabei umgab die AFM-Spitze die Standard-Lysozymlösung. Anschließend wurde eine solche Fläche auf dem Muskovit im Kontakt-Modus gescannt, die in ihrem Zentrum P enthielt. In der zugehörigen Topographie ließen sich bei P keine sich von der Umgebung unterscheidenden Muster erkennen (nicht gezeigt). Im Anschluss wurde, ähnlich wie in den Abschnitten 3.1.1 und 3.1.2, mit der benutzten AFM-Spitze ein Lysozym-Muster auf dem Muskovit erstellt. Dadurch wurde sicher gestellt, dass die benutzte Spitze schreibfähig (siehe Abschnitt 3.1.9) ist. Das Ergebnis des hier beschriebenen Versuches konnte im Rahmen der vorliegenden Dissertation dreimal mit verschiedenen AFM-Spitzen bestätigt werden.

3.1.5 Erzeugung von Lysozym-Muster im Kraft-Distanz Modus

Auch im Kraft-Distanz-Modus (siehe Abschnitt 2.1.2) lassen sich in der Standard-Lysozymlösung an der Kontaktstelle von AFM-Spitze und Muskovit Lysozym-Muster erzeugen. Diese haben aufgrund des veränderten Bewegungsablaufes der AFM-Spitze eine andere Form als die Lysozym-Muster, welche im Kontakt-Modus erzeugt worden sind. Ihre typische Form wird in den folgenden Absätzen beschrieben. Aufgrund der Möglichkeit, im Kraft-Distanz Modus während der gesamten Zeit die loading force kontrollieren zu können (siehe Abschnitt 2.1.2), konnten mit Hilfe dieses Modus die Lysozym-Muster bzgl. ihrer Form und ihrer Größe besonders gut reproduzierbar erzeugt werden. Dadurch eigneten sich diese Muster besonders gut für die Anfertigung von Messreihen unter Variation einzelner Parameter (siehe unten).

Im Kraft-Distanz-Modus wird die Probe wiederholt über einen Höhenbereich ΔZ angehoben und wieder abgesenkt. Dabei durchfährt die Probenhöhe einen Bereich mit einer

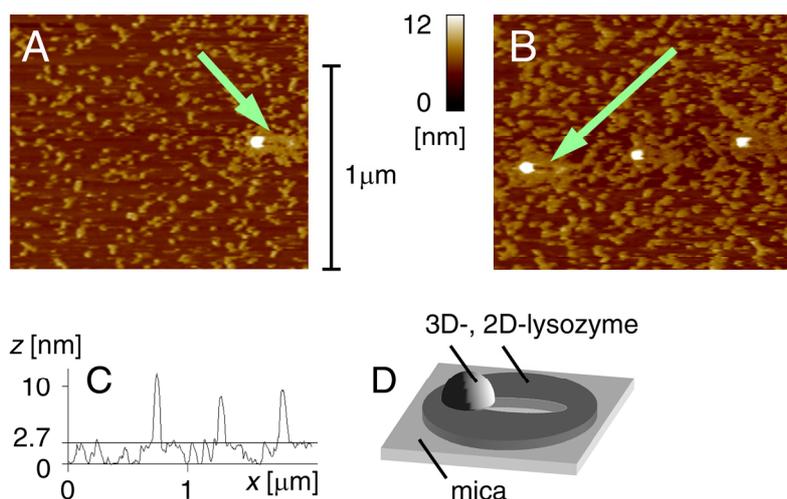


Abb. 15 **A** und **B** zeigen AFM-Topographiebilder von Lysozym-Monoschichten und Lysozym-3D-Aggregaten, welche zuvor im Kraft-Distanz Modus erzeugt worden sind. Das in **A** gezeigte Lysozym-Muster wurde bei $t = 2$ min, $f = 9,3$ Hz und $s_f = s_d = 500$ nm erzeugt. Um die horizontal verlaufende, 96 nm lange Gleitstrecke am rechten Bildrand entstand das dort sichtbare Muster. Nach der Aufnahme von **A** wurden auf dem selben Substrat und mit dem selben Verfahren zwei weitere Muster neben dem bereits erzeugten Muster erzeugt. Alle drei sind in **B** zu sehen. In **C** ist das Höhenprofil über einer Gerade gezeigt, welche alle drei Muster schneidet. In **D** ist die Form eines der so erzeugten Muster schematisch dargestellt. Das Muskovit wurde dabei mit "mica", die 2,7 nm hohe Erhöhung mit "2D-Lysozyme" und die höheren Erhebungen mit "3D-Lysozyme" gekennzeichnet (siehe Text). **A** und **B** wurden im Kontakt-Modus bei 3,8 Hz und $F_l = 2$ nN in der Standard-Lysozymlösung und auf Muskovit als Substrat aufgenommen. Die Abb. ist aus Leisten et al., 2006 [Lei06] entnommen und war zuvor schon in Leisten, 2004 [Lei04] zu sehen.

Länge s_f , bei dem sich der Cantilever noch nicht verbiegt und einen Bereich mit einer Länge s_d , bei dem die AFM-Spitze mit dem Substrat in Kontakt ist und sich der Cantilever verbiegt (siehe Abschnitt 2.1.2). Im letztgenannten Bereich fährt die AFM-Spitze unter zunehmender Kraft auf dem Substrat die Gleitstrecke s_k ab (siehe Abschnitt 2.1.6).

Bei dem im Folgenden beschriebenen Experiment wurde in der Standard-Lysozymlösung im Kraft-Distanz Modus das Substrat Muskovit gegen eine AFM-Spitze wiederholt angehoben und wieder abgesenkt. Dies geschah über eine Dauer von 2 Minuten bei 9,3 Hz mit $s_d = s_k = 500$ nm und $k = 0,08$ N/m. Mit der bekannten Länge des benutzten Cantilevers von $l = 96$ μm und einem Winkel zwischen Cantilever und Muskovit von $\alpha = 11^\circ$ (siehe Abschnitt 2.1.7) bedeutet dies nach Gleichung 2, dass die AFM-Spitze wiederholt eine 96 nm lange Gleitstrecke abgefahren hat. Diese wurde wiederholt von einem ihrer Enden mit einer linear von $F_l = 0$ nN bis auf $F_l = s_d k = 40$ nN steigender loading force mit der AFM-Spitze abgefahren. Danach wurde im Kontakt-Modus ein Topographiebild aufgenommen, welches die zuvor gescannte Gleitstrecke enthält. Es ist in Abb. 15 A gezeigt. Ein Pfeil innerhalb dieser Abbildung zeigt auf das Lysozym-Muster, welches durch den oben beschriebenen Prozess entstanden ist. Das Muster besteht aus einer ausgefranst, ovalen, 2,7 nm hohen Schicht, die sich in der Diskussion als Lysozym-Monoschicht herausstellen wird. In Ihrer Mitte ist eine ca. 90 nm lange, linienförmige Einkerbung zu sehen. In der Diskussion wird sich zeigen, dass diese Einkerbung entlang der Gleitstrecke entstanden ist. Am linken Ende der Einkerbung, der Punkt an dem die loading force der AFM-Spitze auf der Gleitstrecke maximal wird, ist eine weit über 2,7 nm hohe Erhebung zu sehen, welches als 3D-Lysozym-Aggregat identifiziert werden kann (siehe Diskussion, Abschnitt 4.1.1).

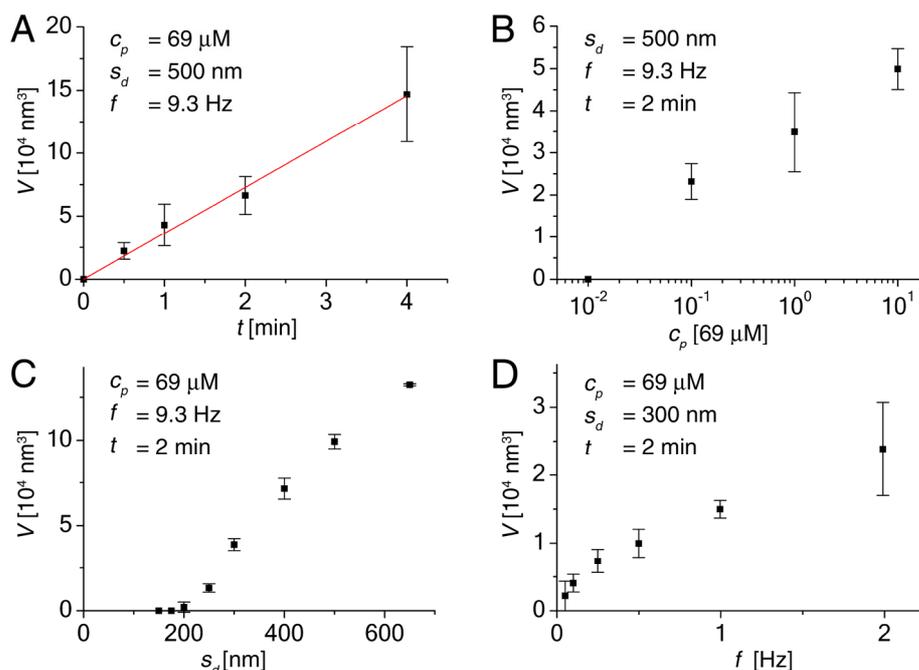


Abb. 16 Volumen V von 3D-Lysozym-Aggregaten, die im Kraft-Distanz-Modus erzeugt worden sind aufgetragen auf die Erzeugungsdauer t (**A**), die Lysozym-Konzentration c_p (**B**), Deflektionsstrecke s_d (**C**) und Frequenz f (**D**). Alle weiteren Parameter wurden, wie jeweils links oben angegeben, konstant gehalten. Abgesehen von diesen Werten wurden die Parameter der Standard-Lysozymlösung benutzt. Die Volumina wurden jeweils als Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängig erzeugten 3D-Lysozym-Aggregaten angegeben. Innerhalb der Messreihen wurde die AFM-Spitze jeweils nicht gewechselt. Weitere Parameter: $s_f = 500 \text{ nm}$ (A+B), $s_f = s_d$ (C), $s_f = 300 \text{ nm}$ (D), $k = 0,08 \text{ N/m}$ (A-D). Die Abb. ist aus Leisten et al., 2006 [Lei06] entnommen und war zuvor schon in Leisten, 2004 [Lei04] zu sehen.

Nach der Aufnahme von Abb. 15 A wurden auf dem selben Substrat, links neben dem bereits erzeugten Lysozym-Muster, mit dem selben Verfahren zwei weitere Lysozym-Muster erzeugt. Jeweils nach der Erzeugung eines solchen Musters wurde im Kontakt-Modus eine Topographie des in Abb. 15 A gezeigten Substrates erstellt. Die zuletzt aufgenommene Topographie ist in Abb. 15 B zu sehen. Man sieht, dass die neu erzeugten Lysozym-Muster dem zuerst erzeugten sehr ähnlich sind. Im linken Lysozym-Muster von Abb. 15 B ist die sich auf der Gleitstrecke befindliche Einkerbung besonders deutlich zu sehen. Sie wurde mit einem Pfeil markiert. Die in Abb. 15 A noch sichtbare Einkerbung inmitten des zuerst erstellten Musters ist hier nicht mehr zu sehen. Vermutet wird, dass auf dieser Einkerbung bei der Erstellung der oben erwähnten Topographien durch den gleitenden Kontakt zur AFM-Spitze eine Lysozym-Monoschicht erzeugt worden ist. Im Vergleich von Abb. 15 A mit Abb. 15 B lässt sich ebenfalls erkennen, dass das die Lysozym-Muster umgebende spontan adsorbierte Lysozym an Dichte gewinnt. Dies lässt sich durch den dreifachen Scanvorgang erklären, welcher zwischen der Aufnahme von Abb. 15 A und der Aufnahme von Abb. 15 B auf der sichtbaren Muskovit-Oberfläche stattgefunden hat.

In Abb. 15 C ist das Höhenprofil über eine Gerade gezeigt, welche alle drei Muster aus Abb. 15 B schneidet. Man kann die Höhe der Lysozym-Monoschicht (2,7 nm) und der 3D-Lysozym-Aggregate daraus ablesen. In Abb. 15 D ist die typische Form eines wie oben beschrieben erzeugten Lysozym-Musters schematisch dargestellt.

Es wurden weitere Lysozym-Muster im Kraft-Distanz-Modus erzeugt. Dabei stellte sich heraus, dass sich die 3D-Lysozym-Aggregate im Kraft-Distanz-Modus bzgl. ihrer Form

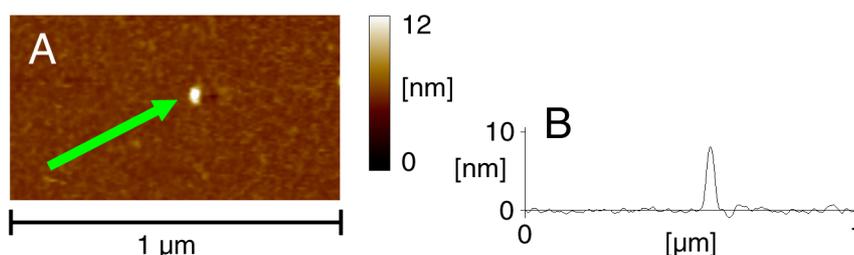


Abb. 17 **A** AFM-Topographie eines zuvor im Kraft-Distanz-Modus erzeugten 3D-Lysozym-Aggregates. Das mit Pfeil markierte Aggregat wurde bei $t = 2$ min, $f = 9,3$ Hz, $s_d = 300$ nm, $s_f = 200$ nm und $k = 0,08$ N/m erzeugt. In **B** ist ein bzgl. **A** horizontal verlaufendes Höhenprofil gezeigt, welches das in **A** markierte Aggregat durchquert. Es ist in einer Lösung, ähnlich der Standard-Lysozymlösung entstanden, die aber eine 10-fach höherer Lysozym-Konzentration von $c_p = 69$ µM besaß. Im Gegensatz zu den in Abb. 15 gezeigten 3D-Lysozym-Aggregaten, ist bei dem hier gezeigten sowohl die umgebende Lysozym-Monoschicht als auch das spontan adsorbierte Lysozym nicht sichtbar. Die Topographie wurde bei 3,8 Hz und $F_t = 2$ nN aufgenommen.

und ihrer Größe besonders gut reproduzierbar erzeugen ließen. Es konnten schließlich vier Messreihen erstellt werden, bei denen das Volumen der 3D-Lysozym-Aggregate auf die Erzeugungsdauer t , die Lysozym-Konzentration c_p , die Deflektionsstrecke s_d und die Frequenz f aufgetragen werden konnte. Für jeden Messpunkt der Messreihen wurden jeweils drei 3D-Lysozym-Aggregate erzeugt. Das Volumen wurde für jedes Aggregat so vermessen, wie es in Abschnitt 2.1.11 beschrieben ist. Zu jedem Messpunkt wurde der Mittelwert und die Standardabweichung der drei gemessenen Volumina angegeben. In all diesen Messreihen wurde jeweils die AFM-Spitze nicht gewechselt. Die Messreihen sind in Abb. 16 zu sehen.

3.1.5.1 Variation der Lysozym-Konzentration

Abb. 16 B kann man entnehmen, dass das Volumen der erzeugten 3D-Lysozym-Aggregate logarithmisch mit der Lysozym-Konzentration zunimmt. Weiter fällt auf, dass sich bei $c_p \leq 0,69$ µM keine 3D-Lysozym-Aggregate erzeugen lassen. Die Messreihe enthält einen weiteren, nicht eingezeichneten Messpunkt bei $c_p = 0$ µM mit dem nach Abschnitt 3.1.3 zu erwartenden Messwert $V = 0$ nm³. Die Messreihe wurde mit den Werten $c_p = \{0; 0,069; 0,69; 6,9\}$ µM wiederholt (Daten nicht gezeigt). Auch in der Wiederholung bestätigte sich, dass erst bei einer Lysozym-Konzentration von $c_p \geq 6,9$ µM 3D-Lysozym-Aggregate erzeugt werden können. Bei $c_p = 6,9$ µM entsprechen die verwendeten Lysozym-Lösungen der Standard-Lysozymlösung.

Für die oben erwähnten Messreihen mussten Topographien von den 3D-Lysozym-Aggregaten und ihrer Umgebung mit dem spontan adsorbierten Lysozym erstellt werden. Darin zeigte sich, dass bei $c_p \leq 0,69$ µM nicht nur keine 3D-Lysozym-Aggregate mehr erzeugt werden konnten, sondern dass sich ebenfalls auch die nach Abb. 15 "dazugehörigen" Lysozym-Monoschichten nicht mehr erzeugen ließen (nicht gezeigt). Bei erhöhter Lysozym-Konzentration ($c_p \geq 69$ µM) ließen sich zwar 3D-Lysozym-Aggregate erzeugen (siehe Abb. 16 B), die nach Abb. 15 aber "dazugehörigen" Lysozym-Monoschichten, welche bei $c_p = 6,9$ µM die 3D-Lysozym-Aggregate umlagern, sind hier nicht zu sehen (siehe Abb. 17). Auch durch das wiederholte Scannen von Flächen (wie in Abschnitt 3.1.1) oder von Linien (wie in Abschnitt 3.1.2) konnte bei solch erhöhten Lysozym-Konzentrationen keine Veränderung der gescannten Oberfläche beobachtet werden (nicht gezeigt). Ebenfalls ist in jeglichen AFM-Topographien, welche

bei $c_p \geq 69 \mu\text{M}$ aufgenommen worden sind, das spontan adsorbierte Lysozym nicht mehr zu sehen (siehe z. B. Abb. 17).

In der Diskussion wird sich zeigen, dass sich bei den benutzten Lösungsbedingungen mit $c_p \geq 69 \mu\text{M}$ so viel spontan adsorbiertes Lysozym auf dem Muskovit ablagert, dass sich eine zusammenhängende Lysozym-Monoschicht bildet. Dadurch sind in den zugehörigen AFM-Topographien die Höhenunterschiede zwischen Lysozym und Muskovit nicht sichtbar. Auf einer bereits vorhandenen Lysozym-Monoschicht lassen sich offensichtlich keine weiteren Lysozym-Monoschichten erzeugen.

Die AFM-Topographie des Substrates ist bei $c_p \geq 69 \mu\text{M}$ aufgrund der spontan gebildeten zusammenhängenden Lysozym-Monoschicht deutlich glatter als bei $c_p \leq 6,9 \mu\text{M}$ (vgl. Abb. 17 B mit Abb. 15 C). Dadurch lassen sich die Volumina der 3D-Lysozym-Aggregate bei $c_p \geq 69 \mu\text{M}$ deutlich besser bestimmen als bei $c_p \leq 6,9 \mu\text{M}$ (siehe Abschnitt 2.1.11). Daher wurde für alle weiteren Messreihen dieses Abschnittes eine Lösung gleich der Standard-Lysozymlösung gewählt, allerdings mit einer um den Faktor zehn erhöhten Lysozym-Konzentration von $c_p = 69 \mu\text{M}$.

3.1.5.2 Variation der Erzeugungsdauer

Unter Variation der Erzeugungsdauer t wurde das Volumen V der erzeugten 3D-Lysozym-Aggregate vermessen. Das Ergebnis $V(t)$ ist in Abb. 16 A zu sehen. Eine lineare, bei Null beginnende Kurve wurde durch einen Fit der Software Origin 7 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA) den Messwerten angepasst und in den Graphen eingetragen. Man erkennt, dass das Volumen V mit zunehmender Erzeugungsdauer t zunimmt.

3.1.5.3 Variation der loading force

Unter Variation der Deflektionsstrecke s_d wurde das Volumen V der erzeugten 3D-Lysozym-Aggregate vermessen. Das Ergebnis $V(s_d)$ ist in Abb. 16 C zu sehen. Man entnimmt dem Graphen, dass sich bei größerer Deflektionsstrecke s_d größere Aggregate erzeugen lassen. Bei $s_d \leq 200 \text{ nm}$ lassen sich keine Aggregate erzeugen. Mit $F_l = k * s_d$ ist die loading force proportional mit der Deflektionsstrecke verknüpft (siehe Abschnitt 2.1.2). In der Diskussion wird klar werden, dass sich 3D-Lysozym-Aggregate erst ab einer spitzenspezifischen loading force F_l^{min} erzeugen lassen. Dies ist der Grund, warum sich bei $s_d \leq 200 \text{ nm}$ keine 3D-Lysozym-Aggregate bilden. Bei der hier benutzten AFM-Spitze ist $F_l^{min} = 0,08 \text{ N/m} * 200 \text{ nm} = 16 \text{ nN}$.

Der Graph von Abb. 16 C ist unter $s_f = s_d$ entstanden. Dadurch konnte die Aufenthaltsdauer der Spitze auf dem Muskovit pro Periode auch bei variierendem s_d konstant gehalten werden. Die Geschwindigkeit, mit der sich die AFM-Spitze auf der Gleitstrecke bewegt, konnte so allerdings nicht konstant gehalten werden.

Die Messreihe von Abb. 16 C wurde unter der Bedingung $s_f + s_d = \text{konstant}$ wiederholt. Die Geschwindigkeit, mit der sich die AFM-Spitze auf der Gleitstrecke bewegt, konnte so konstant gehalten werden. Das nicht gezeigte Ergebnis $V(s_d)$ zeigt eine ähnliche Form, wie der Graph von Abb. 16 C. Auch hier zeigt sich ein Wert von s_d , unterhalb dessen sich keine 3D-Lysozym-Aggregate erzeugen lassen. Durch diese Messreihe konnte ausgeschlossen werden, dass der Verlauf des Graphen von Abb. 16 C durch die Variation der Geschwindigkeit der AFM-Spitze anstatt durch die Variation der loading force bestimmt wird.

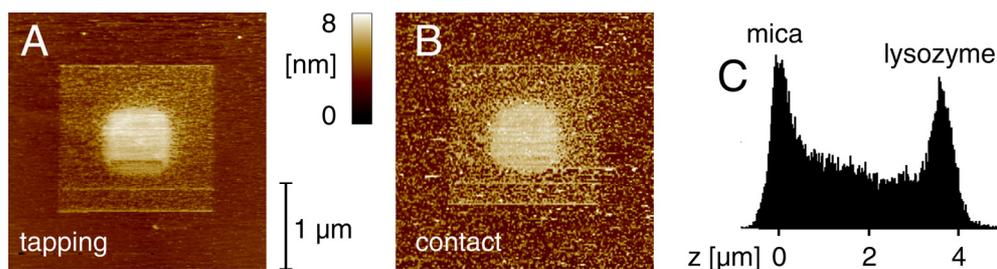


Abb. 18 **A** AFM-Topographie eines Lysozym-Musters, welches zuvor im Tapping-Modus erzeugt worden ist. Das Muster besteht aus zwei ineinander geschachtelten Quadraten. Das äußere entstand durch das einmalige Scannen einer $3 \times 3 \mu\text{m}$ großen quadratischen Fläche, das innere durch das einmalige Scannen einer $1 \times 1 \mu\text{m}$ großen quadratischen Fläche innerhalb der äußeren quadratischen Fläche. Beide Flächen wurden mit 256 Linien, $f = 3 \text{ Hz}$, $A_f = 40 \text{ nm}$, $d = 6 \text{ nm}$ und $k = 0,08 \text{ N/m}$ im Tapping Modus gescannt. A wurde abgesehen von der größeren Scannfläche mit den gleichen Parametern aufgezeichnet, mit denen zuvor das Muster erzeugt worden ist. In **B** ist das selbe Muster aus A zu sehen. B wurde jedoch im Kontakt-Modus mit 256 Linien, $f = 3 \text{ Hz}$ und $F_l = 1 \text{ nN}$ mit der selben Spitze aus A aufgezeichnet. In **C** ist das Höhenhistogramm eines Ausschnittes der Topographie von B gezeigt. Der Ausschnitt bestand aus einem $1 \mu\text{m}$ breiten Streifen, der mittig und horizontal über die gesamte Breite vom B verlief. Die Höhen, welche der blanken Muskovit-Schicht bzw. der adsorbierten Lysozym-Monoschicht zugeordnet werden konnten (siehe Text) wurden mit "mica" bzw. mit "lysozyme" bezeichnet. A und B wurden in der Standard-Lysozymlösung aufgenommen.

Um ebenfalls ausschließen zu können, dass die Form des Graphen von Abb. 16 C durch die Variation der freien Weglänge s_f beeinflusst wird, wurde in einer weiteren Messreihe das Volumen der V unter Variation von s_f in einem Bereich von $s_f = (50-500) \text{ nm}$ bei konstanten s_d vermessen. Es konnte dabei keine Beeinflussung von V mit der Variation von s_f beobachtet werden. Weiter wurde beobachtet, dass sich 3D-Lysozym-Aggregate auch bei $s_f = 0 \text{ nm}$ erzeugen ließen.

3.1.5.4 Variation der Frequenz

Unter Variation der Frequenz f wurde das Volumen V der erzeugten 3D-Lysozym-Aggregate vermessen. Das Ergebnis $V(f)$ ist in Abb. 16 D zu sehen. Man entnimmt dem Graphen, dass die Volumina der Aggregate mit steigender Frequenz zunehmen. Der Graph deutet ein Sättigungsverhalten von V bei steigender Frequenz an.

3.1.6 Erzeugung von Lysozym-Monoschichten im Tapping-Modus

Im Tapping-Modus (siehe Abschnitt 2.1.4) lassen sich in der Standard-Lysozymlösung beim Scannen einer Muskovit-Oberfläche mit einer AFM-Spitze ebenfalls Lysozym-Monoschichten auf dem Muskovit erzeugen. Um dies zu zeigen, wurde nacheinander eine $(1 \times 1, 3 \times 3 \text{ und } 6 \times 6) \mu\text{m}^2$ große Fläche auf Muskovit im Tapping-Modus mit 256 Linien bei $f = 3 \text{ Hz}$ gescannt. Die jeweils kleinere Fläche bildet dabei das Zentrum der jeweils größeren Fläche. Die Aufenthaltsdauer der AFM-Spitze pro Fläche Muskovit war auf der innersten Fläche somit ca. zehn mal höher als auf der mittleren Fläche. Ein Ausschnitt der Topographie, die bei dem Scannen der $6 \times 6 \mu\text{m}$ großen Fläche entstanden ist, ist in Abb. 18 A gezeigt.

Man sieht im Zentrum von Abb. 18 A zwei ineinander geschachtelte, quadratische Flächen, welche sich in ihrer Struktur jeweils von ihrer Umgebung unterscheiden. Die äußere quadratische Fläche ist genau $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ groß und entspricht in ihrer Lage der zuvor gescannten, ebenfalls $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ messenden Oberfläche. Die Struktur dieser Fläche besteht aus vielen, kleinen Bereichen, die sich mit ungefähr gleicher Höhe vom Untergrund abheben. Die Bereiche sind zufällig verteilt und zeigen keine Vorzugsrichtung auf, wie es bei den im Kontakt-Modus entstandenen "länglichen Domänen" (siehe Abb. 11) der Fall war.

Die innere quadratische Fläche aus Abb. 18 A ist mit einer Größe von $1,3 \times 1,3 \mu\text{m}^2$ etwas größer als die zuerst gescannte, $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ große Fläche. Außerdem fällt auf, dass diese Fläche nicht scharf quadratisch, sondern an ihren Ecken etwas abgerundet ist. Die Fläche zeigt im Vergleich zu der gefleckten, äußeren quadratischen Fläche eine geringere Rauheit auf (siehe Abb. 18 A).

Um die Höhe der in Abb. 18 A gezeigten Strukturen bestimmen zu können, wurde die in Abb. 18 A gezeigte Oberfläche im Kontakt-Modus gescannt. Die zugehörige Topographie ist in Abb. 18 B gezeigt. Ein Ausschnitt dieser Topographie wurde benutzt, um ein Höhenhistogramm (siehe Abschnitt 3.1.1) zu erstellen (siehe Abb. 18 C). Darin sieht man, dass zwei Höhen, die einen Höhenunterschied von ca. 3,7 nm aufweisen, besonders häufig vorkommen. 3,7 nm ist die Höhe, die den Strukturen aus Abb. 18 zugeordnet werden kann.

In der Diskussion wird sich zeigen, dass sowohl die Struktur der inneren, als auch die Struktur der äußeren quadratischen Fläche aus Abb. 18 B aus Lysozym besteht. Dadurch, dass die Aufenthaltsdauer der AFM-Spitze auf dem inneren Quadrat ca. zehn mal größer war als auf dem äußeren Quadrat, formierte sich dort eine Struktur mit einer höheren Lysozym-Dichte. Da ein Teil des Lysozyms, welches durch die Bewegung der AFM-Spitze auf das innere Quadrat transportiert worden ist, in der bereits geschlossenen Lysozym-Monoschicht keinen Platz mehr fand, dehnte sich die quadratische Struktur über die Grenzen der gescannten, quadratischen Fläche ($1 \times 1 \mu\text{m}$) aus (ähnlich wie bei Abb. 14).

Die Höhe der im Tapping-Modus erzeugten Lysozym-Monoschicht entspricht eher der langen Seite eines Lysozym-Moleküls von 3,8 nm als der kurzen Seite von 2,7 nm (siehe Diskussion).

Lysozym-Muster, ähnlich derer aus Abb. 18, konnten an insgesamt neun verschiedenen Messtagen erzeugt werden. Dazu wurden unabhängig voneinander hergestellte Standard-Lysozymlösungen und vier andere, aber typengleiche AFM-Spitzen verwendet. Im Gegensatz zu der Erzeugung von Lysozym-Monoschichten im Kontakt-Modus (siehe Abschnitt 3.1.9), konnte bei allen so variierten Wiederholungen des oben beschriebenen Versuches, Lysozym-Monoschichten auf Muskovit erzeugt werden.

Zweimal wurde der in diesem Abschnitt beschriebene Versuch ohne Lysozym wiederholt. Dabei bildeten sich keine Strukturen auf dem Muskovit. Erst nach unmittelbarer Zugabe der Standard-Lysozymlösung und ohne die Veränderung weiterer Parameter, konnten dabei mit dem in diesen Abschnitt aufgezeigten Verfahren Lysozym-Monoschichten erzeugt werden.

Alle in diesen Abschnitt aufgeführten Messungen wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation angefertigt.

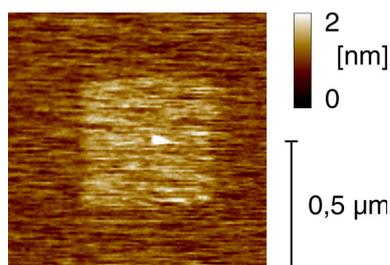


Abb. 19 AFM-Topographie einer spontan adsorbierten Lysozym-Monoschicht auf Muskovit, welche in einem $0,5 \times 0,5 \text{ nm}^2$ großen, quadratischen Bereich durch die AFM-Spitze im Tapping-Modus verändert worden ist. Der veränderte Bereich ist im Zentrum der Topographie sichtbar. Die Veränderung trat auf, nachdem der Bereich mit 256 Linien bei einer Scannrate von 4 Hz im Tapping Modus ($A = 30 \text{ nm}$, $d = 5 \text{ nm}$, $f = 31,82 \text{ kHz}$, $k = 0,08 \text{ N/m}$) gescannt wurde. Der Bereich ist im Vergleich zu seiner Umgebung um ca. 0,4 - 0,8 nm erhöht. Die Topographie wurde im Tapping-Modus mit den selben Parametern aufgenommen, mit welchen auch der veränderte Bereich zuvor gescannt worden ist. Die Topographie entstand in der Standard-Lysozymlösung, aber mit $c_s = 85 \text{ mM}$. In einer solchen Lösung bildet sich spontan eine zusammenhängende Lysozym-Monoschicht auf dem Muskovit (siehe Text).

3.1.7 Veränderung einer Lysozym-Monoschicht im Tapping-Modus

Bringt man Muskovit in die Standard-Lysozymlösung, so adsorbiert Lysozym spontan auf dem Muskovit (siehe Abschnitt 3.1.1 und Diskussion). Dabei sind stets Cluster aus spontan adsorbierten Lysozym neben noch freien Stellen des Muskovits beobachtet worden (siehe Abschnitt 3.1.1). Reduziert man die Ionenstärke durch die Wahl von $c_s = 85 \text{ mM}$, so sind die spontan gebildeten Lysozym-Cluster auf dem Muskovit nicht mehr zu erkennen (siehe Abb. 19). In der Diskussion wird klar werden, dass sich bei einer solch reduzierten Ionenstärke spontan eine zusammenhängende Lysozym-Monoschicht auf dem Muskovit bildet. Dadurch ist in der Topographie der Höhenunterschied zwischen Lysozym und Muskovit nicht mehr sichtbar und das Lysozym lässt sich anhand der Topographie nicht mehr erkennen.

Im Tapping-Modus kann die Höhe einer solchen, spontan adsorbierten Monoschicht durch den Kontakt mit der AFM-Spitze um ca. 0,4 - 0,8 nm erhöht werden (siehe Abb. 19). In der Diskussion wird vermutet, dass die Lysozym-Moleküle der Monoschicht durch die Bewegung der AFM-Spitze im Tapping-Modus so umgeordnet werden, dass sie nicht mehr mit ihrer kurzen Seite, sondern mit ihrer langen Seite zur Höhe der Monoschicht beitragen.

3.1.8 Erzeugung von 3D-Lysozym-Aggregaten im Tapping-Modus

In Abschnitt 3.1.6 wurde gezeigt, dass eine AFM-Spitze im Tapping-Modus eine Lysozym-Monoschicht auf Muskovit erzeugen kann. In Abschnitt 3.1.7 wurde gezeigt, wie die AFM-Spitze im Tapping-Modus eine bereits vorhandene, spontan adsorbierte Lysozym-Monoschicht auf Muskovit verändern kann. In beiden Fällen wurde, im Vergleich zu den im Folgenden benutzten Parametern, die freie Amplitude des Cantilevers A als auch die Dämpfung d relativ klein gewählt (vergleiche hierzu Abb. 18 und Abb. 19 mit Abb. 20). Bei starker Erhöhung von freier Amplitude und Dämpfung auf z. B.

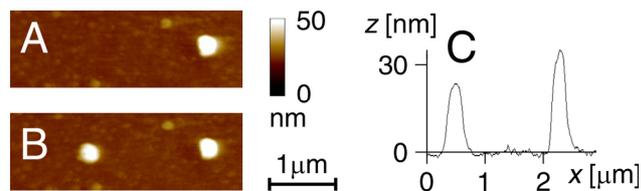


Abb. 20 **A** AFM-Topographie eines 3D-Lysozym-Aggregates (rechter Bildrand). Das Aggregat wurde im Tapping-Modus erzeugt, indem die AFM-Spitze 3 Minuten lang bei fixierter Position mit dem Muskovit in Kontakt stand. Die Spitze wurde dazu mit 31,65 kHz auf $A = 560$ nm angeregt und mit $d = 230$ nm gedämpft. **B** AFM-Topographie von der gleichen Fläche wie in A, jedoch nachdem mit den selben Parametern ein weiteres 3D-Lysozym-Aggregat erzeugt worden ist. **C** Höhenprofil aus B über die Spitzen beider dort sichtbaren Aggregate. Die Topographien wurden im Tapping-Modus ($f = 31,65$ kHz, $A = 560$ nm, $d = 140$ nm, $k = 0,08$ N/m) in der Standard-LysozymbLösung bei erhöhter Lysozym-Konzentration von $c_p = 1,7$ mM (25 mg/ml) aufgenommen.

$A = 560$ nm und $d = 230$ nm und bei fixer Position der AFM-Spitze konnten im Tapping-Modus 3D-Lysozym-Aggregate erzeugt werden (siehe Abb. 20).

Die Aggregate aus Abb. 20 wurden in einer Lysozym-haltigen Lösung, gleich der Standard-LysozymbLösung aufgenommen. Allerdings war die Lysozym-Konzentration auf $c_p = 1,7$ mM erhöht. Es wurden aber auch 3D-Lysozym-Aggregate bei anderen Lysozym-Konzentrationen im Tapping-Modus erzeugt (nicht gezeigt), unter anderem auch in der Standard-LysozymbLösung.

Die für Abb. 20 benutzte Lysozym-Lösung hat eine Übersättigung von $\beta = 4$ [Cac91]. In dieser Lösung wurde sowohl im Rahmen der vorliegenden Arbeit, als auch bei anderen Arbeiten vielfach beobachtet, dass sich spontan Lysozym-Kristalle ausbilden (hier nicht gezeigt, siehe [Li99, Wie01]). In einer solchen Lösung wurden im Rahmen dieser Arbeit im Tapping-Modus an verschiedenen Messtagen und mit verschiedenen AFM-Spitzen ca. fünfzig 3D-Lysozym-Aggregate erzeugt. Dabei konnten Aggregate erzeugt werden, die über 50 nm hoch waren und einen Durchmesser von über 300 nm aufwiesen. Es konnten unter diesen Lösungsbedingungen keine spontan entstandenen Lysozym-Cluster auf Muskovit beobachtet werden, die eine ähnliche Größe aufwiesen. Obwohl davon ausgegangen wird, dass Protein-Kristalle aus unstrukturierten Protein-Aggregaten hervorgehen können, sofern der Radius dieser Aggregate den "kritischen Radius" übersteigt (siehe Abschnitt 1.3 und 4.1.7), konnte hier in keinem Fall beobachtet werden, dass sich aus einem erzeugten 3D-Lysozym-Aggregat ein Lysozym-Kristall ausbildete.

Bei der Erzeugung all dieser 3D-Lysozym-Aggregate fiel auf, dass sich die Aggregate nur unter folgenden Bedingungen bildeten:

- Freie Amplitude $A \geq 100$ nm.
- Dämpfung $d \geq 2/3 A$.
- Von den beiden zur Auswahl stehenden Cantilevern musste der mit der größeren Federkonstante ($k = 0,08$ N/m) ausgewählt werden.

Eine definierte loading force lässt sich im Tapping Modus nicht angeben. Es ist jedoch anzunehmen, dass eine Erhöhung von A , d und k , in den oben angegebenen Bereichen, jeweils einer Erhöhung der Wechselwirkungskraft zwischen AFM-Spitze und Substrat zur Folge hat. Daher lässt sich vermuten, dass auch zur Erzeugung von 3D-Lysozym-Aggregaten im Tapping-Modus ein Schwellenwert der Wechselwirkungskraft zwischen AFM-Spitze und Substrat überschritten werden muss.

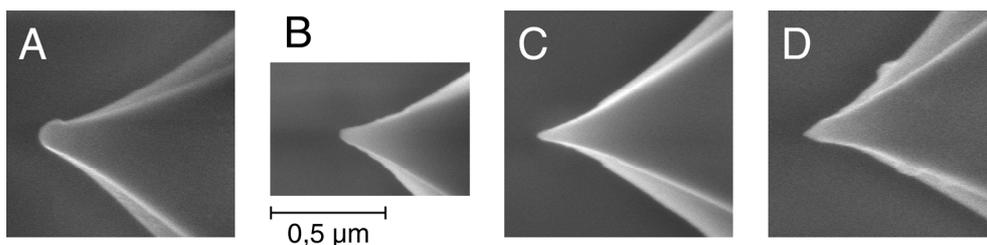


Abb. 21 A-D REM-Bilder (siehe Abschnitt 2.2) von jeweils einer nach links zeigenden AFM-Spitze. Die AFM-Spitzen gehören alle zum selben Spitzentyp ("OMCL TR400 PSA", Olympus Corp., Tokio, Japan). Dennoch sehen sie an ihrer äußersten Spitze unterschiedlich aus. Die AFM-Spitzen wurden zuvor auf ihre Eigenschaft, Lysozym-Muster auf Muskovit erzeugen zu können, untersucht (siehe Tabelle 1). Der angegebene Maßstab gilt für alle Bilder.

Für die Reproduzierung der in diesen Abschnitt gemachten Versuche sei erwähnt, dass sich eine erforderliche freie Amplitude von $A \geq 100$ nm unter einer erforderlichen Dämpfung von $d \geq 2/3 A$ mit dem zur Verfügung stehenden AFM nur schwer erzeugen lässt.

3.1.9 Unterschiede im Schreibverhalten individueller AFM-Spitzen

Nicht immer konnte die Erzeugung der Lysozym-Muster erfolgreich wiederholt werden. Es wurde vermutet, dass die produktionsbedingten Schwankungen der Form des äußersten Endes der AFM-Spitze einen Einfluss auf die Erzeugung der Lysozym-Muster haben. Im Folgenden sind alle beobachteten Phänomene aufgelistet, welche jeweils ein Indiz für die Bestätigung dieser Vermutung darstellen.

- a) Es ist beobachtet worden, dass sich sowohl Lysozym-Monoschichten im Kontakt-Modus, als auch 3D-Lysozym-Aggregate im Kraft-Distanz-Modus besonders gut reproduzieren ließen, wenn weder die AFM-Spitze gewechselt noch andere Parameter variiert wurden.
- b) Es konnte vielfach beobachtet werden, dass eine AFM-Spitze, welche eben noch reproduzierbar Lysozym-Monoschichten im Kontakt-Modus oder 3D-Lysozym-Aggregate im Kraft-Distanz-Modus erzeugte, plötzlich ihre Fähigkeit verlor, Lysozym-Muster zu erzeugen. Dem Zeitpunkt, bei dem eine AFM-Spitze diese Fähigkeit verlor, konnte in den meisten Fällen ein Ereignis zugeordnet werden, das die Spitzenform verändert haben könnte. Solche Ereignisse sind z. B. Luftblasen, die in die AFM-Flüssigkammer eindringen. Durch Luftblasen kann die Oberflächenspannung der Flüssigkeit auf den Cantilever Kräfte ausüben, welche sich auf die AFM-Spitze übertragen und so die AFM-Spitze beschädigen können.
- c) Es konnten AFM-Spitzen gefunden werden, mit denen sich keine Lysozym-Monoschichten im Kontakt-Modus oder 3D-Lysozym-Aggregate im Kraft-Distanz-Modus erzeugen ließen. Durch Austausch der AFM-Spitze, bei sonst gleichen Bedingungen, konnte das Problem behoben werden.
- d) Die Form der erzeugten Lysozym-Muster und die Geschwindigkeit, mit der diese Muster erzeugt werden konnten, variierte mit dem Austausch der AFM-Spitzen. So konnten z. B. mit vielen Spitzen keine so schmalen, linienförmigen Lysozym-Monoschichten erzeugt werden, wie es in Abb. 12 zu sehen ist.

AFM-Spitze	Radius [nm]	Kontakt-Monoschicht	Kontakt-3D-Aggregat	Tapping-Monoschicht
A	65 ± 10	gut	ja	nicht untersucht
B	30 ± 5	gut	nein	nicht untersucht
C	15 ± 5	schlecht	ja	nicht untersucht
D	10 ± 5	nein	nein	ja

Tabelle 1 Spitzen-Radius und Eigenschaften der Lysozym-Muster-Erzeugung von den in Abb. 21 gezeigten AFM-Spitzen. Die Spitzen-Bezeichnung in Großbuchstaben kann den **AFM-Spitzen** mit den gleichnamigen Teilbildern aus Abb. 21 zugeordnet werden. Die Spitzen-**Radien** wurden aus REM-Bildern bestimmt. Alle AFM-Spitzen wurden in der Standard-Lysozymlösung, mit einem AFM über Muskovit geführt. Dabei wurden alle Spitzen wiederholt im Kontakt-Modus mit einer Scannrate von 10 Hz über eine 600 nm lange Linie über Muskovit geführt. Konnte dabei keinerlei Lysozym auf dem Muskovit aufgetragen werden, wurde in der Spalte **Kontakt-Monoschicht** "nein" eingetragen. Entstand eine zusammenhängende Lysozym-Monoschicht (wie in Abb. 12) in weniger als 2 Minuten, wurde anstatt dessen "gut" eingetragen. Bei AFM-Spitze "C" entstand innerhalb von 10 Minuten eine nicht zusammenhängende AFM-Monoschicht. Dort wurde in die selbe Spalte "schlecht" eingetragen. Alle Spitzen wurden im Kraft-Distanz-Modus 1 Minute wiederholt mit einer Scannrate von 9,3 Hz, $s_d = 800$ nm, $s_f = 200$ nm und $k = 0,08$ N/m über Muskovit geführt. Entstand dabei ein 3D-Lysozym-Aggregat, wie in Abb. 15, so wurde in der Spalte **Kontakt-3D-Aggregat** "ja" eingetragen. Sonst wurde "nein" eingetragen. Mit AFM-Spitze "D" konnte im Tapping-Modus ($A = 40$ nm, $d = 8$ nm, $f = 31,74$ kHz, $k = 0,08$ N/m) durch dreimaliges Scannen einer 500 nm^2 großen Fläche eine zusammenhängende Lysozym-Monoschicht (wie in Abb. 18) erzeugt werden. Die Spalte **Tapping-Monoschicht** wurde entsprechend beschriftet. Alle in der Zeile zu Spitze "D" genannten Eigenschaften für die Erzeugung von Lysozym-Mustern konnten an zwei zusätzlichen Messtagen bestätigt werden.

(60 nm breit). Mit den meisten AFM-Spitzen ließen sich nur mindestens doppelt so breite Linien erzeugen.

- e) Es konnte bislang keine AFM-Spitze gefunden werden, mit der sich im Tapping-Modus keine Lysozym-Monoschicht erzeugen ließ. Allerdings wurde die Erzeugung von Lysozym-Monoschichten im Tapping-Modus nur mit vier verschiedenen AFM-Spitzen wiederholt. Darunter war eine Spitze, mit der sich weder im Kontakt-Modus Lysozym-Monoschichten noch im Kraft-Distanz-Modus 3D-Lysozym-Aggregate erzeugen ließen (siehe Tabelle 1, Spalte D).

Um zu sehen, wie groß die geometrischen Unterschiede am äußeren Ende der AFM-Spitzen sind, und welchen Einfluss diese Unterschiede auf das Verhalten beim Erzeugen der Lysozym-Muster haben, wurde im Rahmen dieser Dissertation bei vier AFM-Spitzen die Geometrie ihrer äußeren Spitze mit einem REM (siehe Abschnitt 2.2) vermessen. Die REM-Bilder dieser Spitzen sind in Abb. 21 zu sehen. Man kann den Bildern entnehmen, dass die Geometrien der benutzten AFM-Spitzen deutliche Unterschiede aufweisen. In Tabelle 1 ist der Radius dieser AFM-Spitzen angegeben. Er wurde aus den in Abb. 21 gezeigten Bildern, teilweise aber auch aus REM-Bildern mit noch höherer Auflösung (Spitzen B, C und D; Bilder nicht gezeigt) gewonnen. Der Spitzen-Radius variiert bei den untersuchten Spitzen von 65 nm bis 10 nm.

Die vier mit dem REM untersuchten AFM-Spitzen wurden vor den REM-Untersuchungen auf ihr Verhalten beim Erzeugen von Lysozym-Mustern untersucht. Die so gefundenen Eigenschaften der AFM-Spitzen sind ebenfalls in Tabelle 1 eingetragen. Dort lässt sich erkennen, dass die Fähigkeit einer AFM-Spitze, im Kontakt-Modus Lysozym-Monoschichten erzeugen zu können, mit kleiner werdenden Radius abnehmen könnte (siehe Spalte "Kontakt-Monoschicht"). Eine Korrelation des Spitzen-Radius mit

der Fähigkeit der AFM-Spitze im Kraft-Distanz-Modus 3D-Lysozym-Aggregate zu erzeugen, konnte nicht beobachtet werden (siehe Spalte "Kontakt-3D-Aggregat").

3.1.10 Variation der NaCl-Konzentration

Folgende Versuche wurden unter Variation der NaCl-Konzentration wiederholt:

1. Nach 30 Minuten Kontakt der Muskovit-Oberfläche mit der Lysozymlösung wurde eine Topographie der Muskovit-Oberfläche im Kontakt-Modus erstellt. Aus dem Ergebnis konnte, ähnlich wie in Abschnitt 3.1.5.1, entschieden werden, ob die Muskovit-Oberfläche vollständig oder nur teilweise mit Lysozym bedeckt ist.
2. Erzeugung einer Lysozym-Monoschicht im Kontakt-Modus, ähnlich wie bei Abb. 11.
3. Erzeugung von 3D-Lysozym-Aggregaten im Kraft-Distanz-Modus, ähnlich wie bei Abb. 15.
4. Erzeugung einer Lysozym-Monoschicht im Tapping-Modus, ähnlich wie bei Abb. 18.

Dazu wurde die Standard-Lysozymlösung ($c_p = 6,9 \mu\text{M}$ Lysozym, $c_s = 680 \text{ mM}$ NaCl, 50 mM NaAc, pH 4.5) wie folgt variiert:

- a) $c_s = \{85; 680; 1700\} \text{ mM}$.
- b) $c_s = \{85; 680; 1700\} \text{ mM}$ bei erhöhten $c_p = 69 \mu\text{M}$.
- c) Für den Vergleich mit den Messdaten von Kim et al., 2002 [Kim02] (siehe Diskussion) wurde zusätzlich eine Lösung mit ($c_p = 137 \text{ nM}$ Lysozym, $c_s = 0 \text{ mM}$ NaCl, 10 mM NaAc, pH4) verwendet. Sie wird hier *Kim-Lysozymlösung* genannt.

In den Lysozymlösungen von a) zeigte sich bei $c_s = 85 \text{ mM}$ eine vollständig das Muskovit bedeckende Lysozym-Monoschicht. Auf dieser ließen sich weder im Kontakt-Modus noch im Tapping-Modus Lysozym-Monoschichten erzeugen. Es war allerdings möglich, 3D-Lysozym-Aggregate im Kraft-Distanz-Modus zu erzeugen. Ähnliches wurde bereits in Abschnitt 3.1.5.1 für eine homogene Lysozym-Monoschicht beschrieben. Bei $c_s = 680 \text{ mM}$ (entspricht hier in allen Parametern der Standard-Lysozymlösung), als auch bei $c_s = 1700 \text{ mM}$, zeigte sich eine nur teilweise mit Lysozym bedeckte Muskovit-Oberfläche, auf welcher sich alle hier erwähnten Lysozym-Muster erzeugen ließen.

Bei erhöhter Lysozym-Konzentration (b) zeigten sich sowohl bei $c_s = 85 \text{ mM}$, als auch bei $c_s = 680 \text{ mM}$ vollständig das Muskovit bedeckende Lysozym-Monoschichten. Auch darauf ließen sich weder im Kontakt-Modus noch im Tapping-Modus weitere Lysozym-Schichten, wohl aber 3D-Lysozym-Aggregate im Kraft-Distanz-Modus erzeugen. Bei $c_s = 1700 \text{ mM}$ zeigte sich eine nur teilweise mit Lysozym bedeckte Muskovit-Oberfläche, auf welcher sich alle hier erwähnten Lysozym-Muster erzeugen ließen.

Ein Versuch c_s noch weiter zu erhöhen ($c_s = 5100 \text{ mM}$) scheiterte, da sich beim Vermischen der Lysozym-Stammlösung mit der NaCl-haltigen Lösung (siehe Abschnitt 2.5) ein Ausfall in der resultierenden Lysozymlösung bemerkbar machte, der sich durch eine plötzliche Trübung der Lösung zeigte.

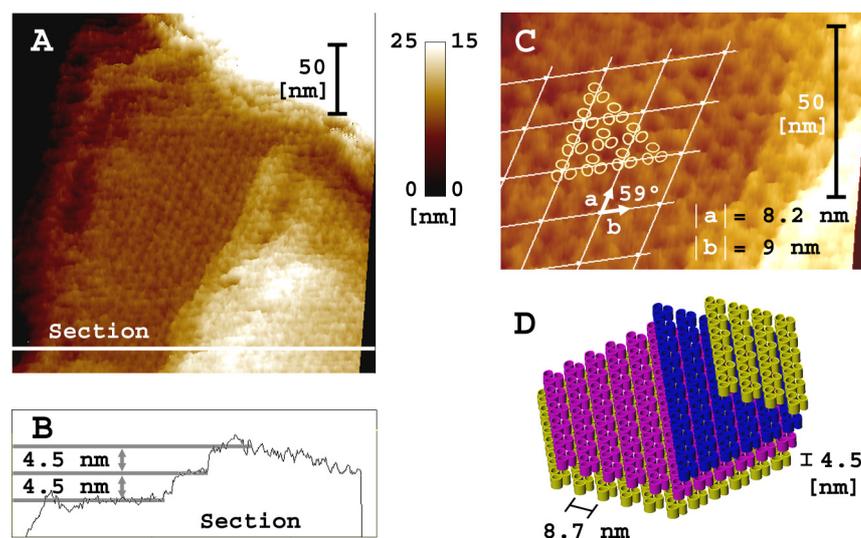


Abb. 22: AFM-Topographiebilder von der Oberfläche eines dreidimensionalen Omp32-Kristalls in wässriger Lösung. **A:** Kristallgitter und Stufen zwischen aufeinanderliegenden Protein-Schichten sind sichtbar. Über die mit ‚Section‘ markierte Linie ist in **B** das Höhenprofil aufgezeichnet. Die Linie überquert zwei Kristallstufen mit einer Höhe von jeweils 4,5 nm. In **C** ist die selbe Ebene in höherer Auflösung gezeigt. Die dort gefundenen Gittervektoren haben eine Länge von $|a| = 8,2$ nm und $|b| = 9,0$ nm. Sie bilden einen Winkel von 59° . Die gefundene Kristallebene ist mit der (001)-Ebene der Kristallform 2 zu vereinbaren (siehe Diskussion). Die Gittervektoren sind zusammen mit einem aus doppelten Gittervektoren resultierenden Gitter und der vermuteten Lage von 9 Beispieltrimern eingezeichnet. Die Orientierung der Trimere bzgl. einer Rotation um 180° um die z-Achse ist dabei willkürlich gewählt. **D:** Modell der (001)-Ebene der Kristallform 2. Die unterschiedlichen Farben in denen die Trimere in D graphisch dargestellt sind, entsprechen den lateral gegeneinander verschobenen Proteinschichten. Beide AFM-Bilder wurden mit einer Scangeschwindigkeit von 2 Hz (A) bzw. 3 Hz (C) aufgenommen. C wurde nachträglich am oberen Rand beschnitten. Gemessen von Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie].

In der Kim-Lysozylösung zeigte sich eine nur teilweise mit Lysozym bedeckte Muskovit-Oberfläche. Dennoch konnte auf dieser in keiner der hier beschriebenen Verfahren Lysozym-Muster erzeugt werden. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Kim et al., 2002 [Kim02].

Alle in diesem Abschnitt aufgeführten Messungen wurden im Rahmen dieser Dissertation angefertigt und wurden nur mit solchen AFM-Spitzen durchgeführt, welche auf ihre Schreibfähigkeit (siehe Abschnitt 3.1.9) überprüft worden sind.

3.2 3D-Kristalle von Omp32 in Flüssigkeit

Es wurden dreidimensionale Proteinkristalle (siehe Abschnitt 1.3) des transmembranen Proteins Omp32 (siehe Abschnitt 2.6) in wässriger Lösung mit Hilfe eines AFMs in molekularer Auflösung untersucht. Die ersten Untersuchungen dieser Art sind von Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie] unternommen worden. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden die Daten dieser Untersuchung zur Präsentation aufbereitet. Die Ergebnisse wurden in Leisten et al., 2006 [Lei06] (Poster) erstmals gezeigt und werden in Abschnitt 3.2.1 beschrieben (Wiechmann et al., in preparation [WieOm]). Im Rahmen dieser Dissertation konnten diese Ergebnisse teilweise bestätigt werden und weitere Ergebnisse gewonnen werden. Dies wird in den Abschnitten 3.2.2, 3.2.3 und 3.2.4 gezeigt.

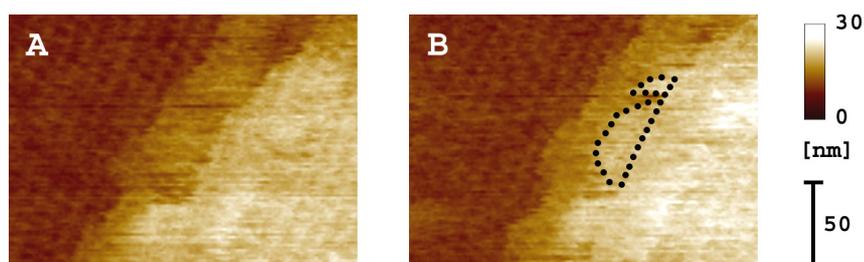


Abb. 23 A: AFM-Topographiebild der selben Kristalloberfläche, wie aus Abb. 22. Es sind zwei Kristallstufen sowie das Kristallgitter zu sehen. Unmittelbar nach der Aufnahme von A wurde das Bild **B** aufgenommen (Aufnahmedauer jeweils 2 min). Die oberste Kristallebene vergrößerte in der Zwischenzeit um das mit schwarzen Punkten markierte Stück. Da sich der Kristall in proteinfreier Lösung befand, wird vermutet, dass der Scannprozess das Wachstum durch Umlagerung verursacht hat (siehe Diskussion). Beide Bilder wurden aus einer $(261 \text{ nm})^2$ großen Topographie gewonnen und mit einer Scangeschwindigkeit von 2 Hz aufgezeichnet. Gemessen von Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie].

3.2.1 Vorhergehende AFM-Messungen auf Omp32-Kristallen

Die Oberflächentopographie von dreidimensionalen Omp32-Kristallen wurde mit Hilfe eines AFMs in wässriger Lösung von Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie] (verstorben) vor Beginn der vorliegenden Dissertation vermessen. Dabei konnte auf einem einzigen Kristall die Oberflächentopographie in molekularer Auflösung untersucht werden. Es wurden dabei drei verschiedene Oberflächenkristallgitter gefunden. AFM-Topographiebilder aller drei Kristallgitter werden im Folgenden präsentiert. Einer Vielzahl Indizien aus Aufzeichnungen von Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie] zufolge (nicht gezeigt), ist der so untersuchte Kristall mit dem selben Verfahren erzeugt worden, wie es in den Abschnitten 2.7 und 2.8 beschrieben steht. Die dabei in den dort genannten Grenzen variablen Parameter c_p und c_A sind jedoch aufgrund des plötzlichen und unerwarteten Todes von Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie] verloren gegangen. Ebenfalls ist unklar, bei welcher Temperatur die Kristalle kristallisiert worden sind und ob der in Abschnitt 2.8 beschriebene Spülprozess von Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie] angewendet worden ist.

In Abb. 22 A ist ein AFM-Topographiebild einer Oberfläche des von Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie] in molekularer Auflösung untersuchten Omp32-Kristalls zu sehen. Die Existenz eines Kristallgitters sowie von Stufen zwischen aufeinander liegenden Proteinschichten ist deutlich zu erkennen. Die Stufenhöhe konnte zu 4.5 nm ermittelt werden (Abb. 22 B). Um die laterale Gitterstruktur besser auflösen zu können wurde die mit 256 Linien abgescannte Fläche der aufgenommenen AFM-Topographie von $(261 \text{ nm})^2$ (Abb. 22 A) auf $(105 \text{ nm})^2$ (Abb. 22 C) verringert. Die dem dort gefundenem Gitter gemittelten Gittervektoren haben eine Länge von $|\mathbf{a}| = 8,2 \text{ nm}$ und $|\mathbf{b}| = 9,0 \text{ nm}$ und bilden zueinander einen Winkel von $\gamma = 59^\circ$. Zur Verdeutlichung wurden die Gittervektoren in Abb. 22 C mitsamt einem aus doppelten Gittervektoren resultierenden Gitter graphisch eingezeichnet. In der Diskussion wird sich herausstellen, dass die in Abb. 22 A-C gezeigte Kristallebene mit der (001)-Ebene der in Zeth et al., 1998 [Zet98] gefundenen Kristallform 2 (siehe Abschnitt 2.8) zu vereinbaren ist. Alle weiteren in Abb. 22 C sichtbaren grafischen Einzeichnungen beziehen sich darauf und werden in der Diskussion erläutert. In Abb. 22 D ist die (001)-Ebene der in Zeth et al., 1998 [Zet98] gefundenen Kristallform 2 skizziert.

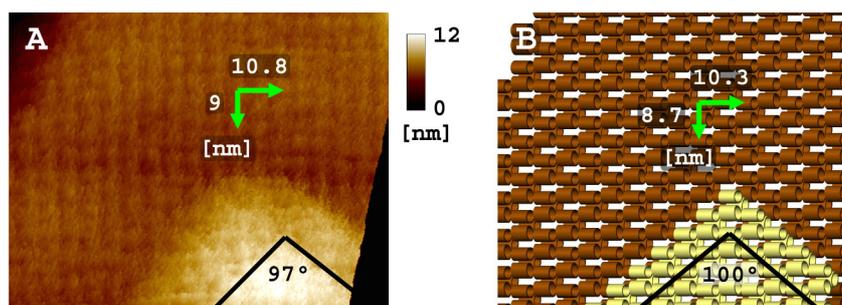


Abb. 24 A: AFM-Topographiebild einer Kristallebene des selben Kristalls von Abb. 22 und Abb. 23. Die Topographie zeigt rechtwinklig zueinander angeordnete horizontale und vertikale Linien. Der mittlere gemessene Abstand über zwei vertikale Linien beträgt 10,8 nm. Der mittlere Abstand über zwei horizontale Linien beträgt 9,0 nm. Beide Abstände wurden in Form grüner Pfeile eingezeichnet. Rechts unten sind zwei Kanten zu sehen, welche in einem Winkel von 97° eine ca. 6,5 nm hohe Schicht einschließen. Der Winkel wurde von einem größeren Topographiebild größerer Dimension bestimmt (siehe Text). **B:** Modellierte (011)-Ebene der in Zeth et al. 1998 [Zet98] gefundenen Kristallform 2. A wurde aus einer $(100 \text{ nm})^2$ großen Topographie gewonnen und mit einer Scangeschwindigkeit von 3 Hz aufgezeichnet. Gemessen von Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie].

Die in Abb. 22 B gezeigte Fläche konnte 20-mal nacheinander in molekularer Auflösung aufgenommen werden. Die dazu mit dem AFM gescannte Fläche sei in diesem Absatz mit A bezeichnet. Unmittelbar danach wurde ein Übersichtsbild einer Fläche erstellt, welche A enthält. Diese entsprach dem in Abb. 22 A gezeigten Ausschnitt. In diesem Übersichtsbild konnte A nicht von seiner Umgebung unterschieden werden. Insbesondere konnte keine Senke bei A festgestellt werden, welche auf ein Eingraben der AFM-Spitze während der Aufnahme von A hinweisen würde (vergleiche Abb. 28 F). Dies zeigt die Stabilität der gezeigten Kristalloberfläche gegenüber dem Scanvorgang der AFM-Spitze.

In Abb. 23 sind zwei nacheinander aufgenommene AFM-Topographiebilder einer Kristallebene zu sehen, welche das gleiche Kristallgitter besitzt, wie es bereits in Abb. 22 zu sehen ist. Durch den Vergleich von Abb. 23 A mit Abb. 23 B erkennt man, dass die bzgl. der z-Achse höchste in dem Bild sichtbare Kristallebene mit der Zeit an Fläche gewinnt. Dieser Flächenzuwachs ist in Abb. 23 B mit Hilfe einer schwarz gepunkteten Linie gekennzeichnet. In der Diskussion wird daraus auf das sog. laterale Stufenwachstum geschlossen. Dies ist eine spezielle Art des Kristallwachstums, welche bei Proteinkristallen aus globulären Proteinen bereits beobachtet worden ist (siehe z. B. Abb. 6).

Auf dem selben Kristall wurde eine Kristalloberfläche gefunden, welche ein anderes Oberflächenkristallgitter besitzt. Ein AFM-Topographiebild, welches diese Ebene zeigt, ist in Abb. 24 A zu sehen. Die Topographie zeigt rechtwinklig zueinander angeordnete horizontale und vertikale Linien. Der mittlere Abstand zwischen den vertikalen Linien beträgt 5,4 nm. Der Abstand zwischen den horizontalen Linien ist unregelmäßiger und konnte zu 4,5 nm gemittelt werden. Unten rechts im Bild ist die Schicht zu sehen, die sich durch zwei Ränder begrenzt von der darunter liegenden Kristallschicht ca. 6,5 nm abhebt. Die beiden Ränder bilden einen Winkel von 97° . Der Winkel und die Höhe der Schicht wurden aus einem Topographiebild größerer Dimension bestimmt, in dem sich die Kanten 50 nm bzw. 60 nm linear fortsetzen (nicht gezeigt). In der Diskussion wird sich herausstellen, dass die in Abb. 24 A gezeigte Kristallebene mit der (011)-Ebene der in Zeth et al., 1998 [Zet98] gefundenen Kristallform 2 (siehe Abschnitt 2.8) zu vereinbaren ist. Diese Kristallebene ist in Abb. 24 B skizziert und wird in der Diskussion mit der in Abb. 24 A gezeigten Ebene verglichen. Die in Abb. 24 A gezeigte Kristallebene er-

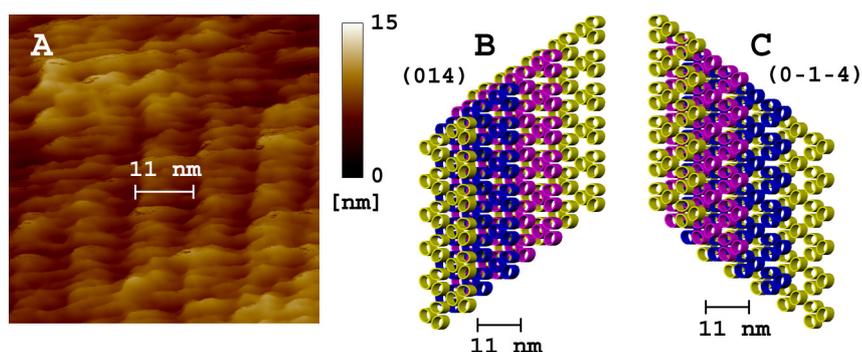


Abb. 25 A: AFM-Topographiebild einer weiteren Kristallebene des Kristalls von Abb. 22. Der mittlere Abstand zwischen den vertikal verlaufenden Linien beträgt 11,0 nm. Dieser ist in guter Übereinstimmung mit den Stufenabständen der aus den Röntgendaten von Zeth et al., 2000 [Zet00] modellierten Ebenen (014) (B) und (0-1-4) (C) der Kristallform 2. Bei den horizontal verlaufenden Linien in A konnte aufgrund der zu geringen Auflösung keine Regelmäßigkeit entdeckt werden. Das Bild wurde aus einer $(114 \text{ nm})^2$ großen Topographie gewonnen und mit einer Scangeschwindigkeit von 3.8 Hz aufgezeichnet. Gemessen von Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie].

wies sich bzgl. des Scanvorgangs des AFMs als ähnlich stabil, wie die in Abb. 22 gezeigte Ebene.

In Abb. 25 A ist eine weitere Kristallebene des selben Kristalls dargestellt. Aufgrund der zu geringen Auflösung konnte nur die Gitterkonstante in horizontaler Richtung ermittelt werden. Der gefundene Abstand zwischen den vertikal verlaufenden Vertiefungen beträgt 11,0 nm. In der Diskussion wird sich herausstellen, dass die in Abb. 25 A gezeigte Kristallebene mit der (014)-Ebene oder der (0-1-4)-Ebene der in Zeth et al., 1998 [Zet98] gefundenen Kristallform 2 zu vereinbaren ist. Diese Kristallebenen sind in Abb. 25 B skizziert und werden in der Diskussion mit der in Abb. 25 A gezeigten Ebene verglichen. Über die Stabilität der in Abb. 25 A gezeigten Kristallebene bzgl. des Scanvorgangs des AFMs lässt sich aus den gegebenen Daten leider keine Aussage gewinnen.

Alle in diesem Abschnitt beschriebenen Messungen wurden im Tapping-Modus mit einem Cantilever aufgenommen, welcher mit 36 kHz bis auf eine freie Amplitude von 40 nm zum Schwingen angeregt worden ist und um 4 nm gedämpft wurde. Der benutzte Cantilever besaß eine Federkonstante von $k = 0,08 \text{ N/m}$.

3.2.2 Suche nach geeigneten "Lösungsbedingungen"

Um die Ergebnisse von Abschnitt 3.2.1 mit gesicherten Parametern zu bestätigen, wurde Omp32 im Rahmen dieser Dissertation nach der in Abschnitt 2.8 beschriebenen Methode kristallisiert. Dabei wurde die Vorgehensweise der "sitting drop vapor diffusion" angewendet. Bei dieser bilden sich die Kristalle innerhalb eines Flüssigkeitstropfens, welcher sich auf einer festen Oberfläche befindet. Die feste Oberfläche bestand aus Gold. In Abb. 26 A-F sind einige der so entstandenen Kristalle zu sehen. Unter den Kristallen erstreckt sich jeweils über den gesamten Bildausschnitt die Gold-Oberfläche. Neben den Kristallen konnte eine zweite flüssige Phase beobachtet werden. Diese macht sich in Form von "Öl-Tropfen" bemerkbar, die sich neben den Kristallen ebenfalls auf der Gold-Oberfläche anlagern (siehe Abb. 26). Die Öl-Tropfen können mit der Zeit innerhalb der AFM-Flüssigkammer verschwinden (siehe Abb. 26). Während der AFM-Messung wurde mit der Omp32-Reservoirlösung eine andere Lösungszusammensetzung gewählt als jene, mit welcher die Kristalle und die Öl-Tropfen zuvor entstanden sind

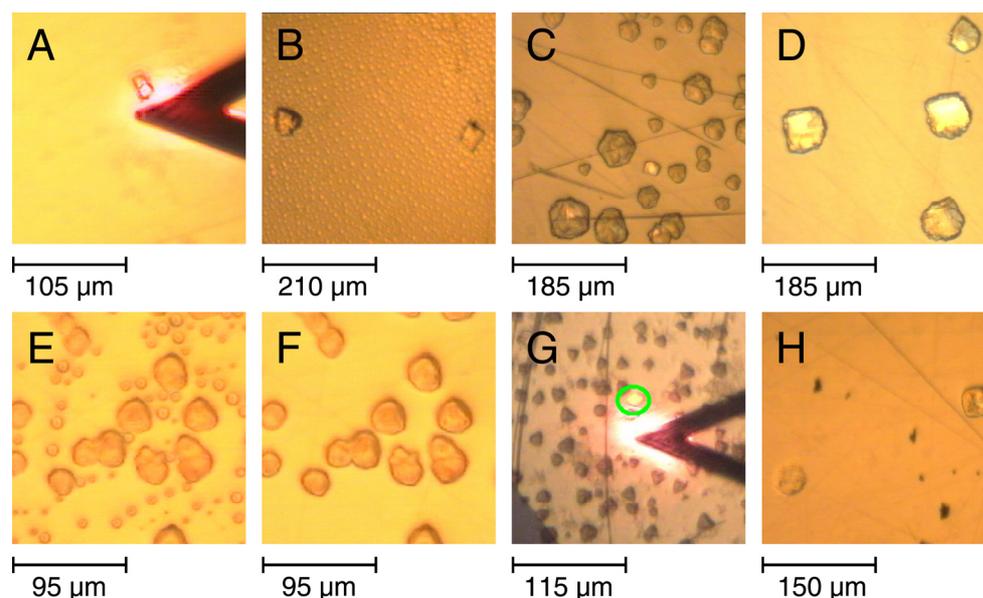


Abb. 26 Omp32-Kristalle in Flüssigkeit auf Gold innerhalb der AFM-Flüssigkammer. Aufgenommen mit einem Auflicht-Mikroskop. Zur Orientierung: In den Bildern A und G ist rechts ein dreieckiger Cantilever des AFMs zu sehen. **A:** Über dem AFM-Cantilever ist ein Kristall zu sehen, welcher im Rahmen dieser Dissertation mit einem AFM in molekularer Auflösung vermessen werden konnte (siehe Abb. 29). Die Kristalle aus **A+B** entstanden, wie in Abschnitt 2.8 beschrieben, aus einer Omp32-Stammlösung mit $c_p = 1,8 \text{ mg ml}^{-1}$. Die Kristalle aus **C-F** entstanden ebenso, wurden aber aus einer Omp32-Stammlösung mit $c_p = 4,6 \text{ mg ml}^{-1}$ (**C+D**) bzw. $c_p = 5,0 \text{ mg ml}^{-1}$ (**E+F**) kristallisiert. Man erkennt deutlich, dass die Kristalle aus C-F größer sind, als die aus A+B. Es konnten sowohl (von oben auf die Gold-Oberfläche gesehen) dreieckige als auch viereckige Kristalle erzeugt werden. In C sind zusätzlich sechseckige Kristalle zu sehen. Neben den Kristallen, konnte eine zweite flüssige Phase beobachtet werden. Diese macht sich in Form von "Öl-Tropfen" bemerkbar (**B+E**). Die Öl-Tropfen können mit der Zeit verschwinden (vgl. E mit dem danach von der selben Probe aufgenommenen Bild F). **G** wurde von Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie] aufgenommen. Den durch einem grünen Kreis markierten Kristall konnte Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie] in molekularer Auflösung vermessen (siehe Abschnitt 3.2.1). In **H** wurde ein alternativer Kristallansatz benutzt (siehe Abschnitt 3.2.4).

(siehe Abschnitt 2.8). Die Kristalle konnten innerhalb der Omp32-Reservoirlösung, den Aufnahmen des Auflicht-Mikroskops zur Folge und den Erwartungen entsprechend (siehe Abschnitt 2.8) in jedem Fall als stabil beobachtet werden.

Auf den Omp32-Kristallen sollten mit Hilfe des AFMs die Kristalloberflächen möglichst in molekularer Auflösung untersucht und die Kristallstufen dargestellt werden (siehe Abschnitt 1.3). Dazu mussten die Kristalle so auf der Gold-Oberfläche adsorbieren, dass sie auch bei Kontakt mit der AFM-Spitze fest mit der Gold-Oberfläche in Verbindung bleiben. Dies gelang Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie] bei der Untersuchung eines Omp32-Kristalls (siehe Abschnitt 3.2.1).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden insgesamt 21 Proben mit Omp32-Kristallen, welche nach der in Abschnitt 2.8 beschriebenen Methode hergestellt worden sind, mit dem AFM untersucht. Zwei dieser untersuchten Proben wurden abweichend von Abschnitt 2.8 nicht bei 8°C , sondern bei Raumtemperatur kristallisiert. Äußerlich unterschieden sich die so hergestellten Kristalle nicht von denen, welche bei 8°C kristallisiert worden sind (nicht gezeigt). Bei diesen Proben konnte von insgesamt 8 untersuchten Kristallen kein Kristall gefunden werden, der fest genug an der Goldoberfläche adsorbiert war, um ihn mit dem AFM untersuchen zu können. Dies äußerte sich darin, dass

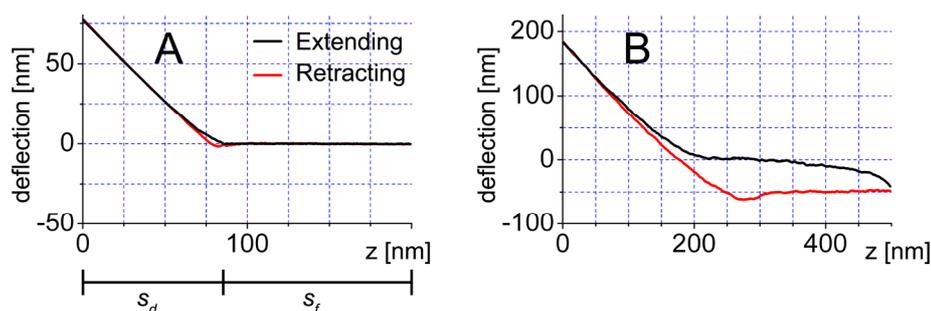


Abb. 27 A: Typische Kraft-Distanz-Kurve (siehe Abschnitt 2.1.2). Die Verbiegung des Cantilevers "Deflection" ist auf die Höhe des Substrates $-z$ (je höher das Substrat, je kleiner z) innerhalb des benutzten Höhenbereiches ΔZ (hier 200 nm) aufgetragen. Für die Erhöhung des Substrates (schwarze Kurve) ist der Höhenbereich ΔZ in zwei Teilbereiche s_f und s_d aufgeteilt. In s_f erfährt der Cantilever noch keine Verbiegung, da die AFM-Spitze noch keinen Kontakt zum Substrat hat. In s_d besteht dieser Kontakt. Somit wird der Cantilever mit der Erhöhung des Substrates proportional verbogen. Bei der Absenkung des Substrates (rote Kurve) kann man kurz vor dem Kontaktabriss eine negative Verbiegung des Cantilevers beobachten. Die AFM-Spitze klebt dort noch am Substrat.

Die Kraft-Distanz-Kurve von Teilabbildung **A** wurde auf einem Omp32-Kristall erstellt, welcher nach der in Abschnitt 2.8 beschriebenen Methode bei $c_p = 4,6 \text{ mg ml}^{-1}$ präpariert worden ist. Die Kurve in **B** wurde auf einem ebenso präparierten Kristall erstellt, bei dessen Präparation der in Abschnitt 2.8 beschriebene "Spülprozess" weggelassen worden ist. Der deutliche Unterschied der beiden Kraftkurven resultiert aus einer den Kristall umgebenden "Öl-Phase", welche sich durch den Spülprozess reduzieren lässt (siehe Text). Beide Kraft-Distanz-Kurven wurden bei $f = 1 \text{ Hz}$ und $k = 0,02 \text{ N/m}$ aufgenommen.

mit einem Aufricht-Mikroskop beobachtet werden konnte, wie sich der jeweils untersuchte Kristall während der AFM-Messung mit dem AFM-Cantilever periodisch mit bewegte oder mit der Zeit seine Position änderte (nicht gezeigt).

Bei drei weiteren der genannten 21 Proben wurden die Kristalle bei 16°C kristallisiert. Dort konnte auf drei der insgesamt 12 untersuchten Kristallen einige Topographien in schlechter Bildqualität erzielt werden (nicht gezeigt), bevor sich auch diese Kristalle vom Substrat lösten. Die übrigen 16 Proben wurden, wie in Abschnitt 2.8 beschrieben, bei 8°C kristallisiert. Auf diesen Proben fanden sich in den meisten Fällen Kristalle, die fest genug auf der Gold-Oberfläche adsorbiert waren, so dass sich deren Kristalloberflächen mit dem AFM untersuchen ließen (siehe Abb. 28 bis Abb. 30). Eine dieser Probe wurde, abweichend von Abschnitt 2.8, nicht bei ca. 12°C mit dem AFM untersucht, sondern bei Raumtemperatur. Auf dieser Probe fanden sich, obwohl bei 8°C kristallisiert, keine Kristalle, die für eine AFM-Untersuchung fest genug auf der Gold-Oberfläche adsorbiert waren.

Bei den 16 mit dem AFM untersuchten Proben, auf welchen die Kristalle mit der in Abschnitt 2.8 beschriebenen Methode bei 8°C kristallisiert worden sind, wurde zur Kristallisation 7 mal eine Omp32-Stammlösung mit $c_p = 1,8 \text{ mg ml}^{-1}$ verwendet. Die so entstandenen Kristalle konnten mit dem AFM bis hin zu molekularer Auflösung vermessen werden (siehe Abb. 29), ohne dass der in Abschnitt 2.8 beschriebene "Spülprozess" angewendet werden musste. Die Kristalle der übrigen 9 Proben wurden aus Omp32-Stammlösungen kristallisiert, welche wesentlich höhere Proteinkonzentrationen von $c_p = 4,6 \text{ mg ml}^{-1}$ bzw. $c_p = 5,0 \text{ mg ml}^{-1}$ besaßen. Diese Kristalle konnten, ohne die Anwendung des in Abschnitt 2.8 beschriebenen "Spülprozesses", sehr viel schwieriger mit dem AFM untersucht werden. Dies äußerte sich darin, dass die Regelung des AFMs sowohl im Kontakt- als auch im Tapping-Modus oft nicht in der Lage war, einen konstanten Wert der loading force bzw. der Schwingungsamplitude (siehe Abschnitte 2.1.3

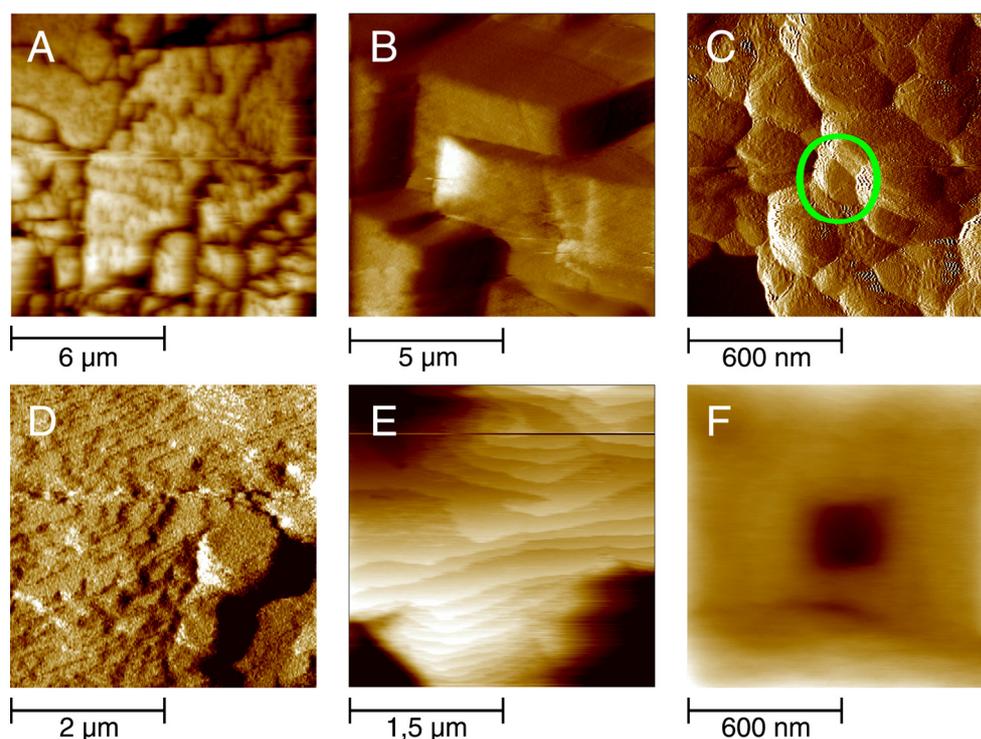


Abb. 28 AFM-Topographiebilder (A, E und F) bzw. AFM-Deflektionsbilder (B-D) von Omp32-Kristallen in wässriger Lösung. **A-E:** Unterschiedliche Kristalloberflächen offenbaren jeweils die Rauheit der Omp32-Kristalle. Ähnliche Strukturen wurden von Qutub et al., 2004 [Qut04] auf Rhodopsin-Kristallen in wässriger Lösung gefunden (vgl. Abb. 7 E-H und siehe Diskussion). Auf dem in C mit einem grünen Kreis markierten Bereich konnte Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie] in molekularer Auflösung messen (siehe Abb. 24). Auf den in A bzw. E sichtbaren Ebenen konnte im Rahmen dieser Dissertation eine molekulare Auflösung erzielt werden (siehe Abb. 30 B bzw. Abb. 29). In F wird die Instabilität der im Rahmen dieser Dissertation vermessenen Omp32-Kristalle verdeutlicht. Die in der Mitte von F sichtbare quadratische Senke ist durch mehrfaches Scannen der AFM-Nadel dieses quadratischen Bereiches entstanden. Die Kristalle aus A+B (D-E) wurden, wie in Abschnitt 2.8 beschrieben, bei $c_p = 1,8 \text{ mg ml}^{-1}$ ($c_p = 4,6 \text{ mg ml}^{-1}$) kristallisiert. Bei A+B wurde zur Präparation der Kristalle der in Abschnitt 2.8 beschriebene "Spülprozess" weggelassen. Die Topographiebilder besitzen eine Farbskala, welche einen Bereich von A: 200 nm, E: 100 nm und F: 250 nm abdecken. Die Deflektionsbilder erstrecken sich über einen Höhenbereich von B: 3 μm , C: 600 nm und D: 400 nm. C und F wurden im Tapping-Modus aufgenommen. Die übrigen Bilder wurden im Kontakt-Modus aufgenommen.

und 2.1.4) einzustellen (nicht gezeigt). In anderen Fällen konnte die loading force bzw. die Dämpfung der Schwingungsamplitude nicht klein genug eingestellt werden, als dass auf den bzgl. der AFM-Messung nur mäßig stabilen Kristallen (siehe Abschnitt 3.2.3) gute AFM-Bilder erzielt werden hätten können.

Eine typische Kraft-Distanz-Kurve (siehe Abschnitt 2.1.2) für einen solchen Fall ist in Abb. 27 B gezeigt. Dort ist für den Höhenbereich der Probe mit $0 \text{ nm} < z < 200 \text{ nm}$ ein zu z proportionaler Anstieg der Verbiegung des Cantilevers ("Deflection") zu sehen. Dies entspricht der Erwartung bei Kontakt der AFM-Spitze mit dem Proteinkristall. Im Höhenbereich der Probe mit $200 \text{ nm} < z < 400 \text{ nm}$ ist kein zu z proportionaler Anstieg der Verbiegung des Cantilevers zu sehen. In diesem Bereich hat die AFM-Spitze noch keinen Kontakt zum Protein-Kristall, sondern befindet sich bis zu 200 nm davon entfernt. Dennoch erfährt die AFM-Spitze in diesem Bereich eine Kraft. Diese Kraft soll hier nicht im Detail untersucht werden. Auffällig ist aber, dass diese Kraft mit Hilfe des

in Abschnitt 2.8 beschriebenen "Spülprozesses" reduziert, oder gar fast aufgehoben werden kann (siehe Abb. 27 A).

Vermutet wird, dass sich in unmittelbarer Nähe die Kristalle während der Kristallisation eine zweite wässrige Phase ausbildet, ähnlich der, die sich in Abb. 26 anhand von "Öl-Tropfen" zeigt. Werden auch die im Rahmen der vorliegenden Dissertation angesetzten Kristalle von einer solchen zweiten wässrigen Phase umgeben, so liegt es nahe zu vermuten, dass diese Phase bei Kontakt mit der AFM-Spitze auf diese eine Kraft ausübt, welche sich negativ auf die Abbildung der Kristalloberflächen auswirken kann.

Eine solche zweite wässrige Phase konnte bereits in Zeth et al., 1998 [Zet98] in direkter Umgebung entstehender Omp32-Kristalle beobachtet und als "Protein-angereicherte Phase" identifiziert werden. In dem in Abschnitt 2.8 beschriebenen "Spülprozess" wird die Probe mit den Kristallen vor der AFM-Untersuchung mit einer Protein-freien aber Detergenz-haltigen Lösung gespült. Sollte die vermutete zweite wässrige Phase ebenfalls eine Protein-angereicherte Phase sein, liegt es ebenfalls nahe, dass eine solche durch den in Abschnitt 2.8 beschriebenen "Spülprozess" reduziert werden kann. Außerdem sollte gerade dann, wenn zur Kristallisation eine Omp32-Stammlösung mit besonders hoher Proteinkonzentration c_p benutzt wird, die Protein-angereicherte Phase besonders ausgeprägt sein. Letzteres ist mit der oben genannten Tatsache vereinbar, dass die hier genannten Schwierigkeiten, die Omp32-Kristalle zu untersuchen, sich stets bei der Kristallisation durch Omp32-Stammlösungen mit $c_p = (4,6 - 5,0) \text{ mg ml}^{-1}$ zeigten.

Im Rahmen dieser Dissertation konnten daher nur solche Omp32-Kristalle erfolgreich mit dem AFM untersucht werden, die entweder aus Omp32-Stammlösungen mit $c_p = (4,6 - 5,0) \text{ mg ml}^{-1}$ entstanden sind und genau so behandelt worden sind, wie es in Abschnitt 2.8 beschrieben steht, oder die aus einer Omp32-Stammlösung mit $c_p = (1,8) \text{ mg ml}^{-1}$ entstanden sind, bei denen der in Abschnitt 2.8 beschriebene "Spülprozess" weggelassen werden konnte.

3.2.3 AFM Messungen auf Omp32-Kristallen

Bei den im Rahmen dieser Dissertation erfolgreich durchgeführten AFM-Untersuchungen auf Omp32-Kristallen konnten auf deren Oberflächen verschiedenartige Topographien untersucht werden. Es konnten dabei zusammenhängende Netzwerke länglicher Vertiefungen entdeckt werden (siehe Abb. 28 A), es konnten Kristallkanten entdeckt werden, welche darauf schließen lassen, dass einige Kristalle aus einem Verbund von ineinander gewachsenen Einkristallen bestehen (siehe Abb. 28 B) und es konnten Stufen entdeckt werden, die auf molekulare Proteinschichten innerhalb des Kristalls hinweisen (siehe Abb. 28 D+E, Abb. 29, Abb. 30 B). Auf zwei voneinander unabhängig gewachsenen Kristallen konnte die Kristalloberfläche in molekularer Auflösung untersucht werden (Abb. 29, Abb. 30 B). Dies äußerte sich darin, dass sowohl die Kristallstufen mitsamt ihrer Höhe, als auch die Kristallgitter mitsamt ihrer Gittervektoren analysiert werden konnten (siehe Abb. 29, Abb. 30 B und die jeweiligen Bildunterschriften). Submolekulare Strukturen ließen sich in den Topographien nicht erkennen. Die gefundenen Oberflächenstrukturen werden im Abschnitt 4.2.1 diskutiert.

Alle so untersuchten Kristalloberflächen erwiesen sich bzgl. des Scanvorgangs der AFM-Spitze als instabil. Dies äußerte sich darin, dass unmittelbar nacheinander aufgenommene Topographien der selben Oberfläche unterschiedliche Strukturen aufwiesen. So konnte z. B. auf der in Abb. 29 gezeigten Oberfläche eine Bildfolge von drei unmittelbar nacheinander aufgenommenen Topographien erstellt werden. Auf diesen Topo-

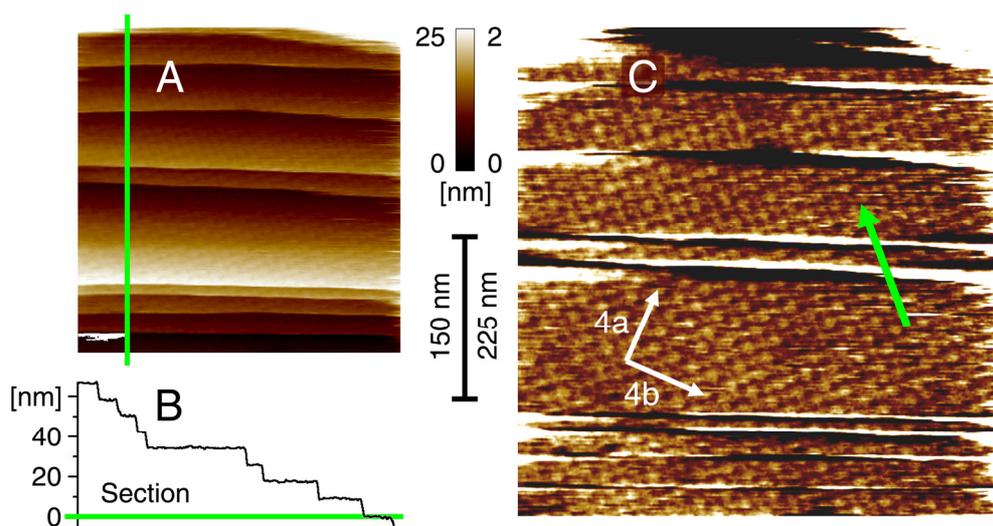


Abb. 29 A: AFM-Topographiebild einer Oberfläche eines Omp32-Kristalls. In **B** ist das Höhenprofil zu sehen, welches sich nach der Bildbearbeitungsmethode "Plane Fit" (siehe Abschnitt 2.1.10) über der grünen Linie in **A** ergibt. Aus diesen und aus zwei weiteren Höhenprofilen konnte eine mittlere Stufenhöhe von 8,3 nm ermittelt werden. In **C** ist das Topographiebild aus **A** mit Hilfe der Bildbearbeitungsroutine "Flatten" (siehe Abschnitt 2.1.10) so verändert worden, dass das Kristallgitter der Oberfläche sichtbar wird. Die gefundenen Gittervektoren wurden in vierfacher Länge eingezeichnet. Sie haben eine Länge von $|\mathbf{a}| = 12,1$ nm und $|\mathbf{b}| = 13,1$ nm und stehen senkrecht zueinander. Auf der gesamten sichtbaren Oberfläche, vor allem aber auf der mit einem grünen Pfeil markierten Stufe, sind zwischen jenen periodischen erhöhten Bereichen, welche die Gittervektoren bestimmen (siehe Diskussion), weitere erhöhte, periodische Bereiche zu erkennen. Diese werden in Abschnitt 4.2.1 diskutiert und sind in Abb. 30 A noch deutlicher zu sehen. Die Topographie wurde im Kontakt-Modus bei $F_t < 0,5$ nN, $f = 3$ Hz und $T = 13^\circ\text{C}$ aufgenommen. Der gezeigte Kristall wurde, wie in Abschnitt 2.8 beschrieben bei $c_p = 1,8$ mg ml $^{-1}$ und $c_A = 2,15$ M kristallisiert und in einer entsprechenden "Omp32-Reservoirlösung" mit dem AFM vermessen. Bei der Präparation des Kristalls wurde der in Abschnitt 2.8 beschriebene "Spülprozess" weggelassen.

graphien waren die Stufen zwischen den Kristallebenen jeweils, wie in Abb. 29 gezeigt, längs der "Fast Scan-Axis" orientiert. Beim Vergleich von jeweils zwei unmittelbar nacheinander aufgenommenen Topographien waren die Positionen der Kristallstufen entlang der "Slow Scan-Axis" jedoch so weit verschoben, dass einzelne in einer Topographie identifizierte Stufen, in der nachfolgenden Topographie nicht mehr eindeutig wiedergefunden werden konnten. Wurde nach der Aufnahme einer Topographiebildfolge mit einer Kantenlänge der Topographie von unter 300 nm eine Übersichtstopographie mit einer größeren Kantenlänge aufgenommen, welche die zuvor mehrfach gescannte Fläche enthält, so konnten in der Übersicht auf der zuvor mehrfach gescannten Fläche Vertiefungen gefunden werden, deren Tiefe sich um mehrere Kristallstufen erstreckt (siehe Abb. 28 F). Auch nach Aufnahme der in Abb. 29 und Abb. 30 gezeigten Topographien konnten solche Vertiefungen beobachtet werden (nicht gezeigt). Die in diesem Absatz beschriebenen Beobachtungen lassen vermuten, dass die Oberfläche der Omp32-Kristalle während der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten AFM-Messungen beschädigt worden ist.

Es sei erwähnt, dass sich die in molekularer Auflösung gemachten AFM-Messungen der Omp32-Kristalloberflächen nur schwer reproduzieren ließen. Die in Abb. 29 und Abb. 30 A gezeigte Kristalloberfläche ließ sich nur in zehn AFM-Bildern in molekularer Auflösung festhalten. Die in Abb. 30 B gezeigte Oberfläche ließ sich nur in drei Bildern in molekularer Auflösung festhalten. Versuche, auf den selben Kristallen und mit den jeweils selben AFM-Spitzen erneut molekulare Auflösung zu erhalten (etwa durch Ände-

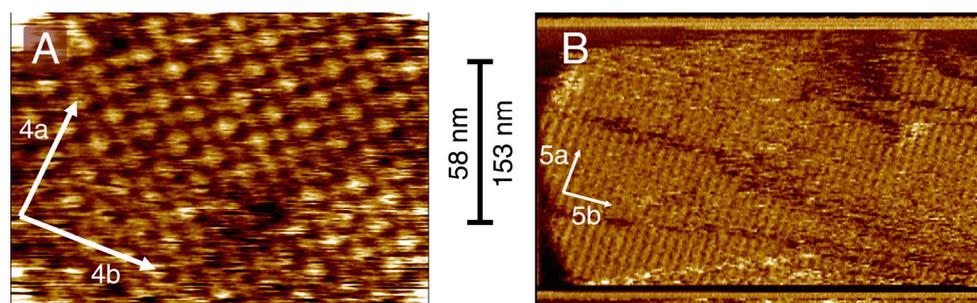


Abb. 30 AFM-Topographie-Bild (A) bzw. AFM-Deflektionsbild (B) der Oberflächen zweier Omp32-Kristalle in wässriger Lösung bei molekularer Auflösung. **A:** Die selbe Oberfläche, welche auch in Abb. 29 zu sehen ist in höherer Auflösung. Die Gittervektoren aus Abb. 29 sind eingezeichnet. Die zu Abb. 29 beschriebenen "weiteren periodischen Bereiche" sind im oberen Teil der hier gezeigten Abb. besonders gut zu sehen. Sie befinden sich im Zentrum von jeweils vier der Gittervektoren bestimmenden erhöhten Bereichen. **B:** Oberfläche eines weiteren Omp32-Kristalls. Die gefundenen Gittervektoren wurden in fünffacher Länge eingezeichnet. Sie haben eine Länge von $|a| = 9,3 \text{ nm}$ und $|b| = 8,5 \text{ nm}$ und bilden einen Winkel von ca. 85° . Den im Bild sichtbaren Stufen konnte ein Höhenbereich von ca. 6-9 nm zugeordnet werden. Unter Berücksichtigung der für A beschriebenen "weiteren periodischen Bereiche" ist die in B gefundene Kristallebene mit der aus A vereinbar (siehe Diskussion). A wurde wie in Abb. 29 beschrieben aufgenommen. B wurde im Kontakt-Modus bei $F_l < 0,1 \text{ nN}$, $f = 2 \text{ Hz}$ und $T = 13^\circ\text{C}$ aufgenommen. Der gezeigte Kristall wurde, wie in Abschnitt 2.8 beschrieben, bei $c_p = 4,6 \text{ mg ml}^{-1}$ und $c_A = 2,3 \text{ M}$ kristallisiert, präpariert und in einer entsprechenden "Omp32-Reservoirlösung" mit dem AFM vermessen.

zung der Geschwindigkeit der AFM-Spitze, durch Variation der loading force oder des Aufnahmebereiches) scheiterten.

Alle im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten AFM-Messungen auf den Omp32-Kristallen, welche zu einer molekularen Auflösung führten, wurden im Kontakt-Modus bei $F_l < 0,1 \text{ nN}$ durchgeführt. Es wurden Versuche unternommen, die Kristalle im Tapping-Modus zu untersuchen. Diese Versuche ergaben aber bzgl. der Auflösung der Kristalloberfläche stets schlechtere Ergebnisse als die Messungen im Kontakt-Modus. Deshalb sind sie hier nicht gezeigt. Die für den Kontakt-Modus berichtete Beschädigung der Kristalloberfläche fand im Tapping-Modus ebenfalls statt. So konnte beobachtet werden, dass über einer mehrfach im Tapping-Modus gescannten Fläche von $(200 \text{ nm})^2$ eine Senke im Kristall entstand (siehe Abb. 28 F). Die Fläche wurde mit einem Cantilever gescannt, welcher mit $f = 9 \text{ kHz}$ bis auf eine freie Amplitude von $A_f = 40 \text{ nm}$ zum Schwingen angeregt worden ist und um $d = 2 \text{ nm}$ gedämpft wurde. Der benutzte Cantilever besaß eine Federkonstante von $k = 0,02 \text{ N/m}$. Es sei angemerkt, dass bei diesen Parametern mit einer geringeren mechanischen Belastung der untersuchten Oberfläche zu rechnen ist, als bei den Parametern, welche von Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie] bei den in Abschnitt 3.2.1 gezeigten Messungen benutzt worden sind ($f = 36 \text{ kHz}$, $A_f = 40 \text{ nm}$, $d = 4 \text{ nm}$, $k = 0,08 \text{ N/m}$).

Abb. 29 und Abb. 30 zeigen periodische Strukturen, welche in der Diskussion (Abschnitt 4.2.1) als molekular aufgelöste Kristallstrukturen identifiziert werden. Periodische Strukturen können bei der Rastersonden-Mikroskopie aber auch durch mechanische, elektrische, akustische oder optische (Leuchtstoffröhre im Labor) Schwingungen entstehen. So kann eine periodische Struktur als Artefakt in der erhaltenen Topographie vorgetäuscht werden. Artefakte dieser Art ändern ihre Erscheinung in der Topographie für gewöhnlich durch die Variation der Zeilenfrequenz oder der Größe des gescannten Bereiches. Die in Abb. 29 und Abb. 30 A gezeigte periodische Struktur konnte in Variation dieser beiden Parameter aufgenommen werden, ohne dass eine Änderung der perio-

dischen Struktur sichtbar wurde (nicht gezeigt). Es wird daher davon ausgegangen, dass die in Abb. 29 und Abb. 30 A gezeigten periodischen Strukturen keine Artefakte zeigen.

3.2.4 Auswahl analysierbarer Kristallformen

In Zeth et al., 1998 [Zet98] sind mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse zwei verschiedene Formen von Omp32-Kristallen analysiert worden (siehe Abschnitt 2.6). In der Diskussion wird sich zeigen, dass der in Abschnitt 3.2.1 beschriebene, von Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie] untersuchte Kristall einer dieser Kristallformen ("Kristallform 2") zugeordnet werden kann. Ebenfalls wird in der Diskussion beschrieben, dass die im Rahmen der vorliegenden Dissertation in molekularer Auflösung untersuchten Kristalloberflächen (siehe Abb. 29 und Abb. 30) zwar beide die selben Kristalloberflächen zeigen könnten, aber jeweils keiner der in Zeth et al., 1998 [Zet98] untersuchten Kristallformen zugeordnet werden kann. Daher wird davon ausgegangen, dass der in Abschnitt 3.2.1 untersuchte Kristall eine andere Kristallform aufweist als jene Kristalle, welche im Abschnitt 3.2.3 in molekularer Auflösung untersucht worden sind.

Das Ziel der Messungen an den Omp32-Kristallen ist es, ein Modellsystem zu finden, mit dem erstmals das Wachstum eines Membranprotein-Kristalls in molekularer Auflösung dargestellt und untersucht werden kann (siehe Abschnitt 1.3). Dazu muss ein Kristall gefunden werden, welcher durch die benutzte Messmethode möglichst wenig angegriffen wird. Die im Rahmen dieser Dissertation gefundene Kristallform konnte zwar mit dem AFM in molekularer Auflösung dargestellt werden, es war jedoch nicht möglich, eine Kristalloberfläche zu untersuchen, ohne dass eine durch den Messvorgang verursachte Veränderung auf dem Kristall beobachtet werden konnte (siehe Abschnitt 3.2.3). Im Gegensatz dazu war es auf der von Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie] untersuchten Kristallform 2 möglich, über 20 mal eine Kristalloberfläche in molekularer Auflösung mit dem AFM zu untersuchen, ohne größere Veränderungen am Kristall zu bewirken (siehe Abschnitt 3.2.1). Daher wurde im Rahmen dieser Dissertation nach einem Kristall der Kristallform 2 gesucht. Eine ausführliche Suche, wie sie in der Diskussion vorgeschlagen wird, war im Rahmen der vorliegenden Dissertation nicht möglich. Durch die im Folgenden beschriebene, stichprobenartige Suche konnten einige Parameter gewonnen werden, die für eine ausführlichere Suche hilfreich sein könnten. Deshalb werden die Ergebnisse im Folgenden kurz erläutert, obwohl die Kristallform 2 nicht gefunden werden konnte.

Viele Proteinkristalle wachsen nur in einem sehr engen Parameterbereich des Kristallansatzes [McP99]. Da nicht bekannt ist, bei welcher Proteinkonzentration c_p und bei welcher Temperatur die in Abschnitt 3.2.1 untersuchte Kristallform 2 entstanden ist, wurden Omp32-Kristalle unter Variation dieser Parameter angesetzt (wie bereits in Abschnitt 3.2.2 unter einem anderen Aspekt beschrieben). Zwei Kristalle, die bei einer Temperatur von 8°C entstanden sind, konnten in molekularer Auflösung untersucht werden. Der eine entstand bei $c_p = 1,8 \text{ mg ml}^{-1}$ (siehe Abb. 29), der andere bei $c_p = 4,6 \text{ mg ml}^{-1}$ (siehe Abb. 30 B). Keiner der beiden konnte der Kristallform 2 zugeordnet werden (siehe Abschnitt 4.2.1).

Insgesamt konnten auf 21 weiteren Kristallen, welche bei 8°C mit der in Abschnitt 2.8 beschriebenen Methode kristallisiert worden sind, AFM-Messungen ausgeführt werden. Akzeptiert man das im Folgenden beschriebene "vage Argument", so kann man davon ausgehen, dass zumindest die meisten dieser Kristalle ebenfalls nicht zur Kristallform 2 gehört haben könnten.

Vages Argument: *Auf dem in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Omp32-Kristall der Kristallform 2 konnten drei verschiedene Kristallebenen relativ zerstörungsfrei in molekularer Auflösung mit dem AFM untersucht werden. Die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Kristalle waren bzgl. der AFM-Messungen sehr viel instabiler und waren, in zwei Fällen, nicht mit der Kristallform 2 vereinbar. In allen weiteren Fällen konnte keine Aussage über die Zuordnung zu einer bestimmten Kristallform gewonnen werden. Zudem wurden die Kristalle in vielen Fällen genau mit jenen individuellen AFM-Spitzen vermessen, die sich in den genannten beiden Fällen für eine molekulare Auflösung auf den Omp32-Kristallen qualifizieren konnten. Es kann daher vage vermutet werden, dass sich ein Omp32-Kristall der Kristallform 2 allein durch die Abbildungsqualität bemerkbar gemacht hätte, welche sich bei der AFM-Messung auf diesen Kristall ergeben hätte.*

Obwohl die meisten Kristalle, die bei 16°C entstanden sind, für die AFM-Untersuchung nicht fest genug am Substrat adsorbierten (siehe Abschnitt 3.2.2), konnten auf drei dieser Kristalle einige AFM-Topographien aufgenommen werden, bevor sich die Kristalle vom Substrat lösten. Diese Kristalle sind jeweils bei $c_p = 1,8 \text{ mg ml}^{-1}$ entstanden. Sie sind teilweise im Tapping-Modus und teilweise im Kontakt-Modus untersucht worden. Die Abbildungsqualität auf dieser Topographien war jeweils sehr schlecht (nicht gezeigt). Akzeptiert man das oben beschriebene "vage Argument", so kann man davon ausgehen, dass auch diese Kristalle nicht zur Kristallform 2 gehört haben könnten.

In Zeth et al., 1998 [Zet98] wurde das Omp32 nicht im "sitting-drop vapor diffusion"-, sondern im "hanging-drop vapor diffusion"-Verfahren kristallisiert (siehe Abschnitt 2.8). Außerdem wurden in Zeth et al., 1998 [Zet98] andere Omp32-Reservoirlösungen benutzt, als jene, welche in dieser Arbeit benutzt worden sind (vgl. Abschnitt 2.8). Im Übrigen wurde bzgl. der Kristallisation von Omp32 in Zeth et al., 1998 [Zet98] genau so verfahren, wie es in Abschnitt 2.8 beschrieben steht. Insbesondere wurden die verwendeten Omp32-Stammlösungen sowohl in Zeth et al., 1998 [Zet98] als auch bei dieser Dissertation in identischen Verfahren hergestellt. Ebenfalls identisch ist, dass die Omp32-Stammlösung mit der Omp32-Reservoirlösung im Verhältnis 1:1 vermischt worden ist und dann in einer abgeschlossenen Kammer, welche die Omp32-Reservoirlösung als Reservoir enthielt, der Diffusion ausgesetzt worden ist.

In Zeth et al., 1998 [Zet98] wurde die CFII mit einer Omp32-Reservoirlösung kristallisiert, welche wie folgt zusammengesetzt war: (1.3 M Ammoniumsulfat ((NH₄)₂SO₄), 100 mM Tris, pH 8,6). Diese Lösung sei hier *Reservoir CFII* genannt. Die Kristalle entstanden laut Zeth et al., 1998 [Zet98] erst nach mehreren Monaten der Diffusion. Im Rahmen dieser Dissertation wurde versucht, dieses Verfahren auf die "sitting-drop vapor diffusion" zu übertragen. Es wurde dabei erhofft, auf einer festen Oberfläche adsorbierte Omp32-Kristalle der Kristallform 2 zu erhalten. Dazu wurde das in Abschnitt 2.8 beschriebene Kristallisationsverfahren angewendet, wobei allerdings die Omp32-Reservoirlösung durch die oben beschriebene Lösung "Reservoir CFII" ausgetauscht worden ist. Um etwaige Unregelmäßigkeiten im Kristallisationsprozess auszugleichen, wie z. B. die von der Stammlösung abhängige Proteinkonzentration (siehe Abschnitt 2.7), wurden jeweils mehrere, wie oben beschriebene Kristallansätze gleichzeitig hergestellt (genau so, wie bei allen im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Kristallansätze, siehe Abschnitt 2.8). Dabei wurde die Ammoniumsulfat-Konzentration c_A der Omp32-Reservoirlösung von 1,2 M bis 1,5 M in Schritten von 0,1 M variiert. Zusätzlich wurde jeweils ein Kristallansatz bei $c_A = 1,35 \text{ M}$ hergestellt.

Ein solches Ensemble von Kristallansätzen wurde bei $c_p = 1,8 \text{ mg ml}^{-1}$ und 16°C angesetzt. Nach ca. einem Monat waren auf den Kristallansätzen mit $c_A = 1,3 \text{ M}$ und $c_A = 1,35 \text{ M}$ einige Kristalle gewachsen (siehe Abb. 26 H). Bei den Versuchen, diese

Kristalle mit dem AFM zu vermessen, stellte sich heraus, dass diese Kristalle für eine AFM-Untersuchung nicht fest genug auf dem Substrat adsorbiert waren. Bereits in Abschnitt 3.2.2 wurde gezeigt, dass es bei Kristallen, welche bei $T \geq 16^\circ\text{C}$ kristallisiert worden sind, Schwierigkeiten mit der Adsorption auf dem festen Substrat gab. Auch in dem hier beschriebenen Fall wird vermutet, dass die Kristalle fester mit dem Substrat verbunden wären, wenn sie bei einer tieferen Temperatur kristallisiert worden wären.

Ein weiteres, wie oben beschriebenes Ensemble von Kristallansätzen wurde bei $c_p = 4,6 \text{ mg ml}^{-1}$ und 8°C angesetzt. Aber auch nach 6 Monaten konnten auf diesen Proben keine Kristalle beobachtet werden. Danach wurden die Proben nicht mehr weiter untersucht. Eine solch lange Kristallisationszeit wäre für ein Modellsystem der Untersuchung des Wachstumsprozesses der Proteinkristallisation nicht praktikabel. Aus Aufzeichnungen von Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie] (nicht gezeigt) ist bekannt, dass der von Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie] untersuchte Kristall aus Abschnitt 3.2.1, welcher in der Diskussion der Kristallform 2 zugeordnet wird, innerhalb einer Diffusionszeit von nur wenigen Tagen entstanden ist.

4 Diskussion

4.1 Erzeugung von Lysozym-Muster in Flüssigkeit

4.1.1 Die erzeugten Muster bestehen aus Lysozym

In den Experimenten von Abschnitt 3.1 sind mit einem AFM sog. "Lysozym-Muster" in einer wässrigen Lösung auf Muskovit erzeugt worden. Diese "Lysozym-Muster" können in zwei Arten unterteilt werden: Die sog. "Lysozym-Monoschichten" und die sog. "3D-Lysozym-Aggregate". Im Folgenden werden diese Bezeichnungen, welche zur besseren Übersicht bereits in Abschnitt 3.1 verwendet worden sind, erklärt.

Diese sog. "Lysozym-Muster" entstanden nur dann, wenn Lysozym in der wässrigen Lösung vorhanden war. Letzteres konnte sowohl für die sog. "Lysozym-Monoschichten" bei der Erzeugung im Kontakt-Modus (siehe Abschnitt 3.1.3) und der Erzeugung im Tapping-Modus (siehe Abschnitt 3.1.6) als auch bei den sog. "3D-Lysozym-Aggregaten" (siehe Abschnitt 3.1.5.1) nachgewiesen werden. Es wird hier daher von der Annahme ausgegangen, dass die sog. "Lysozym-Muster" aus Lysozym bestehen.

AFM-Topographiebilder, welche von "Lysozym-Monoschichten" aufgenommen worden sind, bestehen aus zwei Höhenniveaus. Diese Niveaus haben eine Höhendifferenz von ca. 2,7 nm bei im Kontakt- oder im Kraft-Distanz-Modus erzeugten "Lysozym-Monoschichten" (siehe Abb. 11 und Abb. 15) bzw. von ca. 3,7 nm bei im Tapping-Modus erzeugten "Lysozym-Monoschichten" (siehe Abb. 18). Höhendifferenzen von 2,7 nm bzw. 3,7 nm entsprechen der kurzen bzw. der langen Seite eines Lysozym-Moleküls (siehe Abschnitt 2.4). Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass die "Lysozym-Monoschichten" aus einer einzigen Moleküllage Lysozym bestehen, welche direkt auf dem Muskovit adsorbiert ist. Auf den möglichen Erzeugungsmechanismus der Lysozym-Monoschichten wird in Abschnitt 4.1.5 eingegangen.

Die erzeugten "3D-Lysozym-Aggregate" (siehe Abb. 15) variierten in ihrer Höhe und waren mit einer Höhe bis zu 50 nm mehrere Lysozym-Moleküllagen hoch (siehe Abschnitt 3.1.8). Dadurch erklärt sich der verwendete Name "3D-Lysozym-Aggregat". Auf den Erzeugungsmechanismus der 3D-Lysozym-Aggregate wird in Abschnitt 4.1.6 eingegangen.

Das in Abschnitt 3.1 definierte "spontan adsorbierte Lysozym" zeigt sich in den aufgenommenen Topographien in Form von kleinen erhöhten Bereichen, welche die erzeugten Lysozym-Muster umgeben (siehe z. B. Abb. 11 E). Das "spontan adsorbierte Lysozym" zeigt sich, wenn Lysozym in der umgebenden wässrigen Lösung vorhanden ist (siehe Abschnitt 3.1.3). Es wird hier daher angenommen, dass das "spontan adsorbierte Lysozym" aus Lysozym besteht.

Das "spontan adsorbierte Lysozym" liegt auf dem selben Höhenniveau, wie die erzeugten Lysozym-Monoschichten. Sie haben eine Höhe von ca. 2.7 nm (siehe Abschnitt 3.1.1). Dies entspricht der kurzen Seite eines Lysozym-Moleküls. Es wird hier daher angenommen, dass das "spontan adsorbierte Lysozym" ebenfalls in Form einer molekularen Monoschicht direkt auf dem Muskovit adsorbiert ist.

In anderen Arbeiten, bei denen spontan adsorbiertes Lysozym auf Muskovit mit dem AFM untersucht worden ist, zeigten sich ähnliche Strukturen, wie das in dieser Arbeit

beobachtete "spontan adsorbierte Lysozym" [Cza03, Kim02, Rad94] (siehe z. B. Abb. 2). Die Strukturen wurden dort sowohl als einzelne Lysozym-Moleküle, als auch als zusammenhängenden Lysozym-Cluster identifiziert, welche direkt aus der umgebenden wässrigen Lösung auf dem Muskovit in Form einer molekularen Monoschicht adsorbieren. Die Adsorption dieses Lysozyms wird in den oben genannten Arbeiten als spontan und vom Scanprozess der AFM-Spitze unabhängig beschrieben. Deshalb wird es auch in dieser Arbeit als "spontan adsorbiert" bezeichnet. Es sei jedoch angemerkt, dass in der vorliegenden Arbeit unter Parametern gearbeitet wurde, bei denen der Scanprozess der AFM-Spitze die Adsorption von Lysozym auf Muskovit signifikant verstärkt (siehe oben). Da in dieser Arbeit jener Scanprozess ebenfalls zur Untersuchung des "spontan adsorbierten Lysozyms" verwendet worden ist, lässt sich nicht quantitativ sagen, welcher Anteil des "spontan adsorbierten Lysozyms" auch wirklich spontan adsorbiert ist, und welcher Anteil durch den Scanprozess der AFM-Spitze zusätzlich auf dem Muskovit adsorbiert ist.

Erhöht man, ausgehend von der Standard-Lysozymlösung, die Lysozym-Konzentration c_p um den Faktor 10, so ist das spontan adsorbierte Lysozym für das AFM nicht mehr nachweisbar (siehe Abschnitt 3.1.5.1 und Abb. 17). Es wird hier daher angenommen, dass sich in einer solchen Lysozymlösung eine geschlossene Lysozym-Monoschicht spontan auf dem Muskovit bildet. Die fehlenden Höhenunterschiede zu der Muskovit-Oberfläche lassen die Lysozym-Monoschicht in den Topographien unsichtbar werden. Dieser Effekt wurde in ähnlicher Weise bereits in Kim et al., 2002 [Kim02] beobachtet (siehe Abb. 2 E-G).

Auf einer bereits vorhandenen Lysozym-Monoschicht, ob spontan adsorbiert, oder durch den Scanprozess der AFM-Spitze erzeugt, ließen sich keine weiteren Lysozym-Monoschichten erzeugen (siehe Abschnitt 3.1.5.1 und 3.1.10). Im Gegensatz dazu ließen sich 3D-Lysozym-Aggregate sehr wohl auf einer bereits vorhandenen Lysozym-Monoschicht erzeugen (siehe Abschnitte 3.1.5 und 3.1.8)

4.1.2 Proteinkonzentration und Ionenstärke

Um Lysozym-Monoschichten auf Muskovit erzeugen zu können, muss sowohl die Muskovit-Oberfläche möglichst frei von spontan adsorbierten Lysozym sein (siehe oben), als auch die Lysozym-Konzentration c_p einen gewissen Schwellenwert übersteigen (siehe Abschnitt 3.1.5.1 und Abb. 16 B). Beide Bedingungen stehen aber zueinander im Widerspruch, da eine Erhöhung von c_p , eine Erhöhung der Dichte von spontan adsorbierten Lysozym auf dem Muskovit zur Folge hat (siehe Abschnitt 3.1.5.1, Abb. 2 und [Cza03, Kim02, Roth95]). Ausgehend von der Standard-Lysozymlösung, konnten durch Variation von c_p bei $c_p \leq 0,69 \mu\text{M}$ keinerlei Lysozym-Muster erzeugt werden (siehe Abschnitt 3.1.5.1). Im Gegensatz dazu ließen sich bei $c_p \geq 69 \mu\text{M}$ die Lysozym-Monoschichten aufgrund einer sich spontan bildenden Lysozym-Monoschicht nicht mehr erzeugen (siehe Abb. 17). Nur bei $c_p = 6,9 \mu\text{M}$ konnten in der Standard-Lysozymlösung Lysozym-Monoschichten erzeugt werden. Dies entspricht einer solchen Lysozym-Menge in der AFM-Flüssigkammer (ca. $50 \mu\text{l}$, siehe Abschnitt 2.1.7), mit der sich dreißig lückenlose Lysozym-Monoschichten spontan auf der Muskovit-Oberfläche hätten bilden können. Dennoch blieb die Muskovit-Oberfläche frei genug von spontan adsorbierten Lysozym, so dass sich Lysozym-Monoschichten auf ihr erzeugen ließen (siehe Abschnitt 3.1.1). Im Folgenden wird erläutert, dass letzteres nur durch die Wahl einer geeignet hohen Ionenstärke möglich ist. Die Ionenstärke ist wie folgt definiert:

Seien c_1, c_2, \dots, c_n ($n \in \mathbb{N}$) die Konzentrationen der n verschiedenen Ionensorten, welche in einer wässrigen Lösung vorkommen. Ihre Wertigkeit sei z_1, z_2, \dots, z_n ($n \in \mathbb{N}$). Dann ist die Ionenstärke J dieser Lösung definiert als

$$J = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n z_i^2 c_i \quad (3)$$

[Ada95].

Spontane Proteinadsorption wird im Allgemeinen durch die elektrostatische Kräfte, den Van-der-Waals-Kräften, der hydrophoben Wechselwirkung als auch durch Energiegewinn bei etwaigen Konformationsänderungen der Proteine beim Adsorbieren getrieben [Blo94]. Aber auch die Wechselwirkung der Proteine untereinander (z. B. Clusterbildung [Kim02] oder Kristallisation [Fur98]) kann die Proteinadsorption antreiben. Bei den verwendeten pH-Werten von pH 4 - pH 4,5 ist Lysozym positiv geladen [Tan72] und Muskovit negativ geladen [Sca90, Sca88]. Die elektrostatischen Kräfte tragen in diesem Fall zur Proteinadsorption bei.

Ionen verteilen sich in Flüssigkeiten in der Nähe von geladenen Objekten so um, dass sie das von den Objekten ausgehende elektrische Feld abschwächen (Guy-Chapman-Theorie [Isr97]). Diese Abschwächung ist umso stärker, je größer die Ionenstärke ist [Isr97].

In Czajkowsky et al., 2003 [Cza03] konnte gezeigt werden, dass die Adsorption von Lysozym auf Muskovit durch Erhöhung der Ionenstärke stark negativ beeinflusst werden kann. In der vorliegenden Arbeit konnte dies bestätigt werden. So konnte auch nach sechsständigen Kontakt von Muskovit mit der Standard-Lysozymlösung ($c_p = 6,9 \mu\text{M}$) keine geschlossene Lysozym-Monoschicht auf Muskovit beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.1.1), während sich bei sonst gleichen Bedingungen, aber einer um den Faktor 5,5 verringerte Ionenstärke, schon nach 30 Minuten eine geschlossene Lysozym-Monoschicht auf dem Muskovit zeigte (siehe Abschnitt 3.1.10).

Noch deutlicher zeigt sich die starke Abhängigkeit der Lysozymadsorption auf Muskovit von der Ionenstärke durch einen Vergleich mit den Daten aus Kim et al., 2002 [Kim02]. Dort konnte bei einer (im Vergleich zur Standard-Lysozymlösung) um den Faktor 400 kleineren Ionenstärke bereits bei einer Proteinkonzentration von $c_p = 685 \text{ nM}$ eine vollständig adsorbierte Lysozym-Monoschicht beobachtet werden (siehe Abb. 2 E-G). Bei einer solchen Proteinkonzentration enthält das Proteinreservoir der AFM-Flüssigkammer gerade mal so viel Lysozym, dass die vorhandene Muskovit-Oberfläche mit ungefähr drei Monoschichten Lysozym vollständig bedeckt hätte werden können [Kim02]. So ist anzunehmen, dass die nach der Adsorption resultierende Proteinkonzentration in der AFM-Flüssigkammer sogar noch unterhalb der ursprünglich enthaltenen 685 nM liegt.

In vorhergehenden AFM-Untersuchungen der Lysozymadsorption auf Muskovit (z. B. [Cza03, Kim02, Schap97, Rad94]) konnte eine wie hier gezeigte Lysozym-Musterbildung nicht beobachtet werden. Ein Blick in diese Arbeiten zeigt, dass in keiner dieser Arbeiten mit einer ähnlichen Kombination von Ionenstärke und Proteinkonzentration gearbeitet worden ist, wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall ist. Im Folgenden wird gezeigt, dass die Wahl einer geeigneten Proteinkonzentration und die Wahl einer geeigneten Ionenstärke für die hier aufgezeigte Lithographie-Methode unabdingbar sind.

Aufgrund der starken Abhängigkeit der Lysozym-Lithographie von den elektrostatischen Kräften innerhalb der wässrigen Lösung (siehe oben), werden im Folgenden die elektrischen Potentiale zweier Lysozymlösungen im Detail diskutiert.

4.1.3 Elektrostatische Potentiale

In diesen Abschnitt werden die elektrostatischen Potentiale zwischen einem Lysozym-Molekül und der Muskovit-Oberfläche für zwei unterschiedliche Lysozym-Lösungen abgeschätzt. Die beiden Lösungen sind:

- Die in Abschnitt 3.1 verwendete *Standard-Lysozymlösung* (6,9 μM Lysozym, 680 mM NaCl, 50 mM NaAc, pH 4.5). In dieser Lösung konnte die Erzeugung von Lysozym-Monoschichten beobachtet werden. Alle bezüglich dieser Lösung errechneten oder abgeschätzten Werte werden mit dem Index *Std* versehen.
- Eine in Kim et al., 2002 [Kim02] verwendete Lysozymlösung, hier *Kim-Lysozymlösung* genannt (137 nM Lysozym, 10mM NaAc, pH4). In dieser konnte die Erzeugung von Lysozym-Monoschichten nicht beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.1.10 und [Kim02]). Alle bezüglich dieser Lösung hier errechneten oder abgeschätzten Werte werden mit dem Index *Kim* versehen.

Die dafür nötigen, abgeschätzten Werte werden zur besseren Übersicht in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Potentiale selbst sind in Abb. 31 dargestellt. Sie stellen das Ergebnis dieses Abschnittes dar. Mit Hilfe dieser Potentiale werden in den dann folgenden Abschnitten mögliche Mechanismen diskutiert, die der hier beschriebenen Lithographie-Methode zu Grunde liegen könnten.

Die Nettoladungen der Lysozym-Moleküle q wurden aus einer in Tanford et al., 1972 [Tan72] experimentell bestimmten Titrationskurve entnommen. Daraus ergab sich $q^{Std} = 11,2 e$ und $q^{Kim} = 11,7 e$ (e ist die elektrische Elementarladung).

In beiden hier betrachteten Lösungen wurde ein Essigsäure-Natriumacetat Puffersystem verwendet. Der pK-Wert von Essigsäure beträgt 4,76 [Ada95]. Seien c_A und c_{HA} die Konzentrationen des assoziierten bzw. dissoziierten Natriumacetats, dann lässt sich mit der Henderson-Hasselbalch Gleichung

$$pH = pK + \log\left(\frac{c_A}{c_{HA}}\right) \quad (4)$$

[Ada95] für die relevanten pH-Werte der Anteil des Natriumacetats bestimmen, welches assoziiert ist und zur Ionenstärke beiträgt.

Unter Einbeziehung des dissoziierten Puffersalzes, der Protonen und des zusätzlich in der Standard-Lysozymlösung vorhandenen Salzes (NaCl) ergeben sich die Ionenstärken von $J^{Std} = 700 \text{ mM}$ und $J^{Kim} = 1,6 \text{ mM}$.

Muskovit gibt bei Kontakt mit einem Lösungsmittel die oberflächlichen, das Muskovit neutralisierenden K^+ -Ionen ab. Davon gibt es auf einer Fläche von $45,8 \text{ \AA}^2$ je eines [Sca90], wodurch sich im nicht neutralisiertem Zustand eine Flächenladungsdichte von $\sigma = 349 \text{ mC / m}^2$ ergibt. Die entstehenden freien Stellen werden zum größten Teil durch andere, in der Lösung vorkommende, positive Ionen (hier H^+ und Na^+) ersetzt. In Scales et al., 1990 [Sca90] wurde das Oberflächenpotential von Muskovit φ_0 unter Variation des pH-Wertes (bei $J = 1 \text{ mM}$ durch Zugabe von KCl) gemessen. Aus der Messkurve φ_0 (pH, $J = 1 \text{ mM}$, K^+) ergaben sich die Werte φ_0 (pH = 4, $J = 1 \text{ mM}$, K^+) = -40 mV und φ_0 (pH = 4.5, $J = 1 \text{ mM}$, K^+) = -50 mV.

Annahme 1: Das Oberflächenpotential von Muskovit φ_0 in einer wässrigen, elektrolytischen Lösung ändert sich nicht, wenn man die in der Lösung vorkommenden K^+ -Ionen durch gleichviele Na^+ -Ionen ersetzt.

Mit Annahme 1 ergeben sich Oberflächenpotentiale von φ_0 (pH = 4, $J = 10^{-3}$ M, Na^+) = -40 mV und φ_0 (pH = 4.5, $J = 10^{-3}$ M, Na^+) = -50 mV. Ein möglicher Fehler, der sich aus Annahme 1 bzgl. φ_0 ergeben könnte wird weiter unten in diesem Abschnitt diskutiert.

Sei σ die Oberflächenladungsdichte des Muskovits, $\varepsilon = 80$ die Dielektrizitätskonstante von Wasser [Isr97], ε_0 die elektrische Feldkonstante, k die Boltzmann-Konstante und $T = 298$ K die angenommene Temperatur, dann lässt sich mit Hilfe der Graham-Gleichung

$$\sigma = \sqrt{8\varepsilon\varepsilon_0kT} \sinh(e\varphi_0/2kT) \sqrt{J} \quad (5)$$

[Isr97] vom jeweiligen Oberflächenpotential auf die jeweilige Oberflächenladungsdichte schließen. Es ergeben sich: σ (pH = 4, $J = 1$ mM, Na^+) = -3,2 mC/m² und σ (pH = 4,5, $J = 1$ mM, Na^+) = -4,2 mC/m².

Annahme 2: Die Oberflächenladungsdichte von Muskovit ändert sich bei der Erhöhung von J nicht.

Mit Annahme 2 ergeben sich die Oberflächenladungsdichten $\sigma^{Kim} = \sigma$ (pH = 4, J^{Kim}) = -3,2 mC/m² und $\sigma^{Std} = \sigma$ (pH = 4,5, J^{Std}) = -4,2 mC/m². Ein möglicher Fehler, der sich aus Annahme 2 bzgl. σ ergeben könnte, wird weiter unten in diesem Abschnitt diskutiert.

Aus Gleichung 5 lassen sich jetzt die Oberflächenpotentiale $\varphi_0^{Kim} = -30,62$ mV und $\varphi_0^{Std} = -2,2$ mV bestimmen.

Das elektrische Potential von Muskovit in Abhängigkeit vom Abstand zum Muskovit $\varphi(z)$ lässt sich mit Hilfe der aus der Guy-Chapman-Theorie gewonnenen Gleichung

$$\varphi(z) = \frac{2kT}{e} \log \left[\frac{1 + \gamma e^{-z/l_d}}{1 - \gamma e^{-z/l_d}} \right] \text{ mit } \gamma = \tanh(e\varphi_0/4kT) \quad (6)$$

[Isr97] angeben. Dabei ist

$$l_d = \frac{1}{F} \sqrt{\frac{\varepsilon\varepsilon_0RT}{2J}} \quad (7)$$

[Isr97], F die Faraday-Konstante und R die molare Gaskonstante. l_d wird auch *Debye-Länge* genannt. Bei Oberflächenpotentialen im mV-Bereich lässt sich Gleichung 6 mit

$$\varphi(z) = \varphi_0 e^{-z/l_d} \quad (8)$$

nähern [Isr97]. Anhand von Gleichung 8 lässt sich der Charakter der Debye-Länge erkennen. Die Debye-Länge gibt demnach den Abstand eines Ortes innerhalb der Elektrolytlösung zur Muskovit-Oberfläche an, bei dem sich das elektrische Potential im Vergleich zur Muskovit-Oberfläche um $1/e$ verringert hat. Die Abschwächung des Potentials mit zunehmenden Abstand von der Muskovit-Oberfläche wird durch die Umverteilung der Ionen (Ausbildung eines "electric double-layer" [Isr97]) in der Nähe einer geladenen Oberfläche verursacht (Guy-Chapman-Theorie [Isr97]). Daher hängt die Debye-Länge von der Ionenstärke ab (siehe Gleichung 7). Aus Gleichung 7 ergeben sich $l_d^{Kim} = 7,65$ nm und $l_d^{Std} = 0,36$ nm.

Mit Gleichung 6 und den abgeschätzten Werten aus Tabelle 2 lässt sich der Potentialverlauf $\varphi(z)$ für die Kim-Lysozymlösung als auch für die Standard-Lysozymlösung angeben. Die Potentialverläufe sind in Abb. 31 A gezeigt.

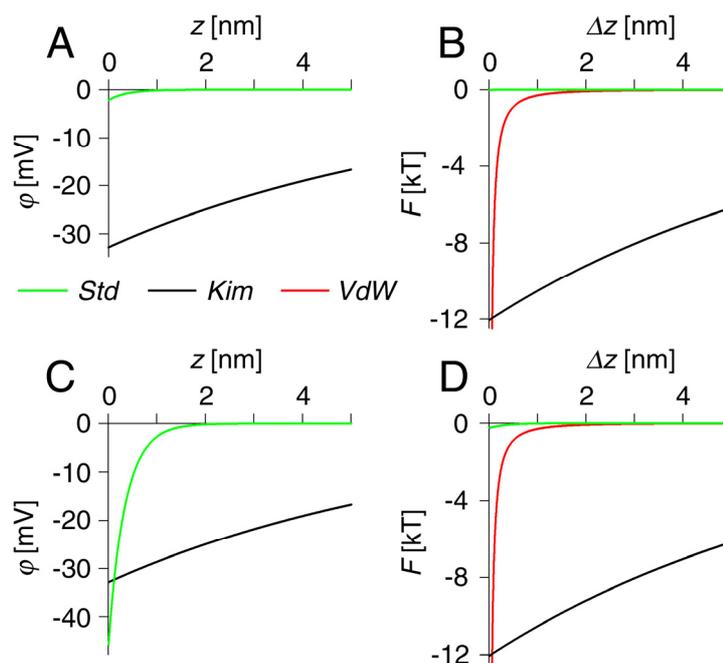


Abb. 31 A+C: Elektrisches Potential φ innerhalb einer Lysozymlösung in Abhängigkeit von der Höhe über der Muskovit-Oberfläche z . **B+D:** Elektrostatischer Anteil der freien Energie eines Lysozym-Moleküls F in Abhängigkeit der Spaltbreite zwischen dem Molekül und der Oberfläche Δz . Schwarze Kurven: "Kim-Lysozymlösung". Grüne Kurven: "Standard-Lysozymlösung". Rote Kurven: Anteil der Van-der-Waals-Kraft an der freien Energie eines Lysozym-Moleküls, gilt für beide hier angesprochenen Lysozymlösungen. **A+B** sind aus den Werten berechnet, welche sich aus den "Annahmen 1 und 2" ergeben (siehe Text oder Tabelle 2). Diese Kurven fanden auch in Leisten et al., 2006 [Lei06] Anwendung. **C+D** sind aus den Werten berechnet, welche für den Fall des "kleinen Potentialunterschiedes" berechnet wurden (siehe Text oder Tabelle 2).

In Roth et al., 1993 [Rot93] wurde das Adsorptionsverhalten von in Elektrolyt gelöstem Lysozym an einer negativ geladenen Oberfläche mit einem Computer simuliert. Für die Lysozym-Moleküle wurden dafür in Roth et al., 1993 [Rot93] zwei unterschiedliche Modelle kreiert:

Lysozym-Modell 1: Die Oberfläche von Lysozym wird aus Dreiecken mit 2454 Knoten modelliert. Die Oberfläche wird den aus der Röntgenstrukturanalyse bekannten Daten für Lysozym angepasst. Die Ladungen werden so auf der Oberfläche verteilt, wie es aus den Strukturdaten von Lysozym zu erwarten ist. Das Innere des Proteins wird als elektrolytfreier Raum mit einer Dielektrizitätskonstante von $\epsilon = 4$ angenommen.

Lysozym-Modell 2: Lysozym wird als Kugel angenommen. Der Radius der Kugel wird so gewählt, dass das Volumen der Kugel dem zuvor beschriebenen Modell entspricht. Der so erhaltene Radius wird Äquivalenzradius R genannt und beträgt $R = 1,58$ nm. Die Ladungen werden im Zentrum der Kugel angenommen. Das Innere des Proteins wird als elektrolytfreier Raum mit einer Dielektrizitätskonstante von $\epsilon = 4$ angenommen.

Beide Lysozym-Modelle wurden in Roth et al., 1993 [Rot93] in ein elektrisches Potential einer Elektrolytlösung in der Nähe einer negativ geladenen Wand versetzt. Die Ionenstärke der Lösung wurde zu $J = 0,1$ M und die Ladung von Lysozym zu $q = 8e$ angenommen. Berechnet wurde die sich aus den elektrostatischen Kräften ergebende freie Energie eines Lysozym-Moleküls in Abhängigkeit von der Spaltbreite zwischen der Lysozym-Oberfläche und der geladenen Wand $F(\Delta z)$. Dabei wurde Lysozym-Modell 1 bei allen möglichen Orientierungen des Lysozym-Moleküls zur Wand berechnet. Letzte-

res war für das Lysozym-Modell 2 aufgrund seiner Symmetrie nicht notwendig. Das Ergebnis ist in Abb. 32 gezeigt. Man sieht dort, dass der Potentialverlauf von Lysozym-Modell 2 bei $\Delta z > 1 \text{ \AA}$ innerhalb der Grenzen des für alle Ausrichtungen des Lysozym-Modells 1 kalkulierten Potentialverlauf-Bereiches liegt. In Roth et al., 1993 [Rot93] wurden daraufhin alle weiteren Kalkulationen, insbesondere jene, welche sich auf das Adsorptionsverhalten von Lysozym beziehen, mit Lysozym-Modell 2 berechnet. Es wird in Roth et al., 1993 [Rot93] erwähnt, dass $F(\Delta z)$ für Lysozym-Modell 2 einen nahezu exponentiellen Verlauf besitzt.

In Anlehnung an diese Kalkulationen, findet Lysozym-Modell 2 auch im folgenden Verwendung. Für die hier durchgeführten Berechnungen wurde Lysozym-Modell 2 einer Vereinfachung unterzogen:

Vereinfachtes Lysozym-Modell 2: *Wie Lysozym-Modell 2, jedoch wurde das Innere des Proteins als ein Medium angenommen, welches sich in seinen Eigenschaften, abgesehen von der zentralen Ladung, nicht von der umgebenden Elektrolytlösung unterscheidet.*

Beim vereinfachten Lysozym-Modell 2 kann $F(\Delta z)$ durch

$$F(z) = q\varphi(z + R) \quad (9)$$

erhalten werden und muss nicht umständlich durch numerische Verfahren gelöst werden, wie es bei Lysozym-Modell 2 der Fall ist [Rot93].

Jeweils ein Lysozym-Molekül wurde nach dem vereinfachten Lysozym-Modell 2 mit der dem pH-Wert entsprechenden Ladung (siehe Tabelle 2) in das elektrische Potential der Kim-Lysozymlösung als auch das der Standard-Lysozymlösung eingesetzt. Die sich aus den elektrostatischen Kräften ergebende freie Energie der Lysozym-Moleküle F wurde in Abhängigkeit von der Spaltbreite zwischen der Lysozym-Oberfläche und Muskovit Δz errechnet. Das Ergebnis $F(\Delta z)$ ist in Abb. 31 B dargestellt.

Die Vereinfachung von Lysozym-Modell 2 bedeutet für das berechnete $F(\Delta z)$ eine zusätzliche Abschwächung über den gesamten Wertebereich. Diese Abschwächung wird sowohl durch die Wahl einer höheren Dielektrizitätskonstanten, als auch durch die Ionenverteilung durch das angenommene Elektrolyt innerhalb des Proteins bewirkt. Um diese Abschwächung sichtbar zu machen, wurde ein $F(\Delta z)$ aus dem vereinfachten Lysozym-Modell 2 dem Potentialverlauf aus Lysozym-Modell 2 bei $J = 0,1 \text{ M}$, $q = 8e$ und $\varphi_0 = -29 \text{ mV}$ gegenübergestellt (siehe Abb. 32). Die nahezu exponentielle Form von $F(\Delta z)$ bei Lysozym-Modell 2 wird laut Gleichungen 8 und 9 bei dem vereinfachten Modell beibehalten.

In Abb. 31 B wird ebenfalls jene freie Energie angegeben, welche sich aus der Van-der-Waals-Kraft F_{VdW} ergibt. Sie wurde mit

$$F_{VdW}(\Delta z) = -\frac{A}{6} \left\{ \frac{R}{\Delta z} + \frac{R}{2R + \Delta z} + \ln \left(\frac{\Delta z}{2R + \Delta z} \right) \right\} \quad (10)$$

[Rot93] errechnet. Die dazu nötige Hamaker-Konstante A wurde mit Hilfe der "Lifschitz-theory to interaction in a medium" [Isr97] mit

$$A \approx \frac{3}{4} kT \left(\frac{\varepsilon_1 - \varepsilon_3}{\varepsilon_1 + \varepsilon_3} \right) \left(\frac{\varepsilon_2 - \varepsilon_3}{\varepsilon_2 + \varepsilon_3} \right) + \frac{3h\nu_e}{8\sqrt{2}} \frac{(n_1^2 - n_3^2)(n_2^2 - n_3^2)}{(n_1^2 + n_3^2)^{1/2} (n_2^2 + n_3^2)^{1/2} \{ (n_1^2 + n_3^2)^{1/2} + (n_2^2 + n_3^2)^{1/2} \}} \quad (11)$$

[Isr97] berechnet. Dabei sind die ε_i die Dielektrizitätskonstanten von Muskovit ($\varepsilon_1 = 5,4$ [Ber97]), Wasser ($\varepsilon_2 = 80$ [Isr97]) und Lysozym ($\varepsilon_3 = 4$ [Rot93]) und die n_i die Bre-

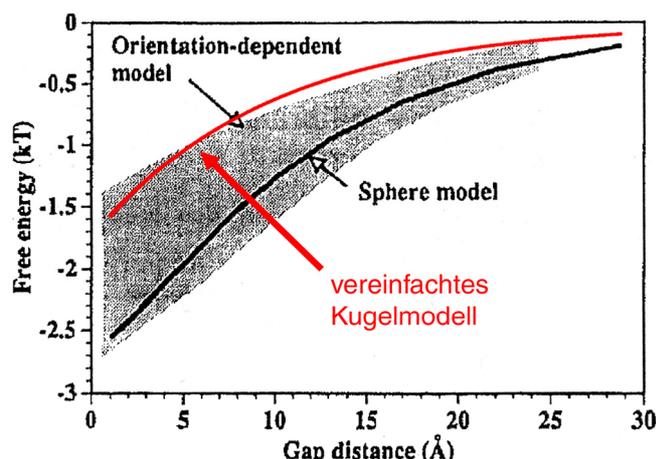


Abb. 32 Freie Energie ("Free energy") eines Lysozym-Moleküls in einer elektrolytischen Lösung in Abhängigkeit der Spaltbreite zwischen dem Molekül ("Gap distance") und einer negativ geladenen Oberfläche. Vergleich des symmetrischen Lysozym-Modells 2 ("Sphere model"), dem vereinfachten Lysozym-Modell 2 ("vereinfachtes Kugelmodell") und dem Lysozym-Modell 1 ("Orientation-dependent model"). Letzteres wurde für alle möglichen Orientierungen zur geladenen Oberfläche berechnet, wodurch sich für jede Spaltbreite ein Energiebereich (grau) ergibt. $J = 0,1 \text{ M}$, $q = 8e$, $\varphi_0 = -29 \text{ mV}$. Aus Roth et al., 1993 [Rot93]. Kurve des "vereinfachten Kugelmodells" wurde aus eigener Berechnung ergänzt.

chungsindizes von Muskovit ($n_1 = 1,58$ [Ber97]), Wasser ($n_2 = 1,33$ [Kuc96]) und Lysozym ($n_3 = 1,51$ [Spe03]). Es ergab sich $A = 1,4 \times 10^{-20} \text{ J}$.

Die in Abb. 31 A+B gezeigten abgeschätzten Potentiale sind bereits in Leisten et al., 2006 [Lei06] präsentiert worden. Sie dienen vor allem dazu, den *Unterschied* der molekularen Kräfte an der Muskovit-Oberfläche zwischen einer Hochsalz-Lösung, in der die hier aufgezeigte Lithographie-Methode möglich ist, und einer Niedersalz-Lösung, in der die hier aufgezeigte Lithographie-Methode nicht möglich ist, aufzuzeigen. Um deutlich zu machen, welche Fehler sich aus Annahme 1 und Annahme 2 bzgl. dieses Unterschiedes ergeben können, werden im Folgenden jene Fehler aus den beiden Annahmen diskutiert, die den Unterschied der Potentiale verkleinern. Der Fall

"kleiner Potentialunterschied" ist genau dann gegeben, wenn die betrachteten Fehler so abgeschätzt werden, dass $|\varphi_0^{Std}|$ groß und $|\varphi_0^{Kim}|$ klein wird.

Bzgl. φ_0^{Kim} nimmt Annahme 1 bereits den Fall des kleinen Potentialunterschiedes an: Nach experimentellen Daten aus Scales et al., 1990 [Sca90] ist der Betrag des Oberflächenpotentials von Muskovit $|\varphi_0|$ in einer Elektrolytlösung (pH 5.8, $J = 1\text{mM}$) mit den Ionen $\{\text{H}^+, \text{Na}^+, \text{Cl}^-\}$ um ca. 20 % größer als mit den Ionen $\{\text{H}^+, \text{K}^+, \text{Cl}^-\}$. Dies liegt daran, dass der Durchmesser der Hydrathüllen der Na^+ -Ionen im Gegensatz zu dem der K^+ -Ionen größer ist, als der Abstand der negativ geladenen Plätze auf dem Muskovit [Sca90, Pas81]. Durch die Konkurrenz der Na^+ -Ionen mit den H^+ -Ionen um die freien, negativ geladenen Plätze auf dem Muskovit, verdrängen die Na^+ -Ionen die H^+ -Ionen teilweise von ihren Plätzen. Aufgrund ihrer Größe und des beschränkten Platzangebotes auf dem Muskovit können die Na^+ -Ionen die negative Ladung des Muskovits weniger ausgleichen, als es H^+ -Ionen oder K^+ -Ionen könnten. So kann in einem Elektrolyt bei pH 4 und $J = 1\text{mM}$ davon ausgegangen werden, dass sich $|\varphi_0|$ durch den Austausch von K^+ durch Na^+ erhöht.

Auch Annahme 2 nimmt bzgl. φ_0^{Kim} bereits den Fall des kleinen Potentialunterschiedes an: Nach experimentellen Daten aus Pashley et al., 1981 [Pas81] wird der Betrag der Oberflächenladungsdichte von Muskovit $|\sigma|$ bei pH = 5,7 mit zunehmender Konzentra-

	<i>Kim</i>	<i>Std</i>	Ermittlung durch
q [e]	11,7	11,2	[Tan72]
J [mM]	1,6	700	Gleichung 3
σ [mC/m ²]	-3,2	-4,2 bis -99	J , [Sca90], Annahme 1, Gleichung 5, kleiner Potentialunterschied
φ_0 [mV]	-32,8	-2,2 bis -45,7	σ , Annahme 2, Gleichung 5, kleiner Potentialunterschied
l_d [nm]	7,65	0,36	J , Gleichung 7

Tabelle 2 Zusammenfassung der in Abschnitt 4.1.3 ermittelten Werte: Ladung eines Lysozym-Moleküls q , Ionenstärke des Elektrolytes J , Oberflächenladungsdichte von Muskovit σ , elektrisches Potential der Muskovit-Oberfläche φ_0 , und Debye-Länge l_d in der Kim-Lysozymlösung ("Kim") bzw. der Standard-Lysozymlösung ("Std"). Rechts daneben die Quellen, Gleichungen und Werte, mit welchen die jeweiligen Werte ermittelt worden sind.

tion von NaCl größer. Dies kann durch die Verdrängung der H⁺-Ionen von deren Gitterplätzen auf dem Muskovit erklärt werden [Pas81]. So kann auch in einem Elektrolyt bei pH 4 davon ausgegangen werden, dass $|\sigma|$ mit sich durch die Zugabe von NaCl erhöhendem J ansteigt. Bei erhöhtem $|\sigma|$ wird auch $|\varphi_0|$ erhöht sein (siehe Gleichung 5).

Bei φ_0^{Std} wird der Fall des kleinen Potentialunterschiedes dadurch angenommen, dass das Muskovit vollständig in hexagonaler Anordnung mit Na⁺ besetzt angenommen wird, so dass kein Platz für ladungsausgleichende H⁺-Ionen auf dem Muskovit bleibt. Dafür wird ein experimentell erhaltener Wert aus Pashley et al., 1981 [Pas81] benutzt, welcher sich direkt auf den Radius von auf Muskovit adsorbierter Na⁺-Ionen bezieht. Er beträgt $R_{Na^+} = 4,3 \text{ \AA}$. Daraus ergibt sich eine Oberflächenladungsdichte von $\sigma = -99 \text{ mC/m}^2$. Mit Hilfe von Gleichung 5 kann so auf das für dieses Modell zugehörige Oberflächenpotential von Muskovit in der Standard-Lysozymlösung geschlossen werden. Es beträgt $\varphi_0^{Std} = -45,7 \text{ mV}$.

Um deutlich zu machen, welcher Fehler sich aus den hier gemachten Annahmen ergeben kann, werden sowohl $\varphi(z)$ als auch $F(\Delta z)$ für beide hier betrachteten Lösungen mit den aus dem Fall des kleinen Potentialunterschiedes erhaltenen Werten in Abb. 31 gezeigt. Trotz des großen möglichen Fehlers bei $\varphi^{Std}(z)$ (vgl. Abb. 31 A mit Abb. 31 C) ändert sich nichts in der Reihenfolge der Größe von $\{F^{Kim}(\Delta z), F^{Std}(\Delta z), F^{VdW}(\Delta z)\}$ in der Nähe der Muskovit-Oberfläche (vgl. Abb. 31 B mit Abb. 31 D). Man kann also in jeden Fall davon ausgehen, dass in der Standard-Lysozymlösung der Van-der-Waals-Anteil an der freien Energie eines Lysozym-Moleküls den Anteil der Elektrostatik übertrifft. In der Kim-Lysozymlösung dagegen ist es umgekehrt. Dies ist auf den entscheidenden Unterschied in der Debye-Länge zurückzuführen. Die Debye-Länge liegt in den betrachteten Lösungen in der Größenordnung der Lysozym-Moleküle selbst vor. Deshalb bestimmt sie den Verlauf von $F(\Delta z)$ unabhängig von der Größe der Oberflächenladungsdichten σ bzw. der Oberflächenpotentiale φ_0 innerhalb der angegebenen Bereiche. Sollten sich weitere Energiebeiträge bei der Adsorption von Lysozym auf Muskovit vernachlässigen lassen (z.B. Konformationsänderungen von Lysozym und die hydrophobe Wechselwirkung, siehe nächster Abschnitt), so könnte man aus den in Abb. 31 gezeigten Potentialen direkt auf die Kräfte schließen, welche bei der Adsorption von Lysozym auf Muskovit in den beiden betrachteten Lösungen wirken.

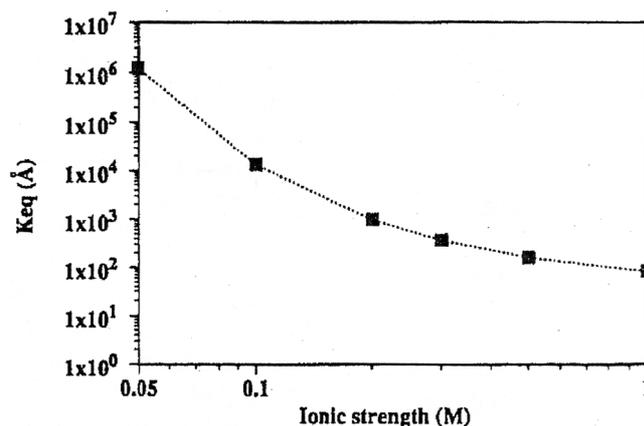


Abb. 33 Theoretisch bestimmte Gleichgewichtskonstante K_{eq} [Å] in Abhängigkeit der Ionenstärke J [M]. Man erkennt an der Abbildung, dass sich die Konzentration von Lysozym auf einer negativ geladenen Oberfläche in einem Bereich von vier Größenordnungen mit der Variation von J um nur 1 1/2 Größenordnungen steuern lässt (siehe Text). Aus Roth et al., 1993 [Rot93].

4.1.4 Spontane Adsorption von Lysozym

In Roth et al., 1993 [Rot93] wurde die Menge von adsorbierten Lysozym an einer negativ geladenen Oberfläche in Abhängigkeit der Ionenstärke numerisch berechnet. Dazu wurde angenommen, dass die positiv geladenen Lysozym-Moleküle lediglich durch die elektrostatische Anziehung des negativ geladenen Muskovits, die Van-der-Waals-Kraft, und der Brownschen Molekularbewegung [Ada95] bestimmt wird. Insbesondere wurde bei dieser Berechnung sowohl die Wechselwirkung der Proteine untereinander, etwaige Konformationsänderungen und die hydrophobe Wechselwirkung vernachlässigt. Aus diesen Annahmen folgt die Existenz eines Gleichgewichtszustandes aus Adsorption und Desorption von adsorbierten und gelösten Lysozym. Dieses Gleichgewicht lässt sich mit Hilfe der im Folgenden definierten Gleichgewichtskonstanten beschreiben:

Sei c_b [$1/\text{Å}^3$] die Proteinkonzentration einer wässrigen Lösung (Index b = "bulk") und c_s [$1/\text{Å}^2$] die Proteinkonzentration auf einer mit dieser Lösung in Kontakt stehenden Oberfläche (Index s = "surface"). Sei die Gleichgewichtskonstante K_{eq} [$1/\text{Å}$] definiert durch

$$\frac{c_s}{c_b} = K_{eq}. \quad (12)$$

Sei weiter $\Delta F(r)$ die freie Energie eines Lysozym-Moleküls in Abhängigkeit vom Abstand zu der negativ geladenen Oberfläche. Dann lässt sich K_{eq} mit den oben beschriebenen Annahmen wie folgt berechnen:

$$K_{eq} = \int_{r_0}^{\infty} e^{-\Delta F(r)/kT} - 1 \, dr \quad (13)$$

[Rot93]. Dabei ist r_0 die "cutoff distance", jene Distanz, die das Protein zur Oberfläche aufgrund von räumlicher Behinderung selbst im adsorbierten Zustand einhält. Sie wird in Roth et al., 1993 [Rot93] grundsätzlich mit $r_0 = 1 \text{ Å}$ gewählt. In Roth et al., 1993 [Rot93] wurde die Ladung von Lysozym auf $q = 8e$, die Hamaker-Konstante zwischen Lysozym und der geladenen Wand auf $A = 10^{-20} \text{ J}$ und die Oberflächenladungsdichte der Wand auf $\sigma = -46 \text{ mC/m}^2$ gesetzt. Dies entspricht ungefähr den Werten, welche auch in der Standard-Lysozymlösung vorliegen (siehe Tabelle 2).

Mit diesen Werten wurde in Roth et al., 1993 [Rot93] der elektrostatische Anteil von $\Delta F(r)$ nach dem (nicht vereinfachten) Lysozym-Modell 2 (siehe Abschnitt 4.1.3) berechnet. Der Van-der-Waals-Anteil von $\Delta F(r)$ wurde nach Gleichung 10 berechnet. Beide Anteile wurden addiert. Mit dem resultierenden $\Delta F(r)$ konnte mittels Gleichung 13 K_{eq} in Abhängigkeit von J berechnet werden. Das Ergebnis ist in Abb. 33 dargestellt. Man erkennt darin eine starke Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten K_{eq} von J . So variiert K_{eq} um vier Größenordnungen, bei einer Variation von J um eineinhalb Größenordnungen. Diese theoretisch bestimmte Aussage konnte durch ein experimentelles Ergebnis mittels "Total Internal Reflectance Fluorescence spectroscopy" (TIRF) in Roth et al., 1995 [Rot95] bei der Adsorption von Lysozym auf eine negativ geladene, hydrophile SiO_2 -Oberfläche bestätigt werden. Der Absolutwert des berechneten K_{eq} [Rot93] weicht allerdings bis zu einer Größenordnung vom Experiment [Rot95] ab. Dies wurde vor allem auf die kritische Wahl von r_0 und der Vernachlässigung der Wechselwirkung der Proteine untereinander zurückgeführt [Rot95].

Dennoch bestätigt das Experiment von Roth et al., 1995 [Rot95] die bereits in Roth et al., 1993 [Rot93] gemachte Annahme, dass die Adsorption von Lysozym auf einer moderat negativ geladenen, hydrophilen Oberfläche von den elektrostatischen- und den Van-der-Waals-Kräften bestimmt wird und Energiebeiträge aus der hydrophoben Wechselwirkung und etwaigen Konformationsänderungen während der Adsorption vernachlässigt werden können. Diese Annahme begründete sich darin, dass Lysozym als "hartes" Protein [Wer02] gilt, und demnach keine größere Konformationsänderung bei der Adsorption auf SiO_2 zu erwarten ist [Rot95]. Da SiO_2 , ebenso wie Lysozym, hydrophil ist, sind ebenfalls keine größeren Energiebeiträge der hydrophoben Wechselwirkung zu erwarten [Rot95].

Im Falle der Lysozymadsorption auf Muskovit konnte im Vergleich zu der Adsorption auf SiO_2 sogar *beobachtet* werden, dass dort keine größeren Konformationsänderungen stattfinden [Blo94]. Zudem ist Muskovit mit seinem gegen Null gehenden Kontaktwinkel [Jos01] stark hydrophil. Die Adsorption von Lysozym auf Muskovit wird hier daher ebenfalls als "von den elektrostatischen- und den Van-der-Waals-Kräften bestimmt" angenommen.

Ein wie in Roth et al. [Roth93, Roth95] beschriebenes Gleichgewicht zwischen dem adsorbierten und dem gelösten Lysozym ist mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bei der Standard-Lysozymlösung vereinbar: Obwohl in der verwendeten AFM-Flüssigzelle im Falle der Standard-Lysozymlösung ca. dreißig mal mehr Lysozym vorhanden ist, als es für die Bildung einer kompletten Lysozym-Monoschicht auf dem Muskovit nötig wäre, konnte über einen Zeitraum von sechs Stunden nach der Inkubation ein nebeneinander von spontan adsorbierten Lysozym und freien Muskovit beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.1.1). In der Kim-Lysozymlösung dagegen konnte kein Gleichgewicht zwischen adsorbierten und dem gelösten Lysozym beobachtet werden. Obwohl in dieser Lösung ca. 50 mal weniger Lysozym vorhanden war, als in der Standard-Lysozymlösung, zeigte sich in den zugehörigen AFM-Topographien ähnlich viel spontan adsorbiertes Lysozym, wie in der Standard-Lysozymlösung (vgl. Abb. 2 C mit Abb. 15 A). Durch das wesentlich stärker ausgeprägte elektrostatische Potential (siehe Abb. 31) adsorbiert in der Kim-Lysozymlösung mit der Zeit vermutlich alles Lysozym, welches dem Reservoir der Lysozymlösung zur Verfügung steht [Kim02], oder, bei Erhöhung der Lysozym-Konzentration, bis sich eine vollständige Lysozym-Monoschicht auf dem Muskovit gebildet hat [Kim02] (siehe Abb. 2 G). Es sei jedoch kritisch angemerkt, dass die Stabilität des beobachteten Gleichgewichtes in der Standard-Lysozymlösung noch über einen längeren Zeitraum überprüft werden sollte, und dass

dazu eine Messmethode verwendet werden sollte, welche im Gegensatz zum AFM die Adsorption von Lysozym auch in der Standard-Lysozymlösung, und nicht nur in der Kim-Lysozymlösung, unbeeinflusst lässt (z. B. TIRF [Roth93]).

Das in Roth et al., 1993 [Rot93] diskutierte Modell der spontanen Lysozymadsorption vernachlässigt die Wechselwirkung der Proteine untereinander. In der Standard-Lysozymlösung ist so viel Lysozym vorhanden, dass sich bereits bei einer Verzehnfachung der Lysozym-Konzentration eine vollständige Lysozym-Monoschicht auf dem Muskovit bildet (siehe Abschnitt 3.1.5.1). Da sich das spontan adsorbierte Lysozym in der Standard-Lysozymlösung anhand von kleinen erhöhten Bereichen zeigt, welche von unterschiedlicher lateraler Ausdehnung sind (siehe Abschnitt 3.1.1), kann davon ausgegangen werden, dass das spontan adsorbierte Lysozym auf dem Muskovit Cluster bildet. Eine solche Clusterbildung von Lysozym auf Muskovit ist bereits in Kim et al., 2002 [Kim02] beobachtet worden. Es ist also insgesamt davon auszugehen, dass die Wechselwirkung der Proteine bei der Adsorption von der Standard-Lysozymlösung auf das Muskovit nicht vernachlässigt werden kann.

Die treibenden Kräfte der Clusterbildung werden in Kim et al., 2002 [Kim02] als die Van-der-Waals-Kraft und die hydrophobe Wechselwirkung diskutiert. Letztere soll deshalb einen Einfluss haben, da die in Kim et al., 2002 [Kim02] angenommene Konformationsänderungen bei der Adsorption hydrophobe Domänen auf der Oberfläche des Lysozyms freilegen könnten [Kim02].

Lysozym ist sowohl in der Kim- als auch in der Standard-Lysozymlösung mit $q \approx 11 e$ elektrisch geladen (siehe Tabelle 2). Die elektrostatischen Kräfte wirken der Clusterbildung demnach entgegen. Aufgrund der geringeren Debye-Länge in der Standard-Lysozymlösung ist anzunehmen, dass die Clusterbildung in der Standard-Lysozymlösung noch stärker ausgeprägt ist als in der in Kim et al., 2002 [Kim02] benutzten Lysozymlösung. In der Standard-Lysozymlösung können sich aufgrund der geringen elektrostatischen Abstoßung der Proteine bei erhöhter Proteinkonzentration tetragonale Lysozym-Kristalle ausbilden [Wie01]. Aus der Röntgenstrukturanalyse ist bekannt, dass die Proteine in diesen Kristallen Ionenbindungen und Wasserstoffbrückenbindungen eingehen [Nad96]. Auch wenn in der Standard-Lysozymlösung weder beim spontan adsorbierten Lysozym, noch bei den erzeugten Lysozym-Strukturen kristalline Strukturen beobachtet werden konnten (siehe Abschnitt 3.1.1), ist denkbar, dass Bindungen dieser Art sowohl zur Clusterbildung als auch zur Bildung der erzeugten Lysozym-Strukturen beitragen.

Es sei bzgl. der Wechselwirkung zwischen den Proteinen erwähnt, dass eine vollständig geschlossene Lysozym-Monoschicht in der Standard-Lysozymlösung eine Flächenladungsdichte von 150 mC/m^2 hat. Damit würde eine solche Lysozym-Monoschicht die höchste in dieser Arbeit angenommene negative Flächenladungsdichte von Muskovit mit -99 mC/m^2 (siehe Tabelle 2) mehr als neutralisieren. Da in der Standard-Lysozymlösung die elektrostatische Kraft im Vergleich zu der Van-der-Waals-Kraft als gering angesehen werden kann (siehe Abb. 32), ist dies hier aber von minderer Bedeutung. Zudem konnte in Blomberg et al., 1994 [Blo94] mit einem "Surface Force Apparatus" bei ähnlichen Bedingungen vermessen werden, dass ein solcher anzunehmender Vorzeichenwechsel der Oberflächenladungsdichte durch die Adsorption von Lysozym nicht stattfindet. Erklärt werden könnte dies z. B. dadurch, dass Lysozym nur unter Abgabe von am Muskovit gebundener Na^+ -Ionen adsorbiert [Blo94].

Abschließend kann gesagt werden, dass die in Abb. 31 gezeigten Potentialverläufe bei der Lysozym-Adsorption auf Muskovit nur eine erste Näherung der Wirklichkeit des komplizierten Prozesses der Proteinadsorption [Gray04] wiedergeben können. Als Näherung sind sie jedoch hilfreich, da sie viele beobachtete Phänomene, wie das Adsorpti-

onsverhalten in Abhängigkeit von Ionenstärke und Proteinkonzentration erklären können.

4.1.5 Erzeugung von Lysozym-Monoschichten im Kontakt-Modus

Um die Erzeugung von Lysozym-Monoschichten auf Muskovit im Kontakt-Modus (siehe Abschnitte 3.1.1 und 3.1.2) zu erklären, werden im Folgenden verschiedene Modelle vorgestellt, bei denen das Lysozym zunächst spontan an die AFM-Spitze adsorbiert, und dann beim Gleiten der AFM-Spitze über das Muskovit auf das Muskovit übertragen wird (siehe Abb. 34). Es werden aber auch alternative Modelle diskutiert (siehe z. B. Abb. 35).

Über die Oberflächenladungsdichte σ von Si_3N_4 (dem Material der AFM-Spitze) im Kontakt mit Flüssigkeiten konnten in der Literatur keine Daten gefunden werden. Dafür konnte die Hamaker-Konstante zwischen Si_3N_4 und Lysozym mit Wasser als Medium bestimmt werden. Sie ergibt sich aus Gleichung 11 mit den selben Werten der Elektrizitätskonstanten und Brechungsindizes für Lysozym und Wasser, wie sie bereits in Abschnitt 4.1.3 verwendet wurden. Dielektrizitätskonstante und Brechungsindex für Si_3N_4 wurden mit $\epsilon = 7,4$ [Ber97] und $n = 1,99$ [Ber97] angenommen. Es ergab sich mit $A = 3 \times 10^{-20}$ J eine mehr als doppelt so hohe Hamaker-Konstante, als die zwischen Muskovit und Lysozym (vergleiche Abschnitt 4.1.3). Aufgrund der geringen Debye-Länge von $l_d = 0,36$ nm können in der Standard-Lysozymlösung die zur Adsorption beitragenden elektrostatischen Kräfte bei einer angenommenen Oberflächenladungsdichte $\sigma_{\text{Si}_3\text{N}_4} = 99$ mC/m² gegenüber den Van-der-Waals-Kräften vernachlässigt werden (vgl. dazu in Abb. 31 D die grüne mit der roten Kurve). Da die elektrostatischen Kräfte mit der Verringerung von $\sigma_{\text{Si}_3\text{N}_4}$ weiter abnehmen (siehe Gleichung 5), könnten diese für $\sigma_{\text{Si}_3\text{N}_4} \leq 99$ mC/m² ebenfalls als vernachlässigbar angenommen werden. Sofern die Oberflächenladungsdichte von Si_3N_4 in der Standard-Lysozymlösung in diesem Bereich liegt, kann aufgrund Gleichung 10 und Gleichung 13 vermutet werden, dass die Lysozym-Konzentration auf der AFM-Spitze größer ist als auf dem Muskovit.

Die in Abb. 13 und Abb. 14 gezeigten Lysozym-Monoschichten sind durch den Scanvorgang der AFM-Spitze entstanden. Sie haben sich auf dem Muskovit um mehrere hundert Nanometer, oder entsprechend der Länge von ca. hundert Lysozym-Molekülen, von der eigentlichen Kontaktfläche von Muskovit und AFM-Nadel ausgedehnt. So ist davon auszugehen, dass auf dem Muskovit adsorbierte Lysozym-Moleküle durch den Scanvorgang der AFM-Spitze verschoben werden können, und diese wiederum benachbarte Lysozym-Moleküle verschieben. Insgesamt können so Lysozym-Moleküle verschoben werden, die mehr als hundert Lysozym-Moleküle von jenen Lysozym-Molekülen entfernt liegen, welche direkt durch Kontakt mit der AFM-Nadel verschoben werden. Es wird hier angenommen, dass bei diesen Vorgang Lücken in der Lysozym-Monoschicht entstehen. Da sich diese Lücken in keinem der AFM-Topographiebilder zeigten, müssen diese Lücken kleiner sein, als sie mit den benutzten AFM-Spitzen hätten detektiert werden können. Es wird vermutet, dass diese Lücken eine laterale Ausdehnung in der Größenordnung der Proteine haben.

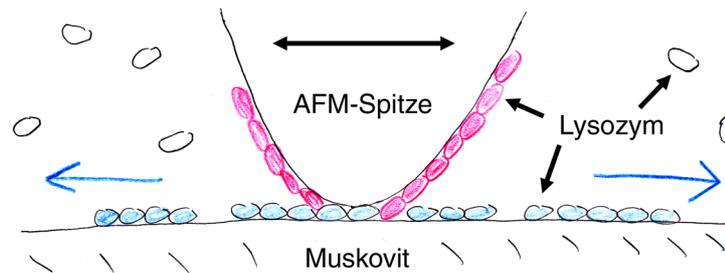


Abb. 34 Bei dem hier gezeigten Modell der Lysozym-Monoschicht-Erzeugung wird an der AFM-Spitze adsorbiertes Lysozym (rot) in Zwischenräume molekularer Größe einer auf dem Muskovit erzeugten Lysozym-Monoschicht (blau) eingefügt. Diese Zwischenräume werden durch die lateralen Kräfte erzeugt, welche die AFM-Spitze auf die auf dem Muskovit adsorbierte Lysozym-Monoschicht ausübt. Durch wiederholte Bewegung der AFM-Spitze nach (hier) links und rechts, breitet sich die Lysozym-Monoschicht von ihrer Mitte her in alle Richtungen aus. Dies ist durch die blauen Pfeile angedeutet. Dadurch, dass Lysozym aus der Lösung (weiß) in die durch die Lysozym-Übertragung entstehenden Zwischenräume der Lysozym-Monoschicht auf der AFM-Spitze adsorbiert, reißt der Mechanismus nicht ab.

Gleitet die AFM-Spitze über eine solche Lücke, so könnte Lysozym, welches auf der AFM-Spitze adsorbiert ist, diese Lücke füllen. Die Lysozym-Monoschicht würde sich so mit zunehmender Zeit von Innen nach Außen lateral vergrößern. Dieses Prinzip ist in Abb. 34 skizziert.

Alle Phänomene, welche in Bezug auf die Erzeugung von Lysozym-Monoschichten gemessen wurden, sind mit dem in Abb. 34 skizzierten Prinzip vereinbar. So ist beobachtet worden, dass die in Abb. 13 und Abb. 14 A gezeigten Lysozym-Monoschichten sich von Innen nach Außen vergrößern. Ebenfalls ist vereinbar, dass die Monoschichten bei einer solchen loading force erzeugt werden, bei der die AFM-Spitze die Lysozym-Monoschichten noch nicht durchstößt (siehe Abschnitt 3.1.2).

Folgende Mechanismen der Lysozym-Übertragung von der AFM-Spitze in die Lücken der auf dem Muskovit adsorbierten Lysozym-Monoschicht sind vorstellbar:

Lysozym-Übertragungsmechanismus 1: Die Bindung adsorbierter Lysozym-Moleküle wird aufgrund der höheren van-der Waals Kraft auf der AFM-Spitze als stärker angenommen, als auf dem Muskovit. Aufgrund der starken Krümmung am äußeren Ende der AFM-Spitze, verursacht durch einen Spitzenradius in der Größenordnung der Proteine, könnte dort die Bindung der Proteine zur AFM-Spitze als auch der Proteine untereinander geringer sein, als auf dem ebenen Muskovit. So könnte es für die Proteine energetisch günstig sein, in die Lücken der Monoschicht auf dem Muskovit zu wechseln.

Lysozym-Übertragungsmechanismus 2: Die laterale Kraft, die nötig ist um Lysozym-Moleküle, welche am äußersten Ende der AFM-Spitze adsorbiert sind, zu verschieben, könnte geringer sein als die laterale Kraft, welche durch den Scannvorgang der AFM-Spitze auf diese Moleküle ausgeübt wird. Daher könnte es sein, dass das äußerste Ende der AFM-Spitze frei von an der AFM-Spitze adsorbierten Lysozym ist. Genau so ist es bereits in Abb. 34 dargestellt. Die Lysozym-Moleküle, welche sich auf der AFM-Spitze am Rand der Lysozym-freien Stelle befinden, haben nun weniger benachbarte Lysozym-Moleküle als Bindungspartner, als sie bekommen könnten, wenn sie sich in die Lücken der Monoschicht auf dem Muskovit einfügen würden. So könnte es für diese Proteine energetisch günstig sein, in die Lücken der Monoschicht auf dem Muskovit zu wechseln.

Es gibt Hinweise, dass sich besonders solche AFM-Spitzen für die Erzeugung von Lysozym-Monoschichten eignen, welche einen großen Radius besitzen (siehe Tabelle 1). Im Falle des 2. Lysozym-Übertragungsmechanismus könnte dies wie folgt interpretiert

werden: Ein größerer Spitzenradius würde zu einem größeren Lysozym-freien Gebiet am äußersten Ende der AFM-Spitze führen. Je größer dieses Gebiet ist, umso mehr Proteine befinden sich am Rand dieses Gebietes. Je mehr Proteine sich an diesem Rand befinden, desto mehr Proteine könnten pro Zeiteinheit von diesem Rand in die Lücken der auf dem Muskovit adsorbierten Monoschicht übertragen werden. Ebenfalls ist denkbar, dass durch einen größeren Spitzenradius größere laterale Kräfte auf die auf dem Muskovit adsorbierte Lysozym-Monoschicht übertragen werden und damit pro Zeiteinheit mehr Lücken entstehen, die durch beide bisher genannten Übertragungs-Mechanismen mit Lysozym gefüllt werden können. Im Falle des 1. Lysozym-Übertragungsmechanismus könnte man wie folgt erklären, warum experimentelle Indizien erhalten werden konnten, bei denen sich ein größerer Spitzenradius für die Lithographie als Vorteil zeigt: Es ist denkbar, dass sich für eine Übertragung des Lysozyms eine starke Krümmung des äußersten Endes der AFM-Spitze zwar positiv auswirkt (siehe Lysozym-Übertragungsmechanismus 1), dass sich eine zu starke Krümmung, aufgrund eines weiteren Effektes aber auch negativ auswirken kann: Für den Fall, dass die Lysozym-Moleküle bevorzugt mit einer bestimmten Seite auf der AFM-Spitze adsorbieren, beeinflusst der Spitzenradius die Orientierung, mit welcher die Lysozym-Moleküle von der AFM-Spitze mit der auf dem Muskovit adsorbierten Monoschicht in Kontakt treten. Es ist denkbar, dass eine solche Orientierung dieser Lysozym-Moleküle von Vorteil für die Erzeugung der Monoschichten ist, bei der die Moleküle mit ihrer langen Seite mit der Monoschicht in Kontakt treten. Dann wären diese Moleküle genau so orientiert, wie sie auf dem Muskovit adsorbieren. Sollte das Lysozym auf Si_3N_4 ebenfalls mit seiner langen Seite adsorbieren, dann wären gerade solche AFM-Spitzen im Vorteil, die einen Radius von über 10 nm aufweisen. Genau so ist es dem Hinweis aus Tabelle 1 zu entnehmen.

Zusätzlich ist denkbar, dass durch den Scanvorgang solche auf der AFM-Spitze adsorbierten Proteine in Richtung des äußersten Endes der AFM-Spitze nachgezogen werden, welche an Proteine angrenzen, die gerade von der AFM-Spitze auf das Muskovit übertragen werden. Diese Proteine wiederum könnten weitere an sie angrenzende Proteine in die selbe Richtung nachziehen. So müsste das Lysozym, welches von der AFM-Spitze auf das Muskovit übertragen wird, nicht zuvor direkt am äußersten Ende der AFM-Spitze aus der Lösung an die AFM-Spitze spontan adsorbieren. Es könnte auch weiter oben an der Spitze adsorbieren und während der Lysozym-Monoschicht-erzeugung kontinuierlich an der AFM-Spitze herunterfließen. Im letzteren Fall wäre es für die Lithographie von Vorteil, wenn sich auf der AFM-Spitze spontan eine zusammenhängende Lysozym-Monoschicht bildet. Dies ist denkbar, da angenommen werden kann, dass die Lysozym-Konzentration auf der AFM-Spitze deutlich höher ist, als auf dem Muskovit (siehe oben). Der Vorteil für die Lithographie einer zusammenhängenden Lysozym-Monoschicht auf der AFM-Spitze könnte der Grund sein, aus dem die Erzeugung von Lysozym-Monoschichten erst bei der Überschreitung einer bestimmten Lysozym-Konzentration in der Lösung möglich wird (siehe Abschnitt 3.1.5.1). Zudem wäre auch hiermit erklärbar, warum sich manche, individuelle AFM-Spitzen nicht zur Erzeugung von Lysozym-Monoschichten eignen (siehe Abschnitt 3.1.9): Ein kontinuierlicher Proteinfluss entlang der AFM-Spitze in Richtung des Muskovits erfordert eine Spitzengeometrie, die einen solchen Fluss zulässt. Eine solche Geometrie muss nicht bei allen AFM-Spitzen vorhanden sein.

Das in Abb. 34 gezeigte Modell erfordert eine bereits vorhandene Lysozym-Monoschicht auf dem Muskovit, zu der Lysozym hinzugefügt werden kann. Als Keim für diese Monoschicht kommen spontan adsorbierte Lysozym-Moleküle oder Lysozym-Cluster auf dem Muskovit in Frage.

Bei einer höheren loading force von $F_l = 9$ nN können auf dem Muskovit adsorbierte Cluster zunächst noch von der AFM-Spitze verschoben werden (Abb. 11 A und B). Dabei ordnen sich die Cluster beim Scannen einer Fläche zu länglichen Domänen an, die quer zur "Fast Scan-Axis" verlaufen (Abb. 11 A-C). Letzteres könnte wie folgt erklärt werden: Adsorbierte Lysozym-Cluster könnten in Richtung der "Fast Scan-Axis" genau soweit verschoben werden, bis die laterale Kraft, welche die AFM-Spitze zum Verschieben dieser Cluster auf die Cluster ausüben müsste größer wird, als die Kraft, welche die AFM-Spitze durch den Scannvorgang tatsächlich auf die Cluster ausübt. Dies könnte dann der Fall sein, wenn sich die Cluster zu einer genügend großen, zusammenhängenden Lysozym-Monoschicht verbinden. Zunächst könnten sich durch diesen Prozess solche Cluster binden, welche entlang einer Linie in Richtung der "Fast Scan-Axis" lokalisiert sind. Ist ihr Halt auf der Muskovit-Oberfläche nicht groß genug, so werden die zusammenhängenden Cluster so weit entlang der "Fast Scan-Axis" verschoben, bis sie auf Cluster treffen, welche sich quer zur der Linie befinden, auf welcher sie lokalisiert sind. Verbinden sich diese Cluster, und ist die dadurch entstehende, zusammenhängende Lysozym-Monoschicht groß genug, so dass diese Monoschicht nicht mehr von dem Scannvorgang der AFM-Spitze verschoben werden kann, so könnten sich längliche Domänen bilden, die quer zur "Fast Scan-Axis" orientiert sind. Durch den in Abb. 34 skizzierten Prozess könnten diese so entstandenen Domänen an ihren Rändern wachsen. Ein solcher Wachstumsprozess ist mit dem in Abb. 11 C-D beobachteten Wachstum vereinbar.

Auch bei geringer loading force ($F_l \leq 0,1$ nN) können im Kontakt-Modus kleine Lysozym-Cluster aufgrund der unkontrollierten lateralen Kräfte verschoben werden. Sonst wäre das nahezu zeitgleiche Erscheinen von fünf Lysozym-Clustern in Abb. 12 B beim wiederholten Scannen einer Linie auf dem Muskovit nicht zu erklären. Es wird vermutet, dass sich hier entweder spontan *ein* Lysozym-Cluster gebildet hat, oder dass sich ein Lysozym-Cluster von der AFM-Spitze auf das Muskovit übertragen hat. Dieser Cluster könnte dann, evtl. durch den in Abb. 34 skizzierten Prozess, wachsen. Zusätzlich wird vermutet, dass sich durch die lateralen Kräfte, welche die AFM-Spitze auf das Muskovit ausübt, Teile vom Lysozym-Cluster gelöst haben, von der AFM-Spitze verschoben wurden, an einer anderen Stelle auf dem Muskovit adsorbierten und dort als Keim einer neuen Lysozym-Monoschicht dienten. Unterstützt wird diese These dadurch, dass in Abb. 12 B auch die Abtragung von einigen Lysozym-Monoschichten beobachtet werden konnte. Letzteres macht sich in Abb. 12 B anhand der vereinzelt vorkommenden Verengungen der hellen Linien in Richtung der Zeitachse bemerkbar.

Das in Abb. 11 und Abb. 12 gezeigte Wachstum von Lysozym-Monoschichten ist mit dem in Abb. 34 skizzierten Prinzip vereinbar. Jedoch überfährt die AFM-Spitze, im Gegensatz zu der Erzeugung der in Abb. 13 und Abb. 14 gezeigten Lysozym-Monoschichten, bei der Erzeugung dieser Strukturen wiederholt den Rand der Lysozym-Monoschichten. Dadurch kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei der Erzeugung dieser Strukturen ein zusätzlicher Wachstumsmechanismus wirkt: Bei diesen könnte Lysozym von der AFM-Spitze beim Überfahren der Ränder der Monoschichten direkt an diese Ränder abgegeben werden. Diese Abgabe ist mit den beiden in diesem Abschnitt vorgeschlagenen Lysozym-Übertragungsmechanismen vereinbar. Weiter ist vorstellbar, dass das nötige Lysozym für diesen zusätzlichen Wachstumsmechanismus nicht von der AFM-Spitze kommt, sondern Lysozym, welches auf dem Muskovit spontan adsorbiert ist, den Rändern der Monoschichten durch einen Schiebeprozess hinzufügt. Ein Prinzip dieser Art ist in Abb. 35 skizziert.

Bei dem in Abb. 34 gezeigten Modell wird Lysozym von der AFM-Spitze auf Muskovit übertragen. Der in Abb. 35 gezeigte Mechanismus kommt ohne eine solche Übertragung

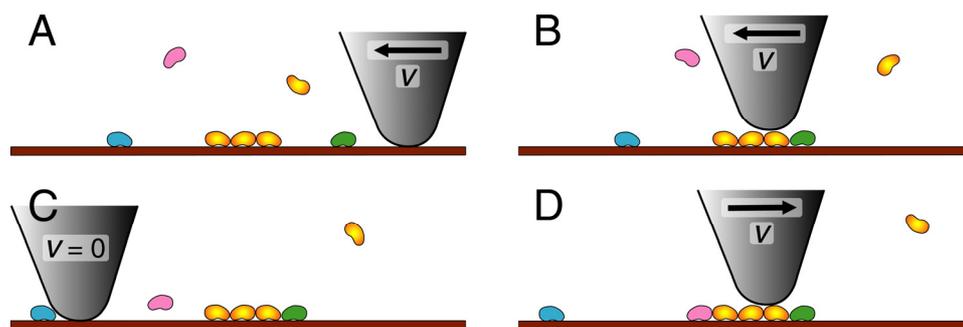


Abb. 35 Bei dem hier gezeigten Modell der Lysozym-Monoschicht-Erzeugung wird spontan auf dem Muskovit adsorbiertes Lysozym durch den Scanvorgang der AFM-Spitze an den Rand einer bestehenden Lysozym-Monoschicht geschoben. Zur besseren Übersicht wurden einige individuelle Lysozym-Moleküle farblich markiert. **A** Die AFM-Spitze fährt unter Kontakt zur Muskovit-Oberfläche nach links. Dabei schiebt sie ein einzelnes, spontan adsorbiertes Lysozym-Molekül (grün) bis an den Rand einer Lysozym-Monoschicht (gelb) (**B**). Das (grüne) Lysozym-Molekül bindet an die Monoschicht. Die loading force ist so eingestellt, dass die AFM Spitze über die schwer verschiebbare Lysozym-Monoschicht hinweg gleitet. Auf dem Weg zum Umkehrpunkt verschiebt die AFM-Spitze ein weiteres, spontan adsorbiertes Lysozym-Molekül (blau) (**C**). Auf der dadurch auf dem Muskovit frei gewordenen Stelle ist das Gleichgewicht von adsorbierten und gelösten Lysozym gestört. Ein Lysozym-Molekül aus der Lösung (pink) adsorbiert dort und wird auf dem Rückweg der AFM-Spitze von der selben an den Rand der Lysozym-Monoschicht geschoben (**D**).

aus, ist aber nur als zusätzlicher zum in Abb. 34 gezeigten Mechanismus denkbar, da er das beobachtete Wachstum der Lysozym-Monoschichten aus Ihrer Mitte heraus nicht erklärt (siehe Abb. 14). Als ersetzende Alternative zum in Abb. 34 gezeigten Mechanismus wäre dagegen folgendes Modell denkbar: Auf der Lysozym-Monoschicht könnte eine zweite Lage Lysozym adsorbieren. Das sich darin befindliche Lysozym könnte durch die AFM-Spitze lateral auf der darunter liegenden Lysozym-Monoschicht verschoben und eine Lücke der Monoschicht eingefügt werden. Die Lücken selbst könnten, wie bereits oben erwähnt, durch den Scanprozess der AFM-Spitze erzeugt werden.

Da sich bei keiner der hier ausgeführten Messungen Hinweise für die Bildung einer zweiten Lysozym-Lage finden ließen, müsste dieses Lysozym so leicht verschiebbar sein, dass es sich mit dem AFM im Kontakt-Modus auch bei der hier oft minimal gewählten loading force von $F_l \leq 0,1$ nN nicht detektieren lassen würde. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen im Tapping-Modus gaben ebenfalls keine Hinweise auf die Existenz einer zweiten Lysozym-Lage. Deshalb wird in dieser Arbeit nicht von der Existenz einer zweiten Lysozym-Lage ausgegangen, welche bei der Erzeugung der Lysozym-Monoschichten eine Rolle spielen könnte. Es sei jedoch kritisch angemerkt, dass Blomberg et al., 1994 [Blo94] mit einem "Surface Force Apparatus" Hinweise für die Adsorption einer zweiten Lysozym-Lage auf Muskovit gefunden werden konnten. Dort wurden mit $\text{pH} = 5,6$ und $c_s = 1$ mM NaCl allerdings nicht vergleichbare Lösungsparameter benutzt. Auch in Kim et al., 2002 [Kim02] konnten Hinweise für die Adsorption von Lysozym-Molekülen in zweiter Lage gewonnen werden. Es wird dort berichtet, dass es sich dabei nur um die Adsorption von vereinzelt Lysozym-Molekülen handelt und sich keinesfalls eine komplette zweite Schicht bildet. Zudem traten diese Hinweise grundsätzlich erst dann auf, nachdem sich bereits eine geschlossene Lysozym-Monoschicht auf Muskovit gebildet hat [Kim02]. Letzteres war in der Standard-Lysozymlösung zu keinem hier beobachteten Zeitpunkt der Fall.

Bei allen hier vorgestellten Prinzipien zur Erzeugung von Lysozym-Monoschichten ist, im Gegensatz zur DPN (siehe Abb. 3 D) die Bewegung der AFM-Spitze Voraussetzung. Dies ist mit den hier gemachten Beobachtungen vereinbar (siehe Abschnitt 3.1.4).

Neben adsorbierten Lysozym als Keim für die Erzeugung der Lysozym-Monoschichten erfordern die in Abb. 34 und Abb. 35 gezeigten Modelle eine ausreichend von spontan adsorbierten Lysozym freie Muskovit-Oberfläche. Dies ist mit den Beobachtungen dieser Arbeit im Einklang. So konnte auf einer bereits vorhandenen Lysozym-Monoschicht keine weitere Lysozym-Schicht erzeugt werden (siehe Abschnitte 3.1.5.1 und 3.1.10).

Nicht mit dem Prinzipien aus Abb. 34 und Abb. 35 vereinbar ist die Erzeugung von Lysozym-Monoschichten bei einer solchen loading force, bei der die AFM-Spitze die Lysozym-Monoschicht durchdringt. Eine solche Erzeugung ist in Abb. 14 B und Abb. 15 B zu sehen und wird im folgenden Abschnitt, neben der Erzeugung der 3D-Lysozym-Aggregate, diskutiert.

4.1.6 Erzeugung von 3D-Lysozym-Aggregaten

3D-Lysozym-Aggregate können im Kontakt-Modus (siehe Abb. 14 B), im Kraft-Distanz-Modus (siehe Abschnitt 3.1.5) und im Tapping-Modus (siehe Abschnitt 3.1.8) erzeugt werden. In allen drei Fällen ist zu ihrer Erzeugung die Überschreitung einer gewissen loading force nötig. Dieser Schwellenwert konnte in einem Fall im Kraft-Distanz-Modus zu $F_l = 16$ nN bestimmt werden (siehe Abschnitt 3.1.5.3). Im Kontakt Modus konnten in zwei Fällen bei $F_l = 1$ nN (bzw. $F_l = 4,5$ nN) keine 3D-Lysozym-Aggregate erzeugt werden. Bei der Erhöhung der loading force auf $F_l = 20$ nN (bzw. $F_l = 80$ nN), bei sonst gleichen Bedingungen, konnten dagegen 3D-Lysozym-Aggregate erzeugt werden (siehe Abschnitt 3.1.2).

Der Ort, bei dem 3D-Lysozym-Aggregate entstehen, konnte im Falle der Erzeugung im Kontakt-Modus bei den Umkehrpunkten der von der AFM-Spitze auf dem Muskovit wiederholt abgefahrenen Linie identifiziert werden (siehe Abschnitt 3.1.2). Bei der Erzeugung im Kraft-Distanz-Modus fährt die AFM-Spitze ebenfalls eine Linie auf dem Muskovit ab. Dies geschieht jedoch unter Variation der loading force (siehe "Gleitstrecke" in Abschnitt 2.1.6). An einem der beiden Umkehrpunkte wird die eingestellte, hohe loading-force erreicht. An dem anderen Umkehrpunkt ist die loading-force geringer, je nach Voreinstellung geht diese sogar gegen Null. Nur an solchen Umkehrpunkten, an denen der oben genannte Schwellenwert der loading force überschritten wird, entstehen im Kraft-Distanz-Modus die 3D-Lysozym-Aggregate (siehe Abb. 15).

Wenn auf der Muskovit-Oberfläche keine geschlossene Lysozym-Monoschicht vorhanden war, so konnte die Erzeugung eines 3D-Lysozym-Aggregates nur unter paralleler Erzeugung einer das 3D-Lysozym-Aggregat umgebenden Lysozym-Monoschicht beobachtet werden (siehe z. B. Abb. 14 B und Abb. 15). Gelegentlich konnte innerhalb dieser Lysozym-Monoschicht eine linienförmige Lücke beobachtet werden, welche sich auf der von der AFM-Nadel wiederholt abgefahrenen Linie befand (siehe Abb. 15 B und D).

Im Folgenden wird ein Modell für die Erzeugung der 3D-Lysomaggregate vorgeschlagen, welches mit allen beobachteten Ergebnissen vereinbar ist:

Das äußere Ende individueller AFM-Spitzen kann sehr unterschiedlich geformt sein (siehe Abb. 21). Es gibt daher eine spitzenspezifische loading force, ab der eine auf Muskovit adsorbierte Lysozym-Monoschicht durchstoßen werden kann. Ist dieser Schwellenwert überschritten, und fährt die AFM-Spitze durch eine auf dem Muskovit

adsorbierte Lysozym-Monoschicht, so schiebt die AFM-Spitze das Lysozym der Monoschicht zu einem 3D-Lysozym-Aggregat zusammen. Dies ist durch den im Vergleich zu Abb. 34 tieferen Angriffspunkt möglich, mit dem die AFM-Spitze mechanischen Einfluss auf die Lysozym-Moleküle der Monoschicht ausübt. Das 3D-Lysozym-Aggregat entsteht daher nur an jenen Umkehrpunkten der von der AFM-Spitze wiederholt abgefahrenen Linie, bei denen die loading force groß genug ist, um die Lysozym-Monoschicht durchstoßen zu können. Auf der von der AFM-Spitze abgefahrenen Linie ist nach der Erzeugung des 3D-Lysozym-Aggregates kein Lysozym mehr vorhanden. Sie ist daher in den AFM-Topographiebildern als linienförmige Lücke erkennbar, sofern durch den bildgebenden Scanprozess kein neues Lysozym von der AFM-Spitze an die Lücke abgegeben worden ist (siehe Abb. 15).

Um die von der AFM-Spitze wiederholt abgefahrte Linie herum bildet sich eine Lysozym-Monoschicht. Diese wird ebenfalls durch den Scanvorgang der AFM-Spitze erzeugt (siehe Abschnitte 3.1.2 und 3.1.5). Bzgl. der Erzeugung der Lysozym-Monoschichten im Kontakt- und im Kraft-Distanz-Modus, wird ein ähnlicher Prozess vorgeschlagen, wie er in Abschnitt 4.1.5 beschrieben ist: Die AFM-Spitze könnte beim Durchfahren der Lysozym-Monoschicht Lysozym, welches auf der AFM-Spitze adsorbiert ist, an die Lysozym-Monoschicht auf dem Muskovit abgeben. Diese Abgabe könnte durch einen der beiden in Abschnitt 4.1.5 vorgeschlagenen Lysozym-Übertragungsmechanismen erfolgen. Im Unterschied zu diesen Mechanismen durchstößt die AFM-Spitze dabei allerdings die Lysozym-Monoschicht. Die AFM-Spitze müsste das Lysozym demnach an den Rand der durch den Scanprozess erzeugten, linienförmigen Lücke abgeben. Dadurch würde sich die Lücke verengen. Beim erneuten Durchfahren der AFM-Spitze durch die Lücke könnte das an die Lysozym-Monoschicht übertragene Lysozym auf dem Muskovit verbleiben. Im weiteren Verlauf würde die AFM-Spitze die Lücke durch den Scanprozess auf ihre ursprüngliche Größe erweitern und dadurch die durch das übertragene Lysozym vergrößerte Lysozym-Monoschicht, ausgehend von der linienförmigen Lücke, in alle Richtungen verschieben. Ein anderer Teil des übertragenen Lysozyms könnte sich beim Scanvorgang durch den im Vergleich zu Abb. 34 tieferen Angriffspunkt der AFM-Spitze von der Monoschicht lösen und durch die AFM-Spitze zu einem 3D-Lysozym-Aggregat aufschieben. Die Erzeugung von Lysozym-Monoschichten im Tapping-Modus wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

4.1.7 Erzeugung von Lysozym-Muster im Tapping-Modus

Im Tapping-Modus können ebenfalls Lysozym-Monoschichten (siehe Abb. 18) und 3D-Lysozym-Aggregate (siehe Abb. 20) auf Muskovit erzeugt werden. Zudem können spontan adsorbierte Lysozym-Monoschichten in ihrer Höhe verändert werden (siehe Abb. 19).

Die Lysozym-Monoschichten, welche in der Standard-Lysozymlösung im Tapping-Modus auf einer Fläche **A** erzeugt werden, sind umso dichter, je länger sich die AFM-Spitze auf **A** pro Flächeninhalt von **A** aufgehalten hat (siehe Abb. 18 A+B). Eine solche Limitierung des Lysozym-Übertrages pro Zeiteinheit von der AFM-Spitze auf Muskovit ist bereits bei der Erzeugung von Lysozym-Monoschichten im Kontakt-Modus beobachtet worden (siehe Abb. 13 B). Ist auf **A** bereits eine vollständig geschlossene Lysozym-Monoschicht entstanden, so breitet sich die Lysozym-Monoschicht, bei weiterem Aufenthalt der AFM-Spitze auf **A**, über **A** hinaus auf dem Muskovit aus (siehe Abb. 18 A+B). Das Einfügen von Lysozym in die Mitte einer vorhandenen Lysozym-Monoschicht, bei dem sich die Monoschicht von Innen nach Außen ausbreitet, konnte

bereits bei der Erzeugung von Monoschichten im Kontakt-Modus beobachtet werden (siehe Abb. 14). Lysozym-3D-Aggregate ließen sich im Tapping-Modus nur bei der Wahl einer hohen Dämpfung einer relativ großen freien Amplitude erzeugen (siehe Abschnitt 3.1.8). Da anzunehmen ist, dass eine solche Wahl mit einer hohen Wechselwirkungskraft zwischen AFM-Spitze und Muskovit korreliert, kann dies als eine Äquivalenz zum bereits diskutierten Schwellenwert in der loading force angesehen werden, der im Kontakt-Modus überschritten werden muss, um dort 3D-Lysozym-Aggregate zu erzeugen. Weiter sei erwähnt, dass sich, ähnlich wie bei der Monoschicht-Erzeugung im Kontakt-Modus, in der Kim-Lysozymlösung keine Monoschicht-Erzeugung im Tapping-Modus beobachten ließ [Kim02].

Es sind aber auch Unterschiede im Vergleich zu der Erzeugung von Lysozym-Monoschichten im Kontakt-Modus beobachtet worden: So sind im Tapping-Modus (Kontakt-Modus) erzeugte Lysozym-Monoschichten ca. 3,7 nm (2,7 nm) hoch (siehe Abb. 18 C und Abb. 11). Deshalb wird hier behauptet, dass die Lysozym-Moleküle innerhalb einer im Tapping-Modus erzeugten Lysozym-Monoschicht vorzugsweise mit ihrer kurzen Seite auf dem Muskovit adsorbieren und nicht mit ihrer langen Seite, wie es im Kontakt-Modus der Fall ist. Führt man die AFM-Spitze im Tapping-Modus über eine Fläche **B** einer auf Muskovit spontan adsorbierten Lysozym-Monoschicht, so kann man eine Höhenänderung von **B** von (0,4 - 0,8) nm gegenüber der Umgebung beobachten (siehe Abb. 19). Daraus lässt sich schließen, dass sich bei **B** Lysozym-Moleküle, welche zuvor mit ihrer langen Seite adsorbiert waren, umordnen und mit ihrer kurzen Seite adsorbieren. Dabei kann bei **B** auch weiteres Lysozym der Lysozym-Monoschicht hinzugefügt worden sein. Im Kontakt-Modus konnte keine Höhenänderung einer Lysozym-Monoschicht durch das Überfahren der Selben mit der AFM-Spitze beobachtet werden. Als weiteren Unterschied zum Kontakt-Modus ist zu nennen, dass keine AFM-Spitze gefunden werden konnte, mit der sich im Tapping-Modus keine Lysozym-Monoschichten bilden ließen. Auch solche AFM-Spitzen, mit welchen sich im Kontakt-Modus keine Lysozym-Monoschichten bilden ließen, waren fähig, Lysozym-Monoschichten im Tapping-Modus zu erzeugen (siehe Abschnitt 3.1.9).

Es wird vermutet, dass der zugrunde liegende Mechanismus zur Erzeugung von Lysozym-Muster im Tapping-Modus den Mechanismen ähnlich ist, welche bereits für den Kontakt-Modus und den Kraft-Distanz-Modus in den Abschnitten 4.1.5 und 4.1.6 diskutiert worden sind.

In einer Lysozymlösung mit einer Übersättigung von $\beta = 4$ wurden mehr als fünfzig 3D-Lysozym-Aggregate unabhängig voneinander erzeugt, von denen einige über 50 nm hoch waren und einen lateralen Durchmesser von über 300 nm besaßen (siehe Abschnitt 3.1.8). In Übereinstimmung mit Beobachtungen aus Schaper et al., 1997 [Schap97] konnten auf dem Muskovit nur solche spontan adsorbierten Lysozym-Aggregate beobachtet werden, die kleiner waren, als die erzeugten Lysozym-Aggregate (siehe Abschnitt 3.1.8). Es wird davon ausgegangen, dass sich Keime von Proteinkristallen aus nicht-kristallinen Proteinclustern ausbilden können, wenn diese Proteincluster einen kritischen Radius überschreiten [Gar03, McP99]. Dieser kritische Radius wird bei Lysozym in Lösung mit einer Größe von 15-75 Molekülen angegeben [Pet98]. Bildet sich der Keim auf einer festen Oberfläche (z. B. Muskovit) aus, so kann die Größe des kritischen Radius, je nach Beschaffenheit der Oberfläche, abweichen [Nan00]. Für Lysozym auf Muskovit konnten dazu keine Angaben in der Literatur gefunden werden. Die erzeugten Lysozym-Aggregate übersteigen weit die Menge von 75 Molekülen. Es konnte beobachtet werden, dass sich in der benutzten Lysozymlösung Proteinkristalle ausbilden (siehe Abschnitt 3.1.8 und [Wie01]). Dennoch konnte nicht beobachtet werden, dass sich ein solcher Proteinkristall aus einem erzeugten 3D-Lysozym-Aggregat ein Lysozym-Kristall ausbildete (siehe Abschnitt 3.1.8).

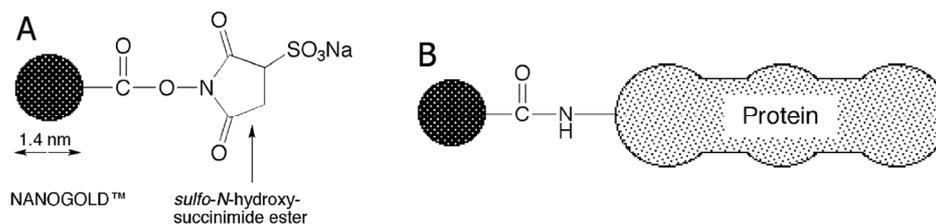


Abb. 36 A: Chemische Struktur von "NHS-Nanogold[®]". Es besteht aus einem 1,4 nm großen Gold-Partikel und einer den Partikel umgebenden Liganden-Hülle, welche einen sulfo-N-hydroxy-succinimide Ester an seiner Oberfläche besitzt. Dieser kann spezifisch an primäre Amide mit H₂N binden. Proteine, welche ein solches Amid besitzen, verbinden sich mit dem NHS-Nanogold[®] zu einem Konjugat (**B**). Aus der Produktinformationsbroschüre von NHS-Nanogold[®] [Nan06].

Die erzeugten 3D-Lysozym-Aggregate unterscheiden sich in ihrer Entstehungsgeschichte stark von den spontan ausgebildeten Lysozym-Clustern (vgl. [Gar03, McP99]). Es wird daher vermutet, dass sich deshalb keine Lysozym-Kristalle aus den 3D-Lysozym-Aggregaten ausbilden, weil der Erzeugungsprozess der 3D-Aggregate Bindungen zwischen den Proteinen bewirken könnte, welche die nötige Unordnung der Moleküle von einem 3D-Aggregat zu einem kristallinen Keim nicht erlauben. Ebenfalls ist denkbar, dass die Proteine durch die Kräfte, welche beim Prozess der 3D-Aggregation wirken, denaturiert werden und sich nicht mehr zur Kristallisation eignen. So ist als Beispiel die bei der Erzeugung von 3D-Lysozym-Aggregaten nötige loading force von $F_l > 16$ nN (siehe Abschnitt 4.1.6) in einem Bereich, in dem Proteine denaturiert werden könnten [Zla00].

4.1.8 Anwendbarkeit der Erzeugungsmethode für weitere Substanzen

In Wiechmann et al., 2006 [Wie06] konnte gezeigt werden, dass mit der hier vorgestellten Lithographie-Methode auch Muster aus Nanogold[®] und Lysozym-Nanogold[®] Konjugat auf Muskovit erzeugt werden können.

Nanogold[®] [Nan06] ist ein Kolloid aus uniformen Gold-Partikeln, welche jeweils einen Durchmesser von 1.4 nm haben. Nanogold[®]-Partikel sind in der Verbindung mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen kommerziell zu erwerben. Je nach Wahl der funktionellen Gruppe, können sie sich mit einer Vielzahl biologischer Makromoleküle zu einem Konjugat verbinden. In Abb. 36 A ist ein Nanogold[®]-Partikel mit der funktionellen Gruppe "sulfo-N-Hydroxy-Succinimide" dargestellt. Diese Partikel werden *NHS-Nanogold[®]* genannt [Nan06]. Das NHS-Nanogold[®] kann sich z. B. mit einem Protein zu einem Konjugat verbinden (siehe Abb. 37 B). Durch die Bildung solcher Konjugate werden die Makromoleküle mit den Gold-Nanopartikeln markiert und können dadurch mit dem Elektronenmikroskop detektiert werden [Hai91]. Dies stellt die Hauptanwendung von Nanogold[®] dar.

In Abb. 37 A+B sind als Beispiel linienförmige Muster aus Nanogold[®] bzw. Lysozym-Nanogold[®] Konjugat auf Muskovit gezeigt (Abbildungen aus Wiechmann et al., 2006 [Wie06]). Diese Strukturen wurden, ähnlich den linienförmigen Lysozym-Mustern aus Abb. 12, in wässriger, elektrolytischer Lösung durch die AFM-Spitze im Kontakt-Modus mit Linescan-Variation erzeugt. In Hinblick auf eine mögliche Anwendung in der Bioelektronik [Wil02, Dav05], wurde in Wiechmann et al., 2006 [Wie06] zusätzlich

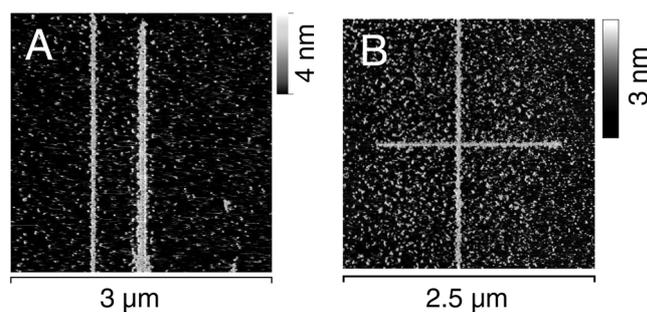


Abb. 37 AFM-Topographiebilder, linienförmiger Muster aus NHS-Nanogold[®] (A) bzw. Lysozym-Nanogold[®] Konjugat (B) auf Muskovit. C: AFM-Deflektionsbild (siehe Abschnitt 2.1.3) eines mit der AFM-Spitze erzeugten, linienförmigen Musters aus Nanogold[®] auf Muskovit zwischen zwei makroskopischen Gold-Kontakten von ca. 100 nm Höhe. Im Bereich des linienförmigen Musters wurde das Deflektionsbild durch das Topographiebild als Inset ersetzt. Auf dieses Inset bezieht sich die rechts vom Bild angegebene Farbskala. Dadurch können die Objekte "Gold-Kontakt" und "Nanogold[®]-Linie", welche sehr unterschiedliche Höhen besitzen, in einem einzigen Bild dargestellt werden. Alle hier gezeigten Muster wurden, ähnlich der linienförmigen Lysozym-Mustern aus Abb. 12, in wässriger, elektrolytischer Lösung durch die AFM-Spitze im Kontakt-Modus mit Linescan-Variation erzeugt. Aus Wiechmann et al., 2006 [Wie06].

versucht, eine Nanogold[®]-Struktur zwischen zwei makroskopischen Gold-Kontakten herzustellen (siehe Abb. 37 C). Die Leitfähigkeit dieser Struktur wurde nicht untersucht.

Ähnlich, wie bei der Erzeugung der Lysozym-Muster, konnte in Wiechmann et al., 2006 [Wie06] beobachtet werden, dass die Wahl einer geeigneten Ionenstärke in Kombination mit einer geeigneten NHS-Nanogold[®]-Konzentration die Erzeugung der Muster bestimmt. So wird berichtet, dass die Erhöhung der Ionenstärke die spontane Adsorption von NHS-Nanogold[®] auf dem Muskovit verringert, wodurch die Muster-Erzeugung erst möglich wird.

In Wiechmann et al., 2006 [Wie06] wird vermutet, dass der Prozess der Muster-Erzeugung aus NHS-Nanogold[®] und Lysozym-Nanogold[®] dem in Leisten et al., 2006 [Lei06] (und in dieser Dissertation) beschriebenen Prozess der Muster-Erzeugung von Lysozym auf Muskovit ähnelt. So wird auch dort vermutet, dass die Moleküle zunächst an der AFM-Spitze adsorbieren, und dann, durch den Scanprozess der AFM-Spitze, auf das Muskovit übertragen werden.

Die Ergebnisse aus Wiechmann et al., 2006 [Wie06] zeigen, dass die in der vorliegenden Dissertation präsentierte Methode, Muster aus Lysozym-Molekülen auf Muskovit zu erzeugen, auch auf andere Moleküle ausgeweitet werden kann.

4.1.9 Ausblick

Die hier vorgestellte Lithographie-Methode kann, wie die DPN, Moleküle bei *Punktdichte* und *Lagegenauigkeit* im nm-Bereich *direkt* zu einer Oberfläche *hinzufügen* (siehe Abschnitt 1.2). Im Gegensatz zu der DPN hat die hier vorgestellte Methode Nachteile, aber auch einige Vorteile, welche sich für zukünftige Anwendungen als nützlich herausstellen könnten:

Der größte Nachteil gegenüber der DPN besteht in der sich parallel ereignenden, örtlich nicht gezielten, spontanen Adsorption der Proteine. Bei der DPN findet der Proteintransport innerhalb eines sich unter Raumluft zwischen AFM-Spitze und Substrat ausbildenden Wasserminiskus statt (siehe Abb. 3). Dadurch adsorbieren die Moleküle nur inner-

halb eines begrenzten Bereiches auf dem Substrat. Es lassen sich Punktmuster erstellen, die aus Punkten mit unterschiedlichen Molekül-Zusammensetzungen bestehen [Dem02]. Dies ist mit der hier vorgestellten Methode nicht möglich. Um hier beim Schreiben von einer Molekülart auf eine andere zu wechseln, müsste ein Austausch der umgebenden Proteinlösung stattfinden. Dadurch wären Vermischungen zwischen den Molekülarten unvermeidbar.

Auch bei der Herstellung von Molekül-Mustern mit nur einer Molekülart hat die hier vorgestellte Methode Nachteile gegenüber der DPN: Aufgrund der konkurrierenden, spontanen Adsorption können die Protein-Muster, im Gegensatz zur DPN, nur auf relativ unsauberen und damit undefinierten Oberflächen erzeugt werden. Es ist jedoch vorstellbar, dass durch die Wahl einer geeigneten ein- oder mehrwertigen Ionensorte, einer geeigneten Ionenstärke, einem geeigneten pH-Wert und einer entsprechend angepassten Proteinkonzentration, die spontane Adsorption weiter unterdrückt werden kann, ohne die Schreibfähigkeit der AFM-Spitze einzuschränken. So konnte z. B. in Czajkowsky et al., 2003 [Cza03] gezeigt werden, dass die Adsorption von Lysozym auf Muskovit durch die Wahl unterschiedlicher Ionensorten, aber identischer Ionenstärken, unterschiedlich gehemmt werden kann.

Ein Vorteil gegenüber der DPN liegt in dem großen Reservoir der zu adsorbierenden Moleküle. So wird die Spitze aus der umgebenden Lösung mit Molekülen versorgt (siehe Abschnitt 4.1.5) und muss nicht, wie bei der DPN regelmäßig in eine "Tinte" getaucht werden. Weiterhin kann als Vorteil angesehen werden, dass die Proteine keinen Kontakt zur Grenzfläche von Luft und Wasser haben, sondern in ihrem natürlichen Aggregatzustand, der flüssigen Phase, verweilen können. Insofern wird angenommen, dass die hier vorgestellte Methode schonender mit den Proteinen umgehen könnte, als die DPN. Im Gegensatz zur DPN existieren aber noch keine Beweise für die Funktionalität der Proteine innerhalb der erzeugten Muster (vgl. [Gin04]).

Die Tatsache, dass die hier vorgestellte Methode in Flüssigkeit arbeitet, kann für spezielle Anwendungen weitere Vorteile haben. So könnte die Erzeugung der 3D-Protein-Aggregate dazu dienen, örtlich gezielt Keime für die Proteinkristallisation (siehe Abschnitt 1.3) zu schaffen. Laut Hammadi et al., 2007 [Ham07] konnte diese Keimbildungsphase, bis auf eine Ausnahme [Yau00], noch nicht auf molekularer Ebene beobachtet werden. In der einen Ausnahme, in welcher dies doch gelang [Yau00], konnten mit einem AFM kristalline Cluster in molekularer Auflösung beobachtet werden, welche aus einer übersättigten Proteinlösung auf einem großen Proteinkristall adsorbieren. Da bei diesen Ereignissen allerdings nicht vorhergesagt werden kann, wann und wo sie stattfinden, waren die Beobachtungen aus Yau et al., 2000 [Yau00] vom Zufall bestimmt und gaben nur Momentaufnahmen aus dem Prozess der Keimbildung preis. In Hammadi et al., 2007 [Ham07] wurde kürzlich gezeigt, dass in einer Lysozymlösung, welche sich in der metastabilen Phase befindet, die Keimung von Proteinkristallen in der Nähe einer spitzenförmigen Elektrode durch Anlegen eines elektrischen Feldes initiiert werden kann. Durch diese lokale und zeitliche Eingrenzung des Keimungsereignisses, so wird es in Hammadi et al., 2007 [Ham07] diskutiert, könnten zukünftige Untersuchungen des Keimungsprozesses auf molekularer Ebene erleichtert werden.

In der vorliegenden Dissertation konnten 3D-Lysozym-Aggregate auf Muskovit in einer übersättigten Lysozymlösung örtlich und zeitlich gezielt mittels einer AFM-Spitze erzeugt werden. Es konnte dabei jedoch nicht beobachtet werden, dass sich aus diesen 3D-Lysozym-Aggregaten Kristallisationskeime ausbildeten (siehe Abschnitte 3.1.8 und 4.1.7). Aber vielleicht finden sich in Zukunft andere Bedingungen oder andere Proteine, mit denen letzteres beobachtet werden kann. Würden sich solche Bedingungen finden

lassen, könnte die direkt neben dem erzeugten Aggregat befindliche AFM-Spitze dafür benutzt werden, einen sich gerade bildenden Kristallkeim in molekularer Auflösung untersuchen zu können.

Ebenfalls ist denkbar, dass mit der hier gezeigten Erzeugung von Protein-Monoschichten in Flüssigkeit und mit der dabei beobachteten Verschiebung dieser Monoschichten auf Muskovit (siehe Abb. 13, Abb. 14 und Abschnitt 4.1.5) neue Erkenntnisse über die physikalischen Eigenschaften von Proteinfilmen an der fest-flüssig Grenze erhalten werden können. Im Gegensatz zu Proteinfilmen an der Wasser-Luft Grenzschicht [Yam06], konnten an der fest-flüssig Grenze für physikalische Eigenschaften bzgl. lateraler Kräfte keine Daten in der Literatur gefunden werden. Wenn man die in Abb. 13 und Abb. 14 gezeigten Messungen im "lateral force mode" [DI97] eines AFMs wiederholen würde, so könnte man bei entsprechend guter Kalibrierung [Rei07, Liu96] qualitative Aussagen über die lateralen Kräfte erhalten, die nötig sind um Proteinfilme auf festen Oberflächen verschieben zu können. Da sich die erzeugten Proteinfilme mit zunehmender Generierungszeit ausdehnen, ist dies auch in Abhängigkeit von der lateralen Ausdehnung der Protein-Monoschicht möglich. Es ließen sich so evtl. Rückschlüsse auf die laterale Mobilität der adsorbierten Proteincluster und auf die Mobilität einzelner adsorbierter Proteine ziehen. Diese Mobilität hat einen wichtigen Einfluss auf die Proteinadsorption [Rav00] und ist schon oft Gegenstand experimenteller [Kim02, Cha97, Til90] und theoretischer [Rav00, Tar90] Untersuchungen gewesen. Dabei konnten bisher in keinem Fall die wirkenden, lateralen Kräfte ermittelt werden. Gerade in Bezug auf das für die Proteinadsorption oft als Modellprotein benutzte Lysozym könnte so ein nützlicher "Mosaikstein" für das Fernziel des vollständigen Verständnisses der Proteinadsorption erhalten werden.

Um den Prozess der hier vorgestellten Lithographie-Methode besser verstehen zu können, wären Versuche von Bedeutung, welche die Menge des adsorbierten Lysozyms auf Muskovit und auf Si_3N_4 (Material der AFM-Spitze) in Abhängigkeit von der Zeit in solchen Lösungsbedingungen untersuchen, in denen die hier vorgestellte Lithographie-Methode wirksam ist (z. B. Standard-Lysozymlösung). Dabei müssten Messmethoden verwendet werden, welche den Prozess der Adsorption, im Gegensatz zur Rasterkraftmikroskopie, nicht beeinflussen (z. B. TIRF [Rot95]). So ließe sich herausfinden, inwiefern das in Abschnitt 4.1.4 vermutete Gleichgewicht zwischen adsorbierten und gelösten Lysozym stabil ist. Würde man bei diesen Versuchen die Ionenstärke, die Ionensorte oder den pH-Wert variieren, könnten diese Ergebnisse zur Findung weiterer geeigneter Bedingungen der hier vorgestellten Lithographie-Methode dienen, bei denen evtl. die spontane Adsorption der Proteine noch weiter unterdrückt werden könnte. Ähnliche Versuche mit anderen Proteinen als Lysozym könnten dazu beitragen, Bedingungen zu finden, bei denen die gefundene Lithographie-Methode auf weitere Proteine ausgeweitet werden könnte.

Bei der Untersuchung der Proteinadsorption ist es von Vorteil solche Messmethoden zu verwenden, welche die Proteinadsorption nicht beeinflussen. Mit der Beschreibung eines Effektes, Proteine durch den Scanprozess einer AFM-Spitze additiv auf eine feste Oberfläche in Flüssigkeit hinzufügen zu können, ist ein Phänomen beschrieben worden, welches bei zukünftigen Untersuchungen der Proteinadsorption mit dem AFM herangezogen werden kann.

Ebene	Kristall	Abbildung	Kristallform (nach [Zet98])	Millersche Indizes
1	1	Abb. 22 + Abb. 23	Kristallform 2	(001)
2	1	Abb. 24	Kristallform 2	(011)
3	1	Abb. 25	Kristallform 2	(014) / (0-1-4)
4	2	Abb. 29 + Abb. 30 A	-	-
5	3	Abb. 30 B	-	-

Tabelle 3 Übersicht über die in der vorliegenden Dissertation präsentierten Ebenen von Omp32-Kristallen, welche in molekularer Auflösung abgebildet werden konnten. Die fünf **Ebenen** und die drei **Kristalle**, auf denen sie gefunden worden sind, wurden durchnummeriert. Zudem sind die **Abbildungen** genannt, in denen die Ebenen zu sehen sind. In der Diskussion konnte Kristall 1 der in Zeth et al., 1998 [Zet98] definierten **Kristallform 2** zugeordnet werden. Den Ebenen von Kristall 1 konnten in der Diskussion **Millerschen Indizes** zugeordnet werden.

4.2 3D-Kristalle von Omp32 in Flüssigkeit

4.2.1 Zuordnung der Kristallebenen

In der vorliegenden Dissertation werden die Topographien von fünf verschiedenen Ebenen auf drei verschiedenen dreidimensionalen Omp32-Kristallen in molekularer Auflösung präsentiert. Den Ebenen und den Kristallen werden in Tabelle 3 Nummern zugeordnet, welche im Folgenden benutzt werden.

In diesem Abschnitt werden die zu den Ebenen 1-5 gefundenen Gittervektoren diskutiert. Anhand dieser konnte Kristall 1 der von Zeth et al., 1998 [Zet98] definierten Kristallform 2 (siehe Abb. 4 und Text zu Abschnitt 2.6) zugeordnet werden. Für die Ebenen 1-3, welche sich auf Kristall 1 befinden, konnten die sog. *Millerschen Indizes* [Ger95] gefunden werden. Mit Hilfe von Millerschen Indizes lassen sich ebene Kristalloberflächen in Bezug auf ein bekanntes Raumgitter mit bereits definierten Gitterachsen bestimmen. Die im Folgenden erwähnten Millerschen Indizes beziehen sich auf die in Abb. 4 gezeigten Kristallachsen x , y und z der Kristallform 2. Den Kristallen 2 und 3 konnten keine bekannten Kristallformen zugeordnet werden. Die Ergebnisse dieses Abschnittes sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Zusammenfassung von Ebenen: *Drei Omp32-Moleküle bilden ein stabiles Trimer (siehe Abb. 4 C und Text in Abschnitt 2.6). Jeweils ein Trimer kristallisiert zusammen mit einem unbestimmten Peptid, welches sich im Zentrum des Trimers anlagert [Zet00] (siehe auch Abb. 4 C). Ein Omp-32 Trimer ist mitsamt seines co-kristallisierten Peptids (siehe Abschnitt 2.6) bzgl. einer Rotation um 120° um seine z-Achse (siehe Abb. 4 A) weitgehend, aber nicht vollständig, symmetrisch. In keiner der hier präsentierten Topographien war die Auflösung ausreichend, um aus den sich dadurch ergebenden drei Möglichkeiten für die Orientierung des Trimers eine bestimmte Orientierung auswählen zu können. Zur Vereinfachung wurden daher die hier diskutierten Kristallebenen (011), (0-1-1), (014), und (0-1-4) stellvertretend für Ebenenscharen aus jeweils drei Kristallebenen ausgewählt, welche sich bis auf die Rotation der Trimere um 120° um die z-Achse nicht unterscheiden. Bei der gefundenen (001)-Ebene (siehe Abb. 22) war die Auflösung nicht ausreichend, um zu sehen, von welcher der beiden Seiten (Rotation um die x- oder*

y -Achse um 180°) sich das Trimer auf der Oberfläche zeigt (vgl. Abb. 4 C). Daher steht die Bezeichnung (001) stellvertretend für die Ebenenschar $\{(001); (00-1)\}$.

In Abb. 22 A+C sind AFM-Topographiebilder von Ebene 1 zu sehen. Oberflächengitter und Stufen zwischen aufeinander liegenden Proteinschichten sind dort deutlich zu erkennen. Die Höhe dieser Stufen konnte zu 4,5 nm ermittelt werden (Abb. 22 B). Die dem Oberflächengitter angepassten Gittervektoren haben eine Länge von $|\mathbf{a}| = 8,2$ nm und $|\mathbf{b}| = 9$ nm und bilden zueinander einen Winkel von $\gamma = 59^\circ$. Die gefundene Kristallebene lässt sich deuten, wenn man sie mit der in Zeth et al., 1998 [Zet98] gefundenen Kristallform 2 für Omp32 vergleicht. Die Größe der Einheitszelle dieser Kristallform ist durch die Vektoren der Einheitszelle bestimmt. Diese werden mit $|\mathbf{x}| = |\mathbf{y}| = 8,71$ nm, $\gamma(\mathbf{a}, \mathbf{b}) = 60^\circ$ und $|\mathbf{z}| = 13,53$ nm angegeben [Zeth00] und sind in Abb. 4 eingezeichnet. Die z -Achse durchquert dabei drei auf dieser Achse senkrecht liegende, identische aber lateral zueinander verschobene Proteinschichten mit einer Höhe von jeweils $|\mathbf{z}|/3 \approx 4.5$ nm [Zet00].

Vergleicht man die Gittervektoren von Ebene 1 mit denen, welche man auf der (001)-Ebene von Kristallform 2 ($\perp z$ -Achse, siehe Abb. 22 D) erwarten würde ($|\mathbf{a}| = |\mathbf{b}| = 8.71$ nm), so ergeben sich relative Abweichungen (Δ relative Abweichung = (Wert/erwarteter Wert)-1) von $\Delta|\mathbf{a}| = -6\%$, $\Delta|\mathbf{b}| = +3\%$ und $\Delta\gamma = -1,5\%$. Diese Abweichungen liegen weit unterhalb eines bereits bekannten Vergleiches von Röntgen- und AFM-Daten aus Qutub et al., 2004 [Qut04], bei dem relative Abweichungen von bis zu 38% beobachtet worden sind. Diese Abweichungen wurden in Qutub et al., 2004 [Qut04] auf eine Drift der Probenposition während des Scanvorgangs zurückgeführt, welche durch den auf der Probe gleitenden, die AFM-Flüssigkammer abdichtenden O-Ring (siehe Abschnitt 2.1.7) verursacht worden sein soll. Die größte Abweichung von Ebene 1 zu den Röntgen-Daten der (001)-Ebene von Kristallform 2 stellt die Länge von \mathbf{a} dar. Diese liegt in der AFM-Topographie entlang der Slow Scan-Axis. Eine Drift der Probenposition, die auch in dieser Arbeit als Fehlerquelle vermutet werden kann, könnte sich deshalb gerade auf $|\mathbf{a}|$ besonders stark auswirken.

Die Topographie von Ebene 2 (Abb. 24 A) zeigt rechtwinklig zueinander angeordnete horizontale und vertikale Linien. Der mittlere Abstand zwischen den vertikalen Linien beträgt 5,4 nm. Der Abstand zwischen den horizontalen Linien ist unregelmäßiger und konnte zu 4,5 nm gemittelt werden. Die (011)-Oberfläche von Kristallform 2 ist in Abb. 24 B skizziert. Sie wird im Folgenden mit Ebene 2 verglichen. In der Projektion auf die (011)-Ebene wiederholt sich die (im Bild) horizontale Lage der Trimere bei jeder zweiten (im Bild) vertikal verlaufenden Proteinschicht (siehe Abb. 24 B). Da die Trimere in dieser Orientierung jeweils zwei Monomere präsentieren, lassen sich für die Topographie dieser Ebene ungefähr senkrecht zueinander angeordnete Erhebungen in der Dimension eines Omp32-Moleküls erwarten (siehe Abb. 24 B). Diese Erwartung ähnelt der Topographie von Ebene 2 (siehe Abb. 24 A). Die beiden Teilbilder von Abb. 24 stellen die aus der Topographie erhaltenen Abstände (siehe Abb. 24 A) und die aus den Röntgendaten der Kristallform 2 [Zet00] zu erwartenden Abstände (siehe Abb. 24 B) der Erhebungen gegenüber. Ihre Unterschiede belaufen sich auf +3% (+5%) für die im Bild vertikal (horizontal) verlaufenden Linien. Die größere, in Abb. 24 A auffallende statistische Varianz der vertikalen Linienabstände, lässt eine geringere Stabilität der Trimere in dieser Richtung vermuten.

Rechts unten in Abb. 24 A sind zwei Kanten zu sehen, welche in einem Winkel von 97° eine um ca. 6,5 nm erhöhte Schicht einschließen. Winkel der Kanten und Höhe der Schicht stimmen hinreichend mit der in Abb. 24 B eingezeichneten Trimer-Monoschicht auf der (011)-Ebene überein. In Abb. 24 A kann man erkennen, dass der Höhenanstieg an den Kanten der Monoschicht nicht scharf ist, sondern sich über zwei bis drei Trimere

erstreckt. Dies lässt vermuten, dass die stufennahen Trimere weniger starr an das Kristallgitter gebunden sind als die übrigen Trimere der (011)-Ebene. Abschließend betrachtet, lässt sich Ebene 2 mit der (011)-Ebene von Kristallform 2 vereinbaren.

In Abb. 25 A ist die Topographie von Ebene 3 dargestellt. Aufgrund der zu geringen Auflösung konnte nur die Gitterkonstante in horizontaler Richtung ermittelt werden. Die gefundenen 11.0 nm Abstand zwischen den vertikal verlaufenden Vertiefungen sind mit den ebenfalls 11.0 nm betragenden Stufenabständen der aus den Röntgendaten von Zeth et al., 2000 modellierten Ebenen (014) (Abb. 25 B) und (0-1-4) (Abb. 25 C) vergleichbar. Beide genannten, modellierten Ebenen unterscheiden sich in der Orientierung der Trimere am Stufenrand. Zudem würden sich im Falle der (014)-Ebene die Trimere von ihrer extrazellulären Seite präsentieren (vgl. Abb. 4 C). Im Falle der (0-1-4)-Ebene dagegen würden sich die co-kristallisierten Peptide auf der Oberfläche zeigen. Aufgrund der zu großen gemessenen Unregelmäßigkeiten in der Topographie entlang der vertikalen Richtung, konnte nicht entschieden werden, ob sich Ebene 3 besser mit der (014)-Ebene oder mit der (0-1-4)-Ebene vergleichen lässt.

Da sich alle drei auf Kristall 1 gefundenen Ebenen gut mit modellierten Ebenen der in Zeth et al., 1998 [Zet98] gefundenen Kristallform 2 vereinbaren lassen, wird angenommen, dass Kristall 1 der Kristallform 2 zugeordnet werden kann.

In der Topographie von Ebene 4 zeigen sich periodische Erhebungen, welche ein Gitter mit senkrecht aufeinander stehenden Gittervektoren von $|\mathbf{a}| = 12,1$ nm und $|\mathbf{b}| = 13,1$ nm bilden (siehe Abb. 29 C). Im Zentrum der Erhebungen, welche diese Gittervektoren bestimmten, konnte jeweils eine weitere, weniger ausgeprägte Erhebung gefunden werden (siehe Abb. 30 A). Zudem konnten auf Ebene 4 Stufen mit einer mittleren Höhe von 8,3 nm gefunden werden. Es konnte keine Oberfläche aus den beiden bereits bekannten Kristallformen von Zeth et al., 1998 [Zet98] modelliert werden, welche mit Ebene 4 vereinbar ist. Ebene 4 ist auf Kristall 2 beobachtet worden. Es wird daher vermutet, dass Kristall 2 ein Omp32-Kristall einer bisher unbekanntem Kristallform ist.

In der Topographie von Ebene 5 zeigen sich periodische Erhebungen, welche ein Gitter mit senkrecht aufeinander stehenden Gittervektoren von $|\mathbf{a}| = 9,3$ nm und $|\mathbf{b}| = 8,5$ nm bilden (siehe Abb. 30 B). Zudem konnten auf Ebene 4 Stufen gefunden werden. Der Höhe der Stufen konnte ein Höhenbereich von ca. 6-9 nm zugeordnet werden. Auch für Ebene 5 konnte keine Oberfläche aus den beiden bereits bekannten Kristallformen von Zeth et al., 2000 [Zet00] modelliert werden, welche mit Ebene 5 vereinbar ist. Ebene 5 ist auf Kristall 3 beobachtet worden. Es wird daher vermutet, dass auch Kristall 3 ein Omp32-Kristall einer bisher unbekanntem Kristallform ist.

In Ebene 4 gibt es im Zentrum der Erhebungen, welche die Gittervektoren bestimmen, weitere Erhebungen. Nimmt man alle Erhebungen von Ebene 4 als gleichwertig an, so würden diese ein Gitter mit aufeinander senkrecht stehenden Gittervektoren von $|\mathbf{a}| = |\mathbf{b}| = 8,9$ nm aufspannen. Es ist denkbar, dass die Erhebungen von Ebene 5 ebenfalls unterschiedliche Höhen aufweisen, dies aber durch die mangelnde Auflösung, mit welcher diese Ebene aufgenommen worden ist, in der zugehörigen Topographie nicht erkennbar ist (siehe Abb. 30 B). Da die dort gefundenen Gittervektoren denen von Ebene 4 ähneln, wenn man alle Erhebungen von Ebene 4 als gleichwertig annimmt, ist es möglich, dass Ebene 4 und Ebene 5 die gleichen Ebenen der gleichen unbekanntem Kristallform zeigen.

4.2.2 Wachstum der Omp32-Kristalle

Auf Kristall 1, welcher der in Zeth et al., 1998 [Zet98] gefundenen Kristallform 2 zugeordnet werden konnte, sind sowohl auf seiner (001)-Ebene, als auch auf der (011)-Ebene Stufen von aufeinanderliegenden Kristallschichten beobachtet worden (siehe Abb. 22 B und Abb. 24 A+B). Die Existenz dieser Stufen lassen ein Kristallwachstum mittels des lateralen Stufenwachstums [McP99] auf diesen beiden Ebenen vermuten. Eine ähnliche Schlussfolgerung wurde bereits bei Kim et al. 2000 [Kim00] getroffen, einer Arbeit, in der ebenfalls Kristallstufen auf einem dreidimensionalen Membranprotein-Kristall (OmpC) beobachtet werden konnten, ohne dass das Kristallwachstum selbst beobachtet werden konnte.

Mit den in der vorliegenden Dissertation präsentierten Daten konnte das laterale Stufenwachstum auf einem dreidimensionalen Membranprotein-Kristall beobachtet werden. Ein Vergleich zweier nacheinander aufgenommener Topographien auf der (001)-Ebene der Kristallform 2 zeigt, dass eine oberste Kristallschicht an Fläche gewinnt und so die Kristallstufe, welche diese Fläche begrenzt, über die Kristalloberfläche wandert (siehe Abb. 23). Da sich der Kristall dabei in Protein- und Detergenz-freier Lösung befand (Omp32-Reservoirlösung, siehe Abschnitt 2.8), wird vermutet, dass der Scanprozess der AFM-Spitze das Wachstum gefördert hat. Proteine aus der Protein-angereicherten Phase, welche die Omp32-Kristalle auch innerhalb der Omp32-Reservoirlösung umgeben kann (siehe Abschnitt 3.2.2), könnten, zunächst noch lateral verschiebbar, auf der Kristalloberfläche adsorbiert sein. Diese könnten dann durch den Scannprozess der AFM-Spitze lateral an die Kristallstufe geschoben worden sein, wo sie sich durch zusätzliche Bindungsmöglichkeiten an der Stufe in das Kristallgitter einfügten.

Bei Ebene 3 (siehe Abb. 25 A), welche der (014)-Ebene (siehe Abb. 25 B) oder der (0-1-4)-Ebene (siehe Abb. 25 C) der Kristallform 2 zugeordnet werden konnte, grenzen die Stufen aufeinander liegende (001) bzw. (00-1)-Ebenen voneinander ab, deren Stufenwachstum 10 nm vor dem Erreichen der nächstfolgenden Stufe stoppte (siehe Abb. 25 B+C). So könnte z. B. die (014)-Ebene durch laterales Stufenwachstum zu einer (011)-Ebene (Abb. 24 B) weiterwachsen. Somit wäre die Existenz einer (014)-Ebene mit einem Mechanismus verbunden, der dieses Weiterwachsen verhindert. Denkbar ist, dass die Trimere an der Randlage einer jeden (001)-Ebene, aufgrund der asymmetrischen Bindungskräfte, in ihrer Position leicht gekippt oder verschoben sind. So könnten sie das Anlagern von Trimeren auf der Schicht über ihnen negativ beeinflussen. Die Weiterbildung einer (014)-Ebene zu einer (011)-Ebene wäre durch einen Keimbildungsprozess denkbar, der zunächst durch eine spontane Überschreitung einer Energiebarriere initiiert werden muss. Ebene 3 könnte aber genauso gut eine (0-1-4)-Ebene darstellen, welche sich aufgrund leicht verrückter Rand-Trimere nicht zu einer (0-1-1)-Ebene weiterbildet. Da eine solche (0-1-1)-Ebene, im Gegensatz zu einer (011)-Ebene (siehe Abb. 24 A), noch nicht entdeckt worden ist, ist es möglich, dass (0-1-4)-Ebenen grundsätzlich ihre Form beibehalten und sich nicht durch einen Keimbildungsprozess zu einer (0-1-1)-Ebene weiterbilden können, während sich (014)-Ebenen grundsätzlich zu einer (011)-Ebene weiterbilden. In diesem Fall würde Ebene 3 zwingend eine (0-1-4)-Ebene darstellen.

Auf der Oberfläche von Kristall 1 sind ineinander übergehende Kuppen beobachtet worden, welche einen mittleren Durchmesser von ca. 200 nm besitzen (siehe Abb. 28 F). Eine solche Oberflächenstruktur wäre mit einem Wachstum mittels 3D-Keimbildung (vgl. Abb. 6 D+E) oder einer von Schraubenversetzungen geprägten Oberfläche (vgl. Abb. 6 F) vereinbar. Auf den Kuppen konnte jedoch keine molekulare Auflösung erzielt werden, so dass keine der beiden Vermutungen ausgeschlossen werden kann.

Auf einem anderen, bzgl. der Kristallform unbestimmten Omp32-Kristall, konnten ineinander gewachsene Kristallgitter gefunden werden (siehe Abb. 28 B). Dies wurde in ähnlicher Weise bereits auf dreidimensionalen Kristallen anderer Membranproteine gefunden (siehe Abb. 7 B+H). Ineinander gewachsene Kristallgitter deuten auf ein Kristallwachstum hin, welches mittels einer Adsorption bereits gekeimter, dreidimensionaler Kristalle initiiert wird [McP99].

4.2.3 Ausblick

Das Wachstum von dreidimensionalen Proteinkristallen kann mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie (siehe Abschnitt 2.2) molekular und zeitlich aufgelöst untersucht werden (siehe Abschnitt 1.3). Im Falle von Kristallen aus den wasserlöslichen, globulären Proteinen, sind bereits Modellsysteme gefunden worden (z. B. Kristalle aus Lysozym und Ferritin), mit denen solche Untersuchungen erfolgreich durchgeführt werden konnten [McP03]. Im Falle der dreidimensionalen Kristalle aus den wichtigen, aber nur wenig erforschten Membranproteinen (siehe Abschnitt 1.3) konnte noch kein solches Modellsystem gefunden werden. Für ein solches Modellsystem müssten Membranprotein-Kristalle vorliegen, welche sich mit dem AFM unter Wachstumsbedingungen in molekularer Auflösung zerstörungsfrei untersuchen ließen.

Die in Zeth et al. [Zet98] gefundene Kristallform 2 eines Omp32-Kristalls konnte von Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie] mit dem AFM in molekularer Auflösung und in Flüssigkeit zerstörungsfrei untersucht werden (siehe Abschnitt 3.2.1). Der Kristall wuchs mittels einer Detergenz-basierten Methode in wässriger Lösung, und damit in der gleichen Phase, in welcher der Kristall mit dem AFM untersucht werden konnte. Damit wurde ein System gefunden, mit welchem das Wachstum von dreidimensionalen Membranprotein-Kristallen molekular und zeitlich aufgelöst untersucht werden könnte. In den drei Publikationen, bei welchen die Oberfläche von dreidimensionalen Kristallen von Membranproteinen mit dem AFM bisher untersucht wurden (siehe Abb. 7), konnten die dort benutzten Kristalle entweder nicht in molekularer Auflösung, oder nicht in der Phase untersucht werden, in welcher sie zuvor gewachsen waren (siehe Abschnitt 1.3).

Die genauen Kristallisationsparameter, bei denen die Kristallform 2 in der für die AFM-Untersuchung nötigen Weise gewachsen ist, gingen durch den plötzlichen und unerwarteten Tod von Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie] verloren. Zwei der Omp32-Kristalle, welche im Rahmen der vorliegenden Dissertation untersucht wurden, konnten ebenfalls in molekularer Auflösung und in wässriger Lösung untersucht werden (siehe Abb. 29 und Abb. 30). Sie wurden zuvor, wie auch die Kristallform 2, mittels der selben, Detergenz-basierten Methode kristallisiert, diesmal bei bekannten Kristallisationsparametern. Allerdings wurden diese Kristalle durch den Scanvorgang der AFM-Spitze so stark beschädigt, dass innerhalb von AFM-Bildfolgen dem jeweils folgenden Bild keine Moleküle oder Kristallstufen aus dem jeweils vorangegangenen Bild zugeordnet werden konnten (siehe Abschnitt 3.2.2). Unter solchen Bedingungen ist keine zeitlich aufgelöste Untersuchung des Wachstumsprozesses der Omp32-Kristalle möglich. Daher müsste in fortführenden Untersuchungen nach Kristallisationsparametern gesucht werden, bei denen die Kristallform 2 reproduzierbar wächst. Die in Zeth et al., 1998 [Zet98] gefundene Methode, die Kristallform 2 herzustellen, eignet sich nicht, da dort mit der sog. "Hanging-Drop"-Methode [McP99] gearbeitet wurde, bei der die Kristalle nicht auf einem festen Substrat adsorbieren. Dies ist aber für eine AFM-Untersuchung unabdingbar. Ein hier unternommener Versuch, die Kristallisationsmethode aus Zeth et al., 1998 [Zet98] auf die "Sitting-Drop"-Methode (siehe Abschnitt 2.8), bei welcher die Kristalle

auf dem festen Substrat adsorbieren können, zu übertragen, hatte keinen Erfolg (siehe Abschnitt 3.2.4).

Die beiden Omp32-Kristalle, welche im Rahmen der vorliegenden Dissertation in molekularer Auflösung untersucht werden konnten, wurden einer aus der Röntgenstrukturanalyse noch nicht bekannten Kristallform zugeordnet (siehe Abschnitt 4.2.1). In Abschnitt 3.2.4 werden Indizien erläutert, welche die zahlreichen, im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Omp32-Kristalle, auf denen keine molekulare Auflösung erreicht werden konnte, ebenfalls unbekanntem Kristallformen zuordnen. Viele Formen von Proteinkristallen entstehen nur in einem engen Parameterbereich [McP99]. Es wird daher vermutet, dass der Parameterbereich, welcher für das Wachstum der Kristallform 2 nötig ist, in den in dieser Arbeit präsentierten Daten nur ein einziges mal getroffen werden konnte (siehe Abschnitt 3.2.1). Es konnte aber ein Substrat (Gold, siehe Abschnitt 3.2.2) und eine Temperatur ($T \approx 8^\circ\text{C}$, siehe Abschnitt 3.2.2) gefunden werden, bei denen Omp32-Kristalle während ihres Wachstums für eine AFM-Messung ausreichend fest auf dem Substrat adsorbieren. Es wird vermutet, dass durch ein Screening unter der Variation der Proteinkonzentration, der Ammoniumsulfat-Konzentration und der Temperatur in einem Bereich um 8°C , die Parameter gefunden werden können, bei denen die Kristallform 2 wächst und ausreichend fest auf Gold als Substrat adsorbiert. Bei dem Screening müssten die genannten Parameter in kleineren Abständen variiert werden, als es in dieser Arbeit möglich war (siehe Abschnitte 3.2.2 bis 3.2.4). Zudem wird vorgeschlagen, die Auswertung der Kristalle mit der Röntgenstrukturanalyse durchzuführen, da nicht gesichert ist, ob sich mit einem AFM die Kristallform 2 allein an den Abbildungseigenschaften, welche sich auf dieser Kristallform mit dem AFM erzielen lassen, erkennen lässt, so wie es in Abschnitt 3.2.4 vermutet wurde. Evtl. sind für ein solches Screening Variationen weiterer, die Kristallisation beeinflussende Parameter nötig, wie z. B. die Menge der Flüssigkeit, in welcher die Kristalle wachsen oder die Menge der Reservoirelösung in der Kristallisationskammer (siehe Abschnitt 2.8). Eine Variation der Temperatur während des Wachstumsprozesses, mit abschließender Wachstumsphase um 8°C , damit die Kristalle auf dem Substrat adsorbieren können, ist ebenfalls eine denkbare Option. Da in der vorliegenden Dissertation keine Zeit war ein solches Screening durchzuführen, und die Röntgenstrukturanalyse als auswertende Methode nicht zur Verfügung stand, konnte das hier vorgeschlagene Screening nicht im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführt werden.

Würde man das Wachstum der Omp32-Kristalle mit dem AFM untersuchen wollen, so müsste man die Kristalle in übersättigter Proteinlösung untersuchen. Dabei könnte die in dieser Arbeit beobachtete, zweite wässrige Phase, welche sich in der Nähe der Kristalloberfläche bildet (siehe Abschnitt 3.2.2), dem bildgebenden Prozess des AFMs Probleme bereiten, wie es bereits beobachtet werden konnte (siehe Abschnitt 3.2.2). Bei Omp32-Kristallen, welche bei einer relativ geringen Proteinkonzentration gewachsen sind, erwies sich diese Phase für die Abbildungseigenschaften des AFMs als wenig störend (siehe Abschnitt 3.2.2). Es konnte so auf Proteinkristallen in molekularer Auflösung gemessen werden, ohne die zweite, wässrige Phase durch den in Abschnitt 2.8 aufgezeigten Spülprozess wegspülen zu müssen (siehe Abschnitt 3.2.2). Für eine AFM-Untersuchung von Omp32-Kristallen in übersättigter Proteinlösung müsste daher bei relativ geringen Proteinkonzentrationen gearbeitet werden. Sollte die Kristallform 2 nur bei hoher Proteinkonzentration entstehen, so könnte die dabei ebenfalls entstehende, zweite, wässrige Phase mit dem in Abschnitt 2.8 beschriebenen Spülprozess entfernt werden. Daraufhin könnte das Kristallwachstum bei geringer Proteinkonzentration fortgeführt und mit dem AFM untersucht werden. Eine geringe Proteinkonzentration hätte bei der AFM-Untersuchung den weiteren Vorteil, eine geringe Übersättigung zur Folge zu haben (siehe Gleichung 1). Eine geringe Übersättigung führt zu einem langsamen

Kristallwachstum. Ein langsames Kristallwachstum ist erwünscht, da die bildgebende AFM-Untersuchung eine relativ geringe Zeitauflösung besitzt, welche lediglich durch die in der Bildgebung eingeschränkte Linescan-Variation erhöht werden könnte (siehe Abschnitt 2.1.5).

Die hier benutzte Detergenz-basierte Kristallisationsmethode ist jene, mit welcher die meisten Membranproteine erfolgreich für die Röntgenstrukturanalyse kristallisiert werden konnten [Caf03]. Zur erfolgreichen Anwendung dieser Kristallisationsmethode ist der wichtigste Parameter die Wahl des richtigen Detergents [Ost97]. Das hier zur Kristallisation benutzte Detergenz " β -D-Octylglucosid" ist jenes Detergenz, mit dem die meisten Membranproteine erfolgreich für die Röntgenstrukturanalyse kristallisiert wurden [McP99]. Würde man die Omp32-Kristalle zu einem Modellsystem zur Untersuchung des Kristallisationsprozesses für Membranprotein-Kristalle ausbauen, so hätte man demnach ein Modellsystem, welches sich sowohl bei der Kristallisationsmethode als auch bei der Wahl des benutzten Detergents nach dem "Mainstream" richtet. Porine gelten als ungewöhnlich stabil gegenüber der Temperatur, dem pH-Wert und vieler weiterer Lösungsparameter [Rum03]. Auch für Omp32 konnte eine Temperaturstabilität bis zu 60 °C nachgewiesen werden [Ger92]. Diese Stabilität erleichtert die Handhabung von Omp32 und trägt zur Eignung von Omp32 als Modellprotein bei.

Ein Modellsystem, welches sich für die Untersuchung des Wachstumsprozesses von dreidimensionalen Kristallen von Membranproteinen mit Hilfe des AFMs in molekularer Auflösung eignen würde, könnte einen wichtigen Betrag zum Verständnis dieses Wachstumsprozesses beitragen. Man könnte das Wachstumsverhalten bzgl. der Wachstumsart (laterales Stufenwachstum / Normalwachstum / 2D- / 3D-Keimung), der Größe molekularer Wachstumsschritte und das Vorkommen verschiedenartiger Kristallfehler (siehe Abschnitt 1.3) auf den verschiedenen Oberflächen des Kristalls unter Variation von Parametern wie der Proteinkonzentration, der Präzipitantenkonzentration, und der Temperatur untersuchen. Zudem könnte man das Wachstumsverhalten in Abhängigkeit von zur Kristalloptimierung oft verwendeten Zusatzstoffen [Yeh07, Wie01ii] untersuchen. Ein besseres Verständnis des Kristallwachstums wiederum könnte bei der Suche nach neuen Kristallisationsmethoden, bei der Suche geeigneter Kristallisationsbedingungen und bei der Optimierung der Kristallisation von noch nicht durch die Röntgenstrukturanalyse entschlüsselten Membranproteinen hilfreich sein. Somit könnte ein solches Modellsystem zur Entschlüsselung der dreidimensionalen Struktur der Membranproteine beitragen.

5 Zusammenfassung

In Leisten, 2004 [Lei04] wurde eine Lithographie-Methode vorgestellt, mit welcher Muster von Proteinen in Flüssigkeit auf einer festen Oberfläche mit einem AFM erzeugt werden können. Dafür wurde eine AFM-Spitze im Kontakt-Modus des AFMs in einer wässrigen Lysozym-Lösung über Bereiche einer Muskovit-Oberfläche geführt. Es entstanden dabei Lysozym-Muster auf dem Muskovit in dem Kontaktbereich von AFM-Spitze und Muskovit (siehe Abb. 11 und Abb. 17). In der vorliegenden Dissertation wurde dieses Phänomen weiterführend untersucht. Dabei wurde abgesichert, dass es sich bei den erzeugten Mustern um Lysozym handelt (siehe Abschnitt 3.1.3). Es wurden mit Hilfe der Linescan-Variation des AFMs linienförmige Lysozym-Muster unter Variation der Erzeugungsdauer und der loading force erzeugt und dabei Länge, Breite, Höhe und Entstehungsgeschichte der erzeugten Muster untersucht (siehe Abb. 12, Abb. 13 und Abb. 14). Dabei wurde beobachtet, dass unterhalb eines Schwellenwertes der loading force Lysozym-Monoschichten auf Muskovit entstehen, während oberhalb dieses Schwellenwertes zusätzlich 3D-Lysozym-Aggregate auf dem Muskovit entstehen (siehe Abb. 14). Zusätzlich wurde beobachtet, dass sich die Lysozym-Monoschichten weit über den Kontaktbereich von AFM-Spitze und Muskovit auf dem Muskovit ausbreiten können (siehe Abb. 13). Es wurden Lysozym-Monoschichten im Tapping-Modus des AFMs erzeugt und untersucht (siehe Abb. 16), und es wurde der Einfluss individueller AFM-Spitzen auf das Lithographie-Verfahren untersucht (siehe Abschnitt 3.1.9). Dazu wurde die Topographie von vier AFM-Spitzen, welche zuvor auf ihre Lithographie-Eigenschaften untersucht worden sind, mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie ermittelt (siehe Abb. 21 und Tabelle 1). In Kim et al., 2002 [Kim02] wurde die spontane Adsorption von Lysozym aus einer wässrigen Lysozym-Lösung auf Muskovit mit einem AFM untersucht (siehe Abb. 2). Dabei konnten keine Lysozym-Muster auf Muskovit erzeugt werden. In Kim et al., 2002 [Kim02] wurde mit einer wässrigen Lysozym-Lösung gearbeitet, welche eine geringere Ionenstärke besaß, als die in dieser Arbeit verwendete Lysozym-Lösung. Die hier beobachtete Lithographie wurde unter Variation der Ionenstärke (siehe Gleichung 3) untersucht. Es wurde dabei gezeigt, dass eine Lysozym-Muster-Erzeugung, so wie sie in dieser Arbeit beschrieben ist, in der von Kim et al., 2002 [Kim02] benutzten Lysozym-Lösung nicht stattfindet (siehe Abschnitt 3.1.10).

Es wurde diskutiert, dass für die beobachtete Lysozym-Lithographie sowohl eine genügend hohe Lysozym-Konzentration in der wässrigen Lösung vorhanden sein muss, als auch das Muskovit ausreichend frei von spontan adsorbierten Lysozym sein muss. Eine höhere Lysozym-Konzentration verursacht aber eine höhere Dichte an spontan adsorbierten Lysozym auf der Muskovit-Oberfläche. Lysozym ist elektrisch positiv, Muskovit negativ geladen. Dadurch ergibt sich eine elektrische Anziehung zwischen Lysozym und Muskovit, welche zur Adsorption positiv beiträgt. Mit Erhöhung der Ionenstärke verringert sich die Debye-Länge, jene Strecke, bei der elektrische Felder in wässriger Lösung durch Umverteilung der Ionen auf $1/e$ abgeschwächt werden (siehe Gleichung 8). Es wird gezeigt, dass durch die Wahl einer geeignet hohen Ionenstärke, eine für die Lithographie genügend hohe Proteinkonzentration benutzt werden kann, ohne dass die Muskovit-Oberfläche durch spontan adsorbiertes Lysozym für die Lithographie zu stark bedeckt wird. Um dies zu diskutieren, wurde das elektrostatische Potential zwischen einem Lysozym-Molekül und Muskovit sowohl für eine in dieser Arbeit benutzten Lysozym-Lösung, in der eine Lithographie möglich ist, als auch bei einer in Kim et al., 2002 [Kim02] benutzten Lysozym-Lösung, in der eine Lithographie nicht möglich ist, abgeschätzt. Dabei stellte sich heraus, dass bei der in dieser Arbeit zur Lysozym-Muster-Erzeugung benutzten Lysozym-Lösung, die elektrostatischen Kräfte durch die hohe Io-

nenstärke so weit unterdrückt werden, dass die Van-der-Waals-Kräfte überwiegen. Da die Van-der-Waals-Kraft zwischen Muskovit und Lysozym geringer ist als die zwischen der AFM-Spitze und Lysozym, kann davon ausgegangen werden, dass in der in dieser Arbeit benutzten Lysozymlösung die Dichte von spontan adsorbierten Lysozym auf der AFM-Spitze höher ist, als auf dem Muskovit. Es wurde versucht, den der Lithographie zu Grunde liegenden Mechanismus zu erklären. Dafür wurde ein Modell vorgeschlagen, bei dem die Lysozym-Moleküle zunächst an die AFM-Spitze adsorbieren und dann durch den gleitenden Kontakt mit dem Muskovit auf das Muskovit übertragen werden.

Die hier präsentierte Lithographie wurde mit konventionellen Lithographie-Methoden, vor allem aber mit der in Piner et al., 1999 [Pin99] erstmals vorgestellten DPN (siehe Abb. 3) verglichen. Die vorliegende Lithographie steht der von der DPN erreichten Punktdichte und Lagegenauigkeit, welche sich im Nanometer-Bereich befindet, nicht nach, arbeitet aber in Flüssigkeit und nicht an Raumluft. Daraus ergibt sich der Nachteil gegenüber der DPN, dass die Lithographie mit der spontanen Adsorption konkurriert und dadurch die Sauberkeit der Umgebung der erzeugten Muster auf dem Substrat begrenzt ist. Zudem wird die Erzeugung von Proteinmustern aus mehreren Proteinsorten, wie es mit der DPN möglich ist, wahrscheinlich nur unter Inkaufnahme von Kreuz-Korrelationen zwischen den Proteinen möglich sein. Es ergeben sich aber auch Vorteile. So kann während des Lithographie-Prozesses aus einem beliebig großen Reservoir an Proteinen geschöpft werden, welche zudem in ihrem natürlichen Aggregatzustand, der flüssigen Phase, verweilen können. Während die DPN Muster aus einer Vielzahl von Molekülen, darunter auch Proteinen, erzeugen kann, wurde in dieser Arbeit bei der hier vorgestellten Lithographie nur die Erzeugung von Lysozym-Muster gezeigt. In Wiechmann et al., 2006 [Wie06] konnten mit Nanogold-Partikeln und Lysozym-Nanogold-Konjugat aber bereits die ersten weiteren Moleküle ermittelt werden, mit welchen die hier vorgestellte Lithographie betrieben werden kann. Die Lithographie wurde mitsamt des hier diskutierten Modells der Lysozym-Übertragung von der AFM-Spitze auf das Muskovit in Leisten et al., 2006 [Lei06] veröffentlicht. Die erzeugten Lysozym-Monoschichten wurden diskutiert, als Modell für die Untersuchung des Verhaltens von nicht kristallinen Proteinfilmen an der Flüssig-Fest-Grenzschicht dienen zu können. Mit der Erwähnung eines Effektes, Proteine durch den Scanprozess einer AFM-Spitze additiv auf eine feste Oberfläche in Flüssigkeit hinzuzufügen zu können, ist ein Phänomen beschrieben worden, welches bei zukünftigen Untersuchungen der Proteinadsorption mit dem AFM herangezogen werden kann. Die 3D-Lysozym-Aggregate wurden diskutiert, als künstliche Keime für die Proteinkristallisation dienen zu können.

Proteinkristalle sind für die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der Proteine (siehe Abb. 1) mittels Röntgenstrukturanalyse (siehe Abb. 5) unabdingbar. Proteinkristalle zu bekommen, welche groß, rein und fehlerfrei genug sind, um sie mit der Röntgenstrukturanalyse zu untersuchen, ist auf dem Weg der Proteinstrukturaufklärung der schwierigste Schritt. Nicht zuletzt deswegen ist das Wachstum der Proteinkristalle selbst Gegenstand der Forschung geworden. Als besonders hilfreich stellte sich dabei das AFM heraus, womit das Wachstum der Proteinkristalle molekular und zeitlich aufgelöst untersucht werden konnte (siehe Abb. 6). Im Vergleich zu den wasserlöslichen, globulären Proteinen, sind erst wenige dreidimensionale Strukturen von Membranproteinen bekannt. Dies begründet sich nicht etwa in einer geringeren biologischen Relevanz der Membranproteine, sondern in den beiden Problemen, die Membranproteine erstens in ausreichend großen Mengen zu bekommen, und zweitens, diese Proteine für die Röntgenstrukturanalyse zu kristallisieren. Ebenso selten, wie die Strukturdaten von Membranproteinen, so selten sind auch die Untersuchungen des Kristallwachstums dieser Proteine. Die drei wissenschaftlichen Arbeiten, bei denen die Oberflächen von Mem-

branprotein-Kristallen mit einem AFM bisher untersucht wurden (siehe Abb. 7), konnten nur Momentaufnahmen des Kristallwachstums zeigen. Keine dieser Publikationen zeigte ein System auf, welches das Potential hätte, das Wachstum der Membranprotein-Kristalle molekular und zeitlich aufgelöst untersuchen zu können, wie es zuvor bei Kristallen aus globulären Proteinen gelungen ist (siehe Abb. 6).

Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie] gelang es, auf einem dreidimensionalen Kristall des Membranproteins Omp32 drei verschiedene Kristallebenen in wässriger Lösung und in molekularer Auflösung mit Hilfe eines AFMs zu untersuchen (siehe Abb. 22 bis Abb. 25). Die exakten Parameter der vorrausgegangenen Kristallisation gingen durch den plötzlichen und unerwarteten Tod von Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie] verloren. Im Rahmen dieser Dissertation wurde versucht, die Kristallisation und die folgende AFM-Untersuchung an den Omp32-Kristallen mit bekannten Parametern zu wiederholen. Dabei gelang es ebenfalls, die Oberflächen von Omp32-Kristallen in Flüssigkeit und in molekularer Auflösung mit dem AFM zu untersuchen (siehe Abb. 29 und Abb. 30). Auf dem Weg dorthin konnten zwei Probleme gefunden werden, dessen beschriebene, erfolgreiche Behebung bei künftigen AFM-Messungen an Omp32-Kristallen wichtige Hilfen darstellen. So konnte eine Kristallisationstemperatur gefunden werden, bei welcher die Kristalle für eine AFM-Messung ausreichend fest auf dem benutzten Substrat absorbieren (siehe Abschnitt 3.2.2), und es konnte eine zweite, wässrige, die Kristalle umgebende Phase gefunden werden (siehe Abb. 27), welche die Abbildungseigenschaften des AFMs auf den Omp32-Kristallen negativ beeinflusst, und welche mit einem hier gefundenen Verfahren entfernt werden kann, ohne dass sich die Kristalle vom Substrat lösen. Der von Dipl. Phys. M. Wiechmann [Wie] mit dem AFM untersuchte Omp32-Kristall konnte der mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse in Zeth et al., 1998 [Zeth98] gefundenen Kristallform 2 zugeordnet werden. Die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Kristalle gehören einer noch nicht bekannten Kristallform an. Die gefundenen Kristallstufen auf den Omp32-Kristallen (Abb. 22, Abb. 28 und Abb. 29) deuten darauf hin, dass die Kristalle mittels des lateralen Stufenwachstums gewachsen sind. In einem Fall konnte das laterale Stufenwachstum, wenn auch wahrscheinlich durch die Bewegung der AFM-Spitze gefördert, beobachtet werden (siehe Abb. 23).

Alle untersuchten Omp32-Kristalle wurden mit einer Detergenz-basierten Kristallisationsmethode kristallisiert. Bei dieser wachsen die Kristalle direkt in einer wässrigen Phase und nicht etwa, wie z. B. bei *in cubo* gewachsenen Kristallen (siehe Abb. 7 D-H), innerhalb eines dreidimensionalen Lipid-Gitters. Damit wachsen die Kristalle genau in jener Phase, in welcher sie hier mit dem AFM untersucht worden sind und zeigen so ein System auf, an dem das Kristallwachstum von dreidimensionalen Membranprotein-Kristallen molekular und zeitaufgelöst untersuchen werden könnte. Würden sich die Omp32-Kristalle zu einem Modellsystem für das Wachstum von Membranprotein-Kristallen ausbauen lassen, hätte man zudem ein Modellsystem, welches sowohl in der Kristallisationsmethode, als auch bei der Wahl des benutzten Detergents dem Weg folgt, auf dem bis heute die meisten dreidimensionalen Strukturen von Membranproteinen entschlüsselt werden konnten. Da die in dieser Dissertation gefundenen Omp32-Kristalle bzgl. des Scanvorgangs des AFMs weniger stabil sind als die Omp32-Kristalle der Kristallform 2, und zudem eine hohe Stabilität der Kristalle zur Untersuchung des Kristallwachstums von Vorteil ist, wurden Versuche vorgeschlagen, die Kristallform 2 der AFM-Untersuchung reproduzierbar zugänglich zu machen. Die in dieser Dissertation präsentierten Daten der Omp32-Kristalle wurden erstmals in Leisten et al., 2006 [Lei06ii] in Form eines Tagungsposters der Öffentlichkeit vorgestellt. Ein Artikel für eine wissenschaftliche Fachzeitschrift [WieOm] wird gegenwärtig angefertigt.

Index

- 3D-Lysozym-Aggregat 36, 62
 A_f 20
AFM 17
AFM-Flüssigkammer 22
AFM-Spitze 17
Ammoniumsulfat-Konzentration 30
Äquivalenzradius 67
Atomic Force Microscope 17
 c_A 30
Cantilever 17
Cantilever-Halter 22
Cantileverträger 17
 c_p 11, 29
 c_p^∞ 10
cutoff distance 71
Dämpfung 20
Debye-Länge 66
Deflektionsbild 19
Deflektionsstrecke 18
Dip-Pen Nanolithographie 8
DI-Software 21
DPN 8
Ebenenangleichung 25
electric double-layer 66
Faltung 6
Fast Scan-Axis 19
 F_l 17
Flatten 25
 F_l^{min} 41
freie Amplitude 20
Gleichgewichtskonstante 71
Gleitstrecke 21
globuläre Proteine 6
in cubo 15
Kim-Lysozymlösung 48, 65
kleiner Potentialunterschied (Fall) 69
Konformationsänderung 6
Kontakt-Modus 19
Kraft-Distanz Modus 18
Kraftkurve 18
Kristallform 1 29
Kristallform 2 29
kritische Radius 11
laterales Stufenwachstum 13
Linescanbilder 20
Linescan-Variation 20
loading force 17
Lysozym 27
Lysozym-Modell 1 67
Lysozym-Modell 2 67
Lysozym-Monoschicht 32, 62
Makromoleküle 6
Membranproteine 6
Messkopf 21
metastabilen Phase 11
Mica 27
Millersche Indizes 86
Muskovit 27
Nanogold[®] 82
NHS-Nanogold[®] 82
NMR 12
normales Kristallwachstum 13
Omp32 29
Omp32-Messlösung 29
Omp32-Spüllösung 30
Omp32-Stammlösung 29
O-Ring 22
Peltier-Element 24
PID-Regler 24
Piezzo-Kristall 17
Plane Fit 25
Polypeptidkette 6
Probenstisch 17
Probenträger 26
Proteinbiosynthese 6
Proteine 6
Punktdichte 8
Rasterelektronenmikroskop 26
Rasterkraftmikroskop 17
Rastertunnelmikroskop 17
Regelgröße 24
REM 26
Reservoir CFII 60
RKM 17
Sättigungskonzentration 10
Scanner 17
Scanning Force Microscope 17
Scanrate 19
 s_d 18
SFM 17
 s_g 21
Slow Scan-Axis 19
Sollwert 24
Sondenlithographie 8
spontan adsorbiertes Lysozym 33
Spülprozess 30

Standard-Lysozymlösung 31
Stellgröße 24
Substrat 17, 26
Tapping-Modus 20
TIRF 72
Topographiebild 19

Transelectronenmikroskop 17
Übersättigung 11
vektorielles Drehen 25
 β 11
 β -D-octylglucoside 29

Literaturverzeichnis

- [Abb73] Abbe E.: *Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der Mikroskopischen Wahrnehmung*. Arch. Mikroskopische Anatomie 1873; 9: 413-468.
- [Ada95] Adam G., Läger P., Stark G.: *Physikalische Chemie und Biophysik*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 3. Auflage - 1995.
- [All01] Allain L. R., Askari M., Stokes D. L., Vo-Dinh T.: *Microarray sampling-platform fabrication using bubble-jet technology for a biochip system*. Fresenius J. Anal. Chem. 2001; 371 (2): 146-150.
- [Ame98] Amelinckx S., van Dyck D., van Landuyt J.: *Handbook of Microscopy I. Methods I*. Wiley-VCH, 1. Auflage - 1998.
- [Ara90] Arai T., Norde W.: *The behavior of some model proteins at solid liquid interface*. Colloid Surface 1990; 51: 1-28.
- [Ard38] von Ardenne, M.: *Das Elektronen-Rastermikroskop. Theoretische Grundlagen*. Zeitschrift für Physik 1938; 108: 553-572.
- [Bar06] Barbulovic-Nad I., Lucente M., Sun Y., Zhang M., Wheeler A. R., Bussmann M.: *Bio-microarray fabrication techniques--a review*. Crit. Rev. Biotechnol. 2006; 26 (4): 237-259.
- [Bel96] Belcher A. M., Wu X. H., Christensen R. J., Hansma P. K., Stucky G. D., Morse D. E.: *Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins*. Nature 1996; 381 (6577): 56-58.
- [Ber97] Bergström L.: *Hamaker constants of inorganic materials*. Adv. Colloid Interface Sci. 1997; 70: 125-169.
- [Bin82] Binnig G., Rohrer H.: *Scanning Tunneling Microscope*. Helv. Phys. Acta 1992; 55 (6): 726-735.
- [Bin86] Binnig G., Quate C. F., Gerber C.: *Atomic force microscope*. Phys. Rev. Lett. 1986; 56 (9): 930-933.
- [Bla65] Blake C.C.F., Koenig D.F., Mair G.A., North A.C.T., Phillips D.C., Sarma V.R.: *Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution*. Nature 1965; 206: 757-761.
- [Blo94] Blomberg E., Claesson P. M., Fröberg J. C., Tilton R. D.: *Interaction between adsorbed layers of lysozyme studied with the surface force technique*. Langmuir 1994; 10: 2325-2334.
- [Blo98] Blomberg E., Claesson P. M., Fröberg J. C.: *Surfaces coated with protein layers: a surface force and ESCA study*. Biomaterials 1998; 19 (4-5): 371-386.
- [Cac91] Cacioppo E., Pusey M. L.: *The solubility of tetragonal form of hen egg white lysozyme from pH 4.0 to 5.4*. J. Cryst. Growth 1991; 114: 286-292.
- [Cai07] Cai C., Bakowsky U., Rytting E., Schaper A. K., Kissel T.: *Charged nanoparticles as protein delivery systems: A feasibility study using lysozyme as model protein*. Eur J Pharm Biopharm. 2007 Oct 12; Epub ahead of print.
- [Cam06] Campbell N. A., Reece J. B., Markl J.: *Biologie*. Verlag Pearson Studium, München, 6. Auflage - 2006.

- [Car04] Carlsson F., Hyltner E., Arnebrant T., Malmsten M., Linse P.: *Lysozyme adsorption to charged surfaces. A Monte Carlo study*. J. Phys. Chem. B 2004; 108 (28): 9871-9881.
- [Cha97] Chan V., Graves D. J., Fortina P., McKenzie S. E.: *Adsorption and Surface Diffusion of DNA Oligonucleotides at Liquid/Solid Interfaces*. Langmuir 1997; 13: 320-329.
- [Cza03] Czajkowsky D.M., Shao Z.: *Inhibition of protein adsorption to muscovite mica by monovalent cations*. J. Microsc. 2003; 211 (Pt 1): 1-7.
- [Cze06] Czeslik C.: *Erwünscht und unerwünscht: Proteinadsorption an festen Oberflächen*. Chemie in unserer Zeit 2006; 40: 238-245.
- [Dav05] Davis J. J., Morgan D. A., Wrathmell C. L., Axford D. N., Zhao J., Wang N.: *Molecular Bioelectronics*. J. Mater. Chem. 2005; 15 (22): 2160-2174.
- [Dei85] Deisenhofer J., Epp O., Miki K., Huber R., Michel H.: *Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center of rhodospseudomonas-viridis at 3 Å resolution*. Nature 1985; 318 (6047): 618-624.
- [Dem02] Demers L. M., Ginger D. S., Park S. J., Li Z., Chung S. W., Mirkin C. A.: *Direct patterning of modified oligonucleotides on metals and insulators by dip-pen nanolithography*. Science 2002; 296 (5574): 1836-1838.
- [DI97] Digital Instruments Inc., Santa Barbara, CA, USA: *Multi Mode Scanning Probe Microscope Instruction Manual*, 1997.
- [Dyk03] Dykstra M. J., Reuss L. E.: *Biological Electron Microscopy*, Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2. Auflage - 2003.
- [End04] Enders O., Ngezahayo A., Wiechmann M., Leisten F., Kolb H.-A.: *Structural calorimetry of main transition of supported DMPC bilayers by temperature-controlled AFM*. Biophys. J. 2004; 87 (4): 2522-2531.
- [End04ii] Enders O., Korte F., Kolb H.-A.: *Lorentz-force-induced excitation of cantilevers for oscillation-mode scanning probe microscopy*. Surf. Interf. Anal. 2004; 36 (2): 119-123.
- [Fer01] Fermani S., Falini G., Minnucci M., Ripamonti A.: *Protein crystallization on polymeric film surfaces*. J. Cryst. Growth 2001; 224 (3-4): 327-334.
- [Fri95] Fritz M., Radmacher M., Cleveland J. P., Allersma M. W., Stewart R. J., Giesemann R., Janmey P., Schmidt C. F., Hansma P. K.: *Imaging Globular and Filamentous Proteins in Physiological Buffer Solutions with Tapping Mode Atomic Force Microscopy*. Langmuir 1995; 11 (9): 3529-3535.
- [Fur98] Furuno T., Sasabe H., Ikegami A.: *Imaging two-dimensional arrays of soluble proteins by atomic force microscopy in contact mode using a sharp supertip*. Ultramicroscopy 1998; 70: 125-131.
- [Gar90] Garavito R. M., Picot D.: *The art of crystallizing membrane proteins*. Methods 1990; 1 (1): 57-69.
- [Gar03] Garcia-Ruiz J. M.: *Nucleation of protein crystals*. J. Struct. Biol. 2003; 142 (1): 22-31.
- [Ger95] Gerthsen C., Vogel, H.: *Physik*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 18. Auflage - 1995.

- [Ger92] Gerbl-Rieger S., Engelhardt H., Peters J., Kehl M., Lottspeich F., Baumeister W.: *Topology of the anion-selective porin Omp32 from Comamonas acidovorans*. J. Struct. Biol. 1992; 108(1): 14-24.
- [Gil89] Gill S. C., Hippel P. H.: *Calculation of Protein Coefficients from Amino Acid Sequence Data*. Annal. Biochem. 1989; 182: 319-326.
- [Gin04] Ginger D. S., Zhang H., Mirkin C. A.: *The evolution of dip-pen nanolithography*. Angew. Chem. Int. Ed. 2004; 43 (1): 30-45.
- [Gor05] Gorti S., Forsythe E. L., Pusey M. L.: *Measurable characteristics of lysozyme crystal growth*. Acta Cryst. 2005; D61: 837-843.
- [Gra04] Gray J. J.: *The interaction of proteins with solid surfaces*. Curr. Opin. Struct. Biol. 2004; 14 (1): 110-115.
- [Gra07] Granseth E., Seppala S., Rapp M., Daley D. O., Von Heijne G.: *Membrane protein structural biology - How far can the bugs take us?* Mol. Mem. Biol. 2007; 24 (5-6) 329-332.
- [Gro06] Groot B. L., Böckmann R. A., Grubmüller H.: *Molekulare Nanomaschinen unter der Lupe*. Phys. Unserer Zeit 2006; 37: 73-79.
- [Gui92] Guilloteau J. P., Riès-Kautt M. M., Ducruix A. F.: *Variation of lysozyme solubility as a function of temperature in the presence of organic and inorganic salts*. J. Cryst. Growth. 1992; 122: 223-230.
- [Hag93] Haggerty L., Lenhoff A. M.: *Analysis of ordered arrays of adsorbed lysozyme by scanning tunneling microscopy*. Biophys J. 1993; 64 (3): 886-895.
- [Hai91] Hainfeld J. F., Furuya F. R.: *A 1.4-nm gold cluster covalently attached to antibodies improves immunolabeling*. J. Histochem. Cytochem. 1992; 40 (2): 177-184.
- [Ham07] Hammadi Z., Astier J. P., Morin R., Veessler S.: *Protein crystallization induced by a localized voltage*. Cryst. Growth Des. 2007; 7 (8): 1472-1475.
- [He07] He Q., Küller A., Schilp S., Leisten F., Kolb H.-A., Grunze M., Li J.: *Fabrication of Controlled Thermosensitive Polymer Nanopatterns with One-Pot Polymerization Through Chemical Lithography*. Small 2007; 3 (11): 1860-1865.
- [Hei06] Heijna M. C. R., van den Dungen P. B. P., van Enkevort W. J. P., Vlieg E.: *An atomic force microscopy study of the (001) surface of triclinic hen egg-white lysozyme crystals*. Cryst. Growth Des. 2006; 6 (5): 1206-1213.
- [Hie05] Hietschold M.: *Einführung in die Raster-Sonden-Mikroskopie*. Teubner, 1. Auflage -2005.
- [Hla96] Hlady V., Buijs J.: *Protein adsorption on solid surfaces*. Curr. Op. Biotechnol. 1996; 7 (1): 72-77.
- [Hon99] Hong S., Zhu J., Mirkin C. A.: *Multiple ink nanolithography: toward a multiple-pen nano-plotter*. Science 1999; 286 (5439): 523-525.
- [Hun03] Hunte C., Michel H.: *Membrane Protein Crystallization*. In: Hunte C., von Jagow G., Schägger H. (Eds.): *Membrane Protein Purification and Crystallization: A Practical Guide*. Academic Press, San Diego, 2003.
- [Isr97] Israelachvili J. N.: *Intermolecular and surface forces*. Academic Press, San Diego, 1997.

- [Jol69] Jolles P.: *Lysozymes: a chapter of molecular biology*. Angew Chem Int Ed. 1969; 8 (4): 227-239.
- [Jol84] Jolles P.: *What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday*. Mol. Cell. Biochem. 1984; 63 (2): 165-189.
- [Jon02] Jones D. B., Middelberg A. P. J.: *Direct determination of the mechanical properties of an interfacially adsorbed protein film*. 2002 Chem. Eng. Sci. 57 (10): 1711-1722.
- [Jos01] Josefowicz J. Y., Avlyanov J. K., MacDiarmid A. G.: *Complete alignment of polyaniline monolayers on muscovite mica: epitaxial effects of a lattice-matched substrate*. Thin Solid Films 2001; 393 (1-2): 186-192.
- [Jos03] Joseph S.: *After the ribosome structure: How does translocation work?* RNA 2003; 9 (2): 160-164.
- [Kad06] Kadowaki A., Yoshizaki I., Adachi S., Komatsu H., Odawara O., Yoda S.: *Effects of forced solution flow on protein-crystal quality and growth process*. Cryst. Growth Des. 2006; 6 (19): 2398-2403.
- [Kan07] Kane R. S., Stroock A. D.: *Nanobiotechnology: Protein-Nanomaterial Interactions*. Biotechnol. Prog. 2007; 23 (2): 316-319.
- [Kim00] Kim H., Garavito R. M., Lal R.: *Atomic force microscopy of the three-dimensional crystal of membrane protein, OmpC porin*. Colloid Surf. B-Biointerfaces 2000; 19: 347-355.
- [Kim02] Kim D. T., Blanch H. W., Radke C. J.: *Direct imaging of lysozyme adsorption onto mica by atomic force microscopy*. Langmuir 2002; 18 (15): 5841-5850.
- [Koe00] Koebnik R., Locher K. P., van Gelder P.: *Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell*. Mol. Microbiol. 2000; 37: 239-253.
- [Kol65] Koltun W. L.: *Precision space-filling atomic models*. Biopolymers 3 (6): 665-679.
- [Kro01] Krogh A., Larsson B., von Heijne G., Sonnhammer E. L. L.: *Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes*. J. Mol. Biol. 2001; 305 (3): 567-580.
- [Kuc96] Kuchling H.: *Taschenbuch der Physik*. Fachbuchverlag Leipzig. 16. Auflage - 1996.
- [Lac07] Lacapère J.-J., Pebay-Peyroula E., Neumann J. M., Etchebest C.: *Determining membrane protein structures: still a challenge!* Trends Biochem. Sci. 2007; 32 (6): 259-270.
- [Lac92] Lacapère J.-J., Stokes D. L., Chatenay D.: *Atomic force microscopy of three-dimensional membrane protein crystals. Ca-ATPase of sarcoplasmic reticulum*. Biophys. J. 1992; 63 (2): 303-308.
- [Lan96] Landau E. M., Rosenbusch J. P.: *Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996; 93 (25): 14532-14535
- [Lan97] Land T. A., DeYoreo J. J., Lee J. D.: *An in-situ AFM investigation of canavalin crystallization kinetics*. Surf. Sci. 1997; 384 (1-3): 136-155.

- [Lee02] Lee K. B., Park S. J., Mirkin C. A., Smith J. C., Mrksich M.: *Protein nanoarrays generated by dip-pen nanolithography*. Science. 2002; 295 (5560): 1702-1705.
- [Lee03] Lee K. B., Lim J. H., Mirkin C. A.: *Protein nanostructures formed via direct-write dip-pen nanolithography*. J. Am. Chem. Soc. 2003; 125 (19): 5588-5589.
- [Lei04] Leisten F., *Untersuchung des Wachstumsprozesses der Proteinkristallisation des Lysozyms mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie*. Diplomarbeit, Institut für Biophysik der Universität Hannover, Januar 2004.
- [Lei06] Leisten F., Wiechmann M., Enders O., Kolb H.-A.: *Generation of nanostructures of mica supported lysozyme molecules in aqueous solution by atomic force microscopy*. J. Coll. Interf. Sci. 2006; 298 (2): 508-514.
- [Lei06ii] Leisten F., Wiechmann M., Zeth K., Meyer J.M., Scheibe A., Haug R.-J., Kolb H.-A.: *Atomic force microscopy of hydrated three-dimensional transmembrane protein crystals of Omp32 at molecular resolution*. Scanning Probe Microscopy & Organic materials XV, Dresden 2006; Third price of the poster award.
- [Li99] Li H. Y., Perozzo M. A., Konnert J. H., Nadarajah A., Pusey M. L.: *Determining the molecular-packing arrangements on protein crystal faces*. Acta Cryst. 1999; D55: 1023-1035.
- [Li99ii] Li H. Y., Nadarajah A., Pusey M. L.: *Determining the molecular-growth mechanisms of protein crystal faces by atomic force microscopy* Acta Cryst. 1999; D55: 1036-1045.
- [Lim02] Lim J. H., Mirkin C. A.: *Electrostatically driven dip-pen nanolithography of conducting polymers*. Adv. Mater. 2002; 14 (20): 1474-1477.
- [Lim03] Lim J. H., Ginger D. S., Lee K. B., Heo J., Nam J. M., Mirkin C. A.: *Direct-write dip-pen nanolithography of proteins on modified silicon oxide surfaces*. Angew. Chem. Int. Ed. 2003; 42 (20): 2309-2312.
- [Lio00] Liou Y. C., Tocilj A., Davies P. L., Jia Z. C.: *Mimicry of ice structure by surface hydroxyls and water of a beta-helix antifreeze protein*. Nature 2000; 406 (6793): 322-324.
- [Liu02] Liu X. G., Fu L., Hong S. H., Dravid V. P., Mirkin C. A.: *Arrays of magnetic nanoparticles patterned via "dip-pen" nanolithography*. Adv. Mater. 2002; 14 (3): 231-234.
- [Liu96] Liu E., Blanpain B., Celis J. P.: *Calibration procedures for frictional measurements with a lateral force microscope*. Wear 1996; 192 (1-2): 141-150.
- [Mal94] Malkin A. J., McPherson A.: *Light-scattering investigations of nucleation processes and kinetics of crystallization in macromolecular systems*. Acta Cryst. D 1994; 50: 385-395.
- [Mal95] Malkin A. J., Kuznetsov Yu. G., Land T. A., DeYoreo J. J., McPherson A.: *Mechanism of growth for protein and virus crystals*. Nature Struct. Biol. 1995; 2 (11): 956-959.
- [Mal96] Malkin A. J., Kuznetsov Yu. G., Glantz W., McPherson A.: *Atomic Force Microscopy Studies of Surface Morphology and Growth Kinetics in Thaumatin Crystallization*. J. Phys. Chem. 1996; 100: 11736-11743.

- [Man03] Manandhar P., Jang J., Schatz G. C., Ratner M. A., Hong S.: *Anomalous surface diffusion in nanoscale direct deposition processes*. Phys. Rev. Lett. 2003; 90 (11): 115505.
- [Mat98] Mathes A., Engelhardt H.: *Nonlinear and asymmetric open channel characteristics of an ion-selective porin in planar membranes*. Biophys. J. 1998; 75: 1255-1262.
- [McP00] McPherson A., Malkin A. J., Kuznetsov Yu. G.: *Atomic force microscopy in the study of macromolecular crystal growth*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2000; 29: 361-410.
- [McP01] McPherson A., Malkin A. J., Kuznetsov Yu. G., Plomp M.: *Atomic force microscopy applications in macromolecular crystallography*. Acta Cryst. D 2001; 57: 1053-1060.
- [McP03] McPherson A., Kuznetsov Yu. G., Malkin A., Plomp M.: *Macromolecular crystal growth as revealed by atomic force microscopy*. J. Struct. Biol. 2003; 142 (1): 32-46.
- [McP04] McPherson A.: *Introduction to protein crystallization*. Methods 2004; 34 (3): 254-265.
- [McP07] McPherson A., Giegé R.: *Crystallogenes Research for Biology in the Last Two Decades as Seen from the International Conferences on the Crystallization of Biological Macromolecules*. Cryst. Growth Des. 2007; 7 (11): 2126-2133.
- [McP99] McPherson A.: *Crystallization of Biological Macromolecules* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York -1999.
- [Moh07] Mohan M., Ramachandran D., Sankar T. V., Anandan R.: *Influence of pH on the solubility and conformational characteristics of muscle proteins from mullet (*Mugil cephalus*)*. Proc. Biochem. 2007; 42 (7): 1056-1062.
- [Mon03] Mondon M, Berger S, Ziegler C: *Scanning-force techniques to monitor time-dependent changes in topography and adhesion force of proteins on surfaces*. Anal. Bioanal. Chem. 2003; 375 (7): 849-855.
- [Moo96] Mooney J. F., Hunt A. J., McIntosh J. R., Liberko C. A., Walba D. M., Rogers C. T.: *Patterning of functional antibodies and other proteins by photolithography of silane monolayers*. P. Natl. Acad. Sci. USA 1996; 93 (22): 12287-12291.
- [Mor00] Morris V. J., Gunning A. P., Kirby A. R.: *Atomic Force Microscopy for Biologists*. Imperial College Press - 2000.
- [Mor00ii] Morra M.: *On the molecular basis of fouling resistance*. J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 2000; 11 (6): 547-569.
- [Mor03] Mortimer C. E., Müller U.: *Chemie*. Thieme Verlag, Germany. 8. Auflage - 2003.
- [Mül95] Müller D. J., Schabert F. A., Büldt G., Engel A.: *Imaging purple membranes in aqueous solutions at sub-nanometer resolution by atomic force microscopy*. Biophys. J. 1995; 68: 1681-1686.
- [Mül97] Müller D. J., Engel A.: *The height of biomolecules measured with the atomic force microscope depends on electrostatic interactions*. Biophys. J. 1997; 73: 1633-1644.

- [Mül02] Müller D. J., Hand G. M., Engel A., Sosinsky G. E.: *Conformational changes in surface structures of isolated connexin 26 gap junctions*. EMBO J. 2002; 21 (14): 3598-3607.
- [Nad96] Nadarajah A., Pusey M. L.: *Growth mechanism and morphology of tetragonal lysozyme crystals*. Acta Cryst. D 1996; 52: 983-996.
- [Nak01] Nakanishi K., Sakiyama T., Imamura K.: *On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon*. J. Biosci. Bioeng. 2001; 91 (3): 233-244.
- [Nan07] Nanev C. N.: *Protein crystal nucleation: Recent notions*. Cryst. Res. Technol. 2007; 42 (1): 4-12.
- [Nan06] Product Information: "Mono-Sulfo-N-Hydroxy-Succinimido Nanogold[®] Labeling Reagent". Nanoprobes, Inc, 95 Horse Block Road, Unit 1, Yaphank NY 11980-9710, USA. 2006.
- [Nan00] Nanev C. N., Tsekova D.: *Heterogeneous nucleation of hen-egg-white lysozyme - Molecular approach*. Cryst. Res. Tech. 2000; 35 (2): 189-195.
- [Nik03] Nikaido H.: *Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003; 67: 593-656.
- [Nik94] Nikaido H.: *Porins and Specific Diffusion Channels in Bacterial Outer Membranes*. J. Biol. Chem. 1994; 269: 3905-3908.
- [Nor07] Norde W.: *Surface-tethered polymers to influence protein adsorption and microbial adhesion*. Z. Phys. Chem. 2007 221 (1): 47-63.
- [Obe97] Oberholzer M. R., Wagner N. J., Lenhoff A. M.: *Grand canonical Brownian dynamics simulation of colloidal adsorption*. J. Chem. Phys. 1997; 107 (21): 9157-9167.
- [Ost97] Ostermeier C., Michelt H.: *Crystallization of membrane proteins*. Cur. Opin. Struct. Biol. 1997; 6: 697-701.
- [Pai03] Paine M. L., Luo W., Zhu D. H., Bringas P., Snead M. L.: *Functional domains for amelogenin revealed by compound genetic defects*. J. Bone Miner. Res. 2003; 18 (3): 466-472.
- [Pal00] Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke C. A., Motoshima H., Fox B. A., Le Trong I., Teller D. C., Okada T., Stenkamp R. E., Yamamoto M., Miyano M.: *Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor*. Science 2000; 289 (5480): 739-745.
- [Pas81] Pashley R. M.: *DLVO and hydration forces between mica surfaces in Li⁺, Na⁺, K⁺, and Cs⁺ electrolyte solutions: A correlation of double-layer and hydration forces with surface cation exchange properties*. J. Coll. Interface Sci. 1981; 83 (2): 531-546.
- [Pet98] Peters R., Georgalis Y., Saenger W.: *Accessing lysozyme nucleation with a novel dynamic light scattering detector*. Acta. Cryst. D 1998; 54: 873-877.
- [Pin99] Piner R. D., Zhu J., Xu F., Hong S. H., Mirkin C. A.: *"Dip-pen" nanolithography*. Science 1999; 283 (5402): 661-663.
- [Pus02] Pusey M. L., Nadarajah A.: *A model for tetragonal lysozyme crystal nucleation and growth*. Cryst. Growth Des. 2002; 2 (6): 475-483.

- [Qut04] Qutub Y., Reviakine I., Maxwell C., Navarro J., Landau E. M., Vekilov P.G.: *Crystallization of transmembrane proteins in cubo: mechanisms of crystal growth and defect formation*. J. Mol. Biol. 2004; 343 (5): 1243-1254.
- [Rad94] Radmacher M., Fritz M., Hansma H. G., Hansma P.K.: *Direct observation of enzyme activity with the atomic force microscope*. Science 1994; 265: 1577-1579.
- [Rad94ii] Radmacher M., Fritz M., Cleveland J. P., Walters D. A., Hansma P. K.: *Imaging adhesion forces and elasticity of lysozyme adsorbed on mica with the atomic force microscope*. Langmuir 1994; 10 (10): 3809-3814.
- [Rad94iii] Radmacher M., Cleveland J. P., Fritz M., Hansma H. G., Hansma P. K.: *Mapping interaction forces with the atomic force microscope*. Biophys. J. 1994; 66 (6): 2159-2165.
- [Rat04] Ratner B. D., Bryant S. J.: *Biomaterials: Where we have been and where we are going*. Annu. Rev. Biomed. Eng. 2004; 6: 41-75.
- [Rav00] Ravichandran S., Talbot J.: *Mobility of adsorbed proteins: a Brownian dynamics study*. Biophys. J. 2000; 78 (1): 110-120.
- [Rei07] Reitsma, M. G.: *Lateral force microscope calibration using a modified atomic force microscope cantilever*. Rev. Sci. Instr. 2007; 78 (10): Art. No. 106102.
- [Rot93] Roth C. M., Lenhoff A. M.: *Electrostatic and van der Waals contributions to protein adsorption: computation of equilibrium constants*. Langmuir 1993; 9 (4): 962-972.
- [Rot95] Roth C. M., Lenhoff A. M.: *Electrostatic and van der Waals Contributions to Protein Adsorption: Comparison of Theory and Experiment*. Langmuir 1995; 11 (9): 3500-3509.
- [RSC] RSCB Protein Data Bank. <http://www.pdb.org/> (20. November 2007)
- [Rum03] Rummel G., Rosenbusch J. P.: *Crystallization of Bacterial Outer Membrane Proteins from Detergent Solutions: Porin as a Model*. In: S. Iwata: *Methods and Results in Crystallization of Membrane Proteins*. IUL Biotechnology Series, International University Line, La Jolla, Ca, USA, 2003.
- [Rus07] Rusmini F., Zhong Z., Feijen J.: *Protein immobilization strategies for protein biochips*. Biomacromolecules 2007; 8 (6): 1775-1789.
- [Sca88] Scales P. J., Healy T. W., Evans D. F.: *The zeta potential of muscovite mica: Counterion complexation by a macrocyclic ligand*. J. Colloid Interface Sci. 1988; 124 (2): 391-395.
- [Sca90] Scales P. J., Grieser F., Healy T. W.: *Electrokinetics of the muscovite mica-aqueous solution interface*. Langmuir 1990; 6 (3): 582-589.
- [Schab95] Schabert F. A., Henn C., Engel A.: *Native Escherichia coli OmpF porin surfaces probed by atomic force microscopy*. Science. 1995; 268 (5207): 92-94.
- [Schap97] Schaper A., Georgalis Y., Umbach P., Raptis J., Saenger W.: *Precrystallization structures in supersaturated lysozyme solutions studied by dynamic light scattering and scanning force microscopy*. J. Chem. Phys. 1997; 106 (20): 8587-8594.

- [Schau01] Schauer R., Enders O.: Skript zum rasterkraftmikroskopischen Praktikum des Institutes für Biophysik der Leibniz Universität Hannover.
- [Ser07] Serreli V., Lee C. F., Kay E. R., Leigh D. A.: *A molecular information ratchet*. Nature 2007; 445 (7127): 523-527.
- [Spe03] Speziale S., Jiang F., Caylor C. L., Kriminski S., Zha C. S., Thorne R.E., Duffy T. S.: *Sound velocity and elasticity of tetragonal lysozyme crystals by Brillouin spectroscopy*. Biophys. J. 2003; 85 (5): 3202-3213.
- [Str03] Stryer L. *Biochemie* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg - 2003.
- [Sut07] Sutton D., Nasongkla N., Blanco E., Gao J. M.: *Functionalized micellar systems for cancer targeted drug delivery*. Pharm. Res. 2007; 24 (6): 1029-1046.
- [Sze95] Sze, S. M.: *Semiconductor Devices - Physics and Technology*. John Wiley & Sons, Inc., New York - 1995.
- [Tak98] Takeda K., Sato H., Hino T., Kono M., Fukuda K., Sakurai I., Okada T., Kouyama T.: *A novel three-dimensional crystal of bacteriorhodopsin obtained by successive fusion of the vesicular assemblies*. J. Mol. Biol. 1998; 283 (2): 463-474.
- [Tan72] Tanford C., Roxby R.: *Interpretation of protein titration curves. Application to lysozyme*. Biochemistry 1972; 11 (11): 2192-2198.
- [Tar90] Tarjus G., Schaaf P., Talbot J.: *Generalized Random Sequential Adsorption*. J. Chem. Phys. 1990; 93 (11): 8352-8360.
- [Tie02] Tietze U., Schenk C.: *Halbleiterschaltungstechnik*. Springer Verlag, 12. Auflage - 2002.
- [Til93] Tilton R. D., Blomberg E., Claesson P. M.: *Effect of anionic surfactant on interactions between lysozyme layers adsorbed on mica*. Langmuir 1993; 9 (8): 2102-2108.
- [Til90] Tilton R. D., Gast A. D., Robertson C. R.: *Surface diffusion of interacting proteins. Effect of concentration on the lateral mobility of adsorbed bovine serum albumin*. Biophys. J. 1990; 58: 1321-1326.
- [Vek04] Vekilov P. G.: *Dense liquid precursor for the nucleation of ordered solid phases from solution*. Cryst. Growth Des. 2004; 4 (4): 671-685.
- [Wan07] Wang, J., Dauter, M., Alkire, R., Joachimiak, A., Dauter, Z.: *HEWL at 0.65 angstrom resolution*. 2007. To be published.
- [Wan03] Wang X. H., Istepanian R. S. H., Song Y. H. *Microarray image enhancement by denoising using stationary wavelet transform*. IEEE Trans. Nanob. 2003; 2 (4): 184-189.
- [Wat53] Watson J. D., Crick F. H.: *Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid*. Nature. 1953; 171: 737-738.
- [Wer02] Wertz C. F., Santore M. M.: *Adsorption and reorientation kinetics of lysozyme on hydrophobic surfaces*. Langmuir 2002; 18 (4): 1190-1199.
- [Whe06] Whelan A., Regan F.: *Antifouling strategies for marine and riverine sensors*. J. Environ. Monit. 2006; 8 (9): 880-886.

- [Wie] Dipl. Phys. Matthias Wiechmann, Institut für Biophysik der Leibniz Universität Hannover. Verstarb am 18.4.2005 während seiner Doktorarbeit.
- [Wie01] Wiechmann M., Enders O., Zeilinger C., Kolb H.-A.: *Analysis of protein crystal growth at molecular resolution by atomic force microscopy*. Ultramicroscopy. 2001; 86: 151-157.
- [Wie01ii] Wiener M. C.: *Existing and emergent roles for surfactants in the three-dimensional crystallization of integral membrane proteins*. Cur. Opin. Col. Interf. Sci. 2001; 6: 412-419.
- [Wie06] Wiechmann M., Enders O., Leisten F., Becker J.M., Haug R.J., Kolb H.-A.: *Nanoscale lines of supported nanogold particles and lysozyme-nanogold conjugates generated by atomic force microscopy in aqueous solution*. Surf. Interf. Anal. 2006; 38 (6): 1004-1009.
- [WieOm] Wiechmann M., Leisten F., Zeth K., Meyer J.M., Scheibe A., Haug R.-J., Kolb H.-A.: *Atomic force microscopy of hydrated three-dimensional transmembrane protein crystals of Omp32 at molecular resolution*. In preparation.
- [Wil03] Wilson D. S., Nock S.: *Recent developments in protein microarray technology*. Angew. Chem. Int. Ed. 2003; 42 (5): 494-500.
- [Wil02] Willner I., Willner B., Katz E.: *Functional biosensor systems via surface-nanoengineering of electronic elements*. J. Biotechnol. 2002; 82 (4): 325-355.
- [Wil96] Williams D. B., Carter C. B.: *Transmission Electron Microscopy*. Kluwer Academic / Plenum Publishers - 1996.
- [Wou04] Wouters D., Schubert U. S.: *Nanolithography and nanochemistry: probe-related patterning techniques and chemical modification for nanometer-sized devices*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2004; 43 (19): 2480-2495.
- [Xia98] Xia Y. N., Whitesides G. M.: *Soft lithography*. Angew. Chem. Int. Ed. 1998; 37 (5): 551-575.
- [Yam06] Yampolskaya G., Platikanov D.: *Proteins at fluid interfaces: Adsorption layers and thin liquid films*. Adv. Coll. Interf. Sci. 2006; 128: 159-183.
- [Yau00] Yau S. T., Vekilov P. G.: *Quasi-planar nucleus structure in apoferritin crystallization*. Nature 2000; 406 (6795): 494-497.
- [Yeh07] Yeh J. I., Beale S. I.: *Calorimetric Approaches to Characterizing Effects of Additives on Protein Crystallization*. Cryst. Growth Des. 2007; 7 (11): 2134-2139.
- [Yos02] Yoshizaki I., Nakamura H., Sato T., Igarashi N., Komatsu H., Yoda S.: *Systematic analysis of the effect of supersaturation on protein crystal quality*. J. Cryst. Growth 2002; 237-239: 295-299.
- [Zac06] Zachariae U., Klühspies T., De S., Engelhardt H., Zeth K.: *High resolution crystal structures and molecular dynamics studies reveal substrate binding in the porin Omp32*. J. Biol. Chem. 2006; 281: 7413-7420.
- [Zet00] Zeth K., Diederichs K., Welte W., Engelhardt H.: *Crystal structure of Omp32, the anion-selective porin from Comamonas acidovorans, in complex with a periplasmic peptide at 2.1 angstrom resolution*. Structure 2000; 8: 981-992.

- [Zet98] Zeth K., Schnaible V., Przybylski M., Welte W., Diederichs K., Engelhardt H.: *Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the native and chemically modified anion-selective porin from Comamonas acidovorans*. Acta Cryst. 1998; D 54: 650-653.
- [Zla00] Zlatanova J., Lindsay S. M., Leuba S. H.: *Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscope*. Prog. Biophys. Mol. Biol. 2000; 74 (1-2): 37-61.

Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst wurde und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden. Die vorliegende Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 01.04.2008

(Leisten)

Lebenslauf des Autors

Persönliche Daten	Dipl. Phys. Frank Leisten Alte Herrenhäuser Str. 32 30419 Hannover Germany
Email	leisten@biophysik.uni-hannover.de
Telefon	0049 511 762 19013
Geburtstag / Ort	12. Oktober 1974, Grossburgwedel
Familienstand	Ledig
Nationalität	Deutsch
Schulbildung	
08/81 - 06/85	Grundschule Bissendorf, 30900 Wedemark
08/85 - 06/87	Orientierungsstufe Bissendorf, 30900 Wedemark
08/87 - 06/91	Realschule Wedemark, 30900 Wedemark
08/91 - 06/95	Fachgymnasium Technik, Celle Leistungskurse: Physik und Elektrotechnik Zusatzleistung: 480 Stunden Fachpraxiskurs Elektrotechnik
Studium	
10/95 - 02/04	Diplomstudiengang Physik, Leibniz Universität Hannover Wahlfach Vordiplom: Mathematik. Wahlfächer Diplom: Biophysik, Strahlenschutz. Titel und Betreuer der Diplomarbeit: Untersuchungen des Wachstumsprozesses der Proteinkristallisation des Lysozyms mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie, Prof. Dr. Hans-Albert Kolb.
03/04 - dato	Promotion an der naturwissenschaftlichen Fakultät, Leibniz Universität Hannover Titel und Betreuer der Dissertation: Manipulation und Analyse von Proteinstrukturen in Flüssigkeit mit dem Rasterkraftmikroskop, Prof. Dr. Hans-Albert Kolb
Sprachen	
Deutsch	Muttersprache
Englisch	Sieben Jahre Schulunterricht. Verfassung wissenschaftlicher Publikationen
Französisch	Drei Jahre Schulunterricht

IT-Kenntnisse	
Software	MS Office, Open Office, LaTeX, Pagemaker, InDesign, Photoshop, Origin, Maple, LabView, SolidWorks, Nvu (Webdesign)
Programmierung	C, Pascal, Fortran
Qualifikationen	
gültig bis 11/11	Befähigung, mit sofortiger Wirkung zum Strahlenschutzbeauftragten ernannt zu werden.
Berufserfahrung	
bis 02/04	Diverses U. a.: Dreimal vier Monate studentische Hilfskraft an der Tierärztlichen Hochschule Hannover zur Betreuung eines studentischen Praktikumsurses. Mehrere Monate betreuende Nachtwache im "Heim für psychisch Genesende", Haus Mohmühle, Wedemark.
02/04 - 11/06	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Leibniz Universität Hannover Interdisziplinäres wissenschaftliches Arbeiten am Institut für Biophysik im Verband mit dem Laboratorium für Nano- und Quantenengineering (LNQE): Betreuung von Praktika, Verfassung von Publikationen, Bau einer Temperatur-Regelung für ein Rasterkraftmikroskop, Erstellung einer Dissertation. Versuchsobjekte: Adsorbierte Proteine, Proteinkristalle, Kernporen, künstliche Lipid-Doppelschichten, Carbon-Nanotubes, Zellkulturen. Methode: Rasterkraftmikroskopie. Leitung: Prof. Dr. Hans-Albert Kolb.
12/06 - 04/07 und 02/08 - 04/08	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg Interdisziplinäres wissenschaftliches Arbeiten am Institut für angewandte physikalische Chemie, Verfassung einer Publikation. Versuchsobjekte: Temperatursensitive, nanostrukturierte Polymerbürsten und Polyelektrolytschichten. Methode: Rasterkraftmikroskopie. Leitung: Prof. Dr. Michael Grunze.
05/07 - 01/08 und 05/08 - dato	Wissenschaftliche Mitarbeiter, Leibniz Universität Hannover Abschluss der Dissertation (siehe oben) am Institut für Biophysik. Leitung: Prof. Dr. Angelika Anders von Ahlfen.

Danksagung und Widmung

Ich danke

- Prof. Dr. Hans-Albert Kolb (Biophysik, Leibniz Universität Hannover) für die Betreuung meiner Doktorarbeit. Sie haben mit vielen entscheidenden Ideen für das Gelingen beigetragen. Ohne Sie wäre das Verfassen der Publikationen nicht möglich gewesen. Zudem haben Sie bis zu Ihrer Pensionierung, und darüber hinaus, für die Finanzierung gesorgt. Danke, dass Sie mir auch noch nach Ihrer Pensionierung tatkräftig als Doktorvater zur Seite standen.
- Prof. Dr. Angelika Anders (Biophysik, Leibniz Universität Hannover). Sie haben neben Prof. Dr. Michael Grunze im letzten Jahr meiner Doktorarbeit für die Finanzierung gesorgt. Danke, dass Sie mich nach der Auflösung der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hans-Albert Kolb (AG Kolb) in Ihre Arbeitsgruppe (Laser-AG) aufgenommen haben.
- PD Dr. Carsten Zeilinger (Biophysik, Leibniz Universität Hannover) für die wertvolle Diskussion. Sie waren stets und gerne mein erster Ansprechpartner, wenn es um die Klärung biologischer oder labortechnischer Fragen ging. Danke, dass Sie mir als Gutachter für meine Dissertation zur Verfügung standen.
- Prof. Dr. Rolf Michel (Zentrum für Strahlenschutz und Radioökologie, Leibniz Universität Hannover) für die administrative Unterstützung ihres Institutes. Danke, dass Sie mir als Prüfer bei meiner Disputation zur Verfügung standen.
- Prof. Dr. Michael Grunze (Angewandte Physikalische Chemie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg). Aufgrund eines bezahlten Messauftrages an PNIPAM-Bürsten haben Sie indirekt zur Finanzierung meiner Dissertation beigetragen. Schön, dass die durch diesen Messauftrag entstandenen Ergebnisse in He et al., 2007 [He07] Verwendung fanden.
- Prof. Dr. Rolf Haug (Festkörperphysik, Leibniz Universität Hannover) für das zur Verfügung stellen der Geräte Ihres Institutes und die gute Zusammenarbeit bei dem Verfassen der Publikation [Wie06].
- Dr. Oliver Enders und Prof. Dr. Analet Ngezahayo (beide Biophysik, Leibniz Universität Hannover) für die wertvolle Diskussion.
- Dr. Kornelius Zeth (MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen) und Dr. Harald Engelhardt (MPI für Biochemie, Martinsried) für die Hilfe bei der Kristallisation des Proteins Omp32 und das zur Verfügung stellen des gereinigten Proteins.
- Dipl. Phys. Jörg-Michael Meyer (Festkörperphysik, Leibniz Universität Hannover) für die gute Zusammenarbeit und die harten Diskussionen über adsorbierte Proteine, Proteinkristalle und Nanogold.
- Dipl. Chem. Sören Schilp, Dr. Axel Rosenhahn und Dr. Alexander Küller (alle Angewandte Physikalische Chemie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg) für die gute Zusammenarbeit an den PNIPAM-Bürsten.
- Dr. Merve Meinhardt und Dipl. Phys. Ann-Kathrin Kniggendorf (beide Biophysik, Leibniz Universität Hannover) für die Hilfen bei der Verfassung englischsprachiger Texte.

- Heidi Bliedung, Ingrid Buchwald, Hans-Georg Hannibal, Frank Koepcke und Andrea Lika-Gerbing (alle Biophysik, Leibniz Universität Hannover) sowie Carsten Borchering, Jörg Lüdke, Ulrike Möller, Michael Senft und Dr. Michael Täschner (alle Zentrum für Strahlenschutz und Radioökologie, Leibniz Universität Hannover) für die technische und administrative Unterstützung.
- allen Mitarbeitern der Biophysik Hannover für die angenehme Arbeitsatmosphäre: Anaclet, Frau Anders, André, Andrea, Andreas, Anita, Ann-Kathrin, Bastian, Britta, Carsten, Ela, Frank, Gunnar, Hans-Georg, Harald, Heidi, Ilona, Ingrid, Inés, Jens, Jörgen, Karina, Karolina, Katharina, Kim, Herr Kolb, Maike, Mariella, Matthias D., Matthias W., Melanie, Merve, Oliver, Ralf, Ronald, Sabrina, Sandra, Sebastian, Thilo, Tobias B., Tobias G., Tom, Vanessa, Wiebke, Willem und Wilhelm.
- meinen Freunden für die nötige Ablenkung und Eure moralische Unterstützung.
- meinen Eltern für die finanzielle Unterstützung und für Eure Liebe.
- Dipl. Phys. Matthias Wiechmann, (Biophysik, Leibniz Universität Hannover, verstorben am 14. April 2005) auch wenn Du Dich wohl etwas sehr frühzeitig aus den Staub gemacht hast, was? Jetzt amüsiert Du Dich mit philosophischen Gedanken und Heaven-Metall beim stillen Beobachten unserer Mühen. Gerade jetzt beißt Du in eine saftig nachgebende Bratwurst, während wir uns an den harten Detail-Teufeln Deiner Arbeit die Zähne ausbeißen. Ganz schön gerissen!

Wenn es doch nur so wäre.

Ich danke einem Energie-geladenen, großzügigen, enthusiastischen, hochintelligenten, lustigen, mitreißenden, geselligen, lieben, lauten-lachenden, sanften und in allen Bereichen riesigen Menschen und Wissenschaftler. Du hast mich, neben Herrn Prof. Kolb, in meiner Diplomarbeit hervorragend betreut. Auch danach hast Du mir bis zu Deinen plötzlichen und unerwarteten Tod mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Mit Dir habe ich meine ersten Ausflüge in die Nano-Welt und den wissenschaftlichen Alltag machen dürfen. Es war besser dort, als Du noch da warst. Du hast die schönen, hier von mir diskutierten Messungen an den Omp32-Kristallen durchgeführt. Ich habe die Qualität dieser Daten nie wieder erreicht. Dir sei diese Dissertation gewidmet.

Publikationen des Autors

Die für diese Dissertation gewonnenen Messergebnisse konnten in folgenden Publikationen Anwendung finden:

- Leisten F.¹, Wiechmann M.¹, Enders O.¹, Kolb H.-A.¹: *Generation of nanostructures of mica supported lysozyme molecules in aqueous solution by atomic force microscopy*. J. Coll. Interf. Sci. 2006; 298 (2): 508-514.
- Wiechmann M.¹, Enders O.¹, Leisten F.¹, Becker J.M.², Haug R.J.², Kolb H.-A.¹: *Nanoscale lines of supported nanogold particles and lysozyme-nanogold conjugates generated by atomic force microscopy in aqueous solution*. Surf. Interf. Anal. 2006; 38 (6): 1004-1009.
- Leisten F.¹, Wiechmann M.¹, Zeth K.³, Meyer J.M.², Scheibe A.⁴, Haug R.J.², Kolb H.-A.¹: *Atomic force microscopy of hydrated three-dimensional transmembrane protein crystals of Omp32 at molecular resolution*. Scanning Probe Microscopy & Organic materials XV, Dresden 2006; Third price of the poster award.
- Wiechmann M.¹, Leisten F.¹, Zeth K.³, Meyer J.M.², Scheibe A.⁴, Haug R.-J.², Kolb H.-A.¹: *Atomic force microscopy of hydrated three-dimensional transmembrane protein crystals of Omp32 at molecular resolution*. In preparation.

Weitere Publikationen des Autors:

- Enders O.¹, Ngezahayo A.¹, Wiechmann M.¹, Leisten F.¹, Kolb H.-A.¹: *Structural calorimetry of main transition of supported DMPC bilayers by temperature-controlled AFM*. Biophys. J. 2004; 87 (4): 2522-2531.
- He Q.⁵, Küller A.⁶, Schilp S.⁶, Leisten F.¹, Kolb H.-A.¹, Grunze M.⁶, Li J.⁵: *Fabrication of Controlled Thermosensitive Polymer Nanopatterns with One-Pot Polymerization Through Chemical Lithography*. Small 2007; 3 (11): 1860-1865.

¹ Institut für Biophysik, Leibniz Universität Hannover, Herrenhäuser Str. 2, 30419 Hannover (Germany)

² Institut für Festkörperphysik, Leibniz Universität Hannover, Appelstr. 2, 30167 Hannover (Germany)

³ Max Planck Institut für Biochemie, Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried (Germany)

⁴ Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie, Leibniz Universität Hannover, Callinstr. 3-3a, 30167 Hannover (Germany)

⁵ International Joint Lab, Beijing National Laboratory for Molecular Science, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Science, Beijing 100080 (P.R. China)

⁶ Angewandte Physikalische Chemie, Ruprecht-Karls Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 253, 69120 Heidelberg (Germany) und Institute for Molecular Biophysics, University of Maine, Orono (USA)