

INAUGURAL-DISSERTATION

**zur Erlangung der Doktorwürde (Dr. rer. nat.)
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen
Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg**

**vorgelegt von
Andreas Robert von Gundlach
geb. Buck aus Lörrach
Tag der mündlichen Prüfung
19. Juni 2015**

**Untersuchung antibiotischer
Wirkmechanismen mit
Röntgenkleinwinkelstreuung**

Gutachter:

Prof. Dr. Axel Rosenhahn

Prof. Dr. Rainer Dahint

KURZFASSUNG

Die weltweit steigende Zahl der Infektionen durch multiresistente Krankheitserreger ist eine bedeutende Herausforderung für unser modernes Gesundheitssystem. Zu ihrer effektiven Bekämpfung werden Antibiotika mit neuen Wirkmechanismen benötigt. Im Entwicklungsprozess eines neuen Antibiotikums können zwar viele antimikrobielle Substanzen erzeugt werden, die Identifikation neuer Wirkmotive stellt jedoch eine zeit- und kostenintensive Hürde dar. In dieser Arbeit wird die Anwendung von Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) mit Synchrotronstrahlung als Hochdurchsatzverfahren zur Klassifizierung antibiotischer Wirkmechanismen präsentiert. Hierzu wurden *Escherichia coli* mit einem Satz klinisch relevanter Antibiotika und mit einem kurzen kationischen Peptid mit unbekanntem Wirkmechanismus behandelt, und mit SAXS untersucht. Mithilfe einer Hauptkomponentenanalyse konnten die Antibiotika anhand ihrer morphologischen Änderungen klassifiziert werden. Die hierfür relevanten Zellstrukturen konnten durch Korrelation mit Transmissionselektronenmikroskopie und zonenplattenbasierter Röntgenmikroskopie (TXM) identifiziert werden. Ein einfaches Modell erlaubte es, aus Kleinwinkelstreukurven ganzer *E. coli* den Volumenanteil und die Anzahl wichtiger Zellkomponenten (DNS und Ribosomen) zu extrahieren. In der Röntgenstreuammer HORST wurde kryo-SAXS im weichen Röntgenbereich etabliert, um kryogene biologische Proben, zusammen mit der existierenden kryo-TXM Einheit, korrelativ in Real- und Fourierraum zu untersuchen.

ABSTRACT

Multi-drug resistant pathogens are currently undermining our health care system worldwide and novel antimicrobial drugs with new modes of action are urgently needed. During drug development, large sets of antibiotic substances may be created but it is a costly and time consuming challenge to identify the new action motifs. This thesis explores the use of small angle X-ray scattering (SAXS) as a high-throughput approach to classify antibiotic modes of action. *Escherichia coli* were treated with a set of clinically relevant antibiotics and a short cationic peptide with currently unknown mode of action and investigated with SAXS. The observed morphological alterations were classified using a principle component analysis. A correlation with transmission electron microscopy and zoneplate based X-ray microscopy (TXM) allowed to identify the relevant cellular structures. A simplified model allowed to extract, the number and the occupied volume of relevant cellular structures (DNA and ribosomes) from the scattering curve of whole *E. coli* cells. In the scattering chamber HORST soft X-ray cryo-SAXS was established to study vitrified biological samples in tandem with the existing cryo-TXM unit.

INHALTSVERZEICHNIS

Kurzfassung.....	I
Abstract	III
Inhaltsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 Antibiotische Wirkmechanismen	3
2.2 <i>Escherichia coli</i> als Modellsystem.....	10
2.3 Methoden zur Strukturanalyse von <i>E. coli</i>	13
2.3.1 Transmissionselektronenmikroskopie	15
2.3.2 Zonenplattenbasierte Vollfeld-Röntgenmikroskopie	16
2.3.3 Röntgenkleinwinkelstreuung.....	18
3 Material und Methoden.....	24
3.1 Chemikalien, Antibiotika & Bakterienstamm.....	24
3.2 Mikrobiologie – Bestimmung der optimale Antibiotikakonzentration	27
3.2.1 Photometrische Bestimmung der Zelldichte	27
3.2.2 Minimale Hemm-Konzentration	28
3.2.3 Abtötungskurven.....	29
3.3 Probenpräparation	30
3.3.1 Fixierte Proben in wässriger Lösung.....	30
3.3.2 Kryogene Proben.....	32
3.4 Datenauswertung	34
3.4.1 Extraktion der Kleinwinkelstreu Kurven aus Detektorbildern	34
3.4.2 Modellierung von Kleinwinkelstreu Kurven.....	34
3.4.3 Hauptkomponentenanalyse.....	37
3.4.4 Quantitative Bildanalyse	39
3.4.5 Berechnung der Strahlendosis.....	40
3.5 Verwendete Apparaturen.....	41
3.5.1 BioSAXS.....	42

3.5.2	USAXS	42
3.5.3	BESSY – TXM	43
3.5.4	HORST	44
4	Ergebnisse und Diskussion	47
4.1	Wirksamkeit der Antibiotika	47
4.2	Kontrastmechanismen von TEM, TXM und SAXS	50
4.3	Transmissionenelektronenmikroskopie (TEM)	52
4.3.1	Quantitative Bildanalyse	58
4.3.2	Fazit	62
4.4	Zonenplattenbasierte Röntgenmikroskopie	63
4.4.1	Bestimmung der Auflösungsgrenze an einer Teststruktur	64
4.4.2	Maximal auflösbare Strukturen bei biologischen Proben	66
4.4.3	Vergleich von U41-TXM und HORST-TXM	67
4.4.4	Strahlendosis.....	69
4.4.5	Korrelation von TXM mit TEM	70
4.4.6	Fazit	73
4.5	Kleinwinkelstreuung an mit Antibiotika behandelten <i>E. coli</i>	75
4.5.1	Reproduzierbarkeit der Streuexperimente	76
4.5.2	Normierung der Bakteriendichte.....	77
4.5.3	Strahlendosis.....	79
4.5.4	Antibiotikainduzierte Veränderung der Morphologie.....	80
4.5.5	Analyse der Kurvensteigungen	81
4.5.6	Die äußere Form der Bakterienzelle.....	83
4.5.7	Kombinierte Streuinformation von USAXS und BioSAXS	86
4.5.8	Modell der inneren Struktur von <i>E. coli</i>	88
4.5.9	Auswirkung antibiotischer Behandlungen auf die Bakterienmorphologie	93
	Fazit.....	96
4.6	Kleinwinkelstreuung als Hochdurchsatzverfahren	97
4.6.1	Hochdurchsatzanalyse am BioSAXS-Strahlrohr.....	98
4.6.2	Hauptkomponentenanalyse.....	100

4.6.3	Korrelation von SAXS und TEM.....	101
4.6.4	Kinetik der Morphologieänderung	104
4.6.5	Morphologieänderung und Überlebensrate.....	106
4.6.6	Fazit	107
4.7	Röntgenkleinwinkelstreuung mit HORST.....	109
4.7.1	Detektierbare Strukturgrößen	110
4.7.2	Streukurven mit hohem dynamischem Bereich.....	111
4.7.3	Kalibrierung des Detektorabstands	112
4.7.4	Vergleich mit USAXS.....	114
4.7.5	Strahlendosis.....	115
4.7.6	Mit Antibiotika behandelte <i>E. coli</i> in kryogener Probenumgebung	116
4.7.7	Fazit	121
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	123
6	Literaturverzeichnis.....	127
7	Anhang	139
7.1	Kompletter BioSAXS-Datensatz	139
7.2	Publikationsliste.....	140
7.3	Konferenzbeiträge	140
7.4	Finanzielle Unterstützung	140

1 EINLEITUNG

Die Entdeckung des Penicillins¹ durch Alexander Fleming im Jahre 1928 hat die Welt nachhaltig verändert und läutete das antibiotische Zeitalter ein. Durch die Entdeckung und Entwicklung weiterer Antibiotika wurden im Verlauf des letzten Jahrhunderts Infektionskrankheiten weitgehend ausgerottet. Diese Entwicklung wird durch zunehmende antibiotische Resistenzen vieler Krankheitserreger bedroht.^{2,3} So ist diese Anpassung vor allem in Entwicklungsländern spürbar und führt zu einer zunehmenden Verbreitung resistenter Krankheitserreger wie beispielsweise multiresistenter Tuberkulose.^{4,5} In Industrienationen wie Deutschland sind vor allem der methillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), sowie multiresistente Gram-negative Stäbchen (MRGN) und Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) im klinischen Umfeld verbreitet und stellen ein Problem bei der Behandlung multimorbider Patienten dar. Die Langzeitperspektive wird durch das Fehlen neuer antibiotischer Substanzen verschlimmert. So wurden bei der amerikanischen Gesundheitsbehörde (FDA) zwischen 2008 und 2012 nur zwei neue Antibiotika angemeldet.⁶ Viele der aktuell eingesetzten Antibiotika beruhen auf Substanzklassen, die seit den 1960er Jahren bekannt sind.⁷ Trotz vielfältiger Bemühungen von universitärer Forschung und der pharmazeutischen Industrie sind neue Wirkmechanismen schwierig zu finden. In der Medikamentenentwicklung kommen vielfach Hochdurchsatzverfahren^{8,9} zum Einsatz, die es ermöglichen, große chemische Substanzbibliotheken herzustellen und auf antibiotische Wirksamkeit zu testen. Nach der Entdeckung einer neuen antibiotisch wirksamen Substanz folgt die aufwändige Analyse, ob dieser wirklich ein neuer, bislang unbekannter Wirkmechanismus zugrunde liegt. Dafür werden vor allem Genexpressionsanalysen¹⁰ und Tests mit resistenten Bakterienstämmen¹¹ verwendet. Daneben gibt es eine Vielzahl an biochemischen Methoden wie Fluoreszenzmikroskopie¹² und Phagen-Assays¹³ oder die Analyse von Metaboliten¹⁴.

Die Wirkung eines Antibiotikums ruft in vielen Fällen eine Änderung in der Bakterienmorphologie hervor. Die bevorzugte Methode zur Untersuchung dieser Phänomene sind Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie¹⁵ (REM und TEM) sowie hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie^{16,17}. Alle drei Methoden liefern Bilder einzelner Bakterien; für die verlässliche Interpretation der Resultate muss allerdings eine ausreichend große Zahl an Bakterien untersucht werden. Mit TEM erhält man Aufnahmen vom Bakterieninneren in höchster Auflösung im Nanometerbereich, allerdings ist die Probenvorbereitung arbeitsintensiv und erfordert Fixierung, Einbetten und Schneiden von Ultradünnschnitten.¹⁸ Dies verhindert den Einsatz von TEM als Hochdurchsatzverfahren, da die Aufnahme und Analyse einer ausreichend großen Anzahl von Bakterien für jede Substanz zu arbeits- und kostenintensiv ist.

Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) ist eine Methode zur Strukturuntersuchung, mit der Unterschiede in der Elektronendichte auf einer Skala von einem bis wenigen hundert Nanometern nachgewiesen werden können. SAXS liefert keine Bilder, sondern über ein großes Objektensemble gemittelte Streuinformation im Fourierraum. Daher erhält man Informationen über die Nanostruktur der Probe mit guter Statistik. Die wichtigste Anwendung von SAXS ist die Strukturbestimmung^{19,20} und Funktionsanalyse²¹ hydratisierter Proteine. Weitere Beispielanwendungen umfassen die

Charakterisierung von vernetzten Kohlenstoffnanoröhren²², der Orientierung von Mikrofibrillen in humanem Knochengewebe²³, der Morphologie von Melanosomen²⁴, humaner Brustkrebszellen²⁵⁻²⁷ und der Mikrostruktur von Sprengstoffen²⁸. In den letzten Jahren wurden viele SAXS-Apparaturen an Synchrotronstrahlungsquellen weltweit für Hochdurchsatzverfahren optimiert.²⁹ Meist dauern Messungen wenige Sekunden und der Probenwechsel findet in unter einer Minute statt.

Diese Arbeit beschreibt die erstmalige Anwendung von SAXS als Hochdurchsatzverfahren zur Untersuchung antibiotischer Wirkmechanismen. Aus der Streukurve können zusätzlich Informationen über die strukturelle Zusammensetzung von *E. coli*-Bakterien extrahiert werden. Durch Korrelation mit zonenplattenbasierter Röntgenmikroskopie (TXM) als bildgebendes Verfahren mit dem gleichen Kontrastmechanismus und TEM als Verfahren mit bester Auflösung konnten die für Streuung relevanten Strukturen identifiziert werden.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Dieses Kapitel gibt einen Überblick über die für diese Arbeit relevanten theoretischen Grundlagen. Zu Beginn werden die verwendeten antibiotischen Wirkmechanismen diskutiert, dann *Escherichia coli* als Probensystem und im Anschluss die Untersuchungsmethoden Transmissionselektronenmikroskopie, zonenplattenbasierte Röntgenmikroskopie und Röntgenkleinwinkelstreuung.

2.1 Antibiotische Wirkmechanismen

Seit der Entdeckung des Penicillins durch Sir Alexander Fleming im Jahre 1929 wurden viele antibakterielle Wirkstoffe entdeckt und entwickelt. Diese waren sowohl abgewandelte Naturstoffe als auch synthetische Produkte. Das Ziel eines Antibiotikums ist entweder der Tod der Bakterien (bakterizide Wirkung) oder die Inhibierung ihres Wachstums (bakteriostatische Wirkung). Dies geschieht meist durch Störung essentieller biochemischer Prozesse in der Bakterie.³⁰ Die für aktuelle klinisch eingesetzte Antibiotika relevanten Zellprozesse sind in Abbildung 1 gezeigt. Diese Prozesse werden im Folgenden im Kontext der entsprechenden Wirkmechanismen diskutiert.

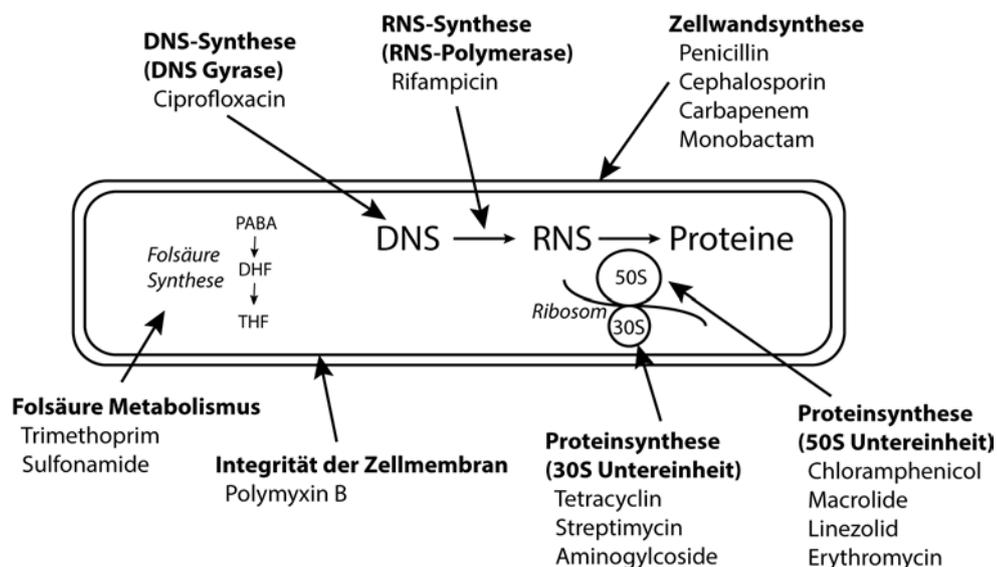


Abbildung 1: Übersicht über die wichtigsten Ziele klinisch verwendeter Antibiotika. Die Mechanismen werden zusammen mit den Antibiotika in den folgenden Abschnitten diskutiert.

ZELLWANDSYNTHESE

Die bakterielle Zellwand dient der Aufrechterhaltung der Zellgeometrie und erlaubt gleichzeitig kontrollierte Transportvorgänge in die Zelle hinein und aus ihr heraus. Bei gram-negativen Bakterien besteht die Zellwand aus einer äußeren und inneren Schicht von Lipopolysacchariden und dem dazwischenliegenden periplasmatischen Raum. In diesem Raum befindet sich die etwa 4 nm dicke Peptidoglycanschicht.

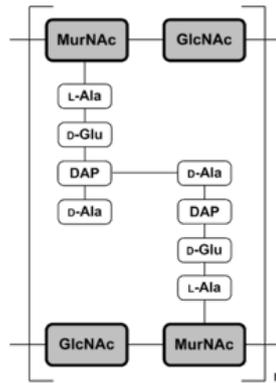


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Peptidoglycanschicht in *E. coli*.³¹

MurNAc = N-Acetylmuraminsäure; GlcNAc = N-Acetylglucosamin; DAP = Diaminopimelinsäure

Die Synthese der Peptidoglycanschicht wird durch β -Lactam-Antibiotika unterbunden. Hierbei bindet der β -Lactam-Ring irreversibel an die bakterielle Transpeptidase-Enzym, sodass die Quervernetzung der in Abbildung 2 gezeigten Mureinsäureketten nicht mehr möglich ist. Penicillin war der erste Vertreter dieser Gruppe von Antibiotika. Nachfolgende Weiterentwicklungen enthalten ebenfalls den charakteristischen β -Lactam-Ring. Als Beispiele für β -Lactame wurden im Rahmen dieser Arbeit Ampicillin, und Piperacillin als derzeit klinisch eingesetzte Breitspektrum-Antibiotika untersucht.

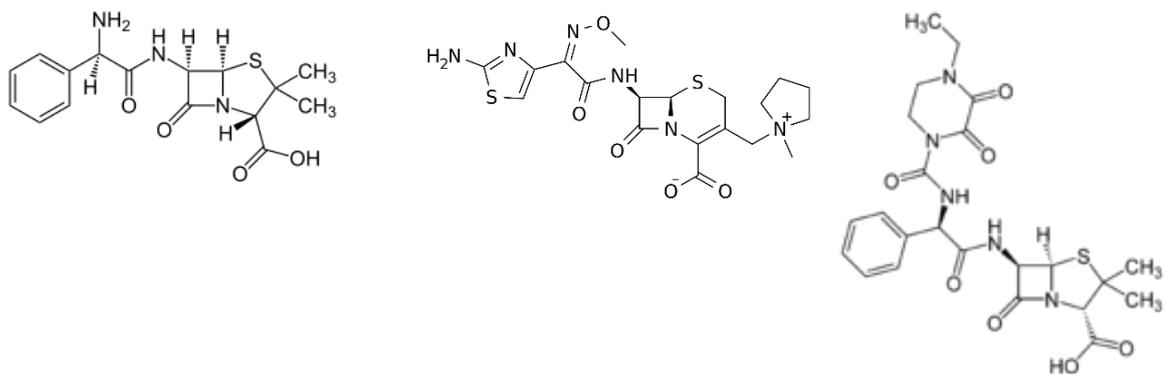


Abbildung 3: Strukturformeln der β -Lactam-Antibiotika von links nach rechts: Ampicillin, Cefepime und Piperacillin.

DNS-REPLIKATION

Eine elementare Funktion der Zelle ist die Vervielfältigung der in der Desoxyribonukleinsäure (DNS) gespeicherten Erbinformation. Dabei müssen die verdrillt vorliegenden DNS-Doppelhelices entspannt und abgelesen werden. Die Aufgabe der Entspannung der DNS wird von den Topoisomeraseenzymen – auch Gyrasen genannt – übernommen. Das Antibiotikum Ciprofloxacin hemmt Topoisomerasen II und IV und verhindert so das Ablesen der Erbinformation. Zur Vorbereitung der Zellteilung dupliziert die Bakterie alle Zellbestandteile. Im Zuge einer Ciprofloxacinbehandlung kann die DNS nicht dupliziert werden, und daher die Zellteilung kann nicht abschließend durchgeführt werden. In der Konsequenz entstehen überlange Bakterienzellen. Ciprofloxacin wirkt nur auf Bakterien in der Wachstumsphase, da nur hier eine Replikation der Erbinformation stattfindet. Ciprofloxacin wirkt vor allem auf gram-negative Bakterien und findet z.B. bei Infektionen des Urogenitaltrakts klinische Anwendung

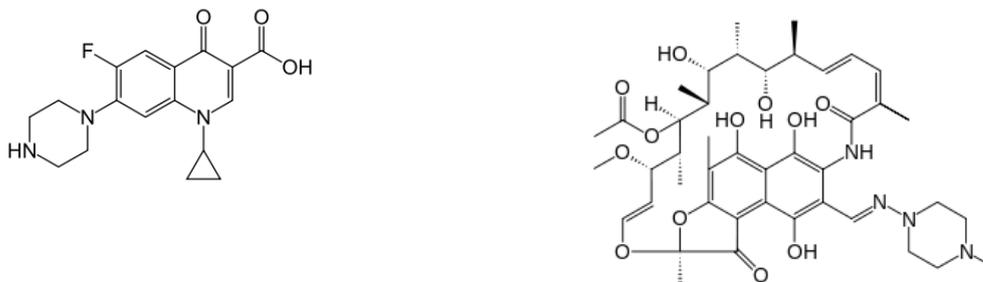


Abbildung 4: Strukturformel von Ciprofloxacin (links) und Rifampicin (rechts).

INHIBIERUNG DER RNS-SYNTHESE

Die Aufgabe der RNS ist die Umsetzung der in der DNS gespeicherten Erbinformationen in Proteine (mRNS), als katalytische Bestandteile des Ribosoms (rRNS) und als Transporter der Proteinbausteine (tRNS). Die DNS-abhängige RNS-Polymerase übersetzt die Information der DNS in RNS, dieser Prozess wird als Transkription bezeichnet.

Rifampicin inhibiert RNS-Polymerase durch eine Bindung in der Nähe des katalytisch aktiven Zentrums. Hierbei wird die Bildung einer Phosphodiesterbindung, die Verknüpfung von zwei RNS-Molekülen durch sterische Wechselwirkung unterbunden.³² Die Transkription kommt zum Erliegen und in der Konsequenz lösen sich die Transkriptionsfoki der Ribosomsynthese auf, der Nukleoid entspannt sich und expandiert.³³ Die im Nukleoid als verdrillte Fasern vorliegende DNS (80 nm und 30 nm) zerfällt nach der Zugabe von Rifampicin zu den elementaren 10 nm-Fasern, bestehend aus DNS und Proteinen.³⁴

Heutzutage findet Rifampicin nur noch in der Tuberkulosetherapie klinische Anwendungen

INHIBIERUNG DER PROTEINSYNTHESE

Eine zentrale Funktion der Zelle ist die Synthese neuer Proteine im Ribosom, genannt Translation. Die Information der in der Transkription hergestellten mRNA wird abgelesen und die entsprechenden Proteine synthetisiert. Das prokaryotische Ribosom besteht aus der größeren 50S-Untereinheit und der kleineren 30S-Untereinheit, wobei sich das katalytisch aktive Zentrum zwischen beiden Untereinheiten befindet. Die Translation lässt sich in drei verschiedene Schritte aufteilen (Abbildung 5):

- 1) Bindung einer passenden tRNA mit Aminosäure an die mRNA an der Akzeptor-Position (A-Stelle in Abbildung 5).
- 2) Ausbildung einer Peptidbindung zur vorangehenden Aminosäure an der Peptidyl-Position (P-Stelle in Abbildung 5).
- 3) Verschiebung der mRNA und Bindung einer neuen tRNA

Am Ribosom greifen unterschiedliche Wirkstoffklassen an, die alle die Proteinsynthese inhibieren.³⁵

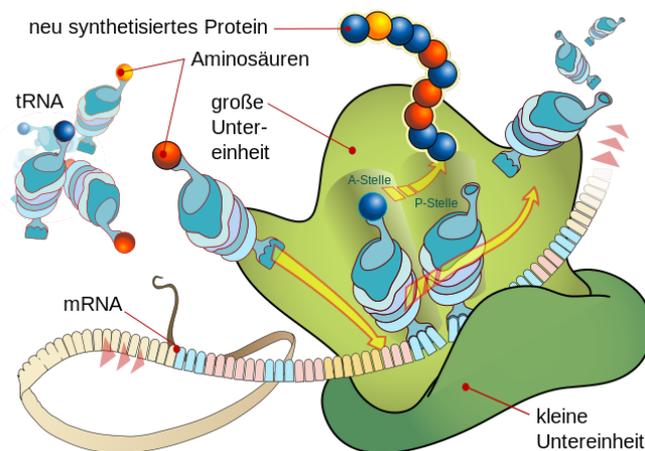


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Translation in einer prokaryotischen Zelle wie z.B. *E. coli*. Aus der in der mRNA enthaltenen Information wird eine Proteinkette synthetisiert. Hierzu bindet eine tRNA mit passender Sequenz an die Akzeptorstelle (A-Stelle). Im nächsten Schritt wird an der Peptidylstelle (P-Stelle) die Aminosäure der tRNA an die neu synthetisierte Peptidkette angehängt. Im dritten und letzten Schritt verlässt die tRNA das Ribosom. Abbildung von M.M., Creative Commons³⁶.

Chloramphenicol

Chloramphenicol bindet an der 50S-Untereinheit des Ribosoms und bewirkt eine reversible Konformationsänderung des Ribosoms. Die Konsequenz ist, dass die Ausbildung einer neuen Peptidbindung zwischen zwei Aminosäuren unterbunden wird und damit die Proteinsynthese zum Erliegen kommt. Die Folge ist eine reversible Inhibierung der Proteinsynthese. Hierdurch entfällt mit der Synthese von Membranproteinen durch die Kopplung von Translation und Transkription auch die Assotiation des Nucleoids an die Zellwand.³⁷ Die fortgesetzte

Transkription wirkt dann als kompaktierende Kraft. Morphologisch kollabiert der Nukleoid in eine kompakte, elliptische Form in der Zellmitte.³⁸ Chloramphenicol wurden von neueren antibiotischen Substanzen abgelöst und werden auf Grund des ungünstigen Nebenwirkungsprofils nur noch als Reserveantibiotikum verwendet.

Tetracyclin

Der Proteinsynthese-Inhibitor Tetracyclin blockiert sterisch die Anlagerung neuer tRNS an die Akzeptor-Position des Ribosoms.³⁵ Dies ist aus Kristallstrukturen des Ribosoms mit Tetracyclin in der Nähe der Akzeptorposition bekannt.³⁹ Morphologisch kollabiert der Nukleoid in eine kompakte, elliptische Form in der Zellmitte.³⁸ Es wird vermutet, dass dies wie bei Chloramphenicol eine Folge von angehaltener Translation und fortgesetzter Transkription ist. Eine wichtige klinische Anwendung von Tetracyclin ist die Bekämpfung von zellwandlosen Bakterien die Infektionskrankheiten wie zum Beispiel Borreliose auslösen.



Abbildung 6: Strukturformeln von Tetracyclin (links) und Chloramphenicol (rechts)

Aminoglykoside

Aminoglykoside sind wie der Name sagt, aus einzelnen Aminoglukosemolekülen aufgebaut. Trotz ähnlicher struktureller Bausteine haben sie verschiedene Wirkmechanismen.⁴⁰ Ein Großteil dieser Mechanismen hat das Ribosom zum Ziel.⁴¹ Im Rahmen dieser Arbeit wurden die strukturell eng verwandten Aminoglykoside Kanamycin und Gentamycin untersucht.



Abbildung 7: Strukturformeln der Aminoglykoside Kanamycin (links) und Gentamycin (rechts).

Am Ribosom binden beide in der Nähe der Akzeptor-Position, an der die neue tRNS an das passende Segment der mRNA (Codon) bindet. Die folgende Verzerrung der Ribosomstruktur führt zu einem Verlust der Selektivität bei der Bindung neuer tRNS. Die Folge ist, dass die neu synthetisierten Proteine fehlerhafte Stellen aufweisen und ihre Funktion in der Zelle nicht ausführen können.⁴² Gleichzeitig kommt es auch zu einer Reduzierung der Syntheseraten. Ein

wichtiges klinisches Anwendungsgebiet ist die Behandlung der Endokarditis (Entzündung der Herzinnenhaut).

ZERSTÖRUNG DER ZELLWAND

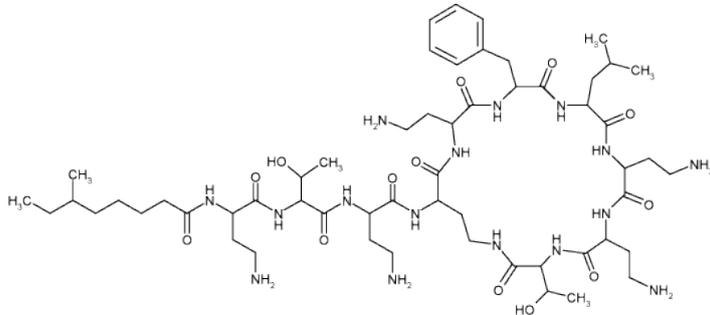


Abbildung 8: Strukturformel des Lipopeptids Polymyxin B.

Polymyxin B ist ein zyklisches Polypeptid, das bei physiologischem pH als kationisches Detergens vorliegt. Es destabilisiert die bakterielle Zellmembran durch Bindung an die negativ geladenen Bereiche der Polysaccharidschicht mit dem positiv geladenen, zyklischen Teil des Moleküls. Der Fettsäureanteil löst sich im hydrophoben Teil der Zellmembran und führt zu einer Auflösung der Membranintegrität. Die Konsequenz ist der Verlust von Zellmaterial sowie das Eindringen von Umgebungssubstanzen in die Zelle. Polymyxin sind neuro- und nephrotoxisch und sind daher Reserveantibiotika auf die nur zur Bekämpfung multiresistenter *Pseudomonas aeruginosa* und Enterobakterien verwendet werden.

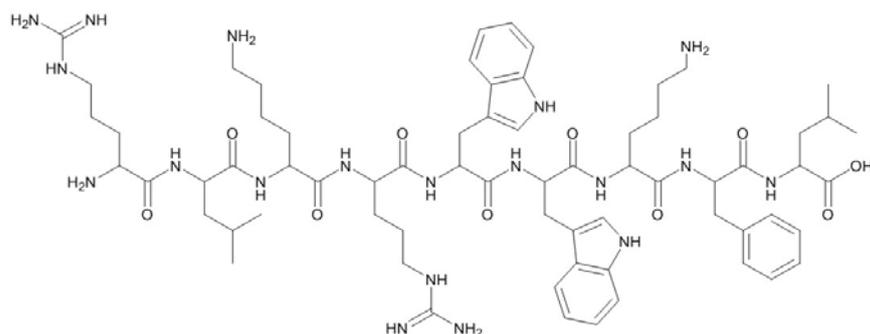
BEISPIEL FÜR NEUE WIRKSTOFFE: KURZE, KATIONISCHE PEPTIDE

Abbildung 9: Das als Beispiel für das kurze kationische Peptid (RLKRWWKFL), als Vertreter einer potenten neuen Substanzklasse.

Eine neue vielversprechende Substanzklasse mit einem neuen Wirkmechanismus sind kurze, kationische Peptide. In bisherigen Arbeiten anderer Gruppen wurde ein System zur schnellen Synthese und schnellem Test verschiedener Aminosäuresequenzen entwickelt⁴³ und neue potentiell interessante Kandidaten mit künstlicher Intelligenz vorhergesagt.⁴⁴ Erste Patente für vielversprechende Vertreter dieser Substanzklasse wurden bereits erteilt.⁴⁵ In dieser Arbeit wurde das kurze kationische Peptid mit der Sequenz, RLKRWWKFL verwendet. Es gibt bislang keine Erkenntnisse über den Wirkmechanismus dieses Peptids beziehungsweise der Wirkstoffklasse, oder das Ziel in der bakteriellen Zelle.

2.2 *Escherichia coli* als Modellsystem

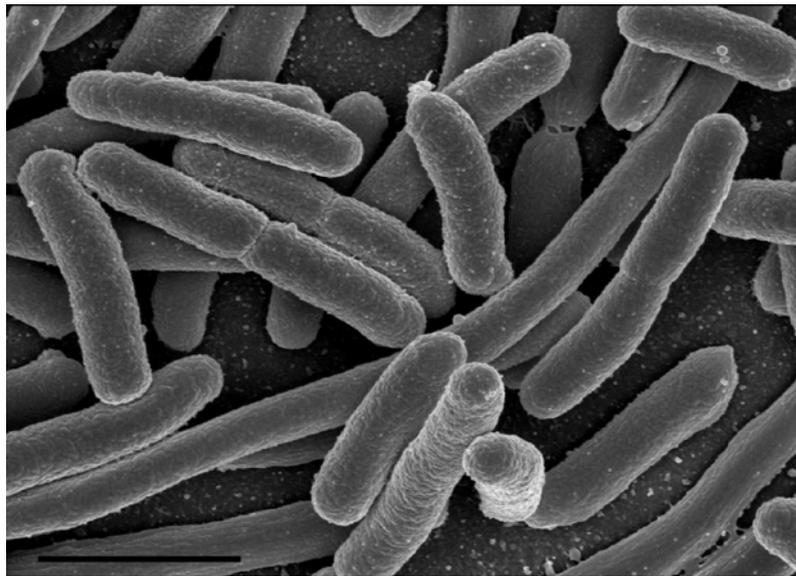


Abbildung 10: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Escherichia coli*. Der Skalierungsbalken hat eine Länge von 2 μm . Abbildung von Rocky Mountain Laboratories, Creative Commons.⁴⁶

Escherichia coli ist ein stäbchenförmiges Enterobakterium, das nach seinem Entdecker, dem deutschen Kinderarzt Theodor Escherich benannt wurde. Es zählt zu den bestuntersuchten Prokaryoten und ist ein Modellorganismus der biochemischen Forschung. Das vollständige Genom von *E. coli* wurde 1997 sequenziert.⁴⁷ Die äußere Form ist zylindrisch, mit einem Durchmesser von 0,5 μm bis 1 μm und einer Länge von 2 μm bis 4 μm . Das innere der Zelle ist anders als bei eukaryotischen Zellen nicht in verschiedene Kompartimente unterteilt. Wichtige Bestandteile einer Bakterienzelle sind Proteine (etwa 2,5 Mio⁴⁸, im Mittel ca. 3 nm Durchmesser)⁴⁹ und Ribosomen (ca. 20 nm Durchmesser).⁵⁰ Die Konzentration der Makromoleküle in der bakteriellen Zelle wird hierbei auf 0,3 bis 0,5 g/ml geschätzt.⁵¹ *E. coli* ist ein wichtiges Testsystem für Antibiotika gegen gram-negative Bakterien. Mechanistische Untersuchungen verwenden häufig an *E. coli* als Modellsystem durchgeführt. Dies gilt auch für die morphologische Konsequenz von antibiotischer Behandlung, die in der Literatur mit kryo-TEM⁵² und Fluoreszenzmikroskopie^{16,17,37} beschrieben wurden. Zudem wurden die wichtigsten Untersuchungen zur Form des Nukleoids^{38,53} ebenfalls in *E. coli* durchgeführt.

DNS – PLASMA – DER NUKLEOID

Die Erbinformation wird in helixförmigen Desoxyribonukleinsäuremolekülen (DNS) gespeichert. Da die Gesamtlänge der DNS ein Vielfaches der Zellgröße wäre, wird die DNS zu superhelikalen Strukturen aufgewickelt und dabei kompaktiert. Der DNS-reiche Teil der Zelle wird als Nukleoid bezeichnet und befindet sich im Zentrum der Zelle,⁵⁴ entlang der Längsachse des Bakteriums und nimmt weniger als $\frac{1}{4}$ des Zellvolumens ein.⁵⁵ Bei sich in exponentiellem Wachstum befindenden Bakterien ist der Nukleoid über die ganze Zelle verteilt.⁵³ Der Nukleoid hat einen

hierarchischen Aufbau. Die kleinste Einheit, eine von histonähnlichen Proteinen umgebene DNS-Faser hat einen Durchmesser von 10 nm und wird mit RNS-Molekülen zu einer Faser mit 30 nm Durchmesser gefaltet. Diese Faser verdrillt sich zur größten Einheit, einer Faser mit 80 nm Durchmesser.⁵⁶ Die Form des Nukleoids hängt von den Wachstumsbedingungen der Zelle ab und wird auch durch eine Behandlung mit verschiedenen Antibiotika variiert.

In der exponentiellen Wachstumsphase ist der Nukleoid in der ganzen Zelle verteilt. Hierbei befinden sich Genomsequenzen auf denen die Struktur der Ribosomen codiert ist in räumlicher Nähe. Diese Zentren werden Transkriptionsfoki genannt.³⁸ In der stationären Phase ist der Nukleoid im Zentrum der Zelle lokalisiert.¹⁷ Die DNS im Nukleoid kann angefärbt werden um die Folgen eines Antibiotikums auf den Nukleoid zu verfolgen. Hierfür ist ein Beispiel aus der Literatur¹⁷ in Abbildung 11 gezeigt. Die DNS-abhängige RNS-Polymerase als strukturbestimmendes Enzym wurde mit grünfluoreszierendem Protein (GFP) angefärbt. Die DNS wurde mit dem Farbstoff DNS-DRQ5 angefärbt. Als Folge einer Antibiotikabehandlung mit Chloramphenicol (Abbildung 11c) ist der Nukleoid im Zellkern kondensiert.³⁸ Eine Rifampicinbehandlung führt hingegen zur Verteilung in der ganzen Bakterienzelle (Abbildung 11b).³⁸

Im aktuell bedeutendsten Modell zur Struktur des Nukleoids von Jin et al.¹⁷ wird die DNS-abhängige RNS-Polymerase (RNAP) als strukturbestimmendes Enzym identifiziert. Während der Transkription wird nur ein kleiner Teil der gesamten Genomsequenz abgelesen, die sich an verschiedenen Stellen des Ribosoms befinden. Viele der Transkriptionsvorgänge finden in räumlicher Nähe zueinander statt. Da die DNS ein einzelnes, zusammenhängendes Molekül ist, erzeugt dies Spannung und verdrillt die DNS unabhängig von den existierenden superhelikalen Strukturen. Laut diesem Modell führt die Hemmung der RNAP durch Rifampicin daher zu Entspannung der Transkriptionsfoki und damit zu einer Expansion des Nukleoids.

Ein weiterer wichtiger vorgeschlagener Mechanismus ist die „Transertion“⁵⁷, der die Kopplung von Transkription (Synthese der RNS aus DNS), Translation (Synthese der Proteine aus RNS) und Transfektion (Transport von Proteinen aus der Zelle oder in die Membran) bezeichnet. Diese Vorgänge finden in räumlicher Nähe zueinander statt und assoziieren so Teile des Nukleoids mit der Zellwand.

Eine Behandlung mit Chloramphenicol hemmt die Proteinsynthese und damit auch die Transertion. Die nicht blockierte Transkriptionsaktivität führt ohne diese expandierende Kraft zu einer Kondensation des Nukleoids. Wenn im Anschluss an eine Chloramphenicolbehandlung die Zelle mit Rifampicin behandelt wird und damit zusätzlich die Transkription gehemmt wird, entspannt sich der kondensierte Nukleoid wieder.³⁷

Weitere vorgeschlagene Mechanismen sind die Kompaktierung des Nukleoids durch hohe Moleküldichten im Cytoplasma (Molecular Crowding)^{50,51,58} und der durch die Histon-ähnlichen Proteinen entlang der DNS gesteuerte Topomerase I Aktivität.^{59,60} Die Topomerasen regulieren die superhelikale Struktur der DNS und damit dann auch die Form des Nukleoids.

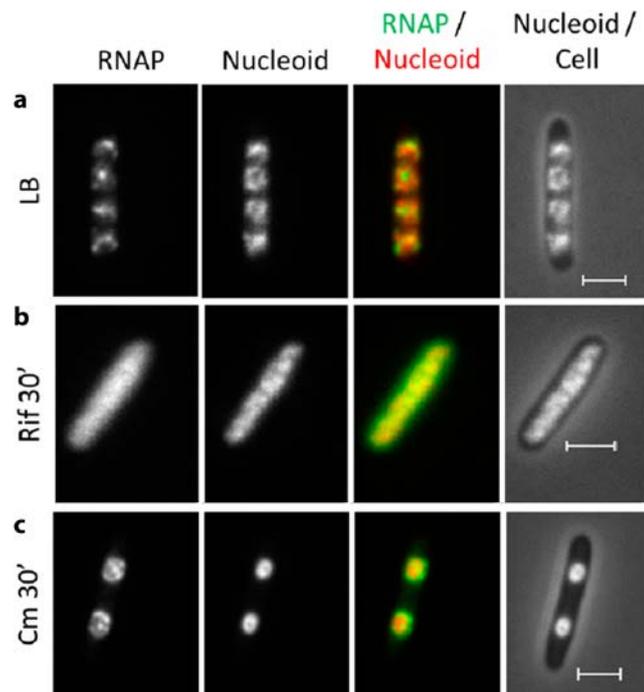


Abbildung 11: Fluoreszenzaufnahmen von *E. coli* behandelt mit verschiedenen Antibiotika. Die DNS abhängige RNS-Polymerase wurde mit einem grünfluoreszierenden Protein (GFP) markiert. a) Unbehandelten *E. coli* in Luria-Medium (LB) in der exponentiellen Wachstumsphase. b) Mit Rifampicin behandelte *E. coli* nach 30 min Inkubationszeit. c) Mit Chloramphenicol behandelte *E. coli* nach 30 min Inkubationszeit. Die Bakterien wurden vor den Mikroskopieaufnahmen mit Glutaraldehyd fixiert. Abbildung aus Jin et al., Chemical Reviews (2013), ACS Publishing Group.¹⁷

2.3 Methoden zur Strukturanalyse von *E. coli*

Eine Antibiotikabehandlung verändert wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben die Morphologie von *E. coli*-Bakterien. Hier gibt es eine Vielzahl an Methoden um diese Unterschiede sichtbar zu machen oder zu detektieren. Das omnipotente Verfahren, das zur Lösung aller Fragestellungen eingesetzt werden kann, wurde allerdings noch nicht gefunden. Vielmehr gilt es Probleme durch eine effiziente Kombination der zur Verfügung stehenden Mittel zu lösen.

Das erste verfügbare bildgebende Verfahren war die Lichtmikroskopie. Hier ist die Auflösung nach Abbe durch die Wellenlänge des Lichts limitiert auf ca. 200 nm. Die innere Struktur einer Bakterie kann hiermit nur bedingt wiedergegeben werden. In einem modernen Verfahren, der Fluoreszenzmikroskopie, der photoaktivierten Lokalisationsmikroskopie (PALM, STORM und STED), werden einzelne Fluoreszenzmarker in der Probe selektiv aktiviert, um ein Überlappen zweier Marker zu vermeiden.^{61,62} Hiermit ist eine Auflösung im Nanometerbereich möglich, die Visualisierbarkeit beschränkt sich jedoch auf fluoreszenzmarkierte Strukturen in der Zelle.^{63,64} So kann der strukturelle Aufbau basierend auf der natürlichen Elektronendichte nicht dargestellt werden.

Röntgenstrahlen oder Elektronen haben eine kürzere Wellenlänge und ermöglichen den strukturellen Aufbau einer *E. coli* Bakterie mit hoher Auflösung darzustellen. Beachtet werden muss hierbei allerdings, dass die höhere Energie von Röntgenphotonen oder Elektronen eine Strukturveränderung in der Probe hervorrufen kann.^{65,66} Diese Strahlenschäden waren eine wichtige Motivation für die Entwicklung von Probenvorbereitung bei tiefkalten Temperaturen. Hier spricht man von einer kryogenen Probenumgebung, die Strahlenschäden effektiv verzögert.⁶⁷ So sind beispielsweise Carbonylbindungen besonders von Strahlenschäden betroffen. Hier zeigt sich, dass der Bruch der Carbonylbindung zwar temperaturunabhängig stattfindet, der Verlust von Sauerstoffmolekülen jedoch stark temperaturabhängig ist.⁶⁸

Die während einer Messung in der Probe deponierte Strahlendosis limitiert die erreichbare Auflösung. Abbildung 12 zeigt den empirischen Zusammenhang von Auflösung und maximal tolerierbarer Strahlendosis.⁶⁹

Mit Elektronenmikroskopie kann an kryogenen biologischen Proben eine Auflösung im Nanometerbereich erreicht werden. Für Transmissionselektronenmikroskopie wurde auch die Einbettung von vollständig hydratisierten Proben in eine tiefkalte amorphe Eismatrix entwickelt. Um eine Kristallisation des Wassers zu verhindern müssen die Kühlraten mindestens 10^4 K s^{-1} betragen.^{70,71} Diese Form der Probenpräparation ermöglicht es biologische Proben in ihrer natürlichen Umgebung zu abbilden und den nativen Kontrast der Unterschiede in der Elektronendichte zu untersuchen. Die geringe Eindringtiefe der Elektronen erfordert es, die interne Struktur biologischer Proben an Dünnschnitten mit etwa 100 nm Dicke zu untersuchen. Um ganze *E. coli*-Bakterien zu untersuchen benötigt man die höhere Eindringtiefe von Röntgenstrahlung. Röntgenmikroskopie ist Mikroskopie mit Röntgenstrahlung. Hier wird

mithilfe diffraktiver Optiken eine Abbildung der Probe erzeugt. Aus tomographischer Aufnahmen entsteht so ein dreidimensionaler Überblick über die interne Struktur.^{72,73} Nach dem für bildgebende Verfahren gültigen Rose-Kriterium⁶⁹ gibt es für zum Erreichen jeder Auflösung eine notwendige Strahlendosis. Für Röntgenmikroskopie mit weichen Röntgenstrahlen liegt diese Auflösungsgrenze bei 10 nm (Abbildung 12).

Neben bildgebender Mikroskopie lassen sich Strukturinformation auch mithilfe von Streuverfahren gewinnen. Das wichtigste Beispiel ist die Kristallographie. Hier wird Strukturinformation auf atomarer Skala als Mittel über viele identische Einheiten erhoben. Die Verteilung der Strahlendosis auf viele Objekte senkt die Strahlendosis für die individuelle Probe. Röntgenkleinwinkelstreuung ist ebenfalls eine Streumethode die ein großes Objektensemble auf einmal untersucht. Allerdings sind die Objekte hier nicht in einen Kristallgitter angeordnet sondern zumeist hydratisiert in einer Lösung. In jüngster Zeit gab erste Ansätze für die Verwendung von kryogener Probenumgebung bei SAXS-Experimenten.⁷⁴

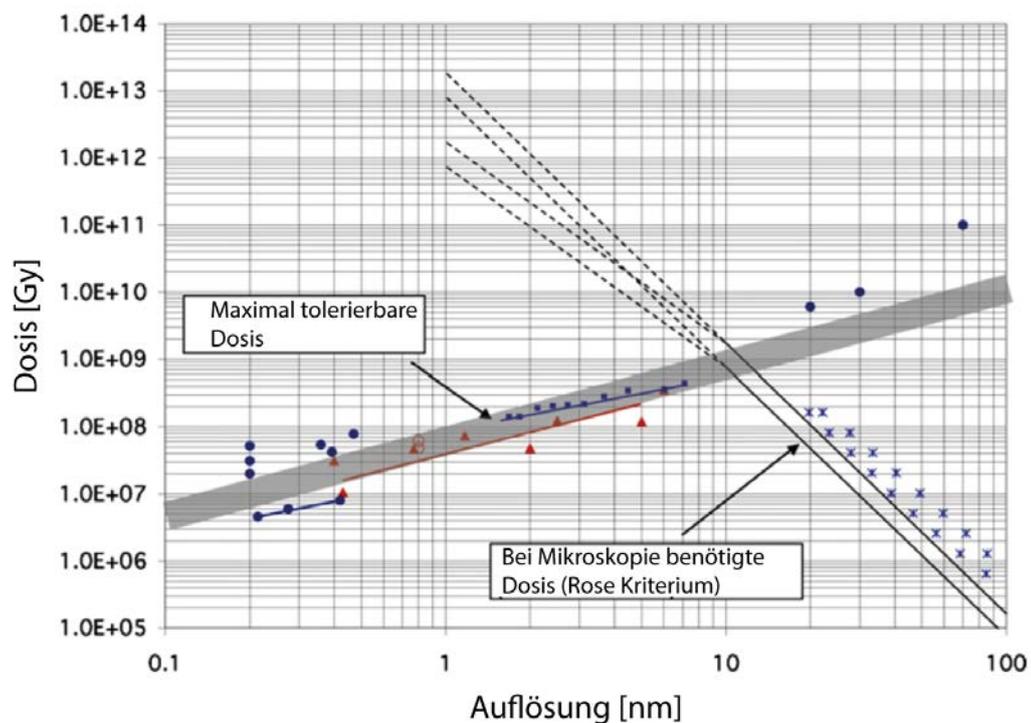


Abbildung 12: Übersicht über die maximal tolerierbare und die für bildgebende Verfahren benötigte Strahlendosis (Rose-Kriterium). Die maximal tolerierbare Dosis wurde aus Literaturdaten abgeschätzt und die nach dem Rose-Kriterium benötigte Dosis für ein Modellprotein bei einer Energie von 1 keV berechnet. Die Symbole bezeichnen in der Literatur durchgeführte Messungen. Die Sternchen sind Röntgenmikroskopieaufnahmen, die gefüllten Kreise sind Röntgenkristallographieexperimente. Abbildung aus Howells et al., *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* (2009), Elsevier.⁷⁵

2.3.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Das erste Transmissionselektronenmikroskop (TEM) wurde von Max Knoll und Ernst Ruska gebaut.⁷⁶ Seither ist es zu einer der wichtigsten hochauflösenden Analysemethoden von Gewebeschnitten im klinischen Umfeld sowie biologischen und materialwissenschaftlichen Proben in der Forschung geworden. So kann bei kristallinen Proben eine atomare Auflösung⁷⁷ erreicht werden während die Auflösung bei biologischen Proben typischerweise im Nanometer Bereich liegt. Bei der TEM-Mikroskopie wird die Probe von einem Elektronenstrahl durchleuchtet. Hierbei werden Elektronen abhängig von der lokalen Elektronendichte absorbiert und transmittierten Elektronen mit einem Flächendetektor detektiert. Für eine einwandfreie Durchführung von TEM-Messungen ist eine ausreichend dünne Probe (< 100 nm) notwendig.

Da sich die Probe im Vakuum befindet müssen biologische Proben entsprechend vorbereitet werden. Konventionelle Probenvorbereitung⁷⁸ enthält die Fixierung der Probe, meist mit einem Aldehyd, gefolgt von einem Einbettungsschritt in ein Polymerharz.⁷⁹ Zur Verstärkung des Kontrasts werden die Proben mit Schwermetallverbindungen gefärbt. Eine klassische Kombination sind Osmiumtetroxid,⁸⁰ Uranylacetat und Bleicitrat.⁸¹ Osmiumtetroxid fixiert vor allem die Lipidstruktur einer Zelle und färbt dank seiner hohen Elektronendichte vor allem die Doppelbindungen ungesättigter Fette sowie Aminosäuren mit ungesättigten Kohlenstoffdoppelbindungen.^{58,81} Uranylacetat färbt Proteine durch Bindung an die Carboxylgruppen und Amidgruppen.⁸² Außerdem bindet Uranylacetat an die Phosphatgruppen von DNS und RNS.⁸¹ Bleicitrat verstärkt die Färbungen von Osmiumtetroxid und Uranylacetat. Hierbei wird angenommen, dass es sich als positiv geladenes Ion vor allem mit negativ geladenen, osmiumfixierten Zellstrukturen anlagert.⁸² Eine ähnliche Verstärkung wurde auch für Uranylacetat gefärbte Regionen beobachtet.⁸¹

Diese Schwermetallfärbungen machen Zellstrukturen sichtbar, verzerren aber den natürlichen Kontrast. Um diesen zu erhalten wird Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie ein. Hier wird die Probe bei in einer Matrix aus amorphem Eis eingebettet und bei Temperaturen von unter -135° C analysiert.⁸³ So kann eine biologische Probe in hydratisierter Form mit den nativen Unterschieden in der Elektronendichte untersucht werden.

2.3.2 Zonenplattenbasierte Vollfeld-Röntgenmikroskopie

Die im vorangestellten Abschnitt beschriebene Transmissionselektronenmikroskopie ist ideal um die interne Struktur einer biologischen Probe anhand von Dünnschnitten mit typischerweise 100 nm Dicke zu untersuchen. Die geringe Eindringtiefe der Elektronen verhindert aber eine Betrachtung einer ganzen Zelle oder eines Bakteriums.⁸⁴ Diese höhere Eindringtiefe kann mit Photonen im Röntgenbereich erzielt werden. Besonders geeignet ist hierfür das sogenannte „Wasserfenster“, bei Photonenenergien zwischen 280 eV und 540 eV. Bei diesen Photonenenergien besteht eine im Absorptionskontrast von Sauerstoff und Kohlenstoff von etwa einer Größenordnung (Abbildung 13).⁸⁵ Außerdem ist innerhalb dieses Intervalls die für eine bestimmte Auflösung benötigte Strahlendosis am geringsten.⁶⁵ Mithilfe von einer kryogenen Probenumgebung können einerseits Strahlenschäden verzögert werden und andererseits hydratisierte biologische Proben mit den nativen Unterschieden in der Elektronendichte dargestellt werden.⁸⁶ Um einen ausreichenden Kontrast bei angemessener kurzer Belichtungszeit zu erzielen, wird die zonenplattenbasierte Vollfeld-Röntgenmikroskopie vorwiegend an Synchrotronquellen⁸⁷ mit hohem Photonenfluss durchgeführt.

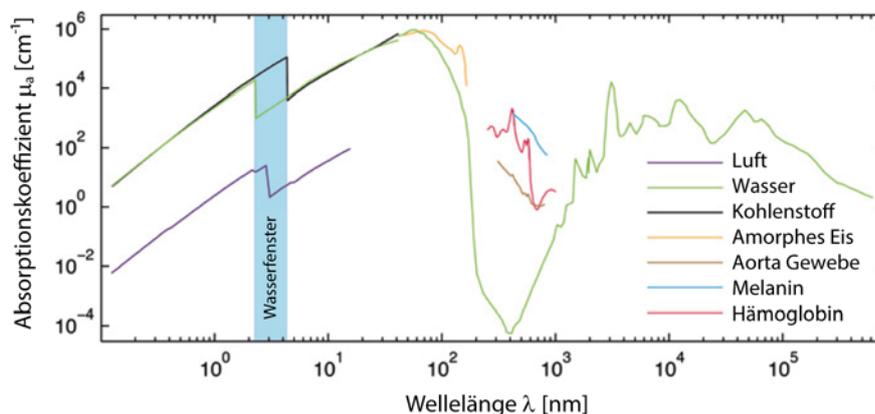


Abbildung 13: Absorption von atmosphärischer Luft, Wasser, Kohlenstoff und organischem Material bei über einen weiten Spektralbereich von Röntgenstrahlung über sichtbares Licht bis zu infraroter Strahlung. Im Bereich von Röntgen- und UV-Strahlung ist außerhalb des sog Wasserfensters die Absorption von Wasser und Kohlenstoff sehr ähnlich. Abbildung aus Gorniak et al., Zeitschrift für Physikalische Chemie (2014), De Gruyter.⁸⁸

Tomographie-Aufnahmen ermöglichen es, ganze eukaryotische Zellen mit ihren einzelnen internen Kompartimenten zu untersuchen.^{89,90} Röntgenmikroskopie verwendet analog zu optischer Mikroskopie optische Elemente zur Fokussierung und als Objektive. Moderne Röntgenmikroskopie verwendet hierfür Fresnel-Zonenplatten als runde Diffraktionsgitter mit steigender Liniendichte. Eine Fresnel-Zonenplatte besteht aus N transparenten und opaken Zonen. Die Zonenbreite wird so gewählt, dass sich die Pfadlänge nebeneinanderliegender transparenter Zonen um m Wellenlängen λ unterscheiden (Abbildung 14). Dadurch kommt es im Fokus zu einer konstruktiven Interferenz.

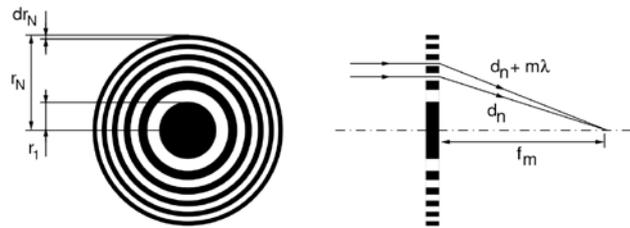


Abbildung 14: Schematische Darstellung einer binären Zonenplatte, mit N Zonen und Radius r_N mit Blick in Strahlrichtung (links) und im Querschnitt (rechts). Die Strahlen der Transparenten Zonen interferieren konstruktiv wenn die Pfadlänge nebeneinanderliegender Zonen einer Diffraktionsordnung m sich um m Wellenlängen unterscheiden. Abbildung aus Wiesemann, Dissertation, Universität Göttingen (2003).⁹¹

Anhand des Rayleigh Kriteriums ($\delta_R = \frac{0.61\lambda}{NA}$) mit der numerischen Apertur NA ergibt sich eine maximale Auflösung von $\delta_R = 1,22 r_N$. Die Weite der äußersten Zone bestimmt also die Auflösung. Der schematische Aufbau eines zonenplattenbasierten Vollfeld-Röntgenmikroskops ist in Abbildung 15 gezeigt und ist analog zur Lichtmikroskopie.⁷⁵ Monochromatische Röntgenstrahlung wird mithilfe einer Kondensor-Optik auf die Probe fokussiert. Der beleuchtete Ausschnitt wird mithilfe einer Objektiv-Zonenplatte, auf einen Detektor abgebildet. Auch dieser Vorgang verläuft analog zur Abbildung eines Objekts in der Lichtmikroskopie. Die Vergrößerung der Abbildung kann über den Abstand des Detektors reguliert werden.

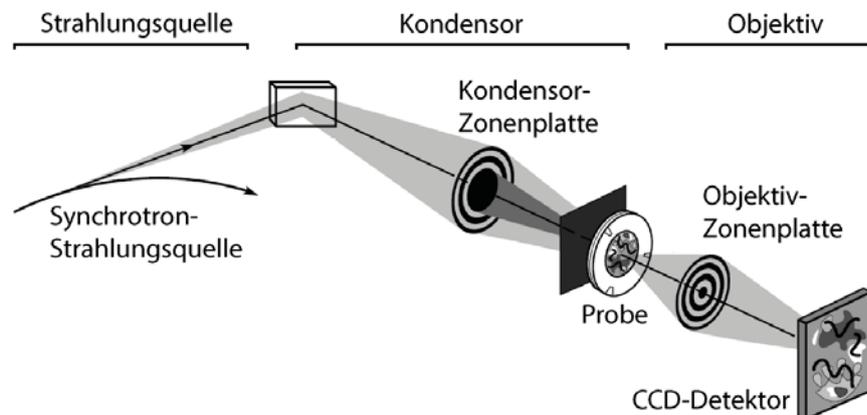


Abbildung 15: Schema eines zonenplattenbasierten Vollfeld-Röntgenmikroskops. Ein mithilfe von Kondensor-Optiken fokussierter Röntgenstrahl leuchtet einen definierten Bereich auf der Probe aus. Mithilfe einer Fresnel-Zonenplatte als Objektivzonenplatte wird dieser Bereich auf einen 2D-Detektor abgebildet. Optional kann der Fokussierte Röntgenstrahl mit einer Lochblende zugeschnitten werden. Dieser Aufbau wurde auch am Mikroskop UE41-TXM, BESSY II, Berlin verwendet. Bei kryo-TXM mit HORST wurde mit der Fokussierung des Strahlrohrs U49-2/PGM-1, BESSY II, Berlin gearbeitet und nur eine Objektivzonenplatte verwandt. Abbildung aus Chao et al., Nature (2005), Nature Publishing Group.⁷⁵

Der in Abbildung 15 gezeigte Aufbau wurde in dieser Form mit Kapillarkondensator und Objektivzonenplatte am Mikroskop UE41-TXM bei BESSY II verwendet. Beim Einsatz von zonenplattenbasierte Vollfeldmikroskopie in der Röntgenstreuammer HORST wurde mit der Fokussierung des Strahlrohrs gearbeitet und auf eine Kondensor-Optik verzichtet.

2.3.3 Röntgenkleinwinkelstreuung

Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS von engl: Small Angle X-ray Scattering) ist eine Methode zur Strukturuntersuchung auf einer Längenskala von einem bis wenigen hundert Nanometern. Im Jahre 1938 entdeckte André Guinier⁹² die grundlegenden Prinzipien und 1955 baute er mit Gérard Fournet die erste SAXS-Apperatur.⁹³ Der grundlegende Aufbau ist bestechend einfach (Abbildung 16), ein monochromatischer Röntgenstrahl beleuchtet die Probe und die gestreuten Photonen werden mit einem Detektor aufgezeichnet.

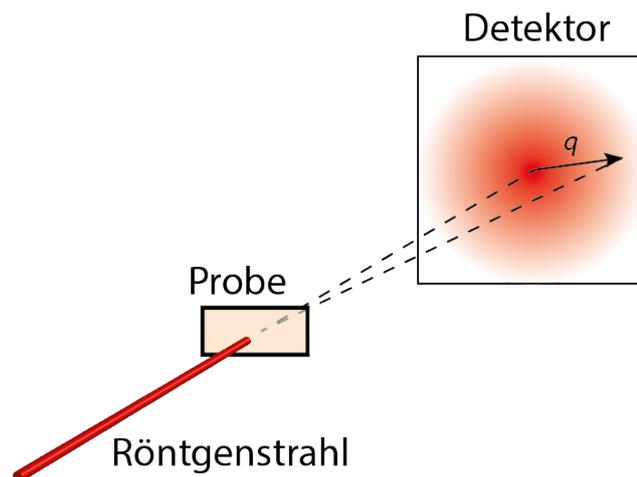


Abbildung 16: Skizze eines Röntgenstreuungsexperiments. Die von der Probe gestreuten Photonen werden detektiert. Nach radialer Integration erhält man die Streuintensität $I(q)$ als Funktion des Streuvektors (q).

Der Streuprozess kann folgendermaßen visualisiert werden: die Elektronen in der Probe oszillieren mit der Frequenz der Röntgenstrahlung und emittieren Sekundärwellen, die miteinander interferieren.⁹⁴ In der Probe häufig vorkommende Strukturgrößen führen zu positiver Interferenz. Da nicht atomare sondern übergeordnete Strukturen betrachtet werden, sind Unterschiede in der Elektronendichte der signalgebende Kontrast. Wenn das Streubild isotrop ist, also zum Beispiel eine zufällige Anordnung der Partikel in der Lösung vorliegt, erhält man durch radiale Integration die eindimensionale Streukurve $I(q)$ als Funktion des Streuvektors q . Der Betrag des Streuvektor q lässt sich aus der Bragg-Bedingung für einen Impulsübertragung herleiten und ist:

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

Hierbei ist λ die Wellenlänge des Röntgenstrahls und θ der Streuwinkel.⁹⁴ In dieser Arbeit wird die Bezeichnung q als Betrag des Streuvektors verwendet.

Die wichtigsten Probeneigenschaften und ihre Auswirkung auf die Streukurve sind in Abbildung 17 am Beispiel monodisperser Kugeln, Zylinder und einer fraktalen Struktur in isotroper Lösung gezeigt. Die Größe der Körper lässt sich anhand der lokalen Minima bestimmen, die Sichtbarkeit höherer Ordnungen wird vom Grad der Monodispersität bestimmt. Die Durchmesser eines Körpers d bestimmt auch den sogenannten „Grenzwinkel“ q_{gr} über

$q_{gr}=2*\pi/d$. Der Grenzwinkel entspricht der Position der ersten Bragg-Reflexion. Die Position von q_{gr} bezeichnet den Übergang vom horizontalen Guinier-Plateau in den stark abfallenden Teil der Streukurve. Bei Proben mit unbekannter Strukturgröße in denen kein Guinier-Plateau erkennbar ist, kann angenommen werden, dass diese an der „Schulter“ bei q_{gr} ihren maximalen Beitrag zur Streuintensität haben. Die Form des bei $q < q_{gr}$ lokalisierten Guinier-Plateaus gibt Auskunft über die Form des Körpers, im Beispiel sichtbar am Unterschied zwischen der Streuung eines Zylinders und einer Kugel. Als fraktale Strukturen werden Formen mit Selbstähnlichkeit über einen weiten Größenbereich bezeichnet. Dies manifestiert sich in der doppeltlogarithmischen Darstellung durch lineare Abschnitte, von deren Streuung auf die Eigenschaften der fraktalen Struktur geschlossen werden kann.

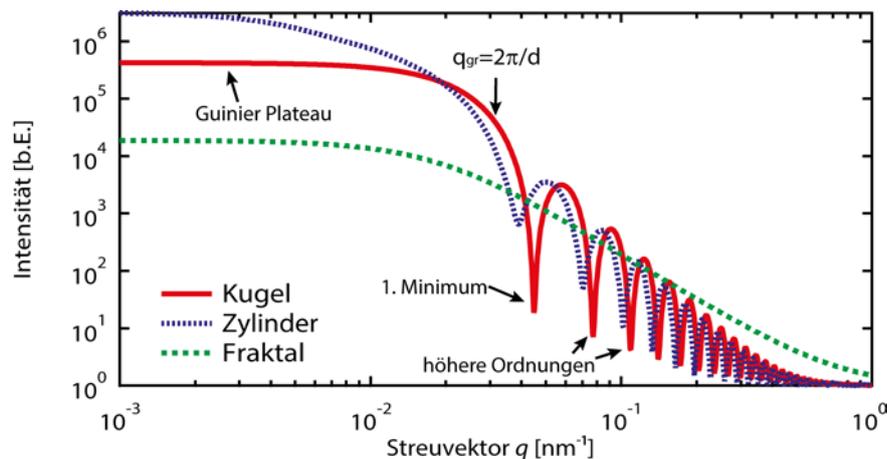


Abbildung 17: Simulierte Streukurven zur Illustration. Isotrop verteilte monodisperse Kugeln mit Radius 100 nm, monodisperse Zylinder mit Radius 100 nm und einer Länge von 500 nm sowie eine fraktale Struktur mit einem Radius von 500 nm und einer fraktalen Dimension von 2,5. An der Streukurve einer Kugel sind wichtige Strukturmerkmale beschrieben: das Guinier-Plateau bei kleinen q -Werten, die Approximation q_{gr} für den Durchmesser des Partikels und lokale Minima. Die Simulation wurde mit dem Modelling II Modul der IRENA-Makros für Igor Pro durchgeführt.

Allerdings wird bei der Detektion der gestreuten Photonen nur die Intensität der Photonen detektiert nicht aber deren Phase. Ähnlich der Kristallographie ist die Lösung des sog. Phasenproblems zentral in der Röntgenstreuung. Hierbei lässt sich die Streuintensität $I(q)$ als Fouriertransformation einer Autokorrelationsfunktion $p(r)$ der Elektronendichte des streuenden Objekts^{93,94} darstellen:

$$I(q) = 4\pi \int_0^{\infty} \frac{p(r) \sin(qr)}{qr} dr \quad (1)$$

Diese Korrelationsfunktion $p(r)$ des Partikels beschreibt die Wahrscheinlichkeit im Radius r um ein Elektron ein weiteres zu finden. Der Betrag des Streuvektors geht als q ein. Abhängig von den Eigenschaften des untersuchten Systems gibt es verschiedene Ansätze die Autokorrelationsfunktion zu modellieren und Aussagen über die Realraumeigenschaften des Systems zu treffen.

INDIREKTE FOURIERTRANSFORMATION

Eine inverse Fourier-Transformation der experimentellen Daten zur Korrelationsfunktion ist nicht durchführbar, da die Daten nur in einem limitierten Intervall erhoben wurden und die absolute Intensität der gestreuten Photonen nicht bekannt ist.¹⁹ Der direkteste Ansatz, ist die von Otto Glatter entwickelten indirekten Fouriertransformation.^{94,95} Hierbei wird eine Begrenzung von $r(r)$ in Intervall $[0, r_{max}]$ und einer Glättung der $P(r)$ -Funktion eingeführt. Die $p(r)$ -Funktion wird iterativ optimiert und dabei immer wieder mit der Streukurve $I(q)$ verglichen. Bei einem sphärischen Partikel hat die $p(r)$ -Funktion die Form einer Gauss'schen Glockenkurve mit dem Maximum beim Radius des Partikels. Dies ermöglicht es, Rückschlüsse auf die Größe und Form monodisperser Partikel in verdünnter Lösung zu treffen.⁹⁶ Die $p(r)$ ist ein wichtiger Zwischenschritt bei der Bestimmung von Form und Funktion hydratisierter Proteine⁹⁷⁻⁹⁹ und die Basis für eine feinere Modellierung der Form zum Beispiel mit dem frei erhältlichen Programm ATSAS¹⁰⁰ der Arbeitsgruppe von Dimitri Svergun (EMBL, Hamburg). Die Aufklärung von Proteinstrukturen ist die mit Abstand bedeutendste Anwendung von SAXS.

FRAKTALANALYSE

In einem fraktalen oder selbstähnlichen System, ist die Form eines Objekts über einen ausgedehnten Größenbereich vorliegen.¹⁰¹ Von Grégory Beaucage¹⁰² wurde 1995 eine Potenzfunktionsanalyse vorgeschlagen. Hier werden in der doppeltlogarithmischen Auftragung lineare Abschnitte mit einem Potenzgesetz $I(q) \propto q^{-p}$ modelliert.¹⁰³ Dies wird auch als „Porod-Analyse“ bezeichnet. Die fraktale Dimension p ermöglicht eine Aussage über die Oberflächen- und Volumenstruktur eines Objekts.¹⁰⁴ Ein Wert von vier deutet auf eine glatte Oberfläche mit homogenem Volumen hin, Werte zwischen 3 und 4 auf eine raue Oberfläche, ein sog. Oberflächenfraktal und Werte zwischen 1 und 3 auf ein Volumenfraktal hin.¹⁰² Im Beispiel von Abbildung 17 ist ein Volumenfraktal mit einer fraktalen Dimension von 2,5 gezeigt, dessen äußerste Größe 200 nm im Durchmesser misst.

Falls das Guinierplateau aufgelöst ist so kann man mit einer Erweiterung des Potenzgesetzes den Trägheitsradius der maximalen Strukturgröße bestimmen:

$$I(q) = A \exp\left(\frac{-q^2 R_g^2}{3}\right) + B q_*^{-p} \quad (2)$$

Hierbei ist R_g der Trägheitsradius, q der Betrag des Streuvektors und p die fraktale Dimension des Objekts. A und B berücksichtigt die Anzahl und Dichte der streuenden Objekte. Der Streuvektor im zweiten Summanden wird hierbei dargestellt als:

$$q_* = \frac{q}{\left[\operatorname{erf}\left(\frac{q R_g}{\sqrt{6}}\right)\right]^3}$$

Die Fraktalanalyse kommt vor allem bei komplexen, anorganischen Proben zum Einsatz, so zum Beispiel bei der Bestimmung der fraktalen Struktur von Zirkonium-Hydrogelen¹⁰⁵ oder der

Porosität von Gesteinsproben¹⁰⁶. Auch bei komplexen biologischen Systemen wie ganzen Organellen kann eine fraktale Betrachtung sinnvoll sein.²⁴

VOLUMENVERTEILUNGEN POLYDISPERSER LÖSUNGEN

Für einfache geometrische Formen lässt sich die Fouriertransformierte der Elektronendichte $\rho(r)$ als Funktion des Radius r analytisch berechnen.^{93,94} Basierend hierauf lassen sich nicht nur monodisperse Partikel sondern auch polydisperse Populationen simulieren. Wenn mehrere polydisperse Populationen an Partikeln vorhanden sind, lässt sich die Streuung als Summe der einzelnen Komponenten modellieren.^{93,94} Hierbei werden glatte Partikel mit ausgefülltem Volumen in verdünnter Lösung angenommen. Wie in den Referenzen^{93,94} beschrieben kann aus der allgemeinen Form der Streugleichung (1) die Streuintensität einer verdünnten, monodispersen Partikellösung darstellen werden:

$$I(q) = \int |\Delta\rho|^2 F(q, r)^2 V(r)^2 dr \quad (3)$$

Hier ist $|\Delta\rho|^2$ der Streukontrast relativ zum umgebenden Medium, F der Formfaktor und V das Volumen eines Partikels. Um die Polydispersität zu berücksichtigen kann statt einem monodispersen Partikel eine Population verschiedener Partikel ähnlicher Größe verwendet werden. Verschiedene Strukturgrößen können durch mehrere dieser Populationen ausgedrückt werden.^{93,94} Da in einem Modell diskrete Schritte numerisch berechnet werden müssen, wird das Integral zur Summe¹⁰⁷:

$$I(q) = \sum_k |\Delta\rho_k|^2 S_k(q) \sum_{i_k} |F_k(q, r_{i_k})|^2 (V_k(r_{i_k}))^2 N_T P_k(r_{i_k}) \Delta r_{i_k} \quad (4)$$

Die Streukurve $I(q)$ wurde modelliert als Summe k der Streubeiträge verschiedener Körper mit Streukontrast $|\Delta\rho|^2$ relativ zum umgebenden Medium. Der Strukturfaktor S_k berücksichtigt interpartikuläre Interaktionen und hat bei einer verdünnten Lösung den Wert 1. Der Formfaktor $F_k(q, r_{i_k})$ beschreibt die Form des Streuenden Körpers. $V_k(r_{i_k})$ ist das Volumen eines Körpers, r_{i_k} ist dessen Radius und N_T die Gesamtzahl der von der Strahlung erfassten Körper. Um die in realen Systemen vorherrschende Polydispersität zu berücksichtigen wird eine Population an Partikeln mit einer Verteilung $P_k(r_{i_k})$ um einen mittleren Radius R simuliert. Üblicherweise wird hier eine Normalverteilung verwendet. Die Verteilung wird als Histogramm mit einer diskreten Schrittweite i_k simuliert.

Aus diesem Modell lassen sich wichtige Informationen extrahieren, die Anzahlverteilung:

$$N(r) = N_T P(r) \quad (5)$$

welche die Anzahl der Körper mit Radius r beschreibt. $P(r)$ ist eine Normalverteilung um den mittleren Radius R mit einer Standardabweichung σ :

$$P(r) = \frac{e^{-(r-R)^2/(2\sigma^2)}}{\sigma\sqrt{2\pi}} \quad (6)$$

Eine praktischere Größe zur Beschreibung eines Systems ist die Volumenverteilung $f(r)$. Hier wird das von Partikeln mit einem gewissen Radius eingenommene Volumen modelliert:

$$f(r) = V(r) N(r) \quad (7)$$

Ein praktischeres Maß zur Skalierung und Modellierung von Volumenverteilungen ist der Parameter B , der Beitrag einer Population zum Gesamtvolumen.

$$f(r) = B P(r) \quad (8)$$

Mithilfe dieses Modells können aus der Kleinwinkelstreucurve $I(q)$ die Größen der beteiligten Partikel, deren Polydispersität, das relative eingenommene Volumen und die relative Anzahl der Partikel berechnet werden. Wenn die Streuintensität mithilfe von Glaskohlenstoff (eng: „glassy carbon“) auf einer absoluten Skala kalibriert wurde¹⁰⁸, können auch absolute Volumina und Anzahlen erfasst werden. Beispiele für die Anwendung dieses Modells sind Porengrößen in Sprengstoffen²⁸, oder die Größenbestimmung von Nanopartikeln in Echtzeit¹⁰⁹.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Chemikalien, Antibiotika & Bakterienstamm

Dieses Kapitel gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Materialien sowie deren Bezugsquelle.

BAKTERIENSTAMM

Als Probensystem wurden wildtyp *Escherichia coli* K12 verwendet. Dieser findet vielfach in der Antibiotikaforschung Anwendung und wird auch als Ausgangspunkt für Genexpressionsstudien verwendet.

Name	Stammbezeichnung	Quelle	Sammlungsnummern
<i>Escherichia coli</i>	K12 wildtyp	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	DSM 498 ATCC 23716

MEDIUM & AGAR

Als Flüssigmedium für Bakterien wurde ausschließlich das nährstoffreiche Müller-Hinton Medium verwendet. Hierzu wurde das entsprechende Pulver in d-H₂O gelöst und im Autoklaven sterilisiert. Zur Herstellung des Nähragars wurden die Bestandteile in d-H₂O gelöst und autoklaviert. Der Nähragar wurde im Anschluss des Autoklaviervorgangs in einem Thermostaten bei 65° C warm gehalten. Bei dieser Temperatur wurden Petrischalen mit 90 mm Durchmesser je zur Hälfte gefüllt. Nach Erkalten wurden die Agarplatten in geschlossenen Petrischalen mit der Öffnung nach unten gelagert.

Name	Quelle, Art. Nr.	Kommentar
Müller-Hinton Medium Rinder-Infus 2g/l Pepton aus Casein 1,5 g/l Maisstärke 1,5g/l pH-Wert: 7,4	Carl Roth GmbH, X927.1	11,5 g in 0,5l d-H ₂ O
Nähragar 5 g Pepton 3 g Rindfleischextrakt 15 g Agar-Agar pH-Wert: 6,8	Carl Roth GmbH, X928.1	Gelöst in 1l d-H ₂ O

ANTIBIOTIKA

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika sind in der untenstehenden Tabelle aufgeführt. Je nach Löslichkeitseigenschaften wurde die Stammlösung in PBS-Puffer, d-H₂O oder Ethanol vorbereitet. Aliquote dieser Stammlösung wurde bei -20° C eingelagert. Die Stammlösung von Tetracyclin und Ampicillin wurden vor jeder Messung frisch hergestellt um den Zerfall der Moleküle in wässriger Lösung zu vermeiden. Bei der Arbeit mit dem Peptid wurden autoklavierte Glasgefäße verwendet um ein Anhaften des Peptids an der Wand zu vermeiden.

Name	CAS	Quelle, Art. Nr.	Kommentar
Ampicillin	69-52-3	Carl Roth GmbH, K020.1	1 mg/ml in PBS-Puffer
Cefepime	88040-23-7	Gentaur, M27655146	1 mg/ml in PBS-Puffer
Ciprofloxacin	85721-33-1	AppiChem, A4589,0001	1 mg/ml in d-H ₂ O
Chloramphenicol	56-75-7	VWR, 442042Q	1 mg/ml in EtOH/H ₂ O, 9:1
Gentamycin	1405-41-0	Calibochem, 345814	1 mg/ml in PBS-Puffer
Kanamycin	25389-94-0	Carl Roth GmbH, T832.1	1 mg/ml in PBS-Puffer
Peptid RLKRWWKFL		Apara-Bioscience GmbH	1 mg/ml in d-H ₂ O
Piperacillin	59703-84-3	Sigma, P8396-1G	1 mg/ml in PBS-Puffer
Polymyxin B	1405-20-5	Calibochem, 5291	1 mg/ml in PBS-Puffer
Rifampicin	13292-46-1	Calibochem, 557303	1 mg/ml in PBS-Puffer
Tetracycline	60-54-8	Carl Roth GmbH, HP63.1	1 mg/ml in PBS-Puffer

CHEMIKALIEN

Der PBS-Puffer wurde mit PBS-Puffertabletten hergestellt und mit dem vorgegebenen pH-Wert von 7,0 verwendet. Die Fixierung mit Glutaraldehyd in einer 2,5 %-Lösung in PIPES-Puffer durchgeführt. Die zur Kalibration der Kleinwinkelstreuung verwendeten Mikrosphären wurden in PBS-Puffer resuspendiert und vor Benutzung 10 min mit Ultraschall behandelt.

Name	CAS	Quelle, Art. Nr.	Kommentar
PBS-Puffer Na ₃ PO ₄ – 10 mM KCl – 2,38 mM NaCl – 140 mM pH = 7,0		Life Technologies GmbH, 18912	Gelöst in d-H ₂ O
PIPES-Puffer 0,1 M, pH = 7,0	5625-37-6	VWR, 97061-134	Gelöst in d-H ₂ O
Glutaraldehyd (25 %)	111-30-8	Merck, 1.04239.0250	2,5 % in PIPES Puffer
Polystyrol Mikrosphären 2 µm	9003-53-6	Polysciences Inc., 19814	In PBS-Puffer resuspendiert
Polystyrol Mikrosphären 0,5 µm	9003-53-6	Polysciences Inc., 09307	In PBS-Puffer resuspendiert

3.2 Mikrobiologie – Bestimmung der optimale Antibiotikakonzentration

Für eine erfolgreiche Untersuchung antibiotischer Wirkstoffe in einem bakteriellen Probensystem müssen verschiedene experimentelle Voraussetzungen gegeben sein. So müssen die Bakterien immer im gleichen Wachstumsstadium sein, meist wird die exponentielle Wachstumsphase gewählt, da hier sichergestellt ist, dass ein Großteil der Kultur lebt und vermehrungsfähig ist. Hierzu werden täglich frische Bakterien aus einer Übernachtskultur benötigt. Die richtige Zelldichte kann photometrisch bestimmt werden (3.2.1). Bei der Untersuchung von antibiotischen Wirkmechanismen ist es essentiell, dass die Dosierung der Antibiotika richtig gewählt wird. Eine zu hohe Antibiotikakonzentration hat sekundäre Wirkmechanismen zur Folge, während bei zu geringen Konzentrationen keine oder nur eine unzureichende Wirkung eintritt. Das Auftreten sekundärer Wirkmechanismen unterscheidet sich stark zwischen einzelnen Antibiotika, abhängig davon ob Sie in großer Konzentration weitere Ziele in der Zelle inhibieren können oder die strukturelle Integrität der Zellwand angreifen. Mithilfe von der minimalen Hemm-Konzentration (3.2.2) wurde Mindestdosierung festgelegt. Die minimale Dosierung, die bei den tatsächlichen experimentellen Gegebenheiten verwendet werden konnte wurde mit Abtötungskurven (3.2.3) ermittelt.

3.2.1 Photometrische Bestimmung der Zelldichte

Die vorgelegten Untersuchungen arbeiten stets mit *E. coli* in der exponentiellen Wachstumsphase. Hierzu wurden jeden Tag *E. coli* aus einer Übernachtskultur im Verhältnis von 1:40 verdünnt und bei 37° C inkubiert (0,5 ml in 20 ml). Um stets eine gleiche Probendichte sicherzustellen wurde das Bakterienwachstum durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt (CO 8000 Cell Density Meter, Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld). Es gibt einen linearen Zusammenhang zwischen der optischen Dichte und der Anzahl Bakterien in der Suspension. Dieser kann mittels Ausplattieren bestimmt werden und wird als Anzahl der kolonienbildenden Einheiten pro Milliliter (KBE / ml) oder einfach Bakterien pro Milliliter (ml^{-1}) angegeben. In Abbildung 18 ist der Zusammenhang zwischen optischer Dichte und Zelldichte gezeigt.

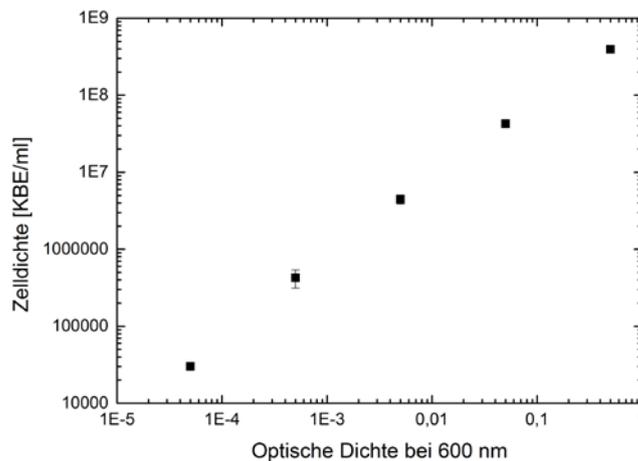


Abbildung 18: Zusammenhang zwischen optischer Dichte und Zelldichte einer Suspension von *E. coli*-Bakterien. Die Zelldichte wurde mittels Ausplattieren bestimmt als Zahl der kolonienbildende Einheiten (KBE) pro ml bestimmt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts.

3.2.2 Minimale Hemm-Konzentration

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) ist ein etabliertes Verfahren und wurde nach einer in der Literatur bekannten Vorschrift¹¹⁰ durchgeführt. Hierbei wird, wie im Namen beschrieben, die minimale Antibiotika-Konzentration bestimmt, die notwendig ist, um ein Wachstum der Bakterien zu unterbinden. Wie in Abbildung 19 dargestellt, wurde eine sterile 96-Loch-Titerplatte verwendet. Im ersten Schritt wurde eine sehr verdünnte, klare Lösung von Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase mit einer Bakteriendichte von 10^5 ml^{-1} vorgelegt (100 μl /Titer). Zur Kontrolle von Sterilität (SC) wurde der letzte Titer jeder Platte nur mit Müller-Hinton-Medium befüllt. Bei einem Wachstum in diesem Titer wurde die Messung verworfen. Die Wachstumsfähigkeit wurde mit Bakterien ohne Antibiotikum (GC) überprüft. Bei Ausbleiben von Wachstum in diesem Titer wurde die Messung ebenfalls verworfen. In einem zweiten Schritt wurden den Titern der ersten Spalte 20 μl der Antibiotika-Stammlösung (1 mg/ml) sowie weitere 80 μl Bakterienlösung hinzugefügt. Hierdurch ergibt sich in den Titern der ersten Spalte eine Antibiotikakonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$. In einem dritten Schritt wurden 100 μl aus den Titern der ersten Spalte in die zweite Spalte pipettiert. Zusammen mit den in der zweiten Spalte vorgelegten 100 μl ergibt sich hier eine Antibiotikakonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$. So wurden entlang jeder Zeile je 100 μl von einem Titer in den nächsten pipettiert. Dies ergibt in aufeinanderfolgenden Titern eine Halbierung der Antibiotikakonzentration. Für diesen Vorgang empfiehlt es sich aus praktischen Erwägungen eine Multipipette zu benutzen und es ist wichtig die Pipettenspitzen nach jedem Pipetiervorgang zu werfen.

Auf diese Weise kann man für jedes Antibiotikum zehn verschiedene Konzentrationen gleichzeitig testen. Die 96-Loch-Titerplatte wird für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Wenn nun

Bakterienwachstum stattfindet, trübte sich die Lösung ein. Die geringste Antibiotikakonzentration ohne Trübung wird als minimale Hemmkonzentration (MIC) bezeichnet. Die Bestimmung der Trübung erfolgte visuell ohne optische Hilfsmittel nach DIN 58940. Der Vorteil dieser Methode ist, dass 10 verschiedene Konzentrationen von bis zu 8 Antibiotika gleichzeitig getestet werden können. Die Experimente wurden je dreifach mit frischen Bakterienkulturen wiederholt.

z.B., X = 32 mg/ml

		32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	GC	SC	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	cX	cX	c ^X / ₂	c ^X / ₄	c ^X / ₈	c ^X / ₁₆	c ^X / ₃₂	c ^X / ₆₄	c ^X / ₁₂₈	c ^X / ₂₅₆	c ^X / ₅₁₂	GC	SC	Antibiotikum A
B	cX	cX	c ^X / ₂	c ^X / ₄	c ^X / ₈	c ^X / ₁₆	c ^X / ₃₂	c ^X / ₆₄	c ^X / ₁₂₈	c ^X / ₂₅₆	c ^X / ₅₁₂	GC	SC	Antibiotikum B
C	cX	cX	c ^X / ₂	c ^X / ₄	c ^X / ₈	c ^X / ₁₆	c ^X / ₃₂	c ^X / ₆₄	c ^X / ₁₂₈	c ^X / ₂₅₆	c ^X / ₅₁₂	GC	SC	Antibiotikum C
D	cX	cX	c ^X / ₂	c ^X / ₄	c ^X / ₈	c ^X / ₁₆	c ^X / ₃₂	c ^X / ₆₄	c ^X / ₁₂₈	c ^X / ₂₅₆	c ^X / ₅₁₂	GC	SC	Antibiotikum D
E	cY	cY	c ^Y / ₂	c ^Y / ₄	c ^Y / ₈	c ^Y / ₁₆	c ^Y / ₃₂	c ^Y / ₆₄	c ^Y / ₁₂₈	c ^Y / ₂₅₆	c ^Y / ₅₁₂	GC	SC	Antibiotikum E
F	cY	cY	c ^Y / ₂	c ^Y / ₄	c ^Y / ₈	c ^Y / ₁₆	c ^Y / ₃₂	c ^Y / ₆₄	c ^Y / ₁₂₈	c ^Y / ₂₅₆	c ^Y / ₅₁₂	GC	SC	Antibiotikum F
G	cY	cY	c ^Y / ₂	c ^Y / ₄	c ^Y / ₈	c ^Y / ₁₆	c ^Y / ₃₂	c ^Y / ₆₄	c ^Y / ₁₂₈	c ^Y / ₂₅₆	c ^Y / ₅₁₂	GC	SC	Antibiotikum G
H	cY	cY	c ^Y / ₂	c ^Y / ₄	c ^Y / ₈	c ^Y / ₁₆	c ^Y / ₃₂	c ^Y / ₆₄	c ^Y / ₁₂₈	c ^Y / ₂₅₆	c ^Y / ₅₁₂	GC	SC	Antibiotikum H

z.B., Y = 128 mg/ml

Abbildung 19: Beispiel für die Bestimmung einer minimalen Hemmkonzentration (MHK). In alle Felder wird eine Bakterienlösung mit 10^5 ml^{-1} vorgelegt, in die sterile Kontrolle (SC) nur Medium, in die Wachstumskontrolle (GC) nur Bakterienlösung. Danach wird die Antibiotikallösung zugegeben und schrittweise von links nach rechts verdünnt. Nach einer Inkubation von 16 Stunden erscheinen die Titer in denen Bakterienwachstum möglich war als visuell eingetrübt. Abbildung modifiziert aus Wiegand et al., Nature Protocols (2008), Nature Publishing Group.¹¹⁰

3.2.3 Abtötungskurven

Abtötungskurven wurden bestimmt, um die Abtötung der Bakterien bei der für spätere Experimente relevanten Bakteriendichte zu verfolgen. Der Startpunkt für diese Experimente war eine Bakterienkultur in der exponentiellen Wachstumsphase mit einer Dichte von 10^8 ml^{-1} . Die Bakteriendichte wurde durch eine Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) bestimmt. Eine Absorption von 0,45 entsprach einer Bakteriendichte von ca. 10^8 ml^{-1} . Nach Zugabe des Antibiotikums zu 1 ml Bakterienlösung wird die Lösung bei 37° C auf einem Taumelschüttler inkubiert. Nach definierten Zeitspannen, im vorliegenden Fall 1, 4 und 24 h wird eine Probe entnommen und in einer Verdünnungsreihe um jeweils Faktor 10 verdünnt. Meist wurden Verdünnungen im Bereich von 10^{-1} bis 10^{-8} verwendet. Von jeder Verdünnung wurden 5 Tropfen à 7 µl auf eine Platte mit Nähragar gegeben, mit zumeist vier Verdünnungen pro Platte. Nach Inkubation für mindestens 16 h hatte jede ursprünglich in der Lösung vorhandene Bakterie eine mit bloßem Auge sichtbare Kolonie gebildet. Die Anzahl dieser Kolonien wird gezählt und auf das Ausgangsvolumen von 1 ml hochgerechnet. Beim Zählen der Kolonien muss sichergestellt werden, dass sich die Kolonien nicht überlagern und klar als einzelne Kolonien erkennbar sind. Dies war zumeist bei < 20 Kolonien pro 7 µl Tropfen der Fall.

3.3 Probenpräparation

3.3.1 Fixierte Proben in wässriger Lösung

Die in dieser Arbeit untersuchten *Escherichia coli* mussten vor der Untersuchung mit Röntgenkleinwinkelstreuung und Transmissionselektronenmikroskopie in die jeweils geeignete Darreichungsform gebracht werden. Dieser Schritt ist nicht zu unterschätzen, da eine schlechte Probenpräparation die interne Struktur verändert und kein Erkenntnisgewinn erzielt werden kann.

Untersucht wurden *wildtyp E. coli* (DSM 498, ATCC 23716). Zu Beginn jeder Präparation wurde eine Übernachtskultur an *E. coli* im Verhältnis 1:40 mit Müller-Hinton Medium verdünnt. Die Kultur wurde für ca. drei Stunden bei 37° C inkubiert bis eine optische Dichte von 0,45 bei einer Lichtwellenlänge von 600 nm erreicht wurde. Dies entsprach einer Zelldichte von 10^8 ml^{-1} . Bei dieser Zellkonzentration wurden die Antibiotika aus einer Vorratslösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml zugegeben.

Je nach gewünschter Einwirkungszeit des Antibiotikums wurden die Proben weiter bei 37° C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet zweimal in PBS-Puffer (10 mM, pH = 7,0) resuspendiert. Dieser Vorgang von abzentrifugieren und anschließendem resuspendieren wird als „waschen“ der Pellets bezeichnet. Um die Pellets zu resuspendieren kann es nötig sein, die Bakterienlösung mehrfach mit einer Pipette aufzuziehen und wieder abzulassen. Der nun folgende Fixierungsschritt wurde mit einer 2,5 % Glutardialdehydlösung in PIPES Puffer (0,1 M, pH =7,0) durchgeführt, die Proben wurden hierzu eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Für eine Kleinwinkelstreuung wurde der Rückstand an Fixanz in fünf Waschvorgängen mit PBS entfernt und die Probe anschließend in 0,1 mL PBS resuspendiert.

Je nach gewünschter Einwirkungszeit des Antibiotikums wurden die Proben weiter bei 37° C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet zweimal in PBS-Puffer (10 mM, pH = 7,0) resuspendiert. Dieser Vorgang des Abzentrifugierens und anschließendem Resuspendieren wird als „Waschen“ der Pellets bezeichnet. Um die Pellets zu Resuspendieren kann es nötig sein, die Bakterienlösung mehrfach mit einer Pipette aufzuziehen und wieder abzulassen. Der nun folgende Fixierungsschritt wurde mit einer 2,5%igen Glutardialdehydlösung in PIPES Puffer (0,1 M, pH =7,0) durchgeführt, wobei die Proben eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt wurden. Für eine Kleinwinkelstreuung wurde der Rückstand an Fixanz in fünf Waschvorgängen mit PBS entfernt und die Probe anschließend in 0,1 mL PBS gelöst.

Für Transmissionselektronenmikroskopie wurden die Proben einer 4%igen Glutaraldehydlösung in einem Natriumkakyolatpuffer (0,2 M, pH = 7,2) fixiert. Die Proben wurden innerhalb von 48 Stunden am St. Georges Hospital, University of London von Maria McGlynn und Raymond Moss weiterverarbeitet. Im folgenden Schritt wurde die Probe mit

Osmiumtetroxid und Uranylacetat gefärbt und anschließend in ein Harz (Spurr's resin)⁷⁹ eingebettet. Die eingebettete Probe wurde mit einem Mikrotom in Dünnschnitte (90 nm – 100 nm) geschnitten. Bilder der Dünnschnitte wurden mit einem Transmissionselektronenmikroskop (Hitachi H-7100) mit einer CCD-Kamera (Gatan 1K, 820) aufgenommen.

3.3.2 Kryogene Proben

Kryogene Probenpräparation kommt vor allem in der Transmissionselektronenmikroskopie¹¹¹ aber auch bei verschiedenen Methoden mit Röntgenstrahlung^{65,74} zum Einsatz. Eine tiefgekühlte Probe ($T < 136\text{K}$)¹¹² verzögert Strahlenschäden¹¹³ und erlaubt bei richtiger Präparation das Abbilden der Probe in einer hydratisierten Umgebung aus amorphem Eis. Die Präparation einer Probe erfolgte durch schnelles abkühlen, auch „plungen“ genannt. Hierzu werden Kühlraten von in der Größenordnung von 10^4 K s^{-1} benötigt.^{70,71} Dabei wurde die Probe schnell in ein flüssiges Gemisch aus 37% Ethan und 63% Propan getaucht.⁷¹ Die benötigten schnellen Kühlraten fordern, dass auch der Probenträger schnell abgekühlt werden muss. Daher wurden TEM-Netzchen mit einer Dicke von $20 \mu\text{m}$ und einem 10 nm dünnen Kohlenstofffilm verwendet. Das TEM-Netzchen mit Kohlenstofffilm (C-flatTM mit $2 \mu\text{m}$ großen Löchern im Abstand von $4 \mu\text{m}$)¹¹⁴ wurde zuerst 10 min in einer Ozonatmosphäre aktiviert, d.h. hydrophilisiert. Das aktivierte TEM-Netzchen wurde mit einer inversen Pinzette aufgenommen und mit $5 \mu\text{l}$ Probensuspension auf der befilmten Seite bestückt. Die Probe wurde in einem sog. Plunger (Abbildung 20)¹¹⁵ eingespannt. Überschüssiges Probenvolumen wurde mit einem Filterpapier (WhatmanTM Zellulosepapier Grad Nr. 1) über die Rückseite durch den perforierten Film abgezogen und das Netzchen mithilfe der Schwerkraft schnell in das flüssige Ethan/Propan Gemisch getaucht. Die Proben wurden unter flüssigem Stickstoff gelagert und bei Temperaturen von unter 115 K analysiert.

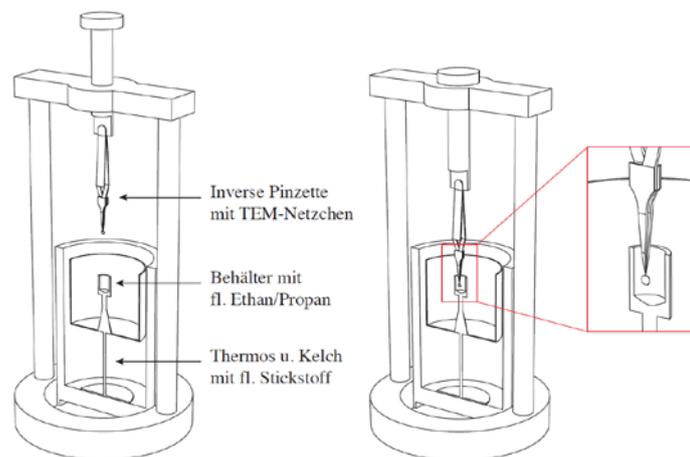


Abbildung 20: Illustration eines „Plungers“ zum schnellen Einfrieren von Proben. Der umgebende Dewar sowie der innere Kelch sind mit flüssigem Stickstoff gefüllt. Das kleinere Töpfchen wird mit dem flüssigen Gemisch aus Ethan und Propan bestückt. Die inverse Pinzette mit dem TEM-Netzchen wird in der Fallvorrichtung befestigt. Das Wasser wird mit einem Filterpapier abgenommen und die Probe wird mit Hilfe der Schwerkraft mit in das Ethan/Propan Gemisch eingetaucht. Kryogene Proben sind von amorphem Eis umschlossen. Abbildung aus Gorniak, Dissertation Universität Heidelberg (2013).¹¹⁵

Die Proben wurden stets unter flüssigem Stickstoff gehandhabt. Zur Untersuchung mit der Streuapparatur HORST (3.5.4) wurden die Proben mithilfe eines Kryo-Transfersystems der Firma Quorum Technologies Ltd., Vereinigtes Königreich in die evakuierte Kammer geschleust.⁸⁸ Hierzu wurden die Proben mithilfe eines evakuierten Transferbehälters in die Vakuumkammer HORST überführt. Wichtig ist, dass dieser Transfer in unter einer Minute abgeschlossen wird, da sonst eine Erwärmung der Probe und damit eine Phasenänderung des amorphen Eises erfolgt. In der Kammer wird die Probe aktiv gekühlt und bei Temperaturen von unter -160°C untersucht. Die Details zum Kryo-Transfersystem sind in der Doktorarbeit von Dr. Thomas Gorniak¹¹⁵ und einer Publikation über der Streukammer HORST⁸⁸ beschrieben.

3.4 Datenauswertung

Dieses Kapitel gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Software und frei erhältlichen Skripte zur Datenanalyse.

3.4.1 Extraktion der KleinwinkelstreuKurven aus Detektorbildern

Bei Messungen an den dezidierten Apparaturen von USAXS und BioSAXS erfolgte die Extraktion der eindimensionalen Streukurve aus den Detektorbildern mittels automatischer Softwareroutinen direkt vor Ort.^{116,117}

Bei Messungen mit weicher Röntgenstreuung und der HORST Apparatur wurde die Streukurve mithilfe der NIKA-Skripte¹¹⁶ für die Software Igor Pro® (Wavemetrics Inc., Portland, USA) verwendet. Der Strahlmittelpunkt wurde visuell aus den ringförmigen Streumustern abgeschätzt. Die weiteren Parameter sind die Pixelgröße der CCD-Kamera von 13,5 μm , die verwendete Wellenlänge sowie der Abstand von Probe und Detektor. Die Position des Strahlenfängers sowie tote Pixel wurden maskiert. Die korrekte Funktion dieser Skripte wurde mit der Bildverarbeitungssoftware ImageJ¹¹⁸ überprüft. Im Übersichtsartikel von B.R. Pauw sind die zu berücksichtigenden Faktoren für eine erfolgreiche SAXS-Messung beschrieben.¹¹⁹

3.4.2 Modellierung von KleinwinkelstreuKurven

VOLUMENVERTEILUNGEN

Für die Modellierung von KleinwinkelstreuKurven wurde das Modul „Modelling II“ der IRENA-Skripte für die Software Igor Pro® (Wavemetrics Inc., Portland) verwendet. Hiermit lassen sich die Modelle glatter Körper an die Streukurven modellieren. Bei den Modellierungen wurde stets mit Annahme einer verdünnten Lösung gearbeitet. Der Benutzer musste bei dieser Software selbst die Eigenschaften des Modells festlegen, also die Anzahl der Streupopulationen sowie deren mittlere Größe R und Beitrag B abschätzen. Zuerst wurde die Hintergrundintensität der Messung abgeschätzt. Es ist empfehlenswert diesen Untergrund nach Abschluss der Modellierung noch einmal zu überprüfen und wenn nötig anzupassen. Bei der Abschätzung der Ausgangsdaten des Modells wurde die Streukurve aus verschiedenen Populationen „aufgebaut“. Um einen guten Übergang zum Untergrund herzustellen ist es empfehlenswert den Aufbau des Modells bei kleinsten Strukturgrößen, also bei größten q -Werten zu beginnen. Die wichtigsten Parameter waren im vorliegenden Fall der mittlere Radius R und der Volumenbeitrag B einer Population. Der Mittlere Radius bestimmt die Strukturgröße und damit die Position entlang der q -Achse. Der Volumenbeitrag einer Population legt die Streuintensität derselben fest. Die Form der Streukurve bestimmt die Form und die Polydispersität der Population. Im Folgenden wurde jeweils die nächstgrößere Population hinzugefügt, da bei kleineren q -Werten lokalisiert sind und sich damit auf dem Guinier-Plateau der vorangegangenen Population befindet. Nach jeder zusätzlichen Komponente wurde das Modell im bisherigen Abschnitt mit einem Fit mit der Methode der kleinsten Quadrate optimiert

(LSQF). Während des manuellen Aufbaus des Streukurvenmodells war es bei den BioSAXS-Datensätzen empfehlenswert mit prozentualen Fehlerangaben (10%) zu beginnen und erst das komplette Modell mit den tatsächlichen Messfehlern zu optimieren.

Um ein Maß für die Qualität der Übereinstimmung von Modell und experimentell gemessener Kurve zu erhalten wurde der Fehler der Fitergebnisse von mittlerem Radius und Volumenbeitrag mit dem internen „Anal. Uncertainty“ Modul bestimmt. Hierzu wurde jedes Fitergebnis (mittlerer Radius und Volumenbeitrag) einzeln in einem geeigneten Intervall variiert und an jedem Punkt die Fitergebnisse der anderen Populationen nacheinander optimiert (Programmoption: „fixed value, sequential optimization“). Auf diese Weise wird die wechselseitige Abhängigkeit der einzelnen Fitparameter berücksichtigt. Als Maß für die Qualität der Übereinstimmung zwischen Modell und Experiment wurde die Summe der Fehlerquadrate χ^2 berechnet: $\chi^2 = \sum (I_{mod}(q) - I(q))^2$, mit der modellierten Intensität I_{mod} und der gemessenen Intensität $I(q)$. Als Fehlergrenzen wurde eine Standardabweichung um den Idealwert von χ^2 angenommen (Standardeinstellung). Die Fehlerbestimmung ist an einem ausführlichen Beispiel im Kapitel 4.5.8 in der Abbildung 48 erläutert.

INDIREKTE FOURIER TRANSFORMATION

Das Modul „Pair Distance Distribution Function“ erlaubte die Modellierung einer Korrelationsfunktion auf Basis einer indirekten Fouriertransformation (Kapitel 2.3.3). Ziel hierbei ist die Bestimmung der sogenannten Korrelationsfunktion $p(r)$, der Fouriertransformierten der Streukurve. Hierzu wurde die Korrelationsfunktion auf das Intervall $[0, r_{max}]$ begrenzt und mit der Regularization-Methode¹²⁰ geglättet. Vom Benutzer musste der kritische Parameter r_{max} festgelegt werden. Ziel ist, dass die Korrelationsfunktion bei r_{max} gleichförmig gegen Null geht.⁹⁹ Zu kleine Werte für r_{max} führen zu einem steilen Abfall mit einer teilweise negativen $p(r)$ -Funktion. Zu große Werte für r_{max} bewirken eine flachen $p(r)$ -Funktion nahe Null in der Umgebung von r_{max} . Hier führte ein iteratives Vorgehen zum Ziel. Außerdem war es essentiell, während der Optimierung von r_{max} prozentuale Fehler von 15 % zu verwenden und diesen dann gegen Ende der Modellierung auf die tatsächlichen Fehler der Streukurve einzusetzen.

FRAKTALANALYSE

Die Fraktalanalyse und der Fit einer Potenzfunktion an die Streukurven erfolgte mit selbstgeschriebenen Skripten für Matlab® (Mathworks, Natick, USA). Fraktale Bereiche erscheinen in der doppeltlogarithmischen Darstellung linear und konnten mit der Potenzfunktion

$I(q) = A * q^{-p} + B$ modelliert werden. Hierbei wurde zur Optimierung des Fits eine in Matlab vorhandene Routine zur Optimierung nach der Methode der kleinsten Quadrate optimiert (LSQF).

BERECHNUNG DER STREUKONTRASTE

Die Berechnung von relativen Streukontrasten wurde mit dem Modul „Scattering Contrast Calculator“ der IRENA-Makros für Igor Pro® durchgeführt. Hier der Streukontrast der Zellbestandteile (Proteine, DNS und Ribosomen) sowie der Zelle als Ganzes aus Literaturangaben zu Dichte und Elementarzusammensetzung berechnet. Die Annahmen hierfür sind in Tabelle 5 beschrieben.

3.4.3 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA von engl. Principle Component Analysis) ist ein Standardverfahren multivariater Datenanalyse die von Karl Pearson¹²¹ im Jahre 1901 erfunden wurde. Ziel ist es die Variation eines Datensatzes in mehreren, möglicherweise korrelierten Variablen in ein Set von nicht korrelierten Variablen, sogenannten Hauptkomponenten zu transformieren (Abbildung 21). Das Ziel hierbei ist, dass die Varianz in einem multidimensionalen Datensatz effektiv beschrieben werden kann. Dies geschieht durch die Hauptkomponenten, die als neue Achsen ins System eingebracht werden und mithilfe einer Linearkombination berechnet werden können. Jede Hauptkomponente wird dabei so gelegt, dass die die größtmögliche Varianz innerhalb des Datensatzes abbildet. Jede weitere Hauptkomponente muss orthogonal zu allen bisherigen Komponenten sein und versucht wieder die größtmögliche Varianz abzubilden. Im Beispiel in Abbildung 21 beschreibt die Hauptkomponente 1 eine größere Varianz als die folgende Hauptkomponente 2. In einem Datensatz mit einer Vielzahl an Variablen erlaubt die Hauptkomponentenanalyse eine Extraktion der relevanten Variation im Datensatz in Form von Hauptkomponenten.

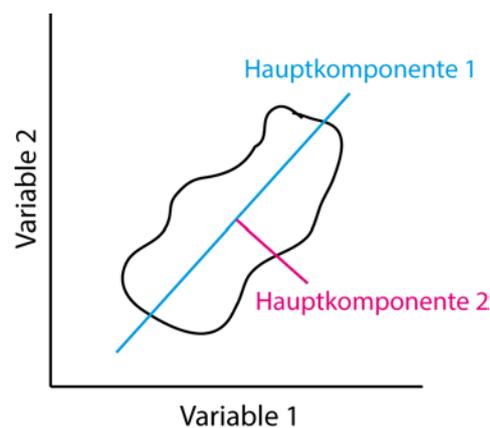


Abbildung 21: Schema einer Hauptkomponentenanalyse. Der in den Variablen 1 und 2 vorliegende Datensatz wird in die nicht korrelierten Hauptkomponenten 1 und 2 transformiert um die Variation im Datensatz besser darzustellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde aufgrund der besseren Visualisierbarkeit eine zentrierte Hauptkomponentenanalyse verwendet. Dies bedeutet, dass die Variation im Datensatz relativ zu einem Mittelwert aller Messwerte (I_m) angegeben wird. Somit kann die experimentell gemessene Streuintensität $I(q)$ folgendermaßen dargestellt werden:

$$I(q) = I_m(q) + A PC1(q) + B PC2(q)$$

Auf Basis des Mittelwerts ließ sich hier jede Streukurve aus den ersten beiden Hauptkomponenten (PC1, PC2) und ihren linearen Koeffizienten (A, B) darstellen. Der Einsatz weiterer Hauptkomponenten ist möglich, allerdings enthielten diese keine weitere Information. Um Probleme bei der Analyse der, sich über mehrere Größenordnungen erstreckende Messwerte zu vermeiden, wurde mit dem natürlichen Logarithmus der Messwerte gearbeitet. Da in einigen Streukurven durch ihre geringe Bakteriendichte viel Rauschen bei hohen q -Werten

enthielten wurde von der Hauptkomponentenanalyse beachtete Bereich auf $q < 0,5 \text{ nm}^{-1}$ beschränkt. Die im Beispiel in Abbildung 21 als Variablen bezeichnete Daten entsprechen im Experiment den verschiedenen Antibiotikabehandlungen, deren Unterschiede, also die Varianz mithilfe zweier Hauptkomponenten. So lassen sich mathematisch Informationen über die Frequenzen mit starker Änderung extrahieren. Aus der Frequenzinformation können Abschätzungen über die betroffenen Strukturgrößen getroffen werden.

Der große Vorteil einer Hauptkomponentenanalyse verglichen mit anderen analytischen Modellen ist dass sie automatisch durchführbar ist und neue Kurven mit einem bestehenden Datensatz verglichen werden können und sofort bewertet werden können. Die Hauptkomponentenanalyse wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Ralf Mikut vom Institut für angewandte Informatik am Karlsruhe Institut für Technologie durchgeführt. Hierzu wurde die Toolbox GaitCAD¹²² für Matlab® verwendet.

3.4.4 Quantitative Bildanalyse

Die quantitative Bildanalyse wurde von Markus Reischl (Institut für Angewandte Informatik (IAI), Karlsruhe Institut für Technologie (KIT)) durchgeführt. Das Ziel war eine Charakterisierung der in den TEM-Aufnahmen sichtbaren DNS-Bestandteile innerhalb der Zelle. Die Fragmentierung dieses sogenannten „Nukloids“ wurde mit einem Soliditätsparameter beschrieben. Pro Behandlung wurden zwischen 3 und 5 TEM-Aufnahmen der kleinsten Vergrößerungsstufe (2500x) analysiert, was ca. 100 bis 300 untersuchten Bakterien pro Behandlung entsprach. Mithilfe von Matlab® wurden die Bilder zuerst in eine RGB-Farbskala konvertiert und auf Werte zwischen 0 und 1 normiert. Die obersten 5% wurden als 1 gesetzt, die untersten 5% als 0 und die dazwischenliegenden Werte wurden linear interpoliert. Der Bilduntergrund wurde abgeschätzt und abgezogen. Die Zellen wurden anhand eines Schwellwertes erkannt. Dieser wurde manuell gesetzt und war abhängig von der Zellzahl bei (50-90) % der Helligkeit. Mithilfe von Ausfüllalgorithmen wurde sichergestellt, dass die Zellen konvexe Objekte ohne Löcher sind. Alle mindestens 100 Pixel großen Objekte wurden als Bakterien klassifiziert, ein Beispiel ist in Abbildung 32 gezeigt. Nach der Entfernung von Ausreißer-Intensitäten wurde die mittlere Intensität innerhalb der Bakterie als Schwellwert für die Grenze zwischen Nukleoid (hell) und Zytoplasma (dunkel) verwendet. Das Verhältnis zwischen der Fläche des Nukleoids und einer konvexen Hülle um alle Nukleoidanteile wurde als Soliditätsparameter S bezeichnet. Eine Beispielabbildung mit verschiedenen geformten Nukleoiden ist im Kapitel 4.3.1 in der Abbildung 33 gezeigt. Kleine Werte von S bedeuten, dass der Nukleoid sehr fragmentiert vorliegt, während große Werte einen kondensierten Nukleoid mit kompakter Form bezeichnen. Ein Soliditätswert von 0.5 entspricht ungefähr der Solidität des Nukleoids einer unbehandelten *E. coli* Bakterie nach 4 Stunden Inkubationszeit.

Soliditätsparameter S

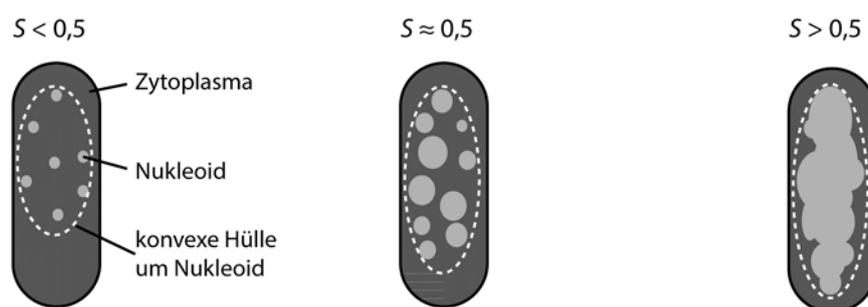


Abbildung 22: Beispiel für verschiedene Fragmentationsgrade des Nukleoids. Der Soliditätsparameter S gibt an, wie kompakt der Nukleoid vorliegt.

3.4.5 Berechnung der Strahlendosis

Die in Synchrotron-Experimenten verwendeten großen Photonenströme erfordern eine Abschätzung der in einer biologischen Probe deponierten Strahlendosis.^{65,69} Um bei dieser Berechnung den ungünstigsten Fall miteinzubeziehen wurde die Strahlendosis an der strahlzugewandten Probenoberfläche berechnet (Abbildung 23). Bei Proben in Suspension wurde die Absorption des Probengefäßes vernachlässigt.

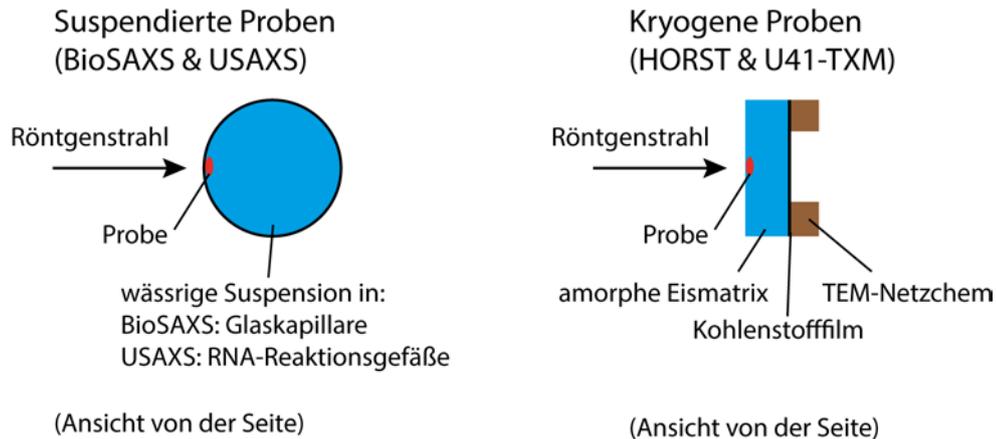


Abbildung 23: Schema zur Abschätzung der Strahlendosis für suspendierte und kryogene Proben. In beiden Fällen wurde die Strahlendosis an der Position der größten Strahlenexposition abgeschätzt. Beide Schemas zeigen einen Schnitt entlang der Strahlachse, also eine Seitenansicht. Die Größe der gezeigten Objekte ist nicht maßstabsgetreu.

Nach Howells et al.⁶⁹ kann die Strahlendosis D [Gy] einer Probe mit Dichte ρ [kg m^{-3}] und Absorptionskoeffizient μ [m^{-1}] berechnet werden als:

$$D = \frac{\mu \rho_{\gamma} E}{\rho}$$

Die Probe wurde mit Photonen der Energie E [J] und der zweidimensionalen Photonendichte ρ_{γ} [ph m^{-2}] bestrahlt. Die Photonendichte pro Fläche wurde aus dem meist angegebenen Photonfluss [$\text{ph s}^{-1} \text{m}^{-2}$] im Fokus und der Belichtungszeit [s] berechnet. Die Dichte ρ und die Elementarzusammensetzung einer *E. coli* Bakterie wurde aus der Trockenzusammensetzung in Abschnitt 4.5.8, Tabelle 5 als $1,1 \text{ g cm}^{-3}$ mit einer Elementarzusammensetzung von $\text{C}_{0,09}\text{H}_{0,61}\text{O}_{0,27}\text{N}_{0,019}$ abgeschätzt.^{123,124} Die Elementarzusammensetzung wurde aus Angaben zur trockenen Zusammensetzung und dem Wassergehalt errechnet.

3.5 Verwendete Apparaturen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen mit Röntgenstrahlung wurden ausschließlich an Synchrotronstrahlungsquellen durchgeführt. Ausschlaggebend ist der hohe Photonenfluss an Synchrotronquellen, der es ermöglicht die jeweiligen Experimente an Anlagen durchzuführen, die in ihrer jeweiligen Spezialisierung zu den besten der Welt gehören (Abbildung 24).

Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) wird vorwiegend im harten Röntgenbereich durchgeführt. Hier ermöglicht es die hohe Eindringtiefe der Photonen in wässriger Probenumgebung zu arbeiten. Die besondere Stärke des BioSAXS-Apparatur ist der Probenroboter und die automatische Datenverarbeitung, die es ermöglichen SAXS auf höchstem Niveau an einer Vielzahl von Proben durchzuführen. An der USAXS-Apparatur liegt die Spezialisierung auf der Erfassung kleinster Winkel. SAXS kann so auch an größeren Objekten oder über einen weiten Größenbereich durchgeführt werden.

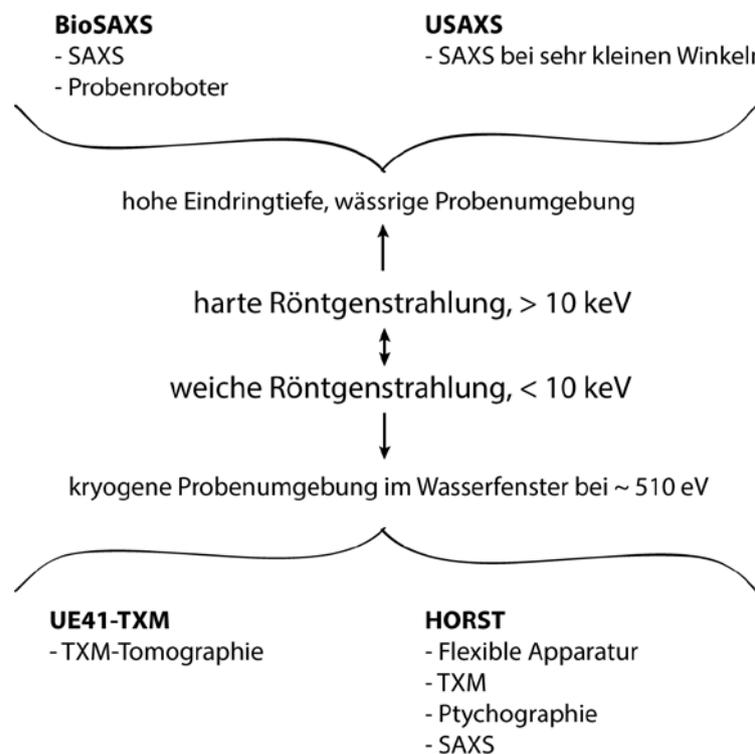


Abbildung 24: Schematische Übersicht über die Stärken der verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten Synchrotron-Apparaturen.

Röntgenmikroskopie wird vor allem im Wasserfenster und damit im weichen Röntgenbereich durchgeführt. Das UE41-TXM erlaubt als eine der weltbesten Anlagen, Tomographie an kryogenen biologischen Proben zu machen. Die Stärke der Röntgenstreuapparatur HORST ist die Flexibilität, die es ermöglicht von kryogenen Proben Aufnahmen mit TXM und Ptychographie zu machen, sowie SAXS mit weicher Röntgenstrahlung.

3.5.1 BioSAXS

Das BioSAXS-Strahlrohr P12 am Synchrotron PETRA III (EMBL/DESY) in Hamburg ist für Kleinwinkelstreuung an Proteinen in wässriger Lösung optimiert.¹⁹ Der hohe Photonenfluss an PETRA III sowie Probenroboter¹²⁵ und die automatisierten Auswertungsroutinen machen diese Anlage zu einer der besten der Welt. Typischerweise wird ein q -Bereich von $0,05 \text{ nm}^{-1}$ - $3,6 \text{ nm}^{-1}$ untersucht, dies entspricht Strukturgrößen von 1 nm – 100 nm . Zentral für schnelle Messungen ist der Probenroboter (Abbildung 25) der $20 \mu\text{L}$ der Probensuspension in eine Kapillare injiziert.¹²⁶ Die geringe Probenmenge ist optimiert für die Arbeit mit wertvollen Proteinen. Hier wird die Probe von Photonen mit einer Energie von $12,8 \text{ keV}$ und einem Fluss von 10^{13} Ph/s beleuchtet. Die Größe des Fokus war $0,2 \times 0,1 \text{ mm}^2$ (horizontal \times vertikal) und beleuchtet etwa eine Million Bakterien. Die gestreuten Photonen wurden mit einem Einzelphotonenzähler (PILATUS 2M, Dectris, Baden, Schweiz) detektiert. Von jeder Probe wurden 20 Streubilder mit einer Belichtungszeit von $0,05 \text{ s}$ aufgenommen. Vor und nach jeder Messung wurde der zugehörige PBS-Puffer zur Untergrundkorrektur vermessen. Um sicherzustellen, dass keine Strahlenschäden auftraten wurden alle Streukurven mit der ersten aufgenommenen Kurve verglichen und gegebenenfalls verworfen.^{117,127}



Abbildung 25: Bilder des BioSAXS-Strahlrohrs P12 bei PETRA III, Hamburg, Deutschland. Links: Blick auf den Detektor und das evakuierte Flugrohr. Rechts: Der Probenroboter für die Hochdurchsatzanalyse.

3.5.2 USAXS

Eines der besten Geräte weltweit für Ultrakleinwinkelstreuung (USAXS), also die Auflösung von kleinsten Winkeln ist die USAXS-Apparatur an der Advanced Photon Source (APS) in Argonne, USA.^{128,129} Der Probenfokus liegt hier eher auf anorganischen Proben, z.B. die Blasenbildung in Sprengstoffen.²⁸ Bei einer Photonenenergie von 17 keV kann ein q -Bereich von $1,6 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-1}$ – $0,12 \text{ nm}^{-1}$ aufgelöst werden, das entspricht Strukturgrößen von 50 nm – 4000 nm . Der Photonenfluss an der Probenposition beträgt 10^{13} Ph/s . Es gibt zwei Modi der Operation, ein punktkollimierter Strahl ($0,4 \text{ mm} \times 0,4 \text{ mm}$) mit einem Flächendetektor (Pilatus 100K, Dectris, Baden, Schweiz) sowie ein mit einem Schlitz kollimierten Strahl ($1 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$) zusammen mit

einer Bonse-Hart Kamera¹³⁰ aus einem Si(111) Analysator-Kristall und einer Photodiode zur Detektion.¹²⁸ Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde die letztere Konfiguration verwendet. Die hohe Photonenenergie und die damit verbundene Eindringtiefe erlaubte es, die Proben direkt in Eppendorff-Gefäßen zu beleuchten. Hierzu wurden die Proben manuell im Strahl justiert. Die Daten wurden mit den NIKA-Skripten¹¹⁶ für Igor Pro® (Wavemetrics, Protland, USA) analysiert.

3.5.3 BESSY – TXM

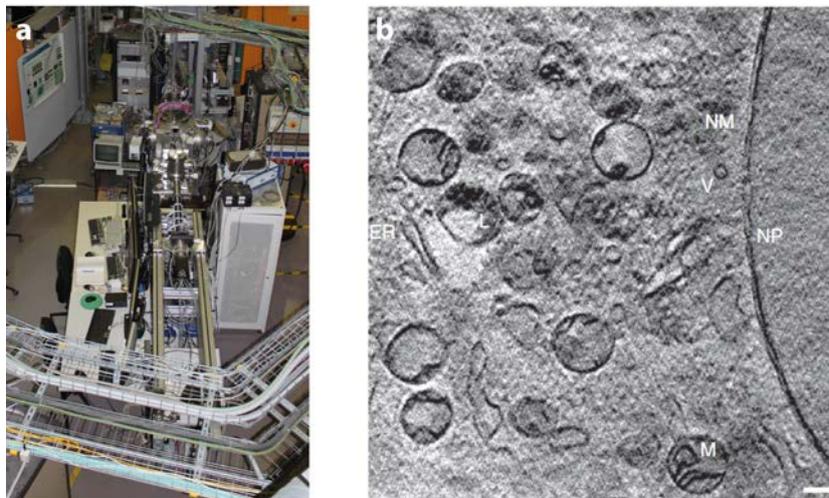


Abbildung 26: a) Blick auf das Röntgenmikroskop UE41-TXM der Arbeitsgruppe von Prof. Schneider bei BESSY II, Berlin. b) Schnitt (10 nm) durch das Tomogram einer murinen Krebszelle mit vielen internen Zellorganellen. Hier sind die Mitochondrien (M), das endoplasmatische Retikulum (ER), Vesikel (V), Lysozyme (L) die Membran des Zellkerns (NM) und Membranporen (NP) erkennbar. Die Länge des Skalierungsbalkens beträgt 390 nm. Abbildung aus Schneider et al., *Nature Methods* (2010), Nature Publishing Group.⁷³

Das Vollfeld-Röntgenmikroskop UE41-TXM der Arbeitsgruppe von Prof. Gerd Schneider am Synchrotron BESSY II in Berlin ermöglicht die Tomographie von kryogenen Proben.⁹⁰ Hierbei wird eine Auflösung von 70 nm in drei Dimensionen erhalten.⁷³ Hierzu wird der eingehende Röntgenstrahl mit einem Fluss von 2×10^{12} Ph/s in einem Fokus von 220 μm mit einem Kapillarkondensator weiter fokussiert, um dann die kryogene Probe zu beleuchten. Diese wird anschließend von einer Objektiv-Zonenplatte auf einen Detektor abgebildet. Der Detektor war eine CCD-Kamera (PI-SX:1300, Roper Scientific, Deutschland) und die Zonenplatte hatte einen Durchmesser von 89,9 μm , 561 Zonen und eine äußerste Zonenbreite von 40 nm. Die Photonenenergie von 510 eV erlaubte die Kontrastierung von kohlenstoffhaltigen biologischen Material gegenüber der umgebenden, amorphen Eismatrix.

Neben der Tomographie ermöglicht die Apparatur auch orts aufgelöste Spektroskopie Absorptionskanten.¹³¹

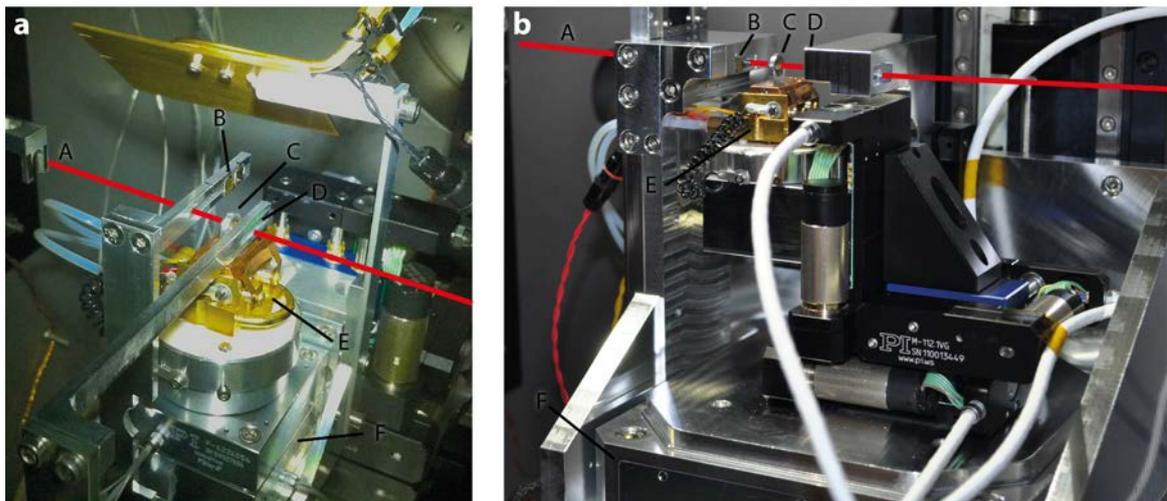
3.5.4 HORST

Ein Großteil der Experimente im weichen Röntgenbereich wurde mit der Röntgenstreuakammer HORST (**H**olographische **R**öntgen**st**reuapparatur) durchgeführt.⁸⁸ Das Innenvolumen der Kammer beträgt 75 cm × 60 cm × 100 cm (Breite × Höhe × Länge) und ist, verglichen mit anderen Apparaturen sehr geräumig und erlaubt eine große Flexibilität in Bezug auf den Aufbau des Experiments im Innenraum (Abbildung 27). Diese Flexibilität wird im aktuellen Aufbau deutlich, der linsenlose, diffraktionsbasierte Mikroskopie (Ptychographie)^{132–134} mit einer Auflösung von 53 nm¹³⁴, zonenplattenbasierte Röntgenmikroskopie (TXM) und Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) ermöglicht. Mit diesen Methoden kann eine Probe in kryogenen Umgebung untersucht werden. Hierbei ist das Design des Probenhalters wichtig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das aktuelle, 2. Design (Januar 2015) mit dem Vorgängermodell (Oktober 2013) verglichen. Während das 1. Design vibrationsanfällig war führte die Dämpfung der Eigenfrequenzen in 2. Design zu einer erheblichen Erhöhung der mechanischen Stabilität (Abbildung 28). Beide Designs enthalten alle für die verschiedenen Methoden kritischen optischen Elemente. So muss für die Ptychographie Messungen der Strahl mit einer Lochblende (B) zugeschnitten werden und nach Interaktion mit der Probe (C) frei propagieren. Bei TXM-Aufnahmen bildet eine Objektivzonenplatte (D) die Probe auf den Detektor ab. Die verwendete Zonenplatte, hergestellt von Anne Sakdinawat¹³⁵, hatte 280 Zonen, einem äußeren Durchmesser von 100 µm und eine Breite der äußersten Zone von 80 nm. Die äußere Zonenbreite ist limitierend für die Auflösung.¹³⁶ SAXS benötigt keine optischen Elemente, hier muss der Röntgenstrahl frei propagieren können. Als Detektor diente eine CCD-Kamera (DODX436-BN, Andor Technology Ltd., Belfast, UK) mit einer Fläche von 27,6 × 27,6 mm² bestehend aus 2048 × 2048 Pixeln mit einer Pixelgröße von 13,5 × 13,5 µm². Die Röntgenstreuakammer HORST wurde im Rahmen dieser Arbeit am Strahlrohr U49-2/PGM-1 bei BESSY II, Berlin betrieben. Hier hatte der einfallende Röntgenstrahl eine Intensität von 10¹³ Ph/s und war auf eine Fläche von 80 µm × 22 µm fokussiert.¹³⁷

Flash 100µm 35 nm außen



Abbildung 27: Blick ins Innere der Röntgenstreuammer HORST beim Aufbau am Synchrotron. Zu sehen ist das 2. Probenhalterdesign (Nahaufnahme in Abbildung 28).



- A - fokussierter Röntgenstrahl
- B - Lochblenden für Ptychographie
- C - Probe
- D - Objektivzonenplatte
- E - Probenhalter für kryogene Proben
- F - Piezoelektrische Verfahrtsche (Ptychographie)

Abbildung 28: Die Probenhalter für kryogene Proben in HORST ermöglichen es an derselben Probe Ptychographie, zonenplattenbasierter Röntgenmikroskopie und Röntgenkleinwinkelstreuung durchzuführen. a) Im ersten Design (Oktober 2013) waren die Komponenten anfällig für Vibrationen. b) Das zweite Design (Januar 2015) verringerte die Vibrationsanfälligkeit durch eine Dämpfung der Eigenfrequenzen.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Wirksamkeit der Antibiotika

Bei der Untersuchung antibiotischer Wirkmechanismen ist es essentiell, vorher die richtige Dosierung festzulegen. Zu hohe Konzentrationen bergen die Gefahr, dass sekundäre Wirkmechanismen auftreten, während zu geringe Konzentrationen zu keiner antibiotischen Wirkung führen. Ein Standardparameter zur Untersuchung von Antibiotika ist die minimale Hemmkonzentration (MHK). Dieser ist als diejenige Konzentration eines Antibiotikums definiert, die bei einer Zelldichte von 10^5 ml^{-1} ein Wachstum unterbinden kann. Hierzu wurden in einer 96-Titerplatte *E. coli*-Bakterien mit einer Zelldichte von 10^5 ml^{-1} mit einer Konzentrationsserie eines Antibiotikums versetzt. Anschließend wurden die Bakterien über eine Nacht bei 37° C inkubiert. Diejenige Antibiotikakonzentration bei der keine visuelle Trübung durch Zellwachstum aufgetreten war ist die MHK. Für jedes Antibiotikum wurden mindestens drei unabhängige Messungen durchgeführt. Details zur experimentellen Durchführung sind in Abschnitt 3.2.3 beschrieben. Die Resultate der MHK sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Für eine morphologische Untersuchung von *E. coli*-Bakterien wurde mehr Zellmaterial benötigt als mit einer Zelldichte von 10^5 ml^{-1} gewonnen werden konnte. Daher wurden diese Untersuchungen mit einer Zelldichte von 10^8 ml^{-1} durchgeführt. Um bei dieser um Faktor 1000 höheren Zelldichte eine antibiotische Wirkung zu erzielen, musste die Konzentration der Antibiotika erhöht werden. Die Bestimmung der MHK ist bei einer Zelldichte von 10^8 ml^{-1} nicht mehr möglich, da die Lösung bereits getrübt ist und ein Wachstum nicht detektiert werden kann. Daher wurde die Wirkung der Antibiotika mithilfe von Abtötungskurven verfolgt. Hierzu wurde eine beliebige Bakteriendichte verdünnt (im konkreten Fall in Zehnerschritten, also 1:10, 1:100,...) und anschließend auf Nähragar ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden konnten bei einer passenden Konzentration die aus einzelnen Zellen gewachsenen Kolonien gezählt werden und auf die Dichte in der Ausgangslösung zurückgerechnet werden. So erhält man die Zahl der kolonienbildenden Einheiten (KBE), erfasst also nur die lebensfähigen Bakterien. Auf Basis der MHK wurden Abtötungskurven verschiedener Antibiotikakonzentrationen bei der für morphologische Experimente benötigten Zelldichte von 10^8 ml^{-1} aufgenommen. Ziel war ein Abtötungsverhalten bei minimaler Antibiotikakonzentration bei gleichzeitiger dauerhafter Reduktion des Bakterienwachstums. So wurde der für die morphologischen Experimente relevante Zeitraum bis zu vier Stunden Inkubationszeit untersucht. Der Messpunkt nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden stellte sicher, dass es nicht zu einem erneuten Bakterienwachstum kam.

Antibiotika	MHK (10^5 Zellen)	Röntgenkleinwinkelstreuung (10^8 Zellen)
Ciprofloxacin	0,08 µg/ml	1 µg/ml
Rifampicin	12 µg/ml	100 µg/ml
Ampicillin	6,3 µg/ml	30 µg/ml
Cefepime	0,08 µg/ml	1 µg/ml
Piperacillin	6 µg/ml	60 µg/ml
Polymyxin B	3,1 µg/ml	10 µg/ml
Gentamycin	1,5 µg/ml	10 µg/ml
Kanamycin	1,5 µg/ml	10 µg/ml
Tetracyclin	1,5 µg/ml	30 µg/ml
Chloramphenicol	6,3 µg/ml	60 µg/ml
RLKRWWKFL	25 µg/ml	75 µg/ml

Tabelle 1: Übersicht über die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) der verwendeten Antibiotika bei einer Bakterienkonzentration von (10^5 /ml). In den Röntgenstreuexperimenten wurde aufgrund der höheren Bakteriendichte (10^8 /ml) eine 3 – bis 20-fach höhere Konzentration verwendet.

Die Abtötungskurven der Antibiotika sind in Abbildung 29 gezeigt. Man sieht die Unterschiede zwischen bakteriostatischen Antibiotika, bei denen die Zahl der Bakterien konstant bleibt aber nicht weiter wächst. Dies sind Tetracyclin, Chloramphenicol, Kanamycin, Cefepime und Piperacillin. Eine bakterizide Wirkung tritt bei Ampicillin, Gentamycin, Rifampicin, Polymyxin B und dem kurzen kationischen Peptid (RLKRWWKFL) auf. Nach spätestens vier Stunden hatten alle Antibiotika ihre Wirkung entfaltet. Mit Ausnahme von Polymyxin B und Peptid A tritt die antibiotische Wirkung erst nach einiger Zeit ein, was ein Zeichen für eine angemessene Dosierung ist.

Die Abtötungskurven wurden bei verschiedenen Antibiotikakonzentrationen wiederholt und immer weiter gesenkt, bis die minimale Konzentration, bei der eine Wirkung hervorgerufen wurde erreicht war. Diese Konzentration sind in Tabelle 1 und die zugehörigen Abtötungskurven in Abbildung 29 gezeigt. Die Konzentrationen liegen Faktor 3 – 20 über der minimalen Hemmkonzentration und sind damit auch Einklang mit üblichen Arbeitskonzentrationen der Antibiotika bei biochemischen Experimenten.¹³⁸

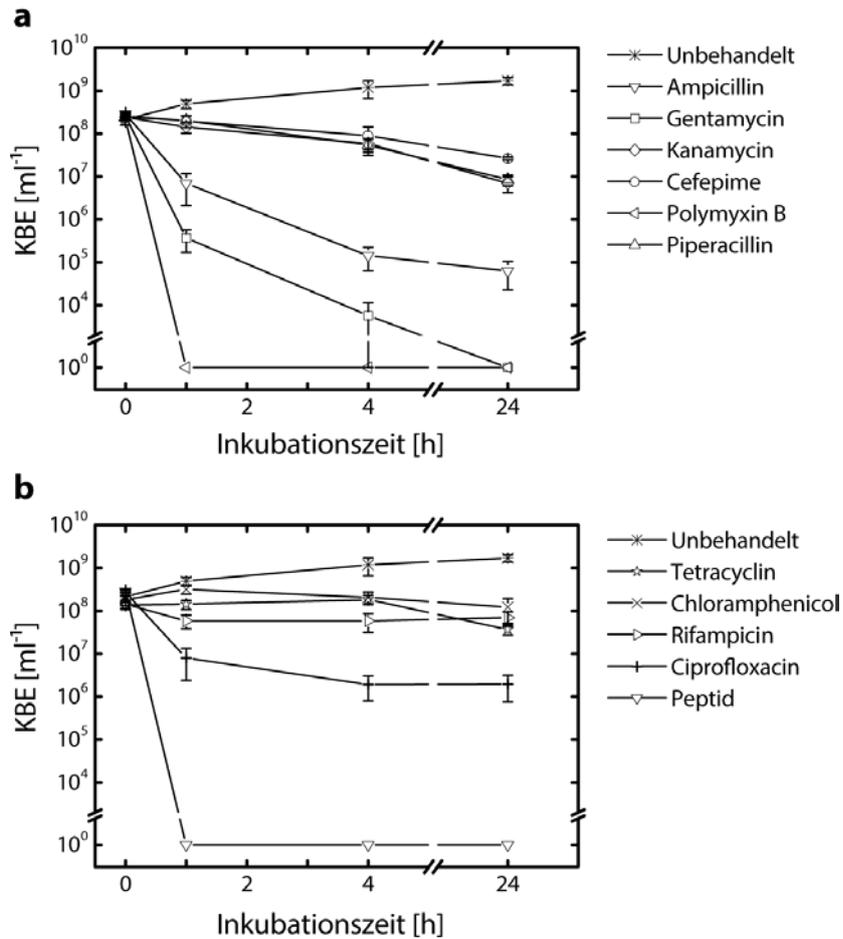


Abbildung 29: Abtötungskurven für verschiedene Antibiotika bei den experimentell verwendeten Bakterienkonzentrationen (10^8 Bakt./ml). Die Zahl der kolonienbildenden Einheiten (KBE) wurde mittels Ausplattieren bestimmt. Die Antibiotikakonzentration (Tabelle 1) waren identisch zu den Konzentrationen der morphologischen Experimente. Jeder Messpunkt wurde über drei Messungen gemittelt und der angezeigte Fehler ist der Standardfehler des arithmetischen Mittels. Die Linien zwischen den Messpunkten dienen der besseren Lesbarkeit.

4.2 Kontrastmechanismen von TEM, TXM und SAXS

Bei der Untersuchung der bakteriellen Morphologie ist es essentiell die Kontrastmechanismen der verschiedenen Mikroskopie- und Streutechniken zu berücksichtigen. Die verwendeten und im Abschnitt 2 eingeführten Methoden umfassten Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), Röntgenmikroskopie mit Zonenplatten (TXM) und Kleinwinkelstreuung (SAXS).

SAXS und TXM verwenden keine Färbechemikalien und der intrinsische Unterschied in der Elektronendichte der zellulären Strukturen erzeugt den Kontrast. Eine etablierte bildgebende Methode mit demselben Kontrast und Auflösung im Nanometer Bereich ist die Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM). Die internen Strukturen in einer Bakterienzelle sind an einem Beispiel aus der Literatur⁵² in Abbildung 30 gezeigt. So sind die Ribosomen, die DNS und die Zellmembranen gegen das elektronenärmere Zytoplasma kontrastiert. Da ein *E. coli*-Bakterium kaum Metallverbindungen enthält, ist davon auszugehen, dass die vorliegenden Kontraste vor allem durch verdichtete Materie erzeugt werden.

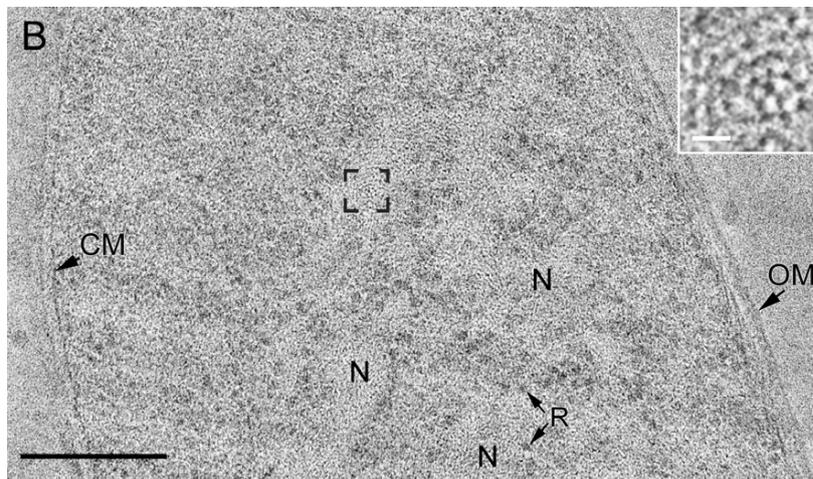


Abbildung 30: Kryo-TEM Aufnahme von mit Chloramphenicol (25 µg/ml, eine Stunde) behandelten *E. coli* Zellen. Die DNS ist vornehmlich im Nukleoid (N) lokalisiert. Die Vergrößerung zeigt einen Schnitt durch die verdrehten Fasern. Die Ribosomen (R) nehmen weite Teile der Fläche außerhalb des Nukleoids ein. Sowohl die äußere Membran (OM) als auch die Zytoplasmamembran (CM) sowie der dazwischenliegende periplasmatische Raum sind schwächer kontrastiert. Der Skalierungsbalken hat eine Länge von 200 nm, in der Vergrößerung 10 nm. **Abbildung aus Eltsov et al., Journal of Structural Biology (2006), Elsevier.**⁵²

Da auch SAXS und TXM auf intrinsischen Kontrasten basieren, sind die zugänglichen Zellkomponenten dieselben wie bei Kryo-TEM (Abbildung 30). Im Unterschied zu den Dünnschnitten der TEM-Aufnahmen wurden die TXM-Messungen an ganzen *E. coli* Zellen in der Projektion vorgenommen. Die in einem Dünnschnitt wie in Abbildung 30 gezeigt Kontraste heben sich in übereinanderliegenden Ebenen wieder auf. Solange sich nicht ein in allen Schnittebenen an derselben Stelle ein Kontrastgebendes Element befindet ist dieser in Projektionsaufnahmen nicht zugänglich. Mit TXM-Tomographieaufnahmen kann dieses Problem gelöst werden.¹³⁹ Auch in der Streumethode SAXS wird die gesamte Zellstruktur integral untersucht und Inhomogenitäten in der Elektronendichte werden detektiert. Die

Intensität mit der eine Zellstruktur zum SAXS-Signal beiträgt hängt vom eingenommenen Volumen und dem Streukontrast der Struktur ab. Die Zellmembranen nehmen nur ein kleines Volumen ein und haben daher auch nur einen kleinen Beitrag zu SAXS-Signal.

Bei TEM, einer konventionellen Methode der Strukturaufklärung wurde durch Anfärben mit Schwermetallen eine hohe lokale Elektronendichte erzeugt und damit Kontrast generiert. Beim in dieser Arbeit verwendeten Standardprotokoll¹⁸ wird die Probe zuerst mit Glutaraldehyd fixiert und in einem zweiten Schritt mit Osmiumtetroxid⁸⁰ nachfixiert und gefärbt. Anschliessend wurde die Probe mit Uranylacetat gefärbt und alle Färbungen in einem letzten Schritt mit Bleicitrat verstärkt. Osmiumtetroxid fixiert vor allem die Lipidstruktur einer Zelle und färbt dank seiner hohen Elektronendichte vor allem die Doppelbindungen ungesättigter Fette sowie Aminosäuren mit ungesättigten Kohlenstoffdoppelbindungen.^{58,81} Uranylacetat färbt Proteine durch Bindung an die Carboxylgruppen und Amidgruppen.⁸² Außerdem bindet Uranylacetat an die Phosphatgruppen von DNS und RNS.⁸¹ Bleicitrat dient Verstärkung der Färbung von Osmiumtetroxid und Uranylacetat und lagert sich, so die Theorie, als positives Ion nahe der negativ geladenen, osmiumfixierten Zellteile an.⁸² Im Zuge der Fixierung und Färbung kommt es in der bakteriellen Zelle zur Aggregation einzelner Ribosomen, so dass diese in konventionellen TEM-Aufnahmen nicht unterscheidbar sind.⁵²

Im direkten Vergleich von SAXS mit angefärbten TEM Dünnschnitten erwartet man also, dass die gleichen zellinternen Strukturen (Ribosome, DNS, Proteine) einen Kontrast verursachen. Die relative Intensität dieses Kontrasts wird allerdings durch die Färbung in den TEM-Aufnahmen verzerrt dargestellt.

4.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) bietet die Möglichkeit, hochauflösende Bilder der bakteriellen Morphologie an Dünnschnitten zu erhalten. Die Probenpräparation wurde in Kapitel 3.3 beschrieben und die zu erwartenden Kontraste im vorangegangenen Abschnitt diskutiert.

Die morphologische Änderung in *E. coli* Zellen wurde bei in den mikrobiologischen Experimenten ermittelten Antibiotikakonzentrationen untersucht. Die in TEM-Aufnahmen eines *E. coli*-Bakteriums sichtbaren Bestandteile sind in Abbildung 31 exemplarisch dargestellt. Zur Kontrastierung wurden die Dünnschnitte mit Osmiumtetroxid, Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt. Hierbei färbt Osmium Tetroxid vor allem Lipide und Proteine und damit Zellwand und das proteinreiche Cytoplasma. Uranylacetat färbt vor allem DNS und RNS und damit auch die aus RNS bestehenden Ribosomen. Bleicitrat verstärkt die Färbung der beiden anderen Farbstoffe. Die Epoxidmatrix im Hintergrund der Aufnahmen ist hell, da überschüssige Farbstoffe nach dem Färbvorgang ausgewaschen werden. In den TEM-Aufnahmen ist die DNS in einem DNS-Plasma, dem Nukleoid, einem hellen Bereich im Zentrum, lokalisiert (Abbildung 31).¹⁴⁰ Dieser Bereich ist arm an Proteinen, die stärker gefärbt werden als DNS und RNS. Innerhalb des Nukloids lassen sich jedoch einzelne DNS-Fibrillen erkennen. Außerdem sind die äußere und innere Membran sowie der dazwischenliegende periplasmatische Raum sichtbar. Einzelne Ribosomen sind anders als in der Cryo-TEM Mikroskopie⁵² (Abbildung 30) hier nicht erkennbar, da sie im Zuge von Fixierung und Färbung aggregieren.

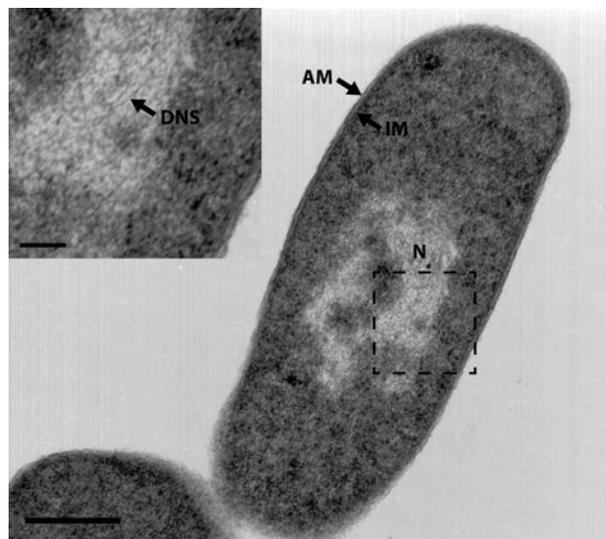


Abbildung 31: TEM-Aufnahme einer mit Chloramphenicol behandelten *E. coli*-Bakteriums. Der helle Bereich im Innern der Zelle ist das aufgrund eines geringeren Protein- und Lipidgehalts schwächer gefärbte DNS-Plasma, genannt Nukleoid (N). In der Vergrößerung erkennt man einzelne DNS-Fibrillen im Fokus. Gut kontrastiert sind die äußere (AM) und innere Zellmembran (IM) sowie der dazwischenliegende periplasmatische Raum. Der Skalierungsbalken hat eine Länge von 1 μm , in der Vergrößerung 100 nm.

Tabelle 2 zeigt repräsentative TEM-Aufnahmen der mit Antibiotika behandelten *E. coli*-Bakterien in unterschiedlichen Vergrößerungen. Unbehandelte *E. coli*-Bakterien (Tabelle 2a) waren zu

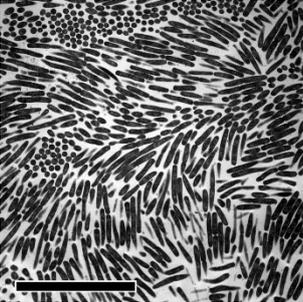
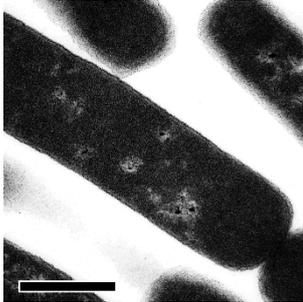
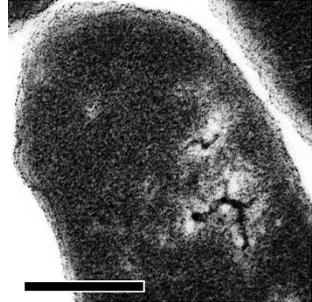
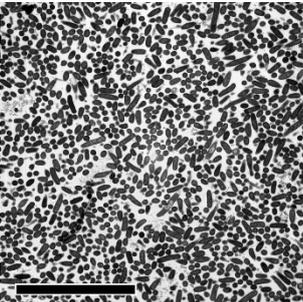
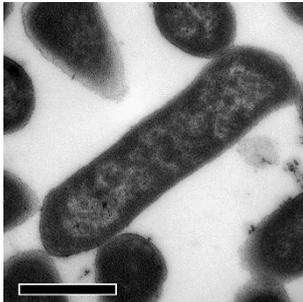
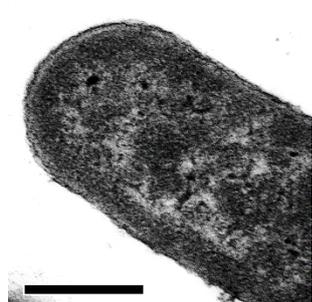
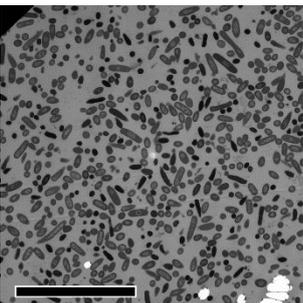
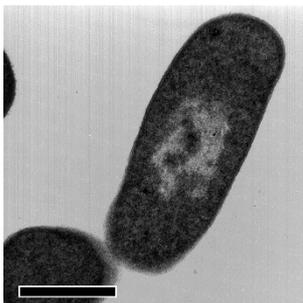
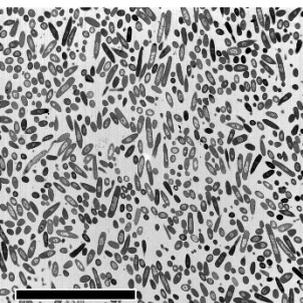
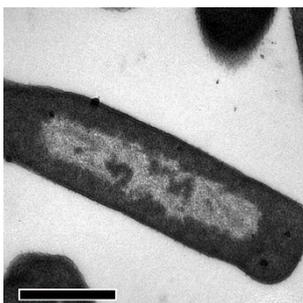
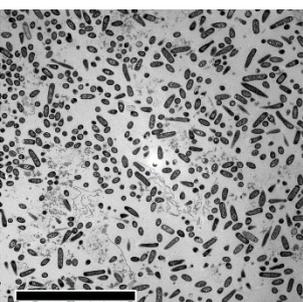
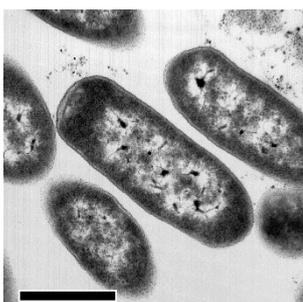
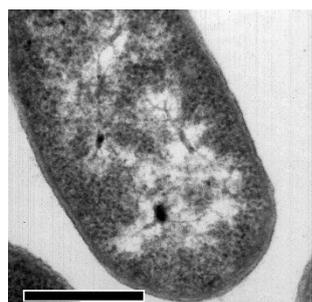
Beginn des Experiments (0 Stunden) gleichmäßig im Zytoplasma verteilt und an einigen Transkriptionsfoki, an denen die Ribosomen synthetisiert werden lokalisiert. Nach vier Stunden Inkubationszeit (Tabelle 2b) war der Nukleoid gleichmäßiger in der ganzen Zelle verteilt und nahm eine größere Fläche ein. Das Bakterienensemble ist einheitlich, einige Bakterien sind gerade in der Teilungsphase und deshalb überlang. Die Zellmembran ist an allen Bakterien intakt. Die Inhibierung der Proteinsynthese durch Tetracyclin oder Chloramphenicol (Tabelle 2c und d) hatte eine Kondensation des Nukleoids im Zentrum der Bakterienzelle zur Folge. Die Zellmembranen blieben intakt, im Nukleoid sind einzelne, dicht gepackte DNS-Fibrillen zu erkennen. Aminoglykoside wie Gentamycin und Kanamycin (Tabelle 2c und d), die ebenfalls auf die Proteinsynthese wirken, aber hauptsächlich zur Bildung von fehltranslatierten Proteinen führen, hatten keinen Einfluss auf die Form des Nukleoids. Dieser war ähnlich der Kontrollbakterie nach vier Stunden Inkubationszeit an verschiedenen Stellen in der Zelle lokalisiert. Zusätzlich traten bei Gentamycin Verklumpungen der DNS-Fibrillen im Nukleoid auf. Eine Behandlung mit dem DNS-Syntheseinhibitor Ciprofloxacin (Tabelle 2e) führte zu einer Verlängerung der einzelnen Zellen. In diesen Bakterienzellen konnte ein verringerter interner Kontrast beobachtet werden. Rifampicin (Tabelle 2f), ein RNS-Synthese Inhibitor, bewirkte eine sichtbare Ausdehnung des Nukleoids in der Zelle. Die einzelnen Fibrillen im Nukleoid sind verteilter als in den Beispielen der Proteinsyntheseinhibitoren. Unterschiedliche morphologische Änderungen waren für die β -Lactam Antibiotika feststellbar: Ampicillin (Tabelle 2i) bewirkte eine Kondensation des Nukleoids, Cefepime (Tabelle 2j), eine Elongation der Zelle und Piperacillin (Tabelle 2k), einen verminderten internen Kontrast. Die Form des Nukleoids einer Cefepime oder Piperacillin Behandlung ist vergleichbar mit der unbehandelten Kontrolle. Polymyxin B (Tabelle 2l) destabilisierte die Zellmembran, was sich in den TEM-Aufnahmen durch eine undefinierte Membranstruktur mit vielen Blasen äußerte. Der Nukleoid verschwand und stattdessen bildeten sich stark gefärbte Strukturen, vor allem an den Zellenden. Der unbekannte Mechanismus des antimikrobiellen Peptids (Tabelle 2m) führte vereinzelt zur Bildung kleiner Blasen in der Zellmembran, die Integrität der Membran blieb jedoch weitgehend erhalten. Entlang der Zellwand und an den Enden der Zelle bildeten sich stark gefärbte granulare Strukturen mit einem mittleren Durchmesser von ca. 75 nm.

Die gefundenen morphologischen Änderungen waren mit den in der Literatur vorgeschlagenen Mechanismen im Einklang.^{30,42} So wurde beispielsweise die Kondensation des Nukleoids nach einer Behandlung mit Chloramphenicol oder Tetracyclin bereits mit Fluoreszenzmikroskopie und Kryo-TEM beschrieben.^{17,141} Da beide Antibiotika am Ribosom angreifen erscheint eine direkte Interaktion mit der DNS im Nukleoid unwahrscheinlich.

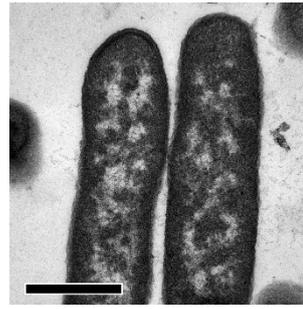
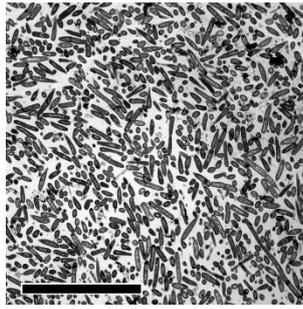
Ein aktuelles Modell erklärt die äußere Form des Nukleoids über ein Gleichgewicht von expandierenden und kompaktierenden Kräften.^{17,37,57} Die Synthese und der Export von Membranproteinen müssen in räumlicher Nähe zur Zellwand geschehen. Da Proteinsynthese (Translation) und RNS-Synthese (Transkription) gekoppelt stattfinden, sind bei aktiver Proteinsynthese Teile des Nukleoids an die Zellwand assoziiert.⁵⁷ Dies die expandierende Kraft

aufgrund der sog. „Transertion“. Kompaktierend wirkt die Verdrillung der DNS durch die Bildung räumlich lokalisierte Schwerpunkte der RNS-Synthese (sog. Transkriptionsfoki), die besonders bei der Synthese der Ribosomen auftreten.¹⁷ Nach erfolgter Hemmung der Proteinsynthese durch Tetracyclin und Chloramphenicol entfällt die expandierende Kraft der Translation und die kompaktierende Kraft der Transkription kondensiert den Nukleoid. Auch die Expansion des Nukleoids nach einer Behandlung mit Rifampicin wurde mit Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen.^{17,33} Auch Rifampicin interagiert nicht direkt mit der DNS im Nukleoid, sondern die Inhibierung der Transkription führt in der Konsequenz zu einer Entspannung der DNS und damit zu einer gleichmäßigeren Verteilung in der Zelle.³⁷

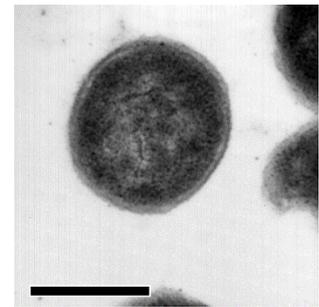
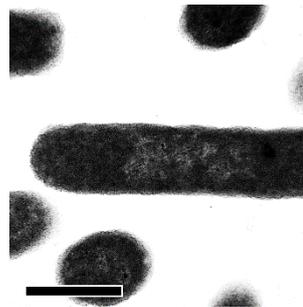
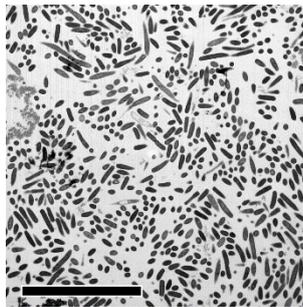
Die Elongation der bakteriellen Zelle nach einer Behandlung mit Ciprofloxacin ist auf die Unfähigkeit der Bakterie eine Kopie ihrer DNS zu erstellen zurückzuführen. Es wird vermutet, dass die meisten Zellbestandteile in Zuge der Zellteilung bereits dupliziert sind und die Bakterien daher Überlänge hat.¹⁴² Die Zerstörung der Zellmembran nach einer Behandlung mit Polymyxin B ist auf dessen Wirkung als Detergenz zurückzuführen.³⁰

Antibiotikum, Behandlungsdauer, Wirkmechanismus	Länge Skalierungsbalken (Vergrößerung)		
	20 µm (2500x)	1 µm (40000x)	0.5 µm (100000x)
a) unbehandelt, 0 Stunden			
b) unbehandelt, 4 Stunden			
c) Chloramphenicol, 4 Stunden, Proteinsynthese Inhibitor			
d) Tetracyclin, 4 Stunden, Proteinsynthese Inhibitor			
e) Gentamycin, 4 Stunden, Protein Synthese Aminoglykosid			

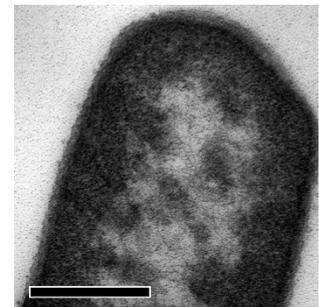
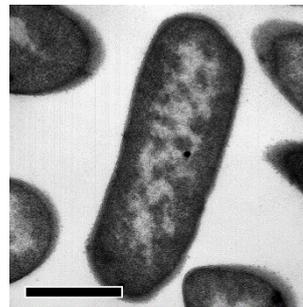
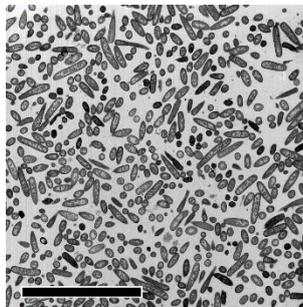
f) Kanamycin,
4 Stunden,
Protein Synthese
Aminoglykosid



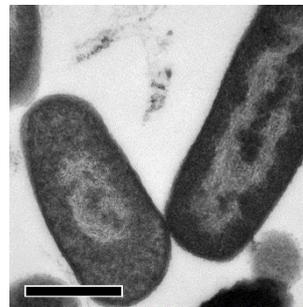
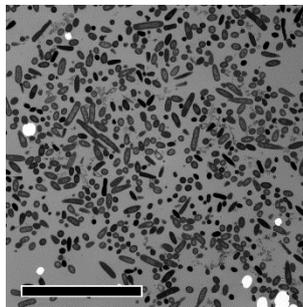
g) Ciprofloxacin,
4 Stunden,
DNS Synthese
Inhibitor



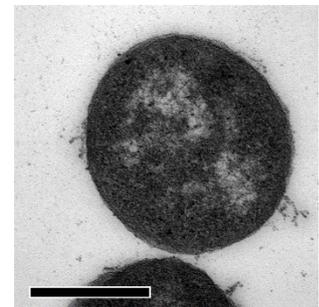
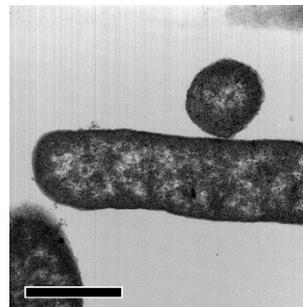
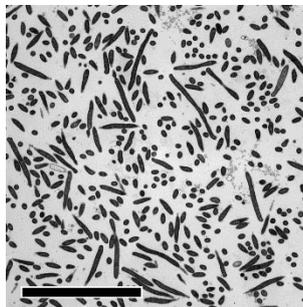
h) Rifampicin,
4 Stunden,
Inhibierung der RNS
Synthese



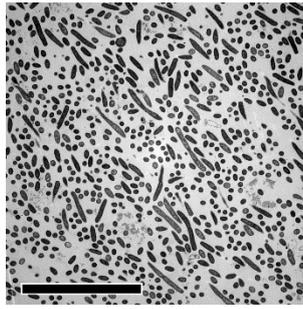
i) Ampicillin,
4 Stunden,
 β -Lactam



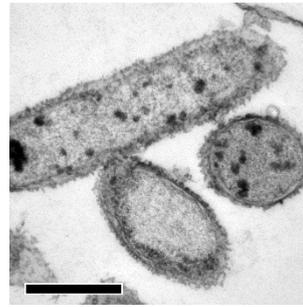
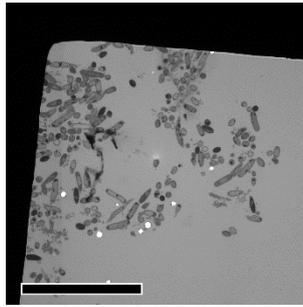
j) Cefepime,
4 Stunden,
 β -Lactam



k) Piperacillin,
4 Stunden,
 β -Lactam



l) Polymyxin B,
30 Minuten,
Zerstörung der
Zellmembran



m) Peptid,
30 Minuten,
unbekannt

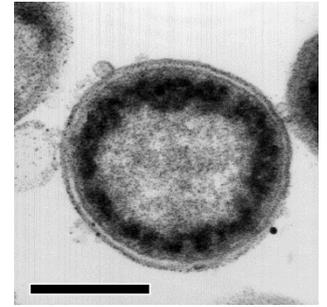
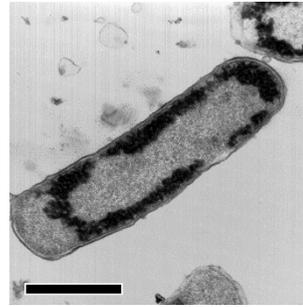
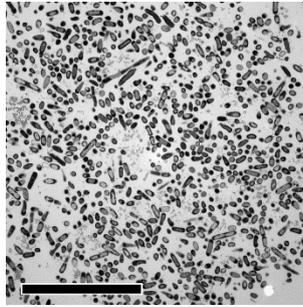


Tabelle 2: Repräsentative TEM-Aufnahmen der antibiotischen Behandlungen bei verschiedenen Vergrößerungsstufen. Die Dünnschnitte (100 nm) wurden mit Osmiumtetroxid, Uranylacetat und Bleicitrat angefärbt. Die Länge des Skalierungsbalkens in den Spalten von links nach rechts: 20 μm , 1 μm , 0,5 μm .

4.3.1 Quantitative Bildanalyse

Die quantitative Bildanalyse wurde von Markus Reischl (Institut für Angewandte Informatik (IAI)), Karlsruhe Institut für Technologie (KIT) durchgeführt. Kern war die Formanalyse des Nukleoids. Dessen Verteilung in der Bakterienzelle wurde mit einem Soliditätsparameter beschrieben. Die Extreme sind ein kondensierter Nukleoid im Zentrum der Zelle und ein in der gesamten Zelle verteilter Nukleoid (Abbildung 33). Da Bilder einzelner Bakterien durch die Auswahl des Experimentators beeinflusst werden, wurden für diese Analyse die Übersichtsbilder mit einer hohen Anzahl an Bakterien verwendet. In einem ersten Schritt wurden die Bakterien innerhalb eines Bildes erkannt (Abbildung 32) und anschließend die Form des Nukleoids extrahiert.

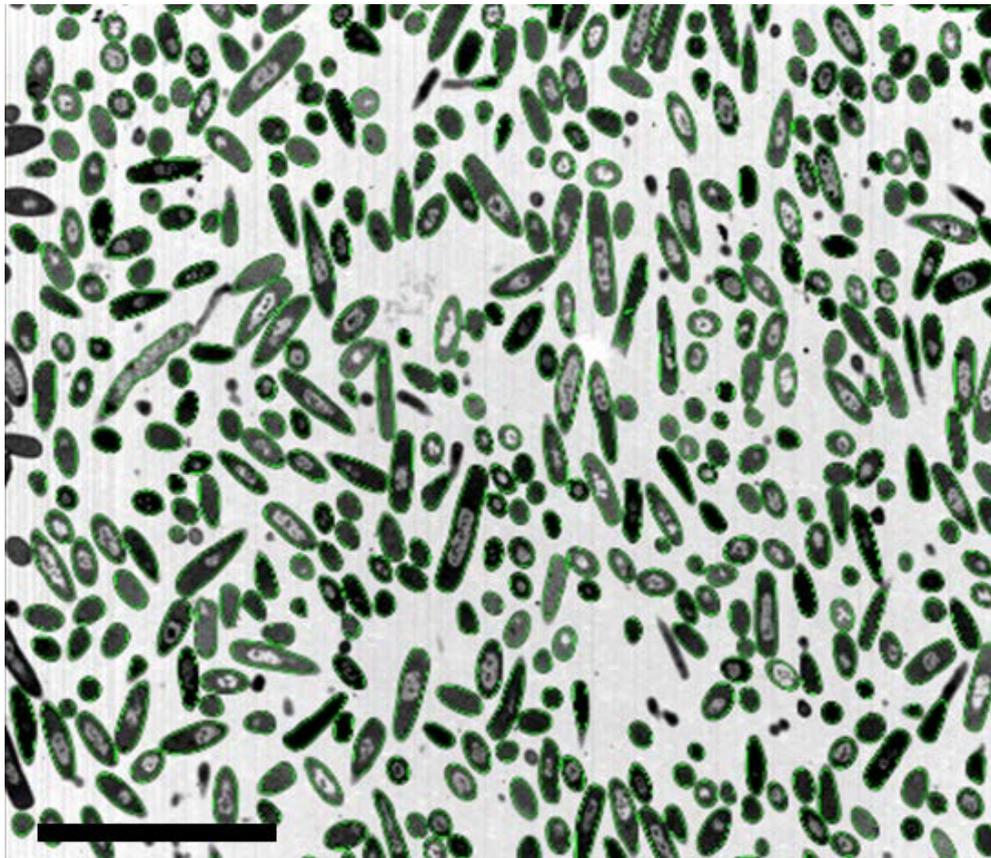


Abbildung 32: Beispiel für die Segmentierung und das Erkennen der einzelnen Bakterien in der quantitativen Analyse. Die TEM-Aufnahme zeigt mit Tetracyclin behandelte *E. coli*-Bakterien. Alle grün umrandeten Objekte wurden als Bakterien klassifiziert. Der Skalierungsbalken hat eine Länge von 20 μm .

Der Nukleoid wurde anhand seiner höheren Helligkeit erkannt. Hierzu wurde 50 % der relativen Intensität innerhalb einer Bakterie als Schwellwert zur Nukleoiderkennung verwendet. Der Fragmentierungsgrad oder Kompaktheit des Nukleoids wurde anhand eines „Soliditätsparameters“ beurteilt. Dieser berechnete sich aus dem Verhältnis zwischen der Fläche des Nukleoids und einer konvexen Hülle um alle Nukleoidanteile. Beispiele für unterschiedliche Soliditätswerte sind in Abbildung 33 gezeigt. Ein fragmentierter Nukleoid mit kleinem Soliditätsparameter war in unbehandelte *E. coli* ($S = 0,36$) in der exponentiellen Wachstumsphase zu sehen. Bei unbehandelten *E. coli* nach 4 Stunden Inkubationszeit ist der Nukleoid lokalisierter ($S = 0,48$). Die höchste Solidität ($S = 0,81$) wurde nach einer Behandlung mit den kurzen kationischen Peptid gefunden und ist hier auf das homogene Zellinnere zurückzuführen. Das detaillierte Vorgehen der Analyse ist in 3.4.4 beschrieben. Hierbei wurden für jede Behandlung 5 TEM-Aufnahmen untersucht, wobei auf jeder zwischen 100 und 300 Bakterienzellen zu sehen waren.

Soliditätsparameter S

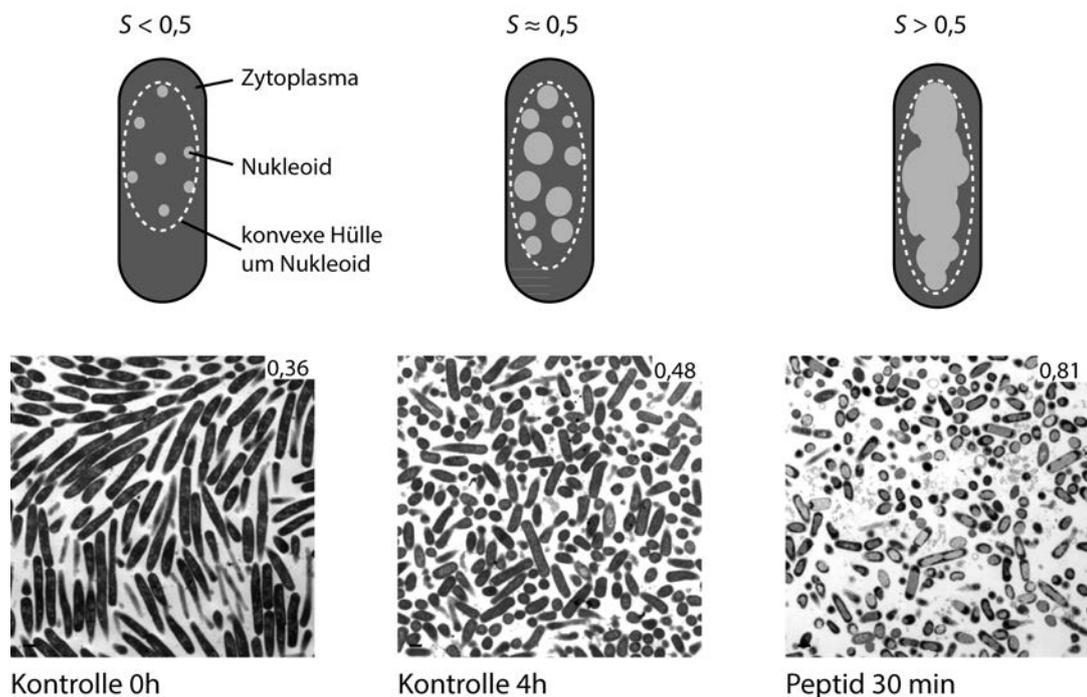


Abbildung 33: Berechnung des Soliditätsparameters. Der Soliditätsparameter S ist das Verhältnis der Fläche des Nukleoids zur Fläche einer konvexen Hülle um alle Nukleoidanteile. Damit ist S ein Indikator dafür, wie stark der Nukleoid fragmentiert ist. Unten sind Ausschnitte aus den TEM-Aufnahmen mit der entsprechenden Solidität (obere rechte Ecke) gezeigt. Der Skalierungsbalken hat eine Länge von $1 \mu\text{m}$.

Die resultierenden Soliditätswerte des Nukleoids nach Antibiotikabehandlung sind in Abbildung 34 gezeigt. Gezeigt sind die Mittelwerte der Soliditätswerte der aller TEM-Aufnahmen sowie der Standardfehler des Mittelwerts. Klar erkennbar sind die starken Veränderungen des Zytoplasmas nach einer Behandlung mit Polymyxin B und dem Peptid A. Hier war kein Nukleoid mehr zu sehen, da sich das Zellmaterial in den stark gefärbten Bereichen

verdichtete. Die Kondensation des Nukleoids nach einer Behandlung mit Tetracyclin, Chloramphenicol und Ampicillin führte zu einer Erhöhung des Soliditätsparameters und ist auch in den Einzelbildern sichtbar. Besonders stark fragmentiert war der Nukleoid bei den Kontrollbakterien zu Beginn der Messungen sowie nach einer Behandlung mit Cefepime, Piperacillin oder Gentamycin. Nach vier Stunden Inkubationszeit nahm der Nukleoid eine korallenartige Form an mit lokal dichteren Teilen. Dies war auch nach der Behandlung mit Ciprofloxacin, Kanamycin und Rifampicin zu beobachten.

Die verbleibenden Antibiotika veränderten die Form des Nukleoids relativ zur unbehandelten Bakterie nur geringfügig. So war der Nukleoid nach einer Behandlung mit Cefepime, Piperacillin und Gentamycin ähnlich dem einer Bakterie in der exponentiellen Wachstumsphase (Kontrolle 0h). Der etwas lokalisierte Nukleoid im Übergang zur stationären Phase (Kontrolle 4h) fand sich nach einer Behandlung mit Ciprofloxacin, Rifampicin und Kanamycin.

Diese Ergebnisse sind mit Literaturbefunden im Einklang. So ist die Kondensation des Nukleoids nach einer Behandlung mit Tetracyclin, Chloramphenicol und Ampicillin bereits beschrieben und einer verringerten Translationsaktivität geschuldet (siehe Diskussion der Einzelbilder).^{17,141} Die in den Einzelbildern und in Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen in der Literatur^{16,37} festgestellte Expansion des Nukleoids¹⁷ durch gehemmte Transkriptionsaktivität (siehe Diskussion der Einzelbilder) nach einer Behandlung mit Rifampicin, ist in der quantitativen Bildanalyse nicht nachweisbar. In unbehandelten *E. coli* ist laut dem aktuellen Modell die Aktivität der DNS-abhängigen RNS-Polymerase (RNAP) bestimmend für die Form des Nukleoids.^{16,17} Bei unbehandelten *E. coli* in der exponentiellen Wachstumsphase ist die DNS gleichmäßig in der Bakterienzelle verteilt. Die hohen Syntheseraten von Ribosomen führen zur Bildung von lokalen Transkriptionsfoki in denen die Komponenten der Ribosomen in lokaler Nähe zueinander synthetisiert und assembliert werden.¹⁷ Wenn sich der Zellzyklus der stationären Phase annäherte, bildeten sich immer größere Anlagerungen von DNS.³⁷ Dieser Übergang ist auch in den TEM-Aufnahmen dieser Arbeit zu erkennen.

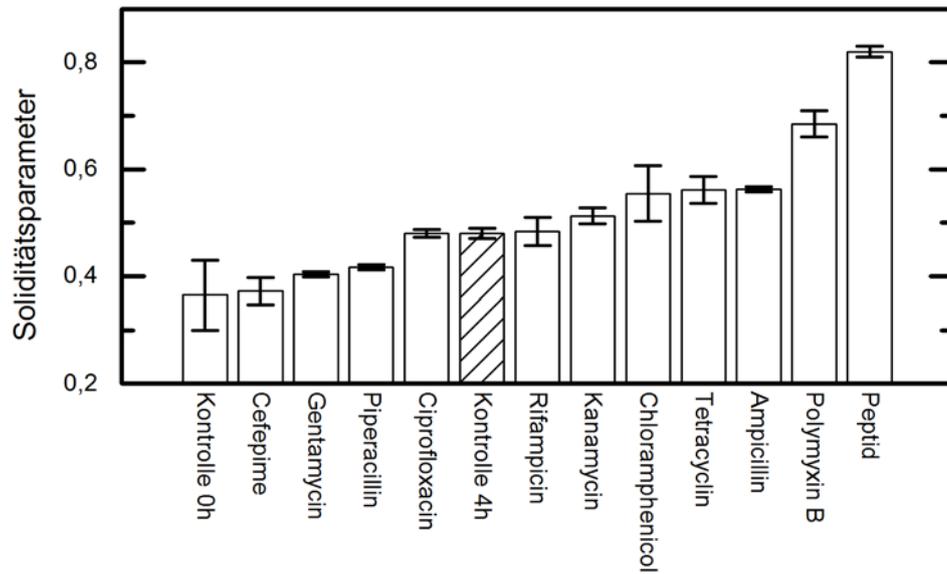


Abbildung 34: Der Soliditätsparameter des Nukleoids berechnet aus den TEM-Übersichtsaufnahmen. Polymyxin B und das Peptid wiesen aufgrund der Veränderung des Zytoplasmas die stärksten Unterschiede auf. Die Kondensation des Nukleoids nach einer Behandlung mit Tetracyclin, Chloramphenicol und Ampicillin ist ebenfalls nachweisbar. Ein stark fragmentierter Nukleoid findet sich bei den unbehandelten Zellen nach 0 h sowie nach einer Cefepime, Piperacillin oder Gentamycin Behandlung. Der korallenartige Nukleoid einer unbehandelten Zelle nach 4 h war ebenso bei Ciprofloxacin, Rifampicin und Kanamycin vorhanden.

4.3.2 Fazit

Mit Transmissionselektronenmikroskopie konnten die morphologischen Änderungen der unterschiedlichen Antibiotika visualisiert und beurteilt werden. Die stärksten Änderungen traten nach einer Behandlung mit Polymyxin B und dem kurzen, kationischen Peptid auf. Hier bildeten sich stark gefärbte granulare Strukturen vor dem Hintergrund eines homogenen Zytoplasmas. Im Unterschied zu Polymyxin B blieb nach einer Behandlung mit dem Peptid die Zellmembran intakt.

Für die weiteren Antibiotika war die Struktur der DNS im Zentrum der Bakterienzelle im sog. Nukleoid entscheidend. Eine Behandlung mit Chloramphenicol, Tetracyclin und Ampicillin führte zu einer Kondensation des Nukleoids in eine elliptische Struktur im Zellzentrum. Die Befunde aus der Einzelbildanalyse konnten mit einer quantitativen Bildanalyse der Nukleoidstruktur bestätigt werden (Abbildung 34). Eine Behandlung den β -Lactamen Cefepime und Piperacillin, dem Gyrase-Hemmer Ciprofloxacin und den Aminoglycosiden Gentamycin und Kanamycin veränderte die Nukleoidstruktur nicht verglichen mit der unbehandelten Bakterienzelle. Sie lassen sich zwischen dem stark fragmentierten Nukleoid der *E. coli* in der exponentiellen Wachstumsphase und der korallenartigen Struktur der Nukleoids im Übergang zur stationären Phase nach vierstündiger Inkubationszeit einordnen.

4.4 Zonenplattenbasierte Röntgenmikroskopie

Die Vollfeldmikroskopie mit Zonenplatten (TXM von engl. Transmission X-ray Microscopy) im weichen Röntgenbereich bietet die Möglichkeit, natürliche Elektronendichtekontraste abzubilden und gleichzeitig Proben bis ca. 10 μm zu durchdringen.⁶⁵ Im sog. Wasserfenster¹³⁹ (284 eV – 543 eV) können kryogene Proben dank eines starken Kohlenstoffkontrasts bei schwacher Sauerstoffabsorption untersucht werden. Eine kryogene Probenumgebung erlaubt die Untersuchung von biologischen Proben in ihrer natürlichen Umgebung. Die hydratisierte Probe wird hier in amorphem Eis eingebettet. Die Vorteile gegenüber der Elektronenmikroskopie sind, dass auf Dünnschnitte verzichtet werden kann und die Probe als Ganzes abgebildet wird. In Kombination mit Rotationsprobenhaltern ist es möglich, Tomographie mit einer Auflösung von bis zu 60 nm zu erhalten.^{143,144} Wenn ungefärbte Proben verwendet werden, kann auf die lokale Materialdichte geschlossen werden. Somit ist TXM, eine zu TEM komplementäre Methode, die es ermöglicht ein biologisches Objekt, z.B. eine Zelle als Ganzes zu betrachten und die lokale Zusammensetzung zu analysieren.¹⁴⁵

Die in der Arbeitsgruppe Rosenhahn entwickelte Röntgenstreukammer HORST ermöglicht Vollfeldmikroskopie in Kombination mit Ptychographie und Kleinwinkelstreuung. Da die Vollfeldmikroskopie ungefärbte Proben verwendet werden, ist der Kontrastmechanismus analog zu dem der Kleinwinkelstreuung. Dies ermöglicht in Korrelation mit TEM-Aufnahmen die Identifikation von Strukturen mit erhöhter Elektronendichte in behandelten *E. coli*. Das Design des multifunktionalen Probenhalters wurde in den letzten Jahren weiterentwickelt. Das von Dr. Thomas Gorniak entwickelte zweite Design wurde im Rahmen dieser Arbeit getestet mit der Vorgängerversion und einem dezidierten Röntgenmikroskop verglichen.

4.4.1 Bestimmung der Auflösungsgrenze an einer Teststruktur

Die Auflösungsgrenze des neuen Probenhalterdesigns in Kombination mit einer Zonenplatte (Hergestellt von Anne Sakdinawat¹³⁵) mit 80 nm Durchmesser der äußersten Zone, wurde an einer Siemensstern-Teststruktur (ATN/XRESO-50, NTT Advanced Technology Corporation, Japan) bestimmt. Die Teststruktur besteht aus einer nanostrukturierten Tantalschicht auf einer mit Ruthenium bedampften Siliziumnitrit Membran (Ru(20 nm)/SiC(200 nm)/SiN(50 nm)). Die Teststruktur bestand aus einzelnen Balken, die als Ring angeordnet waren und am jeweils inneren Ende eine definierte Breite haben (Abbildung 35). Die äußeren Ringe mit 1 μm , 0,5 μm und 0,2 μm Strukturgröße waren gut auflösbar. Der zweitinnerste Ring mit 0,1 μm war teilweise sichtbar, während der innerste Ring mit 50 nm-Strukturen nicht mehr aufgelöst werden konnte. Die Messungen wurden mit der Röntgenstreuammer HORST und dem zweiten Probenhalterdesign am Strahlrohr U49/2 PGM-1 bei BESSY II in Berlin durchgeführt. Die Auflösungsgrenze in vertikaler Richtung war 100 nm während in horizontaler Richtung 200 nm erreicht wurden. Limitierend für die Auflösung in horizontaler Richtung waren vermutlich Vibrationen des Probenhalters. Der weiterentwickelte Probenhalter verringerte dieses Problem erheblich. Da die Auflösung durch die Geometrie der Zonenplatte auf 80 nm begrenzt war, ist die Auflösung von 100 nm in horizontaler Richtung ein sehr gutes Ergebnis. Mit Zonenplatten, die eine höhere Auflösung ermöglichen, wurden von Schneider et al. Tomographie⁷³ an kryogenen, biologischen Proben mit einer Auflösung von 36 nm demonstriert. In Transmissionsmessungen an Teststrukturen konnten Chao et al.⁷⁵ Strukturen mit einer Größe von 15 nm auflösen. Daher sollte nach einer weiteren Verbesserung der Vibrationsstabilität auch für das HORST-TXM eine höhere Auflösung mit besseren Zonenplatten möglich sein.

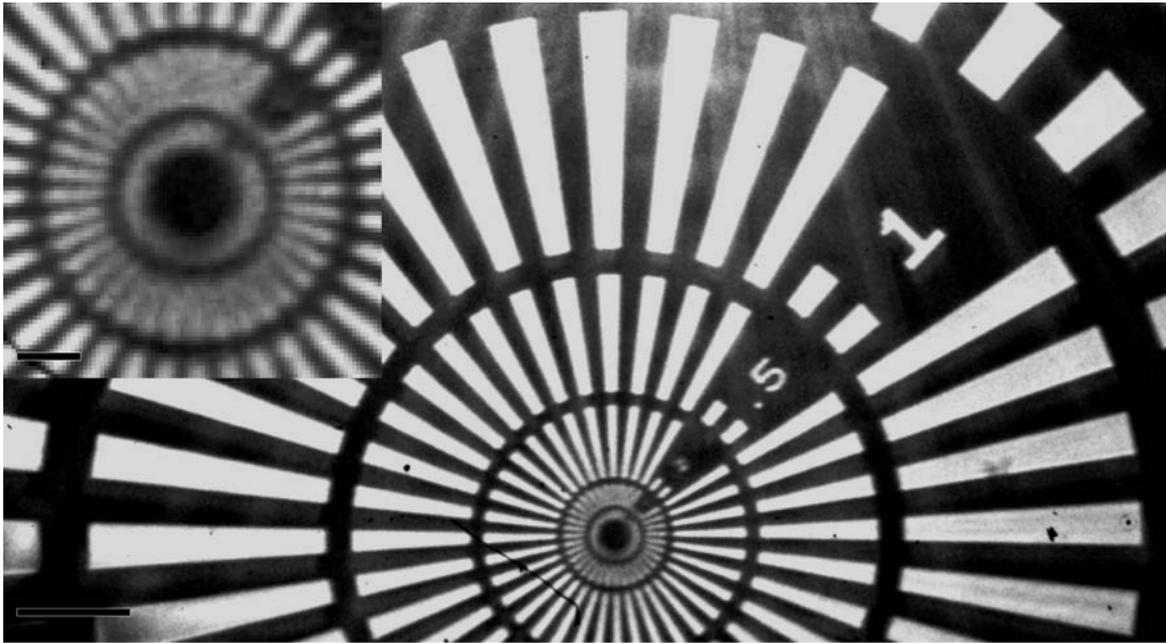


Abbildung 35: Vollfeld-Zonenplattenmikroskopieaufnahme (TXM) einer Siemensstern-Teststruktur bei einer Photonenenergie von 517 eV mit HORST am Strahlrohr U49/2 PGM-1, BESSY II, Berlin. Die aus konzentrisch angeordneten Balken bestehende Teststruktur hat am jeweils inneren Ende eines Balkens eine Breite von 1 μm , 0,5 μm , 0,2 μm , 0,1 μm , 0,05 μm . In der Vergrößerung sind die 0,1 μm Balken in vertikaler Richtung auflösbar. In horizontaler Richtung war die maximale Auflösung 0,2 μm . Der Skalierungsbalken hat eine Länge von 10 μm , in der Vergrößerung 1 μm .

4.4.2 Maximal auflösbare Strukturen bei biologischen Proben

Im Unterschied zur aus dem Schwermetall Tantal bestehenden Testprobe haben biologische Proben zumeist keine starken internen Kontraste. Gleichzeitig werden biologische Proben an besten in ihrer natürlichen Umgebung also in hydratisierter Form untersucht. Hierzu wurden die Proben schockgefroren und sind eingebettet in eine Schicht von amorphem Eis ($\sim 10\mu\text{m}$). Dies erhöht die Probendicke und kann zusammen mit den schwächeren internen Kontrasten eine Limitierung für die erreichbare Auflösung sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurden, unter anderem, mit einem kurzen, kationischen Peptid behandelte *E. coli*-Bakterien untersucht. Dieses Peptid induzierte, wie in den TEM-Aufnahmen in Kapitel 4.3 gezeigt, dichte granulare Strukturen nahe der Zellmembran und an den Zellpolen (Abbildung 36). Auch in den TXM-Aufnahmen waren diese sichtbar. Während die 4 nm dicke Zellmembran nicht darstellbar war, so war es möglich, die granularen Strukturen nahe der Zellmembran zu detektieren. In Abbildung 36 sind eine kryogene TXM-Aufnahme gezeigt. Die Breite des Querschnitts zweier Bakterien (770 nm und 880 nm) war im erwarteten Bereich von ca. 800 nm wie in den TEM-Aufnahmen. Die an der Zellwand angelagerten Strukturen wiesen in den TEM-Aufnahmen eine Dicke von ca. 150 nm auf. Um die Auflösung abzuschätzen, wurden diese Strukturen an zwei Stellen untersucht (Abbildung 36). Die grauen Flächen im Diagramm markieren die Breite der mit der Teststruktur auflösbaren 200 nm. An kryogenen biologischen Proben konnte also abschätzungsweise eine mit der Teststruktur vergleichbare Auflösung erzielt werden.

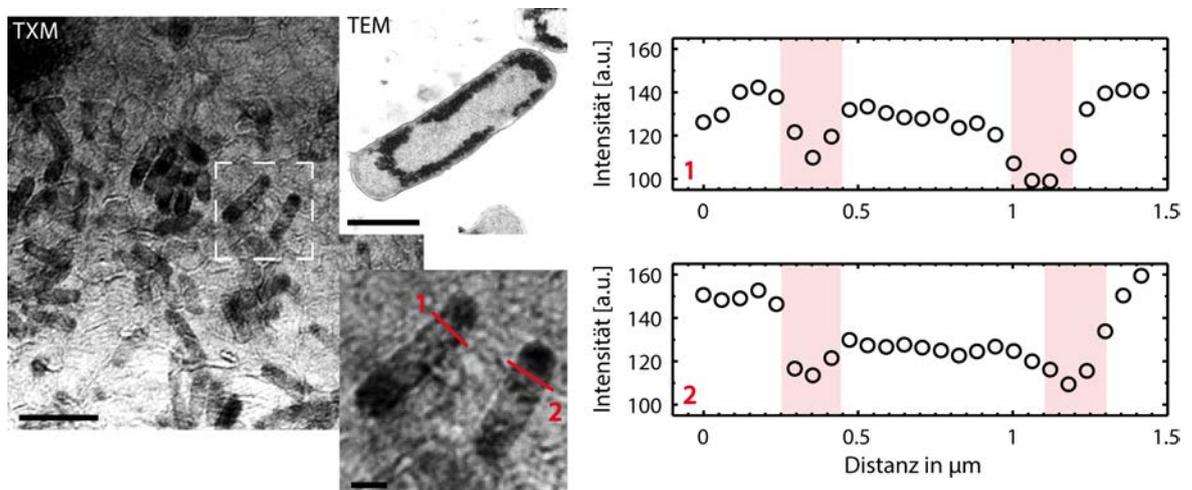


Abbildung 36: Kryogene TXM-Aufnahme von mit einem kurzen, kationischen Peptid behandelten *E. coli* bei 517 eV am Strahlrohr U49/2 PGM-1, BESSY II, Berlin. Die granularen, an der Wand und den Enden der Zellen angelagerten Strukturen sind auch bei intrinsischem Elementkontrast sichtbar. Als Vergleich ist eine TEM-Aufnahme gezeigt. Die Querschnitte zweier Bakterien zeigen eine verstärkte Absorption im Bereich der Zellwand. Die Breite dieser Abschnitte waren ca. 150 nm. Der Skalierungsbalken hat eine Länge von 5 μm , in der Vergrößerung und der TEM-Aufnahme 1 μm .

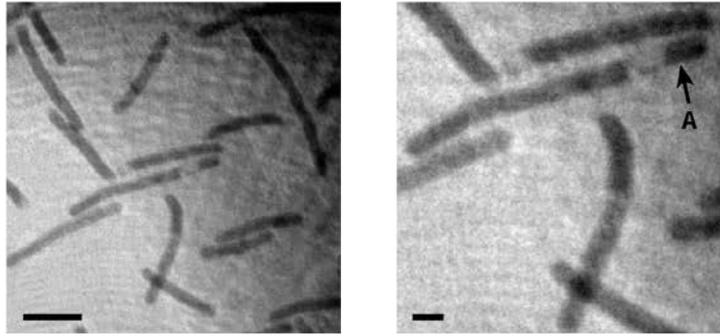
4.4.3 Vergleich von U41-TXM und HORST-TXM

Die gezeigte Auflösung wurde möglich durch die Entwicklung eines neuen Probenhalters durch Dr. Thomas Gorniak, beschrieben in Abschnitt 3.5.4. Zentraler Punkt im Vergleich zum ersten Design war die Dämpfung der Eigenfrequenzen, was durch eine Reduktion von Vibrationen eine höhere Auflösung ermöglichte. Während die Belichtungszeit mit dem ersten Probenhalterdesign minimal gehalten werden musste und im Mittel nur eines von fünf Bildern verwendbar war, waren mit dem zweiten Probenhalterdesign auch Aufnahmen mit Belichtungszeit von 1 s und länger möglich, ohne dass einzelne Bilder verwackelt waren (Abbildung 37).

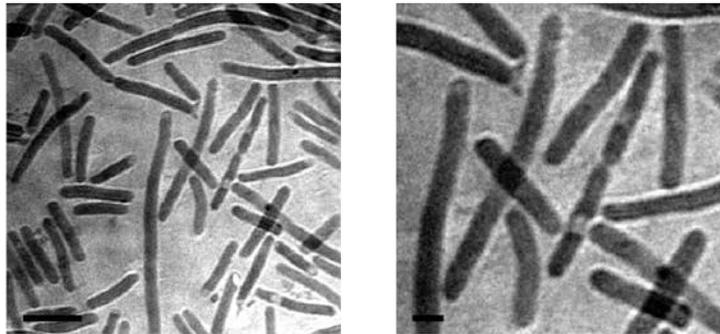
Die Auflösung des HORST-TXM wurde mit einem dezidierten Vollfeld-Zonenplattenmikroskop verglichen. Die Experimente hierzu wurden am Mikroskop U41-TXM, BESSY II, Berlin in Kooperation mit der Gruppe von Prof. Schneider durchgeführt.^{65,73} Auch dieses Mikroskop wird im sog. Wasserfenster betrieben. Ein elliptischer Kapillarkondensator sorgt für eine gleichmäßige Probenbeleuchtung. Mit einer Objektiv-Zonenplatte (Durchmesser 89,9 μm , 561 Zonen, äußerste Zonenbreite 40 nm) wurde das Bild auf den CCD-Detektor (PI-SX:1300, Roper Scientific, (1340 x 1300) Pixel, je (20 x 20) μm^2) projiziert. Die Photonenenergie betrug 510 eV (2,43 nm) und war somit vergleichbar mit der bei HORST verwendeten Wellenlänge. An dieser Anlage wurde bei Tomographiemessungen eine isotrope Auflösung von 50 nm erreicht.⁷³ Gründe für diese bessere Auflösung ist die kleinere Breite der äußersten Zonen der Zonenplatte.

Als Vergleichsobjekte dienten hier mit Ciprofloxacin behandelte *E. coli*-Bakterien. In den Aufnahmen erkennt am HORST-TXM erkennt man abgekapselte Bereiche innerhalb der bakteriellen Zelle. Am dezidierten Röntgenmikroskop U41-TXM konnte zusätzlich der periplasmatische Raum zwischen Zellwand und Zellmembran aufgelöst werden (Abbildung 37). Dies war mit dem HORST-TXM nicht möglich, zudem hätte die Breite dieser Struktur hätte hier nur einen Pixel umfasst.

a) TXM, HORST Probenhalter 1. Design



b) TXM, HORST Probenhalter 2. Design



c) U41-TXM, BESSY, Berlin

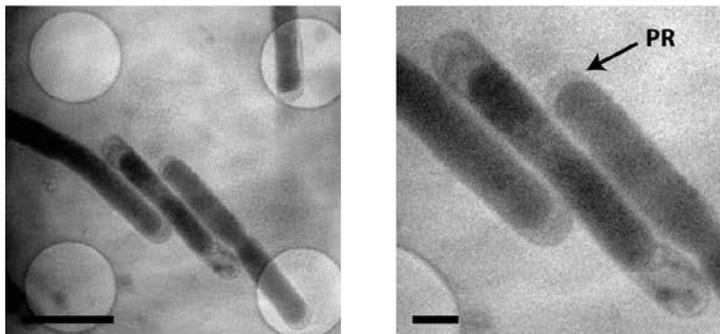


Abbildung 37: Vergleich von kryogenen TXM-Aufnahmen des ersten und zweiten Probenhalterdesigns in HORST und einem dezidierten Röntgenmikroskop (U41-TXM, BESSY, Berlin). Die HORST-TXM Messungen wurden am Strahlrohr U49/2 PGM-1, BESSY II, Berlin bei einer Photonenenergie von 517 eV durchgeführt. Das zweite Probenhalterdesign besitzt durch die Dämpfung der Eigenfrequenzen eine bessere mechanische Stabilität. Dies ermöglichte längere Belichtungszeiten. Das dezidierte Röntgenmikroskop (U41-TXM) hat durch einen zusätzlichen elliptischen Kapillarkondensator eine gleichmäßigere Probenausleuchtung und eine höhere Auflösung durch eine Zonenplatte mit 40 nm äußerer Zonenbreite. Die Photonenenergie war 510 eV. Die nach einer Ciprofloxacinbehandlung abgekapselten Bereiche (A) innerhalb einer Bakterie sind auch in den mit dem HORST-TXM aufgenommenen Bildern erkennbar. Die Darstellung des periplasmatischen Raums (PR) zwischen Zellwand und Zellmembran ist nur mit dem dezidierten Röntgenmikroskop möglich. Die Skalierungsbalken haben in den HORST-TXM-Aufnahmen (a,b) eine Länge von 5 μm (linke Spalte) bzw. 1 μm (rechte Spalte). Bei den Aufnahmen bei U41-TXM (c) sind es 2 μm (linke Spalte) und 0,5 μm (rechte Spalte).

4.4.4 Strahlendosis

Eine Motivation für den Einsatz einer kryogenen Probenumgebung bei bildgebenden Verfahren mit Röntgenstrahlung ist die Reduktion der Strahlenschäden.^{65,146} Dies bedeutet in der Konsequenz, dass eine höhere Strahlendosis appliziert werden kann,⁶⁷ da die es nach dem Rose-Kriterium⁶⁹ ermöglicht, eine höhere Auflösung mit bildgebenden Verfahren zu erreichen. Zur Berechnung der Strahlendosis wurde angenommen, dass sich die Probe an strahlzugewandten Seite der Eismatrix befindet und somit der maximalen Dosis ausgesetzt ist.

STRAHLENDOSIS AM HORST-TXM

Für die Berechnung der Strahlendosis der TXM-Messungen mit HORST am Strahlrohr U49/2-PGM-1 bei BESSY II, Berlin wurde angenommen, dass der Photonenfluss von $2 \times 10^{11} \text{ ph s}^{-1}$ gleichmäßig im Fokus ($80 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$, $h \times v$) des Strahlrohrs verteilt ist.¹³⁷ Die Fokusgröße wurde durch die Breite des Austrittsspalts definiert, der im vorliegenden Experiment $100 \mu\text{m}$ weit war. Die Dichte einer ganzen *E. coli* Bakterie wurde in Abschnitt 4.5.8 in Tabelle 5 als $1,1 \text{ g cm}^{-3}$ mit einer Elementarzusammensetzung von $\text{C}_{0,09}\text{H}_{0,61}\text{O}_{0,27}\text{N}_{0,019}$ abgeschätzt und hat bei einer Photonenenergie von 517 eV eine Absorptionslänge von $2,4 \mu\text{m}$. Die Expositionsdauer nach mehreren Aufnahmen auf 5 s geschätzt. Details zur Rechnung sind im Abschnitt 3.4.5 erläutert.

Die Strahlendosis am HORST-TXM betrug $4 \times 10^6 \text{ Gy}$. Nach Howells et al.⁶⁹ werden hier Strahlenschäden auf einer Größenordnung von unter 1 nm erwartet. Da die Auflösungsgrenze des Experiments 100 nm betrug müssen Strahlenschäden bei der Interpretation nicht berücksichtigt werden.

STRAHLENDOSIS AN U41-TXM

Zur Berechnung der Strahlendosis der Experimente am U41-TXM, BESSY II, Berlin wurden die gleichen Annahmen getroffen wie bei der Berechnung der Dosisrechnung mit dem HORST-TXM. Der in der Probenposition betrug $3 \times 10^{13} \text{ ph s}^{-1} \mu\text{m}^{-2}$. Bei einer Photonenenergie von 510 eV hatte eine *E. coli* Bakterie eine Absorptionslänge von $2,4 \mu\text{m}$. Die gesamte Belichtungszeit wurde als 10 s abgeschätzt.

Die Strahlendosis an U41-TXM betrug $9 \times 10^7 \text{ Gy}$ und ist damit für Strukturgrößen von unter 2 nm relevant. Nach dem Rose-Kriterium können Strukturen mit einer Größe von bis zu 20 nm abgebildet werden. Da die Auflösung in diesen Experimenten etwa 70 nm betrug spielen Strahlenschäden keine Rolle.

4.4.5 Korrelation von TXM mit TEM

Da die mit Schwermetallen gefärbten TEM-Aufnahmen den natürlichen Kontrast der Elektronendichte nur unzureichend wiedergeben, sind die ungefärbten, kryogenen, mit dem HORST-TXM aufgenommenen Bilder von besonderem Interesse, da der natürliche Kontrast auch in den SAXS Messungen zum Tragen kommt. In den TEM-Aufnahmen kommt der Kontrast durch die Färbung von Proteinen, Lipide und DNS zustande. Im Gegensatz dazu basiert der Kontrast der TXM-Aufnahmen auf dem intrinsischen Kontrast im Wasserfenster (hier bei 517 eV). Außerdem ist zu berücksichtigen, dass es sich bei den TEM-Aufnahmen um Dünnschnitte mit ca. 100 nm Dicke handelt, während in den TXM-Aufnahmen die Projektion einer ganzen Zelle zu sehen ist. Als Folge davon können allerdings sich aufhebende Kontraste in verschiedenen Ebenen nicht berücksichtigt werden.¹³⁹

In Abbildung 38 sind die TXM-Aufnahmen den TEM-Aufnahmen gegenübergestellt. In der unbehandelten Bakterienprobe ist die DNS in der Zelle als verteilter Nukleoid kontrastiert. Dies ist in den Projektion der TXM-Aufnahmen nicht erkennbar, da einerseits der Kontrast zu gering war und sich in den unterschiedlichen Ebenen wieder aufhebt. Eine Bestätigung für den geringen Kontrast boten die Aufnahmen des Nukleoids nach einer Behandlung mit Chloramphenicol und Tetracyclin. Hier befand sich zentral in der Bakterienzelle ein kondensierter, lokalisierter Nukleoid der bei ausreichendem Kontrast auch in der Projektion der TXM-Aufnahmen sichtbar sein sollte. Die homogene Intensität der *E. coli* in den TXM-Aufnahmen deutet darauf hin, dass der Nukleoid keine Unterschiede in der Materialdichte aufweist.

Die Größe und äußere Form der Bakterienzelle ist in beiden Mikroskopiemethoden gleich abgebildet. Die nach einer Ciprofloxacinbehandlung eintretende Elongation der bakteriellen Zelle ist ebenfalls mit beiden Mikroskopiemethoden erkennbar. Die abgekapselten Bereiche sind nur in den ungefärbten TXM-Aufnahmen sichtbar. Dies geht mit einem sichtbaren Bruch der Zellmembran einher (siehe Abbildung 37c, U41-TXM). Dieser Vorgang könnte auch die in den TEM-Aufnahmen auffällige starke Färbung vieler Zellen erklären. Die Schwermetallfarbstoffe dringen durch die Brüche in der Zellmembran ein und färben die Zelle stark an. Dass dieser Vorgang die Verteilung des Nukleoids nicht beeinflusst zeigt die quantitative Bildanalyse bei der die Solidität des Nukleoids gleich zur unbehandelten Kontrolle war. Die in den TEM-Aufnahmen kontrastierte innere und äußere Zellmembran ist in den TXM Bildern nicht erkennbar.

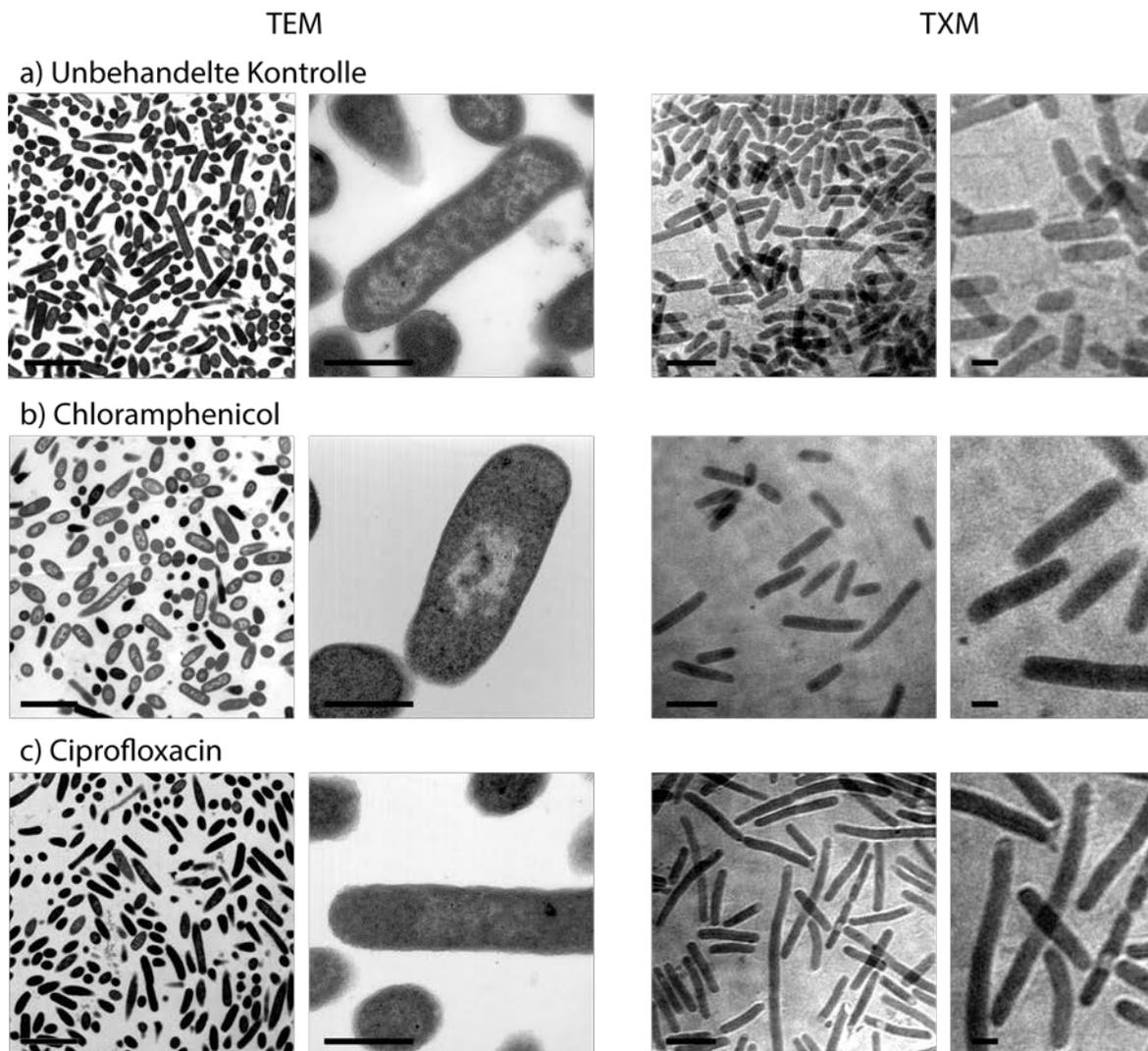


Abbildung 38: Vergleich von TEM- und kryogenen TXM-Aufnahmen mit Antibiotika behandelter *E. coli*-Bakterien. Die TXM-Messungen wurden mit dem HORST-TXM am Strahlrohr U49/2 PGM-1, BESSY II, Berlin bei einer Photonenergie von 517 eV durchgeführt. Der in den TEM-Aufnahmen sichtbare Nukleoid ist in den TXM-Aufnahmen nicht erkennbar. Dass der natürliche Elementkontrast des kondensierten Nukleoids zu schwach ist, um diesen vom umgebenden Cytoplasma abzuheben, zeigt sich an den Aufnahmen von mit Chloramphenicol behandelten *E. coli*-Bakterien. In einigen der mit Ciprofloxacin behandelten Zellen erkennt man in den TXM-Aufnahmen abgekapselte Bereiche. Die Skalierungsbalken in den Spalten von links nach rechts: 10 μm , 1 μm , 5 μm , 1 μm .

Die morphologischen Veränderungen der Zellen infolge einer Behandlung mit Polymyxin B und dem antimikrobiellen Peptid sind sowohl in TEM als auch in TXM sichtbar (Abbildung 39). Nach einer Behandlung mit dem kurzen kationischen Peptid bildeten sich stark gefärbte, granulare Strukturen entlang der Zellwand und an deren Enden. Da diese Strukturen auch in den TXM-Aufnahmen sichtbar waren, zeigen sie tatsächlich eine gegenüber der restlichen Zelle erhöhte Elektronendichte. Da die Zellen ungefärbt sind korreliert diese erhöhte Elektronendichte mit einer erhöhten Materialdichte. In der Projektion des TXM ist außerdem erkennbar, dass sich diese Bereiche erhöhter Elektronendichten stets an den Enden der Zelle befanden. Die nahe der Zellmembran lokalisierten Strukturen wiesen in beiden Mikroskopiemethoden eine Dicke von

ca. 100 nm – 150 nm auf. Als Folge der bei Polymyxin B und dem Peptid benötigten starken Zentrifugation enthielten die Proben vermutlich auch ausgetretenes Zellmaterial. Auch nach einer Behandlung mit Polymyxin B erkennt man in den TXM-Aufnahmen eine Konzentration von Material an den Zellenden sowie eine leere Bakterienhüllen mit stark kontrastierter Zellwand, analog zu den TEM-Aufnahmen.

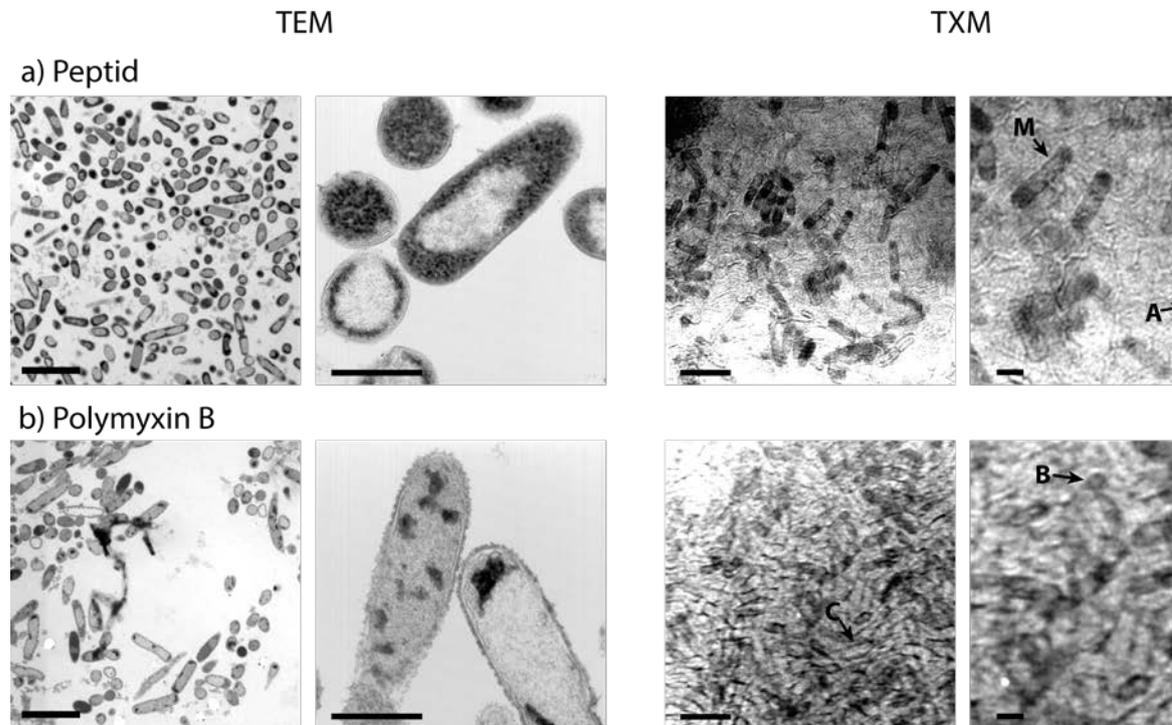


Abbildung 39: TEM- und kryogene TXM-Aufnahmen von *E. coli*-Bakterien nach einer Behandlung mit Polymyxin B und dem kurzen kationischen Peptid. . Die TXM-Messungen wurden mit dem HORST-TXM am Strahlrohr U49/2 PGM-1, BESSY II, Berlin bei einer Photonenenergie von 517 eV durchgeführt. Nach einer Behandlung mit dem Peptid sind vor allem an der Zellwand (M) und an den Enden der Zelle (A) granulare Strukturen mit beiden Mikroskopiemethoden sichtbar. Da diese Strukturen in den TXM-Aufnahmen erkennbar sind, handelt es sich um eine Erhöhung der Elektronendichte und damit auch der Materialdichte in diesen Bereichen. Auch nach einer Behandlung mit Polymyxin B treten granulare Strukturen (B) an den Zellenden auf und sind mit beiden Mikroskopietechniken sichtbar. In den TXM-Aufnahmen erkennt man auch die leere Bakterienhüllen mit stark kontrastierter Zellwand (C). Die Skalierungsbalken in den Spalten von links nach rechts: 10 μm , 1 μm , 5 μm , 1 μm .

4.4.6 Fazit

Die Röntgenmikroskopie mit Zonenplatten in der Streukammer HORST konnte durch Verwendung eines optimierten Probenhalterdesigns an einer Testprobe eine Auflösung von 100 nm in vertikaler und 200 nm in horizontaler Richtung erreichen. Grund für die unterschiedliche Auflösung in den Raumrichtungen sind vermutlich Vibrationen. Die verbesserte Stabilität des Probenhalters ermöglichte außerdem längere Belichtungszeiten, da Störungen durch Vibrationen deutlich verringert werden konnten. Im Vergleich mit dem dezidierten Röntgenmikroskop U41-TXM, BESSY, Berlin sind sowohl die verwendete Zonenplatte als auch der Detektorabstand limitierend.

Auch bei ungefärbten, kryogen fixierten *E. coli*-Bakterien konnte eine Auflösung von 150 nm erzielt werden. Im direkten Vergleich mit TEM-Aufnahmen ist es mit TXM-Aufnahmen möglich, lokalisierte Unterschiede in der Materialdichte von angefärbten Kontrasten zu unterscheiden. Am Beispiel von mit einem neuen kationischen Peptid behandelten *E. coli*-Bakterien haben die granularen Strukturen nahe der Zellwand und in den Polen der Zelle eine erhöhte Materialdichte. Die nach einer Behandlung mit Chloramphenicol im Zentrum der Zelle kondensierte DNS war zu schwach kontrastiert um in den ungefärbten TXM-Aufnahmen erkennbar zu sein. Für die Interpretation der Kleinwinkelstreudaten bedeutet dies, dass die äußere Struktur des Nukleoids aufgrund des geringeren Kontrasts nur einen eingeschränkten Beitrag zur Streukurve leistet, während die granularen Strukturen nach einer Behandlung mit dem Peptid oder Polymyxin B einen großen Beitrag haben.

4.5 Kleinwinkelstreuung an mit Antibiotika behandelten *E. coli*

Die morphologischen Veränderungen in eines *E. coli*-Bakteriums als Folge einer antibiotischen Behandlung lassen sich wie in den beiden vorangegangenen Kapiteln beschrieben mit bildgebenden Verfahren untersuchen. Die herausragende Eigenschaft bildgebender Verfahren ist, dass man Unterschiede direkt „sehen“ und damit auch interpretieren kann. Allerdings stellt sich auch stets die Frage inwiefern das individuelle Objekt das gesamte Ensemble repräsentiert. Wenn es aber darum geht, Strukturveränderungen auf einer an einer großen Anzahl von Objekten zu quantifizieren stoßen bildgebende Verfahren oft an ihre Grenzen. Mit Streumethoden¹⁰¹ können viele Objekte gleichzeitig untersucht werden, was zu statistisch fundierten Ergebnissen führt. Gleichzeitig sind bei biologischen Proben kleinere Strukturgrößen bis hin zu einem Nanometer zugänglich. Ein weiterer Vorteil ist die Probenvorbereitung, die in wässriger Suspension erfolgen kann. Streumethoden sind also kein Ersatz zu bildgebenden Verfahren sondern eine komplementäre Methode mit der mittlere Objekteigenschaften besser bestimmt werden können.

Mit Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) hat man die Möglichkeit, interne Bestandteile biologischer Systemen zu untersuchen.²⁴ Der erfasste Größenbereich bei den meisten auf Proteinstrukturen spezialisierten Strahlrohren^{96,117} liegt im Bereich von 1 nm bis 100 nm. An spezialisierten Ultrakleinwinkelstreustrahlrohren^{129,147} können durch die Erfassung sehr kleiner Streuwinkel Strukturen bis zu einer Größe von 5 μm erfasst werden. Dies ist ausreichend für die äußere Struktur von *E. coli*-Bakterien.

Die antibiotikainduzierten morphologischen Veränderungen in *E. coli*-Bakterien wurden an zwei Strahlrohren durchgeführt, die Zugang zu unterschiedlichen morphologischen Größenbereichen bieten. Am BioSAXS Strahlrohr¹¹⁷ bei PETRA III in Hamburg, Deutschland betrug der erreichbare q -Bereich $0,05 \text{ nm}^{-1}$ bis $3,5 \text{ nm}^{-1}$, was im Realraum Strukturgrößen von $< 120 \text{ nm}$, also Strukturen innerhalb von Bakterien, entspricht. In den Messungen an der Ultrakleinwinkelstreuapparatur (USAXS)¹²⁹ am Strahlrohr ID15 der Advanced Photon Source (APS), Argonne, USA konnte der q -Bereich von $0,01 \text{ nm}^{-1}$ bis zu $0,002 \text{ nm}^{-1}$ untersucht werden, das entspricht Realraumstrukturen von bis zu $3,2 \mu\text{m}$.

In Kombination ermöglichen Experimente an beiden Apparaturen eine gemeinsame Betrachtung von äußeren und inneren Strukturen der Bakterien.

4.5.1 Reproduzierbarkeit der Streuexperimente

Ein entscheidendes Kriterium für die Verwendbarkeit jeder experimentellen Methode ist ihre Reproduzierbarkeit sowie die Reproduzierbarkeit der Probenvorbereitung. Um beides nachzuweisen wurde während zweier unterschiedlicher Messkampagnen je eine Probe unbehandelter *E. coli*-Bakterien mit Kleinwinkelstreuung am BioSAXS-Strahlrohr P12 vermessen. Beide Streukurven sind in Abbildung 40a gezeigt und wurden auf gleiche Bakteriendichten normiert. Im Bereich von $0,05 \text{ nm}^{-1}$ bis $1,4 \text{ nm}^{-1}$ sind sie in der logarithmischen Darstellung deckungsgleich. Das linear aufgetragene Verhältnis beider Messkurven ist in Abbildung 40b gezeigt und ist unter 10% für Werte bis $1,4 \text{ nm}^{-1}$. Die bei q -Werten von ca. $0,1 \text{ nm}^{-1}$ auftretenden Schwankungen sind vermutlich die Folge eines anders positionierten Strahlfängers.

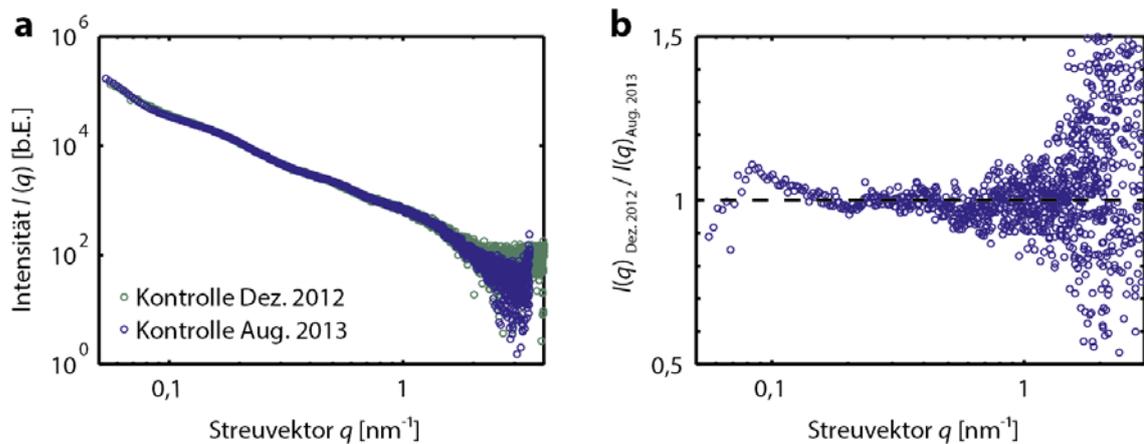


Abbildung 40: SAXS Messungen unbehandelter *E. coli*-Bakterien in verschiedenen Messkampagnen am BioSAXS-Strahlrohr P12 bei PETRA III in Hamburg, Deutschland. Die Photonenergie war in beiden Messungen $12,8 \text{ keV}$. a) Streukurven unbehandelter *E. coli*-Bakterien, normiert auf gleiche Bakteriendichte. b) Der relative Unterschied beider Messungen ist bis zu q -Werten von ca. $1,4 \text{ nm}^{-1}$ kleiner als 10%.

4.5.2 Normierung der Bakteriendichte

Im Experiment treten Unterschiede in der Bakteriendichte auf. Im untersuchten Zeitraum von vier Stunden verzehnfachte sich beispielsweise die Bakteriendichte der unbehandelten Proben, während das Wachstum nach einer Antibiotikabehandlung zum Erliegen kam. Für einen direkten Vergleich wurden identische Bakteriendichten benötigt. Daher wurde die Intensität der Streukurven durch Multiplikation mit einem konstanten Faktor auf identische Zelldichten normiert. Ein ähnliches Verfahren ist bei Röntgenstreuung an Proteinen im Einsatz.¹⁴⁸ Das Intervall zwischen $1,2 \text{ nm}^{-1}$ und $1,4 \text{ nm}^{-1}$ eignete sich zur Normierung, da es zwischen dem durch Antibiotikawirkung veränderten Bereich ($< 1,2 \text{ nm}^{-1}$) und dem in vielen Proben auftretenden starken Rauschen ($> 1,4 \text{ nm}^{-1}$) befindet. Der Median der Intensität dieses Bereichs wurde berechnet und auf die Referenz, unbehandelte *E. coli*-Bakterien nach 4 Stunden Inkubationszeit normiert.

Mithilfe einer Verdünnungsreihe wurde verifiziert, dass sich bei den vorliegenden Bakteriendichten durch die Normierung die Form der Streukurve nicht verändert. Die nicht normierten Streukurven einer Verdünnungsreihe unbehandelter *E. coli*-Bakterien (Abbildung 41a) wiesen gleiche Kurvenformen bei unterschiedlichen Intensitäten auf. Das Streusignal nimmt zu größeren Streuwinkeln (größeren q -Werten) hin exponentiell ab. Bei größerer Verdünnung verschwinden die größeren q -Werte zunehmend im Rauschen. Nach einer Normierung (Abbildung 41b) haben die Kurven die gleiche Intensität. Ebenfalls gut zu erkennen ist, dass mit einer zunehmenden Verdünnung das Rauschen bei höheren q -Werten stärker wird.

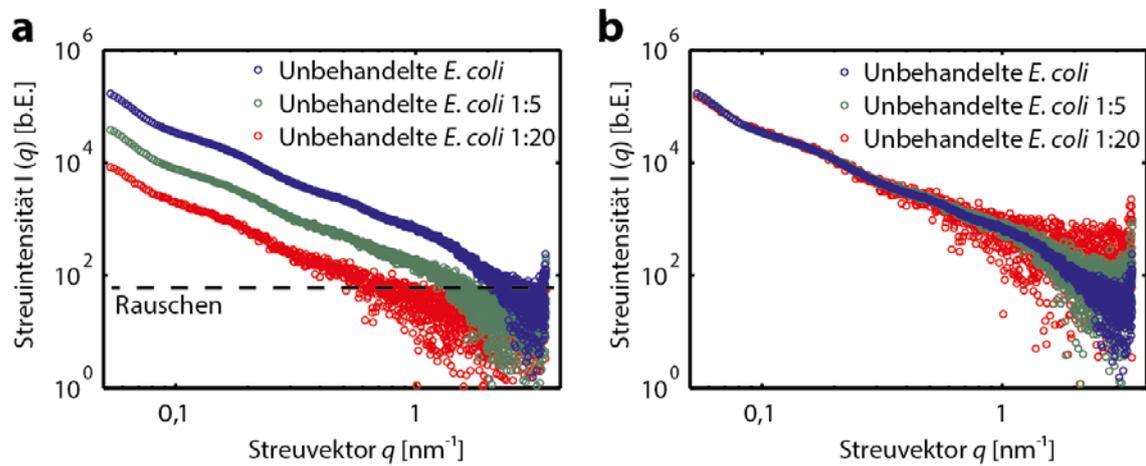


Abbildung 41: Kleinwinkelstreuung un behandelter *E. coli*-Bakterien in verschiedenen Verdünnungen. Die Photonenenergie lag bei 12,8 keV. a) Streukurven un behandelter *E. coli*-Bakterien in verschiedenen Verdünnungen in PBS-Ruffer vor der Normierung. Das Untergrundrauschen ist gut zu erkennen. Mit abnehmender Zelldichte in der Lösung nimmt die Anzahl zu hohen q -Werten gestreuter Photonen bei ansonsten identischen experimentellen Bedingungen ab. b) Die normierten Streukurven haben eine identische Intensität und einen gleichen Kurvenverlauf bei kleinen Streuwinkeln (kleine q -Werte) und eine mit der Verdünnung zunehmendem Rauschen bei gleichen q -Vektoren. Die Messungen wurden am BioSAXS-Strahlrohr P12 bei PETRA III in Hamburg, Deutschland bei einer Photonenenergie von 12,8 keV durchgeführt.

4.5.3 Strahlendosis

Wie bei allen Experimenten, die auf der Anwendung von starker Röntgenstrahlung basieren ist es auch bei Kleinwinkelstreuung notwendig, die Strahlendosis abzuschätzen.¹⁴⁹ Zwar werden an der BioSAXS von Strahlenschäden betroffene Streukurven automatisch verworfen am USAXS-Stahlrohr jedoch nicht. Im Vergleich zu bildgebenden Verfahren wird die Information über probeninterne Strukturgrößen über viele Objekte gemittelt und ist daher vom Rose-Kriterium⁶⁹ für bildgebende Verfahren unabhängig. Die Strahlendosis wurde für eine Bakterie abgeschätzt, die während der gesamten Messung an der strahlzugewandten Seite der Probenkapillare befindet. Dies entsprach der höchstmöglichen Strahlendosis, vernachlässigt wurde, dass die suspendierten Bakterien zwischen zwei Belichtungen durch die Lösung diffundieren können. Die Bakteriendichte der Suspension ist mit $1 \times 10^{10} \text{ ml}^{-1}$ zwar relativ hoch, es wird jedoch nur 3 % des Probenvolumens von *E. coli* Zellen eingenommen. Daher kann die Abschwächung durch andere Bakterien im Strahl ebenfalls vernachlässigt werden.

STRAHLENDOSIS AM BIOSAXS-STRAHLROHR

Zur Berechnung der Strahlendosis am BioSAXS-Strahlrohr wurde angenommen, dass der Photonenfluss von $5 \times 10^{12} \text{ ph s}^{-1}$ gleichmäßig im Fokus ($100 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$) des Strahlrohrs verteilt ist.^{125,126} Die Dichte einer ganzen *E. coli* Bakterie wurde in Abschnitt 4.5.8 in Tabelle 5 als $1,1 \text{ g cm}^{-3}$ abgeschätzt und hat bei einer Photonenenergie von 12,8 keV eine Absorptionslänge von $4300 \mu\text{m}$. Von jeder Probe wurden 20 Streubilder mit je 0,05 s Belichtungszeit aufgenommen, was einer gesamten Expositionsdauer von 1 s entspricht. Details zur Rechnung sind im Abschnitt 3.4.5 erläutert.

Die berechnete Strahlendosis am BioSAXS-Strahlrohr betrug $1 \times 10^5 \text{ Gy}$ und ist für die hier erfassten Strukturgrößen von bis zu 1 nm unbedenklich. Nach Howells et al.⁶⁹ können bei dieser Strahlendosis sogar Strukturen, kleiner als 0,1 nm sind interpretiert werden. Für Strukturgrößen von 1 nm ist demnach eine Dosis von $3 \times 10^7 \text{ Gy}$ tolerabel.

STRAHLENDOSIS AN DER USAXS-APPARATUR

Zur Berechnung der Strahlendosis am USAXS-Apparatur (Ergebnisse werden ab Abschnitt 4.5.6 diskutiert) wurden die gleichen Annahmen getroffen wie bei der Berechnung der Strahlendosis am BioSAXS-Strahlrohr. Der Photonenfluss betrug im Fokus ($0,4 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$) $1 \times 10^{13} \text{ ph s}^{-1}$.^{128,129} Bei einer Photonenenergie von 17 keV hatte eine *E. coli* Bakterie eine Absorptionslänge von $9600 \mu\text{m}$. Eine Messung in der schlitzkollimierten Geometrie mit einer Photodiode dauerte 750 s.¹²⁹

Die berechnete Strahlendosis an der USAXS-Apparatur betrug $2 \times 10^6 \text{ Gy}$ und ist für die hier erfassten Strukturgrößen von bis zu 60 nm unbedenklich. Nach Howells et al.⁶⁹ könnte bei diesen Strukturgrößen eine Strahlendosis von bis zu $4 \times 10^9 \text{ Gy}$ appliziert werden.

4.5.4 Antibiotikainduzierte Veränderung der Morphologie

Röntgenkleinwinkelstreuung liefert reproduzierbare und, wenn die Messungen richtig normiert sind, auch vergleichbare Streukurven. Somit kann eine morphologische Änderung auf einer Längenskala von internen Zellkomponenten (3 nm - 100 nm) untersucht werden. Da im Zuge jeder antibiotischen Behandlung essentielle biochemische Abläufe in einer bakteriellen Zelle gestört werden, kommt es vielfach zu einer Änderung der inneren Morphologie die sich in der Kleinwinkelstreckurve manifestiert. In Abbildung 42 sind beispielhaft am BioSAXS Strahlrohr aufgenommene Kleinwinkelstreckurven von *E. coli*-Bakterien nach einer Behandlung mit Chloramphenicol (inhibiert die Proteinsynthese) und Rifampicin (inhibiert die RNS-Polymerase) zusammen mit der unbehandelten Kontrolle gezeigt. Im Graphen eingebettet ist das Verhältnis der Streuintensitäten von behandelten zu unbehandelten Bakterien, welches qualitativ die Veränderungen der unterschiedlichen Strukturgrößen deutlich macht. Diese Effekte können eine direkte Folge des Antibiotikums, die Stressantwort des Bakteriums oder eine Mischung beider Effekte sein.

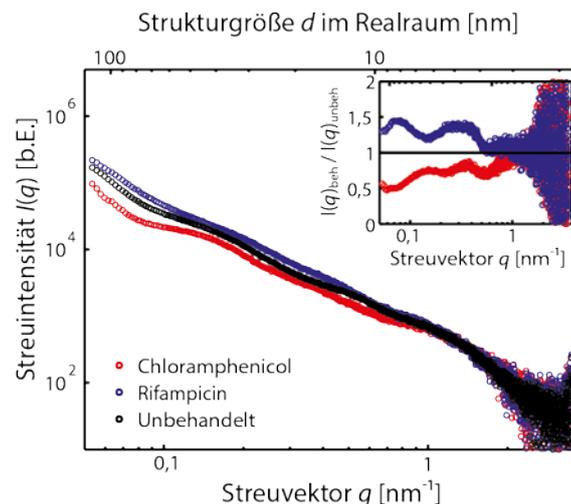


Abbildung 42. Kleinwinkelstreckurven von unbehandelten *E. coli*-Bakterien (schwarz), nach einer Behandlung mit Chloramphenicol (rot) und Rifampicin (blau). Im Graphen eingebettet ist das Verhältnis der Streuintensitäten von behandelten ($I(q)_{\text{beh.}}$) zu unbehandelten Proben ($I(q)_{\text{unbeh.}}$). Die Streukurven wurden wie in Abschnitt 4.5.2 beschrieben normiert. Die Messungen wurden am BioSAXS-Strahlrohr P12 bei PETRA III in Hamburg, Deutschland bei einer Photonenenergie von 12,8 keV durchgeführt.

Qualitativ betrachtet führte eine Behandlung mit Rifampicin zu einer Zunahme der Streuintensitäten, was auf eine Vergrößerung der internen Struktur hindeutet. Eine besondere Zunahme zeigte sich im Bereich von Größenstrukturen zwischen 15 nm und 25 nm. Diese Streuung liegt im Größenbereich von Ribosomen.¹⁵⁰ Außerdem war ein Anstieg der Streuintensität im Größenbereich zwischen 70 nm und 90 nm zu beobachten. In der Zelle sind in dieser Größenordnung vor allem übergeordnete Faserstrukturen der DNS präsent.⁵⁶ Im Gegensatz dazu führte Chloramphenicol zu einer Abnahme der Streuintensität, was auf weniger Zellmaterial in den Bakterien hindeutete. Hier fand der Abnahme in der Größenordnung von

Faserstrukturen der DNS im Nukleoid statt (zwischen 80 nm und 100 nm). Auch in einem Größenbereich von 10 nm bis 14 nm, was dem typischen Durchmesser was dem Durchmesser eines DNS-Strangs Histon-ähnlichen Proteinen entspricht wurde eine verringerte Streuintensität beobachtet.³⁴

4.5.5 Analyse der Kurvensteigungen

Die im vorangegangenen Kapitel durchgeführte beispielhafte qualitative Analyse stößt schnell an ihre Grenzen. Ein Teil der gemessenen Röntgenstreu Kurven lassen sich mit einem Modell für fraktale Strukturen (Kapitel 2.3.3) beschreiben. Wenn in einem Objekt fraktale Strukturen vorliegen bedeutet dies, dass die Form der Objekte über einen bestimmten Größenbereich hinweg ähnlich ist.¹⁰¹ Bei Kleinwinkelstreuung zeigt sich dies, wenn die doppellogarithmische Auftragung einer Kleinwinkelstreu Kurve lineare Abschnitte enthält. Dann kann eine sog. „Porod-Analyse“, durchgeführt werden: Lineare Abschnitte wurden mit einem Potenzgesetz $I(q) \propto q^{-p}$ modelliert.¹⁰³ Die fraktale Dimension p ermöglicht eine Aussage über die Oberflächen- und Volumenstruktur eines Objekts. Ein Wert von 4 deutet auf eine glatte Oberfläche mit homogener Volumenstruktur hin, Werte zwischen 3 und 4 auf eine raue Oberfläche, ein sog. Oberflächenfraktal und Werte zwischen 1 und 3 auf ein Volumenfraktal hin.¹⁰² Dieses Modell konnte auf die Streu Kurven von *E. coli*-Bakterien nach einer Behandlung mit Polymyxin B (zerstört die Zellwand) und dem kurzen kationischen Peptid (unbekannter Mechanismus) angewandt werden. Als Beispiel sind in Abbildung 43a SAXS-Kurven beider Behandlungen nach einer Stunde Inkubationszeit gezeigt. In einem q -Bereich von $0,1 \text{ nm}^{-1}$ bis $0,35 \text{ nm}^{-1}$, was Größen von 20 nm bis zu 60 nm im Realraum entspricht, ist eine Porod-Analyse möglich. Die fraktale Dimension anderer Inkubationszeiten sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die fraktale Dimension beider Behandlungen lagen mit 2,0 bis 2,5 im Bereich eines Volumenfraktals.²⁴ In den TEM-Aufnahmen zeigte sich, dass in beiden Fällen stark gefärbte Strukturen existieren, die im Falle des Peptids Granulen mit etwa 75 nm Durchmesser aufweisen. Diese fraktalen Strukturen ließen sich jedoch nicht bei anderen Behandlungen oder der unbehandelten Bakterienzelle nachweisen. Die mittlere Steigung der verbleibenden Streu Kurven ließ sich aber durch Potenzfunktionen mit $1,3 < p < 1,9$ abschätzen (Abbildung 43b). Diese Steigungen lassen ebenfalls auf ein Volumenfraktal schließen.¹⁰⁴ Das bedeutet, dass die fixierten Bakterienzellen im Inneren eine lockere Struktur haben. Dies ist vergleichbar mit der lockeren Struktur einer Polymerkette ($p = 1,5$).¹⁰⁴

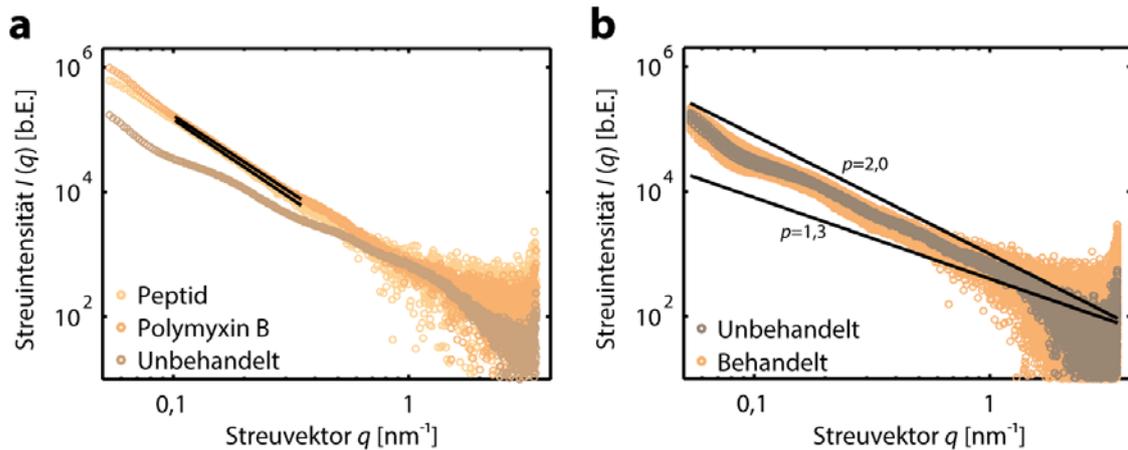


Abbildung 43: Fraktalanalyse der Kleinwinkelstreu曲ven mit Antibiotika behandelter *E. coli*-Bakterien. a) Streu曲ven mit Polymyxin B oder dem Peptid behandelter *E. coli*-Bakterien nach 60 min Inkubationszeit. Die markierten Abschnitte wurden mit einer „Porod-Analyse“ untersucht. Die fraktalen Dimensionen p der Streu曲ven im Intervall von $0,1 \text{ nm}^{-1}$ bis $0,35 \text{ nm}^{-1}$ (20 nm – 60 nm) sind ebenfalls gezeigt. b) Streu曲ven aller anderen Antibiotikabehandlungen sowie der unbehandelten *E. coli*-Bakterien (hervorgehoben). Die mittlere Steigung dieser Kurven lässt sich durch Potenzfunktionen eingrenzen. Die Messungen wurden am BioSAXS-Strahlrohr P12 bei PETRA III in Hamburg, Deutschland bei einer Photonenenergie von 12,8 keV durchgeführt.

Antibiotikum	Inkubationszeit [min]	Fraktale Dimension p
Polymyxin B	15	1,97
	30	2,03
	60	2,13
	240	2,47
Peptid	15	2,27
	30	2,53
	60	2,24

Tabelle 3: Porod-Analyse der mit Polymyxin B und dem kurzen, kationischen Peptid behandelten *E. coli*-Bakterien im Intervall von $0,1 \text{ nm}^{-1}$ bis $0,35 \text{ nm}^{-1}$ (20 nm – 60 nm). Die fraktale Dimension p liegt im Bereich eines Volumenfraktals. Die Messungen wurden am BioSAXS-Strahlrohr P12 bei PETRA III in Hamburg, Deutschland bei einer Photonenenergie von 12,8 keV durchgeführt.

4.5.6 Die äußere Form der Bakterienzelle

Um die durch Antibiotika hervorgerufenen Veränderungen in der Bakterienzelle quantitativ zu betrachten, muss ein geeignetes Modell entwickelt werden. Hierzu wird die Streuinformation von interner Zusammensetzung und äußerer Struktur der Bakterien benötigt. An der USAXS-Apparatur (Advanced Photon Source, Argonne, USA) wurde in Kooperation mit Trevor Willey die äußere Struktur der Bakterienzellen vermessen. Hier zeigt das sog. „Guinier-Plateau“ (Abbildung 45) bei kleinen q -Werten, dass die größten streuenden Strukturen erfasst wurden.

Zur Interpretation der Streukurven wurde ein Modell der Bakterienzelle mithilfe der „IRENA“-Makros¹⁰⁷ für das Programm Igor® (WaveMetrics Inc., Portland, USA) entwickelt. Hierbei wurde die experimentelle Streukurve mit einem Modell aus glatten Kugeln (oder anderen Formen) mit homogener Dichte beschrieben.

$$I(q) = \sum_k |\Delta\rho_k|^2 S_k(q) \sum_{i_k} |F_k(q, r_{i_k})|^2 (V_k(r_{i_k}))^2 N_T P_k(r_{i_k}) \Delta r_{i_k} \quad (9)$$

Der Strukturfaktor $S_k(q)$ wurde als eine verdünnte Lösung angenommen ($S = 1$). Dies ist möglich, da mit SAXS nur Unterschiede im Streukontrast gegenüber dem Hintergrund der fixierten Zellmatrix beobachtet wurden. Die Streukurve $I(q)$ wurde modelliert als Summe k verschiedener Körper mit Streukontrast $|\Delta\rho|^2$. Die Form der Körper im Fourierraum wurde mit einem Formfaktor $F(q, r)$ beschrieben, V_k war das Volumen eines Körpers. Die Polydispersität $P_k(r)$ der Körper wurde hier durch eine Normalverteilung als Funktion des Radius r_{ik} dargestellt. N_T war die Gesamtzahl der Körper. Hieraus ließen sich zwei wichtige Informationen extrahieren, einmal die Anzahlverteilung

$$N(r) = N_T P(r) \quad (10)$$

welche die Anzahl der Körper mit Radius r beschrieb. $P(r)$ war eine Normalverteilung um den mittleren Radius R mit einer Standardabweichung σ :

$$P(r) = \frac{e^{-(r-R)^2/(2\sigma^2)}}{\sigma\sqrt{2\pi}} \quad (11)$$

Ein handlicheres Maß ist die Volumenverteilung $f(r)$, die sich aus der Anteilverteilung berechnen lässt. Die Volumenverteilung $f(r) = V(r) N(r)$, gibt an welches Volumen von die Körper des entsprechenden Radius einnahmen. In der Praxis wird meist mit Volumenverteilungen gearbeitet und um eine einfachere Skalierung zu erreichen wurde der Parameter B , der Beitrag eines Körpers zum Gesamtvolumen eingeführt.

$$f(r) = B P(r) \quad (12)$$

In Abbildung 44 sind die Eigenschaften eines solchen Modells an simulierten Streukurven dargestellt. Die Position des 1. Minimums gibt Aufschluss über die vorliegende Strukturgröße. Die höheren Ordnungen dieses Minimums werden in Abhängigkeit der Monodispersität der

Probe gedämpft. Das Aspektverhältnis des Körpers lässt sich aus der Kurvenform des Guinier-Plateaus modellieren.

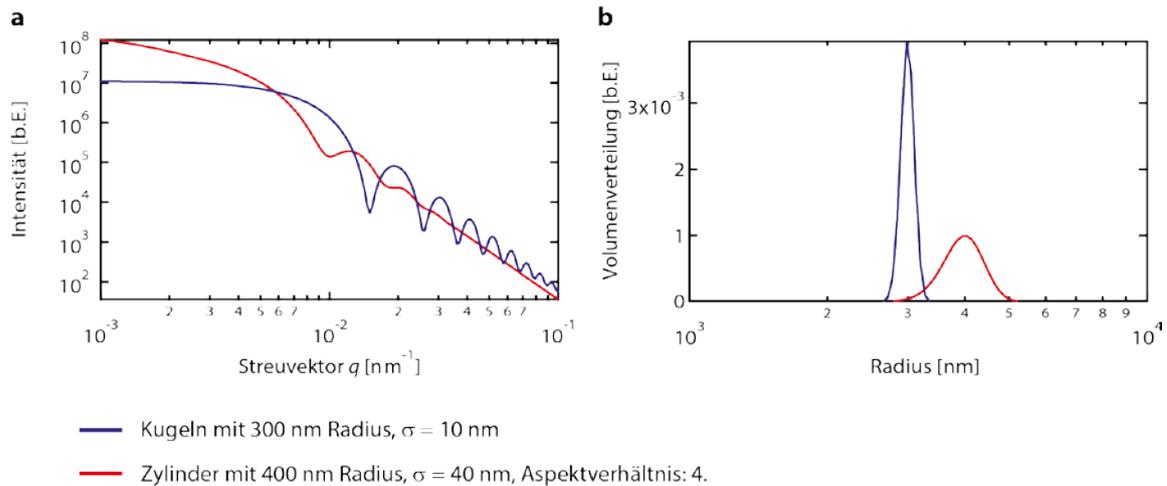


Abbildung 44: Beispielmodelle von glatten Kugeln und Zylinder. a) Simulierte Streukurve von glatten Kugeln mit einem Radius von 300 nm und einer Standardabweichung von 10 nm (blau) sowie einem Zylinder mit einem Aspektverhältnis von 4 mit einem Radius 400 nm, und einer Standardabweichung von 40 nm. (rot) Der Zylinder ist 3200 nm lang, bei einer Standardabweichung von 320 nm. b) Volumenverteilung beider Modelle. Der Volumenbeitrag ist in beiden Fällen identisch. Eine Beispielsimulation für monodisperse Zylinder und Kugeln ist in Abbildung 17 in Kapitel 2.3.3 gezeigt.

Die äußere Form der *E. coli* Zelle ließ sich als Zylinder mit festgelegtem Aspektverhältnis modellieren. Die Modellierung der äußeren Form von Bakterien, die mit Chloramphenicol und Ciprofloxacin behandelt wurden sind in Abbildung 45 gezeigt. Die Übersicht über die Ergebnisse des Fits befindet sich in Tabelle 4. Der Streukontrast relativ zum umgebenden Wasser für eine ganze *E. coli*-Bakterie wurde aus Literaturangaben zur Trockenzusammensetzung¹²³ und zum Wassergehalt¹²⁴ abgeschätzt als $|\Delta\rho|^2 = 0,66 \times 10^{20} \text{ cm}^4$. Das Zylindrische Modell zeigte die Verlängerung der *E. coli* Zellen als ein von 2 auf 4 erhöhtes Aspektverhältnis. Eine Behandlung mit Tetracyclin führte zu einer Vergrößerung des Mittleren Radius der Bakterien um 30 nm auf 450 nm bei einem konstanten Aspektverhältnis. Eine Behandlung mit Rifampicin und Chloramphenicol bewirkte eine Verkürzung der Zellen, was sich in einem Aspektverhältnis von 1 ausdrückte. Dies ist nicht realistisch und zeigt, dass das Modell eines Zylinders mit festem Aspektverhältnis noch nicht das perfekte Modell für eine Bakterienpopulation ist. Zum Vergleich wurden dieselben Informationen über Durchmesser und Aspektverhältnis ebenfalls aus TEM-Aufnahmen extrahiert. Hierbei wurden nur Zellen zu vermessen, die in der Schnittebene zur Gänze erfasst wurden. Die im Modell der USAXS-Streubilder erhaltenen Trends sind grundsätzlich auch in den TEM-Aufnahmen zu beobachten. So führten auch hier Chloramphenicol und Rifampicin zu einer Verringerung des Aspektverhältnisses während Ciprofloxacin dasselbe erhöhte. Allerdings wurde das Aspektverhältnis im Modell der SAXS-Kurven in Vergleich zu den TEM-Aufnahmen systematisch als zu niedrig wiedergegeben. Auch der mittlere Radius R des zylindrischen Modells ist

systematisch kleiner als der halbe Durchmesser der Bakterien in den TEM-Aufnahmen, zeigte aber die gleichen Trends. Hier führte eine Behandlung mit Chloramphenicol, Tetracycline oder Rifampicin zu einer Verbreiterung der Bakterienzelle.

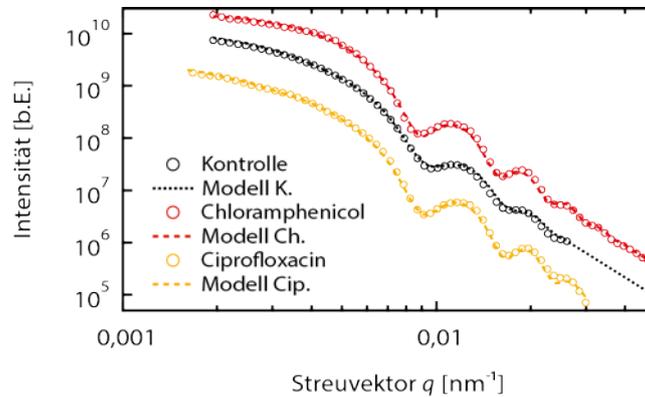


Abbildung 45: USAXS-Streukurven mit Antibiotika behandelter *E. coli* und die Modellierung ihrer äußeren Form. Dargestellt sind die Streukurven unbehandelter *E. coli* (Kontrolle) sowie nach einer Behandlung mit Chloramphenicol oder Ciprofloxacin. Das Modell ist jeweils ein Zylinder mit einem Aspektverhältnis von 2 (Kontrolle), 1 (Chloramphenicol) und 4 (Ciprofloxacin). Die Kurvenform vor dem 1. Minimum beschreibt die Form des Objekts, die Lage des 1. Minimums die Größe und die Dämpfung höheren Ordnungen des 1. Minimums die Monodispersität. Die Kurven wurden zur besseren Sichtbarkeit gegeneinander verschoben.

Antibiotikum	Aspektverh. Zylinder (USAXS)	Mittlerer Radius R [nm] (USAXS)	Std. Abw. σ [nm] (USAXS)	Aspektverh. TEM	Radius TEM [nm]
Unbehandelt	2	418 ± 10	40 ± 10	$3,7 \pm 0,8$	450 ± 40
Chloramphenicol	1	441 ± 10	32 ± 10	$2,6 \pm 0,6$	550 ± 70
Tetracyclin	2	450 ± 10	34 ± 10	$3,2 \pm 0,7$	550 ± 70
Rifampicin	1	455 ± 10	40 ± 10	$3,2 \pm 1,2$	600 ± 60
Ciprofloxacin	4	430 ± 10	35 ± 10	$5,6 \pm 1,4$	360 ± 70

Tabelle 4: Modellierungsparameter der äußeren Form der Bakterienzelle als Normalverteilung von Zylindern mit festgelegtem Aspektverhältnis. Die Verteilungsbreite um den mittleren Radius gibt die Monodispersität der Verteilung an. Die angegebenen Fehler der Modellierung wurden durch Variation der Parameter abgeschätzt.

4.5.7 Kombinierte Streuinformation von USAXS und BioSAXS

Die am BioSAXS-Strahlrohr und an der USAXS-Apparatur gemessenen Kleinwinkelstreu曲ven überlappen, so dass die Information beider Streusignale kombiniert werden können. Dadurch konnte gleichzeitig die äußere Form der Bakterie und das Bakterieninnere ausgewertet werden. Der Unterschied des Streukontrasts $|\Delta\rho|^2$ zwischen Photonenergien von 12,8 keV (BioSAXS) und 17 keV (USAXS) ist etwa 0,01 % und kann daher vernachlässigt werden (Abbildung 46). Die Bakteriendichte bestimmt den maximalen Streuwinkel des USAXS-Instruments. Daher unterscheidet er sich zwischen einzelnen Messungen.

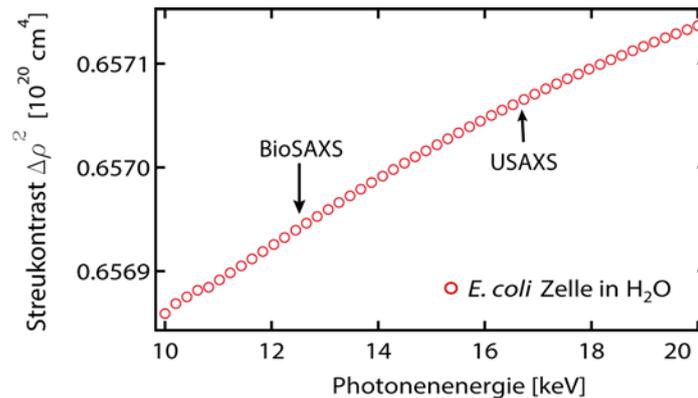


Abbildung 46: Streukontrast $|\Delta\rho|^2$ von *E. coli* Zellen in Wasser. (Tabelle 5) Der Unterschied im Streukontrast bei den unterschiedlichen Photonenergien von BioSAXS (12,8 keV) und USAXS (17 keV) ist vernachlässigbar gering, der Unterschied ist etwas 0,01%. Berechnet mit dem „Scattering Contrast Calculator“ Modul der IRENA-Makros für Igor Pro®.

In Messungen an mit Chloramphenicol behandelten *E. coli*-Bakterien überlappten die q -Bereiche ($0,005 \text{ nm}^{-1}$ bis $0,01 \text{ nm}^{-1}$) von USAXS und BioSAXS (Abbildung 47). Die Steigung im Bereich der Überschneidung war identisch. Bei den Daten der BioSAXS-Messungen wurden die auf gleiche Bakteriendichte normierten Kurven verwendet. An der Streukurve in Abbildung 47 lässt sich ausserdem feststellen, dass die Streukurve der USAXS-Apparatur nur die Streuinformation der äußeren Form enthält. Es gibt keinen Hinweis auf übergeordnete Strukturgrößen (100 nm – 500 nm) in der Bakterienzelle, also außerhalb des am BioSAXS-Strahlrohr zugänglichen q -Bereichs. Dies bestätigt die Beobachtung, dass der Nukleoid der mit Chloramphenicol behandelten Bakterien in den TXM-Aufnahmen nur einen schwachen bzw. gar keinen Kontrast zeigt. Für die verbleibenden Streukurven ohne Überschneidung wurde die äußere Form der USAXS-Streukurven modelliert und in den q -Raum der BioSAXS-Experimente extrapoliert. Die Steigung der Streukurven des extrapolierten Modells stimmten mit der initialen Steigung der BioSAXS-Kurven überein.

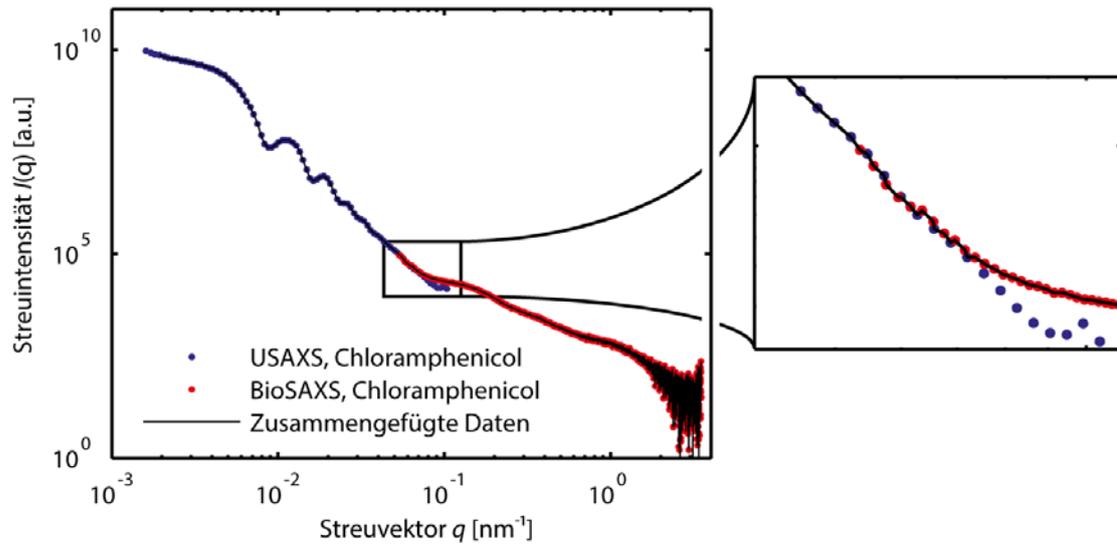


Abbildung 47: Streukurven von mit Chloramphenicol behandelten *E. coli* gemessen an der USAXS-Apparatur (17 keV, Advanced Photon Source, Argonne, USA) und am BioSAXS Strahlrohr P12 (12,8 keV, PETRA III, Hamburg, Germany). Die Datensätze überschneiden sich und zeigen in diesem Abschnitt die gleiche Steigung. Mithilfe des überschneidenden Bereichs lassen sich beide Datensätze relativ zueinander skalieren.

4.5.8 Modell der inneren Struktur von *E. coli*

Auf Basis der zusammengeführten Streukurven, die kombiniert sowohl die äußere Hülle wie die innere Bakterienstruktur enthalten, konnte nun auch die interne Zusammensetzung der *E. coli* Zellen modelliert werden. Das Modell ist analog zu dem der äußeren Hülle, allerdings gibt es einige Einschränkungen: Zur Bestimmung des Formfaktors müsste man für jede zelluläre Komponente das Guinier-Plateau sowie den weiteren Verlauf der Streukurve isoliert betrachten. Da in der Streukurve einer ganzen Bakterie aber nur die Summe der Komponenten zugänglich ist, wurde die Form der internen Zellkomponenten als einfachste Form, also glatte Kugeln angenommen. Eine Normalverteilung glatter Kugeln um einen mittleren Radius R wird im Folgenden als Population bezeichnet und, beginnend bei der kleinsten Kugel nummeriert.

In einem ersten Schritt wurde manuell ein passendes Modell erstellt, welches die Form der Streukurve wiedergibt. In einem zweiten Schritt wurden der mittlere Radius R und der Volumenbeitrag B aller Populationen mit der Methode der kleinsten Quadrate optimiert. Die Fehler der Intensitätswerte $I(q)$ sind die Standardabweichung einer Poisson-Verteilung der gemessenen Photonenintensitäten eines q -Werts. In der Modellierung gewichten diese Fehler die Abweichungen des Modells von der gemessenen Streukurve. Die Polydispersität der Zellkomponenten, also die Standardabweichung σ der Normalverteilung einer Population konnte nur bei der kleinsten Komponente und der äußeren Form bestimmt werden. Für die beiden mittleren Populationen musste die Breite aufgrund von sich überlagernden Beiträgen abgeschätzt werden.

FEHLERABSCHÄTZUNG DER MODELLIERUNG

Der mittlere Radius R und der Volumenbeitrag B einer Streukurve wurden mithilfe der Methode der kleinsten Quadrate optimiert. Hierbei stellt sich die Frage nach der Präzision dieser Modellierung und des Fehlers von mittlerem Radius R und Volumenbeitrag B . Um diese Präzision abschätzen zu können wurde ein Parameter z.B. der mittlere Radius R in einem geeigneten Intervall um das Fitresultat variiert. An jedem Punkt wurden R und B aller Populationen neu optimiert und die Summe der Abweichung von Modell und Fit χ^2 berechnet. Eine Standardabweichung um den Idealwert von χ^2 wird als Fehler bezeichnet. Ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 48 gezeigt: Um den Fehler des optimierten mittleren Radius R (4,2 nm) der zweiten Population un behandelter *E. coli* zu bestimmen wird der Radius im Intervall zwischen 3,6 nm und 4,8 nm variiert. An jedem Punkt werden R und B aller Populationen (ausser dem festgelegten R der zweiten Population) mit der Methode der kleinsten Quadrate optimiert. Am optimierten mittleren Radius ist $\chi^2 = 5610$. Bei einer Standardabweichung ist $\chi^2 = 5714$. Dies entspricht einem mittleren Radius R von 4,55 nm und 3,89 nm und wird als Unsicherheit des Fits bezeichnet. Bei einer schlechteren Übereinstimmung von Modell und Streukurve wäre die Funktion $\chi^2(R)$ flacher, da mehrere Lösungen akzeptabel wären und der Bereich von einer Standardabweichung um den Idealwert würde einen weiteren Bereich umfassen.

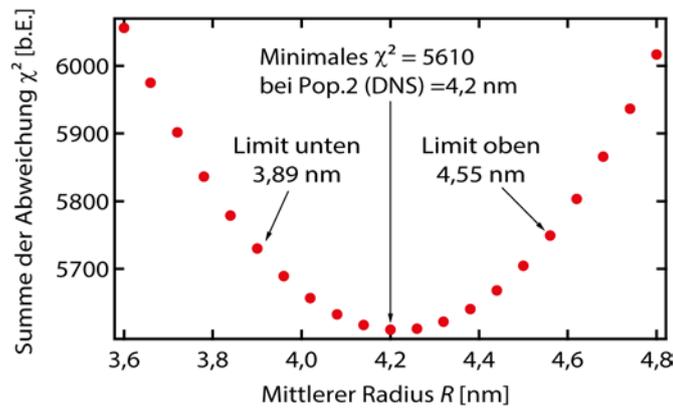


Abbildung 48: Fehlerabschätzung der Modellierung am Beispiel des mittleren Radius der zweiten Population (DNS) unbehandelter *E. coli*-Bakterien. Der mittlere Radius R der Verteilung wurde variiert und die Parameter aller Verteilungen optimiert. χ^2 ist die Summe aller Fehler. Die Fehlerlimits sind eine Standardabweichung um den Idealwert.

Die Modellierung einer unbehandelten *E. coli*-Zelle ist in Abbildung 49 gezeigt. So ließ sich die Form der Streukurve $I(q)$ als Summe von vier Populationen darstellen (Abbildung 49a). Die Volumenverteilung (Abbildung 49b) zeigt welchen Anteil die jeweiligen Populationen am eingenommenen Volumen hatten. Die Anzahlverteilung (Abbildung 49c) gibt die Zahl der Körper mit dem jeweiligen mittleren Radius an. Da die absolute Intensität (wird üblicherweise mit einem Glaskohlenstoffstandard kalibriert) nicht bekannt war, sind die Angaben in Anzahl und Volumenverteilung nicht normiert und müssen daher relativ zueinander betrachtet werden.

Die drei Populationen an zellinternen Komponenten stimmen in ihren mittleren Radien gut mit der Größen wichtiger Zellkomponenten überein. So entsprach Population 1, Kugeln mit einem mittleren Durchmesser von 3,5 nm, dem Größenbereich vieler Proteine die in einer *E. coli* Zelle im Mittel einen Durchmesser von 3 nm haben.¹⁵¹ Population 2 war mit einer Größe von 9 nm nahe am Durchmesser eines elementaren Bausteins des Nukleoids, die mit Histidin-ähnlichen Proteinen bestückte DNS (10 nm).^{34,56} Die dritte Population ist mit einem Durchmesser von 26 nm ist der Größe eines Ribosoms¹⁵⁰ (Literatur 21 nm) sehr ähnlich. Die vierte Population gab schließlich die im vorangegangenen Abschnitt diskutierte äußere Form der Bakterienzelle wieder. Die Streukontraste der einzelnen Zellkomponenten wurden aus Literaturdaten zu Dichte und Elementarzusammensetzung abgeschätzt und sind in Tabelle 5 gezeigt. Die Berechnung wurde mit dem „Scattering Contrast Calculator“ Modul der *IRENA*-Makros für Igor Pro® durchgeführt. Mithilfe dieser abgeschätzten Streukontraste wurde das Modell der internen Zusammensetzung verbessert (Abbildung 49a-c).

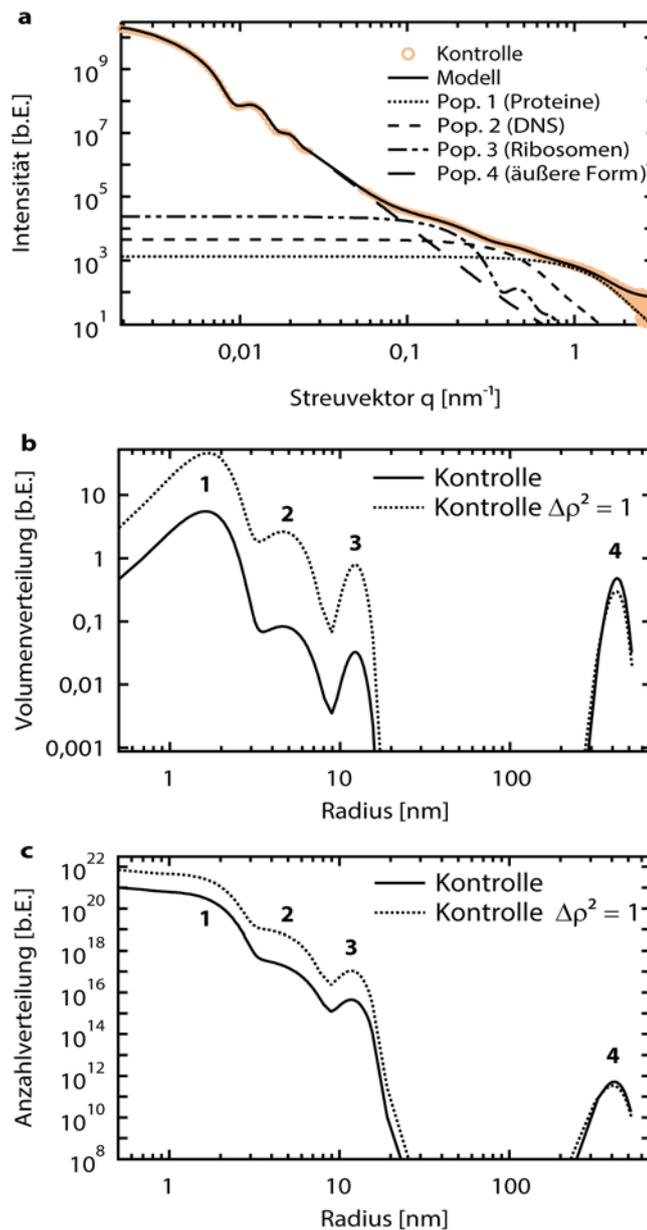


Abbildung 49: Modellierung der zusammengesetzten Streukurven von *E. coli*-Bakterien, gemessen an der USAXS-Apparatur und dem BioSAXS-Strahlrohr (bei 17 keV bzw. 12,8 keV). a) Modellierung der Streukurve unbehandelter *E. coli*-Bakterien mit vier Streupopulationen. Diese konnten den Zellbestandteilen (Proteine, DNS und Ribosomen) sowie der äußere Form zugeordnet werden. Die äußere Form wurde als glatter Zylinder approximiert, die anderen Bestandteile als glatte Kugeln. b) Volumenverteilung $f(r)$ der Komponenten einer unbehandelten *E. coli*-Bakterien als Funktion ihres Radius. Der Streukontrast der einzelnen Komponenten wurde abgeschätzt (Tabelle 5). Die gestrichelte Linie zeigt das Modell ohne Annahmen über die relativen Streukontraste ($|\Delta\rho|^2 = 1$). c) Die Anzahlverteilung $N(r)$ gibt die Anzahl der Komponenten mit einem entsprechenden Radius an. Die gestrichelte Linie zeigt das Modell ohne Annahmen über die relativen Streukontraste ($|\Delta\rho|^2 = 1$).

Komponente	Dichte (g/ml)	Elementzusammensetzung	Streukontrast $ \Delta\rho ^2$ in H ₂ O
Proteine	1,35 ⁴⁹	NC ₅ O ₂ H ₈	7,983 × 10 ²⁰ cm ⁴
DNS	2 ¹⁵²	PN ₅ O ₇ C ₁₀ H ₁₄	30,64 × 10 ²⁰ cm ⁴
Ribosomen	1,62 ¹⁵³	PN ₅ O ₈ C ₁₀ H ₁₄	23,70 × 10 ²⁰ cm ⁴
Ganze Bakterie	1,1 ¹²³	C _{0,09} H _{0,61} O _{0,27} N _{0,019} ^{123,124}	0,665 × 10 ²⁰ cm ⁴

Tabelle 5: Abschätzung der Kleinwinkelstreukontraste ($\Delta\rho^2$) bei 12,8 keV aus Literaturdaten zu Elementarzusammensetzung und Dichte. Die Zusammensetzung einer *E. coli*-Zelle wurde aus der Zusammensetzung der Trockenmasse¹²³ und des Wassergehalts¹²⁴ berechnet. Die Elementarzusammensetzung von DNS, Ribosomen und Proteinen wurden aus ihrer Struktur berechnet. Die Kontraste sind relativ zu H₂O angegeben. (Dichte von 1 g/ml, $|\Delta\rho|^2$ zu Vakuum: 88,73 × 10²⁰ cm⁴).

Die Volumen- und Anzahlverteilung ermöglichte einen direkten Zugang zu relativem Volumen $V_{k,rel}$ und der Anzahl der Komponenten $N_{k,rel}$ einer *E. coli* Zelle. Hierzu wurde für jede Population die Volumenverteilung f_k aufsummiert und relativ zum Volumen des ganzen Bakteriums $\sum f_{E. coli}$ betrachtet:

$$V_{k,rel} = \frac{\sum f_k(r)}{\sum f_{E. coli}(r)}$$

Analog wurde zur Berechnung der Anzahl an Molekülen pro Zelle für jede Population die Anzahlverteilung aufsummiert und relativ zur Bakterienzahl gesetzt:

$$N_{k,rel} = \frac{\sum N_k(r)}{\sum N_{E. coli}(r)}$$

Eine Übersicht über die berechneten Volumenanteile und Anzahl der Zellkomponenten eines unbehandelten *E. coli*-Bakteriums ist in Tabelle 6 gezeigt.

Auffällig ist hierbei, dass das Volumen der Proteine das zehnfache Volumen der Bakterienzelle einnimmt. Auch die Anzahl an Proteinen pro Zelle liegt mit 8×10^8 zwei Größenordnungen über den Literaturwert¹²⁴ von $2,5 \times 10^6$. Die Ursache für diese hohe Anzahl an Proteinen könnte in der Probenvorbereitung liegen. Hier ist es vorstellbar, dass Rückstände aus dem Nährmedium nicht vollständig ausgewaschen waren und im Fixierungsschritt an die Zellen gebunden wurden. Ein weiterer Faktor ist, dass in diesem Modell kleinere Bestandteile der Zelle, z.B. RNS nicht berücksichtigt wurden und möglicherweise zum Streusignal beitragen. Der Volumenanteil der DNS liegt mit 17 % nahe an Literaturangaben zum Volumenanteil des Nukleoids¹⁵⁴ von 20 %. Die Zahl der Moleküle ist schwer zu beurteilen, da ein einzelnes DNS-Molekül als Kette kugelförmigen Bestandteilen modelliert wurde. Die Zahl der Ribosomen pro Zelle liegt mit 9900 nahe am Literaturwert¹²⁴ von 18600 pro Zelle.

Die Präzision dieser Volumen- und Anzahlbestimmung ist sehr gut wenn man die Unsicherheiten der Abschätzung des Streukontrasts der einzelnen Komponenten bedenkt.

Röntgenkleinwinkelstreuung kann also als neue Methode zur Bestimmung der Zellzusammensetzung verwendet werden. Dies ist komplementär zu existierenden Methoden wie hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie¹⁶.

Komponente	Volumen relativ zum Zellvolumen (%)	Anzahl pro Zelle
Proteine	1035	8.02×10^8
DNS	17,2	1.02×10^6
Ribosomen	6,8	9.90×10^3

Tabelle 6: Relative Volumen und Anzahlanteile der zellulären Komponenten eines unbehandelten *E. coli*-Bakteriums. Berechnet aus dem Volumen- und Anzahlverteilungen (Abbildung 49) unter Annahme der abgeschätzten Streukontraste (Tabelle 5).

4.5.9 Auswirkung antibiotischer Behandlungen auf die Bakterienmorphologie

Mit Röntgenkleinwinkelstreuung sind die Bestimmung des von zellulären Komponenten (Ribosomen, DNS, Proteine) eingenommenen Volumens sowie eine Abschätzung der Molekülzahl pro Zelle möglich. Diese Zusammensetzung der internen Komponenten veränderte sich im Zuge einer antibiotischen Behandlung. Hierzu wurden die Streukurven von äußerer Form, gemessen an der USAXS-Apparatur (APS, Argonne, USA) und der internen Struktur, gemessen am BioSAXS-Strahlrohr (PETRA III, Hamburg, Deutschland) wie in Abschnitt 4.5.7 beschrieben zusammengefügt. Die Modellierung wurde analog zur in Abbildung 49 gezeigten unbehandelten *E. coli*-Bakterien durchgeführt. Hierbei wurde die äußere Form als zylinderförmige Partikel mit festem Aspektverhältnis modelliert (siehe Abschnitt 4.5.6). Die internen Zellkomponenten wurden als glatte Kugeln approximiert und es wurde angenommen, dass sich der Streukontrast einer Komponente im Zuge der antibiotischen Behandlung nicht änderte. Die Ergebnisse der Modellierung, der mittlere Radius R und der Volumenbeitrag B jeder Zellkomponente (Proteine, DNS und Ribosomen) nach antibiotischer Behandlung ist in Abbildung 50 dargestellt.

Eine Behandlung mit dem Proteinsyntheseinhibitor Tetracyclin (verhindert die Anlagerung neuer tRNS am Ribosom) blieb der sowohl der Beitrag der Proteine zum Volumen als auch der mittlere Radius unverändert. Der mittlere Radius der DNS vergrößerte sich um 30 % bei einer gleichzeitigen Halbierung des Volumenbeitrags. Zusätzlich verringert sich der Volumenbeitrag der Ribosomen um 20 % bei einem um 10 % kleineren mittleren Radius. Wie schon im Abschnitt 2.1 beschrieben, ist die Kondensation des Nukleoids eine Folge der Inhibierung der Proteinsynthese. In diesem Kontext lässt sich die Veränderung der DNS als eine Aggregation von DNS-Fibrillen im Nukleoid interpretieren. Dies ist auch in der TEM-Aufnahme sichtbar. Der verringerte Volumenbeitrag der Ribosomen deutet auf eine geringe Zahl an Ribosomen in der Zelle hin. Die verringerte Größe der Ribosomen ist möglicherweise eine Folge inhibierten Proteinsynthese. Im Normalfall befindet sich das neu synthetisierte Protein direkt am Ribosom und erhöht so im Mittel dessen Durchmesser. Aus Kristallstrukturen von Ribosomen mit gebundenem Tetracyclin ist bekannt, dass sich die Größe des Ribosoms im Zuge der Anlagerung von Tetracyclin nicht ändert.³⁹

Chloramphenicol, ebenfalls ein Proteinsyntheseinhibitor verhindert die Ausbildung einer neuen Peptidbindung¹⁵⁵ im Ribosom. Bei dieser Messung führte die Modellierung nicht zu einer idealen Abbildung der Streukurve, was sich in großen Fehlern des Fits verglichen mit den anderen antibiotischen Behandlungen manifestiert. Die Proteine waren von der Behandlung unbeeinflusst, die DNS hatte einen halbierten Beitrag bei unklarem mittlerem Radius, während die Ribosomen einen um 10 % verringerten mittleren Radius bei unklarem Beitrag hatte. Eine Behandlung mit Chloramphenicol führt in den *E. coli* Zellen zu einer auch in den TEM-Aufnahmen erkennbaren Kondensation des Nukleoids.¹⁷ Die Veränderung der DNS lässt

sich hier analog zu Tetracyclin als eine Aggregation von DNS-Fibrillen im Nukleoid interpretieren. Bei den Ribosomen, lässt sich die Verringerung des mittleren Radius ebenfalls als Absenz der neu synthetisierten Proteine im Umfeld der Ribosomen interpretieren. Aus Kristallstrukturen von Ribosomen mit Chloramphenicol ist bekannt, dass ändert sich die Größe des Ribosoms nach einer Bindung von Chloramphenicol nicht ändert.¹⁵⁵

Rifampicin inhibiert die RNS-Synthese an der DNS-abhängigen RNS-Polymerase und führt zu einer Expansion des Nukleoids durch die Auflösung der verdrillenden Transkriptionsfoki.³² Die Proteine wurden durch die Behandlung nicht beeinflusst. Der mittlere Radius der DNS stieg um 20 % bei konstantem Volumenbeitrag. Der mittlere Radius der Ribosomen blieb konstant bei einem um 10% gestiegenen Volumenbeitrag. Morphologisch führte Rifampicin zu einer, auch in den TEM-Aufnahmen erkennbaren Expansion des Nukleoids.⁵⁶ Die gleichmäßige Verteilung der DNS in der Zelle führten zu einer Entspannung der verdrillten DNS-Fibrillen und damit zu einem erhöhten mittleren Radius.

Die nach einer Behandlung mit Polymyxin B oder den kurzen kationischen Peptid auftretende morphologische Änderung konnte nicht mit dem vorliegenden Modell beschrieben werden. Die Streukurven hatten keine Merkmale die den einzelnen Komponenten zugeordnet werden konnten. Stattdessen war es möglich die Kurvensteigung mit einem fraktalen Modell (Abschnitt 4.5.4) zu beschreiben. Vermutlich wird das Streusignal durch verdichtete Granulen im Bakterieninneren dominiert.

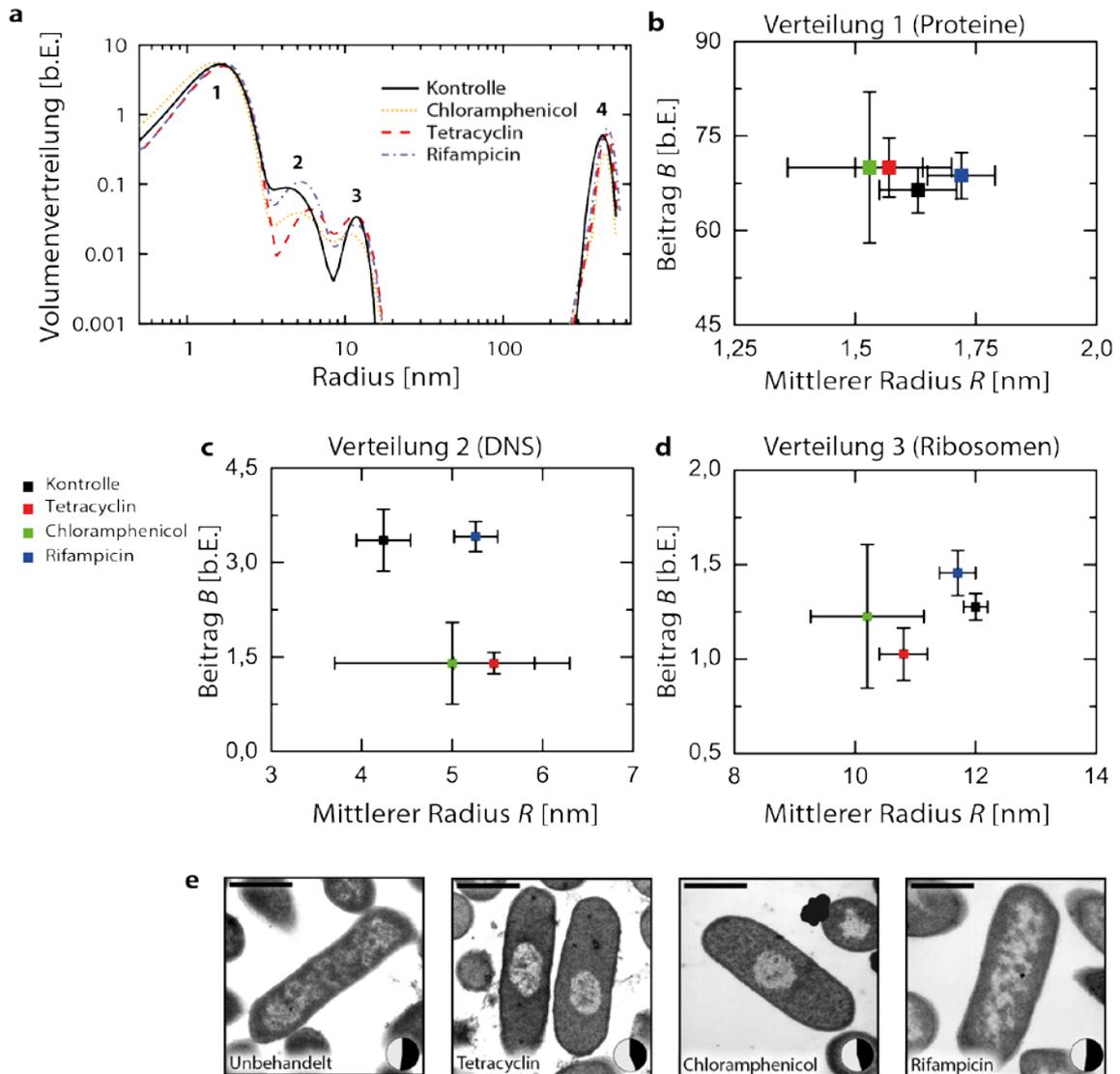


Abbildung 50: Die Zusammensetzung der Streukurven von *E. coli*-Zellen nach antibiotischer Behandlung. a) Die Volumenverteilung der Zellkomponenten nach einer antibiotischen Behandlung. Im Modell kann dies durch eine Veränderung des mittleren Radius R und des Volumenbeitrags B der einzelnen Zellkomponenten beschrieben werden. b) Sowohl der mittlere Radius als auch der Volumenbeitrag der Proteine bleiben nach Antibiotikagabe unverändert. c) Der mittlere Radius der DNS-Fibrillen erhöhte sich nach einer Behandlung mit Chloramphenicol und Tetracyclin um 30 % bei halbiertem Volumenbeitrag. Eine Behandlung mit Rifampicin erhöhte den Radius um 20 % der DNS bei konstantem Volumenbeitrag. (d) Der mittlere Radius der Ribosomen sank nach einer Behandlung mit Chloramphenicol und Tetracyclin um 20 % während sich der Volumenbeitrag der Ribosomen nach einer Rifampicinbehandlung um 10 % erhöhte. Die Fehler des Modells sind als eine Standardabweichung um den Idealwert angegeben und in Abbildung 48 erläutert. (e) TEM-Aufnahmen der antibiotischen Behandlungen, der Skalierungsbalken hat eine Länge von 1 μm . Der Nukleoid kondensiert nach einer Behandlung mit Chloramphenicol und Tetracyclin und expandiert nach einer Rifampicinbehandlung. Der weiße Anteil der Kreisdiagramme ist die Solidität des Nukleoids nach einer quantitativen Bildanalyse von 100 Zellen und zeigt die Fragmentierung des Nukleoids (Details in Kapitel 4.3).

Fazit

Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) erlaubt es, die interne Morphologie von *E. coli*-Bakterien zu untersuchen. Die Kombination von Streuinformation über die einhüllende Bakterienstruktur an der USAXS-Apparatur (APS, Argonne, USA) und den internen Bestandteilen am BioSAXS-Strahlrohr (PETRA III, Hamburg, Deutschland) ermöglichte die Entwicklung eines Modells der Bakterienzelle. Hierzu wurde ein Modell glatter Körper mit homogener Dichte verwendet, das die äußere Form als Zylinder und die internen Bestandteile als Kugeln approximiert. Dieses Modell erlaubt es, eine Aussage über den mittleren Radius und das Volumen der einzelnen Zellkomponenten zu treffen. Die mittleren Radien der internen Bestandteile passten präzise zu den wichtigsten Komponenten einer bakteriellen Zelle: Proteine, DNS und Ribosomen. Nach Abschätzung des Streukontrasts der Komponenten konnte deren Volumenanteil und Anzahl pro *E. coli*-Zelle bestimmt werden. Hierbei zeigte sich, dass die Zahl der Proteine um zwei Größenordnungen zu hoch eingeschätzt wurde. Dies deutet darauf hin, dass sich Proteine (oder Objekte ähnlicher Größe) in der Suspension um das Bakterium befanden. Das Volumen der DNS war mit 17 % nahe an den Volumenangaben des Nukleoids von 20 % in der Literatur.¹⁵⁴ Die Zahl der Ribosomen war mit ca. 10000 pro Zelle ebenfalls nahe den Literaturangaben¹²⁴ von 18000 pro Zelle.

Eine Antibiotikabehandlung veränderte die interne Morphologie und damit auch die internen Zellkomponenten. Eine Inhibierung der Peptidsynthese durch Chloramphenicol oder Tetracyclin erhöhte den mittleren Radius der DNS um 30 % bei einer Halbierung des eingenommenen Volumens. Dies passt zur erwarteten Aggregation der DNS-Fibrillen Zentrum der Zelle. Die Kondensation des Nukleoids ist auch in den TEM-Aufnahmen zu sehen und in der Literatur bestätigt.¹⁷ Gleichzeitig wird auch der mittlere Radius der Ribosomen um 10 % reduziert, was als ein Fehlen der neu synthetisierten Proteine in der direkten Umgebung des Ribosoms interpretiert werden könnte.

Dieses Beispiel illustriert, dass es mit Kleinwinkelstreuung möglich ist, das von einzelnen Zellkomponenten eingenommene Volumen sowie deren Anzahl zu bestimmen. Dies ist eine neue Methode und komplementär zu existierenden Techniken wie hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie¹⁶. Zudem ist dies, neben einigen Studien an Brustkrebsgewebe,^{25-27,156} die erste Anwendung von Kleinwinkelstreuung auf komplexe biologische Objekte wie *E. coli* Zellen.

4.6 Kleinwinkelstreuung als Hochdurchsatzverfahren

Ein großer Vorteil von Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) im Vergleich zu bildgebenden Verfahren ist, dass die Datenerfassung sehr schnell ist. Basierend darauf wurde in den letzten Jahren die Entwicklung von SAXS hin zu einem Hochdurchsatzverfahren vorangetrieben.²⁹ An Synchrotronquellen mit einem automatisierten Probenroboter dauert eine Messung typischerweise weniger als eine Sekunde und der Probenwechsel eine Minute. Mit diesen Voraussetzungen eignet sich SAXS dazu, in einem Hochdurchsatzverfahren einen antibiotischen Wirkmechanismus anhand dessen morphologischer Auswirkung im Bakterium zu identifizieren. Ein großer Vorteil der Röntgenkleinwinkelstreuung hier gegenüber bildgebenden Verfahren hat, ist dass jede Messung über ca. eine Million Zellen gemittelt wurde. Zusätzlich kann auf Farbstoffe und eine aufwändige Probenpräparation verzichtet werden.

Die im vorangegangenen Kapitel vorgestellte Modellierung der einzelnen Zellbestandteile ist zeitintensiv und für eine Hochdurchsatzanalyse nicht geeignet. Daher wurde die hier auf eine nicht auf Modellannahmen basierende Hauptkomponentenanalyse verwendet. Die schnelle Analyse von antibiotischen Wirkmechanismen ist eine zentrale Fragestellung der auf Hochdurchsatzverfahren basierenden modernen Antibiotikaforschung. Dieses Kapitel zeigt wie SAXS diese Rolle ausfüllen könnte.

4.6.1 Hochdurchsatzanalyse am BioSAXS-Strahlrohr

In diesem Experiment wurden *E. coli*-Bakterien (Wildtyp) in ihrer exponentiellen Wachstumsphase verschiedenen Klassen von Antibiotika ausgesetzt. Die in der bakteriellen Zelle hervorgerufene morphologische Änderung wurde mit Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) untersucht. In Abbildung 51 ist der Aufbau des Experiments gezeigt. Ein Probenroboter¹²⁵ injizierte mit Antibiotika behandelte *E. coli*-Bakterien in eine Kapillare. Hier wurden diese von einem monochromatischen Röntgenstrahl (12,8 keV) durchleuchtet und erzeugten ein Streubild auf einem Flächendetektor. Nach radialem Integration erhält man die eindimensionale Streukurve $I(q)$ als Funktion des Streuvektors q . Der am BioSAXS-Strahlrohr abgedeckte q -Raum umfasste $0,05 \text{ nm}^{-1}$ bis $3,5 \text{ nm}^{-1}$, was Strukturgrößen von 120 nm bis 3 nm im Realraum entspricht. Kurze Belichtungszeiten von 0,05 s ermöglichen in Kombination mit einem Probenroboter die Untersuchung von einer Probe pro Minute. Dies ermöglichte die Untersuchung der Kollektion an Antibiotika bei verschiedenen Inkubationszeiten in wenigen Stunden. Die untersuchten antibiotischen Behandlungen sind in Tabelle 5 gezeigt und umfassten eine Sammlung verschiedener etablierter Antibiotika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen sowie ein kurzes kationisches Peptid mit bisher unbekanntem Mechanismus.

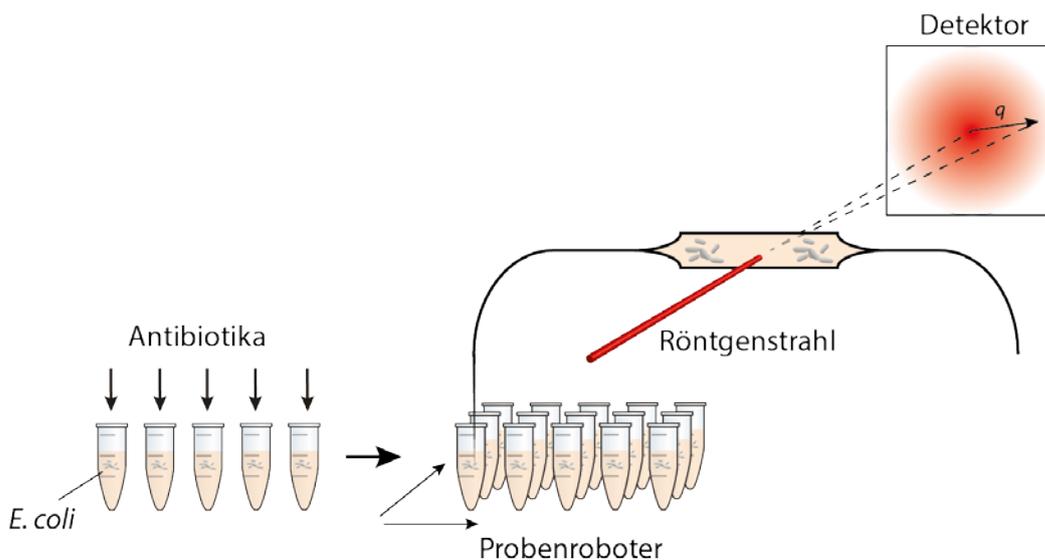


Abbildung 51: Aufbau des Experiments. Mit Antibiotika behandelte *E. coli*-Bakterien werden mit einem automatischen Probenroboter in eine Kapillare injiziert. Ein monochromatischer Röntgenstrahl mit 12,8 keV beleuchtet die Probe und erzeugt ein Streubild auf einem Detektor. Nach radialer Integration des zweidimensionalen Streubilds erhält man die eindimensionale Streukurve $I(q)$ als Funktion des Streuvektors q . Unbehandelte *E. coli* Zellen dienen als interne Referenz. Die Experimente wurden am BioSAXS-Strahlrohr (P12, EMBL/DESY) an PETRA III in Hamburg durchgeführt. Die Belichtungszeit betrug 0,05 s, der Probenwechsel dauerte ca. eine Minute.

Klasse	Mechanismus	Antibiotikum	A	B	Nukleoid Solidität	Modifizierte Morphologie	Morphologie in TEM-Aufnahmen
Unbehandelt	-	-	0,7	0,3	0,48	Nein	Verteilter Nukleoid.
Fluoroquinolone DNS-Syntheseinhibitor	Inhibiert Topoisomerase II (DNA gyrase) und Topoisomerase IV. Blockiert das abwickeln der DNS.	Ciprofloxacin	-0,1	-0,5	0,48	TEM	Verlängerte Zellen, verringerter Kontrast im Cytoplasma. DNS-Fibrillen sind dichter gepackt und in der Zelle verteilt.
Rifamycine RNS-Syntheseinhibitoren	Inhibierung der RNS-Polymerase. Stoppt die Translation.	Rifampicin	4,5	-0,7	0,48	TEM, SAXS	Ausgedehnter Nukleoid.
β -Lactame Inhibitoren der Zellwandsynthese	Binden an das Transpeptidase-Enzym und inhibieren damit die Peptidoglycansynthese.	Ampicillin	0,3	0,2	0,56	TEM	Verlängerter Nukleoid im Zellzentrum. Dicht gepackte DNS-Fibrillen.
		Cefepime	0,4	-0,1	0,37	Nein	Verlängerte Zellen, verteilter Nukleoid
		Piperacillin	0,4	-0,2	0,41	Nein	Verteilter Nukleoid.
Lipopeptide Zerstörung der Zellmembran	Wirkt wie ein Detergenz auf die Zellwand.	Polymyxin B	12,9	-1,1	0,68	TEM, SAXS	Homogenes, schwach kontrastiertes Zytoplasma mit stark gefärbten Strukturen. Beschädigte Zellwand.
Aminoglykoside Inhibitoren der Proteinsynthese	Bindet an die 30S Untereinheit des Ribosoms. Führt zu fehltranslatierten Proteinen.	Gentamycin,	1,3	0,3	0,4	TEM	Verklumpfte DNS-Fibrillen.
		Kanamycin	2,1	0,5	0,51	Nein	Verlängerte Zellen. Verteilter Nukleoid mit dicht gepackten Fibrillen.
Tetracycline Inhibitoren der Proteinsynthese	Verhindert die Bindung neuer tRNS an der 30S Untereinheit des Ribosom	Tetracyclin	-2,8	1,1	0,56	TEM, SAXS	Kondensierter Nukleoid im Zellzentrum.
Phenicol Inhibitoren der Proteinsynthese	Bindet an die 50S Untereinheit des Ribosoms und verhindert die Bildung einer neuen Peptidbindung.	Chloramphenicol	-4,1	0,1	0,55	TEM, SAXS	Kondensierter Nukleoid im Zellzentrum
Kurze kationische Peptide	Unbekant	Peptidsequenz: RLKRWWKEL	12,9	2,0	0,78	TEM, SAXS	Homogenes, schwach kontrastiertes Zytoplasma mit stark gefärbten, granularen Strukturen an den Polen und an der Zellwand. Ca. 50 nm im Durchmesser.

Tabelle 7: Die verwendeten Antibiotika sind Vertreter verschiedener Wirkstoffklassen mit unterschiedlichem Mechanismus. ³⁰ Die Koeffizienten A,B stammen aus Streukurven nach vier Stunden Inkubationszeit und anschließender Hauptkomponentenanalyse. Der aus der quantitativen Bildanalyse Soliditätsparameter beschreibt die Kompaktierung des Nukleoids. In der letzten Spalte sind die Änderungen anhand von individuellen TEM-Aufnahmen beschrieben.

4.6.2 Hauptkomponentenanalyse

Der komplexe Aufbau eines E. coli-Bakteriums mit seinen vielen polydispersen Bestandteilen erschwert die Definition eines geeigneten Modells.^{97,104} Auch die im vorangegangenen Kapitel vorgestellte Modellierung nimmt die Form der elementaren Zellbestandteile als glatte Kugeln mit homogener Dichte an. Um alle 81 am BioSAXS-Strahlrohr gemessenen Streukurven ohne Vorannahmen mathematisch zu untersuchen, wurde eine Hauptkomponentenanalyse (engl. *principal component analysis*, PCA) angewandt. Die in den Streukurven ($I(q)$) vorhandene Variation konnte mit zwei Hauptkomponenten beschrieben werden: $I(q)=I_m(q)+A PC1(q)+B PC2(q)$. Die Abweichung von einer mittleren Streukurve $I_m(q)$ wurde durch die ersten beiden Hauptkomponenten ($PC1$, $PC2$) und den zugehörigen Koeffizienten (A , B) ausgedrückt. Die ersten beiden Hauptkomponenten waren ausreichend um die im Datensatz vorhandene Abweichungen zu erklären. Aufgrund der geringen Zelldichte einiger Proben und dem damit verbundenen Rauschen musste die PCA auf den q -Bereich $< 0,5 \text{ nm}^{-1}$ ($> 13 \text{ nm}$) beschränkt werden. Die ersten beiden Hauptkomponenten sind in Abbildung 52a dargestellt. $PC1$ verschiebt die Intensität im gesamten q -Bereich, was mit einem positiven Koeffizienten darauf hindeutet, dass sich im beobachteten Größenbereich mehr Objekte befinden. Dies kann aufgrund einer Aufspaltung von größeren Strukturen oder der Aggregation kleiner Objekte passieren. $PC2$ hat einen Nulldurchgang bei 34 nm und gewichtet damit die Beiträge größerer ($>34 \text{ nm}$) und kleinerer ($<34 \text{ nm}$) Strukturen. Positive Koeffizienten von $PC2$ deuten auf einer Vergrößerung der internen Struktur hin.

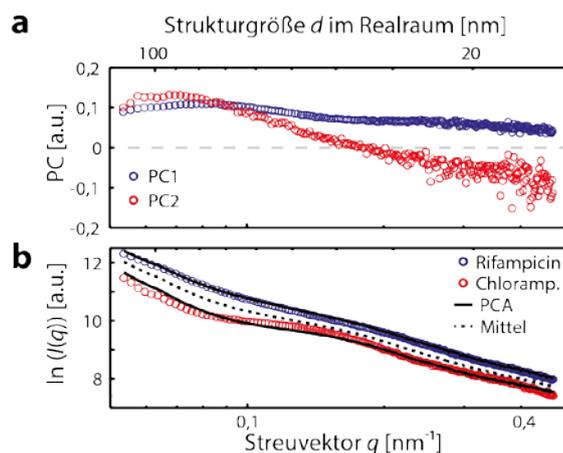


Abbildung 52: Hauptkomponentenanalyse (PCA). a) Die ersten beiden Hauptkomponenten $PC1$ und $PC2$. $PC1$ variiert die Streukurve im gesamten q -Bereich. $PC2$ gewichtet aufgrund des Nulldurchgangs bei 34 nm die Beiträge kleinerer und größerer Strukturen. b) Rekonstruktion der originalen Streukurve durch die Hauptkomponentenanalyse. Ausgehend vom Mittel aller Streukurven wurden die antibiotikainduzierten Veränderungen mit zwei Hauptkomponenten dargestellt.

4.6.3 Korrelation von SAXS und TEM

Die Koeffizienten (A , B) der ersten beiden Hauptkomponenten generierten eine Art spezifischen „Fingerabdruck“ der verschiedenen morphologischen Änderungen. Dieser ist in Abbildung 53 zusammen mit den zugehörigen TEM-Aufnahmen dargestellt. Die verschiedenen Klassen von Antibiotika ließen sich durch den Koeffizienten A der ersten Hauptkomponente von der unbehandelten Kontrolle unterscheiden: Bakteriostatische Inhibitoren der Proteinsynthese (Chloramphenicol, Tetracyclin) hatten negative Werte in A , also eine verringerte Streuintensität. Positive A erhöhten die Streuintensität und traten nach einer Behandlung mit RNS-Polymerase Inhibitoren (Rifampicin) und membranzerstörenden Proteinen (Polymyxin B, Peptid) auf. Die zweite Hauptkomponente mit ihrem Koeffizienten B ermöglichte eine Unterscheidung von Antibiotika innerhalb dieser Gruppen: So kann Tetracyclin von Chloramphenicol unterschieden werden sowie das Polymyxin B vom kurzen kationischen Peptid.

Als quantitative Unterfütterung der visuellen Erindrücke sind die Resultate der Soliditätsanalyse des „DNS-Plasmas“, auch Nukleoid genannt, sind als Kreisdiagramme in den TEM-Aufnahmen dargestellt. Hierbei gibt der weiße Anteil das Verhältnis zwischen der Fläche des Nukleoids und einer konvexen Hülle um alle Nukleoidanteile an (Abbildung 53).

Nach einer Behandlung mit Polymyxin B und dem Peptid treten die stärksten Änderungen im Koeffizienten A auf. Diese führten in den TEM-Aufnahmen zu einem homogenen Zytoplasma sowie der Bildung von stark gefärbten granularen Strukturen an den Zellpolen und der Zellwand. Die quantitative Analyse zeigt, dass diese Unterschiede im gesamten Zellensemble vorhanden sind zeigte der TEM-Aufnahmen. Zusätzlich wird deutlich, dass der in SAXS detektierte morphologische Unterschied nach beiden Behandlungen, in der Struktur der Zellmembran sichtbar war. Nach einer Behandlung mit Polymyxin B Behandlung löste sich diese teilweise auf¹⁵⁷, nach einer Behandlung mit dem Peptid war sie noch intakt.

Bei weniger starken Strukturänderungen war die Verformung des Nukleoids die augenscheinlichste morphologische Änderung. In einem unbehandelten *E. coli*-Bakterium in der exponentiellen Wachstumsphase ist die DNS gleichmäßig verteilt und bildet einzelne Transkriptionsfoki.^{17,38,53,158} Dies bilden sich an Positionen im Genom, an denen die Struktur des Ribosoms kodiert ist. In der exponentiellen Wachstumsphase werden diese verstärkt abgelesen. Eine Behandlung mit Tetracyclin oder Chloramphenicol (Inhibitoren der Proteinsynthese) führte zu negativen A -Koeffizienten. Dieser korrelierte mit einer Kondensation des Nukleoids in eine elliptische Struktur in der Zellmitte, wie bereits in Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopieexperimenten gezeigt.^{17,38,58} Die Kondensation des Nukleoid formte zwei eher homogene Einheiten. Da die Gesamtgröße des Nukleoids keinen Streubeitrag leistet, wurde eine Verringerung der Streuintensität und demzufolge auch ein negative Koeffizient A der ersten Hauptkomponente beobachtet. Die zweite Hauptkomponente ermöglichte einer Unterscheidung beider Behandlungen. Mechanistisch blockiert Tetracyclin die Anlagerung neuer tRNS während Chloramphenicol die Ausbildung einer neuen Peptidbindung verhindert.

Dies führte zu einem positiven B -Wert nach einer Tetracyclinbehandlung und damit zu einer Verstärkung der Streubeiträge großer Strukturen (> 34 nm). Eine Unterscheidung der morphologischen Änderungen in den TEM-Aufnahmen war nicht möglich.

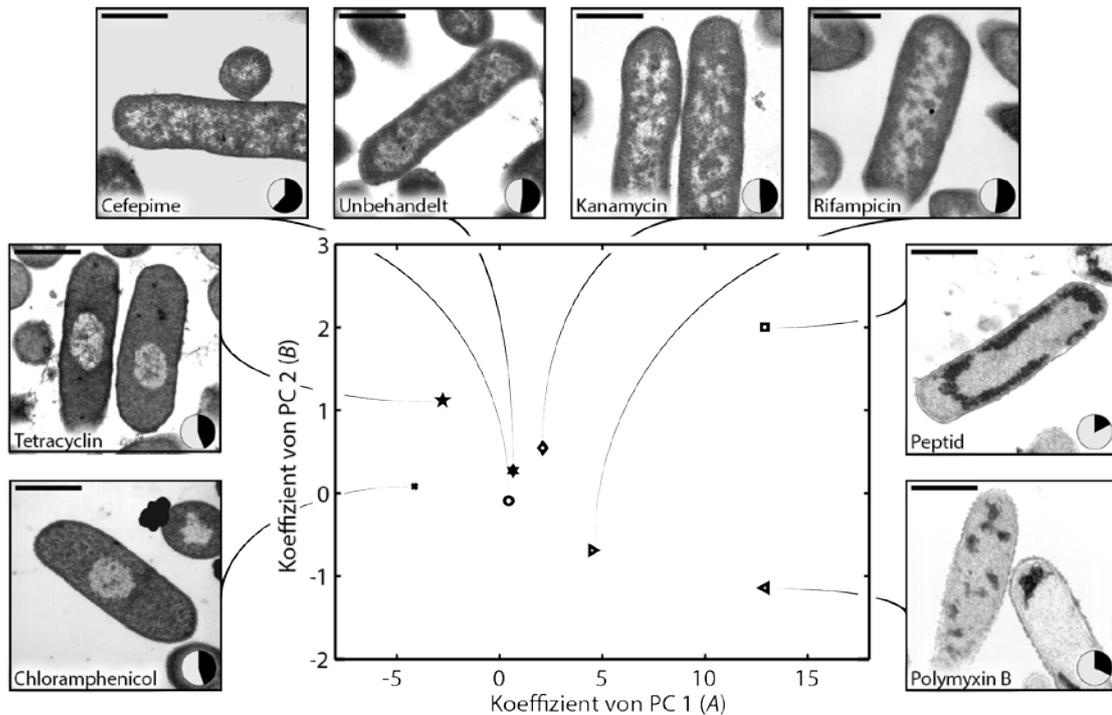


Abbildung 53: Korrelation der Koeffizienten der Hauptkomponentenanalyse mit den TEM-Aufnahmen. Die Wirkung eines Antibiotikums auf die Transkription (Rifampicin), Translation (Chloramphenicol, Tetracyclin) und die Integrität der Zellmembran (Polymyxin B) können unterschieden werden. Aminoglykoside, die zu fehlerhaften Proteinen führen (Kanamycin) sowie β -Lactame (Cefepime) führen zu keiner morphologischen Reorganisation. Die TEM-Aufnahmen zeigen eine Veränderung in der Struktur des Nukleoid (Tetracyclin, Chloramphenicol und Rifampicin) sowie die Bildung von granulären Strukturen in einem homogenen, schwach kontrastierten Zytoplasma (Polymyxin B, Peptid). Die Kreisdiagramme in den TEM-Aufnahmen zeigen eine quantitative Analyse der Solidität der Nukleoid (weiß). Die Messungen wurden am BioSAXS-Strahlrohr (P12, EMBL/DESY) an PETRA III in Hamburg durchgeführt. Für die TEM-Aufnahmen wurden die Proben mit Osmiumtetroxid, Uranlyacetat und Bleicitrat angefärbt. Der Skalierungsbalken hatte eine Länge von $1 \mu\text{m}$.

Ein gegenläufiger Effekt tritt nach einer Behandlung mit Rifampicin (ein Inhibitor der RNS-Synthese) auf. In den SAXS-Messungen wurde eine erhöhte Streuintensität detektiert, daher auch ein positiver Koeffizient A. In den TEM-Aufnahmen erscheint der Nukleoid ausgedehnter. Dies ist bekannt aus Fluoreszenzmikroskopieexperimenten, bei denen eine Expansion des Nukleoids im gesamten Zellbereich nachgewiesen wurde.¹⁷ Die hierdurch hervorgerufene feinere Verteilung der DNS-Fibrillen in der gesamten Zelle führten wahrscheinlich zur beobachteten Erhöhung der Streuintensität. Zusätzlich ist aus Rasterkraftmikroskopie-Aufnahmen bekannt, dass sich die Fasern (80 nm im Durchmesser) innerhalb des Nukleoids nach einer Behandlung mit Rifampicin in ihre Bestandteile (Fasern mit

10 nm und 30 nm Durchmesser) zerfallen.^{34,56} Dies ist konsistent mit der beobachteten Erhöhung der Streuintensität durch eine feinere Verteilung der DNS-Fibrillen.

Einige Wirkmechanismen führten zu keiner morphologischen Änderung: Die Inhibierung der DNS-Replikation durch Ciprofloxacin, das Ausschalten der Peptidoglycansynthese durch β -Lactame (Ampicillin, Cefepime, Piperacillin) sowie die Bildung von fehlerhaften Proteinen durch Aminoglykoside (Kanamycin, Gentamycin).^{35,41} In den TEM Aufnahmen sah man eine vom unbehandelten Bakterium nicht unterscheidbare Morphologie, abgesehen von der Verlängerung der äußeren Form der bakteriellen Zelle (Ciprofloxacin, Cefepime), der Bildung von kleinen kollabierten DNS-Fasern (Gentamycin) und einem kondensierten Nukleoid (Ampicillin). Da sich bei diesen Vorgängen die Granularität konstant blieb, konnte mit SAXS keine Änderung nachgewiesen werden. Eine Übersicht über die morphologischen Änderungen in SAXS und TEM zusammen mit den jeweiligen Wirkmechanismen ist in Tabelle 5 gezeigt.

4.6.4 Kinetik der Morphologieänderung

In den Messungen am BioSAXS-Strahlrohr wurden neben verschiedenen Behandlungen auch unterschiedliche Inkubationszeiten untersucht. Beispielhafte Verläufe der morphologischen Änderungen sind in Abbildung 54 gezeigt.

Hierbei zeigte sich eine Änderung in der Morphologie der unbehandelten Bakterienzelle im Wachstumszyklus (Abbildung 54a). Zu Beginn befanden sich die unbehandelten Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase. Während sich die Bakterienkultur hin zur stationären Phase entwickelte, stieg der Koeffizient B der zweiten Hauptkomponente. Dies deutet auf eine Verschiebung zu größeren internen Strukturen hin. Im zugehörigen TEM Bild änderte sich der Nukleoid von einzelnen Transkriptionsfoki¹⁷ hin zu einer kompakteren Struktur mit einer stärkeren Separierung von DNS und Zytoplasma.

Eine ähnliche Veränderung in der zweiten Hauptkomponente zeigte sich für die Antibiotika, die keine morphologischen Änderungen hervorriefen. Dies war der Fall für die β -Lactam-Antibiotika (Ampicillin, Cefepime und Piperacillin), Aminoglykoside (Kanamycin, Gentamycin) sowie für den Gyrase-Inhibitor Ciprofloxacin. Beispielhaft zeigt Abbildung 54b die Entwicklung von mit Ampicillin behandelten *E. coli*. Zusätzlich zeigt Abbildung 54b den Aufbau einer morphologischen Änderung bei Tetracyclin. Hier erfolgt ein kontinuierlicher Aufbau der morphologischen Änderung bis hin zu zwei Stunden Inkubationszeit, der sich im späteren Verlauf bis zu vier Stunden teilweise wieder umkehrt. Auch Rifampicin zeigt einen kontinuierlichen Aufbau der morphologischen Änderung. Die starken Änderungen bei Polymyxin B und dem kurzen kationischen Peptid haben einen unregelmäßigen Verlauf. Der vollständige Datensatz ist im Anhang in Abbildung 64 dargestellt.

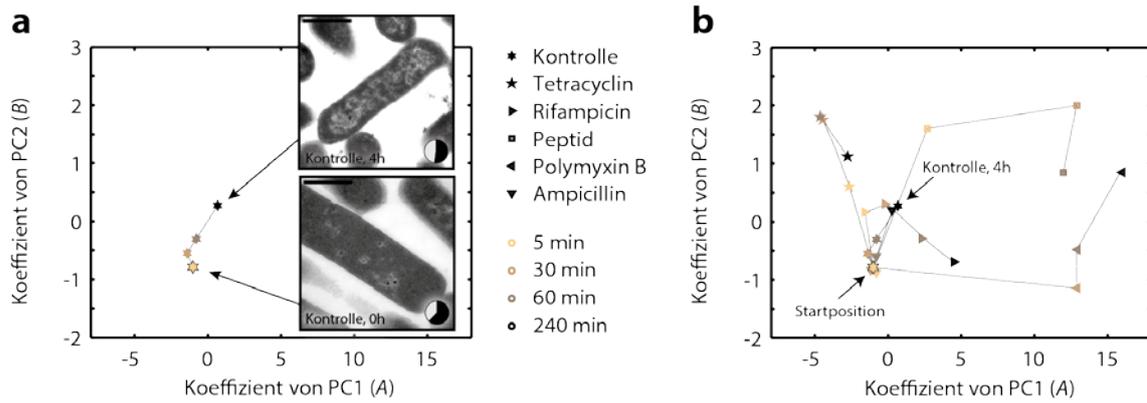


Abbildung 54: Die Änderung der ersten beiden Hauptkomponenten als Funktion der Inkubationszeit (farbkodiert). Die Messungen wurden am BioSAXS-Strahlrohr (P12, EMBL/DESY) bei PETRA III in Hamburg durchgeführt und mit einer PCA untersucht. Evolution der unbehandelten Kontrolle. Die Skalierungsbalken entsprechen 1 μm , der weiße Teil der Kreisdiagramme dem Soliditätsparameter des Nukleoids. Der Soliditätsparameter trifft eine Aussage darüber, wie fragmentiert der Nukleoid war. b) Die morphologische Änderung nach Zugabe eines Antibiotikums (Symbol) als Funktion der Zeit (farbkodiert). Man erkennt den Aufbau von morphologischen Änderungen nach einer Behandlung mit Tetracyclin, Rifampicin, Polymyxin B und dem Peptid. Der Verlauf einer Ampicillinbehandlung ist beispielhaft für Antibiotika, die keine morphologischen Änderungen hervorrufen.

4.6.5 Morphologieänderung und Überlebensrate

Die Änderung als Funktion der Zeit kann auch, wie in Abbildung 55 dargestellt mit der Überlebensrate der Bakterien aus den Abtötungskurven (siehe Abschnitt 4.1) korreliert werden. In dieser Repräsentation lassen sich bakteriostatische und bakterizide Antibiotikaeinflüsse von der unbehandelten Kontrolle unterscheiden. Bakterizide Wirkung wurde bei positiven Werten von A gefunden. Vertreter dieser Klassen sind Polymyxin B, das antimikrobielle Peptid und Rifampicin. Bakteriostatische Wirkung tritt bei negativen Werten von A auf. Nach einer Behandlung mit Tetracyclin blieb die Zahl der lebensfähigen Bakterien konstant. Im Fall der unbehandelten Bakterien stieg die Zellzahl stark an, während der Wert von A nahezu unverändert blieb. Hierbei trat nach einer Behandlung mit β -Lactamen, Aminoglykosiden oder Ciprofloxacin trat zwar eine Reduktion der Zellzahl auf, die Morphologie blieb aber unverändert.

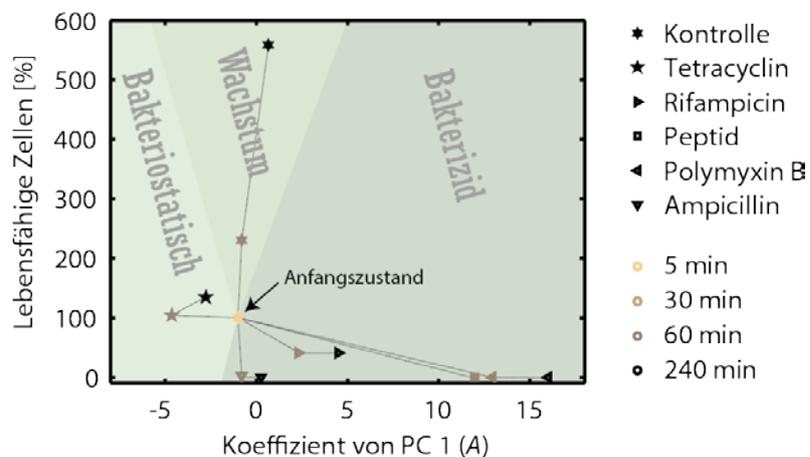


Abbildung 55: Korrelation von Viabilität der Bakterienzellen mit dem Koeffizient der Hauptkomponente. Der Wert von A kann einen Hinweis geben, ob es sich um ein bakteriostatisches (negatives A) oder ein bakterizides (positives A) Antibiotikum handelt. Die Viabilität wurde aus den Abtötungskurven mit einer initialen Bakteriendichte von 10^8 KBE/ml berechnet.

4.6.6 Fazit

Die instrumentellen Voraussetzungen für einen Einsatz von Kleinwinkelstreuung (SAXS) als Hochdurchsatzverfahren sind durch die Entwicklung der letzten Jahre gelegt worden.¹⁵⁹ In diesem Kontext wurden 81 KleinwinkelstreuKurven mit antibiotikainduzierten morphologischen Änderungen untersucht und mit einer Hauptkomponentenanalyse klassifiziert. Auf diese Weise war es möglich, annahmefreie Aussage über den eingesetzten Wirkmechanismus zu treffen. So konnten die Wirkmechanismen verschiedener Klassen von Antibiotika, Proteinsyntheseinhibitoren (Tetracyclin, Chloramphenicol), RNS-Synthese Inhibitoren (Rifampicin), membranzerstörenden Antibiotika (Polymyxin B) und dem kurzen kationischen Peptid mit unbekanntem Wirkmechanismus mithilfe der ersten Hauptkomponente unterschieden werden. Die zweite Hauptkomponente ermöglichte die Unterscheidung innerhalb dieser Klassen: so konnte Tetracyclin von Chloramphenicol und Polymyxin B vom kurzen, kationischen Peptid unterschieden werden. Die zweite Hauptkomponente erlaubte es zudem den Übergang unbehandelter *E. coli* von der exponentiellen Wachstumsphase in die stationäre Phase zu verfolgen. Antibiotika wie β -Lactame (Ampicillin, Cefepime, Piperacillin), Gyrase Inhibitoren (Ciprofloxacin) und Aminoglycoside (Gentamycin, Kanamycin), die keine morphologischen Änderungen hervorrufen waren nicht von der unbehandelten Kontrolle unterscheidbar. Durch Korrelation mit den TEM-Aufnahmen konnten die morphologischen Änderungen im Realraum sichtbar gemacht werden. Durch eine Korrelation mit der Viabilität der Bakterien konnte gezeigt werden, dass Vorzeichen und Wert der ersten Hauptkomponente nicht nur ein Indikator für die Form des Nukleoids sind, sondern anzeigen, ob eine bakterio-statische oder eine bakterizide Wirkung vorliegt. Diese Analyse und die Korrelationen mit Daten in Realraum zeigen, dass SAXS das Potential hat, als Hochdurchsatzverfahren zur Erkennung neuer Wirkmechanismen zum Einsatz zu kommen. In Kombination mit einer Hauptkomponentenanalyse kann eine schnelle Bewertung der Messergebnisse möglich und der Einsatz von SAXS als Echtzeitanalytik.

4.7 Röntgenkleinwinkelstreuung mit HORST

Röntgenkleinwinkelstreuung ermöglicht komplementär zu bildgebenden Verfahren die Erfassung interner Morphologien. Meist wird ein großes Probenensemble untersucht, das zu einer Informationsmittelung über viele Objekte, im vorliegenden Fall *E. coli*-Bakterien führt. Die meisten für Kleinwinkelstreuung gebauten Strahlrohre an Synchrotrons weltweit sowie die kommerziell erhältlichen Laborquellen arbeiten mit harter Röntgenstrahlung. Der offensichtliche Vorteil von Strahlungsenergien $E > 10$ keV ist die Möglichkeit mit Probenumgebungen zu arbeiten, die kein Vakuum erfordern. Zudem ist man durch die höhere Eindringtiefe der Photonen im Hinblick auf Probendicken im Vergleich zu weicher Röntgenstrahlung weniger eingeschränkt. Die meisten Experimente (u.a. auch das BioSAXS-Strahlrohr bei PETRA III, Hamburg) sind dafür ausgelegt, Proteine in wässriger Lösung zu untersuchen, also Strukturgrößen im Bereich von 1 nm bis 150 nm. Hierfür wird meist ein Detektorabstand von etwa 3 m verwandt. Für die Messung größerer Strukturen müssen an dedizierten USAXS-Strahlrohren (z.B. USAXS-Apparatur an der APS, Argonne, USA) ausgewichen werden, die mit einem Detektorabstand von 8 m bis 30 m die Erfassung kleinster Winkel ermöglichen.

Die in der Gruppe Rosenhahn entwickelte Messkammer (HORST) für weiche Röntgenstrahlung erlaubt die Untersuchung einer Probe mit zonenplattenbasierter Röntgenmikroskopie (TXM), linsenloser, Röntgenmikroskopie (Ptychographie) und Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS). Die kryogene Probenumgebung ermöglicht zusätzlich die Analyse von hydratisiert eingefrorenen Proben. Hierdurch kann auf invasive Probenpräparation wie Fixierung oder Trocknung verzichtet werden. Gleichzeitig reduzieren die tiefen Temperaturen durch Strahlenschäden erzeugte Artefakte. Derzeit wird SAXS selten in kryogener Probenumgebung eingesetzt, eine erste Studie zur Machbarkeit und auftretenden Problemen mit kristallinem Eis wurde kürzlich veröffentlicht.⁷⁴

Im Gegensatz zu SAXS mit hartem Röntgenlicht sind bei weicher Röntgenstrahlung¹²⁶ aufgrund der größeren Wellenlänge die benötigten Detektorabstände erheblich kürzer (< 1 m). Die Flexibilität der Detektorposition in der HORST-Kammer ermöglicht es bei einer Photonenenergie von 517 eV Strukturgrößen von 1220 nm bis zu 20 nm zu detektieren. Ein Vorteil weicher Röntgenstrahlung ist, dass die Fokussierungsoptiken eine schnelle Variation der Wellenlänge erlauben. Mithilfe der veränderbaren Wellenlänge können auch SAXS-Messungen an Absorptionskanten durchgeführt werden. Hierdurch wird der Kontrast eines Elements spezifisch verändert. In diesem Zusammenhang spricht man von anormaler Röntgenkleinwinkelstreuung (ASAXS).¹⁶⁰ Ein Beispiel ist die Untersuchung der Korngröße verschiedener Elemente in Katalysatoren.¹⁶¹

Dieses Kapitel beschreibt die ersten Röntgenkleinwinkelstreuexperimente in der HORST-Kammer als komplementäre Methode zu den vorhandenen bildgebenden Verfahren

TXM und Ptychographie. So kann im Idealfall dieselbe kryogene Probe mit einem bildgebenden Verfahren dargestellt und mit Kleinwinkelstreuung am Ensemble untersucht werden.

4.7.1 Detektierbare Strukturgrößen

Der Aufbau eines SAXS-Experiments relativ einfach: Die Probe wird mit einem Röntgenstrahl beleuchtet und die gestreuten Photonen werden mit einem Detektor erfasst. Abhängig vom Streuwinkel und Photonenenergie und dem sich daraus ableitenden Streuvektor q ergibt sich der erfasste Größenbereich im Realraum. In HORST gibt es hierfür einige Limitierungen (Abbildung 56): Die Verfahrenswege des Detektors sowie die Geometrie des Probenhalters. Der minimale Streuwinkel ist limitiert durch die Nähe der gestreuten Photonen zum direkten Strahl. Für kleinste Winkel sind eine präzise Positionierung des Strahlenfängers sowie ein maximaler Abstand von Probe und Detektor erforderlich. Der Zonenplattenhalter begrenzt den maximal erfassbaren Streuwinkel. Abgesehen davon sind grundsätzlich die Verfahrenswege des Detektors in horizontaler bzw. vertikaler Richtung limitierend. In Tabelle 7 sind die mit dem aktuellen Probenhalterdesign erreichbaren q -Werte sowie die zugehörigen Strukturgrößen im Realraum aufgeführt. Bei einer Photonenenergie von 517 eV sind Strukturgrößen von 20 nm bis 1220 nm erreichbar. Um diesen Größenbereich zu erfassen, müssen mehrere überlappende Detektorbilder in horizontaler oder vertikaler Richtung aufgenommen werden. Hierzu muss das Streubild einen kontinuierlichen Verlauf haben, damit im Vergleich der einzelnen Detektorbilder die präzise Positionierung des Detektors von Bild zu Bild verfolgt werden kann und damit auch die korrekte relative Photonenintensität zwischen den Aufnahmen bekannt ist. Daher sind in Tabelle 7 auch die in einem einzigen Detektorbild erreichbaren Strukturdimensionen aufgeführt.

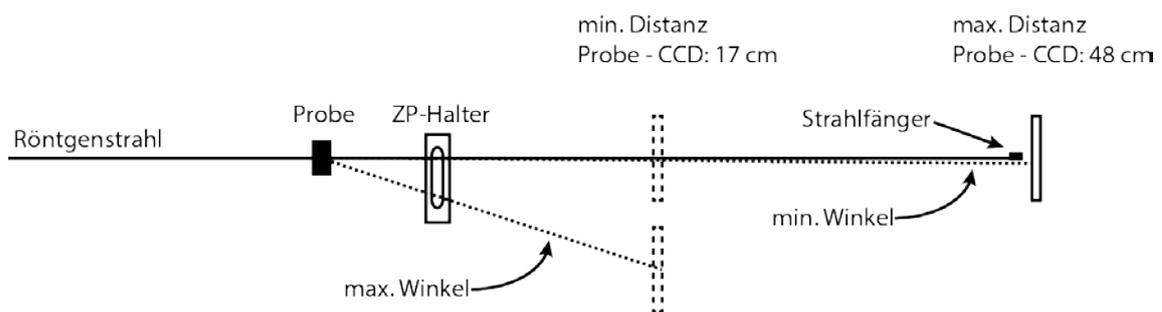


Abbildung 56: Skizze der Kleinwinkelstreuengeometrie in HORST mit den winkellimitierenden Faktoren. Der maximal erfasste Winkel wird begrenzt durch die Ausfräsung des Zonenplattenhalters. Eine präzise Positionierung des Strahlenfängers ist essentiell um die Streuung bei minimalen Winkeln zu erfassen.

Energie [eV]	min. q [nm^{-1}] (max. Dist., min. Winkel)	max. d [nm]	max. q [nm^{-1}] (min. Dist., max. Winkel)	min. d [nm]
280	0,0028	2245	0,16	38
517	0,0052	1220	0,30	20
1000	0,010	630	0,58	11
<i>Innerhalb eines Detektorbilds erfasste q-Werte:</i>				
280			0,11	55
517			0,21	30
1000			0,40	16

Tabelle 7: Für Kleinwinkelstreuung mit HORST zugänglicher q -Raum. Die Strukturgröße d kann über $2\pi/q$ berechnet werden. Der maximale Winkel (max. q) wurde durch die Ausfräsung des Zonenplattenhalters begrenzt. Limitierend für den minimalen Winkel ist die Nähe zum direkten Strahl. Hier wurden 140 Pixel als minimale Distanz zur Strahlmitte angenommen. Die Berechnung geht vom Probenhalterdesign, Stand Januar 2015 aus.

4.7.2 Streukurven mit hohem dynamischem Bereich

Für Kleinwinkelstreuung in HORST wurde eine CCD-Kamera (DODX436-BN, Andor Technology Ltd., Belfast, UK) als Detektor eingesetzt. Während im harten Röntgenbereich Einzelphotonenzähler¹⁶² mit einem dynamischen Bereich von einer Million verfügbar sind, ist der dynamische Bereich der verwendeten CCD-Kamera auf drei Größenordnungen an Intensität beschränkt. Der exponentielle Intensitätsabfall bei höheren Streuwinkeln hatte zur Folge, dass der dynamische Bereich CCD-Kamera zum limitierenden Faktor wurde. Um dies auszugleichen wurde der Detektor nach außen verschoben und Bilder mit längerer Belichtungszeit aufgenommen (Abbildung 57a). Im Zentralen Bild wurden durch eine genaue Positionierung des Strahlenfängers die kleinsten Streuwinkel bei minimaler Belichtungszeit von 0,1 s aufgenommen. Eine horizontale Verschiebung der CCD-Kamera um 2 cm ermöglichte eine Detektion größerer Streuwinkel mit einer längeren Belichtungszeit. Im Beispiel von Abbildung 57 waren es 60 s. Durch Kombination der Streubilder ergibt sich ein besseres Signal-zu-Rausch Verhältnis für die jeweiligen q -Bereiche. Die Intensität der Streubilder wurde radial gemittelt und mit entsprechender Skalierung zusammengefügt (Abbildung 57b). Die Verarbeitung der Streubilder wurde mit den „NIKA“-Makros für Igor Pro® (Wavemetrics, Portland, USA) durchgeführt.

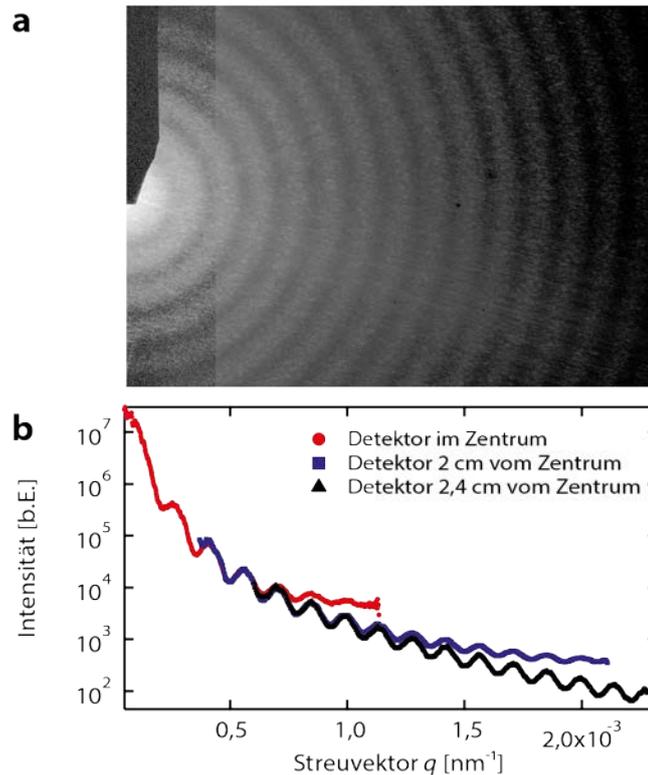


Abbildung 57: Kleinwinkelstreuung von kryogenen Polystyrol-Mikrosphären in HORST mit hohem dynamischem Bereich. a) Detektorbilder von SAXS an PS-Mikrosphären, mit zentraler Kameraposition sowie um 2 cm und 2,4 cm horizontal verschobenem Detektor. Die Belichtungszeiten waren 0,1 s (zentral), 60 s (2 cm vom Zentrum) und 300 s (2,4 cm vom Zentrum). Durch verlängerte Belichtungszeiten kann der dynamische Bereich der Kamera bei großen Winkeln besser genutzt werden. b) Nach radialem Mitteln erhält man die eindimensionale Streukurve $I(q)$. Die relative Intensität der Kurven wurde durch Multiplikation mit einem konstanten Faktor normiert. Man erkennt deutlich die Verbesserung des dynamischen Bereichs durch verlängerte Belichtungszeiten. Die Messungen wurden mit HORST bei 517 eV am Strahlrohr U49/2 PGM-1 bei BESSY II in Berlin durchgeführt.

4.7.3 Kalibrierung des Detektorabstands

Eine kritische Größe zur Berechnung des Streuwinkels und damit des q -Vektors ist die Distanz zwischen Probe und Detektor. In den meisten SAXS-Apparaturen, die sich auf die Strukturgrößen von Proteinen (1 nm – 100 nm) spezialisiert haben, wird dieser Abstand mit Silberbehenat [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOAg}$] (Kristallgitterabstand 6 nm) kalibriert.¹⁶³ Diese Methode ist für die mit HORST zugänglichen Strukturgrößen nicht geeignet, da der Detektor zum Erreichen dieser Strukturgröße um etwa 8 cm nach außen verfahren werden müsste. Da das Streumuster des Behenats den Detektor nicht kontinuierlich ausleuchtet, sondern diskrete Maxima bilden, ist die Fehlerwahrscheinlichkeit durch einen, nicht orthogonal zur Strahlachse verfahrenen Detektor hoch. Daher wurde der Abstand von Probe und Detektor mit monodispersen Polystyrol-Mikrosphären kalibriert, die laut Hersteller einen Durchmesser von $2,192 \pm 0,098 \mu\text{m}$ haben. Die präzise Übereinstimmung von gemessenem und simuliertem Streumuster ist in Abbildung 58 gezeigt. Die genaue Wiedergabe des Streumusters durch die Simulation bei

hohen q -Werten, zeugt von einer präzisen Positionierung des Detektors (Abbildung 58b). Der Abstand zwischen Probe und Detektor betrug in dieser Messkonfiguration 47,8 cm.

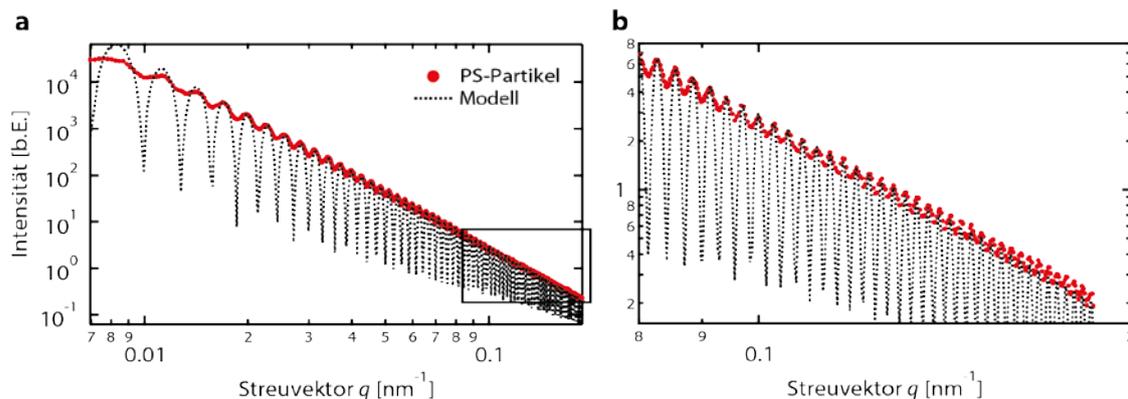


Abbildung 58: Kalibrierung des Abstands von Probe und Detektor mithilfe von kryogenen Polystyrol-Mikrosphären (Durchmesser: $2,2 \mu\text{m}$). a) Streubild von Polystyrol-Mikrosphären zusammen mit einem Modell glatter Kugeln. b) Vergrößerung des markierten Ausschnitts in a). Auch die höheren Ordnungen werden von der Modellierung präzise wiedergegeben. Die Messungen wurden mit HORST bei 517 eV am Strahlrohr U49/2 PGM-1 bei BESSY II in Berlin durchgeführt.

Als Validierung dieser Kalibrierung wurden zusätzlich kryogene Polystyrol-Mikrosphären mit einem Durchmesser von $0,457 \pm 0,011 \mu\text{m}$ vermessen. Die Modellierung der Streukurve mit glatten Kugeln ergibt einen Durchmesser von $0,462 \pm 0,004 \mu\text{m}$ und ist damit im Bereich der Standardabweichung der Herstellerangaben.

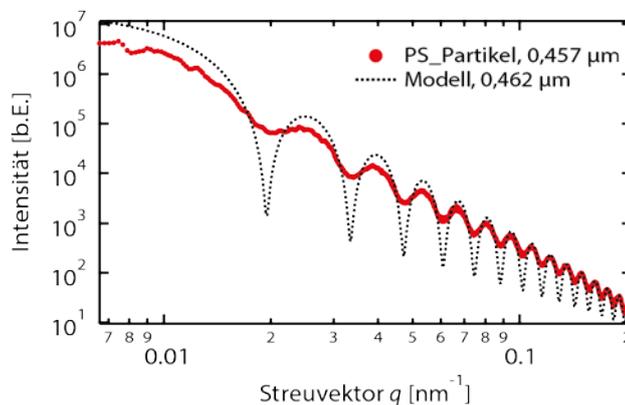


Abbildung 59: Kleinwinkelstreuung von kryogenen Polystyrol Mikrosphären mit einem Durchmesser von $0,457 \mu\text{m}$. Das gezeigte Modell glatter Kugeln hat einen Durchmesser von $0,462 \pm 0,004 \mu\text{m}$ und ist damit im Bereich der vom Hersteller angegebenen Standardabweichung. Die Messungen wurden mit HORST bei 517 eV am Strahlrohr U49/2 PGM-1 bei BESSY II in Berlin durchgeführt.

4.7.4 Vergleich mit USAXS

Beim Aufbau einer neuen Kleinwinkelstreuapparatur ist es grundsätzlich wichtig, die Kalibrierung durch Vergleichsmessungen an anderen Apparaturen zu verifizieren. Hierzu wurden die gleichen Polystyrol-Mikrosphären ($0,457 \pm 0,011 \mu\text{m}$) in kryogener Probenumgebung in HORST sowie in wässriger Suspension an der USAXS-Apparatur vermessen. An der USAXS Apparatur wurde das Streusignal bei hohen q -Werten durch die geringe Probendichte limitiert. Die Streukurven überschneiden sich im Bereich zwischen $0,0065 \text{ nm}^{-1}$ und $0,011 \text{ nm}^{-1}$ (Abbildung 60). In diesem Bereich gibt es zwar keine ausgeprägten Kurvenmerkmale wie lokale Minima, doch geht hier das wagerechte Guinier-Plateau in den wie eine Potenzfunktion abfallenden Teil der Streukurve über. Der Verlauf dieses Übergangs ist in beiden Messungen identisch und bei gleichen q -Werten lokalisiert. Beide Streumuster konnten daher mit demselben Modell glatter Kugeln mit einem Durchmesser von $0,462 \mu\text{m}$ beschrieben werden. Die Berechnung des Modells wurde mit den *IRENA*-Makros für Igor Pro durchgeführt. Auch wenn keine über einen weiten Bereich übereinstimmende Streukurve vorliegt, so dient diese Übereinstimmung im Bereich des Guinier-Plateaus als externe Verifizierung der in vorangegangenen Kapitel durchgeführten Kalibrierung des q -Bereichs für SAXS in der HORST-Apparatur.

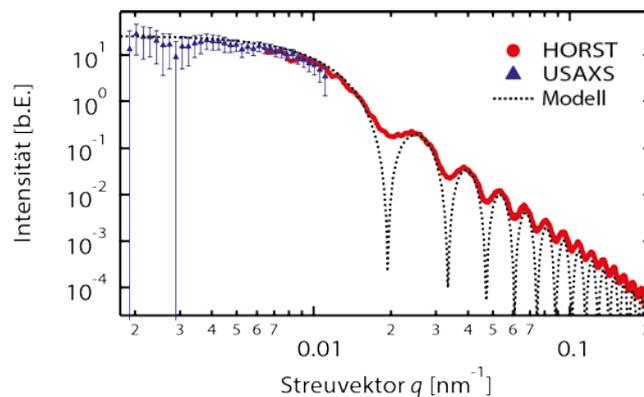


Abbildung 60: Streukurven von Polystyrol-Mikrosphären (Durchmesser $0,457 \mu\text{m}$), gemessen in kryogener Probenumgebung mit HORST bei 517 eV am Strahlrohr U49/2 PGM-1 bei BESSY II in Berlin und in wässriger Lösung an der USAXS-Apparatur bei 17 keV bei der Advanced Photon Source in Argonne, USA. Ein Modell glatter Kugeln mit einem Durchmesser von $0,462 \mu\text{m}$ beschreibt den Verlauf beider Streukurven gut. Im Übergangsbereich zwischen Guinier-Plateau und erstem lokalen Minimum stimmen beide Streukurven überein. Die Intensität der Messungen wurde im überschneidenden Abschnitt normiert. Der Fehler gibt die Abweichung beim radialen Mitteln der Detektorbilder an und ist im Fall der Messungen an HORST zu klein um auf dieser Skala sichtbar zu sein.

4.7.5 Strahlendosis

Da mit Röntgenkleinwinkelstreuung in HORST auch hydratisiertes biologisches Material untersucht wurde, musste die Strahlendosis abgeschätzt und bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden. Die in HORST verwendete kryogene Probenumgebung hilft, den Einfluss der Strahlenschäden zu verringern.⁶⁷ Mithilfe einer Diode wurde die Intensität des direkten Strahls als $2 \times 10^{11} \text{ ph s}^{-1}$ bei einem Fokus von $80 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ ($h \times v$) gemessen. Es wurde angenommen, dass der Photonenfluss gleichmäßig über den Fokus verteilt war. Der Größe des Fokus wurde durch die Weite des Austrittsspalts definiert, der im vorliegenden Experiment $100 \mu\text{m}$ betrug.

Die Dichte einer ganzen *E. coli* Bakterie wurde in Abschnitt 4.5.8 in Tabelle 5 als $1,1 \text{ g cm}^{-3}$ abgeschätzt und hat bei einer Photonenenergie von 517 eV eine Absorptionslänge von $2,4 \mu\text{m}$. Als gesamte Expositionsdauer wurden 300 s angenommen, dies beinhaltete mehrere Detektorbilder, mit bis zu 60 s Belichtungszeit. Details zur Rechnung sind im Abschnitt 3.4.5 erläutert. Die Abschwächung durch die umgebende Eismatrix wurde vernachlässigt. Dies bedeutet, dass sich die Strahlendosis auf ein Objekt an der stahlzugewandten der Probe bezieht und daher als maximale Strahlendosis einzuordnen ist.

Die berechnete Strahlendosis beträgt $3 \times 10^8 \text{ Gy}$. Nach Howells et al.⁶⁹ sind bei dieser Strahlendosis Strukturen bis zu einer Größe von 8 nm von Strahlenschäden betroffen. Da in diesem Experiment die äußere Form im Fokus stand (Durchmesser $\sim 800 \text{ nm}$), sind die Strahlenschäden hier nicht relevant müssen aber bei weiteren Kleinwinkelstreuexperimenten auf der Nanometerskala berücksichtigt werden.

4.7.6 Mit Antibiotika behandelte *E. coli* in kryogener Probenumgebung

Die Röntgenkleinwinkelstreuung mit HORST ermöglichte die Aufnahme von SAXS-Kurven in einem intermediären q -Bereich, der Strukturgrößen zwischen der äußeren Form (USAXS-Apparatur) und der inneren Bakterienzusammensetzung (BioSAXS-Strahlrohr) entspricht. Die Probenvorbereitung erfolgt im Unterschied zu den Messungen an anderen Apparaturen nicht in einer Suspension sondern als schockgefrorene, kryogene Probe. Ein Vergleich der erhaltenen SAXS-Kurven von unbehandelten *E. coli* mit HORST bei BESSY, an der USAXS-Apparatur und BioSAXS-Strahlrohr ist in Abbildung 61 gezeigt. Bemerkenswert ist die gute Struktur des Eises, da keine Störungen durch Eiskristalle beobachtet werden konnten. Allerdings zeigten sich Unterschiede zwischen den an den verschiedenen Apparaturen gemessenen Streukurven. So waren die größenbestimmenden lokalen Minima monodisperser Objekte zwar in beiden Streukurven zu sehen, sind aber im q -Raum gegeneinander verschoben was auf eine unterschiedliche Objektgröße hindeutet. Außerdem gab es bei Messungen kryogener Bakterien im weichen Röntgenbereich keine Anzeichen für eine interne Strukturierung der *E. coli*. Dies ist wahrscheinlich die Folge eines geringeren Streukontrasts zwischen den internen Komponenten im weichen Röntgenbereich. Ein Grund für den unterschiedlichen Verlauf der Streukurven könnte eine Folge der kryogenen Probenvorbereitung sein (Abbildung 62). Während es bei Bakterien in Suspensionen keine Vorzugsrichtung gibt, sind bei kryogener Probenpräparation die meisten Bakterien orthogonal zur Strahlachse in eine dünne Eismatrix eingebettet. Dies ist eine Folge der Probenvorbereitung, bei der ein Tropfen mit Bakteriensuspension auf die mit einem dünnen Kohlenstofffilm bedeckte Seite eines TEM-Netzchens gebracht wird. Im nächsten Schritt wird die überschüssige Flüssigkeit von der Rückseite durch Löcher ($2\ \mu\text{m}$)¹¹⁴ abgesaugt und die Probe in einem flüssigem Ethan/Propan-Gemisch⁷¹ eingefroren. Die nach dem Absaugen verbleibenden *E. coli* Zellen liegen zumeist parallel zur Ebene des TEM-Netzchens. Dies ist in den TXM-Aufnahmen kryogen präparierter Bakterien gut zu erkennen (Abbildung 62, Abschnitt 4.4.5). Die Folge dieser geordneten Probenstruktur wäre ein geänderter Beitrag zum Streusignal von Längsachse und Durchmesser der Bakterienzellen.

Ein weiterer Unterschied der Streubilder ist der unterschiedliche Intensitätsabfall in beiden Streukurven. Der Intensitätsabfall kann mit einer Potenzfunktion, $I(q) = q^{-p}$ modelliert werden, wobei der Exponent eine Aussage über die Oberflächen- bzw. Volumenstruktur des Partikels ermöglicht. In den Messungen an der USAXS-Apparatur war dieser unter Vernachlässigung der lokalen Minima $p = 4$, was auf eine glatte Oberfläche mit ausgefüllter Volumenstruktur hindeutet. Bei kryogenen Messungen mit HORST ist $2 < p < 3$. Dies deutet auf eine Volumenfraktal hin und ist möglicherweise ein Effekt des veränderten Streukontrasts im weichen Röntgenbereich. Das im vorangegangenen Kapitel verwendete Modell für die äußere Form der Bakterien geht von einer glatten Oberfläche mit entsprechendem Intensitätsabfall aus.

Daher wurde zur Modellierung der mit HORST gemessenen Streukurven auf eine indirekte Fourier-Transformation zurückgegriffen.

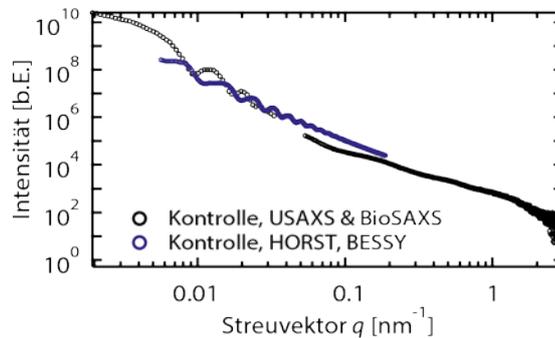


Abbildung 61: Vergleich von Streukurven mit Antibiotika behandelter *E. coli*, gemessen in kryogener Probenumgebung mit HORST bei 517 eV am Strahlrohr U49/2 PGM-1 bei BESSY II in Berlin, in wässriger Lösung an der USAXS-Apparatur bei 17 keV bei der Advanced Photon Source in Argonne, USA und am BioSAXS-Strahlrohr P12, bei 12,8 keV bei PETRA III in Hamburg. Die Streubilder von kryogenen Bakterien im weichen Röntgenbereich weichen von den Streukurven suspendierter Bakterien im harten Bereich ab.

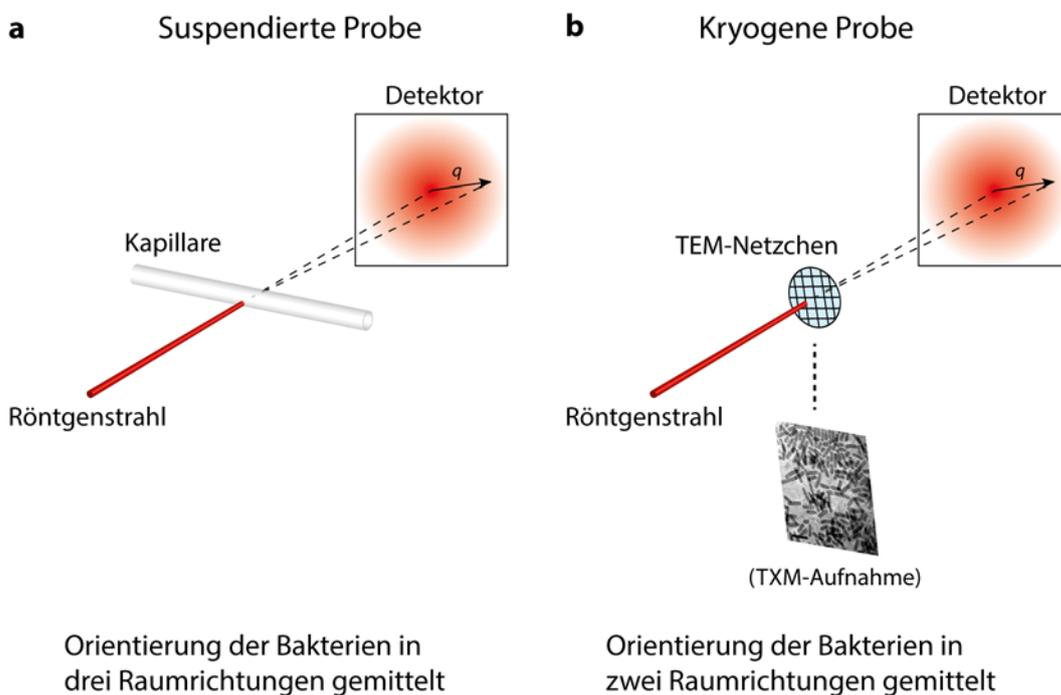


Abbildung 62: Schema der Probendarbringung von kryogenen und suspendierten Proben. a) Bakterien in Suspension waren in allen drei Raumrichtungen zufällig orientiert. (USAXS und BioSAXS) b) Bei kryogenen Proben wurde die überschüssige Flüssigkeit durch Löcher (2 μ m) in der Membran von der Rückseite her abgesaugt. Daher sind die auf dem TEM-Netzchen verbleibenden Bakterien meist orthogonal zur Strahlachse orientiert.

Die Streuintensität $I(q)$ eines Partikels ist über eine Fourier-Transformation mit der Korrelationsfunktion $P(r)$ der Elektronen des Partikels im Realraum verknüpft:⁹⁴

$$I(q) = 4\pi \int_0^{\infty} \frac{P(r) \sin(qr)}{qr} dr \quad (13)$$

Mit dem Streuvektor q und der Distanz r im Realraum (siehe Kapitel 2.3.3). Diese Korrelationsfunktion $P(r)$ des Partikels beschreibt die Wahrscheinlichkeit im Radius r um ein Elektron ein weiteres zu finden. Allerdings ist diese Fourier-Transformation bei experimentellen Daten nicht durchführbar, da die absolute Intensität der gestreuten Photonen nicht bekannt ist und die Daten nur in einem limitierten Intervall erhoben wurden.¹⁹ Die von Otto Glatter⁹⁵ vorgeschlagene indirekte Fourier-Transformation umgeht diese Probleme durch die Begrenzung von $P(r)$ in Intervall $[0, r_{max}]$ und einer Glättung der $P(r)$ -Funktion. Das Intervall wird hierbei abgeschätzt muss bei r_{max} gleichförmig gegen Null gehen.⁹⁹ Zu kleine Werte für r_{max} führen zu einem steilen Abfall mit einer teilweise negativen $P(r)$ -Funktion. Zu große Werte für r_{max} bewirken eine flachen $P(r)$ -Funktion nahe Null in der Umgebung von r_{max} . Die $P(r)$ -Funktion erlaubt es qualitative Aussagen über die geometrische Form des Partikels sowie dessen maximalen interpartikulären Abstands r_{max} zu treffen. Dieses Verfahren kommt bei der Aufklärung von Proteinstrukturen mit SAXS zum Einsatz. Hier wird danach die genaue Form des Proteins aus seiner $P(r)$ -Funktion modelliert.⁹⁶

In Abbildung 63 ist die SAXS-Kurven mit Antibiotika behandelter *E. coli* sowie deren Korrelationsfunktion gezeigt. Der maximale interpartikuläre Abstand d_{max} von 750 ± 25 nm bei unbehandelten *E. coli* und 700 ± 25 nm nach einer Behandlung mit Ciprofloxacin oder Tetracyclin zeigt, dass die Länge der Bakterien nicht erfasst wurden sondern nur ihr Durchmesser. Dies passt zur Theorie, denn um ein Objekt der Größe d_{max} verlässlich beschreiben zu können, muss $q_{min} < \pi/d_{max}$ erfasst werden.⁹⁴ Im vorliegenden Beispiel liegt der minimale q -Vektor bei einem Wert von $0,005 \text{ nm}^{-1}$ was einer Strukturgröße d_{max} von 630 nm entspricht. Daher ist in den vorliegenden Streukurven das Guinier-Plateau, welches bei $q < 2\pi/d_{max}$ beginnt (siehe Kapitel 2.3.3) auch nicht erkennbar. Ein weiterer Hinweis auf die Erfassung des Durchmessers ist die Form der Korrelationsfunktion. Die vorliegende Gauß-förmige Korrelationsfunktion wäre charakteristisch für kugelförmige Partikel.

Wenn man die mit der USAXS-Apparatur bestimmten Bakteriendurchmesser mit den Bakteriendurchmessern der $P(r)$ -Funktion vergleicht, sind letztere im Mittel 100 nm geringer (Tabelle 8). Darauf deuten in den Streukurven auch die gegeneinander verschobenen lokalen Minima der Streukurven (Abbildung 61) hin. Um einen Vergleich mit dem Realraum herzustellen wurden die Bakteriendurchmesser mit bildgebenden Verfahren, TEM und TXM verglichen. Hierbei muss beachtet werden, dass die Proben für die Messungen an der USAXS-Apparatur und TEM fixiert werden mussten. Die TXM-Aufnahmen sowie die SAXS-Messungen mit HORST wurden hingegen an kryogenen Proben durchgeführt. Allerdings deutet die Ähnlichkeit der Messwerte bei USAXS, TEM und TXM darauf hin, dass der Einfluss der Fixierung nicht der Grund

für die vorgefundenen Unterschiede war. Grundsätzlich stützen also die Ergebnisse der bildgebenden Verfahren TEM und TXM die an den SAXS-Daten durchgeführte Modellierung. Insgesamt sind die Angaben des mittleren Durchmessers aller Messungen stark fehlerbehaftet, was die Realität eines polydispersen Bakterienensembles wiedergibt.

So wurde keine Information zur Form des Partikels in die Modellierung einbezogen. Da die Länge einer Bakterie außerhalb des erfassten q -Bereiches lag, beschreibt das Modell ein nahezu kugelförmiges Objekt. Der wichtigste Faktor ist aber, dass die *E. coli*-Bakterien bei kryogener Probenvorbereitung nicht isotrop angeordnet sind. Dies bedeutet, dass sie statt in allen drei nur über zwei Raumrichtungen gemittelt vorliegen. Dieser Faktor spielte bei den sphärischen Partikeln, die zur Kalibration verwendet wurden und korrekt modelliert werden konnten, keine Rolle. Bei zylinderförmigen *E. coli* verzerrt eine unvollständige Mittelung das Streubild. Generell bietet die Ausrichtung von der Bakterien ein erhebliches Potential. Ähnlich wie bei Ansätzen an freien Elektronenlasern¹⁶⁴ kann eine präferenzielle Ausrichtung von Objekten in die Auswertung mit einfließen und so die Güte der Analyse verbessern. Aufgrund des hier nur eingeschränkt verfügbaren q -Bereichs konnte daraus leider noch kein Nutzen gezogen werden. Für die Zukunft bietet die präferenzielle Ausrichtung aber erhebliches Potential.

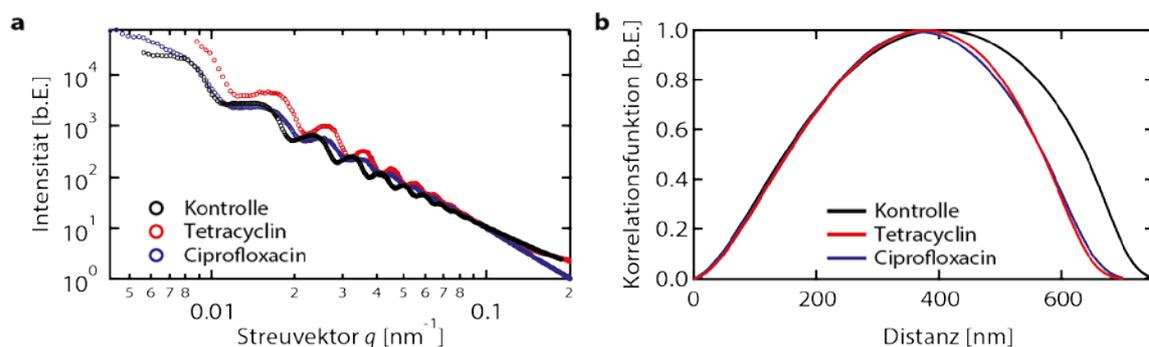


Abbildung 63: Analyse der Kleinwinkelstreuukurven mit Antibiotika behandelter *E. coli* mit einer indirekten Fouriertransformation. a) SAXS-Kurven mit Antibiotika behandelter *E. coli*. b) Die Korrelationsfunktion der SAXS-Kurven beschreibt die Wahrscheinlichkeit, in einer Distanz d um ein Elektron ein weiteres zu finden. Aus ihnen konnte der Durchmesser der Bakterie (d_{\max}) abgelesen werden. Die Form der $P(r)$ -Funktion deutet auf kugelförmige Partikel hin. Die Messungen wurden mit HORST bei 517 eV am Strahlrohr U49/2 PGM-1 bei BESSY II in Berlin durchgeführt.

Probe	TEM [μm]	TXM [μm]	USAXS [μm]	SAXS bei BESSY, d_{max} [μm]
Kontrolle	$0,89 \pm 0,07$	$0,89 \pm 0,08$	$0,85 \pm 0,08$	$0,75 \pm 0,03$
Tetracyclin	$1,10 \pm 0,13$	$1,02 \pm 0,14$	$0,90 \pm 0,07$	$0,70 \pm 0,03$
Ciprofloxacin	$0,71 \pm 0,13$	$0,86 \pm 0,09$	$0,86 \pm 0,07$	$0,70 \pm 0,03$

Tabelle 8: Bakteriendurchmesser in TEM, TXM und SAXS. Die Bakteriendurchmesser in TEM und TXM wurden an je 50 Bakterien bestimmt. Der Fehler gibt die Standardabweichung der Messungen des Mittelwerts an. Ausnahme war die TXM-Probe von Tetracyclin, hier wurden 10 Bakterien vermessen. In den USAXS-Messungen ist der Durchmesser des zylindrischen Modells sowie der Fehler des Fits angegeben. Bei der indirekten Fouriertransformation sind die maximalen interpartikulären Abstände der Korrelationsfunktion sowie der Fehler in der Bestimmung dieses Werts abgeschätzt.

4.7.7 Fazit

Die HORST-Apparatur bietet mit ihrer flexiblen Geometrie die Möglichkeit zonenplattenbasierte Röntgenmikroskopie (TXM) und linsenlose Röntgenmikroskopie (Ptychographie) in einer kryogenen Probenumgebung zu betreiben. Zusätzlich ist es möglich, Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) als komplementäre Methode an der gleichen Probe, ebenfalls in kryogener Probenumgebung, durchzuführen. Hierbei ist bei einer Energie von 517 eV ist die Untersuchung von Strukturgrößen im Bereich von von 20 nm bis 1220 nm möglich. Die kryogene Probenumgebung ermöglicht die Untersuchung von Proben in ihrem nativen Zustand ohne Fixierung oder Färbung, eingebettet in eine amorphe Eismatrix. Die Abstandskalibrierung erfolgte mit kryogenen, monodispersen Polystyrol-Mikrosphären (2,2 μm). Eine Testmessung von kryogenen Polystyrol-Mikrosphären (0,46 μm) validierte die Abstandskalibration. Als zusätzliche, externe Verifizierung diente eine Kontrollmessung suspendierter Polystyrol-Mikrosphären (0,46 μm) an der USAXS-Apparatur.

Die ersten Messungen an kryogenen, mit Antibiotika behandelten *E. coli*-Bakterien zeigten die Anwendbarkeit auf biologische Objekte mit schwächerem internen Kontrast, deckten aber gleichzeitig eine Schwäche der Probenvorbereitung auf. Anders als bei Messungen in Suspension, in der die stäbchenförmigen Bakterien in allen Raumrichtungen orientiert waren, liegen bei kryogenen Proben alle Bakterien in einer Ebene orthogonal zu Strahlrichtung. Dies war in den TXM-Aufnahmen gut zu erkennen und ist wahrscheinlich eine Folge des Einfriervorgangs. Hier wurde die überschüssige Probenflüssigkeit durch Löcher an der Rückseite des TEM-Netzchens abgesaugt. Übrig blieben die quer zur Absaugrichtung orientieren *E. coli*-Bakterien, die in den Messungen orthogonal zur Strahlrichtung stehen. Generell bietet eine solche orientierte Einbettung erhebliches Potential für die Modellierung, da die Orientierung der Zellen bekannt ist. Aufgrund des eingeschränkten q -Bereiches war die Erstellung eines vollständigen Modells wie in Kapitel 4.5.8 bislang noch nicht möglich. Positiv lässt sich zudem feststellen, dass keine Streuung von Eiskristallen die Messungen störten. Die aus den ersten kryogenen SAXS-Messungen mithilfe einer indirekter Fourier-Transformation bestimmten Bakteriendurchmesser waren systematisch kleiner verglichen mit den Messungen der USAXS-Apparatur und den bildgebenden Verfahren TEM und TXM. Diese systematische Abweichung konnte auf die anisotrope Anordnung der Bakterien in der kryogenen Probenvorbereitung zurückgeführt werden.

Die hier diskutierten Ergebnisse sind die erste Anwendungen Kleinwinkelstreuung in kryogener Probenumgebung im weichen Röntgenbereich. In der HORST-Apparatur können mit den bildgebenden Verfahren Ptychographie und TXM sowie die gleichzeitige Erfassung der Streuinformation des gesamten Ensembles mit Kleinwinkelstreuung umfassende Informationen zu kryogenen biologischen Proben gewonnen werden. Außerdem eröffnet sich die Möglichkeit, mit anomaler Kleinwinkelstreuung materialwissenschaftliche Fragestellungen

zu untersuchen. Hier wird mit einer Energie in direkter Umgebung einer Absorptionskante der Streukontrast eines Elements gezielt variiert.

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Multiresistente Bakterienstämme bedrohen die Funktion unseres modernen Gesundheitswesens. Um dieser Bedrohung langfristig Herr zu werden, fehlt es an antibiotischen Substanzen mit neuen Wirkmechanismen. Von Jahr zu Jahr werden weniger Antibiotika zugelassen, da die Entdeckung und Entwicklung neuer Substanzen immer komplexer wird. Moderne Antibiotikaforschung verwendet Hochdurchsatzverfahren, um viele potentielle Kandidaten gleichzeitig zu synthetisieren und sie auf ihre antibiotische Wirkung zu testen. Im Rahmen dieses Prozesses stellt sich bei einer aktiven Substanz sofort die Frage, ob es sich um einen neuen Wirkmechanismus handelt oder ein bekanntes Motiv zugrunde liegt. Die aktuelle Methode der Wahl ist eine teure (> 1000 \$ pro Substanz) und zeitaufwändige (ca. zwei Wochen pro Substanz) Genexpressionsanalyse.

Im Zuge jeder antibiotischen Behandlung werden essentielle biochemische Abläufe in einer bakteriellen Zelle gestört und führen vielfach zu Veränderungen der Morphologie. Sie werden üblicherweise mit bildgebenden Verfahren wie etwa Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Solche Verfahren erfordern meist eine aufwändige Probenpräparation und den Eingriff des Experimentators bei Aufnahme und Interpretation der Bilder. Die Notwendigkeit eine ausreichende Zahl an Bakterien zu untersuchen um eine statistisch fundierte Aussage zu ermöglichen verhindert zudem den Einsatz als Hochdurchsatzmethode. Bei Röntgenkleinwinkelstreuung tragen viele Bakterien - im vorliegenden Fall etwa eine Million - zum Streusignal bei. Zudem sind die Apparaturen für Kleinwinkelstreuung an Synchrotronstrahlungsquellen für Hochdurchsatzverfahren ausgelegt und benötigen aktuell für eine Messung Sekunden und für den Probenwechsel unter einer Minute. Im hier vorliegenden Pilotexperiment konnte gezeigt werden, dass man durch antibiotische Behandlung verursachte Veränderungen der Zellmorphologie mit Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) nachweisen und quantifizieren kann.

Konkret wurden *Escherichia coli* mit verschiedenen etablierten Antibiotika sowie einem kurzen kationischen Peptid (RLKRWWKFL) behandelt und nach einem Fixierungsschritt mit SAXS untersucht. Hierbei führte eine Behandlung mit Proteinsyntheseinhibitoren (Tetracyclin, Chloramphenicol), RNS-Syntheseinhibitoren (Rifampicin), membranzerstörenden Substanzen (Polymyxin B) und dem kationischen Peptid zu einer mit SAXS unterscheidbaren morphologischen Veränderung. Diese wurde mithilfe einer annahmefreien Hauptkomponentenanalyse untersucht. Während die erste Hauptkomponente verschiedene Wirkstoffklassen unterschied, ließen sich mithilfe der zweiten Hauptkomponente einzelne Antibiotika innerhalb der Klassen differenzieren. Eine Inhibierung der Zellwandsynthese durch mit Penicillin verwandten β -Lactamen (Ampicillin, Cefepime, Piperacillin) führte ebenso wie eine Inhibierung der DNS-Synthese (Ciprofloxacin) und der Bildung von fehltranslatierten Proteinen durch Aminoglycoside (Gentamycin, Kanamycin) nur zu

einer geringfügigen morphologischen Änderung. Zusätzlich zu diesen Folgen der Antibiotika ließen sich auch morphologische Unterschiede im Verlauf des Wachstumszyklus unbehandelter *E. coli* feststellen.

Während die Hauptkomponentenanalyse eine schnelle Klassifizierung eines Wirkmechanismus erlaubte, ließen sich aus den zugrundeliegenden Kleinwinkelstreu Kurven weitere Information extrahieren. Hierzu wurde zusätzlich die Streuinformation der äußeren Form mit Ultrakleinwinkelstreuung (USAXS) vermessen. Die Kombination von USAXS und SAXS ermöglichte es, ein Modell für die äußere Form und die inneren Bestandteile einer Bakterienzelle zu entwickeln. In diesem Modell wurde die äußere Form als Zylinder dargestellt und die inneren Komponenten als glatte Kugeln approximiert. Dieses Vorgehen ermöglichte es unter Abschätzung der Streukontraste den mittleren Radius der Zellkomponenten, ihre Anzahl und ihren Anteil am Zellvolumen zu berechnen. Das Streusignal des Zellinneren konnte mithilfe von drei Komponenten dargestellt werden, die mit ihren Durchmessern von 3,5 nm, 9 nm und 26 nm zu den wichtigsten Zellkomponenten Proteinen¹⁵¹ (ca. 3 nm), mit histonähnlichen Proteinen umlagerte DNS-Fibrillen^{34,56} (10 nm) und Ribosomen¹⁵⁰ (21 nm) passten. Im Vergleich mit Literaturdaten¹²⁴ zeigte sich, das mit SAXS bestimmte Volumen der Proteine um einen Faktor 100 zu hoch eingeschätzt wurde. Das von der DNS eingenommene Volumen lag mit 17 % des Zellvolumens nahe an Literaturangaben zum Volumen des Nukleoids¹⁵⁴ von 20 %. Ebenso lag die Zahl der Ribosomen mit ca. 10000 pro Zelle nahe am Literaturwert¹²⁴ von 18600 pro Zelle.

Die antibiotikainduzierten Änderungen der Zellmorphologie bewirkten auch eine Veränderung der Zellzusammensetzung. So führte beispielsweise eine Behandlung mit den Proteinsyntheseinhibitoren Tetracyclin und Chloramphenicol zu einer in der Literatur mit Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie beschriebenen Kondensation der DNS im Zentrum der Bakterienzelle. Dieser Effekt zeigte sich in den SAXS-Messungen an einer Reduktion des mittleren Durchmessers der DNS um 30 % und einer Halbierung des Volumenanteils. Dies deutet auf eine Aggregation der DNS-Fibrillen hin und konnte mit Transmissionselektronenmikroskopie nachgewiesen werden.

Infolge einer Behandlung mit dem kurzen kationischen Peptid zeigten die TEM-Aufnahmen stark gefärbte, granulare Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 75 nm an den Zellwänden und den Zellpolen. Mithilfe von zonenplattenbasierter Röntgenmikroskopie in der Streukammer HORST ließ sich nachweisen, dass es sich um eine Erhöhung der Materialdichte handelte. Die Streuung dieser granularen Strukturen dominierte das SAXS-Signal, so dass kein individuelles Signal von Ribosomen und DNS feststellbar war.

Hier wird deutlich, dass SAXS im Zusammenspiel mit komplementären bildgebenden Verfahren ein mächtiges Instrument der Strukturanalyse sein kann. Die Röntgenstreukammer HORST bietet die Möglichkeit, kryogene Proben im weichen Röntgenbereich mit SAXS, TXM und linsenloser

Mikroskopie (Ptychographie) zu untersuchen. Neben der Etablierung von SAXS als Untersuchungsmethode in HORST wurde auch die Machbarkeit von SAXS an kryogenen biologischen Proben (*E. coli*) mit weichem Röntgenlicht demonstriert.

Diese Arbeit eröffnet ein neues Anwendungsfeld für Röntgenkleinwinkelstreuung als Methode zur raschen Klassifizierung antibiotischer Wirkmechanismen. In Kombination mit einer Hauptkomponentenanalyse sollte eine Bewertung der Messergebnisse in Echtzeit möglich sein. Allerdings ist die Anwendung von SAXS keinesfalls auf die morphologischen Folgen einer antibiotischen Behandlung in *E. coli* limitiert. So kann prinzipiell die innere Struktur eines komplexen biologischen Systems untersucht werden und Veränderungen darin auf einer integralen Skala charakterisiert werden. Studien, die sicherlich auf diese Pilotexperimente folgen werden sind *in vivo* Untersuchungen von *E. coli*, sowie die konkrete Anwendung auf ein Set vielversprechender Antibiotikakandidaten mit unbekanntem Mechanismus. Die aktuell stattfindende rasante Weiterentwicklung von Laborquellen für Röntgenstrahlung wird SAXS in Zukunft unabhängiger von etablierten Synchrotronquellen machen. Die langfristige Vision ist, dass SAXS als Hochdurchsatzverfahren in die bestehende Struktur der Antibiotikaforschung eingebunden wird und hilft, in einem frühen Forschungsstadium Hinweise auf den observierten Wirkmechanismus zu geben.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. *British Journal of Experimental Pathology* 1929; **10**: 226–236.
- 2 Salyers AA, Whitt DD. *Revenge of the Microbes: How Bacterial Resistance is Undermining the Antibiotic Miracle*. ASM Press: Washington, 2005.
- 3 Hancock REW. The end of an era? *Nature Reviews Drug Discovery* 2006; **6**: 28–28.
- 4 Green KD, Garneau-Tsodikova S. Resistance in tuberculosis: what do we know and where can we go? *Frontiers in Microbiology* 2013; **4**: 208.
- 5 Stehr M, Elamin AA, Singh M. Filling the pipeline - new drugs for an old disease. *Current topics in medicinal chemistry* 2014; **14**: 110–29.
- 6 Cooper M a, Shlaes D. Fix the antibiotics pipeline. *Nature* 2011; **472**: 32.
- 7 Lewis K. Antibiotics: Recover the lost art of drug discovery. *Nature* 2012; **485**: 439–440.
- 8 Hughes JP, Rees SS, Kalindjian SB, Philpott KL. Principles of early drug discovery. *British Journal of Pharmacology* 2011; **162**: 1239–1249.
- 9 Payne DJ, Gwynn MN, Holmes DJ, Pompliano DL. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nature reviews Drug discovery* 2007; **6**: 29–40.
- 10 Gardner TS, di Bernardo D, Lorenz D, Collins JJ. Inferring genetic networks and identifying compound mode of action via expression profiling. *Science* 2003; **301**: 102–105.
- 11 Orelle C, Carlson S, Kaushal B, Almutairi MM, Liu H, Ochabowicz A *et al*. Tools for characterizing bacterial protein synthesis inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2013; **57**: 5994–6004.
- 12 Peach KC, Bray WM, Winslow D, Linington PF, Linington RG. Mechanism of action-based classification of antibiotics using high-content bacterial image analysis. *Molecular BioSystems* 2013; **9**: 1837–48.
- 13 Wang H, Claveau D, Vaillancourt JP, Roemer T, Meredith TC. High-frequency transposition for determining antibacterial mode of action. *Nature Chemical Biology* 2011; **7**: 720–9.
- 14 Fernie AR, Trethewey RN, Krotzky AJ, Willmitzer L. Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nature reviews Molecular Cell Biology* 2004; **5**: 763–769.
- 15 Matias VRF, Al-Amoudi A, Dubochet J, Beveridge TJ. Cryo-Transmission Electron Microscopy of Frozen-Hydrated Sections of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Bacteriology* 2003; **185**: 6112–6118.

- 16 Bakshi S, Siryaporn A, Goulian M, Weisshaar JC. Superresolution imaging of ribosomes and RNA polymerase in live *Escherichia coli* cells. *Molecular Microbiology* 2012; **85**: 21–38.
- 17 Jin DJ, Cagliero C, Zhou YN. Role of RNA polymerase and transcription in the organization of the bacterial nucleoid. *Chemical Reviews* 2013; **113**: 8662–82.
- 18 Hayat MA. *Fixation for Electron Microscopy*. Elsevier Science: New York, 2012.
- 19 Blanchet CE, Svergun DI. Small-angle X-ray Scattering on Biological Macromolecules and Nanocomposites in Solution. *Annual review of Physical Chemistry* 2013; **64**: 37–54.
- 20 Wright KE, Hjerrild K a, Bartlett J, Douglas AD, Jin J, Brown RE *et al.* Structure of malaria invasion protein RH5 with erythrocyte basigin and blocking antibodies. *Nature* 2014; **515**: 427–429.
- 21 Fang X, Wang J, O’Carroll IP, Mitchell M, Zuo X, Wang Y *et al.* An unusual topological structure of the HIV-1 Rev response element. *Cell* 2013; **155**: 594–605.
- 22 Dumée L, Sears K, Mudie S, Kirby N, Skourtis C, McDonnell J *et al.* Characterization of carbon nanotube webs and yarns with small angle X-ray scattering: Revealing the yarn twist and inter-nanotube interactions and alignment. *Carbon* 2013; **63**: 562–566.
- 23 Granke M, Gourrier A, Rupin F, Raum K, Peyrin F, Burghammer M *et al.* Microfibril orientation dominates the microelastic properties of human bone tissue at the lamellar length scale. *PloS one* 2013; **8**: e58043.
- 24 Gorniak T, Haraszti T, Garamus VM, Buck AR, Senkbeil T, Priebe M *et al.* Nano-scale morphology of melanosomes revealed by small-angle X-ray scattering. *PloS one* 2014; **9**: e90884.
- 25 Fernandez M, Keyrilainen J. Human breast tissue characterisation with small-angle X-ray scattering. *Spectroscopy* 2004; **18**: 167–176.
- 26 Conceição a. LC, Antoniassi M, Geraldelli W, Poletti ME. Mapping transitions between healthy and pathological lesions in human breast tissues by diffraction enhanced imaging computed tomography (DEI-CT) and small angle x-ray scattering (SAXS). *Radiation Physics and Chemistry* 2014; **95**: 313–316.
- 27 Round AR, Wilkinson SJ, Hall CJ, Rogers KD, Glatter O, Wess T *et al.* A preliminary study of breast cancer diagnosis using laboratory based small angle x-ray scattering. *Physics in medicine and biology* 2005; **50**: 4159–68.
- 28 Willey TM, Hoffman DM, van Buuren T, Lauderbach L, Gee RH, Maiti A *et al.* The Microstructure of TATB-Based Explosive Formulations During Temperature Cycling Using Ultra-Small-Angle X-Ray Scattering. *Propellants, Explosives, Pyrotechnics* 2009; **34**: 406–414.

- 29 Hura GL, Menon AL, Hammel M, Rambo RP, Poole FL, Tsutakawa SE *et al.* Robust, high-throughput solution structural analyses by small angle X-ray scattering (SAXS). *Nature Methods* 2009; **6**: 606–12.
- 30 Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology* 2010; **8**: 423–35.
- 31 Madigan MT, Brock TD, Martinko JM, Clark DP, Stahl DA. *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson: San Francisco, 2013.
- 32 Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A *et al.* Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. *Cell* 2001; **104**: 901–12.
- 33 Weng X, Xiao J. Spatial organization of transcription in bacterial cells. *Trends in Genetics* 2014; **30**: 287–297.
- 34 Kim J, Yoshimura SH, Hizume K, Ohniwa RL, Ishihama A, Takeyasu K. Fundamental structural units of the Escherichia coli nucleoid revealed by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Research* 2004; **32**: 1982–92.
- 35 Wilson DN. The A-Z of bacterial translation inhibitors. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 2009; **44**: 393–433.
- 36 M. M. Creative Commons Lizenz. <http://de.wikipedia.org/wiki/Ribosom>.
- 37 Cabrera JE, Cagliero C, Quan S, Squires CL, Jin DJ. Active transcription of rRNA operons condenses the nucleoid in Escherichia coli: examining the effect of transcription on nucleoid structure in the absence of transertion. *Journal of Bacteriology* 2009; **191**: 4180–5.
- 38 Chai Q, Singh B, Peisker K, Metzendorf N, Ge X, Dasgupta S *et al.* Organization of ribosomes and nucleoids in Escherichia coli cells during growth and in quiescence. *The Journal of Biological Chemistry* 2014; **289**: 11342–52.
- 39 Brodersen DE, Clemons WM, Carter AP, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B, on the 30S ribosomal subunit. *Cell* 2000; **103**: 1143–1154.
- 40 Kotra L, Haddad J, Mobashery S. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 2000; **44**: 3249–3256.
- 41 Tsai A, Uemura S, Johansson M, Puglisi EV, Marshall RA, Aitken CE *et al.* The impact of aminoglycosides on the dynamics of translation elongation. *Cell Reports* 2013; **3**: 497–508.
- 42 Greenwood D, Whitley R. Modes of action. In: O’Grady F, Lambert HP, Finch RG, Greenwood D (eds). *Antibiotics and Chemotherapy, 9th ed.* Churchill Livingstone: New York, 2002.

- 43 Hilpert K, Winkler DFH, Hancock REW. Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion. *Nature Protocols* 2007; **2**: 1333–49.
- 44 Mikut R, Hilpert K. Interpretable Features for the Activity Prediction of Short Antimicrobial Peptides Using Fuzzy Logic. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 2009; **15**: 129–137.
- 45 Hilpert K, Mikut R, Ruden S. Antimicrobial peptides for treatment of infectious diseases. US 2014/0235531 A1. 2014.
- 46 Rocky Mountain Laboratories, NIAID, NIH - NIAID, Creative Commons. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:EscherichiaColi_NIAID.jpg#/media/File:EscherichiaColi_NIAID.jpg.
- 47 Pennisi E. Laboratory workhorse decoded. *Science* 1997; **277**: 1432–34.
- 48 Neidhardt F. What and Where: Construction Plans for Cells and Organisms. In: *Physical Biology of the Cell*. Garland Science: New York, 2008, pp 29–74.
- 49 Fischer H, Polikarpov I, Craievich AF. Average protein density is a molecular-weight-dependent function. *Protein Science* 2004; **13**: 2825–2828.
- 50 McGuffee SR, Elcock AH. Diffusion, Crowding and Protein Stability in a Dynamic Molecular Model of the Bacterial Cytoplasm. *PLoS Computational Biology* 2010; **6**: e1000694.
- 51 Zimmerman SB, Trach SO. Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of Escherichia coli. *Journal of Molecular Biology* 1991; **222**: 599–620.
- 52 Eltsov M, Zuber B. Transmission electron microscopy of the bacterial nucleoid. *Journal of Structural* 2006; **156**: 246–54.
- 53 Thanbichler M, Wang SC, Shapiro L. The bacterial nucleoid: a highly organized and dynamic structure. *Journal of Cellular Biochemistry* 2005; **96**: 506–21.
- 54 Kellenberger E, Ryter A, Sechaud J. Electron microscope study of DNA-containing plasmids. II. Vegetative and mature phage DNA as compared with normal bacterial nucleoids in different physiological states. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 1958; **4**: 671–678.
- 55 Woldringh, C., Nanninga N. *Molecular Cytology of Escherichia coli*. Academic Press: London, 1985.
- 56 Ohniwa RL, Morikawa K, Takeshita SL, Kim J, Ohta T, Wada C *et al.* Transcription-coupled nucleoid architecture in bacteria. *Genes to Cells* 2007; **12**: 1141–52.
- 57 Woldringh CL. The role of co-transcriptional translation and protein translocation (transertion) in bacterial chromosome segregation. *Molecular Microbiology* 2002; **45**: 17–29.

- 58 Zimmerman SB. Shape and compaction of Escherichia coli nucleoids. *Journal of Structural Biology* 2006; **156**: 255–61.
- 59 Joyeux M, Vreede J. A model of H-NS mediated compaction of bacterial DNA. *Biophysical Journal* 2013; **104**: 1615–1622.
- 60 Ghosh S, Mallick B, Nagaraja V. Direct regulation of topoisomerase activity by a nucleoid-associated protein. *Nucleic Acids Research* 2014; **42**: 11156–11165.
- 61 Hell SW. Microscopy and its focal switch. *Nature Methods* 2009; **6**: 24–32.
- 62 Henriques R, Griffiths C, Rego EH, Mhlanga MM. PALM and STORM: Unlocking live-cell super-resolution. *Biopolymers* 2011; **95**: 322–331.
- 63 Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS *et al.* Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 2006; **313**: 1642–1645.
- 64 Huang B, Bates M, Zhuang X. Super resolution fluorescence microscopy. *Annual Review of Biochemistry* 2010; **78**: 993–1016.
- 65 Schneider G. Cryo X-ray microscopy with high spatial resolution in amplitude and phase contrast. *Ultramicroscopy* 1998; **75**: 85–104.
- 66 Jacobsen C, Kirz J. X-ray microscopy with synchrotron radiation. *Nature Structural Biology* 1998; **5**: 650–653.
- 67 Meents A, Gutmann S, Wagner A, Schulze-Briese C. Origin and temperature dependence of radiation damage in biological samples at cryogenic temperatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010; **107**: 1094–1099.
- 68 Beetz T, Jacobsen C. Soft X-ray radiation-damage studies in PMMA using a cryo-STXM. *Journal of Synchrotron Radiation* 2003; **10**: 280–283.
- 69 Howells MR, Beetz T, Chapman HN, Cui C, Holton JM, Jacobsen CJ *et al.* An assessment of the resolution limitation due to radiation-damage in X-ray diffraction microscopy. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* 2009; **170**: 4–12.
- 70 Brüggeller P, Mayer E. Complete vitrification in pure liquid water and dilute aqueous solutions. *Nature* 1980; **288**: 569–571.
- 71 Tivol WF, Briegel A, Jensen GJ. An Improved Cryogen for Plunge Freezing. *Microscopy and Microanalysis* 2008; **14**: 375–379.
- 72 McDermott G, Le Gros M a, Larabell C a. Visualizing cell architecture and molecular location using soft x-ray tomography and correlated cryo-light microscopy. *Annual review of physical chemistry* 2012; **63**: 225–39.

- 73 Schneider G, Guttman P, Heim S, Rehbein S, Mueller F, Nagashima K *et al.* Three-dimensional cellular ultrastructure resolved by X-ray microscopy. *Nature Methods* 2010; **7**: 985–7.
- 74 Meisburger SP, Warkentin M, Chen H, Hopkins JB, Gillilan RE, Pollack L *et al.* Breaking the Radiation Damage Limit with Cryo-SAXS. *Biophysical Journal* 2013; **104**: 227–36.
- 75 Chao W, Harteneck BD, Liddle JA, Anderson EH, Attwood DT. Soft X-ray microscopy at a spatial resolution better than 15 nm. *Nature* 2005; **435**: 1210–3.
- 76 Knoll M, Ruska E. Beitrag zur geometrischen Elektronenoptik. *Annalen der Physik* 1932; **404**: 607–640.
- 77 Williams DB, Carter CB. *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science*. Springer: New Yo, 2009.
- 78 Mikula S, Binding J, Denk W. Staining and embedding the whole mouse brain for electron microscopy. *Nature Methods* 2012; **9**: 1198–201.
- 79 Spurr AR. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* 1969; **26**: 31–43.
- 80 Griffith WP. Osmium Tetroxide and Its Applications. *Platinum Metals Review* 1974; **18**: 94–96.
- 81 Hayat MA. *Stains and Cytochemical Methods*. Springer: New York, 1993.
- 82 Bozzola JJ, Russell LD. *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*. Jones and Bartlett: Sudbury, 1999.
- 83 Jha AR. *Cryogenic Technology and Applications*. Elsevier Academic Press: Oxford, 2006.
- 84 Sakdinawat A, Attwood D. Nanoscale X-ray imaging. *Nature Photonics* 2010; **4**: 840–848.
- 85 Henke BL, Gullikson EM, Davis JC. X-Ray Interactions: Photoabsorption, Scattering, Transmission, and Reflection at E = 50-30,000 eV, Z = 1-92. *Atomic Data and Nuclear Data Tables* 1993; **54**: 181–342.
- 86 Kirz J, Jacobsen C, Howells M. Soft X-ray microscopes and their biological applications. *Quarterly Reviews of Biophysics* 1995; **28**: 33–130.
- 87 Thornagel R, Klein R, Ulm G. The electron storage ring BESSY II as a primary source standard from the visible to the the X-ray range. *Metrologia* 2001; **38**: 385–389.
- 88 Gorniak T, Rosenhahn A. Ptychographic X-ray Microscopy with the Vacuum Imaging Apparatus HORST. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 2014; **228**: 1089–1104.
- 89 Larabell C, Nugent K. Imaging cellular architecture with X-rays. *Current Opinion in Structural Biology* 2010; **20**: 623–631.

- 90 Weis D, Schneider G, Vogt S, Guttman P, Niemann B, Rudolph D *et al.* Tomographic imaging of biological specimens with the cryo transmission X-ray microscope. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 2001; **467-468**: 1308–1311.
- 91 Wieseemann U. *The scanning transmission x-ray microscope at BESSY II*. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Göttingen, 2003.
- 92 Lifshin E. *X-ray Characterization of Materials*. Wiley: Weinheim, 2008.
- 93 Guinier A, Fournet G. *Small-angle scattering of X-rays*. Wiley: Chicago, 1955.
- 94 Glatter O, Kratky O. *Small Angle X-ray Scattering*. Academic Press: München, 1982.
- 95 Glatter O. A new method for the evaluation of small-angle scattering data. *Journal of Applied Crystallography* 1977; **10**: 415–421.
- 96 Svergun DI, Koch MHJ. Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. *Reports on Progress in Physics* 2003; **66**: 1735–1782.
- 97 Svergun DI. Small-angle scattering studies of macromolecular solutions. *Journal of Applied Crystallography* 2007; **40**: 10–17.
- 98 Putnam CD, Hammel M, Hura GL, Tainer J a. X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Quarterly reviews of Biophysics* 2007; **40**: 191–285.
- 99 Rambo RP, Tainer J. Improving small-angle X-ray scattering data for structural analyses of the RNA world. *RNA* 2010; **16**: 638–646.
- 100 Konarev P V., Petoukhov M V., Volkov V V., Svergun DI. ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography* 2006; **39**: 277–286.
- 101 Martin JE, Hurd AJ. Scattering from Fractals. *Journal of Applied Crystallography* 1987; **20**: 61–78.
- 102 Beaucage G. Approximations Leading to a Unified Exponential/Power-Law Approach to Small-Angle Scattering. *Journal of Applied Crystallography* 1995; **28**: 717–728.
- 103 Schmidt PW. *Some Fundamental Concepts and Techniques Useful in Small-Angle Scattering Studies of Disordered Solids*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherland, 1995.
- 104 Beaucage G. Small-Angle Scattering from Polymeric Mass Fractals of Arbitrary Mass-Fractal Dimension. *Journal of Applied Crystallography* 1996; **29**: 134–146.
- 105 Ivanov VK, Kopitsa GP, Baranchikov a. E, Grigor'ev S V., Haramus VM. Evolution of composition and fractal structure of hydrous zirconia xerogels during thermal annealing. *Russian Journal of Inorganic Chemistry* 2010; **55**: 155–161.

- 106 Avdeev MV, Tropin TV, Aksenov VL, Rosta L, Garamus VM, Rozhkova NN. Pore structures in shungites as revealed by small-angle neutron scattering. *Carbon* 2006; **44**: 954–961.
- 107 Ilavsky J, Jemian PR. Irena : tool suite for modeling and analysis of small-angle scattering. *Journal of Applied Crystallography* 2009; **42**: 347–353.
- 108 Zhang F, Ilavsky J, Long GG, Quintana JPG, Allen AJ, Jemian PR. Glassy carbon as an absolute intensity calibration standard for small-angle scattering. *Metallurgical and Materials Transactions A: Physical Metallurgy and Materials Science* 2010; **41**: 1151–1158.
- 109 McKenzie LC, Haben PM, Kevan SD, Hutchison JE. Determining Nanoparticle Size in Real Time by Small-Angle X-ray Scattering in a Microscale Flow System. *The Journal of Physical Chemistry C* 2010; **114**: 22055–22063.
- 110 Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* 2008; **3**: 163–75.
- 111 Plitzko JM, Rigort A, Leis A. Correlative cryo-light microscopy and cryo-electron tomography: from cellular territories to molecular landscapes. *Current Opinion in Biotechnology* 2009; **20**: 83–89.
- 112 Ito K, Moynihan CT, Angell CA. Thermodynamic determination of fragility in liquids and a fragile-to-strong liquid transition in water. *Nature* 1999; **398**: 492–495.
- 113 Egerton RF, Li P, Malac M. Radiation damage in the TEM and SEM. *Micron* 2004; **35**: 399–409.
- 114 Quispe J, Damiano J, Mick SE, Nackashi DP, Fellmann D, Ajero TG *et al.* An Improved Holey Carbon Film for Cryo-Electron Microscopy. *Microscopy and Microanalysis* 2007; **13**: 365–371.
- 115 Gorniak T. *Melanosomen im Real- und Fourierraum*. Dissertation, Naturwissenschaftlich-Mathematische Fakultät, Universität Heidelberg, 2013.
- 116 Ilavsky J. Nika: Software for two-dimensional data reduction. *Journal of Applied Crystallography* 2012; **45**: 324–328.
- 117 Franke D, Kikhney AG, Svergun DI. Automated acquisition and analysis of small angle X-ray scattering data. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, A* 2012; **689**: 52–59.
- 118 Schneider C, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 2012; **9**: 671–675.
- 119 Pauw BR. Everything SAXS: small-angle scattering pattern collection and correction. *Journal of Physics: Condensed Matter* 2014; **26**: 239501.
- 120 Jemian PR, Allen J. The effect of the shape function on small-angle scattering analysis by the maximum-entropy method. *Journal of Applied Crystallography* 1994; **27**: 693–702.

- 121 Pearson K. LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* 1901; **2**: 559–572.
- 122 Mikut R, Burmeister O, Braun S, Reischl M. The open source Matlab toolbox Gait-CAD and its application to bioelectric signal processing. *Proc, DGBMT-Workshop Biosignalverarbeitung, Potsdam* 2008; : 109–111.
- 123 Duboc P, Marison I, von Stockar U. *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry*. Elsevier Science: Amsterdam, 1999.
- 124 Neidhardt FC, Curtiss R. *Escherichia Coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. ASM Press: Washington, 1996.
- 125 Round A, Felisaz F, Fodinger L, Gobbo A, Huet J, Villard C *et al.* BioSAXS Sample Changer: a robotic sample changer for rapid and reliable high-throughput X-ray solution scattering experiments. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 2015; **71**: 67–75.
- 126 Blanchet CE, Spilotros A, Schwemmer F, Graewert MA, Kikhney A, Jeffries CM *et al.* Versatile sample environments and automation for biological solution X-ray scattering experiments at the P12 beamline (PETRA III, DESY). *Journal of Applied Crystallography* 2015; **48**: 431–443.
- 127 Jeffries CM, Graewert M, Svergun DI, Blanchet CE. Limiting radiation damage for high-brilliance biological solution scattering: practical experience at the EMBL P12 beamline PETRAIII. *Journal of Synchrotron Radiation* 2015; **22**: 273–279.
- 128 Ilavsky J, Zhang F, Allen AJ, Levine LE, Jemian PR, Long GG. Ultra-Small-Angle X-ray Scattering Instrument at the Advanced Photon Source: History, Recent Development, and Current Status. *Metallurgical and Materials Transactions A* 2013; **44**: 68–76.
- 129 Ilavsky J, Jemian PR, Allen AJ, Zhang F, Levine LE, Long GG. Ultra-small-angle X-ray scattering at the Advanced Photon Source. *Journal of Applied Crystallography* 2009; **42**: 469–479.
- 130 Shinohara Y, Kishimoto H, Inoue K, Suzuki Y, Takeuchi A, Uesugi K *et al.* Characterization of two-dimensional ultra-small-angle X-ray scattering apparatus for application to rubber filled with spherical silica under elongation. In: *Journal of Applied Crystallography*. 2007, pp 397–401.
- 131 Guttmann P, Bittencourt C, Rehbein S, Umek P, Ke X, Van Tendeloo G *et al.* Nanoscale spectroscopy with polarized X-rays by NEXAFS-TXM. *Nature Photonics* 2011; **6**: 25–29.
- 132 Beckers M, Senkbeil T, Gorniak T, Reese M, Giewekemeyer K, Gleber S *et al.* Chemical Contrast in Soft X-Ray Ptychography. *Physical Review Letters* 2011; **107**: 208101.
- 133 Giewekemeyer K, Beckers M, Gorniak T, Grunze M, Salditt T, Rosenhahn A. Ptychographic coherent x-ray diffractive imaging in the water window. *Optics Express* 2011; **19**: 1037–1050.

- 134 Rose M, Skopintsec P, Dimitry D, Gorobtsov O, Senkbeil T, von Gundlach AR *et al.* Water Window Ptychographic Imaging with Characterized Coherent X-rays. *Journal of Synchrotron Radiation* 2015.
- 135 Byrd JM, Shea TJ, Denes P, Siddons P, Attwood D, Kaertner F *et al.* Enabling instrumentation and technology for 21st century light sources. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 2010; **623**: 910–920.
- 136 Howells M, Jacobsen C, Warwick T, Van den Bos A. Principles and Applications of Zone Plate X-Ray Microscopes. In: Hawkes P, Spence JH (eds). *Science of Microscopy*. Springer New York, 2007, pp 835–926.
- 137 Follath R, Schmidt JS, Siewert F, Holldack K, Zeschke T, Frentrup W *et al.* Commissioning of the U49/2-PGM1 beamline. *AIP Conference Proceedings* 2004; **705**.
- 138 Lorian V. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2005.
- 139 Larabell C. X-ray tomography generates 3-D reconstructions of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, at 60-nm resolution. *Molecular Biology of the Cell* 2004; **15**: 957–962.
- 140 Margolin W. Imaging the Bacterial Nucleoid. In: Dame R, Dorman C (eds). *Bacterial Chromatin*. Springer: Dordrecht, 2010, pp 13–30.
- 141 Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2001; **65**: 232–60.
- 142 Chalkley LJ, Koornhof HJ. Antimicrobial activity of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* determined by the killing curve method: Antibiotic comparisons and synergistic interactions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1985; **28**: 331–342.
- 143 Parkinson DY, Knoechel C, Yang C, Larabell C a, Le Gros M a. Automatic alignment and reconstruction of images for soft X-ray tomography. *Journal of Structural Biology* 2012; **177**: 259–66.
- 144 Chichón FJ, Rodríguez MJ, Pereiro E, Chiappi M, Perdiguero B, Guttman P *et al.* Cryo X-ray nano-tomography of vaccinia virus infected cells. *Journal of Structural Biology* 2012; **177**: 202–11.
- 145 Hanssen E, Knoechel C, Dearnley M, Dixon MW a, Le Gros M, Larabell C *et al.* Soft X-ray microscopy analysis of cell volume and hemoglobin content in erythrocytes infected with asexual and sexual stages of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Structural Biology* 2012; **177**: 224–32.
- 146 Schneider G, Niemann B, Guttman P, Rudolph D, Schmahl G. Cryo X-ray microscopy. *Synchrotron Radiation News*. 1995; **8**: 19–28.

- 147 Narayanan T, Diat O, Bösecke P. SAXS and USAXS on the high brilliance beamline at the ESRF. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 2001; **467-468**: 1005–1009.
- 148 Zhang F, Skoda MWA, Jacobs RMJ, Martin RA, Martin CM, Schreiber F. Protein interactions studied by SAXS: effect of ionic strength and protein concentration for BSA in aqueous solutions. *Journal of Physical Chemistry B* 2007; **111**: 251–259.
- 149 Starodub D, Rez P, Hembree G, Howells M, Shapiro D, Chapman HN *et al.* Dose, exposure time and resolution in serial X-ray crystallography. *Journal of synchrotron radiation* 2008; **15**: 62–73.
- 150 Schuwirth BS, Borovinskaya MA, Hau CW, Zhang W, Vila-Sanjurjo A, Holton JM *et al.* Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* 2005; **310**: 827–834.
- 151 Erickson HP. Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biological Procedures Online* 2009; **11**: 32–51.
- 152 Feijó Delgado F, Cermak N, Hecht VC, Son S, Li Y, Knudsen SM *et al.* Intracellular Water Exchange for Measuring the Dry Mass, Water Mass and Changes in Chemical Composition of Living Cells. *PLoS ONE* 2013; **8**: e67590.
- 153 Fenwick ML. The density of ribosomes bearing messenger RNA in phage-infected and normal bacteria. *Journal of Cell Science* 1971; **8**: 649–658.
- 154 Birge EA. *Bacterial and Bacteriophage Genetics*. Springer: New York, 2006.
- 155 Dunkle J a, Xiong L, Mankin AS, Cate JHD. Structures of the Escherichia coli ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; **107**: 17152–17157.
- 156 Round AR. *Ultra-structural Analysis Of Breast Tissue*. 2006.
- 157 Dixon RA, Chopra I. Polymyxin B and polymyxin B nonapeptide alter cytoplasmic membrane permeability in Escherichia coli. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1986; **18**: 557–63.
- 158 Bohrmann B, Villiger W, Johansen R, Kellenberger E. Coralline shape of the bacterial nucleoid after cryofixation. *Journal of Bacteriology* 1991; **173**: 3149–58.
- 159 Graewert MA, Svergun DI. Impact and progress in small and wide angle X-ray scattering (SAXS and WAXS). *Current Opinion in Structural Biology* 2013; **23**: 748–54.
- 160 Haas S. *Nanochemische Zusammensetzungsanalyse mittels anomaler Röntgenkleinwinkelstreuung (ASAXS): Erbium und Ytterbium dotierte Oxyfluorid-Glaskeramiken*. Dissertation Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Humboldt Universität Berlin, 2010.

- 161 Yu C, Koh S, Leisch JE, Toney MF, Strasser P. Size and composition distribution dynamics of alloy nanoparticle electrocatalysts probed by anomalous small angle X-ray scattering (ASAXS). *Faraday Discussions* 2009; **140**: 9.
- 162 Broennimann C, Eikenberry EF, Henrich B, Horisberger R, Huelsen G, Pohl E *et al.* The PILATUS 1M detector. *Journal of Synchrotron Radiation* 2006; **13**: 120–130.
- 163 Huang TC, Toraya H, Blanton TN, Wu Y. X-ray powder diffraction analysis of silver behenate, a possible low-angle diffraction standard. *Journal of Applied Crystallography* 1993; **26**: 180–184.
- 164 Barty A, Boutet S, Bogan MJ, Hau-Riege S, Marchesini S, Sokolowski-Tinten K *et al.* Ultrafast single-shot diffraction imaging of nanoscale dynamics. *Nature Photonics* 2008; **2**: 415–419.

7 ANHANG

7.1 Kompletter BioSAXS-Datensatz

Anlage zu Kapitel 4.6: Hauptkomponentenanalyse des gesamten, am BioSAXS-Strahlrohr gemessenen Datensatzes. Antibiotika mit klarer morphologischer Änderung sind markiert.

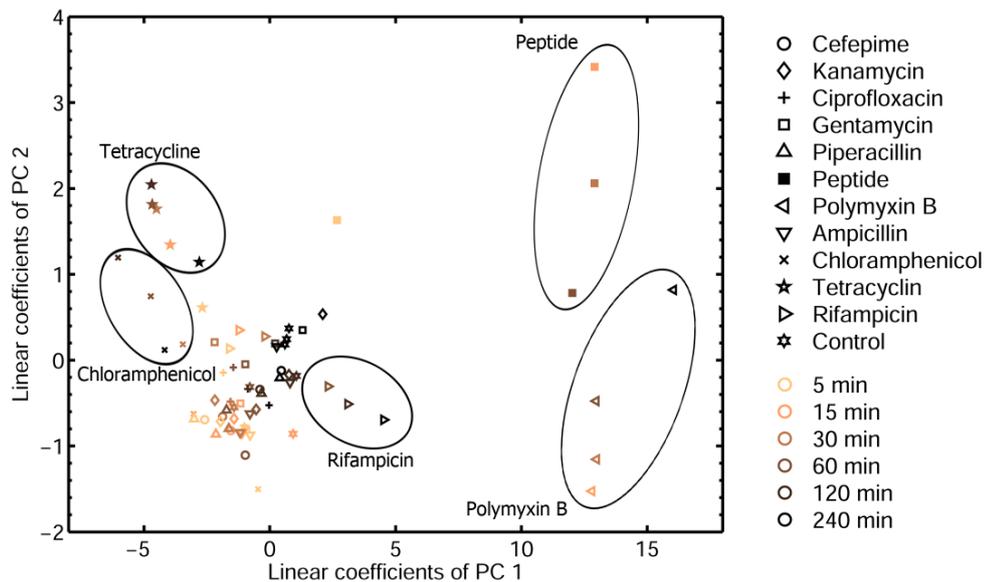


Abbildung 64: Hauptkomponentenanalyse des am BioSAXS-Strahlrohr gemessenen Datensatzes. Gezeigt sind die Koeffizienten (A,B) der ersten beiden Hauptkomponenten. Die Symbole zeigen das Antibiotikum und die Inkubationszeit ist Farbkodiert. Die Antibiotika mit starken morphologischen Änderungen wurden markiert. Antibiotika ohne morphologische Änderungen verhalten sich ähnlich wie die unbehandelten Bakterien (Control).

7.2 Publikationsliste

T. Gorniak, T. Haraszti, V.M. Garamus, A.R. Buck, T. Senkbeil, M. Priebe, A. Hedberg-Buenz, D. Koehn, T. Salditt, M. Grunze, M. G. Anderson, A. Rosenhahn; *Nano-scale morphology of melanosomes revealed by small-angle X-ray scattering*. PloS one, 2014; **9**: e90884.

M. Rose, P. Skopintsec, D. Dimitry, O. Gorobtsov, T. Senkbeil, A.R. von Gundlach, T. Gorniak, A. Shabalin, J. Viefhaus, A. Rosenhahn, I. Vartanyants; *Water Window Ptychographic Imaging with Characterized Coherent X-rays*. *Journal of Synchrotron Radiation*, 2015.

A.R. von Gundlach, V.M. Garamus, T. Gorniak, H.A. Davies, M. Reischl, R. Mikut, K. Hilpert, A. Rosenhahn; *High throughput method to classify the mode of action of novel antimicrobial compounds*.

In Vorbereitung

7.3 Konferenzbeiträge

27.10. – 1.11.2013, *The AVS International Symposium & Exhibition, Long Beach, USA*,
Vortrag

8.11. – 11.9.2013, *11th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation*, Deutschland,
Posterpräsentation

9.7. – 13.7.2012, *11th International conference on synchrotron radiation instrumentation*, Lyon, France,
Posterpräsentation

17.5. – 19.5.2012, *Bunsentagung*, Leipzig, Deutschland,
Posterpräsentation

7.4 Finanzielle Unterstützung

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführte Forschung wurde durch die Helmholtz Gemeinschaft gefördert. (VH-VI-403)

DANKSAGUNG

Vielen Dank an Prof. Axel Rosenhahn für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die spannende Interdisziplinäre Themenstellung mit hohem „Innovationspotential“ und große Freiheit in der Durchführung. Besonders imponiert hat mir dein gnadenloser Optimismus der motiviert und mitzieht. Bei Prof. Rainer Dahint bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Dr. Rainer Bischoff, dass er sich als Prüfer fürs Fach Biologie zur Verfügung gestellt hat.

Vielen Dank an Dr. Kai Hilpert, dass er diesem Projekt die biologische Komponente beige-steuert hat. Mir sind die außergewöhnlich gastfreundliche Aufnahme in London und die vielen konstruktiven Gespräche in Erinnerung.

A big thank goes to Vasyly Garamus, for his faith in this project, especially in its very early stages where you offered the first beamtime at P12 to a mere idea by people without any SAXS experience. Thanks also for your patient support during data evaluation.

Als die Datenanalyse stillstand hat mir Prof. Ralf Mikut mit seiner geduldigen Einführung und Hilfe beim Durchführen der Hauptkomponentenanalyse einen neuen Weg eröffnet.

Thank you to Dr. Trevor Willey, who only just knew me after meeting at the AVS conference and agreed to measure the crucial samples at the USAXS beamline which completed the picture.

I want to thank Maria McGlynn and Raymond Moss for the preparation of the TEM samples and the support during the measurements and afterwards.

Ein Dankeschön geht an Peter Krolla-Sidenstein, für die freundliche Einführung in die Welt der Mikrobiologie und die gute Zeit am KIT.

Vielen Dank an Dr. Markus Reischl für die quantitative Auswertung der TEM-Aufnahmen.

Arbeit am Synchrotron ist Gemeinschaftsarbeit. Hier möchte ich den Operatoren des BESSY-TXM, Dr. Peter Guttmann, Dr. Stephan Werner und Dr. Katja Henzler danken. Thank you to Dr. Cy Jeffries for his last minute help at BioSAXS.

Vielen Dank an alle Korrekturleser dieser Arbeit: Isabel Thomé, Stella Bauer, Max Hanke, Victoria Jacobi und Susan Stuhr. Ich weiß jetzt: mehr Kommas! Alles was in dieser Arbeit „Röntgen“ heißt wurde geduldig von Tobias Senkbeil oder Thomas Gorniak begutachtet. Letzterem Danke für die vielen guten (auch last-minute) Diskussionen.

Zum Thema Röntgen, ich weiß nicht mehr wieviele Strahlzeiten ich mit Thomas Gorniak und Tobias Senkbeil und zuletzt auch Susan Stuhr verbracht habe. Super, dass ihr trotz Nachtschichten nie die Stimmung habt kippen lassen.

Ein großes Dankeschön geht an meine Arbeitsgruppe! Erst in Heidelberg, dann in Karlsruhe und schließlich in Bochum. Es hat Spaß gemacht, mit euch zusammenzuarbeiten.

Der finale Dank gebührt meinen Eltern, meiner Schwester und vor allem meiner Frau Katharina. Ihr habt mich immer wieder in die wirkliche Welt zurückgeholt.

Eidesstattliche Versicherung gemäß § 8 der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der Universität Heidelberg

1. Bei der eingereichten Dissertation zum Thema

Untersuchung antibiotischer Wirkmechanismen mit Röntgenkleinwinkelstreuung

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich ~~wie folgt~~/bisher nicht an einer Hochschule des In- oder Auslandes als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.

4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich.

5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erkläre und nichts verschwiegen habe.

Ort und Datum

Unterschrift

