

Universität Bielefeld

Fakultät für Physik

Arbeitsgruppe Experimentelle Biophysik und angewandte
Nanowissenschaften D1

Bachelorarbeit

im Studiengang BA Physik KF

Thema: Untersuchung von 2-Cys Peroxiredoxin-A-Decameren und
Nanopartikeln des Fe-Sucrose-Komplexes
mit dem Rasterkraftmikroskop

eingereicht von: Johannes Pehe <johannes.pehe@uni-bielefeld.de>

eingereicht am: 14. Mai 2008

Betreuer: Herr Prof. Dr. Dario Anselmetti

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
2	Physikalische Grundlagen der Rastersondenmikroskopie	5
2.1	Die Rastertunnelmikroskopie	6
2.2	Die Rasterkraftmikroskopie	7
2.3	Die optische Rasternahfeldmikroskopie	8
2.4	Das Rasterkraftmikroskop [3]	9
2.4.1	Aufbau und Funktionsweise	9
2.4.2	Abbildungsmodi und Medien	10
2.4.3	Artefakte	13
2.4.4	Probenvorbereitung	14
3	Theoretische Grundlagen der behandelten Proben	15
3.1	2-Cys Peroxiredoxin aus <i>Arabidopsis thaliana</i> [15]	15
3.2	Fe-Oxyhydroxid-Sucrose-Komplex [14]	17
4	Material und Methoden	18
5	Resultate und Diskussion	20
5.1	2-Cys Peroxiredoxin-A	20
5.2	Fe-Sucrose-Komplex Nanopartikel	25
6	Resümee und Ausblick	29
7	Danksagung	30
	Literatur	32

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Bielefeld, 14. Mai 2008

(Johannes Pehe)

1 Einleitung

Ziel dieser Arbeit ist es, unterschiedliche Proben aus der Grundlagenforschung und der Anwendung mittels der Rasterkraftmikroskopie zu untersuchen. Aus dem Bereich Grundlagenforschung soll das Decamer des eukaryotischen Proteins 2-Cys Peroxiredoxin-A aus *Arabidopsis thaliana* möglichst hoch aufgelöst abgebildet werden. Elektronenmikroskopische [13] Bilder (siehe Abbildung 8) liegen bereits vor. Aus dem Bereich Anwendung soll eine Referenzprobe von Fe-Sucrose-Nanopartikeln (Venofer) [14] zur intravenösen Verabreichung an Patienten mit Blutarmut vermessen und mit drei ähnlichen Proben (P_1, P_2, P_3) verglichen werden, um die Übereinstimmung in Form und Größe zu verifizieren. Weiter soll die Größe der Partikel quantitativ bestimmt werden, indem Faltungseffekte aus den Daten herausgerechnet werden.

Um die zu untersuchenden Proben in der Größenordnung < 25 nm abzubilden, gibt es verschiedene Verfahren. Zum Beispiel lassen sich mit Elektronenmikroskopen [13] oder Rastertunnelmikroskopen [5, 4] Auflösungen < 1 nm erzielen. Solchen Mikroskopen sind jedoch nur leitfähige Proben zugänglich. Das bedeutet für biologische Proben, dass diese leitfähig beschichtet werden müssen. Zudem werden diese Geräte im Vakuum betrieben. Das heisst, biologische Proben, welche in der Natur in wässriger Lösung vorliegen, werden in vielen Fällen in ihrer Konformation verändert und denaturiert. Eine Technik, die diese Probleme bei ähnlich hoher Auflösung weitgehend umgeht, ist die Rasterkraftmikroskopie [3]. Hierbei liefert die Kraftwechselwirkung zwischen einer Sonde und der Probe die bildgebende Information. Damit erlaubt sie, die hier zu behandelnden Proben in Luft und in Lösung ¹ abzubilden.

¹unter annähernd physiologischen Bedingungen

2 Physikalische Grundlagen der Rastersondenmikroskopie

Das folgende Kapitel soll einen Überblick über einige in der Nanoanalytik eingesetzte Mikroskopiertechniken sowie die zu Grunde liegenden physikalischen Phänomene geben. Die verwendete Rasterkraftmikroskopie [3] gehört wie die Rastertunnelmikroskopie [5, 4] und die optische Rasternahfeldmikroskopie [19, 1] in die Kategorie der Rastersondenmikroskopie. Jedes dieser Verfahren macht sich bestimmte physikalische Effekte zu Nutze, die im Folgenden kurz beschrieben werden. Die von mir angewandte Rasterkraftmikroskopie wird anschließend ausführlich dargestellt. Die Rastersondenmikroskope unterscheiden sich in Messaufbau und Funktionsweise grundlegend von herkömmlichen optischen Mikroskopen. Im wesentlichen wird eine Sonde mit feiner Spitze von wenigen Nanometern Durchmesser in die Nähe der Probe gebracht. Punkt für Punkt wird die Probe abgerastert. Aufgrund der gemessenen abstandsabhängigen Wechselwirkungen lassen sich in erster Linie topografische Informationen gewinnen und am Computer als dreidimensionale Bilder der Probenoberfläche darstellen. Je nach Art und Betriebsmodus des Mikroskops lassen sich auch Materialeigenschaften, -verteilungen oder -konstanten sowie Fluoreszenzeigenschaften ermitteln.

2.1 Die Rastertunnelmikroskopie

[5, 4] (engl. Scanning tunneling microscopy, **STM**)

Die Rastertunnelmikroskopie macht sich zu Nutze, dass gebundene Teilchen eine klassisch nicht überwindbare Potenzialbarriere *durchtunneln* können (Tunneleffekt). Dies ergibt sich aus der quantenmechanischen Betrachtung. Der Tunnelstrom ist exponentiell abstandsabhängig. Legt man zwischen die metallische Spitze und die leitfähige² Probe eine Spannung, lässt sich der Tunnelstrom als Funktion des Abstandes wie folgt darstellen.

$$I_t \propto V \exp(-0,125d\sqrt{\Phi}) \quad (1)$$

wobei I_t der Tunnelstrom, V die angelegte Spannung, d der Abstand und Φ die Potenzialbarriere ist. Beim Rastern über die Probenoberfläche wird die Höhe der Spitze mittels Piezoelementen so gesteuert, dass der Tunnelstrom konstant bleibt. Aufgrund der Tatsache, dass die Probenoberfläche leitfähig sein muss, ist dieses Verfahren³ für unbehandelte biologische Proben ungeeignet. Abbildung 1 zeigt einen STM-tip⁴.

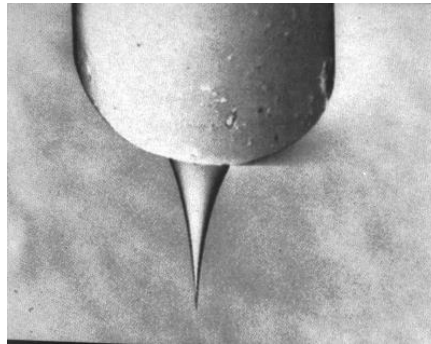


Abbildung 1: STM-tip

²oder leitfähig beschichteten

³wie auch die Elektronenmikroskopie [13]

⁴Quelle: <http://lamp.tu-graz.ac.at/hadley/nanoscience/week3/stm-tip.gif>

2.2 Die Rasterkraftmikroskopie

[3] (engl. Atomic Force microscopy, **AFM**)

Die Rasterkraftmikroskopie basiert im Wesentlichen auf der Kraftwechselwirkung von Oberflächen. Die Wechselwirkung ungeladener, nicht chemisch gebundener Teilchen wird bestimmt von Van-der-Waals Kräften, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (attraktiv) und Pauli-Repulsion (repulsiv). Diese Wechselwirkungen können in der Summe modellhaft durch das *Lennard-Jones-Potenzial* (siehe auch Abschnitt 2.4 und Abb. 5) beschrieben werden:

$$V = \epsilon \left\{ \left(\frac{r_m}{r} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_m}{r} \right)^6 \right\} \quad (2)$$

wobei ϵ die Tiefe des Bindungspotentials (siehe Abb. 5), r_m der Abstand des Energieminimums vom Ursprung und r der Abstand zwischen Sonde und Probe ist. Im Hinblick auf biologische Proben bietet diese Methode neben der hohen Auflösung den Vorteil, dass die Proben nicht aufwändig beschichtet werden müssen. Außerdem können biologische Proben unter nahezu physiologischen Bedingungen untersucht werden. Die technische Umsetzung des Rasterkraftmikroskops wird in Abschnitt 2.4 ausführlich besprochen. In Abbildung 2 ist ein AFM-tip abgebildet⁵.

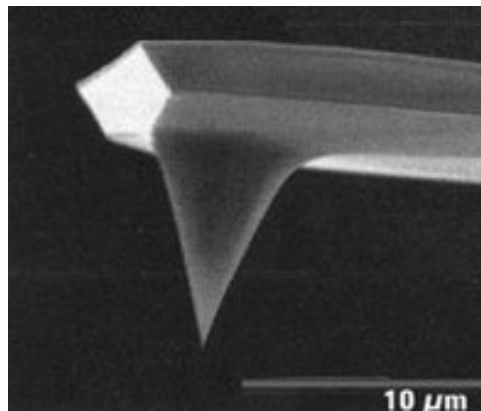


Abbildung 2: AFM-tip

⁵Quelle: <http://www3.physik.uni-greifswald.de/method/afm/AFM-tip.jpg>

2.3 Die optische Rasternahfeldmikroskopie

[19, 1](engl. Scanning nearfield optical microscopy, **SNOM**)

In der optischen Rasternahfeldmikroskopie wird eine Spitze mit optischer Apertur⁶ verwendet. Durch die Spitze⁷ wird nun sichtbares Licht ($\lambda = 400\text{-}700\text{nm}$) geführt. Der Durchmesser der Höhlung im Tip ist mit circa 100nm kleiner als die Wellenlänge des verwendeten Lichtes, wäre also klassisch nicht zu durchdringen. Aufgrund des Tunneleffektes⁸ wirkt ein evaneszentes Feld außerhalb des Tip. Dieses Feld regt die Probe in entsprechend geringer Tiefe zur Fluoreszenz an. Darüber hinaus lässt sich die Spitze auch zur Photodetektion einsetzen. Dabei wird eine für die Lichtmikroskopie hohe Auflösung ($\approx 10\text{nm}$) erzielt, welche sonst aufgrund der Beugungsgrenze auf circa 150nm beschränkt ist. Gleichzeitig liefert die Spitze gemäß der Rasterkraftmikroskopie topografische Informationen. Abbildung 3 zeigt vereinfacht den Versuchsaufbau eines SNOM⁹.

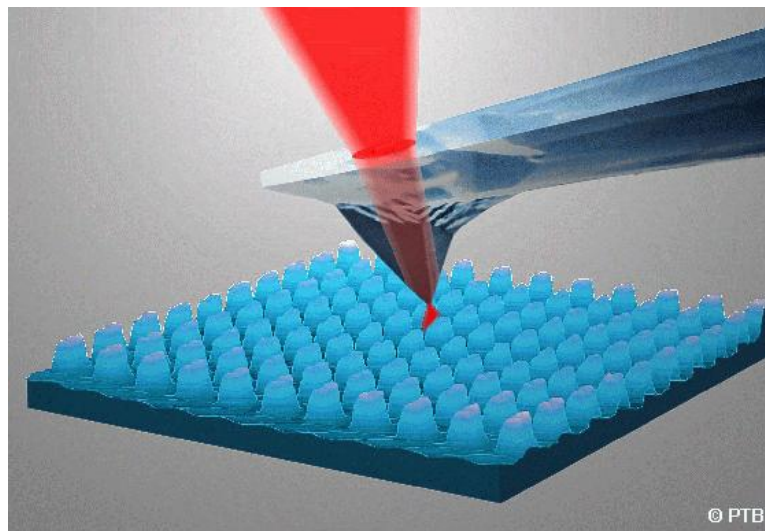


Abbildung 3: SNOM

⁶es gibt auch SNOM-tips ohne Apertur

⁷von innen metallisch beschichtet

⁸siehe 2 Rastertunnelmikroskop

⁹Quelle: <http://www.nahfeldmikroskopie.de/>

2.4 Das Rasterkraftmikroskop [3]

Auf der Basis des 1981 entwickelten Rastertunnelmikroskops [5, 4] entwickelten Binnig et al 1985 [3] das Rasterkraftmikroskop (AFM) [3]. Damit war es erstmals möglich, neben Leitern und Halbleitern auch Isolatoren mit einem Rastersondenverfahren abzubilden.

2.4.1 Aufbau und Funktionsweise

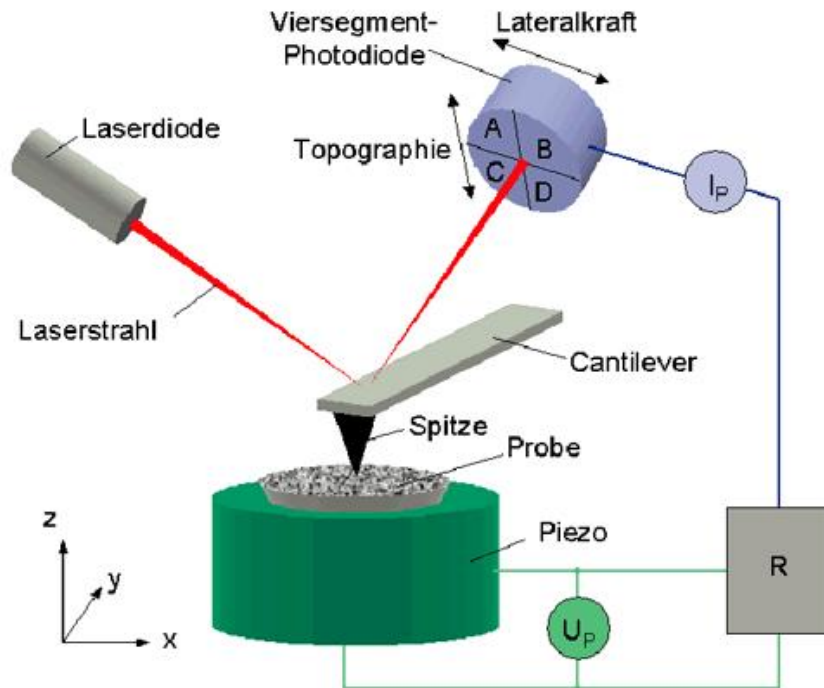


Abbildung 4: Aufbau AFM

Abbildung 4 zeigt den Messaufbau eines Rasterkraftmikroskops¹⁰. Im Zentrum der Abbildung ist eine Blattfeder zu sehen, der sogenannte Cantilever, welcher die Spitze (engl. *tip*) trägt. Der Tip ist meist aus Silizium gefertigt und wird mittels elektrochemischem Ätzen hergestellt. Anhand der Auslenkung des Cantilevers wird die Wechselwirkung mit der Probe detektiert. Hierfür wird ein Laserstrahl auf den Cantilever fokussiert und in eine Mehrsegment-Photodiode reflektiert. Bei Verbiegung des Cantilevers ändert sich die auf die einzelnen Segmente treffende Lichtintensität. Daraus wird die Auslenkung errechnet. Dieses Detektionsverfahren ist so genau, dass in z-Richtung Auflösungen von 0,1nm erzielt werden. Aus der Auslenkung lässt sich mit Hilfe der Federkonstanten des Cantilevers die wechselwirkende Kraft ermitteln. Durch die abgebildete Viersegment-Photodiode lassen sich zudem Reibungskräfte als Torsion des Cantilevers detektieren.¹¹ Die Probe befindet sich auf einem Piezo-

¹⁰Quelle: <http://www.nanomat.de/images/datenblaetter/42000-afm1.gif>

¹¹Es gibt auch andere Detektionsverfahren, z.B. kapazitiv

Scanner. Dieses ist aus mehreren Schichten Piezokristall aufgebaut. Ein Piezokristall verformt sich aufgrund des inversen Piezoeffektes, abhängig von Vorzeichen und Größe einer angelegten Spannung. Das Piezoelement erlaubt so das zeilenförmige Abrastern der Probe in x- und y-Richtung und die Anpassung des Abstandes in z-Richtung mit hoher Genauigkeit.¹² Die Messdaten der Photodiode werden über einen Controller zur Feinsteuerung des Tip in z-Richtung an den Piezo rückgekoppelt. So kann die wechselwirkende Kraft in Echtzeit konstant gehalten werden. Die gewonnenen Daten werden am Computer in Bilder übersetzt.

2.4.2 Abbildungsmodi und Medien

Die für die Rasterkraftmikroskopie relevanten Wechselwirkungen lassen sich, wie in Abschnitt 2 behandelt durch das Lennard-Jones-Potential beschreiben (Gleichung 2, Abbildung 5¹³).

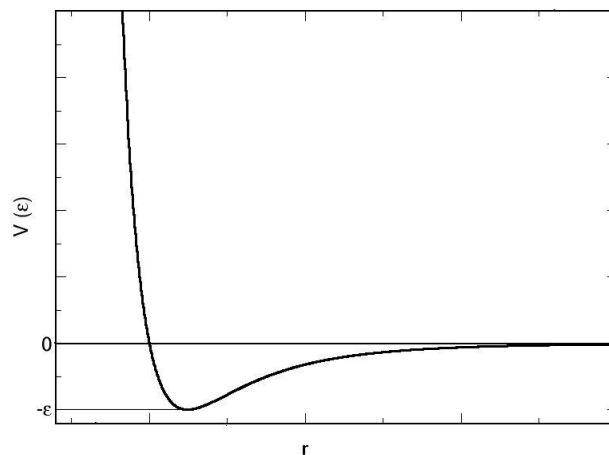


Abbildung 5: Lennard-Jones-Potenzial

Der Teil des Potentials oberhalb der Nullachse führt aufgrund von Pauli-Repulsion zu repulsiven Kräften. Wegen des Pauli'schen Ausschließungsprinzips dürfen sich Elektronenorbitale von Spitzen- und Probenatomen nicht überlappen, was zu starken, abstoßenden Kräften führt. Diese Wechselwirkung entspricht einem Kontakt der Spitze zur Probe mit der hohen Abstandsabhängigkeit $\propto 1/r^{12}$. Der Teil unterhalb der Nullachse ist Van-Der-Waals¹⁴ und permanenten Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zuzuschreiben. Er bewirkt dementsprechend attraktive Kräfte, deren Abstandsabhängigkeit durch $\propto 1/r^6$ gegeben ist. Ein Vorteil dieses Bereichs ist, dass empfindliche Proben zerstörungsfrei untersucht werden können. Um die Vorteile der verschiedenen Abstandsbereiche bedarfsgerecht optimal auszuschöpfen, wurden unterschiedliche Betriebsmodi entwickelt.

¹²Es gibt andere Messaufbauten, in denen der Cantilever über die Probe gerastert wird

¹³Quelle:<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5a/12-6-Lennard-Jones-Potential.png>

¹⁴auch London'sche-Dispersions-Kräfte

- **Contact Mode**

Im Contact Mode wird die Spitze bis in den repulsiven Bereich gebracht. Das hat zur Folge, dass sie elastische Proben eindrückt, was die Probe schädigen kann. Beschädigungen treten zudem durch laterale Reibungskräfte auf. Aus diesem Grund wird der Contact Mode vor allem zur Analyse härterer Proben eingesetzt. Er kann in zwei unterschiedlichen Varianten betrieben werden.

- *Constant Height*

In diesem Modus wird die Sonde in konstanter Höhe über die Probe bewegt. Die topologische Struktur der Probe bewirkt eine Änderung der Kräfte. Da die Höhe nicht nachgeregelt wird, ist diese Methode nur für glatte und harte Proben zu verwenden, da es sonst zu starken Beschädigungen an Probe und Spitze kommt.

- *Constant Force*

Hierbei wird die Höhe der Spitze in z-Richtung so nachgeregelt, dass die gemessene Kraft konstant bleibt. Dies entspricht einem konstanten Abstand zur Probe. Diese Ausführung erlaubt auch die Analyse weicherer Proben. Für die Analyse biologischer Proben kommt diese Technik allerdings selten zum Einsatz, da auch sie im repulsiven Bereich arbeitet.

- **Non Contact Mode**

Im Non-Contact-Mode, auch dynamischer Modus genannt, wird der Cantilever durch einen Piezo nahe seiner Resonanzfrequenz zum Schwingen angeregt. Tritt die schwingende Spitze in den Abstandsbereich attraktiver Kräfte ein, so verschiebt sich die Resonanzfrequenz. Dadurch ändert sich die Amplitude der Schwingung. Durch Nachregeln der z-Richtung wird die Amplitude konstant gehalten, ohne dass die Spitze mit der Probe in Kontakt tritt. Da dieses Verfahren nur im attraktiven Bereich arbeitet, schont es die Probe. Durch die geringe Verformung der Probe ist auf Isolatoroberflächen im Non-Contact-Mode atomare Auflösung zu erreichen. Ein Problem beim dynamischen Modus ist, dass an Luft bei Normaldruck sowohl Spitze als auch Cantilever von einem Flüssigkeitsfilm bedeckt sind, was die Messergebnisse stark beeinträchtigen kann. Bei Messung im Vakuum oder in Lösung tritt dieses Problem nicht auf.

- **Tapping ModeTM [10](Intermittent Contact Mode)**

Im Tapping ModeTM oder intermittierendem Modus wird der Cantilever wie im Non-Contact-Mode nahe seiner Resonanzfrequenz¹⁵ zur Schwingung ange-regt. Bei der Messung tritt die Spitze am unteren Umkehrpunkt der Schwin-gung mit der Probe in Kontakt. Das garantiert zum einen eine hohe Auflösung und verhindert Qualitätseinbußen durch den Flüssigkeitsfilm auf Spitze und Probe, da dieser durchdrungen wird. Bei Proben mit hoher Elastizität kann dies dazu führen, dass die Probe eingedrückt wird, was in der Abbildung zu einer geringeren als der tatsächlichen Höhe der Probe führen kann. Neben dem Höhenbild liefert die Messung im Tapping ModeTM auch ein Phasenbild. Die Phasenverschiebung zwischen Anregung und Cantilever-Schwingung ist abge-sehen von der Höhe der Probe auch von anderen Oberflächeneigenschaften wie Elastizität, Oberflächenspannung und Haftung abhängig, aus denen zusätzli-che Informationen gewonnen werden können. Im Tapping ModeTM kann das AFM sowohl an Luft und im Vakuum, als auch in Flüssigkeit betrieben wer-den. Ein Vorteil dieses Betriebsmodus ist neben der oben genannten Zusatz-information aus dem Phasenbild, dass Beschädigungen der Probenoberfläche gering gehalten werden. Damit bietet er, bei geringem Aufwand und geringer Probenbelastung, eine hohe Auflösung und ist somit sehr gut für biologische Proben geeignet.

- **Medien**

Wie erwähnt ist es möglich, sowohl im Vakuum und in Luft als auch in Flüssig-keit abzubilden. Für biologische Proben ist die Messung in Flüssigkeit beson-ders interessant, da lebende Zellen sowie einzelne Makromoleküle zum Bei-spiel Proteine, unter nahezu physiologischen Bedingungen untersucht werden können. Hierfür werden spezielle Cantilever und -Halterungen eingesetzt. Die-se Variante bietet allerdings auch Nachteile. Es gestaltet sich schwieriger, den Laserspot auf den Cantilever zu fokussieren. Der Laserstrahl durchläuft das Glas der Cantilever-Halterung und die Messflüssigkeit, was zu zahlreichen Re-flexionen führt. Ein weiteres Problem, das zwar auch in Luft, aber besonders in Flüssigkeit auftritt, ist die thermische Drift. Die thermischen Schwankun-gen führen zu einer zusätzlichen Verbiegung des Cantilevers. Daher sollte nach Einbringen des Cantilevers in die Flüssigkeit ein möglichst stabiles thermisches Gleichgewicht abgewartet werden. Die Resonanzfrequenz des Cantilevers wird in Flüssigkeit aufgrund der Dämpfung stark abgesenkt.

¹⁵an Luft $\approx 300\text{kHz}$, in Flüssigkeit $\approx 10\text{kHz}$

2.4.3 Artefakte

Das am Computer erzeugte Bild und die daraus abgelesenen Größen entsprechen nicht immer den realen Größen der Probe. Die Hauptursache dafür ist die Abweichung der Spitze von der idealen δ -Funktion und die daraus resultierenden Faltungseffekte¹⁶. Der Spitzenradius beträgt $\approx 10\text{-}30\text{nm}$. Dies hat zur Folge, dass alle Proben im Querschnitt grundsätzlich zu groß abgebildet werden (siehe Abbildung 6). Abbildungen gleicher Objekte, mit verschiedenen Spitzen aufgenommen, zeigen deshalb unterschiedliche apparente Größen. Die in Abbildung 6 abgebildeten Größen stehen nach [8] wie folgt im Zusammenhang:

$$S = 2\sqrt{RD + \frac{D^2}{4}} \quad (3)$$

Dabei ist S die Halbwertsbreite der Abbildung des Objektes mit dem Durchmesser D, gemessen mit einer Spitze vom Radius R.

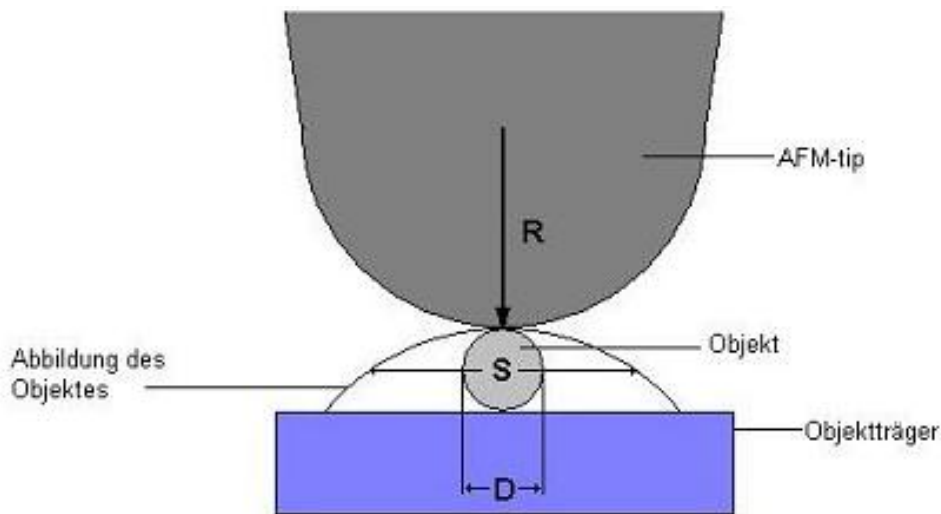


Abbildung 6: Geometrisches Modell zur Abschätzung der Auflösung

Aus Gleichung 3 lässt sich nach Vermessung einer Referenzprobe bekannter Größe der Spitzenradius ermitteln. Daraus kann die Größe unbekannter Proben näherungsweise bestimmt werden [8]. Die Größe der Proben in-z-Richtung wird allerdings sehr genau (Auflösung $\approx 0,1\text{nm}$) abgebildet. Aus Abbildung 6 geht hervor, dass diese Näherung nur bei sphärischen oder zylindrischen Objekten Anwendung finden kann. Beschädigungen der Spitze können dazu führen, dass die untersuchten Objekte in der Abbildung nicht existente Anhänge zeigen. Diese artifiziellen Anhänge sind meist leicht daran zu erkennen, dass sie bei unterschiedlichen Objekten immer in der gleichen Ausrichtung¹⁷ auftreten. In diesem Fall ist die Spitze auszutauschen.

Weiter kann es vorkommen, dass Objekte in der Abbildung eine Art Spur ziehen

¹⁶mathematisch

¹⁷zum Beispiel immer rechts unten

(Abbildung 7). Dies liegt in den meisten Fällen daran, dass das Objekt nicht ausreichend auf dem Objektträger fixiert ist und die Spitze es deshalb vor sich herschiebt. In diesem Fall ist die Probenpräparation zu verbessern.

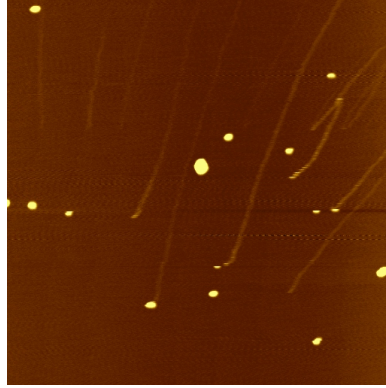


Abbildung 7: Nicht ausreichend fixierte Fe-Nanopartikel

2.4.4 Probenvorbereitung

Um Proben mit dem AFM zu untersuchen, ist es notwendig, sie auf einer möglichst glatten Oberfläche zu fixieren. Als Objektträger eignen sich neben Glas-, Gold- und Siliziumoberflächen vor allem Glimmer (engl. *mica*). Mica ist ein Schichtsilikat welches zwischen einzelnen atomaren Schichten nur geringe Bindungskräfte aufweist. Die obersten Schichten lassen sich dadurch leicht abtragen (zum Beispiel mit Klebeband). Eine atomar glatte Oberfläche bleibt zurück, welche sich, ohne dass eine zusätzliche Reinigung nötig wäre, gut für die Rasterkraftmikroskopie eignet. Mica wird daher sehr häufig verwendet. Je nachdem welche Eigenschaften die abzubildende Probe aufweist, ist es notwendig, die Oberfläche zu funktionalisieren, um eine ausreichende Immobilisierung zu erzielen.

3 Theoretische Grundlagen der behandelten Proben

3.1 2-Cys Peroxiredoxin aus *Arabidopsis thaliana* [15]

Infolge der oxygenen Photosynthese reicherte sich die frühe Erdatmosphäre mit O_2 an, was die Evolution eines O_2 -basierten Metabolismus inklusive eines effizienten respiratorischen Energiemetabolismus möglich machte. Die veränderten Bedingungen bedeuteten jedoch auch eine Bedrohung der Zelle durch oxidativen Stress. Oxidativer Stress wird durch reaktive Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) verursacht. Diese entstehen sowohl im normalen Metabolismus (zum Beispiel Photosynthese) als auch vermehrt, wenn die Zelle Stressbedingungen ausgesetzt ist. Durch wahllose Oxidation von Makromolekülen richten sie enormen Schaden an, da für den Organismus lebenswichtige Prozesse - wie Zellteilung, -differenzierung und -tod - redoxreguliert sind [12]. In dieser Zeit entwickelten sich die Peroxidasen. Ein zu dieser Klasse gehöriges Protein ist das Peroxiredoxin (Prx). Es baut ROS ab und hält so die Konzentration in der Zelle gering [12]. Peroxiredoxine liegen in allen Zellen vor [17].

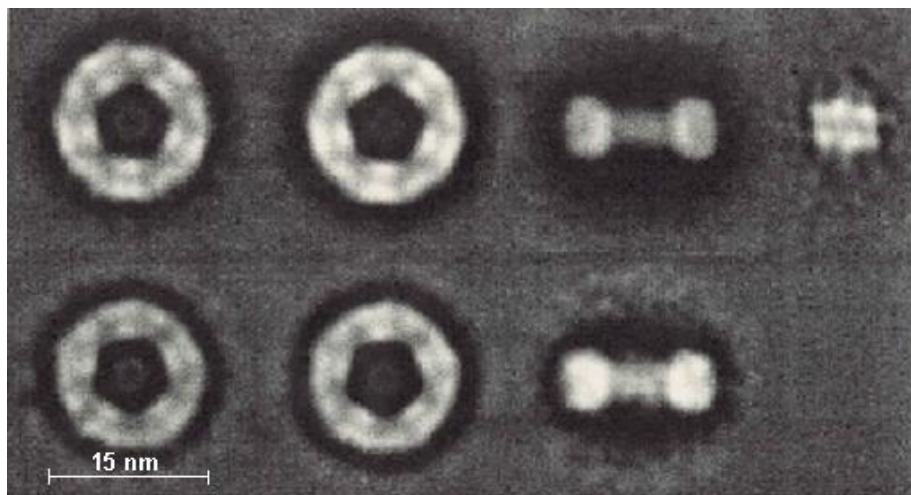


Abbildung 8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von 2-Cys Peroxiredoxin-A-Decameren

Die Peroxiredoxine werden nach ihren katalytischen Mechanismen in 1-Cys Prx (ein katalytischer Cystein-Rest) und 2-Cys Prx (2 katalytische Cystein-Reste) unterschieden [6]. Eukaryotische 2-Cys Peroxiredoxine (2-Cys Prx) sind sehr häufige Thiol-Antioxidantien, welche eine Reihe von Peroxiden reduzieren und in Abhängigkeit vom Redoxzustand maßgeblich ihre Konformation verändern. Das klassische 2-Cys Peroxiredoxin bildet Kopf-Schwanz verbundene Homodimere [11, 7]. Das Enzym kann jedoch auch Oligomere höherer Ordnung bilden, wie zum Beispiel De-

camere (siehe Abbildung 8¹⁸ und 9¹⁹) und Octamere. Ihre Funktion als Antioxidantien wurde in aeroben Bakterien beibehalten. In eukaryotischen Zellen haben die Prx zusätzliche Funktionen als Redox-Sensor, Regulator von Signalwegen und bei der Proteinfaltung (Chaperon-Funktion) übernommen [11, 18, 12]. Zudem wurde gezeigt, dass chloroplastidäre 2-Cys Peroxiredoxine aus *Arabidopsis thaliana* im oxidierten Disulfid-Zustand (S-S Konformation) an Desoxyribonukleinsäure (DNA) binden [15]. Die Größe des donutförmigen Prx-Decamers beträgt etwa 15 nm (siehe Abbildung 8). Der Durchmesser des Lochs, welches die Form eines Pentagons zeigt, beträgt etwa 5 nm. Die Dicke ist ebenfalls etwa 5 nm. Das Molekulargewicht des Decamers beträgt circa 200 kDa (Prx-Monomere wiegen zwischen 17-24 kDa).



Abbildung 9: 2-Cys Prx Decamer im oxidierten Zustand

¹⁸Quelle: Miriam Laxa, Karl-Josef Dietz (Bielefeld University) und Ana Arteni, Sami Kereiche, Egbert Boekema (Groningen Universiteit)

¹⁹Quelle: <http://thesgc.com/SGC-WebPages/StructureDescription/2H66.php>

3.2 Fe-Oxyhydroxid-Sucrose-Komplex [14]

Der vorliegende Fe-Sucrose-Komplex (Venofer, 20 mg/ml) wird Patienten mit Blutarmut und chronischer Nierenerkrankung intravenös verabreicht. Das Eisen ist Bestandteil des humanen Blutfarbstoffs Hämoglobin, welcher zum O₂-Transport dient.

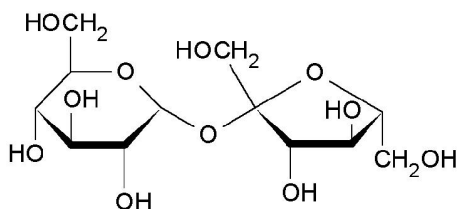


Abbildung 10: Strukturformel Saccharose

Die Nanopartikel bestehen aus einem sphärischen, polynukleären Fe-Oxyhydroxid-Kern in der mineralischen β -FeOOH-Form (*Akaganeit*²⁰) und einer Kohlenhydrathülle aus Sucrose²¹. Das Disaccharid ist der Haushalts- oder Kristallzucker, welcher in Zuckerrübe und Zuckerrohr enthalten ist (Abbildung 10²²). Die Sucrose dient als lösliches Chelat²³, ohne das die Partikel nicht löslich wären. Zudem stabilisiert die Anhaftung die Struktur des mineralischen Kerns. Sucrose bindet schwach an Eisen bei neutralem pH [9, 2, 16]. Ab 25facher Verdünnung löst sich die Sucrose allerdings weitgehend. Für die Nanopartikel wurde mittels Rasterkraftmikroskopie und Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (engl. *transmission electron microscopy*, TEM) eine annähernd einheitliche Größe bestimmt [14]: für die Partikel mit einer anhängenden Sucroseschicht ein mittlerer Durchmesser von 7 ± 4 nm, für den Kern von 3 ± 1 nm. Nach einer Elementaranalyse mit der Annahme einer annähernd sphärischen Form enthält ein durchschnittlicher Kern 416 FeOOH, umgeben von etwa 24 Sucrose-molekülen. Darauf basierend wurde ein Molekulargewicht von etwa 45 kDa errechnet [14].

²⁰Mineralklasse

²¹auch Saccharose

²²Quelle: <http://www.tojozi.de/ChemAll/image31.gif>

²³zwei Bindungen am Zentralion

4 Material und Methoden

Alle behandelten Proben wurden mit dem Rasterkraftmikroskop im Tapping Mode untersucht. Dazu wurde ein kommerzielles Rasterkraftmikroskop der Firma Veeco, vom Typ Multi ModeTM IIIa verwendet. Zudem wurde ein Nanoscope Controller IIIa mit Nanoscope Software Version 5.30r3.sr3 (c) Copyright 2005 eingesetzt. Der AFM-Scanner vom Typ EV wurde mit Kalibrationsgittern der Marke Veeco geeicht. Zur Kalibrierung in x- und y-Richtung wurde ein Gitter mit 1 μm großen Abständen verwendet, für die Eichung in z-Richtung ein Gitter mit 200nm Tiefe. Die Messungen an Luft wurden mit geätzten Budget Sensors Cantilevern vom Typ Tap300Al (Resonanzfrequenz circa 300 kHz) durchgeführt. Die Messungen in Puffer wurden mit Cantilevern der Firma Olympus (Micro Cantilever, Typ OMCL-TR400PSA-HW, Resonanzfrequenz in Flüssigkeit circa 10 kHz) durchgeführt. Zum Abbilden wurde üblicherweise ein Setpoint von 2 V gewählt. Die Scangeschwindigkeit wurde von 0,5 - 3 Hz variiert. Alle Abbildungen wurden mit 512x512 Bildpunkten erzeugt. Die Scangröße wurde zwischen 200 nm - 2 μm variiert. Die Gains wurden bei einer Scangeschwindigkeit von 1 Hz bei Start der Messung auf integral gain = 0,3 und proportional gain = 3.0 eingestellt. Scangeschwindigkeit, Setpoint und Gains wurden jeweils angepasst, bis die bestmögliche Bildqualität erzielt wurde.

Proben

Die vermessenen Proteine 2-Cys Peroxiredoxin-A lagen in Puffer mit 85 μM im oxidierten Disulfid-Zustand (S-S) vor. Die Fe-Nanopartikel standen jeweils als Fe-Oxyhydroxid-Sucrose-Komplex mit einer Konzentration von 20mg/ml in Glasampullen zur Verfügung.

Präparation

Alle Proben wurden zur Messung auf Mica fixiert. Die Proteine wurden zur Messung in Luft von 85 μM mit 0,04M Kpi-Puffer (pH 7) auf 0,5-1 μM verdünnt. 3 μl dieser Lösung wurden auf eine frisch gespaltene Micaoberfläche gebracht und getrocknet. Für die Messungen in Flüssigkeit wurde die Micaoberfläche 90 Minuten im Exsikkator mit 3-Aminopropyl-triethoxysilan (APTES) funktionalisiert. Dieses Molekül bindet an die elektronegative Micaoberfläche und besitzt weiterhin freie positiv geladene Aminogruppen²⁴. Für die Flüssigkeitsmessung wurden 5 μl der Probenlösung auf das silanisierte Micaplättchen gegeben. Der Cantilever wurde in der Vorbereitung mit einem Tropfen (circa 20 μl) des 0,04M Kpi-Puffer (pH 7) bedeckt. Nach dreißig Sekunden wurde die vorbereitete Cantilever-Halterung mit dem Puffer am Cantilever in die Nähe der Oberfläche gebracht, bis sich die Tropfen verbanden.

Zur Präparation der Fe-Nanopartikel wurde, wie in der Literatur [14] beschrieben, vorgegangen. Die Proben mit der Konzentration 20mg/ml wurden jeweils 150fach mit entionisiertem Wasser verdünnt. 5 μl dieser Lösung wurden auf frisch

²⁴es wird auch zur Fixierung von DNA verwendet

gespaltenes Mica ohne zusätzliche Funktionalisierung aufgetragen. Nach einer Bin-
dezeit von 30-60 Sekunden wurde die Oberfläche mit 100 μl entionisiertem Wasser
abgespült und vorsichtig mit Stickstoff trocken geblasen.

Datenanalyse

Die Abbildungen wurden zur Vi-
sualisierung mit einem mathemati-
schen Algorithmus erster Ordnung
(engl. *flattening first order*) bear-
beitet und fehlerhafte Scanlinien
entfernt. Die Skalierung ist jeweils
an der Abbildung abzulesen. Zur
statistischen Auswertung wurden
die Höhe, die Breite und die Halb-
wertsbreite der abgebildeten Ob-
jekte ausgelesen. Die Größenana-
lyse wurde mit der freien Softwa-
re Gwyddion 2.9 durchgeführt. Der
reale Durchmesser der Proben²⁵
wurde mit diesen Daten und Glei-
chung 3 gemäß [8], wie in Abschnitt

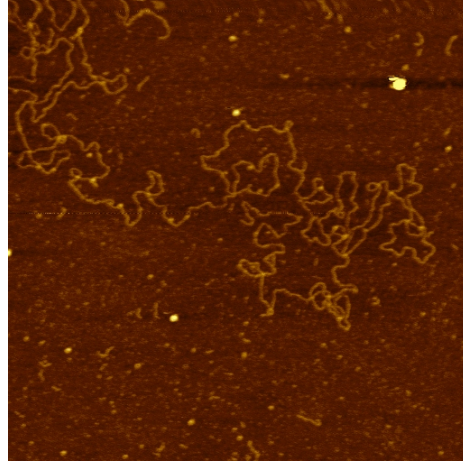


Abbildung 11: λ -DNA mit Durchmesser 2 nm

2.4.3 beschrieben, näherungsweise berechnet. Als Referenzprobe zur Ermittlung des
Spitzenradius wurde λ -DNA (siehe Abbildung 11) mit bekanntem Durchmesser
($D=2$ nm in der B-Form) verwendet, wobei diese in der Abbildung eine mittlere
Halbwertsbreite von $S=16$ nm aufwies. Mit Gleichung 3 wurde für die Cantilever
des verwendeten Wafers ein mittlerer Spitzenradius von $R\approx 30$ nm berechnet.

²⁵nur Fe-Nanopartikel wegen sphärischer Form

5 Resultate und Diskussion

Die folgenden Abbildungen sind das Ergebnis zahlreicher Messungen, wobei typische Ergebnisse dargestellt werden.

5.1 2-Cys Peroxiredoxin-A

Die gezeigten topografischen AFM-Abbildungen wurden mit verschiedenen Scan-Größen erstellt. In Abbildung 12 ist gemäß der Präparation eine stochastische Verteilung von 2-Cys Peroxiredoxin-Komplexen zu sehen. Die Proteinkomplexe zeigen bei annähernd gleicher Größe eine heterogene und nicht kreisrunde Form. Dies könnte daran liegen, dass sie in Luft ihre natürliche Konformation verändern beziehungsweise den oxidierten Zustand verlassen. Der durchschnittliche apparente Durchmesser beträgt in Abbildung 12 etwa 30nm, was unter Berücksichtigung der Faltungseffekte Abbildung 8 etwa entspricht. Einer quantitativen Berechnung der Größe nach Gleichung 3 entzieht sich der Proteinkomplex jedoch aufgrund seiner Form. Auffällig ist, dass das in Abbildung 8 sichtbare Loch in der Mitte der Proteine nicht abgebildet wurde. Dies könnte verschiedene Ursachen haben. Einerseits könnte der Hohlraum auch in Luft mit Wasser gefüllt sein, was eine Penetration der Spitze verhindert. Andererseits ist es fraglich ob die Spitze (nach Abschnitt 4: $R \approx 30$ nm) überhaupt in die Öffnung eindringen kann, welche nach Abbildung 8 circa einen Durchmesser von nur circa 5 nm hat.

Weiter ist es möglich, dass der Komplex aufgrund der Messung in Luft seine Konformation so verändert hat, dass das Loch kleiner oder gar geschlossen ist. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass die Abbildung des pentagonförmigen Loches mit dem AFM (z.B. mit einer sehr guten Spitze und einem optimal gewählten Setpoint) zumindest als Delle visualisierbar wäre. In dieser Messung wurde die Probenlösung auf nicht funktionalisiertem Mica trocken gelassen. Dadurch haben sich neben den Proteinen noch andere Objekte auf der Oberfläche abgelagert, welche vermutlich aus dem Puffer stammen. Dennoch zeigt die Oberfläche eine geringe Rauigkeit.

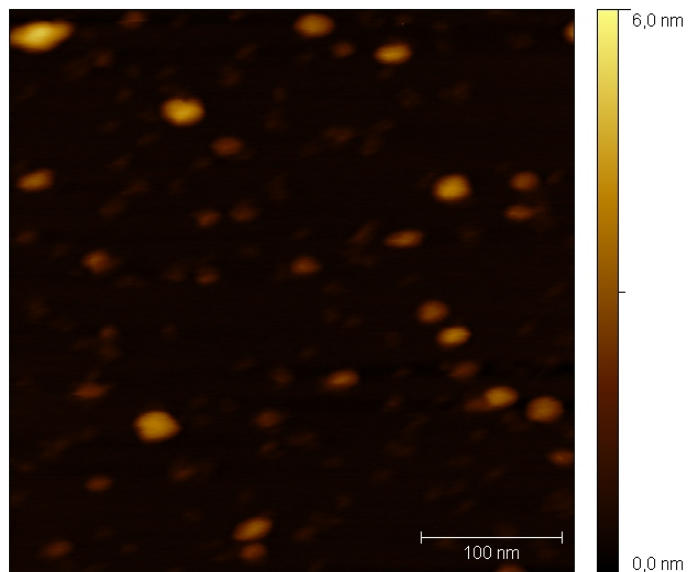
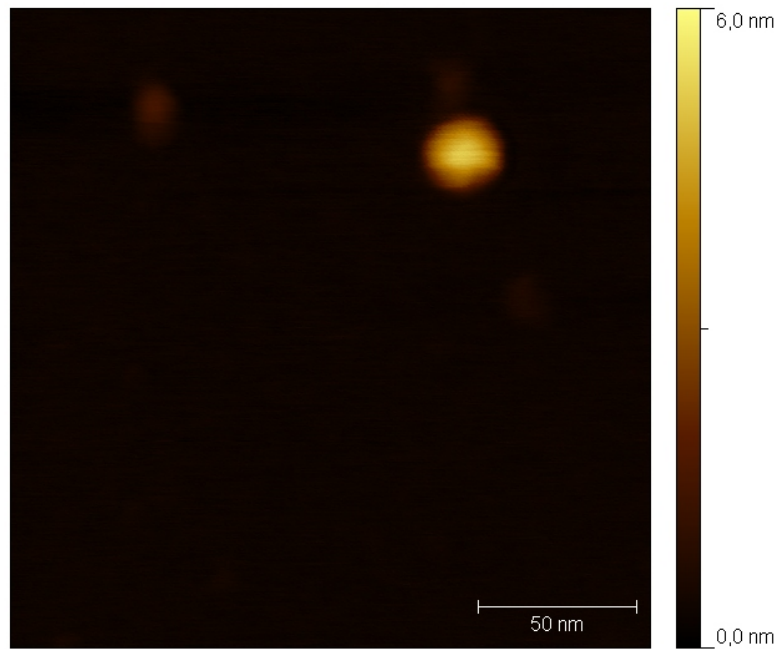


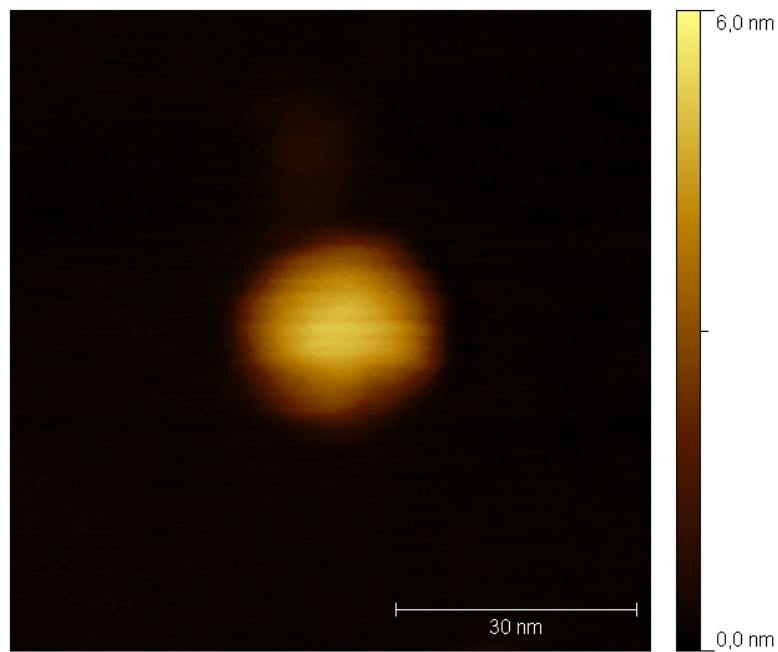
Abbildung 12: 2-Cys Prx-A in Luft auf Mica

Zur Bestimmung der Höhe wurde ein Decamer, welches annähernd kreisrund

abgebildet ist, näher herangezoomt (siehe Abbildung 13).



(a) 2-Cys Prx-A auf sil. Mica Scangröße 200nm



(b) Zoom in Abbildung 13(a)

Abbildung 13: 2-Cys Peroxiredoxin-A in Luft

Aus Abbildung 13(b) wurde ein Höhenprofil extrahiert.

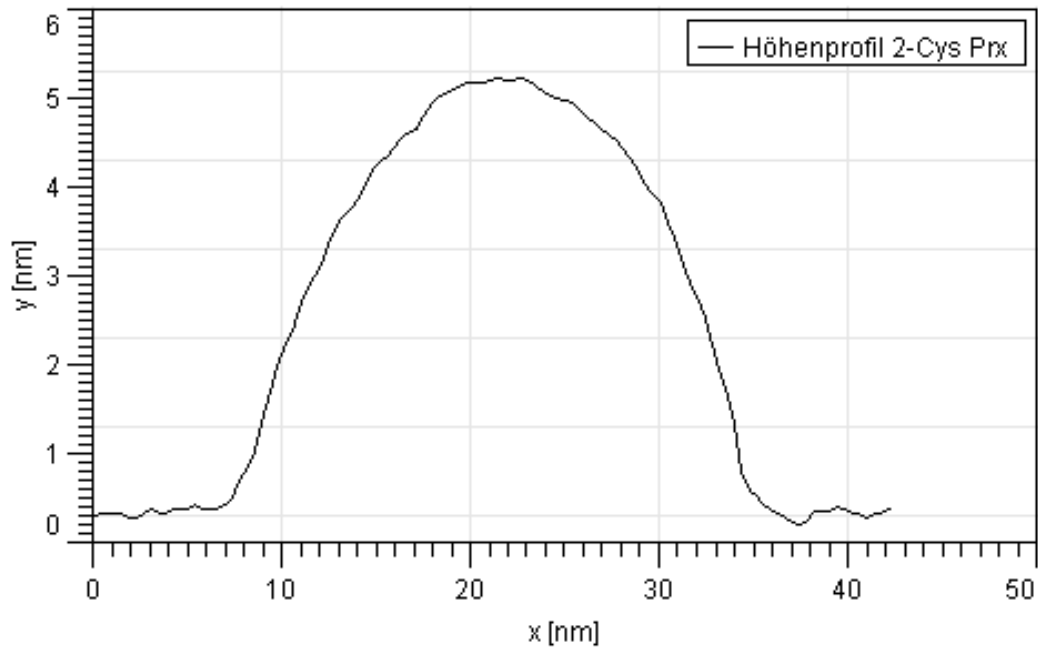


Abbildung 14: Höhenprofil 2-Cys Prx-A in Luft

Der Proteinkomplex in Abbildung 14 zeigt eine apparente Breite von 27 nm und steht somit für einen Komplex durchschnittlicher Größe bei den Messungen in Luft. Unter Berücksichtigung der Faltung und der Größenstreuung der Proteine passt diese Größe auch zum Literaturwert (15 nm). Das Höhenprofil zeigt am Hochpunkt eine Höhe von 4,75 nm. Das entspricht der aus Abbildung 8 ablesbaren Höhe aus der Seitenansicht (circa 5 nm), wenn man berücksichtigt, dass die Probe leicht durch die Spitze eingedrückt wird. Die zu erwartende Vertiefung im Protein ist auch in diesem Höhenprofil nicht zu sehen. Um eine eventuelle Konformationsänderung des Proteins als möglichen Grund dafür auszuschließen, wurden auch Messungen unter nahezu physiologischen Bedingungen in Puffer durchgeführt.

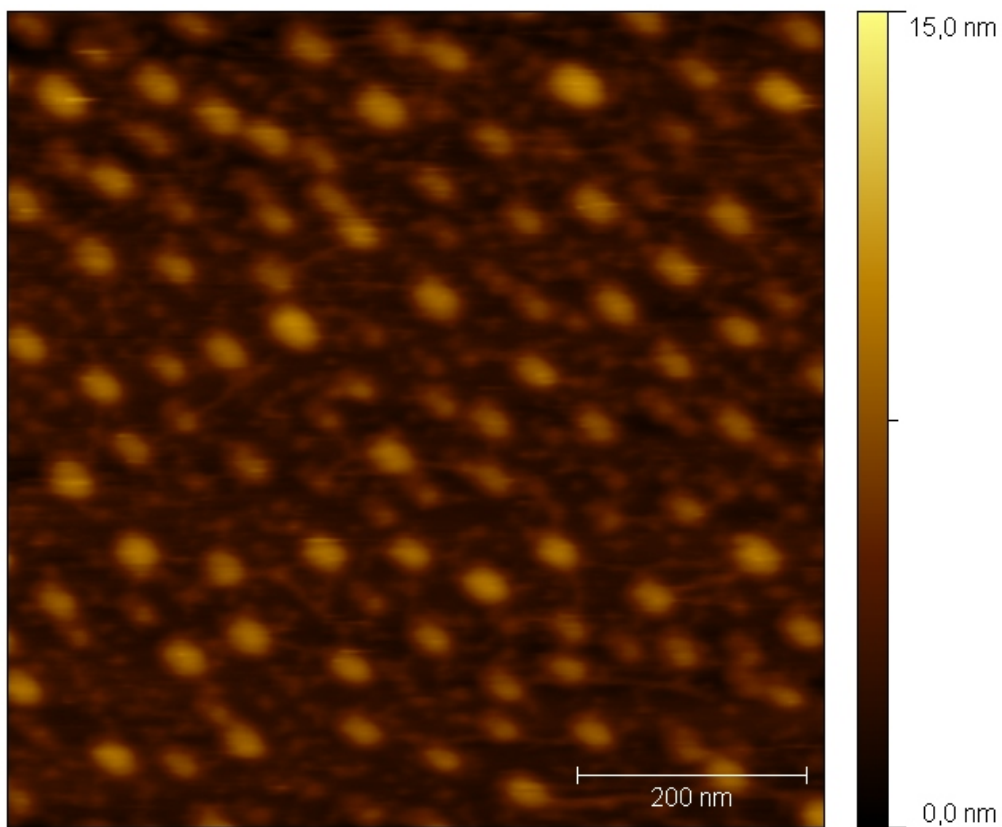


Abbildung 15: 2-Cys Prx in 0,04M Kpi-Puffer (pH 7), S-S

In Abbildung 15 ist zu sehen, dass die Decamere eine deutlich homogenere Form und Größe aufweisen als bei Messungen in Luft. Außerdem ist die Rauigkeit der Micaoberfläche deutlich höher, was wahrscheinlich auf Ablagerungen aus dem Puffer bei der Messung in Flüssigkeit zurückzuführen ist. Die Vertiefungen sind auch in Abbildung 15 nicht zu erkennen. Der durchschnittliche apparente Durchmesser der Proteine beträgt über 50 nm. Dies könnte zum einen an einem größeren Spitzenradius liegen. Eine andere Ursache könnte sein, dass die Proteine in Lösung größer beziehungsweise mit Ionen behaftet sind. Ob die abweichende Größe real ist, ist aus den Daten nicht eindeutig abzuleiten. Um dies zu überprüfen, müssten weitere Messungen in Flüssigkeit durchgeführt werden. Die Höhe entspricht mit durchschnittlichen $6\text{ nm} \pm 1\text{ nm}$ wiederum der in Abbildung 8 (siehe Abbildung 16).

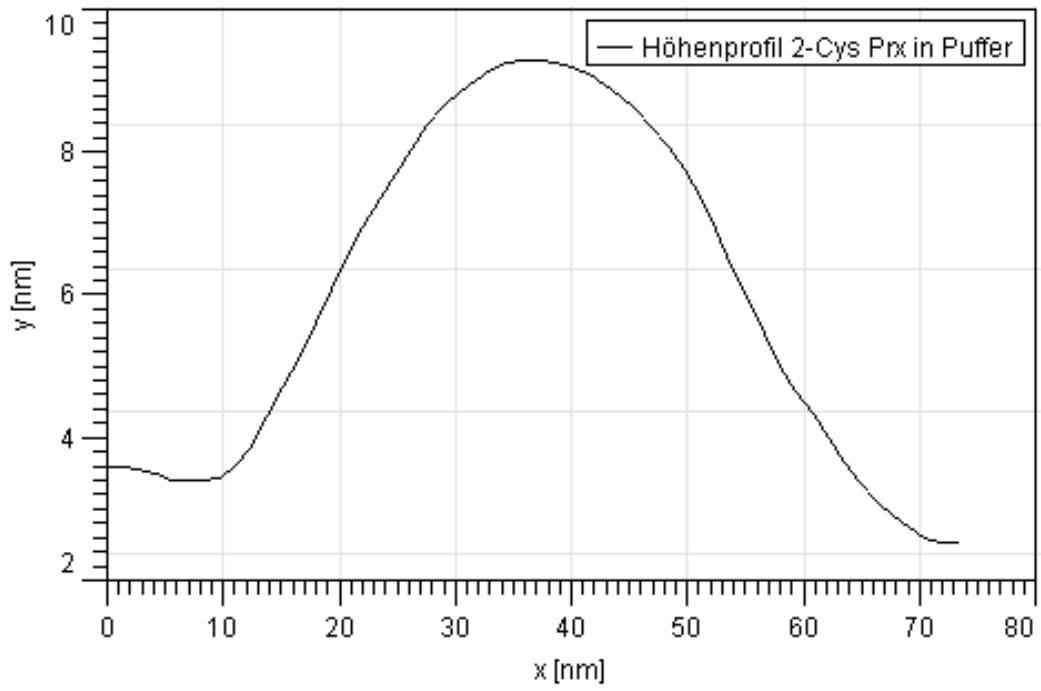


Abbildung 16: Höhenprofil 2-Cys Prx in 0,04M Kpi-Puffer (pH 7), S-S

5.2 Fe-Sucrose-Komplex Nanopartikel

Die folgenden topografischen AFM-Abbildungen ($1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$) zeigen Fe-Sucrose-Komplex-Partikel. Durch die hohe Verdünnung (150fach) wird jedoch gemäß Abschnitt 4 vermutet, dass fast keine Sucrose mehr an den mineralischen Kern gebunden ist. Das heisst, es handelt sich bei den abgebildeten Nanoclustern praktisch nur um die polynukleären FeOOH-Kerne. Die kugelförmigen Partikel aus vier verschiedenen Proben (Venofer, P_1 , P_2 , P_3) sind gemäß der Präparation stochastisch auf der Oberfläche verteilt. Die Abbildungen wurden alle mit der gleichen Spitze erstellt.

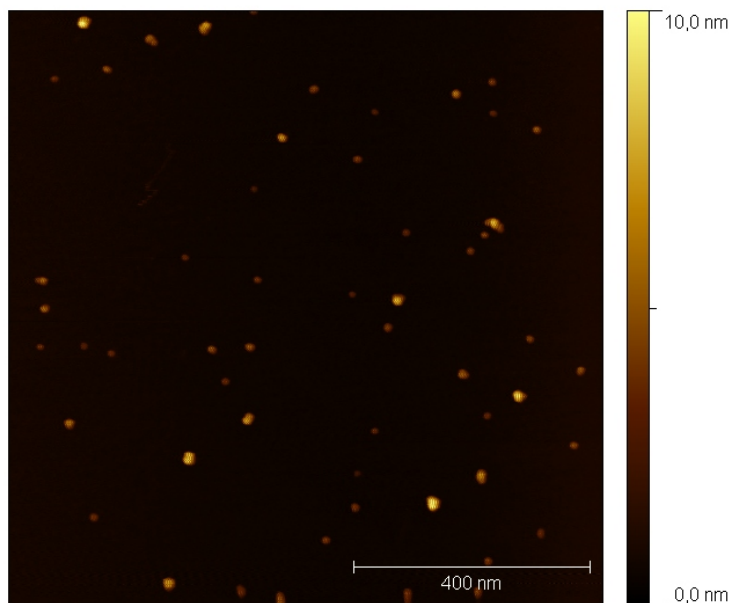


Abbildung 17: Fe-Sucrose-Komplex Venofer

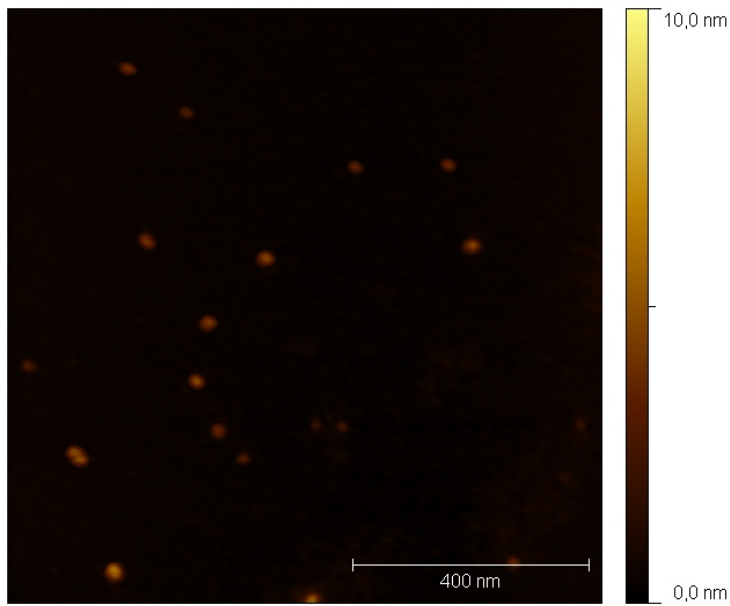


Abbildung 18: Fe-Sucrose-Komplex P_1

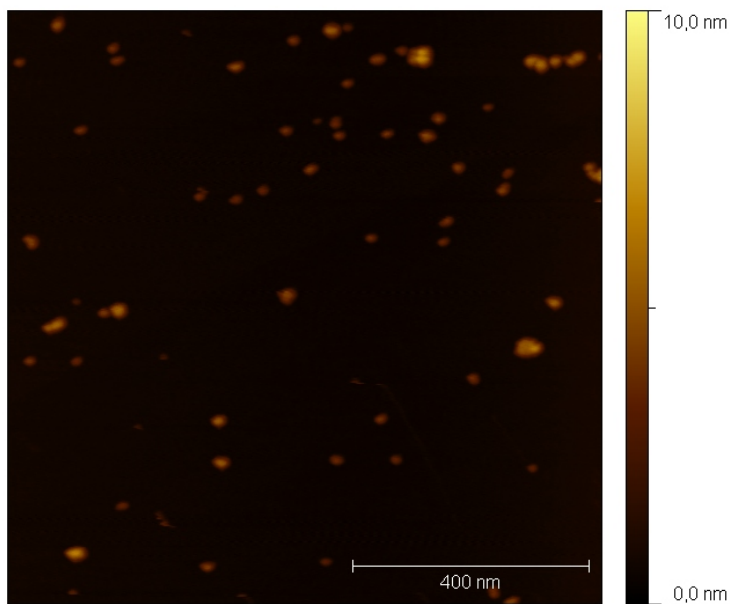


Abbildung 19: Fe-Sucrose-Komplex P_2

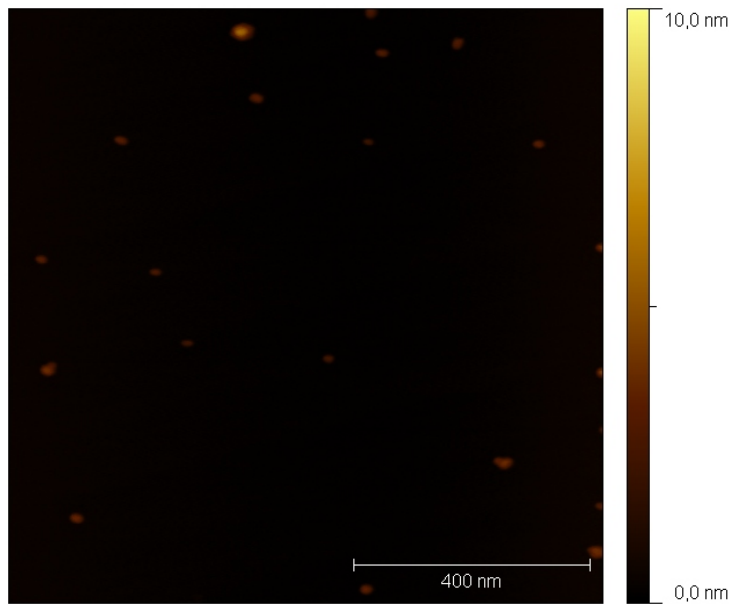


Abbildung 20: Fe-Sucrose-Komplex P_3

Abbildung 21 zeigt exemplarisch, wie für jede Probe die Halbwertsbreiten und Höhen von 40-100 Nanopartikeln aufgenommen und gemittelt wurden. Die Größe der Partikel wurde aus der direkt ablesbaren Höhe und dem gemittelten Spitzenradius $R \approx 30$ nm gemäß Abschnitt 4 und Gleichung 3 ermittelt. Hier ergibt sich aus dem Höhenprofil eines ausgewählten Teilchens eine Höhe von 3,6 nm. Aus der Halbwertsbreite von 20 nm und dem Spitzenradius $R \approx 30$ nm berechnet sich nach Gleichung 3 ein Durchmesser von 3,24 nm, was die sphärische Form bestätigt. Die Unsicherheiten der in Tabelle 1 angegebenen Mittelwerte ergeben sich aus der Größenstreuung der Partikel und aus Abweichungen durch die Verwendung verschiedener Spitzen bei Eichung und Messung.

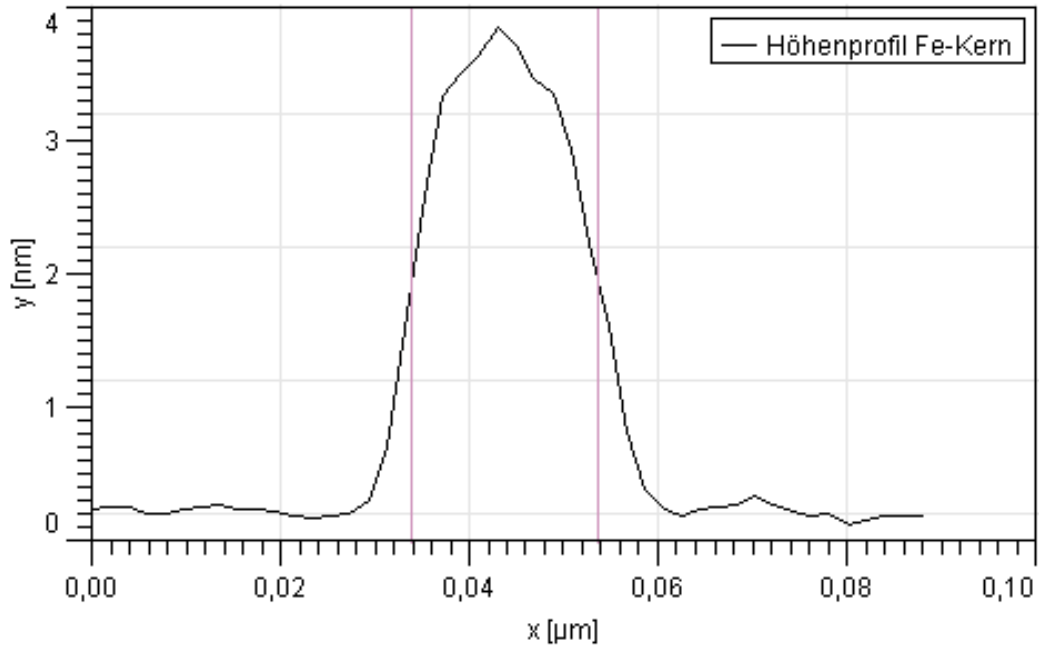


Abbildung 21: Höhenprofil Fe-Nanopartikel

Probe	mittlere Größe [nm]	Fehler [nm]
Venofor	4,0	$\pm 2,0$
P_1	3,5	$\pm 1,5$
P_2	3,3	$\pm 1,5$
P_3	3,3	$\pm 1,5$

Tabelle 1

Der ermittelte Wert für die Probe Venofor entspricht innerhalb des Fehlerbereiches dem in der Literatur angegebenen Wert von 3 ± 2 nm. Die Nanopartikel der Proben P_1 , P_2 , und P_3 sind etwas kleiner als die Referenzprobe von Venofor, allerdings im Rahmen der statistischen Fehler. Außerdem ist in den Abbildungen die leichte Tendenz zu erkennen, dass die Proben P_1 , P_2 , und P_3 eine homogenere Größenverteilung aufweisen als die Referenzprobe.

6 Resümee und Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein Proteinkomplex von 2-Cys Peroxiredoxin-A (Decamer) erfolgreich mit einem Rasterkraftmikroskop abgebildet. Es entstanden topografische Abbildungen durch Messungen in Luft und in physiologischer Umgebung (Puffer). Es gelang, die Proteine auf der Oberfläche zu immobilisieren. Die Abbildungen zeigen unter Berücksichtigung der Messfehler mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Durchmesser circa 15 nm, Höhe circa 5 nm) übereinstimmende Abmessungen. In Puffer zeigten die Proteine eine homogenere Form und größere apparente Ausdehnung (≈ 50 nm gegen ≈ 30 nm in Luft). Ob die abweichende Größe real oder durch die Verwendung verschiedener Spitzen bedingt war, geht aus den vorliegenden Daten nicht hervor. Weitere Messungen in Puffer könnten darüber Aufschluss geben. Das pentagonförmige Loch in der Mitte des Proteinkomplexes, welches die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen, konnte nicht abgebildet werden. Aufgrund der Tatsache, dass das 2-Cys Peroxiredoxin Thiol-Gruppen besitzt, könnte man in Folgeexperimenten versuchen, es auf einer Goldoberfläche zu immobilisieren, da diese sehr gut an Gold binden. Möglicherweise gelingt es damit, das Loch in der Mitte des oligomeren Enzyms zumindest als Delle abzubilden. Eine Messung in Puffer ist zwar aufwändiger, wäre aber den Ergebnissen zufolge aufgrund der besser gewährleisteten oxidativen Konformation vielversprechender.

Weiter gelang es, die mineralischen FeOOH-Kerne des Fe-Sucrose-Komplexes mit einem Rasterkraftmikroskop abzubilden und mit einer Referenzprobe (Venofen) in Größe und Form zu vergleichen. Die Größe wurde quantitativ ermittelt. Hierfür wurde ein geometrisches Modell verwendet, um Faltungseffekte heraus zu rechnen. Für die kugelförmigen Nanopartikel der Referenzprobe wurde ein Durchmesser von $D_{Ven} = 4.0 \pm 2.0$ nm ermittelt, welcher innerhalb des Fehlerbereichs mit dem Literaturwert (3 ± 2 nm) übereinstimmt. Für die restlichen Proben ergaben sich mittlere Durchmesser von $D_{P_1} = 3.5 \pm 1.5$ nm, $D_{P_2} = 3.3 \pm 1.5$ nm und $D_{P_3} = 3.3 \pm 1.5$ nm. Die Vergleichsproben sind etwas kleiner als die Referenzprobe, wenngleich sie innerhalb des Fehlerbereichs mit ihr übereinstimmen. In der Tendenz zeigten die Vergleichsproben eine etwas gleichmäßigere Größenverteilung als die Referenzprobe.

7 Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Dario Anselmetti und Dr. Katja Tönsing für die gute Betreuung meiner Arbeit.

Ebenfalls möchte ich Volker Walhorn und Andre Körnig für ihre Hilfe bei der Einarbeitung und ihre stets bereitwillige Unterstützung mit wichtigen Tipps danken.

Darüber hinaus danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe "Experimentelle Biophysik und angewandte Nanowissenschaften", die mit Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft zu einem angenehmen Arbeitsumfeld beitragen.

Literatur

- [1] ASH., E.A. ; NICHOLS., G.: Super-Resolution Aperture Scanning Microscope. In: *Nature London* 237, 510 (1972)
- [2] BATES, G. ; HEGENAUER, J. ; RENNER, P. ; SALTMAN, P. ; SPIRO, T.G.: In: *Bioinorg. Chem.* 2 (1973), S. 311,327
- [3] BINNIG, G. ; QUATE, C.F. ; GERBER, C.: Atomic Force Microscope. In: *Phys Rev Lett*, 56: 930-933 (1986)
- [4] BINNIG, G. ; ROHRER, H. ; GERBER, C. ; E., Weibel: Tunneling trough a controllable vacuum gap. In: *Appl Phys Lett*, 40: 178-180 (1982)
- [5] BINNIG, G. ; ROHRER, H. ; GERBER, C. ; WEIBEL, E.: Surface studies by scanning tunneling microscopy. In: *Phys Rev Lett*, 49: 57-61 (1982)
- [6] DIETZ, K.-J. ; JACOB, S. ; OELZE, M.-L. ; LAXA, M. ; TOGNETTI, V. ; MIRANDA, S. M. N. ; BAIER, M. ; FINKEMEIER, I.: The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. In: *Journal of experimental botany* 57 (2006)
- [7] DIETZ, K.J.: In: *Annu. Rev. Plant. Biol.* 54 (2003), S. 93–107
- [8] ENGEL, A. ; SCHOENEBERGER, C.-A. ; MÜLLER, D.J.: High resolution imaging of native biological sample surfaces using scanning probe microscopy. In: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7 (1997), S. 279–284
- [9] GYURESIK, B. ; NAGY, L.: In: *Coord. Chem. Rev.* 203 (2000), S. 81–149
- [10] HANSMA, H.G. ; SINSHEIMER, R.L. ; GROPE, J. ; BRUCE, T.C. ; ELINGS, V. ; GURLEY, G. ; BENZANILLA, M. ; MASTRANGELO, I.A. ; HOUGH, P.V.: Tapping ModeTM. In: *Scanning* 5 (1993), S. 296–9
- [11] HOFMANN, B. ; HECHT, H.J. ; FLOHE, L.: In: *Biol. Chem.* 383 (2002), S. 347–364
- [12] JANG, H. ; LEE, K. ; CHI, B. Y.and J. Y.and Jung ; PARK, S. ; PARK, J. ; LEE, J. ; LEE, S. ; MOON, J. ; YUN, J.: Two enzymes in one: Two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. In: *Cell* 117 (2004), S. 625–635
- [13] KNOLL, M. ; RUSKA, E.: Das Elektronenmikroskop. In: *Z. Physik* 78 (1932), S. 318–338
- [14] KUDASHEVA, D.S. ; LAI, J. ; ULMAN, A. ; COWMAN, M.K.: Structure of carbohydrate-bound polynuclear iron oxyhydroxide nanoparticles in parenteral formulations. In: *Jour Inorg Biochemistry*, 98: 1757-1769 (2004)

- [15] LAXA, M. ; BARRANCO-MEDINA, S. ; ROLOFF, N. ; FUHRMANN, A. ; ERB, S. ; ROS, R. ; SEIDEL, T. ; DIETZ, K.J.: Oxidized eukaryotic 2-Cys peroxiredoxin binds to DNA. (2007). – Universität Bielefeld
- [16] NAGY, L. ; SZORESİK, A.: In: *J. Biochem.* 89 (2002), S. 1–12
- [17] NISHIYAMA, Y. ; AL. et: In: *Bacteriol.* 183 (2001), S. 2431–2438
- [18] RHEE, S.G. ; KANG, S.W. ; CHANG, T.S. ; JEONG, W. ; KIM, K: In: *IUBMB* 52 (2001), S. 35–41
- [19] SYNGE, E.H.: A suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region. In: *Phil. Mag.* 6, 356-362 (1928)