

**RASTERKRAFTMIKROSKOPIE
UND KRAFTSPEKTROSKOPIE
AN EINZELNEN
BIOMOLEKÜLEN**

von

Frank Wilco Bartels

aus

Hamm (Westfalen)

Fakultät für Physik
Universität Bielefeld

zur Erlangung des akademischen Grades

Diplom-Physiker

vorgelegte Arbeit

April 2002

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und dabei keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.
(Mit einer Auslegung in der Universitätsbibliothek bin ich einverstanden.)

Bielefeld, den 29. April 2002

(Frank Wilco Bartels)

Gutachter:

Prof. Dr. Dario Anselmetti
Prof. Dr. Günter Reiss

Datum des Einreichens der Arbeit: 29. April 2002

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Physikalische Grundlagen	3
2.1	Rasterkraftmikroskopie.....	3
2.1.1	Aufbau	3
2.1.2	Abbildungsmodi.....	4
2.1.3	Rasterkraftmikroskopie an biologischen Systemen.....	5
2.2	Kraftspektroskopie	6
2.2.1	Meßprinzip	7
2.2.2	Kalibrierung der Kraftsensoren.....	8
2.2.3	Kraftspektroskopie an biologischen Systemen	9
2.3	Immobilisierung.....	9
2.3.1	Substrate	10
2.3.2	Funktionalisierung	11
2.4	Thermodynamik, Kräfte und Kinetik	11
3	Biologische Grundlagen	15
3.1	2-dimensionale Proteinkristalle	15
3.1.1	S-Layer	15
3.1.2	Annexin V-Kristalle auf Lipid-Doppelschichten	20
3.2	Protein-DNA-Interaktion	22
3.2.1	Dreidimensionale Struktur	22
3.2.2	Das Modellsystem <i>Sinorhizobium meliloti</i>	23
3.2.3	Die <i>exp</i> -Genregion.....	24
4	Materialien und Methoden	27
4.1	Instrumente.....	27
4.1.1	Das verwendete Rasterkraftmikroskop.....	28
4.1.2	Die Kraftsensoren.....	28
4.1.3	Abbildungsparameter	29
4.1.4	Aufbau und Meßprogramm zur Kraftspektroskopie	29
4.1.5	Auswertung der Kraft-Distanz-Kurven.....	29
4.2	Immobilisierung.....	31
4.2.1	S-Layer	31
4.2.2	Annexin V	32
4.2.3	DNA	32
4.2.4	Präparation zur Kraftspektroskopie	33
5	Experimente und Resultate	37
5.1	2-dimensionale Proteinkristalle	37
5.1.1	AFM-Aufnahmen von S-Layern.....	37
5.1.2	AFM-Aufnahmen von Annexin V-Kristallen.....	45
5.2	Protein-DNA-Interaktion	47
5.2.1	AFM-Aufnahmen	47
5.2.2	Kraftmessungen	52
6	Zusammenfassung und Ausblick	61
7	Glossar	63
8	Literaturverzeichnis	65
9	Danksagung	74

Kapitel 1

Einleitung

Naturam primum cognoscere rerum (Vor allem, um die Natur der Dinge in Erfahrung zu bringen).

– Lukrez, *De Rerum Natura* (um 55 v. Chr.)

Proteine erfüllen eine Schlüsselfunktion in nahezu allen biologischen Prozessen. Kollagen und Keratin beispielsweise sind Gerüstproteine, die den Hauptbestandteil der Haut, der Haare und des Bindegewebes von Organismen ausmachen. Als kontraktile Proteine kommen Aktin und Myosin im Muskelgewebe vor. Die Transportproteine Myoglobin und Hämoglobin befördern den für zelluläre Stoffwechselfvorgänge benötigten Sauerstoff. Die Immunabwehr der Wirbelträger beruht auf hochspezifischen Proteinen, den Antikörpern. Rezeptorproteine wie Rhodopsin vermitteln die Antwort von Nervenzellen auf spezifische Reize. Auch viele Hormone, die das Wachstum und die Differenzierung von Zellen steuern, sind Proteine, zum Beispiel das Insulin. Ohne Enzyme schließlich würden chemische Reaktionen *in vivo* nur selten in nennenswertem Umfang ablaufen.

Ein Protein ist gekennzeichnet durch die Abfolge seiner Aminosäuren. Je nach seiner Sequenz faltet sich die Aminosäurenkette zu einer für das Protein typischen dreidimensionalen Struktur, die auch seine Funktion bestimmt. Die Ausbildung komplementärer Oberflächen und Vertiefungen im Rahmen dieser Struktur ermöglicht es Proteinen, verschiedenartige Moleküle spezifisch zu erkennen und mit ihnen in Wechselwirkung zu treten. In der Biochemie wird häufig der Versuch unternommen, Moleküle zu entwickeln, die besser an ein gegebenes Protein binden und so seine natürliche Funktion blockieren können. Solche maßgeschneiderten Moleküle bilden die Grundlage für die Entwicklung neuer Medikamente.

Die Struktur und Funktion von Proteinen werden darum mit einer Vielzahl von Verfahren intensiv untersucht. In kristallographischen Studien werden Röntgenstrahlung, Neutronen- oder Elektronenbeugung eingesetzt, um Strukturinformationen zu erhalten. Die kernmagnetische Resonanzspektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) liefert zudem Aussagen über Dynamik und Konformationsänderungen von Proteinen. Daneben treten Rastersondenverfahren (Scanning Probe Microscopy, SPM), laserspektroskopische (Raman, Fluoreszenz) und kalorimetrische Methoden (Differential Scanning Calorimetry, DSC) sowie computergestützte Analysen in Form von Molekulardynamik-Simulationen.

Bei den meisten Meßverfahren wird der Mittelwert eines Ensembles bestimmt, zum Beispiel die gemittelte Struktur von 10^{13} Molekülen in einem Proteinkristall. Aufgrund der herausragenden Statistik sind die Mittelwerte homogener Proben recht verlässlich. Jedoch bleiben einer Ensemble-Messung charakteristische Abweichungen von den Standardeigenschaften verborgen, wie sie in Subpopulationen und heterogenen Proben auftreten können. An diesem Punkt setzen Einzelmolekülmethoden wie die zuvor erwähnten Rastersondenverfahren an, bei denen ein Meßwert das Verhalten eines individuellen Moleküls widerspiegelt.

Ein spezielles Rastersondenverfahren ist die Rasterkraftmikroskopie. Diese ermöglicht nicht nur Aufnahmen der Topographie einer Oberfläche und damit die Abbildung von darauf zu findenden Struktureigenschaften auf der Nanometer-Skala, sondern auch – in kraftspektroskopischen Untersuchungen – die Detektion von Kräften im Piconewton-

Bereich, wie sie bei intramolekularen Strukturübergängen und intermolekularen Wechselwirkungen auftreten. Die Rasterkraftmikroskopie hat sich in der Vergangenheit unter den Rastersondenverfahren durch die Möglichkeit ausgezeichnet, biologische Systeme schonend und in physiologischer Umgebung zu untersuchen.

Diese Arbeit soll rasterkraftmikroskopische und kraftspektroskopische Untersuchungen an einzelnen Biomolekülen vorstellen, die zwei unterschiedliche Gruppen von Proteinen repräsentieren. Zum einen sind dies Membranproteine (bakterielle S-Layer und Annexin V), zum anderen Regulatoren, welche die Genexpression auf der Ebene der Transkription kontrollieren. Dabei gelang es im Rahmen dieser Arbeit erstmals, die bei der Bindung eines regulatorischen Proteins an seine Ziel-Genregion wirkenden Kräfte zu messen sowie Aussagen über die kinetischen Eigenschaften dieser Bindung abzuleiten.

In den folgenden Kapiteln werden zunächst die physikalischen, chemischen und biologischen Grundlagen referiert. Um der Tatsache Rechnung zu tragen, daß diese Arbeit in einer Physik-Fakultät entstanden ist, wird den Erläuterungen zu den untersuchten biologischen Systemen dabei eine exponierte Stellung und ein erweiterter Umfang eingeräumt. An diesen Teil schließt sich eine Darstellung der verwendeten Materialien und Methoden an. Es folgt die Präsentation der durchgeführten Experimente und der erhaltenen Resultate; diese werden stets im Zusammenhang diskutiert. Abschließend soll auf der Basis einer Zusammenfassung ein Ausblick gegeben werden.

Kapitel 2

Physikalische Grundlagen

VT TENSIO, SIC VIS (Wie die Auslenkung, so die Kraft).

– Robert Hooke, *De Potentia Restitutiva* (1678)ⁱ

In diesem und dem folgenden Kapitel sollen die Grundlagen der Arbeit vorgestellt werden. Dabei wird zunächst den physikalischen und chemischen Voraussetzungen Beachtung geschenkt. Ausgehend vom Rasterkraftmikroskop als solchem werden die Prinzipien der Kraftspektroskopie, der für die Untersuchungen unabdingbaren Immobilisierung und der hinter den Kräften stehenden Thermodynamik und Kinetik erläutert.

2.1 Rasterkraftmikroskopie

Das Rasterkraftmikroskop zählt zu den **Rastersondenmikroskopen** (Scanning Probe Microscope, SPM). Diese Instrumente bestehen aus einer sehr feinen, teilweise atomar spitzen Sonde, die im Kontakt oder im Nahfeld (d.h. bei einem Abstand von <50 nm) in einem Raster über die zu untersuchende Probe geführt wird und dabei Punkt für Punkt Informationen über deren Oberfläche liefert. Als Informationen können dabei nicht nur topographische oder elektronische Bilder der Oberfläche, sondern auch lokale spektroskopische Daten erhalten werden. Die Rastersondenverfahren kombinieren eine präzise Kontrolle der Sondenbewegung relativ zur Oberfläche mit einer hochempfindlichen Detektion der Wechselwirkung zwischen Sonde und Probe. Letztere variiert mit dem speziellen Verfahren: Messung von Tunnelströmen im Nano- bis Picoampèrebereich zwischen einer leitenden Probe und einer metallischen Spitze beim **Rastertunnelmikroskop** (Scanning Tunneling Microscope, STM) [1,2], Lichtdetektion durch Glasfasern mit Blendenöffnungen von einigen 10 nm beim **optischen Nahfeldmikroskop** (Scanning Near-Field Optical Microscope, SNOM) [3] und Detektion der mechanischen Auslenkung eines mikrofabrizierten Federbalkens im Subångströmbereich beim **Rasterkraftmikroskop** (Atomic Force Microscope, AFM, oder auch Scanning Force Microscope, SFM) [4]. Es gibt noch eine Reihe weiterer Rastersondenverfahren, die sich aber nur durch die Art der detektierten Wechselwirkung (z.B. magnetisch oder elektrostatisch) von den bereits genannten Vertretern unterscheiden.

2.1.1 Aufbau

Der Sensor eines Rasterkraftmikroskopes besteht aus einem weichen Federbalken (Cantilever)ⁱⁱ, an dessen Ende sich Spitze (Tip) mit einem Radius von einigen Nanometern befindet. Während der Sensor eine Oberfläche abtastet, wird die zwischen Spitze und Probe wirkende Kraft durch die Verbiegung des Cantilevers gemessen. Zu diesem Zweck wird üblicherweise ein Laserstrahl auf die Rückseite des Cantilevers fokussiert, wo er

ⁱ Hooke veröffentlichte diese Erkenntnis bereits 1676 als Anagramm in “A Description of Helioscopes and some other Instruments”, um sich das Prioritätsrecht an seiner Entdeckung zu sichern.

ⁱⁱ An vielen Stellen der Rastersondenmikroskopie haben sich die englischen Bezeichnungen eingebürgert – so auch hier. Aus Gründen der Lesbarkeit wird im folgenden nur noch der Ausdruck Cantilever verwendet.

reflektiert wird und (über einen Spiegel) auf einen Quadrantenphotodetektor fällt [5,6]. Die detektierten Kräfte werden dabei als Rückkopplungssignal zur Steuerung der vertikalen Bewegung des Sensors über der Oberfläche verwendet. Sowohl diese als auch die horizontalen Rasterbewegungen werden von Stillelementen aus piezoelektrischen Keramiken übernommen.

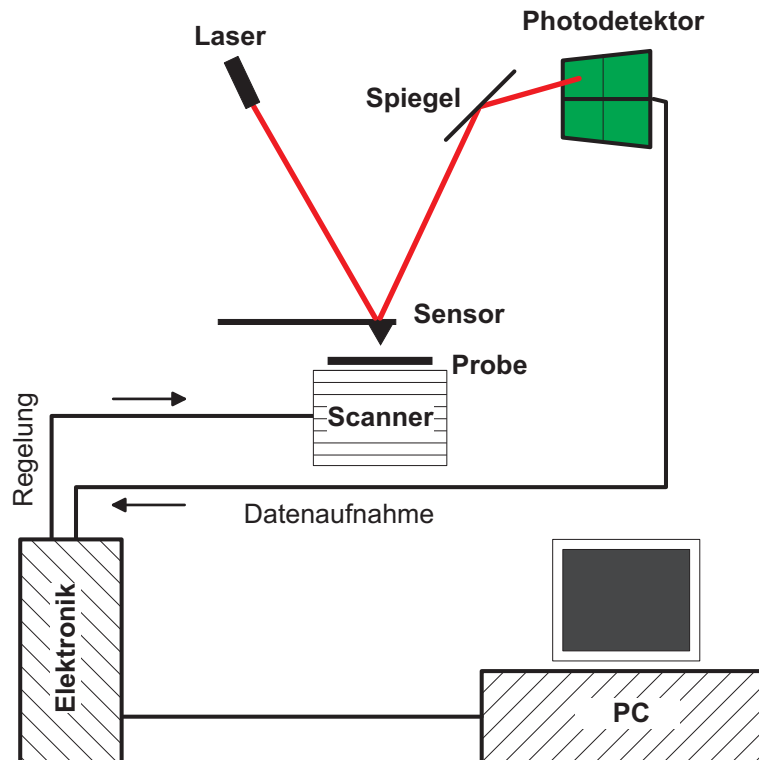


Abbildung 2.1: Das Rasterkraftmikroskop

Das AFM besteht aus einem Scanner mit piezokeramischen Stillelementen, welche die Probe (oder den Sensor) bewegen, einer optischen Detektionseinheit zur Bestimmung der Cantilever-Auslenkung und einer Elektronik zur Datenaufnahme und Regelung.

2.1.2 Abbildungsmodi

Abbildungsmodi können zunächst anhand der effektiven Kräfte zwischen Spitze und Probe unterschieden werden. Diese leiten sich aus dem Wechselwirkungspotential ab, das sich in erster Näherung einfach beschreiben lässt (Abbildung 2.2). Bei den **Kontaktmodi** (Contact Modes) wird das AFM im repulsiven Bereich (Pauli-Verbot) betrieben, also im direkten Kontakt mit der Oberfläche. Während des Rastervorgangs wird die Verbiegung des Cantilevers konstant gehalten, also entweder mit konstanter Kraft (Constant Force Mode; detektiert wird die vertikale Position der Spitze) oder mit konstantem Abstand (Constant Height Mode; detektiert wird die Position des Lasersignals auf der Photodiode) gemessen. Beide Methoden erzielen vor allem bei der Untersuchung harter Proben hohe Auflösungen. Beim **dynamischen Modus** (Nichtkontaktmodus, Non-Contact Mode) hingegen arbeitet das AFM hauptsächlich im attraktiven Bereich. Die Wechselwirkung der Spitze mit der Oberfläche wird dabei über Änderungen im Schwingungsverhalten des Cantilevers detektiert. Dazu wird der Cantilever zu Schwingungen nahe seiner Resonanzfrequenz angeregt. Bei Annäherung an die Oberfläche kommt es aufgrund der Kraftgradienten zwischen Spitze und Probe zu einer Verschiebung der Resonanzfrequenz des Cantilevers

und damit auch zu einer Änderung seiner Schwingungsamplitude, woraus sich der Abstand der Spitze von der Probe bestimmen lässt. Alternativ kann man auch das Phasenverhalten beobachten. Im dynamischen Modus berührt die Spitze die Oberfläche während einer Messung immer nur sehr kurz (Kontaktzeiten im μs -Bereich) [7], sie tippt oder klopft (engl. to tap) also an die Probe. Man bezeichnet diese Methode darum auch als **Tapping Mode**.

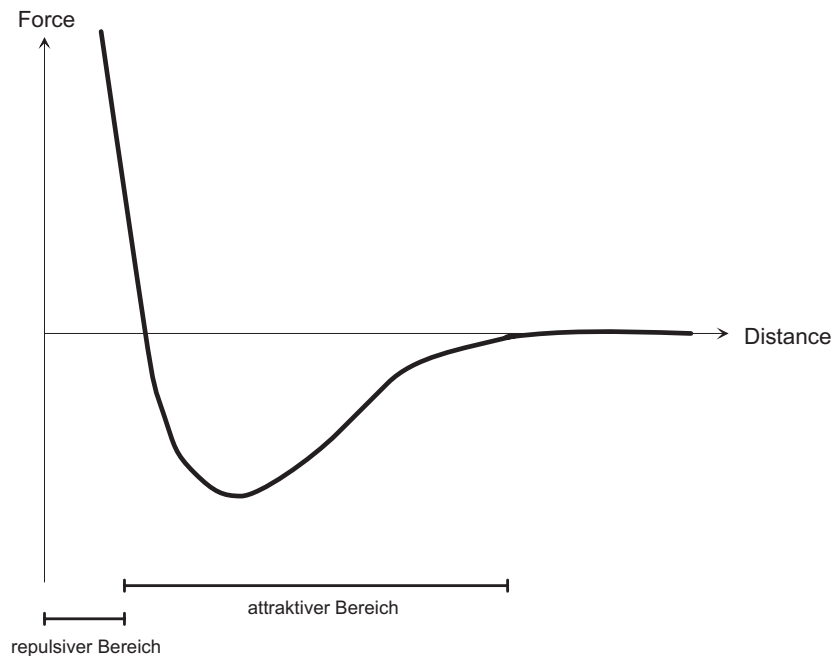


Abbildung 2.2: Kräfte zwischen Sensor und Probe

Diese qualitative Kurve lässt sich aus einem Lennard-Jones-Potential ableiten. Ausgewiesen sind die Bereiche, in denen die AFM-Modi hauptsächlich operieren: repulsiv (contact mode) und attraktiv (non-contact mode).

2.1.3 Rasterkraftmikroskopie an biologischen Systemen

Während zu Beginn der Rastersondenmikroskopie hauptsächlich Anwendungen in der Festkörper- und Oberflächenphysik im Vordergrund standen [2,8], erstreckte sich das Interesse bald auch auf andere Forschungsgebiete. Das AFM öffnete hier – trotz seiner verglichen mit dem STM etwas geringeren Auflösung – das Tor zu den Biowissenschaften [9], da es die Untersuchung von Systemen auf nichtleitenden und biokompatiblen Oberflächen erlaubte. Auch war es damit möglich, Biomoleküle unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen [10]. Mit dem Tapping Mode stand schließlich auch eine Methode zur Abbildung fragiler Systeme zur Verfügung (p.e. [11]).

Eine Vielfalt von biochemischen und molekularbiologischen Erkenntnissen wurde seither durch Rasterkraftmikroskopie gewonnen [12]. Studien an Zelloberflächen (p.e. [13]) und Virionen (siehe Abbildung 2.3) wurden ebenso durchgeführt wie Aufnahmen von Nukleinsäuren (p.e. [14]), DNA-Protein-Wechselwirkungen (p.e. [15-16]) und Membranmolekülen (p.e. [17-19]), um nur einige Arbeiten zu nennen.ⁱⁱⁱ

ⁱⁱⁱ Helen Hansma bemerkt dazu in [133]: “In the early 1990s, it was not too much of a stretch to write review articles about the first several years of the entire field of biological AFM with ~130 references. More recent reviews of biological AFM for only one year periods cited half as many references, and now this review, specific for AFM studies of DNA since the mid-1990s, needs >150 references.”

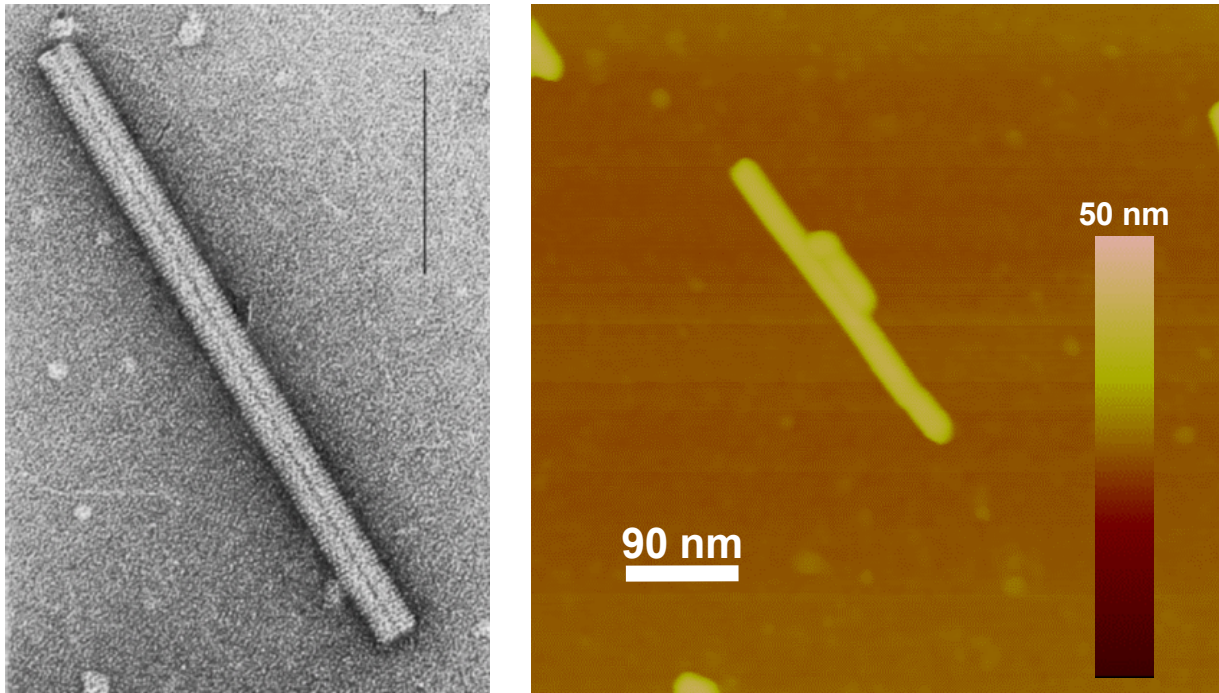


Abbildung 2.3: Rasterkraftmikroskopie an Virionen

Der Tabakmosaikvirus (TMV) gehört zu den bestuntersuchten biologischen Systemen. Die stabförmigen Viruspartikel (Virionen) von etwa 300 nm Länge und 18 nm Durchmesser waren nicht nur die ersten elektronenmikroskopisch untersuchten biologischen Objekte überhaupt [20], sondern auch bereits Gegenstand einer Reihe von AFM-Studien (p.e. [18]). Beide Methoden sind in der Lage, die Dimensionen des Virions korrekt zu ermitteln. EM-Aufnahme (links) aus [21], AFM-Aufnahme (rechts) vom Autor.

2.2 Kraftspektroskopie

Intermolekulare Kräfte können ihrem Ursprung nach grob in drei Kategorien eingeteilt werden [22]. Zunächst sind da die Kräfte, welche aus der Coulomb-Wechselwirkung zwischen Ladungen herrühren und rein **elektrostatischer** Natur sind. Ionische Bindungen, Hydratationskräfte und Wasserstoffbrückenbindungen fallen in diese Gruppe. Dann gibt es **Polarisationskräfte**, die auftreten, wenn Dipolmomente in Molekülen durch die elektrischen Felder naher Ladungen und permanenter Dipole induziert werden. Alle Wechselwirkungen in Lösung beinhalten solche Polarisierungseffekte. Und schließlich existieren noch Kräfte **quantenmechanischen** Ursprungs. Diese Kräfte führen zu kovalenten Bindungen und zu den repulsiven sterischen oder Austausch-Wechselwirkungen (aufgrund des Pauli-Verbotens). Die vorgenannte Einteilung ist jedoch weder streng noch erschöpfend; die van der Waals-Wechselwirkung^{iv} beispielsweise läßt sich nicht eindeutig einer der Kategorien zuordnen.

Diejenigen Kräfte zu verstehen, welche die spezifischen Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen bestimmen, ist kein leichtes Unterfangen, da die **molekulare Erkennung** zweier Biomoleküle (Schlüssel-Schloß-Prinzip) aus einer Vielzahl unspezifischer, schwacher

^{iv} Einen entscheidenden Beitrag zur van der Waals-Wechselwirkung liefern Dispersionskräfte, welche zwar quantenmechanischen Ursprungs sind, aus denen sich jedoch Wechselwirkungen ergeben, die ihrem Wesen nach immer noch elektrostatisch sind – eine Art quantenmechanische Polarisationskraft.

und nicht-kovalenter Bindungen resultiert, die nur durch ihre einzigartige räumliche Anordnung zu einer spezifischen Bindung werden.

Um solche schwachen Wechselwirkungen direkt an einzelnen Molekülen zu untersuchen, wurden verschiedene Methoden angewandt, darunter der Surface Force Apparatus (SFA) [23], Mikropipetten [24], magnetische Beads [25] und optische Pinzetten [26]. Letztere ermöglichen zwar eine hochempfindliche Kraftdetektion, sind jedoch hinsichtlich der Probengröße limitiert (Biopolymere müssen im allgemeinen länger als etwa 2 μm sein).

Das Rasterkraftmikroskop läßt sich in besonders naheliegender Weise als Kraftmesser verwenden. Während in den Abbildungsmodi die Probenoberfläche abgerastert wird, behält man im Wechselwirkungsmodus die Position des Sensors über der Probe bei und mißt die Wechselwirkung zwischen beiden als Funktion ihres gegenseitigen Abstands. Werden bestimmte Moleküle auf Probe und Spitze immobilisiert, läßt sich die Wechselwirkung zwischen diesen Molekülen und deren Verhalten unter äußeren Kräften studieren. Dieses Verfahren bezeichnet man als **Kraftspektroskopie**. Die auf den Sensor wirkenden Kräfte lassen sich aus der Verbiegung des Cantilevers bestimmen, und die kleinen Spitzenradien gestatten dabei eine hohe Ortsauflösung dieser Kräfte.

2.2.1 Meßprinzip

Bei einer **Kraft-Distanz-Messung** wird der Sensor der Probe angenähert und danach wieder zurückgezogen. Dabei durchläuft das System mehrere Phasen, die sich in der gemessenen Kurve niederschlagen (Abbildung 2.4).

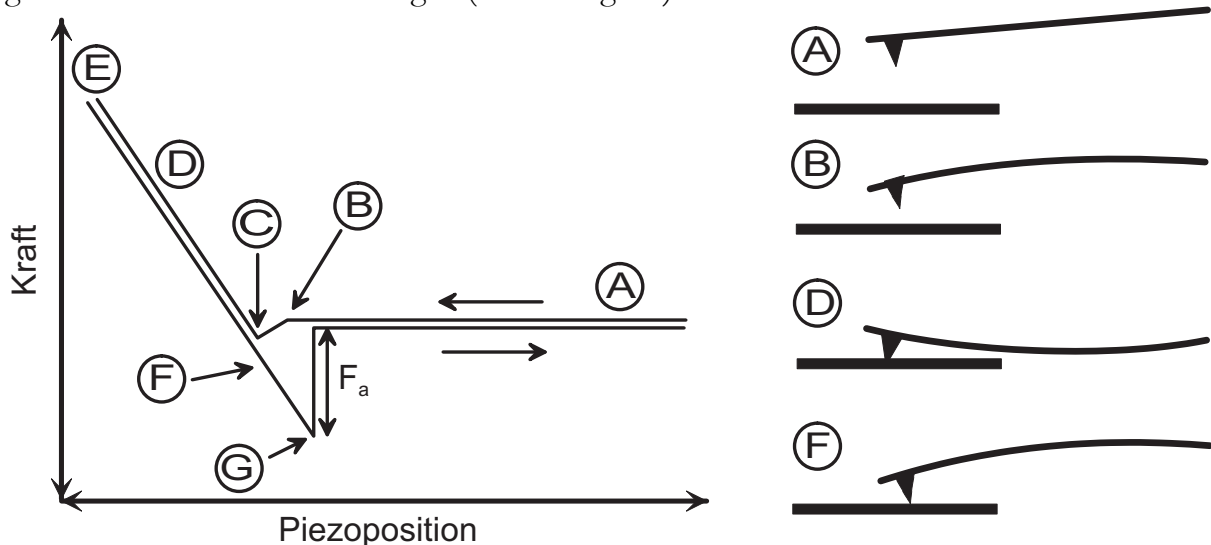


Abbildung 2.4: Schema einer Kraft-Distanz-Kurve

Zunächst ist die Spitze noch weit von der Oberfläche entfernt, und es wirken keine Kräfte (A). Bei weiterer Annäherung verbiegt sich der Cantilever aufgrund der wirkenden Kräfte, und zwar zur Probe hin im Falle attraktiver Kräfte (van der Waals, elektrostatisch) oder von der Probe weg im Falle repulsiver Kräfte (elektrostatisch) (B; gezeigt ist der attraktive Fall). Bei jedem Abstand verbiegt sich der Cantilever, bis seine elastische (rückstellende) Kraft die Wechselwirkungskraft zwischen Spitze und Probe kompensiert und sich das System im Gleichgewicht befindet. An einem gewissen Punkt (C) gerät die Spitze in Kontakt mit der Probe. Attraktive Kräfte führen dazu, daß die Spitze aus einer größeren Distanz in den Kontakt mit der Probe „springt“. Im Kontakt wird der Cantilever proportional zur Piezoposition ausgelenkt (D). Da die Bewegung des z-Piezos wohldefiniert ist, läßt sich die Kurve an dieser Stelle kalibrieren: Mit der Steigung im Kontaktbereich und der

Federkonstanten des Cantilevers kann man die an der Photodiode gemessenen Signale in Kraftwerte umrechnen. Bei einer zuvor bestimmten maximalen Auslenkung des Cantilevers (**E**) wird die Bewegung umgekehrt. Beim Zurückziehen führen attraktive Wechselwirkungen zu einer Hysterese der Auslenkung (**F**). Der Cantilever wird zur Oberfläche hin verbogen, bis die elastische Kraft die attraktive übersteigt (**G**). An diesem Punkt reißt die Bindung zwischen Spitze und Probe ab, und der Cantilever relaxiert in die Ruhelage. Die Kraftdifferenz an der Sprungstelle wird als **Abrißkraft** F_a bezeichnet. Sobald der Sensor wieder seine ursprüngliche Position erreicht hat, kann der Zyklus erneut durchlaufen und die nächste Kraft-Distanz-Kurve aufgenommen werden.

Es ist eine wohlbekannte Tatsache [27], daß sowohl die Probe als auch der Sensor von dünnen Wasserfilmen bedeckt sind, wenn das AFM an Luft betrieben wird. Diese Wasserschicht erzeugt Kapillarkräfte, welche die schwachen van der Waals-Kräfte überdecken und die Kraft-Distanz-Kurven dadurch dramatisch verändern können. Kraftspektroskopische Untersuchungen sollten darum stets in Flüssigkeiten, im Vakuum oder in einer trockenen Stickstoff-Umgebung stattfinden. Bei Biomolekülen sind wäßrige Lösungen zu bevorzugen, welche die native Struktur der Objekte erhalten.

2.2.2 Kalibrierung der Kraftsensoren

Wie bereits erwähnt, ist zur Bestimmung der Kräfte eine genaue Kenntnis der Federkonstanten des verwendeten Cantilevers vonnöten. Da diese mitunter eine erhebliche Abweichung von den Herstellerangaben aufweist, muß eine unabhängige Kalibrierung vorgenommen werden. Dafür stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung: Man kann die Federkonstante aus der Geometrie des Cantilevers errechnen [28], durch Kopplung des Cantilevers mit einer Eichfeder [29] oder Beladen mit einer zusätzlichen Masse [30] bestimmen oder aus seinem thermischen Rauschverhalten ableiten [31]. Die Idee des letztgenannten Verfahrens, das auch in dieser Arbeit Verwendung findet, soll im folgenden kurz skizziert werden.

Ein harmonischer Oszillator im Gleichgewicht mit seiner Umgebung fluktuiert aufgrund des thermischen Rauschens. Der Hamilton-Operator für dieses System ist durch

$$H = \frac{p^2}{2m} + \frac{1}{2} m \omega_0^2 q^2 \quad (2.1)$$

gegeben, wobei q die Auslenkung des Oszillators, p der Impuls, m die oszillierende Masse und ω_0 die Resonanzfrequenz bezeichnet. Nach dem Äquipartitionstheorem gilt

$$\left\langle \frac{1}{2} m \omega_0^2 q^2 \right\rangle = \frac{1}{2} k_B T \quad (2.2)$$

mit der Boltzmann-Konstante k_B und der Temperatur T . Wegen $\omega_0^2 = k/m$ folgt für die Federkonstante k des Cantilevers

$$k = \frac{k_B T}{\langle q^2 \rangle}. \quad (2.3)$$

Bei kleinen Auslenkungen kann der Cantilever als harmonischer Oszillator mit nur einem Freiheitsgrad betrachtet werden. Das Spektrum der Fluktuationen hat – in Abwesenheit anderer Rauschquellen – ein Lorentzprofil. k ergibt sich damit zu

$$k = \frac{k_B T}{P}, \quad (2.4)$$

wobei P sich nach dem Mittelwertsatz der Integralrechnung aus der Fläche unter der Resonanzkurve bestimmen läßt.

2.2.3 Kraftspektroskopie an biologischen Systemen

Erste Kraft-Distanz-Messungen wurden zwischen physikalischen Oberflächen durchgeführt [32]. Bei der Untersuchung biologischer Systeme müssen jedoch noch einige besondere Voraussetzungen an die Experimente gestellt werden. Zunächst einmal müssen die Biomoleküle hinreichend fest auf Sensor und Oberfläche immobilisiert werden (siehe Abschnitt 2.3), aber dennoch so, daß ihre Bindungsstellen frei zugänglich sind. Dann muß die Funktionalität der Moleküle durch die Wahl einer geeigneten Pufferlösung und das Vermeiden zu großer Andruckkräfte der AFM-Spitze auf die Probe gewährleistet bleiben. Schließlich muß die Spezifität der Abrisse überprüft werden, was in der Regel durch eine spezifische Blockade der Bindung (z.B. durch Zugabe freier Bindungspartner in Lösung) geschieht.

Die ersten Experimente dieser Art wurden am Biotin/Streptavidin-System durchgeführt [33]. Diese Bindung ist eine der stärksten und am besten untersuchten Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen in der Biologie. Eine Reihe weiterer Arbeiten an Streptavidin und dem engverwandten Protein Avidin mit verschiedenen Biotin-Derivaten unterstreicht den Modellcharakter des Systems [34-38]. Kraftmessungen zwischen Antikörper-Antigen-Paaren (zunächst [39,40]; später [41,42]) erforderten wegen der komplexeren und fragileren Struktur dieser Moleküle vor allem Fortschritte in der Immobilisierung. Untersuchungen weiterer Protein-Protein-Wechselwirkungen wurden z.B. an Zelladhäsions-Proteoglycanen [43], Chaperonen und Substratproteinen [44] sowie P-Selectin und Liganden [45] vorgenommen.

Daneben gibt es eine Fülle von Experimenten zur Messung intramolekulärer Kräfte, beispielsweise an komplementären DNA-Strängen [46,47]. Bemerkenswert sind auch Untersuchungen zur Entfaltung von Proteindomänen, z.B. an Polysacchariden [48], an Immunoglobulin- und Fibronectin-Domänen des Titins [49,50], an Calmodulin [51] sowie an S-Layern [52,53]. Einen guten Überblick über das Gebiet der Kraftspektroskopie bietet [54].

2.3 Immobilisierung

Um Biomoleküle rasterkraftmikroskopisch zu untersuchen, müssen diese auf einer möglichst flachen Oberfläche (dem **Substrat**) immobilisiert werden. Die Größe der während der Messungen auf die Moleküle ausgeübten Kräfte bestimmt dabei, ob eine schwache und unspezifische Immobilisierung genügt, oder ob die Objekte fest und kovalent an die Oberfläche zu binden sind. Die Güte einer Immobilisierung wird vor allem von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Biomoleküle und der Oberfläche sowie den Umgebungsbedingungen bestimmt. Im einfachsten Fall verfügen die Moleküle über reaktive Gruppen, welche direkt mit dem Substrat Bindungen eingehen können. Häufig ist man jedoch gezwungen, die Oberfläche entsprechend zu modifizieren oder die Moleküle mit geeigneten reaktiven Gruppen auszustatten. Dieses Vorgehen bezeichnet man als **Funktionalisierung**.

2.3.1 Substrate

Neben den Ladungseigenschaften eines Substrates ist vor allem seine Rauigkeit von Bedeutung. Hochauflösende AFM-Abbildungen sind nur möglich, wenn die Rauigkeit der Oberfläche kleiner als die typischen Korngattungen der zu untersuchenden Moleküle ist (d.h. kleiner als etwa 1 nm). Ein Standardsubstrat ist hier der Glimmer (Mica), ein Schichtsilikat, welches sich leicht entlang definierter Ebenen spalten läßt, so daß atomar flache, negativ geladene Oberflächen entstehen [17]. Andere geeignete und häufig verwendete Materialien sind Graphit, Glas, Silizium und unter speziellen Bedingungen aufgedampfte Goldschichten. Zudem ist die Anbindung an Siliziumnitrid (Si_3N_4) bedeutsam, da die zur Kraftspektroskopie eingesetzten AFM-Spitzen aus diesem Material bestehen.

Eine etwaige elektrostatische Abstoßung von Oberfläche und Molekülen läßt sich reduzieren oder sogar kompensieren, wenn der pH-Wert einer Pufferlösung entsprechend gewählt wird. Häufig ist man jedoch hinsichtlich der Funktionalität der Moleküle in der Wahl des pH-Wertes eingeschränkt. In diesem Fall bietet sich die Zugabe entsprechender Ionen in den Puffer an (Abbildung 2.5b).

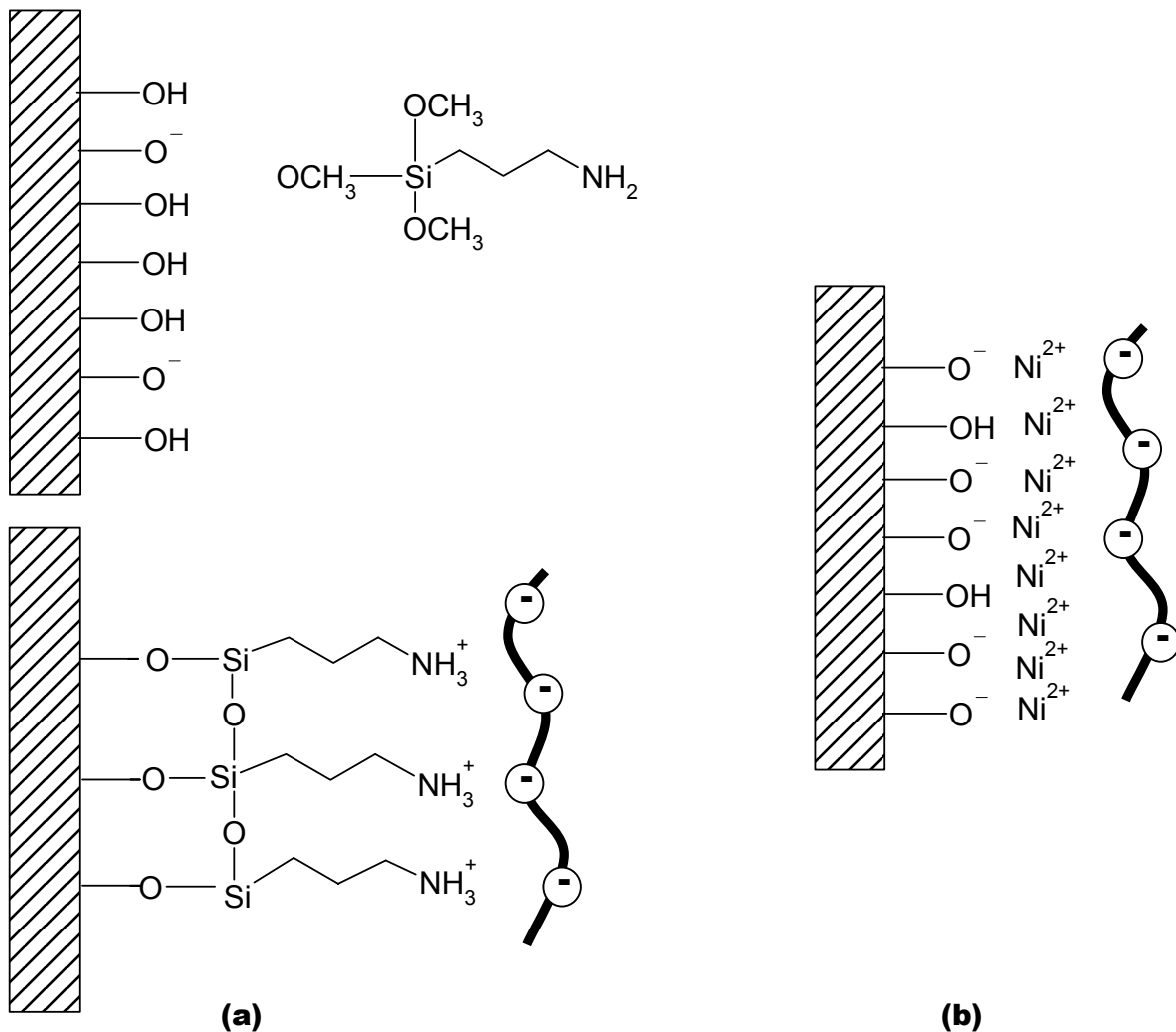


Abbildung 2.5: Immobilisierung von DNA

(a) Funktionalisierung einer OH-terminierten Oberfläche (aktiviertes Glas, Si, Si_3N_4 oder Glimmer) mit Aminopropyl-triethoxysilan (APTES). (b) Kompensation der Oberflächenladungen durch zweiwertige Kationen. Beide Methoden eignen sich – wie angedeutet – beispielsweise zur Immobilisierung von DNA, die aufgrund ihres Phosphatrückgrates negativ geladen ist.

2.3.2 Funktionalisierung

Oberflächen werden in geeigneter Weise durch spezielle Moleküle modifiziert, die möglichst homogene Monolagen ausbilden (Self-Assembled Monolayers, SAM). Üblicherweise werden dazu Alkanthiole oder Organosilane verwendet. Alkanthiole sind lipid-ähnliche organische Moleküle, die aus einer Alkylkette mit einer SH-Gruppe an einem und einer funktionellen Gruppe am anderen Ende bestehen. Organosilane dagegen bestehen aus einem Silizium-Atom und einer Alkylkette, welche die funktionelle Gruppe des Silans trägt, wobei mindestens eine der anderen drei Bindungen des Silizium-Atoms in einer Methoxy- oder Ethoxygruppe endet, die mit einem anorganischen Substrat reagieren kann. Die Endgruppen (z.B. $-\text{NH}_2$, $-\text{CH}_3$) der Thiole und Silane bestimmen dann die Eigenschaften der mit ihnen funktionalisierten Oberflächen [55] (Abbildung 2.5a).

Die Modifikation von Biomolekülen geschieht üblicherweise durch **Linker** (Crosslinker, Spacer), kettenartige Moleküle, die (meistens unterschiedliche) funktionelle Gruppen an beiden Enden tragen. Damit kann man nicht nur eine kovalente Bindung zwischen Molekül und Oberfläche erreichen, sondern zudem über die Länge der Linker den Abstand zwischen Molekül und Oberfläche so einstellen, daß die ursprüngliche Aktivität der Biomoleküle erhalten bleibt. Als Angriffspunkte für die kovalenten Bindungen bieten sich dabei die Aminosäurereste in Proteinen an, die auch zur Markierung mit Fluoreszenzmarkern und radioaktiven Isotopen genutzt werden. Besonders geeignet sind hier die Aminogruppe von Lysin, die Thiolgruppe von Cystein und die Carboxylgruppen von Glutamat und Aspartat [39,56].

2.4 Thermodynamik, Kräfte und Kinetik

Die entscheidende Frage an die Kraftspektroskopie besteht darin, in welcher Weise sich von den ermittelten Kräften auf biochemische Reaktionsparameter schließen läßt. Die Antwort wird durch die sogenannte **Ratentheorie** gegeben ([57-61]; für einen ausführlichen Überblick siehe [62]), deren Grundaussagen im folgenden skizziert werden sollen. Als Beispiel dient dabei die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Bindung eines regulatorischen Proteins (P) an DNA (D) zu einem Protein-DNA-Komplex (PD). Für diese Reaktion gilt



Dabei sind $[P]$ und $[D]$ die Konzentrationen der freien Proteine und DNA-Moleküle in der Lösung, $[PD]$ dagegen die der gebundenen Komplexe. Die **On-Rate** v_{on}^0 (in $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) und die **Off-Rate** v_{off}^0 (in s^{-1}) sind die Raten der Hin- und Rückreaktion. Der Kehrwert der Off-Rate $\tau = 1/v_{\text{off}}^0$ gibt die mittlere Lebensdauer der Bindung an. Bei konstantem Druck und konstanter Temperatur T ist die **freie Reaktionsenthalpie** definiert als

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = G_2 - G_1, \quad (2.6)$$

die Differenz aus den Gibbschen freien Enthalpien ($G = H - TS$) von End- und Anfangszustand (ΔH : Reaktionsenthalpie, ΔS : Entropieänderung im System). Unter Einführung einer **freien Standard-Enthalpie** ΔG^0 (bei Normdruck) läßt sich für die freie Reaktionsenthalpie schreiben:

$$\Delta G = \Delta G^0 - RT \ln \frac{[P][D]}{[PD]}, \quad (2.7)$$

wobei $R = N_A k_B = 8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ die molare Gaskonstante bezeichnet.
Im Gleichgewicht gilt dann

$$\frac{[P][D]}{[PD]} = \frac{v_{off}^0}{v_{on}^0} = K_D, \quad (2.8)$$

wodurch die **Dissoziationskonstante** K_D des Komplexes (in M) definiert ist, aber auch $\Delta G = 0$, also

$$\Delta G^0 = RT \ln K_D. \quad (2.9)$$

Für Reaktionen, die bei konstantem Volumen durchgeführt werden, tritt an die Stelle der freien Reaktionsenthalpie die **freie Reaktionsenergie**^v $\Delta\Phi = \Delta U - T\Delta S = \Phi_2 - \Phi_1$, die Differenz der freien Energien $\Phi = G - pV$ von End- und Anfangszustand (freie Enthalpie und freie Energie unterscheiden sich um die Verdrängungsenergie des Systems). Alle Aussagen über ΔG , die für Systeme bei konstantem Druck gelten, gelten analog für $\Delta\Phi$ für Systeme bei konstantem Volumen.

Die Dissoziation des Komplexes kann als Überwinden einer Potentialbarriere^{vi} aufgrund **thermischer Fluktuationen** interpretiert werden (Abbildung 2.6a). Der Zusammenhang zwischen der Höhe der Potentialbarriere $\Delta\Psi$ und der Off-Rate ist dann nach Arrhenius [57] durch folgenden Ausdruck gegeben:

$$v_{off}^0 = C e^{-\beta\Delta\Psi}, \quad (2.10)$$

wobei β die inverse Temperatur $\beta = (k_B T)^{-1}$ bezeichnet. Die genaue Form des Proportionalitätsfaktors C wurde jedoch erst von Kramers [59] gefunden.

In kraftspektroskopischen Untersuchungen betrachtet man hingegen die durch eine **äußere Kraft** induzierte Dissoziation von Komplexen. Nach Bell [60] sowie Evans und Ritchie [61] wird die Höhe der Potentialbarriere durch eine konstante mechanische Kraft f in folgender Weise verändert:

$$\Delta\Psi(f) = \Delta\Psi_0 - fx_\beta, \quad (2.11)$$

wobei $x_\beta = x_b - x_m$ der Abstand (bezüglich der Reaktionskoordinate x) zwischen dem Maximum der Potentialbarriere und dem Minimum des metastabilen Zustandes ist (Abbildung 2.6b). Setzt man das Ergebnis (2.11) in Gleichung (2.10) ein, erhält man die Off-Rate als Funktion einer wirkenden mechanischen Kraft:

$$v_{off}(f) = v_{off}^0 e^{\beta f x_\beta}. \quad (2.12)$$

^v Die freie Energie wird normalerweise einfach mit dem Buchstaben F bezeichnet; um Verwechslungen mit den in dieser Arbeit zentralen Kraftwerten vorzubeugen, wird hier für die freie Energie ein Φ verwendet.

^{vi} Es können durchaus auch mehrere Barrieren im Potentialverlauf vorhanden sein; dieser Fall wird hier jedoch nicht diskutiert.

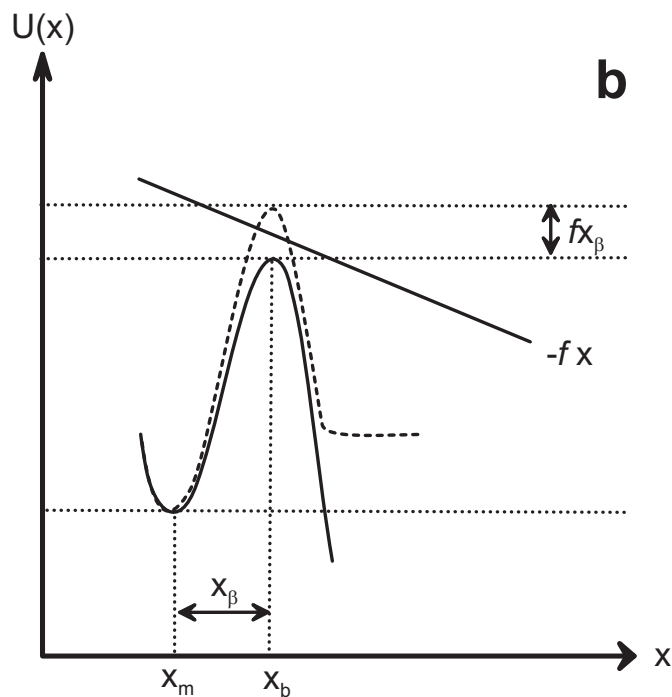
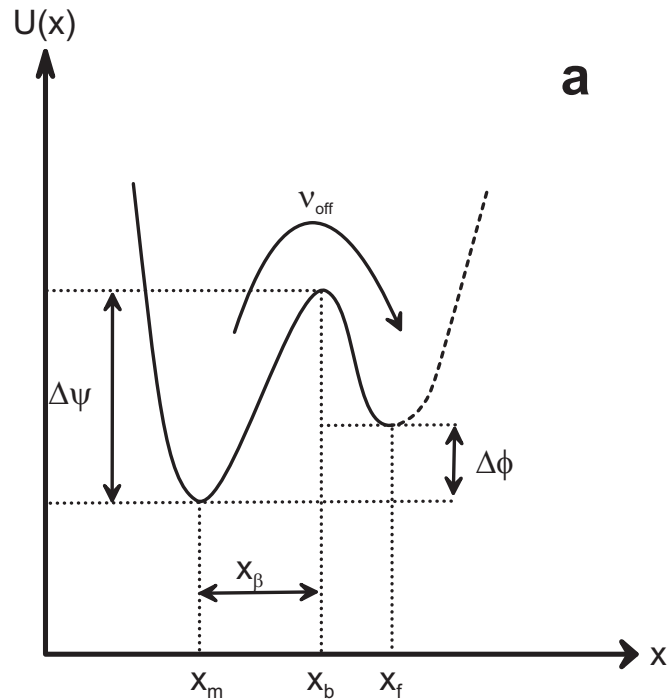


Abbildung 2.6: Dissoziationspotentiale

Bild (a) zeigt die freie Dissoziation eines Komplexes von einem metastabilen gebundenen Zustand (x_m) über eine Potentialbarriere (x_b) in einen freien oder zweiten metastabilen Zustand (x_f). Dabei wurde der gesamte Phasenraum auf die Reaktionskoordinate x projiziert. Die Geschwindigkeit der Dissoziation und damit die Off-Rate hängt von der Temperatur und der Höhe $\Delta\Psi$ der Potentialbarriere ab.

Bild (b) zeigt den Einfluß einer zusätzlich wirkenden, konstanten äußeren Kraft auf den Potentialverlauf. Die Barriere wird um den Wert $f x_\beta$ reduziert.

Bei kraftspektroskopischen Untersuchungen mit dem AFM wird der Sensor mit einer konstanten Geschwindigkeit v_z von der Probe zurückgezogen. Daraus folgt eine zeitliche Änderung der auf den Komplex wirkenden Kraft mit

$$\dot{f} = c v_z = r, \quad (2.13)$$

wobei c die effektive Federkonstante in Reaktionsrichtung ist, die sich aus der Federkonstanten k des Cantilevers und der Elastizität des an die Spitze gebundenen Polymerlinkers ergibt. Den Wert r bezeichnet man auch als **Loading Rate**. Die äußere Kraft wächst also in einem AFM-Experiment linear mit der Zeit. Gemäß (2.12) folgt daraus eine Zeitabhängigkeit der Off-Rate.

Aus der Wahrscheinlichkeit, daß ein Komplex im Zeitintervall $[t, t+dt]$ dissoziiert, läßt sich die Wahrscheinlichkeit bestimmen, daß der Komplex im Kraftintervall $[f, f+df]$ reißt. Nach Evans und Ritchie [61] kann man daraus auf den wahrscheinlichsten Wert F in einer **Verteilung von Abrißkräften** F_a schließen:

$$F = \frac{k_B T}{x_\beta} \ln \frac{x_\beta r}{k_B T v_{off}}. \quad (2.14)$$

Kapitel 3

Biologische Grundlagen

Nature laughs at the difficulties of integration.

- Pierre-Simon de Laplace ⁱ

Nachdem die physikalischen und chemischen Grundlagen bereits behandelt wurden, werden in diesem Kapitel die untersuchten biologischen Systeme vorgestellt. Dabei soll stets auch das wissenschaftliche Interesse an gerade diesen Untersuchungsgegenständen deutlich werden.

3.1 2-dimensionale Proteinkristalle

Strukturuntersuchungen an Kristallen sind seit langer Zeit ein etabliertes Gebiet der Physik [63]. Da sich auch viele Nukleinsäuren, Proteine und sogar intakte Viren kristallisieren lassen, sind sie der Röntgenstrukturanalyse zugänglich, wodurch die Kristallographie eine Schlüsselfunktion in der Molekularbiologie erhalten hat. Die Herstellung hochgeordneter dreidimensionaler Kristalle von Membranproteinen für diese Untersuchungen bleibt jedoch schwierig. Deswegen werden immer häufiger zweidimensionale Kristalle eingesetzt, um die Struktur der Membranproteine mit Hilfe von Kryo-Elektronenmikroskopie aufzuklären [64]. Ein besonderes Augenmerk verdienen dabei diejenigen Systeme, die natürliche zweidimensionale Kristalle darstellen. Zwei ihrem Wesen nach vollkommen verschiedene Beispiele werden im folgenden gegeben.

3.1.1 S-Layer

Eine der bemerkenswertesten Eigenschaften prokaryotischer Zellhüllen ist das Vorhandensein kristalliner monomolekularer Anordnungen aus Proteinen oder Glycoproteinen, die man gemeinhin als *Crystalline Bacterial Surface Layer* (S-Layer) bezeichnet [65]. Sie wurden mittlerweile in Hunderten verschiedener Spezies von Eubakterien identifiziert und bilden einen nahezu universellen Bestandteil von Archaeobakterien. Morphologische, chemische und genetische Untersuchungen haben ergeben, daß S-Layer den einfachsten Typus einer biologischen Membran darstellen, deren Moleküle durch die Milliarden Jahre währende biologische Evolution in ihrer Rolle als Bausteine eines selbstorganisierenden Systems optimiert wurden [66]. Mit wenigen Ausnahmen bestehen sie jeweils stammspezifisch aus einer einzigen Protein- oder Glycoproteinspezies (Molekulargewicht 40-200 kDa), welche dazu in der Lage ist, sich in allen Phasen des Zellwachstums und der Zellteilung zu zweidimensionalen Anordnungen auf der Zelloberfläche zusammenzufindenⁱⁱ.

ⁱ zitiert nach J. W. Krutch "The Colloid and the Crystal", in I. Gordon und S. Sorkin (Hrsg.) *The Armchair Science Reader*, New York, Simon and Schuster, 1959.

ⁱⁱ Die Expression der S-Layer-Moleküle muß äußerst effizient sein, wie eine Überschlagsrechnung ergibt [68]: Ungefähr 5×10^5 Protein-Monomere werden benötigt, um eine durchschnittlich große stäbchenförmige Zelle zu bedecken. Bei einer Entstehungszeit von etwa 20 min müssen also pro Sekunde mindestens 500 Kopien einer einzelnen Polypeptidsorte synthetisiert, auf die Zelloberfläche befördert und in den S-Layer eingebunden werden!

S-layer sind in der Regel 5-10 nm dick und weisen **Poren** identischer Größe (Durchmesser 2-8 nm) und Morphologie auf, die zwischen 30 und 70 % der Oberfläche einnehmen können [67]. Da diese porösen Schichten die äußerste (in Archaeobakterien oft auch die einzige) Zellwandkomponente darstellen, müssen sie eine Vielfalt von Funktionen für die Zelle übernehmen. Einige der den S-Layern zugeordneten Funktionen sind jedoch noch hypothetisch und nicht durch eindeutige experimentelle Ergebnisse belegt [68]. Aufgrund der Allgegenwart von S-Layer tragenden Prokaryoten in der Biosphäre ist immerhin klar, daß diese Schichten eine spezifische Anpassung an Umweltbedingungen und evolutionäre Auswahlkriterien widerspiegeln. Dementsprechend häufig kommt es in Laborkulturen unter idealen Wachstumsbedingungen vor, daß irgendwann Mutanten ohne S-Layer gegenüber dem Wildtyp eines Bakteriums dominieren.

Obschon sich aus den eben genannten Gründen keine allgemein gültige Funktion von S-Layern angeben lassen wird, wurden die folgenden Aufgaben an solchen Systemen belegt und können darum als grobe Richtlinie gelten: S-Layer können als Schutzhülle dienen (z.B. vor größeren Proteinkomplexen oder sogar Angriffen seitens *Bdellovibrio bacteriovorus*), als molekulare Siebe und als Molekül- und Ionenfallen; sie bilden eine Zielstruktur für Zelladhäsion und Oberflächenerkennung; und sie bestimmen zudem die Zellform von Archaeobakterien. S-Layer wurden auf vielen tierischen und menschlichen Pathogenen beobachtet, und es steht zu erwarten, daß sich ihre Signifikanz als Virulenzfaktoren erweisen wird [69].

Die zweidimensionale Kristallstruktur der S-Layer wurde intensiv untersucht, zunächst mit elektronenmikroskopischen Methoden. Dabei ergaben sich fünf mögliche Symmetrien [70] - schief (p1, p2), quadratisch (p4) oder hexagonal (p3, p6) – mit Mittelpunktsabständen (center-to-center) zwischen 2 und 35 nm [68,71]. Dabei ist jedoch zu beachten, daß die meisten S-Layer-Moleküle aus einer schwereren und einer leichteren Domäne bestehen; die schwereren Domänen – sie machen etwa 80 % des Molekulargewichtes aus - gruppieren sich zu massiven „**Kernen**“ (Cores), während die leichteren als Verbindungselemente oder „**Speichen**“ (Spokes) fungieren. Diese Domänen können sich nun in verschiedener Weise zu den Symmetrieachsen anordnen. Saxton und Baumeister haben darum (im Appendix zu [72]) ein universelles Klassifikationsschema für S-Layer entwickelt, das in Abbildung 3.1 wiedergegeben ist. Die Notation M_nC_m bezeichnet dabei eine Struktur, bei der immer n Kerne (M für *massive*) und m Speichen (C für *connectivity*) an jeweils einem Punkt zusammenstoßen. Auf diese Weise wird rasch ersichtlich, daß es insgesamt zwölf mögliche Anordnungen der S-Layer-Moleküle gibt.

S-Layer weisen einen bemerkenswerten Unterschied in Oberflächenrauigkeit und -chemie zwischen der Innen- und der Außenseite auf. Die Topographie der Innenseite (in Bezug auf die Zelle) ist rauher als die äußere [73]. Bei den S-Layern der meisten Bacillaceae konnte zudem gezeigt werden, daß die Innenseite negativ geladen, die Außenseite aber neutral ist [74]. Die negative Oberflächennettoladung der Innenseite rührt von einem Überschuß an Carboxylgruppen her, während die Außenseite zu gleichen Teilen Carboxyl- und Aminogruppen aufweist.

In den meisten S-Layern wechselwirken die Bestandteile miteinander und mit der darunterliegenden Zellwandschicht durch eine Kombination nicht-kovalenter Kräfte, die Wasserstoffbrücken- und ionische Bindungen ebenso wie hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen umfaßt [75]. Isolations- und Disintegrations-Experimente mit S-Layer-Schichten haben insbesondere ergeben, daß die intermolekulären Kräfte zwischen den Untereinheiten stärker sind als diejenigen, welche die Kristallanordnung an die Zellwand binden [76].

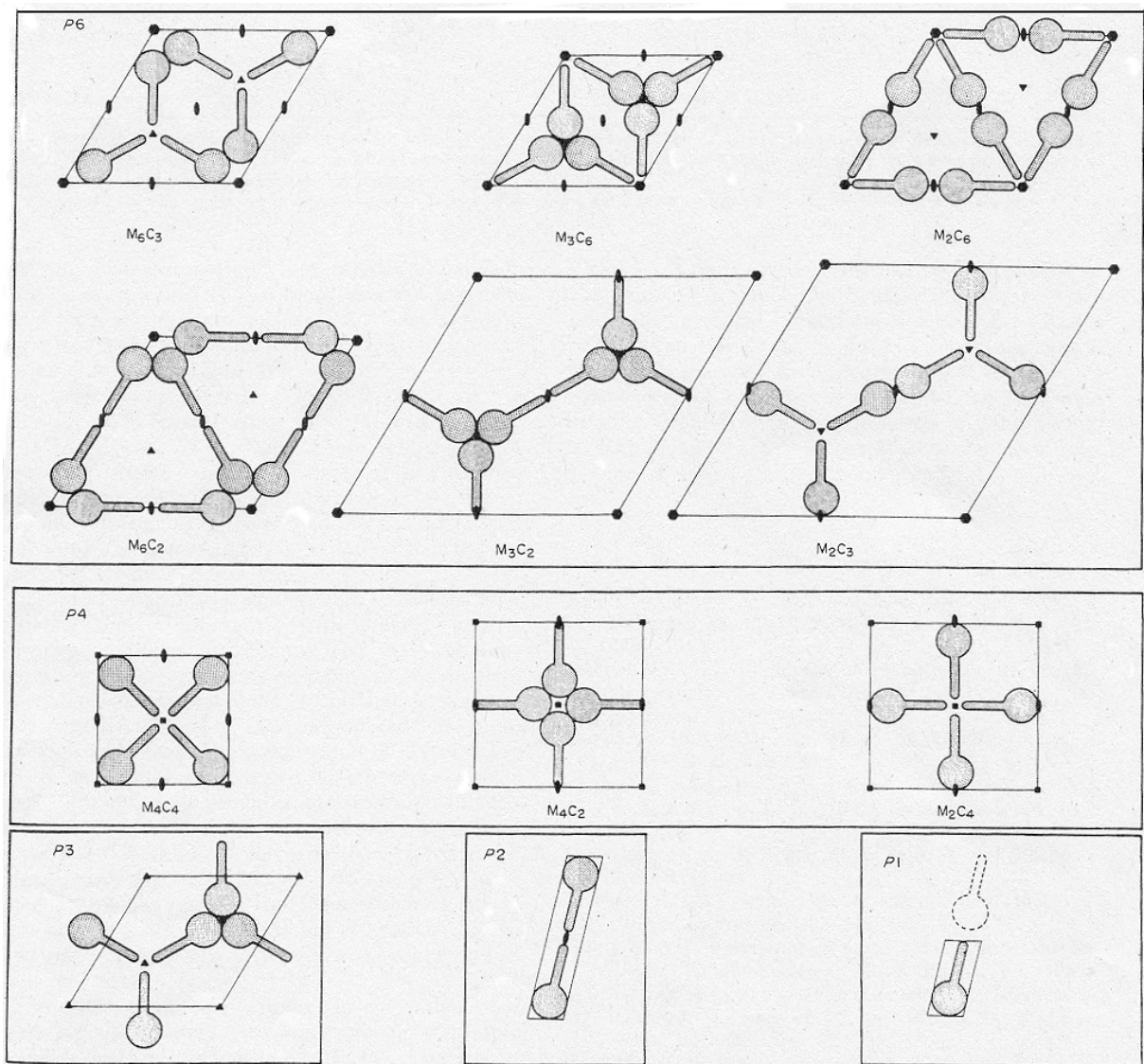


Abbildung 3.1: Organisationsprinzipien in S-Layern
nach Saxton und Baumeister
aus dem Appendix zu [72]

Eine wichtige Eigenschaft von S-Layern ist ihre Fähigkeit, an Oberflächen und Grenzschichten als Monolagen zu **rekristallisieren**ⁱⁱⁱ, da sie den Zugang zu einem breitgefächerten Spektrum an nanobiotechnologischen Anwendungen eröffnet [73]. So wurden S-Layer bereits erfolgreich als Masken zur Nanostrukturierung eingesetzt [77,78] und als Immobilisierungsmatrizen für bindende Monoschichten funktioneller Moleküle (z.B. Antikörper, Liganden, Immunogene) zur Herstellung bioanalytischer Sensoren und Immunoassays verwendet. Einen Überblick über dieses und weitere Verfahren liefert [79].

ⁱⁱⁱ Häufig entstehen bei der Rekristallisation Doppelschichten; in diesem Fall berühren sich die beiden Monoschichten entweder mit ihren Innen- oder ihren Außenseiten.

Deinococcus radiodurans

Das Gram-negative Eubakterium *Deinococcus radiodurans* (vor 1981 als *Micrococcus radiodurans* bezeichnet) erhielt seinen Namen aufgrund einer ungewöhnlich hohen Resistenz gegen UV- und Röntgenstrahlung. Diese rührt vor allem aus dem äußerst effizienten DNA-Reparaturmechanismus her [80].

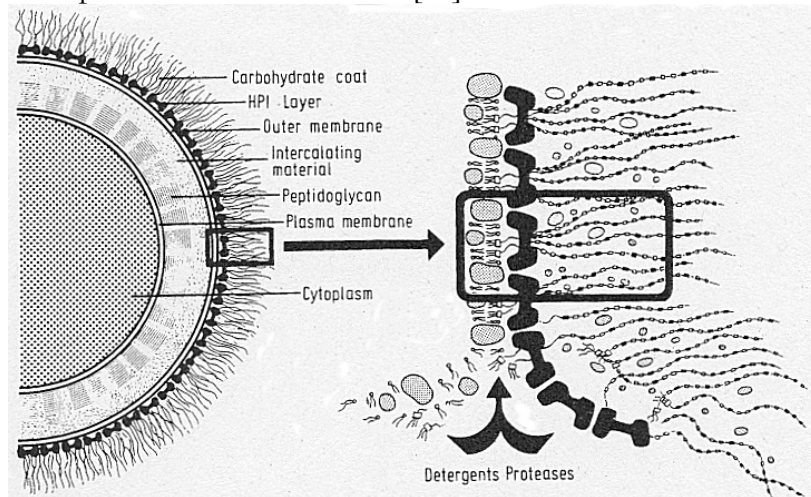


Abbildung 3.2: Zellwandmodell von *D. radiodurans*
aus [72]

Der S-Layer von *D. radiodurans* trägt die Bezeichnung Hexagonally Packed Intermediate Layer (**HPI Layer**). Die Aminosäuresequenz der ihn konstituierenden Proteine, die sich nur geringfügig von Stamm zu Stamm unterscheiden, ist bekannt [81]; und die Struktur des HPI-Layers wurde bereits intensiv elektronenmikroskopisch [72,82] und rasterkraftmikroskopisch [18,19,52,83,84] untersucht.

Es gilt daher als erwiesen, daß der massive Kern - der in seiner Mitte eine Pore aufweist - aus sechs Protein-Monomeren (Protomeren) gebildet wird (Abbildung 3.3). Diese Hexamere besitzen ein Molekulargewicht von 655 ± 36 kDa [85] (das MW eines einzelnen Protomers beträgt 107 kDa für den Stamm SARK [81] bzw. 104 kDa für den Stamm R1 [82]) und sind in einer hexagonalen Symmetrie mit einer Gitterkonstanten von 18 nm angeordnet; die Struktur läßt sich genauer nach dem in Abbildung 3.1 gezeigten Schema als ($\rho 6$)-Symmetrie M_6C_2 beschreiben.

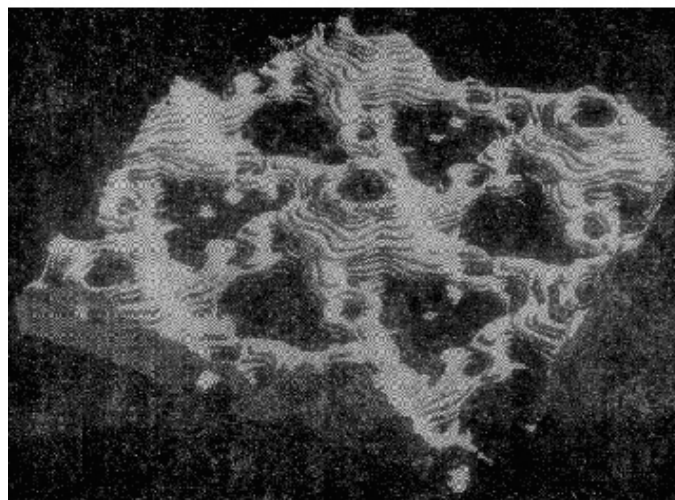


Abbildung 3.3: 3D-Modell des HPI-Layers von *D. radiodurans*
aus [86]

Corynebacterium glutamicum

Die Gattung der Gram-positiven Corynebakterien umfaßt neben tier- und humanpathogenen Arten, deren bedeutendster Vertreter der Diphtherieerreger *C. diphtheriae* ist, auch das apathogene Bodenbakterium *C. glutamicum*. Dieses wird zur industriellen Produktion von Aminosäuren (z.B. Glutaminsäure) durch Fermentationsverfahren eingesetzt, was ihm eine besondere biotechnologische Bedeutung verleiht. Beide Gesichtspunkte – Pathogenizität und Fermentation – richten das Interesse auf die Oberflächen von Corynebakterien, da diese entscheidenden Einfluß auf die Adhäsion von Exoenzymen bei medizinischen Anwendungen respektive die Schaumbildung und Produktionseffizienz bei der industriellen Verwendung haben können.

Obwohl S-Layer in vielen Spezies der Corynebakterien vermutet werden, fanden frühere Untersuchungen dazu nur an einem Stamm des *C. glutamicum* (ATCC 17965) statt. Die Sequenz des S-Layer-Proteins PS2 (MW 55 kDa) wies jedoch keine Homologien zu bekannten S-Layer-Proteinen oder sichtbare S-Layer-Sequenzmotive auf [87,88]. Eine Gefrierbruchpräparation und anschließende elektronenmikroskopische Untersuchung an diesem S-Layer ergab eine hexagonale Symmetrie mit einer Gitterkonstanten von 13.2 nm [89]. Weitere Strukturuntersuchungen waren zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt.^{iv}

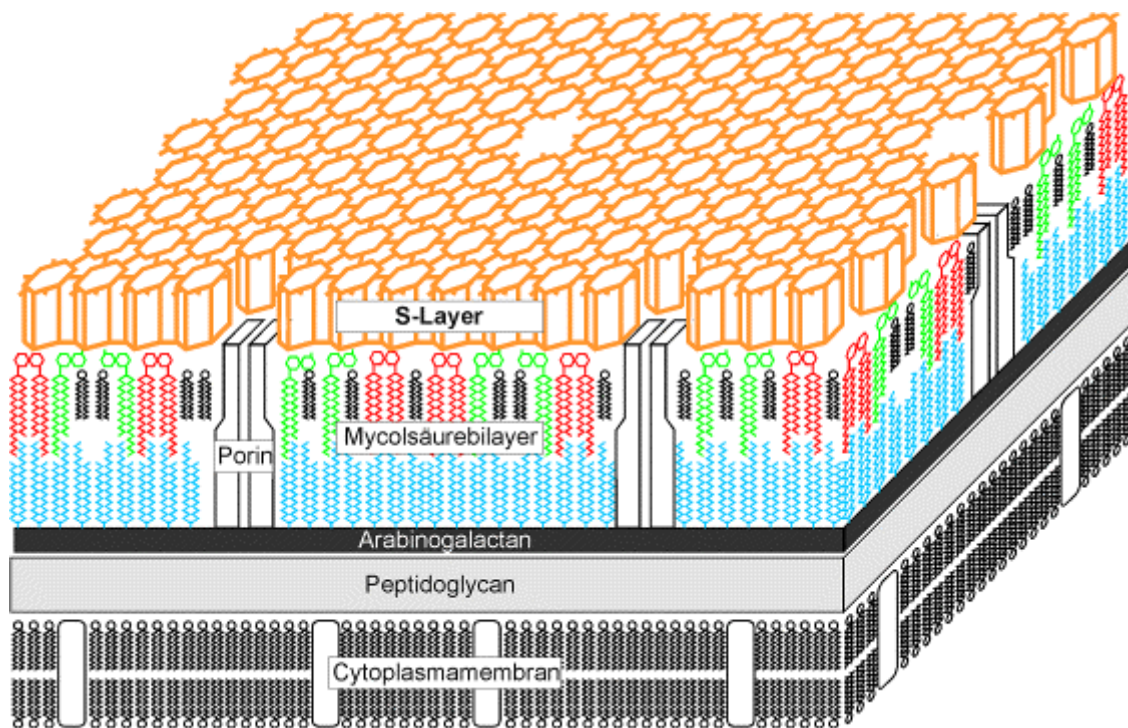


Abbildung 3.4: Zellwandmodell von *C. glutamicum*
aus [90]

An der Universität Bielefeld durchgeführte Untersuchungen führten jedoch zur Identifikation von insgesamt 21 möglichen Kandidaten für S-Layer-tragende Isolate innerhalb der Spezies *C. glutamicum* (Abbildung 3.5). Die entsprechenden Proteine wurden isoliert und mit Hilfe von tryptischer Verdauung und MALDI-Massenspektrometrie charakterisiert. Diese Charakterisierung ergab zwar Ähnlichkeiten aber auch Unterschiede der Proteine untereinander und im Vergleich zu der bekannten Sequenz des

^{iv} Da die Veröffentlichung von Scheuring *et al.* [53] gleichermaßen jung wie aufschlußreich ist, wird sie im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit diskutiert.

Referenzstammes ATCC 17965, so daß von einer Gruppe ähnlicher, aber nicht identischer S-Layer-Proteine ausgegangen wird [91].

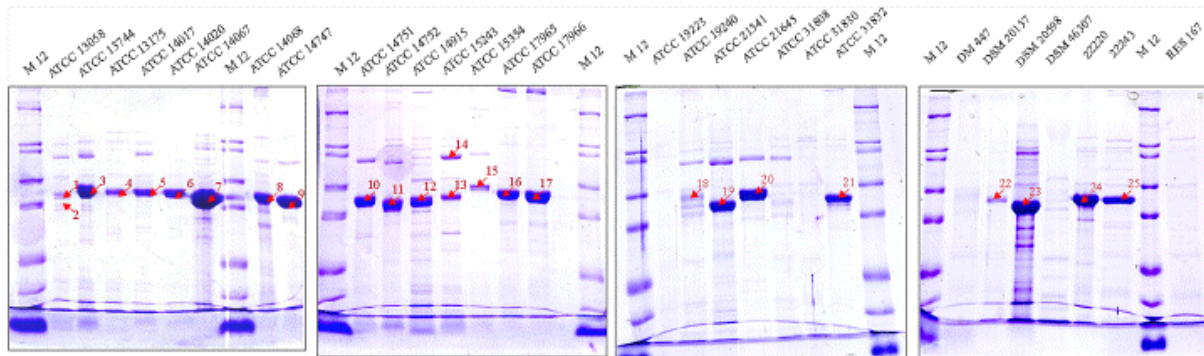


Abbildung 3.5 : Auftrennung extrazellulärer Proteine von *C. glutamicum*-Isolaten mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die mit Pfeilen bezeichneten Proteinbanden stellen S-Layer-Proteine dar. Über den Gelspuren ist jeweils die Stammesbezeichnung angegeben; M = Proteinlängenstandard. (Mit freundlicher Genehmigung von Nicole Hansmeier, Genetik, Universität Bielefeld.)

3.1.2 Annexin V-Kristalle auf Lipid-Doppelschichten

Annexin V^v gehört zu einer Familie calcium- und phospholipidbindender Proteine mit einer auf Gefäße gerinnungshemmenden Wirkung. Es ist nahezu ubiquitär an den Zellen höherer Pflanzen und Säuger zu finden, was ein reges Interesse an seiner Funktion ausgelöst hat. Trotz großer Anstrengungen in den letzten Jahren, die eine Reihe biologischer Eigenschaften aufdeckten, steht eine Bestimmung der tatsächlichen physiologischen Rolle der Annexine jedoch immer noch aus.

Die hohe Wirksamkeit des Annexin V als Antikoagulans rührt von seinem hemmenden Einfluß auf die Prothrombin-Aktivierung her [92] und seiner Fähigkeit, Thrombusbildung unter normalen Blutflußbedingungen in Venen und Arterien zu verhindern [93]; Annexin V besitzt zudem die Eigenschaft, die Aktivität der Phospholipase A2 zu hemmen [94], was eine entzündungshemmende Wirkung vermuten läßt; Annexin V ist auch ein Inhibitor der Proteinkinase C [95]; und schließlich soll Annexin V das Hepatitis B Oberflächenantigen binden und könnte so eine Rolle im Ablauf einer Hepatitis-Virusinfektion spielen[96].

In der Medizin wird Annexin V bereits als **Apoptose-Marker** eingesetzt. Apoptose ist der Mechanismus des programmierten Zelltods, den viele Organismen benutzen, um selektiv Zellen zu entfernen, die entweder zerstörerische Rückwirkungen auf den Wirt besitzen oder keinen vollen Satz an Aktivierungs- und Überlebenssignalen erhalten haben. Eine kritische Phase der Apoptose beinhaltet die Ausbildung von Oberflächenänderungen, die in der Erkennung und Aufnahme dieser sterbenden Zellen durch Phagozyten resultieren. Eine entscheidende Veränderung betrifft die Membranasymmetrie hinsichtlich der enthaltenen Phospholipide. Normalerweise liegt Phosphatidylcholin auf der Außenseite der Lipid-Doppelschicht, während Phosphatidylserin (PS) hauptsächlich auf der Innenseite zum

^v Es existieren verschiedene Synonyme für Annexin V: Placental Protein 4 (PP4), Placental Anticoagulant Protein I (PAP I), Calphobindin I (CPB-I), Calcium Dependent Phospholipid Binding Protein 33 (CaBP33), Vascular Anticoagulant Protein Alpha (VACa), Anchorin CII, Lipocortin-V, Endonexin II und Thromboplastin Inhibitor.

Cytosol hin vorkommt. In einer frühen Apoptosephase (während der die Zellmembran noch intakt ist) wird PS zur äußeren Membranschicht transportiert. Da Annexin V in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen an negativ geladene Phospholipide wie PS bindet (und nur schwach an Phosphatidylcholin und Sphingomyelin), bietet sich eine Möglichkeit, sterbende Zellen frühzeitig zu erkennen. Bereits vor dem Auftreten morphologischer Veränderungen im Zuge der Apoptose läßt sich die PS-Asymmetrie durch eine Messung der Annexin V-Bindungen an die Zellmembran analysieren.

Einige Mitglieder der Annexinfamilie weisen eine Ionenkanalaktivität *in vitro* auf. In diesem Zusammenhang wurde Annexin V als spannungsabhängiger, Kationen-selektiver **Ionenkanal** identifiziert [97]. Der Kanalmechanismus ist jedoch noch ungeklärt, da Annexin V zwar ein peripher an die Membran gebundener, aber nicht integraler Ionenkanal ist [98,99].

Die dreidimensionale Struktur des Annexin V (MW 35.8 kDa) ist bereits 1990 [100,101] durch eine Röntgenstrukturanalyse mit einer Auflösung von 2.0 Å aufgeklärt worden (es ist damit das erste Kanalprotein, dessen Struktur komplett gelöst wurde). Es besteht aus vier α -helikalen Domänen, die eine zentrale hydrophile Pore mit einem Durchmesser von 0.1 nm umgeben (Abbildung 3.6).

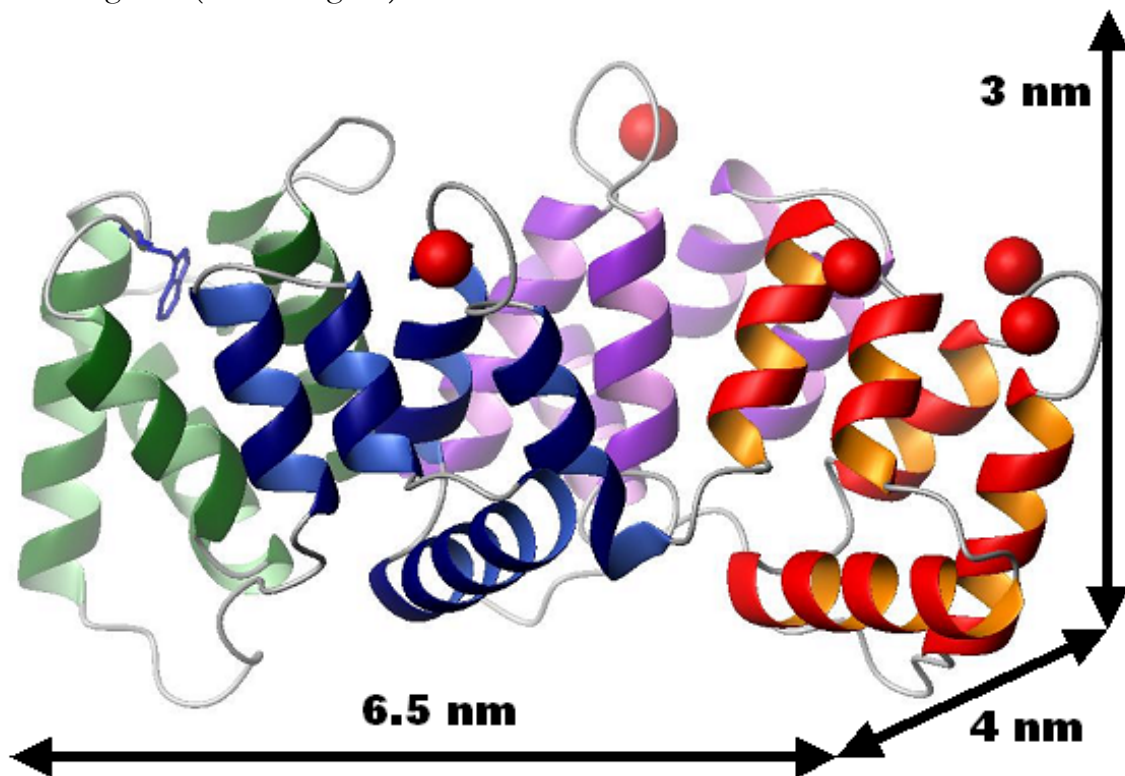


Abbildung 3.6: Dreidimensionale Struktur von Wildtyp-Annexin V
Die konvexe Oberfläche mit den fünf hochaffinen Calcium-Bindungsstellen zeigt in dieser Seitenansicht nach oben (die Calciumionen sind als rote Kugeln angedeutet). Die vier Proteindomänen sind farblich verschieden gezeichnet (aus [102]).

In elektronenmikroskopischen [98,103] und rasterkraftmikroskopischen [104,105] Studien wurde die zweidimensionale Kristallstruktur des auf Lipidschichten zu **Trimeren** gebundenen Annexin V untersucht. Dabei zeigte sich sowohl eine hexagonale (p6)-Symmetrie mit einer Gitterkonstanten von 19.8 ± 1.0 nm als auch eine (p3)-Symmetrie mit einer Gitterkonstanten von 9.2 ± 0.2 nm [104]. Ob diese Anordnungen eine unmittelbare funktionale Bedeutung besitzen, ist derzeit noch ungewiß.

3.2 Protein-DNA-Interaktion

Proteine sind eine Klasse von Makromolekülen mit der einzigartigen Fähigkeit, unterschiedlichste Moleküle zu erkennen und mit ihnen zu interagieren. Auch die Expression zahlreicher Gene wird durch die Bindung von Proteinen gesteuert, die spezifische DNA-Sequenzen erkennen. Die Genaktivität wird in erster Linie auf der Ebene der Transkription^{vi} reguliert. In Bakterien sind viele Gene in Einheiten zusammengefaßt, die als Operons bezeichnet werden. Die koordinierte Transkription von Genen in einem Operon wird durch **Repressorproteine** gehemmt und durch **Stimulatorproteine** aktiviert [106].

Die Untersuchung von Protein-DNA-Wechselwirkungen mittels Rasterkraftmikroskopie ist ein stetig wachsendes Forschungsgebiet (eine Einführung liefert [107]). Bei der Identifikation spezifischer Bindungsstellen von regulatorischen Proteinen auf ausgesuchten DNA-Fragmenten weist die rasterkraftmikroskopische Untersuchung einige Vorteile gegenüber den molekularbiologischen Standardverfahren (Footprinting, Bandshift) auf. Während die biochemischen Techniken Protein-DNA-spezifische Wechselwirkungen einfach feststellen können, wenn die DNA-Moleküle nur einige Dutzend Basenpaare lang sind, ist die Analyse großer DNA-Fragmente aus Hunderten von Basenpaaren ein mühsames und aufwendiges Unterfangen; das AFM hingegen ist hinsichtlich der Moleküllänge nur nach unten limitiert [108]. Das Rasterkraftmikroskop erlaubt auch das Auffinden der Bindungsstellen schwach bindender oder nur in geringen Mengen vorhandener Proteine, da nicht Ensemble-Mittelwerte, sondern einzelne Moleküle beobachtet werden. Zudem können AFM-Experimente auch etwaige Konformationsänderungen der DNA an den Bindungsstellen detektieren [15] und zeitaufgelöste Studien der Protein-DNA-Wechselwirkungen ermöglichen [16]. Das AFM bietet sich also als komplementäres Werkzeug zu den klassischen biochemischen Verfahren an.

Die Bindung eines Proteins an DNA kann in Lösung durchaus durch dreidimensionale Diffusion beider Moleküle erreicht werden. Ein regulatorisches Protein bindet jedoch an spezifische Zielstellen auf der DNA mit einer wesentlich höheren Rate. Ein klassisches Beispiel ist hier der *lac*-Repressor von *Escherichia coli*, der die Operatorsequenz um einen Faktor 100-1000 schneller erkennt, als aufgrund einer rein diffusionsgesteuerten Reaktion zu erwarten wäre [109]. Der tatsächliche Bindemechanismus könnte in zwei Schritten ablaufen [110]: Zuerst bindet das Protein unspezifisch an die DNA und wird danach durch eindimensionale Diffusion zur spezifischen Bindungsstelle befördert. Anhaltspunkte für einen solchen Mechanismus wurden bei verschiedenen Proteinen durch AFM-Experimente in physiologischer Umgebung gefunden [111,112].

3.2.1 Dreidimensionale Struktur

Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur verschiedener Regulatorproteine enthüllte ein immer wieder auftretendes Bindungsmotiv bei Protein-DNA-Wechselwirkungen. Viele DNA-bindende Proteine enthalten zwei Erkennungseinheiten (aus je drei α -Helices), die über eine zweifache Symmetrieachse miteinander in Beziehung stehen und einen Abstand von 3.4 nm aufweisen, was gerade der Ganghöhe der DNA-Helix (B-DNA) entspricht. Eine α -Helix besitzt mit ihren Seitenketten einen Durchmesser von etwa 1.2 nm; die große

^{vi} Als Transkription bezeichnet man den Transfer genetischer Information aus der DNA durch die Synthese eines von der DNA-Vorlage kopierten RNA-Moleküls.

Furche (major groove) der DNA-Helix dagegen ist gerade etwa 1.2 nm breit und 0.7 nm tief. Röntgenstrukturanalysen konnten die Vermutung bestätigen, daß sich die dritte α -Helix jeder Untereinheit in die jeweils benachbarte große Furche der DNA schiebt. Aus dieser Helix herausragende Seitenketten treten spezifisch mit verschiedenen Basen der großen Furche in Wechselwirkung, weswegen sie manchmal auch als Erkennungshelix^{vii} bezeichnet wird. Man bezeichnet diese dimerische Bindungsstruktur als **Helix-Turn-Helix-Motiv** (HTH) [113].

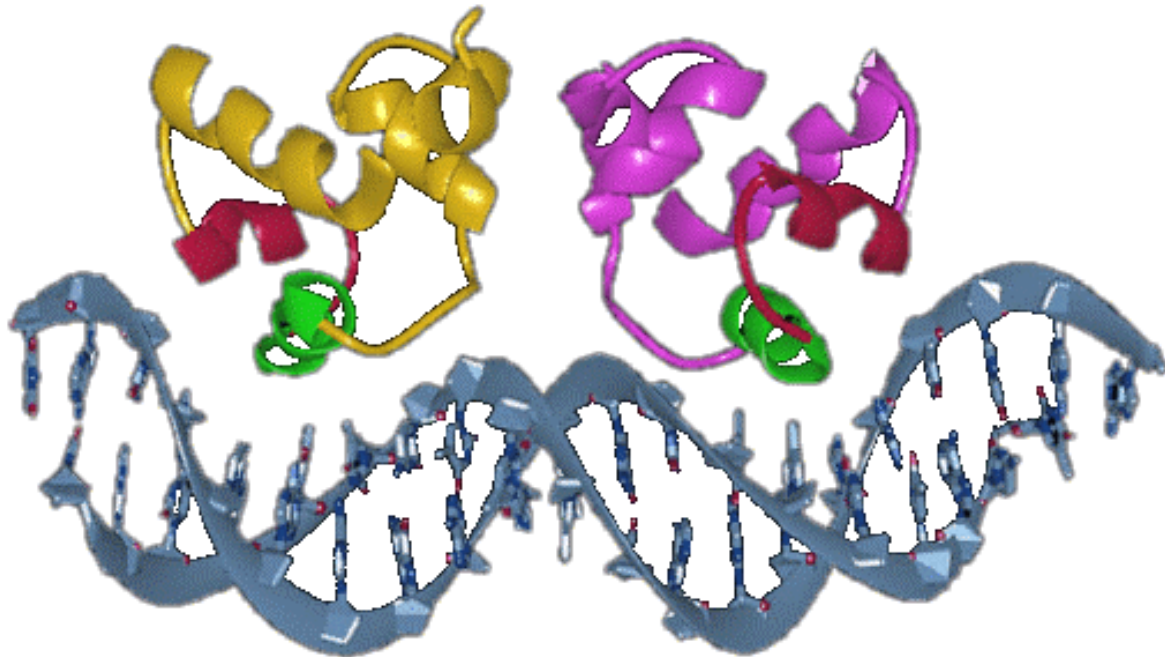


Abbildung 3.7: Helix-Turn-Helix-Motiv

Die Struktur des an die DNA gebundenen Repressors des Phagen 434 weist ein HTH-Motiv auf. Die Erkennungshelices sind grün gezeichnet. (Darstellung aus [114])

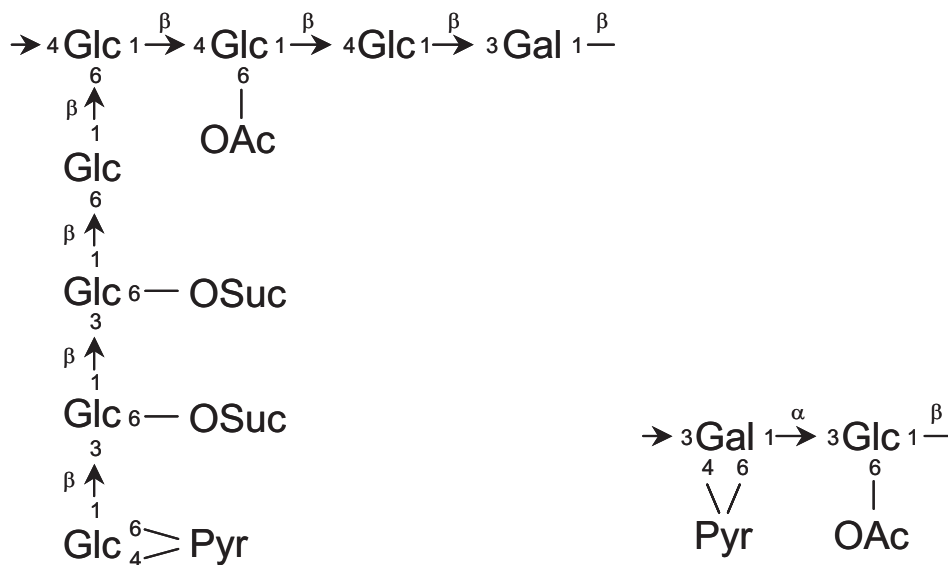
3.2.2 Das Modellsystem *Sinorhizobium meliloti*

Stickstoff aus der Atmosphäre tritt in die Synthese von Aminosäuren und anderen Biomolekülen in reduzierter Form ein (z.B. als NH_4^+). Höhere Organismen sind jedoch nicht imstande, N_2 in diese Form zu überführen. Diese als **Stickstoff-Fixierung** bezeichnete Umwandlung wird vielmehr von Bakterien und Blaualgen (Cyanobakterien) durchgeführt. Einige dieser Mikroorganismen, nämlich die symbiontischen *Rhizobium*-Bakterien, dringen in die Wurzeln von Leguminosen ein und bilden Wurzelknöllchen, in denen die Stickstoff-Fixierung stattfindet, die sowohl den Bakterien als auch der Pflanze zugute kommt [106]. Die auf der Erde pro Jahr neu gebundene Menge an N_2 wird auf eine Größenordnung von 10^{11} kg geschätzt. Etwa 15% davon werden durch Blitzenentladungen und UV-Strahlung fixiert, 25% durch industrielle Prozesse und 60% durch Mikroorganismen.

Das Gram-negative Bodenbakterium *Sinorhizobium meliloti* dient als Modellsystem, um die Wurzelknöllchensymbiose mit Leguminosen (in diesem Fall *Medicago sativa*, besser bekannt

^{vii} Es sollte jedoch erwähnt werden, daß auch weitere Reste des HTH-Motivs und andere Teile des Proteins zu der spezifischen Bindung beitragen. Darüber hinaus gibt es keine einfache Beziehung zwischen den miteinander in Wechselwirkung tretenden Aminosäureresten und der Basensequenz der Zielstelle.

als Alfalfa oder Luzerne) und die symbiotische Stickstoff-Fixierung zu untersuchen. Von dem Bakterium abgesonderte Polysaccharide könnten dabei eine wichtige Rolle spielen. Zuckerpolymere, die eine zusammenhängende Adhäsionsschicht auf der Zelloberfläche bilden, werden als Kapselpolysaccharide (Capsular Polysaccharides, CPS) bezeichnet, während die weiter außen liegenden **Exopolysaccharide** (EPS) nur eine schwache Verbindung zur Zelle aufweisen. Die Stämme Rm1021 und Rm2011 von *S. meliloti* synthetisieren beide zwei voneinander verschiedene saure Exopolysaccharide, Succinoglycan (EPS I) und Galactoglucan (EPS II) (Abbildung 3.8). Für die Infektion der Wurzelknöllchen durch *S. meliloti* ist das Vorhandensein mindestens eines der beiden Exopolysaccharide essentiell [115,116]. Deren Biosynthese wird durch Umweltbedingungen, wie zum Beispiel den Ammonium- und Phosphatgehalt des Mediums, beeinflusst [117].



Succinoglycan (EPS I)

Galactoglucan (EPS II)

Abbildung 3.8: Struktur der Untereinheiten der Exopolysaccharide EPS I und EPS II

Die verwendeten Abkürzungen bedeuten: Gal, Galactose; Glc, Glucose; OAc, O-Acetylgruppe; OSuc, O-Succinylgruppe; Pyr, Pyruvylgruppe (aus [117]).

3.2.3 Die *exp*-Genregion

S. meliloti dient außerdem als Modellsystem, um die Architektur bakterieller Genome zu untersuchen. Die genetische Information dieses Bakteriums verteilt sich auf das Chromosom (3.65 Mb) und zwei Plasmide, die als pSymA (1.35 Mb) und pSymB (1.68 Mb) bezeichnet werden. Ein internationales Konsortium konnte jüngst die komplette Nukleotidsequenz von *S. meliloti* entschlüsseln [118]. Die für die Biosynthese der Exopolysaccharide zuständigen Genregionen – die *exo*-Region für EPS I und die *exp*-Region für EPS II – sind auf dem Megaplasmid-2 (pSymB) lokalisiert. Sechs weitere an der

Biosynthese und Regulation der Exopolysaccharide beteiligte Gene (*exoC*, *exoR*, *exoS*, *chvI*, *mucR* und *expR*) befinden sich auf dem Chromosom.^{viii}

In der 30 kb langen Galactoglucanbiosynthese-Genregion, welche 22 *exp*-Gene umfaßt, wurden durch Kartierung der Promoterregionen und die Analyse von *exp-lacZ* Reporterfusionen sowie durch Gelretardationsstudien potentielle Bindestellen (von 120-260 bp Länge) für die drei transkriptionellen Regulatorproteine ExpG, ExpR und PhoB identifiziert [119,120]. Abbildung 3.9 zeigt eine Zusammenfassung der bisher bekannten Regulatoren und ihrer vorgeschlagenen Wirkungsweise, Abbildung 3.10 die möglichen Bindestellen für ExpG und PhoB in der *exp*-Genregion. Für die Experimente dieser Arbeit wurde ein 157 bp langes DNA-Fragment ausgewählt, das die intergenische Region zwischen *expG* und *expD1* umfaßt; die spezifische Bindung von ExpG an dieses Fragment wurde durch Gelretardationsexperimente (unter Zugabe von DNA-Kompetitorfragmenten) bestätigt [121]. Aufgrund von Homologien des *expG*-Genproduktes zu den Proteinen der MarR-Familie von transkriptionellen Regulatoren, welche DNA über ein Helix-Turn-Helix-Motiv binden, wird vermutet, daß auch die ExpG-Bindung ein HTH-Motiv aufweist [120].

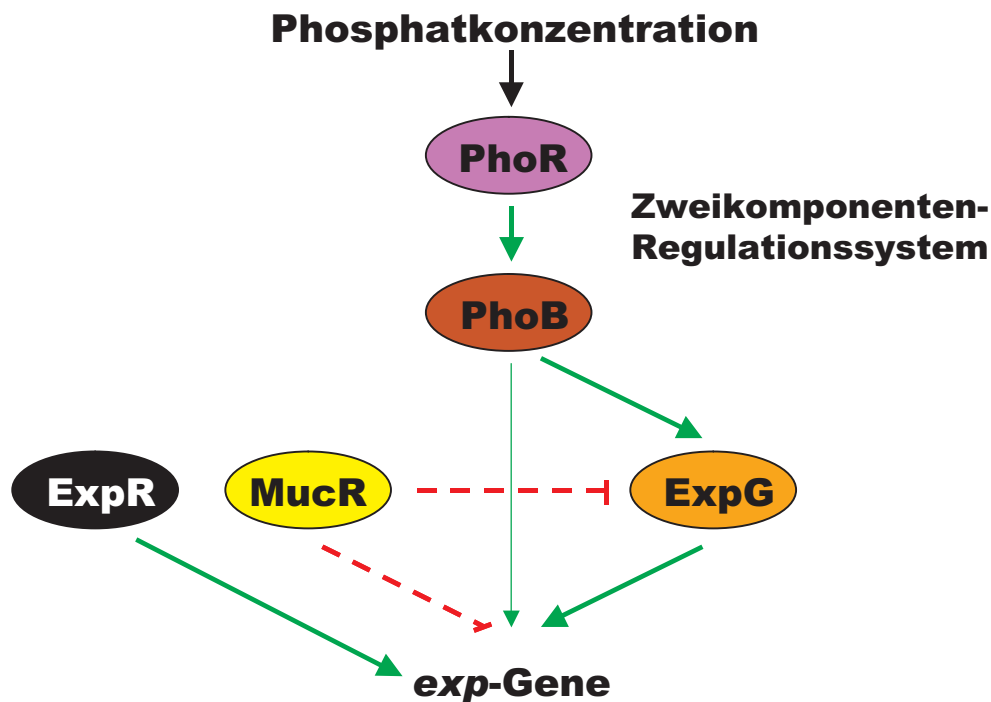
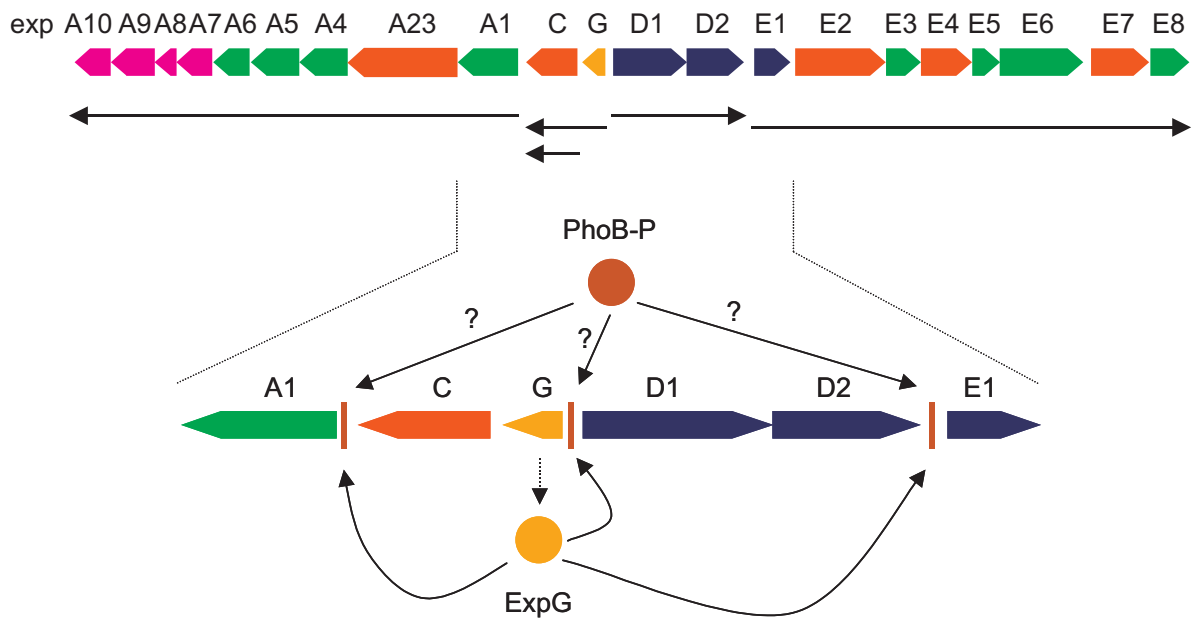


Abbildung 3.9: Modell der Regulation der *exp*-Genexpression

Das Schema zeigt das vorgeschlagene Zusammenspiel der positiven Regulatoren ExpR, PhoB und ExpG und des negativen Regulators MucR bei der *exp*-Genexpression sowie das Zweikomponenten-Regulationssystem aus PhoB und der für PhoB spezifischen Kinase PhoR, die für Änderungen der Phosphatkonzentration sensitiv ist. (Mit freundlicher Genehmigung von Anke Becker, Genetik, Universität Bielefeld.)

^{viii} Es ist in der Genetik üblich, Proteine groß und normal zu schreiben (p.e. ExpG), die für diese kodierenden Gene jedoch klein und kursiv (p.e. *expG*).



PHO-Box-ähnliche Sequenzen

Abbildung 3.10: Potentielle Bindestellen von ExpG und PhoB-P in der *exp*-Genregion

Potentielle Bindestellen für das regulatorische Protein ExpG wurden in drei intergenischen Regionen der exp-Genregion identifiziert. Vorläufige Ergebnisse weisen auch auf eine Bindung des phosphorylierten PhoB-Proteins (PhoB-P) an PHO-Box-ähnliche Sequenzen in derselben Region hin. (Mit freundlicher Genehmigung von Anke Becker, Genetik, Universität Bielefeld.)

Kapitel 4

Materialien und Methoden

The truth is, the Science of Nature has already been too long made only a work of the Brain and the Fancy. It is now high time that it should return to the plainness and soundness of Observations on material and obvious things. - Robert Hooke, Micrographia (1665)

Während in den vorangegangenen Abschnitten die theoretischen Fundamente dieser Arbeit und die prinzipiellen Verfahren zur Durchführung vorgestellt wurden, soll in diesem Kapitel Rechenschaft über die tatsächlich verwendeten Apparate, Arbeitstechniken und Versuchsanordnungen abgelegt werden.

4.1 Instrumente

Der Versuchsaufbau bestand aus einem kommerziellen AFM, das um einen Aufbau zur Kraftspektroskopie erweitert wurde.

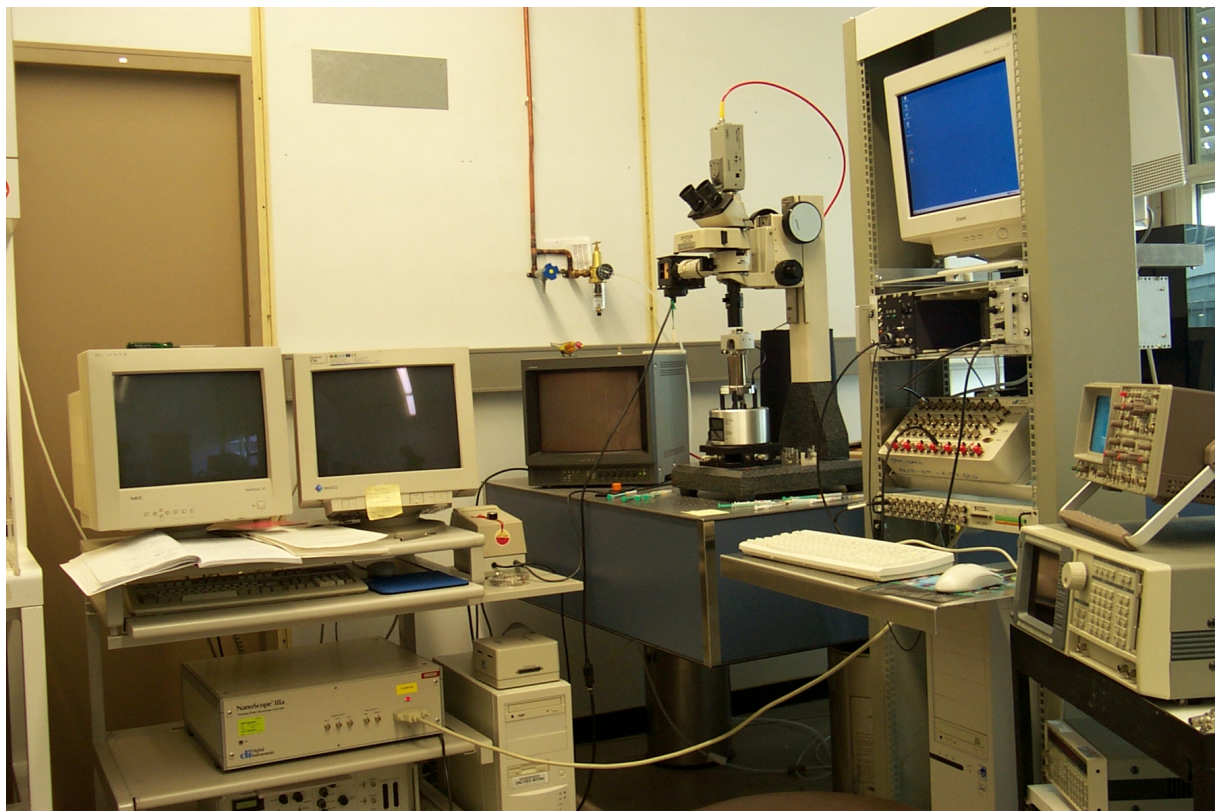


Abbildung 4.1: Versuchsaufbau

Im linken Teil des Bildes ist die Steuerelektronik samt Meßrechner für das Nanoscope IIIa (Bildmitte, mit montierter Kamera und Monitor) zu sehen, im rechten das Rack mit den Elementen der Kraftspektroskopie-Apparatur.

4.1.1 Das verwendete Rasterkraftmikroskop

Alle in dieser Arbeit präsentierten Experimente wurden mit einem Nanoscope IIIa Multimode AFM der Firma Digital Instruments (Santa Barbara, Kalifornien, USA) durchgeführt. Wann immer ein eng begrenzter Abbildungsbereich für die Messung genügte (wie im Falle der Präzisionsmessungen an Proteinkristallen), wurde das AFM mit einem E-Scanner (Scanbereich $15.7\ \mu\text{m}$) ausgestattet, der unmittelbar vor der Untersuchung der entsprechenden Systeme mit Hilfe der entsprechenden Funktion aus der Standard-Software (Release 4.42r8) kalibriert wurde. Bei allen anderen Versuchen – so auch bei den kraftspektroskopischen Untersuchungen – kam ein J-Scanner (Scanbereich $115\ \mu\text{m}$) zur Anwendung.

Für die AFM-Experimente in Flüssigkeit wurde stets eine Original-Flüssigmeßzelle von Digital Instruments (ohne Dichtungsring) benutzt. Vor jedem Einsatz (also auch bei einem Austausch des verwendeten Puffers) wurde diese gründlich gereinigt. Dazu wurde die Zelle zunächst mit Aceton ausgespült, mit ultrareinem Wasser ($18.2\ \text{M}\Omega/\text{cm}$ mit MilliQ-Maschine; Millipore, Eschborn, D)ⁱ abgewaschen, dann mit Ethanol ausgespült, wiederum mit Millipore-Wasser abgewaschen und schließlich mit Stickstoff trockengeblasen. Verschmutzungen in der Flüssigzelle können nämlich die Qualität der Aufnahmen in entscheidender Weise beeinflussen [122]. Ein entsprechender Aufwand wird auch in [83] betrieben.

4.1.2 Die Kraftsensoren

Für Messungen an Luft wurden non-contact/high-frequency (NCH) AFM-Sensoren aus Silizium von Nanosensors (Wetzlar, D) verwendet. Diese überzeugten durch gleichmäßig gute Resonanzpeaks um 300 kHz und Spitzenradien unter 10 nm (die Spitze besitzt dabei die Form einer Pyramide).

In Flüssigkeit kamen ausschließlich Siliziumnitrid-Sensoren von Thermomicroscopes (Sunnyvale, Kalifornien, USA) zum Einsatz. Auf einem Chip des Typs Microlevers sind fünf V-förmige und ein rechteckiger Cantilever mit unterschiedlichen Dimensionen und Federkonstanten (A-F) montiert. Die Spitzen besitzen ebenfalls die Form einer Pyramide, die jedoch an ihrem Ende noch einmal geschärft ist (Spitzenradius $<20\ \text{nm}$). Verwendet wurden nur Sensoren mit V-förmigen Cantilevern, und zwar für Abbildungen Sensor A und für die kraftspektroskopischen Untersuchungen stets Sensor C.

Typ	NCH	Microlevers A	Microlevers C
Länge [μm]	126	180	320
Breite [μm]	32	18	22
Dicke [μm]	4.3 ± 0.3	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1
Federkonstante [pN/nm]	$(5.5\pm 1.1) \times 10^4$	50 ± 20	10 ± 3

Tabelle 4.1: Herstellerangaben für die verwendeten Cantilever

Eine Kalibrierung der verwendeten Microlevers C – Siliziumnitridsensoren über ihr thermisches Rauschen (siehe 2.2.2) wurde im Anschluß an die kraftspektroskopischen Messungen durchgeführt und erbrachte Federkonstanten von 14.5-14.9 pN/nm. Der Fehler läßt sich bei dieser Methode auf 15% abschätzen.

ⁱ Nichts anderes ist gemeint, wann immer im folgenden von Millipore-Wasser die Rede ist.

4.1.3 Abbildungsparameter

Für alle rasterkraftmikroskopischen Abbildungen wurde das AFM im Tapping Mode betrieben. Dabei diente das Amplitudensignal zur Aktivierung der Feedback-Schleife. Vor der Annäherung an die Probe wurden Scanbereich und Offset des AFM auf Null gesetzt sowie eine minimale Scangeschwindigkeit gewählt, um eine mögliche Deformation der Probe oder eine Kontamination des Sensors zu vermeiden. Die während der eigentlichen Aufnahmen benutzten Scangeschwindigkeiten weisen dagegen eine grob lineare Abhängigkeit von den Scanbereichen auf. Sie variieren damit zwischen 0.8 Zeilen/s bei großem Scanbereich (10 μm) und 6 Zeilen/s bei kleinem Scanbereich (250 nm). Die meisten Messungen fanden in einem 1-2 μm großen Bereich bei einer Geschwindigkeit von 1-2 Zeilen/s statt. Aufnahmen wurden stets mit 512 Punkten pro Zeile getätigt.

An Luft wurde der Cantilever mit einer Amplitude von etwa 2 Volt bei einer Frequenz um 300 kHz in Schwingung versetzt. Typische Einstellungen für die elektronischen Regler betragen 0.3 Integral und 3.0 Proportional. In Flüssigkeit betrug die Amplitude dagegen meistens ungefähr 0.5 Volt bei etwa 8 kHz Frequenz sowie 1.0 Integral und 2.0 Proportional. Diese Parameter und die Scangeschwindigkeit mußten von Fall zu Fall optimiert werden, um ein größtmögliches Signal-zu-Rauschen-Verhältnis zu erhalten und damit hochauflösende Messungen zu ermöglichen. Insbesondere mußte der Amplitudenwert bei Messungen in Flüssigkeit vorsichtig korrigiert werden (manuell in Schritten von 0.005 V), um thermische Drift zu kompensieren.

4.1.4 Aufbau und Meßprogramm zur Kraftspektroskopie

Um die benötigte Anzahl von Kraft-Distanz-Kurven mit hinreichender Genauigkeit aufnehmen zu können, wurde das AFM mit einem Signal Access Module (Digital Instruments, Santa Barbara, Kalifornien, USA) ausgestattet. Hierüber wurde das Photodetektor-Signal abgegriffen und nach einer Mittelung über jeweils 100 Datenpunkte (sog. Oversample) in den analogen Eingang einer AD/DA-Karte PCI-6052E (National Instruments, Austin, Texas, USA) eingespeist. Dies erlaubte eine maximale Abtastrate von 333 kHz bei 16 bit Auflösung. Ein von Robert Ros geschriebenes Labview-Programm (ebenfalls National Instruments) las nicht nur die empfangenen Daten ein und sicherte diese in Binärdateien mit einem Ascii-Header, sondern übernahm auch die Steuerung der Bewegung in z-Richtung. Dazu wurde das vom analogen Ausgang der erwähnten Karte stammende Signal (maximal ± 10 V) zunächst über einen Hochspannungsverstärker Model 600H (maximal ± 600 V; NanoTechTools, Echandens, CH) um den Faktor 30 verstärkt, bevor es vom Signal Access Module auf den z-Piezo des AFM (± 220 V) geleitet wurde.

4.1.5 Auswertung der Kraft-Distanz-Kurven

Eine kraftspektroskopische Messung besteht aus Serien mit Hunderten oder Tausenden von Kraft-Distanz-Kurven. Um diese einzulesen, die Abrißkräfte zu ermitteln und die Ergebnisse abzuspeichern, mußte ein Auswerteprogramm erstellt werden. Basierend auf einem Rumpfprogramm von Robert Ros, welches bereits die Input/Output-Funktionen sowie die Kalibrierung der Kurven beherrschte, wurden für diese Arbeit Routinen zur Bestimmung der Abrißkräfte entwickelt und in der Matlab-Programmierungsumgebung (Version 5.3, 1999, von MathWorks, Natick, Massachusetts, USA) geschrieben. Die der Auswertung zugrunde liegenden Kriterien sollen im folgenden kurz erläutert werden.

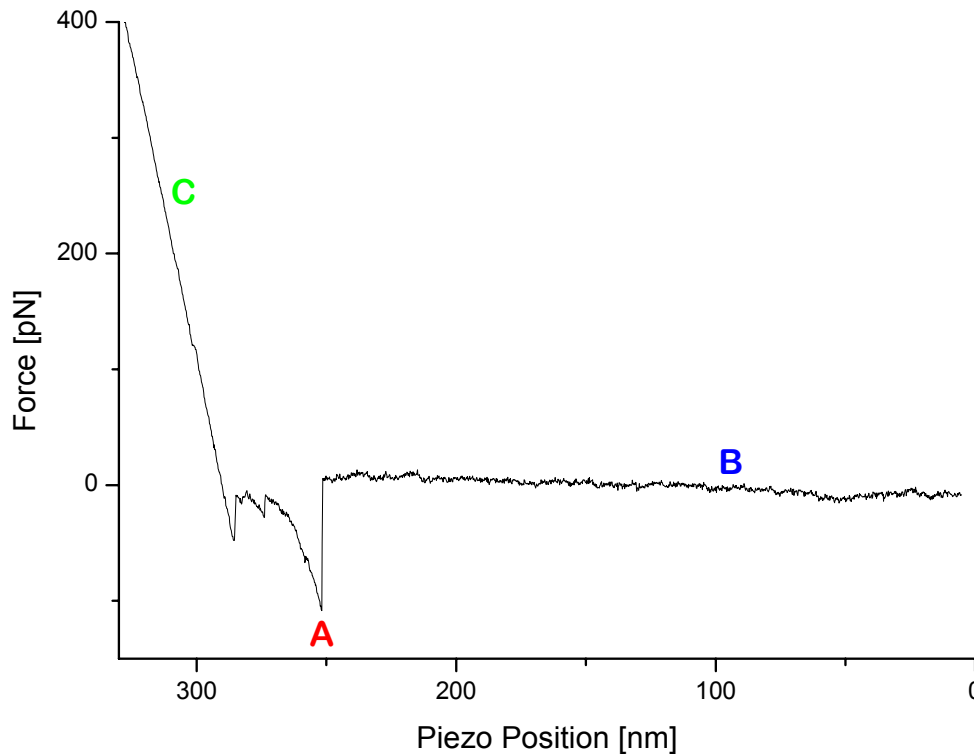


Abbildung 4.2: Eine typische Kraft-Distanz-Kurve ⁱⁱ

Die obige Kraft-Distanz-Kurve ist typisch für die Protein-DNA-Experimente. Sie weist eine ausgeprägte Basislinie (B) und eine Abrißstelle (A) auf, die alle an sie gerichteten Kriterien erfüllt. Im Kontaktbereich (C) läßt sich die Kurve kalibrieren.

Das Programm durchforstet eine vorliegende Kraft-Distanz-Kurve von ihrem Endpunkt her nach potentiellen Ereignissen. Dazu besteht eine mögliche Strategie [40] darin, die Differenz benachbarter Datenpunkte zu bilden und temporär zu speichern, sofern diese auf einen Abriß hindeutet ($\Delta F_i = F_{i+1} - F_i > 0$). Nun kann man darauffolgende Differenzen $\Delta F_{j=i+n}$ solange zu diesem Wert addieren, bis $\Delta F_j \leq 0$ ist. Die Summe ist dann ein Kandidat für eine Abrißkraft, sofern sie einen zuvor festgelegten Schwellenwert übersteigt [123]. Das hier verwendete Programm benutzt die soeben definierten positiven Differenzen nur als Indiz einer Kraftwirkung, ermittelt den in Frage kommenden Kraftwert allerdings als Differenz des Wertes an der Stelle j zu der durch lineare Regression bestimmten Basislinie (siehe Abbildung 4.2). Auf diese Weise wird der Einfluß des Rauschens auf die ermittelten Kraftwerte gegenüber der vorgenannten Methode abgemildert.

Das Programm berechnet ferner die Abrißlänge als den Abstand der potentiellen Abrißstelle zum Schnittpunkt der Basislinie mit der Regressionsgeraden durch die Datenpunkte im Kontaktbereich der Spitze mit der Oberfläche. Die Abrißlänge kann dann mit Schranken, die anhand der Konturlängen der beteiligten Moleküle vorgegeben werden, verglichen werden. Ein Kandidat wird also nur akzeptiert, wenn er die Schwellenbedingung ($F_a > F_{\text{Schwelle}}$) und die Längenbedingung ($l_{\text{min}} < l_{\text{Abriß}} < l_{\text{max}}$) erfüllt.

Nachdem der erste Kandidat angenommen oder verworfen wurde, durchsucht das Programm den Rest der Kurve in identischer Weise nach weiteren Abrißstellen. Je nach Kurvenform werden so genau ein Abriß, keine oder mehrere Abrisse detektiert. Im Falle

ⁱⁱ Die Abbildung zeigt nur den Teil der Kurve, der beim Zurückziehen der Spitze entsteht, da allein dieser für die beschriebene Auswertung von Interesse ist.

von Mehrfachabrissen wird nur der Kraftwert des erstenⁱⁱⁱ Abrisses – also an der am weitesten von der Oberfläche entfernten Stelle – als Abrißkraft gewertet.

Ein letztes entscheidendes Kriterium ist die Form der Abrißkurve. In den Experimenten dieser Arbeit ist ein stetiges Spannen des verwendeten Polymer-Linkers zwischen AFM-Spitze und DNA (siehe Abschnitt 4.2.4) direkt vor dem eigentlichen Abriß zu erwarten, was sich in einer negativen Steigung und konkaven Krümmung der Kurve in diesem Bereich ausdrücken müßte [39,123]. Durch eine manuelle Selektion wurden nur Kurven mit einem derartigen Verhalten vor dem Abriß in die weitere Auswertung einbezogen.

4.2 Immobilisierung

Obwohl mehrere Alternativen zur Verfügung standen (z.B. eine Anbindung auf thiol-funktionalisierten Goldschichten), haben sich bei den Experimenten Glimmer und Glas als Substrate bewährt. Neun von zehn Messungen wurden auf etwa 1 cm × 1 cm großen Glimmerscheiben (Mica; Provac AG, Florida, USA) durchgeführt, die entweder frisch mit Tesafilm abgezogen und sofort verwendet oder zunächst noch im Exsiccator mit 3-Aminopropyl-triethoxysilan (APTES; Sigma, Seelze, D) funktionalisiert wurden (Abbildung 2.5a). Die Funktionalisierung der Glasscheibchen (Menzel-Gläser, Braunschweig, D) geschah analog, wobei der frisch abgezogene Glimmer durch gerade gereinigtes Glas^{iv} zu ersetzen ist. Die folgenden Abschnitte beschreiben die Herstellung der S-Layer-, Annexin- und DNA-Proben für die Rasterkraftmikroskopie mit Hilfe dieser Substrate sowie die Präparation von Proben und AFM-Spitzen für die Kraftspektroskopie.

4.2.1 S-Layer

Die HPI-Layer von *Deinococcus radiodurans* (Stamm R₁) konnten von Ute Santarius (MPI für Biochemie, Martinsried) nach einem für diesen Stamm entwickelten Standardverfahren [82] gewonnen werden, indem diese mit Hilfe von Lithiumdodecylsulfat aus ganzen Zellen extrahiert und anschließend über einen Percoll-Dichtegradienten gereinigt werden. Sie wurden uns in einer Stammlösung (0.2 mg/ml in einer Lösung aus Millipore-Wasser und 0,01% Natriumazid) zur Verfügung gestellt. Die S-Layer-Proteine der verschiedenen Stämme von *Corynebacterium glutamicum* wurden von Nicole Hansmeier (Lehrstuhl für Genetik, Universität Bielefeld) eigens für diese Experimente durch kalte Extraktion (modifiziert nach [87]) gewonnen und mit Konzentrationen um 0.5 mg/ml in einer Pufferlösung (10 mM Tris-HCl, 4% SDS, pH 6.8) aufbewahrt. Die Stammlösungen wurden stets bei 4 °C gelagert.

Für Aufnahmen an Luft wurde 1 µl der entsprechenden S-Layer-Lösung auf APTES-funktionalisierten Glimmer gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten (bei Raumtemperatur) wurde die Probe gründlich mit Millipore-Wasser abgewaschen, um alle Schichten zu entfernen, die nicht fest mit der Oberfläche verbunden waren. Schließlich wurde die Probe mit Stickstoff abgeblasen.

ⁱⁱⁱ Wie erwähnt beginnt die Routine ihre Untersuchung am Ende der Kraft-Distanz-Kurve. Der erste vom Programm erkannte Abriß ist also eigentlich der letzte in der Reihenfolge des Zurückfahrens von der Probe, i.e. der am weitesten von der Probe entfernte.

^{iv} Hierfür werden die Glasplättchen in Aceton gegeben und 5 min lang einem Ultraschallbad ausgesetzt, danach mit Millipore-Wasser abgespült, in Ethanol gegeben und wiederum für 5 min einem Ultraschallbad ausgesetzt; nach erneutem Abwaschen werden sie noch 2 min lang in einem UV-Cleaner bestrahlt.

Für Abbildungen in Flüssigkeit wurden verschiedene Strategien verfolgt. S-Layer-Proteine aus der Stammlösung von *D. radiodurans* wurden mindestens 1:5 mit einem Adsorptionspuffer verdünnt, der ein zweiwertiges Kation enthielt (entweder 10 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20 mM MgCl₂, pH 8.1 oder 10 mM Tris-HCl, 25 mM CaCl₂, pH 8.1). 2 µl der verdünnten Lösung wurden auf frisch abgezogenen Glimmer gegeben und dort für 30-60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Probe mit dem prospektiven Abbildepuffer abgewaschen und unverzüglich im AFM untersucht. Als Abbildepuffer diente dabei entweder eine Lösung aus 10 mM Tris-HCl und 300 mM KCl bei pH 8.1 [83,84] oder 20 mM 2-[N-Morpholino]ethanesulfonic Acid (MES; Sigma, CH) bei pH 6 [18]. Die besten Resultate wurden mit einem Calcium-haltigen Adsorptionspuffer und einem MES-Abbildepuffer erzielt.

Die Anbindung über zweiwertige Kationen in der beschriebenen Weise gelang mit den S-Layern-Proteinen von *C. glutamicum* nicht. (Eine neue Arbeit [53] legt nahe, daß zu niedrige Kationenkonzentrationen dafür verantwortlich gewesen sein könnten.) Stattdessen wurden die S-Layer wie für die Messungen an Luft auf APTES-funktionalisiertem Glimmer immobilisiert und anschließend ohne Abblasen oder weitere Verzögerung in dem erstgenannten Abbildepuffer (10 mM Tris-HCl, 300 mM KCl, pH 8.1) mit dem AFM untersucht.

4.2.2 Annexin V

Die in den Experimenten verwendeten Annexin V-Proteine waren eine freundliche Spende von Robert Huber (MPI für Biochemie, Martinsried). Um die Annexin-Kristalle abzubilden, mußte jedoch zunächst eine Lipid-Doppelschicht auf dem Substrat immobilisiert werden. Diese wurde durch eine Mischung von zwei Mol Palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholin (POPC; Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA) mit einem Mol Phosphatidylserin (PS; Sigma, Seelze, D) aus unilamellaren Vesikeln hergestellt, indem 200 µl dieser Lipid-Suspension (1 mM PS: 2 POPC, 2 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, pH 7.4) 70 Minuten lang bei Raumtemperatur auf frisch abgezogenem Glimmer inkubiert wurden [105]. Danach wurde die Probe vorsichtig mit dem Abbildepuffer (10 mM Hepes, 2 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, pH 7.4) abgewaschen. Auf die dergestalt präparierte Oberfläche wurden 200 µl einer Annexin V-Lösung (0.1 mg/ml) gegeben und dort 30 Minuten lang inkubiert [104]. Schwach gebundene Biomoleküle wurden wiederum durch vorsichtiges Spülen mit dem Abbildepuffer entfernt, bevor die fertige Probe im AFM unter physiologischen Bedingungen untersucht wurde.

4.2.3 DNA

Die rasterkraftmikroskopisch untersuchte DNA war entweder Lambda-DNA (Promega, Mannheim, D), Plasmid-DNA (pGEM-3Z; Promega, Mannheim, D) oder die ExpG-Binderegion aus dem Megaplasmid-2 von *Sinorhizobium meliloti*. Letztere wurde von Birgit Baumgarth (Lehrstuhl für Genetik, Universität Bielefeld) aus einem PCR-Produkt aufgereinigt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die 157 bp lange Binderegion wurde dabei um ein nichtbindendes Fragment von entweder 940 bp oder 960 bp Länge verlängert (was einer Gesamtlänge von etwa 373 nm bzw. 380 nm entspricht).

Für Abbildungen an Luft wurde 1 µl einer schwach konzentrierten DNA-Lösung (etwa 5 µg/ml) 20-30 Minuten bei Raumtemperatur auf APTES-funktionalisiertem Glimmer inkubiert. Die Probe wurde anschließend mit Millipore-Wasser abgewaschen und mit Stickstoff trockengeblasen. Da die Konzentrationsangaben der DNA-Stammlösungen

(gerade bei den *exp*-Proben) mit einem nicht unerheblichen Fehler behaftet waren, erforderte das Auffinden der optimalen Verdünnung stets längere Meßreihen.

Die Flexibilität der DNA-Moleküle wird durch die Adhäsionskräfte zwischen DNA und Oberfläche beschränkt. Die zu untersuchenden DNA-Protein-Wechselwirkungen könnten jedoch ein höheres Maß an Flexibilität erfordern, als die Anordnung mit APTES-funktionalisiertem Glimmer erlaubt. Es sind drei Immobilisierungsverfahren bekannt, die eine gezielte Variation der Adhäsionskräfte ermöglichen. Wenn APTES verdünnt („diluted AP-Mica technique“) oder mit anderen Organosilanen gemischt wird („mixed SAM technique“), kann die Anzahl der Aminogruppen auf der Glimmoberfläche und darüber die Stärke der Immobilisierung kontrolliert werden [124]. Werden dagegen zweiwertige Kationen zur Immobilisierung auf Glimmer eingesetzt, können die Adhäsionskräfte durch Änderungen in der Konzentration des gewählten Kations variiert werden. Dabei wurden die besten Ergebnisse mit Nickel(II)-Ionen erzielt [125]. Da zweiwertige Kationen die zu untersuchende Bindung nicht behindern [121], fand letztere Methode in dieser Arbeit Verwendung.

Die fragliche DNA wurde in einem kationenhaltigen Abbildepuffer (10 mM Hepes, 1 mM NiCl₂, pH 7) auf eine Konzentration von 0.3-0.5 µg/ml verdünnt. 25 µl dieser Lösung wurden dann in die über frisch abgezogenem Glimmer montierte AFM-Flüssigzelle eingespritzt. Die Messungen begannen nach etwa 15 Minuten, die für eine thermische Equilibrierung des Systems und das Heranfahren des Sensors an die Probe benötigt wurden.

4.2.4 Präparation zur Kraftspektroskopie

Für die kraftspektroskopischen Untersuchungen der Protein-DNA-Wechselwirkungen mußten die Bindungspartner an Kraftsensor und Oberfläche immobilisiert werden.

Immobilisierung der DNA-Fragmente an der AFM-Spitze

Die erste Hälfte des Systems bestand aus einem 157 bp langen DNA-Fragment mit der Bindestelle für das ExpG-Protein. Dieses Fragment wurde von Birgit Baumgarth mit einer Thiolgruppe (SH) versehen, welche zur Anbindung an den AFM-Sensor diente. Die DNA wurde dann in einem Bindepuffer verdünnt (25 µM SH-DNA in 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.1 mM NiCl₂, pH 8.3) und bei 4 °C aufbewahrt.

Die zu funktionalisierenden Siliziumnitrid-Sensoren wurden zunächst für wenige Sekunden in Salpetersäure (65 %; Riedel-deHaën, Seelze, D) getaucht und dann zwecks Silanisierung [42] zwei Stunden lang in einer Lösung aus 2% APTES (Sigma, Seelze, D) in trockenem Toluol (Fluka, Seelze, D) aufbewahrt. Danach wurden sie mit Toluol abgespült und für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Crosslinker N-hydroxysuccinimid-poly(ethylenglycol)-maleimid (NHS-PEG-MAL; Shearwater Polymers, Huntsville, Alabama, USA) in einem Phosphatpuffer (1 mM NHS-PEG-MAL in 0.1 M KH₂PO₄, pH 8.0) inkubiert. Nach Abspülen mit dem Phosphatpuffer wurden jede Spitze in 20 µl der zuvor präparierten DNA-Lösung (etwa 10 ng/µl SH-DNA) getaucht und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden sie dann mit dem Bindepuffer abgewaschen. Die solcherart funktionalisierten Sensoren konnten ohne Aktivitätsverlust mindestens eine Woche lang in diesem Puffer bei 4 °C gelagert werden.

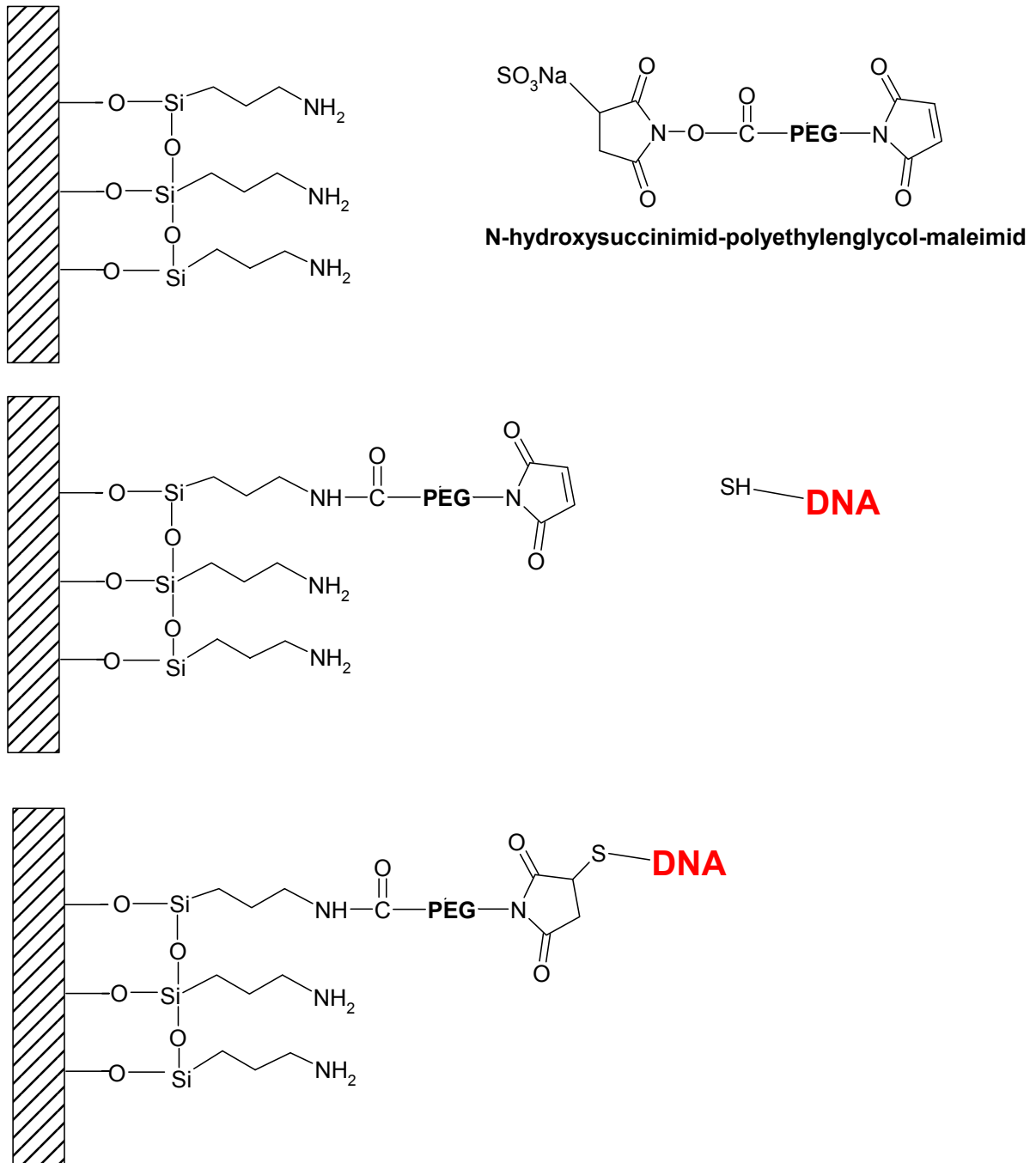


Abbildung 4.3: Funktionalisierung der AFM-Spitze mit DNA

Die Präparation der AFM-Sensoren verläuft in drei Schritten: eine Spitze wird mit APTES funktionalisiert (oberes Bild); der Crosslinker NHS-PEG-MAL bindet an die Aminogruppe (mittleres Bild); das modifizierte DNA-Fragment bindet mit der Thiol-Gruppe an das Maleimid (unteres Bild).

Immobilisierung der ExpG-Proteine auf dem Substrat

Die zweite Hälfte des Systems wurde vom ExpG-Protein gebildet, das von Birgit Baumgarth gewonnen und aufgereinigt wurde. ExpG (MW 21.8 kDa) enthält fünf Lysine, an welche der entsprechend ausgewählte Linker binden sollte. Da die Lysine räumlich weitverteilt sind, war dies keine gezielte Immobilisation in Bezug auf den Angriffspunkt, hielt allerdings die Wahrscheinlichkeit gering, durch die Anbindung die fragliche Bindungstasche zu blockieren. Der Crosslinker bis(Sulfosuccinimidyl)suberat-Natriumsalz (BS³; Sigma, Seelze, D) wurde im Verhältnis 5:1 mit dem Protein in einem Phosphatpuffer gemischt (21.5 µM BS³, 4.3 µM ExpG in 0.1 M KH₂PO₄, pH 8.0) und unverzüglich auf APTES-funktionalisierten Glimmer (25 µl pro Probe) aufgebracht. Die Inkubationszeit bei 4 °C betrug eine Stunde. Danach wurden die Proben mit dem Bindepuffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.1 mM NiCl₂, pH 8.3) abgewaschen. Sie konnten in diesem Puffer bei 4 °C mindestens zwei Tage ohne Aktivitätsverlust gelagert werden.

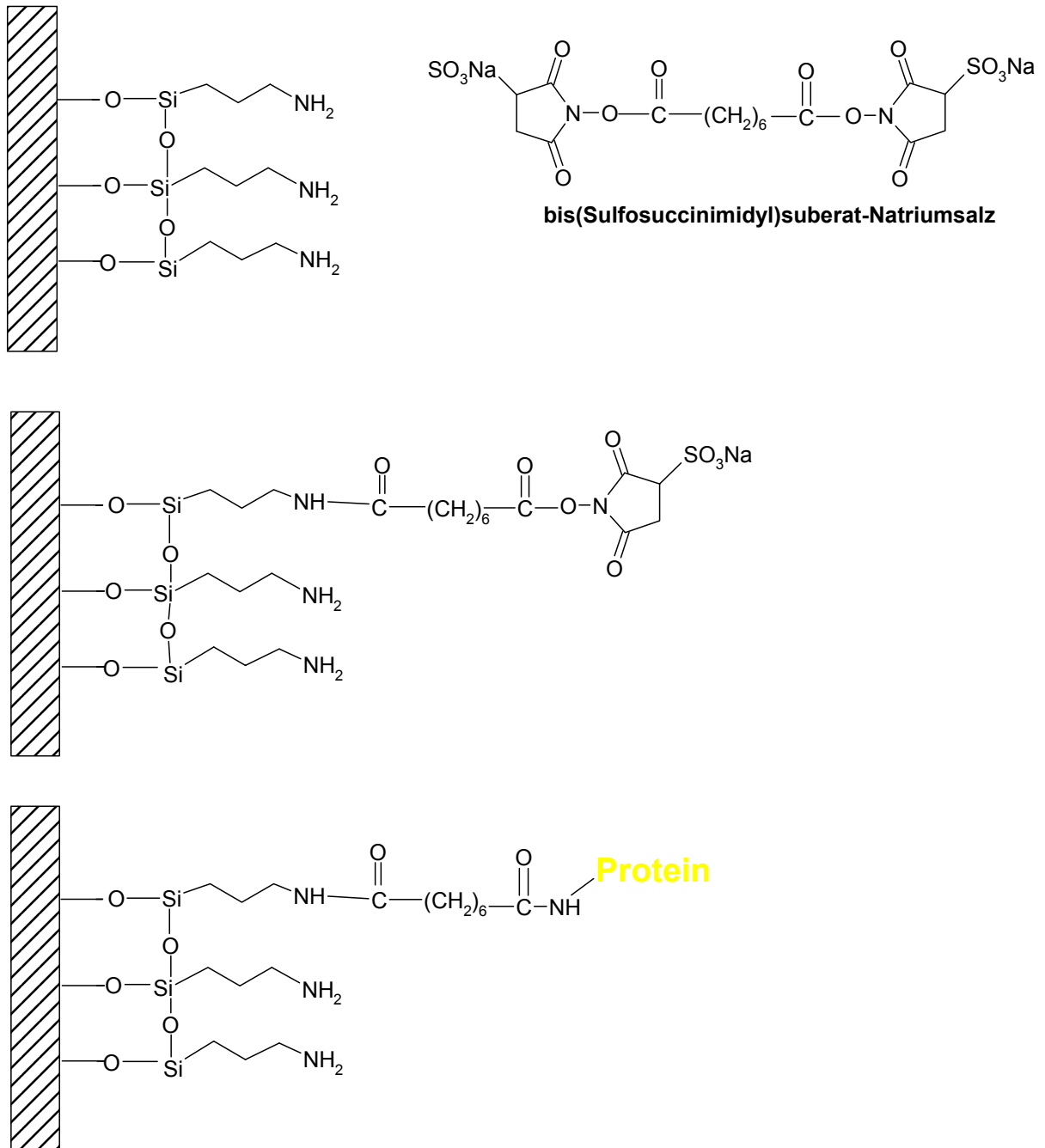


Abbildung 4.4: Funktionalisierung der Oberfläche mit Protein

Die Oberfläche wird ebenfalls in drei Schritten präpariert: Glimmer wird mit APTES funktionalisiert (oberes Bild); der Crosslinker BS^3 bindet an die Aminogruppe der Oberfläche (mittleres Bild) und die Aminogruppe eines Lysins im ExpG-Protein (unteres Bild).

Kapitel 5

Experimente und Resultate

We are usually convinced more easily by reasons we have found ourselves than by those which have occurred to others. - Blaise Pascal, *Pensées* (1670)

Die auf den geschilderten Grundlagen und Methoden basierenden Experimente dieser Arbeit fallen in zwei Kategorien. Zum einen sind da die rasterkraftmikroskopischen Studien an natürlichen zweidimensionalen Proteinkristallen, zum anderen die Untersuchungen zur Bindung regulatorischer Proteine an DNA mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie wie auch der Kraftspektroskopie. Die entsprechenden Ergebnisse sollen nun jeweils in diesen Zusammenhängen diskutiert werden.

5.1 2-dimensionale Proteinkristalle

Da zwar die Methoden, aber weder die Systeme selbst noch die mit ihnen verbundenen Fragestellungen direkt vergleichbar sind, werden die rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen an S-Layern und Annexin-Kristallen in zwei separaten Abschnitten besprochen. AFM-Messungen wurden ausschließlich im Tapping Mode durchgeführt. Für alle AFM-Aufnahmen gilt ferner, daß diese in der Regel ungefiltert präsentiert werden; allenfalls eine etwaige Schräglage der Probe wurde mittels eines Planefit 1. oder 2. Ordnung aus den Bildern entfernt. Nur einige ausgewählte Aufnahmen wurden einer Fast Fourier Transformation (FFT) in zwei Dimensionen unterzogen; in diesen Fällen wird aber im Text oder der Bildunterschrift gesondert darauf hingewiesen.

5.1.1 AFM-Aufnahmen von S-Layern

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die S-Layer von *D. radiodurans* und mehreren *C. glutamicum*-Stämmen untersucht.

Deinococcus radiodurans

Da der HPI-Layer von *D. radiodurans* bereits intensiv hinsichtlich seiner Struktur untersucht wurde, bot er sich für die hier gezeigten Studien an S-Layern als Ausgangspunkt an, um an diesem System Präparations- und Abbildungstechniken zu erproben, die sich eventuell auf den S-Layer von *C. glutamicum* übertragen ließen.

Wie in Abbildung 5.1 gezeigt, konnten die wesentlichen Strukturmerkmale des HPI-Layers erfaßt werden. Die **hexagonale (p6)-Symmetrie** ist auf allen Bildern klar zu erkennen, in den fouriergefilterten Darstellungen (Einschübe in 5.1.C-E) wird die präzisere **M₆C₂**-Klassifikation nach dem Saxton-Baumeister-Schema (siehe Abbildung 3.1) besonders deutlich: Die massive hexamerische Kernregion (M₆) wird von sechs Speichen umgeben, von denen jede auf jeweils eine Speiche der Nachbareinheit trifft (C₂).

Bemerkenswerterweise war es nicht immer leicht, die **zentrale Pore** abzubilden. Generell war diese bei Messungen in Pufferlösungen ausgeprägter als an Luft (man vergleiche beispielsweise die FFT-gefilterten Darstellungen von 5.1E und 5.1C), was sich recht einfach mit einer Reaktion auf die Anwesenheit oder Abwesenheit physiologischer Bedingungen

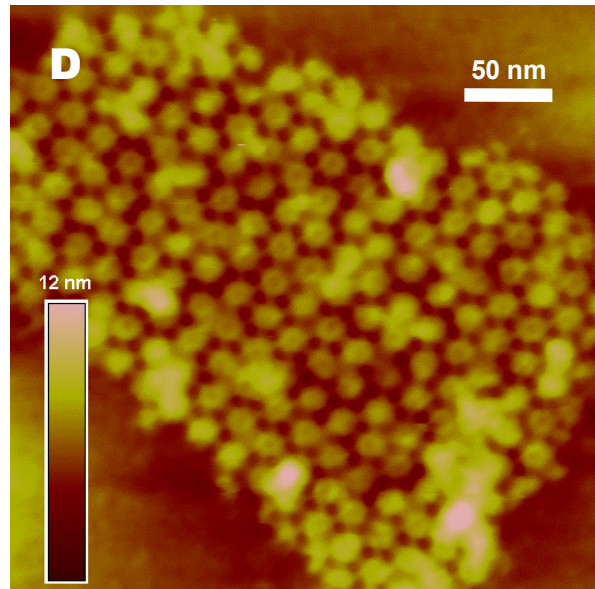
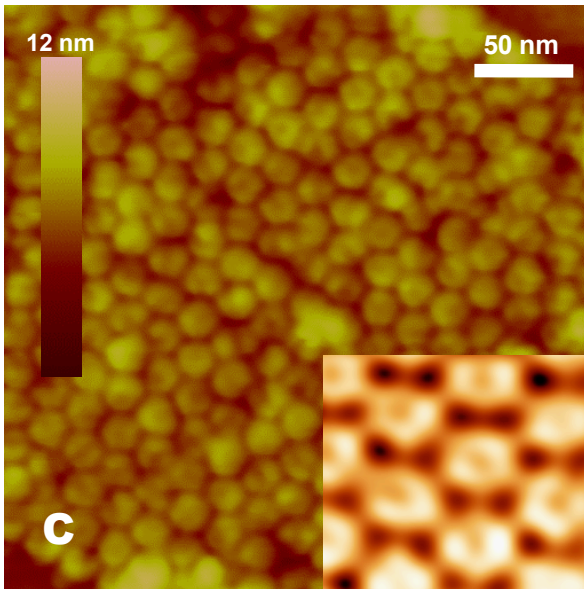
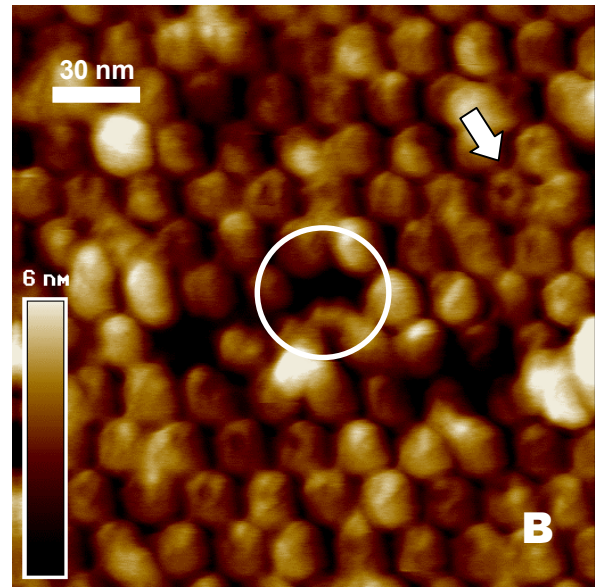
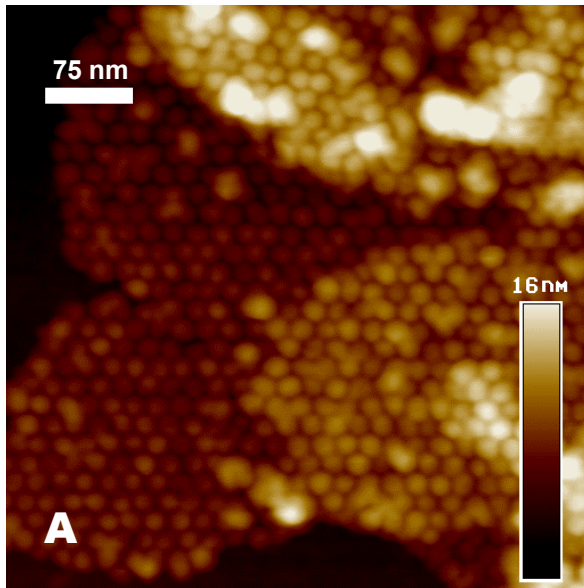


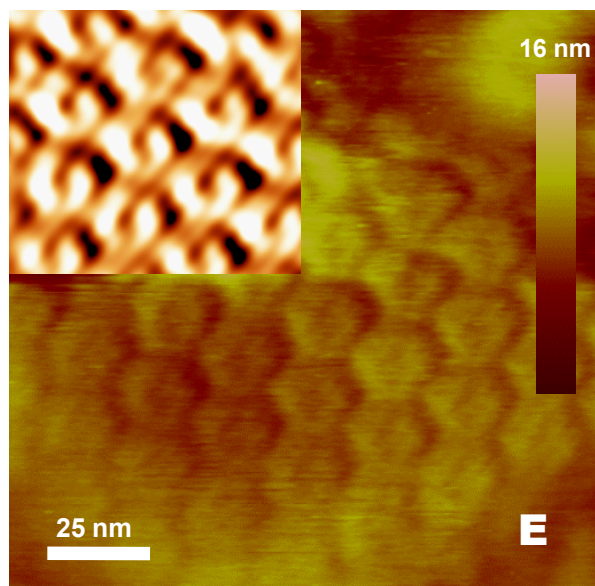
Abbildung 5.1 : AFM-Aufnahmen von *D. radiodurans*

Die Bilder zeigen stets die ungefilterte Aufnahme und im Falle von (C) und (E) als Einschub auch eine fouriergefilterte Darstellung.

Aufnahmen (A)-(D) sind an Luft entstanden, wobei die S-Layer auf APTES-funktionalisiertem Glimmer immobilisiert waren.

(E) wurde in einer Pufferlösung (20 mM MES, pH 6) gemessen; die HPI-Layer wurden dazu zuvor durch Calcium-Ionen auf Glimmer immobilisiert.

Die zentralen Poren der HPI-Hexamere sind in (B)-(D) bereits deutlich zu erkennen – man beachte den Pfeil in (B) – aber in wässriger Lösung (E) offenbar ausgeprägter.



erklären läßt. Da die Erkennbarkeit der Poren, also der Bildkontrast, auf Höhenunterschieden beruht, liegt es nahe anzunehmen, daß die Poren größtenteils nur in physiologischer Umgebung geöffnet, an Luft dagegen geschlossen sind.

Leider gelang es nicht wie in [83], die **einzelnen Protomere** der Kernregionen exakt abzubilden. Dennoch sind Hinweise auf diese Unterstruktur in den Bildern zu entdecken. In Abbildung 5.1B ist nicht nur ein Hexamer (trotz Messung an Luft) sehr deutlich zu erkennen (weißer Pfeil; man vermeint fast Unterteilungen im Ring um die zentrale Pore auszumachen), es finden sich auch einige Stellen in der Aufnahme, wo ganze Hexamere oder *Teile davon* fehlen. In der weiß eingekreisten Region sind noch zwei Protomere auszumachen, die mit den Nachbarhexameren verbunden sind, obwohl der Rest des Kerns offenbar fehlt. Und auch an anderen Kernen fehlen ein oder mehrere Protomere. Dieses Phänomen wird bei HPI-Layern häufig beobachtet [83,84].

Obwohl ein signifikanter Anteil der immobilisierten HPI-Layer als Monolagen auftraten, wurden häufig Überlappungen und Stapel von HPI-Layern beobachtet (siehe 5.1A). Da die beiden Oberflächen eines HPI-Layers sich in ihrer Hydrophobizität stark unterscheiden, binden die Layer bevorzugt mit einer bestimmten Seite auf ein vorgegebenes Substratⁱ. Weil zudem bei einer Stapelung immer gleiche Seiten aufeinander liegen, wird so auch die andere Seite des Layers sichtbar [84]. Auffällige Strukturunterschiede zwischen den Schichten eines Stapels, d.h. den beiden Seiten des HPI-Layers, konnten in dieser Arbeit jedoch nicht festgestellt werden.

Da die bereits gut dokumentierten Struktur von *D. radiodurans* recht getreu wiedergegeben wurde, konnte dieses Systems durchaus auch als Längenreferenz für die xy-Eichung der Abbildungskala bei den folgenden Messungen verwendet werden. Die Gitterkonstante des HPI-Layers wurde also zu diesem Zweck gleich 18 nm gesetzt; hinsichtlich dieses Wertes besteht in der Literatur – unabhängig vom Meßverfahren – große Übereinstimmung [18,19,52,72,83,84].

Corynebacterium glutamicum

Zu Beginn dieser Arbeit war über die Struktur der S-Layer von *C. glutamicum* nur sehr wenig bekannt. Eine grobe elektronenmikroskopische Untersuchung hatte für den Referenzstamm ATCC 17965 eine hexagonale Symmetrie ergeben [89]. Dieser Stamm ist mittlerweile auch von Scheuring *et al.* [53] einer gründlichen Analyse mittels Rasterkraftmikroskopie und Kraftspektroskopie unterzogen worden. Da die S-Layer-Proteine der verschiedenen *C. glutamicum*-Stämme jedoch nur schwache Homologien untereinander zeigen, sollten sich signifikante Unterschiede zwischen den von diesen Proteinen ausgebildeten Strukturen zeigen. Überraschenderweise wiesen die S-Layer aller sechs bislang untersuchten Stämme eine **hexagonale Symmetrie** auf. Es wäre natürlich möglich, daß sich die Ähnlichkeiten auf die für die symmetrischen Verknüpfungen zuständigen Randbereiche der Proteine beschränken, während sie sich in ihrem inneren Aufbau deutlich voneinander unterscheiden. Dennoch könnte dieser Hinweis im Rahmen der biochemischen Untersuchung dazu beitragen, die offenbar vorhandenen Ähnlichkeitselemente aufzufinden.

ⁱ Nach [84] bindet der HPI-Layer z.B. in Gegenwart gelöster zweiwertiger Kationen immer mit seiner hydrophilen Außenseite auf Glimmer.

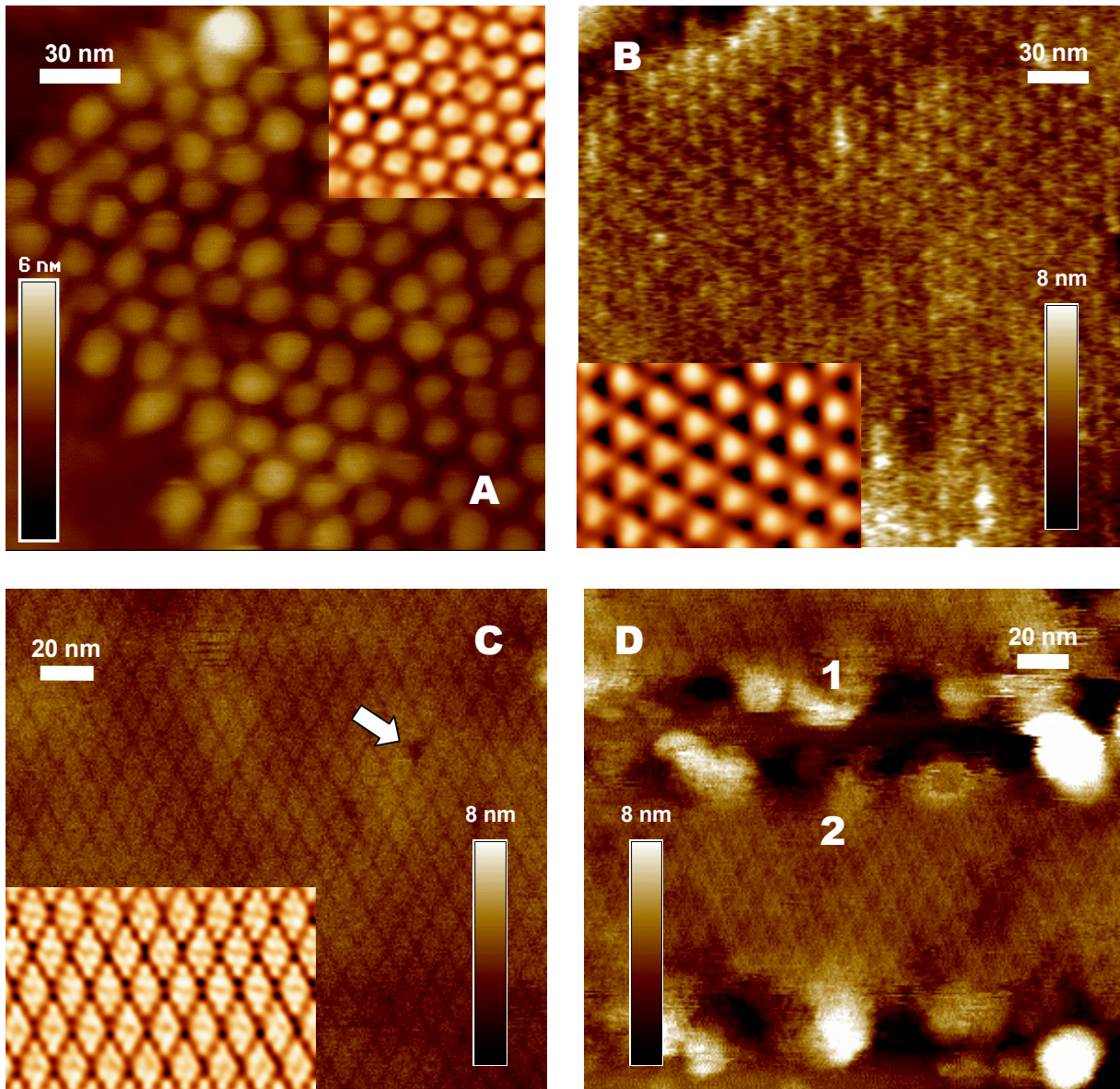
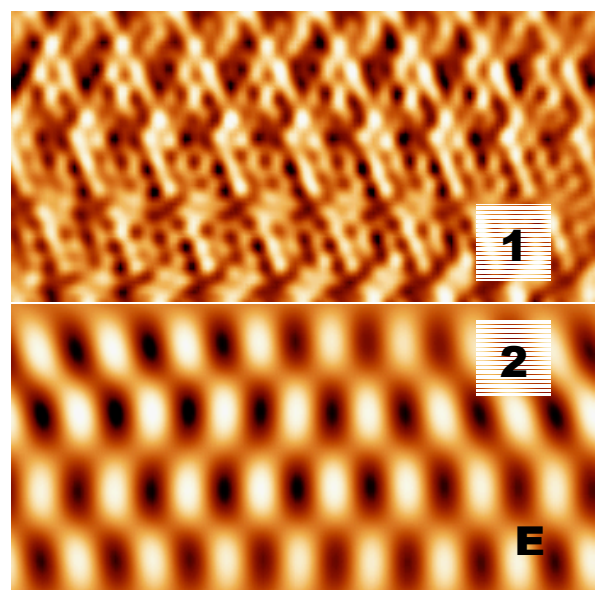


Abbildung 5.2 : AFM-Aufnahmen von *C. glutamicum* ATCC 17965

Nur Aufnahme (A) ist an Luft entstanden, wobei die S-Layer auf APTES-funktionalisiertem Glimmer immobilisiert waren.

(B)-(D) wurden in einer Pufferlösung (10 mM Tris-HCl, 300 mM KCl, pH 8,1) gemessen; auch hier waren die S-Layer auf APTES-funktionalisiertem Glimmer immobilisiert. Die jeweils erkennbaren Strukturen hängen von der durch die AFM-Spitze auf die Probe ausgeübten Kräfte ab (siehe Text).

Die Bilder (A)-(C) zeigen stets die ungefilterte Aufnahme und als Einschub auch eine fouriergefilterte Darstellung. In (E) sind FFT-gefilterte Bilder der beiden gekennzeichneten Bereiche aus (D) zu sehen (die Kantenlänge beträgt dabei 100 nm).



Aus den erwähnten Stämmen wurden vorläufig zwei zur näheren Untersuchung ausgewählt, zum einen der Referenzstamm ATCC 17965 und zum anderen der Stamm DSM 20598.

Der S-Layer von **ATCC 17965** zeigte bei AFM-Messungen an Luft eine hexagonale (p6)-Symmetrie, jedoch nicht die geringsten Andeutungen einer Substruktur (Abbildung 5.2A). Die Oberfläche des S-Layers wirkt auf den Aufnahmen befremdlich glatt, wenn man ihn z.B. mit dem HPI-Layer vergleicht. Untersuchungen in physiologischer Umgebung (Abbildung 5.2B-D) ergaben, daß dies offenbar eine Deformationserscheinung durch das Austrocknen an Luft ist. Diese Erkenntnis steht in Einklang mit der erwähnten Elektronenmikroskopiestudie, welche im Anschluß an die Gefrierbruchpräparation ebenfalls keine über eine hexagonale Anordnung hinausgehende Struktur erkennen konnte. Wird der S-Layer in Pufferlösung betrachtet (5.2B), erkennt man – zumindest in der FFT – die spezielle Form der (p6)-Symmetrie, nämlich M_6C_3 . Im Unterschied zu *D. radiodurans* treffen hier immer drei Verbindungsstücke (C_3) in einem Punkt aufeinander.

Es konnten jedoch auch Doppelschichten von S-Layern gefunden werden. Bei äußerst geringer Kraftwirkung durch die AFM-Spitze konnte an ihnen die **Kehrseite** des S-Layers studiert werden. Diese wies eine vollkommen andere Struktur auf (5.2C). Ein Gebilde aus zwei eng miteinander verbundenen Dreiecken schien deren Grundeinheit zu bilden (man beachte die fouriergefilterte Darstellung). Fehlstellen wie die durch einen Pfeil gekennzeichnete wiesen darauf hin, daß die Basis tatsächlich aus zwei separablen Dreiecken bestand. Die Annahme, daß es sich dabei um die andere Seite des S-Layers handelte, konnte noch in dem selben Experiment bestätigt werden. Durch Erhöhen der Kraftwirkung (5.2D) veränderte sich das Bild nachhaltig (die Stelle ist in 5.2C und 5.2D dieselbe). Während im oberen Teil (mit 1 bezeichnet) noch Reste der zuvor beobachteten Struktur zu erkennen waren, wurde im unteren (2) eine andere Struktur sichtbar. Die Fouriertransformation von Teil 2 (in 5.2E gezeigt) wies eine starke Ähnlichkeit mit der Struktur der bereits untersuchten Seite des S-Layers auf (vergleiche 5.2B), was die Vermutung nahelegte, daß hier eine auf der ersten „verkehrtherum“ liegende zweite Schicht durch die AFM-Spitze abgetragen wurde (auf diese Weise lassen sich auch die zahlreichen in 5.2D zu sehenden Bruchstücke als solche identifizieren).

Interessanterweise ist die Auflösung in Bezug auf Teil 1 von 5.2D, also die obere Schicht, so gut gewesen, daß die FFT-gefilterte Darstellung zusätzliche Elemente gegenüber 5.2C aufwies. Auch wenn der untere Teil der Darstellung aufgrund des Zerreißvorganges verzerrt ist, sind dennoch zwischen den bereits bekannten Rauten (Doppeldreiecken) tiefer liegende Strukturen zu erkennen, die an eine kreisförmige Pore mit davon ausgehenden Verbindungsstücken erinnern. Vermessungen der Schichtdicke des S-Layers ergaben den recht geringen Wert von 3.1 ± 0.5 nm; dies überstieg die Rauigkeit der Oberfläche nur geringfügig. Da die Tiefenauflösung der AFM-Aufnahme offenbar im Bereich der Schichtdicke lag, könnte es sich bei den erwähnten Strukturen in 5.2E(1) um die Rückseite handeln. Daraus ließe sich weiterhin schließen, daß die beiden Seiten bezüglich ihrer massiven Regionen nicht deckungsgleich übereinander liegen, wie dies bei *D. radiodurans* der Fall ist, sondern **versetzt** (ähnlich einer hexagonal dichtesten Kugelpackung).

Alle vorgenannten Resultate und Schlüsse stimmen mit den Ergebnissen von Scheuring *et al.* [53] überein. Scheuring *et al.* konnten darüber hinaus durch Vergleichsmessungen an modifizierten S-Layern den hydrophobischen C-Terminus des PS2-Proteins, der für die Anbindung des S-Layer-Proteins an die Zellwand verantwortlich ist, in der Struktur lokalisieren; aus Fehlstellenanalysen wurde anschließend ein dreidimensionales Modell des S-Layers konstruiert.

Der S-Layer des Stammes **DSM 20598** bildete – im Unterschied zu ATCC 17965 – sehr häufig **Stapel** auf dem Substrat aus (Abbildung 5.3). Dieser Umstand gestattete es, beide Seiten des S-Layers zu beobachten. Während die Oberseite der untersten Schicht (mit einer 1 in 5.3A bezeichnet), die vom Referenzstamm bekannte **M₆C₃**-Organisation aufwies (siehe die FFT-gefilterte Darstellung in 5.3C), war der Aufbau der Kehrseite, die bei der zweiten Schicht sichtbar wird (in 5.3A mit einer 2 bezeichnet), offenbar komplexer, wie auf der fouriergefilterten Darstellung in 5.3C gut zu erkennen ist. Eine etwaige dritte Schicht wies – wie in Abbildung 5.3B gezeigt – wiederum die M₆C₃-Organisation der ersten Schicht aufⁱⁱ. Dies bestätigte die Annahme, daß die S-Layer immer mit paarweise identischen Seiten aufeinander liegen.

Was nun die **auffällige Struktur** der einen Seite betrifft, bei der es sich in Analogie zu ATCC 17965 um die Außenseite des S-Layers handeln müßte, scheint jedoch eine gewisse Vorsicht angebracht. Da die Untersuchungen am Referenzstamm gezeigt haben, welche Verfremdungseffekte durch Austrocknen der *C. glutamicum*-S-Layer an Luft auftreten können (Abbildung 5.2)ⁱⁱⁱ, müssen zukünftige Messungen in geeigneter physiologischer Umgebung noch erweisen, ob es sich dabei tatsächlich um die native Struktur des S-Layers handelt. Aufgrund der Sequenzunterschiede zwischen den S-Layer-Proteinen der einzelnen *C. glutamicum*-Stämme ist jedoch zu erwarten, daß sich – auch hinsichtlich einer dreidimensionalen Modellierung – im Aufbau signifikante Abweichungen zum Referenzstamm ergeben.

Vergleich der untersuchten S-Layer

Es muß noch einmal betont werden, daß die Systeme *D. radiodurans* und *C. glutamicum* biologisch in nahezu keiner Beziehung zueinander stehen. Es war ein glücklicher Zufall, daß die S-Layer aller hier untersuchten Bakterienstämme eine hexagonale Symmetrie aufwiesen, da dies einen Vergleich der einzelnen Strukturen ermöglichte. Die beobachteten Strukturunterschiede sind in Tabelle 5.1 zusammengefaßt. Die Messungen von Gitterkonstanten und Schichtdicken wurden dabei immer an verschiedenen S-Layer-Patches und dort an verschiedenen Aufnahmen und in unterschiedlichen Orientierungen ausgeführt, um Fehler aufgrund der AFM-Scanrichtung zu vermeiden. Die angegebenen Fehler sind stets die Standardabweichungen der Mittelwerte in Bezug auf die Anzahl der Meßwerte (n= 576 für Gitterkonstanten, n=15 für Schichtdicken).

Auffällig sind dabei vor allem die Unterschiede in den Schichtdicken. Diese korrespondieren hervorragend mit den entsprechenden Molekulargewichten, lassen sich also über die unterschiedlichen Längen der Aminosäuresequenzen erklären. Die Gitterkonstanten der hexagonalen Strukturen der *C. glutamicum*-S-Layer sind zwar durchaus deutlich geringer als die bekannten 18 nm von *D. radiodurans*; in der gesamten Bandbreite der beobachteten Gitterkonstanten von S-Layern (2-35 nm nach [68]) nehmen sich diese Unterschiede jedoch eher geringfügig aus.

ⁱⁱ Man möge sich von den Höhenskalen der Abbildungen 5.3A und 5.3B übrigens nicht täuschen lassen; in 5.3A gelang es nicht, in einer geeigneten Weise die Schräglage der Probe aus dem Bild zu subtrahieren. Messungen an Querschnitten zur Bestimmung der Schichtdicke lassen jedoch klar erkennen, daß es sich bei der obersten Schicht in 5.3B um die dritte eines Stapels handelt.

ⁱⁱⁱ Da für *D. radiodurans* nachgewiesen wurde, daß die Struktur des sehr widerstandsfähigen HPI-Layers durch Austrocknen an Luft nur in geringem Maße beeinträchtigt wird [134], kann die beobachtete größere Empfindlichkeit durchaus als weitere Eigenschaft des S-Layers von ATCC 17965 aufgefaßt werden; wiederum gilt, daß sich andere *C. glutamicum*-Stämme nicht zwingend ebenso verhalten müssen.

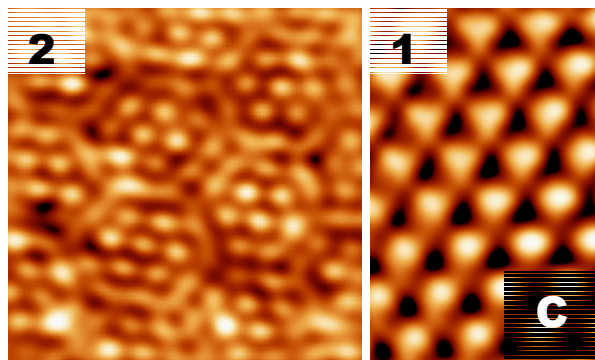
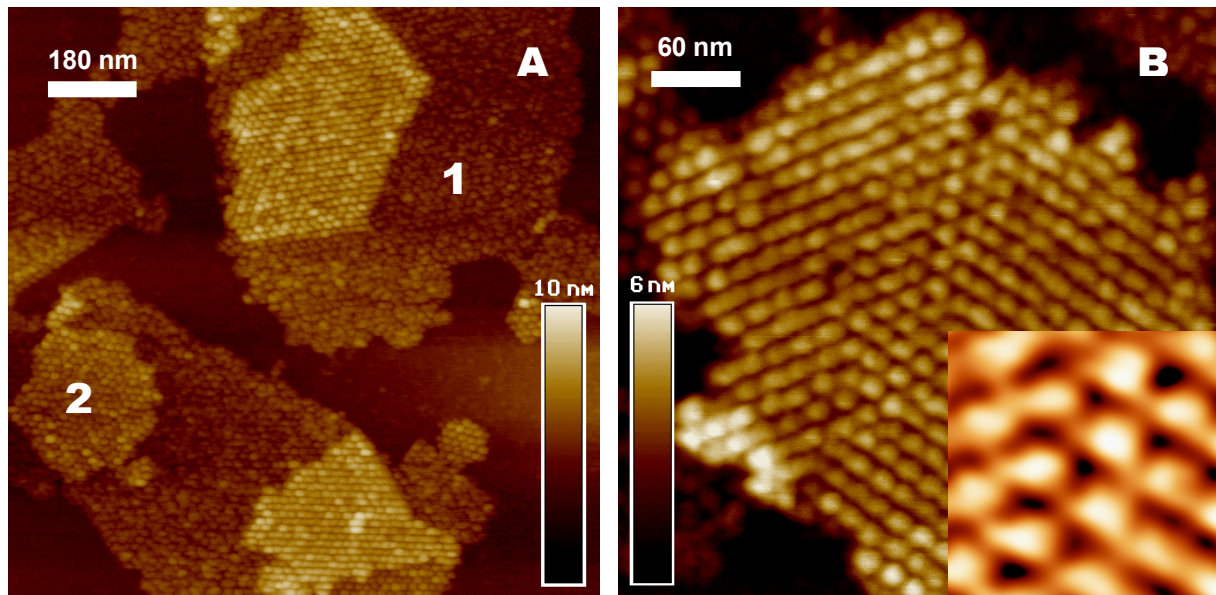


Abbildung 5.3: AFM-Aufnahmen von *C. glutamicum* DSM 20598

Alle gezeigten Aufnahmen sind an Luft entstanden, wobei die S-Layer auf APTES-funktionalisiertem Glimmer immobilisiert waren.

Bild (B) enthält als Einschub eine fouriergefilterte Darstellung der obersten Schicht; Bild (C) zeigt FFT-gefilterte Darstellungen der in (A) mit (1) und (2) bezeichneten Schichten.

S-Layer	Symmetrie	Gitterkonstante	Schichtdicke	Struktur der		MW
				Außenseite	Innenseite	
<i>D. radiodurans</i> Stamm R1	M_6C_2	18 nm (Ref.)	5.4 ± 0.4 nm	Kern mit 6 Speichen	Kern mit 6 Speichen	104 kDa
<i>C. glutamicum</i> ATCC 17965	M_6C_3	16.8 ± 0.2 nm	3.1 ± 0.4 nm	Doppel- dreiecke	Kern mit 3 Speichen	55 kDa
<i>C. glutamicum</i> DSM 20598	M_6C_3	17.0 ± 0.2 nm	1.6 ± 0.3 nm	“Blumen- waben”	Kern mit 3 Speichen	unter 55 kDa

Tabelle 5.1: Strukturvergleich der untersuchten S-Layer

Die Messungen der Gitterkonstanten und der Schichtdicken wurden an Luft durchgeführt; zu diesem Zweck wurde der AFM-Scanner zunächst an zwei verschiedenen Eichgittern geeicht. Die xy-Skalierung wurde nachträglich an die bereits bekannte Gitterkonstante von *D. radiodurans* (Referenzwert) angepasst.

Die Angaben für die Molekulargewichte sind den folgenden Quellen entnommen worden: *D. radiodurans* R1 [82], *C. glutamicum* ATCC 17965 [88] und *C. glutamicum* DSM 20598 [91].

S-Layer	Gitterkonstante [nm]	Schichtdicke [nm]	Quelle
<i>D. radiodurans</i> Stamm R1	18 nm ^{iv}	5.4±0.5	TM(l) (<i>diese Arbeit</i>)
		6.6±0.5	CM(p) [126]
		5.0±0.1	TM(l) [127]
		5.5±0.5	TM(p) [127]
		6.0±0.8	TM(p) [18]
		7.0±0.5	CM(p) [84]
<i>C. glutamicum</i> ATCC 17965	16.8±0.2	3.1±0.5	TM(l) (<i>diese Arbeit</i>)
		4.5±0.7	TM(p) (<i>diese Arbeit</i>)
		4.6±0.1	CM(p) [53]
<i>C. glutamicum</i> DSM 20598	17.0±0.2	1.6±0.3	TM(l) (<i>diese Arbeit</i>)

Tabelle 5.2: Vergleich der ermittelten Strukturdaten mit Ergebnissen anderer AFM-Studien

Die Abkürzungen geben die verwendete Methode an: CM, Contact Mode AFM; TM, Tapping Mode AFM; (l) steht für Messungen an Luft, (p) für Messungen in physiologischer Umgebung (Pufferlösung).

Tabelle 5.2 zeigt einen Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten Werte für die Gitterkonstanten und Schichtdicken der verschiedenen S-Layer mit den Ergebnissen anderer AFM-Untersuchungen. Wie Möller *et al.* [83] bemerken, sind die gemessenen S-Layer-Schichtdicken bei Aufnahmen im Tapping Mode ungefähr 25% kleiner als im Contact Mode, obwohl die laterale Auflösung identisch ist; eine Erklärung für dieses Phänomen wurde bis jetzt nicht gegeben. Bei *C. glutamicum* ATCC 17965 sind zudem Unterschiede zwischen der an Luft getrockneten und der in physiologischer Umgebung befindlichen Probe zu sehen; die S-Layer werden offensichtlich deformiert. Eine noch nachhaltigere Deformation scheint bei der Gefrierbruchpräparation des Referenzstammes aufgetreten zu sein; die an einer so behandelten Probe elektronenmikroskopisch ermittelte Gitterkonstante von 13.2 nm [89] weicht deutlich von den Ergebnissen beider AFM-Untersuchungen ab (*diese Arbeit* und [53]).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente an S-Layern stellen erneut die Leistungsfähigkeit des AFM als Instrument zur Strukturuntersuchung von Biomolekülen unter Beweis. In der Vergangenheit wurden die meisten AFM-Messungen an Proteinkristallen im Contact Mode durchgeführt; dennoch konnten – wie in dieser Arbeit – auch im Tapping Mode vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Bei sehr leicht deformierbaren Proben – wie beispielsweise den sehr dünnen S-Layern von *C. glutamicum* DSM 20598, die hier erstmals abgebildet wurden – könnte Tapping Mode AFM sogar höhere Auflösungen ermöglichen. Die geplanten Untersuchungen an weiteren *C. glutamicum*-Stämmen müssen zudem in geeigneten Pufferlösungen stattfinden, um einer etwaigen Denaturierung vorzubeugen. Die Fähigkeit, Objekte in physiologischer Umgebung zu untersuchen, stellt jedoch gerade einen ausgewiesenen Vorteil der Rasterkraftmikroskopie gegenüber anderen Methoden wie etwa der Elektronenmikroskopie dar. Tapping Mode AFM ermöglicht also einen vielversprechenden Zugang, um die S-Layer-Strukturen der *C. glutamicum*-Stämme – insbesondere hinsichtlich ihrer wechselseitigen Differenzen – zu untersuchen.

^{iv} Die Gitterkonstante von *D. radiodurans* wurde so genau mit anderen Methoden bestimmt, daß sie in den erwähnten AFM-Arbeiten nur zitiert wird.

5.1.2 AFM-Aufnahmen von Annexin V-Kristallen

Um die Kristallstruktur von Annexin V auf Lipid-Doppelschichten zu untersuchen, wurden zunächst nur die Lipid-Membranen auf Glimmer immobilisiert und abgebildet (diese Aufnahmen werden hier nicht gezeigt). Die Oberfläche der Membranen wies nur eine diffuse Rauigkeit (<1 nm) auf^v, aber keinerlei erkennbare Struktur. Tapping-Mode-Aufnahmen von Lipid-Doppelschichten, auf denen Annexine immobilisiert wurden, sind in Abbildung 5.4 gezeigt. Bei vorsichtiger Annäherung der AFM-Spitze und geringer Kraftwirkung konnten Annexin-Kristalle beobachtet werden. In 5.4B ist die trimere Gruppierung der Annexin V-Proteine deutlich zu erkennen. Die Gitterkonstante der dadurch ausgebildeten hexagonalen ($p6$)-Symmetrie konnte mit 19.7 ± 1.0 nm bestimmt werden. Dies ist in ausgezeichneter Übereinstimmung mit Reviakine *et al.* [105], die eine Gitterkonstante von 19.8 ± 1.0 nm mittels Contact Mode AFM fanden.

Die fleckenartige Substruktur in der Kristallanordnung geht auf die vier Domänen des Annexin V zurück. Diese sind auch nicht in einer Ebene auf Lipid-Membranen positioniert, sondern weisen unterschiedliche Höhen auf [104]^{vi}. Auch wenn die Domänen nicht exakt aufgelöst werden konnten, steht die bekannte Annexin V-Struktur doch in Einklang mit den AFM-Aufnahmen.

Für die Annexin V-Kristalle tragenden Lipid-Doppelschichten wurde eine Höhe von 5.7 ± 0.8 nm ($n=28$) bestimmt. Die Lipid-Doppelschichten selbst waren jedoch nur 3.6 ± 0.5 nm ($n=28$) hoch. Die Höhe der Annexin V-Struktur auf den Schichten konnte also mit 2.1 ± 0.9 nm angegeben werden. Dies ist geringer als die bekannte Höhe membrangebundener Annexin V-Moleküle von 3.5 nm [101], steht aber wiederum in Einklang mit [105], wo ein Wert von 2.6 ± 0.2 nm gefunden wurde. Es erscheint möglich, daß die Annexine durch die AFM-Spitze in die Membran gedrückt wurden.

Dieses Höhenverhalten könnte den Aufschluß über die Ionenkanalaktivitäten von Annexin V liefern. Einer Hypothese zufolge [99] wechselt das Protein zwischen zwei Konformationen in Abhängigkeit einer angelegten Spannung; neben der bereits bekannten wäre dies eine membranständige Anordnung. Die Höhendifferenz zwischen den beiden putativen Konformationen müßte sich mit dem AFM detektieren lassen. (Spannungs- und pH-induzierte Kanalaktivitäten sind bereits erfolgreich an Porin OmpF rasterkraftmikroskopisch untersucht worden [128].)

^v Da die Auflösung von der Oberflächenrauigkeit bestimmt wird, sollen zukünftige AFM-Messungen auf Lipid-Doppelschichten aus einer DOPC/PS-Mischung durchgeführt werden. Dioleoylphosphatidylserin (DOPC) besitzt im Unterschied zu dem in dieser Arbeit verwendeten POPC zwei gleichlange Kohlenwasserstoffketten, sollte also ebenere Schichten ausbilden.

^{vi} Dadurch könnten die hellsten Spots in der Falschfarben-Höhenskala von 5.4B – diese sind an den Ecken jeder trimerischen Einheit zu sehen – als Domäne 3 des Annexins V identifiziert werden (die Benennung erfolgt nach [98]).

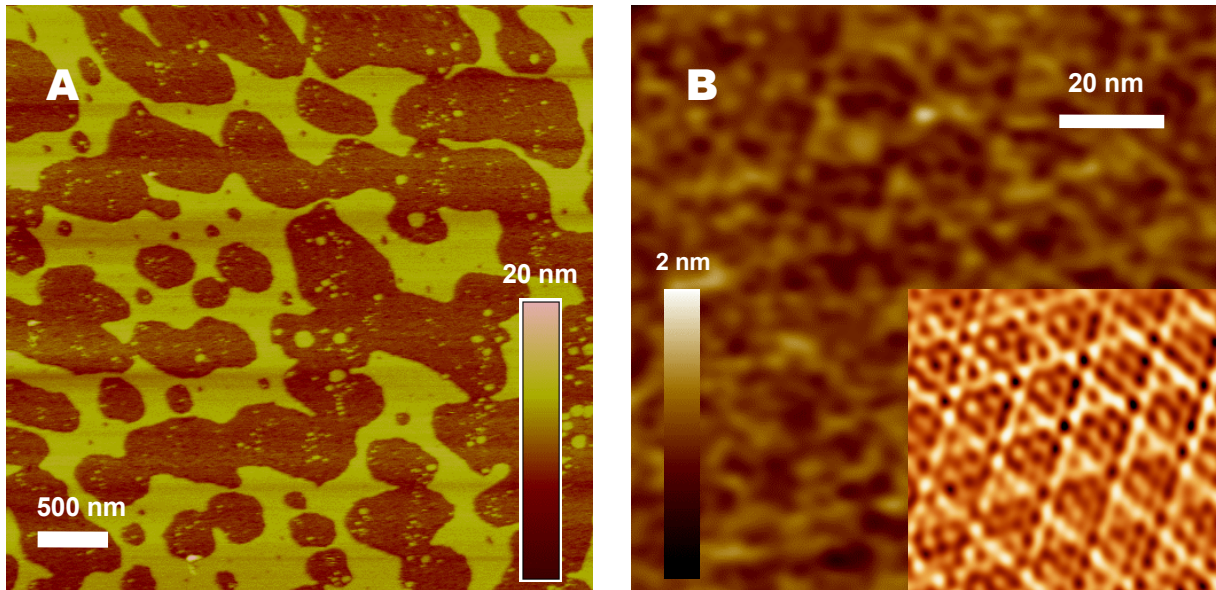


Abbildung 5.4: AFM-Aufnahmen von Annexin V-Kristallen auf Lipid-Doppelschichten

Die Aufnahmen entstanden in physiologischer Umgebung (10 mM HEPES, 2 mM CaCl_2 , 150 mM NaCl, pH 7.4). Bild (A) zeigt die auf Glimmer immobilisierten Lipid-Doppelschichten, auf denen die Annexine kristallisiert sind. In Bild (B) sind die Annexin V-Kristalle zu erkennen (diese Aufnahme ist einem Tiefpassfilter unterworfen worden); in der als Einschub gezeigten FFT-gefilterte Darstellung wird die trimere Gruppierung der Annexine besonders deutlich.

5.2 Protein-DNA-Interaktion

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die spezifische Bindung des regulatorischen ExpG-Proteins an DNA-Fragmente aus der *exp*-Genregion (dem Galactoglucanbiosynthese-Cluster) von *Sinorhizobium meliloti* mittels Rasterkraftmikroskopie und Kraftspektroskopie untersucht.

5.2.1 AFM-Aufnahmen

Die rasterkraftmikroskopische Untersuchung von Protein-DNA-Wechselwirkungen stellt hohe Anforderungen an die Auflösung, die Immobilisierung der DNA und die Reinheit der Proben. Um Abbildetechniken und Immobilisierungsmethoden zu studieren, wurden zunächst einfache und wohlbekannte Systeme ausgewählt: Lambda-DNA (5.5A) und Plasmid-DNA (5.5B). Entsprechende Proben waren kommerziell in einem hohen Reinheitsgrad erhältlich.

Die zu untersuchenden DNA-Fragmente aus der *exp*-Genregion mußten jedoch speziell für die AFM-Messungen aufgereinigt werden. Dazu wurde von biologischer Seite eine ganze Reihe von Ansätzen und Verfahren entwickelt, deren Produkte dann immer im AFM auf ihre Güte hin untersucht wurden. In Abbildung 5.5 sind eine unbrauchbare (5.5C) und eine gute Probe (5.5D) gezeigt. Schließlich gelang es, ein Aufreinigungsverfahren zu finden, daß reproduzierbar hinreichend saubere Proben lieferte [121].

Um die Menge etwaiger unspezifisch bindender Moleküle in der Probe möglichst gering zu halten, wurde auch das ExpG-Protein für die AFM-Untersuchungen aufgereinigt. Im Unterschied zu den Experimenten an den ihrem Wesen nach sehr robusten S-Layer-Proteinen (Kapitel 5.1) war es bei der Probenpräparation der Protein-DNA-Komplexe zwingend erforderlich, molekularbiologischen Reinheitsmaßstäben zu genügen (um ein Eindringen von DNAsen in die Probe zu vermeiden) und auf definierte Bedingungen (vor allem hinsichtlich der Temperatur) zu achten.

Um die Bindestelle des Proteins auf den 157 bp langen DNA-Fragmenten (welche die intergenische Region zwischen *expG* und *expD1* umfaßten, vergleiche Kapitel 3.2.2) zu entdecken, mußte eine Orientierung vorgegeben werden. Die potentielle Binderegion wurde deshalb um ein nichtbindendes DNA-Fragment von entweder 940 bp oder 960 bp verlängert (was einer Gesamtlänge von etwa 373 nm bzw. 380 nm entspricht). Spezifische Protein-Bindungen waren also immer nur an einem Ende der DNA-Moleküle zu erwarten, und damit jeweils eine Richtung für die Vermessung gegeben.

Aufnahmen von Bindungsexperimenten mit ExpG und dem beschriebenen DNA-Molekül sind in Abbildung 5.6 gezeigt. Dazu wurde das Protein zunächst mit dem in den biochemischen Gelretardationsexperimenten [121] verwendeten Bindepuffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.1 mM NiCl₂, pH 8.3) verdünnt und dann mit der DNA derart vermischt, daß die finalen Konzentrationen in dieser Lösung 0.33 ng/µl für das ExpG-Protein und 0.22 ng/µl für die DNA betragen. Nach einer System-Inkubationszeit von 15 min wurde 1 µl der Lösung auf APTES-funktionalisierten Glimmer gegeben und 20 min lang auf dem Substrat inkubiert, bevor die Probe vorsichtig mit Millipore-Wasser abgewaschen wurde. Wie die an Luft entstandenen AFM-Aufnahmen zeigen, konnten potentielle Protein-DNA-Komplexe beobachtet werden.

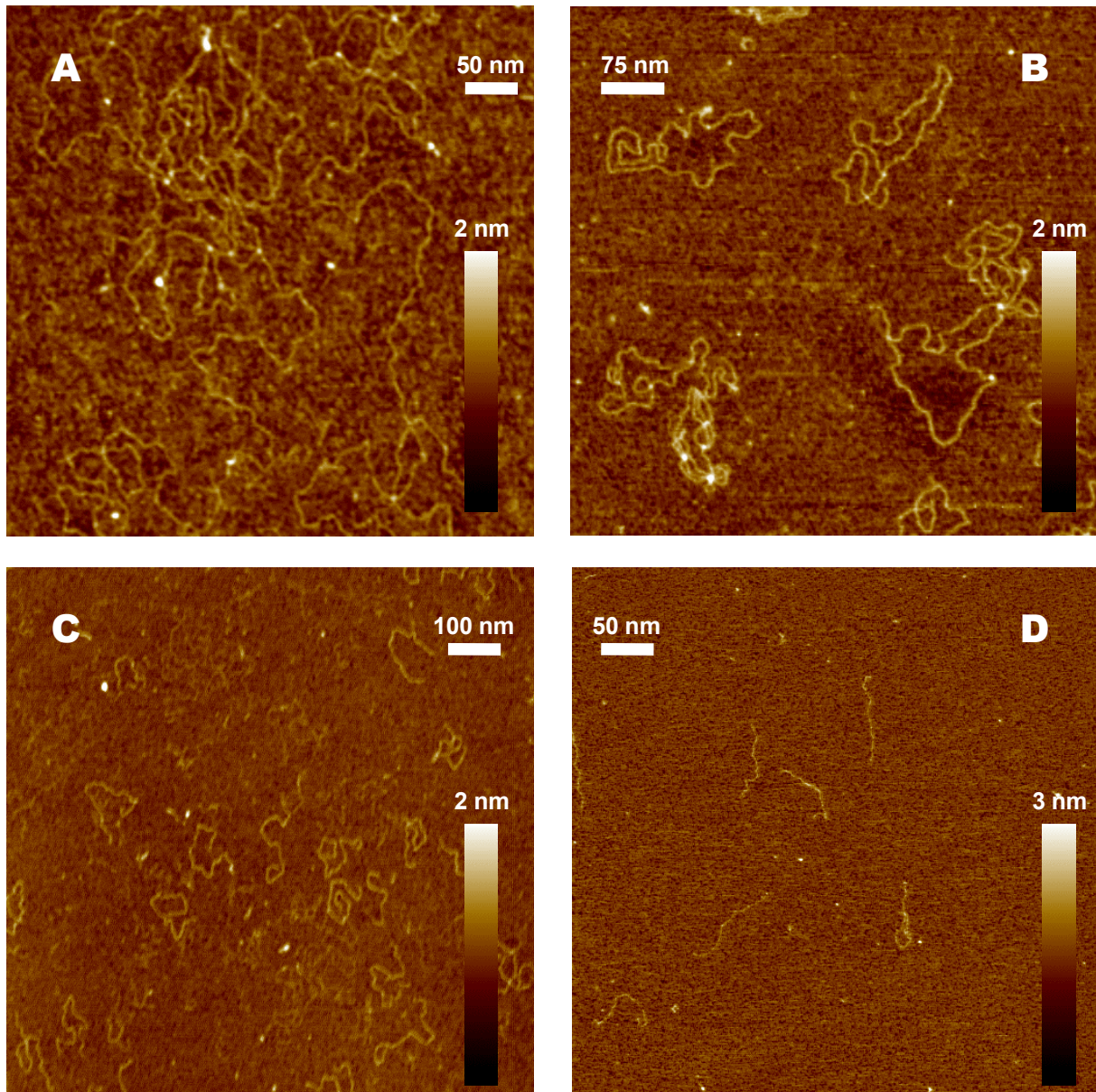


Abbildung 5.5: AFM-Aufnahmen von DNA-Molekülen

Alle Abbildungen sind im Tapping Mode an Luft entstanden, wobei die DNA-Moleküle auf APTES-funktionalisiertem Glimmer immobilisiert waren. Bild (A) zeigt Lambda-DNA und (B) Plasmid-DNA. Die Abbildungen (C) und (D) sind Aufnahmen der verlängerten ExpG-Binderegion aus *S. meliloti*.

Das linke Bild (C) ist ein Beispiel für eine unzureichende Aufreinigung der Probe; zwar sind einige DNA-Moleküle der gewünschten Länge (~ 380 nm) zu sehen, daneben aber auch kürzere Fragmente und zahlreiche DNA-Einzelstränge (welche nur die halbe Höhe aufweisen).

Das rechte Bild (D) zeigt dagegen das Ergebnis einer gelungenen Aufreinigung; außer DNA-Molekülen der gewünschten Länge ist nur geringe Anzahl an Verunreinigungen zu sehen, und Einzelstrang-DNA wird nicht beobachtet.

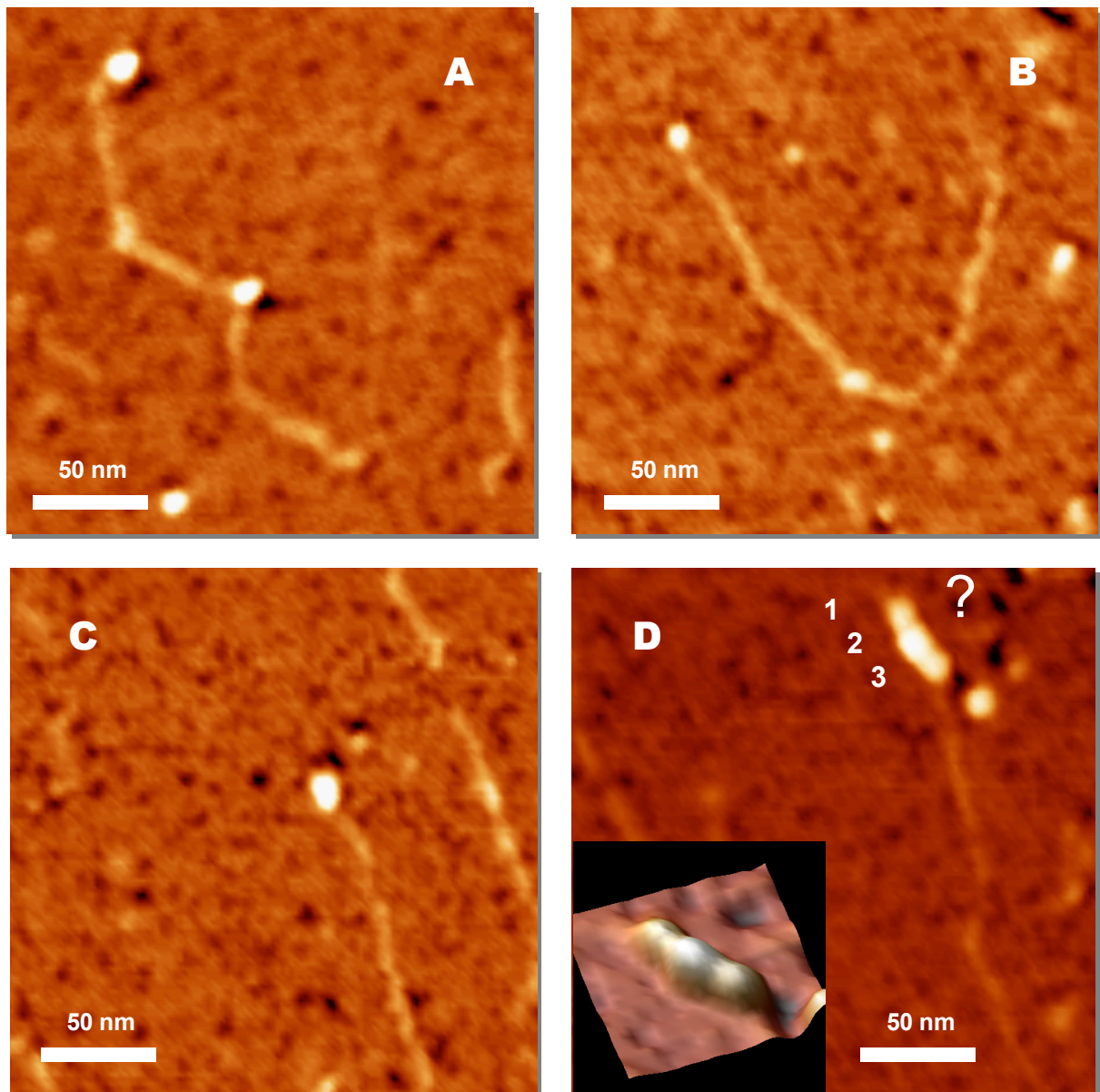


Abbildung 5.6: AFM-Aufnahmen von Protein-DNA-Komplexen

Alle gezeigten Aufnahmen sind im Tapping Mode an Luft entstanden, wobei die Komplexe auf APTES-funktionalisiertem Glimmer immobilisiert wurden. In allen vier Bildern sind potentielle Bindungen des ExpG-Proteins an die DNA zu sehen. In Bild (D) ist möglicherweise eine dreifache Protein-Bindung zu beobachten, wie durch die eingeschobene dreidimensionale Darstellung verdeutlicht werden soll. (Die Höbenskala umspannt stets 2 nm.)

Neben den erwarteten Bindungen an einem Ende der DNA-Moleküle, sind jedoch auch potentielle Bindungen an deren Mittelteil zu erkennen (5.6A und 5.6B). Eine Bewertung der Ergebnisse – auch einer etwaigen trimerischen Bindung wie in 5.6D – ist offenbar nur aus diesen Aufnahmen heraus schwierig. Ist die DNA an einer Stelle nicht flach auf dem Substrat immobilisiert oder überlappen sich zwei DNA-Moleküle, werden lokale Erhöhungen beobachtet, wie sie beispielsweise auch in 5.5A und 5.5B als helle Punkte zu sehen sind. Die Dimensionen des 21.8 kDa großen ExpG-Proteins liegen leider in der Größenordnung dieser Erhebungen^{vii}. Zudem können Verfälschungen durch unspezifisch bindende Moleküle trotz aller Vorsicht bei der Präparation nicht ausgeschlossen werden. Selbst in der sauberen Probe 5.5D sind kleine Moleküle zu sehen, deren Ausdehnung wiederum mit den Dimensionen des ExpG übereinstimmt. Durch reine Abbildemethoden läßt sich ein einzelnes ExpG-Protein also nicht eindeutig identifizieren.

Durch die Bindung von Proteinen induzierte Konformationsänderungen der DNA sind häufig rasterkraftmikroskopisch beobachtet worden. Wie Abbildung 5.6 zeigt, konnte das am *expG*-System bisher nicht beobachtet werden. Es wäre jedoch möglich, daß die zu untersuchenden DNA-Protein-Wechselwirkungen generell ein höheres Maß an Flexibilität erfordern, als die Immobilisierung auf APTES-funktionalisiertem Glimmer erlaubt. Eindeutigeres Bindeverhalten und etwaige Konformationsänderungen sollten dann bei einer flexibleren Anbindung der DNA-Protein-Komplexe an das Substrat zu beobachten sein.

Um dies zu überprüfen, wurde die Immobilisierung über gelöste zweiwertige Kationen auf Glimmer gewählt (siehe 4.2.3). Die Experimente können dadurch auch in der physiologischen Umgebung des ExpG-Proteins stattfinden, was einer eventuellen Denaturierung vorbeugt. Die Immobilisierungsmethode wurde wiederum zunächst an Plasmid-DNA erprobt (Abbildung 5.7A). Da die DNA direkt mit der Pufferlösung in die Flüssigkeitszelle des AFM eingespritzt wurde, ist eine mit der Zeit zunehmende Adsorption der DNA-Moleküle auf dem Substrat zu beobachten (5.7B). Die zwischen den Aufnahmen 5.7A und 5.7B erkennbare Drift der DNA-Moleküle ist zudem ein gutes Indiz für die höhere Flexibilität, die den auf diese Weise immobilisierten Molekülen zur Verfügung steht. Diese Immobilisierung konnte auch erfolgreich auf die verlängerten DNA-Fragmente aus der *exp*-Genregion angewandt werden (5.7C).

Der Erfolg dieser Methode hing in hohem Maße von der Konzentration der DNA in der Pufferlösung ab (etwa 0.5 ng/ μ l), weswegen stets eine Reihe von Experimenten erforderlich war, um das richtige Maß zu finden, zumal die Konzentrationsangaben der ursprünglichen *exp*-DNA-Proben durch das Aufreinigungsverfahren mit einem beträchtlichen Fehler behaftet waren. Da die verfügbaren Mengen an entsprechend aufgereinigten DNA- und Protein-Proben bislang begrenzt waren, konnten im Rahmen dieser Arbeit noch keine erfolgreichen AFM-Messungen an Protein-DNA-Komplexen in wäßriger Lösung durchgeführt werden. Dies sollte in naher Zukunft jedoch möglich sein.

^{vii} Unter der Annahme einer näherungsweise globulären Struktur, kann der Radius des 22 kDa schweren ExpG-Proteins mit $\sim 2-3$ nm abgeschätzt werden.

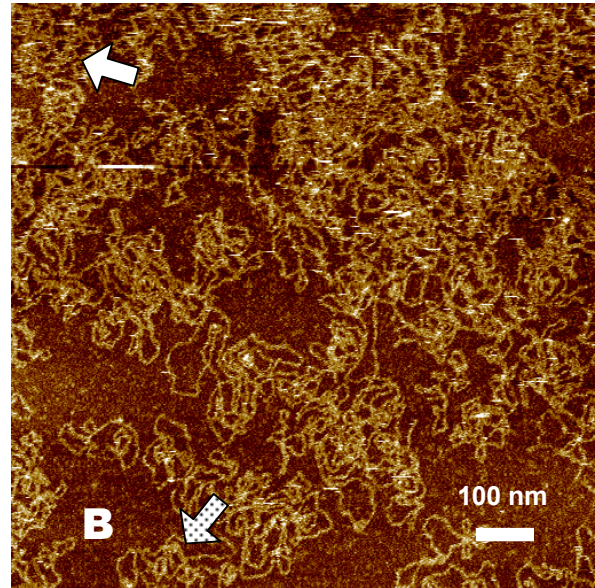
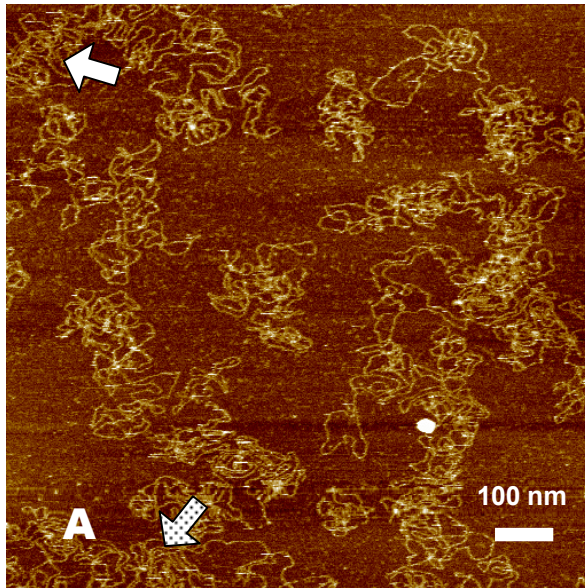
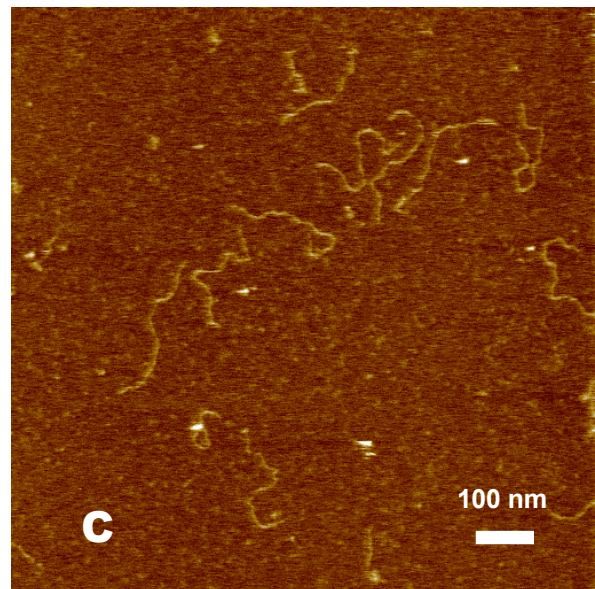


Abbildung 5.7: AFM-Aufnahmen an DNA-Molekülen in wässriger Lösung

Alle gezeigten Aufnahmen entstanden im Tapping Mode in einer Pufferlösung mit Nickel-Ionen (10 mM Hepes, 1 mM NiCl₂, pH 7.0), wobei die DNA-Konzentration bei 0.5 ng/μl lag. Die Höhenskala umspannt stets 5 nm.

Die Bilder (A) und (B) zeigen Plasmid-DNA; die beiden Aufnahmen zeigen dieselbe Stelle im Abstand von 30 min. Deutlich sind in (B) sowohl zusätzlich adsorbierte DNA-Moleküle als auch Driftbewegungen mehrerer Moleküle zu sehen. Letztere können als Indiz für die flexible Immobilisierung der DNA angesehen werden. (Die Pfeile weisen auf Regionen mit minimaler Drift zwischen den beiden Aufnahmen.)

*Bild (C) ist dagegen eine Aufnahme der verlängerten ExpG-Binderegion aus *S. meliloti*.*



5.2.2 Kraftmessungen

Die Bindung des regulatorischen ExpG-Proteins an ein DNA-Fragment aus der *exp*-Genregion, welches eine potentielle Bindestelle für das Protein umfaßte, wurde nicht nur rasterkraftmikroskopisch, sondern auch kraftspektroskopisch untersucht. Dazu wurde das Protein über einen an Lysine bindenden Crosslinker auf APTES-funktionalisiertem Glimmer immobilisiert. Da ExpG (MW 21.8 kDa) fünf räumlich weitverteilte Lysine enthält, ließ die gewählte Art der Anbindung erwarten, daß aufgrund der fünf möglichen Orientierungen ein hinreichender Anteil der immobilisierten Proteine derart ausgerichtet sein würde, daß die Bindungstasche für das AFM-Experiment leicht zugänglich ist. Die DNA dagegen wurde über einen etwa 30 nm langen PEG-Linker an eine APTES-funktionalisierte AFM-Spitze aus Siliziumnitrid gebunden (siehe Kapitel 4.2.4). Zwischen den solcherart funktionalisierten Paar aus Sensor und Oberfläche wurden dann Kraft-Distanz-Messungen durchgeführt.

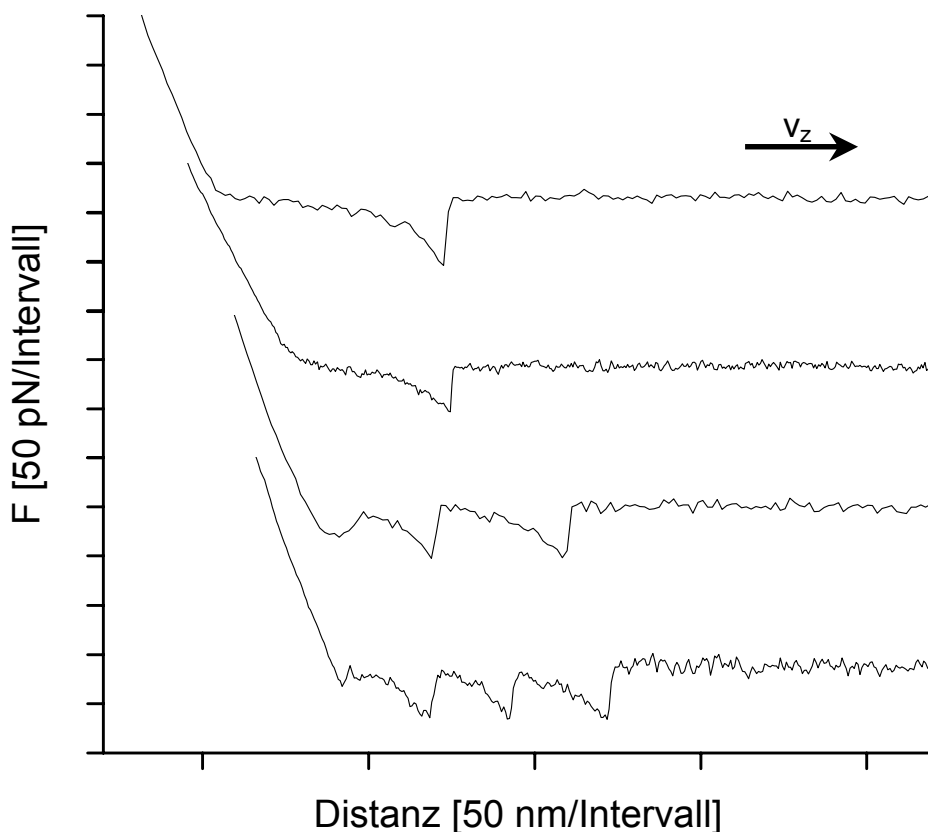


Abbildung 5.8: Typische Kraft-Distanz-Kurven

Neben Kurven mit einer Abrißstelle (oben) wurden auch solche mit mehreren Ereignissen (unten) aufgenommen. In solchen Fällen ging jedoch stets nur der Kraftwert des letzten Abrisses in die Auswertung ein. Deutlich ist das Strecken des Polymerlinkers vor den Abrißstellen zu sehen.

Die meisten Messungen fanden in dem in Gelretardationsexperimenten bewährten **Standardpuffer** (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.1 mM NiCl₂, pH 8.3) bei einer Rückzugsgeschwindigkeit von $v_z = 1 \mu\text{m/s}$ statt. Abbildung 5.8 zeigt typische Kraft-Distanz-Kurven, wie sie bei den Bindungsexperimenten beobachtet wurden. Kurven mit mehreren Abrissen waren recht häufig zu beobachten; in diesen Fällen ging immer nur der Kraftwert des letzten Abrisses in die Auswertung ein (für das genaue Auswertungsverfahren

siehe Kapitel 4.1.5).^{viii} **Mehrfachereignisse** können auf zwei Arten zustande kommen: Zum einen könnte der Komplex reißen und noch innerhalb der Zeitskala eines Kraft-Distanz-Experimentes wieder binden und erneut reißen. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß mehrere der an die AFM-Spitze immobilisierten DNA-Moleküle in einem Experiment Bindungspartner finden und von diesen getrennt werden. Da die DNA-Moleküle an verschiedenen Stellen auf der Spitze gebunden sind, reißen die entsprechenden Komplexe beim Zurückziehen des Sensors nacheinander. Das Auftreten von mehreren Abrissen gleicher Größe kann demnach durchaus als Indiz dafür gelten, daß es tatsächlich gelungen war, die Entbindungskraft eines einzelnen Komplexes zu messen. Die Wahrscheinlichkeit, daß in einem Kraft-Distanz-Experiment an verschiedenen Stellen exakt die gleiche Anzahl von Protein-DNA-Komplexen reißt, ist äußerst gering.^{ix}

Spezifität der Bindung

Die Aussage kraftspektroskopischer Untersuchungen ist nur dann eindeutig, wenn die beobachtete Wechselwirkung mit einer spezifischen Bindung identifiziert werden kann. Es sind viele Ursachen unspezifischer Bindungen denkbar, z.B. eine Adhäsion der AFM-Spitze auf dem Substrat, die unspezifische Bindung eines Proteins über elektrostatische Wechselwirkungen oder das Reißen einer Bindung in der Immobilisierungskette. In dieser Arbeit wurden die erhaltenen Kräfteverteilungen daher in zwei verschiedenen Experimenten einer Überprüfung unterzogen.

Eine häufig verwendete Methode, um die Spezifität der Bindung zu verifizieren, besteht in der **Zugabe freier Bindungspartner in Lösung**. Diese sollten dann – bei hinreichendem Konzentrationsüberschuß – den Großteil der Bindungsstellen besetzen und damit für die Kraft-Distanz-Messung blockieren. Ein solches Experiment wurde im Rahmen einer Meßreihe durchgeführt (Abbildung 5.9), bei der zunächst eine Kräfteverteilung unter Standardbedingungen ermittelt wurde. Anschließend wurde die Flüssigkeitszelle des AFM und die Pufferlösung durch einen Standardpuffer ersetzt, der zudem freies ExpG-Protein in einer Konzentration enthielt, welche derjenigen der auf dem Substrat immobilisierten Proteine entsprach. Mit der selben AFM-Spitze und der selben Probe wurde eine zweite Serie von Kraft-Distanz-Messungen durchgeführt. Danach wurde der Puffer noch einmal gewechselt und – nach mehrmaligem gründlichen Abwaschen der Probe mit dem Standardpuffer – wieder durch den Standardpuffer ohne freies Protein ersetzt. Mit dieser Konfiguration wurde eine dritte Kräfteverteilung bestimmt.

Es ergab sich in Anwesenheit freier Proteine in der Lösung ein Rückgang der Abrißhäufigkeit auf etwa ein Drittel der Ereignisse (5.9 Mitte) gegenüber der Messung im Standardpuffer (bei einer nahezu identischen Form der Kräfteverteilung). Für ein Konzentrationsverhältnis von 1:1 ist dies bereits eine beachtliche Beeinträchtigung des Bindeverhaltens; eine völlige Blockade könnte auf dieser Basis ab einem Verhältnis von etwa 10:1 erwartet werden.^x Die Tatsache, daß nach erneutem Pufferaustausch wieder beinahe die gleichen Abrißhäufigkeiten wie ursprünglich erzielt werden konnten, sich das

^{viii} Die Anzahl der Mehrfachabriss sollte sich bei zukünftigen Experimenten reduzieren lassen, indem die Proteinkonzentration auf der Oberfläche verringert wird.

^{ix} Es sei denn, dies wäre eine inhärente Bindungseigenschaft des Systems. Dann müßten in einem Kraft-Histogramm aber auch mehrere Peaks zu sehen sein, die sich den unterschiedlichen Anzahlen reißender Einzelbindungen zuordnen ließen. Aufgrund kooperativer Effekte wären diese Peaks jedoch nicht notwendigerweise bei den Vielfachen der Kraftmittelwerte einer Einzelbindung zu erwarten.

^x In biochemischen Testverfahren führt normalerweise eine Konkurrenz im 50- bis 200-fachen Überschuß zum gewünschten Nicht-Ergebnis.

System also reaktivieren ließ, beweist, daß spezifische Wechselwirkungen für das Blockadeverhalten verantwortlich waren.

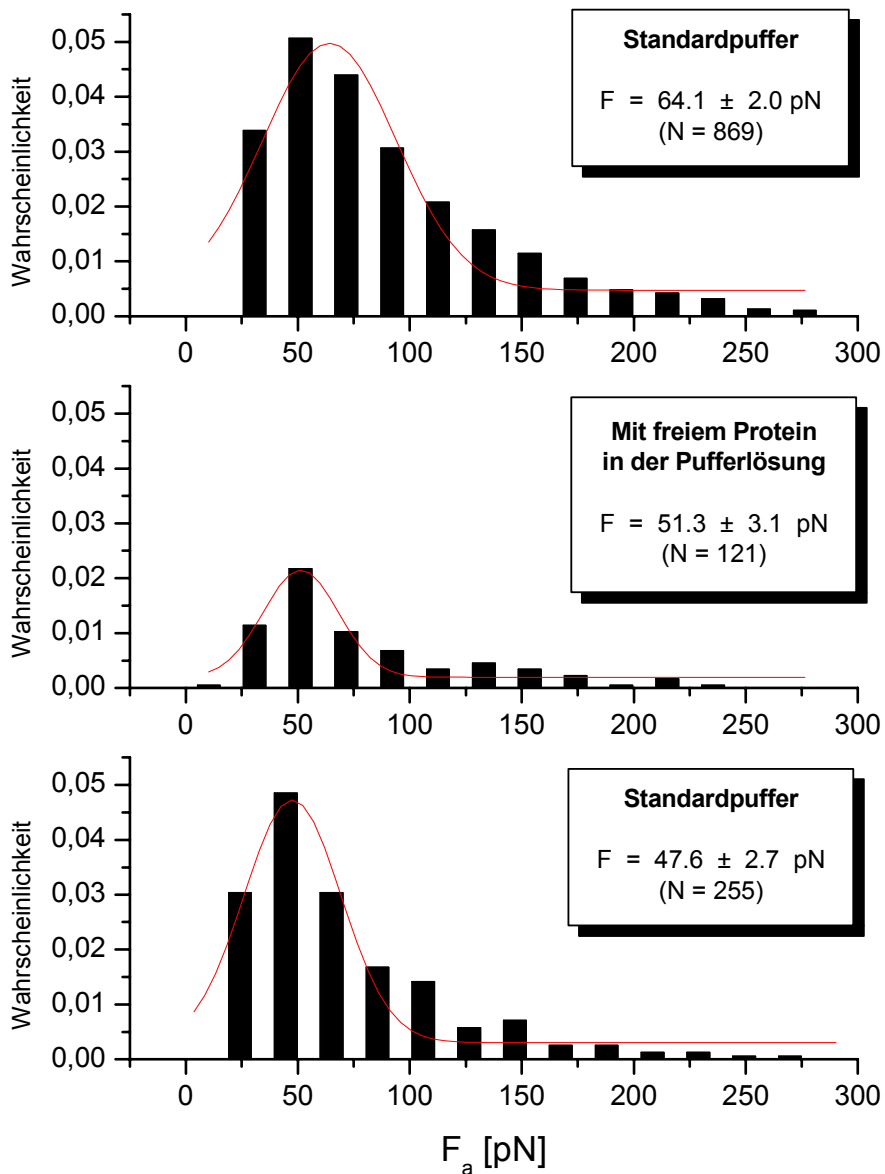


Abbildung 5.9: Blockade der Bindung durch freies Protein

In dieser Meßreihe wurde der Standardpuffer nach Aufnahme der ersten Kräfteverteilung (oben) um freies ExpG-Protein (Konzentration 1:1 zu den immobilisierten Proteinen) angereichert und dann in dieser Lösung eine zweite Verteilung aufgenommen (Mitte). Da die freien Proteine potentielle Bindungsstellen blockieren, ist ein Rückgang der Bindungsereignisse auf etwa ein Drittel zu beobachten. Durch einen erneuten Pufferaustausch läßt sich das System reaktivieren (unten). Dies ist ein klares Zeichen für die Spezifität der beobachteten Bindungsereignisse.

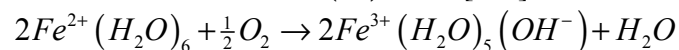
In den Kästen werden die wahrscheinlichsten Kraftwerte F und die absolute Anzahl der beobachteten Bindungsereignisse N für jede Kraft-Distanz-Serie angegeben. Die angegebenen Fehler sind die Standardfehler der Mittelwerte der Gaußverteilungen für eine 95.4%ige Konfidenz (also $2\sigma/N^{1/2}$).

Auffällig ist zudem, daß 85 Minuten zwischen den beiden letzten Kraft-Distanz-Serien verstreichen mußten, damit eine Reaktivierung des Systems festgestellt werden konnte. Dies ist als deutlicher Hinweis auf die lange Lebensdauer und damit die **Stabilität des Protein-DNA-Komplexes** zu werten.

In Verdrängungsexperimenten, bei denen nur eine geringe Konzentration des freien Proteins (0.1:1) eingesetzt wurde, ergab sich dagegen eine leichte Zunahme der Abrißhäufigkeit in Gegenwart des freien ExpG gegenüber den Messungen im Standardpuffer. Dies ist möglicherweise auf ein dimeres Bindungsverhalten des ExpG zurückzuführen, das mit dem vermuteten Helix-Turn-Helix-Bindemotiv in Einklang stünde; die Anwesenheit mobiler Proteine würde die Ausbildung der dimeren Komplexe in naheliegender Weise erleichtern. Zukünftige Experimente werden jedoch erst noch zeigen müssen, ob hier ein signifikantes Verhalten vorliegt. Die Abrißhäufigkeiten während einer Meßreihe in Puffern mit zunehmenden Proteinkonzentrationen müßten bei dimerer Bindung zunächst ein Maximum erreichen und danach abfallen. Dies ließe sich gut mit einer Kompletionsreihe vergleichen, in der freie DNA-Fragmente eingesetzt werden; diese sollte einen streng monotonen Abfall der Abrißhäufigkeiten aufweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde noch ein zweites Verfahren gefunden, mit dem sich die Spezifität der Bindung überprüfen läßt. Es war bekannt, daß zweiwertige **Kationen** die zu untersuchende Bindung nicht behindern; dies war für eine Reihe von Kationen, darunter das im Standardpuffer verwendete Nickel(II), biochemisch festgestellt worden. Nur für zweiwertiges Eisen zeigten sich Unregelmäßigkeiten in den Gelretardationsexperimenten [121].

Eine sich anbietende Erklärung ist die Umwandlung des im Puffer enthaltenen Eisen (II) zu Eisen (III). Eisen korrodiert in Anwesenheit von Wasser und Sauerstoff; das Gleichgewicht liegt bei dieser Reaktion^{xi} stark auf der Eisen(III)-Seite [129]:



Es ist an dieser Stelle wichtig zu bemerken, daß zweiwertige Kationen nicht notwendig für die Bindung sind; diese ist auch in deren Abwesenheit gezeigt worden [121]. Die Abnahme des in der Pufferlösung enthaltenen Eisen(II) allein führt also noch nicht zu einer Beeinträchtigung der Bindung.

Um den Einfluß der Eisen-Kationen auf Einzelmolekülebene zu untersuchen, wurde eine Meßreihe ähnlich der Verdrängungsserie mit freiem Protein durchgeführt (Abbildung 5.10). Dabei wurde zunächst eine Kräfteverteilung im Standardpuffer mit zweiwertigem Nickel (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.1 mM NiCl₂, pH 8.3) ermittelt (5.10A). Der Puffer wurde danach durch einen unmittelbar zuvor hergestellten Eisen(II)-Puffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.1 mM FeCl₂, pH 8.3) ausgetauscht (5.10B). Nach einer zweiten Kraft-Distanz-Serie wurde der Puffer erneut ausgetauscht, diesmal durch einen drei Stunden zuvor hergestellten Eisen(II)-Puffer (ursprünglich 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.2 mM FeCl₂, pH 8.3), in dem sich – an der charakteristischen Gelbfärbung leicht erkennbar – bereits das Reaktionsgleichgewicht auf Seiten des Eisen(III) eingestellt hatte (an Stelle der 0.2 mM Fe²⁺-Ionen enthielt dieser Puffer jetzt also etwa 0.1 mM Fe³⁺-Ionen); auch in dieser Umgebung wurde eine Kräfteverteilung ermittelt (5.10C). Abschließend wurde wieder ein Pufferaustausch zurück zum nickelhaltigen Standardpuffer vollzogen und eine vierte Kraft-Distanz-Serie aufgenommen (5.10D).

^{xi} Das Ergebnis der Reaktion ist bereits optisch durch eine intensive Gelbfärbung der Pufferlösung erkennbar.

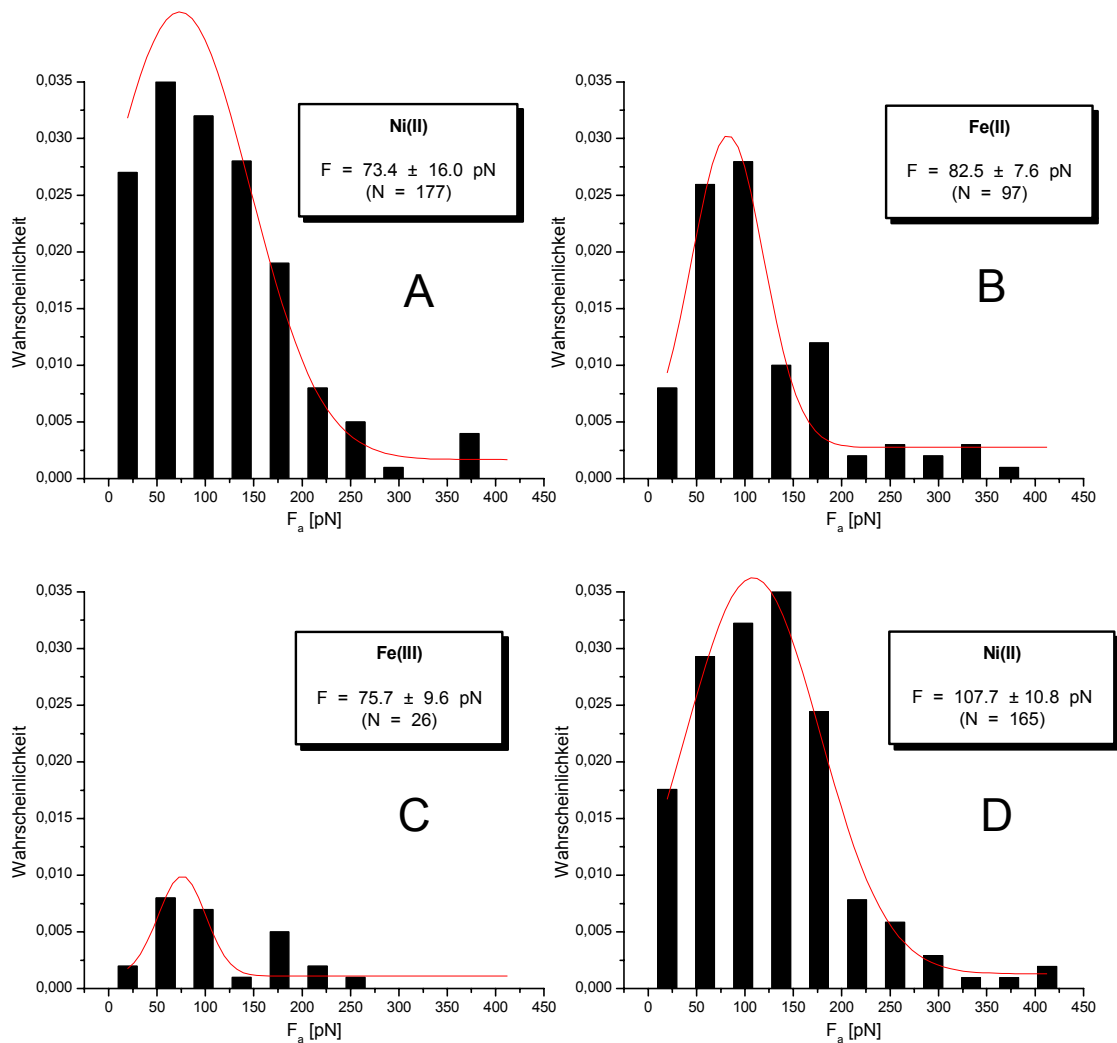


Abbildung 5.10: Blockade der Bindung durch Eisen(III)

Die Bilder (A)-(D) zeigen Kräfteverteilungen, die in Pufferlösungen (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.1 mM $MgCl_2$, pH 8.3) mit unterschiedlichen zweiwertigen Kationen M^{2+} gemessen wurden. Die Beschriftung entspricht dabei der zeitlichen Abfolge der Messungen, die allesamt an einem Sensor-Probe-Paar durchgeführt wurden. Die Serie zeigt eine nur geringe Beeinträchtigung der Bindung in Gegenwart von Eisen(II) (B); demgegenüber wird in Anwesenheit von Eisen(III) eine Abnahme der Bindungshäufigkeit auf etwa ein Siebtel des ursprünglichen Wertes beobachtet (C). Da sich diese Bindungshäufigkeit wieder einstellt, wenn das System wieder im Standardpuffer untersucht wird, liegt offenbar eine spezifische Blockade der Bindung durch Eisen(III) vor.

In den Kästen werden die wahrscheinlichsten Kraftwerte F und die absolute Anzahl der beobachteten Bindungsereignisse N für jede Kraft-Distanz-Serie angegeben.

Für Eisen(II) anstelle von Nickel(II) in der Pufferlösung ergab das Experiment nur eine geringe Beeinträchtigung der Bindung. In Gegenwart von Eisen(III) reduziert sich die Anzahl der Abrißereignisse auf etwa ein Siebtel des Ursprungswertes (bei einer hinreichend ähnlichen Form der Kräfteverteilung). Durch einen Wechsel zurück zum Nickel(II)-Puffer kann das System reaktiviert werden, was für einen spezifischen Blockade-Mechanismus durch Eisen(III) spricht.

Eine genauere Betrachtung der Kraft-Distanz-Serie mit zweiwertigem Eisen enthüllt, daß 85% der beobachteten Ereignisse in die erste Hälfte der Meßdauer (von insgesamt 15 min

Dauer) fallen. Dies ist konsistent mit der Annahme, daß sich Eisen(II) recht rasch in Eisen(III) umwandelt und letzteres zu einer Abnahme der Abrißwahrscheinlichkeit führt. Interessanterweise liegen zwischen den letzten beiden Meßreihen 20 min; dies erscheint angesichts der 85 min die im Fall einer moderaten Blockade durch das ExpG-Protein erforderlich waren, um das System zu reaktivieren, recht gering und weist auf Unterschiede in der Natur der Blockademechanismen hin. Eine genauere Untersuchung der Dynamik des Eisen(II)-Eisen(III)-Einflusses auf die Protein-DNA-Bindung könnte sich hier als weiteres Experiment anschließen.

Eisen(III) kann offenbar als **molekularer Schalter** für das ExpG-System identifiziert werden. Fraglich bleibt, ob tatsächlich Eisen(III) in der natürlichen Umgebung der Protein-DNA-Interaktion diese Funktion ausübt, oder ob dies einem vergleichbaren Ion obliegt. Werden die Wertigkeit und der Ionenradius als Vergleichskriterien herangezogen, kommen mehrere Kandidaten aus der Kategorie der Übergangsmetalle in Betracht:

	Fe	Mn	Co	Cr	V	Ni
Ionenradius M^{2+} [pm]	78	83	75	80	79	69
Ionenradius M^{3+} [pm]	65	65	61	62	64	60

Tabelle 5.3: Ioneneigenschaften ausgewählter Übergangsmetalle (nach [130])

Zukünftige Experimente werden erweisen müssen, ob und wie andere dreiwertige Kationen (insbesondere Mangan und Kobalt) die ExpG-DNA-Bindung beeinflussen.

Kraftwerte

Wird aus den wahrscheinlichsten Werten F aller Kräfteverteilungen, die mit der gleichen Rückzugsgeschwindigkeit $v_z = 1 \mu\text{m/s}$ ermittelt wurden, ein Mittelwert gebildet, läßt sich dieser als Kraft-Richtlinie für die untersuchte Bindung eines regulatorischen Proteins an DNA angeben. Der so bestimmte Wert von $F_{PD} = 72 \pm 5 \text{ pN}$ fügt sich in die Reihe der in anderen Arbeiten ermittelten Wechselwirkungskräfte zwischen einzelnen Biomolekülen (Tabelle 5.4). Eine Beurteilung der ermittelten Kraftwerte aus sich selbst heraus ist jedoch schwierig; eine weiterführende Methode stellt die dynamische Kraftspektroskopie dar.

Molekulare Bindungspartner	Durchschnittliche Kräfte [pN]	Referenz
Fluorescein/Antikörper-scFv-Fragmente	40 ± 3 (His(H58)Ala) 50 ± 4 (Wildtyp)	Ros <i>et al.</i> 1998 [42]
Ferritin/Antiferritin	49 ± 10	Allen <i>et al.</i> 1997 [41]
Biotin/Antibiotin	60 ± 10	Dammer <i>et al.</i> 1996 [40]
ExpG-Protein/exp-DNA	72 ± 5	(<i>diese Arbeit</i>)
NTA/His6	~ 150	Kienberger <i>et al.</i> 2000 [131]
P-Selektin/PSGL-1	159 ± 1	Fritz <i>et al.</i> 1998 [45]
Anti-human serum albumin / human serum albumin	244 ± 22	Hinterdorfer <i>et al.</i> 1996 [39]

Tabelle 5.4: Ausgewählte AFM-Messungen intermolekularer Kräfte

Dynamische Kraftspektroskopie

Nach Gleichung (2.14) besteht ein logarithmischer Zusammenhang zwischen den wahrscheinlichsten Werten F der Kräfteverteilungen und den Ziehgeschwindigkeiten v_z bzw. den Loading Rates $r = c v_z$, wobei c die effektive Federkonstante aus der Federkonstanten des Cantilevers und der Elastizität des verwendeten Polymerlinkers ist:

$$F = \frac{k_B T}{x_\beta} \ln \frac{x_\beta r}{k_B T v_{off}}. \quad (2.14)$$

In der sogenannten dynamischen Kraftspektroskopie [38] werden Kräfteverteilungen für unterschiedliche Loading Rates ermittelt, wobei die Ziehgeschwindigkeit über mehrere Größenordnungen variiert wird. Über die Beziehung (2.14) läßt sich dann auf die thermodynamischen Off-Raten der untersuchten Bindung schließen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden abschließend **ratenabhängige Messungen** am untersuchten Protein-DNA-System durchgeführt. Dabei wurde die Ziehgeschwindigkeit (im Standardpuffer) zwischen 10 nm/s und 2000 nm/s variiert. Die erhaltenen Kräfteverteilungen sind in Abbildung 5.11 wiedergegeben.

Trägt man die auf diese Weise erhaltenen Kraftwerte logarithmisch gegen die Ziehgeschwindigkeiten auf (Abbildung 5.12), ergibt sich – wie gefordert – eine Abnahme der Kraftwerte zu kleineren Ziehgeschwindigkeiten hin. Aus der Steigung der Regressionsgeraden ergibt sich dann der Reaktionskoordinatenparameter x_β (der sich gemäß Abbildung 2.6 als Potentialweite interpretieren ließe) zu $x_\beta = 0.89 \pm 0.15$ nm.

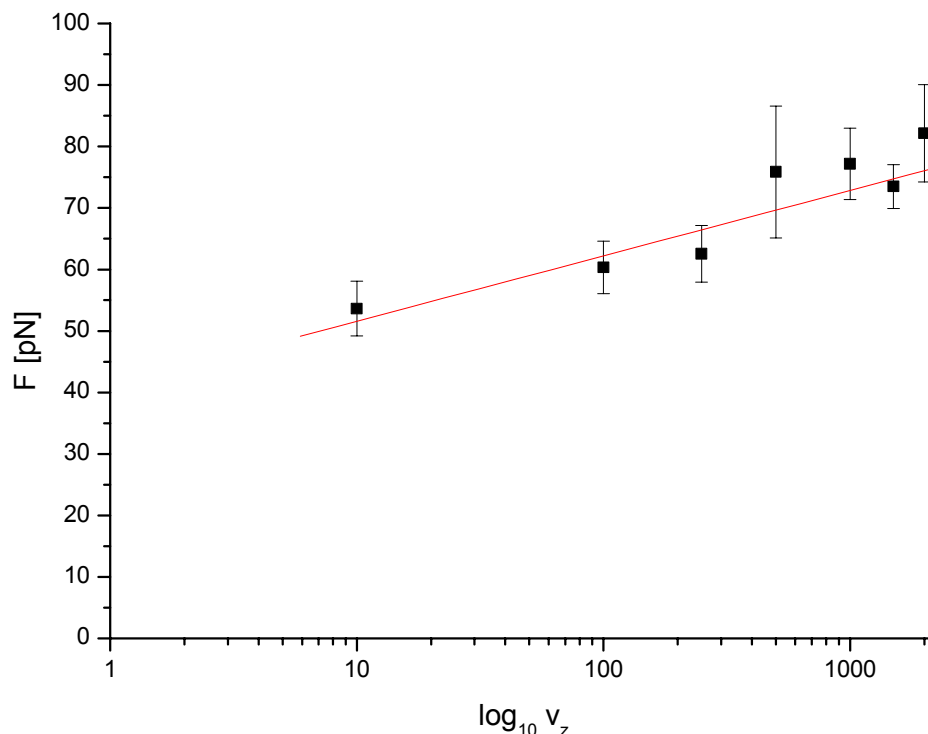


Abbildung 5.12: Abhängigkeit der Kraftwerte von den Ziehgeschwindigkeiten
Die aus den ratenabhängigen Messungen (Abbildung 5.11) ermittelten Kraftwerte sind hier logarithmisch gegen die Ziehgeschwindigkeiten aufgetragen. Die Abhängigkeit entspricht dem geforderten Zusammenhang (2.14); d.h. in dem untersuchten Geschwindigkeitsbereich wurden keine Hinweise entdeckt, die auf mehr als eine Potentialbarriere hindeuten. Durch lineare Regression lassen sich demnach die Parameter x_β und v_0 bestimmen.^{xii}

^{xii} Unter Berücksichtigung des Unterschiedes zwischen der postulierten natürlich-logarithmischen und der gezeigten dezimal-logarithmischen Abhängigkeit.

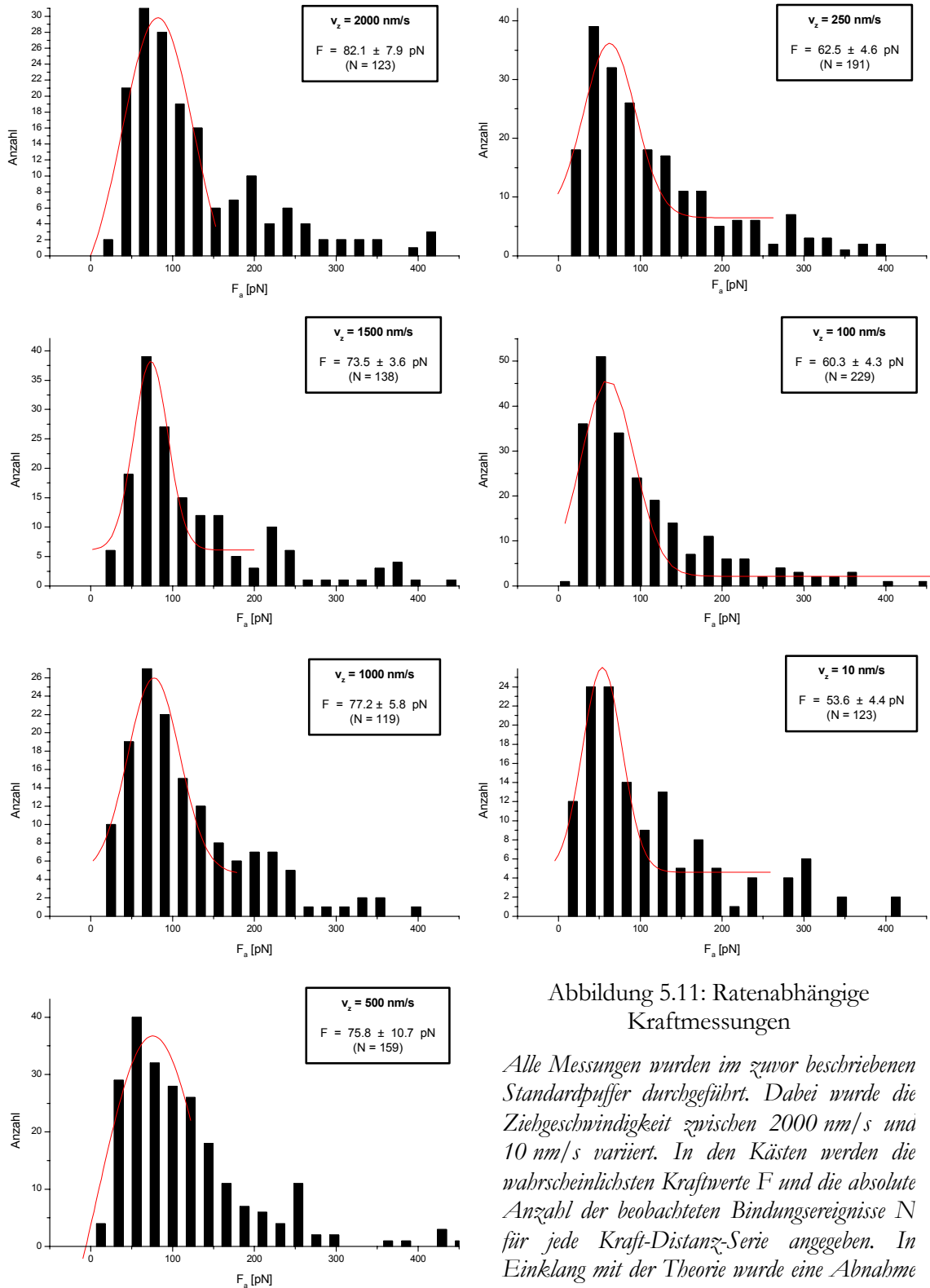


Abbildung 5.11: Ratenabhängige Kraftmessungen

Alle Messungen wurden im zuvor beschriebenen Standardpuffer durchgeführt. Dabei wurde die Ziehgeschwindigkeit zwischen 2000 nm/s und 10 nm/s variiert. In den Kästen werden die wahrscheinlichsten Kraftwerte F und die absolute Anzahl der beobachteten Bindungsereignisse N für jede Kraft-Distanz-Serie angegeben. In Einklang mit der Theorie wurde eine Abnahme der Kraftwerte F zu kleineren Ziehgeschwindigkeiten hin beobachtet.

Für $F = 0$ kann man aus (2.14) die **Off-Rate** bestimmen; es ergibt sich dann nämlich:

$$v_{\text{off}} = \beta x_{\beta} r_0. \quad (5.1)$$

Um $r_0 = r(F=0)$ zu ermitteln, extrapoliert man die Regressionsgerade nach $F = 0$ und erhält so die Ziehgeschwindigkeit $v_0 = v_z(F=0)$. Diese ist aufgrund der thermischen Dissoziation und der damit verbundenen natürlichen Off-Rate nicht gleich Null, sondern $v_0 = (1.4 \pm 2.5) \times 10^{-4}$ nm/s.

Um die effektive Federkonstante c zu bestimmen, wurden fünf Kraft-Distanz-Kurven pro Ziehgeschwindigkeit, bei denen die Abrißkraft jeweils im Maximum der Kräfteverteilung lag, hinsichtlich der Kurvensteigung unmittelbar vor dem Abriß untersucht. Aus den letzten 20 Punkten vor der Abrißstelle wurde c als Steigung einer Regressionsgeraden ermittelt^{xiii}. Es wurde keine Abhängigkeit der effektiven Federkonstante von der Ziehgeschwindigkeit gefunden. Darum ließ sich c durch Mittelwertbildung ($N=35$) mit $c = 5.08 \pm 0.33$ pN/nm bestimmen. Dies ist deutlich geringer als die Federkonstante des verwendeten Cantilevers $k = 14.62$ pN/nm.

Damit ergibt sich für die Loading Rate $r_0 = c v_0 = (7.2 \pm 12.5) \times 10^{-4}$ pN/s.

Die gesuchte Off-Rate (5.1) beträgt demnach $v_{\text{off}} = (1.6 \pm 2.7) \times 10^{-4}$ s⁻¹. Dies entspricht einer mittleren Lebensdauer des Protein-DNA-Komplexes von $\tau = 108 \pm 176$ min. Dieser Wert paßt zu der zuvor getroffenen Feststellung über die Lebensdauer aufgrund des ExpG-Verdrängungsexperimentes (85 min waren in jenem Fall notwendig, um das System nach einer Blockade mit freiem Protein zu reaktivieren.)

Die bestimmte Off-Rate liegt in der Größenordnung von Antikörper-Antigen-Komplexen (z.B. $v_{\text{off}} = 6.7 \times 10^{-4}$ s⁻¹ [132]). Leider stehen aber bezüglich der Protein-DNA-Komplexe keine direkten Vergleichsdaten zur Verfügung, da die Off-Rate der ExpG-*exp*-Bindung zuvor noch nie gemessen wurde. Für moderat bis sehr stabile Protein-DNA-Komplexe kann man Dissoziationskonstanten von $K_D = 10^{-9}$ M – 10^{-13} M annehmen [107]. Um auf eine Dissoziationskonstante zu schließen, fehlt jedoch zur Zeit noch die On-Rate der ExpG-*exp*-Bindung; zukünftige Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie-Messungen sollen gerade diesen Beitrag liefern und somit eine vollständige Analyse der thermodynamischen Größen einer Regulatorprotein-DNA-Bindung auf der Basis von Einzelmolekülmethoden ermöglichen.

^{xiii} Unter Vernachlässigung nichtlinearer Effekte bei der Streckung des Polymers.

Kapitel 6

Zusammenfassung und Ausblick

I cannot judge my work while I am doing it. I have to do as painters do, stand back and view it from a distance, but not too great a distance. How great? Guess. – Blaise Pascal

Die rasterkraftmikroskopischen und kraftspektroskopischen Untersuchungen, die in der vorliegenden Arbeit an einzelnen Biomolekülen vorgenommen wurden, gliedern sich nach der Art der biophysikalischen Fragestellungen in zwei Bereiche.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Struktur natürlicher zweidimensionaler Proteinkristalle mit dem AFM sichtbar gemacht. Die dazu ausgewählten Systeme waren einerseits die S-Layer von *Deinococcus radiodurans* und verschiedenen *Corynebacterium glutamicum*-Stämmen und zum anderen Annexin V-Kristalle. In beiden Fällen konnten auch mit Tapping Mode AFM Aufnahmen erzielt werden, deren Auflösung durchaus mit anderen Arbeiten (die meistens im Contact Mode durchgeführt wurden) vergleichbar ist. Insbesondere wurde hier erstmals die Struktur des S-Layers von *C. glutamicum* DSM20598 abgebildet. Zwischen diesem und dem S-Layer des *C. glutamicum*-Referenzstammes sowie im Vergleich zum HPI-Layer von *D. radiodurans* konnten Unterschiede hinsichtlich der Gitterkonstanten und der Schichtdicke bestimmt werden, die mit den entsprechenden Molekulargewichten korrelieren. Die experimentellen Ergebnisse weisen zudem auf eine (bezogen auf die HPI-Layer) größere Tendenz der *C. glutamicum*-S-Layer hin, in Abwesenheit ihrer physiologischen Umgebung zu denaturieren. Folgerichtigerweise sollten weitere Messungen an diesen Systemen in geeigneten Pufferlösungen stattfinden. AFM-Untersuchungen unter diesen Bedingungen konnten bereits erfolgreich am *C. glutamicum*-Referenzstamm vorgenommen werden. Als mittelfristiges Ziel kann hier die Erfassung der Strukturunterschiede zwischen allen *C. glutamicum*-Stämmen genannt werden, um auf diese Weise die molekularbiologische Analyse der S-Layer-Proteine zu unterstützen.

Die untersuchten Annexin V-Kristalle waren auf Lipid-Doppelschichten immobilisiert, deren Oberflächenrauigkeit die Qualität der Aufnahmen beeinträchtigte. Dennoch konnten Gitterkonstante und Schichtdicke der Proteinkristalle in guter Übereinstimmung mit anderen Arbeiten bestimmt werden. Auf diese Weise wurde eine Grundlage für die geplanten Experimente zur Ionenkanalaktivität des Annexin V geschaffen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Bindung des regulatorischen ExpG-Proteins an ein DNA-Fragment aus der Galactoglucanbiosyntheseregion von *Sinorhizobium meliloti*, welches eine potentielle Bindestelle für das Protein umfaßte, untersucht. Dazu wurde zunächst versucht, die Bindung rasterkraftmikroskopisch abzubilden. Tapping Mode AFM-Messungen an Luft konnten jedoch keine eindeutigen Aussagen über das Bindungsverhalten liefern, da aufgrund der limitierten Probenmengen keine hinreichende Statistik aufgestellt werden konnte. Durch die Protein-Bindung induzierte Konformationsänderungen der DNA wurden nicht beobachtet. Obwohl die DNA auch in wäßriger Lösung abgebildet wurde, gelangen noch keine Aufnahmen des Protein-DNA-Komplexes in physiologischer Umgebung. Dies kann jedoch als erreichbares Nahziel der AFM-Abbildungen angesehen werden.

Die kraftspektroskopischen Untersuchungen an diesem System ergaben einen wahrscheinlichsten Kraftwert von 72 ± 5 pN bei einer Loading Rate von etwa 5 nN/s. Die

Spezifität der Bindung wurde dabei zum einen über eine Zugabe des freien ExpG-Protein in Lösung und zum anderen durch eine Variation der im Puffer enthaltenen Kationen überprüft. Dabei ergab sich eine Blockade der Bindung durch Eisen(III)-Ionen, die einen Hinweis auf die bislang noch unbekannt Struktur des Proteins liefern könnte. Zum Schluß wurden noch ratenabhängige Messungen durchgeführt, aus denen ein Wert für die thermische Off-Rate der Bindung abgeleitet werden konnte ($v_{\text{off}} = (1.6 \pm 2.7) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). Der daraus folgende Wert für die mittlere Lebensdauer des Protein-DNA-Komplexes war mit der Zeitskala des Protein-Verdrängungsexperimentes vereinbar. Die Auftragung der ratenabhängigen Kraftwerte gegenüber den Ziehgeschwindigkeiten ergab keinen Hinweis auf weitere Potentialbarrieren. Diese Aussage kann jedoch nur für den beobachteten Bereich getroffen werden, und es ist durchaus möglich, daß durch ergänzende Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie-Untersuchungen weitere Energiebarrieren in einem anderen Ratenbereich aufgedeckt werden. Zunächst noch naheliegender sind jedoch Experimente, bei denen das System durch eine Serie von Verdrängungsexperimenten mit freiem Protein wie auch mit DNA-Fragmenten auf ein etwaiges dimeres Bindungsverhalten hin untersucht wird. Zudem könnten Versuche mit weiteren Übergangsmetall-Kationen den Weg zu molekularen Schaltungsmechanismen im ExpG-System weisen.

In beiden Teilen der Arbeit konnte erneut die Leistungsfähigkeit des Rasterkraftmikroskopes bei der Untersuchung biologischer Systeme unter Beweis gestellt werden. Es hat sich auch hier als geeignetes Instrument erwiesen, um für sich, aber vor allem in einem gemeinsamen Ansatz mit anderen Verfahren und gerade auch Ensemble-Methoden (wie Gelretardations-experimenten), Erkenntnisse zur Struktur und Funktion einzelner Biomoleküle zu gewinnen.

Welche langfristigen Ergebnisse die in dieser Arbeit begonnenen Untersuchungen zeitigen könnten, kann dabei kaum abgesehen werden. Es scheint, als versprochen hier die Untersuchungen an den Proteinkristallen naheliegendere Anwendungsmöglichkeiten; zum einen, wenn durch genetische Modifikationen die Struktureigenschaften der S-Layer gezielt zur Unterstützung der Fermentationsprozesse beeinflußt werden könnten oder – bei einer Ausdehnung der Untersuchungen auf pathogene Corynebakterien wie *C. diphtheriae* – zur Veränderung der Pathogenizität; zum anderen, wenn der Ionenkanalmechanismus des ubiquitären und aus medizinischer Sicht interessanten Annexin V bekannt wäre.

Nicht ohne Grund wurde jedoch die ExpG-*exp*-Bindung als Untersuchungsgegenstand der Protein-DNA-Experimente gewählt. *S. meliloti* ist ein Modellsystem für die Erforschung bakterieller Genome, und die an diesem System zusammentragbaren Ergebnisse könnten ein grundlegendes Verständnis der molekularen Mechanismen bei der transkriptionellen Regulation bewirken. AFM-Experimente können hier einen wertvollen Beitrag liefern, insbesondere wenn die Protein-DNA-Interaktionen im Zusammenwirken mit anderen Proteinen betrachtet werden (im Falle von ExpG wären dies vor allem MucR und PhoB). Es steht zu erwarten, daß sich die Energielandschaft der Bindung durch kooperative Effekte nachhaltig verändert. Diese könnte beispielsweise mit kleineren Cantilevern, welche höhere Ziehgeschwindigkeiten ermöglichen, noch in anderen Bereichen untersucht werden, um so ein realistisches Potentialmodell der regulatorischen Bindung zu konstruieren.

Die theoretischen Grundlagen der dynamischen Kraftspektroskopie schließlich befinden sich immer noch in einer Phase fortschreitender Entwicklung. Die erstellten Modelle verlangen aber gerade nach anspruchsvollen Systemen – wie einer durch verschiedene kooperative Effekte variablen Energielandschaft – um einer Prüfung unterzogen zu werden. Geeignete Experimente mit Protein-DNA-Interaktionen könnten so den Weg zu einem tieferen Einblick in die physikalischen Grundlagen der Kraftspektroskopie eröffnen.

Glossar

Errors using inadequate data are much less than those using no data at all. – Charles Babbage

Abrißkraft	Rupture Force; auch Pull-Off Force oder Binding Force
AFM	Atomic Force Microscope, Rasterkraftmikroskop
APTES	3-Aminopropyl-triethoxysilan
ATCC	American Type Culture Collection
β	Inverse Temperatur: $\beta = 1/(k_B T)$ mit $k_B T = 4.114 \text{ pN} \times \text{nm}$ bei 298 K ($\sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$)
bp	base pairs, Basenpaare: Ein Basenpaar entspricht etwa 0.34 nm Länge
BS ³	bis(Sulfosuccinimidyl)suberat-Natriumsalz: Crosslinker
c	effektive Federkonstante bei der Kraftspektroskopie
Cantilever	Auslegerarm, Federbalken: Bestandteil eines AFM-Kraftsensors
Contact Mode	Kontaktmodus: AFM-Abbildungsmodus im repulsiven Bereich
Da	Dalton, Einheit des Molekulargewichtes: $1 \text{ Da} = 1 \text{ u} = 1.661 \times 10^{-27} \text{ kg}$
DNA	Desoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure: primärer Träger der Erbsubstanz
DSM	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EPS	von <i>S.meliloti</i> synthetisierte Exopolysaccharide: (I) Succinoglycan, (II) Galactoglucan
<i>exp</i>	Galactoglucan-Biosynthesecuster auf dem Plasmid pSymB von <i>S. meliloti</i>
ExpG	Das von dem <i>expG</i> -Gen der <i>exp</i> -Genregion kodierte regulatorische Protein
F_a	Abrißkraft einer Protein-DNA-Bindung
F	Wahrscheinlichster Wert einer Verteilung von Abrißkräften
FFT	Fast Fourier Transform: Filter zur Bildbearbeitung
G	Gibbsche freie Enthalpie: $G = H - TS$
ΔG	Freie Reaktionsenthalpie
ΔG^0	Freie Standard-Enthalpie
ΔH	Reaktionsenthalpie
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic Acid: Biochemischer Standardpuffer
HPI-Layer	Hexagonally Packed Intermediate-Layer: S-Layer von <i>Deinococcus radiodurans</i>
HTH	Helix-Turn-Helix: häufiges Bindemotiv regulatorischer Proteine in Prokaryoten
k	Federkonstante des Cantilevers nach dem Hookeschen Gesetz ($F = -k x$)
k_B	Boltzmann-Konstante: $k_B = 1.381 \times 10^{-23} \text{ J/K}$
kb	Kilobasen: gebräuchliche Einheit in der Genetik, siehe bp
K_D	Dissoziationskonstante [in M]: $K_D = v_{\text{off}} / v_{\text{on}}$
Kraftsensor	Besteht aus Federbalken (Cantilever) und Spitze (Tip)

Lysin	2,6-Diamino-hexansäure: eine Aminosäure
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization: Massenspektrometrierverfahren
$M_n C_m$	Klassifikation eines S-Layers nach der Anordnung seiner Domänen (Abb. 3.1)
MES	2-[N-Morpholino]ethanesulfonic Acid
Mica	Glimmer: Schichtsilikat, beliebtes Probensubstrat
MW	Molecular Weight, Molekulargewicht [in Da]
v_{off}	Off-Rate [in s^{-1}]: Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation
v_{on}	On-Rate [in $M^{-1}s^{-1}$]: Geschwindigkeitskonstante der Assoziation
NHS-PEG-MAL	N-hydroxysuccinimid-poly(ethylenglycol)-maleimid: Crosslinker
PEG	Poly(ethylenglycol)
Piezo	Stellelement aus einer piezoelektrischen Keramik (Kurzform)
POPC	Palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholin: Phospholipid
Protomer	Protein-Monomer (Kurzform)
pSymB	Plasmid von <i>S. meliloti</i> , früher als Megaplasmid-2 bezeichnet
R	Molare Gaskonstante: $R = N_A k_B = 8.314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$
RNA	Ribonucleic Acid, Ribonukleinsäure
PS	Phosphatidylserin: negativ geladenes Phospholipid
PS2	S-Layer-Protein von <i>Corynebacterium glutamicum</i> (ATCC 17965)
r	Loading Rate: $r = c v_z$
S	Entropie
SAM	Self-Assembled Monolayer
SDS	Sodiumdodecylsulfat: Detergenz zur Extraktion der S-Layer-Proteine
SEM	Scanning Electron Microscope: Rasterelektronenmikroskop
SFM	Scanning Force Microscope: andere Bezeichnung für ein AFM
S-Layer	Surface Layer, Oberflächenschicht: äußerste Zellwandschicht bei Bakterien
SNOM	Scanning Near-Field Optical Microscope, Optisches Nahfeld-Mikroskop
SPM	Scanning Probe Microscope, Rastersondenmikroskop
STM	Scanning Tunneling Microscope, Rastertunnelmikroskop
τ	Mittlere Lebensdauer eines gebundenen Komplexes: $\tau = 1/v_{\text{off}}$
T	Temperatur
Tapping Mode	Dynamischer Modus: AFM-Abbildungsmodus, hauptsächlich im attraktiven Bereich
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskop
TMV	Tobacco Mosaic Virus, Tabakmosaikvirus
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan: Biochemischer Standardpuffer (pH 7-9)
v_z	Geschwindigkeit der AFM-Spitze beim Zurückziehen von der Probe
Φ	Freie Energie
$\Delta\Phi$	Freie Reaktionsenergie
$\Delta\Psi$	Höhe der Dissoziations-Potentialbarriere

Literaturverzeichnis

If I have been able to see further, it was only because I stood on the shoulders of giants.

- Isaac Newton, in einem Brief an Robert Hooke (1670)

1. Binnig G, Rohrer H, Gerber C, Weibel E. Tunneling through a controllable vacuum gap. *Appl Phys Lett* 1982; **40**: 178-180.
2. Binnig G, Rohrer H, Gerber C, Weibel E. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Phys Rev Lett* 1982; **49**: 57-61.
3. Pohl DW, Denk W, Lanz M. Optical Stethoscopy: Image recording with resolution $\lambda/20$. *Appl Phys Lett* 1984; **44**: 651-653.
4. Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic Force Microscope. *Phys Rev Lett* 1986; **56**: 930-933.
5. Meyer G, Amer NM. Simultaneous measurement of lateral and normal force with an optical-beam-deflection atomic force microscope. *Appl Phys Lett* 1990; **57**: 2089-2091.
6. Meyer G, Amer NM. Novel optical approach to atomic force microscopy. *Appl Phys Lett* 1988; **53**: 1045-1047.
7. Tamayo J, Garcia RA. Deformation, contact time, and phase contrast in tapping mode scanning force microscopy. *Langmuir* 1996; **12**: 4430-4435.
8. Binnig G, Rohrer H, Gerber C, Weibel E. 7 x 7 reconstruction on Si(111) resolved in real space. *Phys Rev Lett* 1983; **50**: 120-123.
9. Worcester DL, Miller RG, Bryant PJ. Atomic force microscopy of purple membranes. *J Microsc* 1988; **152**: 817-821.
10. Drake B, Prater CB, Weisenhorn AL, Gould SAC, Albrecht TR, Quate CF, Cannel DS, Hansma HG, Hansma PK. Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope. *Science* 1989; **243**: 1586-1589.
11. Radmacher M, Tillmann RW, Fritz M, Gaub HE. From molecules to cells: Imaging soft samples with the atomic force microscope. *Science* 1992; **257**: 1900-1905.
12. Shao Z, Yang J. Progress in high resolution atomic force microscopy in biology. *Quart Rev Biophys* 1995; **28**: 195-251.
13. Henderson E, Haydon PG, Sakaguchi S. Actin filament dynamics in living glial cells imaged by atomic force microscopy. *Science* 1992; **257**: 1944-1946.
14. Hansma HG, Laney DE, Bezanilla M, Sinsheimer RL, Hansma PK. *Biophys J* 1995; **68**: 1672-1677.

15. Garcia RA, Bustamante CJ, Reich NO. Sequence-specific recognition of cytosine C5 and adenine N6 DNA methyltransferases requires different deformations of DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 7618-7622.
16. van Noort SJ, van der Werf KO, Eker AP, Wyman C, de Grooth BG, van Hulst NF, Greve J. Direct visualization of dynamic protein-DNA interactions with a dedicated atomic force microscope. *Biophys J* 1998; **74**: 2840-2849.
17. Müller DJ, Amrein M, Engel A. Adsorption of biological molecules to a solid support for scanning probe microscopy. *J Struct Biol* 1997; **119**: 172-188.
18. Schabert FA, Rabe JP. Vertical Dimension of Hydrated Biological Samples in Tapping Mode Scanning Force Microscopy. *Biophys J* 1996; **70**: 1514-1520.
19. Karrasch S, Hegerl R, Hoh JH, Baumeister W, Engel A. Atomic force microscopy produces faithful high-resolution images of protein surfaces in an aqueous environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 836-838.
20. Kausche GA, Pfannkuch E, Ruska A. Die Sichtbarmachung von pflanzlichem Virus im Ultramikroskop. *Naturwissenschaften* 1939; **27**: 292-299.
21. Authorized Universal Virus Database, Columbia University, Biosphere 2 Center, 2002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/71010001.htm>
22. Israelachvili JN. *Intermolecular and surface forces*. London: Academic Press, 1992.
23. Leckband D. The surface force apparatus - a tool for probing molecular protein interactions. *Nature* 1995; **376**: 617-618.
24. Evans E, Berk D, Leung A. Detachment of agglutinin-bounded red blood cells. I. Forces to rupture molecular-point attachments. *Biophys J* 1991; **59**: 838-848.
25. Smith SB, Finzi L, Bustamante C. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science* 1992; **258**: 1122-1126.
26. Svoboda K, Block SM. Biological applications of optical forces. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1994; **23**: 247-285.
27. Grigg DA, Russell PE, Griffith JE. Tip-sample forces in scanning probe microscopy in air and vacuum. *J Vac Sci Technol A* 1992; **10**: 680-683.
28. Neumeister JM, Ducker WA. Lateral, normal, and longitudinal spring constants of atomic force microscopy cantilevers. *Rev Sci Instr* 1994; **64**: 2527-2531.
29. Gibson CT, Watson GS, Myhra S. Determination of the spring constants of probes for force microscopy/spectroscopy. *Nanotechnology* 1996; **7**: 259-262.
30. Cleveland JP, Manne S, Bocek D, Hansma PK. A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy. *Rev Sci Instr* 1993; **64**: 403-405.
31. Hutter JL, Bechhoefer J. Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev Sci Instr* 1993; **7**: 1868-1873.

32. Meyer E, Heinzelmann H, Grütter P, Jung TA, Weisskopf T, Hidber H-R, Lapka R, Rudin H, Güntherodt H-J. Comparative study of lithium fluoride and graphite by atomic force microscopy (AFM). *J Microsc* 1988; **152**: 269-280.
33. Lee GU, Kidwell DA, Colton RJ. Sensing discrete streptavidin-biotin interactions with atomic force microscopy. *Langmuir* 1994; **10**: 354-357.
34. Moy VT, Florin E-L, Gaub HE. Adhesive forces between ligand and receptor measured by AFM. *Colloids and Surfaces* 1994; **93**: 343-348.
35. Chilkoti A, Boland T, Ratner BD, Stayton PS. The relationship between ligand binding thermodynamics and protein ligand interaction forces measured by atomic force microscopy. *Biophys J* 1995; **69**: 2125-2130.
36. Florin E-L, Moy VT, Gaub HE. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science* 1994; **264**: 415-417.
37. Moy VT, Florin E-L, Gaub HE. Intermolecular forces and energies in between ligands and receptors. *Science* 1994; **266**: 257-259.
38. Merkel R, Nassoy P, Leung A, Ritchie K, Evans E. Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature* 1999; **397**: 50-53.
39. Hinterdorfer P, Baumgartner W, Gruber H, Schilcher K, Schindler H. Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 3477-3481.
40. Dammer U, Hegner M, Anselmetti D, Wagner P, Dreier M, Huber W, Güntherodt H-J. Specific antigen/antibody interactions measured by force microscopy. *Biophys J* 1996; **70**: 2437-2441.
41. Allen S, Chen X, Davies J, Davies MC, Dawkes AC, Edwards JC, Roberts CJ, Sefton J, Tandler SJB, Williams PM. Detection of antigen-antibody binding events with atomic force microscope. *Biochemistry* 1997; **36**: 7457-7463.
42. Ros R, Schwesinger F, Anselmetti D, Kubon M, Schäfer R, Plückthun A, Tiefenauer L. Antigen binding forces of individually addressed single-chain Fv antibody molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 7402-7405.
43. Dammer U, Popescu O, Wagner P, Anselmetti D, Güntherodt H-J, Misevic GN. Binding strength between cell adhesion proteoglycans measured by atomic force microscopy. *Science* 1995; **267**: 1173-1175.
44. Vinckier A, Gervasoni P, Zaugg F, Ziegler U, Lindner P, Plückthun A, Semenza G. Atomic force microscopy detects changes in the interaction forces between GroEL and substrate proteins. *Biophys J* 1998; **74**: 3256-3263.
45. Fritz J, Katopodis AG, Kolbinger F, Anselmetti D. Force-mediated kinetics of single P-selectin/ligand complexes observed by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 12283-12288.
46. Strunz T, Oroszlan K, Schäfer R, Güntherodt H-J. Dynamic force spectroscopy of single DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 11277-11282.

47. Lee GU, Chrisey LA, Colton RJ. Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA. *Science* 1994; **266**: 771-773.
48. Rief M, Oesterhelt F, Heymann B, Gaub HE. Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by atomic force microscopy. *Science* 1997; **275**: 1295-1297.
49. Rief M, Gautel M, Schemmel A, Gaub HE. The mechanical stability of immunoglobulin and fibronectin III domains in the muscle protein titin measured by atomic force microscopy. *Biophys J* 1998; **75**: 3008-3014.
50. Rief M, Gautel M, Oesterhelt F, Fernandez JM, Gaub HE. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science* 1997; **276**: 1109-1112.
51. Carrion-Vasquez M, Oberhauser AF, Fisher TE, Marszalek PE, Li H, Fernandez JM. The mechanical topology of protein studied by AFM. *Prog Biophys Mol Biol* 2000; **74**: 63-91.
52. Müller DJ, Baumeister W, Engel A. Controlled unzipping of a bacterial surface layer with atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 13170-13174.
53. Scheuring, S., Stahlberg, H., Chami, M., Houssin, C., Rigaud, J.-L., and Engel, A. Charting and unzipping the surface-layer of *Corynebacterium glutamicum* with the atomic force microscope. *Mol. Microbiol.*, in press, 2002.
54. Zlatanova J, Lindsay SM, Leuba SH. Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscope. *Prog Biophys Mol Biol* 2000; **74**: 37-61.
55. Wagner P, Hegner M, Kern P, Zaugg F, Semenza G. Covalent immobilization of native biomolecules onto au(111) Via n hydroxysuccinimide ester functionalized self assembled monolayers for scanning probe microscopy. *Biophys J* 1996; **70**: 2052-2066.
56. Bhatia SK, Shriver-Lake LC, Prior KJ, Georger JH, Calvert JM, Bredehorst R, Ligler FS. Use of Thiol-Terminal Silanes and Heterobifunctional Crosslinkers for Immobilization of Antibodies on Silica Surfaces. *Anal Biochem* 1989; **178**: 408-413.
57. Arrhenius S. Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei Inversion von Rohrzucker durch Säuren. *Zeitschr für phys Chem* 1889; **4**: 226-248.
58. Eyring H. The activated complex in chemical reactions. *J Chem Phys* 1935; **3**: 107-115.
59. Kramers HA. Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions. *Physica* 1940; **7**: 284-304.
60. Bell GI. Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science* 1978; **200**: 618-627.
61. Evans E, Ritchie K. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys J* 1997; **72**: 1541-1555.
62. Hänggi P, Talkner P, Borkovec M. Reaction-rate theory: fifty years after Kramers. *Rev Mod Phys* 1990; **62**: 251-341.
63. Friedrich W, Knipping P, von Laue M. Interferenz-Erscheinungen bei Röntgenstrahlungen. *Sitzungsberichte der Königlich Bayerischen Akademie der Wissenschaften* 1912; **30332**.

64. Kühlbrandt W. Two-dimensional crystallization of membrane proteins. *Quart Rev Biophys* 1992; **25**: 1-49.
65. Sleytr UB. Regular arrays of macromolecules on bacterial cell walls: structure, chemistry, assembly and function. *Int Rev Cytol* 1978; **53**: 1-64.
66. Sleytr UB, Plohberger R. The dynamic process of assembly of two-dimensional arrays of macromolecules on bacterial cell walls. In: Baumeister W, Vogell W (editors). *Electron Microscopy at Molecular Dimensions*. Berlin: Springer-Verlag, 1980; 36-47.
67. Sleytr UB, Messner P, Pum D, Sára ME. *Crystalline Bacterial Cell Surface Proteins*. Austin, TX: R.G. Landes/Academic Press, 1996.
68. Sleytr UB. Basic and applied S-layer research: an overview. *FEMS Microbiol Rev* 1997; **20**: 5-12.
69. Beveridge TJ, Pouwels PH, Sára M, Kotiranta A, Lounatmaa K, Kari K, Kerosuo E, Haapasalo M, Egelseer EM, Schocher I, Sleytr UB, Morelli L, Callegari M-L, Nomellini JF, Bingle WH, Smit J, Leibovitz E, Lemaire M, Miras I, Salamitou S, Béguin P, Ohayon H, Gounon P, Matuschek M, Sahm K, Bahl H, Grogono-Thomas R, Dworkin J, Blaser M, Woodland RM, Newell DG, Kessel M, Koval SF. Functions of S-layers. *FEMS Microbiol Rev* 1997; **20**: 99-149.
70. Hovmöller S, Sjögren A, Wang DN. The structure of crystalline bacterial surface layers. *Prog Biophys Mol Biol* 1988; **51**: 131-163.
71. Rachel R, Pum D, Šmarda J, Šmajs D, Komrska J, Krzyzáněk V, Rieger G, Stetter KO. Fine structure of S-layers. *FEMS Microbiol Rev* 1997; **20**: 13-23.
72. Baumeister W, Barth M, Hegerl R, Guckenberger R, Hahn M, Saxton WO. Three-dimensional Structure of the Regular Surface Layer (HPI Layer) of *Deinococcus radiodurans*. *J Mol Biol* 1986; **187**: 241-253.
73. Pum D, Neubauer A, Györvary E, Sára M, Sleytr UB. S-layer proteins as basic building blocks in a biomolecular construction kit. *Nanotechnology* 2000; **11**: 100-107.
74. Sára M, Sleytr UB. Use of regularly structured bacterial cell surface layers as matrix for immobilizing macromolecules. *Appl Microbiol Biotechnol* 1989; **30**: 184-189.
75. Sleytr UB, Messner P. Crystalline surface layers on bacteria. *Ann Rev Microbiol* 1983; **37**: 311-339.
76. Sleytr UB. Heterologous reattachment of regular arrays of glycoproteins on bacterial surfaces. *Nature* 1975; **257**: 400-402.
77. Panhorst, M. Herstellung von Nanostrukturen mit S-layer Maskentechnik. Diplomarbeit, Universität Bielefeld, 2000.
78. Panhorst M, Brückl H, Kiefer B, Reiss G, Santarius U, Guckenberger R. Formation of metallic surface structures by ion etching using a S-layer template. *J Vac Sci Technol B* 2001; **19**: 722-724.
79. Sleytr UB, Bayley H, Sára M, Breitwieser A, Küpcü S, Mader C, Weigert S, Unger FM, Messner P, Jahn-Schmid B, Schuster B, Pum D, Douglas K, Clark NA, Moore JT,

- Winningham TA, Levy S, Frithsen I, Pankovc J, Beale P, Gillis HP, Choutov DA, Martin KP. Applications of S-layers. *FEMS Microbiol Rev* 1997; **20**: 151-175.
80. Minton KW. Repair of ionizing-radiation damage in the radiation resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mutation Research* 1996; **363**: 1-7.
 81. Peters J, Peters M, Lottspeich F, Schäffer W, Baumeister W. Nucleotide sequence analysis of the gene encoding the *Deinococcus radiodurans* surface protein, derived amino acid sequence, and complementary protein chemical studies. *J Bacteriol* 1987; **169**: 5216-5223.
 82. Baumeister W, Karrenberg F, Rachel R, Engel A, Ten Heggeler B, Saxton WO. The major cell envelope protein of *Micrococcus radiodurans* (R1). *Eur J Biochem* 1982; **125**: 535-544.
 83. Möller C, Allen M, Eilings V, Engel A, Müller DJ. Tapping-Mode Atomic Force Microscopy Produces Faithful High-Resolution Images of Protein Surfaces. *Biophys J* 1999; **77**: 1150-1158.
 84. Müller DJ, Baumeister W, Engel A. Conformational Change of the Hexagonally Packed Intermediate Layer of *Deinococcus radiodurans* Monitored by Atomic Force Microscopy. *J Bacteriol* 1996; **178**: 3025-3030.
 85. Engel A, Baumeister W, Saxton WO. Mass mapping of a protein complex with the scanning transmission electron microscope. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 4050-4054.
 86. Karrenberg, F. Topographische Studien an den äußeren Zellwandschichten von *Deinococcus radiodurans*. Dissertation, Universität Düsseldorf, 1985.
 87. Chami M, Bayan N, Dedieu J-C, Leblon G, Shechter E, Gulik-Krzywicki T. Organization of the outer layers of the cell envelope of *Corynebacterium glutamicum*: A combined freeze-etch electron microscopy and biochemical study. *Biol Cell* 1995; **83**: 219-229.
 88. Chami M, Bayan N, Peyret JL, Gulik-Krzywicki T, Leblon G, Shechter E. The S-layer protein of *Corynebacterium glutamicum* is anchored to the cell wall by its C-terminal hydrophobic domain. *Mol Microbiol* 1997; **23**: 483-492.
 89. Bahl H, Scholz H, Bayan N, Chami M, Leblon G, Gulik-Krzywicki T, Shechter E, Fouet A, Mesnage S, Tosi-Couture E, Gounon P, Mock M, Conway de Macario E, Macario AJL, Fernández-Herrero LA, Olabarría G, Berenguer J, Blaser M, Kuen B, Lubitz W, Sára M, Pouwels PH, Kolen CPAM, Boot HJ, Palva A, Truppe M, Howorka S, Schroll G, Lechleitner S, Resch S. Molecular biology of S-layers. *FEMS Microbiol Rev* 1997; **20**: 47-98.
 90. Brand, S. Untersuchung der Zellhülle von *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Universität Bielefeld, 2001.
 91. Hansmeier, Nicole. Persönliche Mitteilung, 2001.
 92. Andree HAM, Reutelingsperger CPM, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM. Binding of a vascular anticoagulant α (VAC α) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem* 1990; **265**: 4923-4928.
 93. van Heerde WL, Sakariassen KS, Hemker HC, Sixma JJ, Reutelingsperger CPM, de Groot PG. Annexin V inhibits the procoagulant activity of matrices of TNF-stimulated endothelium under blood flow conditions. *Arterioscler Thromb* 1994; **14**: 824-830.

94. Ahn NG, Telle DC, Bienkowski MJ, McMullen BA, Lipkin EW, de Haen C. Sedimentation equilibrium analysis of five lipocortin-related phospholipase A2 inhibitors from human placenta. Evidence against a mechanistically relevant association between enzyme and inhibitor. *J Biol Chem* 1988; **263**: 18657-18663.
95. Schlaepfer DD, Jones J, Haigler HT. Inhibition of protein kinase C by annexin V. *Biochemistry* 1992; **31**: 1886-1891.
96. Neurath AR, Strick N. The putative cell receptors for hepatitis B virus (HBV), annexin V, and apolipoprotein H, bind to lipid components of HBV. *Virology* 1994; **204**: 475-477.
97. Huber R, Berendes R, Burger A, Schneider M, Karshikov A, Luecke H. Crystal and molecular structure of human annexin V after refinement. Implications for structure, membrane binding and ion channel formation of the annexin family of proteins. *J Mol Biol* 1992; **223**: 683-704.
98. Voges D, Berendes R, Burger A, Demange P, Baumeister W, Huber R. Three-dimensional Structure of Membrane-bound Annexin V: A Correlative Electron Microscopy-X-ray Crystallography Study. *J Mol Biol* 1994; **238**: 199-213.
99. Neumann E, Siemens PE, Toensing K. Electroporative fast pore-flickering of the annexin V-lipid surface complex, a novel gating concept for ion transport. *Biophys Chem* 2000; **86**: 203-220.
100. Huber R, Schneider M, Mayr I, Römisch J, Paques E-P. The calcium binding sites in human annexin V by crystal structure analysis at 2.0 Å resolution. Implications for membrane binding and calcium channel activity. *FEBS Lett* 1990; **275**: 15-21.
101. Huber R, Römisch J, Paques E-P. The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *EMBO J* 1990; **9**: 3867-3874.
102. Protein Data Bank. 2002. <http://pdb.gmd.de>
103. Mosser G, Ravanat C, Freyssinet JM, Brisson A. Sub-domain structure of lipid-bound annexin V resolved by electron image analysis. *J Mol Biol* 1991; **217**: 241-245.
104. Reviakine I, Bergsma-Schutter W, Mazères-Dubut C, Govorukhina N, Brisson A. Surface Topography of the p3 and p6 Annexin V Crystal Forms Determined by Atomic Force Microscopy. *J Struct Biol* 2000; **131**: 234-239.
105. Reviakine I, Bergsma-Schutter W, Brisson A. Growth of Protein 2-D Crystals on Supported Planar Lipid Bilayers Imaged *in Situ* by AFM. *J Struct Biol* 1998; **121**: 356-361.
106. Stryer L. *Biochemie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 4. Auflage, 1996.
107. Bustamante C, Rivetti C. Visualizing protein-nucleic acid interactions on a large scale with the scanning force microscope. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1996; **25**: 395-429.
108. Moreno-Herrero F, Herrero P, Colchero J, Baro AM, Moreno F. Imaging and mapping protein-binding sites on DNA regulatory regions with atomic force microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **280**: 151-157.
109. Riggs AD, Bourgeois S, Cohn M. The lac receptor-operator interaction. III. Kinetic studies. *J Mol Biol* 1970; **53**: 401-417.

110. Berg OG, Winter RB, von Hippel PH. Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids 1. Models and theory. *Biochemistry* 1981; **20**: 6929-6948.
111. Bustamante C, Guthold M, Zhu XS, Yang GL. Facilitated target location on DNA by individual Escherichia coli RNA polymerase molecules observed with the scanning force microscope operating in liquid. *J Biol Chem* 1999; **274**: 16665-16668.
112. Jiao Y, Cherny DI, Heim G, Jovin TM, Schäffer TE. Dynamic Interactions of p53 with DNA in Solution by Time-Lapse Atomic Force Microscopy. *J Mol Biol* 2001; **314**: 233-243.
113. Brennan RG, Matthews BW. Structural basis of DNA-protein recognition. *TIBS* 1989; **14**: 286-290.
114. Tan Lab, Biochemistry & Molecular Biology, Pennsylvania State University. 2002.
http://www.bmb.psu.edu/tan/tanlab_website/tanlab_gallery.htm
115. Gonzalez JE, York GM, Walker GC. *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides: synthesis and symbiotic function. *Gene* 1996; **179**: 141-146.
116. Gonzalez JE, Reuhs BL, Walker GC. Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in Medicago sativa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 8636-8641.
117. Becker A, Pühler A. Production of exopolysaccharides. In: Spink HPKHPJJ (editor). *The Rhizobiaceae. Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1998; 97-118.
118. Galibert F, Finan TM, Long SR, Pühler A, Abola P, Ampe F, Barloy-Hubler F, Barnett MJ, Becker A, Boistard P, Bothe G, Boutry M, Bowser L, Buhrmester J, Cadieu E, Capela D, Chain P, Cowie A, Davis RW, Dreano S, Federspiel NA, Fisher RF, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Golding B, Gouzy J, Gurjal M, Hernandez-Lucas I, Hong A, Huizar L, Hyman RW, Jones T, Kahn D, Kahn ML, Kalman S, Keating DH, Kiss E, Komp C, Lelaure V, Masuy D, Palm C, Peck MC, Pohl TM, Portetelle D, Purnelle B, Ramsperger U, Surzycki R, Thebault P, Vandenbol M, Vorholter FJ, Weidner S, Wells DH, Wong K, Yeh KC, Batut J. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 2001; **293**: 668-672.
119. Rüberg S, Pühler A, Becker A. Biosynthesis of the exopolysaccharide galactoglucan in *Sinorhizobium meliloti* is subject to a complex control by the phosphate-dependent regulator PhoB and the proteins ExpG and MucR. *Microbiology* 1999; **145**: 603-611.
120. Becker A, Rüberg S, Küster H, Roxlau A, Keller M, Ivashina T, Cheng H-P, Walker GC, Pühler A. The 32-kilobase *exp* gene cluster of *Rhizobium meliloti* directing the biosynthesis of galactoglucan: genetic organization and properties of the encoded gene products. *J Bacteriology* 1997; **179**: 1375-1383.
121. Baumgarth, Birgit. Persönliche Mitteilung, 2001.
122. Guckenberger, Reinhard. Persönliche Mitteilung, Oktober 2001.
123. Ros R. Kraftmessungen an einzelnen Antikörpermolekülen. Dissertation, Universität Basel, 2000.

124. Umemura K, Ishikawa M, Kuroda R. Controlled immobilization of DNA molecules using chemical modification of mica surfaces for atomic force microscopy: characterization in air. *Anal Biochem* 2001; **290**: 232-237.
125. Hansma HG, Laney DE. DNA binding to mica correlates with cationic radius: Assay by atomic force microscopy. *Biophys J* 1996; **70**: 1933-1939.
126. Karrasch S, Dolder M, Hoh JH, Schabert FA, Ramsden J, Engel A. Covalent binding of biological samples to solid supports for scanning probe microscopy in buffer solution. *Biophys J* 1993; **65**: 2437-2446.
127. Anselmetti D, Dreier M, Richmond T, Meyer E, Frommer J, Güntherodt H-J. Biological materials studied with dynamic force microscopy. *J Vac Sci Technol B* 1994; **12**: 1500-1503.
128. Müller DJ, Engel A. Voltage and pH-induced Channel Closure of Porin OmpF Visualized by Atomic Force Microscopy. *J Mol Biol* 1999; **285**: 1347-1351.
129. Holleman, Wiberg. *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. Berlin: de Gruyter, 101. Auflage, 1995.
130. Mortimer CE. *Chemie*. Stuttgart: Thieme Verlag, 6. Auflage, 1996.
131. Kienberger F, Kada G, Gruber HJ, Pastushenko VPh, Riener C, Trieb M, Knaus H-G, Schindler H, Hinterdorfer P. Recognition force spectroscopy studies of the NTA-His6 bond. *Single Molecules* 2000; **1**: 59-65.
132. Hinterdorfer P, Schilcher K, Baumgartner W, Gruber H, Schindler H. A mechanistic study of the dissociation of individual antibody-antigen pairs by atomic force microscopy. *Nanobiology* 1998; **4**: 177-188.
133. Hansma HG. Surface biology of DNA by atomic force microscopy. *Annu Rev Phys Chem* 2001; **52**: 71-92.
134. Wildhaber I, Gross H, Engel A, Baumeister W. The effect of air-drying and freeze-drying on the structure of a regular protein layer. *Ultramicroscopy* 1985; **16**: 411-422.

Danksagung

Wenn wir um Rat fragen, suchen wir meistens nach einem Komplizen.

– Joseph-Louis Lagrange

Eine Arbeit wie diese kann nicht in einem Vakuum entstehen. Wie bereits an vielen Stellen in den Kapiteln zuvor sichtbar wurde, bin ich einer Reihe von Personen zu Dank verpflichtet, die im folgenden nicht ungenannt bleiben sollen.

Zunächst möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei den Kooperationspartnern aus anderen Arbeitsgruppen zu bedanken, ohne deren Einsatz die vorgestellten Experimente nicht möglich gewesen wären. Am Lehrstuhl für Genetik geht mein Dank an Birgit Baumgarth und Anke Becker für die gute Zusammenarbeit bei den Protein-DNA-Wechselwirkungsexperimenten (Birgit im besonderen für die unzähligen aufgereinigten DNA- und Protein-Proben während des letzten Jahres) sowie an Jörn Kalinowski, Sven Brand und Nicole Hansmeier für die tollen S-Layer-Proben und manches erhellende Gespräch im Rahmen dieser Studien. Uwe Güth aus der Abteilung Physikalische Chemie III danke ich für tatkräftige Hilfe sowohl bei der Präparation der Lipide als auch im PDP. An dieser Stelle möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Günter Reiss danken, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat, die Zweitbegutachtung dieser Arbeit zu übernehmen.

Der gesamten Arbeitsgruppe Experimentelle Biophysik und Angewandte Nanowissenschaften möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die immer wieder gerne in Anspruch genommene Hilfsbereitschaft und manch lustige Stunde danken, zuvorderst jedoch Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti, der diese Diplomarbeit nicht nur formal betreut hat, sondern durch Einsatz, Interesse, Optimismus und die notwendigen kritischen Fragen wesentlich zu ihrem Gelingen beigetragen hat. Ich möchte ferner Carola Haumann für die ersten Schritte mit dem AFM danken, Wibke Hellmich für das Besorgen der Filter zum richtigen Zeitpunkt, Christoph Pelargus für die hübschen Photos und mannigfache technische Hilfe (gerade in Computerangelegenheiten), Rainer Eckel für die vielen anregenden Gespräche (παθηματα μαθηματα), Alexandra Ros und Katja Toensing für Rat in simplen wie komplexen chemischen Fragen, ganz besonders aber Robert Ros, der in unserer gemeinsamen Zeit stets ein offenes Ohr für meine Nöte hatte, und von dessen Wissen und Wesen ich ungemein profitiert habe.

Mein abschließender Dank indessen gilt meinen Eltern, die mir nicht nur das Studium überhaupt erst ermöglicht haben, sondern mich auch stets nach allen Kräften unterstützten.

CURRICULUM VITAE

Frank Wilco Bartels

- 1976 Geboren am 6. Juni in Hamm (Westfalen, Deutschland) als Sohn von Horst Bartels und Leonarda Bartels geb. Laarakker
- 1982-1983 Wilhelm-Busch-Grundschule in Hamm
- 1983-1986 Kappenbusch-Grundschule in Hamm
- 1986-1995 Gymnasium Hammonense in Hamm
12.06.1995 Abitur (Latinum, Graecum)
- 1995-1996 Grundwehrdienst beim Fallschirmjägerbataillon 314 in Oldenburg
- 1996-1999 Studium der Mathematik und Physik an der Universität Bielefeld
20.08.1999 Vordiplom in Physik (Wahlpflichtfach Astrophysik)
- 1999-2002 Studium der Physik an der Universität Bielefeld
Diplomprüfungen in Quantenmechanik, Statistischer Mechanik, Festkörperphysik, Atom- und Molekülphysik, Kernphysik und Laserphysik
seit 02.05.2001 Diplomarbeit in der Abteilung „Experimentelle Biophysik und Angewandte Nanowissenschaften“ von Prof. Dr. Dario Anselmetti
- 2000-2002 Studentische Hilfskraftstellen als Tutor für die Veranstaltungen „Physikalische Reaktionen für Umweltwissenschaftler“ (I und II), „Physikalisch-Didaktisches Praktikum“