

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung für Molekulare Strukturbiologie

Rasterkraftmikroskopie an makromolekularen Proteinkomplexen

Jens Michael Schiener

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. H. Kessler

Prüfer der Dissertation:

1. Hon.-Prof. Dr. W. Baumeister
2. Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff

Die Dissertation wurde am 09.06.2005 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 17.08.2005 angenommen.

Inhalt

1.	ZUSAMMENFASSUNG.....	5
2.	SUMMARY	7
3.	EINLEITUNG	9
4.	RASTERKRAFTMIKROSKOP.....	11
4.1	GRUNDLAGEN UND FUNKTIONSWEISE	12
4.1.1	<i>Aufbau</i>	12
4.1.2	<i>Rasterbewegung der Probe</i>	12
4.1.3	<i>Betriebsmoden</i>	13
4.1.4	<i>Regelung</i>	17
4.1.5	<i>Kräfte</i>	18
4.1.6	<i>Kurz- und langreichweitige Kräfte</i>	19
4.1.7	<i>Annäherungskurven</i>	23
4.1.8	<i>Spitzen</i>	26
4.2	AUTOMATISCHE REGELUNG DES AMPLITUDEN-SETPOINTS	30
4.2.1	<i>Problemstellung</i>	30
4.2.2	<i>Lösungsansatz</i>	31
4.2.3	<i>Technische Realisierung</i>	34
4.2.4	<i>Anwendung und Einschränkungen</i>	35
5.	UNTERSUCHTE PROTEINE.....	37
5.1	GROE-SYSTEM	37
5.1.1	<i>Struktur des GroEL und des GroEL-GroES-Komplexes</i>	37
5.1.2	<i>Proteinfaltung durch das GroE-System</i>	40
5.1.3	<i>GroEL-,single ring'-Mutante</i>	43
5.1.4	<i>Fragestellung</i>	43
5.2	20S-PROTEASOM	45
5.2.1	<i>Struktur und Funktion</i>	45
5.2.2	<i>Kraftspektroskopie am 20S-Proteasom</i>	47
5.3	SMC-PROTEIN.....	48
5.3.1	<i>Grundlagen</i>	48
5.3.2	<i>Aufbau und Funktionsweise</i>	48
5.3.3	<i>Fragestellung</i>	49
6.	ERGEBNISSE	50
6.1	GROE-SYSTEM	50
6.1.1	<i>GroEL</i>	50
6.1.2	<i>GroEL-,single ring'-Mutante</i>	54
6.1.3	<i>Substrat-Komplexe</i>	67
6.2	20S-PROTEASOM	77
6.2.1	<i>Proteasom auf Glimmer</i>	79
6.2.2	<i>Proteasom auf Lipid</i>	80
6.3	SMC-PROTEIN.....	91
7.	ABSCHLUSSDISKUSSION.....	94
8.	MATERIALIEN UND METHODEN.....	98
8.1	RASTERKRAFTMIKROSKOP.....	98
8.2	REGELSCHLEIFE AUF DIE ZWEITE HARMONISCHE	98
8.3	PROBENVORBEREITUNG FÜR AFM-MESSUNGEN	99
8.4	EXPRESSION UND AUFREINIGUNG DER PROTEINE	102
8.5	ELEKTRONENMIKROSKOPIE	108
8.6	CHEMIKALIEN UND GERÄTE	109
8.7	LÖSUNGEN UND PUFFER	111
9.	LITERATUR.....	112
10.	DANKSAGUNG.....	116

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Rasterkraftmikroskops.....	12
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Rasterbewegung.....	13
Abbildung 3: Frequenzspektrum.....	16
Abbildung 4: Rauschspektren eines OMCL-Cantilevers.....	16
Abbildung 5: Schaltbild des AFM-Regelkreises.....	18
Abbildung 6: Theoretische Kraft-Distanz-Kurve (Annäherungskurve) eines Cantilevers an eine Oberfläche....	23
Abbildung 7: Kraftkurve im Tapping-Modus („Ramp Plot“) in Flüssigkeit.....	25
Abbildung 8: Elektronenmikrographen verschiedener AFM-Spitzen.....	27
Abbildung 9: Schema vom „tip convolution“-Artefakt einer realen Spitze.....	28
Abbildung 10: AFM-Abbildung mit Spitzenartefakten.....	28
Abbildung 11: Effekt der automatischen Regelung des Amplituden-Setpoint auf die Abbildungsqualität.....	30
Abbildung 12: Entstehung höherer Harmonischer aus der Cantilever-Grundschiwingung.....	32
Abbildung 13: Schaltbild der Regelung für die automatische Korrektur des Amplituden-Setpoints.....	34
Abbildung 14: Struktur von GroEL.....	38
Abbildung 15: Struktur des GroEL-GroES-Komplexes.....	39
Abbildung 16: Schematische Darstellung des GroE-Reaktionszyklus bei der Proteinfaltung.....	40
Abbildung 17: Strukturveränderung in einer GroEL-Untereinheit bei ATP- und GroES-Bindung.....	41
Abbildung 18: 26S-Proteasom aus <i>Drosophila melanogaster</i>	45
Abbildung 19: 20S-Proteasom aus <i>Thermoplasma acidophilum</i>	46
Abbildung 20: Schema für rasterkraftspektroskopische Messungen der Proteasom-Substrat-Interaktion.....	47
Abbildung 21: Modell des SMC-Proteins (Dimer).....	49
Abbildung 22: AFM-Abbildung von nativem GroEL auf Glimmer.....	50
Abbildung 23: AFM-Abbildung von GroEL auf Glimmer.....	51
Abbildung 24: AFM-Abbildung von halbiertem GroEL auf Glimmer.....	52
Abbildung 25: AFM-Abbildung von GroEL auf Glimmer - Vergrößerung von Abbildung 24.....	53
Abbildung 26: AFM-Abbildung von GroEL-GroES-Komplexen neben halben GroEL.....	54
Abbildung 27: Schematische Darstellung von GroEL und GroEL-SR.....	55
Abbildung 28: AFM-Abbildung von GroEL-SR, adsorbiert auf Glimmer.....	56
Abbildung 29: AFM-Abbildungen von GroEL-SR auf Glimmer unter Zugabe von ATP und GroES.....	57
Abbildung 30: Schematische Darstellung der Konformationsänderung von GroEL-SR bei ATP-Zugabe.....	58
Abbildung 31: AFM-Abbildung von GroEL-SR auf HOPG.....	59
Abbildung 32: AFM-Abbildungen von GroEL-SR auf HOPG unter Zugabe von ATP und GroES.....	60
Abbildung 33: AFM-Abbildung eines GroEL-SR-GroES-Komplexes auf HOPG.....	61
Abbildung 34: AFM-Abbildungen von GroEL-SR-GroES-Komplexen auf HOPG.....	62
Abbildung 35: Höhenverlauf des GroEL-SR-GroES-Komplexes.....	63
Abbildung 36: AFM-Abbildung der Maserung einer „template stripped“-Goldoberfläche.....	64
Abbildung 37: Anordnung der Cystein-Mutationen im GroEL-SR.....	65
Abbildung 38: AFM-Abbildung von GroEL-SR _{A109C} auf Gold.....	66
Abbildung 39: AFM-Abbildung von GroEL-SR _{A464C} auf Gold.....	66
Abbildung 40: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Substratbindung an GroEL-SR.....	68
Abbildung 41: AFM-Abbildung von GroEL-SR-CS-Komplexen auf Glimmer.....	69
Abbildung 42: AFM-Abbildungen eines GroEL-SR-CS-Komplexes unter Zugabe von ATP.....	70
Abbildung 43: Schematische Darstellung der Konformationsänderung des GroEL-SR-CS-Komplexes.....	70
Abbildung 44: 2D-Gel identifizierter nativer Substrate von GroEL.....	72
Abbildung 45: Eigenvektoren aus der MSA-Analyse von GroEL-SR-SYT-Komplexen.....	73
Abbildung 46: AFM-Abbildung von GroEL-SR-SYT-Komplexen auf HOPG.....	74
Abbildung 47: AFM-Bilderserie eines GroEL-SR-SYT-Komplexes bei GroES-Zugabe.....	76
Abbildung 48: Strukturformel der Ni-NTA-His ₆ -Tag-Bindung.....	78
Abbildung 49: Schematische Darstellung der His-Tag-Mutanten des 20S-Proteasoms.....	78
Abbildung 50: AFM-Abbildung von α -His ₆ -Proteasome auf Glimmer.....	79
Abbildung 51: AFM-Abbildung von β -His ₆ -Proteasome auf Glimmer.....	80
Abbildung 52: Schematische Darstellung zur Spreizung von Lipidvesikeln auf Glimmer.....	81
Abbildung 53: AFM-Abbildung einer SOPC-Ni-NTA-DODA-Lipiddoppelschicht.....	82
Abbildung 54: AFM-Abbildung der SOPC-Ni-NTA-DODA-Lipiddoppelschicht mit α -His ₆ -Proteasome.....	83
Abbildung 55: AFM-Abbildung der SOPC-Ni-NTA-DODA-Lipiddoppelschicht mit α -His ₆ -Proteasome.....	84
Abbildung 56: AFM-Abbildungen eines 2D-Kristalls von 20S-Proteasome auf einer Lipiddoppelschicht.....	86
Abbildung 57: Schematische Darstellung der Abscheidung einer Lipidmonoschicht auf HOPG.....	87
Abbildung 58: AFM-Abbildung kleiner 2D-Kristalle von 20S-Proteasome.....	88
Abbildung 59: AFM-Abbildung der „turn“-His ₈ -Proteasome auf Glimmer.....	89
Abbildung 60: Höhenprofil von „turn“-His ₈ -Proteasome auf Glimmer.....	89

Abbildung 61: AFM-Abbildung dimerer SMC-Proteine auf Glimmer.....	91
Abbildung 62: AFM-Abbildung von SMC-Komplexen auf Glimmer.....	92
Abbildung 63: Modell des SMC-Komplexes.....	93
Abbildung 64: Laufdiagramm der Superdex-200-Gelfiltrationssäule bei der GroEL-SR Aufreinigung.	104
Abbildung 65: SDS-Acrylamidgel von GroEL-SR-CS-Komplexen.....	107

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Relative Amplituden der ersten bis fünften Harmonischen bei verschiedenen Dämpfungen.	33
Tabelle 2: Zusammenstellung der Substratproteine nach steigender Monomergröße.....	67
Tabelle 3: Zusammenstellung der Chromatographiesäulen bei der Aufreinigung von GroEL-SR.....	103
Tabelle 4: Zusammenstellung der Elutionsbedingungen bei der Aufreinigung von GroEL-SR.....	103
Tabelle 5: Zusammenstellung der Chromatographiesäulen bei der Aufreinigung von Rubisco.	106
Tabelle 6: Zusammenstellung der Elutionsbedingungen bei der Aufreinigung von GroEL-SR.....	106

 Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
AFM	Rasterkraftmikroskop (,atomic force microscope')
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BSA	Rinderserum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CS	Citratsynthase
d.h.	dass heißt
DNase	Desoxyribonuklease
DODA	N^{α},N^{α} -Bis(carboxymethyl)- N^{ϵ} -[(dioctadecylamino)-succinyl]lysin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FFT	schnelle Fouriertransformation (,fast fourier transformation')
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GuCl	Guanidiniumchlorid
HOPG	hoch orientierter pyrolytischer Graphit
H ₂ O _{MilliQ}	hochreines Wasser
kDa	Kilo-Dalton (1000 Dalton)
Luc	Luciferase
M	molar
MetE	Homocystein-Methyltransferase
mg	Milligramm
min	Minuten
mM	millimolar
MSA	multivariante statistische Analyse
mtMDH	mitochondriale Malatdehydrogenase
ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
NTA	Nitrilotriessigsäure
Nuc	Nukleotid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Rubisco	Ribulosebiphosphat-Carboxylase
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	so genannt
SMC	Chromosominstandhaltung (,structural maintenance of chromosomes')
SOPC	1-Stearoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin
SPM	Rastersondenmikroskopie (,scanning probe microscopy')
SR	'single ring'-Variante des GroEL
SYT	Threonyl-tRNA-Synthetase
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung

1. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung makromolekularer Proteinkomplexe in verschiedenen funktionellen Zuständen. Dies wurde unter Einsatz der Rasterkraftmikroskopie (AFM) verwirklicht, mit der in Flüssigkeit neben der Struktur auch Konformationsänderungen am Einzelmolekül detektiert wurden.

Um die Stabilität der AFM-Abbildung zu verbessern, wurde eine zusätzliche Regelschleife für das Mikroskop entwickelt. Mittels Analyse der höheren Harmonischen der Federbalkenbewegung, insbesondere der zweiten Harmonischen, konnte die Langzeitdrift der Amplitude der freien Schwingung des Balkens, die durch das umgebende Flüssigmedium gestört wird, korrigiert werden. Dies ermöglichte neben der Stabilisierung der Mikroskopie sogar den Austausch der umgebenden Flüssigkeit während der Abbildung, was sehr hilfreich für die Untersuchungen an biologischen Proben war.

Die Arbeit beschreibt rasterkraftmikroskopische Studien an drei verschiedenen makromolekularen Proteinkomplexen, dem Chaperonin GroEL aus *Escherichia coli*, dem 20S-Proteasom aus *Thermoplasma acidophilum* und dem SMC-Protein aus *Bacillus subtilis*.

Bei der Untersuchung des GroEL-Proteins und dessen Substratbindungseigenschaften konnte die Topographie des nativen Proteins bis zur Auflösung der heptameren Struktur abgebildet werden. Eine reproduzierbar gute Abbildung war beim nativen GroEL aber nicht möglich, da der obere der beiden Ringe, die das Protein aufbauen, aufgrund des schwachen Zwischenringkontaktes leicht abgeschert wird. Um die apikalen Bindungsdomänen stabil untersuchen zu können, wurde eine Einzelring-Mutante, GroEL-SR, auf verschiedenen Oberflächenmaterialien in unterschiedlicher Orientierung immobilisiert und abgebildet. Die Mutante adsorbierte analog dem nativen Protein mit den apikalen Domänen auf Glimmer, wodurch Studien an der Äquatorialebene, der normalerweise verborgenen Schnittstelle der beiden Ringe, durchführbar waren. Auf HOPG (hoch orientierter pyrolytischer Graphit) hingegen wurde GroEL-SR über die Äquatorialebene gebunden, was die Untersuchung des GroEL-SR-GroES-Komplexes und der Bindung von Substratproteinen an GroEL-SR ermöglichte. Hierbei konnte gezeigt werden, dass SYT, ein stringentes Substrat, das GroEL zur Faltung benötigt, aufgrund seiner Größe von GroES nicht mehr in der GroEL-SR-Faltungskammer eingekapselt werden kann.

Das 20S-Proteasom aus *Thermoplasma acidophilum* wurde zur Vorbereitung für kraftspektroskopische Messungen der Substratwechselwirkung unter Verwendung verschiedener Methoden in aufrechter Orientierung immobilisiert. Die Affinitätsbindung von His₆-Tag-Mutanten des Proteasom auf NTA-haltigen Lipiddoppel- und Lipideinfachschichten erwies sich aufgrund der höheren Komplexität der Probenbereitung und der Instabilität der Lipidschichten

als nicht vorteilhaft. Die direkte Adsorption einer ‚turn‘-His₈-Mutante auf Glimmer ist die aussichtsreichste Methode zur korrekten Immobilisierung des 20S-Proteasoms.

Das SMC-Protein aus *Bacillus subtilis* wurde sowohl als Dimer als auch im höheren Oligomerisierungszustand im Rasterkraftmikroskop abgebildet. Der beobachtete oligomere Komplex wurde als der eigentlich aktive Komplex bei der Kompaktierung von DNA während der Teilung des Bakteriums interpretiert.

2. Summary

The aim of the present work was to investigate the functional states of macromolecular protein complexes. This was realized using Atomic Force Microscopy (AFM) on single molecules, from which information about both protein structure and conformational changes of proteins within fluids can be obtained.

To improve the stability of AFM-imaging, an additional control loop was developed for the microscope. By analysis of the amplitude of the second harmonic of the cantilever oscillation long term disturbances of the free oscillation amplitude caused by the surrounding liquid can be corrected. In addition to improving the stability of the microscope, this method also allows the surrounding liquid to be exchanged during imaging, which enables the study of biologically interesting specimen.

The present work describes AFM investigations of three different macromolecular protein complexes; the chaperonin GroEL from *Escherichia coli*, the 20S Proteasom from *Thermoplasma acidophilum* and the SMC protein from *Bacillus subtilis*.

When investigating GroEL and its substrate binding properties, the topography of the native protein was resolved to such extent that the heptameric shape of the apical ring was visible. However, reproducible high resolution imaging was not achieved on native GroEL since the upper of the two rings comprising the protein was often removed by imaging forces that were stronger than the relatively weak inter ring contact. In order to investigate the apical binding regions, a single ring mutant, called GroEL-SR, was immobilized and imaged after adsorption to different surface materials in a specific orientation. Analogous to the native protein, the mutant binds to mica via its apical domains. This allows the investigation of the equatorial domains, which build the inter ring interface and are normally hidden. On the other hand, GroEL-SR binds to HOPG (highly oriented pyrolytic graphite) by its equatorial domains, which enables the investigations of substrate binding and the formation of the GroES-GroEL-SR-complex. Furthermore it could be shown that SYT, a stringent substrate, is not encapsulated into the GroEL-SR by GroES. This is due to its size, which is larger than the GroEL folding chamber.

The 20S proteasome from *Thermoplasma acidophilum* was immobilized using different methods for upright orientation in order to prepare atomic force spectroscopy investigations of substrate interactions. Here affinity binding of His₆ tagged mutants of the proteasome on NTA-containing lipidmonolayers and lipidbilayers was employed. However, the disadvantages of the lipid layers created during the more complex sample preparation and

their instability prevailed. Direct adsorption of a ,turn'-His₈ tagged mutant on mica seemed to be the best choice for successful immobilisation of the proteasomes.

The SMC protein from *bacillus subtilis* was imaged in an atomic force microscope both as a single molecule and in a high oligomeric state. The imaged complex was found to be the active complex which compacts DNA during bacterial division.

3. Einleitung

Zu den wichtigsten Zellvorgängen zählen die Synthese und die Faltung von Proteinen sowie deren Abbau. Hierbei ist eine Reihe von makromolekularen Proteinkomplexen involviert. Die Synthese der Aminosäurekette erfolgt am Ribosom. Die Faltung der Kette zum funktionsfähigen Protein übernehmen im Anschluss verschiedene Systeme von Faltungshelfern, sog. ‚Chaperone‘. Werden die Proteine nicht mehr von der Zelle benötigt, unterliegen sie einem Abbauprozess, durch den sie über mehrere Stufen wieder in das Ausgangsmaterial, die Aminosäuren, gespalten werden, die zur erneuten Proteinsynthese zur Verfügung stehen.

Zum Verständnis der Vorgänge innerhalb jeder Zelle ist die Kenntnis der Struktur von Proteinen ein wesentlicher Schritt. Da sie aufgrund ihrer Größe nicht durch Lichtmikroskopie abbildbar sind, mussten andere Methoden der Strukturaufklärung angewendet werden. Neben der Neutronenstreuung, die eher geringe Auflösung liefern kann, haben sich die Elektronenmikroskopie von kontrastierten oder schockgefrorenen Proteinproben und die Röntgenstreuung an Proteinkristallen als Standardtechniken etabliert. Alle Methoden sind jedoch mittelnde Verfahren, d.h. sie können nur Ensembleinformationen der untersuchten Proben gewinnen. Die Information, die ein einzelnes oder wenige Proteine tragen, geht verloren. Zusätzlich sind die Proteine nicht mehr funktionsfähig, das bedeutet, sie können keine weiteren Reaktionen durchführen. Bei der Elektronenmikroskopie wird bei kontrastierten Proben nur der ‚Schatten‘, den die Proteine in der Schwermetalllösung hinterlassen, abgebildet. In Eis eingebettete Proteine sind zu keiner natürlichen ‚Bewegung‘ mehr fähig. Für die Röntgenkristallographie müssen Proteine sogar, wie der Name schon impliziert, kristallisiert, d.h. in eine gleichmäßige Anordnung gezwungen werden, die wahrscheinlich nicht artefaktfrei ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden makromolekulare Proteinkomplexe in verschiedenen funktionellen Zuständen am Einzelmolekül in Lösung untersucht. Als Methode der Wahl wurde die Rasterkraftmikroskopie verwendet, da sie den erwähnten Nachteil der Mittelung bei der Strukturbestimmung von Proteinen vermeidet. Mit dem Rasterkraftmikroskop ist es möglich, Proteinflagen, vollständige Proteine oder Proteinkomplexe topographisch abzubilden. Hierzu müssen die Proben auf einer Oberfläche adsorbiert werden, wobei sie in ihrer natürlichen gepufferten Lösung bei Raumtemperatur verbleiben. Sie sind dadurch in ihrer Funktion nur leicht eingeschränkt. Um Topographieinformation zu gewinnen, wird die präparierte Oberfläche mittels einer sehr scharfen Spitze, die an einem langen Federhebel, dem sog. ‚Cantilever‘ angebracht ist, mechanisch abgetastet.

Neben der statischen Topographie können mit dem Rasterkraftmikroskop noch weitere Informationen über Proteine erhalten werden. Da die untersuchten Proteine immer noch funkti-

onsfähig sind, können ihre Konformationsänderungen, denen sie während ihrer Reaktionen unterliegen, beobachten werden. Hierfür eignen sich am besten Proteine, bei denen während ihrer Aktivität deutliche Variationen in der Form auftreten oder die durch Bindung eines Zusatzproteins eine signifikante Strukturveränderung erfahren.

Der genaue Aufbau eines kommerziellen Rasterkraftmikroskops wird im Kapitel 4 vorgestellt. Um eine stabile Abbildung von empfindlichen Proteinen in Lösung zu ermöglichen, mussten eigene Modifikationen am Rasterkraftmikroskop durchgeführt werden, die in Kapitel 4.2 beschrieben werden.

Im Rahmen der Arbeit wurden drei verschiedene makromolekulare Proteinkomplexe untersucht, das Chaperonin GroEL aus *Escherichia coli*, das 20S-Proteasom aus *Thermoplasma acidophilum* und das SMC-Protein aus *Bacillus subtilis*, deren Aufbau und Funktionsweise in Kapitel 5 vorgestellt werden.

Der Hauptteil der Ergebnisse (Kapitel 6.1) beschäftigt sich mit dem Chaperonin GroEL, einer Faltungsmaschinerie für Proteine, die sowohl als Wildtyp als auch in Form einer Mutante, die nur ein halbes GroEL ausbildet, untersucht wurde. Zusätzlich konnten beide Proteine mit ihrem Cofaktor GroES im Komplex abgebildet werden. Ein weiterer Gegenstand der Arbeit war die Untersuchung der Substratbindung von GroEL.

In Kapitel 6.2 wird die Arbeit am 20S-Proteasom beschrieben. Hierbei ging es insbesondere darum, eine für anschließende kraftspektroskopische Messungen günstige Immobilisierung des 20S-Proteasoms auf der Oberfläche zu realisieren.

Kapitel 6.3 stellt die erste Visualisierung eines SMC-Proteins vor, das in prokaryontischen Zellen für die Packung der DNA zuständig ist. Die Leitfrage hierbei war, ob neben den dimeren Proteinen Mehrfachstrukturen, die bei der zellulären Funktion vermutet werden, auftreten.

4. Rasterkraftmikroskop

Die Rasterkraftmikroskopie gehört zur Gruppe der Rastersondenmikroskopie (Scanning Probe Microscopy, SPM), deren Entwicklung während der 80er und 90er Jahre des letzten Jahrhunderts einen der wichtigsten Fortschritte in der Technologie der Abbildung darstellte. SPM umfasst im Wesentlichen zwei Methoden zur Abbildung von Oberflächen. Man bedient sich eines Tunnelstromes an einer scharfen Spitze beim Rastertunnelmikroskop (Scanning Tunneling Microscope, STM) oder einer weichen Federnadel beim Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscope, AFM), die Veränderungen der Wechselwirkungen mit der Oberfläche wahrnimmt.^[1-3]

Das Rasterkraftmikroskop, das erstmals 1986 beschrieben wurde, liefert Informationen über die Probe durch die Kraftwechselwirkungen der Spitze (AFM-tip) mit der Unterlage.^[2] Neben der Topographie können mit einem AFM auch, je nach Art der verwendeten Spitze, weitere Informationen, wie Oberflächenladungen, Elastizität, Widerstand, Hydrophobie/philie, Plastizität, chemische und magnetische Eigenschaften und andere Charakteristika lokal mit einer Auflösung im Idealfall bis in den Nanometerbereich erhalten werden. Neben der reinen Abbildung ist es mit Hilfe des AFM außerdem möglich, lokal auf Oberflächen oder auf immobilisierte Objekte über direktes mechanisches Kratzen einzuwirken,^[6] oder lokale chemische Reaktionen mit Hilfe modifizierter Spitzen hervorzurufen.^[7] Diese Vielfalt an Informationen machen das AFM zu einem nützlichen Werkzeug in der Festkörperphysik, der Chemie und Oberflächenchemie sowie der Halbleiterphysik und anderen Oberflächen- und Materialwissenschaften, wo es seinen Ursprung hat.^[4]

Rastertunnel- und Rasterkraftmikroskopie konnten erfolgreich auf biologische Proben angewendet werden. Obwohl STM, der direkte Vorgänger von AFM, ein gewisses Anwendungspotential in der Biologie besitzt,^[9] konnte es sich aufgrund des Fehlens einer kompletten Theorie zur Interpretation des Signalkontrastes bei der Abbildung von kleinen, nicht leitenden Molekülen und dem Erfordernis einer leitenden Schicht, die größere nicht leitende Proben umschließt, nicht durchsetzen.^[10-14]

Keine andere Technologie wurde zur Erstellung von Abbildungen so schnell für biologische Fragestellungen aufgegriffen wie AFM. Die Akzeptanz von AFM in der Biologie ist auf eine Zahl von Faktoren zurückzuführen. Mit dem AFM können, im Gegensatz zum Elektronenmikroskop, Abbildungen unter Normaldruck und, noch wichtiger, in Lösung bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Es deckt eine enorme Spanne von Auflösungsbereichen ab, von μm bis sogar nm, und kann für die Untersuchung von nichtkristallinen Proben eingesetzt werden. Zusätzlich können Methoden der Bildverarbeitung angewendet werden.^[8] Nicht zu ver-

nachlässigen ist der Vorteil der relativ niedrigen Anschaffungs- und Unterhaltskosten eines AFM-Instruments im Vergleich zu anderen Mikroskopen.

4.1 Grundlagen und Funktionsweise

4.1.1 Aufbau

Das Rasterkraftmikroskop beruht auf der Messung von Kräften. Die lokale Interaktion der AFM-Spitze mit der Oberfläche wird mit Hilfe eines Kraftarmes (Cantilever) aufgenommen. Auf die Spitze wirken dabei anziehende und abstoßende Kräfte. Diese werden durch die Federkraft des Cantilevers kompensiert, wodurch er aus seiner Ruhelage gebogen wird. Die Größe der Auslenkung wird mittels der Lichtzeigermethode (laser beam deflection) ausgelesen. Dabei wird ein Laserstrahl auf die Rückseite des Cantilevers fokussiert und von dort in einen Photodetektor reflektiert. Eine Höhenänderung der Spitze und die folgende Verbiegung des Cantilevers wird somit in eine Winkeländerung des Laserstrahls umgesetzt. Die Positionsbestimmung des reflektierten Laserstrahls geschieht mittels einer Quadrantenphotodiode. Der Aufbau des AFM und die technische Realisierung des kommerziellen Gerätes, das in dieser Arbeit verwendet wurde, wird im folgenden Schaubild (Abbildung 1) illustriert.

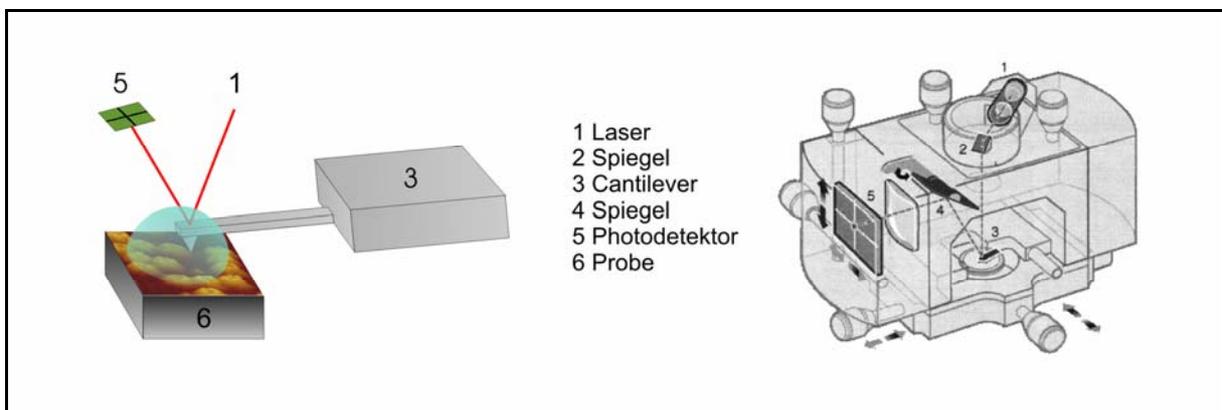


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Rasterkraftmikroskops.

Schematischer Aufbau des AFM (links) und die Realisierung im Messkopf des ‚Multi Mode‘-AFM, Digital Instruments (rechts).^[15]

4.1.2 Rasterbewegung der Probe

Die Bewegung der Probe unter der Spitze erfolgt beim AFM in der Regel durch Piezokeramiken. Diese Piezos sind mikrokristalline Feststoffe, die in Umkehrung des piezoelektrischen Effekts ihre Längenausdehnung bei Anlegen einer elektrischen Spannung ändern. Diese Ausdehnung ist genau dosierbar und in kleinen Maßstäben (Å) möglich.

Ordnet man vier viertelkreisförmige Piezos paarweise so gegenüber an, dass sie einen Kreis bilden, dann kann man durch Anlegungen von Spannungen an die verschiedenen Einheiten eine X- und Y-Bewegung erreichen (Abbildung 2). Die Z-Bewegung wird oft mittels eines zusätzlichen Piezos durchgeführt, der sich auf dem X-Y-Piezo befindet und getrennt angesteuert wird.

Ein Bild entsteht dadurch, dass verschiedene X- und Y-Werte abgefahren werden. Hierbei wird üblicherweise das Rasterverfahren angewendet (daher auch Rastermikroskopie), d.h. der Messbereich wird zeilenweise abgetastet, was in einer schnellen X- und einer langsamen Y-Rasterrichtung resultiert.

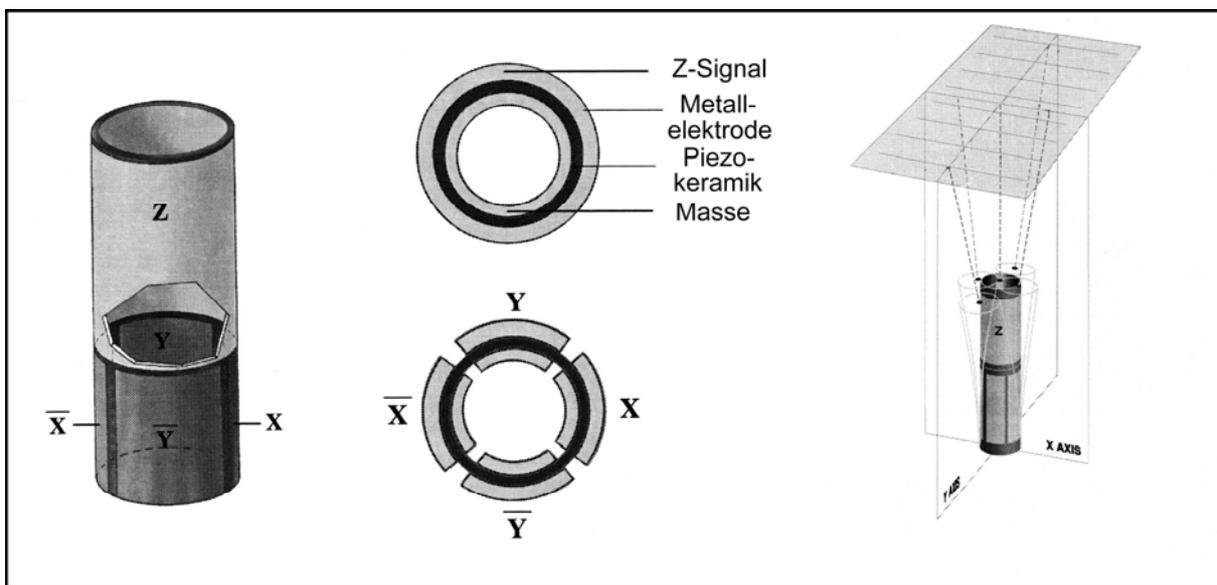


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Rasterbewegung.

Aufbau des Piezoelements (links) und schematische Darstellung zur Entstehung der Rasterbewegung (rechts).^[15]

4.1.3 Betriebsmoden

Um Informationen über Topographie und andere lokale Eigenschaften zu erhalten, kann das Rasterkraftmikroskop in unterschiedlichen Betriebsarten eingesetzt werden. Im Kontakt-Modus befindet sich die AFM-Spitze während der Messung konstant im Kontakt mit der Probenoberfläche. Beim Tapping-Modus[®] („Tapping Mode AFM“ ist ein eingetragenes Warenzeichen von Digital Instruments Co.) wird die Spitze mittels eines zusätzlichen Piezo am Cantilever-Chip nahe der Resonanzfrequenz des Cantilevers zu Oszillationen angeregt. Beim Abbilden der Oberfläche tritt die Spitze periodisch mit der Probenoberfläche in Kontakt.

Konstante-Höhe-Modus

Hält man während der Rasterbewegung die Höhe (Z) der Probe konstant, so ist die Biegung des Kraftarms ein direktes Maß für die Topographie der Probe. Das Signal der Photodiode wird direkt als Bild dargestellt.

Der Vorteil dieser als Konstante-Höhe-Modus (constant height mode) bezeichneten Methode ist, dass keinerlei Regelung notwendig ist, und deshalb schwingungsarm und schnell gerastert werden kann.

Ein Nachteil ist, dass die mit der Spitze ausgeübte Kraft auf die Probe nicht konstant gehalten und unter Umständen sehr groß wird, was Probe und Spitze schädigen kann. Gerade bei biologischen Proben kann die angewandte Kraft kritisch sein.

Konstante-Kraft-Modus

Um den Nachteil des Konstante-Höhe-Modus zu kompensieren, wird beim Konstante-Kraft-Modus das horizontale Auslenkungssignal der Photodiode in einen Regelkreis (PI-Regler) eingespeist. Im PI-Regler (proportionaler und integraler Regler) wird das Regelsignal aus der Differenz zwischen dem Istwert, dem Signal des mit der Probe im Kontakt stehenden ausgeLenkten Cantilevers, und dem Sollwert der Auslenkung, auch Setpoint genannt, erzeugt. Dieses Fehlersignal, die Abweichung von Sollzustand, wird verstärkt auf den Z-Piezo gegeben, so dass dieser die Abweichung ausgleicht. Hierdurch wird erreicht, dass die Auslenkung des Levers über die gesamte Messzeit bei einem festen Wert gehalten wird. Somit wird auch immer eine konstante Kraft auf die Probe ausgeübt, daher auch Konstante-Kraft-Modus (constant force mode). Das Regelsignal entspricht der Höhe der Probe am Messpunkt, aus der die Topographie erhalten wird. Da der Konstante-Höhe-Modus in der Praxis nicht verwendet wird, werden die Ausdrücke ‚Kontakt-Modus‘ und ‚Konstante-Kraft-Modus‘ äquivalent gebraucht.

Tapping-Modus

Beim Tapping-Modus wird der Cantilever, der die Spitze trägt, in der Nähe seiner Eigenfrequenz zu sinusförmigen Oszillationen angeregt. Berührt die Spitze die Probe, wird die Amplitude des schwingenden Cantilever gedämpft. Der Regelkreis wird auf eine konstante Dämpfung eingestellt, das heißt, es wird auf eine Amplitude geregelt, die unter der Amplitude der freien Schwingung liegt. Dies ist die Soll-Amplitude oder Setpoint-Amplitude. Im Endeffekt wird so der Abstand der Spitze zur Probe konstant gehalten, genauer gesagt, der über eine Schwingungsperiode gemittelte Abstand.

Beim Tapping-Modus entstehen wie beim Konstante-Kraft-Modus zwei Bildsignale. Erstens erhält man die dem Regelkreis nachgeführte Höhe der Probe (Höhensignal oder Topographie). Als zweites Signal ergibt sich die nicht ausgeregelte Restmodulation des Amplitudensignals. Dieses ‚Fehlersignal‘ zeigt, wie schnell die Regelung die Soll-Amplitude nach einer Störung wieder einstellen kann und wie groß die Abweichung von der Soll-Amplitude ist.

Da beim Tapping-Modus die Oberfläche nur kurzzeitig senkrecht von oben berührt wird, treten geringere laterale Kräfte auf als im Kontakt-Modus. Diese Eigenschaft macht den Tapping-Modus vor allem für schwach an der Oberfläche haftende Objekte interessant, was bei biologischen Proben meistens der Fall ist. Aus diesem Grund wurde für die Untersuchungen in dieser Arbeit ausschließlich der Tapping-Modus verwendet.

Torsions-Modus

Eine andere Möglichkeit, lokale Informationen über die Probe zu erhalten, verwendet ebenfalls den resonant oszillierenden Cantilever. Hier wird jedoch nicht die senkrechte Schwingungsmode des Kraftarmes angeregt, sondern eine Torsionsmode, d.h. der Arm verwindet sich um seine Längsachse. Beim Kontakt mit der Probe wird diese Torsion ebenfalls gedämpft und die Topographie kann mit diesem Dämpfungssignal nachgefahren werden. Jedoch spricht die Dämpfung nicht für alle Reliefformen und Materialien gleich an, so dass im entstehenden Bild Kanten und Materialübergänge anders betont werden, als dies im Tapping- oder Kontakt-Modus der Fall wäre. Somit ist der Torsions-Modus auch nur für spezielle Fragestellungen wie z.B. Materialübergänge geeignet.

Tapping in Flüssigkeiten

Das Tapping in Flüssigkeiten verhält sich etwas anders als an Luft. Die Schwingung des Cantilevers ist aufgrund des viel dichteren Mediums stark gedämpft. Ebenfalls wird durch den Lever die umgebende Flüssigkeit mitbewegt, wodurch sich die effektive Masse des Levers erhöht. Hierdurch kommt es zu einem Verschieben der Resonanzfrequenz zu viel kleineren Werten als an Luft. Zusätzlich treten konstruktionsbedingte Artefakte auf, da der Chip, der den Cantilever trägt, ebenfalls in Kontakt mit der Flüssigkeit steht und der Lever somit nicht direkt zur Oszillation angeregt werden kann. Die indirekte Anregung über den Leverhalter, in diesem Fall in Form einer Glaszelle realisiert, führt dazu, dass alle Eigenschwingungen des Halters selbst angeregt werden. Dies äußert sich darin, dass im Frequenzspektrum (Abbildung 3) viele Spitzen auftreten. Die wahre Resonanz des Levers liegt unter den Resonanzen des Systems.

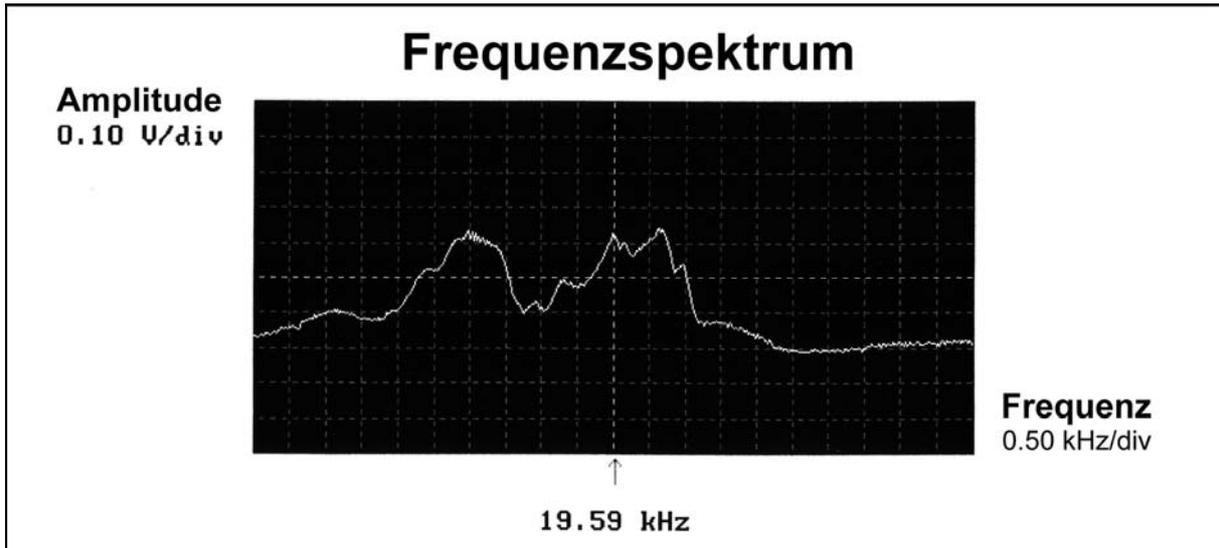


Abbildung 3: Frequenzspektrum.

Das Frequenzspektrum des Cantilevers in Lösung verschwindet unter dem Spektrum der Glaszelle, durch die der Lever gehalten wird.

Um die wahre, gedämpfte Eigenresonanz des Levers zu erhalten, werden Spektren ohne äußere Piezo-Anregung aufgenommen. Hierbei wird auf ein aktives Durchfahren des Frequenzspektrums verzichtet und die thermische Energie als Anregung der schwachen Resonanzschwingung des Levers verwendet.

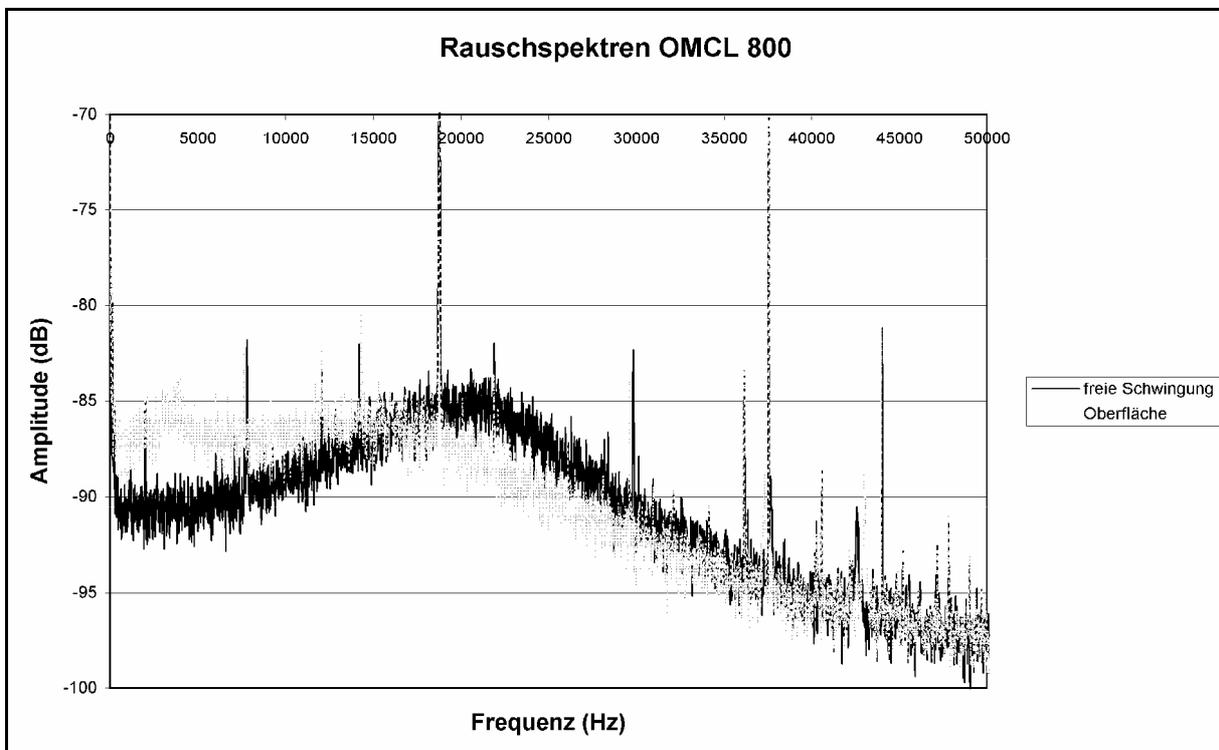


Abbildung 4: Rauschspektren eines OMCL-Cantilevers.

Thermisches Rauschspektrum eines OMCL-Cantilevers in Lösung, frei schwingend (—) und in Kontakt mit der Oberfläche (--).

Diese wird durch die empfindliche Laserdetektion gemessen und mittels geeigneter Elektronik, Rechner und Fouriersoftware bestimmt. Bei genügend langer Messzeit erhält man ein Rauschspektrum wie in Abbildung 4 (freie Schwingung), aus dem die breite Grundfrequenz abgelesen und somit eine geeignete Anregungsfrequenz bestimmt werden kann. Es ist jedoch zu bedenken, dass aufgrund hydrodynamischer Prozesse die Resonanz des Cantilevers beim Annähern an die Probenoberfläche leicht zu kleineren Frequenzen wandert, bevor der Lever direkt in Kontakt mit der Probe kommt. So liegt die freie Resonanz bei den verwendeten OMCL 800-Cantilevern in Lösung bei ca. 22 kHz, in Kontakt mit der Oberfläche aber unter 20 kHz. Der Resonanzpeak ist in Kontakt mit der Oberfläche kaum noch als solcher zu erkennen (Abbildung 4, Oberfläche).

Phasensignal

Durch die Berührung der Spitze mit der Unterlage wird nicht nur die Amplitude gedämpft, sondern es kommt auch zu einer Phasenverschiebung der Tapping-Bewegung relativ zur Anregung. Dieses Phasensignal kann über einen Lock-In-Verstärker neben dem Amplitudensignal aufgenommen werden.^[17] Alternativ kann dieses auch unter Ausnutzung des hohen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses mit einfachen Mitteln zeitlich hoch aufgelöst gemessen werden.^[18] Beide Fälle ermöglichen, dass das Phasensignal neben dem Topographiesignal detektiert und als Bild ausgegeben werden kann. Obwohl viele verschiedene Konzepte des Tapping-Modus-AFM veröffentlicht wurden, bleibt die Interpretation des Phasenbildes schwierig.^[19]

4.1.4 Regelung

Eine Abweichung der über die Quadrantendiode gemessenen Auslenkung des Levers von der Sollwert-(Setpoint)-Ablenkung (im Kontakt-Modus die direkte Ablenkung, im Tapping-Modus die Amplitude) wird von der Regelung über den Z-Piezo über eine Abstandsänderung von der Spitze zur Oberfläche nachgeregelt (Abbildung 5).

Der Regelkreis für das Nachfahren der Topographie kann jedoch wegen der intrinsischen Phasenverschiebungen einiger seiner Bauteile, wie z.B. der Elektronik, der Piezos, usw. nicht perfekt funktionieren.^[16] Stellt man die Regelungsverstärkung zu groß ein, so kommt es zu Schwingungen des Systems, wodurch die Abbildung stark eingeschränkt oder sogar unmöglich wird. In der Praxis wird der Regelkreis so schnell eingestellt, dass gerade noch keine Schwingungen auftreten, Fehler aber noch schnell ausgeregelt werden, um Beschädigungen der Spitze und der Probe zu vermeiden. Ein kritischer Parameter ist hierbei unter anderen die Scangeschwindigkeit, da schnelleres Rastern größere Regelfehler zur Folge hat. Um Re-

gelabweichungen und Fehler in der gemessenen Topographie zu verhindern, muss sie eventuell reduziert werden.

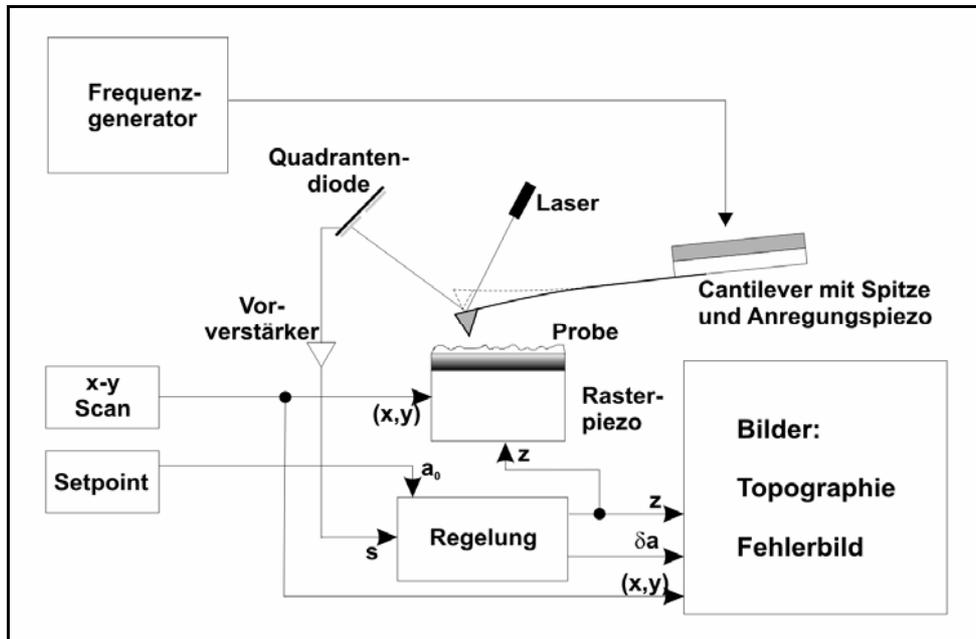


Abbildung 5: Schaltbild des AFM-Regelkreises.

Das Schaltbild des AFM-Regelkreises fasst die Messung der Topographie einer Probe zusammen. Über die Quadrantendiode wird die Auslenkung des Levers (Kontakt-Modus) bzw. die Amplitude seiner Oszillation (Tapping-Modus) bei dessen Interaktion mit der Probe gemessen. Über den Vergleich des Soll- mit dem Istwert korrigiert die Regelungseinheit die Position des Z-Piezos.

4.1.5 Kräfte

Die Informationsträger bei der Rasterkraftmikroskopie sind Wechselwirkungskräfte zwischen Spitze und Probe. Ein Verständnis der auftretenden Kräfte erlaubt eine Abschätzung, inwieweit die auf die Probe ausgeübte Kraft die erhaltenen Informationen beeinflusst. Darüber hinaus können über die Kräfte auch nichttopographische Eigenschaften der Probe untersucht werden, wie z.B. die Elastizität, die Plastizität und der Ladungszustand. Im Weiteren soll ein kurzer Überblick über die physikalischen Eigenschaften der hier auftretenden Kräfte gegeben werden.^[20]

Cantileverkraft

Die Auslenkung des Cantilevers erfolgt nach dem Hook'schen Gesetz, nach dem die auf den Cantilever wirkende Kraft proportional zu seiner Auslenkung aus der Ruhelage ist:

$$F_C = -k_C \Delta s_C$$

mit: F_C Kraft auf den Cantilever
 k_C Federkonstante des Cantilevers
 Δs_C Auslenkung des Cantilevers aus der Ruhelage

Deformation der Probe

Beim Abbilden drückt die Spitze elastisch in die Probe. Diese Deformation kann nach dem Hertz-Modell beschrieben werden. Für eine Kugel mit dem Radius R und der Auflagekraft F auf eine ebene Oberfläche bildet sich ein kreisförmiger Kontakt mit der Fläche S :

$$S^{3/2} = \pi^{3/2} \frac{RF_{\text{Hertz}}}{E^*} \quad \text{mit} \quad \frac{1}{E^*} = \frac{3\pi^2}{4} \left[\frac{1-\nu_1^2}{E_1} + \frac{1-\nu_2^2}{E_2} \right]$$

mit: E^* Effektives Elastizitätsmodul des Kontaktes
 E_i Young'scher Modulus des Körpers i
 ν_i Poisson-Zahl des Körpers i ($\nu \leq 1/2$)

4.1.6 Kurz- und langreichweitige Kräfte

Kurz- und langreichweitige Kräfte werden gemeinsam durch das Lennard-Jones-Potential zusammengefasst, das das Potential zwischen zwei punktförmigen Objekten im Abstand D voneinander beschreibt:

$$U_{LJ} = \frac{k_1}{D^{12}} + \frac{k_2}{D^6}$$

Die Einfachheit der Gleichung begründet ihre häufige Verwendung zur qualitativen Beschreibung von Interaktionen.

Bei der direkten Interaktion der Spitze mit der Probe überwiegen die kurzreichweitigen Kräfte, vor allem die Pauliabstoßung, welche durch den D^{12} -Term des Lennard-Jones-Potentials beschrieben wird. Die langreichweitigeren Van-der-Waals-Kräfte werden durch den D^6 -Term des Lennard-Jones-Potentials ausgedrückt und setzen sich aus den Wechselwirkungskräften permanenter oder induzierter Dipole zusammen. Je nach Geometrie ergibt sich ein anderes Abstandsgesetz.

Für zwei unendlich ausgedehnte Flächen in einem Medium kann man die Van-der-Waals-Kräfte nach Israelachvili folgendermaßen beschreiben:^[21]

$$F_{vdw} = \frac{-H}{6D^3\pi}$$

mit: F_{vdw} Van-der-Waals-Kraft
 H Hamaker-Konstante
 Materialkonstante, z.B. für Glimmeroberflächen in reinem Wasser $8,3 \cdot 10^{-21}$ J

Beim Arbeiten in Luft bildet sich aufgrund der allgegenwärtigen Oberflächenfeuchtigkeit zwischen Spitze und Probe ein Wassermeniskus aus. Dieser verursacht eine auf die Spitze wirkende Kapillarkraft F_{kap} der Form:

$$F_{kap} = \gamma_{lg} (x_0 - r)^2 \left[\frac{1}{-r} + \frac{1}{x_0 - r} \right]$$

mit: γ_{lg} Oberflächenenergie (Materialkonstante)
 r Krümmungsradius des Meniskus
 x_0 Krümmungsmittelpunkts des Meniskus

In den meisten Fällen gilt $r < x_0 - r$, d.h. der Meniskus ist konvex und die Kapillarkraft wirkt attraktiv. Für im Rasterkraftmikroskop übliche Bedingungen (rel. Luftfeuchtigkeit 50%, vollständige Benetzbarkeit bei 72.5 N/m Oberflächenenergie und 20 nm Spitzenradius) wurden rund -5 nN Kapillarkraft bei 2 nm Abstand zwischen Spitze und Probe berechnet, ein Mehrfaches der Van-der-Waals-Kraft im selben Abstand.^[22]

Eine zusätzliche langreichweitige Kraft, die vor allem bei Abbildungen in Lösung eine große Rolle spielt, ist die elektrostatische Kraft. Sie besteht zwischen zwei geladenen Partikeln und wird durch das Coulomb'sche Gesetz beschrieben:

$$\vec{F}_C = \frac{q_1 q_2}{4d^2 \pi \epsilon_r \epsilon_0} \frac{\vec{d}}{d}$$

mit: F_C Coulomb'sche Anziehungskraft
 q Ladungen der Partikel
 d Abstand der Partikel
 \vec{d} Richtungsvektor des Partikelabstands
 ϵ_r Dielektrizitätszahl
 ϵ_0 Dielektrizitätskonstante des Vakuums

In Flüssigkeiten dominieren die Kräfte der Ionen an der Probenoberfläche und an der Oberfläche des Cantilevers. Diese Ladungen werden durch das Wasser und die gelösten Ionen des Puffers abgeschirmt.

Nach Butt kann für eine Spitze gegenüber einer Fläche im Elektrolyten folgende Näherungsformel für die elektrostatische Kraft verwendet werden:^[23]

$$F = \frac{\pi\sigma^2}{\varepsilon_r\varepsilon_0\kappa^2} g e^{-2\kappa D}$$

mit: ε_r Dielektrizitätszahl
 ε_0 Dielektrizitätskonstante des Vakuums
 F elektrostatische Kraft
 σ Schichtdicke
 D Abstand der Spitze zur Oberfläche
 g Geometriefaktor:
für einen spitz zulaufenden Konus mit Öffnungswinkel α : $g = \tan^2\alpha$
für einen Konus mit Spitzenradius $R > 1/\kappa$: $g = 2\kappa R$

Dabei ist $1/\kappa$ die so genannte Debye-Länge, welche ein Maß für die Dicke der diffusen Ionen-doppelschicht an einer Oberfläche ist und somit den Wirkungsbereich der Oberflächenladungen angibt, und nur von der Art der Elektrolyten abhängt:

$$\frac{1}{\kappa} = \sqrt{\frac{\varepsilon_r\varepsilon_0kT}{2N_A e^2 I}} \quad \text{und} \quad I = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 c_i .$$

mit: ε_r Dielektrizitätszahl
 ε_0 Dielektrizitätskonstante des Vakuums
 e Einheitsladung
 T Temperatur
 k Boltzmann-Konstante
 N_A Avogadro-Konstante
 i Anzahl der Ionensorten
 I Ionenstärke
 z_i Valenz der Ionen
 c_i molare Konzentrationen der Elektrolyte

Bei 25°C beträgt die Debye-Länge für Elektrolytlösungen (in nm):

$$\frac{1}{\kappa} = K \frac{1}{\sqrt{c}}$$

mit:	c	Konzentration des Elektrolyten	
	K	Konstante, für monovalente Elektrolyten (1:1) wie NaCl oder KCl:	0,354
		für divalente Elektrolyten (2:1, 1:2) wie MgCl ₂ oder NaSO ₄ :	0,152
		für divalente Elektrolyten (2:2) wie MgSO ₄ :	0,176

Ist die Debye-Länge in destilliertem Wasser noch ca. 960 nm, liegt sie für typische Puffer (ca. 150 mM NaCl) schon unter 1 nm.

4.1.6.1 Kräfte beim Tapping

Die Verhältnisse beim Tapping-Modus lassen sich nicht so einfach wie beim Kontakt-Modus diskutieren, bei dem die Kräfte in erster Näherung konstant sind. Beim Tapping bewegt sich die Spitze durch einen großen Potentialbereich. Die beste Art, die Kräfte zu beschreiben, besteht darin, die Bewegungsgleichung für die Spitze aufzustellen und zu lösen, wobei hier die Schwingung des Cantilevers auf seine erste Grundmode beschränkt werden soll. Sie lautet:

$$m\ddot{z} + \alpha\dot{z} + k_c z + F(z) = F_0 \sin(\omega t)$$

mit:	z	Abstand der Spitze von der Probe
	\dot{z} , \ddot{z}	erste und zweite Ableitungen des Abstands nach der Zeit
	k _c	Federkonstante des Cantilevers
	m	effektive Masse des Cantilevers
	α	Dämpfungskonstante
	F ₀	Amplitude der angeregten Schwingung
	ω	Frequenz der angeregten Schwingung.

F(z) ist die Summe aller auf die Spitze wirkenden Kräfte. Da F(z) nichtlinear in z ist, lässt sich diese Gleichung nicht analytisch lösen. Es gibt Ansätze zur numerischen oder Näherungen zur analytischen Lösung.^[24,25] Qualitativ lässt sich aus diesen Rechnungen folgern, dass die vertikalen Kräfte in der Größenordnung der Kräfte des Kontakt-Modus liegen, die lateralen Kräfte auf die Probe im Vergleich aber deutlich verringert sind.

Ein anderer Ansatz zur feineren Zeitauflösung der Kräfte liegt in der Interpretation des Reflexionssignals, das alle Informationen über die Art und die zeitlichen Effekte der wirkenden

Kräfte trägt.^[26] Aus diesen Untersuchungen wird deutlich, dass neben den bekannten, geringen mittleren Kräften hohe Kraftspitzen kurzer Dauer auftreten können.

4.1.7 Annäherungskurven

Kontakt-Modus

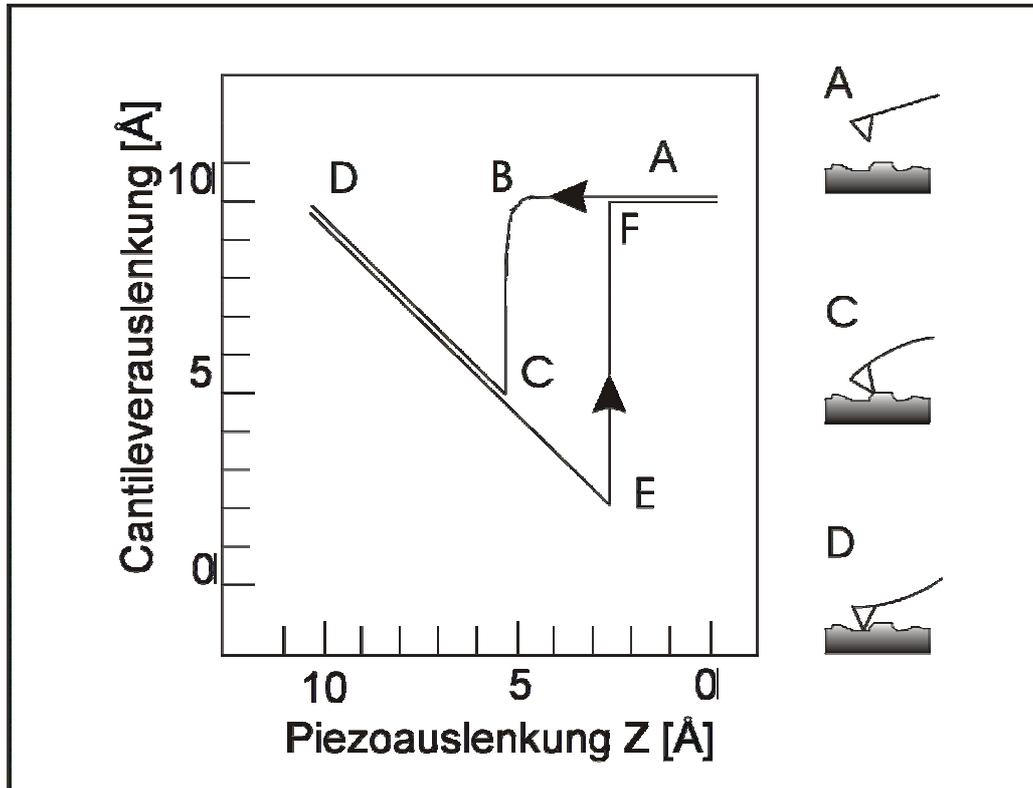


Abbildung 6: Theoretische Kraft-Distanz-Kurve (Annäherungskurve) eines Cantilevers an eine Oberfläche.

Bei der Annäherung des entspannten Levers an die Oberfläche (A) kommt es ab einem bestimmten Punkt (B) zu attraktiven Wechselwirkung mit der Oberfläche, wodurch der Lever leicht angezogen und zur Oberfläche hingebogen wird (B) und schließlich abrupt in den Kontakt (C) übergeht. Weiteres Annähern lässt den Lever in die entgegengesetzte Richtung durchbiegen (D). Auf dem Rückweg kommt es aufgrund von Adhäsionskräften zu einer Hysterese, bis die Rückstellkraft des Levers überwiegt und er von der Oberfläche abreißt (E) und in die Ausgangslage (A) zurückkehrt.

Informationen über die auf den Lever wirkenden Kräfte können im Kontakt-Modus aus der Kraft-Distanz-Kurve erhalten werden (Annäherungskurve, Abbildung 6). Dazu wird der Z-Abstand zwischen Probe und Spitze variiert, so dass die Messspitze aus ihrer Ruheposition in Kontakt mit der Probe kommt, dann etwas gegen die Probe gedrückt wird, um schließlich in die Ruheposition zurückgezogen zu werden. Die dabei auftretende Auslenkung des Kraftarmes (Δs_c) wird aufgezeichnet. Man erhält eine Kurve der Auslenkung des Cantilevers in Abhängigkeit der Piezoauslenkung (Z). Die Verbiegung des Levers kann in einen Wert für die aufgewendete Kraft umgerechnet werden, wenn dessen Federkonstante bekannt ist.

Für die in Abbildung 6 gezeigte theoretische Kurve ergibt sich folgende Beschreibung der Vorgänge für das Arbeiten an Luft:

Beim Annähern (A) bleibt die Auslenkung des Levers konstant, bis er knapp über der Oberfläche eine in diesem Fall anziehende Kraft erfährt (B) und zum Kontakt (C) gezogen wird. Bei weiterer Annäherung wird der Lever erst wieder entspannt und im weiteren Verlauf durchgedrückt (D). Hierbei steigt die ausgeübte Kraft gleichmäßig an. Beim Rückweg folgt der Entspannung des Levers ein Anhaften der Spitze aufgrund von Adhäsionskräften. Überwiegt bei weiterer Entfernung des Levers dessen Zugkraft die Adhäsion, löst sich der Lever von der Oberfläche (E) und kehrt zurück in die Ruhestellung (A).

Beim Arbeiten in Flüssigkeiten kann sich der Verlauf etwas ändern. In Lösung fällt die Menskuskraft, die aufgrund des allgegenwärtigen Feuchtigkeitsfilmes auf den Oberflächen auftritt, weg. Andererseits können vor allem in Lösungen mit niedrigem Salzgehalt Oberflächenladungen der verschiedenen Spitzen- und Probenmaterialien starke Coulomb-Wechselwirkungen verursachen, die so weitreichend sind, dass der Lever beim Annähern schon im zweistelligen Nanometerbereich eine detektierbare Auslenkung hin oder weg von der Probe erfahren kann.

Kraftkurven

In der Rasterkraftspektroskopie wird die Eigenschaft des Cantilever als empfindlicher Kraftsensor verwendet. Es werden, wie oben beschrieben, Kraft-Distanz-Kurven aufgenommen. Allerdings wird möglichst kurz nach dem Spitze-Probe-Kontakt die Abwärtsbewegung gestoppt, um die Eindrückkräfte der Spitze auf die Probe gering zu halten.

Beim Zurückziehen wird der Cantilever entsprechend der Kraft, mit der er an der Probe zurückgehalten wird, ausgelenkt und diese über den Laserzeiger präzise detektiert. Überschreitet die Auslenkkraft die Haftkraft, reißt die Verbindung und der Lever kehrt in seine Ruhelage zurück. Es wird also immer das Maximum der Haftkraft bestimmt.

Mit dieser Methode können spezifische biologische Fragen beantwortet werden. So lassen sich Bindungskräfte von Antikörpern an Proteinen, die nötige Kraft, ein Membranprotein aus der Membran zu entfernen oder Adhäsionskräfte einzelner Proteine im gemeinsamen Komplex bestimmen. Hierzu müssen die Spitze und die Probe entsprechend präpariert werden, so dass während der Kraft-Distanz-Kurve beim Kontakt der Spitze mit der Oberfläche die zu untersuchende Wechselwirkung auf beiden Seiten ‚eingespannt‘, und beim Rückzug durch die Rückstellkraft des Levers bis zum Abriss beansprucht wird. Natürlich muss hierbei gewährleistet sein, dass die zu untersuchende Kraftwechselwirkung schwächer als die Immobilisie-

nung an der Oberfläche und der Spitze ist. Über Variationen der Zuggeschwindigkeit können die genauen Bindungskonstanten dieser Wechselwirkungen bestimmt werden.

Tapping-Modus

Analog obigem Zyklus kann eine Kraftkurve auch im Tapping-Modus aufgenommen werden.

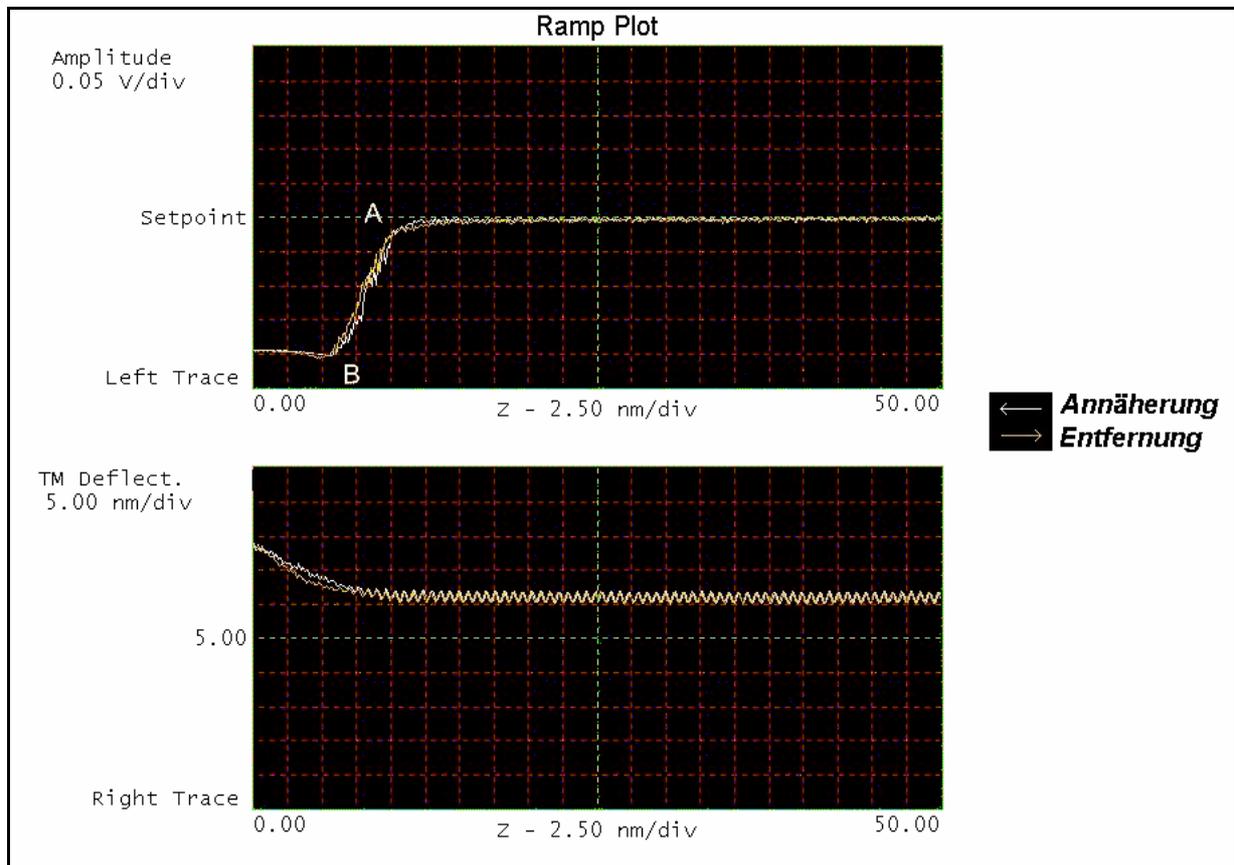


Abbildung 7: Kraftkurve im Tapping-Modus („Ramp Plot“) in Flüssigkeit.

Bei der Kraftkurve in Flüssigkeiten wird die Amplitude (oben) und die Leververbiegung (TM-Deflection, unten) aufgezeichnet. Bei Annäherung tritt der oszillierende Lever in bei Kontakt mit der Probe (A), bis die Oszillation zum Stillstand kommt (B). Weitere Annäherung lenkt den Lever weiter aus (TM-Deflection).

Hier wird neben der mittleren Auslenkung des Cantilevers (TM-Deflektion, untere Kurve) vor allem auch die Amplitude der Schwingung des Levers (obere Kurve) während des Annäherns an die Probe verfolgt. Diese nimmt fast linear von der freien Schwingung (A) bis zum schwingungslosen Zustand (B) ab. Währenddessen bleibt die Deflektion idealer Weise unverändert. Erst bei der absoluten Dämpfung der Schwingung wird der Lever linear mit der weiteren Annäherung abgebogen, was sich in einem geraden Anstieg der Deflektion äußert. Beim Rückziehen werden diese Stationen wieder rückwärts durchlaufen, wobei oft auch eine kleine Hysterese bei der Amplitude aufgrund von Adhäsionskräfte auftritt, die ein verspätetes ‚Anspringen‘ der Schwingung bewirkt.

In Flüssigkeiten wird häufig ein Abnehmen der Amplitude beim makroskopischen Annähern an die Oberfläche beobachtet, bevor die Amplitude durch den Kontakt gedämpft wird. Dies wird eventuell durch ein verändertes Anregungsverhalten durch die Lösung in der Nähe der Oberfläche oder durch einen hydrodynamischen Effekt, der die Schwingung des Levers in der Nähe der Oberfläche behindert, verursacht.

4.1.8 Spitzen

Neben den durch den Setpoint definierten Kräften hat beim AFM besonders die Spitze eine große Auswirkung auf die Qualität und Stabilität der Abbildung. Ideal wäre eine punktförmige Spitze ohne laterale Ausdehnung und mit unendlicher Schlankheit. Nur mit dieser könnte man alle Oberflächenstrukturen mit scharfen Kanten und Vertiefungen beliebig gut abbilden. Reale Spitzen besitzen jedoch eine endliche Ausdehnung, die üblicherweise mit dem Spitzenradius R und dem Öffnungswinkel α beschrieben wird.

Die Werte hierfür sind von den verwendeten Spitzen abhängig, so sind für kommerzielle Pyramidenspitzen aus Siliziumnitrid (Abbildung 8 a, b) 10-20 nm für den Spitzenradius und 25-45° für den Öffnungswinkel die Regel (Datenblatt OMCL 800, Olympus Inc.).

Schärfer sind so genannte „Oxide-sharpened“ Spitzen, die meist aus Silizium bestehen. Bei diesen wurde die Oberfläche erst zu Siliziumoxid oxidiert, das anschließend mittels Fluorwasserstoff weggeätzt wird. Hierdurch bleibt bei der Wahl geeigneter Bedingungen eine schärfere Spitze zurück. Die Abbildung 8 (c) zeigt z.B. eine transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme (TEM) einer so genannten ‚Super Sharp Silicon‘-Spitze der Firma Nanosensors, die Kurvenradien von deutlich unter 5 nm erreicht (vgl. Abbildung 8 d).

Noch schlanker sind so genannte EBD-Spitzen (electron beam deposited), die mittels eines Elektronenstrahls auf herkömmliche Spitzen aufgewachsen werden. Diese besitzen nach verschiedenen Schärfprozessen einen Spitzenradius von bis zu 2-5 nm und einen Öffnungswinkel von weniger als 2,5°.

Schließlich gibt es noch Spitzen, bei denen auf eine normale AFM-Spitze mittels patentierter Verfahren sog. ‚Whisker‘, also Faserspitzen, aufgewachsen werden. Dieses Verfahren führt meist nicht zu einer dominanten Spitze, sondern zu mehreren in etwa gleich langen Spitzenfortsätzen. Solche Spitzen sind nur für extrem flache Proben geeignet, bei denen die kürzeren Fortsätze nicht mit der Probe in Kontakt kommen (vgl. Abbildung 8 e).

Durch ihre endliche Ausdehnung hat die Spitzenform einen Einfluss auf das Abbild der Probe. Das erhaltene Bild in der Rastersondenmikroskopie ist eine Überlagerung der Form der Spitze mit der Topographie der Probe (sog. tip convolution, Abbildung 9).

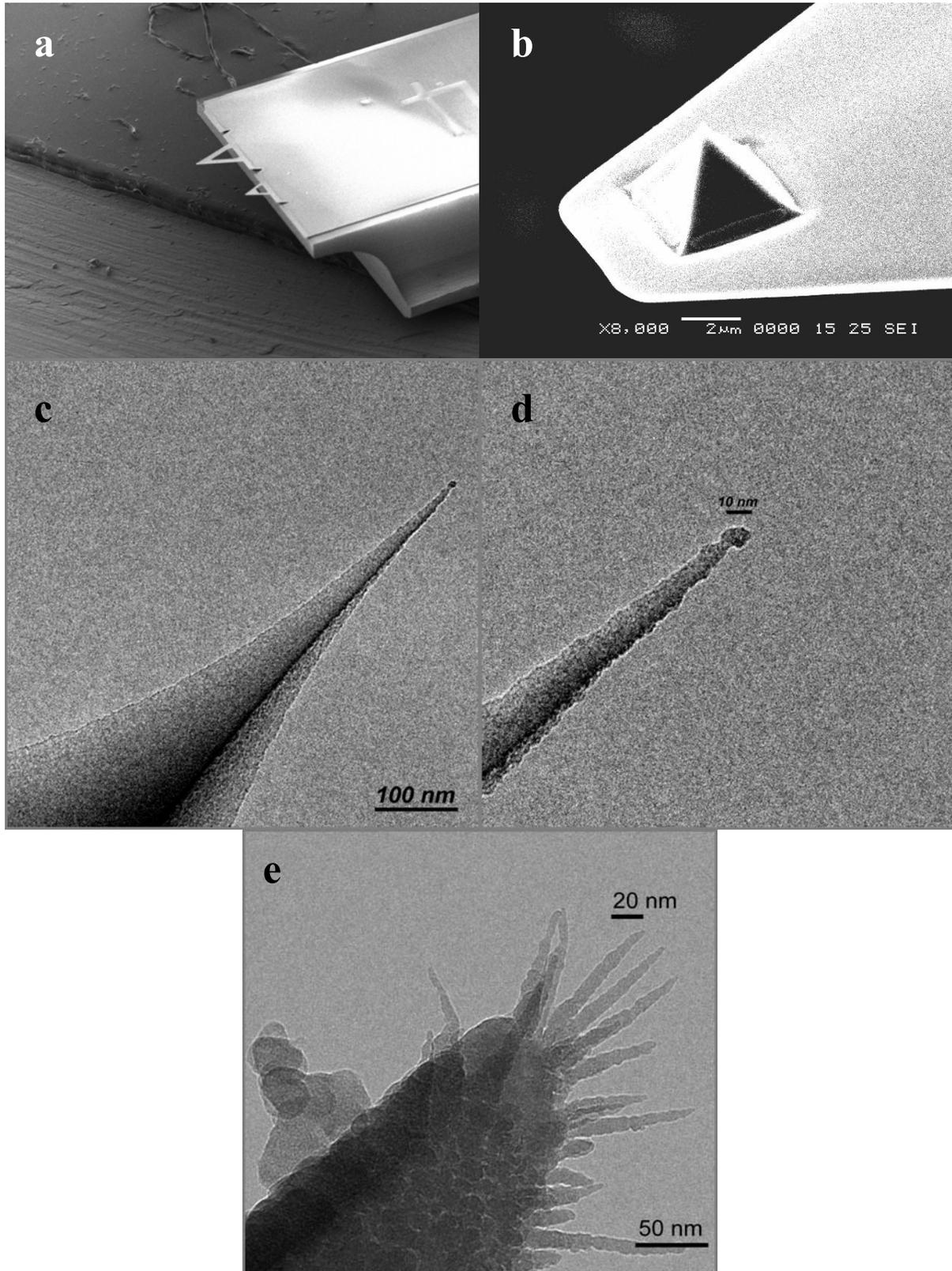


Abbildung 8: Elektronenmikrographen verschiedener AFM-Spitzen.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (SEM) eines OMCL-Cantilevers (a,b); Transmissionselektronische Aufnahmen (TEM) einer ‚Super Sharp Silicon‘-AFM-Spitze (c,d) und einer ‚Whisker-type‘-AFM-Spitze (e).

Die Verfälschungen der Oberflächenstruktur der Proben durch die Spitze bezeichnet man als Spitzenartefakte, was in Abbildung 10 deutlich zu erkennen ist.

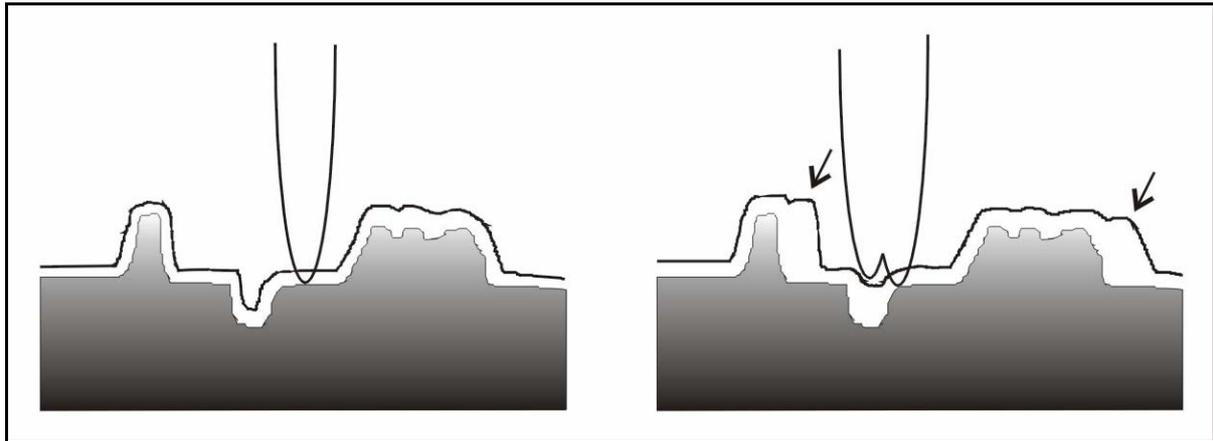


Abbildung 9: Schema vom ‚tip convolution‘-Artefakt einer realen Spitze.
 Bedingt durch die Spitzenform wird die gemessene Topographie verfälscht.

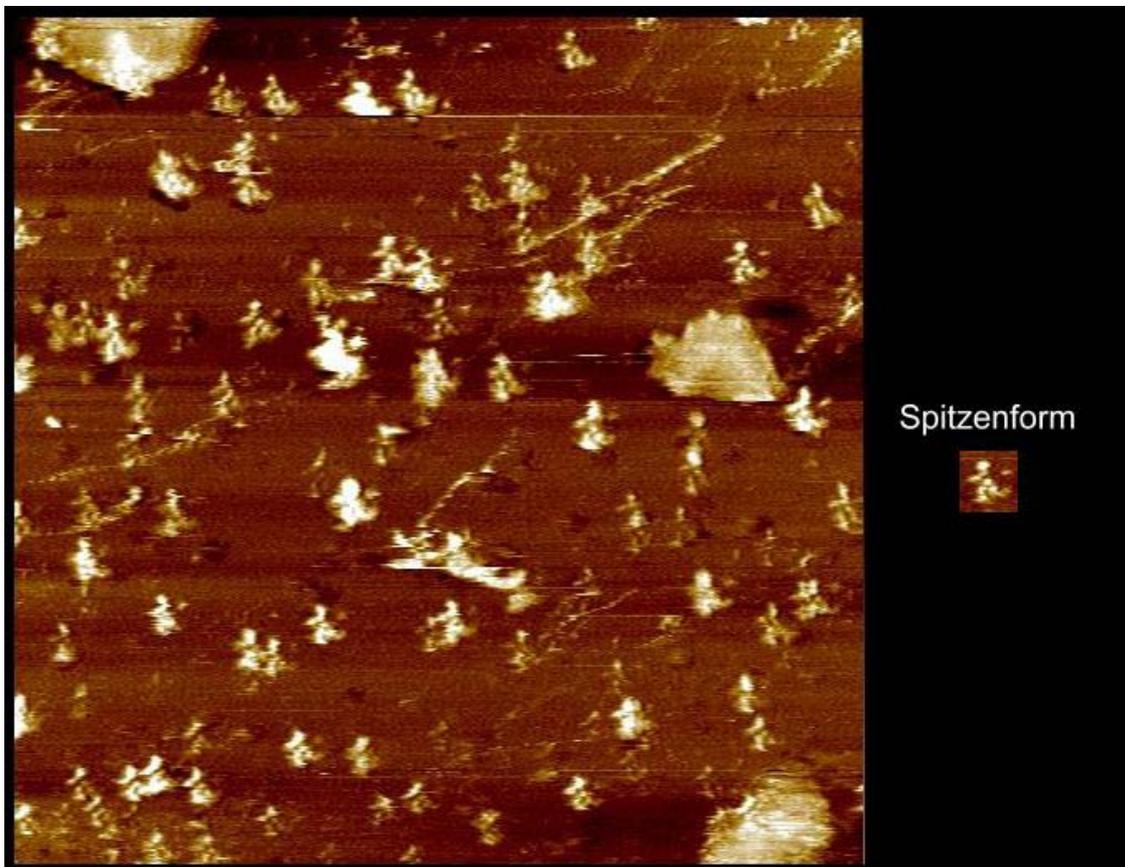


Abbildung 10: AFM-Abbildung mit Spitzenartefakten.

Die Spitzenform (siehe rechts) bildet sich mehrfach mit der selben Orientierung in der Topographie ab (links).

Durch Adsorption von Teilen der Probe an die Spitze können sich die Form und die chemischen Eigenschaften der Spitze und damit die Wechselwirkungen mit der Probe verändern. Ebenso kann ein Teil der Probe an der Spitze haften bleiben oder der vorderste Spitzenteil abbrechen, wodurch sich die Form der Spitze meistens zum Nachteil verändert. Dies kann bei

jeder Probe vorkommen, ein Abbrechen ist aber bei harten und ein Aufsammeln von Verunreinigungen bei weichen, organischen Proben wahrscheinlicher.

4.2 Automatische Regelung des Amplituden-Setpoints

4.2.1 Problemstellung

Das größte Problem bei der Erstellung guter Abbildungen biologischer Proben in Lösung sind die auftretenden Driften. Ungleichgewichte des chemischen Potentials zwischen Luft und Pufferlösung verursachen Verdunstungseffekte und somit Salzgradienten. Mit Variation der Temperatur ändert sich ebenfalls die Viskosität des die Spitze umgebenden Mediums. Dies alles hat zur Folge, dass sich die Verhältnisse der freien Schwingung des Cantilevers beim Tapping auch nach längerem Äquilibrieren der Apparatur nicht absolut stabilisieren. Auf der anderen Seite sind die Abbildungen von Proteinen in Lösung extrem empfindlich gegenüber Kräften, die immer am Minimum gehalten werden müssen, so dass gerade noch abgebildet werden kann. Dies bedeutet, dass der optimale Setpoint, der Sollwert der geregelten Amplitude, die sich während der Abbildung ständig ändert, immer wieder nachgeregelt werden muss. Von der Software des verwendeten kommerziellen AFM ist dies nur per Tastatureingabe eines numerischen Wertes möglich, was einen Sprung in der Abbildung aufgrund der schlagartig veränderten Bedingungen zur Folge haben kann. Zudem muss das Ergebnis der manuellen Korrektur an der Qualität des anschließend erhaltenen Bildes eingeschätzt und unter Umständen nachkorrigiert werden (Abbildung 11, links).

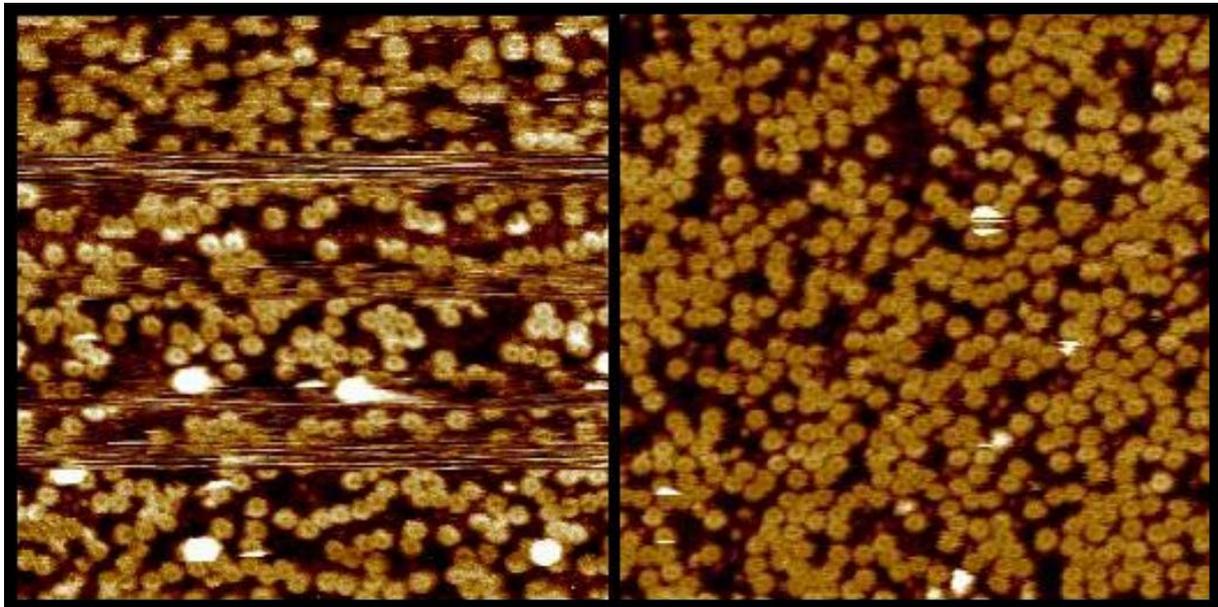


Abbildung 11: Effekt der automatischen Regelung des Amplituden-Setpoint auf die Abbildungsqualität.

Links: AFM-Abbildung von GroEL-SR mit starker Drift und entsprechenden Sprüngen durch das manuelle Nachkorrigieren; rechts: AFM-Abbildung wurde mit automatischer Regelung aufgenommen; beide 500x500 nm².

4.2.2 Lösungsansatz

Das verwendete kommerzielle Mikroskop bietet die Möglichkeit, mittels einer Signalschnittstelle (breakout box) einige Steuersignale und Werte in Form von Spannungen abzugreifen, elektronisch zu manipulieren, und wieder einzuspeisen, so dass diese vom Gerät zur Abbildung genutzt werden.

Auf diese Weise wurde im ersten Schritt eine Zwischenelektronik konstruiert, die das Setpoint-Signal manuell über einen Drehregler, ein Potentiometer, verändert. Hiermit ist es möglich, während der Abbildung die Nachregelung feiner und gleichmäßiger als mittels Tastatureingabe durchzuführen. Einen genauen Anhaltspunkt zur Regelung liefern aber immer noch nur das Auge und die Erfahrung. Eine Quantifizierung der Driftabweichung ist noch nicht möglich.

Aus Untersuchungen der Cantileverbewegung bei der AFM-Messung an Luft war bekannt, dass bestimmte Änderungen des Amplitudensignals während der Abbildung auftreten.^[27] Der Cantilever wird beim Tapping zu Oszillationen nahe seiner Resonanzfrequenz angeregt. Aufgrund des nichtlinearen Wechselwirkungspotentials in der Nähe und beim Kontakt zur Oberfläche wird die Bewegung der Levers anharmonisch, die Anteile höherer Harmonischer der Schwingungsgrundfrequenz nehmen zu. Die Anregung höherer Moden, wie an Luft beobachtet wird, treten in Flüssigkeiten aufgrund der starken Dämpfung kaum auf.^[27]

Während einiger Abbildungen zeigte sich im Auslenkungssignal des Levers ein direkter Zusammenhang im Verhältnis der Amplitude der ersten und zweiten Harmonischen der Anregungsfrequenz und der aus der Qualität der Abbildung bestimmten Driftkorrektur. Eine Veränderung des Setpoints während der Abbildung äußerte sich in einem entsprechenden Anstieg oder Abnahme der Anteile der zweiten Harmonischen der Leverbewegung.

Dieser lineare Zusammenhang wurde genutzt, um mittels Eigenbauelektronik eine zusätzliche Regelschleife zu konstruieren (Abbildung 13). Diese regelt analog dem Potentiometer in obiger manueller Ausführung den Setpoint so nach, dass die Amplitude der zweiten Harmonischen der Grundoszillation des Cantilevers auf einem festen, justierbaren Wert gehalten wird. Somit bleibt die Wechselwirkung der Spitze mit der Oberfläche im Zeilenmittel immer in derselben Größenordnung.

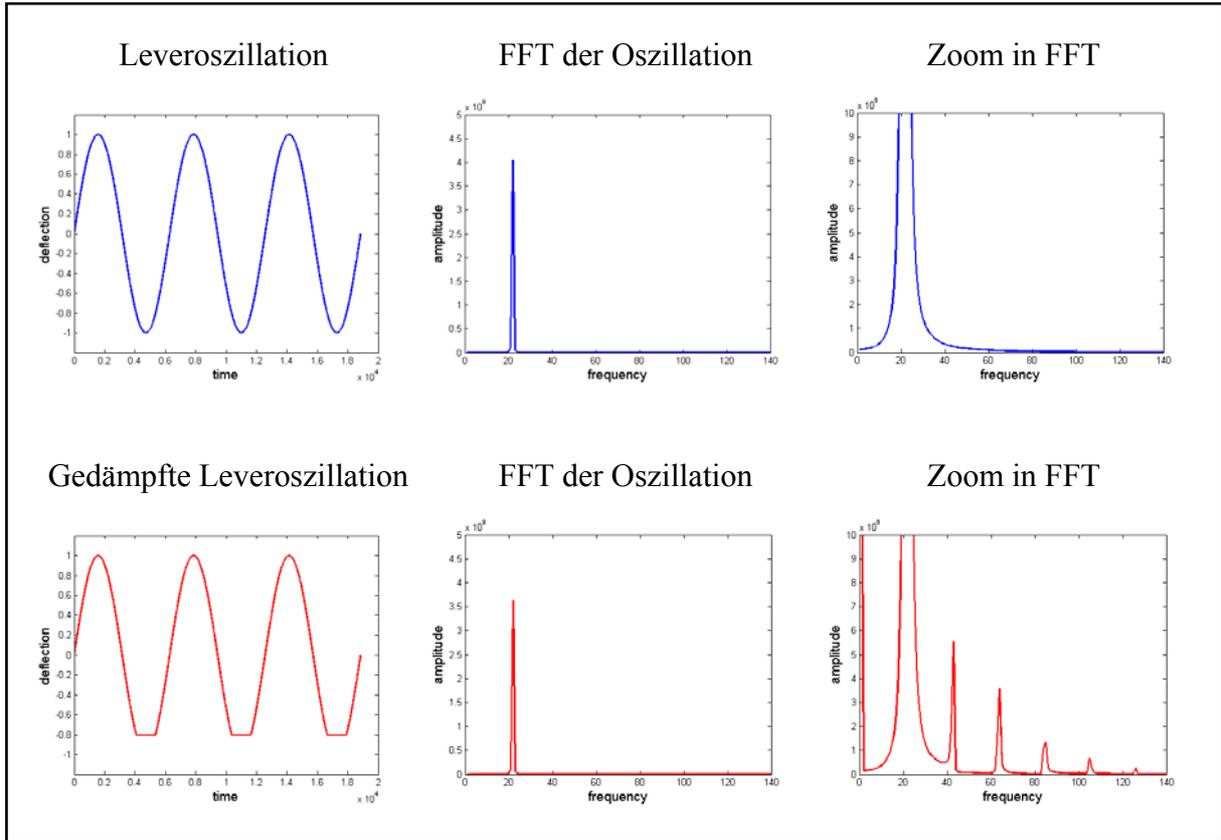


Abbildung 12: Entstehung höherer Harmonischer aus der Cantilever-Grundschiwingung.

Die Graphen zeigen von links nach rechts den zeitlichen Verlauf der Leveroszillation, die Fouriertransformation (FFT) derselben und einen Zoom in die FFT. In der oberen Zeile handelt sich um eine freie Oszillation; in der unteren Zeile wird die Oszillation, z.B. durch die Wechselwirkung mit einer Oberfläche gedämpft. Hierbei werden im Zoom in die FFT die Anteile der höheren Harmonischen sichtbar (kleine Peaks bei den Vielfachen der Grundfrequenz).

Die Entstehung der höheren Harmonischen kann folgendermaßen veranschaulicht werden (Abbildung 12). Die Bewegung eines Cantilevers während der Zeit wird aufgrund der linearen Kraft-Weg-Beziehung des zugrunde liegenden Hook'schen Gesetzes definitionsgemäß als ein perfekter Sinusverlauf erhalten. Dieser liefert nach der Fouriertransformation (FFT) einen einzigen Peak, entsprechend der Resonanzfrequenz der Cantileverschiwingung. Wird die Oszillation jedoch abrupt durch eine Barriere aufgehalten, wie die Oberfläche in erster Näherung beschrieben werden kann, so kommt es zu einer periodischen Verformung am unteren Wendepunkt der Schwingung. Diese periodische Störung der Oszillation äußert sich nach der Fouriertransformation durch Auftreten aller höheren Harmonischen der Grundfrequenz, wobei die zweite die höchste Amplitude aufweist.

Bei Messungen mit dem OMCL-Cantilever in Wasser auf einer Glimmeroberfläche konnten die Amplituden bis zur fünften Harmonischen noch deutlich im Rauschen identifiziert werden. Ihre Werte sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die relativen Amplituden der Harmonischen sind normalisiert auf die Anregungsamplitude des 5 μm über der Oberfläche schweben-

den Levers, gemessen bei einer Tapping-Amplitude von 0.3 V (etwa 3 nm) und in dB angegeben. Unter langsamer Reduktion des Setpoint wurde die Amplitude auf 100% (freie Oszillation) an dem Punkt gesetzt, an dem die Höhenregelung begann, der Topographie zu folgen. Die angegebenen Fehler sind die Standardabweichungen aus fünf Messungen auf Glimmer mit verschiedenen Spitzen desselben Bautyps (viermal in reinem Wasser und einmal in Pufferlösung mit adsorbiertem Protein). Der Rauschlevel lag in etwa bei -65 dB, wobei wenige zusätzlich auftretende Signale Intensitäten von bis zu -53 dB hatten. Es ist zu berücksichtigen, dass die Werte für andere Tapping-Amplituden sicherlich abweichen.

Tabelle 1: Relative Amplituden der ersten bis fünften Harmonischen bei verschiedenen Dämpfungen.

Die relativen Amplituden aller Harmonischen sind auf die Amplituden des 5 μm von der Oberfläche abgehobenen Levers normalisiert, gemessen bei einer Tapping-Amplitude von 0.3 V (ca. 3 nm); 100% Amplitude (freie Oszillation) wird an dem Punkt definiert, an dem die Höhenregelung der Topographie zu folgen beginnt; alle Werte sind in dB angegeben. Die angezeigten Fehler sind Standardabweichungen aus fünf Messungen auf Glimmer unter Verwendung unterschiedlicher Spitzen (viermal in $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$, einmal in Puffer mit adsorbiertem Protein). Der Rauschlevel liegt bei etwa -65 dB. Einige vereinzelte Signale haben Intensitäten bis zu -53 dB. Die Werte ändern sich für andere Tapping-Amplituden.

Harmonische (dB)	1.	2.	3.	4.	5.
5 μm über der Oberfläche	0	- 54,5 \pm 2,8	- 65 \pm 1,2	- 67 \pm 3,7	- 66,5 \pm 1,3
100% Amplitude	- 2,2 \pm 0,8	- 55,2 \pm 1,6	- 66 \pm 5	- 67,9 \pm 1,7	- 68,3 \pm 2,3
95% Amplitude	- 2,5 \pm 0,9	- 43,2 \pm 1,6	- 59 \pm 4,2	- 64,3 \pm 4,3	- 65,9 \pm 5,8
90% Amplitude	-3 \pm 0,9	- 36,6 \pm 1	- 55 \pm 2,2	- 61,2 \pm 4,4	- 63,7 \pm 4,8

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Amplitude der zweiten Harmonischen mit stärker gedämpfter Amplitude, d.h. mit steigender Interaktion des Levers mit der Probe deutlich ansteigt. Aus diesem Grund ist die Amplitude der zweiten Harmonischen als Messgröße für die Interaktion geeignet.

4.2.3 Technische Realisierung

Folgendes Schaltbild verdeutlicht die Realisierung des übergeordneten Regelkreises für den Amplituden-Setpoint (Abbildung 13).

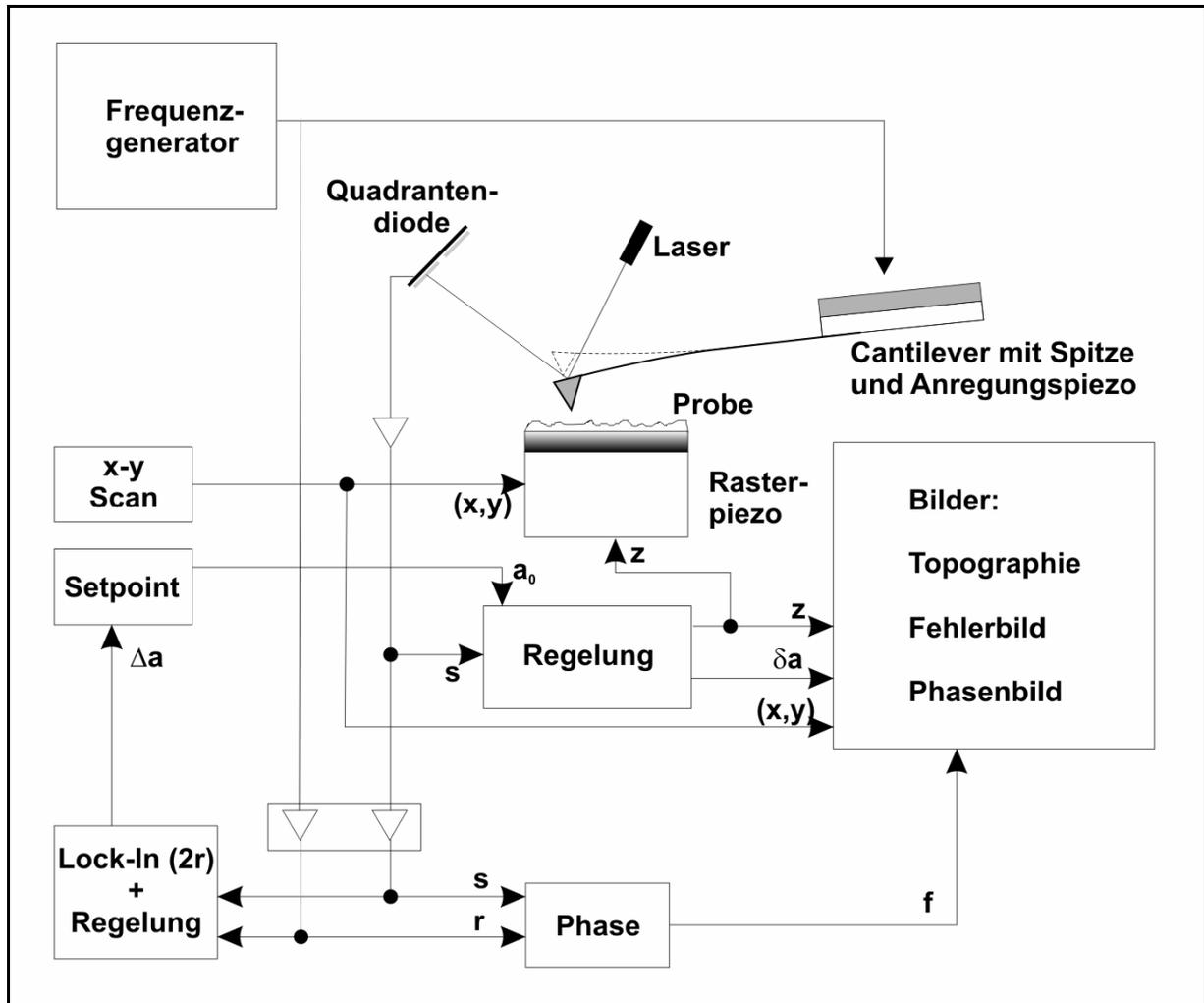


Abbildung 13: Schaltbild der Regelung für die automatische Korrektur des Amplituden-Setpoints.

Aufbauend auf der Regelung der Topographie (siehe Abbildung 5) wurde ein Lock-In-Verstärker hinzugefügt, der im Signal (s) die Amplitude der doppelten Anregungsfrequenz (2r) misst. Über eine Regelungseinheit wird der Amplituden-Setpoint korrigiert.

Die AFM-Apparatur aus Abbildung 5 wurde durch die zweite Regelschleife zur Korrektur des Amplituden-Setpoints ergänzt. Ein Lock-In-Verstärker misst die Amplitude der zweiten Harmonischen (2r) des Tapping-Signals (s), das verstärkte Signal für die Horizontalablenkung des Levers aus der Quadrantendiode. Dieses Signal der zweiten Harmonischen ist ein Maß für die Verformung des Sinusverlaufes (s.o.). Eine Regelungseinheit vergleicht die Amplitude der zweiten Harmonischen mit einem vorgegebenen Sollwert, der individuell für Spitze und Probe gewählt wird, und korrigiert den Amplituden-Setpoint dementsprechend.

4.2.4 Anwendung und Einschränkungen

Nach längerer Anwendung der Regelung basierend auf der zweiten Harmonischen der Cantileveroszillation haben sich folgende Einschränkungen der Anwendbarkeit herauskristallisiert. Die Regelung kann nicht bei extrem weichen Proben angewendet werden, die keine genügend große Wechselwirkung mit der Spitze liefern. Hier führt eine eingeschaltete Regelung sonst zu einem immer weiter reduzierten Amplituden-Setpoint, da die geforderte Wechselwirkung nicht detektiert werden kann. Dies führt unweigerlich zum Aufsetzen der Spitze auf der Oberfläche, wodurch die Spitze oft zerstört wird. Allerdings bleibt die Frage, ob auf solchen Proben ein sinnvolles Abbilden der Topographie überhaupt möglich ist.

Weiterhin kann ein fixer Sollwert für die zweite Harmonische für manche sehr inhomogene Proben ungünstig sein. So ist zum Beispiel die Generation der zweiten Harmonischen auf Glimmer deutlich höher als auf Lipiden. Für eine Glimmerprobe mit Lipidbereichen bedeutet das, dass der optimale Wert für den Setpoint auf Glimmer oder Lipid jeweils unterschiedlich ist.

Im Weiteren können verschiedene Bauteile, die am Regelkreis beteiligt sind, andere Quellen von Anharmonizitäten darstellen und somit ebenfalls höhere Harmonische erzeugen, die das Messsignal überlagern. Dies hat sich z.B. als besonders gravierend bei der Verwendung von Cantilevern herausgestellt, die den reflektierten Detektionslaser nicht sauber, sondern diffus zurückstreuen, so dass er nicht komplett auf die Quadrantendiode trifft. Eine mögliche Lösung dieses Problems liegt in der Korrektur des Grundlevels der X- und Y-Ausgänge des Lock-In-Verstärkers. Unter der Voraussetzung, dass die fremden Signale während der Messung konstant oder die Änderungen klein gegen das Messsignal bleiben, kann ein Offset auf die X- und Y- Werte des Lock-In-Verstärkers gegeben werden, bevor dieser die Gesamtamplitude der Harmonischen berechnet. So wird realisiert, dass das Messsignal für die Interaktion der Spitze mit der Probe ohne Kontakt minimal wird und bei der Messung der Unterschied annähernd linear und größtmöglich bleibt.

Andererseits erlaubt die korrekte Anwendung der Regelung bei der Abbildung ein schnelleres Arbeiten, weil die Äquilibrierungszeiten der Apparatur stark verkürzt sind, da auch größere Driften gut kompensiert werden.

Ein weiterer Vorteil ist die gleichmäßige Abbildung mit stets konstanten Bedingungen für die Probe. Bei unregelmäßigem Betrieb kommt es aufgrund von Driften zu einem ‚Hin- oder Weglaufen‘ der Spitze von der Probe, was zu unterschiedlichen Wechselwirkungen und somit Störung der Abbildung führt. Bei aktivierter Regelung ist dieser Einfluss des Scanvorgangs

gleichmäßig und auch die Probenveränderung minimal. Das wirkt sich sehr positiv bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse, z.B. von Höhenmessungen, aus (Abbildung 11).

Auch muss bei aktiver Regelung in eine einmal gestartete Messung kaum mehr eingegriffen werden. Somit ist die Gefahr einer falschen Einstellung beim manuellen Eingriff durch Tippfehler herabgesetzt. Es können lange Serien von Bildern aufgenommen werden, die von der Haltbarkeit der Spitze limitiert werden. Daneben bleiben der eingeschränkte Sensorbereich der Quadrantendiode, bedingt durch die Langzeitdrift der Auslenkung des Cantilevers, und der Regelbereich des Z-Piezos, der die Höhendrift kompensiert, gerätespezifische Einschränkungen.

Der größte Vorteil der Regelung des Amplituden-Setpoints über die zweite Harmonische liegt darin, dass massive Störungen der Abbildung kompensiert werden können, da nur die Interaktion der Spitze mit der Probe, und nicht anderen Messgrößen, wie die Amplitude, berücksichtigt werden. Die Regelung funktioniert so zuverlässig, dass sogar der Abbildungspuffer während der Aufnahme von Bildern ausgetauscht werden kann, was normalerweise aufgrund von verschiedenen Temperaturen und Salzkonzentrationen der Lösungen einen enorm störenden Einfluss auf die Messung hat. So ändert sich z.B. bei einer Temperaturerhöhung von 1°C die Viskosität von Wasser bei 20°C um 2,5%,^[28] was auch entsprechenden Einfluss auf die freie Amplitude der Cantileverschwingung hat. Eine Kompensation dieser Störungen hat enorme Konsequenzen für die Untersuchung biologischer Proben, da jetzt z.B. verschiedene Salze, Nukleotide oder sogar Proteine während des Abbildens durch Pufferaustausch zugegeben werden können. Die Reaktion der Probe kann hierauf direkt am selben Einzelmolekül verfolgt werden, was bei dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen sehr vorteilhaft war.

5. Untersuchte Proteine

5.1 GroE-System

Auf jede Zelle wirkt im Laufe ihres Lebens eine Vielzahl von verschiedenen Einflüssen. Um sich erfolgreich auf diese Einflüsse einstellen zu können und somit ihre Überlebenswahrscheinlichkeit der Zelle zu steigern, haben Eukaryonten wie Prokaryonten mehrere Hilffssysteme entwickelt. Dazu gehören komplexe Reparatursysteme für DNA und Proteine.

Solche Systeme sind von größter Relevanz für alle Arten des Lebens, so auch für den Menschen. Es zeigt sich nämlich immer mehr, dass vor allem altersbedingte Krankheiten, wie z.B. die Alzheimersche Erkrankung aber auch BSE und das Creutzfeld-Jakob-Syndrom auf unzureichende Regenerations- und Reparationsfunktionen der Zellen zurückzuführen sind.^[30]

Im Falle von Stress, z.B. durch einen Temperaturschock, werden Proteine zum Teil denaturiert und sie verlieren ihre Funktionsfähigkeit. Ihre Aggregation würde der Zelle die funktionalen Proteine für immer entziehen und ihre Ablagerungen würden zudem die Zelle auf Dauer schädigen.

Dieser Aggregation wirkt eine Gruppe von Proteinen, die Chaperone, entgegen, die normalerweise in geringer Konzentration immer in der Zelle vorhanden sind und die korrekte Faltung vieler frisch synthetisierter Proteine ermöglichen.

Innerhalb der Gruppe der molekularen Chaperone gibt es die Familie der Chaperonine. Diese bestehen entweder aus einem Ring (mitochondriales Hsp60) oder aus zwei Ringen, die sich aus 7-9 Untereinheiten zusammensetzen, wie z.B. das GroE-System aus *Escherichia coli* oder das Thermosom aus *Thermoplasma acidophilum*. Die Chaperonine umschließen eine Pore, innerhalb der ungefaltete Proteine vor der Umgebung geschützt gebunden werden und die Möglichkeit zur Faltung bekommen. Dies ist nötig, da viele zelluläre Proteine nicht aus eigenem Antrieb zur korrekten Faltung in ihren nativen, funktionsfähigen Zustand fähig sind.^[34-37]

5.1.1 Struktur des GroEL und des GroEL-GroES-Komplexes

GroEL aus *E. coli* ist ein dickwandiger Zylinder, dessen Höhe (146 Å) sich nur wenig von seiner Breite (137 Å) unterscheidet. Es ist aus zwei versetzten Ringen zusammengesetzt, die wiederum aus 7 gleichen Untereinheiten bestehen. Jede Untereinheit beinhaltet 547 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 57 kDa, was zu einem Gesamtmolekulargewicht des GroEL von ca. 800 kDa führt. Die beiden Ringe liegen, leicht verdreht, Rücken an Rücken aneinander und haben eine ausgedehnte und nahezu ebene Berührungsfläche. Jeder der Ringe umschließt eine zentrale Kavität.

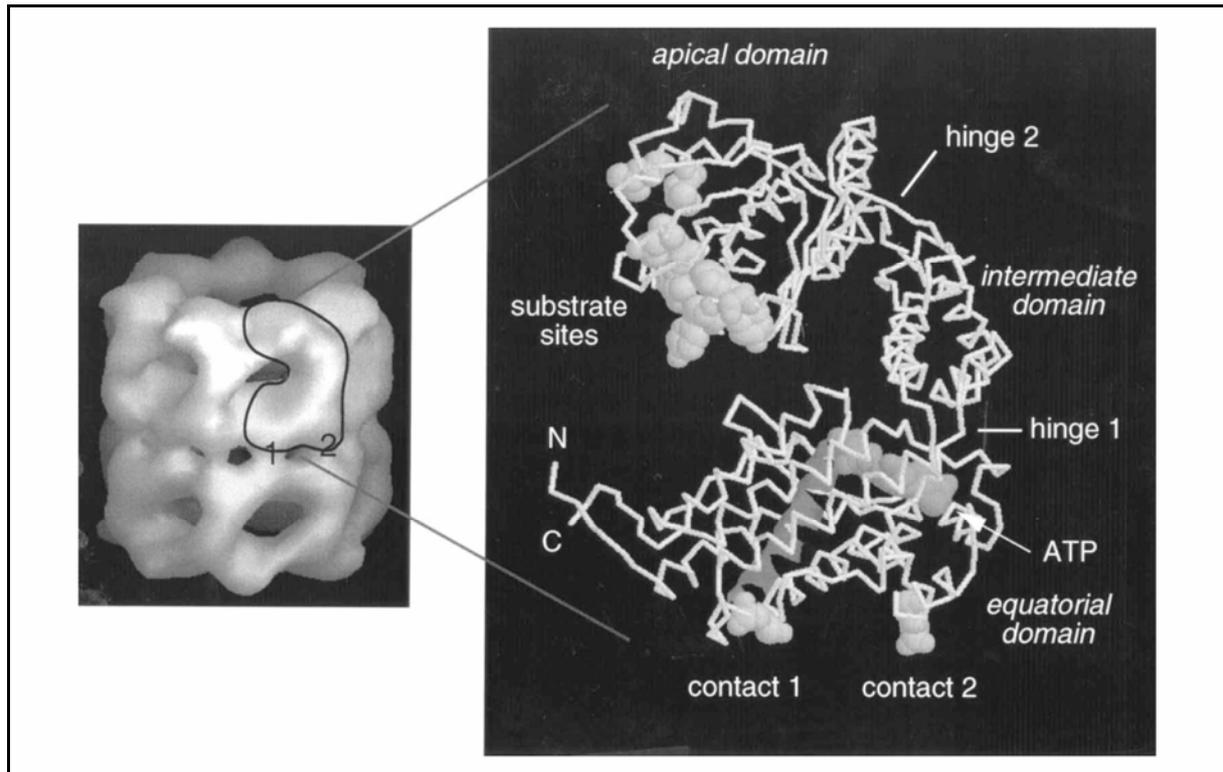


Abbildung 14: Struktur von GroEL.

Elektronenmikroskopische Rekonstruktion der Struktur von GroEL (links) und Detailansicht einer Untereinheit, basierend auf der Kristallstruktur (rechts).^[31]

Jede der 14 Untereinheiten ist aus drei verschiedenen Domänen zusammengesetzt. Die größte, äquatoriale Domäne (equatorial domain, AS 6-133 und 409-523), trägt den C- und den N-Terminus, die wahrscheinlich beide in den Hohlraum hineinreichen. Sie beinhaltet eine Anordnung von α -Helices, was einen hohen Ordnungsgrad bewirkt und als Fundament an der Nahtstelle zwischen den beiden Ringen und zwischen den monomeren Untereinheiten dient, die hauptsächlich über diese Domäne verknüpft sind. Überdies liegt in der äquatorialen Domäne auch die ATP-Bindungsstelle, deren Funktion im Kapitel 5.1.2 beim Faltungsmechanismus genauer beschrieben wird.

Die Zwischendomäne (intermediate domane, AS 134-190 und 377-408) ist die kleinste Domäne und dient nur als kovalente Verknüpfung zwischen der äquatorialen und der apikalen Domänen über steife, antiparallele β -Faltblätter, die als Gelenk bei Konformationsänderungen eine Rolle spielen (Kapitel 5.1.2). Im GroEL bildet sie die dünne Wand der Faltungskammer (ca. 26 Å), die an dieser Stelle am weitesten ausgedehnt ist und etwa 90 Å durchmisst.

Die apikale Domäne (apical domain, AS 191-376) befindet sich im Komplex am äußeren Rand des Proteins und umschließt dort den Eingang zur Faltungskammer. Insbesondere die Reste, die in der Nähe der Pore liegen, zeigen nach den Röntgenstrukturdaten hohe thermi-

sche Beweglichkeiten. Diese Reste konnten als Substratbindungsstellen (substrate sites) identifiziert werden. Die Domäne führt eine bei der Faltung wichtige Bewegung durch, ein ‚*en-bloc*‘-Klappen an der Zwischendomäne, die als Gelenk fungiert (Abbildung 14, hinge 1+2), was die Bindungsstellen für das GroES zugänglich macht.^[32]

In der Zelle bildet GroEL in Anwesenheit von ATP unsymmetrische Komplexe mit seinem Cochaperonin GroES (Abbildung 15), die als GroE-Komplexe bezeichnet werden. GroES besteht aus einem heptameren Ring aus identischen, 10 kDa großen Untereinheiten. Jede der GroES-Untereinheiten faltet in einer einzigen Domäne mit neun β -Faltblättern.

Das GroES bindet den GroEL-Ring, der im ATP-Zustand ist, den so genannten ‚cis-Ring‘. Im Komplex kommt es hierbei, im Vergleich zum freien GroEL, zu einer deutlichen Stellungsänderung der apikalen Domänen. Zusätzlich kommt es zu einer Vergrößerung der Kavität durch Ausklappen der Zwischendomäne und einem Verschließen der Öffnung mit GroES als passendem Deckel. Der *trans*-Ring, der gegenüberliegende Ring, verändert hierbei seine Konformation kaum.^[33] Die genaue Funktion dieser Konformationsänderung wird im nächsten Abschnitt erläutert.

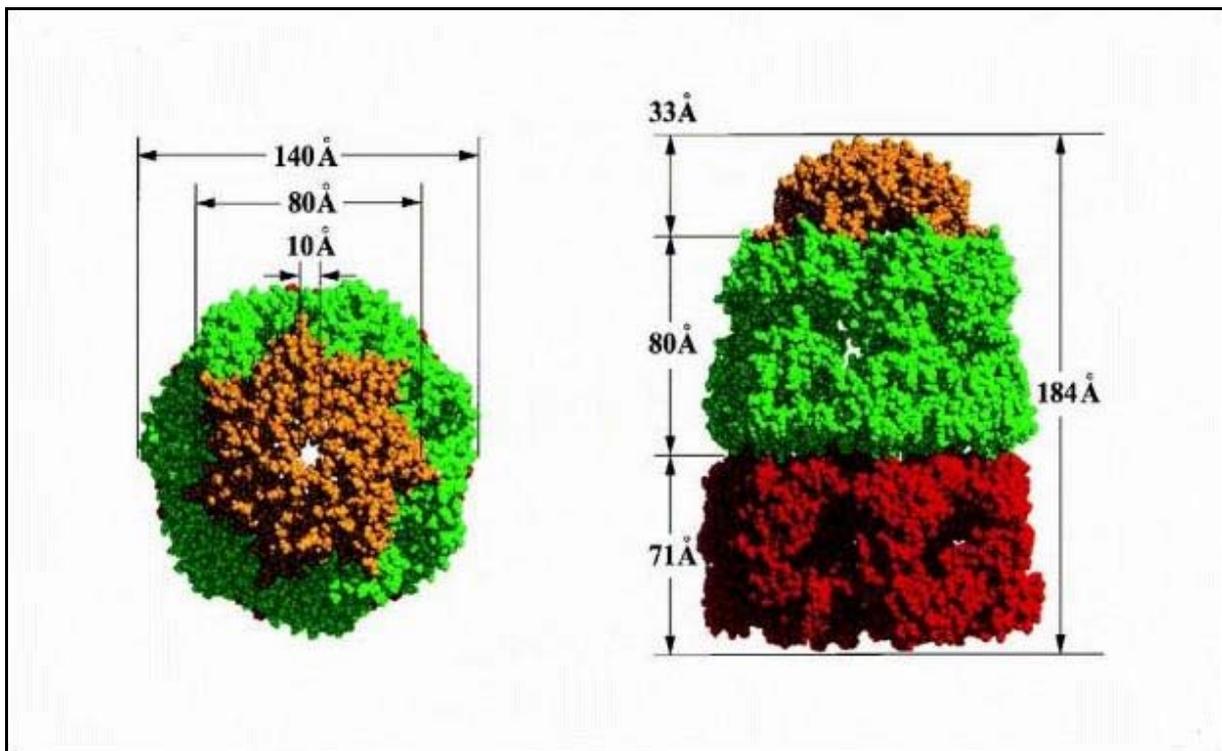


Abbildung 15: Struktur des GroEL-GroES-Komplexes.

GroEL-GroES-Komplex mit GroEL (rot und grün) mit der GroES-Kappe (orange), Aufsicht (links) und Seitenansicht (rechts).^[33]

5.1.2 Proteinfaltung durch das GroE-System

Das GroE-Chaperonin-System aus *Escherichia coli* spielt eine essentielle zelluläre Rolle bei der Faltung einer großen Anzahl von zytosolischen Proteinen.^[34-36,41]

Obwohl das GroE-System eine der meistuntersuchten makromolekularen Maschinerien ist, sind die exakten Vorgänge und Wirkungsweisen der verschiedenen Zustände und Übergänge des GroEL-GroES-Systems während des Reaktionszyklus zur Faltung eines Polypeptid-Substrats nicht komplett verstanden.^[42,43] So wird kontrovers diskutiert, ob GroEL nur als passiver Verhinderer der Aggregation fungiert oder ob es aktiv an der Proteinfaltung, durch Entfaltung des gefangenen Substrates oder durch andere direkte Einwirkung auf dieses, teilnimmt.^[44] So schlagen einige Studien vor, GroEL ändere die Struktur von nicht nativen Proteinen, obwohl die direkte Verbindung zur Faltungsförderung von strikt GroEL-abhängigen Substraten bisher nicht gezeigt wurde.^[45-49] Andere Untersuchungen zeigen wiederum, dass diese Proteine unter gewissen Umständen auch ohne Faltungshelfer falten können, wenn nur die Aggregation durch günstige Wahl der Bedingungen unterdrückt wird.^[53-55] Ob hierbei Aggregate niedriger Ordnung auftreten, ist nicht geklärt.^[56,57] In einem speziellen Fall (Barnase) konnte ein signifikanter Anstieg der Rückfaltungsgeschwindigkeit eines Proteins, das im GroE-Komplex gefangen ist, im Vergleich zur spontanen Faltung festgestellt werden.^[53] Diese Untersuchungen und theoretische Studien führten zu der Interpretation, dass allein der Einschluss eines Faltungszwischenzustands innerhalb der GroEL-GroES-Kammer die Energielandschaft der Faltung eines Proteins direkt verändern kann.^[58-60,74]

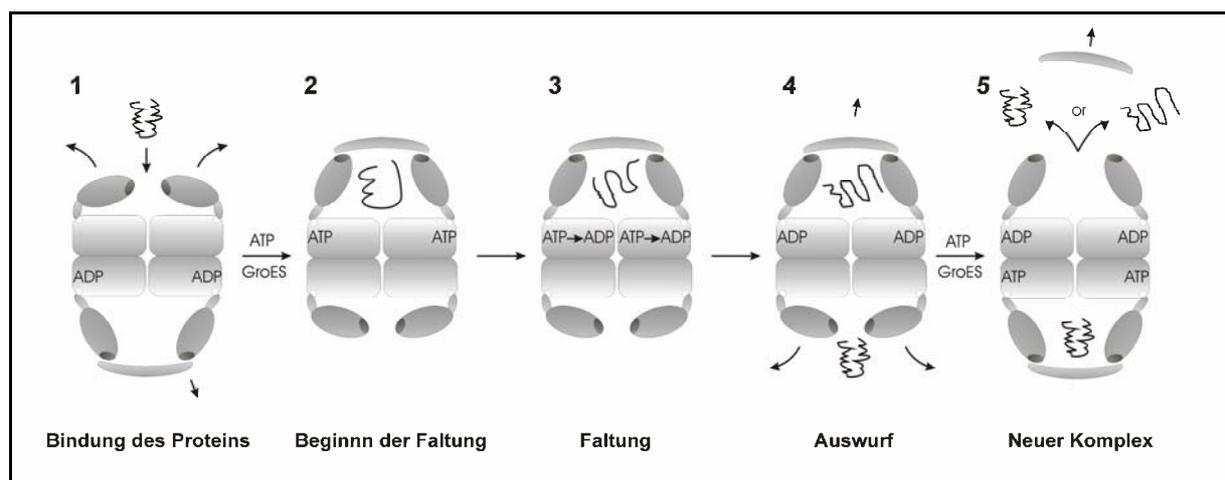


Abbildung 16: Schematische Darstellung des GroE-Reaktionszyklus bei der Proteinfaltung.

In der ersten Stufe (1) bindet denaturiertes Protein an die apikalen Substratbindungsdomänen (dunkelgrau); im Anschluss führt die Bindung von ATP zu einer Lageänderung der apikalen Domänen, die die Bindung von GroES ermöglicht, das hierbei das Substrat in die Kammer drückt und einschließt (2); die Hydrolyse des ATP zu ADP bestimmt die Dauer des Komplexes (3-4), bevor die Bindung von ATP am trans-Ring (5) den Komplex löst und das Substratprotein befreit; dies ist der Startpunkt für eine neue Komplexbildung des gegenüberliegenden Ringes.^[61]

Die mechanistischen Vorgänge beim GroE-Reaktionszyklus werden im Folgenden genauer vorgestellt.^[61] GroEL bindet ein breites Spektrum von ungefalteten oder teilweise nicht gefalteten Proteinen, es hat aber nur eine geringe Affinität zu nativen Polypeptidketten. Die Substratbindung kommt hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen zustande.^[32,62] Dies erklärt die niedrige Substratspezifität und die hohe Selektivität für ungefaltete Proteine, die hydrophobe Bereiche präsentieren. Bei nativen globulären Proteinen sind die hydrophoben Seitenketten normalerweise innerhalb des Kerns verborgen. Zu einem gewissen Teil spielen auch elektrostatische Wechselwirkungen bei der Bindung des Substrats eine Rolle.^[63,65]

Die Bindung der nicht nativen Polypeptidkette an den freien Ring des GroEL₁₄-GroES₇-ADP₇-Komplexes findet am inneren, oberen Rand der apikalen Domäne statt, und zwar in der Furche zwischen zwei parallelen α -Helices (Schritt 1, Abbildung 16).^[62,66,67] Die Struktur dieser Region ist flexibel und unterscheidet sich im ligandfreien GroEL von der im GroEL-Peptid-Komplex oder im GroEL-GroES-ADP-Komplex.^[32,33,66,68-70] Diese Flexibilität der Substratbindungsstelle scheint eine Voraussetzung für eine stabile Bindung eines breiten Spektrums verschiedener Proteine zu sein. Von Belang ist ebenfalls, dass die kooperative Bindung vom Substrat oder von GroES an mehr als eine apikale Bindungsstelle die Affinität zwischen GroEL und seinem Bindungspartner signifikant zu verstärken scheint.^[66,70]

Bei Anwesenheit von Nukleotid und GroES zeigt GroEL aufgrund von Konformationsänderungen in seinen Domänen ein komplexes allosterisches Verhalten.^[72] ATP-Bindung an einen Ring geschieht sehr schnell (diffusionskontrolliert) mit positiver Kooperativität und erlaubt spätere GroES-Anlagerung. Die Struktur des GroEL-GroES-ADP-Komplexes zeigt, dass die Zwischendomäne sich leicht eindreht und die apikale Domäne eine Drehung um 60° nach oben und um 90° um sich selbst durchführt (Abbildung 17).^[33]

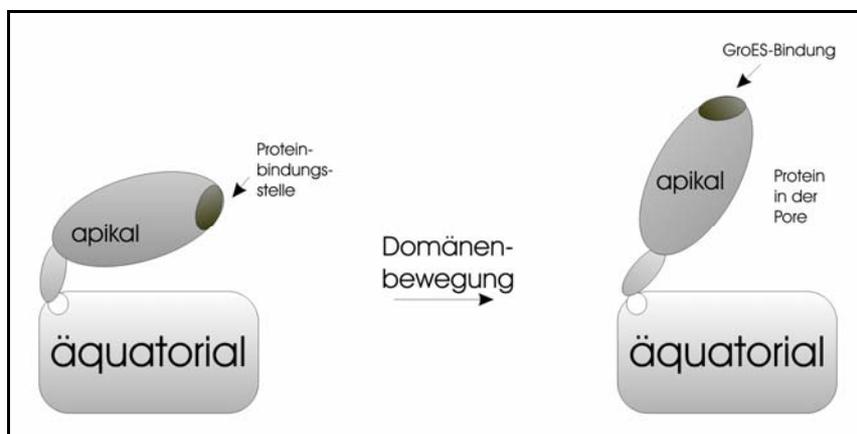


Abbildung 17: Strukturveränderung in einer GroEL-Untereinheit bei ATP- und GroES-Bindung. Bei Bindung von ATP in die Bindungstasche ändert sich die relative Lage der apikalen zur äquatorialen Domäne, um die anschließende GroES-Bindung zu ermöglichen.

Dies verringert die Affinität für nicht native Polypeptide in diesem Ring dramatisch, da die Substratbindungsstelle vom oberen Rand an die Spitze des Zylinders gewandert ist. Hieraus ergibt sich auch eine Verdoppelung des Porenvolumens und Entlassen des gebundenen Proteins in die Kavität, wahrscheinlich gefördert durch die anschließende Bindung von GroES.

Der GroEL₁₄-GroES₇-ATP₇-Komplex wird auch *cis*-Komplex bezeichnet, im Gegensatz zum *trans*-Komplex, bei dem das Nukleotid an dem GroEL-Ring ohne GroES gebunden ist. Dieser *cis*-Komplex ist die aktive Spezies im GroE-Faltungszyklus.^[73-75]

Die Assoziation des GroES an einen GroEL₁₄-ATP₇-Ring ist sehr schnell ($>4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, Schritt 2, Abbildung 16).^[76] Während der damit verbundenen Strukturveränderung wechseln die Wände der Kavität ihren Charakter von hydrophob nach hydrophil und geben dem Peptid so die Möglichkeit der Faltung ohne zwischenmolekulare Wechselwirkungen und Störungen.^[33] Zusätzlich verhindert die negative Kooperativität zwischen den zwei GroEL-Ringen die Bindung von ATP und GroES am gegenüberliegenden *trans*-Ring so lange, wie ATP am *cis*-Ring gebunden ist.^[72,76] Die Substratbindung am *trans*-Ring wird nicht beeinflusst.

Die ATP-Hydrolyse (Schritt 3, Abbildung 16) ist Kalium-abhängig und geschieht in einem asymmetrischen GroEL₁₄-GroES₇-ATP₇-Komplex mit einer Rate von 0.12 s^{-1} und einem GroEL₁₄-GroES₇-ADP₇-Komplex als Ergebnis.^[77] Die ATP-Hydrolyse triggert die Fortführung des GroE-Faltungszyklus, da jetzt die negative Kooperativität der ATP-Bindung am *trans*-Ring wegfällt und ein GroEL₇-ATP₇-GroEL₇-GroES₇-ADP₇-Komplex gebildet werden kann.

Die ATP-Bindung am *trans*-Ring bewirkt einen Konformationswechsel, der über die äquatoriale Ringschnittstelle zum *cis*-Ring zurück übertragen wird. Auf diese Weise induziert die Bindung von ATP die Freigabe von an den *cis*-Ring gebundenem ADP und GroES (Schritt 4, Abbildung 16).^[76,78,79] Die Trägheit der Domänen-Bewegungen der Konformationsänderung begrenzen die Rate des GroE-ATPase-Zyklus auf einen Umsatz von 0.042 s^{-1} .^[76,78,79] Sparrer und Buchner zeigten, dass die ATP-Bindung an den GroEL₁₄-GroES₇-ADP₇-Komplex diffusionskontrolliert abläuft und durch die Bindung von GroES am gegenüberliegenden Ring gefördert wird. Dagegen ist der konformelle Wechsel des *trans*-Rings von einem hochaffinen Zustand der Substratbindung in einen niederaffinen langsam ($k=30 \text{ s}^{-1}$), so dass die Bindung eines Substrats mit hoher Affinität an den *trans*-Ring deutlich vor dem Konformationswechsel in den Zustand niedriger Affinität erfolgt.^[80]

Der vollständige Zyklus (Schritt 1-5, Abbildung 16) dauert bei *in-vitro*-Messungen bei Raumtemperatur ca. 15 s.^[76,81] Hierbei kann die ATP-Hydrolyse als zeitlicher Trigger angesehen werden, der einen Auswurf des Polypeptids alle 15 s verursacht, unabhängig vom aktuellen

Faltungszustand. Die ATPase-Aktivität des GroE-Systems steigt linear mit der Temperatur an.^[82,83] Dies führt zu einer beschleunigten Triggerung bei physiologischen Temperaturen.

5.1.3 GroEL-,single ring'-Mutante

Zur Untersuchung der Zwischen-Ring-Kommunikation des GroEL mit eventuell beteiligten Konformationsänderungen wurde eine Ein-Ring-Variante (GroEL₇, 'single ring', SR) kloniert.^[73] Diese Mutante mit dem Namen GroEL-SR enthält vier Punktmutationen in der äquatorialen Domäne, die für die Kontakte zwischen den Ringen verantwortlich ist (R452E, E461A, S463A, und V464A).^[32,33,74]

Die ATPase-Aktivität bleibt von diesen Veränderungen in Abwesenheit von GroES unverändert. Das Protein ist aber funktionell *in vitro* und *in vivo* inaktiv.^[73,74,84] In Anwesenheit von Kaliumionen und GroES nimmt die ATPase-Aktivität deutlich ab, ein Hinweis auf einen stabilen GroEL-SR-GroES-Komplex.

Die Faltungseigenschaften von Substraten durch GroEL-SR sind noch nicht vollständig geklärt. So zeigten Weissmann *et al.*, dass GroEL-SR Rhodanase, ein potentiell GroEL-Substrat, unter GroES-Bindung falten kann. Das gefaltete Protein wird aber nicht wieder freigesetzt, da das Signal vom nicht vorhandenen *trans*-Ring fehlt, um das GroES abzustreifen.^[74] Erst unter nicht physiologischen Kalium-Konzentrationen, wie Hayer-Hartl *et al.* fanden, kann GroEL-SR Rhodanase gefaltet wieder freisetzen.^[85]

Weiterhin kann GroEL-SR mitochondriale Malatdehydrogenase (mtMDH), ein stringentes Substrat, das normalerweise GroEL, GroES und ATP benötigt, sowie Ornithintranscarbamoylase (OTC) nicht falten, da diese Substrate nicht in die Lösung abgegeben werden können.^[71,86,87]

Buchner *et al.* konnte zeigen, dass thermisch denaturierte Citratsynthase (CS) an GroEL-SR gebunden werden kann. Durch Zugabe von GroES und ATP kann ein GroEL-SR-GroES-ATP-Komplex erhalten werden, in dem CS in der Kavität gebunden vorliegt. Durch Inkubation auf Eis wird der Komplex aufgebrochen und gefaltete CS freigesetzt.^[88]

5.1.4 Fragestellung

Mittels der Rasterkraftmikroskopie lassen sich einzelne Moleküle, die auf Oberflächen adsorbiert sind, unter Pufferbedingungen funktionsfähig im Nanometerbereich abbilden. Für das GroEL-System sollten diese Vorteile des AFM für die Beantwortung von noch offenen Fragen genutzt werden.

So ist keine Struktur des GroEL mit gebundenem Substratprotein bekannt. Die genaue Lokalisierung des Substrates würde unter Umständen Rückschlüsse auf die Anzahl der belegten

apikalen Bindungsstellen während den verschiedenen Schritten des Faltungszyklus zulassen. In Anbetracht der verschiedenen Größen der bindenden Substrate stellt sich zusätzlich die Frage nach dem jeweiligen Faltungsmechanismus. Bei kleinen Substraten kann die Bindung an das GroEL auf den Oberseiten der apikalen Domänen an eine oder innerhalb des Ringes unter Beteiligung mehrerer Bindungsstellen stattfinden. Dies würde im ersten Fall bei der Abbildung eines Substratkomplexes direkt im AFM sichtbar sein.

Bei großen Substraten, die nicht mehr von GroES eingekapselt werden können, ist das Aussehen des Komplexes noch völlig ungeklärt. Eine Abbildung im AFM kann hier erste Hinweise geben.

Durch das AFM kann zwar eine Auflösung am Einzelmolekül von wenigen Nanometern erreicht werden, sie hängt aber stark vom gemessenen Objekt und den Abbildungsbedingungen ab.

So war fraglich, ob am nativen GroEL die Auflösung für die Visualisierung der Substratbindung erreichbar ist. Ein Ansatz lag deshalb in der Verwendung der GroEL-SR-Mutante, die mit ihrem vereinfachten Aufbau besondere Vorteile gegenüber dem nativen GroEL haben sollte.

5.2 20S-Proteasom

In jeder lebenden Zelle ist neben der Produktion und Faltung von Proteinen ihr kontrollierter Abbau von ebenso großer Bedeutung.

In eukaryontischen Zellen gibt es grundsätzlich zwei Wege des Proteinabbaus. In den Lysosomen, spezialisierten Zellorganellen mit einem sauren Milieu (pH 5), werden überwiegend Proteine aus dem extrazellulären Raum (exogene Proteine), aber auch Krankheitserreger wie Bakterien, Pilze oder Parasiten, die in die Zelle gelangt sind, abgebaut. Dieser Abbauweg durch lysozymale Proteasen ist unspezifisch und vollständig.^[89]

Daneben gibt es einen zweiten, intrazellulären Mechanismus zum Proteinabbau, der für die Beseitigung des überwiegenden Teils der zelleigenen, zytoplasmatischen (endogenen) Proteine verantwortlich ist und hochspezifisch abläuft. Zentraler Bestandteil dieser Maschinerie ist ein makromolekularer Proteinkomplex von etwa zwei Megadalton, der als 26S-Proteasom bezeichnet wird.^[90,91] Kernstück dieses ausschließlich in eukaryontischen Zellen auffindbaren Proteins ist das 20S-Proteasom, welches aber auch in Archaeobakterien und Eubakterien nachgewiesen werden konnte.^[92,93]

5.2.1 Struktur und Funktion

Das 20S-Proteasom besteht aus einer zylinderförmigen Tonne. Flankiert von einem oder zwei 19S-Kappenkomplexen formt es das 26S-Proteasom (Abbildung 18).

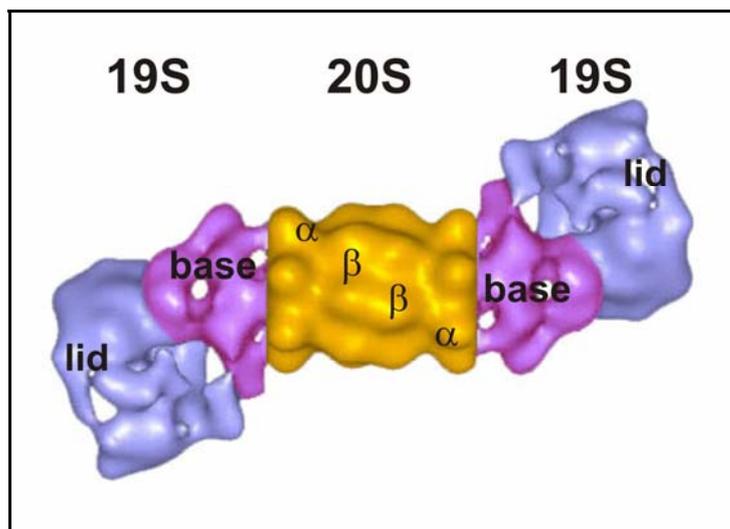


Abbildung 18: 26S-Proteasom aus *Drosophila melanogaster*.

Elektronenmikroskopische Rekonstruktion des 26S-Proteasoms mit dem 20S-Proteasom und den beiden 19S-Kappenkomplexen.^[91]

Das 20S-Proteasom aus *Thermoplasma acidophilum* besitzt eine Höhe von 15 nm und einen Durchmesser von 11 nm. Es setzt sich aus vier übereinander gestapelte Ringen zusammen,

wobei jeweils die beiden äußeren aus sieben α - und die inneren Ringe aus sieben β -Untereinheiten bestehen.

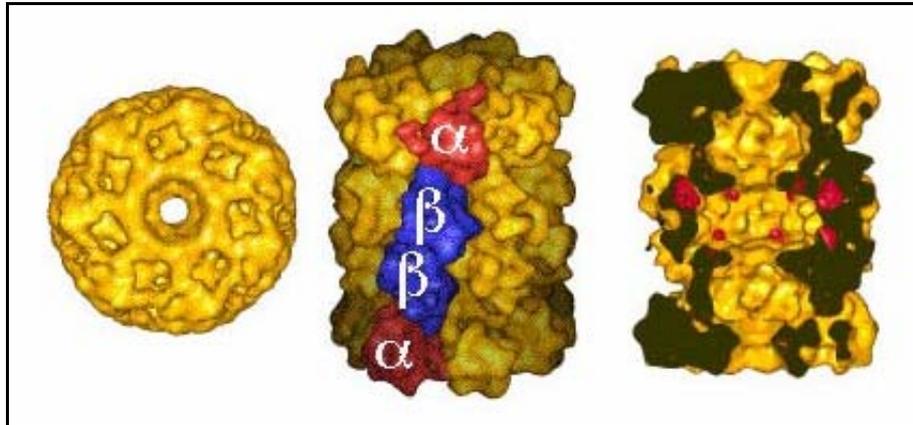


Abbildung 19: 20S-Proteasom aus *Thermoplasma acidophilum*.

Abgebildet ist eine aus den Atomkoordinaten des *T. acidophilum* 20S-Proteasoms gerechnete Oberflächendarstellung mit ca. 1,2 nm Auflösung. Das 20S-Proteasom ist in Aufsicht (links), Seitenansicht (mitte) und im Querschnitt mit rot markierten aktive Zentren gezeigt.^[95]

Elektronenmikroskopische und röntgenkristallographische Untersuchungen zeigen einen zentralen Kanal durch den Zylinder des 20S-Proteasoms, der am Einlass nur einen Durchmesser von 1,3 nm besitzt, und sich im Inneren zu drei Hohlkammern aufweitet, den äußeren Vorkammern und der zentralen Kammer mit den aktiven Zentren (vgl. Abbildung 19 rechts).^[95] Dort werden die Proteinsubstrate in 5-15 Aminosäuren lange Peptide zerlegt. Der proteolytisch aktive Rest ist das Threonin am N-Terminus der β -Untereinheit. Demnach gehört das Proteasom zu den Ntn-Hydrolasen, die sich durch eine katalytische N-terminale Aminosäure (Threonin, Serin, Cystein) auszeichnen, die den für die Hydrolyse entscheidenden nukleophilen Angriff durchführt.^[96]

Um den Eingang aber passieren und zu den aktiven Zentren vordringen zu können, muss ein Protein vollständig entfaltet vorliegen. Unter physiologischen Bedingungen besitzt jedoch die Mehrzahl der abzubauenen Proteinsubstrate ihre native Struktur. Sie können deshalb durch das 20S-Proteasom alleine noch nicht gespalten werden. Bei Eukaryonten sorgen die 19S-Kappenkomplexe für eine spezifische Substraterkennung, Entfaltung und Translokation in den aktiven 20S-Kern. In Prokaryonten, wo die 19S-Kappen fehlen, übernehmen wahrscheinlich andere ATPasen die Erkennung, die Entfaltung sowie die Übergabe von Proteinsubstraten an das 20S-Proteasom.

5.2.2 Kraftspektroskopie am 20S-Proteasom

Eine der offenen Fragen des 20S-Proteasoms ist der Mechanismus und die Stärke der Translokation eines ungefalteten Proteinsubstrates in das aktive Zentrum. In der vorliegenden Arbeit wurden Voruntersuchungen zur geeigneten Immobilisierung des Proteasoms für kraftspektroskopische Messungen geleistet (Abbildung 20).

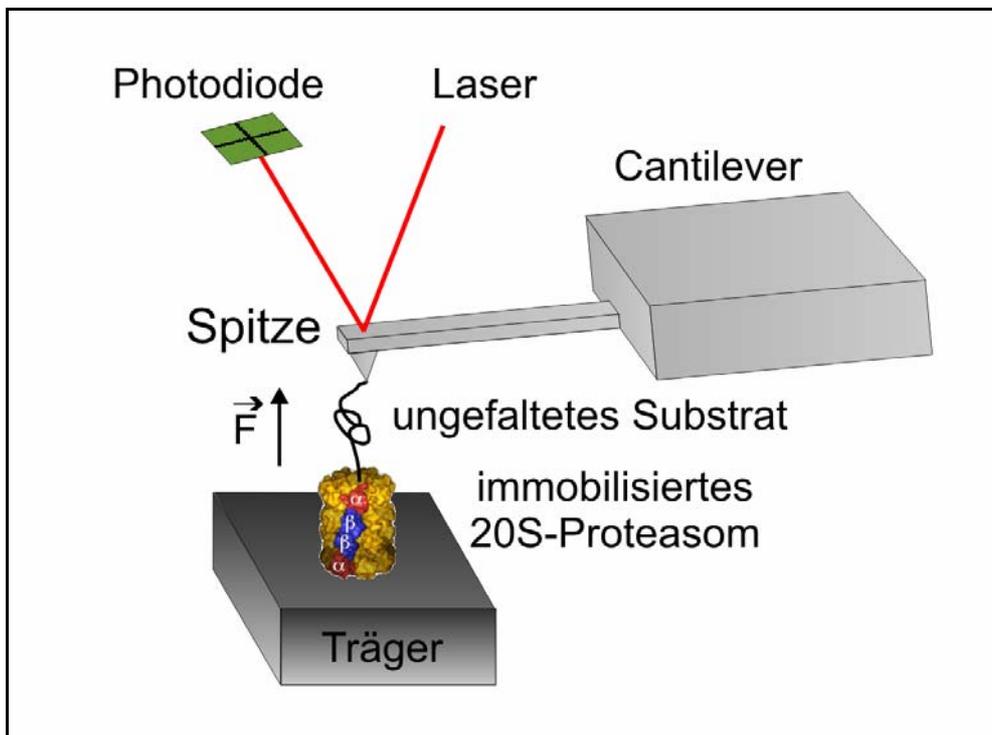


Abbildung 20: Schema für rasterkraftspektroskopische Messungen der Proteasom-Substrat-Interaktion. Mit einem an die AFM-Spitze fixierten, ungefalteten Substrat könnte dessen Interaktion mit einem stehend immobilisierten 20S-Protesom bestimmt werden.

Die Idee besteht hierbei darin, das Rasterkraftmikroskop als einen sehr sensitiven Kraftsensor zu verwenden. Um diese Untersuchungen durchzuführen, muss ein ungefaltetes Proteinsubstrat an die AFM-Spitze gebunden werden. Zudem müssen die Proteasome in aufrechter Position, d.h. mit Zugang zur Pore an der Stirnseite des Zylinders, senkrecht in Richtung der Spitze, aufgestellt werden. Diese Immobilisierung mit genügend großer Homogenität zu erreichen, stellte sich als größtes Problem heraus.

Sollte eine solche Probe einmal vorliegen, könnte die Wechselwirkungskraft der Interaktion des Proteinsubstrates mit dem 20S-Proteasom beim Entfernen des ungefalteten Substratproteins über Kraftkurven (Kapitel 4.1.7) ermittelt werden, aus denen weitere Rückschlüsse auf den Translokationsmechanismus gezogen werden können.

5.3 SMC-Protein

5.3.1 Grundlagen

SMC-ähnliche Proteine (Structural Maintenance of Chromosomes) sind eine weit verbreitete Proteinfamilie, die essentielle Aufgaben bei einer Reihe von Chromosombewegungen übernimmt.^[97] SMC-Proteine sind ausnahmslos mit weiteren Proteinen assoziiert und bilden mindestens drei Komplexe in niederen und vier Komplexe in höheren Eukaryonten aus: SMC1 und SMC3 bilden einen Cohesin-Komplex, der Schwesterchromosomen während der S-Phase verbrückt, um eine ordnungsgemäße Anordnung der Chromosomen während der Metaphase zu gewährleisten.^[98,99] SMC2 und SMC4 bilden einen Kondensin-Komplex, der die Chromosomstruktur und Kondensation während des Zellzyklus und während der Prophase vermittelt.^[100] Höhere Eukaryonten besitzen mindestens zwei Kondensin-Komplexe, in denen SMC2/4 mit verschiedenen Nicht-SMC-Proteinen interagiert, und die andere Strukturaufgaben der Chromosomstruktur übernehmen.^[101] SMC5 und SMC6 sind Teil eines großen DNA-Reparaturkomplexes, der mindestens noch sieben andere Proteine beinhaltet.^[102] In Prokaryonten ist nur ein SMC-Protein in den bisher analysierten Genomen vertreten, das einen Komplex mit dem ScpA-Kleisin- und ScpB-Protein eingeht.^[103-105] Der prokaryontische SMC-Komplex wird bei der Zellteilung für die richtige Anordnung und die aktive Aufteilung der Schwesterchromosomen in die Tochterzellen benötigt.^[106]

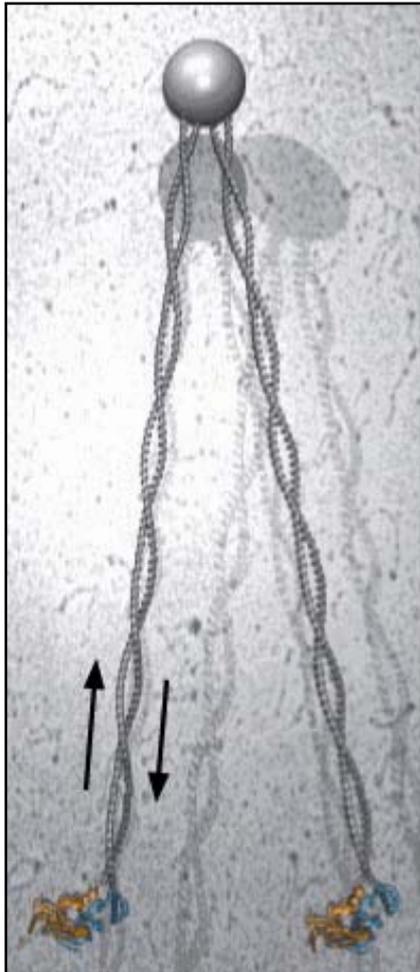
Diese Zusammenstellung zeigt, dass SMC-Proteine an einer großen Vielzahl von verschiedenen Proteinkomplexen beteiligt sind. Wie diese Proteinfamilie die verschiedensten Aufgaben auf Molekülebene bewältigt ist jedoch noch weitgehend unbekannt.

5.3.2 Aufbau und Funktionsweise

Ein SMC-Protein-Monomer aus *Bacillus subtilis* (67.5 kDa) besteht aus einer N-terminalen Region, die das Walker-A-Motiv, ein Teil der ATP Bindungstasche, trägt, aus zwei langen helikalen (sog. Coiled Coil) Regionen, die durch eine ‚Scharnierdomäne‘ getrennt werden, und einer C-terminalen Region, die ein Walker B Motiv (ATP-Tasche) und ein ‚C‘-Motiv, notwendig für die ATP-Hydrolyse, trägt.^[107,108] SMC-Proteine formen, über die Scharnierdomäne vermittelt, grundsätzlich Dimere (135 kDa) aus antiparallelen Peptidsträngen zweier Monomere (Abbildung 21).^[111-113] Die funktionsfähigen ATPase-Taschen, die Kopf-Gruppen, werden gemeinsam von je einem N- und C-Terminus jeweils eines Monomers gebildet.^[109,110] Die Helices-Regionen falten sich umeinander und bilden so die 50-nm-langen Superhelices, die Arme des SMC-Proteins. Die symmetrischen SMC-Komplexe bestehen also aus einem zentralen Knickstück, zwei langen Armen und zwei Kopfgruppen am Ende. Sie können eine

offene V-Form annehmen oder eine geschlossene Struktur, mit dem Verschluss an der Kopfseite, bilden. Die Bindung von Proteinen, die mit dem SMC interagieren, konnte bisher nur an seine Kopfgruppen lokalisiert werden.

Es wurde gezeigt, dass der Cohesin-Komplex und prokaryontisches SMC-Protein die DNA als Ringstruktur binden,^[104,116] indem sie die DNA mit den langen Coiled-Coil-Armen umfassen und die beiden Kopfdomänen durch Interaktion den Ring schließen.^[111]



Im *Bacillus subtilis* wird während der Zellteilung die DNA nach dem Transport in die Mitte der Mutterzelle repliziert und im Anschluss aktiv auf die beiden Zentren der neu entstehenden Tochterzellen verteilt. Der SMC-Komplex ist, abhängig vom Zellzyklus, an verschiedenen Stellen im Bakterium zu finden, was aus Messungen mit konvokaler Fluoreszenzmikroskopie hervorgeht.^[103] Zu Beginn des Zyklus kann er in der Nähe des zentralen Replikationszentrums lokalisiert werden. Nach der Trennung der Chromosomenursprünge in Richtung der Tochterzellen teilt sich der Komplex auf zwei Orte auf, von denen jeder in eine der beiden neuen Tochterzelloberflächen wandert. An diesen Orten kompaktiert der SMC-Komplex die Chromosomen, während diese nach der Replikation aus dem zentralen Polymerase-Komplex freigegeben werden.^[104] Eine genaue Beschreibung, wie der Komplex dies bewerkstelligt, ist noch nicht bekannt.

Abbildung 21: Modell des SMC-Proteins (Dimer).

Die beiden Kopf-Domänen (blau-orange), je bestehend aus der C- und N-Domäne zweier antiparalleler SMC-Peptidketten, sind über zwei flexible Coiled-Coil-Arme mit der Scharnierdomäne (graue Kugel) verbunden.^[114]

5.3.3 Fragestellung

Da die Struktur des SMC-Proteins sehr flexibel ist, war es für elektronenmikroskopische Untersuchungen aufgrund dessen niedrigen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses und des entsprechend geringen Kontrastes in den erhaltenen Bildern ungeeignet. Im Rasterkraftmikroskop können die einzelnen SMC-Protein-Dimere jedoch unter verschiedenen Bedingungen abgebildet werden. So war die Analyse einer postulierten Überstruktur aus vielen SMC-Proteinen möglich.

6. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden rasterkraftmikroskopische Untersuchungen an den drei vorgestellten makromolekularen Proteinkomplexen, dem GroE-System, dem 20S-Proteasom und dem SMC-Protein durchgeführt. Im Folgenden werden die erhaltenen Abbildungen dargestellt und interpretiert.

6.1 GroE-System

6.1.1 GroEL

Zu Beginn standen Versuche zur Immobilisierung des GroEL-Proteins im Vordergrund. Hierzu wurde gereinigtes GroEL (Kapitel 8.4) in einer geeigneten Pufferlösung auf einer Glimmeroberfläche adsorbiert und anschließend im Rasterkraftmikroskop in der Pufferlösung bei Raumtemperatur abgebildet. Dabei kam die eigens konstruierte automatische Setpoint-Regelung (Kapitel 4.2) zum Einsatz, um die Abbildungskräfte beim Tapping so gering wie möglich zu halten.

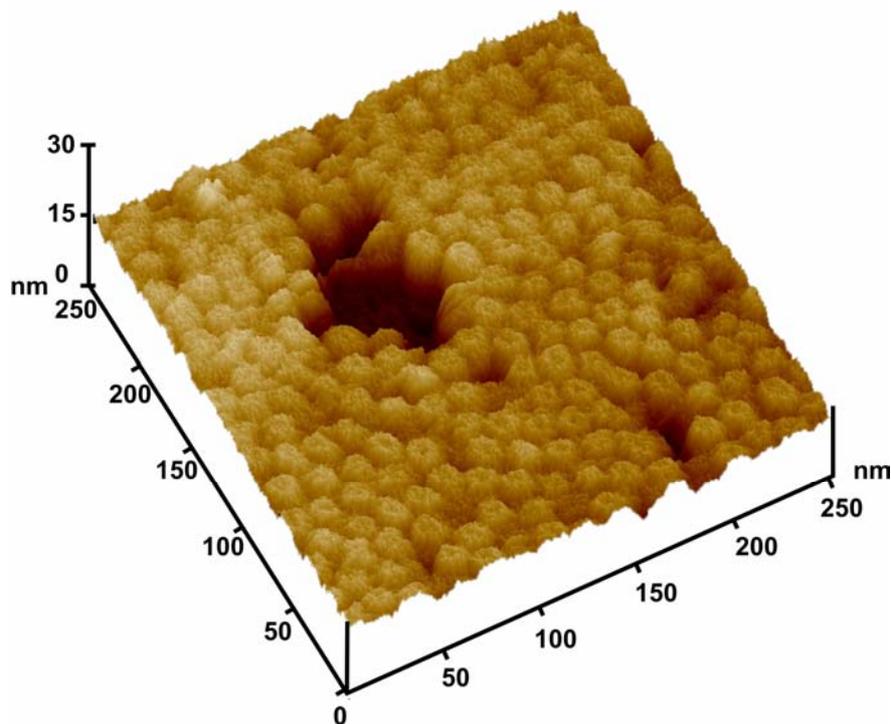


Abbildung 22: AFM-Abbildung von nativem GroEL auf Glimmer.

In der isometrischen Topographieansicht einer Monoschicht von nativem GroEL in TRIS auf Glimmer. Die zentralen Vertiefungen der stehenden GroEL-Zylinder sind zu sehen.

Abbildung 22 zeigt die isometrische Ansicht einer Aufnahme von GroEL im Rasterkraftmikroskop. Wenn das Protein auf Glimmer unter Standardbedingungen (siehe Kap. 8.3) adsorbiert, wird eine Monoschicht aufrecht stehender GroEL Moleküle erhalten. Die Höhe dieser

Schicht konnte über Messungen an nicht komplett geschlossenen Proteinlagen auf 14 nm bestimmt werden. Der obere Durchmesser des sichtbaren Ringes beträgt ebenfalls ca. 14 nm, was gut mit den Daten aus Röntgenkristallographie und Elektronmikroskopie an GroEL übereinstimmt.^[32] Weiterhin können die Poren in Form der zentralen Vertiefung, die jeder Ring trägt, erkannt werden.

Ähnliche AFM-Abbildungen sind bereits aus der Literatur bekannt.^[118-122] Erste Aufnahmen von GroEL sind noch mittels Fixierlösungen wie Glutaraldehyd präpariert worden, was das Protein zwar steifer und damit stabiler für die Abtastung macht, seine biologische Aktivität jedoch zerstört.^[118,119] Später wurde das GroEL ohne Fixierung abgebildet, und sogar als Kalibrierungsprobe für das AFM verwendet.^[120,121] Mit neu entwickelten Cantilevern wurden im Folgenden Bindungskinetiken mit GroES bestimmt.^[122] Die Auflösung des GroEL blieb jedoch relativ niedrig.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte unter Verwendung eines Puffers mit niedrigeren Salzkonzentrationen (TRIS_{low}) die Auflösung des oberen Ringes so weit gesteigert werden, dass die sieben Untereinheiten, die den apikalen Ring ausbilden, erstmals im AFM unterscheidbar waren.

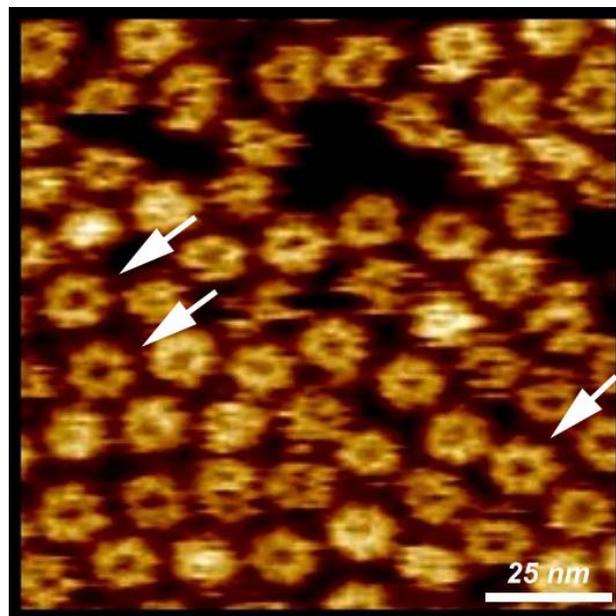


Abbildung 23: AFM-Abbildung von GroEL auf Glimmer.

Abbildung von nativem GroEL in TRIS_{low} auf Glimmer; die Pfeile markieren Partikel mit deutlich sichtbarer, heptamerer Symmetrie (Höhenkala 5 nm).

Weitere Untersuchungen bestätigten jedoch die aus der Literatur bekannte Empfindlichkeit des GroEL für rasterkraftmikroskopische Abbildungen.^[118,120,121] So ist das GroEL aufgrund seiner Doppelringstruktur sehr empfindlich auf laterale Scherkräfte, die auf die Interaktions-

fläche der beiden Ringe wirken. Zu hohe Kräfte bewirken ein Lösen des Zwischen-Ring-Kontaktes. In Abbildung 24 wird gezeigt, wie GroEL mit Hilfe der AFM-Spitze halbiert werden kann. Hierzu wurde in einem später abgetasteten Probenbereich der innere Teil ($250 \times 250 \text{ nm}^2$) mit niedrigem Amplituden-Setpoint abgebildet, was einer leicht erhöhten Kraft entspricht, die auf die Probe wirkt. Im anschließend aufgenommenen Bild mit vollem Scanbereich ($500 \times 500 \text{ nm}^2$) ist zu erkennen, dass im inneren Bereich durch den ersten Abbildungsvorgang eine Veränderung aufgetreten ist. Die sichtbare Vertiefung ist um genau 7 nm abgesenkt, was der halben GroEL Höhe entspricht. Das GroEL ist durch die erhöhte Kraft der Spitze halbiert worden.

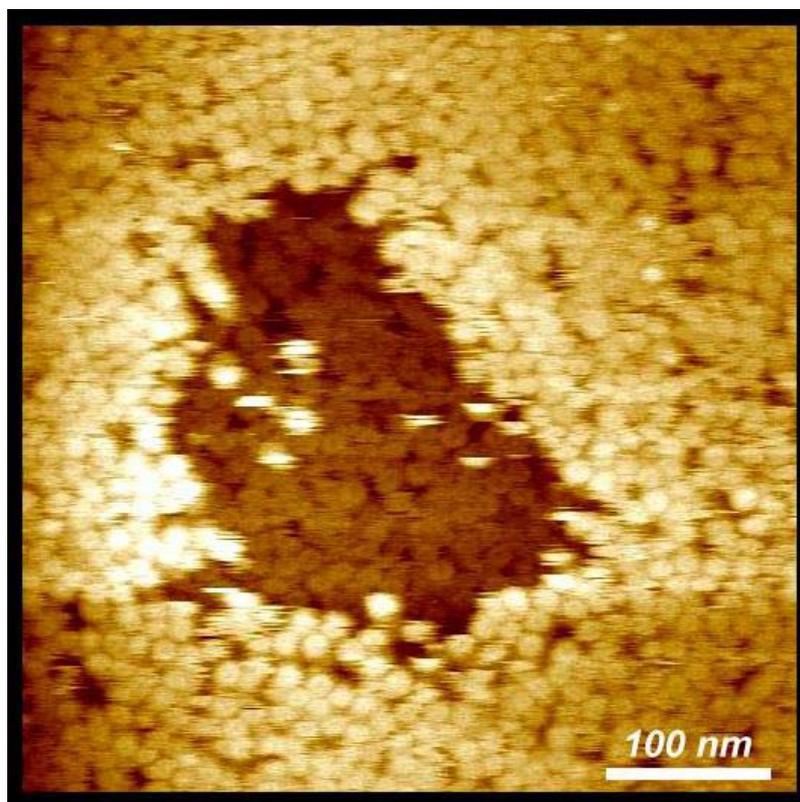


Abbildung 24: AFM-Abbildung von halbiertem GroEL auf Glimmer.

Der zentrale, innere Bereich ($250 \times 250 \text{ nm}^2$) wurde vorher mit niedrigerem Setpoint, d.h. mit erhöhter Kraft abgebildet (Höhenskala 20 nm).

Abbildung 25 zeigt eine Vergrößerung in den Übergangsbereich von ganzen auf halbe GroEL. Hier ist deutlich zu erkennen, dass nicht nur die ganzen GroEL eine zentrale Vertiefung aufgrund des Eingangs zur Faltungskammer tragen sondern interessanter Weise auch die halben Proteine (siehe Pfeile). Die sichtbare Rückseite des halbierten GroEL, bestehend aus den äquatorialen Domänen, besitzt somit ebenfalls eine zentrale Vertiefung von ca. $0,5 \text{ nm}$, bzw. einen Bereich, der leicht von der Rasterkraftspitze eingedrückt werden kann. Aus röntgenstrukturanalytischen Messungen ist der Bereich zwischen den Einzelringen nicht nach-

weisbar.^[32,33,69] Es bleiben 23 Aminosäurereste unaufgelöst, deren Masse auch in Neutronenstreuexperimenten nicht eindeutig lokalisiert werden konnte.^[123,124,125] So ist nicht ersichtlich, ob die beiden Enden der Aminosäurekette den Zwischenraum zwischen den heptameren Ringen vollständig ausfüllen oder sogar in die Kavität hineinragen. Die vorliegenden AFM-Messungen können so interpretiert werden, dass der Raum zwischen den Ringen nicht komplett gefüllt ist.

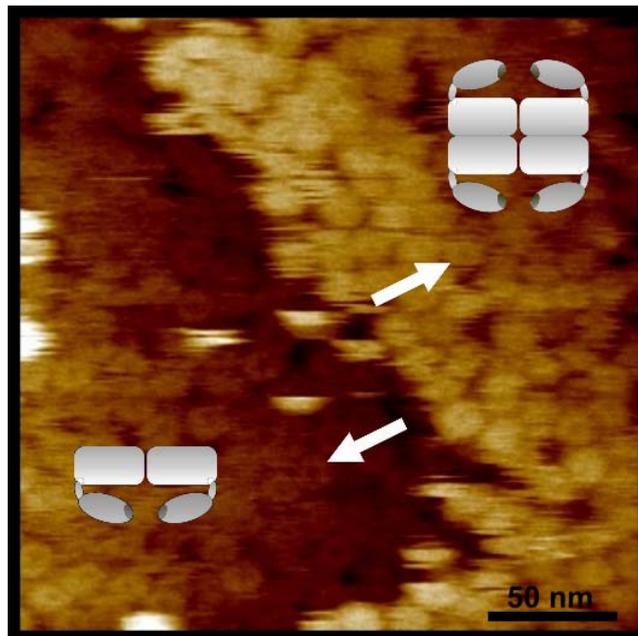


Abbildung 25: AFM-Abbildung von GroEL auf Glimmer - Vergrößerung von Abbildung 24.

Die halbierten GroEL (links) zeigen wie das native Protein (rechts) eine zentrale Vertiefung, was mit Pfeilen angedeutet ist (Höhenskala 20 nm).

Nach Einspülung von ADP und GroES konnte unter Verwendung der automatischen Regelung des Amplituden-Setpoints an der Stelle, an der vorher das GroEL mit der AFM-Spitze halbiert wurde, abgebildet werden. Wie aus Abbildung 26 an der Höhenänderung zu erkennen ist, bindet GroES an das native GroEL, was als helle Punkte sichtbar wird (schwarzer Pfeil), während im vorherigen Bild (Abbildung 25) noch Poren erkennbar waren. Die mit dem Eingang zur Kavität nach unten orientierten GroEL-Hälften binden erwartungsgemäß kein GroES (weißer Pfeil), da ihre Bindungsstellen für das Cochaperonin durch die Adsorption auf den Glimmer nicht zugänglich sind.

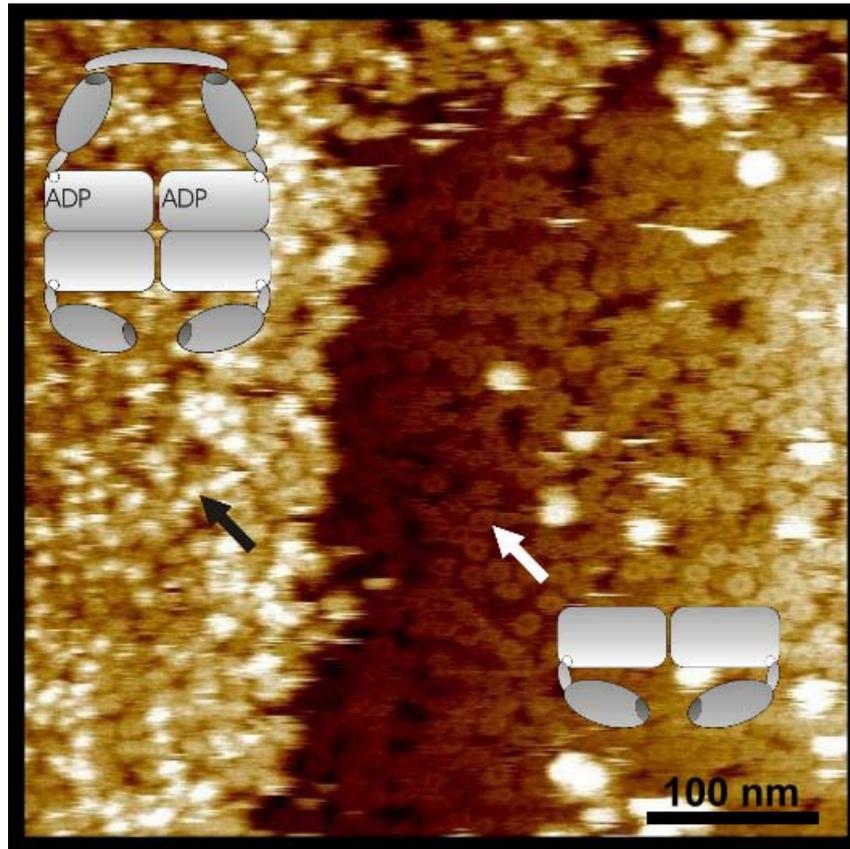


Abbildung 26: AFM-Abbildung von GroEL-GroES-Komplexen neben halben GroEL.
Die GroEL-GroES-Komplexe mit den hellen GroES-Kappen (schwarzer Pfeil) neben den halbierten GroEL (weißer Pfeil), die kein GroES binden können (Höhenskala 15 nm).

Der relativ lockere Zwischenringkontakt bleibt trotz Regelung des Amplituden-Setpoint auf minimale Abbildungskräfte ein Problem für die Abbildung von nativem GroEL. Zwar konnte im vorliegenden Fall eine relativ gute Auflösung auf der geschlossenen Proteinlage erreicht werden, allerdings war dies nicht immer reproduzierbar. Die Probe wird durch mehrmaliges Abbilden kontinuierlich zerstört, wie an dem durch wiederholtes Abbilden vergrößerten Bereich der Beschädigung (Abbildung 24 bis Abbildung 26) sichtbar ist. Dies war für die Beantwortung komplexerer Fragestellungen wie Substratbindung hinderlich.

6.1.2 GroEL-,single ring'-Mutante

Um das im vorherigen Kapitel 6.1.1 beschriebene Problem der Halbierung des nativen GroEL durch die AFM-Spitze zu umgehen, wurden Untersuchungen an der Einringmutante GroEL-SR durchgeführt.

Die GroEL-SR-Mutante unterscheidet sich durch vier Punktmutationen vom GroEL-Wildtyp. Die Mutationen führen zur Ausbildung von heptameren Ringen, diese können aber nicht mehr zum kompletten GroEL dimerisieren.

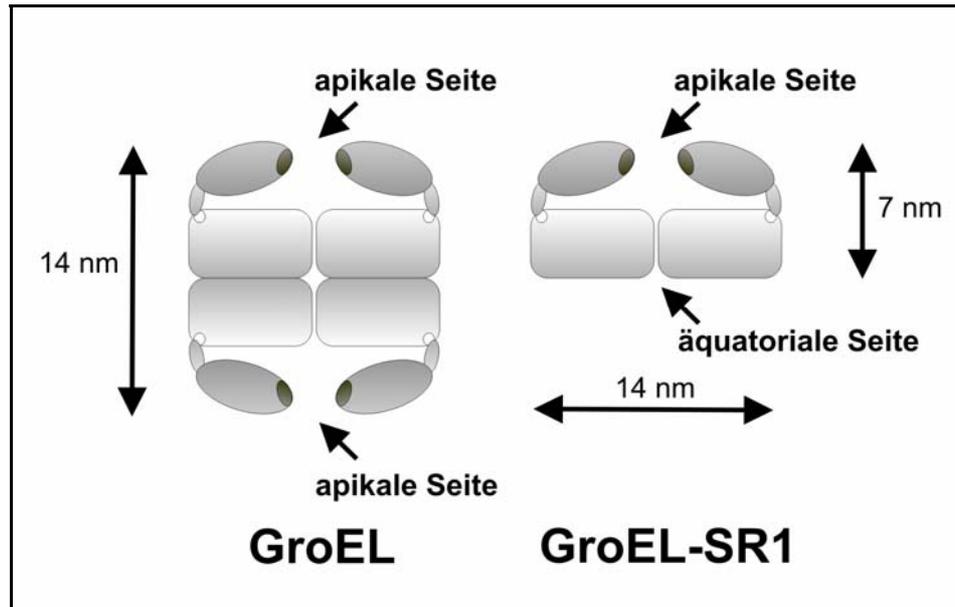


Abbildung 27: Schematische Darstellung von GroEL und GroEL-SR.

Die GroEL-SR-Mutante bildet nur einen heptameren Ring und besitzt somit zwei unterschiedliche Seiten, die apikale und die äquatoriale Seite.

Die Höhe der Proteinschicht reduziert sich von 14 nm beim GroEL auf nur noch 7 nm beim GroEL-SR (Abbildung 27). Dies ist für die Abbildung im AFM von Vorteil, da die Auflösung mit der Verringerung des überspannten Höhenbereichs steigt und beim GroEL-SR die für die Spitze zu überwindenden Stufen geringer werden. Somit ist eine absolut geschlossene Proteinmonolage wie beim GroEL für hohe Auflösungen nicht mehr zwingend notwendig. Zusätzlich hat das entstandene Protein nicht nur eine zugängliche Seite, wie das native GroEL die apikale Seite, sondern liegt bei der Mutante die äquatoriale Seite ebenfalls offen. Wie im Folgenden gezeigt wird, kann der GroEL-SR spezifisch auf unterschiedlichen Oberflächen orientiert werden. Dadurch wird die jeweils nicht bindende Seite für AFM-Untersuchungen zugänglich.

GroEL-SR auf Glimmer

Abbildung 28 zeigt auf Glimmer adsorbierten GroEL-SR, abgebildet in Pufferlösung (Kapitel 8.3) bei Raumtemperatur.

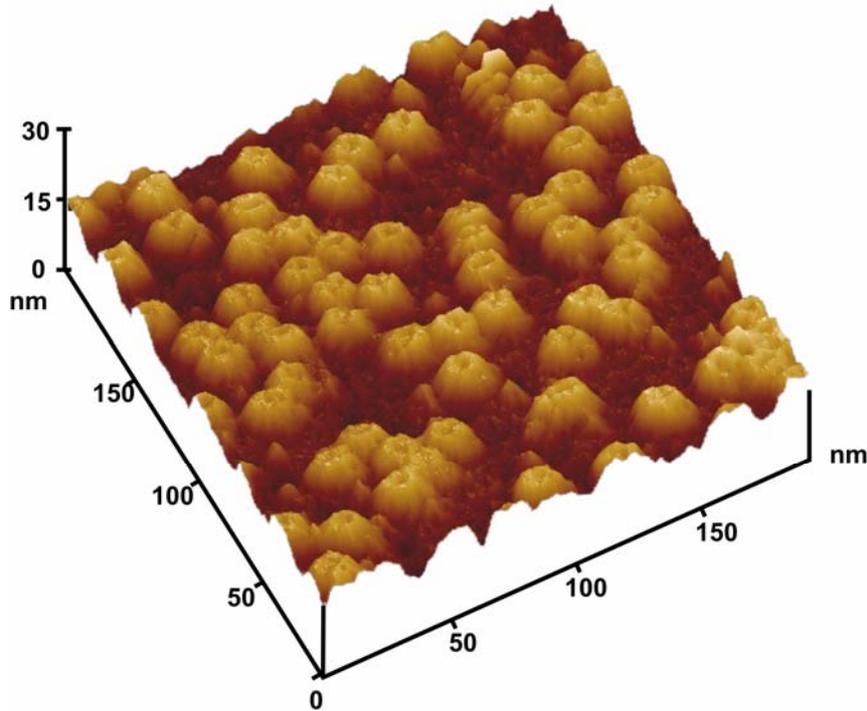


Abbildung 28: AFM-Abbildung von GroEL-SR, adsorbiert auf Glimmer.

Vereinzelte GroEL-SR auf Glimmer in isometrischer Topographieansicht. Die zentrale Vertiefung der ringförmigen Einzelmoleküle ist zu erkennen.

Aufgrund von geringerer Proteinkonzentration liegen die Ringe hier vereinzelt auf der Oberfläche, es können jedoch auch dichte Belegungen erzielt werden (siehe folgende Abbildung 29 (i)). Die Topographie zeigt runde Partikel mit einer Höhe von ca. 7.5 nm und einem Durchmesser des oberen Rands von ca. 14 nm, gleich dem Wert für natives GroEL. Die zentrale Vertiefung ist ebenfalls deutlich zu erkennen. Dieser Form nach zu urteilen, kann auf Glimmer adsorbierter GroEL-SR nicht von nativem GroEL unterschieden werden. Es war aber nicht eindeutig, mit welcher Seite GroEL-SR auf Glimmer adsorbiert, da keine Tapping-Modus-Aufnahmen von der äquatorialen Seite von GroEL vorlagen. Aus biochemischen Untersuchungen war bekannt, dass nicht nur GroEL sondern auch GroEL-SR in Anwesenheit von Nukleotid mit GroES stabile Komplexe bilden.^[126] Deshalb wurden im Folgenden GroES-Bindungsexperimente durch Zugabe von GroES und Nukleotid (ADP oder ATP) zur Orientierungsbestimmung durchgeführt.

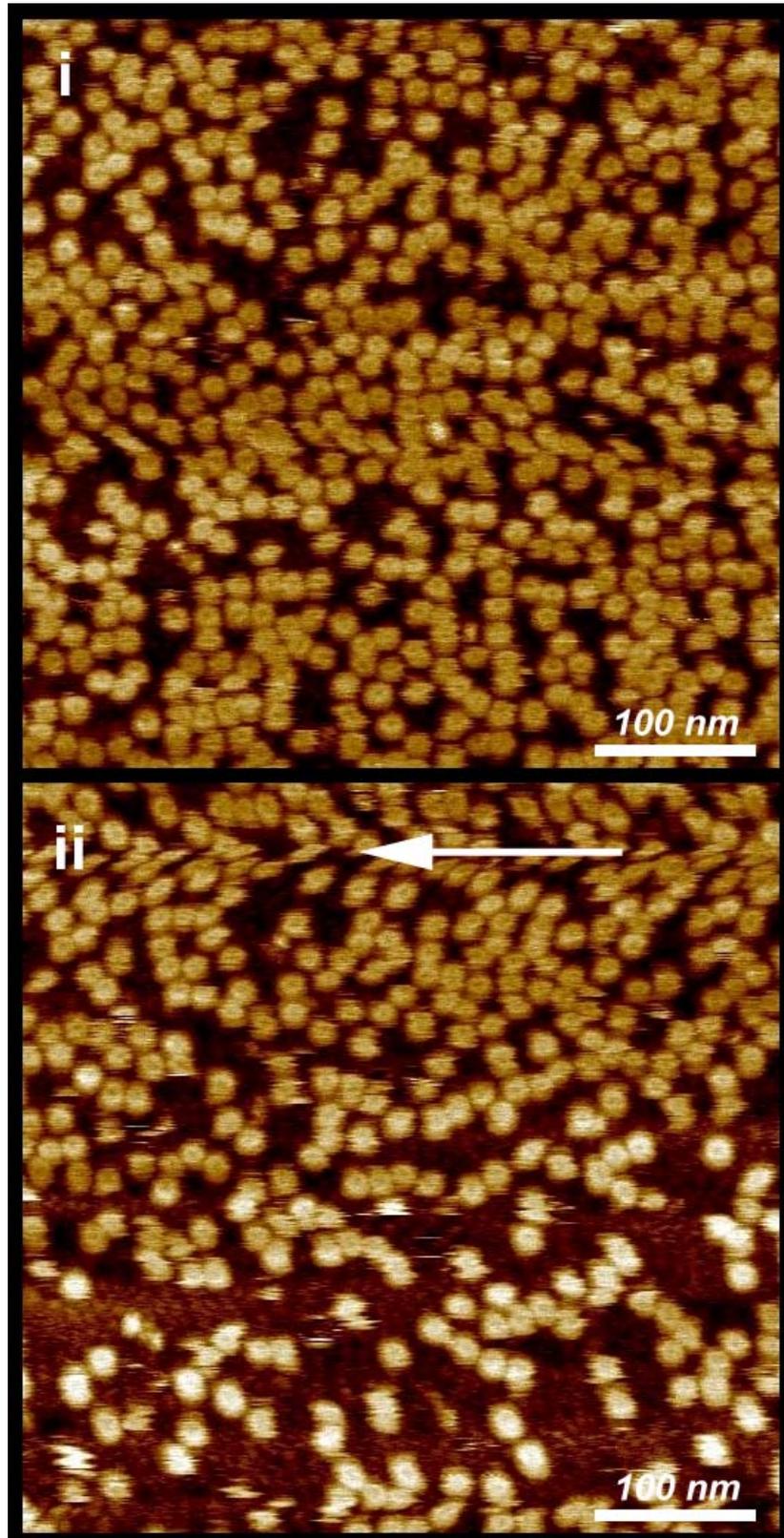


Abbildung 29: AFM-Abbildungen von GroEL-SR auf Glimmer unter Zugabe von ATP und GroES.

(i) Abbildung in Puffer (TRIS, vgl. Kap. 8.7), (ii) ATP und GroES wurden eingespült (weißer Pfeil, langsame Scanrichtung abwärts). In der unteren Hälfte ist die einsetzende Ablösung der GroEL-SR-Proteine von der Oberfläche sichtbar (Höhenskala 10 nm).

Das obere Bild (i) in Abbildung 29 zeigt GroEL-SR adsorbiert auf Glimmer analog zur Abbildung 28. Im unteren Bild (ii), ist nach Zugabe von ATP und GroES zum Abbildungspuffer, eine Ablösereaktion zu erkennen, kurz nachdem das Nukleotid die an der Oberfläche adsorbierten Proteine erreicht hat (untere Hälfte des Bildes). Die Partikeldichte wird deutlich geringer, die Höhe des noch adsorbierten GroEL-SR ändert sich bei Anwesenheit des ATP nicht signifikant. Es ist keinerlei Bindung des Cochaperonin zu erkennen, was sich in einer Höhenänderung von ca. 4 nm äußern würde. Die feineren Punkte im Hintergrund sind auf am Glimmer adsorbierte GroES zurückzuführen.

Die Tatsache, dass die Topographie des GroEL-SR auf Glimmer sehr ähnlich der der halbierten GroEL ist und das native GroEL sich auch mit den apikalen Domänen auf Glimmer orientiert, spricht dafür, dass die Mutante auf Glimmer mit den apikalen Domänen bindet und die äquatoriale Rückseite nach oben präsentiert.

Das Phänomen der Ablösung des GroEL-SR von der Oberfläche in Anwesenheit von ATP, was ohne GroES ebenfalls zu beobachten ist, ist wahrscheinlich auf eine Nukleotid-induzierte Bewegung der apikalen Domänen zurückzuführen. Analog den im Kapitel 5.1.2 diskutierten Konformationsänderungen im Rahmen der Faltung drehen sich die apikalen Domänen zur Bindung des GroES von der Kavität weg, was durch die Orientierung des GroEL-SR auf Glimmer zu einer Ablösung von der Oberfläche führt (vgl. Abbildung 30).

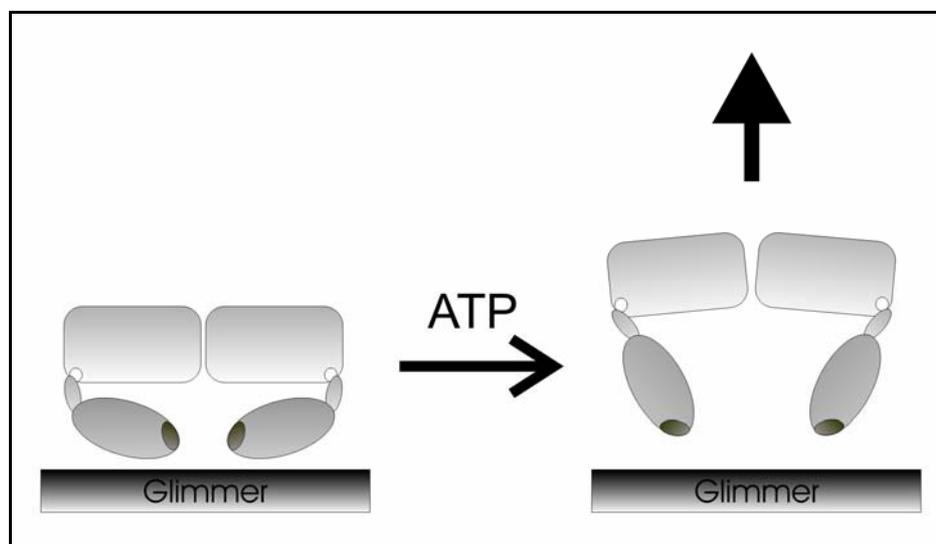


Abbildung 30: Schematische Darstellung der Konformationsänderung von GroEL-SR bei ATP-Zugabe. Die apikalen Domänen des GroEL-SR ändern ihre Konformation bei Zugabe von ATP, was zur Loslösung des Proteins von der Glimmeroberfläche führt.

GroEL-SR auf HOPG

Um den GroEL-SR mit umgekehrter Orientierung als auf Glimmer zu immobilisieren, wurde HOPG (Highly Oriented Pyrolytic Graphite) als Trägermaterial verwendet. Diese Oberfläche ist im Gegensatz zu Glimmer hydrophob und bis auf wenige Stufen atomar glatt. Sauberer HOPG ist wie Glimmer durch Abspaltung der obersten Schicht erhältlich.

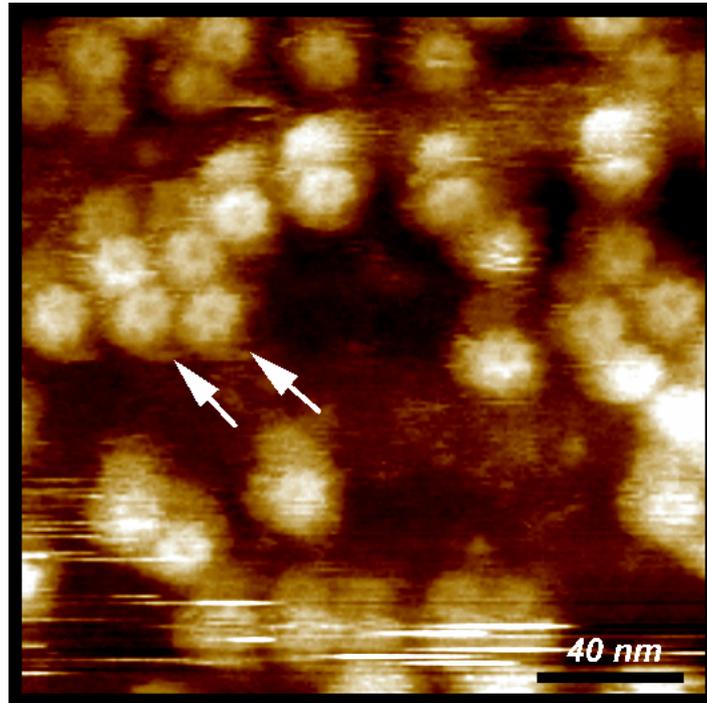


Abbildung 31: AFM-Abbildung von GroEL-SR auf HOPG.

Die Pfeile markieren GroEL-SR, bei denen die sieben Untereinheiten deutlich erkennbar sind (Höhenskala optimiert, ca. 5 nm).

Wird GroEL-SR analog den Bedingungen auf Glimmer (vgl. Abbildung 28) auf HOPG adsorbiert, ist die Oberflächenbelegung geringer (Abbildung 31). Die Dimensionen des GroEL-SR auf diesem Material entsprechen mit 7.5 nm Höhe und 14 nm Durchmesser am oberen Partikelrand, wie zu erwarten war, denen auf Glimmer. Bei genauer Betrachtung wird jedoch bei einigen Partikeln eine siebenfache Unterteilung sichtbar, wie sie bei den apikalen Domänen des nativen GroEL auf Glimmer zu beobachten war. Diese heptamere Form konnte bei der Abbildung von GroEL-SR auf Glimmer, bei dem die apikalen Domänen an die Oberfläche binden, nicht nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine andere Orientierung der Mutante auf HOPG hin. Wenn die Ausrichtung auf diesem Oberflächenmaterial mit den äquatorialen Domänen nach unten ist, sind die apikalen Domänen nach oben gerichtet und stehen für die Bindung von GroES oder Substrat zur Verfügung. Dies würde die geplanten Substratbindungsuntersuchungen ermöglichen.

Um die Zugänglichkeit der apikalen Bindungsstellen zu analysieren, wurde GroEL-SR in Anwesenheit von Nukleotid und GroES im Abbildungspuffer (TRIS) abgebildet. Es konnte eine Bindung des GroES nachgewiesen werden. Die Bildung des GroEL-SR-GroES-Komplexes bei Anwesenheit von ADP oder ATP war aber, anders als erwartet, nicht dauerhaft (Abbildung 32).

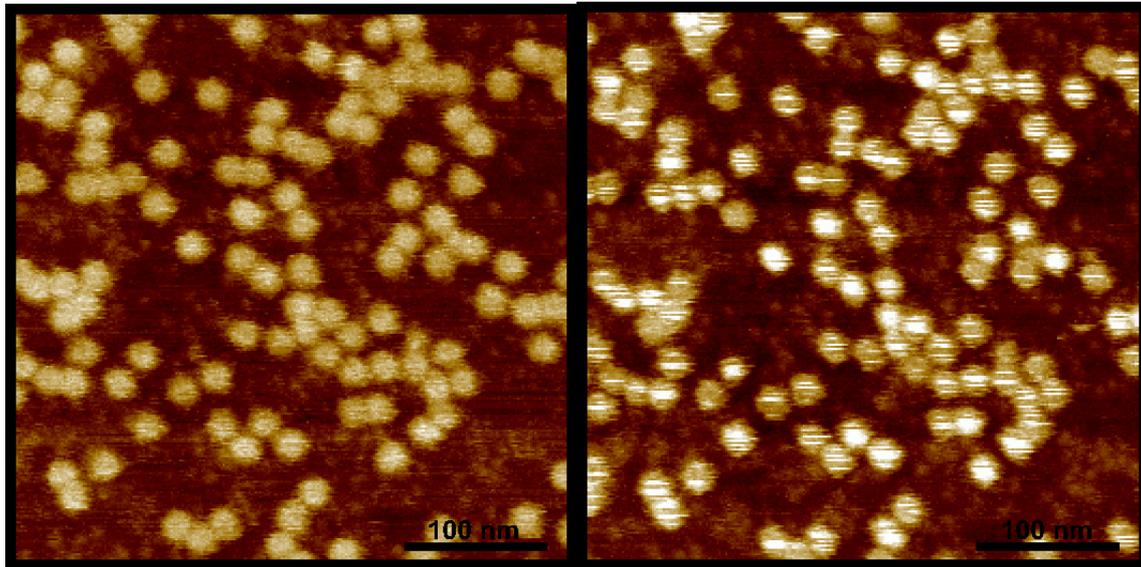


Abbildung 32: AFM-Abbildungen von GroEL-SR auf HOPG unter Zugabe von ATP und GroES. Links in Puffer, rechts unter Zugabe von ATP und GroES zum Abbildungspuffer (TRIS) (Höhenskala 15 nm).

Im linken Bild von Abbildung 32 ist GroEL-SR, adsorbiert auf HOPG, zu erkennen. Die Topographie ist aufgrund einer stumpferen Spitze schlechter aufgelöst als in den vorherigen Abbildungen, was an der nur sehr schwach ausgeprägten zentralen Vertiefung der Mutante zu erkennen ist. Am Übergang vom linken auf das rechte Bild wurden ATP und GroES zum Abbildungspuffer zugegeben. Die hellen Streifen auf dem Protein resultierten aus der Bildung des GroEL-SR-GroES-Komplexes.

Im Gegensatz zum nativen GroEL (Abbildung 26) war die Bindung des Cochaperonin an GroEL-SR nicht dauerhaft, was als beständige Erhöhung sichtbar wäre. Hier wird aber nur während einer Scanzeile das GroES gebunden und in der nächsten Scanzeile hat das Cochaperonin seine Bindungsstelle wieder verlassen. Das Protein verliert dadurch an Gesamthöhe und es entsteht ein dunkler Streifen. Dies kann sich mehrere Male abwechseln, wie in folgender Vergrößerung auf ein einzelnes Protein (Abbildung 33) illustriert wird.

Die hierbei verwendeten Pufferbedingungen entsprachen denen, für die eine stabile Bindung des Cochaperonin an GroEL-SR in Lösung bereits gezeigt wurde.^[126] Für den Zerfall des Komplexes auf HOPG müssen somit andere Ursachen verantwortlich sein.

Einerseits kann durch die Adsorption die Bewegung der äquatorialen Domänen, die essentiell für den kompletten GroEL-Zyklus ist, eingeschränkt sein. Dies könnte die GroES-Bindung am GroEL-SR destabilisieren.

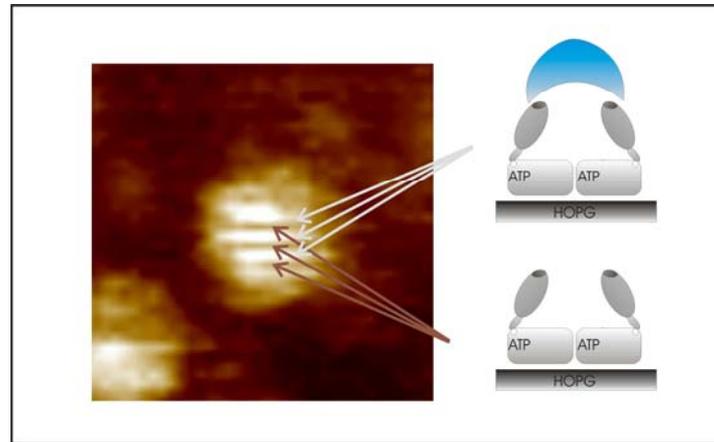


Abbildung 33: AFM-Abbildung eines GroEL-SR-GroES-Komplexes auf HOPG.

Die Pfeile zeigen die Bildung (hell) und Lösung (dunkel) des GroEL-SR-GroES-Komplexes während der Scanzeilen (55x55nm², Höhengskala 15 nm).

Andererseits kann die Abtastung mit der Spitze die GroEL-SR-GroES-Bindung negativ beeinflussen. Die bei der Abbildung auftretenden Kräfte könnten analog Abbildung 24, in der am GroEL Veränderungen gezeigt wurden, den Komplex zerstören. Für diese These spricht, dass auf manchen Bildern (nicht gezeigt) alle GroEL-SR-Proteine bei der ersten Abtastung noch ein Cochaperonin tragen. Das GroES verschwindet erst bei den anschließenden Abbildungsdurchgängen (ähnlich dem aus Abbildung 33). Dies deutet auf eine Abscherung des GroES vom GroEL-SR durch die Spitze hin.

Für quantifizierende Messungen, wie die Aufnahme von Bindungskinetiken auf der Basis von Bilderserien oder wiederholten Zeilenscans, bedeutet das, dass keine artefaktfreien Werte erhalten werden können. Es kann versucht werden, Bindungskonstanten der GroEL-SR-GroES-Komplexbildung zu vergleichen. Hierzu wurden die GroES-Bindung unter Einsatz von zwei verschiedenen Nukleotiden untersucht (Abbildung 34). Um die zeitliche Auflösung der Abbildung der Bindung des Cochaperonin auf der Mutante zu verbessern, wurde ein anderer Abbildungsmodus gewählt. Hierbei wurde während des Scans die langsame Rasterbewegung in y-Richtung angehalten und somit auf derselben Zeile stehen geblieben, um diese wiederholt abzubilden. Die zeitliche Auflösung stieg damit von wenigen Minuten auf ca. eine Sekunde. Die gleichen Proteine einer Zeile wurden wiederholt gescannt. Im entstehenden Bild ist die x-Achse weiterhin eine Ortsachse, die y-Achse wird aber zur Zeitachse des Höhenprofils einer Zeile.

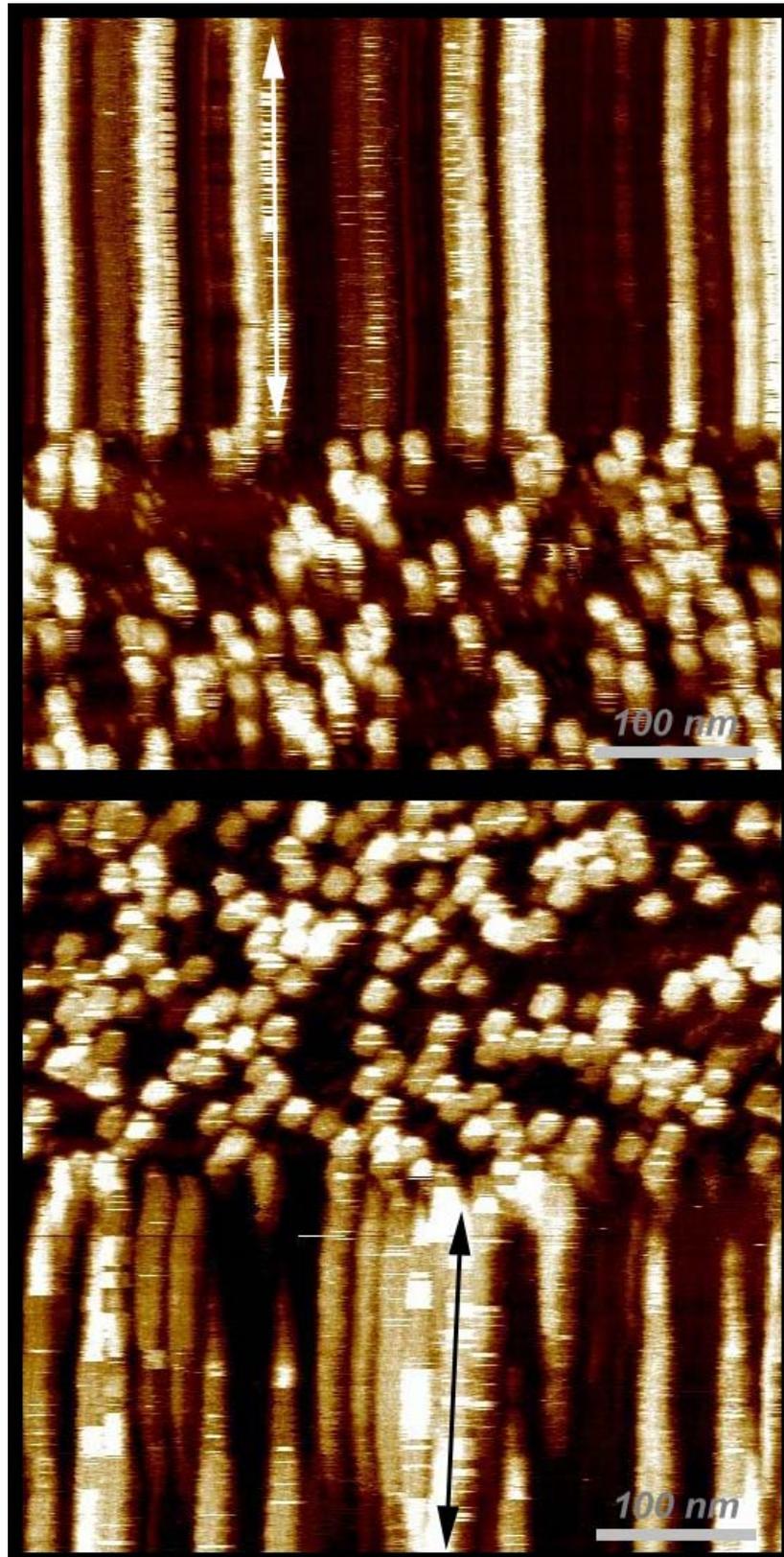


Abbildung 34: AFM-Abbildungen von GroEL-SR-GroES-Komplexen auf HOPG.

Die obere Abbildung ist in Gegenwart von ADP (langsame Scanrichtung nach oben), die untere in Gegenwart von ATP (langsame Scanrichtung nach unten), die langsame Scanbewegung wurde jeweils in der Mitte des Bildes gestoppt (Höhenskala 10 nm).

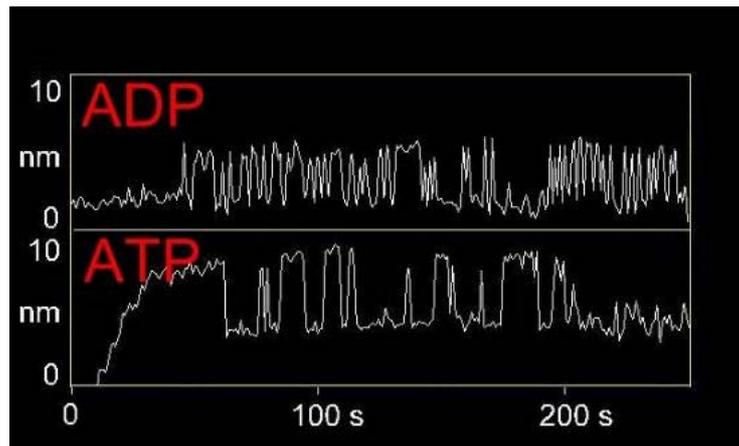


Abbildung 35: Höhenverläufe des GroEL-SR-GroES-Komplexes.

Gezeigt sind die Höhenverläufe an der Position der Pfeile aus Abbildung 34, oben auf dem weißen Pfeil (ADP), unten auf schwarzem Pfeil (ATP). Die konstante Höhenänderung bei GroES-Bindung auf GroEL-SR wird deutlich.

Abbildung 34 zeigt im oberen Bild GroEL-SR auf HOPG unter Zugabe von GroES und ADP im Abbildungspuffer. Das Bild wurde mit langsamer Scanrichtung von unten nach oben aufgenommen. In der Mitte des Bildes wurde die y-Bewegung des Scanners deaktiviert; dieselbe Reihe von GroEL-SR wurde abgebildet, was zu den ‚schlauchähnlichen‘ Bildern führte. Die Fluktuationen in der Höhe konnten so während der Zeit auf einem Protein der gescannten Zeile verfolgt werden. Analog hierzu ist das untere Bild entstanden, wobei ATP als Nukleotid verwendet wurde. Die langsame Scanrichtung war hier von oben nach unten und wurde ebenfalls in der Mitte des Bildes deaktiviert, wobei eine leichte Restbewegung des Scanners in die y-Bewegung blieb. Damit kann erklärt werden, warum die gemessene Zeile leicht von den Proteinen abdriftete und die ‚Schläuche‘ nicht kontinuierlich waren.

In Abbildung 35 wurde der Höhenverlauf von jeweils einem GroEL-SR-Protein aus Abbildung 34 (weißer Pfeil im oberen Bild mit ADP, schwarzer Pfeil im unteren Bild mit ATP) gegen die Zeilennummer, was der Zeit entspricht, geplottet. Die Höhe des Proteins erhöht sich bei Bindung von GroES und wird entsprechend nach Loslösung des Cochaperonins wieder erniedrigt. Die Bindung in Gegenwart von ADP ist nur kurz, das Höhenprofil zeigt Bindungsereignisse in Form von Spitzen. Im Gegensatz hierzu ist die GroEL-SR-GroES-Komplex-Bindung unter ATP deutlich länger, was an den Plateaus im Höhenverlauf erkennbar ist. Dies entspricht einer schwächeren Bindung des GroES bei Anwesenheit von ADP und eines stärkeren, länger bestehenden Komplexes bei ATP im Puffer. Eine Quantifizierung der Bindungskonstanten ist jedoch aus den oben genannten Gründen nicht möglich. Diese Ergebnisse zeigen, dass GroEL-SR auf HOPG mit den äquatorialen Domänen adsorbiert und somit

Zugang zu den apikalen Domänen erlaubte und die Untersuchungen der Substratbindung an GroEL-SR (Kapitel 6.1.3) ermöglichte.

GroEL-SR auf Gold

Als alternative Strategie zur orientierten Immobilisierung von GroEL-SR wurden neben der Ausnutzung hydrophober oder hydrophiler Oberflächeneigenschaften die selektive chemische Bindung in Betracht gezogen. Hierbei bediente man sich der spezifischen Affinität des Schwefels zu Gold, indem im zu immobilisierenden Protein eine exponierte Aminosäure gegen das Schwefel tragende Cystein ausgetauscht wurde. Über die spezifische Gold-Schwefel-Bindung konnte das Protein auf einer glatten Goldoberfläche fixiert werden.

Zur Herstellung extrem glatter Goldoberflächen gibt es verschiedene Methoden. Als gut reproduzierbar hat sich das ‚template stripping‘ erwiesen, bei dem in diesem Fall auf gespaltenen Glimmer aufgedampftes Gold abgezogen wurde, um eine für die Rasterkraftmikroskopie geeignete Oberfläche zu erhalten.^[127] Abbildung 36 zeigt die Topographie einer so hergestellten Goldoberfläche mit Rauigkeiten um 2 nm, die für GroEL-SR-Untersuchungen gut geeignet sind.

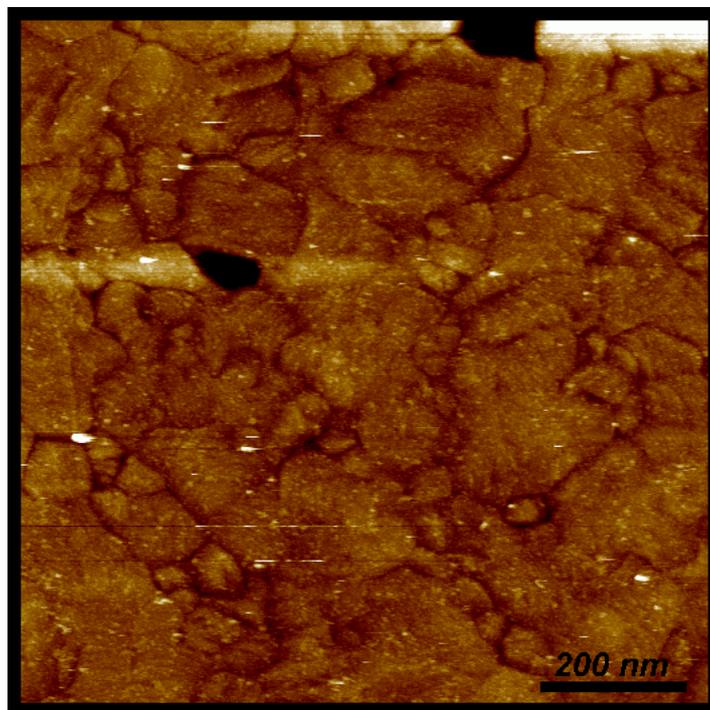


Abbildung 36: AFM-Abbildung der Maserung einer ‚template stripped‘-Goldoberfläche. Bei Goldschichten, die von Glimmer abgezogen werden, bleiben Rauigkeiten von ca. 2 nm (Höhenskala 5 nm).

Ziel der Immobilisierung war die Untersuchung der Substratbindung. Hierfür ist eine Bindung mit den äquatorialen Domänen auf dem Träger notwendig, um Zugang der Tastspitze zu den

apikalen Bindungsdomänen zu ermöglichen. Somit mussten Aminosäurereste aus dem exponierten Bereich, der normalerweise die äquatoriale Schnittstelle zum *trans*-Ring bildet, zu Cystein mutiert werden. Ein Ring besteht aus sieben identischen Untereinheiten, daher genügte eine Punktmutation, um mit sieben potentiellen Bildungsstellen sicheren Halt auf der Oberfläche zu gewährleisten. Abbildung 37 illustriert die Anordnung der mutierten Reste innerhalb der äquatorialen Domäne.

Im Rahmen der Arbeit wurden von GroEL-SR die Cystein-Mutanten A109C und A464C aufgereinigt (Kapitel 8.4), die freundlicherweise von Karin Felderer und Susanne Witt kloniert und exprimiert worden waren, und im Rasterkraftmikroskop abgebildet. Zuerst wurde die korrekte Assemblierung zu heptameren Ringen durch Abbildung auf Glimmer nachgewiesen. Die genannten Mutanten waren deutlich als runde Partikel mit ca. 14 nm Durchmesser und einer zentralen Vertiefung, analog den Abbildungen von GroEL-SR auf Glimmer (nicht gezeigt), zu erkennen.

Anschließend wurden die Präparationen auf Gold abgebildet. Trotz genügend hoher Konzentration (vgl. Kapitel 8.3) sind nur wenige ringförmige Partikel von GroEL-SR_{A109C} auf Gold zu erkennen (Abbildung 38).

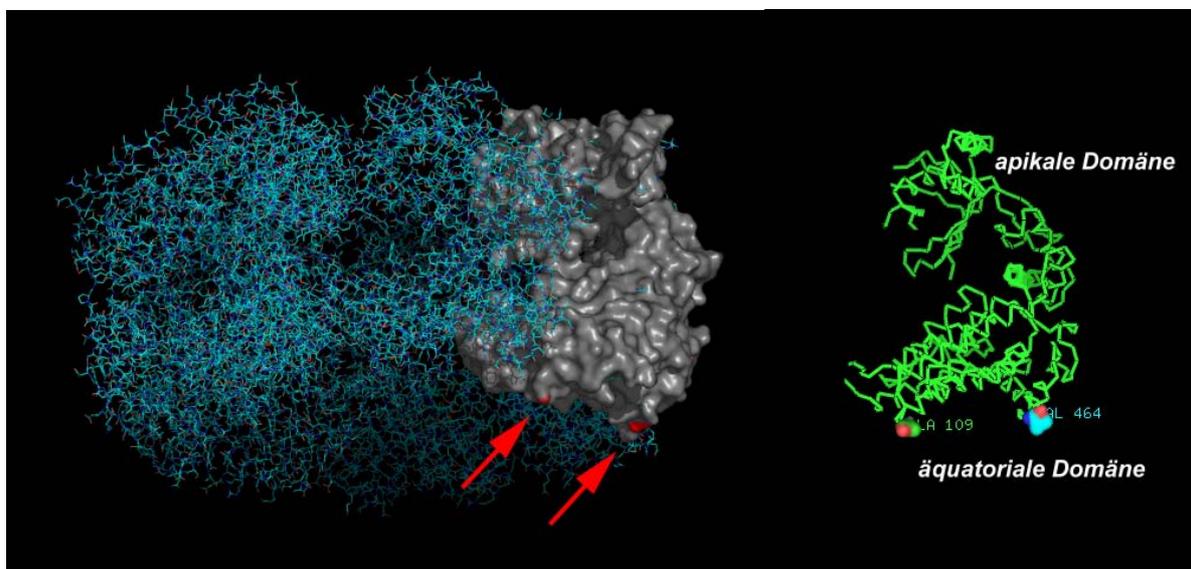


Abbildung 37: Anordnung der Cystein-Mutationen im GroEL-SR.

Im linken Bild wurde in der GroEL-SR-Kristallstruktur, die leicht nach oben gekippt ist, bei einer Untereinheit (grau) die mutierten Aminosäurereste (rot) markiert; im rechten Bild ist eine einzelne Untereinheit mit den beiden Mutationsstellen dargestellt; die Darstellung wurde mittels PyMOL angefertigt.

Der Hintergrund ist mit einer Vielzahl von kleineren Objekten übersät, die wahrscheinlich den Untereinheiten des Ringes entsprechen. Das Vorhandensein freier Untereinheiten konnte aufgrund einer vorher durchgeführten Gelfiltration ausgeschlossen werden. Es ist zu vermu-

ten, dass die GroEL-SR_{A109C} zwar mit dem Schwefel auf Gold binden, dies aber zu einer Spannung im Ring führt und die Komplexe zerstört werden.

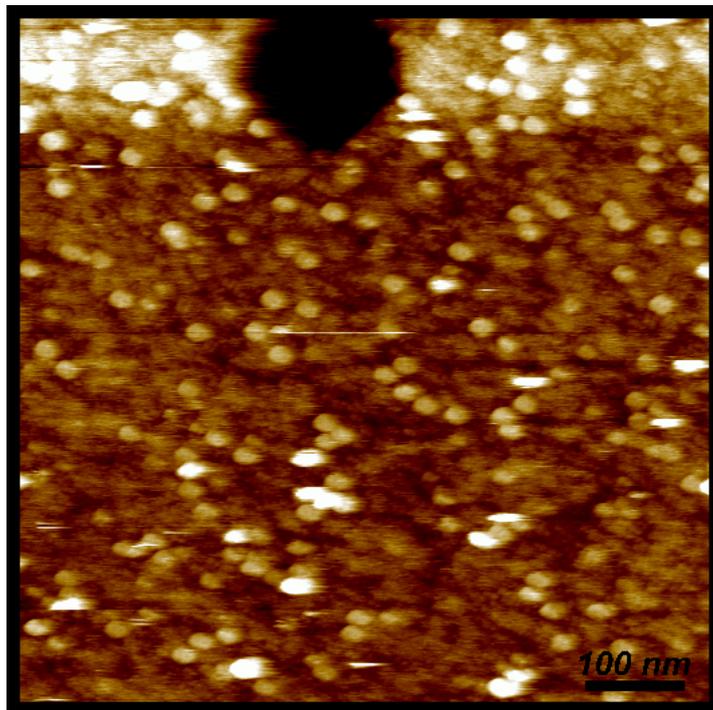


Abbildung 38: AFM-Abbildung von GroEL-SR_{A109C} auf Gold.

Auf Gold adsorbiertes GroEL-SR_{A109C} zerfällt meistens in seine Untereinheiten, die den Hintergrund bedecken (Höhenskala 20 nm).

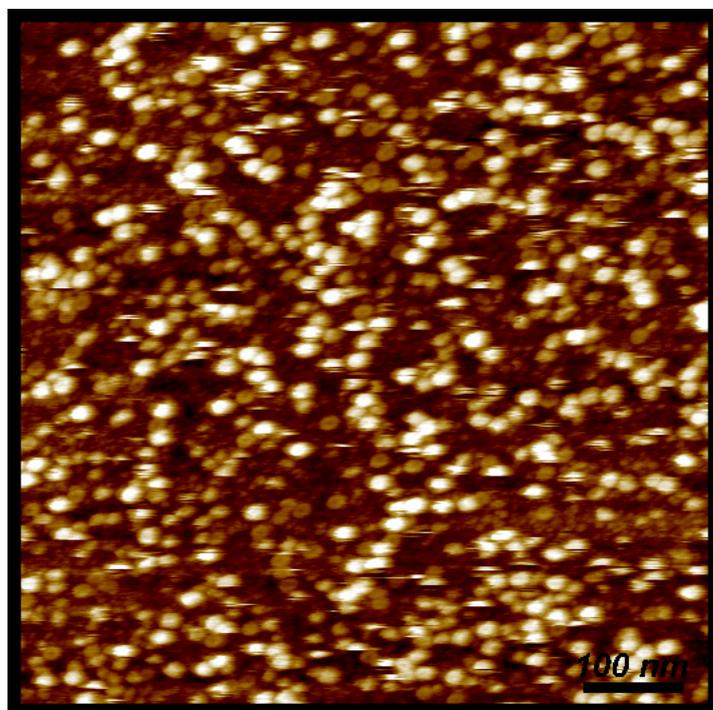


Abbildung 39: AFM-Abbildung von GroEL-SR_{A464C} auf Gold.

Auf Gold adsorbiertes GroEL-SR_{A464C} zerfällt ebenfalls in seine Untereinheiten, zeigt aber auch GroEL-SR_{A464C}-Doppelstrukturen (Höhenskala 20nm).

Die GroEL-SR_{A464C}-Mutante, die auf Glimmer ebenfalls gut und in heptamerer Form abzubilden war, konnte auf Gold nur als inhomogene Probe identifiziert werden (Abbildung 39).

Zusätzlich zu monomeren Untereinheiten scheint ein Teil des Proteins in einer Form artifiziellen Doppel-GroEL-SR vorzuliegen (siehe Abbildung 39, hellere Partikel), wobei zwei GroEL-SR zu einem GroEL über Cysteinbrücken dimerisiert sind. Die Dimerisierung konnte aufgrund der Symmetrie auch unter Verwendung von reduzierenden Pufferbedingungen (TRIS_{DTT}) nicht vermieden werden.

Im Weiteren wurde aus den oben genannten Gründen der Instabilität der Cystein-Mutanten auf Gold auf weitere Untersuchungen zur Substratbindung und Abbildung der GroEL-SR-Mutanten verzichtet.

6.1.3 Substrat-Komplexe

Zur Abbildung von Substratbindung am GroEL wurden eine Reihe von Substratproteinen verwendet. Folgende Tabelle gibt Aufschluss über Name, Größe, Denaturierungsmethode und Hersteller der eingesetzten Proteine.

Tabelle 2: Zusammenstellung der Substratproteine nach steigender Monomergröße.

Aufgeführt sind alle eingesetzten Substratproteine nach steigender Monomergröße, die verwendeten Denaturierungsmethode und die Bezugsquelle; die mit (*) markierten Proteine wurden freundlicher Weise von Tobias Maier, Abt. Zelluläre Biochemie, Prof. Hartl, zur Verfügung gestellt.

Substrat	Monomergröße	Gesamtgröße	Denaturierungsmethode	Hersteller
Malatdehydrogenase (mtMDH)	35 kDa	105 kDa	Thermisch (30 Min 47°C)	Sigma
Citratsynthase (CS)	49 kDa	98 kDa	Thermisch (30 Min 42°C)	Sigma
Ribulosebiphosphat Carboxylase (Rubisco)	55 kDa	110 kDa	Chemisch 6 M GuCl	eigene Expression + Reinigung
Firefly Luciferase (Luc)	62 kDa	62 kDa	Thermisch (10 Min 42°C)	eigene Expression + Reinigung
Threonyl-tRNA-Synthetase (SYT)	74 kDa	74 kDa	Chemisch 6 M GuCl	aus Kooperation*
Homocystein-Methyltransferase (MetE)	84,5 kDa	84,5 kDa	Chemisch 6 M GuCl	aus Kooperation*

Von den kommerziell erhältlichen, kleineren Substraten (CS, mtMDH), die als Modellsubstrate für die Bindung an GroEL verwendet werden, ist eine gute Ausbeute des GroEL-Substrat-Komplexes bekannt.^[71,88] Für bessere Detektion im AFM mussten die Substrate mit höherer Masse eingesetzt werden. Diese Substrate (Luc, Rubisco) wurden über Expression

und chromatographische Aufreinigung hergestellt (Kapitel 8.4). Die großen Substratproteine (SYT, MetE) wurden freundlicher Weise vom Kooperationspartner (Tobias Maier, Abt. Zelluläre Biochemie, Prof. Hartl) zur Verfügung gestellt.

6.1.3.1 Bindung kleiner Substrate (< 57 kDa)

Die GroEL-SR-Substrat-Komplexe mit Citratsynthase und Luciferase wurden durch thermische Denaturierung der Substrate unter Anwesenheit des Chaperonin und anschließender chromatographischer Aufreinigung für die Messungen im Rasterkraftmikroskop vorbereitet (Kapitel 8.3). Hierbei kann lediglich nicht umgesetztes Substrat, nicht aber leere GroEL-SR von den Komplexen abgetrennt werden. Deshalb wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Nachweis der Komplexe angestrengt.

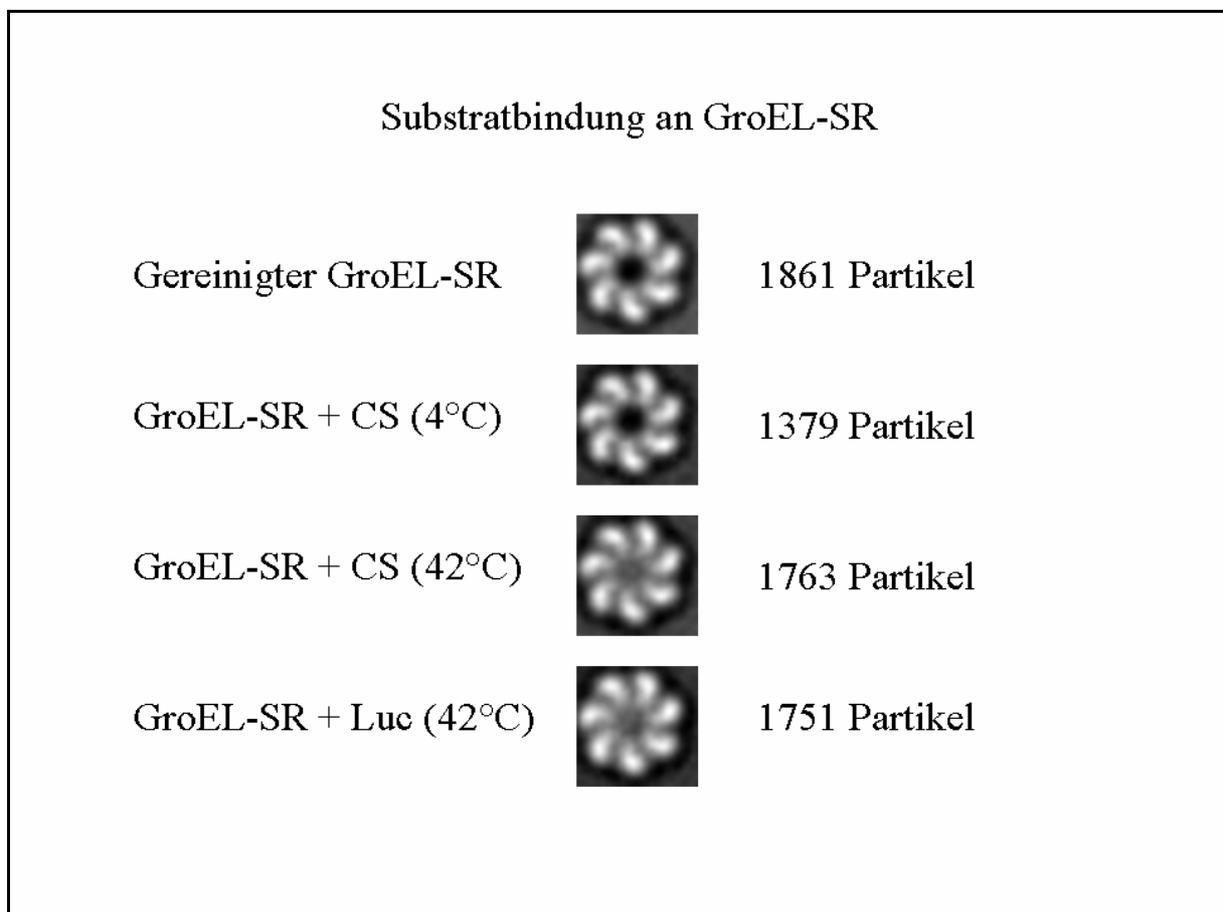


Abbildung 40: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Substratbindung an GroEL-SR.

Elektronenmikroskopische Mittelungen von gereinigtem GroEL-SR und im Komplex mit verschiedenen Substraten. Die Mittelungen stammen aus negativ kontrastierten Aufnahmen.

Hierzu wurden von gereinigtem GroEL-SR und von Komplexen mit verschiedenen Substraten negativ kontrastierte elektronenmikroskopische Aufnahmen bei 28000-facher Vergrößerung angefertigt, in den erhaltenen Bilddaten Proteinpartikel manuell oder semiautomatisch ausge-

wählt und eine Mittelung erstellt (Abbildung 40, Kapitel 8.5). Diese gibt Auskunft über das durchschnittliche Aussehen aller Partikel, das sich im Falle eines Komplexes durch eine zusätzliche zentrale Masse von freien Chaperonin unterscheiden sollte.

Es ist zu erkennen, dass gereinigter GroEL-SR ohne Substrat eine niedrige zentrale Dichte aufweist, was sich durch den dunklen Punkt in der Pore äußert. Dieser ist ebenfalls sichtbar, wenn GroEL-SR mit nicht denaturiertem Substrat, hier nativer Citratsynthase bei 4°C versetzt wird. Es wird kein Komplex gebildet und die Faltungskammer der Mutante bleibt leer. Wird die Citratsynthase jedoch bei 42°C in Anwesenheit von GroEL-SR thermisch denaturiert, bildet sich ein Komplex, der sich im Elektronenmikroskop durch eine zusätzliche, zentrale Masse in der Mittelung äußert. Ein so deutlicher Unterschied lässt auf eine gute Ausbeute bei der Komplexbildung schließen, da bei Veränderung von nur wenigen Partikeln der Mittelwert kaum beeinflusst wird.

Im Rasterkraftmikroskop auf Glimmer adsorbieren die GroEL-SR-Substrat-Komplexe analog der leeren Mutante mit der apikalen Seite. Die äquatoriale Seite lässt sich analog Kapitel 6.1.2 abbilden und zeigt immer noch ihre zentrale Vertiefung. Dieser Bereich wird also durch die Bindung von Substrat nicht beeinflusst (Abbildung 41, untere Hälfte).

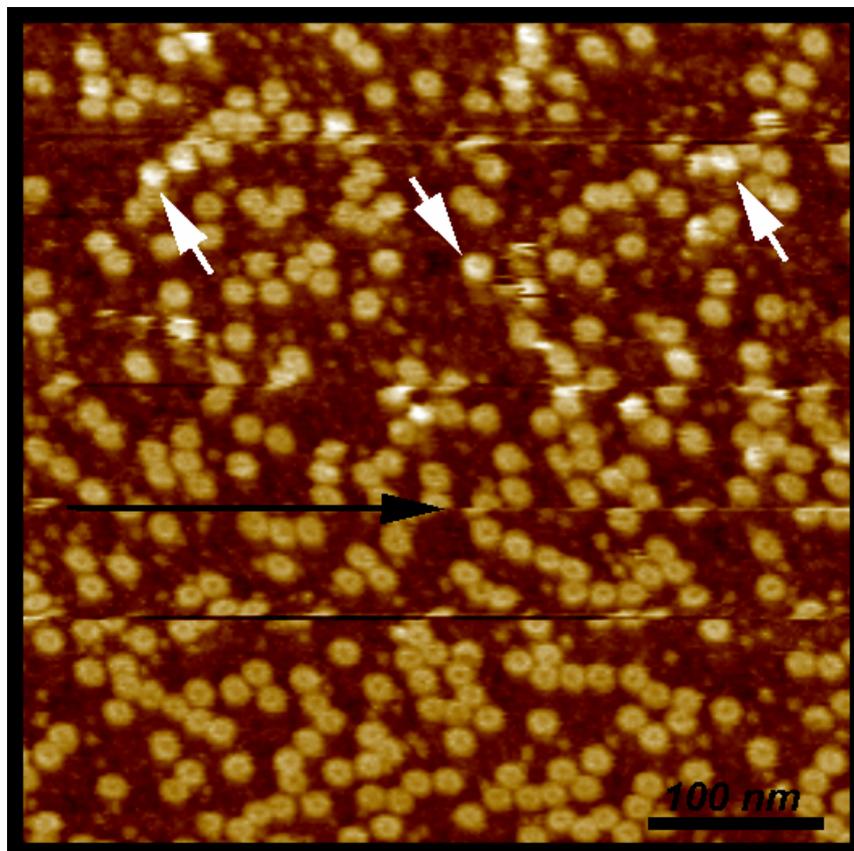


Abbildung 41: AFM-Abbildung von GroEL-SR-CS-Komplexen auf Glimmer.

Unter Zugabe von ATP zum Abbildungspuffer (oberhalb des schwarzen Pfeils) zeigen sich asymmetrisch hellere Partikel (weiße Pfeile) (Höhenskala 12 nm).

Wird jedoch, wie in Abbildung 41 oberhalb des schwarzen Pfeils sichtbar, ATP enthaltender Puffer zugegeben, so weisen die vorher konstanten Höhen der GroEL-SR jetzt Variationen auf. Während einige Ringe ihre Höhe nicht verändern, werden andere asymmetrisch heller (weiße Pfeile in Abbildung 41), was auf einen deutlichen Anstieg der vertikalen Abmessung schließen lässt. Abbildung 42 zeigt eine Vergrößerung auf wenige Einzelmoleküle von GroEL-SR-CS-Komplex. Vom linken ins rechte Bild wurde ATP zugegeben, worauf einer der Komplexe eine deutliche Vergrößerung seiner Höhe aufzeigt (grauer Pfeil).

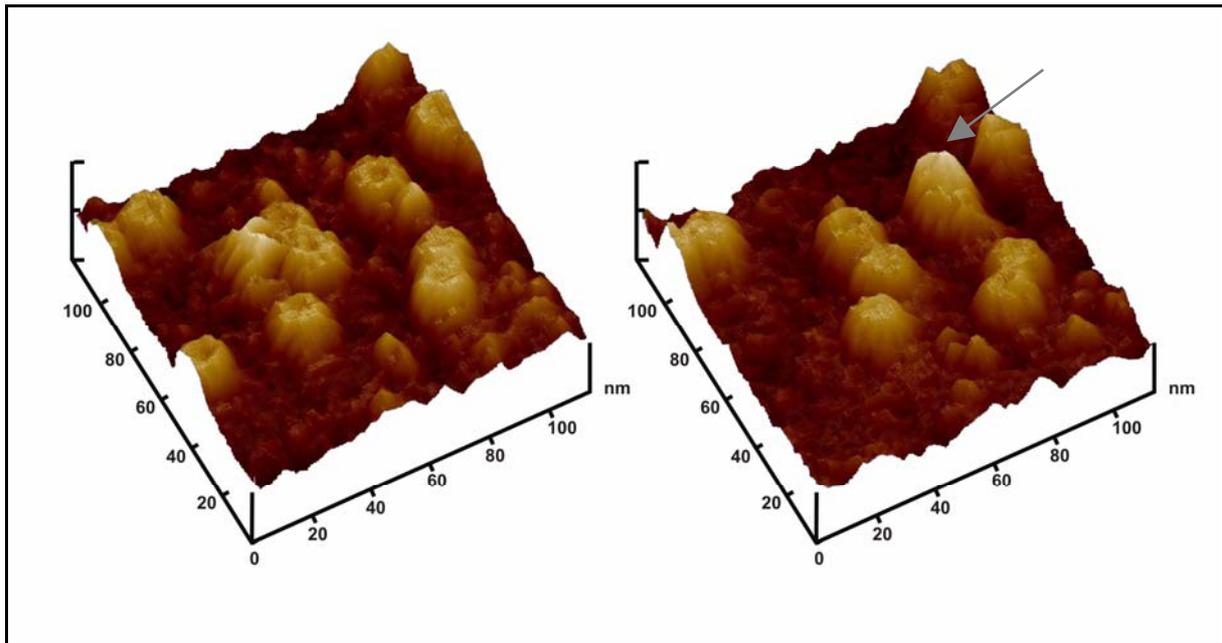


Abbildung 42: AFM-Abbildungen eines GroEL-SR-CS-Komplexes unter Zugabe von ATP.
Der GroEL-SR-CS-Komplex vor (links) und nach (rechts) der Zugabe von ATP zum Abbildungspuffer.

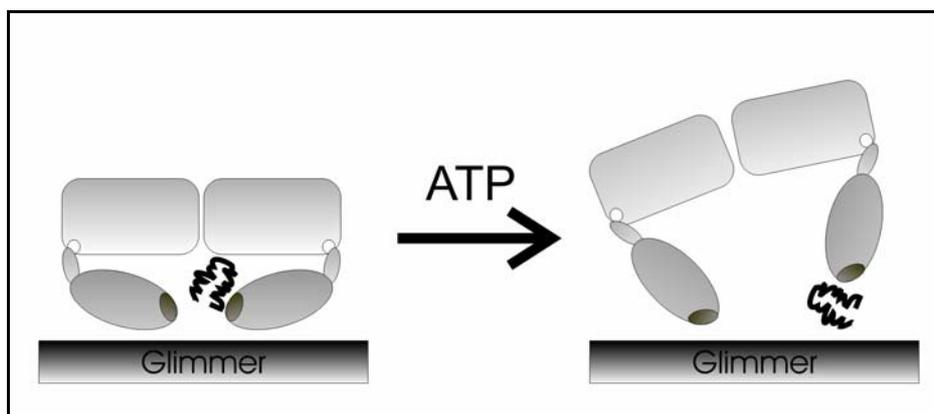


Abbildung 43: Schematische Darstellung der Konformationsänderung des GroEL-SR-CS-Komplexes.
Zugabe von ATP zu GroEL-SR-Substrat-Komplexen, adsorbiert auf Glimmer, führt zu einem asymmetrischen Aufkippen der Komplexe.

Die Beobachtung der höheren Partikel lässt sich mit einer zu der Abbildung 30 analogen, durch Nukleotid induzierte Konformationsänderung erklären, bei der die apikalen Domänen von der Pore weg rotieren. Da im Falle der Komplexe noch Substrat an die Bildungsstelle gebunden ist, wird der GroEL-SR leicht aufwärts gekippt (vgl. Abbildung 43), was zu der asymmetrischen Form führt. In dieser Konstellation des GroEL-SR auf Glimmer kann die Substratbindung somit nur indirekt abgebildet werden und ist für genauere Untersuchungen ungeeignet. Speziell für die direkte Abbildung der Substratbindung ist die umgekehrte Orientierung mit Zugang zur apikalen Domänen unerlässlich. Wie oben beschrieben, kann dies mit HOPG als Trägermaterial realisiert werden. Unter Verwendung von kleinen Substraten wie CS konnte kein an GroEL-SR gebundenes Substrat direkt abgebildet werden. Der Grund liegt gerade in der Größe der Substrate, die mit unter 57 kDa nicht aus der Pore des GroEL herausragen, da sie die Faltungskammer nicht einmal komplett ausfüllen. Bei der Abbildung im Rasterelektronenmikroskop kann die Spitze nur den Eingangsbereich der Höhlung abtasten, das Innere der Pore aber nicht erreichen. Die Verwendung von kleinen Substraten führte, trotz guter Komplexausbeuten (vgl. Abbildung 40), nicht zur eindeutigen Abbildung und es wurden im Folgenden größere Proteine als Substrate eingesetzt.

6.1.3.2 Bindung großer Substrate (> 57 kDa)

Als Ergebnis einer systematischen Studie über native GroEL-Substrate in *E. coli*, die von Houry et al. durchgeführt worden war, wurde eine ganze Reihe von Substraten im Molekulargewichtsbereich von wenigen kDa bis ca. 100 kDa gefunden.^[128] Die meisten Proteine konzentrieren sich im Bereich von 25 bis 60 kDa. Darüber nimmt ihre Anzahl stark ab, was vermutlich auf die Größe der Pore zurückzuführen ist, die Substrate bis ca. 57 kDa einschließen kann.

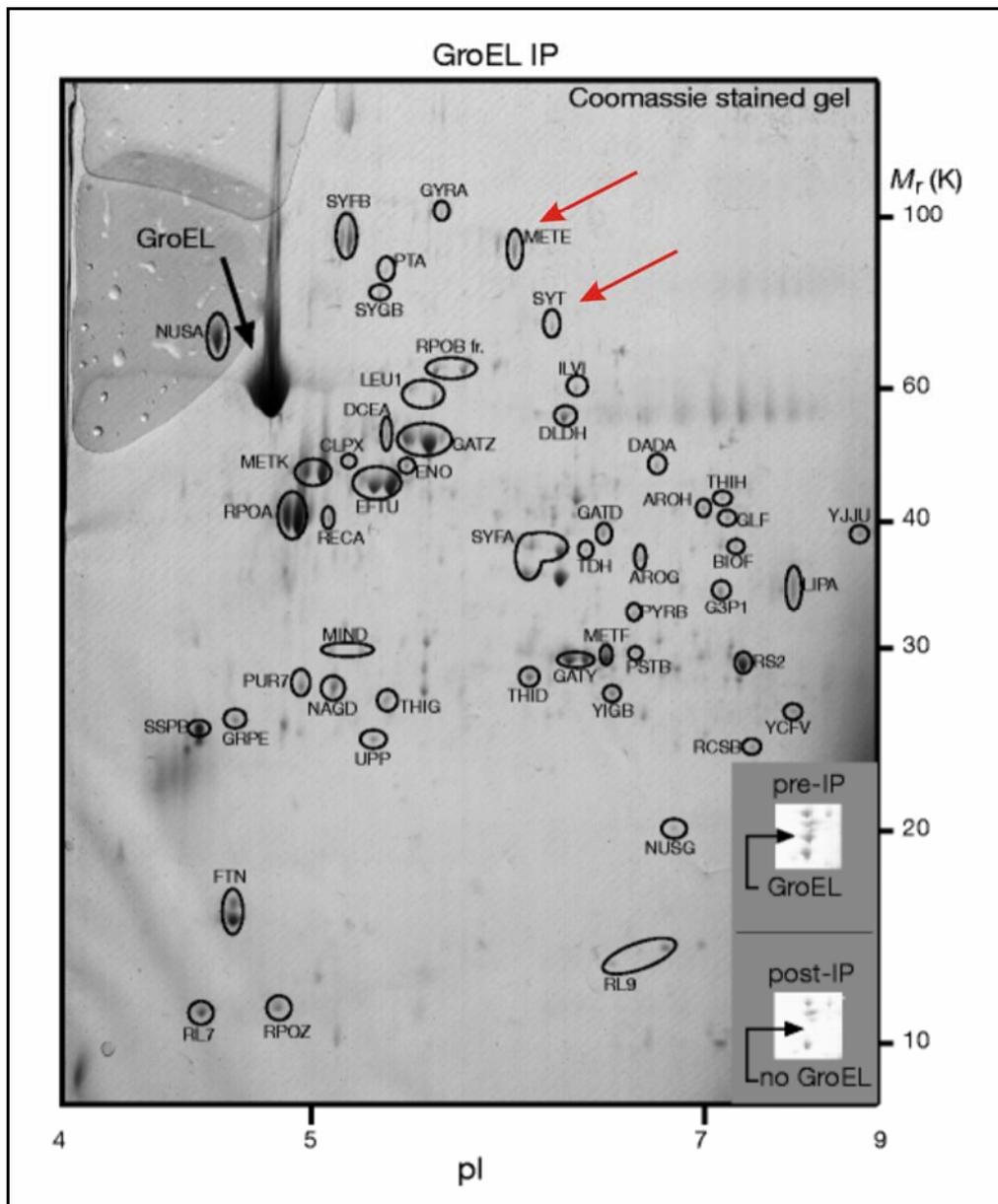


Abbildung 44: 2D-Gel identifizierter nativer Substrate von GroEL.

Gefärbtes 2D-Gel von GroEL mit seinen natürlichen Substraten aus *E. coli*; Trennung in x-Achse nach isoelektrischer Fokussierung und in y-Achse nach Molekulargewicht.^[128]

Für die Abbildung der Substratbindung am GroEL-SR im Rasterkraftmikroskop muss die Masse des Substrats mindestens so groß sein, dass die Kavität ganz ausgefüllt und deshalb als Pore nicht mehr sichtbar ist. Im Bereich über 70 kDa konnten von Houry et al. SYT, SygB, PTA, MetE, SyfB und GyrA an GroEL-Substraten in *E. coli* identifiziert werden.^[128] Zwei von ihnen, SYT und MetE, wurden von Tobias Maier (Abt. Zelluläre Biochemie, Prof. Hartl) kloniert, überexprimiert und aufgereinigt. Sie standen zu Bindungstests im Rasterkraftmikroskop zur Verfügung. Mit 74 kDa (SYT) und 84,5 kDa (MetE) sind diese Substrate so groß, dass sie deutlich über dem Kavitätsvolumen von GroEL liegen. Sie sollten selbst bei idealer Bindung von GroEL aus der Pore herausragen. Ungeklärt ist, wie diese Proteine von GroEL gebunden und ob sie noch wie kleine Substrate von GroES eingekapselt werden, d.h. ob das Cochaperonin noch an die apikalen Domänen binden kann. Diese Frage sollten mit dem GroEL-SR-System auf HOPG beantwortet werden.

Zu Beginn stand, analog den Untersuchungen an kleinen Substraten, die Analyse der Effizienz der Substratbindung mittels Elektronenmikroskopie. Nach Denaturierung der Proteine mittels Guanidiniumchlorid und Zugabe von GroEL wurden von den gereinigten Komplexen EM-Aufnahmen angefertigt und eine Mittelung von Partikeln erstellt. Es war bekannt, dass SYT und MetE niedrige Bindungseffizienzen zu GroEL aufweisen, was sich in den Mittelungen bestätigte, die nicht von ‚leeren‘ GroEL zu unterscheiden waren. Um trotzdem die Existenz von wenigen ‚gefüllten‘ Partikeln nachzuweisen, wurde ein anderes Verfahren verwendet. Bei der multivariaten statistischen Analyse (multivariate statistical analysis, MSA) wird die Gesamtheit der Partikel mittels Eigenwertzerlegung in so genannte selbstähnliche Klassen aufgeteilt. Die erhaltenen Eigenwerte beschreiben die wesentlichen Hauptkomponenten und Unterscheidungsmerkmale zwischen den vorhandenen Klassen der Partikel.

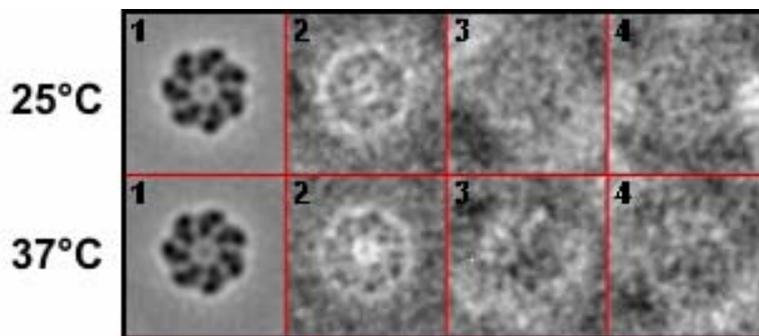


Abbildung 45: Eigenvektoren aus der MSA-Analyse von GroEL-SR-SYT-Komplexen.

Die Eigenwerte aus der MSA-Analyse von GroEL-SR, jeweils bei 25°C (oben) und 37°C (unten) mit denaturiertem SYT versetzt. Die ersten Werte sind jeweils der Mittelwert, die zweiten Werte zeigen bei 25°C eine schwache, bei 37°C eine stärkere Variation in der Pore, was die Existenz weniger Komplexe bestätigt. Die übrigen Eigenwerte zeigen Variationen, die aus der Kontrastierung entstehen.

Abbildung 45 zeigt die Eigenwerte aus der MSA von GroEL-SR-SYT-Komplexen aus negativ kontrastierten elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Der jeweils erste Wert entspricht der am häufigsten vorhandenen Information, also dem Mittelwert der Partikel. Die heptamere Grundform des GroEL-SR ist deutlich zu erkennen, in diesem Fall aber invertiert. Der zweite Eigenwert beschreibt die Komponente, in der sich die Einzelpartikel untereinander am meisten unterscheiden. In der oberen Zeile, die der Präparation bei Raumtemperatur entspricht, ist eine leichte zentrale Masse und eine Masse am Rand der Partikel zu erkennen. Dies bedeutet, dass einige Partikel vom Mittelwert aller Partikel (erstes Bild) sich mit einer zusätzlichen zentralen Masse unter leichter Erhöhung des Radius unterscheiden, was den gefüllten Chaperoninen entsprechen sollte. Die Ausbeute der Komplexe ist bei Raumtemperatur gering, kann aber, wie in der zweiten Bilderzeile sichtbar, durch Präparation bei 37°C erhöht werden. Hier bleibt die Mittelung, der erste Eigenwert, im Vergleich zur ersten Zeile unverändert. Der zweite Eigenwert beschreibt eine hellere zentrale Masse, was bedeutet, dass mehr Partikel diese Variation tragen, die Komplexausbeute also erhöht ist.

Die GroEL-SR-SYT-Komplexe wurden bei Raumtemperatur auf HOPG präpariert und im Rasterkraftmikroskop abgebildet (Abbildung 46).

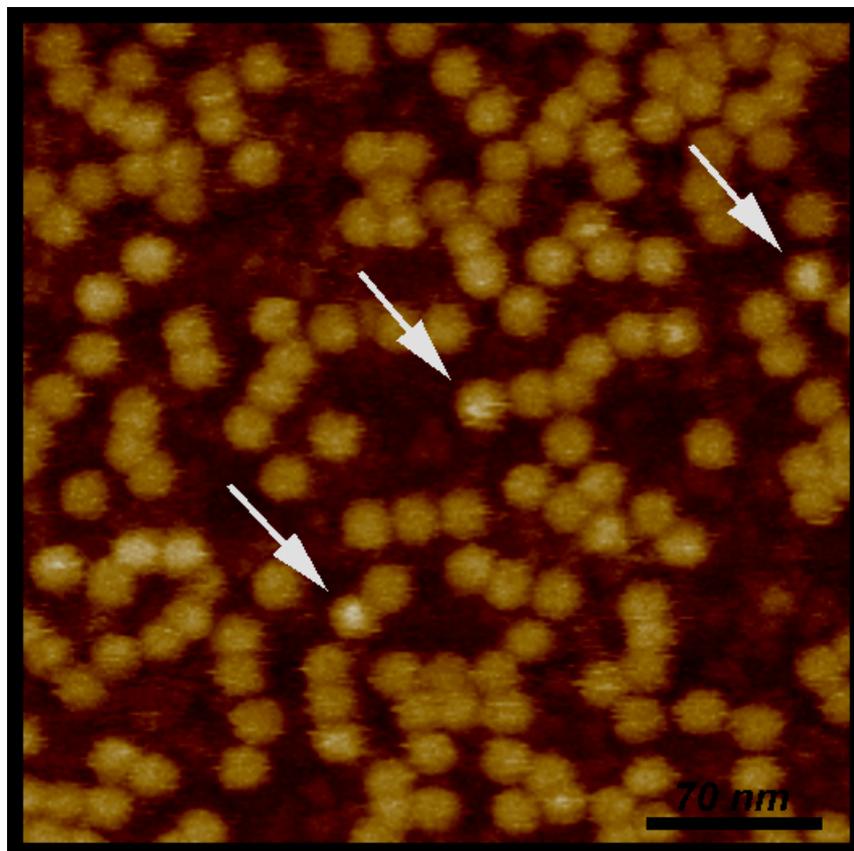


Abbildung 46: AFM-Abbildung von GroEL-SR-SYT-Komplexen auf HOPG.

Die weißen Pfeile zeigen wenige GroEL-SR-SYT-Komplexe, die sich durch eine zentrale Erhöhung auszeichnen (Höhenskala 18 nm).

Im Vergleich zu leeren GroEL-SR auf HOPG (vgl. Abbildung 32) sind in der GroEL-SR-SYT-Präparation wenige Komplexe zu sehen, was an den zentralen Erhöhungen einzelner Ringe zu erkennen ist (Abbildung 46, weiße Pfeile). Diese können vereinzelt auch in ‚leeren‘ GroEL-SR-Proben ohne zusätzliche Substratzugaben vorkommen, da diese nicht 100%-ig frei von Restsubstraten sind. Wird jedoch der Komplex frisch präpariert, so treten diese zentralen Erhöhungen 3-10-mal häufiger auf und sind konstant in den Abmessungen. Die GroEL-SR sind ca. 7.5 nm hoch, die Komplexe messen meist 9 bis 9.5 nm in der Höhe.

Trotz Steigerung der Komplexausbeute durch Präparation bei 37°C bleibt das Problem, dass die Abbildung bei Raumtemperatur zur Auflösung der Komplexe führt. So blieben sie nur für wenige Bilder bestehen, bevor sie zerfallen waren und die Erhöhungen nicht mehr detektiert werden konnten. Deshalb wurde das gesamte Rasterkraftmikroskop auf 37°C aufgeheizt. Bei erhöhter Temperatur des Puffers lösten sich die GroEL-SR jedoch von der Oberfläche ab. Dies ist wahrscheinlich auf die erhöhte thermische Energie zurückzuführen, was die Desorption fördert. Somit musste die Abbildungstemperatur bei leicht über Raumtemperatur (ca. 25°C) gehalten werden, so dass dauerhafte Abbildung möglich war, die Komplexe aber nicht zu schnell zerfielen.

Mittels Zugabe von GroES und ATP zum Abbildungspuffer konnten vergleichende Bindungsuntersuchungen des Cochaperonins auf leeren und mit Substrat beladenen GroEL-SR durchgeführt werden. Abbildung 47 zeigt einen Ausschnitt aus einer Bilderserie von GroEL-SR-SYT-Komplexen, bei denen nach den ersten drei Bildern der Reaktionspuffer zur Bildung eines GroEL-SR-GroES-Komplexes eingepumpt wurde. Zu Beginn sind einzelne GroEL-SR-Proteine zu erkennen, wobei das mit einem weißen Pfeil markierte Partikel zwei Nanometer höher ist, somit als GroEL-SR-SYT-Komplex identifiziert wurde. Dies wird durch die beiden anschließenden Ausschnitte bestätigt, die von den nachfolgenden Bildern stammen. Beim Übergang vom dritten auf das vierte Bild wurde ATP- und GroES-haltiger Puffer in die Probenzelle des Rasterkraftmikroskops gepumpt. Im vierten Bild zeigen nun alle außer dem vorher höheren GroEL-SR-SYT-Partikel helle Streifen analog denen in Abbildung 34, was auf eine Bindung von GroES in Anwesenheit von ATP hindeutet. Die Bindung des Cochaperonin kann auch in den folgenden zwei Bildern bestätigt werden, bis die Partikel aus dem Scanbereich gewandert waren. Eine Bindung von GroES auf dem GroEL-SR-SYT-Komplex war jedoch in keinem Bild zu erkennen.

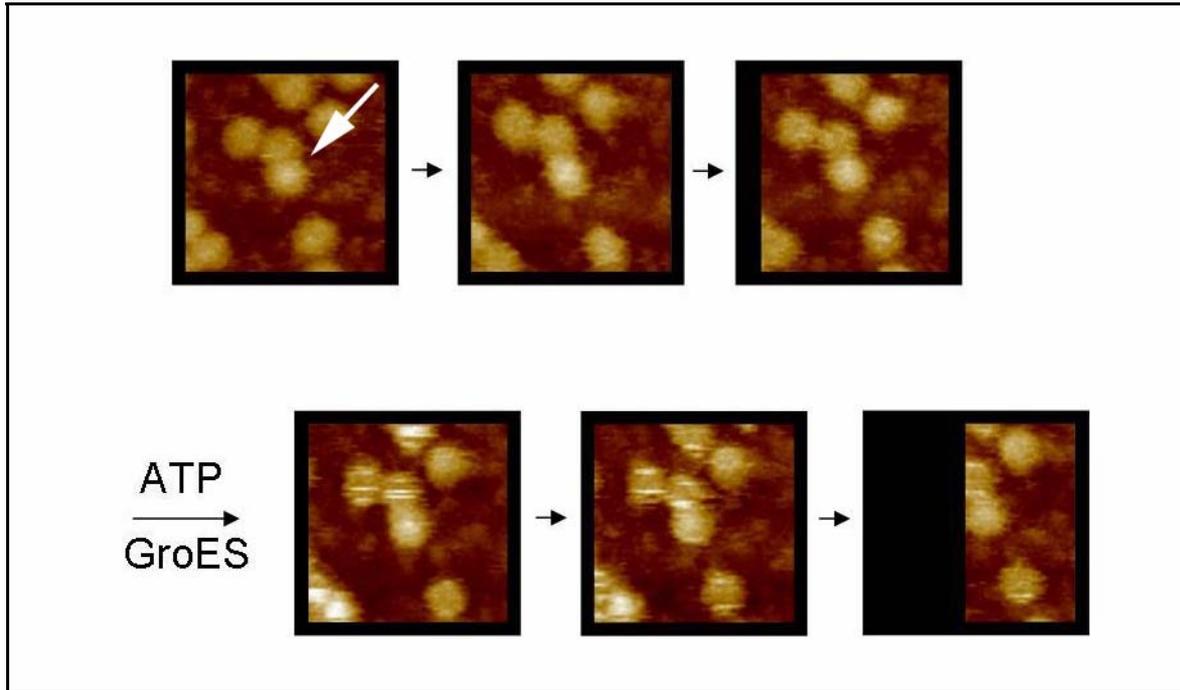


Abbildung 47: AFM-Bilderserie eines GroEL-SR-SYT-Komplexes bei GroES-Zugabe.

Die Bilderserie zeigt mehrere GroEL-SR, unter denen ein GroEL-SR-SYT-Komplex (weißer Pfeil) zu erkennen ist; bei Zugabe von ATP und des Cochaperonin GroES findet GroES-Bindung nur auf ‚leeren‘ GroEL-SR statt, der GroEL-SR-SYT-Komplex wird nicht von GroES gebunden (jeweils 100x100 nm², Höhengkala 18 nm).

Diese Bilderserie zeigt, dass bei Bindung eines großen Substratproteins, wie SYT mit 74 kDa, welches deutlich aus der Pore herausragt, die Einkapselung mittels GroES als Deckel nicht mehr möglich ist.

Aufgrund der enormen Anforderungen an die Stabilität des Gerätes und an eine geeignete Präparation mit guter Komplexausbeute konnte eine Bilderserie wie Abbildung 47 in den seltensten Fällen komplett aufgenommen werden. Aus diesem Grund muss die gefolgerte Aussage, dass GroES-Bindung auf den Substratkomplexen großer Proteine nicht möglich ist, als Resümee einer einzelnen Messung getroffen werden. Nichtsdestotrotz unterstützen die wenigen gemessenen Partikel die schon aus sterischen Aspekten logische Annahme, dass eine GroES-Bindung im Falle von SYT als Substrat nicht möglich ist.

Dies beantwortet jedoch nicht die Frage, ob und wie die Faltung im Falle dieser großen Proteine ermöglicht oder gefördert wird. Die verwendeten Substrate (SYT, MetE) sind stringente Substrate, d. h. sie benötigen GroEL für die Faltung. Für die Beantwortung solcher Fragen wären Untersuchungen an einzelnen Molekülen mit anschließendem Funktionstest der korrekt gefalteten Proteine nötig, was allein mit der Topographie als Datenquelle nicht zu realisieren ist.

6.2 20S-Proteasom

Ziel der Untersuchungen am 20S-Proteasom aus *Thermoplasma acidophilum* war die Etablierung einer definierten vertikalen Immobilisierung, um mit einem entfalteten Substratprotein bei vertikaler Annäherung Zugang zum Eingang der Reaktionskammern zu erhalten. Auf diese Weise könnte mittels Kraftspektroskopie die Interaktionskraft zwischen dem Proteasom und einer Polypeptidkette gemessen werden.

Das Proteasom wurde bereits früher im Rasterkraftmikroskop abgebildet.^[129] Es war bekannt, dass in der Topographie des liegenden Proteasoms nicht alle vier, sondern nur drei Ringe sichtbar sind, da die inneren beiden nicht aufgelöst werden können. Die Topographie eines 2D-Kristalls von stehenden Proteasomen wurde schon von Thess et al. vermessen, wobei die Immobilisierung auf einer Lipidschicht realisiert wurde, was im Rahmen der Arbeit weitergeführt wurde.^[130]

Das native Proteasom bevorzugt aufgrund seiner Zylinderform und der an der Oberfläche präsentierten Reste in der Regel die waagerechte, liegende Anlagerung auf Glimmer, wobei auch Gemische aus liegenden und stehenden Proteasomen auf Kohlefilmen beobachtet wurden. Um eine homogene Anordnung von stehenden Proteasomen zu erreichen, müssen spezifische Bindungen auf entsprechend präparierten Trägern zum Einsatz kommen. Ansatzpunkt der Immobilisierung ist die Verwendung eines His-Tags, einer peptidisch verknüpften Anordnung von Histidinen, die an einen Terminus oder in die Sequenz der Polypeptidkette des Zielproteins gesetzt werden. Die spezifische Bindung wird durch die Affinität der Imidazolringe im Histidin zu einem Nickelkation (Ni^{2+}) ermöglicht. Wie in Abbildung 48 dargestellt, wird ein Nickelkation von einer Matrix-fixierten Nitrilotriessigsäure (NTA) (a) chelatisierend gebunden (b). Die beiden eingelagerten Wasser können durch zwei Histidinreste des His-Tags ersetzt werden (c). Diese Bindung ist stabil genug, ein Protein an der Matrix zu fixieren. Die Bindung kann durch Verdrängung der Histidine mit Imidazol wieder gelöst werden.

Über Mutagenese wurden die Proteasome an verschiedenen Stellen mit den Histidin-Bindungsstellen ausgestattet.^[130] Abbildung 49 zeigt die Lokalisation der eingeführten Histidin-Tags. Die α -His₆-Mutante trägt den His-Tag am N-Terminus der α -Untereinheit, so dass dieser am inneren Rand der Eingangspore liegt. Beim β -His₆-Proteasom befindet sich der Tag am C-Terminus der β -Untereinheit und ragt etwa in der Mitte des Proteasoms nach Außen. Bei der ‚turn‘-His₈-Mutante ist der aus sterischen Gründen um 2 Histidine verlängerte Tag (His₈) in die Aminosäurekette der α -Untereinheit C-terminal von Lysin33 fusioniert, so dass er am äußeren Rand der Stirnseiten des Proteasoms lokalisiert ist.

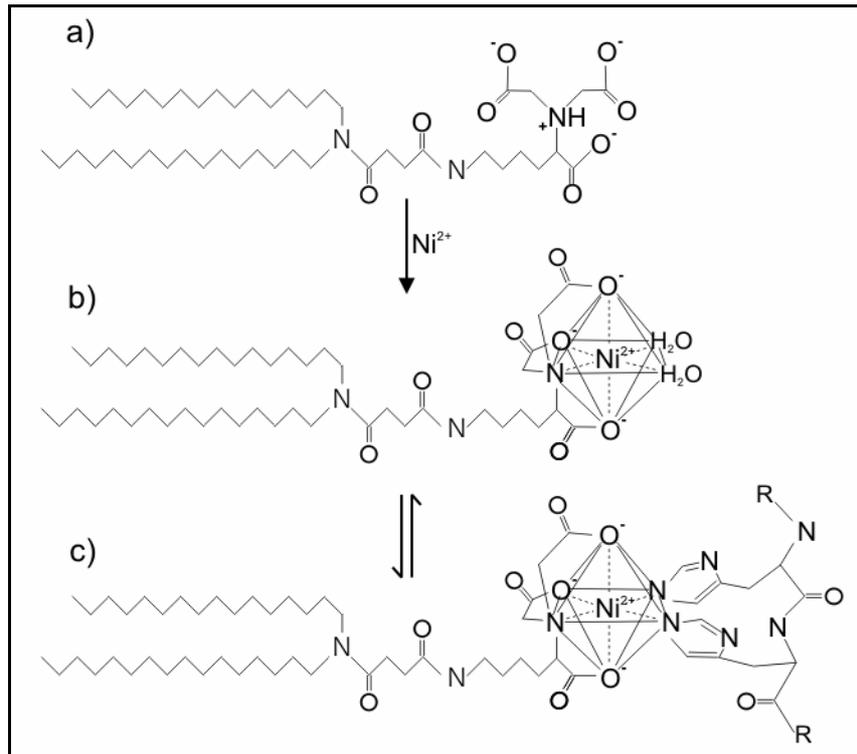


Abbildung 48: Strukturformel der Ni-NTA-His₆-Tag-Bindung.
 a) NTA-DODA, b) Ni²⁺-NTA-DODA und c) His-Ni²⁺-NTA-DODA.

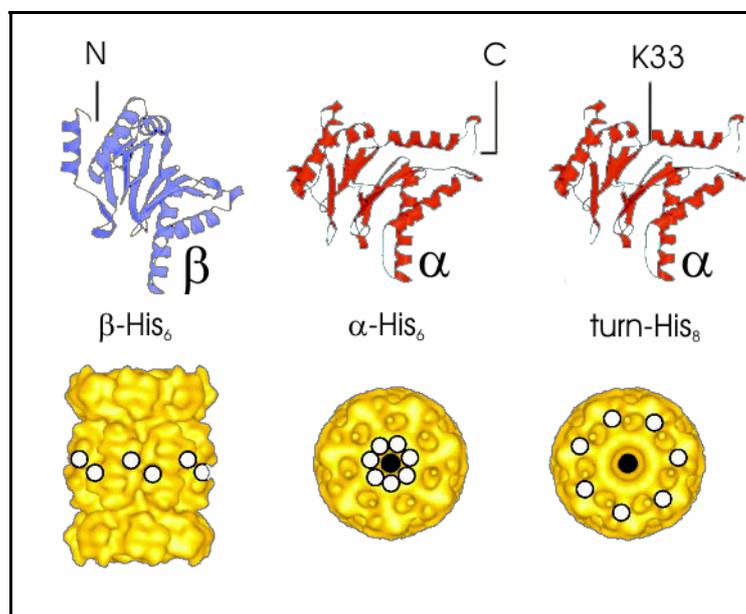


Abbildung 49: Schematische Darstellung der His-Tag-Mutanten des 20S-Proteasoms.

Schematische Darstellung der β-His₆-, α-His₆- und turn⁷-His₈-Mutante des 20S-Proteasoms; jeweils mit Darstellung der Position des His-Tags in der Kristallstruktur einer Untereinheit (oben) und im oligomeren Proteasomkomplex (unten, weißer Kreis).^[130]

6.2.1 Proteasom auf Glimmer

Zunächst wurden die Proteasom-Mutanten auf Glimmer abgebildet, da dieser eine glatte, saubere und homogene Oberfläche besitzt und deshalb zu den meistverwendeten Trägermaterialien in der Rasterkraftmikroskopie zählt. Es zeigt sich, dass die α -His₆- und β -His₆-Mutanten liegend adsorbieren, d.h. der zentrale Kanal parallel zur Oberfläche verläuft. Dabei kommt es wahrscheinlich unter den His-Tags zu einer attraktiven Wechselwirkung, was durch die Anwesenheit von Mg²⁺-Ionen in der Pufferlösung verstärkt wird. Dies hatte zur Folge, dass bei Adsorption von α -His₆-Proteasome Ketten aus Kopf-an-Kopf verknüpften Proteasome beobachtet wurden, bei denen der Eingang zum zentralen Kanal blockiert ist (vgl. Abbildung 50).

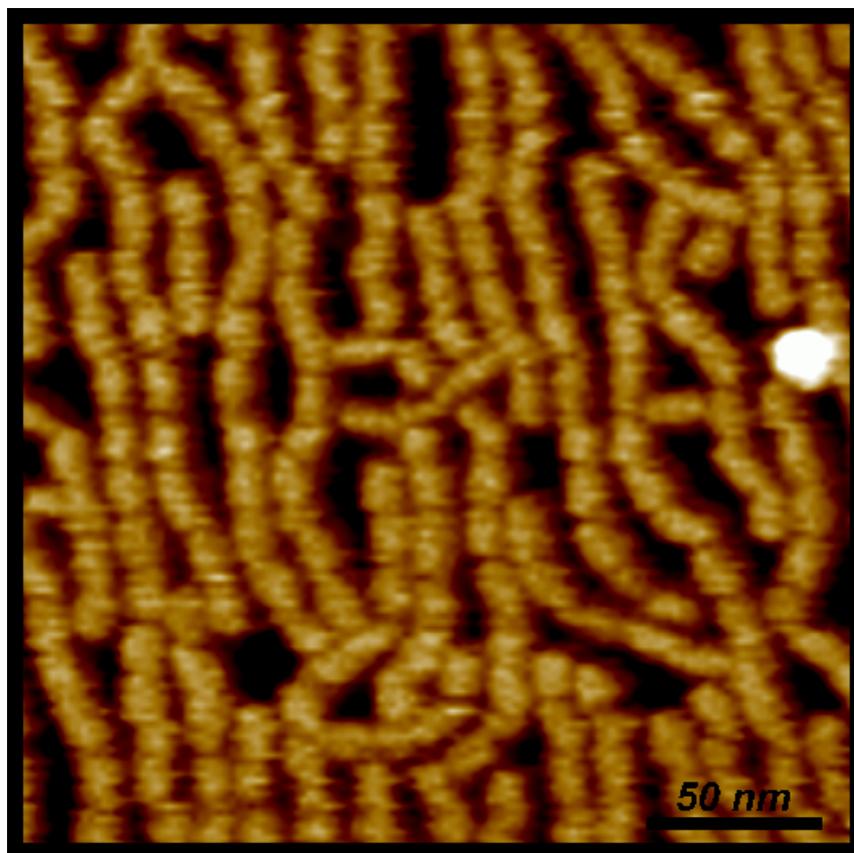


Abbildung 50: AFM-Abbildung von α -His₆-Proteasome auf Glimmer.
Ketten von Kopf-an-Kopf verknüpften liegenden α -His₆-Proteasome sind sichtbar (Höhenskala 8 nm).

In Analogie wurde bei β -His₆-Proteasome eine seitliche Verknüpfung beobachtet, wenn diese auf Glimmer adsorbierten. In Abbildung 51 ist zusätzlich die Dreiteilung, die aufgrund der Ununterscheidbarkeit der zwei β -Ringe in der Topographie auftritt, am einzelnen Proteasom sehr gut zu erkennen. Die größeren hellen Flecken im Bild stammten von weiteren, auf der ersten Schicht liegenden Proteasome.

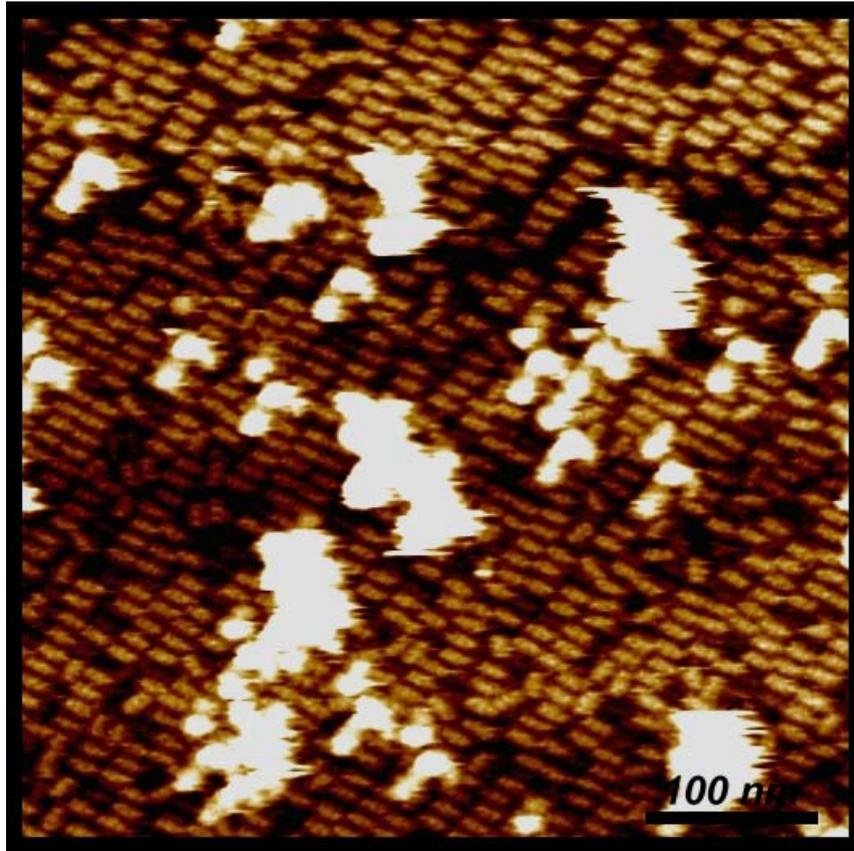


Abbildung 51: AFM-Abbildung von β -His₆-Proteasome auf Glimmer.
Ketten von Seite-an-Seite verknüpften liegenden β -His₆-Proteasome sind sichtbar (Höhenskala 10 nm).

Der His-Tag interagiert somit eher mit sich selbst als mit der Glimmeroberfläche. Wegen der liegenden Anordnung sind die beiden Mutanten, α -His₆ und β -His₆, auf Glimmer für Kraftexperimente ungeeignet. Der Zugang zu den aktiven Zentren über die Eingangspore ist nicht zugänglich und somit für das bei Kraftmessungen senkrecht von oben kommende Substrat nicht erreichbar.

Der Vorteil des His-Tags liegt hier eher in der Möglichkeit zur spezifischen Bindung zu komplexgebundenem Ni²⁺ als in der unspezifischen Interaktion mit geladenen Oberflächen. Deshalb wurde versucht, wie im folgenden Kapitel beschrieben, eine senkrechte Immobilisierung der Proteasom-Mutanten über eine Nickel-chelatisierende Matrix auf dem Glimmer zu erreichen.

6.2.2 Proteasom auf Lipid

Lipidschichten haben mehrere Vorteile für die Rasterkraftmikroskopie. So können homogene flache Doppelschichten, in der Lipide aufgrund ihres amphiphilen Charakters in verdünnter wässriger Lösung meist vorliegen, direkt auf dem Glimmer hergestellt werden. Des Weiteren ist es möglich, die Lipide in verschiedensten Gemischzusammensetzungen herzustellen. Dem

Basislipid können in geringem Anteil z.B. länger-kettige Lipide zugesetzt werden, die den Schmelzpunkt der Mischung und somit sein Fließverhalten ändern. Andererseits können aber auch Ankerlipide, wie in dem Fall ein Nickel-chelatisierendes Lipid, beigemischt werden, die dann als spezifische Knüpfungspunkte für weitere Aufbauschichten dienen. Abbildung 52 veranschaulicht den Vorgang der Spreizung der Lipidvesikel auf Glimmer und die chemische Struktur der Komponenten.

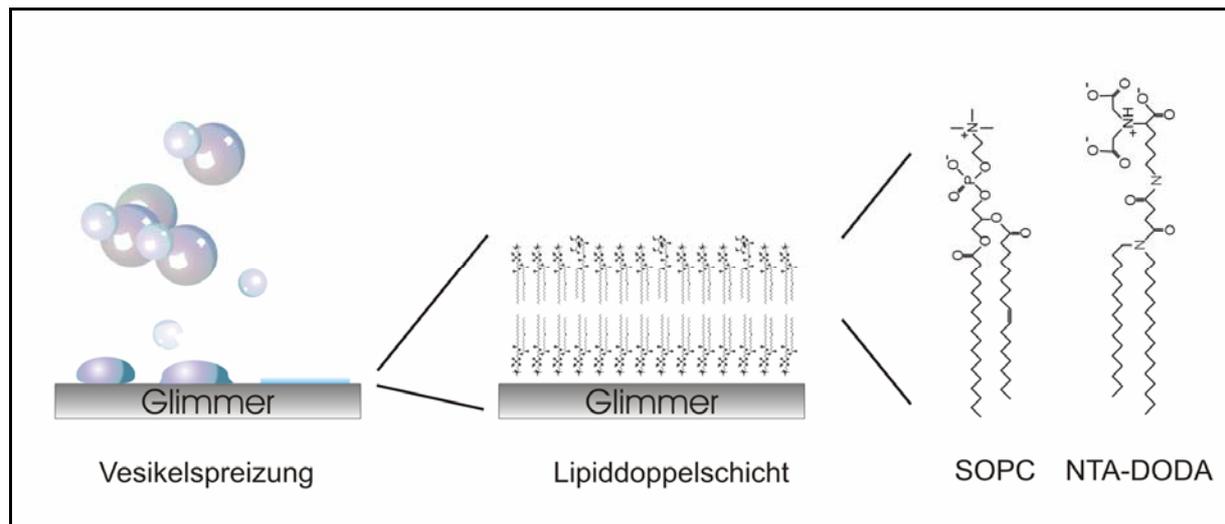


Abbildung 52: Schematische Darstellung zur Spreizung von Lipidvesikeln auf Glimmer.

Gezeigt ist die Probenbereitung der Lipiddoppelschicht aus SOPC (1-Stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin; Basislipid) mit beigemischttem Nickel-chelatisierendem NTA-DODA (N^{α},N^{α} -Bis-(carboxymethyl)- N^{ϵ} -[(dioctadecylamino)-succinyl]-lysine; Ankerlipid), die aus Vesikeln auf Glimmer gespreizt wird.

Wird das Ankerlipid nur in geringem Anteil zugegeben, bleiben die Fremdlipide innerhalb der Matrix aus Basislipid fluid, d.h. sie können innerhalb der Schicht diffundieren. Dies hat zur Folge, dass ein gebundenes Protein auf der Oberfläche wandern und sich so eventuell zum 2D-Kristall anordnen kann. So wird die Bildung einer sehr homogenen Proteinschicht ermöglicht.

Wird eine solche Lipiddoppelschicht, wie beschrieben, auf Glimmer präpariert und im Rasterkraftmikroskop abgebildet, entspricht sie typischerweise einer Topographie wie in Abbildung 53, die ein $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ großes Übersichtsrelief zeigt. Da die Lipidschicht im Rahmen der Auflösung der Abbildung nicht von der ebenfalls glatten Glimmeroberfläche zu unterscheiden ist, lässt sich eine erfolgreiche Belegung nur durch die Existenz von freien, nicht belegten Bereichen feststellen. An diesen Stellen tritt eine Höhenänderung von 6 nm zum Glimmeruntergrund auf (links oben).

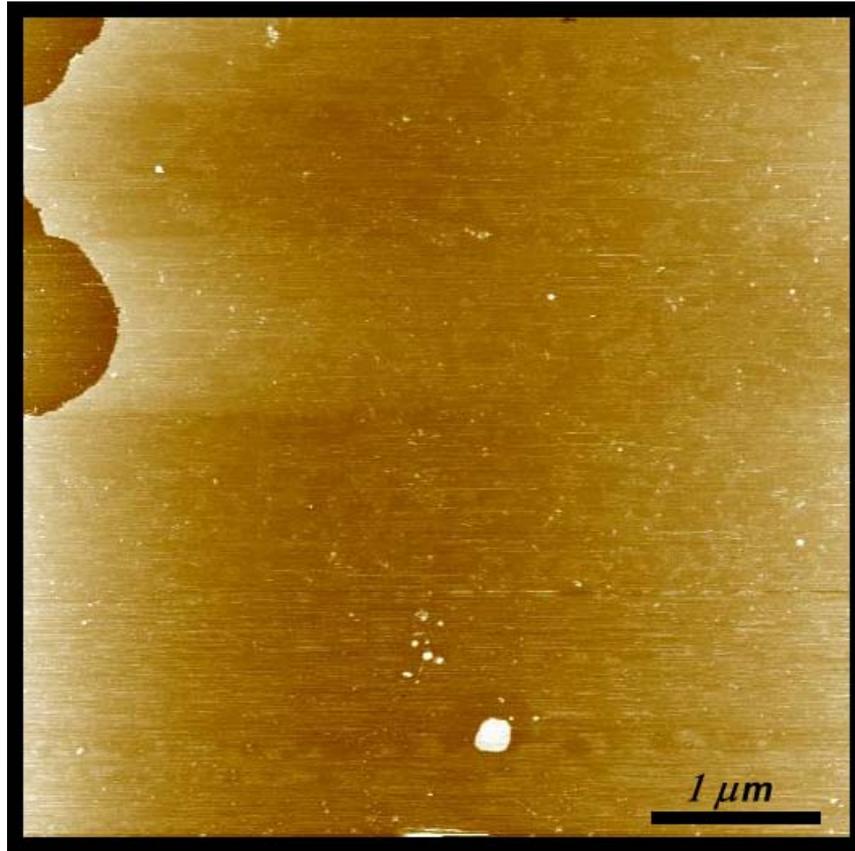


Abbildung 53: AFM-Abbildung einer SOPC-Ni-NTA-DODA-Lipiddoppelschicht.

Eine glatte, fast homogene Lipiddoppelschicht von SOPC-Ni-NTA-DODA mit nicht belegter Glimmeroberfläche (oben links) ist erkennbar (Höhenskala 20 nm).

Die Oberfläche ist bis auf wenige Löcher (dunkle Halbkreise, links oben) und kleine Bereiche, in denen eine weitere Lipidschicht adsorbiert ist (heller Fleck, Mitte unten), glatt und homogen. Zudem konnte beobachtet werden, dass kleinere Löcher im Laufe von wiederholten Scans derselben Stelle wieder geschlossen wurden oder wanderten (hier nicht gezeigt), was auf eine Fluidität des Lipids bei Raumtemperatur schließen lässt.

Wurde nun α -His₆-Proteasom eingespült und anschließend abgebildet, band das Proteasom zuerst an den freien Stellen, an denen der Glimmer nicht von Lipid bedeckt war (Abbildung 54). Höhenmessungen zeigten dort eine Stufe von mindestens 6 nm von Lipid auf Proteasom, was auf Glimmer liegende Proteasome schließen lässt. Anschließend legten sich weitere Proteasome auf die erste Schicht, was in der Abbildung als weißer Bereich zu erkennen war, der deutlich über den Helligkeitsbereich der Höhenskala hinausragte. Diese Beobachtung deutet auf eine schwache Interaktion der Proteasome mit dem Lipid hin, mit der Folge, dass wegen der Nichtbindung an die Ankerlipide die freie Proteinkonzentration in der Lösung hoch blieb, und die Proteasome sich auf den Glimmerstellen sammeln konnten. Es war bekannt, dass eine

deutliche Bindung der α -His₆-Proteasome auf einer solchen Lipidschicht erst nach Inkubation über Nacht erfolgt.^[130]

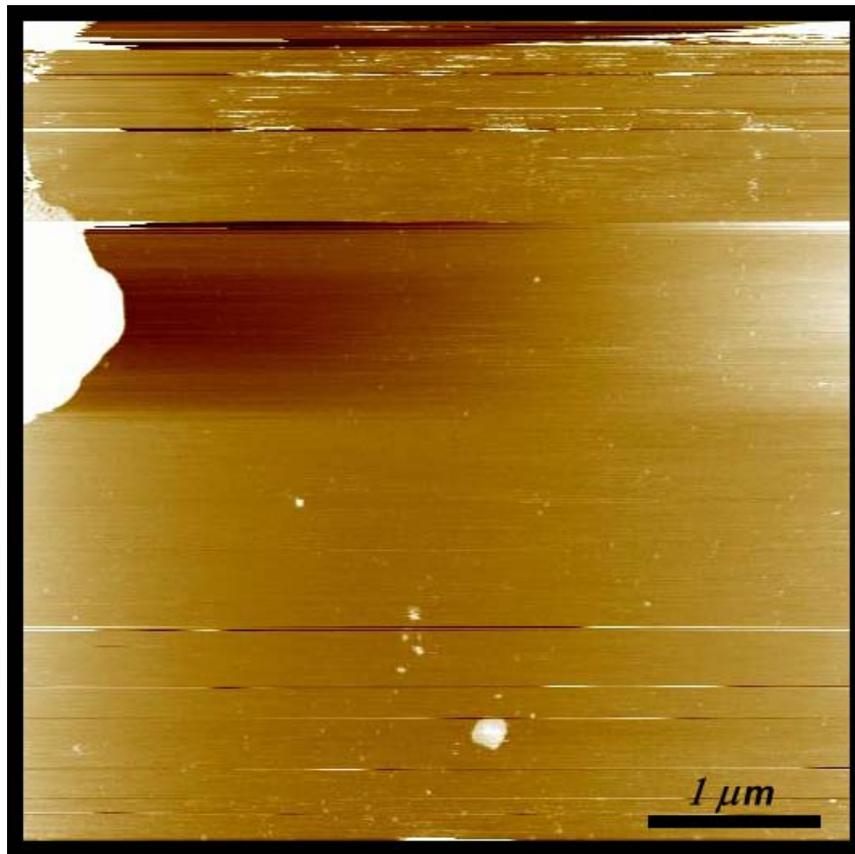


Abbildung 54: AFM-Abbildung der SOPC-Ni-NTA-DODA-Lipiddoppelschicht mit α -His₆-Proteasome. Abbildung fünf Minuten nach der Zugabe von α -His₆-Proteasome zum Abbildungspuffer (Höhenskala 30 nm).

Auf der rasterkraftmikroskopischen Abbildung einer Über-Nacht-Präparation (Abbildung 55) sind zwei verschiedene Bereiche zu erkennen. Der erste in der linken oberen Hälfte ähnelt Abbildung 50 mit den erkennbaren schlangenförmigen Strukturen von ca. 11 nm Durchmesser. In diesem Bereich ist die Oberfläche nicht von einer Lipidschicht bedeckt und das Proteasom adsorbiert dort liegend auf der Glimmeroberfläche. Im rechten Bereich ist ein gleichmäßiges, hexagonales Muster aus Punkten zu erkennen, die einen Abstand von 11 nm besitzen. Hier stehen die Proteasome aufrecht und haben aufgrund der Fluidität der Lipidanker einen kleinen 2D-Kristall gebildet.

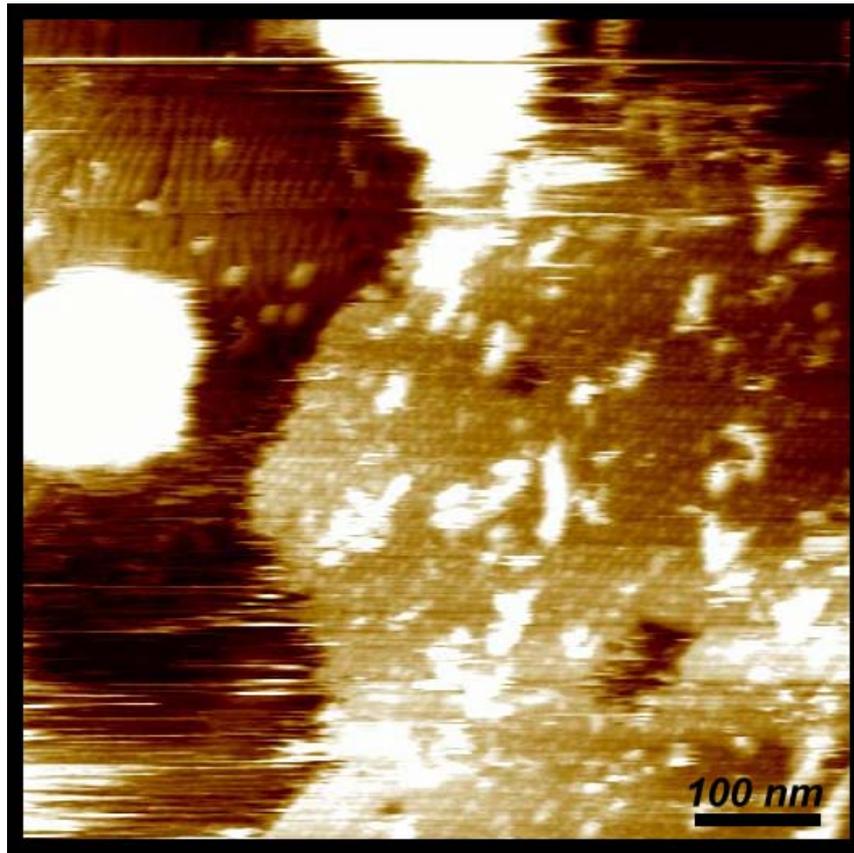


Abbildung 55: AFM-Abbildung der SOPC-Ni-NTA-DODA-Lipiddoppelschicht mit α -His₆-Proteasome. Abbildung 24 h nach Zugabe von α -His₆-Proteasome zum Puffer (Höhenskala 30 nm).

Wie aus Abbildung 55 zu entnehmen ist, war die Präparation einer Proteasommonoschicht mit vielen Problemen behaftet. Bereits die Spreizung des Lipids hängt von sehr vielen Faktoren, wie Zusammensetzung, Temperatur, Spreizungsdauer und Art des Glimmers ab, so dass eine absolut geschlossene Lipiddoppelschicht auf dem Glimmer nicht immer gewährleistet ist. Dies führt gerade bei Proteinen, die eine hohe Affinität zum Glimmer haben, wie das Proteasom, zu Problemen. Die lange Inkubationszeit zur Erzeugung der gewünschten Adsorption und Bildung eines stabilen 2D-Kristalls wirkt anscheinend der Stabilität der Lipidträgerschicht entgegen. Es wurden wenige Kristalle gefunden, da die meisten Bereiche mit liegenden Proteasomen belegt waren.

Zusätzlich stellte sich die Frage der Interpretation der abgebildeten 2D-Struktur. Ein Punktabstand von 11 nm in hexagonalem Muster sprach für eine geordnete Anordnung stehender Proteasome. Andererseits besitzt das Proteasom an den Seitenflächen eine Pore von 1,4 nm Durchmesser, was in der Topographie als zentrale Vertiefung erkennbar sein sollte. Stattdessen wurde aber eine Erhöhung sichtbar. Diese Beobachtung stimmte mit den Daten von Thess et al. überein.^[130] Der einzige Unterschied war, dass bei Thess et al. eine zusätzliche Ordnung der Reihen in Form einer alternierenden Erhöhung jeder zweiten Reihe auftrat, was eine be-

stimmte Vorzugsrichtung des Kristalls bedeutete. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens lieferte folgendes Experiment auf einem etwa $500 \times 500 \text{ nm}^2$ großen 2D-Kristall (Abbildung 56).

Abbildung 56 zeigt eine Bilderserie eines 2D-Kristalls stehender Proteasome auf einer Lipiddoppelschicht, der wie oben beschrieben präpariert wurde. Zwischen den Bildern wurde mit Hilfe der automatischen Setpoint-Korrektur die Abbildungskraft variiert. Im ersten Bild (a) war die Kraft noch minimal, das gleichmäßige hexagonale Muster der Proteasome im Kristall war gut zu erkennen. Im zweiten Bild (b) wurde der Setpoint leicht erniedrigt, was eine höhere Kraft der Spitze auf die Probe bei der Abbildung bedeutete. Es war zu erkennen, dass das hexagonale Muster nicht mehr in alle Richtungen des Kristalls gleichförmig ist. Die Höhen der Proteasomreihen schienen in einer Richtung zu alternieren. Dies entspricht den Ergebnissen von Thess et. al.^[130] Wurde die Kraft durch Erniedrigung des Setpoints weiter erhöht, wie im dritten Bild (c) zu sehen ist, kehrte sich das Relief in eine Art Honigwabemuster um. Dass dieser Prozess reversibel durch die bei der Abbildung wirkende Kraft, und nicht durch Zerstörung der Probe verursacht wurde, zeigt das vierte Bild (d). Hier wurde die Kraft schrittweise wieder reduziert. Im oberen Bilddrittel war die Kraft noch hoch und das Honigwabemuster ist deutlich sichtbar. Im mittleren Bilddrittel war die Kraft leicht reduziert, und die aus dem zweiten Bild (b) bekannte Zweireihigkeit ist erkennbar. Wurde die Kraft schließlich im unteren Drittel wieder auf minimale Werte reduziert, trat die normale gleichmäßig hexagonale Topographie wieder auf. Bei minimaler Kraft konnte das hexagonale Muster im fünften Bild (e) noch einmal über den gesamten vorher gescannten Bereich gezeigt werden. Die sichtbaren Variationen derselben Probenstelle sind also rein artifiziell und durch zu hohe Abtastkräfte erklärbar.

Warum jedoch keine Poren an den Stirnflächen des Proteasom sichtbar waren, ist nicht eindeutig zu erklären. Eine Interpretation ist, dass die sieben freien His₆-Tags an den flexiblen N-Termini der α -Untereinheiten sich untereinander sehr nahe kommen und, vor allem in Anwesenheit von divalenten Kationen, interagieren können. Dies könnte zu einem Verschluss der Pore führen, der im Rasterkraftmikroskop als Erhöhung sichtbar ist. Erhärtet wird diese Vermutung dadurch, dass α -His₆-Proteasome eine zum Wildtyp niedrigere Abbau-Aktivität haben.^[130]

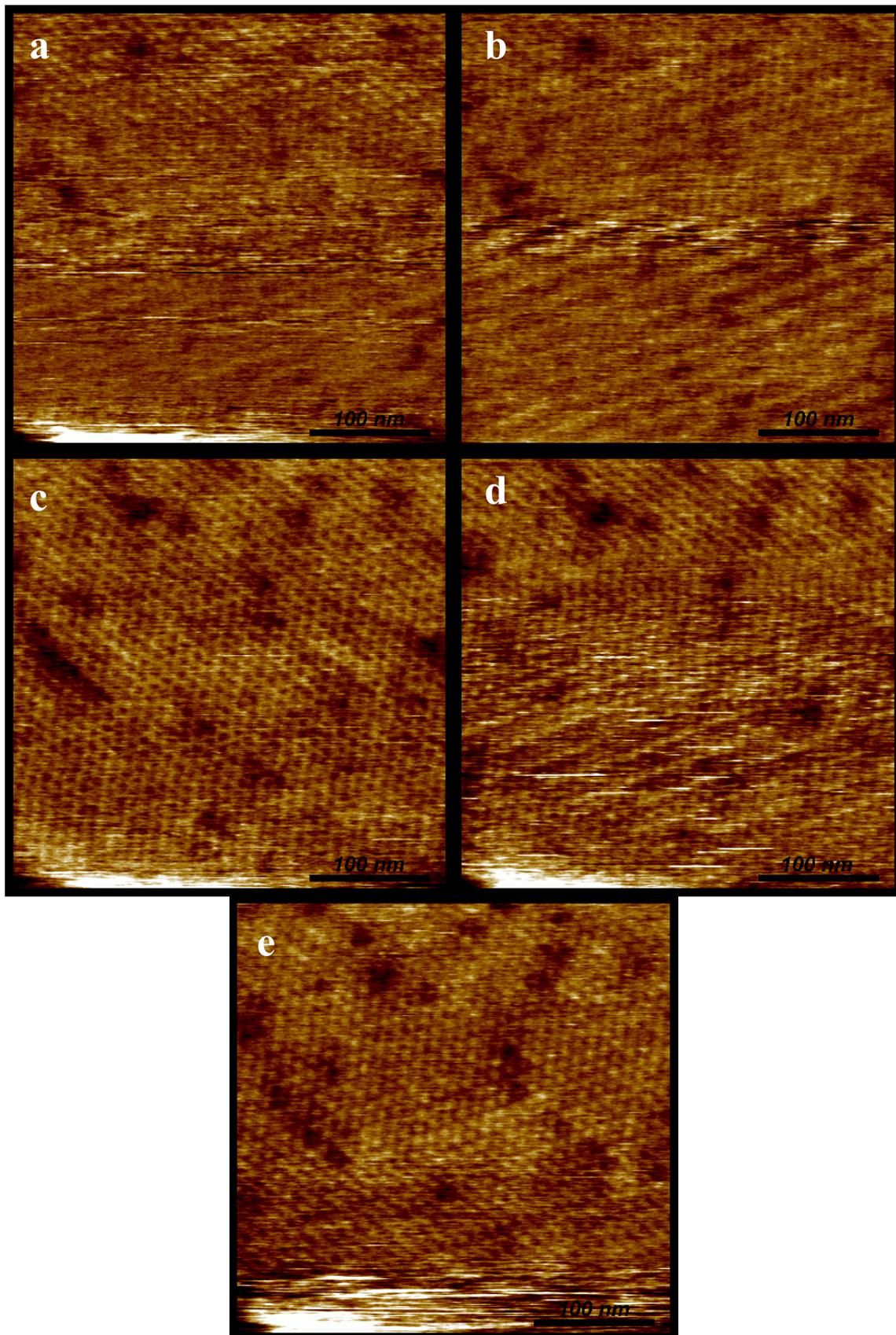


Abbildung 56: AFM-Abbildungen eines 2D-Kristalls von 20S-Proteasome auf einer Lipiddoppelschicht. Bilderserie eines 2D-Kristalls stehender 20S-Proteasome bei minimaler (a und e), erhöhter (b), hoher (c) und variiertes (d) Abbildungskraft (Höhenskalen 4 nm).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Immobilisierung der α -His₆-Proteasome auf einer Lipiddoppelschicht nicht für rasterkraftspektroskopische Untersuchungen geeignet ist. Zum einen war die Präparation aufwendig, schwierig zu reproduzieren und führte zum anderen in keinem Fall zu einer annähernd geschlossenen Präparation stehender Proteasome, was für Kraftexperimente notwendig ist. Bei der Verwendung des α -His₆-Proteasoms ist zudem die Gefahr durch einen möglichen Verschluss der Pore durch eine Interaktion der His-Tags gegeben, was eventuell den Zugang des Substrates bei der Messung stört und diese somit verfälschen könnte.

In Anbetracht der vorliegenden Probleme wurden weitere systematische Untersuchungen durchgeführt. Ein Ansatzpunkt war der Wechsel zu einer anderen Oberfläche, die eventuell weniger Affinität zum Proteasom besitzt. Auf hydrophobem HOPG (vgl. Seite 59) konnten Lipidmonoschichten von der Flüssigkeit-Luft-Grenzschicht abgeschieden werden (Abbildung 57). Innerhalb der Flüssigkeit wurden vorher 20S-Proteasome über den His₆-Tag an diese Monoschicht gebunden, um eine Immobilisierung zu erreichen. Die Fluidität des Lipids war nach Abscheidung am HOPG nicht mehr vorhanden. Abbildung 58 zeigt eine solche Präparation für das Rasterkraftmikroskop. Die Proteinkonzentration und die Präparationsbedingungen waren noch nicht optimal, da viele vereinzelte Proteasome zu erkennen waren. Es zeigten sich jedoch auch kleine kristallähnliche Bereiche (s. Pfeile). Die Höhe dieser Bereiche gegenüber dem Untergrund entsprach mit 17 nm auf Lipid stehenden Proteasome. Ob diese Bereiche vergrößert oder gar geschlossen werden können, müssen weitere Versuche zeigen.

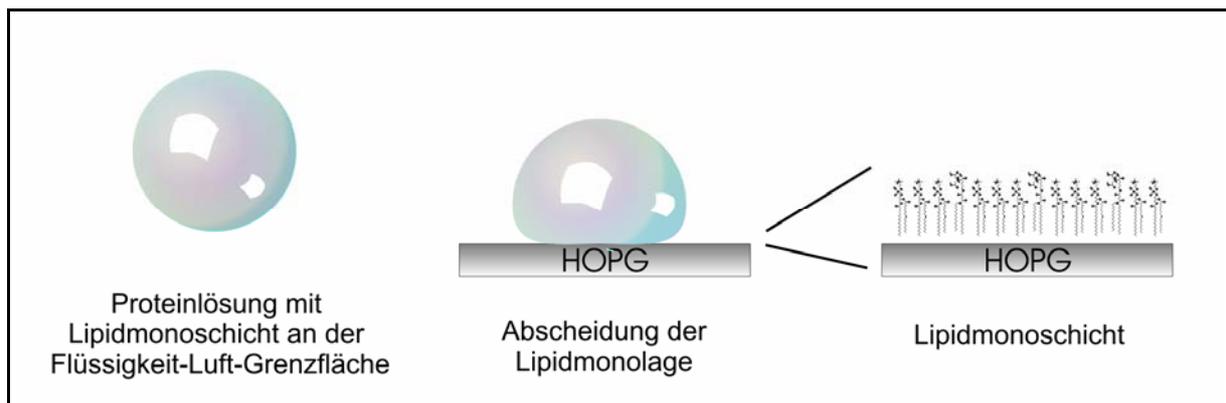


Abbildung 57: Schematische Darstellung der Abscheidung einer Lipidmonoschicht auf HOPG.

Die Lipidmonoschicht mit adsorbierten Proteasome wird von der Flüssigkeit-Luft-Grenzschicht auf eine HOPG-Oberfläche übertragen.

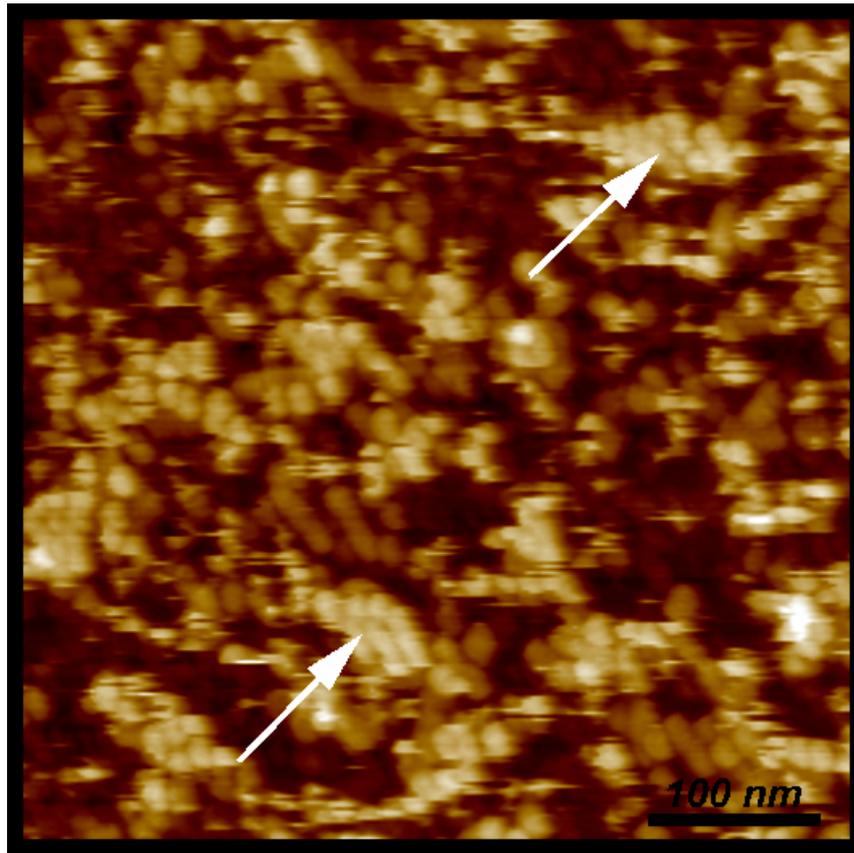


Abbildung 58: AFM-Abbildung kleiner 2D-Kristalle von 20S-Proteasome.

Die Pfeile markieren kleine kristalline Bereiche stehender α -His₆-Proteasome, die über eine Lipidmonoschicht auf HOPG immobilisiert wurden (Höhenskala 30 nm).

Ein anderer Ansatz ist der völlige Verzicht auf das Lipid als Trägerschicht unter Verwendung der ‚turn‘-His₈-Proteasom-Mutante. Bei dieser Mutante sind die His-Tags der Untereinheiten weiter voneinander entfernt, so dass eine direkte Interaktion zwischen den Tags auszuschließen ist. Durch Variation des pH-Wertes des Puffers sollte die Ladung der Histidine so optimiert werden, dass eine direkte spezifische Interaktion mit der in wässriger Lösung negativ geladenen Glimmeroberfläche möglich wurde. Dies konnte vorgenommen werden, da der pK_s des Imidazolrings bei 6,04 und somit im Rahmen des bei Proteinen variierbaren pH-Bereiches liegt.

Schon erste Tests im Standardpuffer zeigten, dass die ‚turn‘-His₈-Mutante auf Glimmer in richtiger Orientierung adsorbiert. Es waren runde Partikel zu erkennen (Abbildung 59), die in der Mitte eine Vertiefung trugen. Aus dem Höhenprofil einer Scanzeile konnte die Höhe der Partikel auf ca. 14 nm bestimmt werden, was mit der Länge des Proteasom-Zylinders korreliert (Abbildung 60).

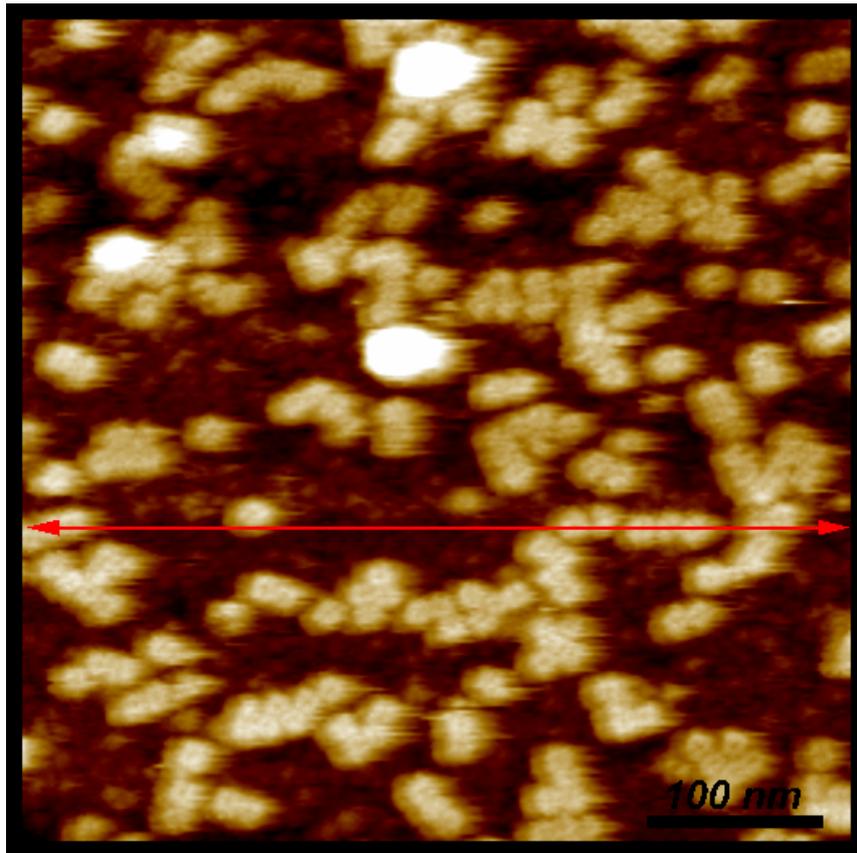


Abbildung 59: AFM-Abbildung der α -His₆-Proteasome auf Glimmer.

Direkt auf Glimmer präparierte α -His₆-Proteasome adsorbieren sofort in stehender Orientierung (Höhenskala 20 nm).

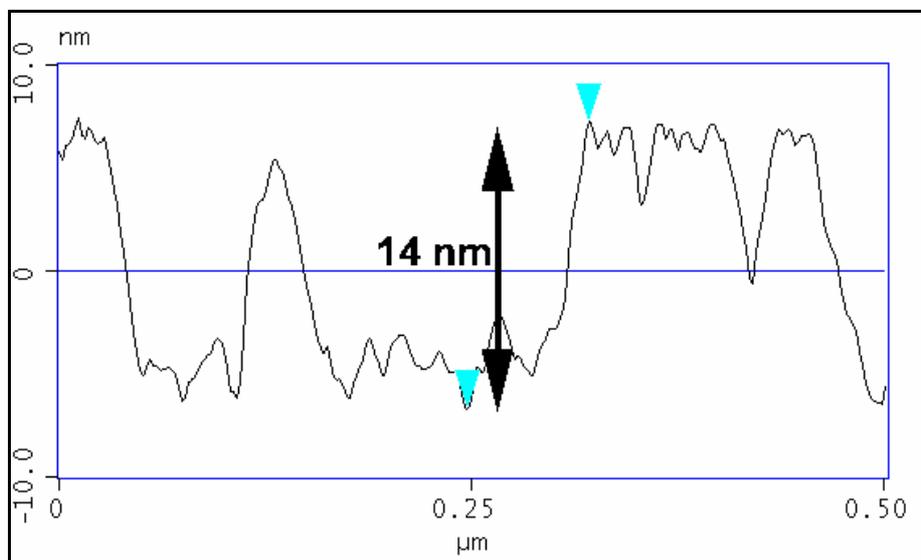


Abbildung 60: Höhenprofil von α -His₆-Proteasome auf Glimmer.

Der Höhenverlauf über Proteasome aus Abbildung 59 (roter Pfeil) beweist ihre stehende Orientierung.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Präparation stehender α -His₆-Proteasome mittels einer Lipiddoppelschicht auf Glimmer zu keiner für die Rasterkraftspektroskopie geeigneten Probe führte. Der Ansätze über die Spreizung einer Lipidmonoschicht mit gebundenem 20S-

Proteasom von der Flüssigkeits-Luft-Grenzschicht auf HOPG führte nur zu kleinen Bereichen genügend homogener, richtig orientierter Proteasome. Am vielversprechendsten stellte sich die Verwendung der ‚turn‘-His₈-Proteasom-Mutante direkt auf Glimmer heraus, da dieser Ansatz auf die Lipidstufe verzichtet. Auf dieser Probe konnten zahlreiche stehende Proteasome, wenn auch nicht in hinreichender Bedeckungsdichte, nachgewiesen werden.

6.3 SMC-Protein

Ziel der Untersuchungen war eine rasterkraftmikroskopische Abbildung von dimeren SMC-Proteinen und deren oligomere Zustände. Hierfür wurde gereinigtes Protein, das freundlicher Weise von Prof. Graumann, Universität Marburg, zur Verfügung gestellt wurde, unter verschiedenen Pufferbedingungen auf Glimmer adsorbiert und im AFM abgebildet. Um elektrostatische Ladungen des Proteins und der Oberfläche weniger abzuschirmen und somit mögliche Adsorptionskräfte nicht zu verhindern, wurde zuerst Puffer mit niedrigem Salzgehalt verwendet. Dies führte nicht zur gewünschten Abbildung, da keine Objekte auf der Glimmeroberfläche zu finden waren. Das Protein war wahrscheinlich aufgrund der niedrigen Ionenstärke der Lösung noch vor der Adsorption agglomeriert und ausgefallen.

Ein Wechsel zu höheren Ionenstärken des Puffers, eine für das Protein nativere Umgebung, führte zu einer Abbildung des dimeren SMC-Proteins (Abbildung 61).

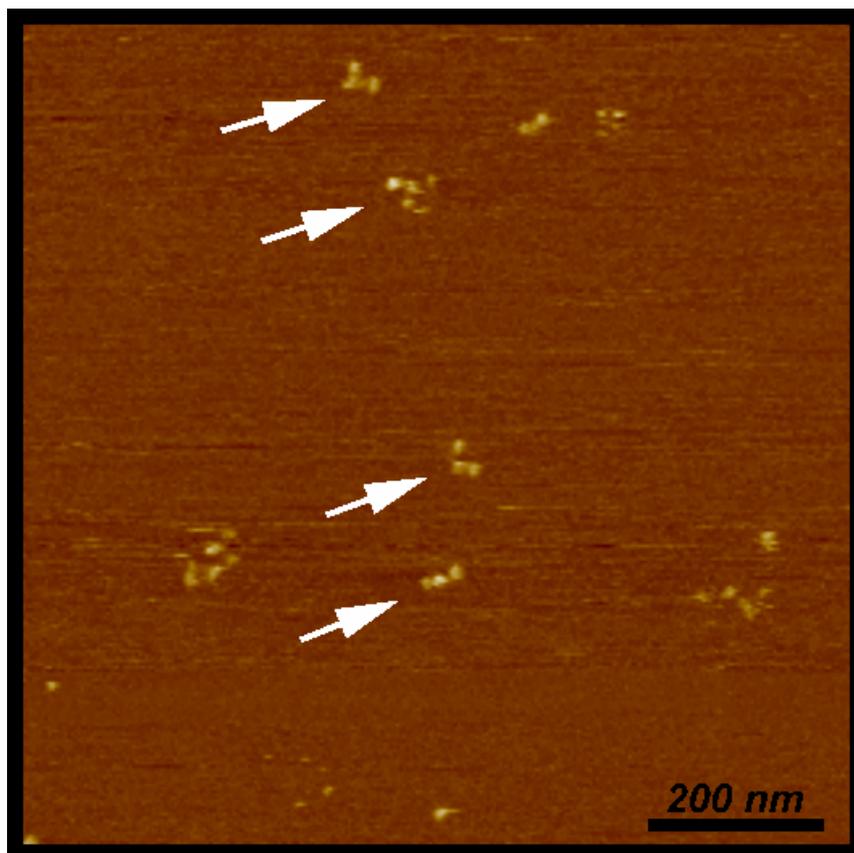


Abbildung 61: AFM-Abbildung dimerer SMC-Proteine auf Glimmer.

Dimere SMC-Proteine sind als Objekte zu erkennen, die aus drei Punkten zusammengesetzt sind (Pfeile, Höhen-skala 10 nm).

Auf Glimmer adsorbierte SMC-Proteine wurden als Partikel erkannt, die aus drei Punkten zusammengesetzt sind und deren Gesamtausdehnung etwa 60 – 80 nm betrug (siehe Pfeile). Verglichen mit der bekannten Topologie des SMC (vgl. Abbildung 21) bedeutet das, dass die

beiden Kopfdomänen und die Scharnierdomäne in der Topographie erkennbar waren, die sehr dünnen Verbindungsstränge aber aufgrund ihres geringen Durchmessers und ihrer Flexibilität nicht beobachtet werden konnten. Da die Kopfdomänen aber nicht nur als ein Partikel zu erkennen waren, gehen sie unter diesen Pufferbedingungen keine Bindung miteinander ein. Dies war jedoch nicht der einzige Zustand, in dem das SMC-Protein sichtbar war. Wie in Abbildung 62 erkennbar, lag ein signifikanter Teil des Proteins in einem Komplex vor, der aus einer zentralen Masse besteht und eine ringförmige, nicht absolut definierte Aura trug. Der Durchmesser lag mit 80 – 100 nm im Bereich des gestreckten SMC-Moleküls.

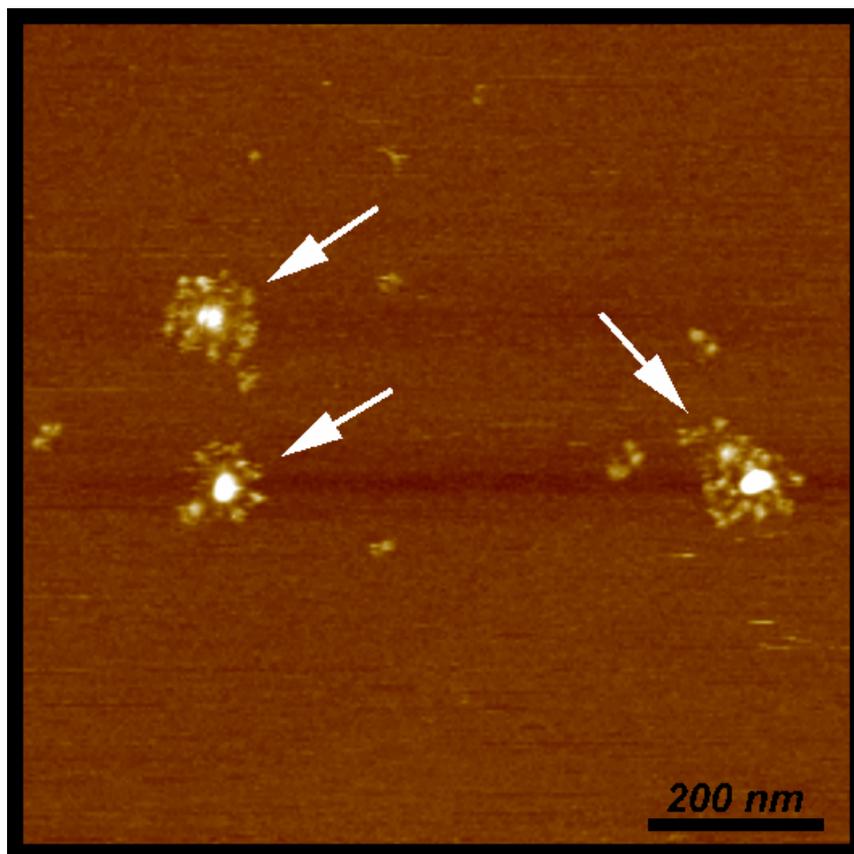


Abbildung 62: AFM-Abbildung von SMC-Komplexen auf Glimmer.

Oligomere SMC-Proteine sind als Objekte mit zentrale Masse und nicht aufgelöster Aura zu erkennen (Pfeile, Höhenskala 10 nm).

Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass die SMC-Proteine nicht mehr in gestreckter Form vorlagen. Aus Bindungsstudien war zwar klar, dass Scharnierdomänen nicht interagieren, bei den Kopfdomänen gab es aber deutliche Anzeichen für eine mögliche Komplexbindung. Daraus konnte ein Modell erstellt werden, bei dem die Kopfdomänen miteinander interagieren und die Scharnierdomänen nach außen ragen und aufgrund ihrer Flexibilität die nicht im Detail aufgelöste Aura bilden (Abbildung 63).

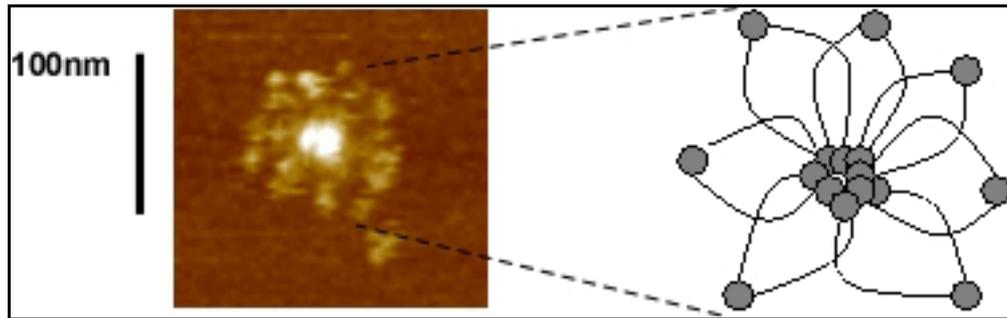


Abbildung 63: Modell des SMC-Komplexes.

Der im AFM abgebildete SMC-Komplex kann als Ring von über die Kopfdomäne verknüpften SMC-Proteinen interpretiert werden.^[117]

Dieser im AFM abgebildete Oligomerisierungszustand könnte auch der aktive Komplex im Bakterium (hier: *bacterius subtilis*) sein, mit dessen Hilfe während der Zellteilung die im Zentrum der Mutterzelle frisch replizierte DNA in den entstehenden Tochterzellen komprimiert wird. Mittels Fluoreszenzmessungen konnte im Bakterium eine eindeutige Ansammlung der SMC-Proteine und eine Kollokalisierung mit der DNA an diesen Zentren festgestellt werden.^[103]

Eine Abbildung der isolierten Kopfdomänen zeigte ebenfalls die Existenz von Partikeln mit ähnlichen Dimensionen wie die zentrale Erhöhung in den SMC-Komplexen (nicht gezeigt). Eine eindeutige Zuordnung ist jedoch aufgrund der Existenz höherzähliger Komplexe der Köpfe und der zu allgemeinen, mehrdeutigen Topographie von runden Partikeln nicht signifikant möglich.

Zu untersuchen bleibt einerseits, ob Mutanten, bei denen die Interaktion der Kopfdomänen gestört ist, ebenfalls Komplexe ausbilden, oder ob sie nur als einzelne SMC-Moleküle zu beobachten sind. Andererseits ist zusätzlich zu bestimmen, ob die SMC-Proteine sich um möglicherweise noch vorhandene DNA-Reste ballen, die nach den angewendeten Reinigungsmethoden noch vorhanden sein können, und es so zu den beobachteten Komplexen kommt.

Sollte dies bestätigt werden, könnte unter Zugabe von DNA und Nukleotiden eine Komplexbildung von SMC-Proteinen gezielt herbeigerufen werden, um die native Funktion zu imitieren und zu untersuchen.

7. Abschlussdiskussion

Ziel der Arbeit war, Informationen über Struktur und Funktion makromolekularer Protein-komplexe zu erhalten. Hierbei war insbesondere die Untersuchung am Einzelmolekül in nativer Umgebung von entscheidender Bedeutung.

Mit der Rasterkraftmikroskopie, vor allem mit der dynamischen Kraftmikroskopie, können empfindliche biologische Proben in gepufferten Lösung bei Raumtemperatur mit einer Auflösung bis in den Nanometerbereich untersucht werden. Zur Untersuchung von Proteinen müssen diese auf einer Oberfläche immobilisiert werden. Die Immobilisierung bedeutet jedoch eine gewisse Einschränkung. Jede Art von Fixierung ist mit einem Eingriff in das native Verhalten des Proteins verbunden. Ein anderer Nachteil liegt in der Arbeitsweise des AFM. Die Rasterkraftmikroskopie bedient sich einer physikalischen Interaktion zwischen einer scharfen Spitze und der Probe. Die wirkenden Kräfte werden ausgelesen und zur Messung der Topographie verwendet, können also nicht beliebig reduziert werden. Diese Wechselwirkung stellt eine weitere Manipulation der Probe dar.

Um diese Einschränkungen bei den beabsichtigten AFM-Messungen zu minimieren, wurde während der Arbeit eine Modifikation des Gerätes entwickelt. Über die Analyse der zweiten Harmonischen der Cantileverbewegung wird der Amplituden-Setpoints automatisch nachge-regelt, um die Kräfte während der Abbildung zu minimieren. So können auf Oberflächen adsorbierte, native und biologisch aktive Proteine unabhängig von äußeren Störungen, wie Austausch des umgebenden Puffers oder Zugabe von Chemikalien und Cofaktoren topographisch abgebildet werden. Damit ist gezieltes mechanisches Einwirken, Abbildung bei hoher Auflösung unter minimierter Probenbeeinflussung und sogar die Verfolgung von Reaktionen von einzelnen, löslichen Proteinen durchführbar.

Dies gestattete Untersuchungen des *Escherichia coli* Chaperonin GroEL im AFM. Bei der Abbildung von nativem, auf Glimmer stehendem Protein konnte die heptamere Struktur des Apikalrings aufgelöst werden. Über die Kontrolle der Abbildungskräfte war es möglich, GroEL gezielt mit der Spitze zu manipulieren und die obere Hälfte zu entfernen. Dies bot Zugang zu den äquatorialen Domänen, die die Schnittstelle zwischen den beiden heptameren Ringen darstellen. Die Schwierigkeit der unerwünschten Halbierung des Proteins durch Abscheren des oberen Rings durch die wirkenden Abbildungskräfte konnte jedoch nicht vollständig beseitigt werden, was eine systematische Untersuchung der apikalen Bindungsdomänen am nativen GroEL verhinderte.

Die GroEL-SR-Mutante, die im Gegensatz zum nativen Protein zwei unterschiedliche Seiten besitzt, konnte auf zwei verschiedenen Oberflächen in unterschiedlicher Orientierung spezi-

fisch immobilisiert werden. Auf Glimmer wurde die aus kristallographischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen unbekannte Äquatoriale Seite topographisch abgebildet. Sie zeigte eine zentrale Vertiefung, was darauf hindeutet, dass die hier vermuteten C- und N-Termini in die Kavität ragen, beziehungsweise sehr flexibel sind und der Tastspitze keinen Widerstand liefern. Auf HOPG band das GroEL-SR-Protein in entgegengesetzter Orientierung mit den äquatorialen Domänen auf der Oberfläche, was über Bindung des Cochaperonins GroES an der zugänglichen äquatorialen Seite gezeigt wurde. Die Bindungsfähigkeit des GroES an GroEL-SR war wahrscheinlich durch die bei der Abbildung auftretenden Kräfte beeinflusst, da im Gegensatz zu Wildtyp-GroEL keine stabile Bindung messbar war. Stattdessen wurde ein kurzlebigerer GroEL-SR-GroES-Komplex unter Zugabe von ADP beobachtet, dessen Stabilität sich unter Zugabe von ATP leicht erhöhte. Diese Veränderung kann aufgrund einer gestörten Funktionalität des Proteins durch die Adsorption an der HOPG-Oberfläche erklärt werden. Andererseits könnte die GroES-Bindung den bei der Abbildung wirkenden Kräften nicht dauerhaft standhalten, was zur Ablösung des Cochaperonins führt. Trotz der durch die zusätzliche Regelschleife minimierten Kraft konnte ein Einfluss der Abbildung auf die Probe hier nicht verhindert werden. Bei GroEL-SR-Substratkomplexen zeigte sich, dass unter Verwendung kleiner Substrate, die die Faltungskammer nicht komplett ausfüllen, nur eine indirekte Abbildung erreicht werden konnte. So führte bei GroEL-SR-CS-Komplexen eine induzierte Konformationsänderung der apikalen Bindungsdomänen zu einem unsymmetrischen Aufdrehen des Proteins und partieller Ablösung der Partikel von der Glimmeroberfläche. Unter Verwendung von großen Substraten konnte der GroEL-SR-SYT-Komplex selbst in extrem niedrigen Ausbeuten aufgrund des hervorragenden Signal-zu-Rausch-Verhältnisses an wenigen Einzelmolekülen auf HOPG direkt abgebildet werden. SYT, als ein Vertreter größerer Substrate (74 kDa), ragte aus der Faltungskavität heraus. Unter Zugabe von Nukleotid und GroES konnte es, wahrscheinlich aufgrund der Raumerfüllung, nicht mehr in der Faltungskammer eingekapselt werden. Dies bestätigte die These, dass die von GroEL abhängigen, großen Proteinsubstrate ohne GroES allein durch die Bindung in die Faltungskammer korrekt falten können.

Für die Zukunft soll das GroEL-Substrat-System so optimiert werden, dass es für nahfeldoptische (Scanning Nearfield Optical Microscopy, SNOM) Messungen eingesetzt werden kann. Mit dieser Methode könnte unter Verwendung von grün fluoreszierendem Protein (GFP) die Faltung direkt beobachtet werden. Aus biochemischen Versuchen ist die aktive Rückfaltung von GFP im GroEL bekannt. Sollte es vermehrt in der Kavität zurückfalten, kann dies aufgrund der hierbei wiedererlangten Fluoreszenz mittels eines SNOM visualisiert und eindeutig

mit hoher Ortsauflösung lokalisiert werden. Hierfür müssen die rasternahfeldoptischen Geräte zwar noch optimiert und für Messungen in Wasser vorbereitet werden. Die Faltung im GroEL-Systems könnte auf diese Weise am Einzelmolekül direkt verfolgt werden.

Für rasterkraftspektroskopische Messungen sollte das 20S-Proteasom aus *Thermoplasma acidophilum* in stehender Orientierung, d.h. mit senkrecht verlaufendem Reaktionskanal, immobilisiert werden. Da native 20S-Proteasome aus *T. acidophilum* auf Glimmer grundsätzlich in liegender Ausrichtung adsorbieren, mussten selektive Bindungen angestrengt werden. Unter Verwendung von His-Tag-Mutanten, wie des α -His₆-Proteasoms, wurden senkrecht immobilisierte Proteasome auf NTA-haltigen Lipiddoppelschichten realisiert und abgebildet. Auf diesen 2D-Kristallen wurde der Einfluss der Rasterkraftabbildung besonders deutlich. So konnte die erhaltene Topographie stark mit der eingestellten Kraft variiert werden. Für systematische kraftspektroskopische Untersuchungen erwies sich jedoch die verwendete Lipidschicht unter den benötigten Bedingungen nicht als stabil und homogen genug. Auf einer NTA-haltigen Lipidmonoschicht erzeugte kleine kristalline Bereiche von α -His₆-Proteasomen müssen für rasterkraftmikroskopische Messungen noch verbessert werden. Der Ansatz, die Histidinreste einer ‚turn‘-His₈-Mutante durch leichte Veränderung des pH-Wertes des verwendeten Puffers in ihrer Affinität zur Glimmeroberfläche zu variieren, verspricht die aussichtsreichste Probenpräparation für die Kraftspektroskopie zu sein. In diesen Versuchen soll die Interaktionskraft eines ungefalteten Substratproteins mit dem 20S-Proteasom vermessen werden. Dies könnte einerseits durch Annäherung und nachfolgende Entfernung einer AFM-Spitze, an die ungefaltetes Substrat gebunden ist, an das Proteasom, verwirklicht werden. Andererseits wären ebenfalls Messungen möglich, bei denen die beladene Spitze über dem Protein verharrt, und über gemessene Einschränkungen der freien thermischen Schwingung die Substrat-Proteasom-Interaktion bestimmt werden könnte.

Messungen am SMC-Protein aus *Bacillus subtilis* im AFM bestätigten dessen Aufbau aus zwei Kopfgruppen, die je über ca. 40 nm lange flexible Stränge mit einer Scharnierdomäne verbunden sind. Dieses Protein stellt aufgrund seiner flexiblen Struktur eine Herausforderung für jede Methode der Proteinstrukturaufklärung dar. Es konnten einzelne SMC-Moleküle in Form von Dreipunktobjekten abgebildet werden. Ob ein SMC-Protein durch Bindung der beiden Kopfgruppen in der Lage ist, einen DNA-Strang zu umschließen, konnte im AFM nicht beantwortet werden. Das größte Problem bei der Identifikation waren die dünnen flexiblen Arme, die nicht aufgelöst werden konnten. Neben Einzelmolekülen wurde ein makromolekularer Komplex, wahrscheinlich ein höherer Oligomerenkomplex von SMC-Proteinen abgebildet. Eine Interpretation dieses Makromoleküls ist ein Komplex, der aus vielen SMC-

Molekülen besteht und ein DNA-Fragment umschließt. Diese Erklärung steht im Einklang mit der vermuteten Funktion der SMC-Proteine bei der Kompaktierung neu replizierter DNA während der Zellteilung des Bakteriums. Für die Zukunft bleibt die Frage nach dem Nachweis der Kopfdomäneninteraktion bei der Komplexbildung. Andererseits ist zusätzlich zu bestimmen, ob die SMC-Proteine sich um möglicherweise noch vorhandene DNA-Reste anhäufen. Sollte dies bestätigt werden, könnte unter Zugabe von DNA und Nukleotiden eine Komplexbildung von SMC-Proteinen gezielt herbeigerufen werden, um die native Funktion zu imitieren und zu untersuchen.

Trotz der gewonnenen Erkenntnisse an den drei vorgestellten makromolekularen Proteinkomplexen bleiben Einschränkungen bei der Anwendung des AFM. Einerseits müssen die zu untersuchenden Proteine stabil genug an der Oberfläche adsorbiert werden. Andererseits müssen auch die resultierenden Kräfte der tastenden Spitze berücksichtigt werden, die ebenfalls von den gewählten Bedingungen, vor allem der Salzkonzentration und des pH-Wertes der Pufferlösung, abhängen. Generell gilt es, bei der Wahl des Oberflächematerials und der verwendeten Puffer die Immobilisierung so sanft wie möglich einzustellen, die nötige Haftung dennoch zu gewährleisten. Das Protein darf aber nicht in seiner Funktion eingeschränkt werden. Dies bleibt gerade bei einzelnen löslichen Proteinen, im Gegensatz zu membranständigen Proteinen, ein kritischer Faktor. Membranen lassen sich in der Regel einfacher und stabiler auf Oberflächen fixieren.

Die richtige Balance der wirkenden Kräfte einzustellen, ist die eigentliche Herausforderung. Hierzu bedeutet die zusätzliche Regelschleife eine konsequente Weiterentwicklung der dynamischen Rasterkraftmikroskopie. So hat sich bei der Untersuchung makromolekularer Proteinkomplexe im Rasterkraftmikroskop gezeigt, dass unter den variierbaren Parametern die Abbildungskraft der kritische Faktor zur erfolgreichen, artefaktfreien und biologisch aussagekräftigen Abbildung bleibt. So verfälschte die Abbildung durch auftretende Kräfte einerseits Bindungskinetiken, wie am GroEL-SR-GroES-Komplex zu sehen ist, andererseits konnten aber unbekannte Regionen durch vorherige Manipulationen, wie das Halbieren nativer GroEL, topographisch erfasst werden. Beim Proteasom zeigte sich, wie Variationen der eingestellten Abbildungskraft zu Topographieartefakten führen können. Beim SMC-Protein wurde aufgrund leicht überhöhter Kräfte das Protein bei der Abbildung von der Oberfläche entfernt, da die Immobilisierung nicht stark genug war. Erst eine stabilere Bindung an die Oberfläche zeigte die Existenz eines Überkomplexes. Diese Beispiele verdeutlichen den Wert der Kontrolle der wirkenden Abbildungskraft.

8. Materialien und Methoden

8.1 Rasterkraftmikroskop

In dieser Arbeit wurde ein kommerzielles Rasterkraftmikroskop (Nanoscope IIIa Veeco-Digital Instruments, Santa Barbara, USA) eingesetzt. Verwendet wurde ein Rasterpiezo des Typs E mit einem maximalen Rasterbereich von 10 μm und des Typs F mit einem maximalen Rasterbereich von 100 μm , sowie Flüssigkeitszellen mit Piezoanregung für die Abbildung in Lösung (Digital Instruments).

Diese Flüssigkeitszelle wurde vor jeder Verwendung sorgfältig mit Spülmittel vorgewaschen und anschließend mehrmals mit Ethanol_{abs} und H₂O_{MilliQ} abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet, um Ablagerungen von Salzresten zu vermeiden.

Über das ‚Signal-Access-Modul‘ (break out box, Digital Instruments) wurden zusätzliche, externe Signale, wie z.B. das Regelsignal für den Amplituden-Setpoint, eingespeist. Neben diesen gegebenen Spannungen wurden auch direkt das Photodioden- und das Anregungspiezozignal am Messkopf mittels einer Reihe von Spannungsverstärkern, die zwischen Gerätebasis und Messkopf geschaltet wird, abgegriffen und extern weiterverarbeitet.

Für die Messungen in Flüssigkeit wurden die Cantilever OLYMPUS OMCL TR800PSA, mit 100 μm Länge und einer Kraftkonstante von 0.68 N/m, und OLYMPUS OMCL RC800PSA, mit 100 μm Länge und 0.39 N/m bei einer Anregungsfrequenz von ca. 19 kHz mit einer Tappingamplitude von ca. 4 nm verwendet.

8.2 Regelschleife auf die zweite Harmonische

Die direkt vom Messkopf abgegriffenen, unverfälschten Spannungssignale für Auslenkung und Anregung des Cantilevers wurden in einen kommerziellen Lock-In-Verstärker (LIA-BV-150, FEMTO Messtechnik, Deutschland) mit Detektion auf die doppelte Frequenz im Auslenkungssignal und mit dem Anregungssignal als Referenz gespeist. Zur Reduzierung der Grundspannung (Offset) ohne Kontakt der Spitze mit der Probe wurde das R-Ausgangssignal mit den X- und Y-Offsets über die extra verfügbaren Eingänge des Lock-In Verstärkers minimiert. Dieses der Amplitude der zweiten Harmonischen der Leverbewegung entsprechende Signal wurde anschließend in eine Regeleinheit mit hohem Integrationsfaktor für Zeitkonstanten in Sekundenbereich gespeist, die den Wert gegen eine justierbare Referenzspannung konstant zu halten versucht. Die erhaltene Regelspannung wurde mittels Addiereinheit auf die aus dem ‚Signal-Access-Modul‘ erhaltene sog. ‚Bias‘-Ausgangsspannung, die dem Amplituden-Setpoint entspricht, addiert und in den entsprechenden Eingang zurückgespeist.

8.3 Probenvorbereitung für AFM-Messungen

Herstellung der Probenträger

Für die Messungen auf Glimmer diente als Probenträger ein rundes, ca. 5 mm breites ausgestanztes Glimmerplättchen, das mit doppelseitigem Klebeband auf ein Metallplättchen, das magnetisch auf dem Piezo gehalten wird, geklebt wurde. Die Glimmeroberfläche wurde durch Abziehen der obersten Schicht mittels Tesafilm gereinigt.

Für Messungen auf HOPG diente ein auf 1 mm gespaltener Röntgenstrahlfilter aus HOPG mit ca. 8 mm x 8 mm Fläche, mit Klebeband auf einem Metallplättchen befestigt, als Probenträger. Die Oberfläche wurde ebenfalls durch Abziehen eines aufgeklebten Tesafilms vor jedem Versuch gereinigt.

Beide Oberflächen wurden normalerweise zuerst mit 5-10 μl des Belegungspuffers benetzt. Die Sauberkeit äußerte sich im Ausbreitungsverhalten des Tropfen, was sich beim hydrophilen Glimmer durch schnelles Ausbreiten des Tropfens, und beim hydrophoben HOPG durch Stehen bleiben des Tropfen mit großem Kontaktwinkel zeigte.

Im Anschluss wurden entsprechend 5-20 μl der jeweiligen Probenlösungen aufgegeben und je nach Probe meist 30 min inkubiert. Anschließend wurde mit dem jeweiligen Abbildungspuffer, z.B. TRIS, HEPES oder $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$, gespült, wobei die Probe nie eintrocknen durfte, und darin abgebildet.

Zur Präparation der ‚template stripped‘-Goldoberflächen wurde frisch gespaltener Glimmer mit ca. 100 nm Gold bei ca. 10^{-5} mbar bedampft und die Trägerplättchen anschließend mit Sekundenkleber (Henkel) oder Zweikomponentenkleber (Schnellfest, Henkel) auf die Goldschicht geklebt. Zur Verwendung wurden die Trägerplättchen mit der Goldschicht vom Glimmer abgezogen, eventuell überbleibende Glimmerreste entfernt und mit der Proteinlösung beschichtet.

Herstellung der GroEL-Proben für das AFM

Zur Abbildung von GroEL auf Glimmer wurden 5-10 μl einer mit TRIS_{low} (20 mM Tris HCl, pH 8.0, 5 mM KCl, 5 mM MgCl_2) auf 0.33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (0.41 μM) verdünnten Proteinlösung 30 min auf dem Glimmer inkubiert, mit demselben Puffer gespült und im AFM abgebildet. Zur Bindung von GroES auf GroEL wurde 500 μl TRIS_{low} durch 4 mM ATP und 1.6 μM (0.13 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) GroES ergänzt.

Zur Abbildung von GroEL-SR bzw. den GroEL-SR-Substrat-Komplexen auf Glimmer oder HOPG wurden 5-10 μl einer mit TRIS (50 mM Tris HCl, pH 8.0, 10 mM KCl, 10 mM MgCl_2) auf 0.12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (0.288 μM) verdünnten Proteinlösung 30 min auf dem Glimmer inku-

biert, mit demselben Puffer gespült und im AFM abgebildet. Für die GroES-Bindungsexperimente wurde der Abbildungspuffer durch 500 μl TRIS-ES (50 mM Tris HCl, pH 8.0, 10 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 1,6 μM GroES (0.13 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)) mit 4 mM ADP bzw. 4 mM ATP ersetzt.

Zur Abbildung von GroEL-SR_{A109C} und GroEL-SR_{A464C} auf dem ‚template stripped‘-Goldoberflächen wurden 5–10 μl einer mit TRIS (50 mM Tris HCl, pH 8.0, 10 mM KCl, 10 mM MgCl_2) auf ca. 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (0.24 μM) verdünnten Proteinlösung 30 min auf Glimmer inkubiert, mit demselben Puffer gespült und im AFM abgebildet.

Präparation der Substratkomplexe von GroEL-SR

Die GroEL-SR-CS-Komplexe und die GroEL-SR-Luc-Komplexe wurden durch thermische Denaturierung von Citratsynthase-Lösung (30 min 42°C) bzw. Luciferase-Lösungen (10 min 42°C) in Anwesenheit von GroEL-SR durchgeführt. Anschließend wurden die GroEL-SR-Substrat-Komplexe und das restliche GroEL-SR von nicht umgesetztem Substrat per Gelfiltrationssäulenchromatographie (SMART System, Amersham Biosciences) unter Verwendung einer Superose 6 Säule und TRIS-Puffer getrennt. Die Fraktionen aus der Gelfiltration wurden direkt für die AFM-Probenpräparation verwendet.

Die GroEL-SR-SYT-Komplexe wurden durch eine 1:100 Verdünnung von 2 μl mit Guanidiniumchlorid denaturierter SYT-Lösung (6 M GuCl, 10 mM DTT, 50 μM SYT) in 198 μl GroEL-SR-Puffer (20 MOPS pH 7.4, 100 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 500 nM GroEL-SR) hergestellt. Die Komplexlösung wurde auf ca. 50 μl aufkonzentriert (30-K-Konzentrator Amicon Ultra, Millipore) und über eine Gelfiltrationssäulenchromatographie (Superose 6) aufgetrennt. Die Fraktionen aus der Gelfiltration wurden direkt für die AFM-Probenpräparation verwendet.

Herstellung der Lipidschichten

Zur Bereitung von Ni-NTA-Lipidvesikel wurden 18 μl in CHCl_3 gelöstes SOPC (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 12.7 mM) und 2 μl in CHCl_3 gelöstes Ni-NTA-DODA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 11.1 mM) gemischt, nach dem Trockenblasen mit N_2 in 200 μl HEPES (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5) aufgenommen, 3 h bei 37°C inkubiert und für 21 Durchgänge durch einen 200 nm Filter extrudiert (Lipid-Extruder, AVESTIN).

Zur Spreizung einer Lipiddoppelschicht auf Glimmer wurden 10 μl der Ni-NTA-Vesikel 3 h bei 50 °C inkubiert, der Träger anschließend mit HEPES (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5) gespült und gegebenenfalls im AFM abgebildet.

Zur Übertragung einer Lipidmonoschicht mit 20S-Proteasome auf HOPG wurden 10 μl eines in CHCl_3 gelösten SOPC-Ni-NTA-DODA-Gemisches (9 SOPC : 1 Ni-NTA-DODA, $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$) auf einen 50 μl Tropfen Proteasom-haltigen Puffers (20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 80 nM α -His₆-Proteasom ($0.06\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$)) gegeben, 30 min inkubiert und die Lipidmonoschicht mit dem HOPG-Träger durch senkrecht Annähern an den Tropfen bis zum Kontakt abgenommen.

Herstellung der 20S-Proteasom-Proben für das AFM

Zur Abbildung des α -His₆- und des β -His₆-20S-Proteasoms auf Glimmer wurden 5-10 μl einer mit TRIS (50 mM Tris HCl, pH 8.0, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂) oder HEPES (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5) auf $0.10\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($0.14\ \mu\text{M}$) verdünnten Proteinlösung 15 min auf dem Glimmer inkubiert, mit demselben Puffer gespült und im AFM abgebildet.

Zur Abbildung der ‚turn‘-His₈-Proteasome auf Glimmer wurden 5-10 μl einer mit TRIS (50 mM Tris HCl, pH 8.0, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂) oder HEPES (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5) auf $0.10\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($0.14\ \mu\text{M}$) verdünnten Proteinlösung 15 min auf dem Glimmer inkubiert, mit demselben Puffer gespült und im AFM abgebildet

Für die Proteasom-Bindungsexperimente auf der Ni-NTA-Lipiddoppelschicht auf Glimmer wurde auf der gespreizten Lipiddoppelschicht der Abbildungspuffer im AFM durch 500 μl Proteasom-haltigen Puffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 8 nM α -His₆-Proteasom ($0.006\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$)) ersetzt und abgebildet.

Für die Über-Nacht-Präparation der 2D-Kristalle von 20S-Proteasome auf der Ni-NTA-Lipiddoppelschicht auf Glimmer wurden auf die frisch gespreizte Lipiddoppelschicht 50 μl Proteasom-haltigen Puffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 80 nM α -His₆-Proteasom ($0.06\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$)) gegeben, 24 h bei RT inkubiert und anschließend mit HEPES gespült und in dem Puffer im AFM abgebildet.

Herstellung der SMC-Protein-Proben für das AFM

Zur Abbildung des SMC-Proteins wurden 10 μl einer mit HEPES_{SMC} (50 mM Hepes, pH 8.0, 300 mM NaCl) auf $0.01\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnten Proteinlösung 30 min auf Glimmer inkubiert, mit demselben Puffer gespült und im AFM abgebildet.

8.4 Expression und Aufreinigung der Proteine

Alle biochemischen Arbeiten wurden nach Standardmethoden durchgeführt.^[131]

Gereinigtes GroEL, GroES, wurde freundlicher Weise von Manajit Hayer-Hartl, und SYT und MetE von Tobias Maier, beide Abteilung für Zelluläre Biochemie, MPI für Biochemie, Martinsried, zur Verfügung gestellt.

GroEL-SR

Bakterienstamm und Plasmid

Zur Expression des GroEL-SR wurde in den *E. coli*-Stamm BL21pLysS das Plasmid pET11a-SR über Hitzeschock (30 s, 42°C) transformiert.

Die Mutanten GroEL-SR_{A109C} und GroEL-SR_{A464C} wurde freundlicher Weise von Karin Felderer und Susanne Witt aus dem GroEL-SR Plasmid unter Anwendung eines PCR-basierten Protokolls für Punktmutationen (QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit, STRATAGENE) generiert. Die Expression und Proteinaufreinigung wurde analog zu GroEL-SR durchgeführt.

Proteinreinigung

Nach der Transformation wurde 1 ml Zelloösung zur Gewinnung von Einzelkulturen auf LB-Agarplatten, die Ampicillin (100µg/ml) enthielt, ausgestrichen. Eine Kultur wurde gepickt und in 120 ml LB-Medium mit Ampicillin (100µg/ml) als Übernachtskultur in Schikanekolben angezogen.

Nach dem Überimpfen und 3 h Anwachsen in 6 l LB-Medium mit Ampicillin (100µg/ml) bei 37°C unter Schütteln in Schikanekolben bis zu einer OD von 0.8 wurde durch Zugabe von IPTG auf 1 mM Gesamtkonzentration induziert, für weitere 3 h inkubiert und anschließend bei 4°C durch Zentrifugieren bei 4500xg geerntet.

Die nach der Expression eingefrorenen Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in 50 ml Lyse/Dnase-Puffer resuspendiert. Nach 15 min wurden diese mit Hilfe eines Cell-Disruptors bei 10.000 MPa aufgeschlossen. Das Homogenat wurde erst bei 4°C 30 min bei 3700xg, 30 min bei 11.000xg und schließlich 60 min bei 300.000xg zentrifugiert. Der klare Überstand wurde zur sofortigen Aufreinigung weiterverwendet oder bei -20°C tiefgefroren.

Die säulenchromatographische Aufreinigung wurde analog eines Reinigungsprotokolls vom Arbeitskreis U. Hartl vom 18.02.1999, das freundlicherweise mit dem zur Verfügung gestellten Plasmid ausgehändigt wurde, ausgeführt.

Folgende vier Säulen wurden zur Aufreinigung verwendet:

Tabelle 3: Zusammenstellung der Chromatographiesäulen bei der Aufreinigung von GroEL-SR.

Schritt	Matrix	Art	Größe	pH des Puffers
1	Q-Sepharose	Aniontauscher	16/10, 22 ml	7.7
2	Source 15 Q	Aniontauscher	HR 10/10, 8 ml	5.8
3	Mono Q	Aniontauscher	HR 5/5, 1 ml	7.8
4	Superdex 200	Gelfiltration	HiLoad 16/60, 120 ml	7.2

Die verwendeten Puffer und Elutions- und Regenerationsbedingungen sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 4: Zusammenstellung der Elutionsbedingungen bei der Aufreinigung von GroEL-SR.

	Q-Sepharose	Source 15 Q	Mono Q	Superdex 200
Äquilibrierung	30 mM Tris HCl pH 7.7 1 mM EDTA 1 mM DTT	25 mM Histidin pH 5.8 1 mM DTT	30 mM Tris HCl pH 7.7 1 mM EDTA 1 mM DTT	20 mM MOPS pH 7.2 50 mM NaCl 10% Glycerol
Waschen		+5 mM NaCl		
Auftrag	33 ml	41 ml	10 ml	2 ml
Elution	+1 M NaCl	+0.5 M NaCl	1 M NaCl	
Regeneration	1 M NaOH	1 M NaOH 2 M NaCl	1 M NaOH 2 M NaCl	H ₂ O _{MilliQ}

Die Durchführung der drei Anionentauschersäulen war einheitlich. Sie wurden zuerst im verwendeten Niedersalzpuffer äquilibriert, die Proteinlösung aufgegeben, weitere 5 Säulenvolumen gespült und anschließend ein Salzgradient über ca. 10 Säulenvolumen bis zum Hochsalz-Elutionspuffer gefahren.

Alle Fraktionen wurden bei jedem Reinigungsschritt mittels SDS-Gelelektrophorese auf das Zielprotein hin untersucht, die Fraktionen mit hohem Anteil gepoolt, aufkonzentriert und jeweils für die nächste Säule umgepuffert.

Bei der Superdex-200-Gelfiltrationssäule wurde folgendes Diagramm der UV-Absorption gegen das Elutionsvolumen erhalten:

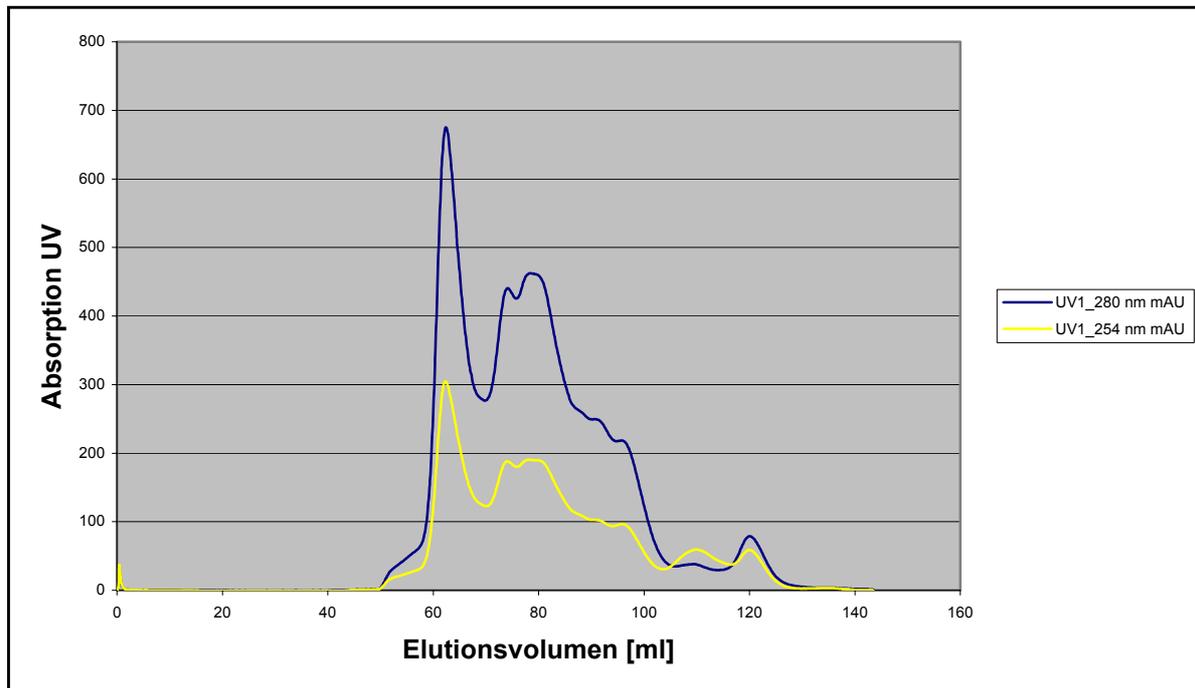


Abbildung 64: Laufdiagramm der Superdex-200-Gelfiltrationssäule bei der GroEL-SR Aufreinigung.

Die Proteinfractionen von 60 ml bis 68 ml der Superdex-200-Gelfiltration entsprachen gemäß SDS Gelelektrophorese (siehe Abschnitt Proteinanalyse) dem gewünschten, sauberen GroEL-SR und wurden gesammelt, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

Um Überreste gebundenen Substratproteins für elektronenmikroskopische und Substratbindungsuntersuchungen zu entfernen, wurde eine fünfte Säule, eine Red Agarose 120 CL 3000, verwendet.^[132] Bei dieser Säule ist ein Farbstoff (Red Dye), der spezifisch an bestimmte, vor allem NADH-umsetzende Proteine bindet, kovalent mit der Agarosematrix verknüpft.

GroEL-SR wurde bei 4°C in einem speziell optimiertem Nidrigsalzpuffer (20 mM TRIS, pH 7.5, 5 mM MgCl_2) auf die Säule geladen, eine Stunde inkubiert und anschließend eluiert. Die GroEL-SR enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt, umgepuffert, aufkonzentriert und zur Lagerung bei -20°C aliquotiert. Auf diese Weise konnte die Tryptophanfluoreszenz, die aufgrund des Fehlens eines Tryptophans im GroEL-SR nur durch das Substrat verursacht wird, auf ca. 10% des Ausgangswertes reduziert werden. Die Reduktion gebundenen Substrates wurde mittels elektronenmikroskopischen Mittelungen (vgl. Kapitel 6.1.3.2) bestätigt.

Luciferase

Bakterienstamm und Plasmid

Zur Expression der Luciferase wurde in den *E. coli* Stamm BL21pLysS das Plasmid pET3a-Luc-FXa-his über Hitzeschock (30 s, 42°C) transformiert.

Proteinreinigung

Nach der Transformation wurde 1 ml Zelloesung zur Gewinnung von Einzelkulturen auf LB-Agarplatten, die Ampicillin (100µg/ml) enthielt, ausgestrichen. Eine Kultur wurde gepickt und in 120 ml LB-Medium mit Ampicillin (100µg/ml) in Schikanekolben als Übernachtskultur angezogen.

Nach dem Überimpfen und 3 h Anwachsen in 6 l LB-Medium in Schikanekolben mit Ampicillin (100µg/ml) bei 30°C bis zu einer OD von 0.8 wurde durch Zugabe von IPTG auf 1 mM Gesamtkonzentration induziert, für weitere 3 h inkubiert und anschließend bei 4°C durch Zentrifugieren bei 4500xg geerntet.

Die nach der Expression eingefrorenen Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in 50 ml Lyse/DNase-Puffer resuspendiert. Nach 15 min wurden diese mit Hilfe eines Cell-Disruptors bei 10.000 MPa aufgeschlossen. Das Homogenat wurde bei 4°C zuerst 30 min bei 3700xg, nachfolgend 30 min bei 11.000xg und schließlich 60 min bei 300.000xg zentrifugiert. Der klare Überstand wurde zur sofortigen Aufreinigung verwendet oder bei -20°C eingefroren.

Zur Aufreinigung konnte aufgrund des am Protein vorhandenen His-Tags über eine Affinitätsäulen chromatographie mit 5 ml HiTrap Ni-NTA Säulen (Amersham) durchgeführt werden. Das zentrifugierte Lysat wurde über die in Puffer A (30 mM Na_xH_{3-x}PO₄, pH 8.0, 300 mM NaCl, 1mM BME) equilibrierte Säule bei 4°C über Nacht im Kreislauf gepumpt, um eine optimale Beladung der Nickel-Matrix zu erreichen. Anschließend wurde die Säule drei Säulenvolumen mit Puffer A gewaschen und ein Gradient gegen Puffer B (Puffer A + 500 mM Imidazol) gefahren. Die Fraktionen des Imidazolgradienten wurden mittels SDS-Gelelektrophorese auf Reinheit der Luciferase untersucht, gesammelt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Rubisco

Bakterienstamm und Plasmid

Zur Expression von Rubisco aus *Rhodospirillum rubrum* wurde in den *E. coli* Stamm BL21 DE3 das Plasmid pET11a-Rub über Hitzeschock (30 s, 42°C) transformiert.

Proteinreinigung

Nach der Transformation wurde 1 ml Zelllösung zur Gewinnung von Einzelkulturen auf LB-Agarplatten, die Ampicillin (100µg/ml) enthielt, ausgestrichen. Eine Kultur wurde gepickt und in 120 ml LB-Medium mit Ampicillin (100µg/ml) als Übernachtskultur in Schikanekolben angezogen. Nach dem Überimpfen und 3 h Anwachsen in 6 l LB-Medium in Schikanekolben mit Ampicillin (100µg/ml) bei 37°C bis zu einer OD von 0.8 wurde durch Zugabe von IPTG auf 1 mM Gesamtkonzentration induziert, für weitere 3 h inkubiert und anschließend bei 4°C durch Zentrifugieren bei 4500xg geerntet.

Die nach der Expression eingefrorenen Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in 50 ml Lyse/DNase-Puffer resuspendiert. Nach 15 min wurden diese mit Hilfe eines Cell-Disruptors bei 10.000 MPa aufgeschlossen. Nach 20 min Erhitzen auf 55°C zur Fällung der *E. coli* Proteine wurde das Homogenat bei 4°C erst 30 min bei 3700xg, nachfolgend 30 min bei 11.000xg und schließlich 60 min bei 300.000xg zentrifugiert. Der klare Überstand wurde entsprechend zur sofortigen Aufreinigung weiterverwendet oder bei -20°C eingefroren.

Folgende Säulen wurden zur Aufreinigung verwendet:

Tabelle 5: Zusammenstellung der Chromatographiesäulen bei der Aufreinigung von Rubisco.

Schritt	Matrix	Art	Größe	pH des Puffers
1	Q-Sepharose	Aniontauscher	16/10, 22 ml	8.0
2	Superdex 200	Gelfiltration	HiLoad 16/60, 120 ml	7.6
3	Phenyl HP	HIC-Säule	HiTrap 5 ml	7.1

Die verwendeten Puffer und Elutions- und Regenerationsbedingungen sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 6: Zusammenstellung der Elutionsbedingungen bei der Aufreinigung von Rubisco.

Schritt	Q-Sepharose	Superdex 200	Phenyl HP
Äquibrierung	50 mM Tris HCl pH 8.0 0.1mM EDTA 1mM DTT	100 mM TRIS pH 7.6 1 mM EDTA 1 mM DTT	50 mM $K_xH_{3-x}PO_4$ pH 7.1 1,7 M $(NH_4)SO_4$
Auftrag	50 ml	2 ml	10 ml
Elution	+0.5 M NaCl		-1,7 M $(NH_4)SO_4$

Proteinanalytik

Mittels SDS-Gelelektrophorese wurde die Citratsynthase im GroEL-SR-CS-Komplex nachgewiesen. Folgendes SDS-Gel (Abbildung 65) zeigt, neben gereinigtem GroEL-SR (1) und Citratsynthase nach der Dialyse (3), den GroEL-SR-CS-Komplex (2) nach der SMART-Gelfiltration (vgl Kapitel 8.3). Die Citratsynthasebande ist schwach, aber deutlich zu erkennen (Pfeil).

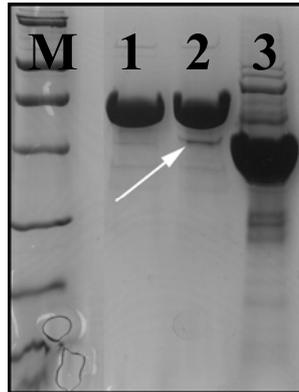


Abbildung 65: SDS-Acrylamidgel von GroEL-SR-CS-Komplexen.

M entspricht den Größenmarkerbanden, in 1 ist gereinigtes GroEL-SR, in 2 GroEL-SR-CS-Komplex und in 3 die Citratsynthase nach der Dialyse aufgetragen.

Es wurden 12%ige Gele und Auftragspuffer nach Laemmli verwendet.

Als Proben wurde jeweils 5-15 μl Proteinlösung mit Probenpuffer auf 25 μl aufgefüllt, 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend 15 μl aufs Gel aufgegeben. Nach dem Lauf wurde 15 min in Fixierlösung inkubiert, kurz in Coomassie-Lösung in der Mikrowelle erwärmt, 30 min bei Raumtemperatur gefärbt, in Wasser abgespült und abschließend 60 min in Destainlösung entfärbt.

Die Zusammensetzung der 12%igen Gele war wie folgt:

12%iges Trenngel (5 Gele):

13.2 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$, 16.0 ml 30% Acrylamid, 10.0 ml Trenngelpuffer, 0.4 ml 10% SDS-Lösung, 0.4 ml 10% APS, 10.0 μl TEMED.

5%iges Sammelgel (5 Gele):

10.2 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$, 2.55 ml 30% Acrylamid, 1.875 ml Sammelgelpuffer, 0.15 ml 10% SDS-Lösung, 0.15 ml 10% APS, 15.0 μl TEMED.

Trenngelpuffer: 1.5 M Tris, pH 8.8.

Sammelgelpuffer: 1 M Tris, pH 6.8.

Laufpuffer: 0.025 M Tris; 0.192 M Glycin, 0.1% SDS

8.5 Elektronenmikroskopie

Abbildungen der Cantileverspitzen

Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen der Cantileverspitzen wurden mittels eines speziell angefertigten Cantileverhalters an einem CM-12 (Philips) bei 120 kV durchgeführt. Fokus, Astigmatismus und die Belichtungszeit der CCD Kamera wurden manuell justiert.

Probenvorbereitung für negativ kontrastierte Aufnahmen

Auf einem Kupfergrid, das mit einem 10 nm Kohlefilm beschichtet und vor Gebrauch im Plasmacleaner gereinigt wurde, wird etwa 5 μl einer Proteinlösung mit einer Konzentration von etwa 0.05 mg/ml für 1 min inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit Filterpapier abgesaugt, das Grid mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$ gewaschen und 15 s mit 1% Uranylacetat (pH 4.1) negativ kontrastiert.

Die Probenvorbereitung und die EM-Aufnahmen wurden von Frau Brigitte Kühlmorgen an einem CM12 (Philips) durchgeführt.

Bildverarbeitung

Zur Auswertung der EM-Aufnahmen wurde das Softwarepaket ‚TOM‘ verwendet, das in der Abteilung entwickelt wurde. Mit dem Programm ‚tom_average2D‘ konnten die Rohdaten vom Mikroskop eingelesen und weiterverarbeitet werden. Zur Erstellung der Mittelungen (Abbildung 40) wurde eine Referenz aus 64 manuell gewählten Partikeln erstellt, die anschließend als Matrize für die automatische Partikelsuche (Korrelationssuche) verwendet wurde. Die Klassifizierung der Partikelkollektionen (Abbildung 45) wurde mittels der Funktion ‚EIGEN‘ des EM-Softwarepaketes der Abteilung durchgeführt.

8.6 Chemikalien und Geräte

Chemikalien/Enzyme	Abkürzung/Formel	Hersteller
1,4-Dithiothreitol	DTT	Merck
Acrylamid 30% / Bisacrylamid 0,8%		Protogel
Adenosintriphosphat	ATP	Pharmacia
Ammoniumperoxodisulfat	APS	Merck
Ampicillin	Amp	Amersham
Bacto Tryptone		DIFCO
Bacto Yeast Extract		DIFCO
Bovine Serum Albumin	BSA	Biolabs
Bradford-Farbstoff		BioRad
Bromphenolblau		Serva
Chloramphenicol (kristallin)	Cam	Sigma
Chloroform	CHCl ₃	Riedel de Haen
Citratsynthase	CS	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R		Sigma
Dinatriumphosphat	Na ₂ HPO ₄	Merck
Desoxyribonuklease I	DNase	Sigma
Eisessig		Merck
Ethanol abs.	EtOH	Riedel de Haen
Glycerin 86-88%		Riedel de Haen
Guanidiniumchlorid	GuCl	Merck
4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethanesulfonsäure	Hepes	Merck
Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranoside	IPTG	Biomol
Imidazol		Merck
Kanamycin	Kan	Sigma
Lysozym		Sigma
Magnesiumchlorid	MgCl ₂	Merck
Malatdehydrogenase (mitochondrial)	mtMDH	Sigma
Marker SDS-Gel		Sigma
Methanol	MeOH	Merck
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	TEMED	Serva
Natriumchlorid	NaCl	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	NaH ₂ PO ₄	Merck
Natriumdodecylsulfat	SDS	ROTH
Proteaseinhibitor <i>cocktail tablets</i>		Boehringer Mannheim
Salzsäure konz.	HCl	Merck
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Tris	Riedel de Haen
Tricine		Calbiochem

Gerät

Blockthermostat BT200
 Cell-Disruptor
 Eismaschine
 FPLC LCC 500 PLUS / Pump P-500 (2x)
 Fraktionssammler LKB Redi Frac
 Gelfiltrationssäule Superdex-200 (d=10 mm, h=60 cm)
 Gelfiltrationssäule Superose 6 (d=2 mm, h=30 cm)
 Gelgießkassette (5 Gele)
 Gel Trockner
 HIC-Chromatographiesäule (d=5 mm, h=5 cm)
 Ionenauschersäule MonoQ (d=5 mm, h=10 cm)
 Ionenauschersäule Q-Sepharose (d=5 mm, h=10 cm)
 JSM-5600 Scanning Electron Microscope
 Konzentratoren, Jumbosep 50 ml 30K
 Konzentratoren, Microsep 3,5 ml 30K
 Lipid-Extruder
 7280 DSP Lock-In-Verstärker
 Mikrowelle
 MilliQ PLUS Ultra Pure Water System
 pH-Meter: pH525
 Photomesszelle LKB Unit UV-1
 Photometer: Lambda 2 UV/VIS Photospectrometer
 Proteinreinigungssystem ÄKTA
 Proteinreinigungssystem SMART
 Präzision-Küvetten, Quarz Typ Nr. 105.251 –QS
 Rasterkraftmikroskop (Multimode)
 Reaktionsgefäße 1,5/2 ml
 SDS-Gelelektrophoresekammer: Mighty Small II for 7x8 cm gels
 Vortexer Genie 2TM
 Waagen
 Zentrifuge 5417R
 Zentrifuge Avanti J25
 Zentrifuge Rotana 45 RS
 Zentrifuge OptimaTM LE-80K
 Zentrifugenröhrchen 50 ml/15 ml Gamma sterilisiert
 Zentrifugenrotor JA-10
 Zentrifugenrotor JA-25.50
 Zentrifugenrotor F 45-30-11

Hersteller

Kleinfeld Labort.
 AVESTIN
 Ziegler
 Pharmacia Biotech
 Pharmacia Biotech
 Pharmacia Biotech
 Pharmacia Biotech
 Pharmacia Biotech
 BIO-RAD
 Pharmacia Biotech
 Pharmacia Biotech
 Pharmacia Biotech
 JEOL
 Pall Filtron
 Pall Filtron
 AVESTIN
 PERKIN ELMER
 AEG
 Millipore
 WTW
 Pharmacia
 PERKIN ELMER
 Pharmacia Biotech
 Pharmacia Biotech
 HELIMA
 Digital Instruments
 Eppendorf
 Pharmacia
 Bender & Hohbein AG
 Sartorius
 Eppendorf
 Beckman
 Hettich
 Beckman
 TPP
 Beckman
 Beckman
 Eppendorf

8.7 Lösungen und Puffer

LB-Medium (5 l):	25 g Hefeextrakt, 50 g Trypton, 50 g NaCl, 5 ml NaOH.
Lyse/DNase-Puffer:	Proteaseinhibitortablette, DNase, Lysozym in 50 mM Tris HCl, pH 7.5.
Probenpuffer SDS-Page:	4% SDS, 12% Glycerin, 50 mM Tris, pH 6,8, 2% Mercaptoethanol, 0,01% Bromphenolblau.
Coomassie-Färbelösung:	0,4% Coomassie Brilliant Blue G250, 10% Eisessig, 40% EtOH.
Destainlösung:	40% EtOH, 10% Eisessig, 50% H ₂ O _{MilliQ} .
Abbildungspuffer (TRIS):	50 mM Tris HCl, 10 KCl, 10 MgCl ₂ , pH 8.0.
Abbildungspuffer (TRIS _{DTT}):	50 mM Tris HCl, 10 KCl, 10 MgCl ₂ , 1 mM DTT, pH 8.0.
Abbildungspuffer (TRIS _{low}):	20 mM Tris HCl, 5 KCl, 5 MgCl ₂ , pH 8.0.
Abbildungspuffer (HEPES):	20 mM Hepes, 50 NaCl, pH 7.5.
Puffer (HEPES _{SMC}):	50 mM Hepes, 300 NaCl, pH 7.5.
Belegungspuffer:	50 mM Tris HCl, 10 KCl, 10 MgCl ₂ , pH 8.0.
Komplexbildungspuffer:	20 MOPS, 100 KCl, 10 MgCl ₂ , pH 7.4.
Denaturierungspuffer:	7.5 M GuCl 20 MOPS, 100 KCl, 10 MgCl ₂ , pH 7.4.

9. Literatur

- 1 Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C.H., Gerber, E., Weibel, E. (1982) *Appl. Phys. Lett.* **40**, 178-180.
- 2 Binnig, G., Quate, C.F., Gerber, C.H. (1986) *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930-933.
- 3 Alexander, S., Hellmans, L., Marti, O., Schneir, J., Elings, V., Hansma, P.K. (1989) *J. Appl. Phys.* **65**, 164-167.
- 4 Eschrich, Rainer, Dissertation 1996, Technische Universität München.
- 5 z.B. Fotiadis, D., Scheuring, S., Müller, S.A., Engel, A., Müller, D.J. (2002) *Micron* **33**, 385-397.
- 6 Hugel, T., Seitz, M. (2001) *Macromol. Rapid Commun.* **22**, 989-1016.
- 7 Zhou, Y.Q., Fan, H.Q., Fong, T. Lopez, G.P. (1998) *Langmuir* **14**, 660-666.
- 8 Schabert, F.A., Engel, A. (1994) *Biophys. J.* **67**, 2394-2403.
- 9 z.B. Guckenberger, R., Wiesgräbe, W., Hillebrand A., Hartmann, T., Wang, Z., Baumeister, W. (1989) *Ultramicroscopy* **31**, 327-332.
- 10 Nejoh, H. (1990) *Appl. Phys. Lett.* **57**, 2907-2909.
- 11 Yuan, J.Y., Shao, Z. (1990) *Ultramicroscopy* **34**, 223-226.
- 12 Yuan, J.Y., Shao, Z., Gao, C. (1991) *Phys. Rev. Lett.* **67**, 863-866.
- 13 Guckenberger, R., Heim, M., Cevc, G., Knapp, H.F., Wiegräbe, W., Hillebrand, A. (1994) *Science* **266**, 1538- 1540.
- 14 Shao, Z., Yang, J., Somlyo, A.P. (1995) *Annu. Rev. Dev. Biol.* **11**, 241-265.
- 15 Di Digital Instruments, Scanning Probe Microscopy Training Notebook.
- 16 Olivia, A.I., Anguiano, E., Denisenko, N., Aguilar, M, Pena, J.L. (1995) *Rev. Sci. Instrum.* **66**, 3196-3203.
- 17 Dürig, U., Steinhauer, H.R., Blanc, N. (1997) *J. Appl. Phys.* **82**, 3641-3651.
- 18 Stark, M., Guckenberger, R. (1999) *Rev. Sci. Instrum.* **70**, 3614-3619.
- 19 Stark, M., Möller, C., Müller, D. Guckenberger, R. (2001) *Biophys. J.* **80**, 3009-3018.
- 20 z.B. Israelachvili, J.N., Surface Forces, in the Handbook of Surface Imaging and Visualization, A.T. Hubbard, Editor. 1995, CRC Press: Boca Raton, p. 793-816.
- 21 Israelachvili, J. 1992. Academic press Limited, London. "Intermolecular & surface forces."
- 22 Stifter, T., Marti, O., Bhushan, B. (2000) *Physikal Review B* **62**, 13667-13673.
- 23 Butt, H.J. (1991) *Biophysical Journal* **60**, 777-785.
- 24 Anzykowski, B., Kruger, D., Babcock, K.L., Fuchs, H. (1996) *Ultramicroscopy* **66**, 251-259.
- 25 z.B. Brandsch, R., G. Bar, Whangbo, M.H. (1997) *Langmuir* **13**, 6349-6353.
- 26 Stark, Martin, Dissertation 2001, Shaker Verlag, Aachen.
- 27 Hillenbrand, R., Stark, M., Guckenberger, R. (2000) *Appl. Phys. Lett.* **76**, 3478-3480.
- 28 Weast, R.C., CRC Handbook of Chemistry and Physics, 58th ed. (CRC Press, Cleaveland, OH, 1977-1978).
- 29 Ellis, R.J. Introduction. *Seminars in Cell&Developmental Biology* (2000) **11**,1-5.
- 30 Walter, S., Buchner, J. (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 1098-1113.
- 31 Roseman, A. M., Chen, S., White, H., Braig, K., Saibil, H. R. (1996) *Cell* **87**, 241-251.
- 32 Braig, K., Otwinoski, Z., Hegde, R., Boisvert, D.C., Joachimiak, A., Horwich, A.L., Sigler, P.B. (1994) *Nature* **371**, 578-586.
- 33 Xu, Z., Horwich, A.L., Sigler, P.B. (1997) *Nature* **388**, 741-750.
- 34 Fayet, O., Ziegelhoffer, T., Georgopoulos, C. (1989) *J. Bacteriol.* **171**, 1379-1385.
- 35 Horwich, A.L., Low, K.B., Fenton, W.A., Hirshfield, N.I., Furtak, K. (1993) *Cell* **74**, 909-917.
- 36 Houry, W.A., Frishman, D., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Hartl, F.U. (1999) *Nature* **402**, 147-154.

-
- 37 Dobson, C.M. (2003) *Nature* **426**, 884-890.
- 38 Dobson, C.M. (2001) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **356**, 133-145.
- 39 Koo, E.H., Landsbury, P.T., Jr., Kelly, J.W. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9989-9990.
- 40 Prusiner, S.B., Scott, M.R., DeArmond, S.J., Cohen, F.E. (1998) *Cell* **93**, 337-348.
- 41 Ewalt, K.L., Hendrick, J.P., Houry, W.A., Hartl, F.U. (1997) *Cell* **90**, 491-500.
- 42 Hartl, F.U., Hayer-Hartl, M. (2002) *Science* **295**, 1852-1858.
- 43 Fenton, W.A., Horwich, A.L. (2003) *Q. Rev. Biophys.* **36**, 229-256.
- 44 Wang, J.D., Weissman, J.S. (1999) *Nat. Struct. Biol.* **6**, 597-600.
- 45 Bhutani, N., Udgaonkar, J.B. (2000) *J. Mol. Biol.* **297**, 1037-1044.
- 46 Clark, A.C., Frieden, C. (1999) *J. Mol. Biol.* **285**, 1777-1788.
- 47 Gervasoni, P., Gerhrig, P., Pluckthun, A. (1998) *J. Mol. Biol.* **275**, 663-675.
- 48 Shtilerman, M., Lorimer, G.H., Englander, S.W. (1999) *Science* **284**, 822-825.
- 49 Walter, S., Lorimer, G.H., Schmidt, F.X. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9425-9430.
- 50 Zahn, R., Pluckthun, A. (1994) *J. Mol. Biol.* **242**, 165-174.
- 51 Zahn, R., Spitzfaden, C., Ottiger, M., Wutrich, K., Pluckthun, A. (1994) *Nature* **368**, 261-265.
- 52 Zahn, R., Perret, S., Stenberg, G., Fersht, A.R. (1996) *Science* **271**, 642-645.
- 53 Brinker, A., Pfeifer, G., Kerner, M.J., Naylor, D.J., Hartl, F.U., Hayer-Hartl, M. (2001) *Cell* **107**, 223-233.
- 54 Schmidt, M., Buchner, J., Todd, M.J., Lorimer, G.H., Viitanen, P.V. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 10304-10311.
- 55 Van der Vies, S.M., Viitanen, P.V., Gatenby, A.A., Lorimer, G.H., Jaencke, R. (1992) *Biochemistry* **31**, 3635-3644.
- 56 Ranson, N.A., Dunster, N.K., Burston, S.G., Clarke, A.R. (1995) *J. Mol. Biol.* **250**, 581-586.
- 57 Silow, M., Oliveberg, M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6084-6086.
- 58 Baumketner, A., Jewett, A., Shea, J.E. (2003) *J. Mol. Biol.* **332**, 701-713.
- 59 Takagi, F., Koga, N., Takada, S. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 11367-11372.
- 60 Lin, Z., Rye, H.S. (2004) *Mol. Cell* **16**, 23-34.
- 61 Grantcharova, V., Alm, E.J., Baker, D., Horwich, A.L. (2001) *Curr. Op. Struc. Biol.* **11**, 70-82.
- 62 Fenton, W.A., Kashi, Y., Furtak, K., Horwich, A.L. (1994) *Nature* **371**, 614-619.
- 63 Richarme, G., Kohiyama, M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 7095-7089.
- 64 Katsumata, K., Okazaki, A., Kuwajima, K. (1996) *J. Mol. Biol.* **258**, 827-838.
- 65 Perret, S., Zahn, R., Stenberg, G., Fersht, A.R. (1997) *J. Mol. Biol.* **269**, 892-901.
- 66 Chen, L., Sigler, P.B. (1999) *Cell* **99**, 757-768.
- 67 Chatellier, J., Buckle, A.M., Fersht, A.R. (1999) *J. Mol. Biol.* **292**, 163-172.
- 68 Braig, K., Adams, P.T., Brünger, A.T. (1995) *Nat. Struct. Biol.* **2**, 1083-1094.
- 69 Boisvert, D.C., Wang, J., Otwinowski, Z., Horwich, A.L., Sigler, P.B. (1996) *Nat. Struct. Biol.* **3**, 170-177.
- 70 Buckle, A.M., Zahn, R., Fersht, A.R. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3571-3575.
- 71 Chatellier, J., Hill, F., Fersht, A.R. (2000) *J. Mol. Biol.* **15**, 883-896.
- 72 Yifrach, O., Horovitz, A. (1995) *Biochemistry* **34**, 5303-5308.
- 73 Weissman, J.S., Hohl, C.M., Koalenke, O., Kashi, Y. Y., Chen, S., Braig, K., Saibil, H. R., Fenton, W.A., Horwich, A.L. (1995) *Cell* **83**, 577-587.
- 74 Weissman, J.S., Rye, H.S., Fenton, W.A., Beecham, J.M., Horwich, A.L. (1996) *Cell* **84**, 481-490.
- 75 Mayhew, M., da Silva, A.C.R., Martin, J., Hartl, F.U. (1996) *Nature* **379**, 420-426.
- 76 Burston, S.G., Ranson, N.A., Clarke, A.R. (1995) *J. Mol. Biol.* **249**, 138-152.

-
- 77 Viitanen, P.V., Lubben, T.H., Reed, J., Goloubinoff, P., Okeefe, D.P., Lorimer, G.H. (1990) *Biochemistry* **29**, 5665-5671.
- 78 Rye, H.S., Burston, S.G., Fenton, W.A., Beechem, J.M., Xu, Z., Sigler, P.B., Horwich, A.L. (1997) *Nature* **388**, 792-798.
- 79 Kad, N.M., Ranson, N.A., Cliff, M.J., Clarke, A.R. (1998) *J. Mol. Biol.* **278**, 267-278.
- 80 Sparrer, H., Buchner, J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 14080-14086.
- 81 Todd, M., Viitanen, P.V., Lorimer, G.H. (1994) *Science* **265**, 659-666.
- 82 Mendoza, J.A., Warren, T., Dulin, P. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**, 271-274.
- 83 Grallert, H., Rutkat, K., Buchner, J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 20424-20430.
- 84 Weber, F., Keppel, F., Georgopoulos, C., Hayer-Hartl, M.K., Hartl, F.U. (1998) *Nature Struct. Biol.* **5**, 977-985.
- 85 Hayer-Hartl, M., Weber, F., Hartl, F.U. (1996) *EMBO J.* **15**, 6111-6121.
- 86 Nielsen, K.L., Cowan, N.J. (1998) *Cell* **2**, 1-7.
- 87 Llorca, O., Pérez-Pérez, J., Carrascosa, J.-L., Galan, A., Muga, A., Valpuesta, J.M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 32925-32932.
- 88 Grallert, H., Buchner, J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 20171-20177.
- 89 D. Voet, J.G. Voet, Biochemie, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1994.
- 90 Coux, O., Tanaka, K., Goldberg, A.L. (1996) *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 801-847.
- 91 Walz, J., Erdmann, A., Kania, M., Typke, D., Koster, A.J., Baumeister W. (1998) *J. Struc. Biol.* **121**, 19.
- 92 Baumeister, W., Cejka, Z., Kania, M., Seemüller, E. (1997) *Biol. Chem.* **378**, 121.
- 93 Tamura, T., Nagy, I., Lupas, A., Lottspeich, F., Cejka, Z., Schoofs, G., Tanaka, K., De Mot, R., Baumeister, W. (1995) *Curr. Biol.* **5**, 766.
- 94 Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F., Seemüller, E. (1998) *Cell* **92**, 367.
- 95 Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W., Huber, R. (1995) *Science* **28**, 533.
- 96 Seemüller, E., Lupas, A., Stock, D., Löwe, J., Huber, R., Baumeister, W. (1995) *Science* **268**, 579.
- 97 Strunnikov, A.V. (1998) *Trends Cell Bio.* **8**, 454-459.
- 98 Nasmyth, K., Peters, J.M., Uhlmann, F. (2000) *Science* **288**, 1379-1385.
- 99 Uhlmann, F., Lottspeich, F., Nasmyth, K. (1999) *Nature* **400**, 37-42.
- 100 Hirano, T. (2002) *Genes Dev.* **16**, 399-414.
- 101 Ono, T., Losada, A., Hirano, M., Myers, M.P., Neuwald, A. F., Hirano, T. (2003) *Cell* **115**, 109-121.
- 102 Fujioka, Y., Kimata, Y., Nomaguchi, K., Watanabe, K., Kohno, K. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 21585-21591.
- 103 Mascarenhas, J., Soppa, J., Strunnikov, A., Graumann, P.L. (2002) *EMBO J.* **21**, 3108-3118.
- 104 Volkov, A.V., Mascarenhas, J., Andrei-Selmer, C., Ulrich, H.D. Graumann, P.L. (2003) *Mol. Cell Biol.* **23**, 5638-5650.
- 105 Soppa, J., Kobayashi, K., Noiro-Gros, M.F., Oesterhelt, D., Ehrlich, S.D., Dervyn, E., Ogasawara, N., Moriya, S. (2002) *Mol. Microbiol.* **45**, 59-71.
- 106 Graumann, P.L. (2000) *J. Bakteriologie.* **182**, 6463-6476.
- 107 Koshland, D., Strunnikov, A. (1996) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 305-333.
- 108 Graumann, P.L., Losick, R., Strunnikov, A.V. (1998) *J. Bakteriologie.* **180**, 5749-5755.
- 109 Lowe, J., Cordell, S.C., van den Ent, F. (2001) *J. Mol. Biol.* **306**, 25-35.
- 110 Hopfner, K.P., Karcher, A., Shin, D.S., Craig, L., Arthur, L.M., Carney, J.P., Trainer, J.A. (2000) *Cell* **101**, 789-800.
- 111 Hearing, C.H., Lowe, J., Hochwagen, H., Nasmyth, K. (2002) *Mol. Cell* **9**, 773-788.
- 112 Hirano, T., Kobayasi, R., Hirano, M. (1997) *Cell* **89**, 511-521.

-
- 113 Melby, T.E., Ciampaglio, C.N., Briscoe, G., Ericson, H.P. (1998) *J. Cell Biol.* **142**, 1595-1604.
- 114 Titelbild von Löwe, J., Cordell, S.C., van den Ent, F. (2001) *J. Mol. Biol.* **306**, 25-35.
- 115 Kimura, K., Rybenkov, V.V., Crisona, N.J., Hirano, T., Cozzareli, N.R. (1999) *Cell* **98**, 239-248.
- 116 Gruber, S., Haering, C.H., Nasmyth, K. (2003) *Cell* **112**, 765-777.
- 117 Mascarenhas, J., Volkov, A., Rinn, C., Schiener, J., Guckenberger, R., Graumann, P.L. (2005) *BMC Cell Biol.* submitted.
- 118 Mou, J.X., Sheng, S.T., Ho, R.Y., Shao, Z.F. (1996) *Biophys. J.* **71**, 2213-2221.
- 119 Vinckier, A., Gervasoni, P., Zaugg, F., Ziegler, U., Lindner, P., Groscurth, P., Pluckthun, A., Semenza, G. (1998) *Biophys. J.* **74**, 3256-3263.
- 120 Valle, F., DeRose, J.A., Dietler, D., Kawe, M., Pluckthun, A., Semenza, G. (2001) *J. Microsc.* **203**, 195-198.
- 121 Valle, F., DeRose, J.A., Dietler, D., Kawe, M., Pluckthun, A., Semenza, G. (2002) *Ultramicroscopy* **93**, 83-89.
- 122 Viani, M.B., Pietrasanta, L.I., Thompson, J.B., Chand, A., Gebeshuber, I.C., Kindt, J.H., Richter, M., Hansma, P.K., Hansma, P.K. (2000) *Nat. Struct. Biol.* **7**, 644-647.
- 123 Krueger, R., Gregurick, S.K., Zondlo, J., Eisenstein, E. (2003) *J. Struct. Biol.* **141**, 240-258.
- 124 Stegmann, R., Manakova, E., Rossle, M., Heumann, H., Niebe-Axmann, S.E., Pluckthun, A., Hermann, T., May, R.P., Wiedenmann, A. (1998) *J. Struct. Biol.* **121**, 30-40.
- 125 P. Thiagarajan, P., Henderson, S.J., Joachimiak, A. (1996) *Structure* **4**, 79-88.
- 126 Sun, Z., Scoot, P.A., Lund, P.A. (2003) *J. Mol. Biol.* **332**, 715-728.
- 127 Hegner, M., Wagner, P., Semenza, G. (1993) *Surf. Science* **291**, 39-46.
- 128 Houry, W.A., Frishman, D., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Hartl, F.U. (1999) *Nature* **402**, 147-154.
- 129 Dorn, I.T., Eschrich, R., Seemüller, E., Guckenberger, R., Tampé, R. (1999) *J. Mol. Biol.* **288**, 1027-1036.
- 130 Thess, A., Hutschenreiter, S., Hofmann, M., Tampé, R., Baumeister, W., Guckenberger, R. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 36321-36328.
- 131 Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., *Molecular Cloning: A Laboratory Handbook*. CSHL Press 1982, Cold Spring Harbor.
- 132 Clark, A.C., Ramanathan, R., Frieden, C. (1998) *Methods Enzymol.* **290**, 100-118.

10. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Baumeister danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung anfertigen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Reinhard Guckenberger und Frau Dr. Susanne Witt für ihre kompetente, stets freundliche und geduldige Betreuung während der Doktorarbeit.

Ich danke Frau Manajit Hayer-Hartl und Herrn Tobias Maier für die fruchtbare Kooperation und die Versorgung mit vielen Proteinen.

Bei meinen Laborkollegen Herrn Dr. Heinrich Frey bedanke ich für die vielen guten Ratschläge und die fruchtbaren Diskussionen und bei Frau Antonija Cvitcovic und Frau Mirjam Beuttler für das gute Arbeitsklima im SPM-Labor.

Frau Karin Felderer danke ich für die nette Zusammenarbeit und die tatkräftige Unterstützung in allen biochemischen Fragen.

Frau Brigitte Kühlmorgen danke ich sehr für die Anfertigung von zahlreichen GroEL-EM-Grids und die Aufnahme von vielen elektronenmikroskopischen Bildern.

Herrn Florian Beck und Herrn Martin Beck danke ich für die Hilfe bei allen Problemen rund um die Auswertung der elektronenmikroskopischen Daten.

Zu guter Letzt richte ich meinen Dank an alle Kollegen am Max-Planck-Institut für die angenehme Arbeitsatmosphäre.