

**KRAFTSPEKTROSKOPISCHE  
BINDUNGSSTUDIEN  
AN EINZELNEN  
PROTEIN-DNA-KOMPLEXEN**

von

**Frank Wilco Bartels**

aus

Hamm (Westfalen)

Fakultät für Physik  
Universität Bielefeld

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat)**

vorgelegte Dissertation

**Juli 2005**



## ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und dabei keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Mit einer Auslegung in der Universitätsbibliothek bin ich einverstanden. Zu Archivierungszwecken wurde diese Arbeit auf alterungsbeständigem Papier gemäß DIN-ISO 9706 gedruckt.

Bielefeld, den 7. Juli 2005

(Frank Wilco Bartels)

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von  
**Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti**  
und **Herrn Priv.-Doz. Dr. Robert Ros**  
in der Arbeitsgruppe Experimentelle Biophysik und Angewandte Nanowissenschaften  
der Fakultät für Physik der Universität Bielefeld  
in Zusammenarbeit mit der  
Arbeitsgruppe von **Frau Priv.-Doz. Dr. Anke Becker**  
am Lehrstuhl für Genetik der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld  
im Rahmen des  
Sonderforschungsbereichs 613

„Physik von Einzelmolekülprozessen und molekularer Erkennung  
in organischen Systemen“

Robert Hooke gewidmet,  
jenem Heroen in Newtons Schatten,  
der mit seiner *Micrographia* 1665 das Tor zur Mikrowelt aufstieß

*CEDIINNOOPSSSTTUU*

– Robert Hooke, *A Description of Helioscopes and some other instruments* (1676)

Anagramm für das bekannte Hooke'sche Gesetz  $UT\ PONDUS,\ SIC\ TENSIO$  (Das Gewicht ist gleich der Auslenkung), das er drei Jahre später in seinem *De potentia Restitutiva* oder *Of Spring* (1679) enthüllte. Hooke (1635-1703) wollte sich damit die Priorität an seiner Entdeckung sichern, ohne zuviel zu verraten [1].

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Protein-DNA-Interaktion</b>	<b>3</b>
2.1	Grundsätzliches .....	3
2.1.1	Proteine .....	3
2.1.2	DNA .....	5
2.1.3	Genregulation .....	7
2.1.4	Quorum Sensing .....	9
2.1.5	Molekularbiologische Bindungsstudien .....	9
2.2	Das Modellsystem <i>Sinorhizobium meliloti</i> .....	10
2.2.1	Der Organismus .....	10
2.2.2	Die <i>exp</i> -Genregion .....	11
<b>3</b>	<b>Kraftspektroskopie</b>	<b>13</b>
3.1	Intermolekulare Kräfte .....	13
3.2	Rasterkraftmikroskopie .....	13
3.2.1	Aufbau .....	14
3.2.2	Abbildungsmodi .....	16
3.3	Kraft-Distanz-Messungen .....	16
3.3.1	Messprinzip .....	16
3.3.2	Kalibrierung der Kraftsensoren .....	17
3.4	Immobilisierung .....	18
3.4.1	Substrate .....	18
3.4.2	Funktionalisierung .....	19
3.5	Thermodynamik, Kräfte und Kinetik .....	20
3.5.1	Dissoziation im thermischen Gleichgewicht .....	20
3.5.2	Dissoziation unter einer äußeren Kraft .....	21
3.5.3	Strukturierte Energielandschaften .....	23
3.5.4	Die Standardtheorie auf dem Prüfstein .....	24
3.5.5	Heterogenität chemischer Bindungen .....	26
<b>4</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>29</b>
4.1	Instrumente .....	29
4.1.1	Das verwendete Rasterkraftmikroskop .....	29
4.1.2	Die Kraftsensoren .....	30
4.1.3	Abbildungsparameter .....	30
4.1.4	Aufbau und Messprogramm zur Kraftspektroskopie .....	31
4.1.5	Auswertung der Kraft-Distanz-Kurven .....	31
4.2	Immobilisierung .....	34
4.2.1	Abbildungen .....	34
4.2.2	Kraftspektroskopie .....	35

<b>5 Experimente und Resultate</b>	<b>39</b>
5.1 ExpG-DNA.....	39
5.1.1 Rasterkraftmikroskopische Studien .....	40
5.1.2 Verifikation einer spezifischen Bindung .....	42
5.1.3 Bindung an verschiedene Promotorregionen .....	46
5.1.4 Das Bindemotiv im Detail .....	50
5.2 ExpR-DNA .....	52
5.2.1 Effektor-stimulierte Protein-DNA-Interaktion.....	52
5.2.2 Einfluss verschiedener Effektoren auf Einzelmolekülebene.....	53
5.2.3 Stabilität des Effektor-Protein-Komplexes .....	55
<b>6 Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>57</b>
<b>7 Glossar</b>	<b>59</b>
<b>8 Literaturverzeichnis</b>	<b>61</b>
<b>9 Danksagung</b>	<b>68</b>
<b>10 Anhang</b>	<b>69</b>

# Kapitel 1

## Einleitung

Der Signalaustausch zwischen Biomolekülen ist für das Leben von grundlegender Bedeutung. Sowohl im Stoffwechsel als auch in der Kommunikation zwischen Zellen muss ein Biomolekül (der Rezeptor) seinen Bindungspartner (den zugehörigen Liganden) angesichts einer Überzahl konkurrierender Moleküle identifizieren können. Diese sogenannte molekulare Erkennung funktioniert mit erstaunlicher Präzision: Die Rezeptoren des Immunsystems beispielsweise sind problemlos in der Lage, zwischen dem Virus der diesjährigen Wintergrippe und dem der letztjährigen zu unterscheiden.

Diese spezifische Bindung ist das Produkt einer Vielzahl schwacher, lokal begrenzter Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken, Ionenbindungen und Van-der-Waals-Kräfte. Unter physiologischen Bedingungen sind all diese Effekte nur von kurzer Reichweite (Größenordnung: 1 Nanometer). Nur wenn zwei Moleküle über Oberflächen verfügen, die topographisch und chemisch zueinander passen wie ein Schlüssel zu einem Schloss, summieren sich die schwachen und lokalen Wechselwirkungen zu einer wirksamen Bindung. Obwohl dabei mehrere tausend Atome beteiligt sind, ist die entstehende Gesamtwechselwirkung immer noch schwach verglichen mit kovalenten Molekülbindungen. Die Reversibilität der Bindung zwischen Biomolekülen, d.h. die begrenzte Lebensdauer der von ihnen gebildeten Komplexe, ermöglicht jedoch erst eine zeitlich variable und äußeren Einflüssen angepasste Steuerung organischer Prozesse.

Eine experimentelle Methode zur Untersuchung intermolekularer Bindungen ist die Kraftspektroskopie. Dabei wird stets nur ein einzelner Molekülkomplex betrachtet, der durch Anlegen einer äußeren Kraft zur Dissoziation gebracht wird. Da die relevanten Kräfte im Piconewton-Bereich liegen, bedarf es eines sensitiven Kraftmessers, während die nanoskopischen Dimensionen der untersuchten Moleküle nach einer exakten Positionierung des Kraftsensors verlangen. Beide Anforderungen erfüllt z.B. das Rasterkraftmikroskop (engl.: *atomic force microscope*, AFM). Dieses Gerät ermöglicht zudem die topographische Untersuchung einer Oberfläche und damit die Aufklärung von darauf zu findenden Struktureigenschaften auf der Nanometer-Skala. Eine Stärke der Einzelmolekül-Messverfahren besteht darin, auch schwach bindende oder nur in geringen Mengen vorhandene Moleküle (z.B. in Subpopulationen und heterogenen Proben) charakterisieren zu können, deren besondere Eigenschaften in Messungen an großen Molekülensembles verborgen bleiben. Die klassischen molekularbiologischen Verfahren werden daher wirkungsvoll durch die Einzelmolekül-Kraftspektroskopie ergänzt.

Die ersten Experimente dieser Art wurden am Biotin/Streptavidin-System durchgeführt [2]. Diese Bindung ist eine der stärksten und am besten untersuchten Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen in der Biologie. Eine Reihe weiterer Arbeiten an Streptavidin und dem engverwandten Protein Avidin mit verschiedenen Biotin-Derivaten unterstreicht den Modellcharakter des Systems [3-7]. Kraftmessungen zwischen Antikörper-Antigen-Paaren [8-11] erforderten wegen der komplexeren und fragileren Struktur dieser Moleküle vor allem Fortschritte in der Adressierung der Bindungspartner durch den Kraftsensor. Untersuchungen weiterer Protein-Protein-Wechselwirkungen wurden z.B. an Zelladhäsions-Proteoglycanen [12] sowie P-Selectin und Liganden [13,14] vorgenommen.

Mit dieser Erfahrung wurde kürzlich ein synthetisches Ligand-Rezeptor-System kraftspektroskopisch analysiert [15].

Die spezifische Bindung von Proteinen an DNA ist eine Ligand-Rezeptor-Interaktion von besonderer biologischer Relevanz. Sie ist essentiell für die Replikation und Reparatur des Erbmateri­als, aber auch für die Gentranskription, die erste Stufe der Proteinherstellung. Die Untersuchung von Protein-DNA-Wechselwirkungen mittels Rasterkraftmikroskopie ist daher ein stetig wachsendes Forschungsgebiet [16,17]. AFM-Experimente können etwaige Konformationsänderungen der DNA an den Bindungsstellen detektieren [18] und die Dynamik des Bindeprozesses sichtbar machen [19,20]. Lange Zeit blieben diese Untersuchungen allerdings auf topographische Analysen beschränkt.

Vorrangiges Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Wechselwirkung zwischen DNA und daran spezifisch bindenden Proteinen kraftspektroskopisch zu charakterisieren. Dazu wurde ein Modellsystem ausgewählt, in dem solche Interaktionen eine entscheidende Rolle spielen: die Steuerung der Galactoglucan-Biosynthese im Bakterium *Sinorhizobium meliloti*. Was es damit auf sich hat, erfahren Sie im nachfolgenden Abschnitt (Kapitel 2).

Im Anschluss werden die Grundlagen der Kraftspektroskopie erläutert. Dabei wird insbesondere der Zusammenhang zwischen Kräften, Thermodynamik und Kinetik betrachtet (Kapitel 3). Nach einer Beschreibung der verwendeten Materialien und Methoden (Kapitel 4) werden dann die erarbeiteten Resultate für die Wechselwirkung zweier verschiedener regulatorischer Proteine mit ihren jeweiligen DNA-Zielsequenzen vorgestellt und diskutiert (Kapitel 5). Abschließend soll ein Ausblick auf der Basis einer Zusammenfassung gegeben werden (Kapitel 6).



## Kapitel 2

# Protein-DNA-Interaktion

## 2.1 Grundsätzliches

Die komplexen Wechselwirkungen von Biomolekülen beruhen nicht nur auf deren chemischer Zusammensetzung, sondern auch auf ihren strukturellen Eigenschaften. Makromoleküle, die aus einem begrenzten Satz von biochemischen Bausteinen entstehen, unterscheiden sich zumeist erheblich in der räumlichen Anordnung derselben. Man spricht von einer unterschiedlichen **Konfiguration**, wenn diese Strukturdivergenz im Aufbau festgelegt ist (z.B. Chiralität), bzw. von einer anderen **Konformation**, wenn die verschiedenen Zustände (prinzipiell) durch Drehungen um Einfachbindungen ineinander überführt werden können.

### 2.1.1 Proteine

Proteine oder Eiweiße sind polymere Makromoleküle, die durch lineare Verknüpfung von bis zu 20 verschiedenen Aminosäuren entstehen und eine definierte Raumstruktur annehmen, die mit ihrer Funktion in unmittelbarer Verbindung steht. Die Proteinviefalt resultiert aus den Kombinationsmöglichkeiten der 20 Grundbausteine zu unterschiedlichen Sequenzen.

Alle proteinogenen Aminosäuren enthalten ein zentrales C-Atom, um das sich vier Substituenten gruppieren: ein H-Atom, eine Amino-Gruppe (-NH<sub>2</sub>), eine Carboxylgruppe (-COOH) und eine variable Seitenkette (-R), die für jede Aminosäure charakteristisch ist (Abbildung 2.1). Aufgrund ihrer Seitenketten unterscheiden sich Aminosäuren in Größe, Form, elektrischer Polarität bzw. Ladung und chemischer Reaktivität. Zehn Aminosäuren tragen eine unpolare Seitenkette, lösen sich daher nur schlecht in Wasser und neigen wegen des hydrophoben Effekts zur Aggregation. Fünf Aminosäuren besitzen polare, hydrophile Seitenketten, die H-Brücken zum umgebenden Wasser ausbilden. Die letzten fünf Aminosäuren tragen geladene Seitenketten und sind besonders hydrophil.

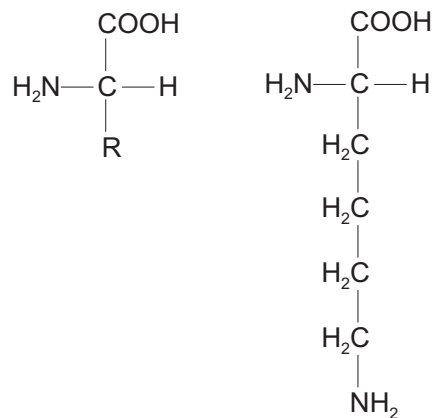


Abbildung 2.1: Struktur proteinogener Aminosäuren  
*Links der allgemeine Aufbau, rechts als Beispiel Lysin mit ausgeführter Seitenkette.*

Durch Peptidbindung werden die einzelnen Aminosäuren zu polymeren Ketten verknüpft. Dabei bindet die  $\alpha$ -Carboxylgruppe der ersten an die  $\alpha$ -Aminogruppe einer zweiten Aminosäure unter Wasserabspaltung. Die Biosynthese schreitet immer vom Amino- zum Carboxyterminus fort, sodass die entstehende Polypeptidkette eine Orientierung erhält – die Aminosäuresequenz. Diese bezeichnet man auch als **Primärstruktur** eines Proteins. Sie ist im zugehörigen Gen auf der Ebene der Nucleinsäuren festgeschrieben.

Die **Sekundärstruktur** dagegen wird durch die Organisation von in der linearen Abfolge benachbarten Aminosäuren über Wasserstoffbrücken bestimmt, wobei im Wesentlichen der Raumbedarf der Seitenketten eine Rolle spielt. Dabei stellen sogenannte Sekundärstrukturelemente häufig wiederkehrende Grundtypen dar; am prominentesten sind die  $\alpha$ -Helix und das  $\beta$ -Faltblatt. Die begrenzte Zahl definierter Sekundärstrukturelemente findet sich in Proteinen oft in typischen Kombinationen, den **Motiven**.

Die dreidimensionale Struktur des ganzen Proteins wird als **Tertiärstruktur** bezeichnet. Hier sind auch Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren von Bedeutung, die in der Primärstruktur weit voneinander entfernt liegen. Eine wichtige Rolle spielt dabei der hydrophobe Effekt. Häufig falten sich Teilbereiche eines Proteins in sogenannte **Domänen**, die ihre Tertiärstruktur behalten, auch wenn sie vom Rest des Proteins abgetrennt werden. Sie besitzen oft bestimmte Funktionen innerhalb des Gesamtproteins.

Wenn sich die fertig gefaltete Polypeptidkette mit anderen Polypeptidketten zusammenlagert, bildet sie eine **Quartärstruktur** aus, wobei die einzelnen Polypeptide die **Untereinheiten** stellen.

Die Ausbildung komplementärer Oberflächen und Vertiefungen im Rahmen ihrer Struktur ermöglicht es Proteinen, verschiedenartige Moleküle spezifisch zu erkennen und mit ihnen in Wechselwirkung zu treten. Diese **Liganden** können andere Proteine, DNA, Polysaccharide, kleinere organische Moleküle, aber auch gasförmige Moleküle oder Metallionen sein. Die molekulare Erkennung beruht auf komplementären Oberflächen: Der richtige Ligand kann die vorhandene Bindungsstelle des **Rezeptors** passgenau ausfüllen (Abbildung 2.2). (Emil Fischer prägte hierzu bereits 1894 das Bild von **Schlüssel und Schloss**, das sich als sehr nachhaltig erwies.)

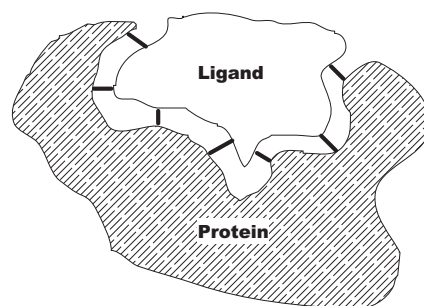


Abbildung 2.2: Molekulare Erkennung

*Durch Ausbildung komplementärer Oberflächen binden Proteine einen Liganden spezifisch und reversibel. Die Bindung ist dabei eine Summe schwacher Wechselwirkungen: Wasserstoffbrücken, ionische Bindungen, van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen.*

Ligand und Protein können über Wasserstoff- und Salzbrücken, van-der-Waals-Kräfte oder hydrophobe Wechselwirkung reversible Bindungen miteinander eingehen. Dagegen können Enzyme ihre Liganden – hier meist Substrate genannt – vorübergehend auch kovalent binden. Die spezifische Bindungsstärke zwischen Rezeptor und Ligand nennt man **Affinität**.

Eine häufige Reaktion von Proteinen auf die Bindung eines Liganden ist eine Konformationsänderung. Besitzt ein Protein mehrere räumlich getrennte Bindestellen, können diese häufig über solche Änderungen der Raumstruktur des Rezeptors miteinander kommunizieren. Dies bezeichnet man als **allosterischen Effekt**, wobei die Bindung des ersten Liganden die Bindung des zweiten entweder erleichtert oder erschwert.

Nach der Ligandenbindung versieht das Protein seine eigentliche Funktion: *Transportproteine* bringen ihre Fracht an einen anderen Ort des Organismus oder der Zelle. *Enzyme* katalysieren chemische Reaktionen und modifizieren dabei den gebundenen Liganden. *Rezeptorproteine* geben ein Signal an andere Proteine weiter. In der Biochemie wird häufig der Versuch unternommen, Moleküle zu entwickeln, die mit einer höheren Affinität an ein gegebenes Protein binden und so seine natürliche Funktion blockieren können. Solche maßgeschneiderten Moleküle bilden die Grundlage für die Entwicklung neuer Medikamente.

## 2.1.2 DNA

Nucleinsäuren sind die Informationsspeicher der Zelle. Als langkettige Biopolymere bestehen sie aus Nucleotidbausteinen, deren lineare Abfolge (Sequenz) die gesamte Information über Bauplan, Entwicklung und Funktionsweise eines Organismus enthält. Diese Erbinformation befindet sich bei Eukaryonten größtenteils im Kern der Zellen, daher der Name **Nucleinsäuren** (lat.: *nucleus* = Kern) [21].

Die **Nucleotide** setzen sich aus drei Komponenten zusammen: Einem Monosaccharid, einer Base und einem Phosphatrest (Abbildung 2.3).

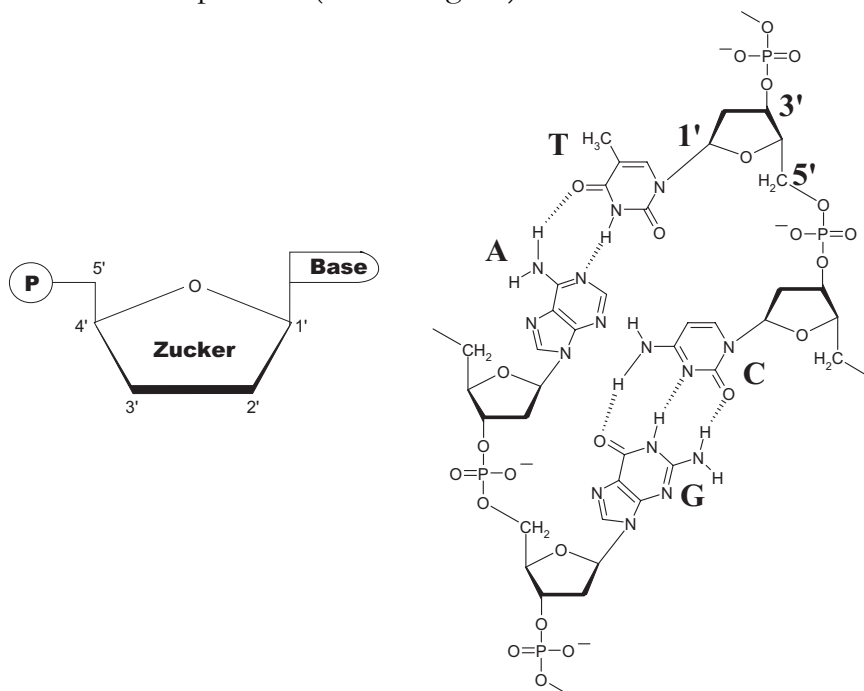


Abbildung 2.3: Nucleotide und Basenpaare

*Links: Nucleotide bestehen aus einer Base, einem Zucker und einem Phosphatrest. Um die Ringatome von Base und Zucker zu unterscheiden, werden die Stellen im Zucker mit einem Strich versehen (1', 2' usw.). Rechts: Watson-Crick-Basenpaarung zwischen Adenin (A) und Thymin (T) bzw. Cytosin (C) und Guanin.*

Bei der **Ribonucleinsäure** (*ribonucleic acid*, **RNA**) ist die Kohlenhydratkomponente eine  $\beta$ -D-Ribofuranose, bei der **Desoxyribonucleinsäure** (*desoxyribonucleic acid*, **DNA**) eine  $\beta$ -D-2'-Desoxyribofuranose. Zudem unterscheiden sich RNA und DNA im Basensatz: Die bityklichen Purinbasen **Adenin** (A) und **Guanin** (G) sowie die heterozyklische Pyrimidinbase **Cytosin** (C) kommen in beiden Nucleinsäurearten vor; als zweite heterozyklische Pyrimidinbase ist in DNA nur **Thymin** (T) möglich, in RNA nur **Uracil** (U). Die Kombination von vier verschiedenen Nucleotiden erlaubt einer Nucleinsäure mit N Einheiten bereits  $4^N$  unterschiedliche Sequenzen.

Prinzipiell besitzen Nucleotide zwei Verknüpfungsstellen, nämlich das phosphorylierte 5'-Ende sowie die freie 3'-Hydroxylgruppe. Da Nucleinsäuren über Phosphodiesterbindungen in 5'-3'-Richtung wachsen, besitzen sie eine entsprechende Orientierung, in der auch die Sequenz der Basen angegeben wird (die Zuckerphosphatkomponenten sind gleich und bedürfen daher keiner Auflistung).

Die DNA besteht nun aus zwei antiparallelen Nucleotidsträngen, die sich schraubenförmig um eine gemeinsame Achse winden. Bei dieser **Doppelhelix** kommen die Basen im Innenraum zu liegen, während die Zuckerphosphatreste das „Rückgrat“ bilden. Zwischen Strang und Gegenstrang besteht eine eindeutige Basenpaarung: Die Basen A und T bzw. G und C bilden komplementäre **Watson-Crick-Basenpaare**, benannt nach den beiden „Entdeckern“ der Doppelhelix (Abbildung 2.3).

Die in der Natur vorherrschende Konformation der DNA ist die rechtsgängige B-Helix (B-DNA). Sie wird durch eine Ganghöhe von 3.4 nm und ca. 10 Basenpaare (bp) pro Helixwindung (also einen helikalen Abstand von 0.34 nm zwischen benachbarten Basenpaaren) sowie einen mittleren Durchmesser von 2 nm und eine Drehung entlang der Helixachse von  $35.9^\circ$  pro bp charakterisiert. Da sich die glykosidischen Bindungen eines Basenpaars nicht diametral gegenüber stehen, ergeben sich zwei Arten von Einkerbungen: eine Hauptfurche (*major groove*) von etwa 0.85 nm Tiefe und eine Nebenfurche (*minor groove*) von etwa 0.75 nm Tiefe (Abbildung 2.4). Das Oberflächenprofil der DNA hat funktionelle Bedeutung: In der Tiefe der Furchen (insbesondere der Hauptfurche) sitzen nämlich Donor- und Akzeptorgruppen für Wasserstoffbrücken, über die regulatorische Proteine spezifisch an DNA binden können.

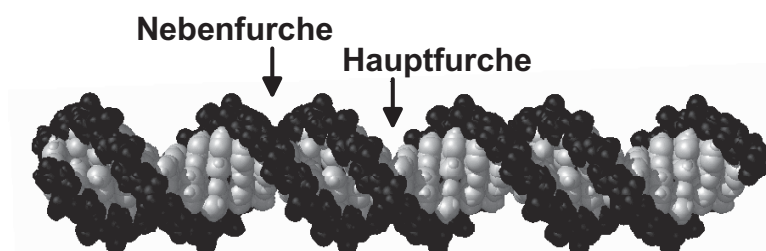


Abbildung 2.4: B-DNA-Doppelhelix

In einem vielzelligen Organismus, bei dem alle kernhaltigen Zellen prinzipiell dieselbe Erbinformation in ihrer DNA archiviert tragen, beruht die Differenzierung und Funktionalität der Zelle auf der unterschiedlichen Ausprägung der Gene: der **Genexpression**. Dieser zentrale Prozess beginnt mit der Umschrift oder **Transkription** der DNA eines Genabschnitts in eine RNA-Kopie (wobei Uracil anstelle von Thymin verwendet wird), die als Informationsübermittler dient. Die in dieser Boten-RNA oder **mRNA** (*messenger-RNA*) enthaltene Information wird danach an einem Ribosom in das Aminosäure-Alphabet der Proteine übersetzt: Bei der **Translation** wird eine einzelne

Aminosäure immer von einem Triplet von Nucleotiden (einem sogenannten Codon) bestimmt. Dieser genetische Code ist nahezu universell. Die Proteinbiosynthese aber ist ein komplexer Vorgang mit vielen Komponenten und resultiert in der beobachteten Vielfalt der Proteine. Ein Teil der Proteine, die eine Zelle synthetisiert, wird von ihr selbst verwendet; ein anderer Teil wird „exportiert“: Diese Proteine wirken in der Umgebung oder an weit entfernten Stellen im Organismus.

### 2.1.3 Genregulation

Die Natur hat mehrere Kontrollmechanismen hervorgebracht, mit denen die Zelle auf chemische Signale oder veränderte Umweltbedingungen mit einer Veränderung ihres Musters exprimierter Gene reagieren kann. Ein wichtiger Ansatzpunkt ist hierbei die Transkription, die durch **positive Regulation** (Aktivatoren) gesteigert oder durch **negative Regulation** (Repressoren, Attenuatoren) gedrosselt werden kann.

Die Transkription findet bei Eukaryonten im Zellkern, bei Prokaryonten dagegen im Cytoplasma statt. Man unterscheidet drei Phasen: Initiation, Elongation und Termination. Die Initiation ist der entscheidende Schritt, an dem ein komplexer Regelmechanismus ansetzt. Das ausführende Enzym der Transkription ist bei Prokaryonten die **RNA-Polymerase** (Eukaryonten besitzen drei Typen von RNA-Polymerasen mit verschiedenen Funktionen). In der **Initiationsphase** findet die RNA-Polymerase den Anfang des zu transkribierenden Gens anhand bestimmter Erkennungssequenzen, die als **Promotor** bezeichnet werden. Bei Prokaryonten dienen häufig Sechsergruppen von Nucleotiden wie z.B. TATAAT (die sogenannte TATA-Box), die einige Nucleotide 5'-stromaufwärts vom Transkriptionsstart liegen, als Startsignale. Wenn die RNA-Polymerase an die Promotorregion gebunden hat, bedeckt sie ein DNA-Segment von etwa 60 Nucleotiden.

Ein kurzes Stück des Doppelstrangs wird nun zu einem offenen Komplex entwunden. An der Einzelstrang-DNA beginnt die RNA-Polymerase mit der Synthese der mRNA, indem sie freie Ribonucleotide gemäß der Vorlage (Matrize) verknüpft. Wird eine kritische Länge von etwa zwölf Nucleotiden überschritten, beginnt die **Elongationsphase**. Dabei läuft die RNA-Polymerase stetig in 5'-3'-Richtung entlang der DNA und schiebt entwundene DNA und entstehende RNA vor sich her, bis sie auf ein Stopp-Signal stößt. In Prokaryonten ist dies gut definiert: Wenn die RNA-Polymerase nach einer G-C-reichen Einheit ein kurzes Segment mit Uridyl-Resten (poly-U) synthetisiert, bildet sich durch Selbstassoziation eine Haarnadelschleife, die das Enzym vom Strang löst und so die Transkription beendet (**Termination**).

Es existieren nun verschiedene Möglichkeiten, wie regulatorische Proteine Einfluss auf die Transkription nehmen können: Ein Repressor kann z.B. so an den DNA-Strang binden, dass er der RNA-Polymerase die Bindung an den Promotor verwehrt, oder aber (bei Proteinen mit mehreren Untereinheiten) an zwei Sequenzen binden, so dass der überbrückte DNA-Bereich eine Schleife bildet. In beiden Fällen wird die Transkription an dieser Stelle verhindert. Ein Aktivator kann die DNA dagegen so verbiegen, dass die RNA-Polymerase leichteren Zugang zum Promotor erhält und damit die Transkription steigern. (Bei Eukaryonten werden die Promotoren hingegen in der Regel erst durch **Transkriptionsfaktoren** aktiviert, die sich aus mehreren Proteinen zusammensetzen und in ihrer Summe eine Plattform für die RNA-Polymerase II bilden.)

Die gesamte Regulation basiert damit auf der spezifischen Bindung von Proteinen an bestimmte DNA-Sequenzen (typischerweise 6-20 Nucleotide lang [21]). In der Haupt- und Nebenfurche kann die DNA mit Proteinen wechselwirken, ohne dass die Basenpaarung der Doppelhelix beeinträchtigt würde. Jedes Basenpaar besitzt eine charakteristische

Anordnung von Donor- und Akzeptorgruppen, die Wasserstoffbrücken (H, N) oder hydrophobe Wechselwirkungen (Methylgruppe des Thymin) mit Regulatoren eingehen können.

Die meisten Regulatorproteine binden über eine **Erkennungshelix** an ihre spezifische DNA-Sequenz. Eine wichtige Gruppe bilden hier die **Helix-turn-Helix-(HTH)-Proteine** (Abbildung 2.5)<sup>i</sup>. Ihre Erkennungsregion besteht aus zwei Helices von je 7-9 Aminosäuren, die durch eine lange Schleife (turn) von etwa vier Resten miteinander verbunden sind [21]. Dabei ist Helix 2 die Erkennungshelix, die in der Hauptfurche bindet, während die Helix 1, die in einem Winkel von 120° zu Helix 2 angeordnet ist, die Bindung stabilisiert. Zur spezifischen Bindung tragen aber auch noch andere, außerhalb des HTH-Motivs liegende Stellen des Proteins bei. HTH-Proteine liegen zumeist als **Dimere** vor und besitzen daher ein Paar von Erkennungshelices, die einen Zangengriff in zwei benachbarte DNA-Hauptfurchen ermöglichen. Sie besitzen eine Affinität für **palindromische Sequenzen**, die eine Spiegelsymmetrie aufweisen und beide Erkennungshelices optimal ansprechen. Die Funktionalität des HTH kann daher leicht durch die An- oder Abwesenheit etwaiger Protein-Liganden beeinflusst werden: Diese **Effektoren** können die relative Position der beiden Bindedomänen dergestalt verändern, dass sie nicht mehr der Form der DNA angepasst ist [22].

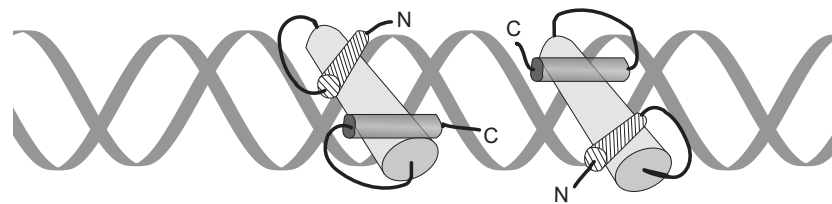


Abbildung 2.5: Das Helix-turn-Helix-Motiv (HTH)

*Zur besseren Verdeutlichung sind hier nur die beiden DNA-Bindedomänen eines dimerischen Proteins gezeigt, bestehend jeweils aus einer Erkennungshelix in der Hauptfurche (major groove) der DNA und einer stabilisierenden Helix (am N-Terminus).*

Die Bindung eines Proteins an DNA kann in Lösung durchaus durch dreidimensionale Diffusion beider Moleküle erreicht werden. Ein regulatorisches Protein bindet jedoch an seine spezifische Zielstellen auf der DNA mit einer wesentlich höheren Rate. Ein klassisches Beispiel ist hier der *lac*-Repressor von *Escherichia coli*, der die Operatorsequenz um einen Faktor 100-1000 schneller erkennt, als aufgrund einer rein diffusionsgesteuerten Reaktion zu erwarten wäre [23]. Der tatsächliche Bindemechanismus könnte in zwei Schritten ablaufen [24]: Zuerst bindet das Protein unspezifisch an die DNA und wird danach durch eindimensionale Diffusion zur spezifischen Bindungsstelle befördert. Anhaltspunkte für einen solchen Mechanismus wurden bei verschiedenen Proteinen durch AFM-Experimente in wässriger Umgebung gefunden [20,25].

<sup>i</sup> Andere wichtige Bindemotive sind in Helix-loop-Helix-(HLH), Zinkfinger- oder *leucine-zipper*-Proteinen vertreten.

### 2.1.4 Quorum Sensing

Eine besondere Form der Genregulation ist das sogenannte **Quorum Sensing**, ein populationsabhängiger Kontrollmechanismus. Er beruht auf der Erkennung der Konzentration sogenannter **Effektoren** oder **Autoinducer**, kleiner Signalmoleküle mit geringem Molekulargewicht, die von Bakterien produziert werden. Man weiß, dass Quorum Sensing viele verschiedene physiologische Prozesse steuert, darunter die Virulenz in Pathogenen und die Ausbildung von Biofilmen [26].

Einige Organismen wie *Photobacterium fischeri* und *Pseudomonas aeruginosa* dienen als Modellsysteme für das Quorum Sensing. In *P. fischeri* produziert die Synthase LuxI ein acetyliertes Homoserinlacton (AHL), N-3-(Oxohexanoyl)-L-Homoserinlacton (kurz oxo-C<sub>6</sub>-HL, siehe Abbildung 2.6), das von dem Regulator LuxR erkannt wird [27]. Das C-terminale Drittel von LuxR bildet eine DNA-Bindedomäne, der N-terminale Teil dagegen eine Effektor-Bindedomäne, die die Aktivität der DNA-Bindedomäne in Abwesenheit des Effektors blockiert. Einmal aktiviert bindet LuxR stromaufwärts des Promotors der *lux*-Gene und wirkt als positiver Regulator. (Die Expression der *lux*-Gene führt zu Biolumineszenz.) LuxR bindet aber auch stromaufwärts des Promotors *luxI*, der für die AHL-Synthase LuxI codiert. Diese Stimulation führt zu einer positiven Rückkopplung.

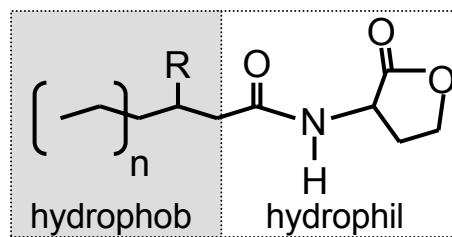
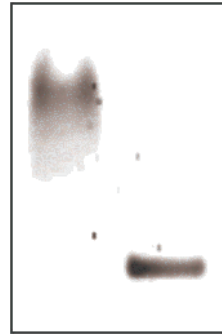


Abbildung 2.6: N-Acyl-Homoserinlacton

Bakterienzellen sind für AHLs durchlässig, entweder durch freie Diffusion über die Zellmembran (bei kurzen Acylketten) oder durch aktiven Transport (denkbar für längere Acylketten). Bei geringer Zelldichte produziert ein Bakterium eine basale Anzahl von AHL-Signalen, die aus der Zelle entlassen werden. Wenn die Effektoren sich aufgrund einer gestiegenen Zelldichte ansammeln und eine bestimmte Konzentration erreichen (sowohl in als auch außerhalb der Zelle), werden Transkriptionsregulatoren der LuxR-Familie aktiviert, um die Expression der Zielgene auszulösen. Über die positive Rückkopplung kommt es zu einem nachhaltigen Effekt.

### 2.1.5 Molekularbiologische Bindungsstudien

Bei der Suche nach DNA-Zielsequenzen von Regulatorproteinen ist der ***Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA)** nützlich. Im elektrischen Feld einer Gelelektrophorese werden DNA-Moleküle nach ihrer Beweglichkeit aufgetrennt (Abbildung 2.7). Bindet nun ein Protein an eine bestimmte DNA-Sequenz, ist dieser Komplex weniger beweglich als die nackte DNA. Je nach Molekulargewicht und Ladung des Proteins wird daher die Wanderung im elektrischen Feld mehr oder minder verzögert. Für diese Experimente werden die DNA-Fragmente markiert (mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder radioaktiv); die proteinfreie DNA dient als Vergleich. Das spezifisch gebundene Protein bewirkt dann eine Verschiebung (*shift*) der DNA-Bande.



<b>Protein:</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
<b>DNA:</b>	<b>+</b>	<b>+</b>

Abbildung 2.7 : Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

*Die Moleküle laufen im Gel von oben nach unten. Durch den Unterschied in der Laufzeit des Protein-DNA-Komplexes (links) und der ungebundenen DNA (rechts) kann die Bindung eines Proteins an das DNA-Fragment nachgewiesen werden, im gezeigten Fall die Bindung des Regulators ExpG an die expA1-Promotorregion (siehe Kapitel 5.1.2) [28].*

Ein anderes wichtiges Verfahren stellt das **DNA-Footprinting** dar. Dabei wird ein Ende des zu untersuchenden DNA-Segments markiert (s.o.). Danach wird das Molekül mit DNase I inkubiert, einer **Endonuclease**, die DNA prinzipiell an jedem internen Nucleotid spalten kann. Bei hinreichend kurzen Inkubationszeiten schneidet DNase I jeden Strang etwa einmal. So entsteht ein kontinuierliches Spektrum an DNA-Fragmenten, das in einer Gelelektrophorese aufgetrennt wird. Ist nun ein Bereich der DNA durch ein gebundenes Protein geschützt, kann die Endonuclease an dieser Stelle nicht schneiden. Der geschützte Bereich zeigt sich im Spektrum der DNA-Fragmente als Lücke und hinterlässt damit eine Spur (*foot print*). Bei bekannter DNA-Sequenz kann die Bindestelle auf diese Weise bestimmt werden.

## 2. 2 Das Modellsystem *Sinorhizobium meliloti*

Die Protein-DNA-Interaktion wird in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der Genregulation der Galactoglucan-Biosynthese in *Sinorhizobium meliloti* untersucht. Die Funktion des Bakteriums und die Rolle des Polysaccharids Galactoglucan sollen im Folgenden ebenso skizziert werden wie ein Modell der Genregulation.

### 2.2.1 Der Organismus

Stickstoff aus der Atmosphäre tritt in die Synthese von Aminosäuren und anderen Biomolekülen in reduzierter Form ein (als  $\text{NH}_4^+$ ). Höhere Organismen sind jedoch nicht imstande,  $\text{N}_2$  in diese Form zu überführen. Diese als **Stickstoff-Fixierung** bezeichnete Umwandlung wird vielmehr von Bakterien und Blaualgen (Cyanobakterien) durchgeführt. Einige dieser Mikroorganismen, nämlich die symbiontischen *Rhizobium*-Bakterien, bilden an den Wurzeln von Leguminosen sogenannte Wurzelknöllchen, in denen die Stickstoff-Fixierung stattfindet, die sowohl den Bakterien als auch der Pflanze zugute kommt [29]. Die auf der Erde pro Jahr neu gebundene Menge an  $\text{N}_2$  wird auf eine Größenordnung von  $10^{11}$  kg geschätzt. Etwa 15% davon werden durch Blitzentladungen und UV-Strahlung fixiert, 25% durch industrielle Prozesse und 60% durch Mikroorganismen.



Das Gram-negative Bodenbakterium *Sinorhizobium meliloti* dient als Modellsystem, um die Wurzelknöllchensymbiose mit Leguminosen (in diesem Fall *Medicago sativa*, besser bekannt als Alfalfa oder Luzerne) und die symbiotische Stickstoff-Fixierung zu untersuchen. Von dem Bakterium abgesonderte Polysaccharide könnten dabei eine wichtige Rolle spielen. Zuckerpolymeren, die eine zusammenhängende Adhäsionsschicht auf der Zelloberfläche bilden, werden als Kapselpolysaccharide (Capsular Polysaccharides, CPS) bezeichnet, während die weiter außen liegenden **Exopolysaccharide** (EPS) nur eine marginale Verbindung zur Zelle aufweisen. Die *S. meliloti* Wildtypstämme Rm1021 und Rm2011 sind in der Lage, zwei voneinander verschiedene saure Exopolysaccharide zu synthetisieren, Succinoglycan (EPS I) und Galactoglucan (EPS II) (Abbildung 2.8). Für die Infektion der Wurzelknöllchen durch *S. meliloti* ist das Vorhandensein mindestens eines der beiden Exopolysaccharide essentiell [30,31]. Deren Biosynthese wird durch Umweltbedingungen wie zum Beispiel den Ammonium- und Phosphatgehalt des Mediums beeinflusst [32].

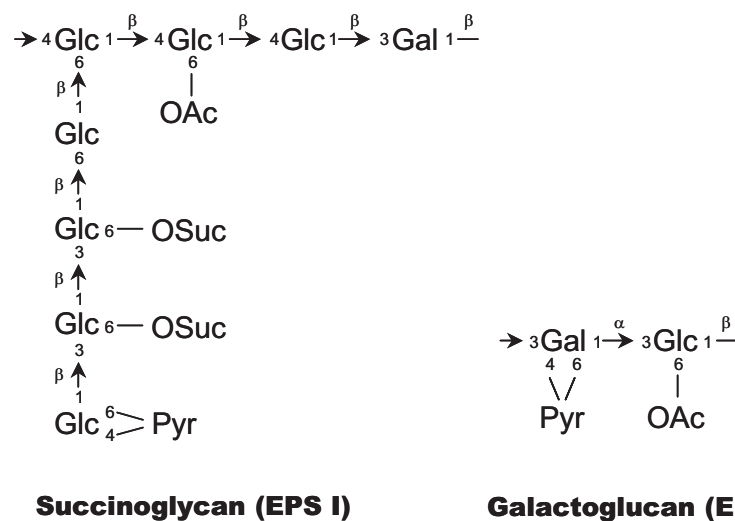


Abbildung 2.8: Struktur der Untereinheiten der Exopolysaccharide EPS I und EPS II

Die verwendeten Abkürzungen bedeuten: Gal, Galactose; Glc, Glucose; OAc, O-Acetylgruppe; OSuc, O-Succinylgruppe; Pyr, Pyruvylgruppe (aus [32]).

## 2.2.2 Die *exp*-Genregion

*S. meliloti* dient außerdem als Modellsystem, um die Architektur bakterieller Genome zu untersuchen. Die genetische Information dieses Bakteriums verteilt sich auf das Chromosom (3.65 Mb) und zwei Plasmide, die als pSymA (1.35 Mb) und pSymB (1.68 Mb) bezeichnet werden. Ein internationales Konsortium konnte vor wenigen Jahren die komplette Nukleotidsequenz von *S. meliloti* entschlüsseln [33]. Die für die Biosynthese der Exopolysaccharide zuständigen Genregionen – die *exo/exs*-Region für EPS I und die *exp*-Region für EPS II – sind auf dem Plasmid pSymB lokalisiert. Sechs weitere an der Biosynthese und Regulation der Exopolysaccharide beteiligte Gene (*exoC*, *exoR*, *exoS*, *chvI*, *mucR* und *expR*) befinden sich auf dem Chromosom.<sup>ii</sup>

In der 30 kb langen Galactoglucanbiosynthese-Genregion, welche 22 *exp*-Gene umfasst, wurden potentielle Bindestellen (auf Fragmenten von 120-260 bp Länge) für die drei

<sup>ii</sup> Es ist in der Genetik üblich, Proteine groß und normal zu schreiben (p.e. ExpG), die für diese kodierenden Gene jedoch klein und kursiv (p.e. *expG*).

transkriptionellen Regulatorproteine ExpG, PhoB und ExpR identifiziert [34-36]. Abbildung 2.9 zeigt eine Zusammenfassung der bisher bekannten Regulatoren und ihrer vorgeschlagenen Wirkungsweise.

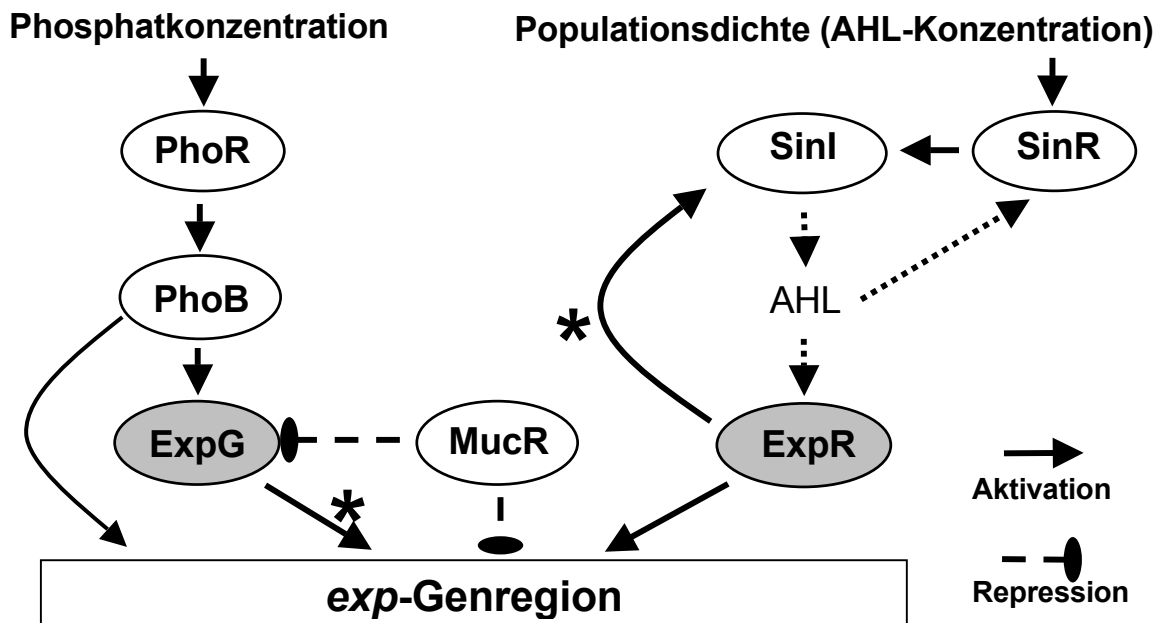


Abbildung 2.9: Modell der Regulation der *exp*-Genexpression

Das Schema zeigt das vorgeschlagene Zusammenspiel der positiven Regulatoren ExpR, PhoB und ExpG und des negativen Regulators MucR bei der *exp*-Genexpression sowie zwei Signalwege, die zur Galactoglucan-Biosynthese führen: zum einen das Zweikomponenten-Regulationssystem aus PhoB und der für PhoB spezifischen Kinase PhoR, die für Änderungen der Phosphatkonzentration sensitiv ist; zum anderen ein Quorum-Sensing-Mechanismus mit den Komponenten SinI, SinR und ExpR, der über verschiedene N-Acyl-Homoserinlacton-(AHL)-Effektormoleküle auf die Zelldichte in der Umgebung reagiert. Die beiden in dieser Arbeit untersuchten Interaktionen sind mit einem Stern (\*) markiert.

Für diese Arbeit sind zwei Bereiche des Regulationsnetzwerks von besonderer Bedeutung:

**1. Die Wechselwirkung des positiven Regulators ExpG mit Segmenten der *exp*-Genregion, wodurch die Galactoglucan-Biosynthese aktiviert wird.** Hier wurden über Gelretardationsexperimente drei verschiedene DNA-Zielsequenzen ausgemacht, an die das Aktivatorprotein spezifisch bindet [28]. Aufgrund von Homologien des *expG*-Genproduktes zu den Proteinen der MarR-Familie von transkriptionellen Regulatoren, welche DNA über ein Helix-Turn-Helix-Motiv binden, wird vermutet, dass auch die ExpG-Bindung ein HTH-Motiv aufweist [35]. → Kapitel 5.1

**2. Die Wechselwirkung des positiven Regulators ExpR mit einer DNA-Sequenz stromaufwärts des *sinI*-Gens, wodurch die Expression der AHL-Synthase SinI verstärkt wird.** Dieser Prozess ist in ein Quorum-Sensing-System eingebettet. Das Sin-System bringt verschiedene langkettige N-Acyl-Homoserinlactone (AHLs) hervor (C<sub>12</sub>-HL bis C<sub>18</sub>-HL, [37]). Ein zweiter in *S. meliloti* beheimateter Quorum-Sensing-Mechanismus, das Mel-System, steuert die Synthese kurzkettiger AHLs von C<sub>6</sub>-HL bis C<sub>8</sub>-HL [38]. Das *expR*-Genprodukt zeigt große Homologie zu den Proteinen der LuxR-Familie (siehe Abschnitt 2.1.4) und bindet in Gegenwart verschiedener AHLs an eine DNA-Zielsequenz in der *sinRI*-Genregion, wie wiederum in EMSA-Experimenten festgestellt wurde [39]. → Kapitel 5.2

## Kapitel 3

# Kraftspektroskopie

Als Kraftspektroskopie bezeichnet man ein Verfahren, die Wechselwirkung zwischen bestimmten Molekülen und deren Verhalten unter äußeren Kräften zu studieren. Ausgehend von dieser Problemstellung werden im folgenden Kapitel die physikalischen und chemischen Grundlagen der Arbeit vorgestellt: das Rasterkraftmikroskop, die für die Untersuchungen unabdingbare Immobilisierung der Biomoleküle und die hinter den Kräften stehende Thermodynamik und Kinetik.

### 3.1 Intermolekulare Kräfte

Intermolekulare Kräfte können ihrem Ursprung nach grob in drei Kategorien eingeteilt werden [40]. Zunächst sind da die Kräfte, welche aus der Coulomb-Wechselwirkung zwischen Ladungen herrühren und rein **elektrostatischer** Natur sind. Ionische Bindungen, Hydratationskräfte und Wasserstoffbrückenbindungen fallen in diese Gruppe. Dann gibt es **Polarisationskräfte**, die auftreten, wenn Dipolmomente in Molekülen durch die elektrischen Felder naher Ladungen und permanenter Dipole induziert werden. Alle Wechselwirkungen in Lösung beinhalten solche Polarisierungseffekte. Und schließlich existieren noch Kräfte **quantenmechanischen** Ursprungs. Diese Kräfte führen zu kovalenten Bindungen und zu den repulsiven sterischen oder Austausch-Wechselwirkungen (aufgrund des Pauli-Verbotes). Die vorgenannte Einteilung ist jedoch weder streng noch erschöpfend; die van der Waals-Wechselwirkung<sup>i</sup> beispielsweise lässt sich nicht eindeutig einer der Kategorien zuordnen.

Diejenigen Kräfte zu verstehen, welche die spezifischen Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen bestimmen, ist kein leichtes Unterfangen, da die **molekulare Erkennung** zweier Biomoleküle (Schlüssel-Schloss-Prinzip) aus einer Vielzahl unspezifischer, schwacher und nicht-kovalenter Bindungen resultiert, die nur durch ihre einzigartige räumliche Anordnung zu einer spezifischen Bindung werden (siehe Kapitel 2.1.1).

Um solche schwachen Wechselwirkungen direkt an einzelnen Molekülen zu untersuchen, wurden verschiedene Methoden angewandt, darunter der Surface Force Apparatus (SFA) [41], Mikropipetten [42], magnetische Beads [43] und optische Pinzetten [44]. Ein anderer weit verbreiteter Kraftmesser ist das in der vorliegenden Arbeit verwendete Rasterkraftmikroskop.

### 3.2 Rasterkraftmikroskopie

Das Rasterkraftmikroskop zählt zu den **Rastersondenmikroskopen** (Scanning Probe Microscope, SPM). Diese Instrumente bestehen aus einer sehr feinen, teilweise atomar spitzen Sonde, die im Kontakt oder im Nahfeld (d.h. bei einem Abstand von <50 nm) in einem Raster über die zu untersuchende Probe geführt wird und dabei Punkt für Punkt Informationen über deren Oberfläche liefert. Als Informationen können dabei nicht nur

---

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

topographische oder elektronische Bilder der Oberfläche, sondern auch lokale spektroskopische Daten erhalten werden. Die Rastersondenverfahren kombinieren eine präzise Kontrolle der Sondenbewegung relativ zur Oberfläche mit einer hochempfindlichen Detektion der Wechselwirkung zwischen Sonde und Probe. Letztere variiert mit dem speziellen Verfahren: Messung von Tunnelströmen im Nano- bis Picoampèrebereich zwischen einer leitenden Probe und einer metallischen Spitze beim **Rastertunnelmikroskop** (Scanning Tunneling Microscope, STM) [45,46], Lichtdetektion durch Glasfasern mit Blendenöffnungen von einigen 10 nm beim **optischen Nahfeldmikroskop** (Scanning Near-Field Optical Microscope, SNOM) [47] und Detektion der mechanischen Auslenkung eines mikrofabrizierten Federbalkens im Subångströmbereich beim **Rasterkraftmikroskop** (Atomic Force Microscope, AFM, oder auch Scanning Force Microscope, SFM) [48]. Es gibt noch eine Reihe weiterer Rastersondenverfahren, die sich aber nur durch die Art der detektierten Wechselwirkung (z.B. magnetisch oder elektrostatisch) von den bereits genannten Vertretern unterscheiden.

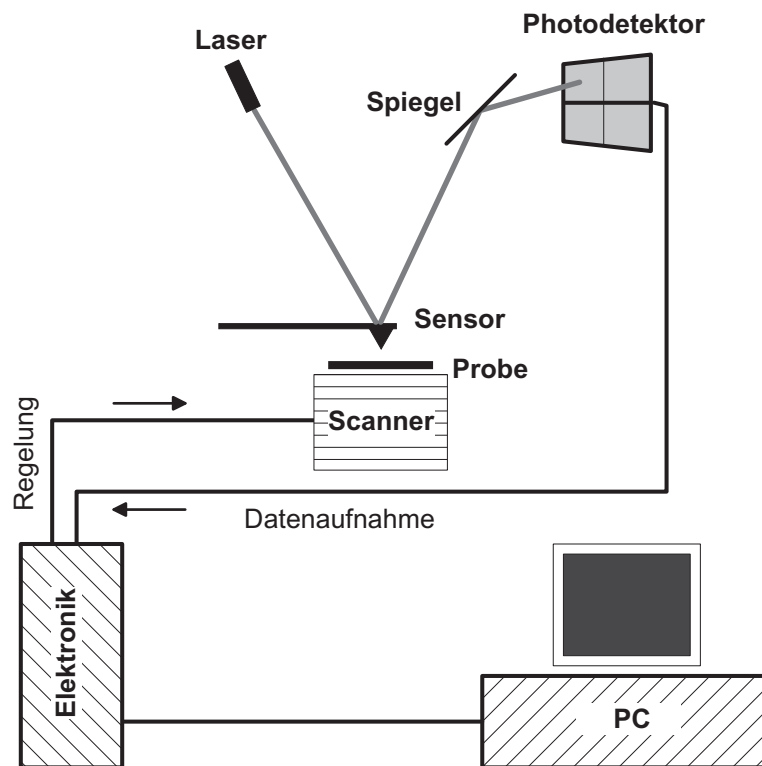


Abbildung 3.1: Das Rasterkraftmikroskop

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

### 3.2.1 Aufbau

Der Sensor eines Rasterkraftmikroskopes besteht aus einem weichen Federbalken (Cantilever)<sup>ii</sup>, an dessen Ende sich die Spitze (Tip) mit einem Radius von einigen Nanometern befindet. Während der Sensor eine Oberfläche abrastert, wird die zwischen Spitze und Probe wirkende Kraft durch die Verbiegung des Cantilevers gemessen. Zu

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

diesem Zweck wird üblicherweise ein Laserstrahl auf die Rückseite des Cantilevers fokussiert, wo er reflektiert wird und (über einen Spiegel) auf einen Quadrantenphotodetektor fällt [49,50]. Die detektierten Kräfte werden dabei als Rückkopplungssignal zur Steuerung der vertikalen Bewegung des Sensors über der Oberfläche verwendet. Sowohl diese als auch die horizontalen Rasterbewegungen werden von Stillelementen aus piezoelektrischen Keramiken übernommen. Das AFM erlaubt die Untersuchung von Systemen in wässriger Lösung und auf nichtleitenden und biokompatiblen Oberflächen – im Bereich der Biowissenschaften entscheidende Vorteile, die seine verglichen mit dem STM etwas geringere Auflösung mehr als aufwiegen.

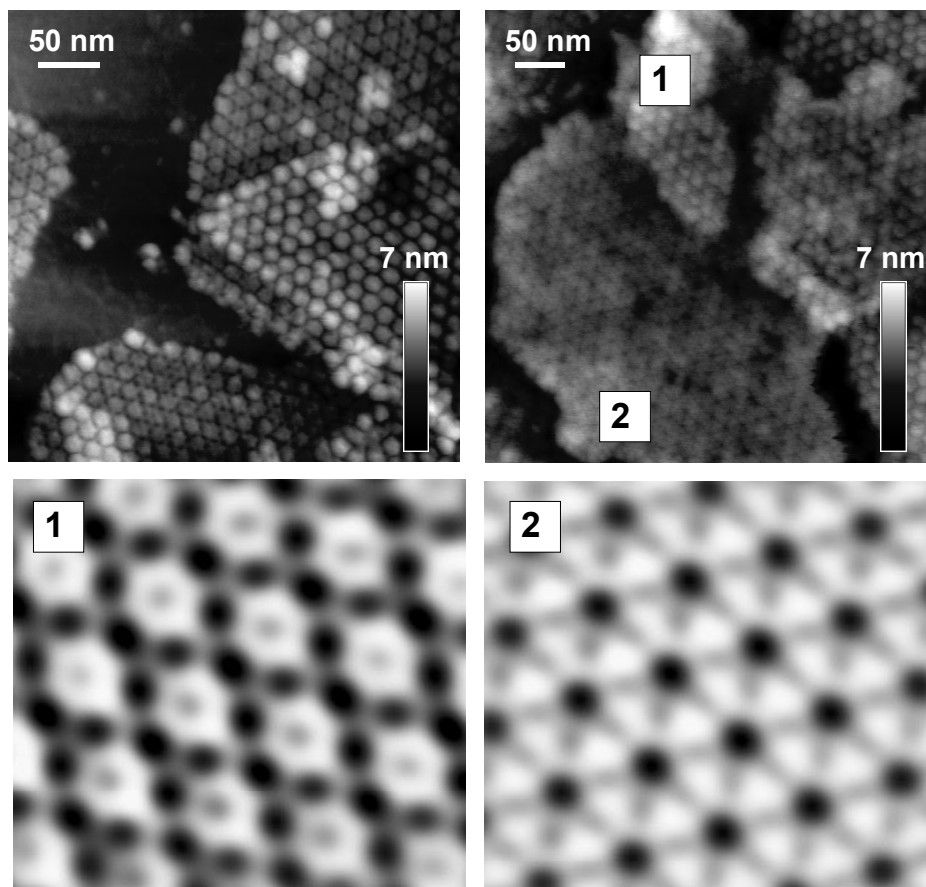


Abbildung 3.2: Rasterkraftmikroskopie an Membranproteinen

*Proteine aus dem Surface Layer (S-layer) von Corynebacterium glutamicum bilden durch Selbstorganisation regelmäßige Strukturen aus. Die topographischen Eigenschaften variieren für verschiedene Bakterienstämme. Ihre Analyse vermittelt AFM-Aufnahmen im Tapping Mode erlaubt es, die morphologischen Unterschiede mit der Primärstruktur der Proteine zu korrelieren [52]. Obere Reihe: S-layer ATCC 14751 (links) und ATCC 19240 (rechts). Untere Reihe: Fouriergefilterte Detailansichten von Unterseite (1) und Oberseite (2) des S-layers von C. glutamicum ATCC 19240.*

### 3.2.2 Abbildungsmodi

Abbildungsmodi können zunächst anhand der effektiven Kräfte zwischen Spitze und Probe unterschieden werden. Bei den **Kontaktmodi** (Contact Modes) wird das AFM im repulsiven Bereich des Wechselwirkungspotentials (Pauli-Verbot) betrieben, also im direkten Kontakt mit der Oberfläche. Während des Rastervorgangs wird die Verbiegung des Cantilevers konstant gehalten, also entweder mit konstanter Kraft (Constant Force Mode; detektiert wird die vertikale Position der Spitze) oder mit konstantem Abstand (Constant Height Mode; detektiert wird die Position des Lasersignals auf der Photodiode) gemessen. Beide Methoden erzielen vor allem bei der Untersuchung harter Proben hohe Auflösungen.

Beim **dynamischen Modus** (Nichtkontaktmodus, Non-Contact Mode) hingegen arbeitet das AFM hauptsächlich im attraktiven Bereich. Die Wechselwirkung der Spitze mit der Oberfläche wird dabei über Änderungen im Schwingungsverhalten des Cantilevers detektiert. Dazu wird der Cantilever zu Schwingungen nahe seiner Resonanzfrequenz angeregt. Bei Annäherung an die Oberfläche kommt es aufgrund der Kraftgradienten zwischen Spitze und Probe zu einer Verschiebung der Resonanzfrequenz des Cantilevers und damit auch zu einer Änderung seiner Schwingungsamplitude, woraus sich der Abstand der Spitze von der Probe bestimmen lässt. Alternativ kann man auch das Phasenverhalten beobachten. Im dynamischen Modus berührt die Spitze die Oberfläche während einer Messung immer nur sehr kurz (Kontaktzeiten im  $\mu\text{s}$ -Bereich) [51], sie tippt oder klopft (engl. to tap) also an die Probe. Man bezeichnet diese Methode darum auch als **Tapping Mode**. Der Tapping Mode eignet sich besonders zur Abbildung fragiler Systeme, weshalb Biomoleküle häufig in dieser Weise untersucht werden.

## 3.3 Kraft-Distanz-Messungen

Das Rasterkraftmikroskop lässt sich in besonders naheliegender Weise als Kraftmesser verwenden. Während in den Abbildungsmodi die Probenoberfläche abgerastert wird, behält man im Wechselwirkungsmodus die Position des Sensors über der Probe bei und misst die Wechselwirkung zwischen beiden als Funktion ihres gegenseitigen Abstands. Die auf den Sensor wirkenden Kräfte lassen sich aus der Verbiegung des Cantilevers bestimmen, und die kleinen Spitzenradien gestatten dabei eine hohe Ortsauflösung dieser Kräfte.

### 3.3.1 Messprinzip

Bei einer **Kraft-Distanz-Messung** wird der Sensor der Probe angenähert und danach wieder zurückgezogen. Dabei durchläuft das System mehrere Phasen, die sich in der gemessenen Kurve niederschlagen (Abbildung 3.3).

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

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

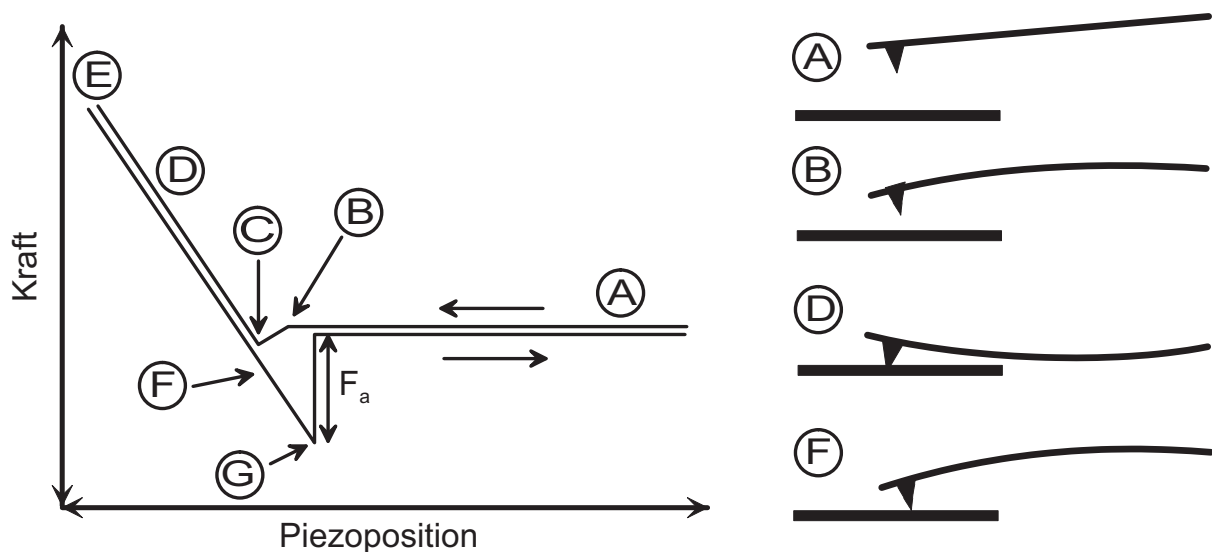


Abbildung 3.3: Schema einer Kraft-Distanz-Kurve

Es ist eine wohlbekannt Tatsache [53], dass sowohl die Probe als auch der Sensor von dünnen Wasserfilmen bedeckt sind, wenn das AFM an Luft betrieben wird. Diese Wasserschicht erzeugt Kapillarkräfte, welche die schwachen van der Waals-Kräfte überdecken und die Kraft-Distanz-Kurven dadurch dramatisch verändern können. Kraftspektroskopische Untersuchungen sollten darum stets in Flüssigkeiten, im Vakuum oder in einer trockenen Stickstoff-Umgebung stattfinden. Bei Biomolekülen sind wässrige Lösungen zu bevorzugen, welche die native Struktur der Objekte erhalten.

### 3.3.2 Kalibrierung der Kraftsensoren

Wie bereits erwähnt, ist zur Bestimmung der Kräfte eine genaue Kenntnis der Federkonstanten des verwendeten Cantilevers vonnöten. Da diese mitunter eine erhebliche Abweichung von den Herstellerangaben aufweist, muss eine unabhängige Kalibrierung vorgenommen werden. Dafür stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung: Man kann die Federkonstante aus der Geometrie des Cantilevers errechnen [54], durch Kopplung des Cantilevers mit einer Eichfeder [55] oder Beladen mit einer zusätzlichen Masse [56] bestimmen oder aus seinem thermischen Rauschverhalten ableiten [57]. Die Idee des letztgenannten Verfahrens, das auch in dieser Arbeit Verwendung findet, soll im folgenden kurz skizziert werden.

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

$$H = \frac{p^2}{2m} + \frac{1}{2}m\omega_0^2q^2 \quad (3.1)$$

gegeben, wobei  $q$  die Auslenkung des Oszillators,  $p$  der Impuls,  $m$  die oszillierende Masse und  $\omega_0$  die Resonanzfrequenz bezeichnet. Nach dem Äquipartitionstheorem gilt

$$\left\langle \frac{1}{2}m\omega_0^2q^2 \right\rangle = \frac{1}{2}k_B T \quad (3.2)$$

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

$$k = \frac{k_B T}{\langle q^2 \rangle}. \quad (3.3)$$

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

$$Q(\nu) = \frac{q}{\sqrt{\nu}} = Q_{bg} + \frac{Q_{amp} w^2}{w^2 + (\nu - \nu_c)^2} \quad (3.4)$$

wobei  $Q_{amp}$  die Amplitude,  $w$  die Güte,  $\nu_c$  die Peakfrequenz und  $Q_{bg}$  den Hintergrundparameter des Lorentz-Profiles darstellen. Durch Integration über  $Q$  ergibt sich:

$$\langle q^2 \rangle \equiv P = \int_0^\infty d\nu Q(\nu)^2 \quad (3.5)$$

$k$  ergibt sich damit zu

$$k = \frac{k_B T}{P}. \quad (3.6)$$

## 3.4 Immobilisierung

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

### 3.4.1 Substrate

Neben der Oberflächenchemie eines Substrates ist vor allem seine Rauigkeit von Bedeutung. Hochauflösende AFM-Abbildungen sind nur möglich, wenn die Rauigkeit der Oberfläche kleiner als die typischen Korngattungen der zu untersuchenden Moleküle ist (d.h. kleiner als etwa 1 nm). Ein Standardsubstrat ist hier der Glimmer (Mica), ein Schichtsilikat, welches sich leicht entlang definierter Ebenen spalten lässt, so dass atomar



flache, negativ geladene Oberflächen entstehen [58]. Andere geeignete und häufig verwendete Materialien sind Graphit, Glas, Silizium und unter speziellen Bedingungen aufgedampfte Goldschichten. Zudem ist die Anbindung an Siliziumnitrid ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) bedeutsam, da die zur Kraftspektroskopie eingesetzten AFM-Spitzen aus diesem Material bestehen.

Eine etwaige elektrostatische Abstoßung von Oberfläche und Molekülen lässt sich reduzieren oder sogar kompensieren, wenn der pH-Wert einer Pufferlösung entsprechend gewählt wird. Häufig ist man jedoch hinsichtlich der Funktionalität der Moleküle in der Wahl des pH-Wertes eingeschränkt. In diesem Fall bietet sich die Zugabe entsprechender Ionen in den Puffer an (Abbildung 3.4a). Dies ist insbesondere bedeutsam, da die Flexibilität von Biomolekülen (z.B. DNA) durch die Adhäsionskräfte zur Oberfläche beschränkt wird. Werden Gegenionen (im Fall der DNA meist zweiwertige Kationen) zur Immobilisierung auf dem Substrat eingesetzt, können die Adhäsionskräfte durch Änderungen in der Konzentration des gewählten Ions gezielt variiert werden.

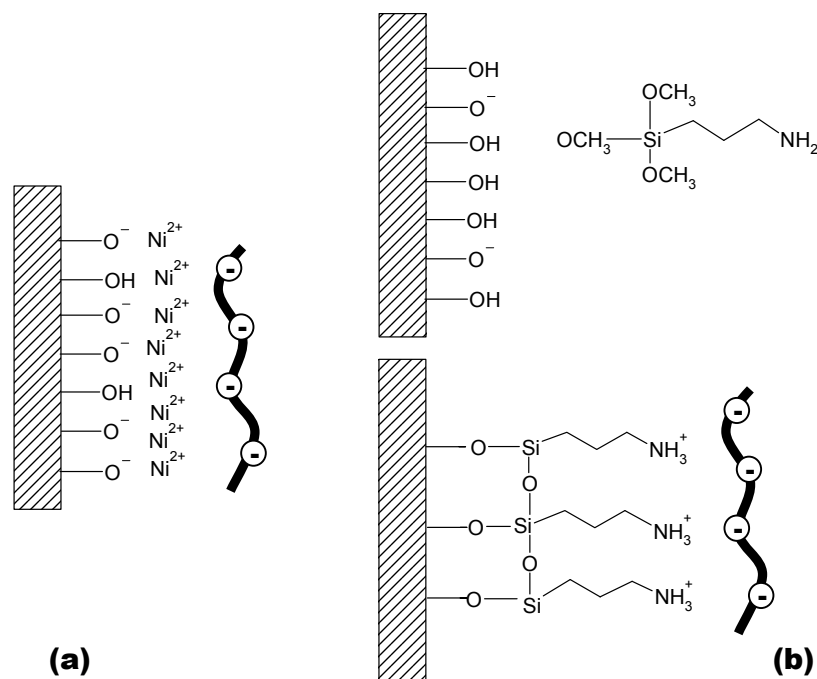


Abbildung 3.4: Immobilisierung von DNA

(a) Kompensation der Oberflächenladungen einer OH-terminierten Oberfläche (aktiviertes Glas,  $\text{Si}$ ,  $\text{Si}_3\text{N}_4$  oder Glimmer) durch zweiwertige Kationen. (b) Funktionalisierung mit Aminopropyltriethoxysilan (APTES). Beide Methoden eignen sich – wie angedeutet – beispielsweise zur Immobilisierung von DNA, die aufgrund ihres Phosphatrückgrates negativ geladen ist.

### 3.4.2 Funktionalisierung

Oberflächen werden in geeigneter Weise durch spezielle Moleküle modifiziert, die möglichst homogene Monolagen ausbilden (Self-Assembled Monolayers, SAM). Üblicherweise werden dazu Alkanthiole oder Organosilane verwendet. Alkanthiole sind lipid-ähnliche organische Moleküle, die aus einer Alkylkette mit einer SH-Gruppe an einem und einer funktionellen Gruppe am anderen Ende bestehen. Organosilane dagegen bestehen aus einem Silizium-Atom und einer Alkylkette, welche die funktionelle Gruppe des Silans trägt, wobei mindestens eine der anderen drei Bindungen des Silizium-Atoms in

einer Methoxy- oder Ethoxygruppe endet, die mit einem anorganischen Substrat reagieren kann. Die Endgruppen (z.B.  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{CH}_3$ ) der Thiole und Silane bestimmen dann die Eigenschaften der mit ihnen funktionalisierten Oberflächen [59] (Abbildung 3.4b).

Die Modifikation von Biomolekülen geschieht üblicherweise durch **Linker** (Crosslinker, Spacer), kettenartige Moleküle, die (meistens unterschiedliche) funktionelle Gruppen an beiden Enden tragen. Damit kann man nicht nur eine kovalente Bindung zwischen Molekül und Oberfläche erreichen, sondern zudem über die Länge der Linker den Abstand zwischen Molekül und Oberfläche so einstellen, dass die ursprüngliche Aktivität der Biomoleküle erhalten bleibt. Als Angriffspunkte für die kovalenten Bindungen bieten sich dabei die Aminosäurereste in Proteinen an, die auch zur Markierung mit Fluoreszenzmarkern und radioaktiven Isotopen genutzt werden. Besonders geeignet sind hier die Aminogruppe von Lysin (siehe Abbildung 2.1), die Thiolgruppe von Cystein und die Carboxylgruppen von Glutamat und Aspartat [8,60].

### 3.5 Thermodynamik, Kräfte und Kinetik

Die entscheidende Frage an die Kraftspektroskopie besteht darin, in welcher Weise sich von den ermittelten Kräften auf biochemisch relevante Reaktionsparameter schließen lässt. In den Anfangstagen der Einzelmolekül-Kraftspektroskopie war die Überzeugung vorherrschend, eine definierte Kraft gebe die Stärke einer bestimmten Bindung wieder. Dies hat sich als falsch erwiesen: Die Abrisskräfte unterliegen einer stochastischen Verteilung, und diese Verteilung variiert mit der Ziehgeschwindigkeit. Einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis der Zusammenhänge lieferte 1997 die bahnbrechende Arbeit von Evan Evans und Ken Ritchie [61]. Sie erkannten, dass ein Dissoziationsereignis unter einer äußeren Kraft dem thermisch aktivierten Zerfall eines metastabilen Zustands entspricht, der mit der Kramers'schen **Reaktionsratentheorie** [62-66] beschrieben werden kann. Einen schönen Überblick über die theoretischen und experimentellen Arbeiten, die den geistigen Wandel begleiteten, liefert [67].

#### 3.5.1 Dissoziation im thermischen Gleichgewicht

Als Beispiel für ein Ligand-Rezeptor-System soll die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Bindung eines regulatorischen Proteins (P) an DNA (D) zu einem Protein-DNA-Komplex (PD) dienen. Für diese Reaktion gilt



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

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = G_2 - G_1, \quad (3.8)$$

die Differenz aus den Gibbschen freien Enthalpien ( $G = H - TS$ ) von End- und Anfangszustand ( $\Delta H$  : Reaktionsenthalpie,  $\Delta S$  : Entropieänderung im System). Unter

Einführung einer **freien Standard-Enthalpie**  $\Delta G^0$  (bei Normdruck) lässt sich für die freie Reaktionsenthalpie schreiben:

$$\Delta G = \Delta G^0 - RT \ln \frac{[P][D]}{[PD]}, \quad (3.9)$$

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

$$\frac{[P][D]}{[PD]} = \frac{k_{off}^0}{k_{on}^0} = K_D, \quad (3.10)$$

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

$$\Delta G^0 = RT \ln K_D. \quad (3.11)$$

Für Reaktionen, die bei konstantem Volumen durchgeführt werden, tritt an die Stelle der freien Reaktionsenthalpie die **freie Reaktionsenergie**  $\Delta F = \Delta U - T\Delta S = F_2 - F_1$ , die Differenz der freien Energien  $F = G - pV$  von End- und Anfangszustand (freie Enthalpie und freie Energie unterscheiden sich um die Verdrängungsenergie des Systems). Alle Aussagen über  $\Delta G$ , die für Systeme bei konstantem Druck gelten, gelten analog für  $\Delta F$  für Systeme bei konstantem Volumen.

Die Dissoziation des Komplexes kann als Überwinden einer Potentialbarriere aufgrund **thermischer Fluktuationen** interpretiert werden (Abbildung 3.5a). Der Zusammenhang zwischen der Höhe der Potentialbarriere  $\Delta\Psi$  und der Off-Rate ist dann nach Arrhenius [62] durch folgenden Ausdruck gegeben:

$$k_{off}^0 = C e^{-\beta\Delta\Psi}, \quad (3.12)$$

wobei  $\beta$  die inverse Temperatur  $\beta = (k_B T)^{-1}$  bezeichnet. Die genaue Form des Proportionalitätsfaktors  $C$  wurde jedoch erst von Kramers [64] gefunden.

### 3.5.2 Dissoziation unter einer äußeren Kraft

In kraftspektroskopischen Untersuchungen betrachtet man hingegen die durch eine **äußere Kraft** induzierte Dissoziation von Komplexen. Nach Bell [65] sowie Evans und Ritchie [61] wird die Höhe der Potentialbarriere durch eine konstante mechanische Kraft  $f$  in folgender Weise verändert:

$$\Delta\Psi(f) = \Delta\Psi_0 - fx_\beta, \quad (3.13)$$

wobei  $x_\beta = x_b - x_m$  der Abstand (bezüglich der Reaktionskoordinate  $x$ ) zwischen dem Maximum der Potentialbarriere und dem Minimum des metastabilen Zustandes ist (Abbildung 3.5b). Setzt man das Ergebnis (3.13) in Gleichung (3.12) ein, erhält man die Off-Rate als Funktion einer wirkenden mechanischen Kraft:

$$k_{off}(f) = k_{off}^0 e^{\beta f x_\beta}. \quad (3.14)$$

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

$$\dot{f}(t) = cv = r, \quad (3.15)$$

wobei  $c$  die effektive Federkonstante in Reaktionsrichtung ist, die sich aus der Federkonstanten  $k$  des Cantilevers und der Elastizität des an die Spitze gebundenen Polymerlinkers ergibt. Den Wert  $r$  bezeichnet man auch als **Loading Rate**. Die äußere Kraft wächst also in einem AFM-Experiment (im Idealfall) linear mit der Zeit. Gemäß (3.14) folgt daraus eine Zeitabhängigkeit der Off-Rate.

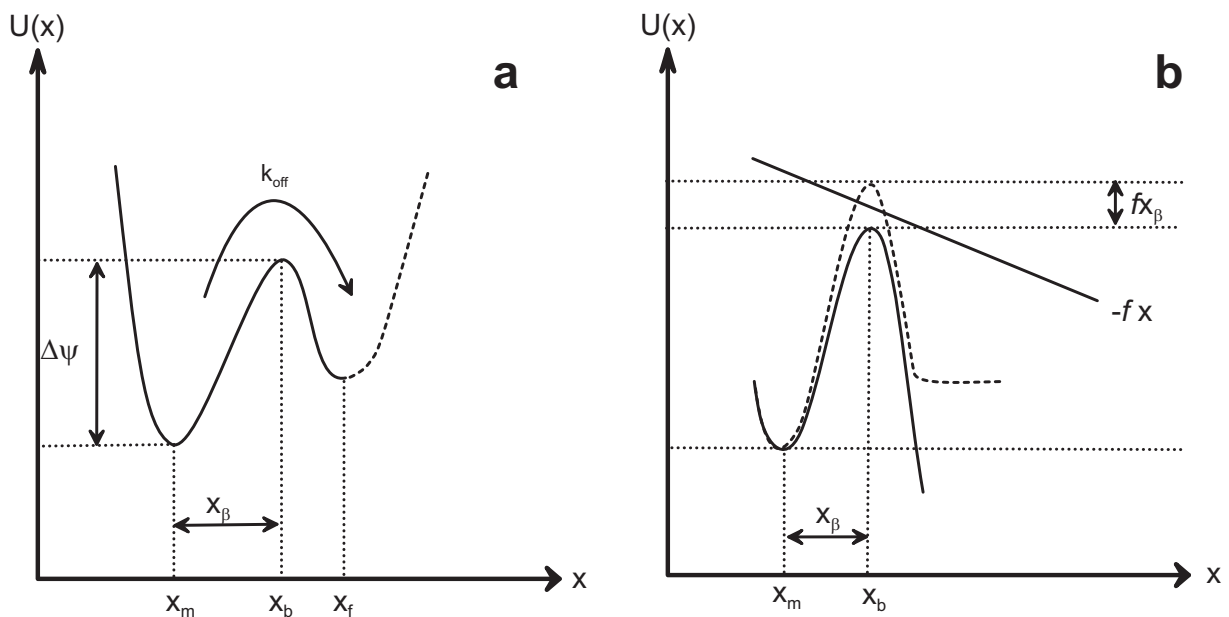


Abbildung 3.5: Dissoziationspotentiale

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

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

Nach Evans und Ritchie entspricht ein Dissoziationsereignis dem thermisch aktivierten Zerfall eines metastabilen Zustands, beherrscht von einer Reaktionskinetik der Form

$$\frac{dp(t)}{dt} = -k_{off}(f(t))p(t), \quad (3.16)$$

wobei  $p(t)$  die Wahrscheinlichkeit des Überlebens der Bindung bis zum Zeitpunkt  $t$  bezeichnet und  $k_{off}(f)$  die Dissoziationsrate unter einer äußeren Kraft  $f$ .

Das Wiederherstellen einer einmal dissoziierten Bindung wird unter einer äußeren Kraft exponentiell unterdrückt und kann daher in (3.16) vernachlässigt werden [67,68]. Die einzige andere in (3.16) implizit enthaltene Voraussetzung besteht darin, dass die Dissoziationswahrscheinlichkeit nur von der instantan wirkenden Kraft abhängt, nicht von

der Vergangenheit des Systems ( $df(t)/dt$  eingeschlossen). Dies kann damit begründet werden, dass intramolekulare thermische Relaxationsprozesse in das Gleichgewicht des metastabilen Zustands viel schneller stattfinden (typischerweise  $t_R=10^{-10}-10^{-9}$  s [69]) als eine Änderung der angelegten Kraft  $f(t)$  ( $\sim 10^{-4}$  s bis min im Experiment) und auch als die Lebensdauer der Bindung.

Die zweite Annahme von Evans und Ritchie besteht darin, dass die Kraft  $f(t)$  in (3.16) in folgender Weise von der Ziehgeschwindigkeit  $v$  abhängt:

$$f(t) = F(vt), \quad (3.17)$$

wobei die Funktion  $F(s)$  von  $v$  unabhängig sein soll. D.h., die Kraft  $f(t)$  hängt nur von der gesamten extern verursachten Auslenkung  $s = vt$  aller elastischer Komponenten des Setups (Molekül, Linker, AFM-Cantilever etc.) ab, aber nicht von der Geschwindigkeit, mit der diese Auslenkung anwächst. Dies scheint gerechtfertigt, da alle elastischen Komponenten unter realen Bedingungen nahe bei ihren Gleichgewichtszuständen bleiben und ihre Vorgeschichte daher keine Rolle spielt.

Aus (3.16) und (3.17) ergibt sich für die Wahrscheinlichkeit des Überlebens der Bindung bis zu einer äußeren Kraft  $f$  mit  $p_v(f(t)) = p(t)$  und  $p(t=0) = p_v(f = f_{\min}) = 1$  das Ergebnis

$$p_v(f) = \exp \left\{ -\frac{1}{v} \int_{f_{\min}}^f df' \frac{k_{\text{off}}(f')}{F'(F^{-1}(f'))} \right\}, \quad (3.18)$$

wobei  $f_{\min}$  den Schwellenwert bezeichnet, unter dem Dissoziationskräfte im Experiment nicht mehr von Fluktuationen unterschieden werden können. Es wird außerdem angenommen, dass  $F(s)$  monoton wachsend ist, so dass die inverse Funktion  $F^{-1}$  existiert.

Aus dem Maximum der Verteilung  $-dp_v(f)/df$  kann man – unter Benutzung von (3.14) und (3.15) – auf die wahrscheinlichste Abrisskraft  $F^*$  in einer Verteilung von Abrisskräften  $F_a$  bei gegebener Loading Rate schließen:

$$F^* = \frac{k_B T}{x_\beta} \ln \frac{x_\beta r}{k_{\text{off}}^0 k_B T}. \quad (3.19)$$

Dieser von Evans und Ritchie postulierte Zusammenhang ist die Basis der **dynamischen Kraftspektroskopie** (Dynamic Force Spectroscopy, DFS). Dabei werden Kräfteverteilungen für unterschiedliche Loading Rates ermittelt, wozu die Ziehgeschwindigkeit über mehrere Größenordnungen variiert wird. In einer halblogarithmischen Darstellung sollten die wahrscheinlichsten Kraftwerte eine lineare Abhängigkeit von den Loading Rates aufweisen. Aus der Steigung der Regressionsgeraden ergibt sich dann die Reaktionslänge  $x_\beta$ , die Extrapolation zum Wert  $F^*=0$  (keine äußere Kraft) ermöglicht die Bestimmung der Off-Rate  $k_{\text{off}}$ .

### 3.5.3 Strukturierte Energielandschaften

Im vorhergehenden Abschnitt wurde stillschweigend vorausgesetzt, dass sich auf dem Dissoziationsweg nur eine einzelne, scharf abgegrenzte Potentialbarriere befindet. In einer strukturierten Energielandschaft dagegen erfolgt die Dissoziation über intermediäre gebundene Zustände und/oder es existieren verschiedene Übergangszustände hin zum ungebundenen Zustand. Um dieses System vollständig zu beschreiben, ist ein Netzwerk (kraftabhängiger) Übergangsraten zwischen den einzelnen Zuständen nötig [70].

Es lässt sich leicht einsehen, dass bei einer erzwungenen Dissoziation (DFS) die prominente und für den Dissoziationsvorgang entscheidende Barriere von der Stärke der

äußeren Kraft abhängt (Abbildung 3.6). Die Variation der angelegten Kräfte (durch die Variation der Loading Rates) über einen weiten Kraftbereich erlaubt so die Erforschung der Energielandschaft des Systems. In der halblogarithmischen Auftragung gemäß der in 3.5.2 geschilderten Standardmethode treten mehrere Steigungsbereiche auf, die auf eine strukturierte Energielandschaft hindeuten. Dies wurde bei unterschiedlichen Ligand-Rezeptor-Systemen experimentell beobachtet, zuerst in [7] und jüngst in [71].

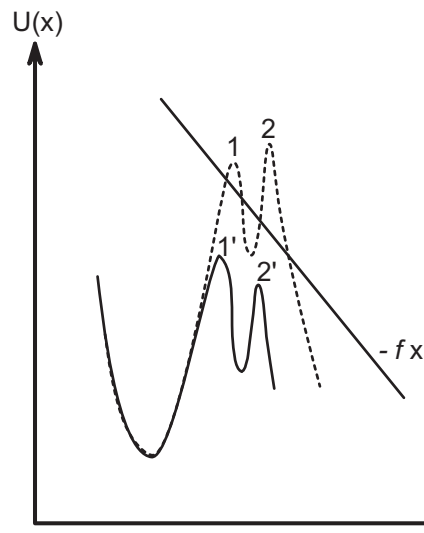


Abbildung 3.6: Mehrere Potentialbarrieren unter einer äußeren Kraft

*Ist die von außen am Komplex wirkende Kraft hinreichend groß, wird die (eigentlich höhere) Potentialbarriere 2 soweit erniedrigt, dass sie gegenüber der Potentialbarriere 1 zurückfällt.*

Eine nicht zu unterschätzende Schwierigkeit besteht jedoch darin, aus den durch DFS experimentell bestimmbar Parameter (Reaktionslänge  $x_{\beta,n}$  und Off-Rate  $k_{\text{off},n}$  für jeden der  $n$  Steigungsbereiche) die exakte Gestalt der Energielandschaft abzuleiten. Bei nur zwei Potentialbarrieren gibt es bereits drei Raten, die den Prozess bestimmen:  $k(g \rightarrow i)$ , die Rate der Dissoziation aus dem gebundenen in den intermediären Zustand,  $k(i \rightarrow g)$ , die Rate für das Re-Binding aus dem Intermediat, und  $k(i \rightarrow f)$ , die Rate für die Dissoziation vom intermediären in den freien Zustand. (Die Rate  $k(f \rightarrow i)$  kann unter einer äußeren Kraft vernachlässigt werden, da sich die Bindungspartner im Experiment rasch makroskopisch voneinander entfernen). Die gemessenen Raten sind eine Überlagerung dieser drei Parameter; eine Zuordnung ist ohne weitere Informationen über die Energielandschaft nicht eindeutig möglich [70]. So kann nicht unterschieden werden, ob bei höheren Kräften eine innere oder äußere Barriere die Dissoziationsrate bestimmt: Dies hängt nicht nur von der Lage entlang der Reaktionskoordinate, sondern vor allem von der Höhe der barriereeigenen Übergangsrates (s.o.) ab. Bei größeren Kräften ist es die kleinere Rate, also die höhere der beiden Potentialbarrieren, die sich in der Messung ausdrückt.

### 3.5.4 Die Standardtheorie auf dem Prüfstein

Seit der ursprünglichen Arbeit von Evans und Ritchie wurde diese Theorie in mehrere Richtungen erweitert und in einigen Bereichen verbessert [7,68,70,72-75]. Dennoch blieb das grundlegende physikalische Bild des Dissoziationsprozesses jahrelang unverändert. In [76] wurde 2003 eine optimierte Methode zur Analyse der Kraftspektroskopiedaten vorgeschlagen – mit weitreichenden Konsequenzen, wie nachfolgend referiert werden soll.

Für einen gegebenen Datensatz aus  $N_v$  experimentell beobachteten Abrisskräften  $f_n$  ( $n = 1, \dots, N_v$ ;  $f_n > f_{\min}$  für alle  $n$ ) bei einer festen Ziehgeschwindigkeit  $v$  kann der nachfolgende Schätzwert  $\tilde{p}_v(f)$  für die wahre Überlebenswahrscheinlichkeit der Bindung  $p_v(f)$  bestimmt werden:

$$\tilde{p}_v(f) = \frac{1}{N_v} \sum_{n=1}^{N_v} \Theta(f_n - f) \quad (3.20)$$

Dabei ist  $\Theta(x) = \int_{-\infty}^x \delta(y) dy$  die Heaviside-Sprungfunktion [ $\Theta(x < 0) = 0, \Theta(x > 0) = 1$ ] mit  $\Theta(0) = \frac{1}{2}$ . Definitionsgemäß geht  $\tilde{p}_v(f) \rightarrow p_v(f)$  für  $N_v \rightarrow \infty$ . Für jede endliche Anzahl  $N_v$  ist (3.20) die beste Abschätzung für  $p_v(f)$ , die ohne weitere Annahmen über das System erfolgen kann. Hieraus kann man einen Schätzwert für das wahre Integral in (3.18) ableiten:

$$\tilde{g}_v(f) = -v \ln \tilde{p}_v(f) \quad (3.21)$$

mit  $g(f) = \int_{f_{\min}}^f df' \frac{k_{\text{off}}(f')}{F'(F^{-1}(f'))}$  und  $p_v(f) = \exp\left\{-\frac{g(f)}{v}\right\}$ .

Aus den beiden grundlegenden Postulaten (3.16) und (3.17) der Standardtheorie nach Evans und Ritchie folgt nun, dass der Ausdruck  $\tilde{g}_v(f) = -v \ln \tilde{p}_v(f)$  (im Rahmen statistischer Fluktuationen) unabhängig von der Ziehgeschwindigkeit  $v$  sein muss. Wenn Kraftverteilungen unter verschiedenen Ziehgeschwindigkeiten in einem Diagramm aufgetragen werden, sollten die einzelnen Datensätze also zu einer Masterkurve zusammenfallen.

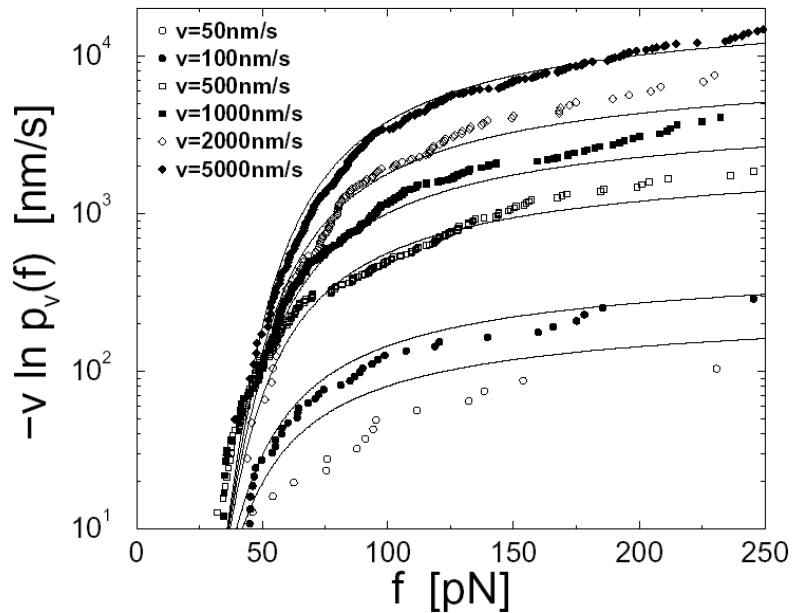


Abbildung 3.7: Masterkurvenansatz für Kraftspektroskopiedaten

*Gezeigt ist die Anwendung der in (3.20) und (3.21) begründeten Analysemethode auf die experimentell bestimmten Abrisskräfte für einen Protein-DNA-Dissoziationsprozess (Protein ExpG und expE1-Promotorregion). Dies ist derselbe Datensatz, der uns noch in Kapitel 5.1.3 begegnen wird. Offensichtlich fallen die Funktionen  $\tilde{g}_v(f) = -v \ln \tilde{p}_v(f)$  nicht zu einer Masterkurve zusammen [77]. Die durchgezogenen Linien stehen für die theoretisch vorhergesagten Kurven nach Einführung einer Bindungsheterogenität [81].*

Eine Anwendung dieser Methode auf experimentell bestimmte Daten zeigt jedoch auf [77], dass dies keineswegs der Fall ist (Abbildung 3.7)! Dieses Phänomen ist systemunabhängig und wurde bei völlig unterschiedlichen Ligand-Rezeptor-Systemen [15,39,78,79], auch solchen [80], die nicht mit dem AFM, sondern der Mikropipetten-Methode untersucht wurden, festgestellt [81].

Dies bedeutet, dass die grundlegenden Annahmen der Theorie einer Überprüfung zu unterziehen sind. Da Bedingung (3.17) vom Experiment (im Rahmen der Fehlertoleranz) bestätigt wird (siehe Kapitel 4.1.5, v.a. Abbildung 4.4), muss sich das Augenmerk auf Bedingung (3.16) richten. Verschiedene Denkansätze wurden versucht [77], doch weder war ein Einfluss des Schwellenwertes  $f_{\min}$  feststellbar, noch vermochte die Annahme mehrerer metastabiler Zustände die beobachteten Abweichungen von der vorhergesagten Masterkurve zu erklären.

### 3.5.5 Heterogenität chemischer Bindungen

In einem neuen und vielversprechenden Ansatz [81] wird daher eine Heterogenität der chemischen Bindungen postuliert, um die beschriebenen Widersprüche aufzulösen. Dies belässt die Annahmen (3.16) und (3.17) im Wesentlichen intakt, mit der zusätzlichen Bedingung, dass die kraftabhängige Dissoziationsrate  $k_{\text{off}}(f)$  bei der Wiederholung des Kraftspektroskopie-Experimentes zufälligen Variationen unterworfen ist. Daher darf die experimentell bestimmte Funktion  $\tilde{p}_v(f)$  nicht mit  $p_v(f)$  verglichen werden, sondern nur mit dem über die statistisch verteilten Raten  $k_{\text{off}}(f)$  gemittelten Wert  $\bar{p}_v(f)$ .

Für eine solche intrinsische Wahrscheinlichkeitsverteilung der Dissoziationsrate lassen sich verschiedene Gründe anführen, die möglicherweise, aber keineswegs zwingend in einem realen Experiment vorliegen:

- I. Die Orientierung des Molekülkomplexes relativ zur Richtung der angelegten Kraft könnte variieren, wodurch  $k$  auf unterschiedliche Weise von  $f$  abhinge.
- II. Zufällige Variationen der lokalen Umgebung der Bindedomäne könnten die Dissoziation beeinflussen; man denke hier an Ionen- und Lösungsmittelleffekte.
- III. Es könnte eine Mischung verschiedener Klassen, Konformationen oder Isoformen desselben Moleküls vorliegen.
- IV. Große und komplexe Biomoleküle könnten mehrere verschiedene Bindedomänen aufweisen.
- V. Unter bestimmten Bedingungen könnten mehrere Dissoziationsprozesse im Experiment als Einzelereignisse misinterpretiert werden, was eine modifizierte effektive Dissoziationsrate zur Folge hätte.
- VI. Unspezifische Bindungen, die im Experiment auftreten, könnten in geringer, aber nicht zu vernachlässigender Zahl die gleiche Kraft-Distanz-Charakteristik wie die eigentlich zu untersuchten Dissoziationsprozesse aufweisen.

(Für eine Diskussion der für die Diskrepanzen in Abbildung 3.7 wahrscheinlich verantwortlichen Einflüsse wird auf Kapitel 5.1.3 verwiesen).

In der theoretischen Beschreibung bedeutet dies den Übergang zu einer Rate der Form  $k_{\text{off}}(f) = k_{\text{off}}(f; \vec{\lambda})$  mit einem Satz von Parametern  $\vec{\lambda}$ , die mit der Wahrscheinlichkeitsdichte  $\rho(\vec{\lambda}, \vec{\mu})$  zufällig verteilt sind (abhängig von einem Satz von Fit-Parametern  $\vec{\mu}$ ). Mit (3.14) und (3.15) ergibt sich aus (3.18) explizit



$$p_v(f; \vec{\lambda}) = \exp \left\{ -\frac{k_{off}^0}{r} \frac{e^{\alpha f} - 1}{\alpha} \right\} \quad \text{mit} \quad \alpha = \beta x_\beta = \frac{x_\beta}{k_B T}, \quad (3.22)$$

also

$$p_v(f; \vec{\lambda}) = \exp \left\{ -\frac{k_{off}^0 k_B T}{x_\beta r} \left( e^{\frac{x_\beta f}{k_B T}} - 1 \right) \right\},$$

sowie

$$\bar{p}_v(f; \vec{\mu}) = \frac{\int d\vec{\lambda} \rho(\vec{\lambda}, \vec{\mu}) p_v(f; \vec{\lambda})}{\int d\vec{\lambda} \rho(\vec{\lambda}, \vec{\mu}) p_v(f_{min}; \vec{\lambda})} \quad (3.23)$$

Die angenommene Heterogenität der Bindungen läuft auf die Randomisierung der zwei Parameter  $k_{off}^0$  und  $\alpha$  in (3.14) hinaus, d.h.  $\vec{\lambda} = (k_{off}^0, \alpha)$ .

In Tests mit verschiedenen Wahrscheinlichkeitsverteilungen am experimentellen Datensatz aus Abbildung 3.7 stellt sich nun heraus [81], dass eine Randomisierung von  $k_{off}^0$  zu einer äußerst schlechten Übereinstimmung mit den experimentellen Daten führt und eine unwahrscheinliche Dispersion von  $k_{off}^0$  in der Größenordnung  $1000 k_{off}^0$  ergibt. Da die Größen  $k_{off}^0$  und  $c$  zudem immer in der Kombination  $k_{off}^0/c$  auftreten, entspricht eine Randomisierung der Linkerelastizität [72,82] im Wesentlichen einer Randomisierung von  $k_{off}^0$  und erklärt nicht das hier besprochene Phänomen.

Da aufgrund der Exponentialfunktion in (3.14) die Zufälligkeit von  $\alpha$  ohnehin einen größeren Einfluss als die von  $k_{off}^0$  haben sollte, darf der Parameter  $k_{off}^0$  also als fest angenommen werden, wodurch er vom Parametersatz  $\vec{\lambda}$  in den Satz  $\vec{\mu}$  überwechselt. Es bleiben also drei Fit-Parameter  $\vec{\mu} = (k_{off}^0, a, \sigma)$  für eine Wahrscheinlichkeitsverteilung der Form

$$\rho(\alpha) = \rho(\alpha; a, \sigma) = \wp \exp \left\{ -(\alpha - a)^2 / 2\sigma^2 \right\} \Theta(\alpha), \quad (3.24)$$

eine abgeschnittene Gaußverteilung mit der Normalisierungskonstanten  $\wp$ . Dabei geben  $a$  und  $\sigma$  näherungsweise das Mittel und die Varianz von  $\alpha$  wieder, vorausgesetzt, die relative Breite  $\sigma/a$  ist hinreichend schmal. Mit dieser Verteilung wurde in den Tests die größte Annäherung an die experimentellen Daten erzielt (Abbildung 3.7). Zusätzliche Parameter, um nichtlineare Effekte oder mehrere metastabile Zustände zu berücksichtigen, erbrachten ebenso wie eine simultane Randomisierung von  $k_{off}^0$  und  $\alpha$  keine signifikante Verbesserung des Fits.

Der entscheidende neue Fit-Parameter ist also die **Dispersion der effektiven Dissoziationslänge**. Dieser Parameter kann mit der oben beschriebenen Standardmethode der Datenanalyse nicht bestimmt werden.

Obwohl sie den Einfluss der Bindungsheterogenität vernachlässigt, leistet die Standardmethode überraschend gute Dienste bei der Bestimmung der beiden anderen Parameter  $k_{off}^0$  und  $a$ . Bestimmt man die wahrscheinlichste Abrisskraft  $F^*$  nämlich nach der verallgemeinerten Theorie (numerisch) aus  $d^2 \bar{p}_v(f_0) / df^2 = 0$  und (3.23), ergibt sich  $F^*$  immer noch in sehr guter Näherung als lineare Funktion von  $\ln(r)$ , allerdings mit einer komplizierteren Abhängigkeit von den Parametern  $k_{off}^0, a, \sigma$  (Abbildung 3.8A). Daher

konnte die Inkonsistenz der Standardtheorie auch nicht anhand der traditionellen  $F^* \cdot \ln(r)$ -Diagrammen festgestellt werden.

Wenn man die traditionellen Gaußfits der Standardmethode auf die numerisch bestimmten Abrisskraftverteilungen anwendet und dann  $F^*$  berechnet, ergibt sich ein sehr ähnliches Bild (Abbildung 3.8B). Die Funktionen  $f^*(v)$  für die verschiedenen Verhältnisse  $\sigma/a$  liegen sogar dichter beieinander. Aus der Steigung dieser Funktionen kann daher gemäß Beziehung (3.19) die Dissoziationslänge recht genau bestimmt werden. Bei der Bestimmung der Dissoziationsrate ist die neue Methode der alten dagegen deutlich überlegen, auch wenn beide Verfahren mit einer inhärenten statistischen Unsicherheit von ungefähr einer Größenordnung zu kämpfen haben, mit der die ermittelte Dissoziationsrate behaftet ist [81].

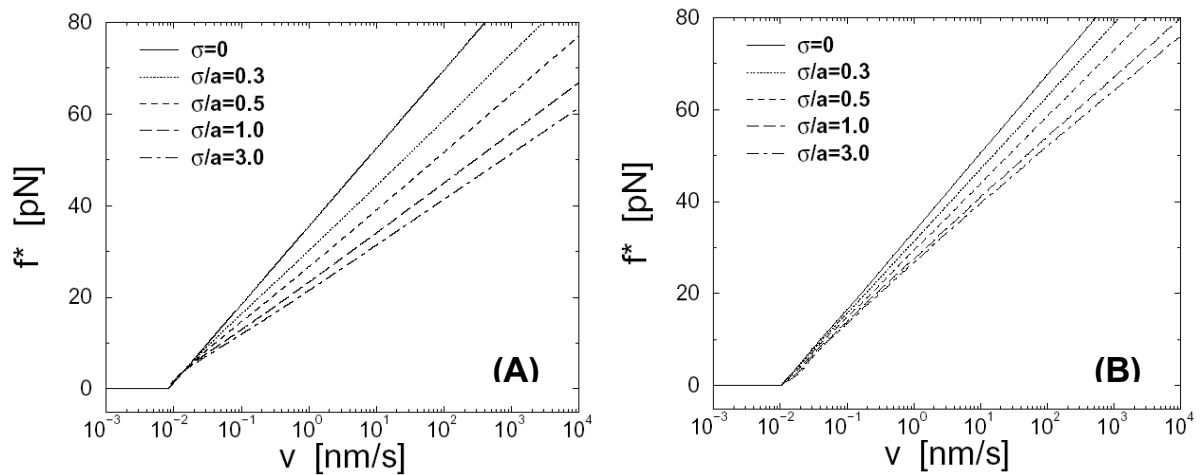


Abbildung 3.8: Vergleich der neuen und der alten Analyseverfahren

In beiden Diagrammen ist für den Datensatz aus Abbildung 3.7 die wahrscheinlichste Abrisskraft  $F^*$  gegen die Geschwindigkeit  $v$  (in logarithmischer Skalierung) aufgetragen, mit fünf verschiedenen Werten für die mittlere Breite  $\sigma/a$ . **(A)** Numerisch aus bestimmte Kraftwerte gemäß der verallgemeinerten Theorie (mit  $f_{\min} = 0$ ). **(B)** Kraftwerte bestimmt durch Gaußfits gemäß der Standardmethode an den numerisch ermittelten Verteilungen  $-\overline{d\bar{p}_v(f)}/df$  [81].

## Kapitel 4

### Materialien und Methoden

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

#### 4.1 Instrumente

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



Abbildung 4.1: Versuchsaufbau

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

##### 4.1.1 Das verwendete Rasterkraftmikroskop

Alle in dieser Arbeit präsentierten Experimente wurden mit einem Nanoscope IIIa Multimode AFM der Firma Veeco Instruments (Santa Barbara, Kalifornien, USA) durchgeführt. Dabei wurde ein J-Scanner (Scanbereich  $115\ \mu\text{m}$ ) verwendet, der regelmäßig mit Hilfe der entsprechenden Funktion aus der Standard-Software (Release 4.43r6) kalibriert wurde.

Da für die AFM-Experimente eine wässrige Umgebung unerlässlich war, wurde stets eine Original-Flüssigmesszelle von Digital Instruments (ohne Dichtungsring) benutzt. Vor jedem Einsatz (also auch bei einem Austausch des verwendeten Puffers) wurde diese gründlich gereinigt. Dazu wurde die Zelle zunächst mit herkömmlichem Geschirrspülmittel ausgespült, mit ultrareinem Wasser (18.2 MΩ/cm mit MilliQ-Maschine; Millipore, Eschborn, D)<sup>i</sup> abgewaschen, dann mit Ethanol ausgespült, wiederum mit Millipore-Wasser abgewaschen und schließlich mit Stickstoff trockengeblasen. Dieser Aufwand hat sich als ratsam erwiesen, da Verschmutzungen in der Flüssigzelle die Qualität der Aufnahmen in entscheidender Weise beeinflussen. Ein entsprechender Aufwand wird auch in [83] betrieben.

### 4.1.2 Die Kraftsensoren

Für die Messungen kamen ausschließlich Siliziumnitrid-Sensoren zum Einsatz, und zwar entweder vom Typ MSC-T-AU (Veeco Instruments, Santa Barbara, CA, USA; ehem. Thermomicroscopes) oder OMCL-TR400PSA (Olympus, Tokyo, Japan). Die besten Resultate wurden mit den Veeco-Sensoren erzielt. Auf einem Chip dieses Typs sind fünf V-förmige und ein rechteckiger Cantilever mit unterschiedlichen Dimensionen und Federkonstanten (A-F) montiert. Die Spitzen besitzen die Form einer Pyramide, die jedoch an ihrem Ende noch einmal geschärft ist (Spitzenradius <20 nm). Verwendet wurden nur V-förmige Cantilever, und zwar für Abbildungen Sensor A und für die kraftspektroskopischen Untersuchungen stets Sensor C. Die Olympus-Sensoren sind ebenfalls pyramidenförmig auf der Basis eines V-förmigen Cantilevers.

Typ	Olympus	Veeco A	Veeco C
Länge [μm]	200	180	320
Breite [μm]	28	18	22
Dicke [μm]	0.4	0.6±0.1	0.6±0.1
Federkonstante [pN/nm]	20	50±20	10±3
Resonanzfrequenz [kHz]	11	22±8	7±3

Tabelle 4.1: Herstellerangaben für die verwendeten Cantilever

Eine Kalibrierung der verwendeten Siliziumnitridsensoren über ihr thermisches Rauschen (siehe 3.2.2) wurde im Anschluss an die kraftspektroskopischen Messungen durchgeführt. Bei mehreren hundert im Laufe dieser Arbeit kalibrierten Sensoren erbrachte dies Federkonstanten von 8-22 pN/nm (Veeco) bzw. 18-26 pN/nm (Olympus). Der Fehler lässt sich bei dieser Methode auf 15% abschätzen. Dennoch zeigt die erhebliche Streuung der Werte gerade im Hinblick auf die Herstellerangaben, dass eine solche Kalibrierung unerlässlich ist.

### 4.1.3 Abbildungsparameter

Für die rasterkraftmikroskopischen Abbildungen der Protein-DNA-Komplexe wurde das AFM im Tapping Mode betrieben. Dabei diente das Amplitudensignal zur Aktivierung der Feedback-Schleife. Vor der Annäherung an die Probe wurden Scanbereich und Offset des AFM auf Null gesetzt sowie eine minimale Scangeschwindigkeit gewählt, um eine mögliche

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

Deformation der Probe oder eine Kontamination des Sensors zu vermeiden. Die während der eigentlichen Aufnahmen benutzten Scangeschwindigkeiten weisen dagegen eine annähernd lineare Abhängigkeit von den Scanbereichen auf. Sie variieren damit zwischen 0.8 Zeilen/s bei großem Scanbereich (10  $\mu\text{m}$ ) und 6 Zeilen/s bei kleinem Scanbereich (250 nm). Die meisten Messungen fanden in einem 1-2  $\mu\text{m}$  großen Bereich bei einer Geschwindigkeit von 1-2 Zeilen/s statt. Aufnahmen wurden stets mit 512 Punkten pro Zeile getätigt.

Der Cantilever wurde mit einer Amplitude von 0.2 Volt (entsprechend  $\sim 3$  nm) bei einer Frequenz um 28 kHz in Schwingung versetzt. Typische Einstellungen für die elektronischen Regler betragen 1.0 Integral und 2.0 Proportional. Diese Parameter und die Scangeschwindigkeit mussten von Fall zu Fall optimiert werden, um ein größtmögliches Signal-zu-Rauschen-Verhältnis zu erhalten und damit hochauflösende Messungen zu ermöglichen. Amplituden- und Phasensignal wurden simultan aufgenommen (mit den Signalen in Hin- und Rückrichtung), um zwischen Protein und DNA unterscheiden zu können [84].

#### 4.1.4 Aufbau und Messprogramm zur Kraftspektroskopie

Um die benötigte Anzahl von Kraft-Distanz-Kurven mit hinreichender Genauigkeit aufnehmen zu können, wurde das AFM mit einem Signal Access Module (Veeco Instruments, Santa Barbara, Kalifornien, USA) ausgestattet. Hierüber wurde das Photodetektor-Signal abgegriffen, durch einen Tiefpass ( $< 6$  kHz) gefiltert und nach einer Mittelung über jeweils 10-30 Datenpunkte (sog. Oversample) in den analogen Eingang einer AD/DA-Karte PCI-6052E (National Instruments, Austin, Texas, USA) eingespeist. Dies erlaubte eine maximale Abtastrate von 333 kHz bei 16 bit Auflösung. In den meisten Experimenten wurde jedoch im Hinblick auf eine einheitliche Auswertung die Anzahl der Datenpunkte festgehalten: Der typische experimentelle Datensatz bestand aus 2000-3000 Datenpunkten pro Kraft-Distanz-Kurve. Ein von Robert Ros geschriebenes Labview-Programm (ebenfalls National Instruments) las nicht nur die empfangenen Daten ein und sicherte diese in Binärdateien mit einem Ascii-Header, sondern übernahm auch die Steuerung der Bewegung in z-Richtung. Dazu wurde das vom analogen Ausgang der erwähnten Karte stammende Signal (maximal  $\pm 10$  V) zunächst über einen Hochspannungsverstärker Model 600H (maximal  $\pm 600$  V; NanoTechTools, Echandens, CH) um den Faktor 30 verstärkt, bevor es vom Signal Access Module auf den z-Piezo des AFM ( $\pm 220$  V) geleitet wurde.

#### 4.1.5 Auswertung der Kraft-Distanz-Kurven

Eine kraftspektroskopische Messung besteht aus Serien mit Tausenden von Kraft-Distanz-Kurven. Um diese einzulesen, die Abrisskräfte zu ermitteln und die Ergebnisse abzuspeichern, musste ein Auswerteprogramm erstellt werden. Das bereits gegen Ende der Diplom-Arbeit des Autors in der Matlab-Programmierungsumgebung (Version 6.5, von MathWorks, Natick, Massachusetts, USA) entwickelte Programm wurde im Verlaufe dieser Arbeit mehrfach erweitert, komfortabler gestaltet und verbessert. Die den Routinen zur Bestimmung der Abrisskräfte zugrunde liegenden Kriterien sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

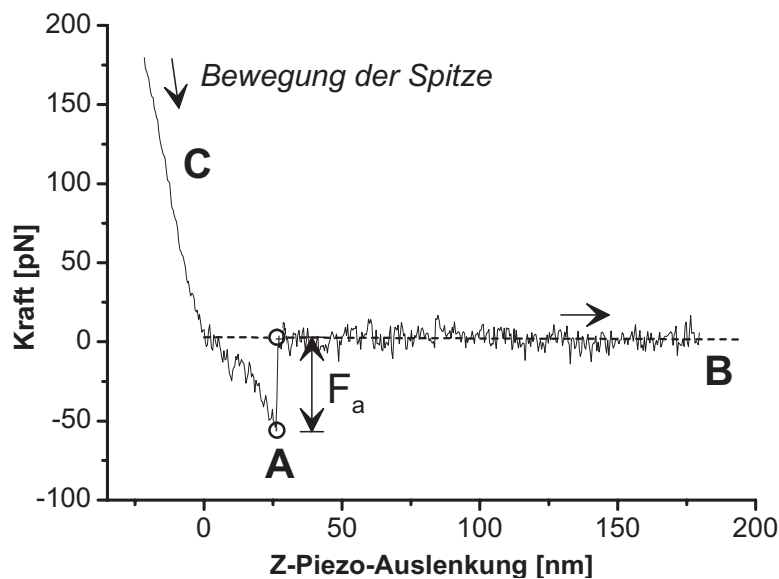


Abbildung 4.2: Eine typische Kraft-Distanz-Kurve<sup>ii</sup>  
 Die obige Kraft-Distanz-Kurve ist typisch für die Protein-DNA-Experimente. Sie weist eine ausgeprägte Basislinie (B) und eine Abrissstelle (A) auf, die alle an sie gerichteten Kriterien erfüllt. Im Kontaktbereich (C) lässt sich die Kurve kalibrieren.

Das Programm durchforstet eine vorliegende Kraft-Distanz-Kurve von ihrem Endpunkt her nach potentiellen Ereignissen. Dazu besteht eine mögliche Strategie [9] darin, die Differenz benachbarter Datenpunkte zu bilden und temporär zu speichern, sofern diese auf einen Abriss hindeutet ( $\Delta F_i = F_{i+1} - F_i > 0$ ). Nun kann man darauffolgende Differenzen  $\Delta F_{j=i+n}$  solange zu diesem Wert addieren, bis  $\Delta F_j \leq 0$  ist. Die Summe ist dann ein Kandidat für eine **Abrisskraft**  $F_a$ , sofern sie einen zuvor festgelegten Schwellenwert übersteigt [85]. Das hier verwendete Programm benutzt die soeben definierten positiven Differenzen nur als Indiz einer Kraftwirkung, ermittelt den in Frage kommenden Kraftwert allerdings als Differenz des Wertes an der Stelle  $j$  zu der durch lineare Regression bestimmten Basislinie (siehe Abbildung 4.2). Auf diese Weise wird der Einfluss des Rauschens auf die ermittelten Kraftwerte gegenüber der vorgenannten Methode abgemildert.

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

Nachdem der erste Kandidat angenommen oder verworfen wurde, durchsucht das Programm den Rest der Kurve in identischer Weise nach weiteren Abrissstellen. Je nach Kurvenform werden so genau ein Abriss, keine oder mehrere Abrisse detektiert. Im Falle von Mehrfachabrissen wird nur der Kraftwert des ersten<sup>iii</sup> Abrisses – also an der am weitesten von der Oberfläche entfernten Stelle – als Abrisskraft gewertet.

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

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

Ein letztes entscheidendes Kriterium ist die Form der Abrisskurve. In den Experimenten dieser Arbeit ist ein stetiges Spannen des verwendeten Polymer-Linkers zwischen AFM-Spitze und DNA (siehe Abschnitt 4.2.2) direkt vor dem eigentlichen Abriss zu erwarten, was sich in einer negativen Steigung und konkaven Krümmung der Kurve in diesem Bereich ausdrücken müsste [8,85]. Durch eine manuelle Selektion wurden nur Kurven mit einem derartigen Verhalten vor dem Abriss in die weitere Auswertung einbezogen.

Zu jedem Kraftwert speichert das Programm auch eine **Elastizitätskonstante  $c$** , die durch eine lineare Regression über die letzten 20 Datenpunkte vor dem Abrisspunkt bestimmt wird. Dieser Parameter beruht auf einer Kopplung der Federkonstanten des Cantilevers, der Elastizität des Polymerlinkers und des Ligand-Rezeptor-Komplexes und steht für die Elastizität des Gesamtsystems. Da reale Polymerlinker eine leicht unterschiedliche Länge aufweisen [72] (und keineswegs alle Ereignisse einer Kraft-Distanz-Serie von einem einzigen Ligand-Linker-System ausgehen), unterliegt auch die Gesamtelastizität einer gewissen Verteilung.

Um die Elastizitätskonstante korrekt zu bestimmen, müssen die Kraft-Distanz-Kurven jedoch zunächst eine Korrektur erfahren, welche die Auslenkung des Cantilevers bei wirkender Kraft berücksichtigt. Nur durch diesen Korrekturfaktor, der für weiche Cantilever besonders bedeutsam ist, kann von der Auslenkung des  $z$ -Piezos auf die molekularen Distanzen geschlossen werden (Abbildung 4.3). Generell sind die molekularen Ausdehnungen geringer und die wirklichen Elastizitätskonstanten damit höher als die unkorrigierten Größen.

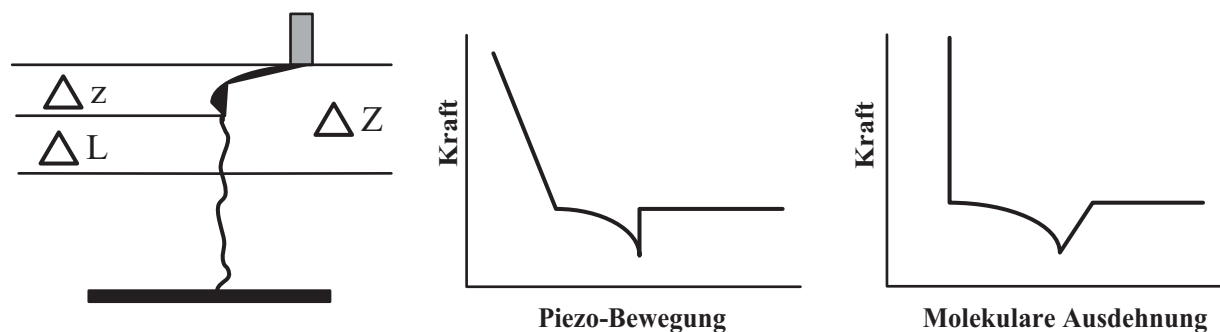


Abbildung 4.3: Zur Bestimmung der Elastizitätskonstanten

*Linke Graphik: Die Bewegung des piezokeramischen Scanners  $\Delta z$  bei der Kraftspektroskopie setzt sich zusammen aus der tatsächlichen Streckung des Moleküls  $\Delta L$  und der Strecke  $\Delta z_c$ , die von der Verbiegung des Cantilevers herrührt. Letztere folgt aus dem Hooke'schen Gesetz  $F = -k_L \Delta z_c$ . Damit ergibt sich:  $\Delta L = \Delta z - \Delta z_c = \Delta z + (F/k_L)$ . Die daraus resultierende Änderung der Kurvenform wird qualitativ durch die mittlere und die rechte Graphik veranschaulicht [86].*

Durch Multiplikation der (mittleren) Elastizitätskonstante  $c$  mit der Ziehgeschwindigkeit  $v$  ergibt sich die **Loading Rate  $r$** , d.h. die zeitliche Änderung der von außen am Komplex wirkenden Kraft. Eine Detailanalyse (Abbildung 4.4) zeigt, dass die mittlere Elastizitätskonstante  $c$  über einen großen Bereich von Ziehgeschwindigkeiten konstant bleibt ( $v = 100 \text{ nm/s}$  bis  $5000 \text{ nm/s}$ ) und die lineare Näherung im Bereich kurz vor dem Abrisspunkt valide ist (die Nichtlinearitäten der Polymerkurve können für die Bestimmung der Elastizität vernachlässigt werden, was die theoretische Beschreibung erleichtert).<sup>iv</sup>

<sup>iv</sup> Da der in diesen Experimenten verwendete PEG-Linker im Mittel nur aus 73 Monomeren besteht (was einer Gesamtlänge von etwa 27 nm entspricht), ist dies nicht weiter verwunderlich. Die Simulationen zu

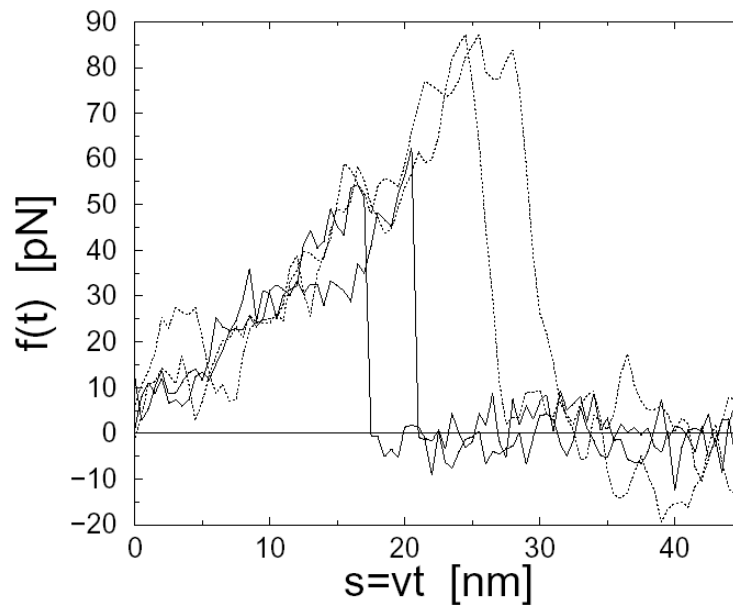


Abbildung 4.4: Quasi-Linearität der Kraft-Distanz-Charakteristik

Dargestellt sind Ausschnitte aus vier typischen Kraft-Distanz-Kurven mit je einem Protein-DNA-Dissoziationsereignis; zwei Kurven (durchgezogene Linie) bei  $v = 100 \text{ nm/s}$ , zwei andere (gepunktete Linie) bei  $v = 5000 \text{ nm/s}$ . Von Rauscheinflüssen abgesehen fallen alle Kraftkurven  $f(t)$  in Einklang mit (3.17) zu einer einzelnen Kraft-Distanz-Charakteristik  $F(s)$  zusammen [77,81].

## 4.2 Immobilisierung

Obwohl mehrere Alternativen zur Verfügung standen (z.B. eine Anbindung auf thiol-funktionalisierten Goldschichten), haben sich bei den Experimenten Glimmer und Glas als Substrate bewährt. Die allermeisten Messungen wurden auf etwa  $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$  großen Glimmerscheiben (Mica; Provac AG, Florida, USA) durchgeführt, die entweder frisch mit Tesafilm abgezogen und sofort verwendet oder zunächst noch im Exsiccator mit 3-Aminopropyl-triethoxysilan (APTES; Sigma, Seelze, D) funktionalisiert wurden (Abbildung 3.4a). Die Funktionalisierung der Glasscheibchen (Menzel-Gläser, Braunschweig, D) geschah analog, wobei der frisch abgezogene Glimmer durch gerade gereinigtes Glas<sup>v</sup> zu ersetzen ist. Die folgenden Abschnitte beschreiben die Herstellung der Proben für die Rasterkraftmikroskopie mit Hilfe dieser Substrate sowie die Präparation von Proben und AFM-Spitzen für die Kraftspektroskopie.

### 4.2.1 Abbildungen

Die rasterkraftmikroskopisch untersuchte DNA war die *expG*-Promotorregion aus dem Plasmid pSymB von *Sinorhizobium meliloti*. Diese wurde von Birgit Baumgarth (Lehrstuhl für Genetik, Universität Bielefeld) aus einem PCR-Produkt aufgereinigt und freundlicherweise

den nichtlinearen Effekten des Linkers in [72] wurden für durchschnittlich 150 Monomere durchgeführt, die Experimente in [72,82,87] mit vielen hundert oder sogar mehreren tausend Monomeren.

<sup>v</sup> Hierfür werden die Glasplättchen in Aceton gegeben und 5 min lang einem Ultraschallbad ausgesetzt, danach mit Millipore-Wasser abgespült, in Ethanol gegeben und wiederum für 5 min einem Ultraschallbad ausgesetzt; nach erneutem Abwaschen werden sie noch 2 min lang in einem UV-Cleaner bestrahlt.



zur Verfügung gestellt. Die 158 bp lange Binderegion wurde dabei um ein nichtbindendes Fragment von 990 bp Länge verlängert (was einer Gesamtlänge von etwa 390 nm entspricht).

Für die Abbildungen wurde zunächst eine schwach konzentrierte DNA-Lösung (0.2 ng/ $\mu$ l) mit dem ExpG-Protein (0.2 ng/ $\mu$ l) in Pufferlösung (50 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl, 4 mM NiCl<sub>2</sub>) vermischt. Nach 5 min Inkubationszeit wurde das Gemisch auf eine frisch abgezogene Glimmeroberfläche gegeben, die dann sogleich unter der Flüssigmesszelle des AFM installiert wurde. Die Messungen begannen nach etwa 15 Minuten, die für eine thermische Equilibrierung des Systems und das Heranfahren des Sensors an die Probe benötigt wurden.

Die Konzentration der Ni<sup>2+</sup>-Gegenionen wurde dabei optimiert, um eine flexible Immobilisierung der DNA-Moleküle an die Oberfläche zu ermöglichen [88]. Dies war möglich, da zweiwertige Kationen die zu untersuchende Bindung nicht behindern [89].

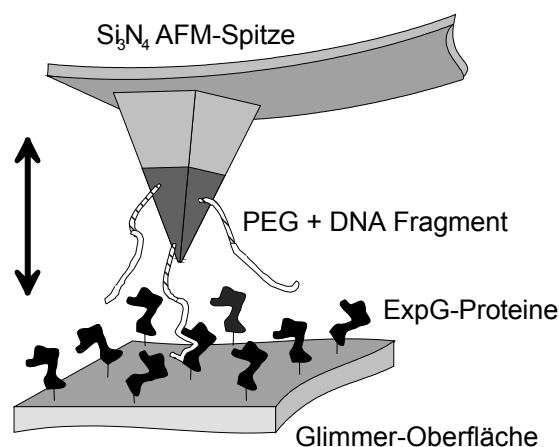


Abbildung 4.5: Immobilisierung für die Kraftspektroskopie

*Die DNA-Fragmente wurden über einen PEG-Spacer kovalent an die AFM-Spitze gebunden, die Proteine dagegen an eine flache Glimmer-Oberfläche [28].*

## 4.2.2 Kraftspektroskopie

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

### *Immobilisierung der DNA-Fragmente an der AFM-Spitze*

Die DNA-Fragmente (mit einer Länge von 158-326 bp) wurden über einen entsprechend modifizierten Primer in der PCR mit einer Thiolgruppe (SH) versehen, welche zur Anbindung an den AFM-Sensor diente. Die zu funktionalisierenden Siliziumnitrid-Sensoren wurden zunächst für wenige Sekunden in Salpetersäure (65 %; Riedel-deHaën, Seelze, D) getaucht und dann zwecks Silanisierung [11] zwei Stunden lang in einer Lösung aus 2% APTES (Sigma, Seelze, D) in trockenem Toluol (Fluka, Seelze, D) aufbewahrt. Danach wurden sie mit Toluol abgespült und für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Crosslinker N-hydroxysuccinimid-poly(ethylenglycol)-maleimid (NHS-PEG-MAL, MW 3.400 Da; Nektar, Huntsville, Alabama, USA) in einem Phosphatpuffer (1 mM NHS-PEG-MAL in 0.1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0) inkubiert. Nach Abspülen mit dem Phosphatpuffer

wurden jede Spitze in 20  $\mu\text{l}$  der zuvor präparierten DNA-Lösung (etwa 10  $\text{ng}/\mu\text{l}$  SH-DNA) getaucht und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden sie dann mit dem Bindepuffer (für ExpG: 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.1 mM NiCl<sub>2</sub>, pH 8.3; für ExpR: 100 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5) abgewaschen. Die solcherart funktionalisierten Sensoren konnten ohne Aktivitätsverlust mindestens eine Woche lang in diesem Puffer bei 4 °C gelagert werden.

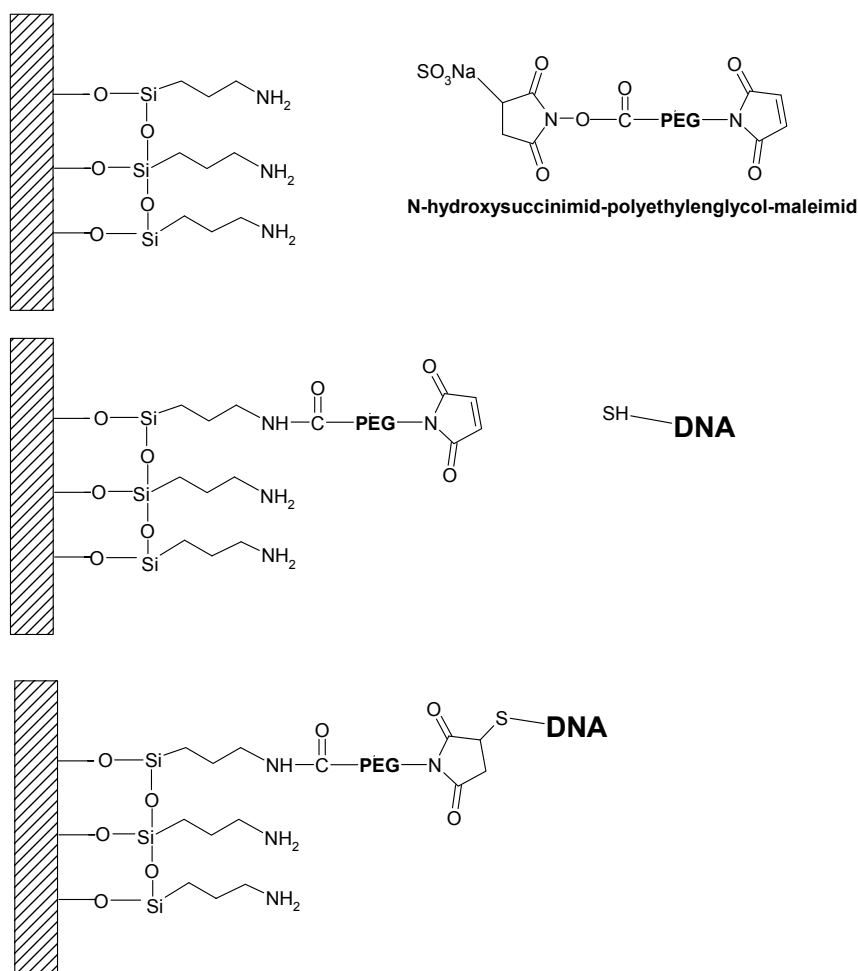


Abbildung 4.6: Funktionalisierung der AFM-Spitze mit DNA

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

### ***Immobilisierung der Proteine auf dem Substrat***

Die Proteine ExpG und ExpR wurden am Lehrstuhl für Genetik gewonnen und aufgereinigt. Die Expression rekombinanter (His)<sub>6</sub>ExpG-Fusionsproteine bzw. Exp(His)<sub>6</sub>-Fusionsproteine in *E.coli* wurde von Birgit Baumgarth wie in [90,91] beschrieben durchgeführt. (His)<sub>6</sub>ExpR wurde von Matthew McIntosh in M15 (QIAGEN) überexprimiert und entsprechend dem QIAexpressionist™ Handbook gereinigt [39]. ExpG (MW 23.2 kDa) enthält fünf Lysine, ExpR (MW 28 kDa) dagegen elf, an welche der entsprechend ausgewählte Linker binden sollte. Da die Lysine räumlich weitverteilt sind,

war dies keine gezielte Immobilisation in Bezug auf den Angriffspunkt, hielt allerdings die Anzahl der Moleküle gering, bei denen durch die Anbindung die fragliche Bindungstasche blockiert sein dürfte. Für die Anbindung des Crosslinkers war eine amingruppen-freie Umgebung essentiell; daher wurde das Protein vermittels einer Mini-Dialyse-Einheit (Slyde-A-Lyzer mit Cut-off bei 3.5 kDa MW; Pierce, Rockford, Illinois, USA) über Nacht bei 4 °C aus seinem Lagerungspuffer in einen Phosphatpuffer (0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.5) umgepuffert. Der Crosslinker bis(Sulfosuccinimidyl)suberat-Natriumsalz ( $\text{BS}^3$ ; Sigma, Seelze, D) wurde dann jeweils im Verhältnis 5:1 mit dem gewünschten Protein in einem Phosphatpuffer gemischt (15-75  $\mu\text{M}$   $\text{BS}^3$ , 3-15  $\mu\text{M}$  Protein in 0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.5) und unverzüglich auf APTES-funktionalisierten Glimmer (25  $\mu\text{l}$  pro Probe) aufgebracht. Die Inkubationszeit bei 4 °C betrug eine Stunde. Danach wurden die Proben mit dem Bindepuffer (für ExpG: 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.1 mM  $\text{NiCl}_2$ , pH 8.3; für ExpR: 100 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.5) abgewaschen. Sie konnten in diesem Puffer bei 4 °C mindestens zwei Tage ohne Aktivitätsverlust gelagert werden.

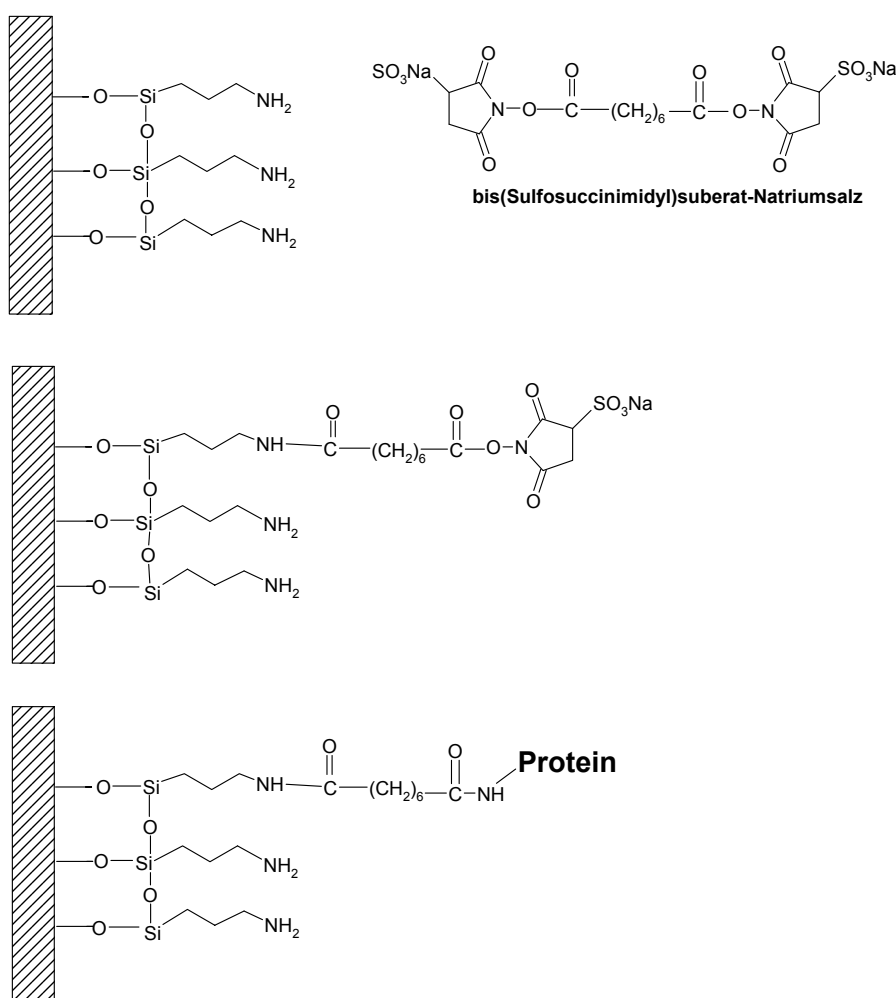


Abbildung 4.7: Funktionalisierung der Oberfläche mit Protein

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

### ***Zugabe von Effektoren***

Für die Experimente mit dem ExpR-Protein waren Acyl-Homoserin-Lactone (AHL) als Effektor-Moleküle entscheidend (siehe Abbildung 2.6). Die sieben getesteten AHLs wurden entweder (C<sub>8</sub>-HL, C<sub>12</sub>-HL, oxo-C<sub>14</sub>-HL, C<sub>16:1</sub>-HL C<sub>18</sub>-HL) von Patrik Plattner in der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld (Lehrstuhl Prof. Dr. Norbert Sewald) synthetisiert [39] oder käuflich erworben (C<sub>7</sub>-HL, C<sub>10</sub>-HL; Sigma, Seelze, D). Im Folgenden werden nur diese in der Literatur üblichen Kürzel verwendet; die entsprechenden vollständigen Bezeichnungen sind in Tabelle 4.2 gelistet. Im AFM-Experiment wurde der Effektor jeweils in den Bindepuffer des wie oben beschrieben präparierten Systems zwischen Spitze und Oberfläche hinzugegeben, so dass die Endkonzentration des verwendeten AHL 10 µM betrug.

<b>Kurzbezeichnung</b>	<b>voller Name</b>
C <sub>7</sub> -HL	<i>N</i> -Heptanoyl-L-Homoserinlacton
C <sub>8</sub> -HL	<i>N</i> -Octanoyl-L-Homoserinlacton
C <sub>10</sub> -HL	<i>N</i> -Decanoyl-L-Homoserinlacton
C <sub>12</sub> -HL	<i>N</i> -Dodecanoyl-L-Homoserinlacton
oxo-C <sub>14</sub> -HL	<i>N</i> -(3-Oxotetradecanoyl)-L-Homoserinlacton
C <sub>16:1</sub> -HL	<i>N</i> -[(9 <i>Z</i> )-hexadec-9-enoyl]-L-Homoserinlacton
C <sub>18</sub> -HL	<i>N</i> -Octadecanoyl-L-Homoserinlacton

Tabelle 4.2: Liste der verwendeten AHLs und ihrer Kürzel

## Kapitel 5

# Experimente und Resultate

## 5.1 ExpG-DNA

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die spezifische Bindung des regulatorischen Proteins ExpG an verschiedene DNA-Segmente aus der *exp*-Genregion (dem Galactoglucan-Biosynthese-Gencluster) von *Sinorhizobium meliloti* mittels Rasterkraftmikroskopie und Kraftspektroskopie untersucht.

In molekularbiologischen Studien, die parallel zu dieser Arbeit von Birgit Baumgarth am Lehrstuhl für Genetik der Universität Bielefeld durchgeführt wurden, konnten **drei verschiedene Bindestellen** für ExpG in der *exp*-Genregion ausgemacht werden [28,91]: die Promotorregionen *expA1*, *expE1* und *expG/expD1* (Abbildung 5.1A). Über EMSA-Experimente (siehe Kapitel 2.1.5), bei denen unmarkierte (nicht spezifische) DNA-Fragmente als Kompetitor eingesetzt wurden, wurde in allen drei Fällen die Spezifität der Protein-DNA-Bindung gezeigt [28].

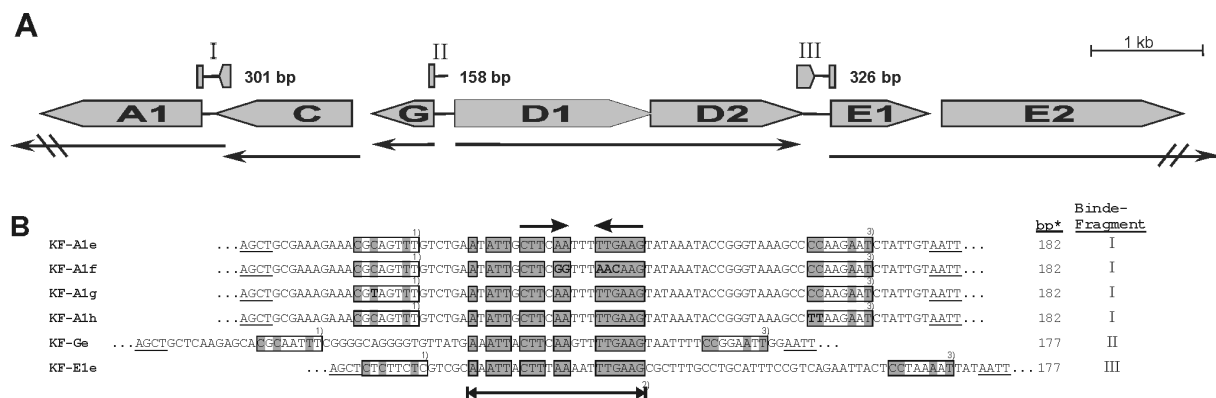


Abbildung 5.1: Ausschnitt aus der *exp*-Genregion

(A) Gezeigt ist die *exp*-Genregion aus *S. meliloti* 2011 von *expA1* bis *expE2*. Transkriptionseinheiten sind mit Pfeilen gekennzeichnet.  
 (B) Vergleich der konservierten Bereiche der DNA-Sequenzen; identische Basen umrahmt und schattiert. <sup>1</sup>) Box 1, <sup>2</sup>) palindromische Kernregion, <sup>3</sup>) Box 2, \* Länge der DNA-Fragmente für die Untersuchungen in Abschnitt 5.1.4. Die gezielten Mutationen in den Fragmenten KF-A1f-b sind **fett** gedruckt. [78]

Ein Vergleich der entsprechenden DNA-Sequenzen zeigt konservierte Bereiche auf (Abbildung 5.1B): eine palindromische Sequenz von 21 bp Länge (hier als **Kernregion** bezeichnet) und zwei weitere Bereiche (**Box 1** und **Box 2** genannt). Die Bedeutung dieser Sequenzähnlichkeit wurde durch EMSA-Experimente mit originären und mutierten DNA-Fragmenten<sup>i</sup> untersucht, bei denen jeweils etwa ein Drittel der Basen eines bestimmten Teilbereichs ausgetauscht worden war [78]. Dabei ergab sich einerseits, dass eine intakte (nicht-mutierte) Kernregion notwendig für das Zustandekommen der ExpG-DNA-Bindung ist, jedoch nicht hinreichend. Andererseits konnte für die beiden Boxen kein

<sup>i</sup> In Abbildung 5.1B sind aus Gründen der Übersicht nur diejenigen gezeigt, die auch in den AFM-Studien Verwendung fanden (siehe Kapitel 5.1.4).

vergleichbarer Einfluss festgestellt werden: Ein DNA-Fragment, in dem nur entweder Box 1 oder Box 2 mutiert war, erfüllte im EMSA immer noch seine Funktion. Auch wenn das Bindemotiv anscheinend korrekt erkannt wurde, ließ sich die Rolle der einzelnen Komponenten nur aus den über molekularbiologische Methoden am Ensemble gewonnenen Daten nicht eindeutig erschließen.

Bemerkenswerterweise variiert der Abstand der Kernregion zu den Boxen in den drei Promotorregionen:

*expA1*: ... (Box 1) + 6 bp + (Kernregion) + 20 bp + (Box 2) ...

*expG*: ... (Box 1) + 18 bp + (Kernregion) + 7 bp + (Box 2) ...

*expE1*: ... (Box 1) + 5 bp + (Kernregion) + 30 bp + (Box 2) ...

Natürlich differieren die Zwischenstücke nicht nur in ihrer Länge, sondern auch in ihrer Sequenz; zudem sind die beiden Boxen nicht streng konserviert. Obwohl ein und dasselbe Protein alle drei Sequenzen spezifisch erkennt, sind also (minimale) Unterschiede in der Struktur des gebundenen Protein-DNA-Komplexes zu erwarten.

ExpG, ein Protein von 23.2 kDa Molekulargewicht, bindet vermutlich als Dimer mittels eines HTH-Motivs an seine Zielsequenz [78]. Es wurde in dieser Arbeit entweder als Fusionsprotein (His)<sub>6</sub>ExpG mit einem N-terminalen Histidin-Tag oder aber als Fusionsprotein ExpG(His)<sub>6</sub> mit einem C-terminalen Histidin-Tag untersucht. In EMSA-Studien wurde jedoch gezeigt, dass der Histidin-Teil die Bindung nicht beeinträchtigt [78,91].

### 5.1.1 Rasterkraftmikroskopische Studien

Die rasterkraftmikroskopische Untersuchung von Protein-DNA-Wechselwirkungen stellt hohe Anforderungen an die Immobilisierung der Moleküle und die Reinheit der Proben. Diese beiden Faktoren bestimmen zusammen mit der Geometrie des AFM-Sensors die Auflösung. Dabei besitzt die Immobilisierung einen besonderen Stellenwert: Nur eine feste, aber auch hinreichend flexible Anbindung der Biomoleküle auf dem Substrat gewährt überhaupt die Möglichkeit, den gewünschten dynamischen Prozess, die Wechselwirkung der Bindepartner nämlich, zu beobachten.

Das hier untersuchte DNA-Fragment mit einer Gesamtlänge von etwa 390 nm auf den 158 bp der *expG*-Promotorregion, die an einem Ende um eine nichtbindende Sequenz von 990 bp verlängert wurde. Durch die Verlängerung erhielt das Molekül eine Orientierung: Spezifisch gebundene Proteine waren nur an einem Ende der DNA zu erwarten.

Die DNA (Konzentration 0.2 ng/μl) und das ExpG(His)<sub>6</sub>-Protein (Konzentration 0.2 ng/μl) wurden zunächst in einer Pufferlösung (50 mM TRIS, 25 mM NaCl, 4 mM NiCl<sub>2</sub>, pH 8.3) vermischt<sup>ii</sup> und dann zusammen auf eine Glimmer-Oberfläche gebracht. Die Konzentration der Ni<sup>2+</sup>-Gegenionen wurde dabei über eine Folge von Experimenten optimiert, um eine flexible Immobilisierung der DNA an das Substrat über elektrostatische Attraktion zu gewährleisten. Alle Aufnahmen wurden im Tapping-Mode durchgeführt, um eine schonende Abtastung der fragilen Komplexe zu erreichen.

Eine gleichzeitige Aufnahme des Phasensignals erlaubt es, zusätzlich zur topographischen Beschaffenheit der Oberfläche Materialunterschiede zu erkennen: Wie Lysetska *et al.* zuerst beobachtet haben [84], weist das Protein eine negative Phasenverschiebung auf (d.h. es erscheint dunkler im Phasenbild), während die DNA eine positive Phasenverschiebung zeigt (d.h. sie erscheint heller).

---

<sup>ii</sup> Dies entspricht schlussendlich einem Verhältnis Proteine : DNA von etwa 30 : 1. Allerdings ist es nicht möglich, etwas über den Anteil *aktiver* Proteine auszusagen.

Tatsächlich wurden gebundene ExpG(His)<sub>6</sub>-Proteine nur an einem Ende eines gegebenen DNA-Fragments beobachtet, was die Bindung des Proteins an die Promotorregion bestätigt (Abbildung 5.2a und 5.2b). Zudem war im AFM eine Konformationsänderung der DNA während des Dissoziationsprozesses zu beobachten, bei der sich die Krümmung der Promotorregion änderte (Abbildung 5.2c und 5.2d). Obwohl der umgekehrte Prozess nicht beobachtet wurde (die Wahrscheinlichkeit, einen Assoziationsvorgang zu detektieren, ist zu gering), kann man davon ausgehen, dass die DNA ihre charakteristische Krümmung durch die Bildung des Protein-DNA-Komplexes erhält. Ein derartiger Einfluss auf die räumliche Anordnung der DNA ist bei einem positiven Regulator durchaus zu erwarten (siehe Kapitel 2.1.3).

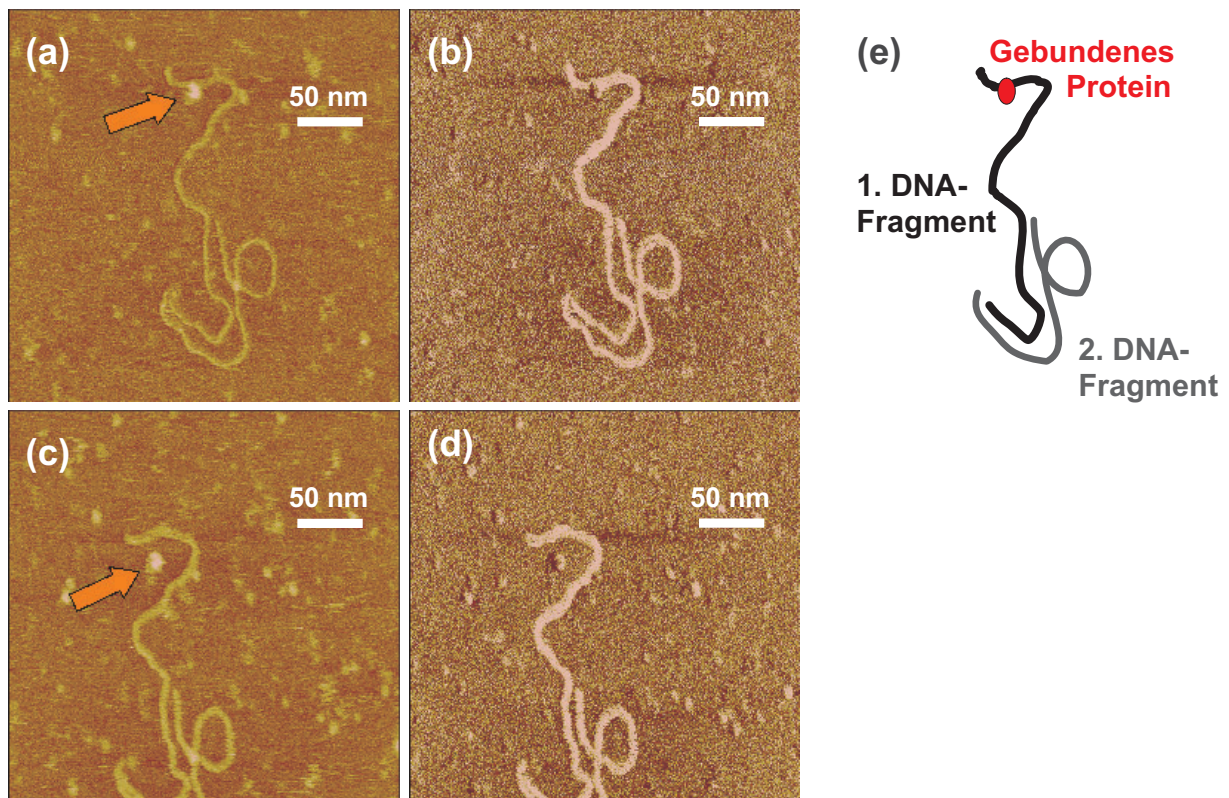


Abbildung 5.2: AFM-Aufnahmen von Protein-DNA-Komplexen

Die Abbildungen auf der linken Seite zeigen die Topographie (Höhenskala 3.5 nm), in der Mitte ist die dazugehörige Phaseninformation dargestellt (Skala 8.0°). Höhen- und Phasensignal wurden simultan aufgenommen, um Protein von DNA zu unterscheiden (siehe Text). Bilder (a) und (b) zeigen zwei DNA-Fragmente, die sich wahrscheinlich durch die Gegenionen der Lösung gegenseitig stabilisieren. Eines der beiden trägt ein gebundenes Protein (Pfeil). Wenn das Protein dissoziiert (Zeit zwischen den Aufnahmen: 9 min), ändert sich die Krümmung der Bindestelle auf der DNA (c und d). Zur Verdeutlichung sind der gebundene Zustand und die Lage der beiden DNA-Moleküle in (e) skizziert. Alle Aufnahmen sind in Pufferlösung (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.1 mM NiCl<sub>2</sub>, pH 8.3) entstanden.

Der Erfolg dieser Untersuchungen hing in hohem Maße von den Konzentrationen der Biomoleküle in der Flüssigmesszelle ab. Da die Konzentrationsangaben der Proben durch das Aufreinigungsverfahren mit einem beträchtlichen Fehler behaftet waren, erforderte es stets eine Reihe von Experimenten, um das richtige Maß zu finden.

Die Anzahl an hochauflösenden AFM-Aufnahmen blieb daher zu gering, um die Bindestelle mit befriedigender Genauigkeit zu lokalisieren (vergleiche [92]). Immerhin wurde die Konformationsänderung bei acht verschiedenen DNA-Fragmenten und entsprechenden Protein-Bindepartnern verlässlich beobachtet. Die Krümmung an der Protein-Bindestelle ist außerdem über längere Zeiträume stabil (15-30 Minuten; dies ist die Größenordnung der kraftspektroskopisch bestimmten Lebensdauer des Komplexes, siehe 5.1.3), während andere Teile desselben DNA-Doppelstranges kleine Bewegungen von Aufnahme zu Aufnahme zeigen (bei einer Aufnahmedauer von 2-5 min, je nach Scanrate). An anderen Stellen der DNA oder ohne Strukturveränderung gebundene Proteine wurden nicht beobachtet.

### 5.1.2 Verifikation einer spezifischen Bindung

Die kraftspektroskopischen Experimente wurden grundsätzlich in Pufferlösung durchgeführt (im Fall ExpG: 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.1 mM NiCl<sub>2</sub>, pH 8.3). Ihnen allen lag folgender Aufbau zugrunde:

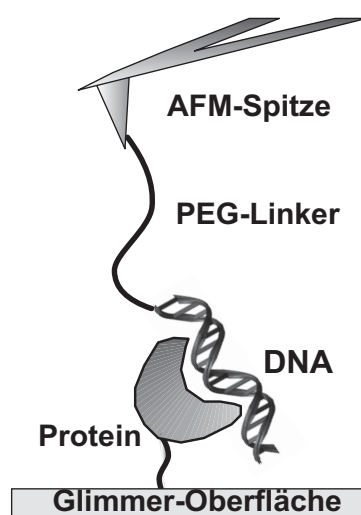


Abbildung 5.3: Schematischer Aufbau der Kraftspektroskopie-Experimente

Über kovalente Chemie wurde das Protein an das Substrat gebunden, die DNA dagegen an den AFM-Sensor. Dies geschah in beiden Fällen über flexible Polymer-Spacer, die den Biomolekülen hinreichende Bewegungsfreiheit zum Eingehen einer Bindung gestatteten. Die DNA-Fragmente wurden an einem Ende mit einer Thiolgruppe modifiziert, das eine gezielte und gerichtete Anbindung des Spacers ermöglichte. Auf der Proteinseite dagegen wurde ein kurzer Spacer ausgewählt, der an die Aminoruppe eines der fünf Lysine von ExpG binden sollte (für Einzelheiten siehe Kapitel 4.2.2). Der Angriffspunkt war also nicht eindeutig definiert; jedoch ließ die weite Verteilung der Lysine über die Primärstruktur des Proteins erwarten, dass immer ein signifikanter Anteil der Moleküle derart immobilisiert sein würde, dass die DNA-Bindedomäne im Experiment für das DNA-Fragment zugänglich wäre.

Tatsächlich wiesen durchschnittlich 15% aller gemessenen Kraft-Distanz-Kurven einer Serie ein eindeutiges Dissoziationsereignis des ExpG-DNA-Komplexes auf (Abbildung 5.4; zur Auswertung der Kraft-Distanz-Kurven siehe Kapitel 4.1.5). Dies wurde durch eine Messung des unspezifischen Untergrundsignals verifiziert: Dabei wurde die AFM-Spitze mit DNA funktionalisiert, die Oberfläche allerdings nur mit dem Linker, nicht aber mit



dem Protein dekoriert. Bei dieser Anordnung konnten keine Dissoziationsereignisse beobachtet werden. Ein wenig anders verhielt es sich im Falle eines zweiten Kontrolllexperiments: Dabei wurde die Oberfläche normal mit dem (His)<sub>6</sub>ExpG-Protein präpariert, an die Spitze jedoch EBNA-DNA aus *E.coli* immobilisiert, so dass höchstens unspezifische Bindungen zu erwarten waren. Es wurden Dissoziationsereignisse beobachtet, jedoch nur selten (< 1.5%) und durchweg mit Dissoziationskräften > 100 pN.

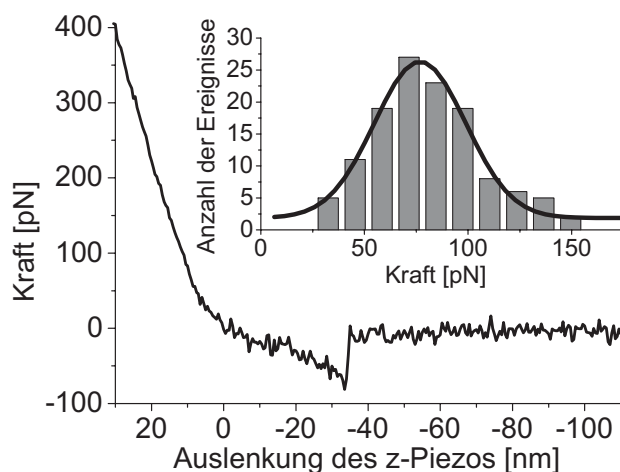


Abbildung 5.4: Typische Kraft-Distanz-Kurve und Kräfteverteilung

*Die Dissoziationskräfte bei einer bestimmten Ziehgeschwindigkeit (hier:  $v = 500 \text{ nm/s}$ ) unterliegen einer Verteilung, deren wahrscheinlichster Wert in erster Näherung durch den Fit mit einer Gaus-Verteilung bestimmt werden kann. Die statistischen Fehler werden dann durch die Standardabweichung des Mittelwerts gegeben ( $2\sigma/N^{1/2}$  für eine 95.4%ige Konfidenz). Zur Form der Kraft-Distanz-Kurve und zur Bestimmung der Dissoziationskräfte siehe Abbildung 4.2.*

### **Einzelereignisse**

Gehören die gemessenen Dissoziationskräfte nicht vielleicht zu mehreren dissoziierenden Komplexen? Dies ist eine gerne gestellte, durchaus berechtigte Frage. Sicher ist es denkbar, dass mehrere DNA-Moleküle während eines Messzyklus an jeweils ein Protein auf der Oberfläche binden und die so gebildeten Komplexe gleichzeitig dissoziieren, allerdings ist die Wahrscheinlichkeit dafür sehr gering.

Die Konzentrationen der Biomoleküle während der Präparation wurden mit Bedacht ausgewählt, um die Anzahl der wechselwirkenden Moleküle gering zu halten.<sup>iii</sup> Nur die DNA-Fragmente am äußersten Ende der AFM-Spitze haben überhaupt Gelegenheit, mit dem Protein auf der Oberfläche zu interagieren. Basierend auf der Geometrie der Spitze, Oberflächenbedeckungen (für die Aminosilanschicht und den Polymerlinker, siehe [93]) und der Länge des DNA-Fragments kann man die Anzahl „reaktiver“ DNA-Fragmente in den vorliegenden Experimenten auf etwa ein Dutzend abschätzen. Im zugehörigen „Reaktionsvolumen“, das von diesen DNA-Molekülen aufgespannt wird, befindet sich typischerweise ein einziges zugängliches Protein auf dem Substrat (vgl. Abbildung 5.5).

<sup>iii</sup> Dies ist natürlich ein Spagat: Für die Experimente ist eine hinreichende Bindewahrscheinlichkeit ebenso essentiell. Das experimentelle Geschick besteht darin, einen geeigneten Mittelweg zu finden.

Dieses Zahlenverhältnis spiegelt sich in der beobachteten Ereigniswahrscheinlichkeit von 15% wieder.

Multiple Bindungen sind noch unwahrscheinlicher. Sie können jedoch tatsächlich im Experiment beobachtet werden, und zwar als mehrere Kraftpeaks gleicher Höhe zu verschiedenen Abständen von der Oberfläche. Da die DNA-Moleküle an verschiedenen Stellen auf der Spitze gebunden sind, reißen die entsprechenden Komplexe beim Zurückziehen des Sensors nacheinander. Zweifach- und sogar Dreifachbindungen wurden auf diese Weise identifiziert, allerdings in weniger als 1% der gemessenen Kraft-Distanz-Kurven [94]. In diesem Fall wurde stets nur der letzte Kraftauschlag in die Auswertung einbezogen, also wiederum nur ein Einzelereignis. Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei DNA-Moleküle zwei Proteine so binden können, dass die Komplexe zum selben Zeitpunkt dissoziieren, ist verschwindend gering.

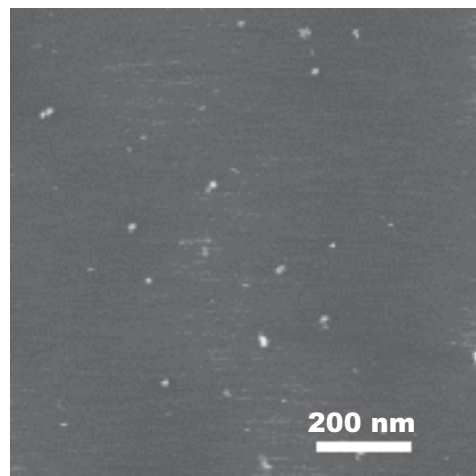


Abbildung 5.5: Immobilisierte ExpG-Proteine

*Diese AFM-Aufnahme an Luft zeigt eine Glimmeroberfläche, die für die Kraftspektroskopie funktionalisiert wurde (Höbenskala: 3 nm). Typischerweise sind 20-25 Proteine pro  $\mu\text{m}^2$  auf der Oberfläche zu finden.*

### ***Spezifität der Bindung***

Nur aus der Messung an einem Ligand-Rezeptor-System heraus kann nichts über die Spezifität der Bindung ausgesagt werden. Zu diesem Zweck haben sich in der Molekularbiologie Konkurrenzexperimente mittels EMSA etabliert, bei denen einer der beiden Bindungspartner als freies (unmarkiertes) Molekül im Überschuss dazugegeben wird. Bei den primär detektierten Molekülen wird dann ein Rückgang der Bindewahrscheinlichkeit zu beobachten sein, da die freien Moleküle Bindestellen besetzen und somit blockieren.

Diese Methode wurde auch in den kraftspektroskopischen Untersuchungen angewandt. Dabei wurde in der Regel – wie in den EMSA-Experimenten – freie DNA als Kompetitor eingesetzt (Abbildung 5.6A-C). Zunächst wurde die Verteilung der Dissoziationskräfte für das Protein-DNA-System unter Standardbedingungen gemessen (5.6A). Dann wurden freie DNA-Fragmente in einem Überschuss von ungefähr 60:1 bezogen auf die Proteine an der Oberfläche zugegeben. Dies führte zu einer deutlichen Reduktion der

Bindewahrscheinlichkeit bei allen drei DNA-Zielsequenzen<sup>iv</sup> (5.6B, gezeigt für die *expA1*-Promotorregion). Schließlich wurden AFM-Spitze und Oberfläche mit Pufferlösung gewaschen, zudem die AFM-Flüssigmesszelle gereinigt, bevor eine dritte Kräfteverteilung aufgenommen wurde, diesmal wieder in der ursprünglichen, kompetitorfreien Pufferlösung. Das System konnte dabei beinahe zu seiner vollen Bindewahrscheinlichkeit reaktiviert werden (5.6C).

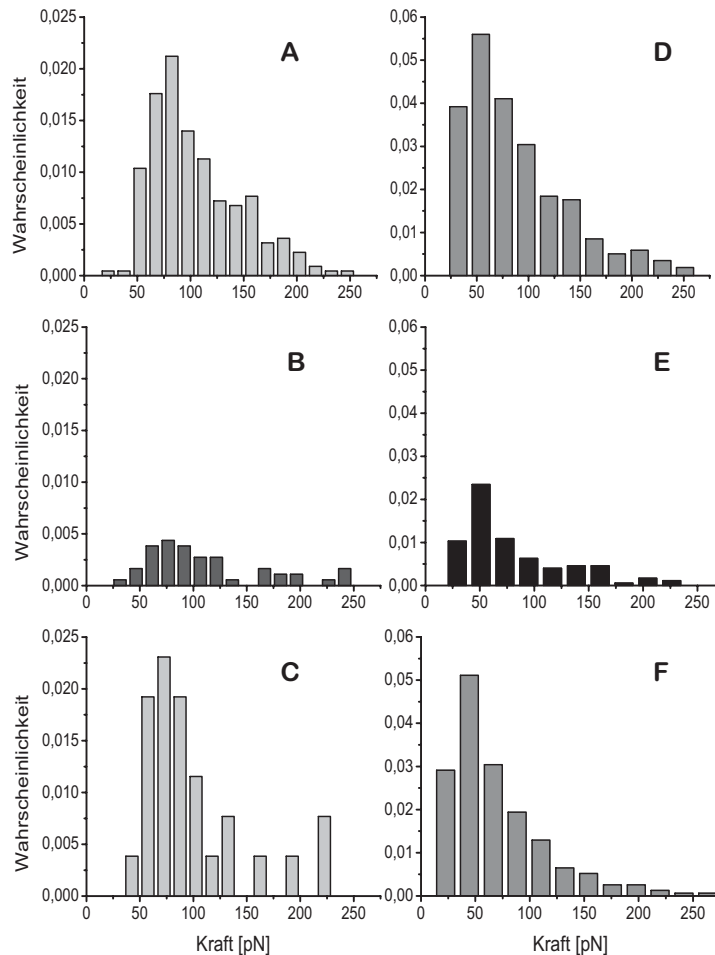


Abbildung 5.6: Einzelmolekül-Kompetitionsexperimente

*Kraftspektroskopie unter wechselnden Pufferbedingungen weist die Spezifität der Bindung nach. (A-C) In dieser Serie war ein DNA-Fragment mit der *expA1*-Promotorregion an die AFM-Spitze gebunden. Freie DNA-Fragmente wurden im Überschuss zugegeben (B). Durch einen Pufferaustausch zurück zur ursprünglichen, kompetitorfreien Lösung konnte das System nach 20 min reaktiviert werden (C). (D-F) In dieser Serie war ein DNA-Fragment mit der *expG*-Promotorregion an die Spitze gebunden. Hier wurden freie  $(His)_6ExpG$ -Proteine zugegeben (E). Durch Pufferaustausch konnte das System nach 85 min reaktiviert werden (F). Probe und Spitze wurden während einer Serie nicht ausgetauscht.*

<sup>iv</sup> Dabei wurden dieselben DNA-Fragmente wie im nächsten Abschnitt verwendet: *expA1/A4* (301 bp), *expG1/G4* (158 bp) und *expE1/E5* (326 bp) [28]. Zur Bezeichnung der Fragmente siehe Abbildung 5.1A.

In einem Experiment mit der *expG/expD1*-Sequenz wurden freie (His)<sub>6</sub>ExpG-Proteine als alternativer Kompetitor zugegeben (5.6D-F). Schon bei einem Verhältnis von 1:1 bezogen auf die DNA-Bedeckung der AFM-Spitze (die wie oben angegeben abgeschätzt wurde) konnte eine deutliche Verminderung der Bindewahrscheinlichkeit beobachtet werden (5.6E). Auch hierbei konnte das System durch eine Rückkehr zur ursprünglichen Pufferlösung reaktiviert werden (5.6F).

Der ausgeprägte Einfluss der freien Kompetitoren und die Möglichkeit, das System zu reaktivieren, sowie die Tatsache, dass alternativ DNA oder Protein zur Kompetition verwendet werden konnten, zeigen klar, dass die beobachtete Protein-DNA-Interaktion spezifisch ist.

### 5.1.3 Bindung an verschiedene Promotorregionen

Nachdem gezeigt worden war, dass ExpG spezifisch an jede der drei Promotorregionen bindet, wurden die drei verschiedenen Protein-DNA-Komplexe mittels dynamischer Kraftspektroskopie (DFS) genauer untersucht. Dabei wurden Kraftverteilungen bei unterschiedlichen Ziehgeschwindigkeiten bestimmt. Auf diese Weise wurde die Zeitabhängigkeit der äußeren Kraft gezielt variiert, die Loading Rate = Ziehgeschwindigkeit × Gesamtelastizität (siehe Kapitel 3.5.2). Für jede der DNA-Zielsequenzen, die auf Fragmenten von 301 bp (*expA1*), 158 bp (*expG*) bzw. 326 bp Länge (*expE1*) vorlagen<sup>v</sup>, wurden typischerweise 150-300 Dissoziationsereignisse (aus jeweils 1000-2000 Messzyklen) pro Ziehgeschwindigkeit aufgenommen, bei 7-9 verschiedenen Ziehgeschwindigkeiten zwischen 10 nm/s und 8000 nm/s. Dies resultierte in Loading Raten von 70-79000 pN/s. Die Annäherungsgeschwindigkeit wurde konstant bei 1000 nm/s gehalten.

Die Ergebnisse für die drei DNA-Zielsequenzen sind in Abbildung 5.7 dargestellt. Werden die wahrscheinlichsten Kraftwerte gegen die Logarithmen der zugehörigen Loading Raten aufgetragen, wird der von der Standardtheorie nach Evans und Ritchie [61] vorhergesagte Zusammenhang deutlich (Formel 3.19):

$$F^* = \frac{k_B T}{x_\beta} \ln \frac{x_\beta r}{k_{off}^0 k_B T}.$$

Dabei ist  $F^*$  die wahrscheinlichste Dissoziationskraft,  $k_B T = 4.114$  pN nm (bei 298 K) ein Boltzmann-Faktor,  $x_\beta$  der Abstand (bezüglich der Reaktionskoordinate  $x$ ) zwischen dem Maximum der Potentialbarriere und dem Minimum des metastabilen Zustandes ist,  $r$  die Loading Rate und  $k_{off}^0$  die Off-Rate im thermischen Gleichgewicht.

#### **Struktur der Energielandschaft**

Auffällig ist, dass für jeden Protein-DNA-Komplex zwei Bereiche linearer Abhängigkeit mit unterschiedlicher Steigung auftreten. Dies ist typisch für eine strukturierte Energielandschaft (siehe Kapitel 3.5.3).

1. Bei **niedrigen Loading Raten** ( $r < 11$  nN/s) unterscheiden sich die Steigungen bei den drei verschiedenen Systemen innerhalb der Fehlergrenzen nicht. Dies entspricht einer **einheitlichen Reaktionslänge von  $x_\beta = (7.5 \pm 1.0)$  Å** für alle Protein-DNA-Komplexe. Es kann angenommen werden, dass dieser Bereich die Dissoziation vom gebundenen in den freien Zustand beschreibt (und nicht einen intermediären Übergang). In diesem Fall kann durch eine Extrapolation zu  $F^*=0$  die natürliche thermische Off-Rate  $k_{off}^0$  bestimmt

<sup>v</sup> Eine genauere Eingrenzung der Binderegion erfolgte erst später [28].

werden. Es ergibt sich  $k_{\text{off}}^0 = (1.2 \pm 1.0) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  für alle DNA-Zielsequenzen, was einer mittleren Lebensdauer des gebundenen DNA-Protein-Komplexes von  $\tau = (13.9 \pm 11.6) \text{ min}$  entspricht.

2. Bei **höheren Loading Raten** ( $r > 11 \text{ nN/s}$ ) werden deutliche Unterschiede im Bindeverhalten der drei DNA-Zielsequenzen sichtbar. Die Messungen ergaben eine Reaktionslänge  $x_{\beta} = (2.0 \pm 0.6) \text{ \AA}$  für den Protein-DNA-Komplex mit der *expG*-Promotorregion,  $x_{\beta} = (1.0 \pm 0.1) \text{ \AA}$  mit *expE1* und  $x_{\beta} = (0.4 \pm 0.1) \text{ \AA}$  mit *expA1*. Interessanterweise variieren die dazugehörigen Dissoziationsraten (wenn man eine ähnliche Extrapolation wie in 1. ansetzt) kaum und liegen bei  $\sim 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Die Unterschiede sind gemäß der Theorie auf einen intermediären Zustand mit einer hohen Übergangsrate zurückzuführen, dessen Lage entlang des Reaktionswegs durch die jeweilige DNA-Sequenz bestimmt wird<sup>vi</sup>. Die am Anfang dieses Kapitels (in Zusammenhang mit Abbildung 5.1) angesprochenen **geringfügigen Unterschiede zwischen den einzelnen Promotorregionen** können mit der dynamischen Kraftspektroskopie also tatsächlich beobachtet werden.

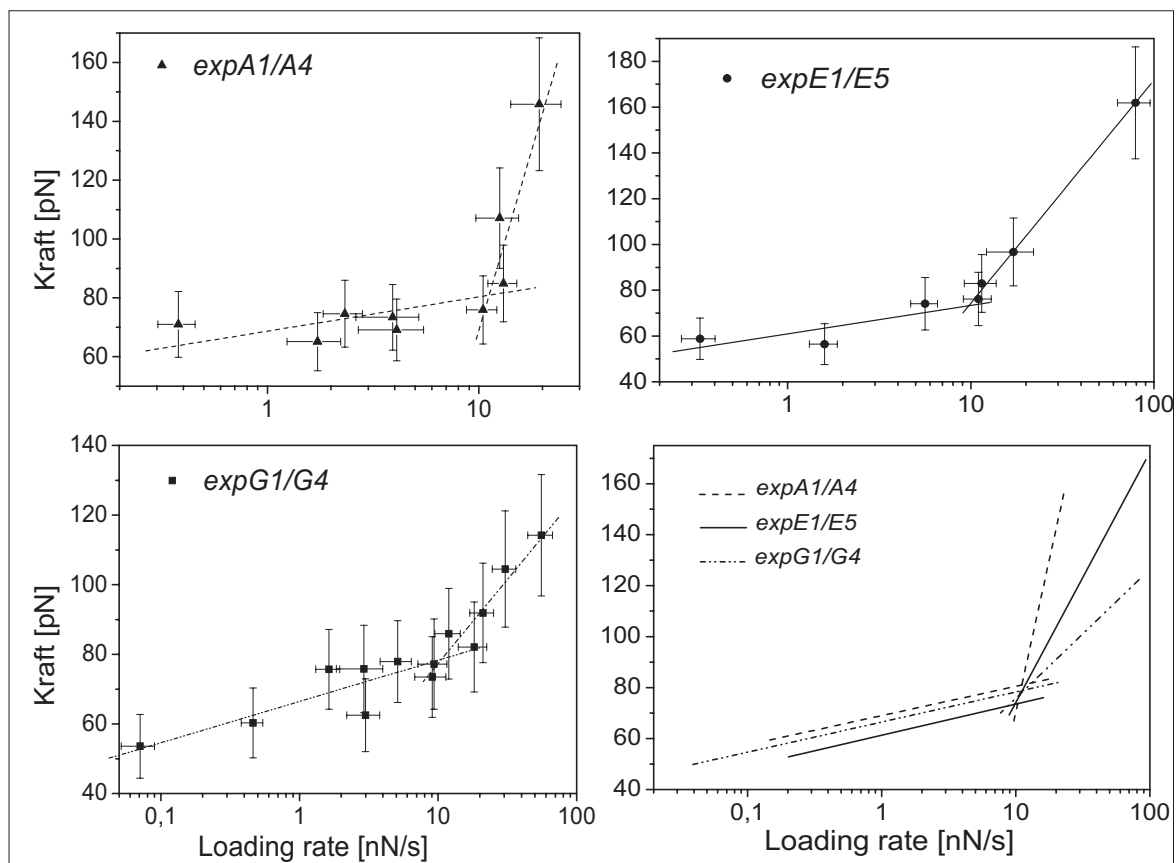


Abbildung 5.7: Dynamische Kraftspektroskopie mit drei DNA-Zielsequenzen

*Gezeigt sind ratenabhängige Messungen der Dissoziationskräfte für Komplexe aus dem  $(\text{His})_6\text{ExpG}$ -Protein und jeder seiner drei DNA-Zielsequenzen. Es ergibt sich eine logarithmische Abhängigkeit der wahrscheinlichsten Dissoziationskräfte von der Loading Rate, und zwar mit zwei unterschiedlichen Bereichen (Steigungen) für jeden Komplex. Im Bild rechts unten sind die Ergebnisse der Einzelmessungen gegenübergestellt.*

<sup>vi</sup> Die Steigung wächst nicht einfach mit der Länge des untersuchten DNA-Fragments. Es ist also in der Tat ein sequenz-spezifisches Problem.

### ***Konsistenz der Ergebnisse***

Die Messungen an (His)<sub>6</sub>ExpG-DNA-Komplexen wurden mehrfach im Abstand von Monaten wiederholt. Dabei erzielten die aus unterschiedlichen Präparationen stammenden und mit verschiedenen AFM-Sensoren gemessenen Systeme sogar eine bessere Übereinstimmung, als es der systematische Fehler aufgrund der Kalibrierung der Federkonstanten ( $\sim 15\%$ ) erwarten ließ (vgl. Höhe der Fehlerbalken und Lage der Kraftmittelwerte in Abbildung 5.7).

Um der Frage nachzugehen, ob bei noch niedrigeren Loading Raten nicht noch weitere Potentialbarrieren erkennbar würden, welche daher – und nicht die beobachtete Barriere – die Reaktion im thermischen Gleichgewicht bestimmten, wurden von Birgit Baumgarth zeitabhängige EMSA-Experimente durchgeführt [78]. Bei diesen Studien konnten die On- und Off-Raten der verschiedenen Protein-DNA-Komplexe und daher auch die Dissoziationskonstante  $K_d$  bestimmt werden (Tabelle 5.1). Dabei hängt der numerische Wert der On-Rate (und auch  $K_d$ ) davon ab, ob ExpG als Dimer oder Monomer vorliegt.

Promotorregion	$k_{\text{on}}$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]		$k_{\text{off}}$ [s <sup>-1</sup> ]	$K_d$ [M]	
	Monomer	Dimer		Monomer	Dimer
<i>expD/expG</i>	$1.7 \times 10^5$	$3.7 \times 10^5$	$4.3 \times 10^{-4}$	$2.5 \times 10^{-9}$	$1.2 \times 10^{-9}$
<i>expE1</i>	$1.3 \times 10^5$	$5.0 \times 10^5$	$2.9 \times 10^{-4}$	$2.2 \times 10^{-9}$	$5.8 \times 10^{-10}$
<i>expA1</i>	$5.0 \times 10^4$	$1.0 \times 10^5$	$1.3 \times 10^{-4}$	$2.6 \times 10^{-9}$	$1.3 \times 10^{-9}$

Tabelle 5.1: On- und Off-Raten aus EMSA-Studien [78]

Allerdings wurde bei diesen EMSA-Studien das ExpG-Protein mit einem Histidin-Anhang am C-Terminus untersucht, während die dynamische Kraftspektroskopie an N-terminal histidin-modifiziertem ExpG durchgeführt wurden. Daher war die Frage von Bedeutung, inwiefern der Histidin-Tag die Bindung beeinflussen könnte. Dies wurde in einer ratenabhängigen Messreihe mit dem expG1/G4-DNA-Fragment und dem ExpG(His)<sub>6</sub>-Fusionsprotein überprüft. Dabei ergaben sich die zwei bekannten Abhängigkeitsbereiche mit  $x_\beta = (2.5 \pm 0.7) \text{ \AA}$  bei höheren Loading Raten bzw.  $x_\beta = (6.6 \pm 3.8) \text{ \AA}$  und  $k_{\text{off}}^0 = (2.9 \pm 2.1) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  bei niedrigen Loading Raten. Später (siehe Abschnitt 5.1.4) wurde auch die Bindung eines ExpG(His)<sub>6</sub>-Fusionsproteins an ein kürzeres DNA-Fragment (182 bp statt 301 bp), das die *expA1*-Promotorregion trug, untersucht. Dabei wurde bei niedrigen Loading Raten  $x_\beta = (5.1 \pm 0.5) \text{ \AA}$  und  $k_{\text{off}}^0 = (4.4 \pm 2.1) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  bestimmt. Diese Werte stehen in guter Übereinstimmung mit den für das (His)<sub>6</sub>ExpG-Fusionsprotein bestimmten. Weder die N- noch die C-terminale Modifikation scheint im Falle von ExpG den molekularen Bindemechanismus zu verändern.

Auf dieser Basis ist ein Vergleich der Off-Raten aus den EMSA-Studien mit den kraftspektroskopisch bestimmten erlaubt. Die im thermischen Gleichgewicht gemessenen Werte liegen innerhalb der Fehlergrenzen der durch erzwungene Dissoziation bestimmten Größen<sup>vii</sup>. Die Extrapolation aus dem der AFM-Kraftspektroskopie noch zugänglichen Bereich in das thermische Gleichgewicht scheint also gerechtfertigt.

<sup>vii</sup> Der Fehler in den bestimmten Raten ist bei den zeitabhängigen EMSA-Studien schwierig abzuschätzen, dürfte jedoch mindestens eine Größenordnung betragen.

### ***Populationsheterogenität***

Aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit der Ergebnisse empfahl sich die Dissoziation von ExpG-DNA-Komplexen als Testobjekt für die optimierte Datenanalyse zur Kraftspektroskopie an Ligand-Rezeptor-Systemen, entsprechend der Darstellung in Kapitel 3.5.4. Die anfänglich dabei auftretenden Schwierigkeiten führten zum Postulat der Populationsheterogenität (siehe Kapitel 3.5.5). Mit dieser Annahme konnten von Martin Raible (Theoretische Physik, Universität Bielefeld, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Peter Reimann) die Dissoziationsparameter wie folgt bestimmt werden [81]:

- für die *expG*-Promotorregion:  $x_{\beta} \sim 5.4 \text{ \AA}$  und  $k_{\text{off}}^0 \sim 2.6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
- für die *expE1*-Promotorregion:  $x_{\beta} \sim 5.4 \text{ \AA}$  und  $k_{\text{off}}^0 \sim 3.3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$

Dabei wurden beileibe nicht alle gemessenen Werte in die Auswertung einbezogen, sondern nur jeweils eine Serie mit einem einzigen AFM-Sensor (um einen Einfluss der Kalibrationsfehler auszuschließen); zudem wurden manche Kräfteverteilungen (gerade höherer Ziehgeschwindigkeiten) nicht berücksichtigt. Trotz dieses geringeren Datensatzes (und des daher eigentlich zu erwartenden größeren Fehlers) liegen die bestimmten Werte sehr nahe sowohl an den nach der DFS-Standardmethode berechneten als auch an den in den EMSA-Studien ermittelten Werten. Besonders wichtig ist die Beobachtung, dass auch unter dem schärferen Blick der verbesserten Analyse Reaktionslängen und Off-Raten für die verschiedenen Protein-DNA-Komplexe (unter niedriger Loading Rate) nahezu identisch sind. Auch wenn sich die numerischen Größen leicht verschieben mögen, bleiben die Relationen und damit die Kernaussagen aus diesen Studien gewahrt.

Da das einheitliche Verhalten der verschiedenen Protein-DNA-Komplexe unter niedrigen Loading Raten sich aus der neuen Methode sogar mit größerer Präzision ergibt, scheint die Annahme einer Populationsheterogenität zulässig. Doch worauf beruht diese? In Kapitel 3.5.5 werden mehrere mögliche Gründe genannt. Wie im Abschnitt 5.1.2 ausgeführt, kann Punkt V (Misinterpretation mehrerer Dissoziationsvorgänge) vernachlässigt werden. Dass das Protein ExpG in mehreren bindefähigen Konformationen vorliegt (Punkt III) oder über mehrere gleichberechtigte DNA-Bindedomänen verfügt (IV), erscheint unwahrscheinlich. Statistische Variationen der lokalen Umgebung der Bindedomäne durch gelöste Ionen (Punkt II) können dagegen nicht ausgeschlossen werden. Wahrscheinlich spielt die Orientierung des Molekülkomplexes bezüglich der angelegten Kraft eine Rolle (Punkt I). Wie bereits beschrieben, gibt es bis zu fünf verschiedene Möglichkeiten, wie das Protein an die Oberfläche immobilisiert sein kann; daher ist auch eine gewisse Variabilität in der Interaktion mit dem an die Spitze gebundenen DNA-Molekül denkbar. Das Vorhandensein eines geringen, nicht a priori von den spezifischen Wechselwirkungen unterscheidbaren Untergrundes an unspezifischen Protein-DNA-Interaktionen (Punkt VI) wurde experimentell direkt nachgewiesen (siehe Abschnitt 5.1.2). Es sei daran erinnert, dass dies bei Protein-DNA-Wechselwirkungen durchaus zu erwarten ist (Kapitel 2.1.3).

### 5.1.4 Das Bindemotiv im Detail

Um die Bindestelle genauer zu bestimmen, wurde die Bindung von ExpG(His)<sub>6</sub> an mutierte DNA-Zielsequenzen untersucht, und zwar am Beispiel der Promotorregion *expA1*. In kraftspektroskopischen Studien wurden dabei vier DNA-Fragmente von jeweils 182 bp Länge betrachtet: die unveränderte Promotorregion (**KF-A1e**, Wildtyp); eine DNA-Sequenz, in der 5 von 15(21) bp<sup>viii</sup> der palindromischen Kernregion verändert worden waren (**KF-A1f**); eine Sequenz, in der 1 von 3(8) bp der Box 1 verändert worden war (**KF-A1g**); und schließlich eine Sequenz, in der 2 von 4(9) bp der Box 2 verändert worden waren (**KF-A1h**). Die Fragmente sind einander in Abbildung 5.1 gegenübergestellt.

Für jedes der vier DNA-Fragmente wurde eine Verteilung von Dissoziationskräften wie bereits beschrieben gemessen (Abbildung 5.8). Von Bedeutung ist der Vergleich mit dem Wildtyp (5.8a). Die Mutation in der palindromischen Kernregion hat vernichtende Auswirkung (5.8b): Es können kaum noch Dissoziationsereignisse beobachtet werden; die verbliebenen sind vermutlich das Ergebnis unspezifischer Bindungen (vgl. Abschnitt 5.1.2). Eine Mutation von Box 1 (5.8c) oder Box 2 (5.8d) reduziert dagegen die Bindewahrscheinlichkeit nur leicht.

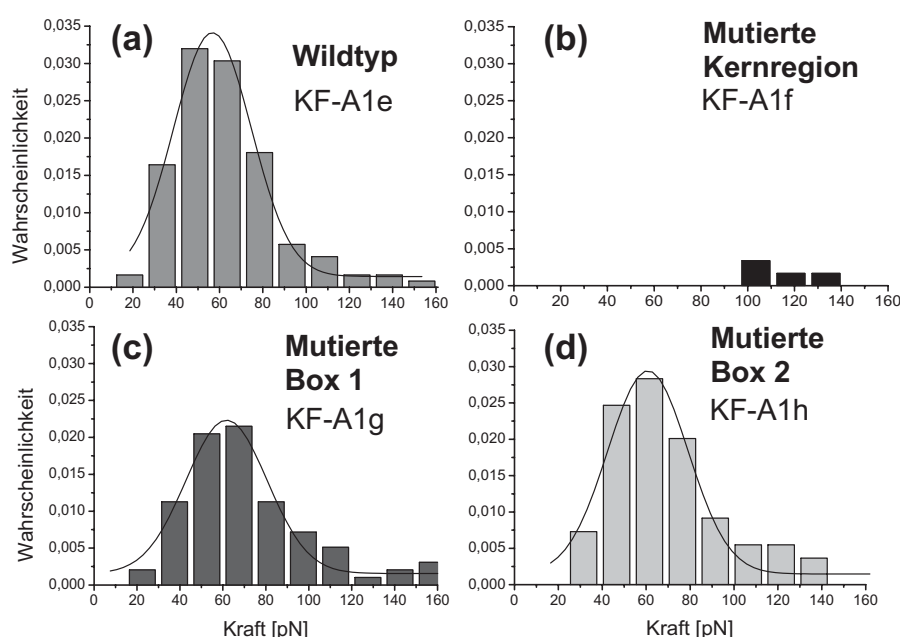


Abbildung 5.8: Einfluss von Mutationen auf die Bindung von ExpG an die *expA1*-Promotorregion

Soweit decken sich die Beobachtungen mit den Ergebnissen der eingangs erwähnten EMSA-Studien: Eine intakte Kernregion scheint unabdingbar, doch eine Mutation in einer der beiden Boxen verhindert die Bindung nicht (auch wenn es sie vermutlich beeinträchtigt).

Genauere Informationen lieferte die dynamische Kraftspektroskopie an den Protein-DNA-Komplexen der drei bindenden DNA-Fragmente (KF-A1e, KF-A1g, KF-A1h). In Abbildung 5.9 sind die wahrscheinlichsten Kraftwerte in Abhängigkeit der Loading Raten für diese drei Systeme dargestellt. Es wurde gezielt der Bereich niedriger Loading Raten ( $\tau <$

<sup>viii</sup> Gemeint ist: 15 bp sind streng konserviert, die gesamte Subregion umfasst jedoch 21 bp mit Ähnlichkeiten.



11 nN/s) untersucht. Aus Formel (3.19) und der zuvor erläuterten Extrapolation zu  $F^*=0$  ergaben sich die in Tabelle 5.2 zusammengestellten Reaktionslängen und natürlichen thermischen Off-Raten.

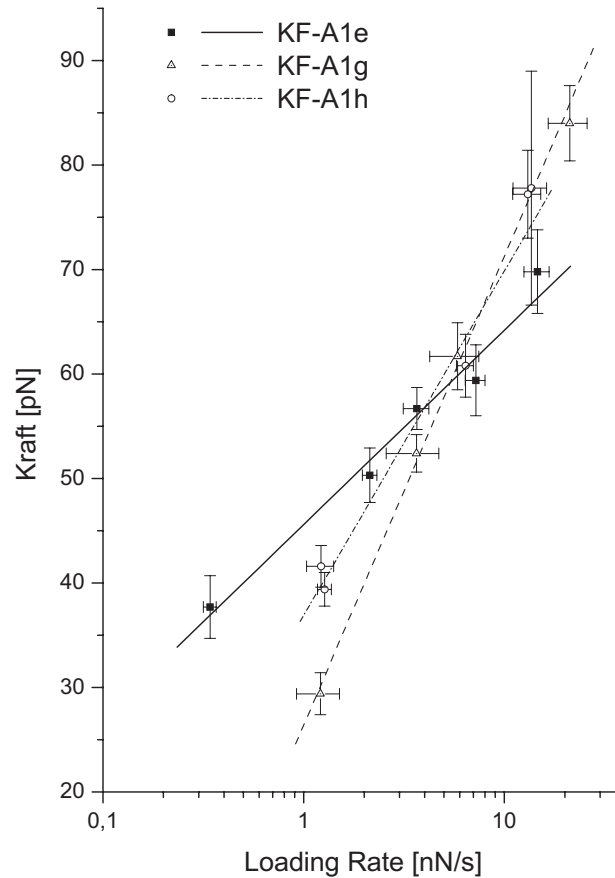


Abbildung 5.9: Dynamische Kraftspektroskopie an ExpG-DNA-Komplexen mit den DNA-Fragmenten aus Abbildung 5.8

DNA-Fragment	Reaktionslänge $x_{\beta}$ [Å]	Off-rate $k_{\text{off}}^0$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	Mittlere Lebensdauer $\tau$ [sec]
KF-A1e ( <i>Wildtyp</i> )	$5.1 \pm 0.5$	$(4.4 \pm 2.5) \times 10^{-4}$	$2273 \pm 1291$
KF-A1g ( <i>Box 1 mutiert</i> )	$2.1 \pm 0.1$	$(1.3 \pm 0.2) \times 10^{-2}$	$77 \pm 12$
KF-A1h ( <i>Box 2 mutiert</i> )	$2.9 \pm 0.3$	$(5.3 \pm 1.5) \times 10^{-3}$	$189 \pm 53$

Tabelle 5.2: Aus den Abbildung 5.9 zugrunde liegenden Daten ermittelte Parameter

Offenbar variieren die Off-Raten über zwei Größenordnungen. Daraus wird ersichtlich, dass eine Mutation in einer der beiden Boxen zwar nicht die Bindung a priori unmöglich macht, die entstehenden DNA-Protein-Komplexe jedoch eine deutlich reduzierte Lebensdauer haben, wobei die Mutation in Box 1 sich noch deutlicher auswirkt als die in Box 2.

Es kann also gefolgert werden, dass die **palindromische Kernregion für das Zustandekommen der ExpG-DNA-Bindung essentiell ist, während die beiden assoziierten Box-Regionen eine stabilisierende Funktion ausüben.**

## 5.2 ExpR-DNA

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die spezifische Bindung des regulatorischen Proteins ExpR an die *sinR/sinI*-DNA-Sequenz mittels Kraftspektroskopie untersucht, und zwar in Gegenwart verschiedener Effektormoleküle.

ExpR, wie ExpG ein Transkriptionsaktivator der *exp*-Gene von *Sinorhizobium meliloti*, ist ein vermutlich als Monomer vorliegendes [95]Protein von 28 kDa Molekulargewicht. Es wurde ausschließlich als (His)<sub>6</sub>ExpR-Fusionsprotein mit einem N-terminalen Histidin-Anhang untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein noch funktional ist: (His)<sub>6</sub>ExpR stimuliert die Transkription des *expE1*-Gens *in vivo* [39].

Die Primärstruktur von ExpR weist eine gewisse Ähnlichkeit zu den Regulatoren der LuxR-Proteinfamilie auf, die eine C-terminale DNA-Bindedomäne und eine N-terminale AHL-Bindedomäne besitzen [27] und als Rezeptoren für Acyl-Homoserinlactone (AHLs) in Quorum-Sensing-Systemen fungieren, wo sie die Expression einer AHL-Synthase vom LuxI-Typ stimulieren und so eine positive Rückkopplungsschleife auslösen.

In molekulargenetischen Studien (EMSA) war von Christoph Metzendorf am Lehrstuhl für Genetik der Universität Bielefeld gezeigt worden, dass (His)<sub>6</sub>ExpR in Gegenwart von oxo-C<sub>14</sub>-HL, C<sub>16:1</sub>-HL oder C<sub>18</sub>-HL<sup>ix</sup> an die *sinI*-Promotorregion bindet [36]. Diese Untersuchungen wurden parallel zu dieser Arbeit von Matthew McIntosh (ebd.) fortgeführt. Dabei wurde bei einer Reihe von AHLs ein aktivierender oder stimulierender Effekt auf die Protein-DNA-Interaktion festgestellt (siehe Abschnitt 5.2.1).

Die in den folgenden Untersuchungen verwendete DNA war immer ein 313 bp langes Fragment, auf dem sich neben unspezifischen Teilen eine 216 bp lange Region befand, die 31 bp vom 3'-Ende von *sinR*, die 156 bp lange intergenische Region zwischen *sinR* und *sinI* sowie 29 bp vom 5'-Ende von *sinI* umfasste. In Footprint-Experimenten schützte (His)<sub>6</sub>ExpR in Gegenwart von oxo-C<sub>14</sub>-HL einen Bereich von 35 bp in der intergenischen Region zwischen *sinR* und *sinI*, wo also die Bindestelle zu verorten ist [39].

### 5.2.1 Effektor-stimulierte Protein-DNA-Interaktion

Um die ExpR-DNA-Interaktion auf Einzelmolekülebene zu untersuchen, wurde dieselbe Anordnung und Immobilisierung gewählt, die sich schon bei der kraftspektroskopischen Analyse der ExpG-DNA-Wechselwirkung bewährt hatte (Kapitel 5.1.2). ExpR wurde dabei über eines seiner 11 Lysine (via einen kurzen Linker) an die Oberfläche gekoppelt. Alle Experimente fanden in Pufferlösung statt (100 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5).

Für das reine (His)<sub>6</sub>ExpR-DNA-System blieb die Bindewahrscheinlichkeit unter 0.5%. Die wenigen beobachteten Dissoziationsereignisse ergaben eine weit gestreute Kräfteverteilung (Abbildung 5.10A). Bei nichtfunktionalisierter AFM-Spitze und normal präparierter Oberfläche zeigten sich dagegen – wie auch bei den Messungen mit ExpG – keinerlei Ereignisse.

Durch die Zugabe eines passenden Effektors konnte die Bindewahrscheinlichkeit drastisch erhöht werden, wie exemplarisch in Abbildung 5.10B zu sehen: Hier wurde oxo-C<sub>14</sub>-HL zur Pufferlösung hinzugefügt, so dass die Endkonzentration des Effektors 10 µM betrug. (Dies ist dieselbe Konzentration, die auch in den molekulargenetischen Studien verwendet wurde). Die Bindewahrscheinlichkeit stieg dadurch auf 8-10%, und die Dissoziationskräfte

---

<sup>ix</sup> Für eine Erklärung der Kürzel siehe Tabelle 4.2

wiesen die gewohnte Verteilung auf, die wiederum in erster Näherung durch eine Gaußverteilung beschrieben werden kann.

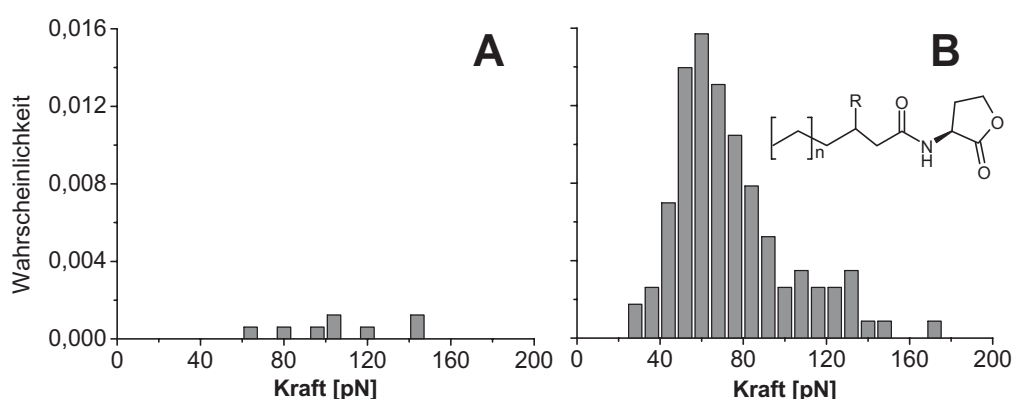


Abbildung 5.10: AHL-stimulierte ExpR-DNA-Interaktion

(A) Kräfteverteilung für die Dissoziation von  $(His)_6ExpR$ -DNA-Komplexen ohne Effektor (bei  $v = 2000 \text{ nm/s}$ ). (B) Nach Zugabe von  $10 \mu\text{M}$  oxo- $C_{14}$ -HL, steigt die Bindewahrscheinlichkeit in hohem Maße.

Daraus folgt: Auch wenn nicht ausgeschlossen werden kann, dass das Protein auch in Abwesenheit eines Effektors an die DNA-Zielsequenz bindet (z.B. durch unspezifische Interaktion), wird die Bindung durch einen passenden Effektor (zumindest) stark stimuliert. Diese Stimulation wurde in den Kraftspektroskopie-Experimenten quasi sofort wirksam – die Bindung des AHLs an das Rezeptorprotein und der daraus resultierende allosterische Effekt auf die DNA-Bindedomäne spielten sich auf einer Zeitskala ab, die kleiner war als die für die thermische Beruhigung des Systems nach der Zugabe der Effektoren benötigte Zeitspanne ( $\sim 5 \text{ min}$ ). Dies ist ein Indiz für die hohe Affinität, mit der die AHL-Effektoren an das ExpR-Protein binden.

AFM-Kraftspektroskopie erwies sich hier als hochauflösende Untersuchungsmethode, um den Einfluss verschiedener Effektoren auf die Protein-DNA-Wechselwirkung festzustellen<sup>x</sup>. Von den sieben getesteten Effektoren, waren sechs dazu in der Lage, die ExpR-DNA-Interaktion wie beschrieben anzuregen:  $C_8$ -HL,  $C_{10}$ -HL,  $C_{12}$ -HL, oxo- $C_{14}$ -HL,  $C_{16:1}$ -HL und  $C_{18}$ -HL (siehe Abbildung 5.11 für die wahrscheinlichsten Dissoziationskräfte unter verschiedenen Loading Raten). Nur  $C_7$ -HL bewirkte keinen merklichen Anstieg der Bindewahrscheinlichkeit, wenn es Bestandteil der wässrigen Umgebung war (Abbildung 5.12A).

## 5.2.2 Einfluss verschiedener Effektoren auf Einzelmolekülebene

Der Einfluss der sechs stimulierenden Effektoren auf den molekularen Mechanismus der Protein-DNA-Bindung wurde danach durch dynamische Kraftspektroskopie untersucht. Für jeden Effektor wurden typischerweise 80-150 Dissoziationereignisse des Protein-DNA-Komplexes (aus 1000-2000 Messzyklen) aufgenommen, und dies bei jeweils 5-9 verschiedenen Ziehgeschwindigkeiten zwischen  $100 \text{ nm/s}$  und  $6000 \text{ nm/s}$ . Dies resultierte in Loading Raten von  $220$ - $44000 \text{ pN/s}$ . Die Annäherungsgeschwindigkeit wurde konstant bei  $2000 \text{ nm/s}$  gehalten.

<sup>x</sup> In den begleitenden EMSA-Experimenten konnte dagegen der Einfluss von  $C_8$ -HL,  $C_{10}$ -HL und  $C_{12}$ -HL nicht eindeutig bestimmt werden.

In der üblichen Darstellung (Abbildung 5.11) zeigte sich die bereits bekannte logarithmische Abhängigkeit der wahrscheinlichsten Dissoziationskraft von der Loading Rate. Durch Extrapolation gemäß Gleichung (3.19) konnten daraus die Parameter des Dissoziationsprozesses bestimmt werden, die in Tabelle 5.3 zusammengestellt sind.

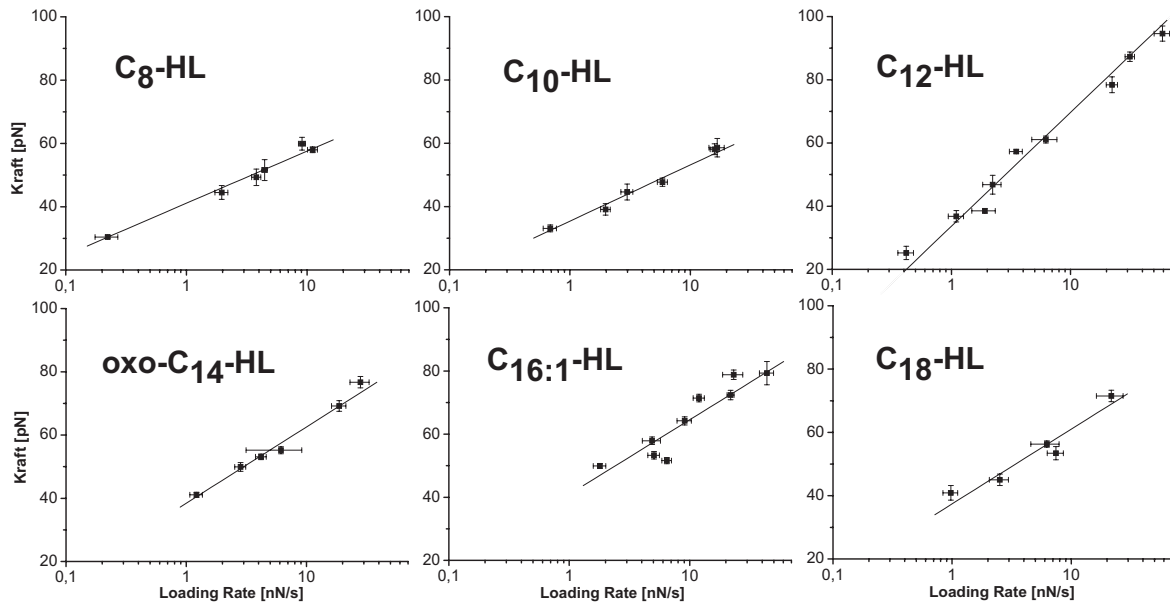


Abbildung 5.11: Dynamische Kraftspektroskopie an  $(\text{His})_6\text{ExpR}$ -DNA-Komplexen in Gegenwart verschiedener AHL-Effektoren

AHL	Reaktionslänge $x_\beta$ [ $\text{\AA}$ ]	Off-rate $k_{\text{off}}^0$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	Mittlere Lebensdauer $\tau$ [sec]
$\text{C}_8\text{-HL}$	$5.8 \pm 0.2$	$(4.43 \pm 0.80) \times 10^{-4}$	$2257 \pm 408$
$\text{C}_{10}\text{-HL}$	$5.3 \pm 0.3$	$(1.31 \pm 0.41) \times 10^{-3}$	$763 \pm 239$
$\text{C}_{12}\text{-HL}$	$2.6 \pm 0.3$	$(7.44 \pm 2.16) \times 10^{-3}$	$134 \pm 39$
$\text{oxo-C}_{14}\text{-HL}$	$3.9 \pm 0.2$	$(2.41 \pm 0.66) \times 10^{-3}$	$415 \pm 114$
$\text{C}_{16:1}\text{-HL}$	$4.2 \pm 0.6$	$(1.24 \pm 0.94) \times 10^{-3}$	$806 \pm 611$
$\text{C}_{18}\text{-HL}$	$4.0 \pm 0.6$	$(2.53 \pm 1.77) \times 10^{-3}$	$395 \pm 277$

Tabelle 5.3: Aus den Abbildung 5.11 zugrunde liegenden Daten ermittelte Parameter

Die verschiedenen Effektoren besitzen einen erkennbaren Einfluss auf die Kinetik und Struktur der Protein-DNA-Bindung. Die meisten Off-Raten liegen um  $k_{\text{off}}^0 = 2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , was einer mittleren Lebensdauer des gebundenen Komplexes von ungefähr 8 Minuten entspricht. Die bemerkenswerten Ausnahmen sind  $\text{C}_8\text{-HL}$ , das eine Off-Rate von  $k_{\text{off}}^0 = 4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  ( $\tau = 38 \pm 7 \text{ min}$ ) bewirkt, und  $\text{C}_{12}\text{-HL}$  mit  $k_{\text{off}}^0 = 7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ( $\tau = 2 \pm 1 \text{ min}$ ). Die gemessenen Reaktionslängen  $x_\beta$  deuten ebenfalls auf drei verschiedene Bereiche hin: die Komplexe unter dem Einfluss langkettiger AHLs ( $\text{oxo-C}_{14}\text{-HL}$ ,  $\text{C}_{16:1}\text{-HL}$  und  $\text{C}_{18}\text{-HL}$ ) bewegen sich um  $x_\beta \sim 4.0 \text{ \AA}$ , während die kurzkettigen AHLs ( $\text{C}_8\text{-HL}$  und  $\text{C}_{10}\text{-HL}$ ) zu höheren Werten um  $x_\beta \sim 5.6 \text{ \AA}$  führen, und  $\text{C}_{12}\text{-HL}$  bewirkt eine auffällig kurze Reaktionslänge von  $x_\beta \sim 2.6 \text{ \AA}$ .

Da sich keine klare Abhängigkeit der molekularen Parameter (etwa von der Länge der Seitenkette) finden ließ, ist eine weiter gehende Interpretation ohne zusätzliche Strukturinformationen über die gebildeten Komplexe (z.B. aus Kristallstrukturanalysen) schwierig. Bemerkenswert ist jedoch die Sonderstellung, die C<sub>12</sub>-HL einnimmt: Die unter Einfluss dieses Effektors gebildeten Protein-DNA-Komplexe stechen hinsichtlich der Reaktionslänge und der Lebensdauer heraus.

### 5.2.3 Stabilität des Effektor-Protein-Komplexes

Warum ist C<sub>7</sub>-HL nicht in der Lage, die Protein-DNA-Interaktion zu stimulieren (Abbildung 5.12A)? Denkbar wäre, dass es überhaupt nicht an das ExpR-Protein bindet. Dies ist jedoch nicht der Fall. Selbst nachdem C<sub>7</sub>-HL sowohl von der Probenoberfläche als auch vom AFM-Sensor durch mehrere Waschschriffe mit AHL-freier Pufferlösung im Verlauf einer Stunde entfernt worden war, erbrachte die Zugabe des (ansonsten gut stimulierenden) C<sub>12</sub>-HL nur sehr wenige Ereignisse (5.12B). Es scheint, als würden in diesem Fall die meisten Proteine immer noch einen C<sub>7</sub>-HL-Effektor tragen, der die Stimulation durch C<sub>12</sub>-HL verhindert. Obwohl C<sub>7</sub>-HL also an das (His)<sub>6</sub>ExpR-Protein bindet, ist es nicht in der Lage, dessen Konformation zu einem aktiveren Zustand hin zu verändern.

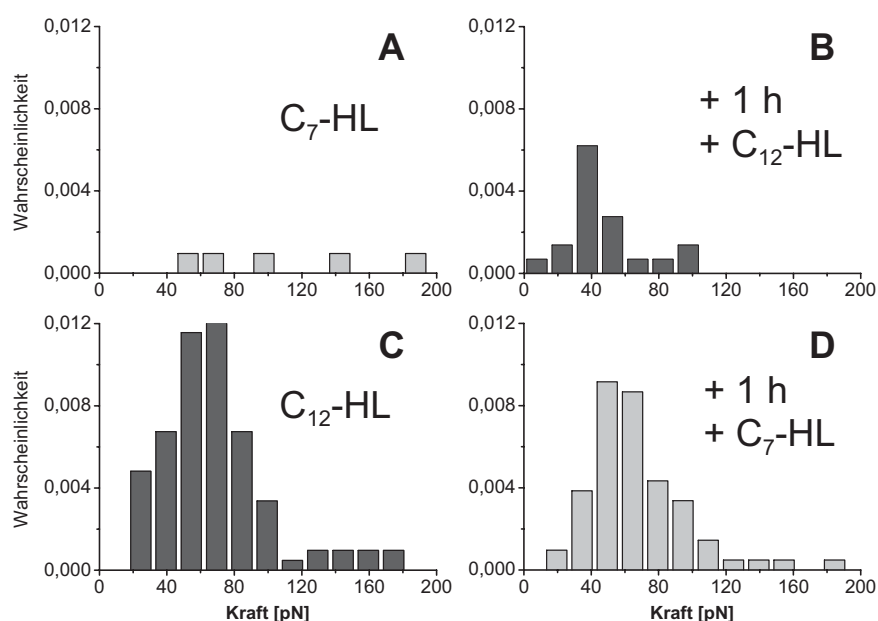


Abbildung 5.12: Stabilität der Protein-Effektor-Komplexe

(A) In Gegenwart von C<sub>7</sub>-HL werden nur wenige Protein-DNA-Komplexe gebildet. (B) Selbst nachdem die Probe mehrfach mit Pufferlösung gewaschen wurde und eine Stunde verstrichen ist, bleibt die Bindewahrscheinlichkeit niedrig. Mit einer neuen AFM-Spitze und einer neuen Probenoberfläche wurde der Vorgang in der umgekehrten Reihenfolge untersucht: (C) In Gegenwart von C<sub>12</sub>-HL zeigt das System die gewohnte Aktivität. (D) Die Probe wird mehrere Male im Verlauf einer Stunde gewaschen, bevor C<sub>7</sub>-HL hinzugegeben wird. Das System zeigt immer noch eine starke Aktivität.

Das letzte Experiment deutet auf eine lange Lebensdauer des Effektor-Protein-Komplexes hin. Dies wurde für C<sub>12</sub>-HL überprüft, das das gewohnte Ausmaß an stimulierender Wirkung bei einer frischen Proteinprobe zeigte (5.12C). Nach Aufnahme dieser Kräfteverteilung wurden Probenoberfläche und AFM-Sensor wiederum mehrere Male im Verlauf einer Stunde mit AHL-freier Pufferlösung gewaschen, bevor diesmal C<sub>7</sub>-HL hinzugegeben wurde. Obwohl die Bindewahrscheinlichkeit dadurch merklich reduziert wurde (5.12D), wies das System immer noch eine beachtliche Aktivität auf.

Die Lebensdauer der Protein-Effektor-Bindung übersteigt damit die Lebensdauer der Protein-DNA-Komplexe bei weitem (letztere beträgt schließlich im Falle C<sub>12</sub>-HL nur  $\tau = 134 \pm 39$  sec, siehe Tabelle 5.3). Die Protein-DNA-Kinetik kann daher unabhängig von der Effektor-Protein-Kinetik betrachtet werden. Es ist nur die durch einen bestimmten Effektor hervorgerufene strukturelle Veränderung des Proteins, welche die Eigenschaften der Protein-DNA-Wechselwirkung bestimmt. Dies ist besonders bemerkenswert, da hier im extremsten Fall ein C-Atom mehr oder weniger (C<sub>7</sub>-HL bzw. C<sub>8</sub>-HL) bereits einen erheblichen Unterschied bewirkt.

## Kapitel 6

# Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden die spezifischen Interaktionen zweier regulatorischer Proteine mit ihren DNA-Zielsequenzen vor dem Hintergrund der Galactoglucan-Biosynthese in *Sinorhizobium meliloti* untersucht.

Zunächst gelang es, die spezifische Bindung des Proteins ExpG an drei verschiedene Promotorregionen zu verifizieren. Durch verschiedene Kontrollmessungen wurde aufgezeigt, dass die Ergebnisse der AFM-Kraftspektroskopie an einzelnen Protein-DNA-Komplexen mit den aus molekularbiologischen Standardmethoden gewonnenen Daten in Einklang stehen. Der Übergang zur dynamischen Kraftspektroskopie erlaubte es, erstmals eine (einheitliche) Dissoziationsrate für die verschiedenen Protein-DNA-Komplexe zu bestimmen; ein Ergebnis, das später durch Ensemble-Messungen im thermischen Gleichgewicht bestätigt wurde. Die Einzelmoleküluntersuchungen lieferten jedoch noch darüber hinaus gehende Informationen: Unter höherer Beladung mit einer äußeren Kraft wiesen die einzelnen Komplexe charakteristische Unterschiede auf, die auf eine sequenz-spezifische Struktur des Bindungspotentials zurückzuführen sind.

In einem zweiten Schritt wurde das Bindemotiv daher einer genaueren Analyse unterzogen. Es konnte gezeigt werden, dass eine palindromische Kernregion in der DNA-Zielsequenz für die Bindung von ExpG notwendig ist, während zwei flankierende Box-Regionen eine stabilisierende Wirkung auf den Protein-DNA-Komplex ausüben. Da die Abstände der beiden Boxen von der Kernregion in den drei Promotorregionen variieren, liegt die Vermutung nahe, dass dies die in den vorhergehenden Experimenten beobachteten sequenz-spezifischen Eigenschaften der Bindung bewirkt.

Für die *expG/expD1*-Promotorregion lieferten rasterkraftmikroskopische Aufnahmen zudem einen Hinweis auf eine charakteristische Strukturveränderung der DNA durch die Proteinbindung.

Die bei der ExpG-DNA-Interaktion gewonnenen Erfahrungen bildeten die Grundlage für eine Analyse der Bindung des Proteins ExpR an seine DNA-Zielsequenz im *sinRI*-Locus. Bei diesem Dreikomponentensystem führte die Zugabe passender Effektoren zu einer drastischen Stimulation der Protein-DNA-Interaktion. Dabei konnte sehr genau zwischen wirksamen und nicht wirksamen Effektoren unterschieden werden. Für erstere wurden durch dynamische Kraftspektroskopie Dissoziationsraten und Reaktionslängen bestimmt, in denen ein effektorabhängiger Einfluss auf die gebildeten Protein-DNA-Komplexe sichtbar wurde. Die kraftspektroskopischen Untersuchungen lieferten zudem einen indirekten Nachweis für die Effektor-Protein-Bindung, deren Lebensdauer die der Protein-DNA-Bindung übersteigt.

Die vorgenannten spezifischen Protein-DNA-Wechselwirkungen waren damit die ersten direkt kraftspektroskopisch untersuchten Systeme dieser Art [82,96]. Die AFM-Kraftspektroskopie erwies sich dabei als Untersuchungsmethode, die zu molekularbiologischen Studien komplementäre und gut reproduzierbare Ergebnisse lieferte. Die Empfindlichkeit der Einzelmoleküldetektion war beachtlich: Minimale Einflüsse auf die Struktur und Kinetik der Protein-DNA-Komplexe konnten präzise ausgemacht werden, verursacht durch die Mutation eines einzelnen Basenpaares der DNA-Zielsequenz (ExpG-KFA1g) oder durch einen Unterschied von einem C-Atom in der Seitenkette des Effektors

(C<sub>7</sub>-HL bzw. C<sub>8</sub>-HL). Die Genauigkeit und die große vorhandene Datenmenge ermöglichten es schlussendlich, eine neuartige Analysemethode an diesem Datensatz zu testen, was eine Revision des bislang vorherrschenden theoretischen Modells der Kraftspektroskopie an Ligand-Rezeptor-Systemen anregte.

In welche Richtung wird sich die Kraftspektroskopie an Ligand-Rezeptor-Systemen in Zukunft entwickeln? Auf diese Frage soll abschließend der Versuch einer Antwort unternommen werden. Eine inhärente Schwäche der AFM-Kraftspektroskopie ist die Beschränkung auf den Dissoziationsvorgang; ohne eine On-Rate ist die thermodynamische Information unvollständig. Der Experimentator muss (wie auch im vorliegenden Fall) zu anderen Methoden greifen, um eine Gleichgewichtskonstante zu bestimmen. Allerdings können durch dynamische Kraftspektroskopie Beobachtungen hinsichtlich der Struktur der Energielandschaft gemacht werden, die sich anderen Zugriffen entziehen. Auf dieser Ebene schlagen sich auch – wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt – kleine Variationen des Systems in messbaren Größen nieder. Diese Stärke gilt es folglich auszubauen.

Auf der einen Seite sollte die Entdeckung der Populationsheterogenität neue Messanordnungen nach sich ziehen, mit denen die Interaktionsparameter genauer bestimmt werden können. Auf der anderen Seite kann der Messapparat von technischen Entwicklungen profitieren, um mehr Informationen aus einem gegebenen System zu extrahieren. Hier ist insbesondere der Übergang zu kleineren AFM-Cantilevern zu nennen, durch den ein größerer dynamischer Bereich zugänglich sein dürfte und damit die verbesserte Möglichkeit, intermediäre Zustände im Bindungspotential aufzudecken (z.B. beim ExpR-DNA-System). Aber auch die Kombination mit optischen Methoden könnte eine Interpretation der gemessenen Parameter erleichtern. Die simultane Detektion der Kraftantwort und z.B. eines Energieübertrags von einem Fluorophor zum anderen hat das Potential, interne Strukturübergänge der an der Bindung beteiligten Moleküle aufzuklären.

Auf die untersuchte Protein-DNA-Wechselwirkung bezogen, sind speziell Vergleichsdaten wünschenswert, die eine genauere Einordnung der in dieser Arbeit erhaltenen Resultate ermöglichen. Eine Strukturanalyse der Molekülkomplexe durch Röntgenkristallographie wäre ungeheuer hilfreich. Man kann jedoch auch hoffen, durch eine geeignete *bottom-to-top*-Strategie komplementäre Informationen zu erhalten, nämlich durch die Synthese funktioneller Peptidanaloga, welche die Bindedomäne des betreffenden Proteins nachbilden. Freilich versagt dieser Ansatz, wenn (wie bei ExpR) allosterische Effekte eine entscheidende Rolle spielen.

Um die komplexe Regulation der Galactoglucan-Biosynthese in *Sinorhizobium meliloti* in ihrer Gänze zu verstehen und dereinst vielleicht in einem systembiologischen Ansatz zu modellieren, sind noch viele Daten vonnöten. Diese Arbeit liefert einen ersten Beitrag dazu.



## Glossar

Abrisskraft	Rupture Force; auch Pull-Off Force oder Dissociation Force
AFM	Atomic Force Microscope, Rasterkraftmikroskop
AHL	Acyl-Homoserinlacton: Effektor der untersuchten ExpR-DNA-Wechselwirkung
APTES	3-Aminopropyl-triethoxysilan
$\beta$	Inverse Temperatur: $\beta = 1/(k_B T)$ mit $k_B T = 4.114 \text{ pN} \times \text{nm}$ bei 298 K ( $\sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$ )
bp	base pairs, Basenpaare: Ein Basenpaar entspricht etwa 0.34 nm Länge
BS <sup>3</sup>	bis(Sulfosuccinimidyl)suberat-Natriumsalz: Crosslinker
c	effektive Federkonstante bei der Kraftspektroskopie
Cantilever	Auslegerarm, Federbalken: Bestandteil eines AFM-Kraftsensors
Contact Mode	Kontaktmodus: AFM-Abbildungsmodus im repulsiven Bereich
Da	Dalton, Einheit des Molekulargewichtes: $1 \text{ Da} = 1 \text{ u} = 1.661 \times 10^{-27} \text{ kg}$
DFS	Dynamic Force Spectroscopy: Kraftspektroskopie unter Variation der Loading Rate
DNA	Desoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure: primärer Träger der Erbsubstanz
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay: Molekularbiologische Untersuchungsmethode
EPS	von <i>S. meliloti</i> synthetisierte Exopolysaccharide: (I) Succinoglycan, (II) Galactoglucan
<i>exp</i>	Galactoglucan-Biosynthesecuster auf dem Plasmid pSymB von <i>S. meliloti</i>
$F_a$	Abrisskraft einer Protein-DNA-Bindung
$F^*$	Wahrscheinlichster Wert einer Verteilung von Abrisskräften
G	Gibbsche freie Enthalpie: $G = H - TS$
$\Delta G$	Freie Reaktionsenthalpie
$\Delta G^0$	Freie Standard-Enthalpie
$\Delta H$	Reaktionsenthalpie
HTH	Helix-Turn-Helix: häufiges Bindemotiv regulatorischer Proteine in Prokaryonten
k	Federkonstante des Cantilevers nach dem Hookeschen Gesetz ( $F = -k x$ )
$k_B$	Boltzmann-Konstante: $k_B = 1.381 \times 10^{-23} \text{ J/K}$
kb	Kilobasen: gebräuchliche Einheit in der Genetik, siehe bp
$K_D$	Dissoziationskonstante [in M]: $K_D = k_{\text{off}} / k_{\text{on}}$
$k_{\text{off}}$	Off-Rate [in s <sup>-1</sup> ]: Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation
$k_{\text{on}}$	On-Rate [in M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]: Geschwindigkeitskonstante der Assoziation
Kraftsensor	Besteht aus Federbalken (Cantilever) und Spitze (Tip)
Lysin	2,6-Diamino-hexansäure: eine Aminosäure
Mica	Glimmer: Schichtsilikat, beliebtes Probensubstrat
MW	Molecular Weight, Molekulargewicht [in Da]

## Glossar

---

NHS-PEG-MAL	N-hydroxysuccinimid-poly(ethylenglycol)-maleimid: Crosslinker
PEG	Poly(ethylenglycol)
Piezo	Stellelement aus einer piezoelektrischen Keramik (Kurzform)
pSymB	Plasmid von <i>S. meliloti</i> , früher als Megaplasmid-2 bezeichnet
R	Molare Gaskonstante: $R = N_A k_B = 8.314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$
RNA	Ribonucleic Acid, Ribonukleinsäure
r	Loading Rate: $r = c v_z$
S	Entropie
SAM	Self-Assembled Monolayer
SEM	Scanning Electron Microscope: Rasterelektronenmikroskop
SFM	Scanning Force Microscope: andere Bezeichnung für ein AFM
S-Layer	Surface Layer, Oberflächenschicht: äußerste Zellwandschicht bei Bakterien
SNOM	Scanning Near-Field Optical Microscope, Optisches Nahfeld-Mikroskop
SPM	Scanning Probe Microscope, Rastersondenmikroskop
STM	Scanning Tunneling Microscope, Rastertunnelmikroskop
$\tau$	Mittlere Lebensdauer eines gebundenen Komplexes: $\tau = 1/k_{\text{off}}$
T	Temperatur
Tapping Mode	Dynamischer Modus: AFM-Abbildungsmodus, hauptsächlich im attraktiven Bereich
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan: Biochemischer Standardpuffer (pH 7-9)
$v_z$	Geschwindigkeit der AFM-Spitze beim Zurückziehen von der Probe
$\Delta\Psi$	Höhe der Dissoziations-Potentialbarriere

## Literaturverzeichnis

1. Chapman, A. England's Leonardo: Robert Hooke (1635-1703) and the art of experiment in Restoration England (1996); *Proceedings of the Royal Institution of Great Britain* **67**, 239-275.
2. Lee, G. U., Kidwell, D. A., und Colton, R. J. Sensing discrete streptavidin-biotin interactions with atomic force microscopy (1994); *Langmuir* **10**, 354-357.
3. Moy, V. T., Florin, E.-L., und Gaub, H. E. Adhesive forces between ligand and receptor measured by AFM (1994); *Colloids and Surfaces* **93**(A), 343-348.
4. Chilkoti, A., Boland, T., Ratner, B. D., und Stayton, P. S. The relationship between ligand binding thermodynamics and protein ligand interaction forces measured by atomic force microscopy (1995); *Biophys. J.* **69**(5), 2125-2130.
5. Florin, E.-L., Moy, V. T., und Gaub, H. E. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs (1994); *Science* **264**, 415-417.
6. Moy, V. T., Florin, E.-L., und Gaub, H. E. Intermolecular forces and energies in between ligands and receptors (1994); *Science* **266**, 257-259.
7. Merkel, R., Nassoy, P., Leung, A., Ritchie, K., und Evans, E. Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy (1999); *Nature* **397**, 50-53.
8. Hinterdorfer, P., Baumgartner, W., Gruber, H., Schilcher, K., und Schindler, H. Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy (1996); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3477-3481.
9. Dammer, U., Hegner, M., Anselmetti, D., Wagner, P., Dreier, M., Huber, W., und Güntherodt, H.-J. Specific antigen/antibody interactions measured by force microscopy (1996); *Biophys. J.* **70**, 2437-2441.
10. Allen, S., Chen, X., Davies, J., Davies, M. C., Dawkes, A. C., Edwards, J. C., Roberts, C. J., Sefton, J., Tendler, S. J. B., und Williams, P. M. Detection of antigen-antibody binding events with atomic force microscope (1997); *Biochemistry* **36**, 7457-7463.
11. Ros, R., Schwesinger, F., Anselmetti, D., Kubon, M., Schäfer, R., Plückthun, A., und Tiefenauer, L. Antigen binding forces of individually addressed single-chain Fv antibody molecules (1998); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7402-7405.

12. Dammer, U., Popescu, O., Wagner, P., Anselmetti, D., Güntherodt, H.-J., und Misevic, G. N. Binding strength between cell adhesion proteoglycans measured by atomic force microscopy (1995); *Science* **267**, 1173-1175.
13. Fritz, J., Katopodis, A. G., Kolbinger, F., und Anselmetti, D. Force-mediated kinetics of single P-selectin/ligand complexes observed by atomic force microscopy (1998); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12283-12288.
14. Evans, E., Leung, A., Heinrich, V., und Zhu, C. Mechanical switching and coupling between two dissociation pathways in a P-selectin adhesion bond (2004); *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**(31), 11281-11286.
15. Eckel, R., Ros, R., Decker, B., Mattay, J., und Anselmetti, D. Supramolecular Chemistry at the Single Molecule Level (2005); *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 484-488.
16. Bustamante, C. und Rivetti, C. Visualizing protein-nucleic acid interactions on a large scale with the scanning force microscope (1996); *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **25**, 395-429.
17. Hansma, H. G. Surface biology of DNA by atomic force microscopy (2001); *Annu. Rev. Phys. Chem.* **52**, 71-92.
18. Garcia, R. A., Bustamante, C. J., und Reich, N. O. Sequence-specific recognition of cytosine C5 and adenine N6 DNA methyltransferases requires different deformations of DNA (1996); *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**(15), 7618-7622.
19. van Noort, S. J., van der Werf, K. O., Eker, A. P., Wyman, C., de Grooth, B. G., van Hulst, N. F., und Greve, J. Direct visualization of dynamic protein-DNA interactions with a dedicated atomic force microscope (1998); *Biophys. J.* **74**, 2840-2849.
20. Jiao, Y., Cherny, D. I., Heim, G., Jovin, T. M., und Schäffer, T. E. Dynamic Interactions of p53 with DNA in Solution by Time-Lapse Atomic Force Microscopy (2001); *J. Mol. Biol.* **314**, 233-243.
21. Müller-Esterl, W. Biochemie (1. Auflage, 2004); Elsevier, München.
22. Brennan, R. G. und Matthews, B. W. Structural basis of DNA-protein recognition (1989); *TIBS* **14**, 286-290.
23. Riggs, A. D., Bourgeois, S., und Cohn, M. The lac receptor-operator interaction. III. Kinetic studies (1970); *J. Mol. Biol.* **53**, 401-417.
24. Berg, O. G., Winter, R. B., und von Hippel, P. H. Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids 1. Models and theory (1981); *Biochemistry* **20**, 6929-6948.
25. Bustamante, C., Guthold, M., Zhu, X. S., und Yang, G. L. Facilitated target location on DNA by individual Escherichia coli RNA polymerase molecules observed with the scanning force microscope operating in liquid (1999); *J. Biol. Chem.* **274**, 16665-16668.

26. Zhang, L.-H. und Dong, Y.-H. Quorum sensing and signal interference: diverse implications (2004); *Mol. Microbiol.* **53**(6), 1563-1571.
27. Eberhard, A., Burlingame, A. L., Eberhard, C., Kenyon, G. L., Nealson, K. H., und Oppenheimer, N. J. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase (1981); *Biochemistry* **20**, 2444-2449.
28. Bartels, F. W., Baumgarth, B., Anselmetti, D., Ros, R., und Becker, A. Specific Binding of the Regulatory Protein ExpG to Promoter Regions of the Galactoglucan Biosynthesis Gene Cluster of *Sinorhizobium meliloti* - A Combined Molecular Biology and Force Spectroscopy Investigation (2003); *J. Struct. Biol.* **143**, 145-152.
29. Stryer, L. Biochemie (4. Auflage, 1996); Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
30. Gonzalez, J. E., York, G. M., und Walker, G. C. *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides: synthesis and symbiotic function (1996); *Gene* **179**(1), 141-146.
31. Gonzalez, J. E., Reuhs, B. L., und Walker, G. C. Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa* (1996); *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**(16), 8636-8641.
32. Becker, A. und Pühler, A. Production of exopolysaccharides in The Rhizobiaceae. Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria. (1998); Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, .
33. Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Pühler, A., Abola, P. et al. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* (2001); *Science* **293**(5530), 668-672.
34. Rüberg, S., Pühler, A., und Becker, A. Biosynthesis of the exopolysaccharide galactoglucan in *Sinorhizobium meliloti* is subject to a complex control by the phosphate-dependent regulator PhoB and the proteins ExpG and MucR (1999); *Microbiology* **145**, 603-611.
35. Becker, A., Rüberg, S., Küster, H., Roxlau, A., Keller, M., Ivashina, T., Cheng, H.-P., Walker, G. C., und Pühler, A. The 32-kilobase *exp* gene cluster of *Rhizobium meliloti* directing the biosynthesis of galactoglucan: genetic organization and properties of the encoded gene products (1997); *J. Bacteriology* **179**(4), 1375-1383.
36. Metzendorf, C. Molecular Characterization of ExpR, a LuxR-Type Regulator Involved in Regulation of EPSII Production in *Sinorhizobium meliloti* (Diplomarbeit), Universität Bielefeld, 2005.
37. Marketon, M. M., Gronquist, M. R., Eberhard, A., und Gonzalez, J. E. Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* *sinR/sinI* locus and the production of novel N-acyl homoserine lactones (2002); *J. Bacteriol.* **184**(20), 5686-5695.
38. Marketon, M. M. und Gonzalez, J. E. Identification of two quorum-sensing systems in *Sinorhizobium meliloti* (2002); *J. Bacteriol.* **184**, 3466-3475.

39. Bartels, F. W., Metzendorf, C., McIntosh, M., Plattner, P., Sewald, N., Anselmetti, D., Ros, R., und Becker, A. (2005); (*in preparation*)
40. Israelachvili, J. N. Intermolecular and surface forces (2. Auflage, 1992); Academic Press, London.
41. Leckband, D. The surface force apparatus - a tool for probing molecular protein interactions (1995); *Nature* **376**, 617-618.
42. Evans, E., Berk, D., und Leung, A. Detachment of agglutinin-bounded red blood cells. I. Forces to rupture molecular-point attachments (1991); *Biophys. J.* **59**, 838-848.
43. Smith, S. B., Finzi, L., und Bustamante, C. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads (1992); *Science* **258**, 1122-1126.
44. Svoboda, K. und Block, S. M. Biological applications of optical forces (1994); *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**, 247-285.
45. Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C., und Weibel, E. Tunneling through a controllable vacuum gap (1982); *Appl. Phys. Lett.* **40**, 178-180.
46. Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C., und Weibel, E. Surface studies by scanning tunneling microscopy (1982); *Phys. Rev. Lett.* **49**, 57-61.
47. Pohl, D. W., Denk, W., und Lanz, M. Optical Stethoscopy: Image recording with resolution  $\lambda/20$  (1984); *Appl. Phys. Lett.* **44**, 651-653.
48. Binnig, G., Quate, C. F., und Gerber, C. Atomic Force Microscope (1986); *Phys. Rev. Lett.* **56**(9), 930-933.
49. Meyer, G. und Amer, N. M. Simultaneous measurement of lateral and normal force with an optical-beam-deflection atomic force microscope (1990); *Appl. Phys. Lett.* **57**(20), 2089-2091.
50. Meyer, G. und Amer, N. M. Novel optical approach to atomic force microscopy (1988); *Appl. Phys. Lett.* **53**(12), 1045-1047.
51. Tamayo, J. und Garcia, R. A. Deformation, contact time, and phase contrast in tapping mode scanning force microscopy (1996); *Langmuir* **12**, 4430-4435.
52. Hansmeier, N., Bartels, F. W., Ros, R., Anselmetti, D., Tauch, A., Pühler, A., und Kalinowski, J. Classification of hyper-variable *Corynebacterium glutamicum* surface-layer proteins by sequence analyses and atomic force microscopy (2004); *J. Biotechnol.* **112**, 177-193.
53. Grigg, D. A., Russell, P. E., und Griffith, J. E. Tip-sample forces in scanning probe microscopy in air and vacuum (1992); *J. Vac. Sci. Technol. A* **10**, 680-683.

54. Neumeister, J. M. und Ducker, W. A. Lateral, normal, and longitudinal spring constants of atomic force microscopy cantilevers (1994); *Rev. Sci. Instr.* **64**, 2527-2531.
55. Gibson, C. T., Watson, G. S., und Myhra, S. Determination of the spring constants of probes for force microscopy/spectroscopy (1996); *Nanotechnology* **7**(3), 259-262.
56. Cleveland, J. P., Manne, S., Bocek, D., und Hansma, P. K. A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy (1993); *Rev. Sci. Instr.* **64**(2), 403-405.
57. Hutter, J. L. und Bechhoefer, J. Calibration of atomic-force microscope tips (1993); *Rev. Sci. Instr.* **7**, 1868-1873.
58. Müller, D. J., Amrein, M., und Engel, A. Adsorption of biological molecules to a solid support for scanning probe microscopy (1997); *J. Struct. Biol.* **119**, 172-188.
59. Wagner, P., Hegner, M., Kernen, P., Zaugg, F., und Semenza, G. Covalent immobilization of native biomolecules onto au(111) Via n hydroxysuccinimide ester functionalized self assembled monolayers for scanning probe microscopy (1996); *Biophys. J.* **70**(5), 2052-2066.
60. Bhatia, S. K., Shriver-Lake, L. C., Prior, K. J., Georger, J. H., Calvert, J. M., Bredehorst, R., und Ligler, F. S. Use of Thiol-Terminal Silanes and Heterobifunctional Crosslinkers for Immobilization of Antibodies on Silica Surfaces (1989); *Anal. Biochem.* **178**, 408-413.
61. Evans, E. und Ritchie, K. Dynamic strength of molecular adhesion bonds (1997); *Biophys. J.* **72**(4), 1541-1555.
62. Arrhenius, S. Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei Inversion von Rohrzucker durch Säuren (1889); *Zeitschr. für phys. Chem.* **4**, 226-248.
63. Eyring, H. The activated complex in chemical reactions (1935); *J. Chem. Phys.* **3**, 107-115.
64. Kramers, H. A. Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions (1940); *Physica* **7**(4), 284-304.
65. Bell, G. I. Models for the specific adhesion of cells to cells (1978); *Science* **200**(12 May), 618-627.
66. Hänggi, P., Talkner, P., und Borkovec, M. Reaction-rate theory: fifty years after Kramers (1990); *Rev. Mod. Phys.* **62**(2), 251-341.
67. Merkel, R. Force spectroscopy on single passive biomolecules and single biomolecular bonds (2001); *Physics Reports* **346**, 343-385
68. Evans, E. Probing the relation between force-lifetime-and chemistry in single molecular bonds (2001); *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30**, 105-128.

69. Evans, E. Energy landscapes of biomolecular adhesion and receptor anchoring at interfaces explored with dynamic force spectroscopy (1998); *Faraday Discuss.* **111**, 1-16.
70. Strunz, T., Oroszlan, K., Schumakovitch, I., Guntherodt, H., und Hegner, M. Model energy landscapes and the force-induced dissociation of ligand-receptor bonds (2000); *Biophys. J.* **79**(3), 1206-1212.
71. Berquand, A., Xia, N., Castner, D. G., Clare, B. H., Abbott, N. L., Dupres, V., Adriaensen, Y., und Dufrène, Y. Antigen binding forces of single antilysozyme Fv fragments explored by atomic force microscopy (2005); *Langmuir* **21**, 5517-5523.
72. Friedsam, C., Wehle, A. K., Kühner, F., und Gaub, H. E. Dynamic single-molecule force spectroscopy: bond rupture analysis with variable spacer length (2003); *J. Phys.: Condens. Matter* **15**, 1709-1723.
73. Rief, M., Fernandez, J. M., und Gaub, H. E. Elastically coupled two-level systems as a model for biopolymer extensibility (1998); *Phys. Rev. Lett.* **81**(21), 4764-4767.
74. Braun, O., Hanke, A., und Seifert, U. Probing molecular free energy landscapes by periodic loading (2004); *Phys. Rev. Lett.* **93**(15), 158105-1-158105-4.
75. Heymann, B. und Grubmüller, H. Dynamic force spectroscopy of molecular adhesion bonds (2000); *Phys. Rev. Lett.* **84**(26), 6126-6129.
76. Evstigneev, M. und Reimann, P. Dynamic force spectroscopy: Optimized data analysis (2003); *Phys. Rev. E* **68**, 045103-1-045103-4.
77. Raible, M., Evstigneev, M., Reimann, P., Bartels, F. W., und Ros, R. Theoretical analysis of dynamic force spectroscopy experiments (2004); *J. Biotechnol.* **112**, 13-23.
78. Baumgarth, B., Bartels, F. W., Anselmetti, D., Becker, A., und Ros, R. Detailed studies of the binding mechanism of the *Sinorhizobium meliloti* transcriptional activator ExpG to DNA (2005); *Microbiology* **151**, 259-268.
79. Eckel, R., Wilking, S. D., Becker, A., Sewald, N., Ros, R., und Anselmetti, D. Single Molecule Experiments in Synthetic Biology – A New Approach for the Affinity Ranking of DNA-binding Peptides (2005); *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 3921-3924.
80. Nguyen-Duong, M., Koch, K. W., und Merkel, R. Surface anchoring reduces lifetime of single specific bonds (2003); *Europhys. Lett.* **61**(6), 845-851.
81. Raible, M., Reimann, P., Evstigneev, M., Bartels, F. W., Eckel, R., Ros, R., Anselmetti, D., und Merkel, R. (2005); (*in preparation*)
82. Kühner, F., Costa, L. T., Bisch, P. M., Thalhammer, S., Heckl, W. M., und Gaub, H. E. LexA-DNA bond strength by single molecule force spectroscopy (2004); *Biophys. J.* **87**(4), 2683-2690.



83. Möller, C., Allen, M., Eilings, V., Engel, A., und Müller, D. J. Tapping-Mode Atomic Force Microscopy Produces Faithful High-Resolution Images of Protein Surfaces (1999); *Biophys. J.* **77**, 1150-1158.
84. Lysetska, M., Boehringer, D., Hey, T., Krauss, G., und Krausch, G. UV light-damaged DNA and its interaction with human replication protein A: an atomic force microscopy study (2002); *Nucleic Acids Res.* **30**(12), 2686-2691.
85. Ros, R. Kraftmessungen an einzelnen Antikörpermolekülen (Dissertation), Universität Basel, 2000.
86. Eckel, R. Messung und Simulation der mechanischen Elastizität einzelner DNA-Ligand-Komplexe (Diplomarbeit), Universität Bielefeld, 2002.
87. Oesterhelt, F., Rief, M., und Gaub, H. E. Single molecule force spectroscopy by AFM indicates helical structure of poly(ethylene-glycol) in water (1999); *New J. Phys.* **1**, 6.1-6.11.
88. Hansma, H. G. und Laney, D. E. Dna binding to mica correlates with cationic radius: Assay by atomic force microscopy (1996); *Biophys. J.* **70**(4), 1933-1939.
89. Baumgarth, Birgit, persönliche Mitteilung (2001).
90. Becker, J. D., Moreira, L. M., Kapp, D., Frosch, S. C., Puhler, A., und Perlic, A. M. The nodulin vnfENOD18 is an ATP-binding protein in infected cells of *Vicia faba* L. nodules (2001); *Plant Mol Biol* **47**(6), 749-59.
91. Baumgarth, B. Molekularbiologische Charakterisierung des ExpG-Proteins aus *Sinorhizobium meliloti* und Untersuchungen zur komplexen Regulation der *exp*-Genexpression durch MucR, PhoB und ExpG (Dissertation), Universität Bielefeld, 2004.
92. Scipioni, A., Zuccheri, G., Anselmi, C., Bergia, A., Samori, B., und De Santis, P. Sequence-dependent DNA dynamics by scanning force microscopy time-resolved imaging (2002); *Chemistry & Biology* **9**, 1315-1321
93. Hinterdorfer, P., Schilcher, K., Baumgartner, W., Gruber, H., und Schindler, H. A mechanistic study of the dissociation of individual antibody-antigen pairs by atomic force microscopy (1998); *Nanobiology* **4**, 177-188.
94. Bartels, F. W. Rasterkraftmikroskopie und Kraftspektroskopie an einzelnen Biomolekülen (Diplomarbeit), Universität Bielefeld, 2002.
95. Becker, Anke, persönliche Mitteilung (2005).
96. Koch, S. J. und Wang, M. D. Dynamic force spectroscopy of protein-DNA interactions by unzipping DNA (2003); *Phys. Rev. Lett.* **91**(2), 208103-1-208103-4.

## Danksagung

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

Zunächst möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei den Kooperationspartnern aus anderen Arbeitsgruppen zu bedanken, ohne deren Einsatz die vorgestellten Experimente nicht möglich gewesen wären:

- Am Lehrstuhl für Genetik geht mein Dank an Christoph Metzendorf, Dr. Matthew McIntosh, PD Dr. Anke Becker und vor allem Dr. Birgit Baumgarth für die seit Jahren ungebrochen gute Zusammenarbeit bei den Protein-DNA-Wechselwirkungsexperimenten.
- In der Theoretischen Physik sind dagegen Dr. Martin Raible, Dr. Mykhaylo Evstigneev und Prof. Dr. Peter Reimann zu nennen, die sich um die Analyse der Kraftspektroskopiedaten verdient gemacht haben.
- Patrik Plattner aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Norbert Sewald bin ich für die chemische Synthese der AHL-Effektoren zu Dank verpflichtet.
- Und schließlich danke ich noch Dr. Jörn Kalinowski und Nicole Hansmeier für die tollen S-Layer-Proben und manches erhellende Gespräch im Rahmen jener Studien, die nach meiner Diplomarbeit im Wesentlichen von anderen fortgeführt wurden.

Der gesamten Arbeitsgruppe Experimentelle Biophysik und Angewandte Nanowissenschaften möchte ich für die immer wieder gerne in Anspruch genommene Hilfsbereitschaft und manch lustige Stunde danken, ganz besonders aber Herrn PD Dr. Robert Ros, der diese Arbeit als Projektleiter von Anfang an engagiert und aufmerksam begleitet hat.

Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti habe ich nicht nur für die Gelegenheit zu danken, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren, sondern auch für seinen Optimismus und die konstruktive Kritik, mit denen er wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen hat.

Ich möchte ferner Christoph Pelargus, Jörg Martini und Volker Walhorn für Rat in technischen Fragen danken, der mechanischen Werkstatt der Physik-Fakultät für das Stanzen aberhunderter Probenplättchen und die Geduld, mit der man dort AFM-Flüssigmesszellen repariert hat, Gabi Krome als guten Geist in vielen Dingen, Wibke Hellmich für das Organisieren anfallender Events, Tobias Kahre für manch originelle Einsicht, Kai Leffhalm für das Radio und ganz besonders Rainer Eckel für die vielen anregenden Gespräche im Zeichen der Myrmidonen.

Philipp Schumann, Björn Berghausen, Andree Hachmann, Florian Mlodoch, Tonja Mlodoch, Sebastian Prante, Jens-Daniel Georgi und Michaela Quante schulde ich Dank für treue Freundschaft.

Mein abschließender Dank indessen gilt meinen Eltern, die mich insbesondere während des „Endspurts“ nach allen Kräften unterstützt haben.

# Anhang

## Wissenschaftliche Publikationen

1. F.W. Bartels, B. Baumgarth, D. Anselmetti, R. Ros und A. Becker “Specific Binding of the Regulatory Protein ExpG to Promoter Regions of the Galactoglucan Biosynthesis Gene Cluster of *Sinorhizobium meliloti* - A Combined Molecular Biology and Force Spectroscopy Investigation”, *Journal of Structural Biology* 143 (2003), 145-152.
2. R. Ros, R. Eckel, F. Bartels, A. Sischka, B. Baumgarth, S. D. Wilking, A. Pühler, N. Sewald, A. Becker und D. Anselmetti “Single molecule force spectroscopy on ligand–DNA complexes: from molecular binding mechanisms to biosensor applications“, *Journal of Biotechnology* 112 (2004), 5-12.
3. M. Raible, M. Evstigneev, P. Reimann, F.W. Bartels und R. Ros “Theoretical analysis of dynamic force spectroscopy experiments on ligand–receptor complexes“, *Journal of Biotechnology* 112 (2004), 13-23.
4. N. Hansmeier, F.W. Bartels, R. Ros, D. Anselmetti, A. Tauch, A. Pühler und J. Kalinowski “Classification of hyper-variable *Corynebacterium glutamicum* surface-layer proteins by sequence analyses and atomic force microscopy“, *Journal of Biotechnology* 112 (2004), 177-93.
5. B. Baumgarth, F.W. Bartels, D. Anselmetti, A. Becker und R. Ros “Detailed studies of the binding mechanism of the *Sinorhizobium meliloti* transcriptional activator ExpG to DNA“, *Microbiology-SGM* 151 (2005), 259-268.

Weitere Veröffentlichungen, in denen Teile dieser Arbeit dargestellt werden, sind derzeit in Vorbereitung.

## Konferenzbeiträge

1. F.W. Bartels, N. Hansmeier, R. Ros, M. Panhorst, H. Brückl, J. Kalinowski, D. Anselmetti “Atomic force microscopy on bacterial surface layers”, *Scanning Probe Microscopies and Organic Materials X & Nanotechnology in Biology, Medicine and Pharmacy I*, 8.-9. Oktober 2001, Kaiserslautern, Deutschland (Poster).
2. R. Ros, F.W. Bartels, B. Baumgarth, A. Becker, A. Pühler, D. Anselmetti “Specific Binding of Single Regulatory Proteins to DNA”, *WE-Heraeus-Seminar* 282, 18.-21. Juni 2002, Bad Honnef, Deutschland (Poster).

3. F.W. Bartels, R. Ros, B. Baumgarth, A. Becker, A. Pühler, D. Anselmetti “Specific Binding of Regulatory Proteins to DNA”, Scanning Probe Microscopies and Organic Materials XI, 22.-24. September 2002, Kassel, Deutschland (Vortrag).
4. R. Ros, F.W. Bartels, B. Baumgarth, A. Becker, A. Pühler und D. Anselmetti “Specific Binding of Regulatory Proteins to DNA: A Combined Ensemble and Single Molecule Investigation”, 47th Annual Meeting of the Biophysical Society, 1.-5. März 2003, San Antonio, Texas, USA (Vortrag).
5. F.W. Bartels, B. Baumgarth, D. Anselmetti, R. Ros, A. Becker “Specific Binding of a Regulatory Protein to DNA: An AFM Force Spectroscopy Investigation”, 12<sup>th</sup> International Conference on Scanning Tunneling Microscopy/Spectroscopy and Related Techniques, 21.-25. Juli 2003, Eindhoven, Niederlande (Poster).
6. F.W. Bartels, R. Ros, B. Baumgarth, A. Becker, A. Pühler, D. Anselmetti “Atomic Force Microscopy and Spectroscopy of Specific Protein-DNA Interaction”, Scanning Probe Microscopies and Organic Materials XII, 24.-26. September 2002, Mainz, Deutschland (Vortrag).
7. F.W. Bartels, B. Baumgarth, A. Becker, R. Ros, D. Anselmetti “Atomic Force Microscopy and Spectroscopy of Specific Protein-DNA Interaction”, DPG-Frühjahrstagung des AK Festkörperphysik, Symposium „Life Sciences on the Nanometer Scale – Physics Meets Biology“, 8.-12. März 2004, Regensburg, Deutschland (Vortrag).
8. F.W. Bartels, B. Baumgarth, D. Anselmetti, A. Pühler, A. Becker, R. Ros “Atomic Force Microscopy and Spectroscopy of Specific Protein-DNA Interaction”, Scanning Probe Microscopies and Organic Materials XIII, 06.-08. September 2004, Bielefeld, Deutschland (Poster).
9. F.W. Bartels, B. Baumgarth, C. Bahlawane, C. Metzendorf, A. Becker, D. Anselmetti und R. Ros “Molecular Details of Specific Protein-DNA Interaction“, DPG-Frühjahrstagung des AK Biologische Physik, 4.-9. März 2005, Berlin, Deutschland (Vortrag).