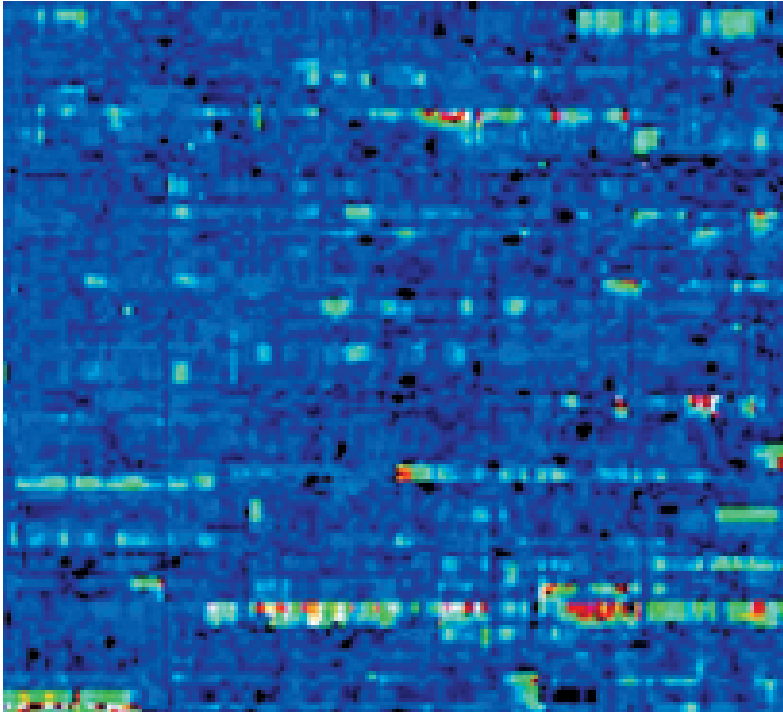


»Small is beautiful«

Bioforschung in der Nanowelt

Von Ali Tinazli und Robert Tampé



Im Zuge der steigenden Bedeutung der Proteomforschung und der »Molekularisierung« der Medizin werden neue, effizientere Plattformen zur Untersuchung von Proteinen und deren Wechselwirkungen notwendig. Hier bietet die Nanotechnologie, eine Wissenschaft mit Ursprüngen in der Physik und der Halbleiterindustrie, attraktive Lösungsperspektiven. Ein Bereich der Forschung am Institut für Biochemie der Universität Frankfurt um Prof. Dr. Robert Tampé widmet sich den Aspekten der Nanotechnologie zur Entwicklung von Protein-Chips für die Proteomforschung und Erzeugung von Mustern im Kleinstformat.

DNA-Chips zur funktionellen Genomanalyse werden seit einigen Jahren erfolgreich in der Bio- und Pharmaforschung eingesetzt. Zur Klärung essenzieller Fragen auf der Ebene des Proteoms sind jedoch Protein-Chips mit immobilisierten Proteinen erforderlich. Ein Teil der Nanobiotechnologie ist die Entwicklung nanoskaliger Protein-Chips zur effizienten Durchführung von Protein-Interaktionsanalysen.

»There's Plenty of Room at the Bottom«

Richard Feynman Vordenker der Nanotechnologie, 1959.

In der von uns wahrgenommenen Welt sind uns Objekte am vertrautesten, die unserem eigenen Größenmaßstab entsprechen. So können wir Objekte bis zu einer Größe von 0,1 Millimeter mit bloßem Auge mühelos erkennen, zum Beispiel einzelne Härchen. Für kleinere Objekte, wie etwa einzelne Zellen oder Zellkompartimente, reicht die Auflösung des menschlichen Auges jedoch nicht aus; wir benötigen Lichtmikroskope zur Abbildung dieser Strukturen. Die Auflösungsgrenze für Lichtmikroskope liegt aus physikalischen Gründen bei etwa einem Mikrometer, dies entspricht dem Hundertstel der Dicke eines Haares. Zur Abbildung von Molekülkomplexen oder einzelnen Molekülen, deren Dimensionen sich im Nanometermaßstab befinden und somit dem 100 000sten Teil eines Härchens entsprechen, bedarf es anderer Techniken als der Lichtmikroskopie. Hier sind in den vergangenen zwei Dekaden neue Mikroskopietechniken entstanden, die sowohl Abbildung als auch Kontrolle über einzelne Moleküle ermöglichen. Die von Gerd Binnig (Nobelpreis für Physik, 1986) und Kollegen in den 1980er Jahren bei IBM entwickelte Rastersondenmikroskopie öffnete die Tür in die Nanowissenschaften und markiert hiermit einen Meilenstein der Nanotechnologie. Ein in den Biowissenschaften immer wichtiger werdendes Instrument ist hierbei das Rasterkraftmikroskop **1**.

»Think small!« ist ein technologischer Anspruch, der die Welt verändert hat. Die Entwicklung der Mikroelek-

tronik – vom Transistor bis zu Mikroprozessoren und Speicherchips – gipfelt in einer Fülle von Produkten der Informationstechnologie (IT). Die gesamte Mikroelektronik stützt sich auf Routineverfahren, mit denen sich feine Strukturen bis zu einem zehntel Mikrometer Dicke herstellen lassen. Die Untergrenze liegt hier also bei wenig mehr als hundert Nanometern und grenzt an die Nanotechnologie. Verglichen mit den Gegenständen des Alltags ist das eine winzige Größenordnung, und doch nutzen wir tagtäglich Computer, MP3-Spieler, CD/DVD-Systeme oder Handys, in denen elektronische Komponenten durch Ergebnisse der Nanotechnologie optimiert wurden und die unser Leben hiermit bereits direkt beeinflussen. Die Nanotechnologien wirken jedoch nicht nur in der Halbleiter- und IT-Branche, sondern haben das Potenzial, auch die Biowissenschaften in Zukunft nachhaltig zu verändern.

Ähnlich den Mikroprozessoren in der Elektronik werden nanoskalige Protein-Chips für bioanalytische Funktionen die Produktivität und Effizienz in den Biowissenschaften in Zukunft maximieren, insbesondere bei der Analyse von Proteinen beziehungsweise Protein-Protein-Interaktionen. Bei diesen Verfahren wird ein Kontrollprotein, beispielsweise ein Antikörper oder Zellrezeptor, auf der Chip-Oberfläche immobilisiert und nach Zugabe von verschiedenen Liganden (Interaktionspartnern) auf Bindungsereignisse hin untersucht.

Vor allem in der Proteomforschung und der Wirkstoffsuche (»Proteomics«/»Pharmakoproteomics«), bei der Tausende von Proteinen auf mögliche Interaktionspartner hin überprüft werden, besteht ein enormer Bedarf, die Ausbeute und Wirtschaftlichkeit dieser Methoden zu steigern. Die Nachfrage nach schnell durchführbaren Funktionstests mit verschiedenen Kontrollproteinen sowie häufig geringen Analytmengen in der medizinischen Diagnostik und Wirkstoffforschung begründet die rasche Weiterentwicklung nanoskaliger Protein-Chips.

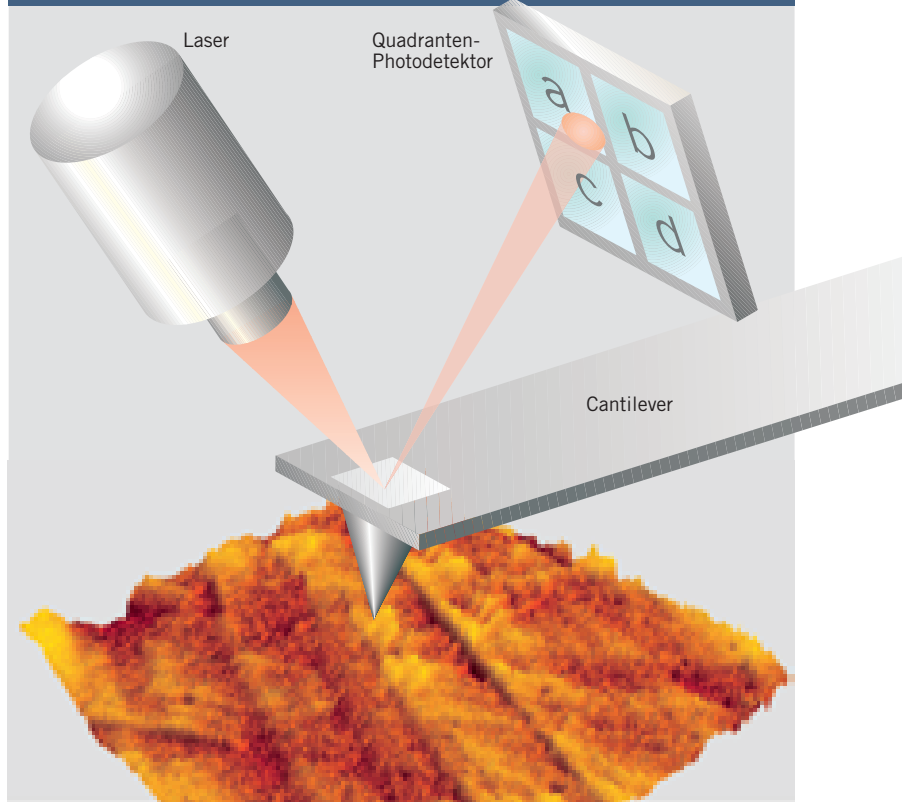
Allerdings lassen sich Proteine, im Gegensatz zu den bereits seit Jahren etablierten DNA-Chips, nicht ohne weiteres auf festen Trägern immobilisieren. Proteine reagieren im Vergleich zur DNA äußerst empfindlich auf ihre Umwelt und können sehr leicht denaturieren, wodurch ihre Funktion zerstört wird. Schonende Wege zur Protein-Immobilisierung sind daher die entscheidende Voraussetzung für die Entwicklung von Protein-Chips. Außerdem sollen im Idealfall ausschließlich die erwünschten Proteine dicht gepackt und funktional an die Chip-Oberfläche binden. Zusätzlich ist – aus Gründen der Wirtschaftlichkeit – eine Regenerierung der Chip-Oberflächen wünschenswert, die es ermöglicht, ein und denselben Chip mehrmals zu verwenden. Die Art der Bindung, mit der das Protein an der Oberfläche immobilisiert wird, soll also reversibel sein. Um den verschiedenen Anforderungen bei der Chipentwicklung gerecht zu werden, ist ein kombinierter Ansatz aus den Bereichen Physik, Chemie und Biologie nötig. Eine neue Disziplin entsteht: die Nanobiotechnologie ¹¹.

Gebunden auf Gold

Chip-Oberflächen zur Immobilisierung von Proteinen können aus Silizium, Siliziumoxiden oder Gold hergestellt werden. Goldoberflächen bieten den Vorteil, dass sie außerordentlich flach (ultraflach) präpariert werden können. Außerdem lassen sich durch chemische Modifikationen mit Alkyl-Thiolen Plattformen mit fast beliebigen Eigenschaften herstellen. Alkyl-Thiole sind schwefelhaltige organisch-synthetische Moleküle, die spontan mit Goldoberflächen reagieren und selbstorganisierende, hochgeordnete, mono-molekulare Schichten (»Self-Assembled Monolayer«, SAM) ausbilden ¹². Mit Hilfe dieser spontanen Selbst-Organisation von Molekülen zu komplexeren Verbänden verfügt der Chemiker über ein potentes Mittel, über nanoskopische Entitäten mesoskopische Strukturen aufzubauen. In dieser mono-molekularen Schicht sind die Moleküle fast vertikal ausgerichtet und zeigen ein frei zugängliches Ende, das die Eigenschaft der Goldoberfläche bestimmt. Daran können so genannte »funktionelle Gruppen« fixiert sein, wie zum Beispiel die Gruppierung »N-Nitrilo-Triacetic Acid« (NTA), die Proteine spezifisch erkennt und diese an die Oberfläche bindet ^{3, 4, 5} **2**. Die Besonderheit dieser funktionellen Gruppe ist die Metall-Ionen-abhängige Schaltbarkeit der Protein-Bindung. Erst nach Aktivierung dieser NTA-Gruppe mit Nickel-Ionen werden Proteine nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip erkannt und gebunden. Diese funktionelle Einheit stellt eine selektive, molekulare Pinzette dar, die ihre »Greifer« nur in Gegenwart des »richtigen« Proteins »schließt«. Erkennt werden ausschließlich Proteine, die durch einen rekombinanten Eingriff – quasi als Markierung – eine kurze Aminosäuresequenz von Histi-

dinen, einen so genannten His-Tag, tragen. Dieser His-Tag wird weltweit in allen Biochemielabors zur Proteinaufreinigung eingesetzt und ist somit nahezu universell. Die Eleganz dieser Bindung ist ihre Orientierung und Reversibilität: Die immobilisierten Proteine besitzen eine präzise definierte Ausrichtung und können »nach Gebrauch« von der Oberfläche wieder schonend entfernt werden. Diese Reversibilität wird durch Zugabe von Substanzen, die mit den Proteinen um die Bindungsstelle konkurrieren (Imidazol) oder Komplexbildnern (EDTA) erreicht, die die Nickel-Ionen abfangen und dadurch die Bindung des Proteins an die Oberfläche auflö-

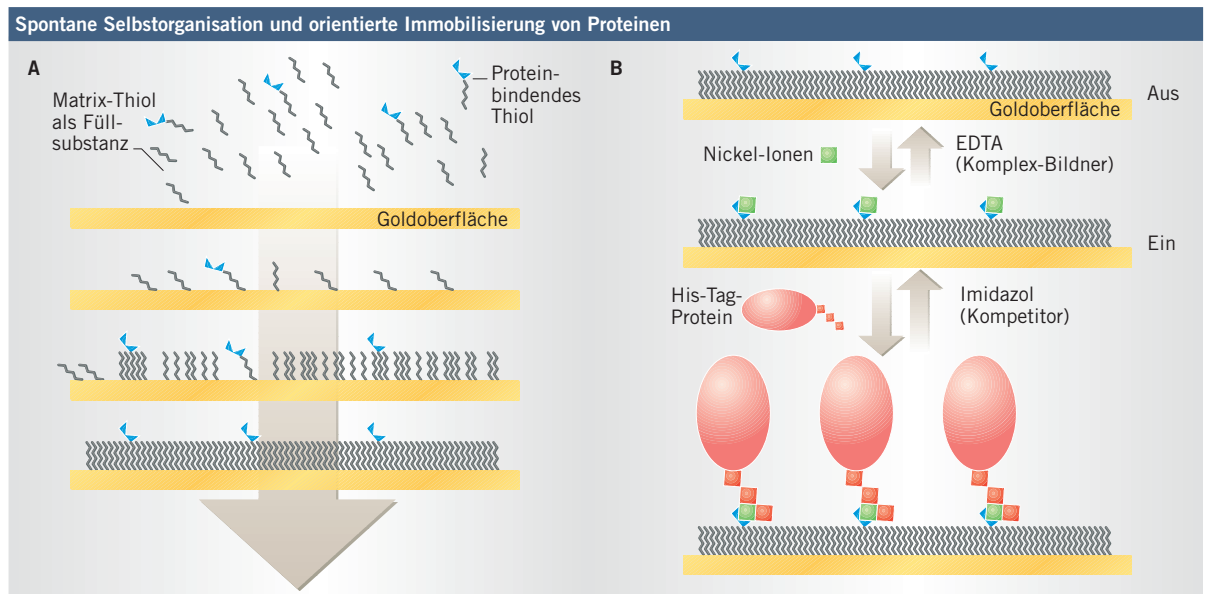
Rasterkraftmikroskop während der Messung einer ultraflachen Goldoberfläche



1 Das Arbeits-
ähnelt dem des
Plattenspielers:
mit einer pyramiden-
der Regel zwei bis
messer – sitzt am Ende
sich auf und ab bewegt, wenn
Tiefen der Probenoberfläche
von der Steuereinheit ausgewertet wird. So können noch Höhenunterschiede, die kleiner
als die Abmessung der Sonde, gemessen werden. Die Probenoberfläche wird
während der Messung hin und her bewegt und sukzessive von der Spitze förmlich
abgetastet (gerastert). Für diese Bewegungen im Nano- bis Mikrometerbereich werden
piezoelektrische Bauteile verwendet, die uns auch aus Ski-Ausrüstungen oder
E-Gitarren geläufig sind. Dieses Piezo-Element (Piezo-Scanner) wird durch Span-
nungssignale zu winzigen Längenänderungen angeregt. Damit lassen sich nun Be-
wegungen erzeugen, deren Schrittweiten nicht einmal ein hundertstel Nanometer
betragen. Die Abbildung zeigt ein Rasterkraftmikroskop während der Messung einer
ultraflachen Goldoberfläche. Zu erkennen sind Reliefstrukturen in der Morphologie
der Oberfläche. Die durchschnittliche Höhendifferenz beträgt in dieser Fläche etwa
0,2 Nanometer. Übertragen auf unsere makroskopische Welt würde dies bedeuten,
dass eine Ebene von 3 x 3 Metern nur eine Höhenabweichung von 0,2 mm aufweist.
Proteine haben eine Größe von wenigen Nanometern. Daher darf die Oberflächen-
morphologie des Chips keine Verwerfungen aufzeigen, die größer als die darauf be-
findlichen Proteine sind. Je ebener die Oberfläche ist, umso besser lassen sich
einzelne Proteine abbilden.

prinzip
guten alten
Eine kleine Sonde –
förmigen Spitze – in
dreißig Nanometern Durch-
eines Auslegers (Cantilever), der
sie sukzessive über die Höhen und
fährt. Diese Auslenkung wird mit einem
einem Photodetektor aufgefangen und von

2 Alkyl-Thiole reagieren spezifisch mit Gold und bilden selbstorganisierende, mono-molekulare Schichten (A). Durch ihren Einsatz können diese Schichten spezifisch Proteine binden. Der Bindungsprozess ist durch die Zugabe von Imidazol oder EDTA umkehrbar (B).

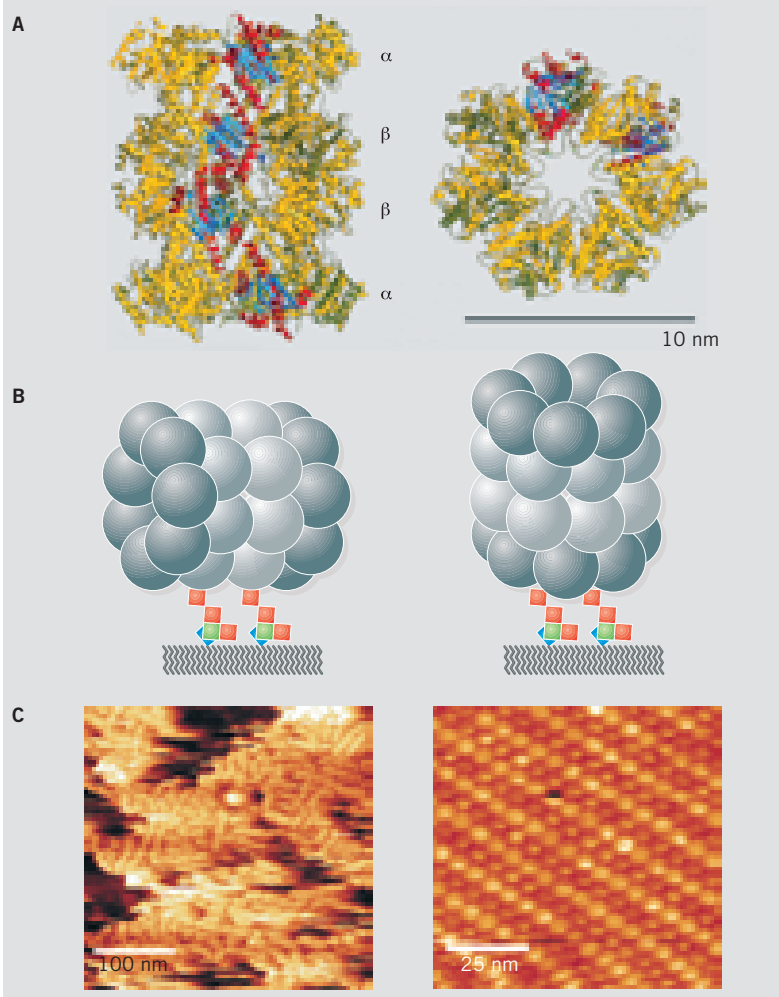


sen. Damit sich die NTA-Gruppen nicht gegenseitig behindern, wird dieser mono-molekularen Schicht eine zweite selbstorganisierende Verbindung beigemischt, die als Füllsubstanz (»Matrix«) dient, das Matrixthiol. Beide Verbindungen, sowohl das NTA-Thiol als auch das Matrixthiol, minimieren die unspezifische Bindung von Proteinen, das heißt die Bindungen, die nicht über den His-Tag der rekombinanten Proteine erfolgen.

Als Testprotein in der Entwicklung der Protein-Chip-Oberflächen dient das so genannte 20S Proteasom, ein zylindrischer Proteinkomplex mit Ausmaßen von 11 x 15 Nanometern, der in fast allen Lebewesen vorkommt ^{16/}. Das Proteasom bildet ein Nano-Kompartiment in der Zelle für die Beseitigung nicht (mehr) erwünschter Proteine (Proteolyse). Aufgrund dieser proteolytischen Eigenschaft kann man das Proteasom auch als »Nano-Reißwolf« der Zelle bezeichnen. Durch die Positionierung der His-Tags ist es möglich, die Ausrichtung dieser molekularen Maschine auf der Chip-Oberfläche zu bestimmen ^{17, 8, 9/}. Die Kontrollierbarkeit der Protein-Orientierung ist insofern essenziell, weil nur so gewährleistet werden kann, dass das aktive Zentrum des Proteins – in diesem Fall der Hohlraum des Zylinders – auch nach der Bindung an die Oberfläche noch frei zugänglich für Substrate und somit auch voll funktionstüchtig bleibt.

Mit Hilfe einer Variante der Rasterkraftmikroskopie, der chemischen Kraftmikroskopie (»Chemical Force Microscopy«), ist es möglich, die Bindungsaffinität zwischen der Chip-Oberfläche und der chemisch funktionalisierten Spitze des Rasterkraftmikroskops genau zu untersuchen ^{10/}. Hierzu wird die Spitze des Rasterkraftmikroskops chemisch so modifiziert, zum Beispiel mit His-Tags, dass sie Protein-bindende Stellen von nicht-bindenden unterscheiden kann. Die Spitze hat nun ein »chemisches Auge« und »sieht« das, was auch das Protein »sieht«. Mit dieser Methode kann man überprüfen, in welchem Zustand (»ein«/»aus«) sich die biochemischen Pinzetten des Protein-Chips befinden ^{4/}.

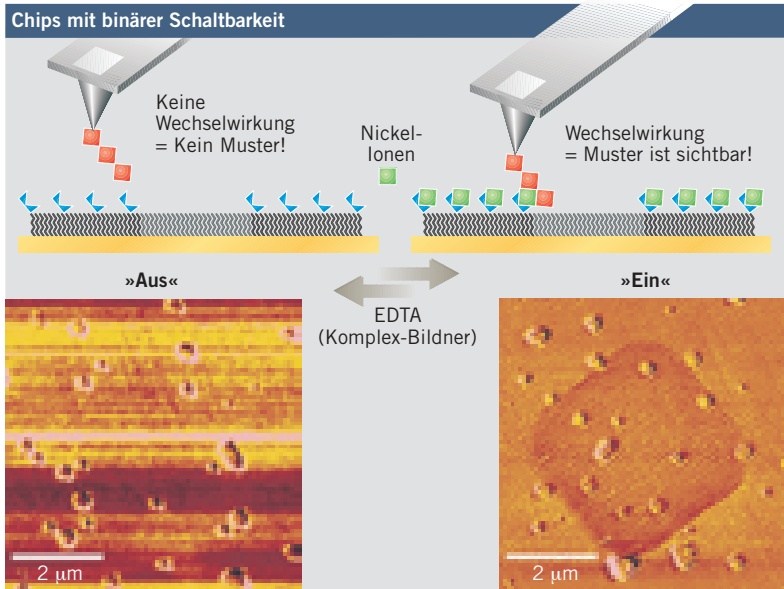
Das Proteasom – eine zylindrische Nano-Maschinerie



Nanostrukturierte Protein-Chips: kleiner, schneller, besser

Dichtgepackte Protein-Chips können dazu beitragen, funktionale und diagnostische Untersuchungen im me-

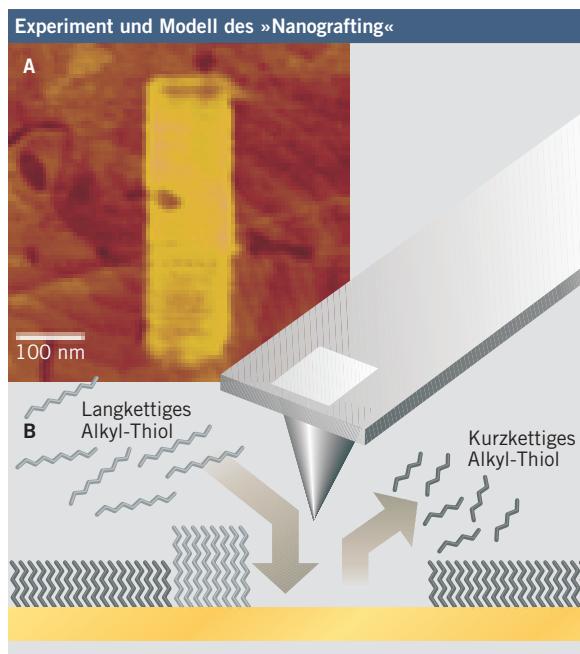
3 Das Proteasom – eine zylindrische Nano-Maschinerie. Dieser Proteinkomplex setzt sich aus 28 Untereinheiten zusammen und besitzt einen Hohlraum ^{16/} (Nanokompartiment), in dem in der Zelle nicht (mehr) benötigte Proteine abgebaut werden (A). Durch die rekombinante Positionierung von His-Tags kann das Proteasom sowohl liegend als auch stehend immobilisiert werden (B). Die Abbildung zeigt die Unterschiede der beiden immobilisierten Varianten deutlich (C) ^{17, 8, 9/}.



4 In Abwesenheit von Nickel-Ionen findet keine Wechselwirkung zwischen der His-Tag-modifizierten Spitze und der Oberfläche statt (»Aus«). Nach Zugabe der Nickel-Ionen dagegen tritt diese Wechselwirkung hervor. Die chemisch modifizierte Spitze des Rasterkraftmikroskops hat jetzt eine unterschiedliche Affinität zu den verschiedenen Arealen. Man sieht den Kontrast und das aufgestempelte Quadrat deutlich (»Ein«). Durch Zugabe des Komplexbildners EDTA werden die Nickel-Ionen abgefangen und der Ausgangszustand wieder hergestellt (»Aus«). Mit der chemischen Kraftmikroskopie lassen sich zuverlässig verschiedene Bindungsaffinitäten ablesen und die Schaltbarkeit der Proteinbindung darstellen.

5 Beim »Nanografting« werden bestehende mono-molekulare Thiol-Schichten mit der Spitze des Rasterkraftmikroskops lokal herausgekratzt, wobei die Goldoberfläche freigelegt wird. Andere Alkyl-Thiole binden an die freigelegte Stelle und bilden lokal ebenfalls eine mono-molekulare Schicht aus (B). In der rasterkraftmikroskopischen Analyse setzen sich die eingebauten langkettigen Alkyl-Thiole deutlich vom Untergrund ab und werden als Nanostruktur im topographischen Bild sichtbar (A).

dizinischen Bereich parallel und beschleunigt durchzuführen – auch mit kleineren und damit kostengünstigeren Analytmengen. So dienen zum Beispiel Antikörper in der Medizin häufig als »molekulare Spürhunde« zur Diagnose von Infektionen; sie sind jedoch sehr teuer (zehn Mikrogramm kosten einige Tausend Euro). Beim Einsatz nanoskaliger Bio-Chips und Analysemethoden ließen sich damit die eingesetzten Mengen und Kosten drastisch senken. Daher laufen Forschungsanstrengungen zur Erzeugung nanoskaliger Strukturen auf Hochtouren. Verschiedene Methoden mit jeweils spezifischen Vor- und Nachteilen stehen derzeit zur Wahl. Eine Technik, die momentan bevorzugt angewendet wird, ist das so genannte »Nanografting« (dtsh.: Nano-Pfropfen) ^{11/5a}. Die Methode basiert darauf, dass man mit der Spitze des Rasterkraftmikroskops Oberflächen nicht nur abbilden, sondern auch gezielt verändern und verformen kann. Entscheidend hierbei ist die Kraft, die auf die Probenoberfläche ausgeübt wird. Kräfte werden in der Einheit Newton ausgedrückt; ein Newton entspricht beispielsweise der Gewichtskraft, die eine Tafel Schokolade (100 g) am Äquator auf Meereshöhe auf die Masse der



Die Autoren

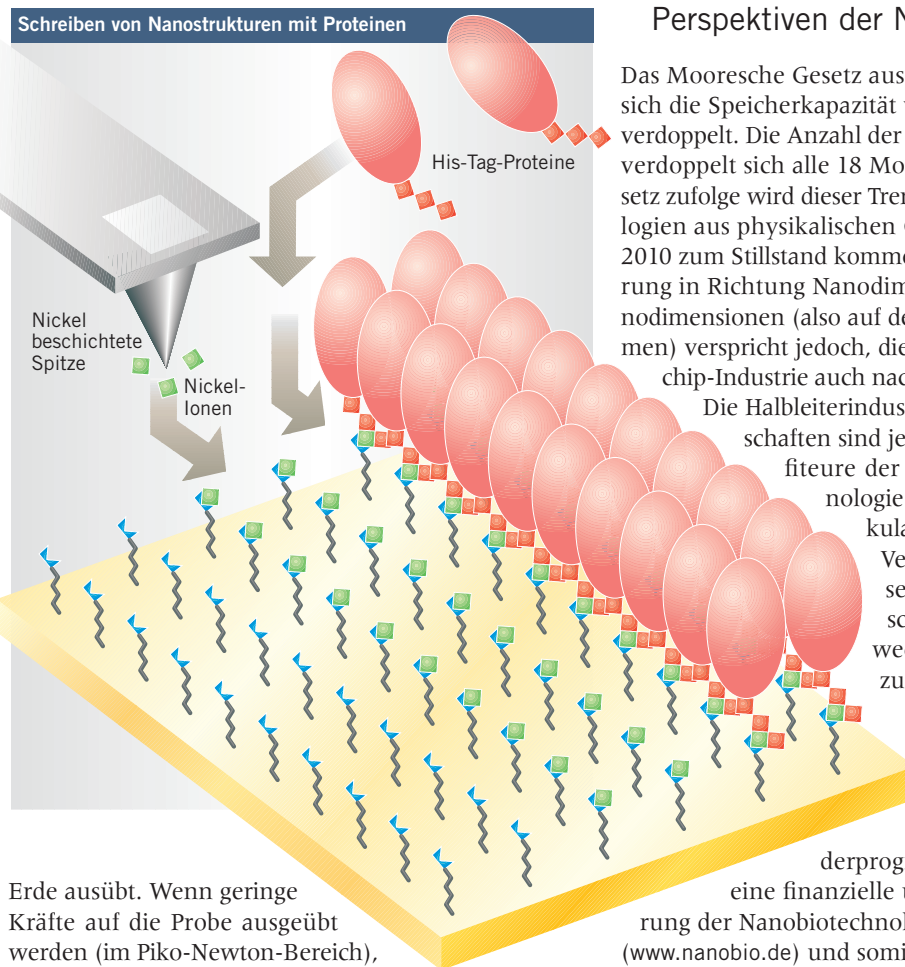
Prof. Dr. Robert Tampé (rechts), 42, studierte Chemie an der TU Darmstadt, wo er im Fach Biochemie 1989 bei Prof. Dr. Hans-Joachim Galla mit einer Arbeit über Lipid-Protein-Wechselwirkungen promovierte. An der Stanford University forschte er zusammen mit Prof. Dr. Harden M. McConnell an der Struktur und Funktion von MHC II-Komplexen. Von 1992 bis 1998 leitete er am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried eine Forschergruppe und betreute gleichzeitig eine Arbeitsgruppe am Institut für Biophysik der TU München, wo er 1996 in Biochemie habilitierte. Anschließend erhielt er ein Heisenberg-Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft. 1997 wurde er als Professor des Instituts für Physiologische Chemie (Medizin) an die Philipps-Universität Marburg berufen. Im Jahr 2001 folgte er dem Ruf auf eine Professur an das Institut für Biochemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität. Er ist Sprecher des 2003 gegründeten Sonderforschungsbereichs 628 »Functional Membrane Proteomics – From Membrane Transporters to Dynamic Assemblies and Networks« sowie Vorstandsmitglied des Center for

Membrane Proteomics. Seine Hauptforschungsinteressen liegen in den Bereichen der Biochemie und Biophysik biologischer Membranen, molekularen Immunologie, intrazellulären Transportprozesse sowie der Nanobiotechnologie.

Ali Tinazli, 26, studierte von 1997 bis 2002 Biochemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt. Seine Diplomarbeit bei Prof. Dr. Heinz D. Osiewacz am Botanischen Institut zum Thema »Biologische Alterungsprozesse« wurde mit dem »Procter & Gamble« Förderpreis 2002 ausgezeichnet. Nach einer dreimonatigen Mitarbeit an einem Proteomics-Projekt bei Aventis Pharma Deutschland begann er seine Doktorarbeit am Institut für Biochemie bei Prof. Dr. Robert Tampé und widmet sich seitdem nanobiotechnologischen Fragestellungen.



Die noch in der Entwicklung befindliche Methode basiert auf der lokalen Abscheidung von Nickel-Ionen an der Spitze des Kraftmikroskops. Dadurch werden nur die nächstgelegenen funktionellen Alkyl-Thiole, so genannte »Greifer«, aktiviert, die wiederum His-Tag-Proteine erkennen und binden. Durch die lokale Abscheidung von Nickel-Ionen werden Nanostrukturen mit Proteinen »geschrieben«. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden hier die Matrix-Thiole weggelassen.



Erde ausübt. Wenn geringe Kräfte auf die Probe ausgeübt werden (im Piko-Newton-Bereich), wird diese lediglich abgetastet und abgebildet, nicht aber verformt. Bei Steigerung der einwirkenden Kraft verschiebt und entfernt die Spitze die mono-molekulare Alkyl-Thiol-Schicht von der Goldoberfläche und legt sie dadurch frei. Mit dieser Prozedur lassen sich verschiedene nanoskalige Muster in die Oberfläche »eingravieren«. Durch die Zugabe von Thiol-Molekülen lässt sich die freigelegte Goldoberfläche auch wieder auffüllen. Durch Beigabe einer anderen Thiol-Verbindung können Areale von verschiedenen Thiolen in ein und derselben mono-molekularen Schicht erzeugt und mit dem Rasterkraftmikroskop nachgewiesen werden ^{5b}. Ein weiterer Ansatz zur Nanostrukturierung von Proteinen ist zurzeit noch in der Umsetzungsphase ⁶.

Perspektiven der Nanotechnologie

Das Mooresche Gesetz aus dem Jahr 1965 besagt, dass sich die Speicherkapazität von Computerchips jährlich verdoppelt. Die Anzahl der Transistoren auf einem Chip verdoppelt sich alle 18 Monate. Dem Mooreschen Gesetz zufolge wird dieser Trend mit den heutigen Technologien aus physikalischen Gründen bis etwa zum Jahr 2010 zum Stillstand kommen. Die weitere Miniaturisierung in Richtung Nanodimensionen oder gar Sub-Nanodimensionen (also auf der Ebene von einzelnen Atomen) verspricht jedoch, diesen Trend in der Computerchip-Industrie auch nach 2010 aufrecht zu erhalten.

Die Halbleiterindustrie und die Materialwissenschaften sind jedoch nicht die einzigen Profiteure der aufkommenden Nanotechnologie. Zusätzlich findet auf molekularer Ebene fortschreitend ein Verschmelzen der Materialwissenschaften mit den biologischen Disziplinen statt und erweckt die Nanobiotechnologie zu einem neuen Forschungsfeld. Frühzeitig hat das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) mit der Gründung von nationalen Förderprogrammen die Weichen für

eine finanzielle und infrastrukturelle Sicherung der Nanobiotechnologie in Deutschland gestellt (www.nanobio.de) und somit die internationale Position Deutschlands auf diesem Gebiet gestärkt.

Mehr und mehr wächst die Nanotechnologie in den Biowissenschaften zur Nanobiotechnologie heran und verspricht dadurch mittel- und langfristig neue Werkzeuge in den Lebenswissenschaften. Nach dem Siegeszug der DNA-Chips, die die Molekularbiologie revolutioniert haben, versprechen Protein-Chips Ähnliches im Bereich der Proteine. Die Anwendungsmöglichkeiten dieser neuartigen Bio-Chips reichen von der Umweltanalytik über die medizinische Diagnostik bis hin zur individuellen Bestimmung der optimalen Wirkstoffmengen in der medizinischen Therapie. ♦

Im Internet: <http://www.biochem.uni-frankfurt.de>

Literatur:

^{1/1} Niemeyer, C.M. und Mirkin, C., NanoBiotechnology. Hrsg. (2004), Wiley-VCH, New York.

^{1/2} Ulman, A., Formation and structure of self-assembled monolayers. Chem. Rev. (1996), 96: S. 1533–1554.

^{1/3} Hochuli, E., Large-scale chromatography of recombinant proteins. J. Chromatogr. (1988), 444: S. 293–302.

^{1/4} Schmitt, L., Dietrich, C. und Tampé, R., Synthesis and characterization of chelator lipids for reversible immobilization of engineered proteins at self-assembled lipid interfaces. J. Am. Chem. Soc. (1994), 116: S. 8485–8491.

^{1/5} Tampé, R. et al., Biofunctionalized membranes on solid surfaces in nanofabrication and biosystems: Integrating materials science, engineering and biology. H.C. Hoch, L.W. Jelinski and H.G. Craighead, Hrsg. (1996), Cambridge University Press: Cambridge. S. 201–221.

^{1/6} Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. und Huber, R., Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. Science (1995), 268: S. 533–539.

^{1/7} Dorn, I.T., Eschrich, R., Seemüller, E., Guckenberger, R. und Tampé, R., High-resolution AFM-imaging and mechanistic analysis of the 20S proteasome. J. Mol. Biol. (1999), 288: S. 1027–1036.

^{1/8} Thess, A., Hutschenreiter, S., Hofmann, M., Tampé, R., Baumeister, W. und Guckenberger, R., Specific orientation and two-dimensional crystallization of the proteasome at metal-chelating lipid interfaces. J. Biol. Chem. (2002), 277 (39): S. 36321–36328.

^{1/9} Hutschenreiter, S., Tinazli, A., Model, K. und Tampé, R., Two-substrate association with the 20S proteasome at single-molecule level. EMBO J. (2004), 23: S. 2488–2497.

^{1/10} Frisbie, C.D., Rozsnyai, L.F., Noy, A., Wrighton, M.S. und Lieber, C.M., Functional group imaging by chemical force microscopy. Science (1994), 265: S. 2071–2074.

^{1/11} Xu, S., Miller, S., Laibinis, P.E. und Liu, G.-Y., Fabrication of nanometer scale patterns within self-assembled monolayers by nanografting. Langmuir (1999), 15: S. 7244–7251.