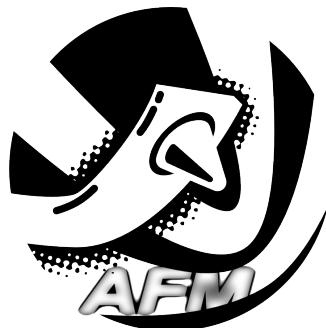

Optomechanische Untersuchungen an Biomolekülen mittels Rastersondenmikroskopie



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
doctor rerum naturalium

an der Fakultät für Physik
in der Universität Bielefeld

Alexander Harder

Bielefeld, 2014

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier nach DIN ISO 9706

*«Wahrlich es ist nicht das Wissen, sondern das Lernen,
nicht das Besitzen sondern das Erwerben, nicht das Daseyn,
sondern das Hinkommen, was den grössten Genuss gewährt »*

Carl Friedrich Gauß

Erklärung

gemäß §8 Abs. 1 g) der Promotionsordnung der Fakultät für Physik der Universität Bielefeld vom 10. Jan. 2012.

Die vorliegende Dissertation entstand im Zeitraum von Oktober 2009 bis Juni 2014 unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti in der Abteilung *Experimentelle Biophysik und Angewandte Nanowissenschaften* an der Fakultät für Physik der Universität Bielefeld.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und dabei keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle wörtlich beziehungsweise dem Sinn nach aus Werken entnommenen Stellen sind durch entsprechende Quellenangaben gekennzeichnet worden. Die vorliegende Arbeit ist weder in der jetzigen noch in einer anderen Fassung jemals vorgelegt worden.

Es sind von mir keine weiteren Anträge auf Zulassung zur Promotion eingereicht worden, weder bei einer anderen Fakultät noch bei einer anderen Hochschule.

Bielefeld, 20. Juni 2014

(Alexander Harder)

Gutachter:

Prof. Dr. Dario Anselmetti

Prof. Dr. Thomas Dierks

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung	3
2 Physikalische Grundlagen	7
2.1 Rastersondenmikroskopie	7
2.1.1 Rasterkraftmikroskop (AFM)	8
2.1.2 Messmodi in der Rasterkraftmikroskopie	10
2.1.3 Optische Nahfeldmikroskopie-Methoden	13
2.1.4 Optische Nahfeld-Sonden	14
2.1.5 Aperturloses optisches Rasternahfeldmikroskop (aSNOM)	16
2.2 Fluoreszenz	18
2.2.1 Fluoreszenz in der Nähe einer scharfen Scansonde	20
2.3 Theorie der Kraftspektroskopie	21
2.3.1 Kalibration des Kraftsensors	23
2.3.2 Kinetik, Thermodynamik und Kräfte	25
Dissoziation im thermodynamischen Gleichgewicht	26
Dissoziation unter einer äußeren Kraft	27
2.3.3 <i>Slip Bond</i>	31
2.3.4 <i>Catch Bond</i>	31
2.3.5 <i>One-State, two-path Catch Bond</i> Modell	33
3 Biologische Grundlagen	37
3.1 Glycosaminoglycane	37
3.1.1 Biosynthese von Glycosaminoglycanen	39
3.2 Sulfatasen	41
3.2.1 Humane Sulfatasen	43

3.2.2	Sulfatasen Sulf1 und Sulf2	44
3.2.3	Sulfs und ihre Hydrophile Domäne	45
3.2.4	Physiologische Relevanz der Sulfs	47
3.3	Desmin	49
3.3.1	Struktur und Assemblierung	49
3.3.2	Physiologische Aufgaben	49
3.4	Tabakmosaikvirus	52
4	Experimentelle Methoden und Materialien	55
4.1	Kraftspektroskopie	55
4.1.1	Biologisches System	55
4.1.2	Chemikalien	56
4.1.3	Messvorrichtung	58
4.1.4	Kraftsensoren	58
4.1.5	Substrate	59
4.1.6	Funktionalisierung	60
4.1.7	Kraftspektroskopische Parameter	62
	Dynamische Kraftspektroskopie	62
	<i>Force Clamp</i>	63
4.1.8	Auswertung der kraftspektroskopischen Daten	64
	Kraft-Distanz-Kurve	64
	Kraft-Zeit-Kurve	65
4.2	Optische Rasternahfeldmikroskopie (aSNOM)	68
4.2.1	Messaufbau	68
4.2.2	Kurze Bedienungs- und Funktionsanleitung	70
4.2.3	Scansonde	71
4.2.4	Farbstoff	72
4.2.5	Biologische Systeme	72
4.2.6	Probenimmobilisierung	73
4.2.7	Abbildungsparameter	74
4.2.8	Auswertung und Aufbereitung der aSNOM-Daten	74

5 Ergebnisse und Diskussion	75
5.1 Kraftspektroskopie	75
5.1.1 Spezifität der HD und ihrer Subdomänen zu Hep und DS	76
5.1.2 HD-GAG Dissoziation bei konstanten Ziehgeschwindigkeiten	80
Verteilungen von Dissoziationskräften der GAG	82
Bestimmung der thermischen Off-Ratenkonsatnaten	85
5.1.3 HD-GAG Dissoziation bei konstanten Kräften (<i>Force Clamp</i>)	87
Verifizierung des <i>Catch Bond</i> Verhaltens	87
Relevanz der 6- <i>O</i> -Sulfate für das <i>Catch Bond</i> Verhalten	92
5.1.4 Ansatz für die Beschreibung der Interaktion von HD mit GAG	93
<i>Two-State Two-Path</i> Modell	94
5.1.5 Messungen bei niedrigen Belastungsraten für HD mit Heparansulfat	98
5.1.6 Interpretation der Wechselwirkung zwischen HD und Heparansulfat	101
Heparansulfat bindet effizienter als Heparin an HD	102
Fundamentale Indizien für Allosterie	103
5.2 Optische Rasternahfeldmikroskopie (aSNOM)	106
5.2.1 Regelung der z-Richtung	106
5.2.2 Phasengekoppelte Fluoreszenz-Detektion	108
5.2.3 Auflösungsvermögen des aSNOM	111
Topografische Auflösung	111
Optische Auflösung	112
5.2.4 Das aSNOM als Diagnosewerkzeug	114
6 Zusammenfassung und Ausblick	117
Literaturverzeichnis	119
Appendix	155
Veröffentlichungen	167
Danksagung	

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Abb.	Abbildung
Abschn.	Abschnitt
ACC	Amylose Affinitäts Chromatographie
AFM	Atomic Force Microscope
AM-AFM	Amplituden Modulation-AFM
APD	Avalanche Photodiode
AS	Aminosäuren
aSNOM	apertureless Scanning Near-Field Optical Microscope
Bind.	Bindung
DFS	Dynamic Force Spectroscopy
DS	Dermatansulfat
EZM	extrazelluläre Matrix
FIB	Focused Ion Beam
FWHM	Full Width at Half Maximum
GAG	Glycosaminoglycan
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
GlcA	D-Glucuronsäure
GlcN	Glucosamin
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GlcNS(6S)	<i>N</i> - und 6- <i>O</i> -sulfatiertes Glucosamin
HD	Hydrophile Domäne
Hep	Heparin
HIM	Helium Ion Microscope
HS auch HS+6S	Heparansulfat
HS-6S	6- <i>O</i> -desulfatiertes Heparansulfat
IdoA	L-Iduronsäure

Abkürzungsverzeichnis

IdoA(2S)	2- <i>O</i> -sulfatierte Iduronsäure
K5NS	<i>N</i> -sulfatiertes K5-polysaccharid (Heparosan <i>N</i> -Sulfat)
MBP	Maltose bindendes Protein
NA	Numerische Apertur
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
PEG	Polyethylenglycol
PSGL-1	P-Selectin glycoprotein ligand-1
PSPD	Position Sensitive Photodiode
REM	Rasterelektronenmikroskop
SNOM	Scanning Near-Field Optical Microscope
SPM	Scanning Probe Microscope
STM	Scanning Tunneling Microscope
Sulf1 / Sulf2	extrazelluläre Matrix-Sulfatasen 1 und 2
Tab.	Tabelle
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence
TMV	Tobacco Mosaic Virus
ULF	Unit Length Filaments
WLC	Wormlike-Chain-Modell

1 Einleitung

Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen steuern und regeln alle essentiellen Prozesse in lebenden Organismen. Bei solch hochspezifischen Vorgängen müssen Proteine zwischen mannigfaltigen konkurrierenden Biomolekülen differenzieren und mit ihren komplementären Bindungspartnern eine reversible Bindung eingehen. Diese molekulare Erkennung wird auch als das Schlüssel-Schloss-Prinzip bezeichnet [1]. Dabei werden die Struktur sowie die funktionellen Eigenschaften der Proteine durch die Aminosäuresequenz, die so genannte Primärstruktur, festgelegt [2]. Die Bindung und die Funktion der Proteine werden durch eine Reihe von lokal begrenzten nicht kovalenten Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken-, Ionenbindungen und Van-der-Waals-Kräften vermittelt. Die gebildeten Molekül-Komplexe zerfallen wieder nach einer charakteristischen Lebensdauer durch eine thermisch getriebene Dissoziation. Die Rasterkraftmikroskopie (engl.: Atomic Force Microscopy, AFM) [3] hat sich als eine Werkzeug zur Untersuchung solcher Vorgänge auf molekularer Ebene etabliert. Dabei hat sich in kraftspektroskopischen Analysen gezeigt, dass die Bindungen der Molekül-Komplexe anhand des Charakters ihrer Dissoziation unter einer externen Kraft unterscheiden lassen.

Eine thermische Dissoziation nach Kramers-Bell-Evans [4–6] beschreibt das Verhalten der meisten bekannten Systeme [7–19] und entspricht einem *Slip Bond*. Hier nimmt die Lebensdauer des Komplexes mit wachsender mechanischer Belastung exponentiell ab. Bei einem *Catch Bond* hingegen steigt die Lebensdauer bei wachsender Belastung für ein gewisses Kräfte-Intervall an, verhält sich aber bei hoher Belastung wie ein *Slip Bond*. Diese Art der Bindung zeigt somit ein „unintuitives“ Verhalten und ist bis jetzt nur bei einer Handvoll von Systemen beobachtet worden [20–30]. Bei den meisten dieser Systemen ist das *Catch Bond* Verhalten mit allosterischen Effekten verbunden, die wesentlich für die Ausübung der Funktion sind.

In dieser Arbeit werden kraftspektroskopische Experimente an der hydrophilen Domäne (HD) aus der extrazellulären Matrix-Sulfatase1 (Sulf1) durchgeführt. Dazu werden die Spezifität sowie die Art der Bindung von der HD zu verschiedenen Glycosaminoglyca-

1 Einleitung

nen kraftspektroskopisch auf Einzelmolekül niveau untersucht und ein mathematisches Modell für die Beschreibung der Interaktion vorgeschlagen. Die Sulf1 regelt essentielle Prozesse in der Signalgebung und der Embryonalentwicklung durch das Abspalten gewisser Sulfat-Gruppen von Glycosaminoglycan (GAG)-Ketten der Proteoglycane an der Zelloberfläche. Dabei steuert die HD die Erkennung, die Desulfatierungs-Effizienz sowie das Binden des Substrats Heparansulfat (HS) an die Sulf1 und ist damit wesentlich für die funktionellen Eigenschaften der Sulf1 [31]. Eine funktionelle Störung der Sulf1 kann onkogene Auswirkungen haben. Deshalb ist das Verständnis der Wechselwirkung zwischen der hydrophilen Domäne und Heparansulfat sehr wichtig für die Entwicklung geeigneter Tumortherapien.

Bei kraftspektroskopischen Experimenten werden die zu untersuchenden Biomoleküle zunächst auf der Spitze eines mikrofabrizierten Kraftsensors wie auch auf einem geeigneten Substrat kovalent immobilisiert. Dann wird der Kraftsensor unter physiologischen Bedingungen nach erfolgter Assoziation des Molekül-Komplexes entweder mit konstanter Ziehgeschwindigkeit solange ausgelenkt, bis die äußere Kraft der Bindungskraft des Komplexes gleicht (dynamische Kraftspektroskopie) [5] oder mit einer definierten konstanten Kraft belastet, bis die Bindung sich selbst löst (*Force Clamp*) [32]. Über die mechanische Auslenkung des Kraftsensors sind direkt Informationen über die Dissoziationskräfte der Biomoleküle zugänglich. Werden solche Experimente bei verschiedenen Ziehgeschwindigkeiten beziehungsweise Kräften gemacht, kann die thermische Off-Ratenkonstante k_{off}^0 respektive die mittlere Lebensdauer τ des Komplexes mit vorhandenen Modellen berechnet werden [4–6, 33].

Des Weiteren wird hier ein optisches Rasternahfeldmikroskop (engl.: Scanning Near-Field Optical Microscope, SNOM) [34] für strukturelle Untersuchungen des Desmins verwendet. Desmin gehört zum Typ III der Gruppe von Intermediärfilamenten (IF) und ist für die mechanische Integrität der Muskelzellen verantwortlich. Durch Mutationen des Desmin-Gens werden die mechanischen sowie die strukturellen Eigenschaften stark beeinflusst und können sich letal auswirken [35–38].

SNOM ist eine Kombination von AFM mit den optischen Nahfeld-Methoden. Hier werden die Vorteile der Rastersondenmikroskopie mit leistungsfähiger optischer Mikroskopie gebündelt. Diese Applikation liefert zusätzlich zu hochauflösender Topografie im sub-Nanometer-Bereich noch eine optische Auflösung, die weit unter der Beugungsgrenze liegt [39]. Die hier vorgestellte Kombination aus zwei etablierten Methoden, der TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) Mikroskopie [40, 41] und dem AFM, repräsentiert

tiert das aperturlose optische Rasternahfeldmikroskop (aSNOM). Dieses aSNOM verfügt über eine phasengekoppelte Fluoreszenz-Detektion. Durch Überlagerung des Topografie- und des Fluoreszenz-Signals lässt sich die strukturelle Beschaffenheit der Biomoleküle auf lokaler Ebene präzise untersuchen [42].

Im Folgenden (Kapitel 2) wird auf die physikalischen Grundlagen der Rasterkraftmikroskopie, optischen Rasternahfeldmikroskopie und Kraftspektroskopie eingegangen. Anschließend (Kapitel 3) werden die biologischen Grundlagen behandelt. Danach (Kapitel 4) werden die verwendeten Materialien und experimentellen Methoden angegeben und die erlangten Ergebnisse (Kapitel 5) präsentiert und diskutiert. Abschließend (Kapitel 6) folgen eine Zusammenfassung und ein Ausblick für mögliche weitere Experimente.

1 Einleitung

2 Physikalische Grundlagen

In diesem Kapitel wird die allgemeine Funktionsweise der Rastersondenmikroskopie beschrieben. Insbesondere werden das Rasterkraftmikroskop und seine Erweiterung zum optischen Nahfeldmikroskop sowie die verschiedenen Kraftspektroskopie-Methoden anhand einer Kraft-Distanz-Kurve beziehungsweise Kraft-Zeit-Kurve erläutert. Die zugehörigen theoretischen Grundlagen wie die Thermodynamik und die Kinetik der *Slip Bonds* und *Catch Bonds* werden eingeführt.

2.1 Rastersondenmikroskopie

Seit der Einführung des Rastertunnelmikroskops (engl.: Scanning Tunneling Microscope, STM) [43, 44] im Jahre 1981, gefolgt von dem Rasterkraftmikroskop (engl.: Atomic Force Microscope, AFM) [3] im Jahre 1985, gibt es eine rasante und mannigfaltige Entwicklung auf dem Gebiet der so genannten Rastersondenmikroskope (engl.: Scanning Probe Microscope, SPM). Für die Entwicklung des Rastertunnelmikroskops bekamen dessen Erfinder Binnig und Rohrer 1986 den Nobelpreis für Physik.

Während anfangs das reine Abbilden die Rastersondenmikroskopie dominierte, werden mittlerweile vielfältige interessante Effekte und Eigenschaften von Oberflächen beziehungsweise Molekülen auf Nanometerskala mit dieser Methode untersucht. Unter anderem sind elektronische, magnetische, biologische, chemische und tribologische Beschaffenheiten von nanoskopischen Systemen für Messungen zugänglich geworden.

Die Rastersondenmikroskope besitzen alle eine sehr feine, aus nur wenigen Atomen bestehende Sonde. Diese wird im Kontakt oder im Nahfeld (Abstände von wenigen Nanometern) über die Probe gerastert und liefert somit punktweise Informationen über die Probenoberfläche. Die unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen Sonde und Oberfläche charakterisieren die jeweilige Methode.

Beim Rastertunnelmikroskop wird für die Regelung ein sehr kleiner Tunnelstrom (nA – pA) gemessen, was eine leitfähige Sonde und Oberfläche voraussetzt. In der Rasterkraft-

mikroskopie hingegen werden atomare beziehungsweise molekulare Kraftwechselwirkungen der Größenordnung kleiner als 1 nN zwischen Oberfläche und Sonde als Feedback-Regelung benutzt. Dieses Messverfahren erlaubt Untersuchungen für einen breiten Temperaturbereich im Vakuum, an Luft und in Flüssigkeit. Die Probe bedarf keiner besonderen Präparation und muss nicht leitfähig sein. Somit ist das AFM prädestiniert für Untersuchungen von biologischen Proben, da diese unter physiologischen Bedingungen analysiert werden können.

Wird die scharfe Sonde eines Rasterkraftmikroskops zusätzlich noch mit einem Laser be- oder durchleuchtet [45–47], wird darüber hinaus ein optischer Kanal mit einer Auflösung kleiner 20 nm zugänglich. In diesem Fall wird das Gerät als optisches Rasternahfeldmikroskop (engl.: Scanning Near-Field Optical Microscope, SNOM) [34] bezeichnet, wobei hier die Lichtwechselwirkung (evaneszentes Feld) zur Bilderzeugung dient.

2.1.1 Rasterkraftmikroskop (AFM)

Die Grundbausteine eines Rasterkraftmikroskops sind ein Kraftsensor, ein Piezo-Scanner, sowie eine Regelelektronik inklusive Detektion der Kraftsensor-Bewegung beziehungsweise -Auslenkung (Abb. 2.1).

Der Kraftsensor besteht aus einem Federbalken (engl.: cantilever) und einer idealerweise atomar scharfen Spitze (engl.: tip) mit einem Radius von nur wenigen Nanometern.

Die Annäherung des Kraftsensors an die Probenoberfläche kann feinmechanisch oder mit piezoelektrischen Stellelementen erfolgen. Die piezoelektrischen Stellelemente lassen sich proportional zu einer angelegten Spannung strecken respektive stauchen. Diese Eigenschaft erlaubt eine punktweise Abtastung der Probenoberfläche.

Bei sehr kleinen Abständen im Bereich von 0,1 – 100 nm wirken auf den Kraftsensor Kräfte des Oberflächenpotentials (Abb. 2.2 b)) [48–50], die den Federbalken auslenken. Diese Auslenkung wird vorwiegend durch ein sogenanntes Lichtzeigersystem (optical beam deflection) [51] detektiert (Abb. 2.1). Dabei wird ein Laserstrahl auf die Rückseite des Kraftsensors fokussiert, wobei die Reflektion über einen Spiegel auf einen 4-Quadranten Fotodetektor [52] projiziert wird. Aufgrund der Verbiegung des Kraftsensors verändert sich der Reflexionswinkel des Laserstrahls und bewirkt somit eine Verschiebung des Laserspots auf dem Detektor. Dadurch ändert sich die Spannung in der Detektoreinheit. Diese Spannungsänderung dient als Rückkopplungssignal für die Steuerung der Bewegung des Piezo-Scanners beziehungsweise des Kraftsensors (Feedback-Regelkreis).

Je nach Messmodus (Abschn. 2.1.2) kann die Regelung sowohl in vertikaler Richtung, als auch in lateraler Richtung erfolgen. Damit lässt sich sowohl die vertikale als auch die laterale Auslenkung des Kraftsensors sehr präzise bestimmen [53] und somit auch die Topografie der Oberfläche.

Eine vertikale Auslenkung des Kraftsensors entspricht einer Normalkraft F_N , die proportional zu der Differenz der Teilspannungen der oberen und unteren Segmente des Detektors ist ($U_N = (U_A + U_B) - (U_C + U_D)$). Die Torsionsauslenkung (bedingt durch Lateralkräfte F_L) ist proportional zur Differenz der Teilspannungen der linken und rechten Segmente ($U_L = (U_A + U_C) - (U_B + U_D)$).

Es existieren einige weitere Methoden um die Auslenkung des Kraftsensors zu detektieren, zum Beispiel mit Hilfe des Tunnelstroms [3], über die Interferometrie [54] oder kapazitiv [55]. Jedoch ist das Lichtzeigersystem das etablierteste, da es relativ einfach zu handhaben ist.

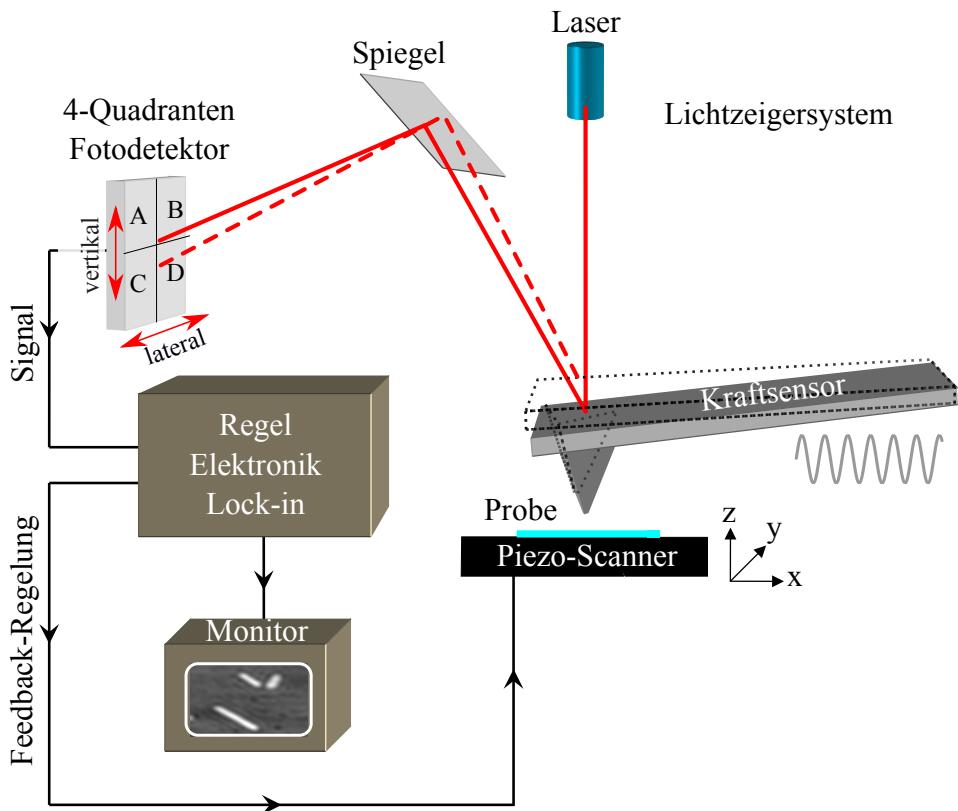


Abb. 2.1: Schematische Darstellung eines Rasterkraftmikroskops mit Lichtzeigersystem.

2.1.2 Messmodi in der Rasterkraftmikroskopie

Prinzipiell existieren zwei Messmodi für die Topografiedarstellung: der Kontakt-Modus (engl.: contact mode) und der dynamische Modus, wobei der dynamische Modus weiter unterteilt wird, abhängig von den Regelparametern Amplitude, Frequenz oder Phase. In Abb. 2.2 b) ist die Potentiallandschaft der Wechselwirkung [49] zwischen Kraftsensor und Oberfläche dargestellt. Diese Wechselwirkung ist charakteristisch und essentiell für die später beschriebenen Messmodi. Insgesamt lässt sich diese Potentiallandschaft qualitativ in Form eines Lennard-Jones-Potentials $\Phi(z)$ darstellen:

$$\Phi(z) = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{z}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{z}\right)^6 \right] \quad (2.1)$$

mit der Tiefe des Potentialtopfes ϵ , der Nullstelle des Potentials σ und dem Kontaktabstand z , wobei ϵ und σ materialabhängige Parameter sind. Für $z < \sigma$ wächst der $\left(\frac{\sigma}{z}\right)^{12}$ Term stark an. Dementsprechend ist die Potentialkurve in diesem Bereich sehr steil, die Wechselwirkung daher stark repulsiv und kurzreichweitig. Wenn $z >$

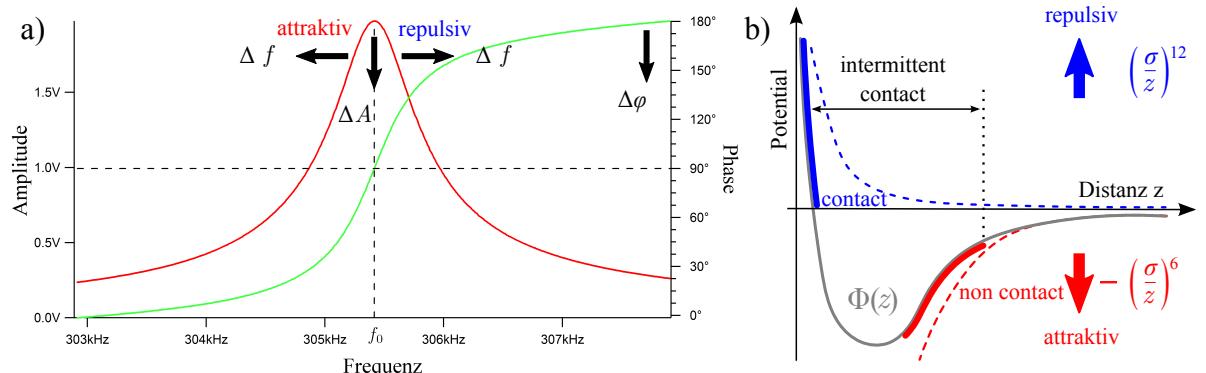


Abb. 2.2: a) Resonanzkurve eines frei schwingenden Siliziumkraftsensors an Luft. Die rote Kurve zeigt den Resonanzpeak bei f_0 mit Amplitude A_0 und die grüne Kurve die Phase. Nähert sich der Kraftsensor der Probenoberfläche, so ändern sich die Parameter Δf , ΔA und $\Delta \varphi$ je nach Wechselwirkung, die für die verschiedenen Regelarten verwendet werden.
b) Das Lennard-Jones-Potential $\Phi(z)$ zeigt die Wechselwirkungsbereiche für die verschiedenen AFM-Messmodi. Die blau und rot gestrichelten Linien verdeutlichen die Zusammensetzung des Potentials aus Gleichung 2.1. Der Kontakt-Modus (contact) arbeitet im repulsiven Bereich. Der Tapping-Modus (intermittent contact) arbeitet sowohl im repulsiven als auch im attraktiven Bereich und der Nichtkontakt-Modus (non contact) arbeitet ausschließlich im attraktiven Bereich.

σ ist, gibt der $-\left(\frac{\sigma}{z}\right)^6$ Term hauptsächlich das Van-der-Waals-Potential wieder. Das Van-der-Waals-Potential setzt sich aus Dipol-Dipol-Wechselwirkung*, Dipolinduzierter-Wechselwirkung† und der Londonschen Dispersionswechselwirkung‡ zusammen. Hier sind langreichweite attraktive Kräfte vorherrschend. Dieses Modell liefert im Vakuum bei ungeladenen Proben eine passende Näherung. Bei geladenen Proben muss der Coulomb-Anteil zusätzlich beachtet werden, der sich aber durch Messungen in Flüssigkeit wie Wasser aufgrund der Ionen-Abschirmung vermeiden lässt. Außerdem können Kapillarkräfte bei Messungen unter Umgebungsbedingungen auftreten, die jedoch durch Verwendung ultra-scharfer Spitzen reduziert werden können [56].

Der **Kontakt-Modus** [3] ist die einfachste Messvariante. Hierbei wird der Kraftsensor auf die Oberfläche gedrückt, sodass ein ständiger unmittelbarer „mechanischer“ Kontakt vorhanden ist. Für die Regelung kann entweder die Auslenkung des Kraftsensors (constant force mode) oder der Abstand zur Oberfläche (constant height mode) konstant gehalten werden. Während des Kontakts zwischen Kraftsensor und Oberfläche überlappen sich die Elektronenwellenfunktionen der Spitzenatome mit denen der Oberfläche und rufen eine stark repulsive Kraft mit einer Reichweite von $\sim 0,1$ nm hervor. Diese Tatsache beruht auf dem Pauli-Prinzip, da Elektronen, deren Zustände in allen Quantenzahlen übereinstimmen, nicht am selben Ort sein dürfen. Die repulsiven Kräfte erreichen Werte von 10^{-10} bis 10^{-6} N und sind sehr abstandssensitiv (z^{-12}), folglich ist die Auflösung in z-Richtung mit $\sim 0,01$ nm sehr hoch [57]. Die erreichbare laterale Auflösung beträgt aufgrund der Spitzengeometrie etwa 0,1 nm bei idealen Bedingungen. Aufgrund des Kontakts wird die Problematik mit dem Kondensatfilm [57] und der damit verbundenen Kapillarkräfte aufgehoben, da dieser von der Spitze des Kraftsensors durchstochen wird.

Der Kontakt-Modus ist vergleichsweise stabil und bietet hohe Auflösungen. Zudem können neben der Topografie zusätzliche Informationen über Reibungskräfte und plastische Verformung [58] gewonnen werden. Allerdings eignet er sich nur bedingt für weiche Oberflächen oder Biomoleküle, da diese durch die Interaktion mit der Spitze zerstört werden können.

Bei den **dynamischen Modi** [59] gibt es im Wesentlichen drei Möglichkeiten die Topografie einer Oberfläche zu untersuchen: AM-AFM (Amplituden-Modulation) [60], FM-

*Ausrichtung von permanenten Dipolen relativ zueinander

†Erzeugung eines Dipolmoments durch das Feld eines Dipols

‡Wechselwirkung zwischen fluktuiierenden Dipolen und der in ihrem Feld induzierten Dipolen [50]

AFM (Frequenz-Modulation) [61] und PM-AFM (Phasen-Modulation) [62]. Bei diesen Techniken wird der Kraftsensor durch eine Piezo-Keramik in Schwingung versetzt, der mit Resonanzfrequenz f_0 und Amplitude A_0 in einem Abstand von 1 bis 100 nm von der Oberfläche oszilliert. In diesem Abstandsbereich wirkt ein Kraftgradient auf den Sensor, der sich vorwiegend aus attraktiven Van-der-Waals-Kräften [63] zusammensetzt. Dadurch wird eine Änderung der Schwingungsparameter induziert, die für die jeweilige Methode AM-AFM (ΔA), FM-AFM (Δf) und PM-AFM ($\Delta\varphi$) zur Bild-Erzeugung dient.

Beim AM-AFM schwingt der Kraftsensor in der Nähe seiner Resonanzfrequenz f_0 mit einer festen Amplitude A_{exc} . Die detektierten Kräfte zwischen Spitze und Oberfläche machen sich durch die Dämpfung der Amplitude um ΔA bemerkbar. Während des Abbildens dient ΔA als Regelgröße (engl.: setpoint), um die Wechselwirkung zwischen Sensor und Oberfläche konstant zu halten. Diese Methode vermindert stark die Lateralkräfte [64] und ermöglicht relativ stabile Rahmenbedingungen für das Abbilden verschiedenster Oberflächen und Biomoleküle an Luft und in Flüssigkeit. AM-AFM ist sehr weit verbreitet und wird vermehrt für Messungen an Luft verwendet. Dabei sind drei Datensätze zugänglich: Topografie-Bild (engl.: height image), ein Amplituden-Bild (engl.: amplitude image) und ein Phasen-Bild (engl.: phase image). Das Phasen-Bild liefert Informationen über die Energiedissipation und den Materialkontrast, die es ermöglichen zwischen gewissen Oberflächeneigenschaften (elastisch oder hart) zu differenzieren [65]. Ein Unterschied zwischen konservativen und dissipativen Wechselwirkungen kann jedoch nicht beobachtet werden, da ΔA von beiden beeinflusst wird. Aufgrund der kurzzeitigen Berührung von Spitze und Oberfläche [66] wird AM-AFM auch häufig als *intermittent contact mode* beziehungsweise *tappingTM mode*[§] bezeichnet.

FM-AFM und PM-AFM sind deutlich sensitiver in der Kraftdetektion und ermöglichen sogar ein Abbilden ohne jeglichen Kontakt (engl.: non contact mode) [67], nicht nur im Vakuum, sondern auch an Luft und in Flüssigkeit [68, 69]. Diese Methoden sind instabiler und erfordern einen anspruchsvollen Messaufbau mit sehr sensitiver Regelelektronik. Deshalb finden sie meist Verwendung in Vakuum-Umgebung.

[§]Diese Bezeichnung stammt ursprünglich von Digital Instruments jetzt Bruker und ist abgeleitet vom engl.: to tap = abklopfen.

2.1.3 Optische Nahfeldmikroskopie-Methoden

Die klassische optische Mikroskopie und Spektroskopie bieten enorm umfangreiche Möglichkeiten strukturelle und chemische Informationen von einer breiten Palette verschiedenster Materialien zu gewinnen. Jedoch ist die erreichbare laterale Auflösung von konventionellen Mikroskopen mit hochnumerischen Objektiven ($NA = 1,4$) auf $250 - 300$ nm für Wellenlängen λ im sichtbaren Bereich durch das Beugungslimit nach Abbe:

$$\Delta x \approx \frac{\lambda}{2NA} \quad (2.2)$$

beschränkt [70]. Aber bereits 1928 wurde von Synge beschrieben, wie dieses Beugungslimit überwunden werden könnte [71]. Seine Idee war eine Probe durch eine kleine Apertur ($< \lambda$) zu beleuchten. Dadurch bildet sich zwischen der Apertur und der Probe ein evaneszentes Feld aus. Aufgrund des exponentiellen Abfalls der Intensität der evaneszenten Komponenten darf sich die Apertur nur wenige Nanometer von der Oberfläche entfernt befinden. Durch das Scannen der Probe mit dieser Apertur im Nahfeld kann eine Auflösung erreicht werden, die weit unter dem Beugungslimit liegt. Die Auflösung ist in diesem Fall prinzipiell nur von dem Durchmesser der Apertur abhängig. Experimentell konnte diese Idee vom optischen Rasternahfeldmikroskop (SNOM) erst in den frühen 80er Jahren nach der Erfindung der Rastersondenmikroskopie-Techniken realisiert werden [34, 72]. Heutzutage ist SNOM eine einzigartige Technik der Wissenschaft, die Vorteile der Rastersonden-Methode mit leistungsfähiger optischer Mikroskopie verbindet.

Es gibt zwei Grundprinzipien für SNOM: das Apertur-SNOM nach der Idee von Synge

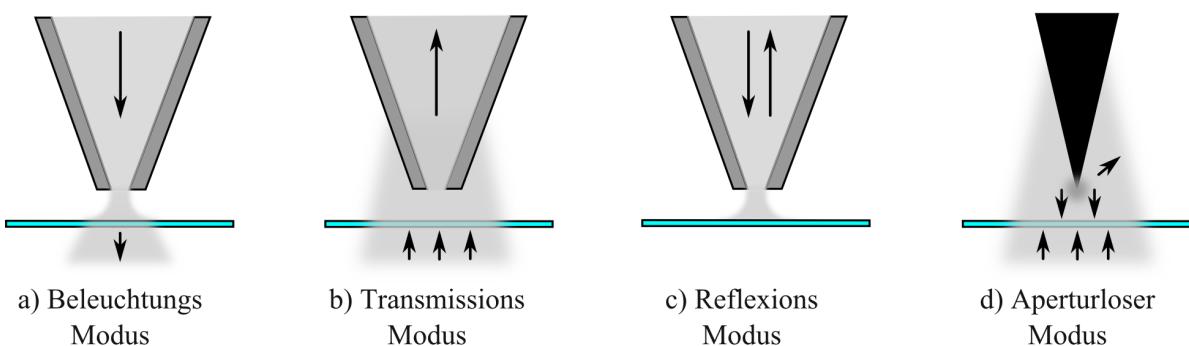


Abb. 2.3: Illustration der verschiedenen Verfahren für die Einkoppelung von Licht und der Detektion des Signals. a) – c) zeigen die Arten des Apertur-SNOM. d) präsentiert das Streuverfahren (aSNOM), dabei kann die Anregung und die Detektion von oberhalb oder unterhalb des Substrats erfolgen.

und das Aperturlose-SNOM[¶] nach dem Babinetsschem Prinzip[¶]. In Abb. 2.3 sind die gängigen Messmethoden der beiden SNOM-Arten schematisch dargestellt. Wie bei anderen Rastersonden-Methoden spielt die Geometrie der Sonde eine Schlüsselrolle für die maximal erreichbare Auflösung: je kleiner die Apertur beziehungsweise je schärfer die Spitze, desto höher ist die Auflösung.

2.1.4 Optische Nahfeld-Sonden

Die Sonden des Apertur-SNOM bestehen meist aus geschärften, mit Metall beschichteten Glasfasern, die an der Spitze eine lichtdurchlässige Öffnung (Apertur) besitzen. Für die Herstellung der Apertur-Sonden werden hauptsächlich zwei Methoden verwendet: die Laser-Heiz-Zieh Methode [74] und das chemische Ätzen [75, 76]. Bei dem ersten Verfahren wird eine Glasfaser an beiden Enden gezogen und gleichzeitig mit einem Laser erhitzt. Dabei verjüngt sich die Glasfaser bis zum Abriss [77, 78] und man erhält so zwei angespitzte Sonden. Bei der zweiten Methode wird die Glasfaser mit oder ohne Mantel in einem Bad von Flusssäure (HF) und einem organischen Lösungsmittel (z.B. Isooctan

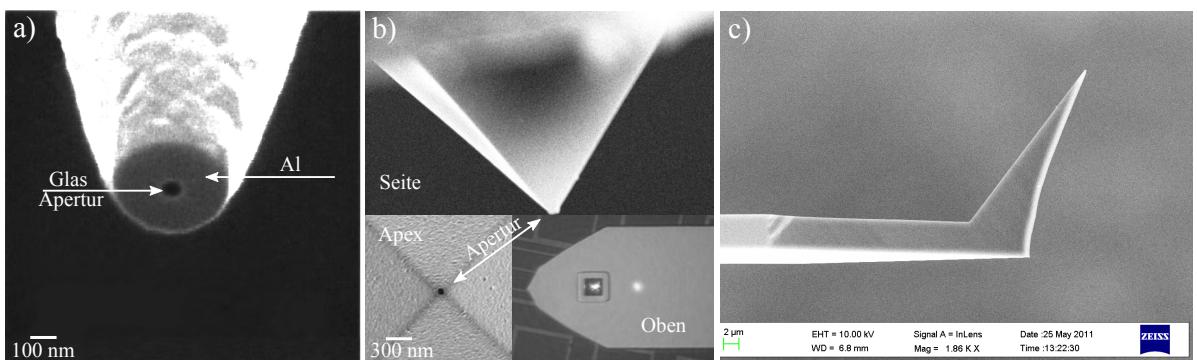


Abb. 2.4: a) Eine mit Aluminium bedampfte Glasfaser-Spitze mit einer Apertur < 100 nm. (aus [73])
b) AFM-Kraftsensor basierte Apertur-Sonde mit Kraftsensor-Spitze aus einer hohen Aluminium-Pyramide. Die Apertur kann Öffnungen von 40 – 150 nm Durchmesser haben. (aus Witec Focus Innovation)
c) Monolithischer Siliziumkraftsensor ATEC-NC mit geneigter Spitze. Diese Kraftsensoren sind für die aSNOM-Experimente in dieser Arbeit verwendet worden. (HIM-Bild: Karsten Rott)

[¶]im Folgenden aSNOM genannt

[¶]Das Babinettsche Prinzip besagt, dass das von einer scharfen Spitze oder einem Nanopartikel generierte Nahfeld dieselben Eigenschaften hat wie das durch eine Apertur (komplementäre Strukturen).

oder Chloroform) geätzt. Dabei dient das Lösungsmittel dem Schutz des nicht zu behandelnden Teils der Faser und zum Einstellen des Öffnungswinkels [79–82]. Nach dem Anspitzen werden die Sonden noch mit Metall (meist Aluminium) bedampft. Danach wird eine Apertur am Apex der Sonden mit Dimensionen kleiner 50 nm durch Festkörperelektrolyse, einen fokussierten Ionenstrahl (FIB) oder ein kontrolliertes mechanisches Abstreifen des Metalls generiert [47, 83].

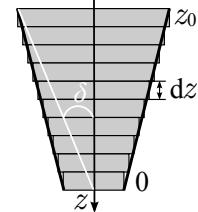
Die Abstandsregelung während einer Messung wird meist durch die Detektion der Scherkräfte (engl.: shear force) bewerkstelligt. Hierbei schwingt die Sonde lateral zur Oberfläche. Bei geringen Abständen wird diese Schwingung durch Wechselwirkung mit der Oberfläche gedämpft, dadurch kann bei konstanter Dämpfung ein konstanter Abstand zur Oberfläche gehalten werden, ähnlich dem AM-AFM Modus (Abschn. 2.1.2).

Des Weiteren gibt es noch AFM-Kraftsensor basierte Apertur-Sonden, wo die Kraftsensor-Spitze aus einer hohlen Aluminium-Pyramide mit Öffnungen von 40 – 150 nm besteht (engl.: hollow pyramid cantilevered, HPC) [84–86]. Abb. 2.4 a) und b) zeigen eine Glasfaser-Sonde und einen Kraftsensor mit Apertur.

Die optische Auflösung der Apertur-Sonden liegt typischerweise bei 50 nm, da die Transmissionsleistung $P_{trans}(z)$ des evaneszenten Feldes mit dem Apertur-Durchmesser abfällt:

$$P_{trans}(z) = P(z_0) \exp \left\{ -2 \int_{z_0}^z \alpha_{11}(z) dz \right\}, \quad (2.3)$$

$$\text{mit } z = -\frac{D - D_a}{2 \tan \delta} \text{ und } z_0 \leq z \leq 0, \quad (2.4)$$



D ist der Kern-Durchmesser, D_a der Apertur-Durchmesser, δ der halbe Öffnungswinkel und $\alpha_{11}(z)$ die Schwächungs-Konstante der zylindrischen HE₁₁ Mode. Mit dieser Beziehung beträgt die Transmissionsleistung $P_{trans}(z)$ entlang der Faser-Achse für eine Apertur von 50 nm in etwa das 10^{-6} fache und für 20 nm nur noch $\sim 2 \cdot 10^{-12}$ fache der ursprünglichen Transmissionsleistung $P(z_0)$. Somit ist ab einem gewissen Durchmesser der Apertur nicht mehr genug Licht vorhanden, um es detektieren zu können. Deshalb wird die topografische Auflösung bei Apertur-Sonden auf etwa 60 nm limitiert, bedingt durch die Apertur am Apex der Sonde. Zudem ist die Reproduzierbarkeit bei der Herstellung, insbesondere bei den Glasfaser-Sonden, nicht immer gegeben. Im Übrigen ist die komplexe, zeitaufwendige und teilweise sehr kostspielige Herstellung der Nahfeld-Sonden für das Apertur-SNOM nicht gerade anwenderfreundlich.

Im Gegensatz dazu werden die Sonden des aSNOM zum größten Teil durch kommerziell erhältliche metallische STM-Sonden sowie halbleitende oder dielektrische AFM-Sonden repräsentiert (Abb. 2.4 c)). Diese können vom Anwender weiter modifiziert werden, wie zum Beispiel durch Nanostrukturierung des Apex, um das Nahfeld-Signal zu verstärken [87, 88]. Mit aSNOM werden Auflösungen kleiner 20 nm erreicht, sowohl topografisch wie auch optisch. Zudem können Messungen mit Standard AFM-Messmodi wie dem Tapping-Modus durchgeführt werden. Somit ist aSNOM eine gute Wahl für die Kombination aus hoher topografischer und optischer Auflösung. Die Hürde bei dieser Technik ist die Extraktion des schwachen Nahfeld-Signals von dem parasitären beugungsbegrenzten Hintergrund. Dieses Hindernis wird aber unter anderem durch interferometrische Techniken [89–91] oder durch Ausnutzung der materialabhängigen Phonon-Polariton-Resonanz [92, 93] überwunden.

2.1.5 Aperturloses optisches Rasternahfeldmikroskop (aSNOM)

Beim aSNOM handelt es sich im Prinzip um ein AFM (Abb. 2.1), bei dem der Apex der Sonde zusätzlich mit fokussiertem Laserlicht bestrahlt wird. Als Sonden für aSNOM werden häufig handelsübliche Kraftsensoren benutzt, wie zum Beispiel der in Abb. 2.4 c) gezeigte ATEC-NC. Für die Daten-Aufnahme wird in den meisten Fällen ein dynamischer Standard AFM-Messmodus (Abschn. 2.1.2) verwendet, wobei das optische Nahfeld-Signal mittels *homo-* oder *heterodyner* [94] Detektion unter Verwendung von Lock-in-Technik extrahiert wird. Die Sonde hat in diesem Fall eine duale Rolle: Sie dient einerseits als Abtaster der Topografie, andererseits als optische Nano-Antenne für das Sammeln des Nahfeld-Signals und das Abstrahlen des Signals in das Fernfeld für die Detektion. Unter gewissen Bedingungen verhält sich die Sonde auch als eine stark örtlich begrenzte „Lichtquelle“ [95, 96], welche durch eine Feld-Überhöhung am Apex der Sonde generiert wird. In diesem Fall wird die Sonde nicht zum Streuen des Nahfeld-Signals der Oberfläche verwendet, sondern sie erzeugt selbst ein lokales Nahfeld und ermöglicht es lokale spektroskopische Antworten der Oberfläche aufzunehmen. Somit sind simultan optische Eigenschaften als auch räumlich hoch aufgelöste Struktur-Informationen weit unter dem Beugungslimit zugänglich.

Die Qualität dieser Attribute ist stark von dem Feld-Überhöhung-Faktor ζ abhängig [97], der wiederum eine Funktion der verwendeten Wellenlänge λ , dem Material, der Geometrie und der Polarisation des einfallenden Lichts ist [98]. Dabei ist ein hoher axialer

Anteil im Anregungsfeld in Richtung der Sonde ausschlaggebend für die Größe des Feld-Überhöhungs-Faktors. Unabhängig von der Größe des Feld-Überhöhungs-Faktors lässt sich das elektrische Feld in der Nähe einer scharfen Sonde mit dem Feld eines effektiven Dipols $\vec{p}(\omega)$, der sich im Zentrum des Apex der Sonde befindet, beschreiben [99]:

$$\vec{p}(\omega) = \begin{bmatrix} \alpha_{\perp} & 0 & 0 \\ 0 & \alpha_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & \alpha_{\parallel} \end{bmatrix} \vec{E}_0(\omega), \quad (2.5)$$

wobei die z-Achse die axiale Richtung der Sonde widerspiegelt, \vec{E}_0 entspricht dem Anregungsfeld, α_{\perp} der transversalen und α_{\parallel} der longitudinalen Polarisierbarkeit mit:

$$\alpha_{\perp}(\omega) = 4\pi\epsilon_0 r_0^3 \frac{\epsilon(\omega) - 1}{\epsilon(\omega) + 2} \quad (2.6)$$

und

$$\alpha_{\parallel}(\omega) = 8\pi\epsilon_0 r_0^3 \zeta_e(\omega), \quad (2.7)$$

wobei α_{\perp} der Polarisierbarkeit einer kleinen Kugel entspricht. Hier repräsentiert ϵ die dielektrische Konstante und r_0 den Radius der Sondenspitze. ζ_e stellt den komplexen Feld-Überhöhungs-Faktor dar und $\omega = \frac{2\pi}{\lambda}$ die Kreisfrequenz. Mit Hilfe der Mehrfachdipol-[100] beziehungsweise der Mehrfachmultipol-Entwicklung (engl.: Multiple Multipole Method, MMP) [101–103] lassen sich der komplexe Feld-Überhöhungs-Faktor ζ_e und das Feld an der Spitze numerisch berechnen. Ist der Dipol $\vec{p}(\omega)$ der Sondenspitze bekannt, dann lässt sich das Feld an der Spitze \vec{E} näherungsweise berechnen durch:

$$\vec{E}(\vec{r}, \omega) = \vec{E}_0(\vec{r}, \omega) + \frac{1}{\epsilon_0} \frac{\omega^2}{c^2} \mathbf{G}(\vec{r}, \vec{r}_0, \omega) \vec{p}(\omega) \quad (2.8)$$

mit \vec{r}_0 dem Ursprung von \vec{p} und \mathbf{G} der dyadischen Greenschen Funktion. Diese Feld-Überhöhung wird beim aSNOM für die lokale Anregung der elektronischen Zustände von organischen und anorganischen Farbstoffen und somit für die Erzeugung von Fluoreszenz verwendet.

2.2 Fluoreszenz

Fluorophore (beziehungsweise Farbstoffe) haben die Eigenschaft durch Absorption (A) von Licht aus elektronisch angeregten Zuständen Licht wieder zu emittieren (2.5 a)). Dieses Phänomen tritt bei Molekülen mit delokalisierten π -Elektronen-Systemen auf. Solche Moleküle besitzen konjugierte C-Doppelbindungen und haben häufig mehrere aromatische Ringe (Abb. 2.5 b)). Die Emission von Licht wird Lumineszenz genannt und wird abhängig von den angeregten Zuständen (Singulett oder Triplett) in Fluoreszenz (F) und Phosphoreszenz (P) unterteilt. Die Prozesse, die zwischen Absorption und Emission von Licht stattfinden, werden meist durch ein Jablonski-Diagramm dargestellt (Abb. 2.5 a)) [104].

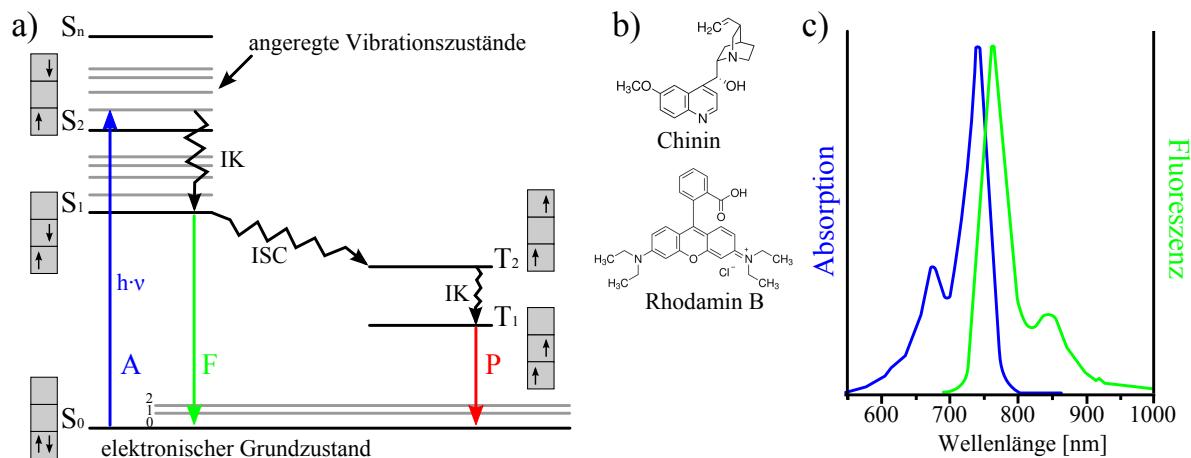


Abb. 2.5: a) Jablonski-Diagramm mit den Prozessen (IK: Interne Konversion und ISC: Intersystem-Crossing), die nach Absorption (A) für die Fluoreszenz (F) beziehungsweise Phosphoreszenz (P) entscheidend sind. Dabei repräsentieren S_0 den Grundzustand, S_1 , S_2 sowie S_n die angeregten Singulett-Zustände und T_1 sowie T_2 die angeregten Triplett-Zustände.
b) Zwei prominente Beispiele für fluoreszierende Moleküle: Chinin und Rhodamin B.
c) Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von Atto740-maleimide, das den Stokes-Shift verdeutlicht. Dieser Farbstoff ist für die Fluoreszenzmessungen in dieser Arbeit verwendet worden.

Die Absorption ist ein sehr schneller Vorgang und dauert typischerweise $\tau_A \sim 10^{-15}$ s. Nach einigen relativ schnellen strahlungslosen Relaxationsprozessen (Interne Konversion, IK; $\tau_{IK} \sim 10^{-14} - 10^{-11}$ s) kommt es dann zu Fluoreszenz oder Phosphoreszenz, wobei die Wellenlänge λ_{emitt} des emittierten Photons größer ist, dieses also weniger Energie

trägt. Die Energieänderung kommt durch Stöße mit anderen Molekülen sowie Vibrationsübergänge zustande und wird als Stokes-Shift [105] bezeichnet (Abb. 2.5 c)). Dabei wird die Energie zum Teil in thermische Energie umgewandelt. Diese Tatsache beruht auf dem Franck-Condon-Prinzip [106, 107], da die Übergänge zwischen den elektronischen Zuständen nur aus diskreten Vibrationszuständen stattfinden können. Die Energie des angeregten Zustands kann auch komplett in thermische Energie umgewandelt werden. Dies kann durch strahlungslosen Zerfall beziehungsweise Fluoreszenzlösung (engl.: quenching) geschehen. Weitere Prozesse, die für die Deaktivierung verantwortlich sein könnten, sind zum Beispiel der Förster-Energietransfer, chemische Reaktionen beziehungsweise Konformationsänderungen oder auch Stöße mit dem Lösungsmittel. Bei Fluoreszenz wird ein Elektron aus einem angeregten Singulett-Zustand (S_1, S_2, S_n ; entgegengesetzte Spins, Spin 0) in den Grundzustand S_0 überführt. Dieser Übergang aus dem niedrigsten Vibrationszustand des angeregten S_1 Zustands (Kasha Regel [108]) in den Grundzustand ist quantenmechanisch erlaubt und verläuft sehr schnell mit einer typischen Lebensdauer $\tau_F \sim 10^{-8}$ s in Form eines emittierten Photons. In Abb. 2.5 b) sind zwei Beispiele für fluoreszierende Moleküle wie Chinin^{**} und Rhodamin B gezeigt. Phosphoreszenz ist ein Emissionsprozess, bei dem ein Elektron aus dem angeregten Singulett-Zustand S_1 über Intersystem-Crossing (ISC) ($\tau_{ISC} \sim 10^{-12}$ s) in den angeregten Triplett-Zustand T_1 wechselt (Spin-Umkehr \rightarrow gleiche Spin-Ausrichtung) und von dort aus in den Grundzustand zurückkehrt. Dieser Prozess ist quantenmechanisch für elektrische Dipolstrahlung verboten und hat deshalb eine typische Lebensdauer τ_P von einigen Millisekunden bis zu mehreren Sekunden oder gar Minuten. Der Übergang kann sowohl unter Emission eines Photons stattfinden, als auch strahlungslos in Form von thermischer Energie. Phosphoreszenz tritt meist bei Molekülen auf, die schwere Atome wie Brom oder Iod enthalten. Die schweren Atome ermöglichen das Intersystem-Crossing und erhöhen damit die Wahrscheinlichkeit für den Prozess der Phosphoreszenz [110]. Ein weiteres Charakteristikum der Fluorophore bei Fluoreszenz-Mikroskopie ist die Quantenausbeute Q (engl.: quantum yield)

$$Q = \frac{\# \text{ emittierter Photonen}}{\# \text{ absorbierter Photonen}} = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{non}} , \quad (2.9)$$

mit Γ der Emissions-Rate und k_{non} der Rate für strahlungslose Prozesse. Die Fluoreszenz-Lebensdauer setzt sich folgendermaßen aus diesen Parametern zusammen:

^{**}Mit Hilfe von Chinin hat Sir Herschel 1845 erstmalig Fluoreszenz beobachten können [109].

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{non}} . \quad (2.10)$$

Eine hohe Quantenausbeute Q impliziert eine große Emissions-Rate Γ , damit werden konkurrierende Prozesse weniger wahrscheinlich. Deshalb kann bei solchen Fluorophoren schon mit einer geringen Lichtintensität des Anregungslights eine detektierbare Antwort erhalten werden. Das wiederum minimiert den Hintergrund und vermeidet das vorzeitige Fotobleichen (engl.: photobleaching, fading).

2.2.1 Fluoreszenz in der Nähe einer scharfen Scansonde

Die Anwesenheit einer scharfen Scansonde (metallisch oder dielektrisch), die wenige Nanometer von dem Farbstoff entfernt ist, kann durch Dipol-Dipol-Kopplung verstärkende Auswirkungen sowohl auf die Fluoreszenz-Intensität als auch auf die Emissions-Rate haben [111, 112]. Deshalb ist es sinnvoll bei Anwendungen wie aSNOM Farbstoffe mit niedriger Quantenausbeute zu benutzen.

Die Intensität der Fluoreszenz wird verstärkt, wenn das Material der Scansonde die Anregungs-Rate erhöht ($E + E_{sonde}$). Dieser Effekt bewirkt eine selektive Anregung einzelner Farbstoffe in der Nähe der Scansonde. In diesem Fall ändert sich die Quantenausbeute und folglich auch die Lebensdauer nicht. Wird jedoch die Emissions-Rate erhöht, so ändert sich die Gleichung 2.9 für die Quantenausbeute zu:

$$Q_{sonde} = \frac{\Gamma + \Gamma_{sonde}}{\Gamma + \Gamma_{sonde} + k_{non}} \quad (2.11)$$

und die Gleichung 2.10 für die Lebensdauer zu:

$$\tau_{sonde} = \frac{1}{\Gamma + \Gamma_{sonde} + k_{non}} . \quad (2.12)$$

Dieser Effekt hat eine Erhöhung der Quantenausbeute und eine Verringerung der Fluoreszenz-Lebensdauer zu Folge. Normalerweise ist eine Abnahme der Lebensdauer mit einer Abnahme der Quantenausbeute assoziiert, weil dadurch k_{non} die Rate für strahlungslose Prozesse anwächst (Gleichungen 2.9 und 2.10). Wird aber die totale Emissions-Rate $\Gamma_T = \Gamma + \Gamma_{sonde}$ erhöht, so wächst die Quantenausbeute an. In diesem Fall emittieren mehr Farbstoffe Licht, bevor diese strahlungslos über k_{non} zerfallen können.

Somit liefern Fluorophore mit niedriger Quantenausbeute in der Nähe einer Scansonde schnelle und lokale Fluoreszenz-Antworten mit hoher Intensität. Der Rest der Fluoro-

phore auf der Probe fluoresziert aufgrund der niedrigen Quantenausbeute mit geringerer Intensität. Daraus folgt geringere Hintergrundstrahlung [113].

2.3 Theorie der Kraftspektroskopie

Die Kraftspektroskopie ist eine weitere wichtige Anwendung des AFM, die es ermöglicht Bindungskräfte zwischen einzelnen Molekülen zu messen. Dafür werden die zu untersuchenden Moleküle an dem Kraftsensor beziehungsweise dem Substrat in Submonolagendichte immobilisiert, was in vielen Fällen eine Reihe von chemischen Präparationsschritten erfordert [114]. Dabei muss beachtet werden, dass die Kopplung der immobilisierten Moleküle, sowohl an dem Kraftsensor wie auch an dem Substrat, um Größenordnungen stärker (kovalent) ist, als die Dissoziationskräfte der wechselwirkenden Moleküle. Dies gewährleistet die Messung der gewünschten Ereignisse. Die Moleküle auf dem Kraftsensor werden häufig über einen Polymer-Linker (Polyethylenglycol, PEG) mit funktionellen Gruppen befestigt. Der Polymer-Linker stellt die sterische Flexibilität der Moleküle sicher und unterbindet die Messung von unspezifischer Adhäsion F_{ad} . Damit findet die Dissoziation (F_{bond}) des molekularen Komplexes in einer gewissen Entfernung von der Oberfläche statt, die der Länge des Polymer-Linkers entspricht (Abb. 2.6). Die Messungen werden in physiologischer Umgebung (Puffer, Lösungsmittel etc.) durchgeführt und erlauben eine präzise Bestimmung von sehr kleinen Kräften bis ~ 10 pN.

Die Methode wird in zwei Untergruppen unterteilt: dynamische Kraftspektroskopie (engl.: Dynamic Force Spectroscopy, DFS) und *Force Clamp*. Bei der ersten Methode wird mit konstanter Geschwindigkeit v am Molekül-Komplex gezogen und die Kraft F_{bond} , die für die Dissoziation notwendig ist, gemessen. Im zweiten Fall wird die Bindung des Molekül-Komplexes mit einer konstanten Kraft F belastet, bis dieser von selbst zerfällt. Hier wird die Zeit τ_d , die sogenannte Lebensdauer während der Belastung, gemessen.

Die Kraftspektroskopie wird unter anderem für die Bestimmung der thermodynamischen Dissoziationsrate von Rezeptor-Ligand-Bindungen [5] sowie in Untersuchungen von Protein-Faltungsstrukturen [115] verwendet. Die molekularen Bindungskräfte werden mittels des Hookeschen Gesetzes

$$\Delta F = -k\Delta z \quad (2.13)$$

extrahiert. Dabei wird der Abstand zwischen Kraftsensor und Probenoberfläche in

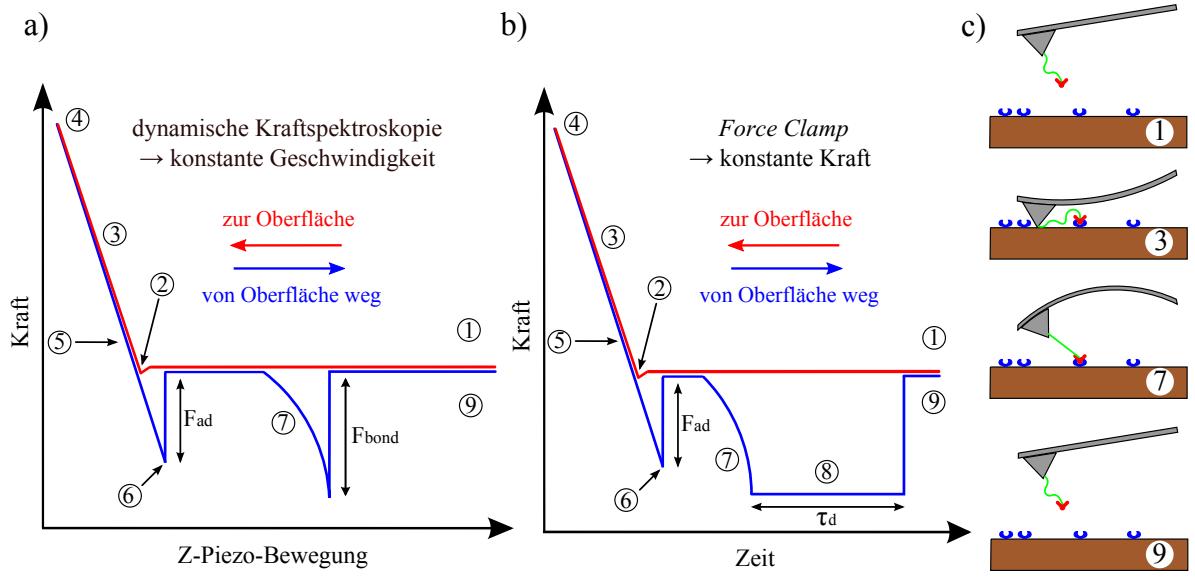


Abb. 2.6: Grafische Darstellung der beiden AFM-Kraftspektroskopie-Methoden:

- a) Dynamische Kraftspektroskopie, bei der die Ziehgeschwindigkeit v des Kraftsensors konstant gehalten wird.
- b) Force Clamp, bei der die wirkende Kraft F des Kraftsensors auf den Komplex konstant gehalten wird.
- c) Darstellung der wichtigsten Phasen der Kraftsensor-Bewegung in Momentaufnahmen.

z -Richtung variiert und die Auslenkung Δz (engl.: deflection) des Kraftsensors mit dem Lichtzeigersystem (Abschn. 2.1.1) gemessen. Die wirkende Kraft ΔF wird dann aus der Auslenkung Δz und der Federkonstante k (Abschn. 2.3.1) des Kraftsensors bestimmt. Der Kraftsensor wird zunächst mit dem Piezo an die Oberfläche gefahren, bis er mit einer definierten Kraft (engl.: trigger point) darauf drückt, und dann über eine festgelegte Distanz wieder zurückgezogen. Diese Distanz wird durch einen so genannten LVDT-Positionssensor (Linear Variable Differential Transformator) kontrolliert. Die Messdaten aus Kraft auf den Kraftsensor und Distanz des Piezos werden abhängig von der Kraftspektroskopie-Methode über eine Kraft-Distanz-Kurve beziehungsweise Kraft-Zeit-Kurve visualisiert.

In Abb. 2.6 a) ist eine typische Kraft-Distanz-Kurve der dynamischen Kraftspektroskopie und in Abb. 2.6 b) eine Kraft-Zeit-Kurve einer *Force Clamp* Messung dargestellt. Im Bereich (1) ist der Kraftsensor weit von der Probenoberfläche entfernt. Es wirkt keine Kraft, ergo gibt es keine Auslenkung des Kraftsensors. Nahe der Oberfläche über-

wiegen attraktive Kräfte (Van-der-Waals-, elektrostatische- und Kapillarkräfte), sodass der Kraftsensor zur Oberfläche „springt“ (snap-in) ②. Dieses Phänomen wird aber bei Messungen in Flüssigkeit durch Ladungsabschirmung stark unterdrückt. Bei weiterer Annäherung verbiegt sich der Kraftsensor aufgrund der nun dominierenden repulsiven Kräfte zunächst in seine Ruheposition. Bei Kontakt mit der Probenoberfläche wird dieser nun nach oben ③ ausgelenkt, bis eine vorgegebene Trigger-Kraft erreicht wird ④. Hier kann eine Verweildauer (engl.: dwell time) des Kraftsensors auf der Oberfläche definiert werden, damit die Moleküle genug Zeit zur Interaktion haben. Danach wird der Kraftsensor wieder zurückgezogen ⑤, kann aber durch unspezifische Wechselwirkungen an der Oberfläche haften ⑥ (F_{ad}). Erst wenn die Rückstellkraft die anziehenden Kräfte überwiegt, löst sich der Kraftsensor von der Probenoberfläche. Der Kraftsensor ist dann für kurze Zeit kräftefrei, bis dieser wieder eine Kraft verspürt, die durch eine spezifische molekulare Wechselwirkung hervorgerufen wird. Das zeigt sich durch einen nichtlinearen Teil der Kraft-Kurve^{††} ⑦. Bei der dynamischen Kraftspektroskopie wird der molekulare Komplex solange gestreckt bis dieser dissoziiert. Dabei wird die Höhe des Kraftsprunges F_{bond} gemessen. Dagegen wird bei *Force Clamp* der Komplex mit einer definierten konstanten Kraft belastet, bis er selbst zerfällt. Hier wird die Lebensdauer τ_d ⑧ der Bindung gemessen. Nachdem die Bindung unterbrochen worden ist, befindet sich der Kraftsensor in seiner Ausgangs-Position ⑨ und der Annäherungsprozess beginnt von neuem ①.

2.3.1 Kalibration des Kraftsensors

Die Federkonstante k des Kraftsensors muss vor jeder Messung kalibriert beziehungsweise bestimmt werden, um die wirkenden Kräfte möglichst genau zu messen. Es gibt mehrere Methoden, die sich in statische und dynamische Methoden unterteilen lassen [117]. Mit den statischen Methoden wird die Federkonstante des Kraftsensors über das Anlegen einer exakt bekannten Kraft und die dadurch hervorgerufene Auslenkung berechnet. Bei den dynamischen Methoden wird die Resonanzfrequenz kombiniert mit den geometrischen Informationen des Kraftsensors für die Bestimmung der Federkonstante verwendet.

Im Folgenden wird auf die so genannte *Thermal Noise* Methode [118] genauer eingegan-

^{††}Durch das Anpassen des nichtlinearen Teils der Kraft-Kurve mit dem Wormlike-Chain-Modell (WLC), kann die Steifigkeit beziehungsweise die Elastizität des Komplexes berechnet werden [116].

gen, da diese recht gängig ist und auch in dieser Arbeit angewendet worden ist. Diese Methode erlaubt es relativ „weiche“ Kraftsensoren bis zu einer Federkonstante von $k = 200 \frac{\text{pN}}{\text{nm}}$ zu kalibrieren [119]. Dabei wird der Kraftsensor als harmonischer Oszillator im thermischen Gleichgewicht betrachtet, der durch die Hamiltonfunktion

$$H = \frac{p^2}{2m_{\text{eff}}} + \frac{1}{2}m_{\text{eff}}\omega_0^2q^2 \quad (2.14)$$

beschrieben wird. Mit p dem Impuls, m_{eff} der effektiven Masse, ω_0 der Resonanzfrequenz und q der Auslenkung des Oszillators (Kraftsensors). Das Äquipartitionstheorem liefert folgenden Zusammenhang:

$$\left\langle \frac{1}{2}m_{\text{eff}}\omega_0^2q^2 \right\rangle = \frac{1}{2}k_B T, \quad (2.15)$$

mit k_B der Boltzmannkonstante und T der absoluten Temperatur. Durch Verwendung von $\omega_0^2 = \frac{k}{m_{\text{eff}}}$ folgt für die Federkonstante des Kraftsensors:

$$k = \frac{k_B T}{\langle q^2 \rangle}. \quad (2.16)$$

Für die Berechnung von $\langle q^2 \rangle$ muss die Langevin Gleichung für einen gedämpften harmonischen Oszillator mit erzwungener Schwingung gelöst werden, die durch

$$\frac{d^2q}{dt^2} + 2\alpha \frac{dq}{dt} + \omega_0^2 q = \frac{F_0}{m_{\text{eff}}} \exp i\omega t \quad (2.17)$$

gegeben ist, wobei α die Dämpfungskonstante, ω Anregungsfrequenz, ω_0 Resonanzfrequenz und F_0 die externe Kraft ist. Bei geringer Dämpfung ($2\alpha \ll \omega_0$) und $\omega \approx \omega_0$ ist die partikuläre Lösung für stationäre Schwingung im thermischen Gleichgewicht gegeben durch ein Lorentzprofil:

$$q(t) = \frac{F_0}{2m_{\text{eff}}\omega\sqrt{(\omega_0 - \omega)^2 + \alpha^2}} \cos(\omega t + \varphi) \quad (2.18)$$

mit $\varphi = \arctan\left(\frac{\alpha\omega}{\omega^2 - \omega_0^2}\right)$ dem Phasenwinkel. Durch Integration des Quadrats der Fouriertransformierten dieser Lösung:

$$\tilde{q}(\omega)^2 = \frac{A_0^2\omega_0^4}{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + \left(\frac{\omega\omega_0}{Q}\right)^2} \quad (2.19)$$

mit $Q = \frac{\omega_0}{\alpha}$ Gütefaktor und A_0 Amplitude, über den Frequenzraum, ergibt sich die mittlere quadratische Auslenkung:

$$\langle q^2 \rangle = \int_0^\infty d\omega \tilde{q}(\omega)^2. \quad (2.20)$$

Die Parameter A_0 , ω_0 und Q werden durch einen Fit automatisch ermittelt. Die Auslenkung wird aber zunächst in $Defl$ [V] ausgegeben. Damit die Elektronik das Signal in pN ausgibt, muss eine Kraft-Distanz-Kurve auf hartem Untergrund (Mica, Gold) aufgenommen und die Steigung im Kontaktbereich bestimmt werden. Die inverse Steigung, liefert die so genannte inverse optische Kraftsensorsensitivität (engl.: inverted optical lever sensitivity) $InvOLS$ [nm/V], mit der die Auslenkung in $Defl$ [nm] umgerechnet werden kann:

$$Defl[\text{nm}] = Defl[\text{V}] \cdot InvOLS [\text{nm/V}]. \quad (2.21)$$

Damit folgt für die Gleichung 2.16:

$$k = \frac{k_B T}{\langle \delta V^2 \rangle \cdot \chi^2 \cdot InvOLS^2} \quad (2.22)$$

mit χ Korrekturfaktor und $\langle \delta V^2 \rangle$ mittlerer quadratischer Auslenkung in Volt. Der Korrekturfaktor ist das Verhältnis von dem $InvOLS$ -Wert für einen frei schwingenden Kraftsensor und dem $InvOLS$ -Wert im Kontakt. Auch die Position und Größe des Laserspots sind für den Korrekturfaktor relevant [120]. Mit Hilfe dieser Parameter wird die auf den Kraftsensor wirkende Kraft bestimmt:

$$F[\text{pN}] = Defl[\text{nm}] \cdot k \left[\frac{\text{pN}}{\text{nm}} \right]. \quad (2.23)$$

Der Messfehler bei der Kalibration liegt bei allen Methoden bei etwa 10 – 15% [121, 122].

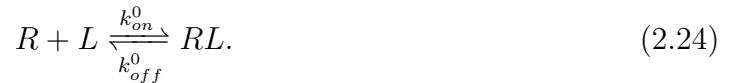
2.3.2 Kinetik, Thermodynamik und Kräfte

Die AFM-Kraftspektroskopie ist ein Werkzeug, um Dissoziationskräfte von zum Beispiel Rezeptor-Ligand-Systemen zu messen. Anfangs war jedoch die Handhabung beziehungsweise die molekulare Essenz der gemessenen Kräfte nicht ganz klar. Deshalb wurde zunächst fälschlicherweise angenommen, dass die absolut gemessenen Kräfte gewisse molekulare Bindungskräfte widerspiegeln. Es hat sich später herausgestellt, dass die

gemessenen Kräfte einer statistischen Verteilung unterliegen, die insbesondere von der Ziehgeschwindigkeit abhängt, aber auch von weiteren Parametern [33]. Diese Erkenntnis gelang Evan Evans und Ken Ritchie [5] 1997. Sie entwickelten ein Modell basierend auf der **Reaktionsratentheorie** [4, 6, 123, 124] für die Beschreibung der Dissoziation eines Komplexes unter einer äußeren Kraft. Die Kernannahme war, dass die erzwungene Dissoziation einer Bindung mit einem thermisch aktivierte Zerfall eines metastabilen Zustands verglichen werden kann.

Dissoziation im thermodynamischen Gleichgewicht

Die Wechselwirkung eines Rezeptors R mit einem Liganden L wird durch die Assoziationskonstante k_{on}^0 $\left[\frac{1}{\text{sm}}\right]$ oder auch On-Ratenkonstante und die Dissoziationskonstante beziehungsweise die thermische Off-Ratenkonstante k_{off}^0 $\left[\frac{1}{\text{s}}\right]$ beschrieben. Die Assoziationskonstante k_{on}^0 reflektiert die Bildung des Komplexes RL und die Dissoziationskonstante k_{off}^0 dessen Zerfall:



Derzeit ist die Assoziationskonstante k_{on}^0 über Ensemble-Messungen wie SPR (Surface Plasmon Resonance) zugänglich [125, 126]. Es gibt aber Hinweise darauf, dass k_{on}^0 auch aus der Annäherungskurve der AFM-Kraftspektroskopie bestimmt werden kann [127]. Biochemische Reaktionen werden durch die freie Enthalpie $G(T, p) = H - TS$ thermodynamisch beschrieben. Um die Berechnungen zu vereinfachen, wird der Wert der Temperatur T und der Druck p festgehalten. Über die Richtung der Reaktion entscheidet die Differenz ΔG der freien Enthalpien von End- und Anfangszustand:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = G_E - G_A, \quad (2.25)$$

mit ΔH Reaktionsenthalpie und ΔS Entropieänderung im System. Für ΔG folgt mit der freien Standardenthalpie ΔG^0 :

$$\Delta G = \Delta G^0 - RT \ln \frac{[R][L]}{[RL]}, \quad (2.26)$$

dabei sind $R = 8,314 \frac{\text{J}}{\text{Kmol}}$ die universelle Gaskonstante, $[R]$ und $[L]$ die Konzentrationen der freien Rezeptoren beziehungsweise Liganden und $[RL]$ die Konzentration der

Rezeptor-Ligand-Komplexe. Befindet sich das System im thermodynamischen Gleichgewicht, so ist $\Delta G = 0$, somit folgt:

$$\frac{[R][L]}{[RL]} = \frac{k_{off}^0}{k_{on}^0} = K_D \quad (2.27)$$

und die Dissoziationsgleichgewichtskonstante des Komplexes K_D [M] kann berechnet werden. Die freie Standardenthalpie lässt sich dann schreiben:

$$\Delta G^0 = RT \ln K_D. \quad (2.28)$$

Die Assoziation der Rezeptor-Ligand-Reaktion läuft im thermodynamischen Gleichgewicht spontan ab, wenn $\Delta G^0 < 0$ ist. Die Dissoziation eines solchen Komplexes erfordert Energie, die durch thermische Fluktuationen erbracht wird und zum Zerfall der Bindung führt. Solch eine Dissoziation eines Komplexes kann nach Arrhenius [128] als ein thermisch aktiviertes Überwinden einer endlich hohen Potentialbarriere beschrieben werden, die folgendem Zusammenhang entspricht:

$$k_{off}^0 = C \exp \left\{ -\frac{\Delta G^\ddagger}{k_B T} \right\} \quad (2.29)$$

mit ΔG^\ddagger der Höhe der Potentialbarriere, $k_B T$ der thermischen Energie und C dem Proportionalitätsfaktor [4].

Dissoziation unter einer äußeren Kraft

Wird eine äußere Kraft F an einen Komplex angelegt, so wird nach Kramers-Bell-Evans [4–6] die Höhe der Potentialbarriere um $F \cdot x_\beta$ verringert und die Dissoziation des Komplexes beschleunigt:

$$\Delta G^\ddagger(F) = \Delta G^\ddagger - F \cdot x_\beta, \quad (2.30)$$

wobei $x_\beta = x_{max} - x_{min}$ die molekulare Bindungslänge darstellt, die dem Abstand zwischen dem Minimum des metastabilen Zustands und dem Maximum der Potentialbarriere entspricht (Abb. 2.7 a)). Aus dieser Beziehung folgt mit Gleichung 2.29 für die Dissoziation unter einer externen Kraft F :

$$k_{off}(F) = k_{off}^0 \exp \left\{ \frac{F \cdot x_\beta}{k_B T} \right\}. \quad (2.31)$$

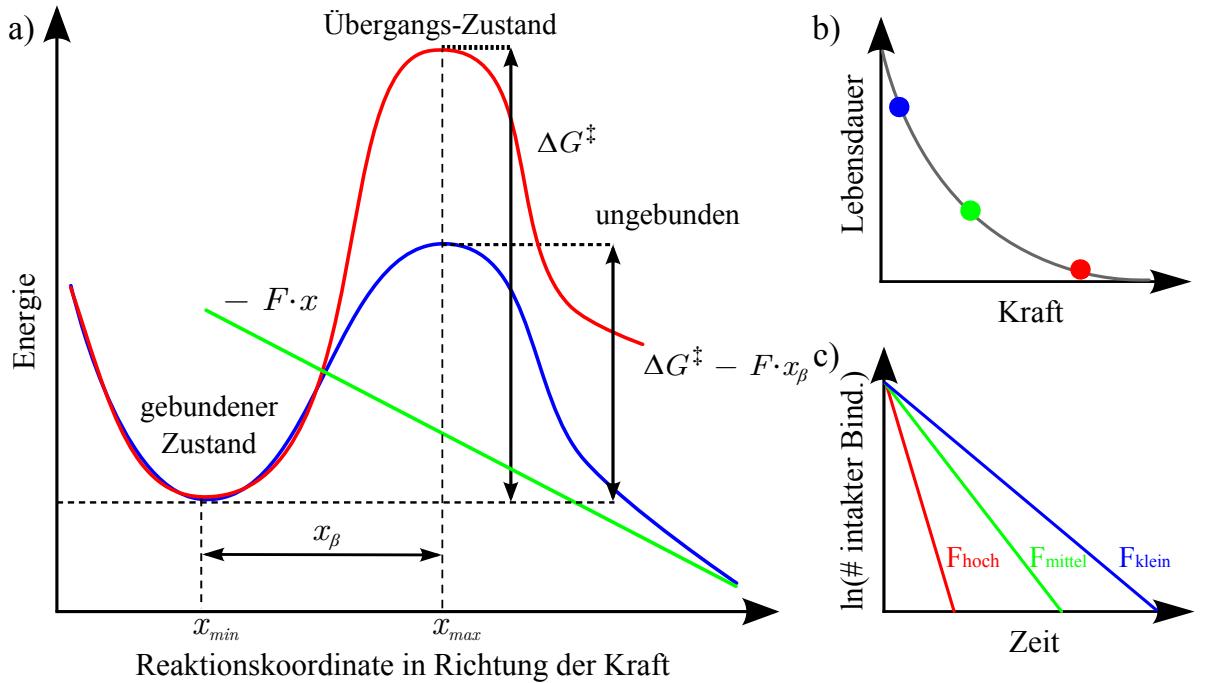


Abb. 2.7: a) Typische Potentiallandschaft für ein Slip Bond. Die rote Kurve stellt die thermische Dissoziation eines Komplexes dar, der aus einem metastabilen Zustand x_{min} über die Potentialbarriere x_{max} in einen ungebundenen Zustand beziehungsweise in einen zweiten metastabilen Zustand übergeht, falls vorhanden. In diesem Fall ist die Kinetik und damit die thermische Off-Ratenkonstante k_{off}^0 von der Temperatur T und der Höhe der Potentialbarriere ΔG^\ddagger abhängig. Die blaue Kurve zeigt den Verlauf des Potentials bei einer wirkenden äußeren Kraft, die durch die grüne Kurve angedeutet ist. Die Potentialbarriere ΔG^\ddagger wird dabei um den Wert $F \cdot x_\beta$ abgesenkt.
b) Charakteristischer exponentiell abnehmender Verlauf der Lebensdauer τ mit steigender Kraft von Slip Bonds.
c) Zeigt denselben Kontext wie b). Hier werden die Messwerte der Lebensdauer zunächst abwärts sortiert. Dann wird $\ln(\# \text{ intakter Bind.})$ gegen die Zeit t aufgetragen. Mit wachsender Kraft wird die Lebensdauer kürzer.

Die Gleichung 2.31 liefert die Dissoziationsrate als Funktion einer wirkenden mechanischen Kraft. Mit der gemessenen Lebensdauer τ_d bei einer bestimmten Kraft F und der Beziehung $k_{off}^0 = \frac{1}{\tau}$ können die thermische Off-Ratenkonstante k_{off}^0 sowie die molekulare Bindungslänge x_β aus den Force Clamp Daten (Abschn. 2.3, Abb. 2.6 b)) bereits durch Gleichung 2.31 bestimmt werden.

Für die Bestimmung von k_{off}^0 und x_β mittels der dynamischen Kraftspektroskopie (Abb. 2.6 a)) muss die Reaktionskinetik näher betrachtet werden. Diese ist ein stochastischer

Prozess wird beschrieben durch:

$$\frac{dp(t)}{dt} = -k_{off}(F(t))p(t), \quad (2.32)$$

dabei ist $p(t)$ die Wahrscheinlichkeit, dass die Bindung bis zum Zeitpunkt t überlebt. Voraussetzung für die Gültigkeit dieser Definition ist, dass die Vergangenheit des Systems nicht relevant für die Dissoziationswahrscheinlichkeit ist, sondern nur die momentan wirkende Kraft. Aufgrund der sehr viel schnelleren Relaxation ($t \approx 10^{-10} - 10^{-9}$ s) [129, 130] von intramolekularen Prozessen in das thermodynamische Gleichgewicht, verglichen mit der Änderung der angelegten Kraft $F(t)$ ($\sim 10^{-4}$ s bis min) [130] und der Lebensdauer der Bindung, ist die Prämisse erfüllt. Eine weitere wichtige Annahme ist, dass die wirkende Kraft $F(t)$ von der gesamten Auslenkung $x = v \cdot t$ aller elastischen Komponenten (Moleküle, Kraftsensor etc.) abhängt und nicht von der Ziehgeschwindigkeit:

$$F(t) = f(v \cdot t) = f(s). \quad (2.33)$$

Somit ergibt sich bei konstanter Ziehgeschwindigkeit v des Kraftsensors von der Probenoberfläche eine konstante Belastungsrate r (engl.: loading rate) auf den Komplex:

$$\frac{df(s)}{dt} = \frac{df(s)}{dx} \frac{dx}{dt} = k_{eff} \cdot v = r. \quad (2.34)$$

Dabei ist k_{eff} die effektive Federkonstante des Systems, deren Wert sich aus den Federkonstanten des Kraftsensors sowie der Elastizität des Linkers und des molekularen Komplexes zusammensetzt.

Mit Gleichung 2.32 und Gleichung 2.33 ergibt sich dann für die Wahrscheinlichkeit des Überlebens der Bindung unter einer äußeren Kraft F mit $p_v(F(t)) = p(t)$ und $p(t=0) = p_v(F=F_{min}) = 1$ der Ausdruck:

$$p_v(F) = \exp \left\{ -\frac{1}{v} \int_{F_{min}}^F dF' \frac{k_{off}(F')}{f'(f^{-1}(F'))} \right\}. \quad (2.35)$$

F_{min} ist der Schwellenwert, bei dem die Dissoziationskräfte im Experiment gerade noch von den thermischen Fluktuationen unterschieden werden können.

Damit die inverse Funktion f^{-1} existiert, muss $f(s)$ monoton wachsend sein. Das Maximum der Verteilung $-\frac{d^2 p_v(F)}{dF^2} = 0$ liefert bei einer gegebenen Belastungsrate r die wahrscheinlichste Dissoziationskraft F_{max} :

$$F_{max} = \frac{k_B T}{x_\beta} \ln \frac{x_\beta r}{k_{off}^0 k_B T}. \quad (2.36)$$

Dieser Zusammenhang bildet die Basis für die dynamische Kraftspektroskopie. Um die thermische Off-Ratenkonstante zu erhalten, werden Kräfteverteilungen für verschiedene Belastungsraten aufgenommen, indem die Ziehgeschwindigkeiten über mehrere Größenordnungen variiert werden. Die erhaltenen Werte der wahrscheinlichsten Dissoziationskräfte sollten in einer halblogarithmischen Darstellung eine lineare Abhängigkeit von den verschiedenen Belastungsraten zeigen. Die inverse Steigung der erhaltenen Regressionsgeraden ist proportional zu der molekularen Bindungslänge x_β . Die Extrapolation der Regressionsgeraden zum Wert $F_{max} = 0$ liefert die thermische Off-Ratenkonstante k_{off}^0 (Abb. 2.8). Der Kehrwert der Off-Ratenkonstante $\tau = \frac{1}{k_{off}^0}$ entspricht der mittleren Lebensdauer der Bindung.

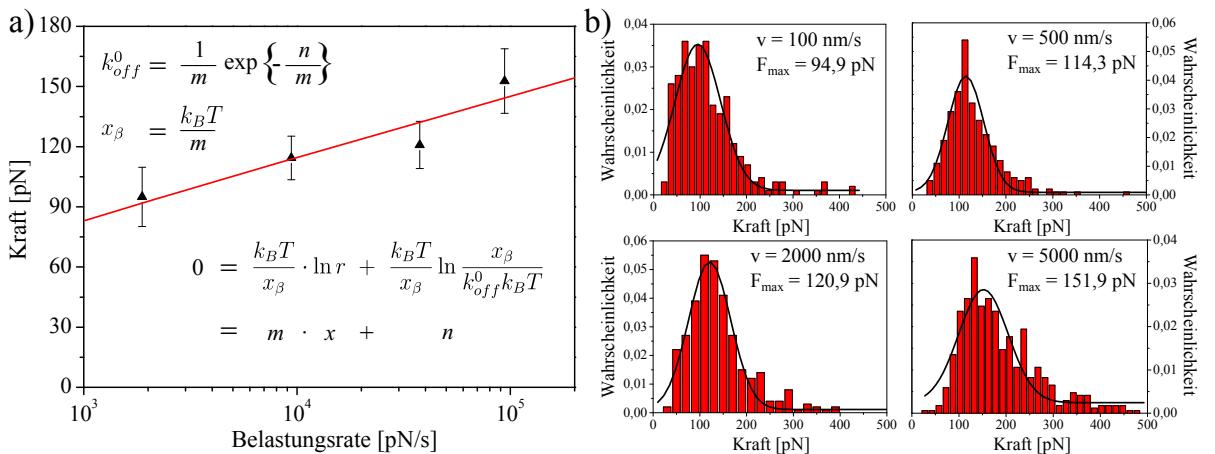


Abb. 2.8: Ein Beispiel für die Bestimmung der thermischen Off-Ratenkonstante k_{off}^0 nach Kramers-Bell-Evans an dem Datensatz aus [18].

a) Die halblogarithmische Auftragung der wahrscheinlichsten Dissoziationskräfte gegen die jeweiligen Belastungsraten mit linearer Anpassung der Form $y = m \cdot x + n$. Mit den Fit-Parametern m (Steigung) und n (Achsenabschnitt) lassen sich k_{off}^0 sowie x_β berechnen.

b) Die erhaltenen Verteilungen von Dissoziationskräften für die verschiedenen Ziehgeschwindigkeiten. Die wahrscheinlichsten Dissoziationskräfte F_{max} werden jeweils mit einer Gauß-Anpassung bestimmt.

2.3.3 Slip Bond

In den meisten Fällen verkürzt sich die Lebensdauer τ_d des Rezeptor-Ligand-Komplexes mit zunehmender Zugkraft F [7–19]. Dieses Verhalten gibt die Gleichung 2.31 wieder und ist in Abb. 2.7 b) und c) für verschiedene Kräfte schematisch dargestellt. Bindungen, deren Lebensdauer exponentiell mit wachsender Belastung abfällt, werden *Slip Bonds* genannt und werden durch die Kramers-Bell-Evans Theorie (Abschn. 2.3.2) beschrieben. Die Potentiallandschaft in Abb. 2.7 a) repräsentiert eine Bindung mit *Slip Bond* Charakter.

2.3.4 Catch Bond

In bisher wenigen bekannten Fällen bewirkt eine äußere mechanische Zugkraft in einem gewissen Kräfte-Intervall, meist zwischen 10 und 40 pN, eine Verlängerung der Lebensdauer τ_d (Abb. 2.11 b) und c)) des Molekül-Komplexes. Dieses „unintuitive“ Verhalten von Dissoziationsereignissen wird *Catch Bond* genannt und wurde bereits 1988 von Dembo et al. vorhergesagt [131]. Beobachtet wurden *Catch Bonds* zum ersten Mal 2002 zwischen dem bakteriellen Adhäsin^{††} *FimH* und seinem Liganden, der D-Mannose

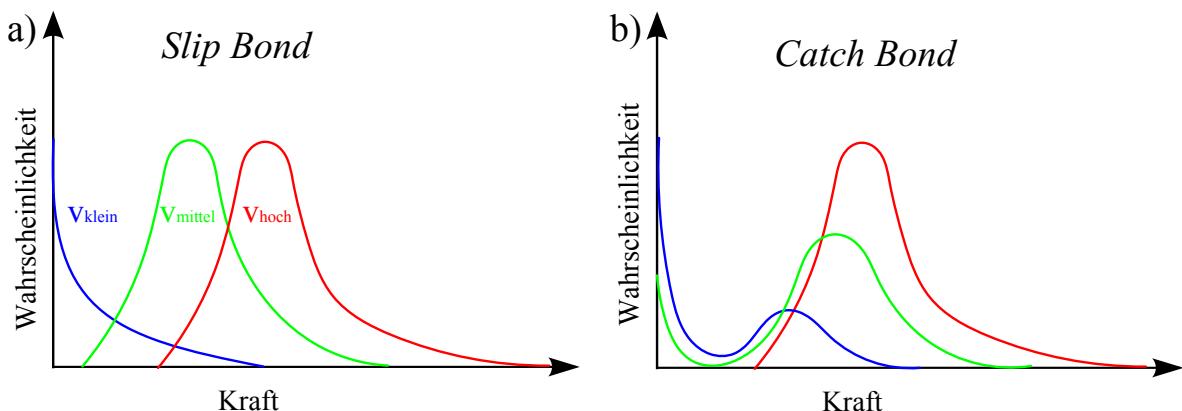


Abb. 2.9: Wahrscheinlichkeitsverteilungen für Einzelmolekül-Experimente mit konstanter Geschwindigkeit v (dynamische Kraftspektroskopie). Für *Slip Bonds* a) bleibt die Wahrscheinlichkeit nahezu konstant, bei wachsender Geschwindigkeit v . Es wird lediglich der typische Anstieg der Kraft F beobachtet. Bei *Catch Bonds* b) steigt sowohl die Kraft F als auch die Bindungswahrscheinlichkeit mit wachsender Geschwindigkeit v an.

^{††}Adhäsine sind Faktoren, die von Bakterien exprimiert werden und für die Anhaftung von Bakterien an Strukturen beziehungsweise Zellen des Wirtes zuständig sind.

[132–134]. Weitere Rezeptor-Ligand-Paare mit *Catch Bond* Charakter sind die Adhäsionsmoleküle der Blutzellen P-Selectin und L-Selectin, die an ihre *Sialyl-Lewis^X*^{§§} enthaltenden Liganden binden [30, 135, 136], die Interaktion des Motorproteins Myosin mit dem Aktinfilament [137], die Wechselwirkung der Integrine mit ihren Liganden [138] sowie die Bindung zwischen dem Glycoprotein Ib α (GPIb α) mit dem Von-Willebrand-Faktor (vWF) [139] und die Interaktion der Cadherine [140].

Insbesondere ist die Interaktion zwischen P-Selectin mit seinem primären Liganden *P-Selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) ein sehr prominentes *Catch Bond* System. Diese Wechselwirkung ist wesentlich für das Abrollen der Leukozyten entlang der Gefäßwand [142] und wurde bereits 1998 von Anselmetti und Kollegen mit dynamischer Kraftspektroskopie untersucht [143]. Sie stellten fest, dass die Bindungswahrscheinlichkeit mit zunehmender Zuggeschwindigkeit am Komplex höher wird (Abb. 2.9) und fanden dabei eine Anomalie, die alle bisher bekannten *Catch Bond* Systeme zeigen. Somit sind *Catch Bonds* sowohl in Experimenten mit konstanter Geschwindigkeit sowie auch mit konstanter Kraft nachweisbar (Abb. 2.6) und können von den *Slip Bonds* unterschieden werden. Die klassische Methode für den Nachweis von *Catch Bonds* sind Ensemble-Messungen in einer Hydrodynamischen-Flusskammer [144, 145]. Die bessere Alternative sind jedoch

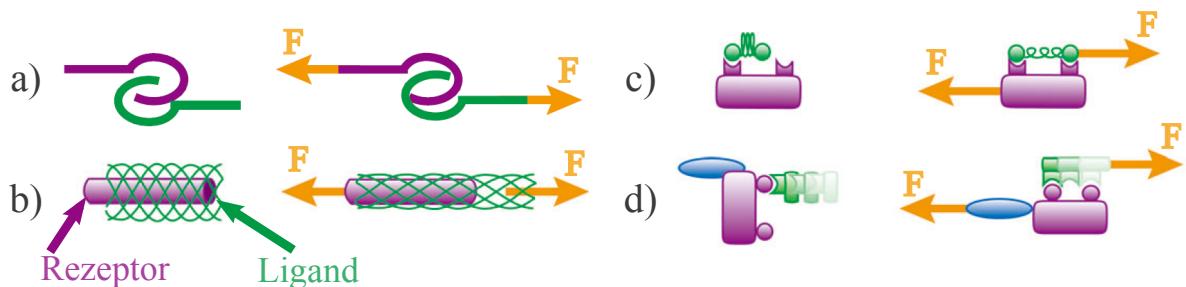


Abb. 2.10: Mögliche Konzepte, die *Catch Bond* Verhalten hervorrufen können: a) Beim Modell Harpune beziehungsweise Widerhaken sollte der Ligand in Richtung des Rezeptors gebracht werden, damit die Bindung bricht. b) Funktioniert wie eine Fingerfalle. Hier wird die Dissoziation des Komplexes durch eine externe Zugkraft F erschwert. Bei c) wird der Rezeptor-Ligand-Komplex durch eine angelegte Kraft F passend deformiert, sodass eine festere Bindung entstehen kann. d) zeigt das Sliding-Rebinding Modell. Hier wird angenommen, dass bei einer angelegten Kraft F der Rezeptor-Ligand-Komplex seine Orientierung ändert und dadurch neue Bindungsstellen für eine festere Interaktion frei werden. (aus [141])

§§ *Sialyl-Lewis^X* oder auch *sialyl Le^X* und *SLe^X* ist ein Tetrasaccharid, das für gewöhnlich über ein O-Linked Oligosaccharid mit der Zelloberfläche verknüpft wird.

AFM-Experimente mit konstanter Kraft (*Force Clamp*, Abb. 2.6 b)). Diese Methode bietet Einzelmolekül-Auflösung und die Lebensdauer des Komplexes ist direkt messbar. Zudem ist *Force Clamp* besonders im Kräfte-Bereich einiger Pikonewton sehr sensitiv [135].

Für die molekulare Funktionsweise von *Catch Bonds* wurden mehrere anschauliche Konzepte vorgestellt, die in der Abb. 2.10 gezeigt sind. Im einfachsten Fall fungieren Rezeptor und Ligand mikroskopisch wie eine Fingerfalle oder ein Widerhaken beziehungsweise eine Harpune makroskopisch.

Wird an den genannten makroskopischen Systemen kräftig gezogen, so bleiben die Finger in der Falle beziehungsweise der Widerhaken im Fisch, wohingegen sich beim vorsichtigen Ziehen die Systeme leicht lösen.

Es gibt noch keine einheitliche mathematische Beschreibung der *Catch Bonds*, da sogar die wenigen bekannten Systeme untereinander Unterschiede aufweisen und die verfügbaren Modelle das Verhalten noch nicht zufriedenstellend beschreiben. Momentan werden mehrere Modelle diskutiert, die die Wechselwirkung der P- und L-Selectine mit ihren Liganden beschreiben können. Dazu gehören das *Sliding-Rebinding* Modell [20, 21], das *Deformation* Modell [22] sowie das *One-State, two-path Catch Bond* Modell [23, 24] und weitere [25–29]. Das *One-State, two-path Catch Bond* eignet sich auch für die Beschreibung des Bindungsverhaltens von Myosin mit dem Aktinfilament. Die Bindungs-Charakteristik der *FimH* Interaktion mit seinem Liganden D-Mannose wird allerdings bis jetzt nur von dem *Two-State Catch Bond* [30] Modell qualitativ erklärt. Diese Modelle basieren nicht alle streng auf der Kramers-Bell-Evans Theorie (Abschn. 2.3.2).

2.3.5 ***One-State, two-path Catch Bond* Modell**

Als Beispiel wird im Folgenden kurz auf die Physik der *Catch Bonds* mittels des *One-State, two-path Catch Bond* Modells eingegangen.

Experimentell wurde gezeigt, dass eine *Catch Bond* Interaktion bei einer kritischen Kraft f_{cr} zur einer *Slip Bond* Wechselwirkung wird [135, 137, 138]. Aus diesem Verhalten folgt, dass das Rezeptor-Ligand-System zwei Möglichkeiten der Dissoziation hat (two-pathway Modell) [136]. Um diese Eigenschaft mit einem Modell zu beschreiben, muss die Potentiallandschaft aus Abb. 2.7 a) angepasst werden, indem ein zweiter Dissoziationsweg eingeführt wird. In Abb. 2.11 a) besitzt nun die Potentiallandschaft zwei endliche Potentialbarrieren und stellt den Übergang von *Catch* bei einer mäßigen Kraft zu *Slip* bei

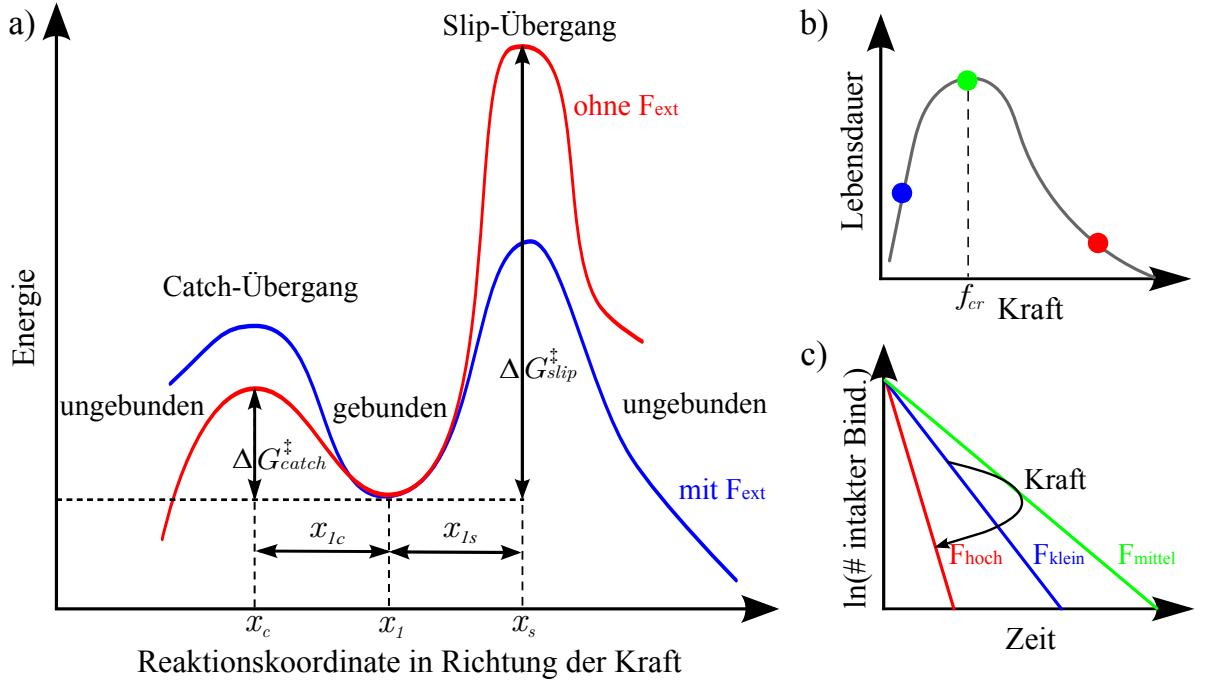


Abb. 2.11: a) Die Potentiallandschaft des One-State, two-path Catch Bond Modells. Der Rezeptor-Ligand-Komplex hat zwei Alternativen zu zerfallen: über den Catch-Übergang oder den Slip-Übergang, abhängig von der angelegten Kraft. Die rote Kurve zeigt den Potentialverlauf ohne und die blaue mit Krafteinwirkung. b) Verlauf der Lebensdauer τ_d abhängig von der Kraft. Bei der Kritischen Kraft f_{cr} ist die Lebensdauer τ_d maximal. c) $\ln(\# \text{ intakter Bindungen})$ aufgetragen gegen die Zeit t . Auch hier wird deutlich, dass die Bindungen mit Catch Bond Verhalten bei moderaten Zugkräften (F_{mittel}) eine längere Zeit brauchen, um zu zerfallen.

einer hohen Kraft dar.

In diesem Fall kann sich die Bindung auf zwei Wegen lösen. Der Ligand kann abhängig von der angelegten konstanten Kraft vom gebundenen Zustand x_1 über x_{1c} oder über x_{1s} in den ungebundenen Zustand wechseln. Dabei sind zwei Geometrien möglich:

- ① Die Kraft wirkt in Richtung von \vec{x}_s ,

$$x_{1s} = |\vec{x}_s - \vec{x}_1| \cos \theta > 0 \quad (2.37)$$

sodass die Interaktionslänge $x_{1s} > 0$ ist. In diesem Fall liegt ein Slip-Übergang vor. Die Bindung verhält sich wie in Abschn. 2.3.3 beschrieben.

- ② Wirkt die Kraft aber so, dass die Interaktionslänge $x_{1c} < 0$ wird, also negativ:

$$x_{1c} = -|\vec{x}_c - \vec{x}_1| \cos \theta < 0 \quad (2.38)$$

dann leistet die angelegte Kraft „negative Arbeit“ und führt zur Erhöhung der Potentiwalbarriere $\Delta G_{catch}^\ddagger$ des Catch-Übergangs. Diese Tatsache ruft einen Anstieg der Lebensdauer des Komplexes hervor und somit ist die Bindung ein *Catch Bond*. Dabei zieht die Kraft die Bindung von dem Übergangs-Zustand weg und bewirkt eine Verkürzung der Rezeptor-Ligand-Distanz, verglichen mit der Distanz im gebundenen Zustand ohne Krafteinwirkung.

Auch in diesem Fall handelt es sich um einen stochastischen Prozess, wo $p(t)$ die Wahrscheinlichkeit für das Überleben der Bindung bis zum Zeitpunkt $t > 0$ angibt. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit $p(0) = 1$ zur Zeit $t = 0$ maximal, diese sinkt mit voranschreitender Zeit t gemäß:

$$\frac{dp(t)}{dt} = -[k_{1c}(F(t)) + k_{1s}(F(t))]p(t). \quad (2.39)$$

$k_{1c}(F(t))$ und $k_{1s}(F(t))$ stellen die beiden Off-Ratenkonstanten bei einer konstant anliegenden Kraft für den Catch- beziehungsweise Slip-Übergang gemäß Gleichung 2.31 dar und sehen folgendermaßen aus:

$$k_{1c}(F) = k_{1c}^0 \exp \left\{ \frac{Fx_{1c}}{k_B T} \right\} \quad \text{und} \quad k_{1s}(F) = k_{1s}^0 \exp \left\{ \frac{Fx_{1s}}{k_B T} \right\} \quad (2.40)$$

mit k_{1c}^0 und k_{1s}^0 den thermischen Off-Ratenkonstanten gemäß Gleichung 2.29. Der Beitrag der Assoziation des Liganden mit dem Rezeptor wird in Gleichung 2.39 vernachlässigt, da dieser sich kaum ändert und sehr klein ist. Die Lösung der Gleichung 2.39 zeigt einen simplen exponentiellen Abfall der Wahrscheinlichkeit für das Überleben der Bindung:

$$p(t) = \exp \{ -(k_{1c} + k_{1s})t \}. \quad (2.41)$$

Dieses Verhalten des *two-pathway Catch Bonds* ist ähnlich dem des *Slip Bonds* nach Kramers-Bell-Evans. Mit dem Zusammenhang $\frac{1}{\tau} = k_{off}^0$ und der Gleichung 2.40 folgt für die inverse Lebensdauer:

$$\frac{1}{\tau(F)} = k_{1c}^0 \exp \left\{ \frac{Fx_{1c}}{k_B T} \right\} + k_{1s}^0 \exp \left\{ \frac{Fx_{1s}}{k_B T} \right\}. \quad (2.42)$$

Allgemein folgt für die Lebensdauer $\tau(F)$ mit Gleichungen 2.39, 2.41 und der Wahr-

scheinlichkeitsdichte $w(t) = -\frac{dp(t)}{dt} = \frac{1}{\tau(F)} \exp\left\{-\frac{t}{\tau(F)}\right\}$:

$$\tau(F) = \int_0^\infty tw(t)dt. \quad (2.43)$$

Gleichung 2.42 enthält vier Parameter k_{1c}^0 , x_{1c} , k_{1s}^0 und x_{1s} , die mittels Approximierung von experimentellen Daten bestimmt werden können. Vorausgesetzt, die Parameter erfüllen die Bedingung:

$$\alpha = -\frac{k_{1c}x_{1c}}{k_{1s}x_{1s}} > 1 \quad (2.44)$$

folgt für die kritische Kraft f_{cr} , bei der die Lebensdauer τ maximal ist, mit $\frac{d(1/\tau(F))}{dF} = 0$:

$$f_{cr} = \frac{k_B T}{x_{1s} - x_{1c}} \ln(\alpha). \quad (2.45)$$

Gleichung 2.44 setzt den Rahmen für die Bedingungen für das in Abb. 2.11 a) gezeigte Potential mit einem Minimum und zwei Maxima. Diese Bedingungen müssen erfüllt werden, damit ein *Catch Bond* Verhalten bei wachsender Zugkraft in ein *Slip Bond* Verhalten übergeht. Deshalb muss die thermische Off-Ratenkonstante des Catch-Übergangs immer höher sein als die des Slip-Übergangs $k_{1c}^0 > k_{1s}^0$ und die Interaktionslänge des Catch-Übergangs darf nicht kleiner werden als die des Slip-Übergangs $|x_{1c}| \geq |x_{1s}|$.

Wenn keine externe mechanische Kraft am Molekül-Komplex anliegt, liefert dieses Modell allerdings eine sehr kurze Lebensdauer (Abb. 2.11 b)).

3 Biologische Grundlagen

In diesem Kapitel wird auf die in dieser Arbeit verwendeten biologischen Systeme eingegangen.

3.1 Glycosaminoglycane

Glycosaminoglycane (GAG) gehören zu der Klasse natürlich vorkommender sulfatierter Polysaccharide, die aus langen, repetitiven, unverzweigten Polymeren bestimmter Disaccharide gebildet werden. Die Struktur ist meist durch die Disaccharide einer der beiden Uronsäuren D-Glucuronsäure respektive L-Iduronsäure und aus *N*-Acetylglucosamin oder *N*-Acetylgalactosamin gegeben. Sie sind charakteristisch für Vertebraten und kommen nur sporadisch in anderen Organismen wie der Afrikanischen Riesenschnecke (*Achatina fulica*) und dem *Escherichia coli* Bakterium als Kapselpolysaccharid K5 vor. Die GAG werden in Form hochmolekularer Proteoglycane synthetisiert und bilden einen wichtigen Bestandteil der extrazellulären Matrix (EZM) sowie der Glycocalyx tierischer Zellen. Proteoglycane sind vielfältige Makromoleküle und bestehen aus einem Kernprotein, dessen molare Masse (M_r) von 10 bis 500 kDa reichen kann, an das eine (z.B. Decorin) oder mehrere bis über 100 (z.B. Aggrecan) GAG-Ketten bürstenartig kovalent gebunden sind [146, 147].

Insgesamt gibt es sechs GAG-Typen: Keratansulfat (KS), Chondroitinsulfat (CS), Dermatansulfat (DS), Heparin (Hep), Heparansulfat (HS) und Hyaluronsäure (HA) (Abb. 3.1), wobei HA als einziges GAG keine Sulfatierung trägt und an kein Proteinrückgrat gebunden ist. Sowohl der makromolekulare Aufbau der Proteoglycane als auch der GAG weist eine breite Strukturpalette auf, die den Proteoglycanen eine vielfältige und essenzielle Rolle in vielen physiologischen Prozessen beschert [148, 149].

KS-Proteoglycane haben meist einfache mechanische Aufgaben in Bindegewebe und Stützgewebe (Fibromodulin) und sind auch in der Cornea (Lumican) zu finden.

CS-Proteoglycane sind verbreiteter und haben ebenfalls strukturelle Aufgaben (Knor-

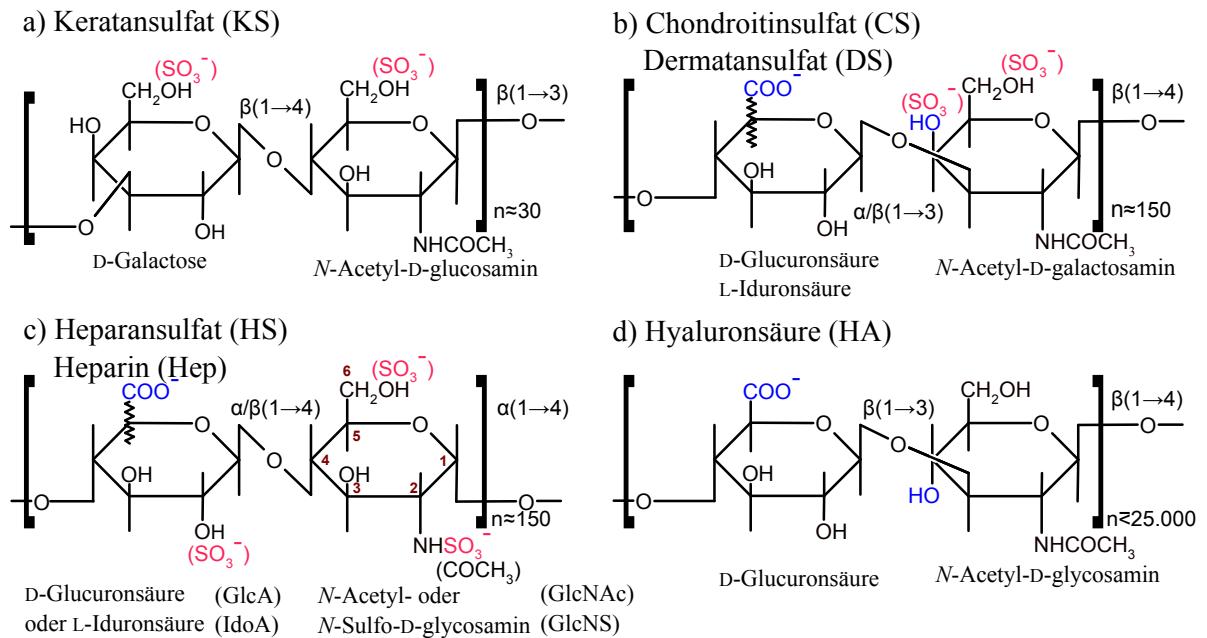


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der natürlich vorkommenden Glycosaminoglycane. Mit (SO_3^-) markierte Positionen zeigen mögliche Sulfatierungs Konstellationen der GAG.

pel: Aggrecan) [150] aber auch eine regulatorische Funktion bei der Immunantwort, der Blutgerinnung, der Ausbildung von Axonen [151] sowie bei der Signaltransduktion (engl.: signaling) von PDGF (platelet derived growth factor) [152].

HS-Proteoglycane zeigen aufgrund der großen strukturellen Diversität [153–156] und des ubiquitären Vorkommens die stärkste Bindungskapazität an verschiedenste Proteine. Bislang wurden über 100 verschiedene Proteine wie Enzyme, Proteaseinhibitoren, Wachstumsfaktoren, Selectine und einige weitere als Liganden von Heparansulfat beziehungsweise Heparin identifiziert. HS-Proteoglycane fungieren unter anderem als Transmembranproteine (Syndican), die die Organisation von Epithelien durch Zell-Zell-Interaktionen steuern oder dienen als Co-Rezeptor für den Wachstumsfaktor (*fibroblast growth factor*, FGF) [157]. Auch in der Basalmembran und EZM werden zahlreiche Vorgänge mit Beteiligung von HS-Proteoglycanen (Perlican und Agrin) gesteuert [158].

Die Protein-HS-Interaktion basiert meist auf elektrostatischen Wechselwirkungen, die zwischen den negativ geladenen Sulfat-Gruppen am GAG und den basischen Aminosäureresten (AS) am Proteinrückgrat geformt werden. Überwiegend fungieren Arginin- und Lysinreste, angeordnet in den sogenannten Cardin / Weintraub-Motiven Consensus-

Sequenzen, als Interaktionspartner zwischen den HS-Ketten. Diese Consensus-Sequenzen können von der Form [-X-B-B-X-B-] sein, die in der Regel einem β -Faltblatt [159] entspricht oder [-X-B-B-B-X-X-B-X], wobei diese Consensus-Sequenz gewöhnlich eine α -Helix darstellt [160]. X steht für eine beliebige jedoch ungeladene AS und B für Arginin oder Lysin. Bei beiden Motiven sind die unpolaren AS-Reste dem Proteinkern zugewandt und die basischen AS-Reste den HS-Ketten. Jedoch ist bei einer Vielzahl von Protein-HS-Interaktionen meist nicht die lineare Anordnung der basischen AS-Reste wichtig für eine spezifische Bindung, sondern ihre Tertiärstruktur, wo die wechselwirkenden AS-Reste in einem definierten Abstand von etwa 20 Å voneinander entfernt sind. Zudem existiert eine dritte Consensus-Sequenz der folgenden Komposition [-X-B-B-B-X-X-B-B-X-X-B-B-X-] [161, 162].

3.1.1 Biosynthese von Glycosaminoglycanen

Die komplexe und präzise regulierte Biosynthese der Proteoglycane und GAG verläuft nach einem fundamentalen Prinzip. Zu Beginn wird das Kernprotein am rauen endoplasmatischen Retikulum erzeugt. Darauf folgend startet die GAG-Synthese* von CS, DS und HS im Golgi-Apparat mit der *O*-glycosidischen Anbindung eines Tetrasaccharid-Linkers an einen Serinrest des Kernproteins in der Reihenfolge Serin-Xylose-Galactose-Galactose-Glucuronsäure. Anschließend wird die GAG-Kette alternierend sukzessiv mit Zuckerbausteinen am jeweils nicht reduzierenden Ende verlängert.

Bei CS/DS-Proteoglycanen werden abwechselnd *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc) und Glucuronsäure (GlcA) verbaut, bei HS-Proteoglycanen *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) und GlcA. Typischerweise besteht eine GAG-Kette aus 50 – 150 Disacchariden [148], das entspricht einer Länge von etwa 30 – 100 nm[†].

Die Modifizierung der GAG-Ketten findet bei CS/DS-Ketten nach vollständiger Ketten-Elongation statt. DS-Ketten haben im Unterschied zu CS-Ketten einen höheren Iduronsäure (IdoA) Anteil, der über C₅-Epimerisation aus der Glucuronsäure (GlcA) katalysiert wird und teilweise 2-*O*-sulfatiert ist. Ansonsten können sowohl DS- als auch CS-Ketten an 4-*O*- und 6-*O*-Positionen des GalNAc Sulfate tragen, die jeweils durch positionsspezifische Sulfotransferasen erzeugt werden [165, 166].

*Die Keratansulfat-Biosynthese [163] wird hier nicht näher erläutert, da KS nicht als Substrat für die Messungen verwendet wurde.

[†]Zum Beispiel hat das CS beim Aggrecan aus dem bovinen artikulären Knorpel eine Länge von 34 – 61 nm [18, 164].

Bei HS-Ketten [154, 167, 168] beginnt die enzymatische Modifizierung bereits während der Ketten-Elongation [153]. Zunächst werden die Acetyl-Gruppen des Glucosamins (GlcNAc) durch eine der vier verschiedenen Isoformen der *N*-Deacetylase/*N*-Sulfotransferase (NDST) umgestaltet, indem die Acetyl-Gruppen bis auf einige Ausnahmen durch Sulfat-Gruppen ersetzt werden (40 – 60%). Diese Modifizierungen sind essentiell für alle weiteren Konfigurationen der HS-Ketten, welche zwischen Zelltypen variieren und in einer definierten Reihenfolge stattfinden. Dazu gehören C₅-Epimerisation der GlcA zu IdoA mit 2-*O*-Sulfatierung, 6-*O*-Sulfatierung des GlcNS sowie GlcNAc und die seltener vorkommende 3-*O*-Sulfatierung des GlcNS(6S). Die hochsulfatierten Bereiche der HS-Ketten werden als S-Domänen bezeichnet. Diese bestehen aus 6 – 10 Disaccharid-Einheiten und enthalten als häufigste Komposition das tri-sulfatierte Disaccharid IdoA (2S)-GlcNS(6S). Zwischen den S-Domänen befinden sich Bereiche mit unmodifizierten *N*-acetylierten Glycosaminen (NA-Domänen), die 16 – 20 Disaccharide enthalten können. Der Übergang zwischen den S-Domänen und den NA-Domänen ist fließend und wird durch kurze Bereiche aus alternierend *N*-acetylierten und *N*-sulfatierten Glycosaminen (NA/NS-Domänen) gebildet [169]. Der Grad der Sulfatierung und die Ausdehnung der jeweiligen Domänen ist vom Gewebetyp und Entwicklungsstadium vorgegeben [170, 171]. Durch diese Faktoren werden signifikante Sulfatierungsmuster generiert, die dann sehr spezifische Interaktionen mit einer Vielzahl von Proteinen eingehen und dadurch wichtige physiologische Prozesse steuern oder katalysieren [172].

HS-Proteoglycane werden nach der Biosynthese nach außen sezerniert und auf der Zelloberfläche exponiert. Dort werden dann die HS-Ketten spezifisch desulfatiert, aber

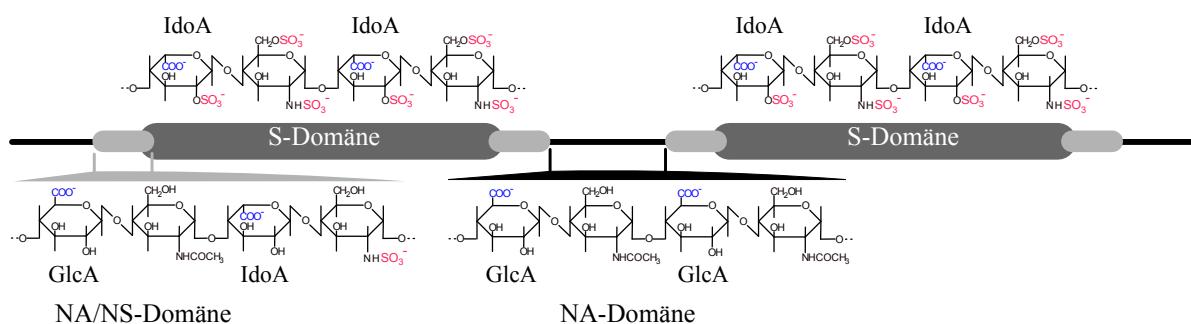


Abb. 3.2: Aufbau der S-Domänen aus tri-sulfatierten Disacchariden IdoA(2S)-GlcNS(6S), die unscharf durch alternierende kurze Bereiche der *N*-acetylierten und *N*-sulfatierten Glycosamine (NA/NS-Domänen) von den unmodifizierten *N*-acetylierten Glycosaminen (NA-Domänen) getrennt werden.

auch zum Teil durch Proteolyse des Kernproteins freigesetzt, somit können diese sowohl in Glycosaminoglycan- als auch in Proteinanteilen vorkommen und stellen eine Gruppe von löslichen membranständigen Proteoglycanen dar.

Für Forschungszwecke wird meistens Heparin anstelle von Heparansulfat verwendet, da das Heparansulfat sehr heterogene Strukturen annehmen kann, die sich wiederum von Zelltyp zu Zelltyp stark unterscheiden können. Heparin enthält über 70% des tri-sulfatierten Disaccharids IdoA(2S)-GlcNS(6S) und entspricht somit einer langen S-Domäne von HS-Ketten [173]. Weil die S-Domänen der HS-Ketten für die Regulation vieler essentieller Prozesse verantwortlich gemacht werden, ist das Heparin für die Nutzung als Modell-GAG prädestiniert [174]. Dadurch wird die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse gewährleistet und in Einzelmolekül-Experimenten die ohnehin geringe Interaktionswahrscheinlichkeit von spezifischen Sulfatmustern der S-Domänen mit den Proteinen erhöht. Folgend führt dieses Vorgehen zu einer besseren Statistik.

Das Heparin wird in basophilen Granulozyten[†] und Mastzellen an dem Protein Serglycin gebildet, wobei durch Einwirkung von spezifischen Proteasen und Endo- β -glucuronidasen Heparin-Ketten von etwa 15 kDa generiert werden, die bis zur ihrer Freisetzung in der Granula akkumuliert werden. Heparin kommt in erheblicher Menge in Darmmukosa, Lunge, Herz, Leber, Milz und Thymus vor. In der Medizin wird es aufgrund seiner antikoagulatorischen Wirkung als Blutgerinnungshemmer verwendet. Physiologisch ist die Aufgabe von Heparin bisher nicht ganz klar. Vermutlich übernimmt es Schutzfunktionen, durch das Binden von Proteasen und biologischen Aminen wie zum Beispiel Histaminen in der Granula, bis zu ihrer Verwendung.

3.2 Sulfatasen

Sulfatasen sind Sulfatester spaltende Enzyme, die beispielsweise den Sulfatierungsstatus von Glycosaminoglycan (GAG)-Ketten der Proteoglycane an der Zelloberfläche dynamisch editieren können und somit eine Vielfalt von essentiellen physiologischen Prozessen regeln. Insgesamt reichen diese von der Degradation sulfatiertter Makromoleküle über anabole Prozesse im Rahmen der Embryogenese und Homöostase im adulten Organismus bis zur Hormonregulation. Es sind drei Sulfatase-Typen bekannt, deren unterschiedliche Reaktionsmechanismen durch ihre jeweiligen aktiven Zentren festgelegt sind.

[†]analoge Blutzellen

Die Sulfatasen vom Typ I [175] sind am häufigsten und werden durch einen FGly-Rest (2-Amino-3-oxypropansäure, C_α -Formylglycin) in den aktiven Zentren charakterisiert, der durch eine posttranskriptionale Modifikation eines Cysteinrestes [176–178] oder Serinrestes [179] erzeugt wird und für die katalytische Aktivität der Sulfatasen essenziell ist [180]. Dieses Strukturmerkmal kommt bislang bei allen charakterisierten prokaryotischen und eukaryotischen Sulfatasen vor, welches das Sulfatester hydrolytisch zu anorganischem Sulfat und einem entsprechendem Alkohol spaltet (Abb. 3.3). Im menschlichen Organismus sind lediglich Typ I-Sulfatasen zu finden, die deshalb auch humane Sulfatasen genannt werden. Zurzeit sind 17 verschiedene humane Sulfatasen bekannt, von denen 11 in der Tab. 3.1 aufgeführt sind. In der Regel haben diese Sulfatasen eine Größe von 500 – 600 Aminosäureresten und werden umfangreich N -glycosyliert.

Die Superfamilie der Dioxygenasen stellen die Typ II-Sulfatasen dar und sind Fe(II) und α -Ketoglutarat abhängige Enzyme. Diese Enzyme spalten oxidativ Sulfatester zu anorganischem Sulfat und einem entsprechenden Aldehyd [181].

Typ III-Sulfatasen besitzen ein Zn^{2+} -Ion im aktiven Zentrum, welches eine hydrolytische Spaltung über ein aktives H_2O -Molekül vermittelt [182].

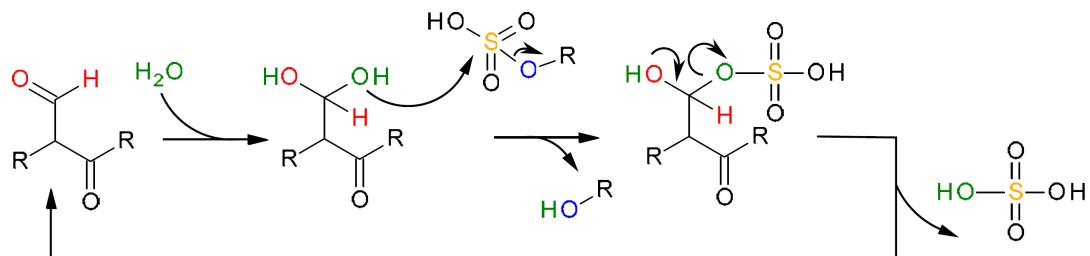


Abb. 3.3: Schematische Darstellung des Sulfatesterhydrolyse-Prozesses: Zunächst erfolgt eine Hydratisierung des C_α -Formylglycins zu einem geminalen Diol (linke Seite). Folgend wird das Schwefelatom des Sulfatester über einen Umsatz-Substitutions-Mechanismus einem nukleophilen Angriff durch eine der beiden Hydroxylgruppen des C_α -Formylglycins unterzogen. Dabei verlässt das Substrat als Alkohol das katalytische Zentrum. Im Weiteren wird das anorganische Sulfat durch intramolekulare Umlagerungen des Elektronenpaares der zweiten Hydroxylgruppe entfernt, somit entsteht wieder ein C_α -Formylglycin, welches sich einem weiteren Reaktionszyklus anbietet [183, 184]. (aus [185])

3.2.1 Humane Sulfatasen

Wie im vorherigen Abschn. 3.2 beschrieben, kommen nur Typ I-Sulfatasen im Menschen vor. Diese haben erheblichen Einfluss durch das Spalten von Sulfatestern und Sulfamaten von verschiedenen Biomolekülen, wie Glycosaminoglycanen, Sulfolipiden und sulfatierten Steroidhormonen auf zentrale Funktionen in den Signaltransduktionsprozessen, der lysosomalen Degradation und der Steuerung von Hormonaktivitäten [175, 187]. Deshalb

Enzym	Substrat	Lokalisierung	Krankheit
Arylsulfatase A	Cerebrosid-3-sulfat	Lysosom	MLD [§]
Arylsulfatase B	DS/CS (4S)	Lysosom	Maroteaux-Lamy (MPS VI)
Arylsulfatase C (Steroidsulfatase)	Steroidsulfat	ER [¶]	X-chrom. Ichthyose (XLI)
Arylsulfatase E	—	Golgi-Apparat	Chondrodysplasia Punctata 1 (CDPX1)
Arylsulfatase G	HS (3S)	Lysosom	MPS IIIE
Sulf1	HS (6S)	Zelloberfläche	—
Sulf2	HS (6S)	Zelloberfläche	—
Sulfamidase	HS (NS)	Lysosom	Sanfilippo A (MPS IIIA)
Iduronat-2- Sulfatase	DS/HS (2S)	Lysosom	Hunter (MPS II)
Galactosamin-6- Sulfatase	CS/KS (6S)	Lysosom	Morquio A (MPS IVA)
Glucosamin-6- Sulfatase	HS/KS (6S)	Lysosom	Sanfilippo D (MPS IID)

Tab. 3.1: Eine Übersicht über einige bekannte humane Sulfatasen, ihre Substrate, Lokalisierungen und auftretende Krankheiten bei einer Dysfunktion [175, 186, 187]. Die subzelluläre Lokalisierung der humanen Sulfatasen differenziert zwischen anabolen Enzymen mit neutralem pH-Optimum (Endoplasmatisches Reticulum, Golgi-Apparat und Zelloberfläche) [188] und katabolen, lysosomalen Enzymen mit saurem pH-Optimum.

[§]Metachromatische Leukodystrophie

[¶]Endoplasmatisches Reticulum

^{||}im Mausmodell gezeigt [189, 190]

ist das Verständnis ihrer molekularen Funktionsabläufe außerordentlich wichtig. Zudem sind viele Krankheiten (Tab. 3.1) mit einer Überfunktion oder Defizienz der Sulfatasen assoziiert [186].

Beim Menschen sind acht unterschiedliche, genetisch bedingte Stoffwechselerkrankungen [186] bekannt, die mit einem Desulfatierungs-Defekt von spezifisch sulfatierten Metaboliten verbunden sind. Im Falle einer Dysfunktion einzelner lysosomaler Enzyme akkumuliert unverdautes Substrat in den Lysosomen und führt damit zu Fehlfunktionen, die als sogenannte lysosomale Speicherkrankheiten des Mucopolysaccharidose-Typs bezeichnet werden. Die Krankheitsbilder bei Defizienzen unterschiedlicher Arylsulfatasen können einen schweren Phänotyp aufweisen, der sich mit einer bedingt milden Hautkrankheit (X-chrom. Ichthyose), über gravierende Demyelinisierung im zentralen und peripheren Nervensystem (Metachromatische Leukodystrophie) bis hin zu Defekten in der Knochen- und Bindegewebsentwicklung (Chondrodysplasia Punctata) bemerkbar macht. In seltenen Fällen kann es zu verminderter Aktivität oder gar zu komplettem Ausfall aller humanen Sulfatasen kommen. Diese autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselkrankheit wird Multiple Sulfatase Defizienz (MSD) genannt [191] und führt zum Tod des Patienten. Die Dysfunktion der Sulfatasen ist ein Folgeeffekt einer fehlerhaften posttranslationalen Modifikation eines Cysteinrestes oder Serinrestes zu einem C_α -Formylglycin [192], das für die katalytische Aktivität aller Sulfatasen unabdingbar ist. In Abb. 3.3 ist die katalytische Spaltung von Sulfatresten durch ein C_α -Formylglycin schematisch dargestellt.

3.2.2 Sulfatasen Sulf1 und Sulf2

Sulf1 und Sulf2 (Sulfs) gehören zu der Klasse der extrazellulären Matrix-Sulfatasen und sind wesentlich für einige essentielle Prozesse in der Signalgebung und die Embryonalentwicklung. Die Erforschung der Sulfs begann mit der Entdeckung von QSulf1 2001 [193], als Dhoote et al. auf der Suche nach Sonic-Hedgehog** (Shh)-responsiven Genen in Wachtelembryos waren. Binnen kurzem wurden weitere extrazelluläre Sulf1-Orthologe in Ratten [194], Mäusen und Menschen identifiziert, wobei für die letzten beiden Gattungen zusätzlich eine Isoform, Sulf2, gefunden wurde [195]. Später folgten weitere Funde in Huhn [196], Fliege [197], Krallenfrosch [198], Seeigel [199] und Zebrafisch [200].

Die Sulfs haben eine hoch-konservierte Struktur über verschiedene Metazoa. Sie bestehen

**Shh: Ein extrazelluläres Signalmolekül zur Steuerung der Entwicklung von Stammzellen zu spezifischen Geweben und Organen.

aus ~ 870 Aminosäuren (AS) und haben eine identische Domänenanordnung (Abb. 3.4) mit einer Signalsequenz vor zwei Sulfatasen verwandten Domänen der Größe ~ 372 AS und ~ 118 AS, die durch eine ~ 320 AS große hydrophile Domäne getrennt werden [195]. Die ~ 118 AS Domäne ist der C-terminalen Region von lysosomalen Glycosamin-6-Sulfatasen sehr ähnlich, die für das Abbauen der Heparansulfat-Ketten zuständig ist. Die am äußersten N-terminus lokalisierte Signalsequenz dient zur Translokation der Sulfos in das Endoplasmatische Reticulum. Dort wird das C_α -Formylglycin gebildet, anschließend wird die Signalsequenz gespalten und eine umfangreiche *N*-glycosylierung findet im Golgi-Apparat sowie im Endoplasmatischen Reticulum statt [201–203]. Nach der Biosynthese und Prozessierung sind die Sulfos auf der Zelloberfläche lokalisiert. Zusätzlich zu den strukturellen Parallelen haben biochemische Untersuchungen ergeben, dass die Sulfos Aktivität gegenüber dem generellen Arylsulfatasen-Substrat 4-Methylumbelliferyl sulfat (4-MSU) zeigen, jedoch hat das Pseudosubstrat eine schwächere Affinität zu den Sulfos mit $K_D \approx 10$ mM [204] als zu anderen Arylsulfatasen. Zudem wurde als pH-Optimum für die Aktivität der Sulfos ein Wert von pH 7,5 ermittelt [195, 205]. Insgesamt lässt sich die Zugehörigkeit der Sulfos zu den humanen Sulfatasen ableiten, wobei die Sulfos einzigartig für ihre endosulfatische Aktivität, extrazelluläre Lokalisierung und hydrophile Domäne sind [206, 207].

3.2.3 Sulfos und ihre Hydrophile Domäne

Die in Sulf1 und Sulf2 enthaltene hydrophile Domäne (HD) ist strukturell über verschiedene Spezies stark konserviert und bis jetzt wurde kein Pendant zu dieser Sequenz in anderen Sulfatasen oder Proteinen gefunden. Die HD ist aus ~ 320 AS aufgebaut (Abb. 3.4 b)), davon sind etwa 27% basisch und etwa 14% sauer. Bis auf einen stark basischen Cluster am C-terminus, der in Abb. 3.4 durch die pinke Farbkodierung dargestellt ist, sind die geladenen AS beinahe homogen verteilt. Lediglich in der mittleren Region (in Abb. 3.4 hellblau dargestellt) ist die Konservierung in geringerem Maße ausgeprägt. Hier werden Unterschiede zwischen Sulf1 und Sulf2 erkenntlich, wie zum Beispiel ein zusätzlich disponierter stark saurer Cluster in der HD von Sulf1 (Abb. 3.4 schwarz dargestellt), der in der HD von Sulf2 nicht vorhanden ist [195]. Aufgrund der starken positiven Ladung der HD wird vermutet, dass diese an der Substratbindung beziehungsweise Substraterkennung der Sulfos beteiligt ist [201]. Dass die stark konservierten Regionen der HD (in Abb. 3.4 blau dargestellt) für die Zell-Oberflächen-Lokalisierung und die enzymatische

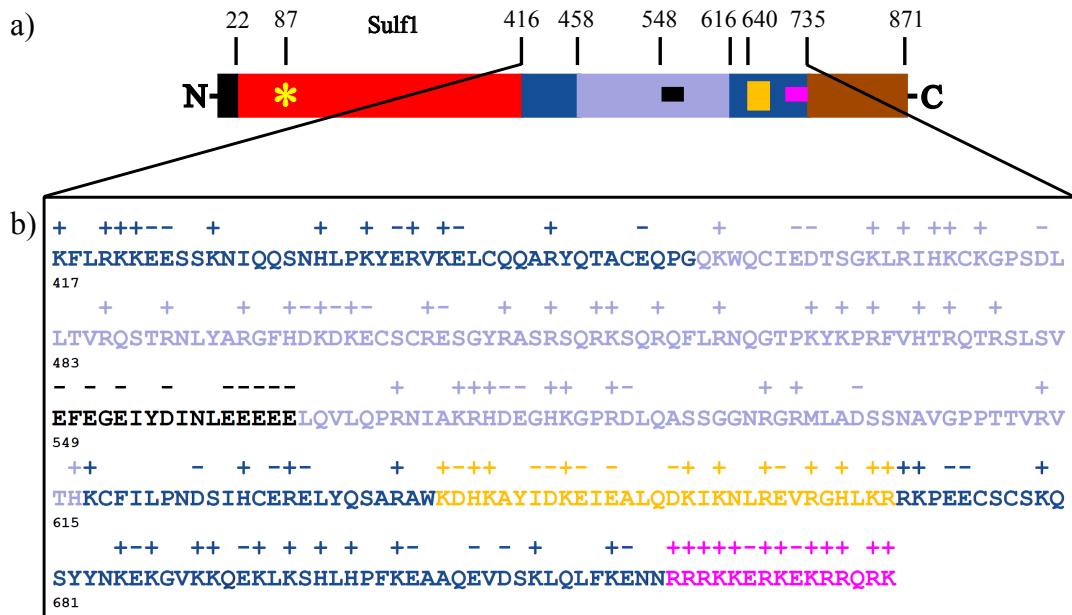


Abb. 3.4: a) Schematische Aufschlüsselung der Domänenanordnung von Sulf1 vom N- zum C-terminus [204] am Beispiel der Sulf1: Signalsequenz (schwarz), katalytisch aktive Domäne (rot), C_α -Formylglycin (gelber Stern), hydrophile Domäne (blau), wobei die mit hellblau markierten Bereiche weniger stark konservierte Sequenzen zeigen und C-terminale Domäne (braun). Innerhalb der hydrophilen Domäne markiert das schwarze Rechteck einen sauren Cluster, das orangene die coiled-coil-Vorhersagen [208, 209] und das pinke einen basischen Cluster. Die Zahlen kennzeichnen die jeweilige Aminosäureposition.
 b) Detaillierte Darstellung der linearen Aminosäuresequenz der hydrophilen Domäne von Sulf1: Der Farbcode entspricht den Bereichen in a) innerhalb der hydrophilen Domäne. Mit + sind die basischen (27%) und mit - die sauren (14%) Aminosäurereste gekennzeichnet. Diese Darstellung verdeutlicht die stark positive Ladung der HD. Die Aufschlüsselung der Aminosäuren ist im Appendix in Abb. 6.1 zu finden. (aus [185])

Aktivität der Sulf1s erforderlich sind, konnte bereits mit mehreren Deletionsmutanten nachgewiesen werden. Unter anderem führte eine Deletion des weniger stark konservierten Mittelteils der HD zu keiner nennenswerten Veränderung der Aktivität und Spezifität des Enzyms. Auch Experimente mit isolierter HD dieser Deletionsmutante zeigten ähnliche Affinitäten zum Substrat wie die native HD. Sogar bei der Deletion der gesamten HD bis auf den basischen Cluster am C-terminus (Abb. 3.4 pinke Farbkodierung) der Sulf1 aus dem Menschen reduziert sich die enzymatische Aktivität gegenüber dem physiologischen Substrat nur um 40%, wohingegen die Deletion des basischen Cluster

bei der HD aus der Sulf2 der Wachtel die Aktivität lediglich um 16% reduziert hat [193, 201, 206]. Auch bei der Substrat-Spezifität zeigten sich leichte Unterschiede zwischen Sulf1 aus der Wachtel und dem Menschen. Durch *in vitro* Experimente mit Heparin (NaCl-Resistenz ~ 1 M) [210] und Affinitätschromatographie mit verschiedenen GAG [185] konnte gezeigt werden, dass die Interaktion der Sulf1 aus dem Menschen und auch ihrer isolierten HD Heparansulfat spezifisch ist. Dabei ist auch die 6-*O*-Sulfat-Spezifität der HD an HS-Ketten gezeigt worden, da die HD mit dem durch Sulf1 desulfatierten HS keine Interaktion mehr einging.

3.2.4 Physiologische Relevanz der Sulf

Als physiologisches Substrat von den Sulf wurde Heparansulfat identifiziert. Insbesondere ist die Präferenz zu den 6-*O*-Sulfaten an den tri-sulfatierten Disacchariden IdoA(2S)-GlcNS(6S) in den S-Domänen (Abb. 3.2) der Heparansulfat-Ketten und die damit verbundene endolytische Aktivität der Sulf bei verschiedenen Untersuchungen aufgefallen [211–214]. Diese besondere enzymatische Aktivität ermöglicht eine bisher einzigartige postsynthetische Anpassung der Sulfatierung auf den HS-Ketten nach der Biosynthese und zwar am nicht reduzierenden Ende der GAG-Kette. Die charakteristische Desulfatierung bringt maßgebliche physiologische Reaktionen vieler Moleküle auf die vorliegenden Bedingungen mit sich und modelliert so ihre spezifische Interaktionen mit den HS-Ketten. Unter anderem wird dadurch die Signaltransduktion von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren aktiviert, indem die 6-*O*-Sulfat-spezifisch assoziierte Wnt (*wingless int*) und GDNF (*glial cell-derived neurotrophic factor*) von den HS-Ketten samt den 6-*O*-Sulfaten durch die Sulf abgesondert werden, die dann mit spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche interagieren [205, 215]. Die Sulf können aber auch inhibierend auf Signalprozesse wirken, wie es zum Beispiel bei FGF-1 (*fibroblast growth factor*) und FGF-2 der Fall ist [216, 217]. Des Weiteren wird eine Vielzahl von Prozessen durch die Sulf indirekt beeinflusst beziehungsweise katalysiert. Dazu gehören Zelldifferenzierung, Proliferation, Apoptose [218], Ausprägung des Nervensystems [219, 220], sowie embryonale Entwicklung des Knorpelgewebes und Homöostase des adulten Knorpelgewebes [221, 222]. Zusätzlich zu den physiologischen Schlüsselfunktionen der Sulf in der Embryogenese und der Homöostase des adulten Organismus wird häufig eine Fehlregulation, das heißt Über- und/oder Unterexpression der Sulf, in einer Vielzahl von Tumoren verschiedener Gewebetypen beobachtet. In der Tab. 3.2 ist eine Übersicht von

Tumor/Zelllinie	Expressions Status	Referenz
Eierstock, Brust-, Bauchspeicheldrüsen- und Leberzellkarzinom	Sulf1	[223]
Zelllinie <i>Pnac-1</i> (Pankreas)	unter exprimiert	[223, 224]
Brustkrebs		[228]
Brust Duktales Karzinom <i>in situ</i>		[230]
		[234]
Zelllinie <i>SU-8686</i> (Pankreas)		[234]
Brustkrebs		[228]
Eierstockkrebs	Sulf1	[229]
Magenkrebs	über exprimiert	[231]
akute lymphatische Leukämie		[240]
Nierenkarzinom		[237]
Brustkrebs		[237]
Leberzellkarzinom		[227]
multiples Myelom	Sulf2	[226]
Lungenadenokarzinom	über exprimiert	[236]
Hautkrebs		[239]
Hodenkrebs		[237]
Bauchspeicheldrüsenkrebs	Sulf1 und Sulf2	[233]
	über exprimiert	

Tab. 3.2: Auflistung von Tumoren mit bekannter Sulf-Mitwirkung. Bei Probanden beziehungsweise Patienten mit einer Unter- und Überexpression von *Sulf1* besteht eine höhere Wahrscheinlichkeit ein Krebsleiden zu bekommen [242]. Eine beobachtete Überexpression von *Sulf2* in Leber und Lunge ist meist mit bösartigen Tumoren in diesen Organen verbunden [226, 243].

Tumoren zusammen gestellt, bei denen eine Sulf-Beteiligung beobachtet wurde. Jedoch sind primär die zu regulierenden Wachstumsfaktoren für die Onkogene [223–240], in seltenen Fällen aber auch für eine Tumorsuppressor Wirkung [241] der Sulfs verantwortlich. Summa summarum sind die humanen extrazellulären Matrix-Sulfatasen Sulf1 und Sulf2 verhältnismäßig gut erforscht und haben sowohl physiologisch als auch medizinisch eine hohe Relevanz. Allerdings ist die spezifische Substrat Interaktion der Sulfs, insbesondere ihrer hydrophiler Domäne auf molekularer Ebene, noch nicht generell verstanden worden. Dieses Verständnis ist notwendig, um wirkungsvolle Tumortherapien zu entwickeln, da man sich dadurch erhofft die Aktivität der Sulfs zu steuern und damit auch gewisse Signalprozesse, die zu einem unkontrollierten Zellwachstum führen.

3.3 Desmin

Desmin gehört zum Typ III der Gruppe von Intermediärfilamenten (IF), die anhand ihrer Aminosäuresequenzen (Sequence Homology Class, SHC) in sechs Untergruppen klassifiziert werden [244–250]. IF werden aus filamentösen Proteinuntereinheiten zusammengesetzt und unterstützen die mechanische Stabilität der Zelle. Zusammen mit den Mikrofilamenten (Aktin) und den Mikrotubuli bilden sie die strukturellen Hauptbestandteile des Zytoskeletts. Aufgrund des Durchmessers von ~ 10 nm, der zwischen den Durchmessern der Mikrofilamente (~ 7 nm) [251] und der Mikrotubuli (~ 25 nm) [252] liegt, hat sich die Bezeichnung Intermediärfilament (engl.: Intermediate Sized Filaments) etabliert [253, 254].

3.3.1 Struktur und Assemblierung

Ein einzelnes Protein (Monomer) des Desmins ist wenige Nanometer dünn und hat eine Länge von ~ 48 nm. Das Monomer setzt sich aus einer stark konservierten ~ 45 nm langen α -helikalen Domäne (Rod) zusammen, die von nicht-helikalen, globulären Domänen am N- und C-terminus (Head und Tail) umschlossen wird. Fügen sich zwei Monomere parallel zusammen, indem sie sich seilartig um sich selbst winden, entsteht ein so genanntes coiled-coil-Dimer. Danach ordnen sich zwei polare Dimere antiparallel zueinander an und bilden somit apolare Tetramere [259]. Folgend assemblieren die Tetramere zu den ULF (Unit Length Filaments) [256], wobei diese jeweils innerhalb weniger Millisekunden [257, 258] aus acht Tetrameren geformt werden. Im letzten Schritt fügen sich die ULF zu langen Filamenten zusammen [260, 261]. Anschließend wird noch das Filament durch Umorganisation seiner Untereinheiten in seinem Durchmesser auf ~ 10 nm reduziert. Die Assemblierung des Desmins vom Monomer bis zum Filament ist in Abb. 3.5 schematisch dargestellt.

3.3.2 Physiologische Aufgaben

Desmin ist das wesentliche IF aller Muskelzellen und wird in den drei Muskeltypen Skelett-, Herzmuskel und glatter Muskel exprimiert [262]. Es vernetzt die einzelnen Myofibrillen [263] und die Z-Scheiben miteinander [264] (Abb. 3.6). Außerdem verknüpft Desmin die Myofibrillen mit den in Glanzstreifen lokalisierten Desmosomen, die für die interzelluläre Adhäsion der Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) zuständig sind [265].

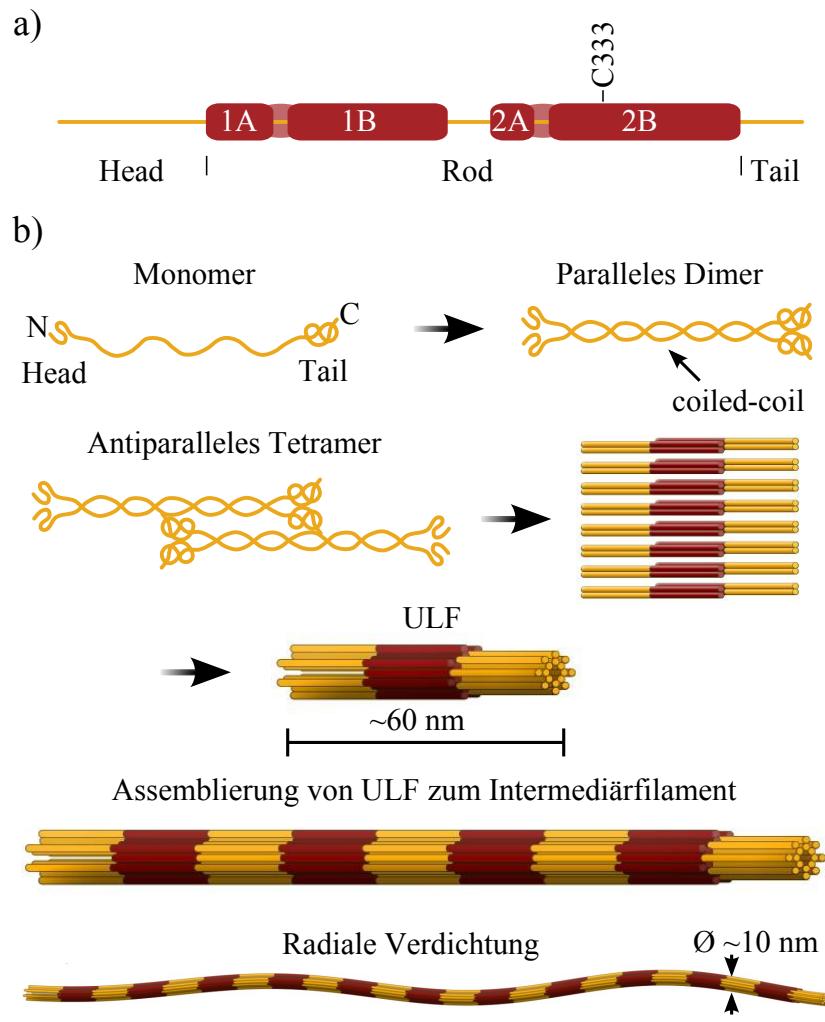


Abb. 3.5: a) Grafische Darstellung der Domänen in der IF-Sekundärstruktur. Mit C333 ist die Stelle gekennzeichnet, wo das Desmin mit dem Farbstoff Atto740-maleimide markiert wird.

b) Skizze der einzelnen Schritte in der *in vitro* Assemblierung von Desmin. Die Dimere bilden unter gewissen Voraussetzungen, wie geringe Ionenstärke und physiologischer pH-Wert (2 mM Phosphatpuffer pH 7,5 und 1 mM DTT) [255], die Grundkomponente für die weitere nicht kovalente *in vitro* Assoziation zum Filament. Durch Erhöhung der Salzkonzentration wird im zweiten Schritt die Assemblierung von Tetrameren zu den ULF (Unit Length Filaments) eingeleitet [256], die in wenigen Millisekunden [257, 258] aus acht Tetrameren geformt werden. (aus [248])

Des Weiteren bindet Desmin an die Kernlamina [266] und die Mitochondrien [267] sowie Komponenten des DAPC (Dystrophin Associated Protein Complex), das den Kontakt zwischen Zellmembran und extrazellulärer Matrix herstellt [268]. Wegen dieser verbindenden Eigenschaft wurde diesem Intermediärfilament die Bezeichnung Desmin (griech.: $\delta\epsilon\sigma\mu\omega\varsigma$ = Band, Verbindung) verliehen [269].

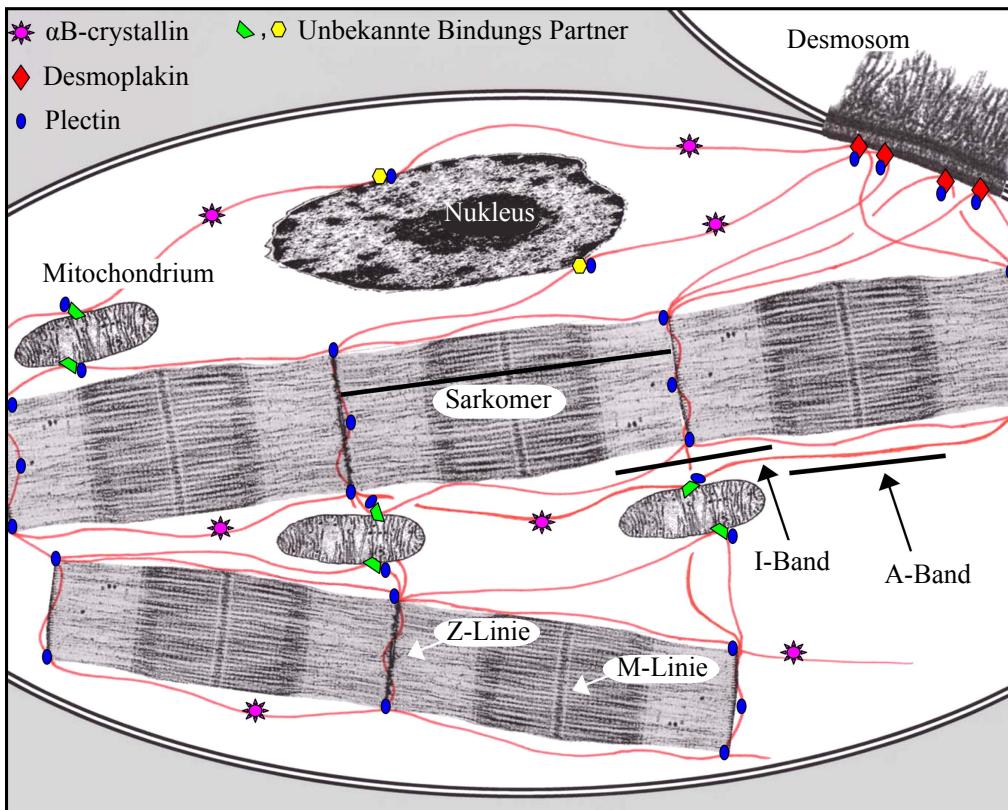


Abb. 3.6: Illustration der Lokalisation und Funktion von Desmin in einer Muskelzelle. Unter anderem werden die Z-Scheiben benachbarter Myofibrillen mit Mitochondrien und dem Zellkern verknüpft. Zusätzlich bindet Desmin an Desmosome (bei Herzmuskelzellen), die einzelne Muskelzellen miteinander verbinden. Diese Eigenschaften von Desmin stellen die intrazelluläre mechanische Integrität der Muskelzellen sicher. (aus [263])

Medizinisch hat Desmin eine hohe Relevanz, da bereits seit den frühen 1970er Jahren eine Involvierung von Desmin in einigen Skelettmuskeldystrophien und Kardiomyopathien beobachtet wurde [270–273]. Wegen der Beteiligung weiterer Proteine bei diesen Erkrankungen hat sich die Bezeichnung DRM (Desmin Related Myopathy) etabliert [274, 275]. Erkrankungen, die durch Mutationen vom Desmin-Gen [276, 277] auf Chromosom 2q35

verursacht werden, tragen den Namen Desminopathien [278]. Diese sind autosomal dominant vererbte Krankheiten und werden als relativ selten eingestuft. Eine Folge dieser Mutationen ist zum Beispiel die Ausprägung einer Arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie (ARVC)^{††}, die zum plötzlichen Herztod insbesondere bei jungen Menschen und Sportlern führen kann [35–38].

Die Mutationen des Desmin-Gens sind meist mit einer fehlerhaften Assemblierung verbunden [279]. Deshalb ist es von höchster Bedeutung die strukturelle Assemblierung des Desmins und vor allem seiner Mutanten auf molekularer Ebene zu verstehen und zu untersuchen, da dies die Verbesserung der Diagnostik und die Entwicklung repräsentativer Behandlungsmethoden begünstigt.

3.4 Tabakmosaikvirus

Das Tabakmosaikvirus (engl.: Tobacco Mosaic Virus, TMV) wurde bereits 1886 von Adolf Mayer [280] entdeckt. Er hatte beobachtet, wie sich die Tabakmosaik-Krankheit durch simplen Kontakt auf gesunde Pflanzen übertrug und beschrieb es als Bakterien ähnlichen Befall. 1892 konnte dann Dimitri Iwanowski [281] zeigen, dass das TMV Tabak-Pflanzen ohne jegliche Beteiligung von Bakterien infizieren kann, und somit war das erste Virus gefunden.

Das TMV ist weit verbreitet und ausschließlich für die Pflanzen infektiös, zu denen alle Nachtschattengewächse (Solanaceae) zählen, inklusive Tomaten und Paprika sowie einige andere Pflanzenfamilien. Es hat eine Stäbchenform mit ~ 300 nm Länge und ~ 18 nm Durchmesser, das auf ganzer Länge einen Hohlraum von ~ 4 nm im Durchmesser aufweist (Abb. 3.7). Das Kapsid des Virus besteht aus 2130 identischen und helikal angeordneten Hüllenproteinen, die die einzel-strängige RNA mit der kompletten viralen Information umschließen [282, 283].

Aufgrund des enormen Vorkommens, seiner regelmäßigen Stäbchenstruktur und der hohen Stabilität gehört es zu den besterforschten Viren überhaupt. Diese Eigenschaften prädestinieren das TMV als Test- oder Modellsystem für verschiedene Methoden, insbesondere Rastersondenmikroskopie. Zudem gewinnt es immer mehr an Bedeutung in der Nano-Elektronik, da die Hüllenproteine des TMV sich relativ leicht modifizieren lassen und infolgedessen Nickel und Kobalt binden können. Es entstehen somit metalli-

^{††}Bei ARVC werden Kardiomyozyten durch Fett- und Bindegewebszellen pathologisch ersetzt.

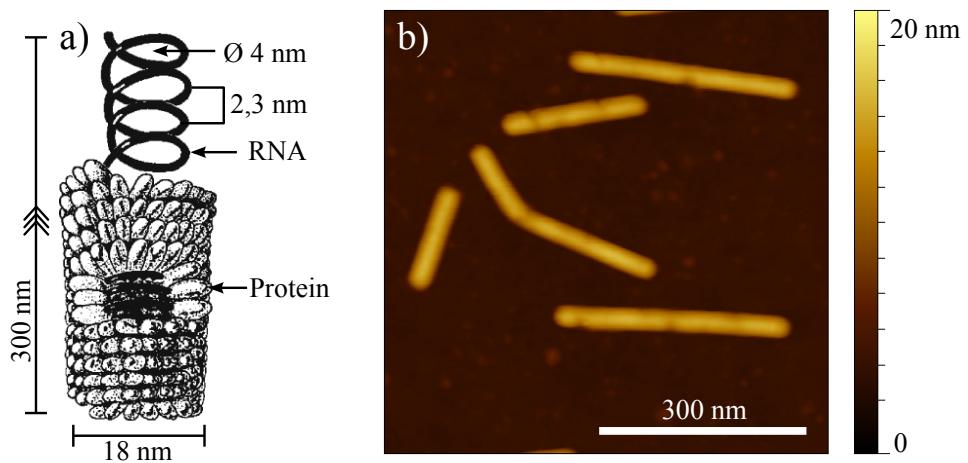


Abb. 3.7: a) Schematische Darstellung des TMV. b) AFM-Abbildung von einzelnen TMV. (TMV-Grafik aus [284]; AFM-Bild: Christin Kleineberg)

sche Nano-Stäbchen, die zum Beispiel in der Batterietechnik Verwendung finden, um die Kapazität zu verbessern [285]. Aber auch andere Materialien lassen sich auf dem Virus immobilisieren, wie zum Beispiel ZnO. Solche TMV können für Feldeffekt-Transistoren verwendet werden [286].

4 Experimentelle Methoden und Materialien

In diesem Kapitel wird auf die experimentellen Präparationsschritte sowie die verwendeten Materialien und Geräte der kraftspektroskopischen Messungen und der aSNOM-Experimente eingegangen.

4.1 Kraftspektroskopie

4.1.1 Biologisches System

Die isolierte hydrophile Domäne (HD) (Abb. 3.4) aus der humanen Sulfatase1 (Sulf1) wird in *E.coli* Rosetta 2 (DE3) exprimiert [185, 201, 287]. Durch Klonierung von cDNA* der entsprechenden HD-Subdomänen in den Vektor pMAL-c5X (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany) ist ein MBP-HD Fusionsprotein erzeugt worden [288, 289]. Studien von Frese und Kollegen zeigen, dass die fehlende *N*-Glycosylierung im bakteriellen System nicht entscheidend ist, da die HD nicht *N*-glycosyliert wird [201]. Das MBP (Maltose bindendes Protein) dient zur Aufreinigung sowie Expressionssteigerung und beeinflusst die Eigenschaften der HD in keiner Form [290]. Um einen möglichst hohen Reinheitsgrad und Homogenität zu erhalten, wird MBP-HD mittels Amylose Affinitäts Chromatographie (AAC) aufgereinigt. Somit sind mg-Mengen der MBP-HD von guter Reinheit erzielbar. Zusätzlich sind auch die HD-Subdomänen (Abb. 4.1) HD_I (Fragment K⁴¹⁷ – G⁴⁵⁸), HD_III (Fragment Q⁴⁵⁹ – H⁶¹⁶) und HD_V (Fragment K⁶¹⁷ – K⁷³⁵) vermessen worden, um die Spezifität beziehungsweise den Anteil der Wechselwirkung der einzelnen HD-Subdomänen zu bestimmen. Die MBP-HD Konstrukte sind für jede AFM-Messung frisch vorbereitet worden und werden maximal 48 h lang verwendet.

*Die cDNA wird mit dem Enzym Reverse Transkriptase aus RNA synthetisiert.

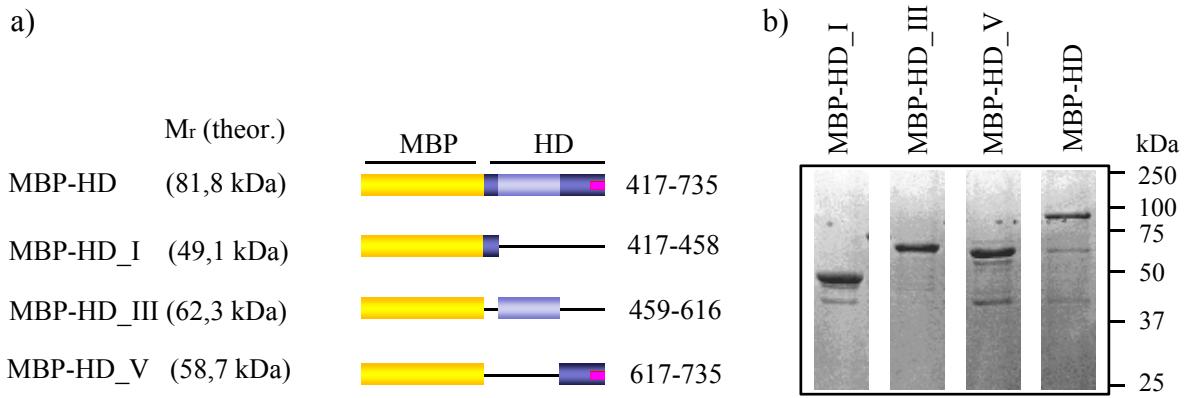


Abb. 4.1: a) Schematische Darstellung der MBP-HD und ihrer Subdomänen. Die lineare Aminosäuresequenz der HD ist in Abb. 3.4 im Abschn. 3.2.2 zu finden. Mit M_r ist die theoretische molare Masse der Konstrukte angegeben.
b) Coomassie gefiltertes SDS-PAGE-Gel der Aufreinigung von MBP-HD und ihrer Subdomänen nach ACC. Die Banden entsprechen der theoretischen molaren Masse der jeweiligen Konstrukte. (aus [287])

4.1.2 Chemikalien

Alle benutzten GAG (DS, Hep, HS+6S[†], HS-6S und K5NS) sind vor Gebrauch am reduzierenden Ende nach [201, 291] mit einer Amino-Gruppe versehen worden. Zudem

Reagenz	Hersteller und Herkunft
Aceton p.A.	Sigma Aldrich, München, Germany
Ethanol p.A.	Sigma Aldrich, München, Germany
MilliQ-Wasser 18,2 MΩ/cm	Millipore, Eschborn, Germany
Epoxydharz EPO-TEK® 377	Polytec PT GmbH, Waldbronn, Germany
PEG-NHS-Ester Disulfid-Linker	Polypure AS, Oslo, Norway
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Chondroitinsulfat B/Dermatansulfat (DS)	Sigma Aldrich, München, Germany
Heparin (Hep)	Sigma Aldrich, München, Germany
Heparansulfat (HS+6S)	Celsus Glycoscience, Inc., Cincinnati, USA
<i>N</i> -sulfatiertes K5-polysaccharid (K5NS)	Iduron Ltd., Manchester, United Kingdom

Tab. 4.1: Übersicht der verwendeten kommerziellen Chemikalien für die kraftspektroskopischen Experimente.

[†]HS+6S entspricht dem natürlichen Heparansulfat (HS). Um Verwirrungen zu vermeiden, wird es im Weiteren mit der Abkürzung HS+6S bezeichnet, weil in dieser Arbeit auch desulfatiertes Heparansulfat (HS-6S) verwendet wird.

repräsentiert das HS-6S das mittels Sulf1 Δ HDC[†] 6-*O*-desulfatierte Heparansulfat. Dabei wird der Anteil der tri-sulfatierten Disaccharide IdoA(2S)-GlcNS(6S) um 74% auf 8% reduziert. Währenddessen steigt der Anteil der di-sulfatierten Disaccharide IdoA(2S)-GlcNS, was den Verlust der 6-*O*-Sulfatierung widerspiegelt [287].

Neben den schon genannten Chemikalien in Tab. 4.1 sind für die Kraftspektroskopie zusätzlich folgende selbst hergestellte Puffer benutzt worden:

- Für die Kopplung der GAG mit dem PEG-NHS-Ester Disulfid-Linker ist ein 0,2 M NaHCO₃ Puffer mit pH 8,2 verwendet worden.
- Als Mess- und Lagerpuffer ist PBS (Inhaltstoffe auf 1 L MilliQ-Wasser: 1,4 M NaCl, 0,027 M KCl, 0,1 M Na₂HPO₄ und 0,018 M KH₂PO₄) mit pH 7,3 verwendet worden.

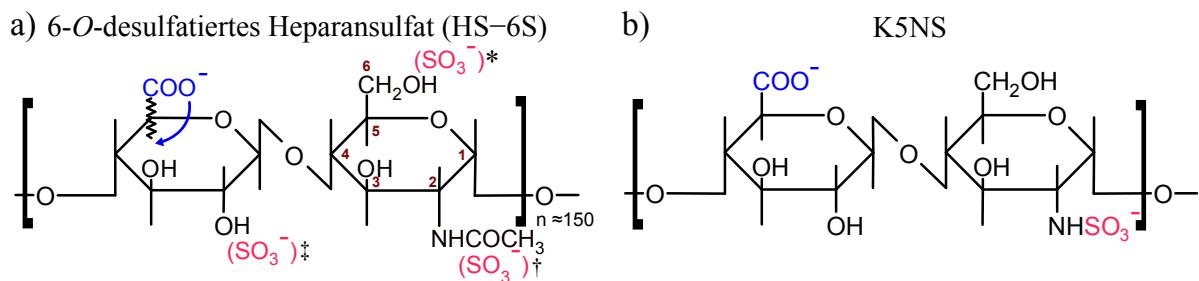


Abb. 4.2: Diese zwei schematisch dargestellten GAG sind für Negativkontrollen eingesetzt worden, um die Rolle der 6-*O*-Sulfate für die Interaktion zwischen GAG und HD näher zu beleuchten.

- a) Das über Sulf1 Δ HDC desulfatierte HS-6S enthält 40 – 60% nicht sulfatierte Disaccharide der Form [4]- β -D-GlcA-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow] n . Es sind immer noch \sim 8% tri-sulfatiert [4]- α -L-IdoA(2S)[‡]-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNS[†](6S)^{*}-(1 \rightarrow] n und \sim 21% sind di-sulfatiert [4]- α -L-IdoA-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNS[†](6S)^{*}-(1 \rightarrow] n . Insgesamt wird die Sulfatierung des HS-6S durch Sulf1 Δ HDC um \sim 12% reduziert, verglichen mit dem HS+6S [185].
- b) Das K5NS ist ein synthetisches Polysaccharid, das nur N-sulfatiert ist [4]- β -D-GlcA-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNS[†]-(1 \rightarrow] n .

[†]Sulf1 Δ HDC ist eine Mutante der Sulf1, deren Spezifität unverändert ist, jedoch fehlt ihr der mittlere, weniger konservierte Teil der HD (Abb. 3.4) [201].

4.1.3 Messvorrichtung

Für die dynamische Kraftspektroskopie und die *Force Clamp* Messungen ist das kommerzielle AFM MFP-3D-BIOTM (Asylum Research, Santa Barbara, USA) verwendet worden, das in Abb. 4.3 gezeigt ist. Der Zusatz BIO in der Bezeichnung steht für die Besonderheit an diesem Gerät. Es besitzt einen speziellen Z-Piezo mit einer maximalen Extensionslänge von 35 μm und ist an einem inversen Mikroskop aufgebaut. Dieses ermöglicht kraftspektroskopische Untersuchungen insbesondere an Molekülen mit einer breiten Größen-Verteilung, wie z.B. Zellen. Die Experimente erfolgten mittels der Standard-Software von Asylum Research basierend auf Igor Pro 6.22A Wavemetrics.

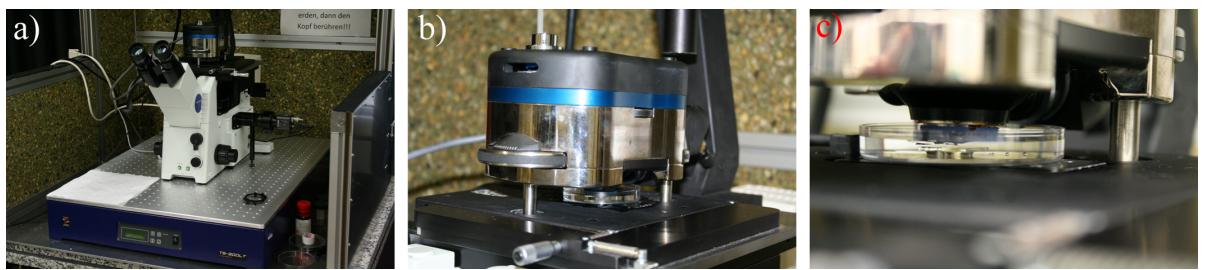


Abb. 4.3: a) *Messaufbau mit inversem Mikroskop und Schallschutzbox.* b) *Der AFM-Kopf.* c) *Petrischale mit Messpuffer und fertig präpariertem Substrat unter dem AFM-Kopf mit angenähertem Kraftsensor, messbereit.*

4.1.4 Kraftsensoren

Als Kraftsensoren für die kraftspektroskopischen Messungen sind die in Abb. 4.4 gezeigten Biolever BL-RC150VB (Olympus, Tokyo, Japan) verwendet worden. Am Biolever-

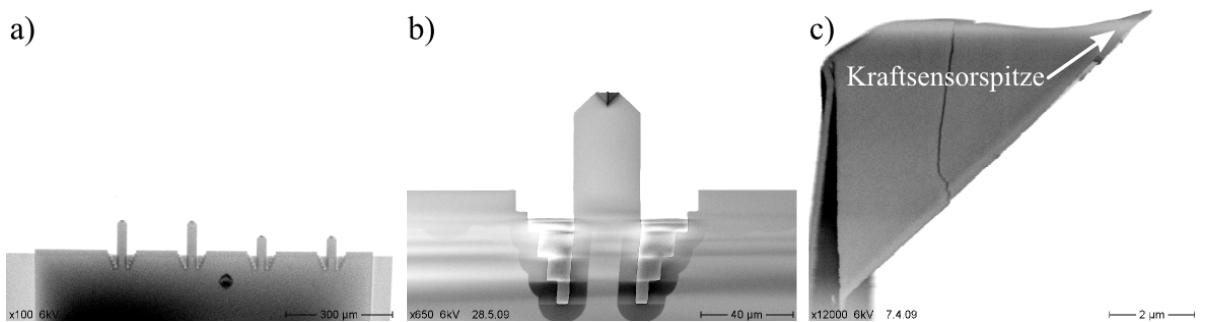


Abb. 4.4: *Biolever BL-RC150VB:* a) *Die Ansicht der vier Kraftsensoren von unten.* b) *Die Ansicht eines kurzen Kraftsensors von unten.* c) *Die Spitzengeometrie von der Seite.* (REM-Bild: Sebastian Zünkeler)

Chip[§] befinden sich vier rechteckige, beidseitig mit Gold beschichtete Kraftsensoren. Die zwei kurzen, sehr rauscharmen Kraftsensoren haben hervorragende Eigenschaften für die dynamische Kraftspektroskopie und die zwei langen, mit einer sehr kleinen Federkonstante eignen sich für die *Force Clamp* Experimente. Die Kraftsensoren bestehen aus Si_3N_4 und haben eine V-förmige Spitze aus einer hohlen dünnwandigen Pyramide, die unter einem Winkel von 45° am Federbalken befestigt ist. Diese einzigartige Geometrie ermöglicht eine sehr präzise Positionierung der Spitze mit Hilfe eines Lichtmikroskops. Insbesondere bietet die Goldbeschichtung gute Reflexionseigenschaften sowie einfache Funktionalisierungs-Möglichkeiten über Thiol-Chemie und einen sehr stabilen Messverlauf über mehrere Stunden.

Biolever	Kurzer Kraftsensor	Langer Kraftsensor
Federkonstante	0,03 N/m	0,006 N/m
Resonanzfrequenz	37 kHz	13 kHz
Länge	60 μ m	100 μ m
Breite	30 μ m	30 μ m
Dicke	180 nm	180 nm
Spitzenhöhe	7 μ m	7 μ m
Spitzenradius	30 nm	30 nm

Tab. 4.2: Herstellerangaben der Abmessungen und mechanischen Eigenschaften der Biolever. Für die dynamische Kraftspektroskopie sind die kurzen Kraftsensoren mit der Federkonstante von 0,03 N/m verwendet worden. Bei Force Clamp Messungen ist der lange Kraftsensor mit der Federkonstante 0,006 N/m benutzt worden.

4.1.5 Substrate

Bei den kraftspektroskopischen Messungen sind folgende Goldsubstrate für die Präparation verarbeitet worden:

- **TSG:** Die selbst hergestellten TSG (Template Stripped Gold) nach [292] sind ultra-flache Goldsubstrate und werden meist für topografische Messungen verwendet. Sie eignen sich aber auch hervorragend für die AFM-Kraftspektroskopie. Vorteilhaft an diesen Substraten ist die wegfallende aufwendige Reinigung vor der Funktionalisierung, aufgrund der Herstellungsart. Hierbei wird zunächst ein

[§]Mit Chip wird das Substrat bezeichnet, an dem die Kraftsensoren befestigt sind.

großes Stück ($5 \times 5,5 \text{ cm}^2$) Glimmer gespalten. Danach wird es mit der sauberen Seite nach oben in eine Vorrichtung eingespannt, die in eine Hochvakuum-Kleinbeschichtungsanlage MED 020 (Vakuumtechnik Wetzlar GmbH, Asslar, Germany) eingebaut wird. Der Glimmer wird bei einem Druck von etwa $2 \cdot 10^{-6} \text{ mbar}$ ca. 20 h bei 300°C ausgeheizt. Nach der Abkühlung des Glimmers auf etwa 40°C werden 200 nm Gold über eine Maske mit definierten Flächen von 1 cm^2 auf die Glimmeroberfläche gedampft. Auf die so entstandenen Goldflächen werden als nächstes Glasplättchen von $8 \times 8 \text{ mm}^2$ (Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany) mit einem Epoxydharz-Kleber EPO-TEK® 377 aufgeklebt. Diese Glasplättchen werden vorher im Aceton-Ultraschallbad gründlich gereinigt, gefolgt von Spülvorgängen mit Ethanol und MilliQ-Wasser, sowie einer Trocknung mit Stickstoff. Nach dem Abziehen der Glasplättchen entstehen saubere und glatte Goldoberflächen auf dem Glasträger mit Rauigkeiten von unter 2 Å, die sofort einsetzbar sind.

- **Arrandee™ Goldsubstrate** (Arrandee, Werther, Germany): Hierbei handelt es sich um kommerziell erhältliche Goldsubstrate, die etwas rauer sind als die TSG. Vor der Präparation müssen die Substrate einer gründlichen Reinigung im Aceton- und Ethanol-Ultraschallbad unterzogen werden. Anschließend werden diese mit MilliQ-Wasser gespült und mit Stickstoff trocken geblasen. Danach können die Substrate funktionalisiert werden.

4.1.6 Funktionalisierung

Für die Funktionalisierung werden die oben genannten goldbeschichteten Kraftsensoren und Substrate benutzt. Vor der Präparation werden alle benutzten Instrumente und Materialien mit den Lösungsmitteln Aceton und Ethanol im Ultraschallbad gründlich gereinigt, dann mit MilliQ-Wasser gespült und mit Stickstoff trocken geblasen. Alle Präparationsschritte erfolgen bei Raumtemperatur.

- **Kraftsensor:** Vor der Funktionalisierung werden drei Bechergläser mit Aceton, Ethanol und MilliQ-Wasser gefüllt, um die Kraftsensoren zu reinigen. Die Kraftsensoren werden für 20 s mit einer Pinzette in die Flüssigkeiten in der Reihenfolge Aceton, Ethanol, MilliQ-Wasser getaucht. Danach werden sie auf einem speziellen Teflonblock[¶] für eine Dauer von ca. 15 min vorsichtig zur Trocknung abgelegt.

[¶]Der Teflonblock fungiert als Kraftsensorhalter, während der Funktionalisierung und Lagerung.

Die Immobilisierung der GAG über den PEG-NHS-Ester Disulfid-Linker auf dem Kraftsensor erfolgt in zwei Schritten. Zunächst wird der Kraftsensor in 1 mM DMSO PEG-NHS-Ester Disulfid-Linker Lösung für 60 min gebadet, damit sich der PEG-Linker über Thiol-Chemie mit dem Kraftsensor kovalent verbindet. Danach wird der Kraftsensor mit DMSO, Ethanol und MilliQ-Wasser gespült und für weitere 60 min in 1 μ g/ml GAG-Lösung bestehend aus 0,2 M NaHCO₃ Puffer mit pH 8,2 deponiert. Diese Abfolge ist notwendig, um die vorzeitige Hydrolyse der NHS-Gruppen zu unterbinden, denn in wässriger Lösung steigen die Hydrolyse des NHS-Esters sowie dessen Aminreaktivität mit wachsendem pH-Wert der Lösung an. Somit beträgt zum Beispiel die Halbwertszeit der NHS-Ester bei 0°C und pH 7 ca. 4 – 5 h [293], bei 25°C und pH 8 dann schon 1 h [294] und bei 4°C und pH 8,6 sogar nur 10 min [295]. Abschließend werden die Kraftsensoren mit PBS-Puffer (Abschn. 4.1.2) gespült. In Abb. 4.5 ist ein Schema von einem fertig präpariertem Kraftsensor gezeigt, an den ein GAG über den PEG-Linker kovalent gebunden ist. In grün ist der PEG-Linker gekennzeichnet und in schwarz ist der GAG mit rot markierten negativ geladenen Sulfat-Gruppen dargestellt. Die Kraftsensoren können sofort verwendet werden oder in PBS-Puffer im Teflonblock bei 4°C gelagert werden. Die so präparierten Kraftsensoren sind mindestens eine Woche für die kraftspektroskopischen Experimente verwendbar.

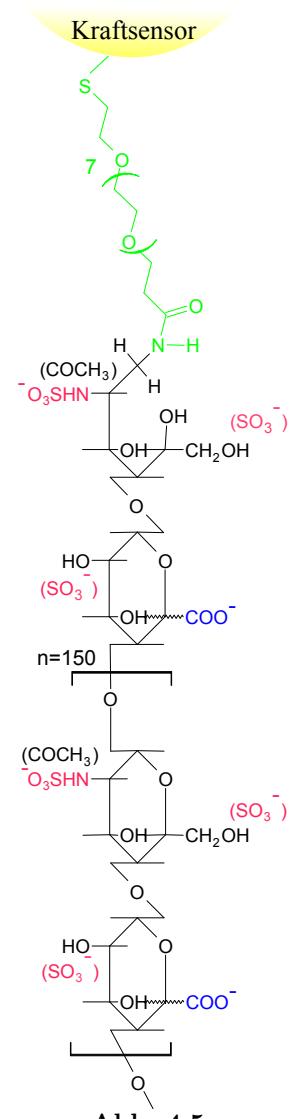


Abb. 4.5:
PEG-GAG-Konstrukt

- **Goldsubstrat:** Die TSG werden mit einer Pinzette vom Glimmer vorsichtig abgezogen (Abschn. 4.1.5) und können sofort für die Funktionalisierung genutzt werden. Die Arrandee™ Goldsubstrate müssen vorher gründlich gereinigt werden (Abschn. 4.1.5). Alle Substrate werden auf Gummiringen[¶] mit der Goldoberfläche nach oben abgelegt. Als nächstes werden 100 μ l Molekül-Lösung (MBP-HD: 100 μ g/ml) auf

[¶]Die Gummiringe fixieren die Substrate beim Transport und erleichtern die Handhabung bei Spülvorgängen.

das Substrat gegeben und 60 min inkubiert. Dabei erfolgt die Kopplung an Gold über freie Cystein-Gruppen. Nach der Inkubationszeit werden die Substrate mit PBS-Puffer (Abschn. 4.1.2) gründlich gespült und sofort für die Messung verwendet. Bei Messungen mit den HD-Subdomänen ist die Anzahl der Moleküle auf der Oberfläche über die Konzentration der Inkubationslösung eingestellt worden, damit die Interaktionswahrscheinlichkeiten für verschiedene Messreihen vergleichbar sind. Die funktionalisierten Substrate sind maximal 10 h lang für die kraftspektroskopischen Experimente verwendbar.

Für die Fixierung der Substrate während der Messung ist zusätzlich jeweils ein magnetisches Edelstahlplättchen auf deren Rückseite mit dem Epoxydharz-Kleber EPO-TEK® 377 angebracht worden. Dieses ermöglicht eine magnetische Befestigung des Substrats in einer Petrischale (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) mit ca. 12 ml Messpuffer (Abb. 4.3 c)). Das und eine gute Abdeckung der Petrischale erlauben sehr lange Messzeiten bis zu 10 h, da bei geringer Verdunstung sich die Salzkonzentration nicht stark ändert und über eine längere Zeit ähnliche Messbedingungen vorherrschen.

4.1.7 Kraftspektroskopische Parameter

Dynamische Kraftspektroskopie

Für die dynamische Kraftspektroskopie sind folgende Parameter relevant:

- *force distance*: gibt die Länge der Kraft-Distanz-Kurve an beziehungsweise die Strecke, die der Z-Piezo während eines Kraft-Distanz-Zyklus zurücklegt.
- *approach velocity*: ist die Geschwindigkeit, mit der sich der Kraftsensor der Probenoberfläche annähert. Diese Geschwindigkeit wird bei allen Experimenten konstant gehalten.
- *retract velocity*: ist die Rückziehgeschwindigkeit des Kraftsensors. Die Änderung dieser Geschwindigkeit wirkt sich auf die Belastungsrate r aus (Abschn. 2.3.3).
- *trigger point*: ist die maximale Kraft, die der Kraftsensor auf die Probenoberfläche ausübt.
- *dwell time*: die Dauer der Kontaktzeit zwischen Kraftsensor und Probenoberfläche.

Parameter	Wert
force distance	0,2 – 1 μm
approach velocity	3000 nm/s
retract velocity	100 – 5000 nm/s
trigger point	400 pN
dwell time	0,5 s
Anzahl Kurven	1000 – 2000
Temperatur	293 K

Tab. 4.3: Die benutzten Parameter für die dynamische Kraftspektroskopie.

In Tab. 4.3 sind die verwendeten Parameter für die dynamischen kraftspektroskopischen Experimente in dieser Arbeit aufgelistet.

Force Clamp

Bei den *Force Clamp* Experimenten sind neben den schon genannten Parametern noch folgende von Bedeutung, die im Weiteren näher erläutert werden:

Parameter	Wert
force distance	80 nm
pull off	25 – 30 nm
approach velocity	3000 nm/s
retract velocity	500 nm/s
trigger point	30 – 40 pN
pull trigger	7,5 – 40 pN
hold time limit	30 s
dwell time	1 s
Anzahl getriggerner Ereignisse	150 – 3000
Temperatur	293 K

Tab. 4.4: Die benutzten Parameter für die Force Clamp Experimente.

- *pull off*: Dieser Parameter gibt die Distanz an, ab welcher die Software die Kraft auf die Bindung triggert. Damit wird die Detektion der parasitären Adhäsionsergebnisse unterbunden.

- *pull trigger*: gibt den Wert der konstanten Kraft an, die auf den Molekül-Komplex wirkt, bis dieser selbst zerfällt.
- *hold time limit*: Hiermit wird die Zeit angegeben, wie lange die konstante Kraft wirken soll. Dieser Parameter dient auch zur Vermeidung unsinniger Ereignisse.

In Tab. 4.4 sind die benutzten Werte für die verschiedenen Parameter der *Force Clamp* Experimente aufgelistet.

4.1.8 Auswertung der kraftspektroskopischen Daten

Die Analyse der erhaltenen Kraft-Distanz-Kurven aus der dynamischen Kraftspektroskopie und der Kraft-Zeit-Kurven aus den *Force Clamp* Experimenten erfolgt mit einer auf Matlab 2010 (The Mathworks, Inc.) basierenden Software, die in enger Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Volker Walhorn (Universität Bielefeld) entwickelt wurde. Im folgenden wird die Arbeitsweise des Algorithmus für den jeweiligen Datensatz kurz erläutert.

Kraft-Distanz-Kurve

Der Datensatz (Kraft-Distanz-Kurve) wird von der Igor-Software als ibw-Datei ausgegeben. Beim Einlesen rechnet der Algorithmus für jeden Messpunkt der Kraft-Distanz-Kurve die Z-Piezo-Position und die Kraftsensorsauslenkung (deflection) von [V] in [m] um, sowie die mit der Igor-Software bestimmte und gespeicherte Federkonstante in [pN/nm]. Für die Auswertung ist nur die Rückziehkurve (blaue Kurve in Abb. 4.6) relevant. Zunächst wird diese stückweise vom Endpunkt linear angepasst, bis eine abrupte Änderung in der Steigung auftritt. Diese Baseline („Nulllinie“) wird dann bis zu dieser Stelle angepasst und für die ganze Kurve extrapoliert. Nun wird der Fit von der Kurve subtrahiert (Offset und Neigung) und man erhält eine ausgerichtete und gerade Kurve. Der Schnittpunkt zwischen der Baseline und dem linearen Kontaktbereich der Kurve stellt den Kontaktspunkt zwischen Kraftsensor und Probenoberfläche dar (Abb. 4.6 in gelb dargestellt). Folgend wird die Kraftsensorsauslenkung in [pN] umgerechnet (Abschn. 2.3.1), geglättet (gleitender Durchschnitt) und danach numerisch differenziert. Nun wird der Datensatz nach großen Sprüngen durchsucht (Signal-Rausch-Verhältnis), die mindestens um drei Standardabweichungen vom Durchschnitt abweichen. Die gefundenen Sprünge zeigen vermeintliche Abrisse auf. Um die Detektion von unspezifischen Adhäsionsereignissen

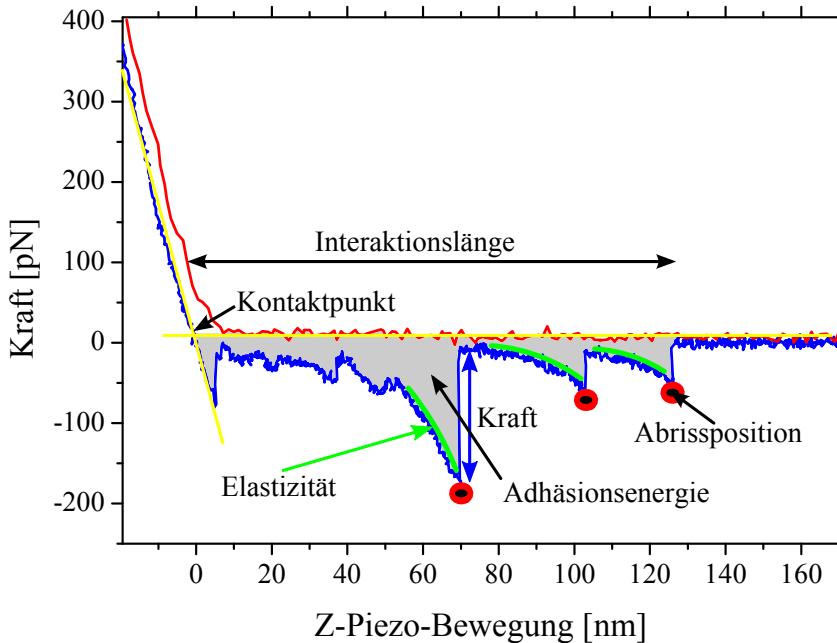


Abb. 4.6: Die essentiellen Informationen aus einer Kraft-Distanz-Kurve, die durch den Algorithmus bestimmt werden.

zwischen Kraftsensor und Probenoberfläche zu unterbinden, werden nur die Dissoziationsereignisse ab einer Interaktionslänge von 40 nm ausgewertet. Kurven, die Ereignisse enthalten, werden in einen separaten Ordner kopiert und die relevanten Informationen in einer txt-Datei zusammengefasst. Dazu gehören die Kraft, die Position der einzelnen Ereignisse, die Interaktionslänge, die Elastizität und die Adhäsionsenergie. Mit der Elastizität wird die „Federkonstante“ (k_{eff}) des Systems (Kraftsensor + Komplex) angegeben, die mittels einem Fit des konvexen Teils der Kraft-Distanz-Kurve (Abb. 4.6 grün dargestellt) mit einem Polynom zweiten Grades kurz vor einem Abriss bestimmt wird. Die Berechnung der Adhäsionsenergie (Abb. 4.6 mit grau unterlegte Fläche in der Kraft-Distanz-Kurve) erfolgt durch numerisches Integrieren vom Kontaktpunkt bis zum Ende der Kurve: Die Summe der deflection-Werte multipliziert mit den Abständen zum nächsten Positions-Wert.

Kraft-Zeit-Kurve

Bei *Force Clamp* Experimenten wird der Datensatz ebenfalls als ibw-Datei ausgegeben. Der Algorithmus rechnet beim Einlesen die Z-Piezo-Position und die Kraftsensorauslen-

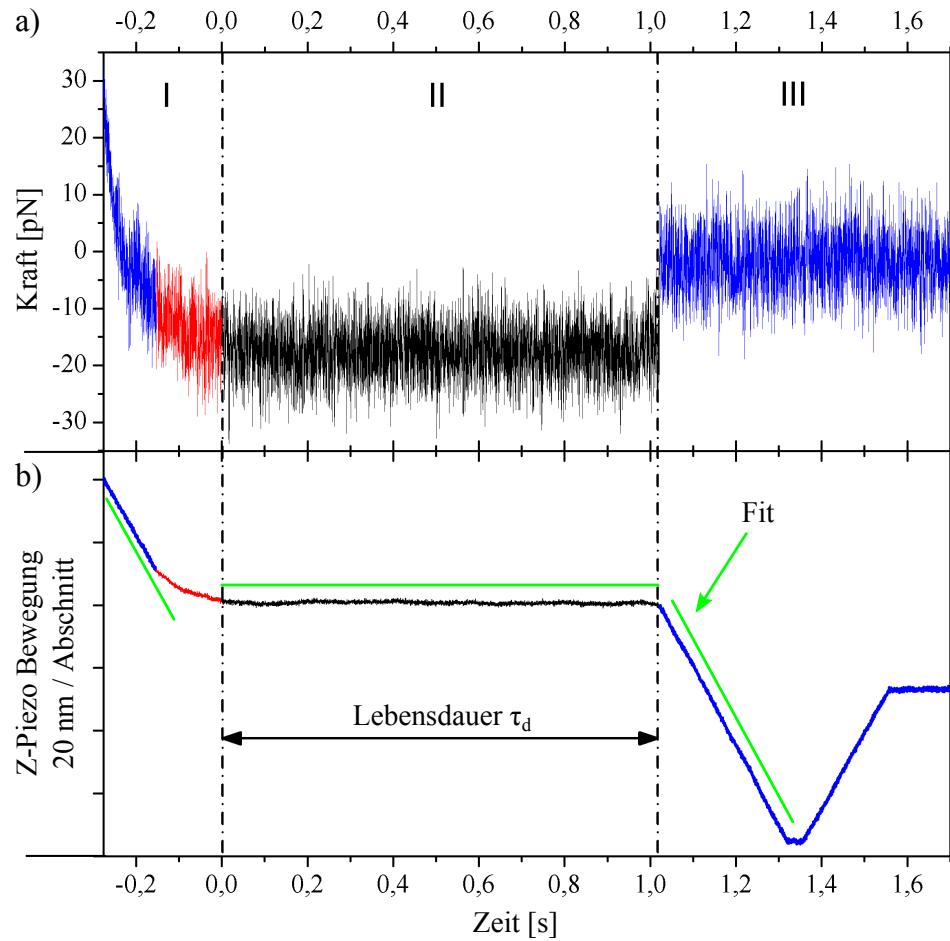


Abb. 4.7: Typische Kraft-Zeit-Kurve einer Force Clamp Messung. Der Datensatz ist in drei Farben kodiert: Der I blau markierte Teil zeigt den pull off Bereich. Im rot gekennzeichneten Bereich wird die voreingestellte konstante Zugkraft auf die Bindung getriggert. Der schwarze, konstante Bereich zeigt die Lebensdauer τ_d der Bindung unter der wirkenden Kraft. Im Bereich III (blau kodiert) ist die Bindung zerfallen. Der Kraftsensor ist kräftefrei und wird vollständig zurückgezogen. Nach einer kurzen Wartezeit wird dieser für die nächste Messung wieder an die Probenoberfläche gefahren.

a) Hier wird die Änderung der Auslenkung des Kraftsensors über die Zeit (Kraft-Zeit-Kurve) während der Separation zwischen Rezeptor und Ligand gezeigt. Die Assoziations- beziehungsweise Annäherungsphase ist nicht gezeigt, da nicht relevant.

b) Diese Kurve zeigt die Änderung der Position des Z-Piezos über die Zeit (Distanz-Zeit-Kurve). Da dieses Signal deutlich rauschärmer ist, wird es für die Bestimmung der Lebensdauer τ_d aus dem Datensatz benutzt, angedeutet durch die grünen Linien.

kung (deflection) von [V] in [m] um, wobei hier für die Bestimmung der Lebensdauer τ_d die Änderung der Position des Z-Piezos (Abb. 4.7 b)) über die Zeit verwendet wird. Dazu wird nur die Separationsphase zwischen Kraftsensor und Probenoberfläche anschaut. Wenn eine Distanz-Zeit-Kurve ein relevantes Ereignis enthält, so besitzt diese eine markante Gestalt, die in Abb. 4.7 b) dargestellt ist. Zunächst kommt ein Bereich mit konstanter Steigung, dann einer mit Steigung null, gefolgt von einem zweiten Bereich mit konstanter Steigung, die ähnlich der aus dem ersten Bereich ist. Werden solche Distanz-Zeit-Kurven vom Algorithmus gefunden, so werden diese angezeigt und von dem Anwender als relevant oder nicht relevant eingestuft. Für diese Entscheidung ist die Form des getriggerten Bereichs von Bedeutung (mit rot markierte Sektion). Hier dürfen keine Sprünge im Datensatz auftreten, was für eine Übertriggerung der Bindung stehen würde und somit zur einer verfälschten Ausgabe der Lebensdauer τ_d führt. Dieser muss für die Kraft-Zeit-Kurve Abb. 4.7 a) konvex sein und für die Distanz-Zeit-Kurve Abb. 4.7 b) konkav. Ist das der Fall, so wird der Bereich mit Steigung null in der Distanz-Zeit-Kurve als Lebensdauer τ_d ausgegeben und in einer txt-Datei abgelegt. Die gleichzeitige Betrachtung der Kraft-Zeit-Kurve und der Distanz-Zeit-Kurve erhöht die Genauigkeit und vermeidet die Mitnahme der unspezifischen Ereignisse, wie zum Beispiel Adhäsion.

4.2 Optische Rasternahfeldmikroskopie (aSNOM)

4.2.1 Messaufbau

Das aSNOM ist eine Eigenkonstruktion, bestehend aus einem diskret aufgebauten inversen Mikroskop mit einem aufgesetzten AFM-Kopf. Das inverse Mikroskop sowie Teile des Verschiebe-Tisches aus Aluminium sind in enger Zusammenarbeit mit der Mechanik-Werkstatt der Universität Bielefeld entwickelt und konstruiert worden. Dasselbe gilt für

Bezeichnung, Typ	Hersteller
Motorisierter Verschiebe-Tisch, SCAN IM 112×74	Märzhäuser, Wetzlar, Germany
Mikrometerschrauben	Mitutoyo, Neuss, Germany
AFM-Regelung, Nanonis mit OC4 Modul	SPECS, Zürich, Switzerland
3D Piezo-Nanopositionierer, P-733.3DD	Physik Instrumente, Karlsruhe, Germany
Verstärker, Modul E-503	Physik Instrumente, Karlsruhe, Germany
Schnittstelle, Modul E-516.13	Physik Instrumente, Karlsruhe, Germany
Auswerteelektronik, Modul E-509.C3A	Physik Instrumente, Karlsruhe, Germany
Tapping und Z-Piezo, PSt 150/2×3/5	Piezomechanik, München, Germany
Fokussierungs-Piezo, P-830.10	Physik Instrumente, Karlsruhe, Germany
Laser-Treiber (Lichtzeiger), LDX-3412	Newport Spectra-Physics, Darmstadt, Germany
Laserdiode, RLT904-30MG, $\lambda = 904$ nm	Roithner Lasertechnik, Vienna, Austria
Interferenz-Filter, RLT-905-33.5-A	Roithner Lasertechnik, Vienna, Austria
PSPD**, QD7-5 (R& S 652 027)	Anfatec Instruments, Oelsnitz (V), Germany
$\lambda/4$ -Plättchen	Pegasus Lasersysteme, Wallenhorst, Germany
Strahlteilerwürfel, Z690RDC	AHF Analysentechnik, Tübingen, Germany
Laserdiode, RLT6830MG, $\lambda = 685$ nm	Roithner Lasertechnik, Vienna, Austria
Interferenz-Filter, RLT-690-11-A	Roithner Lasertechnik, Vienna, Austria
Objektiv, Apo TIRF 100× Oil, NA = 1,49	Nikon, Tokio, Japan
Objektiv, CFI Plan Achromat 10×	Nikon, Tokio, Japan
Optische Keilprismen, NT47-624	Edmund Optics, Karlsruhe, Germany
Umlenkspiegel, PFE-10-P01-1	Thorlabs, Newton, NJ, USA
Fluoreszenz-Filter, T = 715 – 855 nm bei 86%	Optische Laboratorien, Nabburg, Germany
Emissions-Filter, HQ685/110	AHF Analysentechnik, Tübingen, Germany
Grau-Filter	AHF Analysentechnik, Tübingen, Germany
SNOM-Detektor, APD ^{††} SPCMAQR-13	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Justage-Kamera, Ecoline TV7004	ABUS, Wetter, Germany
Dichroit, z 690 rd	AHF Analysentechnik, Tübingen, Germany
Stangenführungssystem, Mikrobank	Linos, Göttingen, Germany
Dämpfungstisch, RS4000	Newport Spectra-Physics, Darmstadt, Germany

Tab. 4.5: Auflistung der kommerziell erworbenen Geräte und Materialien, die beim Aufbau des aSNOM verwendet worden sind.

**PSPD: *position sensitive photodiode*

††APD: *avalanche photodiode*

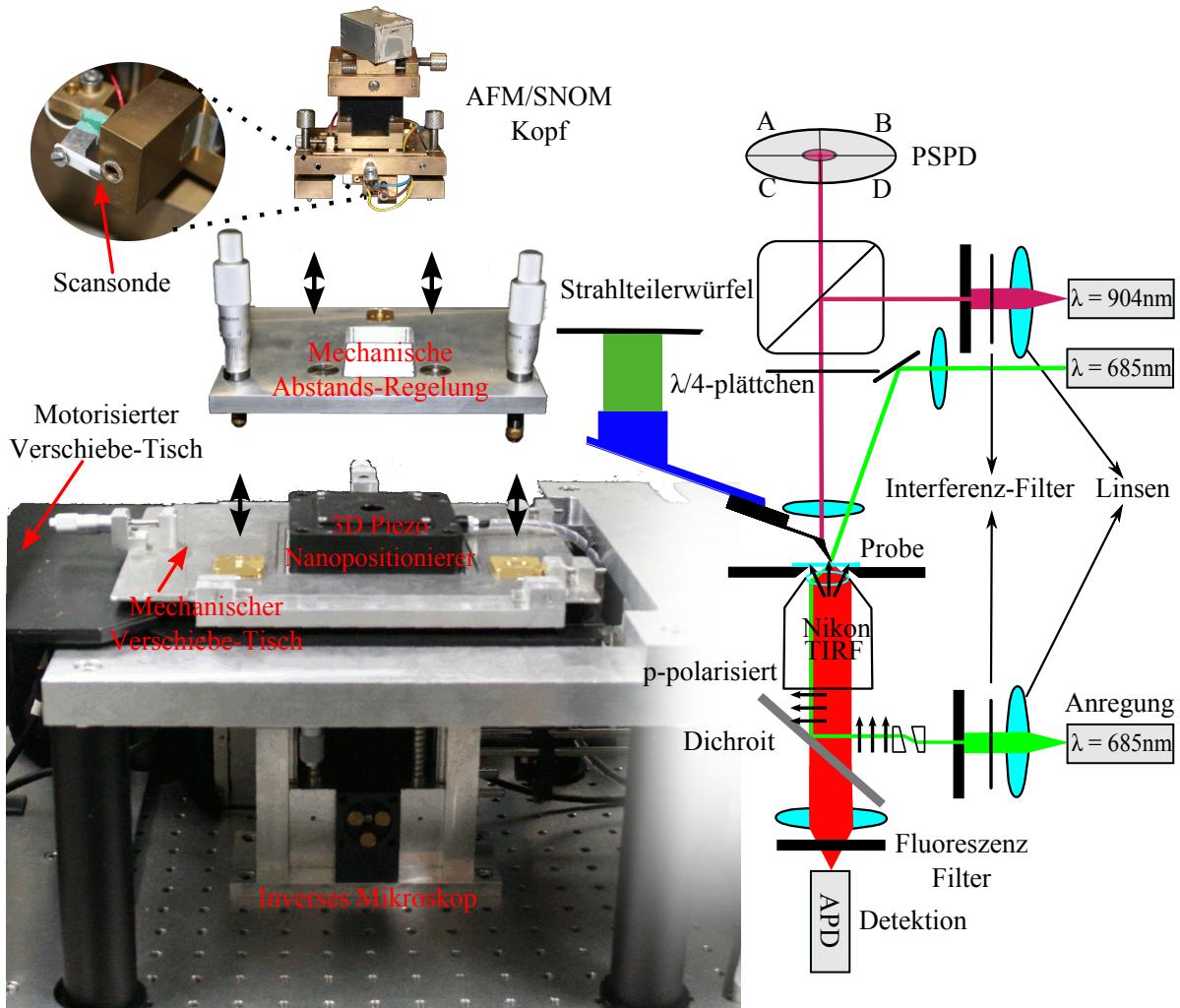


Abb. 4.8: Foto von dem Messaufbau mit dem diskret aufgebauten inversen Mikroskop und dem aufgesetzten AFM-Kopf. Auf der rechten Seite sind die Strahlengänge im AFM-Kopf und inversen Mikroskop schematisch dargestellt. Schema ist nicht maßstabgetreu.

den AFM-Kopf, der fast komplett aus Messing besteht. Messing ($\rho = 8,86 \text{ g/cm}^3$) hat eine relativ hohe Dichte im Vergleich zu Aluminium ($\rho = 2,7 \text{ g/cm}^3$), lässt sich aber dennoch gut bearbeiten. Ein hohes Gewicht des AFM-Kopfes verleiht Stabilität und minimiert das Rauschen während des Abbildens, insbesondere bei Konstruktionen, bei denen die x-y-Richtung von der z-Richtung des Scanners quasi entkoppelt ist. In Abb. 4.8 ist das verwendete Gerät gezeigt. Alle kommerziell erworbenen Komponenten des aSNOM sind in Tab. 4.5 aufgeführt. Zudem sind auch elektronische Komponenten für die Regelung der z-Richtung und der Detektion des Fluoreszenz-Signals in enger Zusam-

menarbeit mit der Elektronik-Werkstatt der Universität Bielefeld entwickelt und gebaut worden. Die Schaltpläne für diese Komponenten können im Appendix gefunden werden und die Funktionsweise wird in Abschn. 5.2.1 und 5.2.2 beschrieben.

4.2.2 Kurze Bedienungs- und Funktionsanleitung

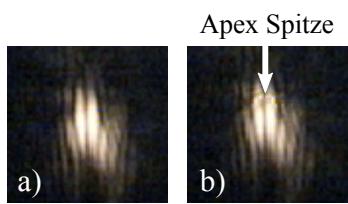


Abb. 4.9: Screenshots des auf die Substratoberfläche fokussierten Anregungslasers für die Fluoreszenz mit dem TIRF Objektiv: a) Ohne Scansonde und b) mit Scansonde. Dieser kleine Schatten, der bei b) mit dem Pfeil gekennzeichnet ist, repräsentiert das gestreute Licht durch die Scansonde. Das ist ein Zeichen dafür, dass die Sonde sich im Fokus befindet und perfekt für das aSNOM-Experiment ausgerichtet ist.

Als Erstes werden alle elektrischen Geräte, die für das Experiment benötigt werden, 2 h vor der Messung eingeschaltet. Dadurch stellt sich ein thermisches Gleichgewicht ein und das Driften wird minimiert. Als Nächstes wird die präparierte Probe (Abschn. 4.2.6) auf dem 3D Piezo-Nanopositionierer mittels einer dünnen PDMS-Schicht (SYLGARD® 184, Dow Corning, Midland, MI, USA) befestigt. Die PDMS-Schicht dämpft gleichzeitig störende Vibrationen. Danach werden die mechanische Abstands-Regelung und der AFM-Kopf samt Scansonde aufgesetzt. Auf den Federbalken der Scansonde wird dann der Laser für die Regelung (Lichtzeigersystem, $\lambda = 904$ nm) fokussiert und zusätzlich wird der Apex der Scansonde mit einem weiteren Laser ($\lambda = 685$ nm) von oben (Abb. 4.8) für die spätere Feinjustierung markiert. Folgend wird die Scansonde mittels Mikrometerschrauben an der mechanischen Abstands-Regelung grob angenähert und mit den Mikrometerschrauben an dem mechanischen Verschiebe-Tisch möglichst zentral über einem *CFI Plan Achromat* Nikon 10× Objektiv ausgerichtet. Danach erfolgt die optische Feinjustierung mit einem *Apo TIRF* Nikon 100× Objektiv (NA = 1,49) und einem Immersionsöl (Immersionsöl Immersol 518 F fluoreszenzfrei, Carl Zeiss AG, Switzerland). Dazu wird der Anregungs-Laser ($\lambda = 685$ nm) eingeschaltet und die Scansonde ganz an die Oberfläche angenähert. Dabei wird das linear polarisierte Licht der Laserdiode so eingekoppelt, dass die Polarisation parallel zur Einfallsebene ist (p-polarisiert). Somit wird relativ einfach ein hoher axialer Polarisationsanteil erreicht (Abschn. 2.1.5). Nun wird die Scansonde vorsichtig mit dem motorisierten Verschiebe-Tisch mittels Joystick in Position gebracht und piezoelektrisch fokussiert, bis das in Abb. 4.9 b) gezeigte Muster zu sehen ist.

Abschließend wird die APD auf das maximale Signal ausgerichtet, zunächst über einen

Grau-Filter, der für die Messung durch den Fluoreszenz-Filter ($T = 715 - 855$ nm bei 86%) ausgetauscht wird. Vor der Messung werden noch die AFM-Abbildungsparameter (Abschn. 4.2.7) und dann die phasengekoppelte Fluoreszenz-Detektion (Abschn. 5.2.2) mithilfe eines Oszilloskops (HM205-3, HAMEG GmbH, Frankfurt, Germany) eingestellt. Die aufgenommenen Daten werden dann, wie in Abschn. 4.2.8 beschrieben, verarbeitet.

4.2.3 Scansonde

Für die aSNOM-Messungen im Tapping-Modus werden monolithische Scansonden ATEC-NC 50 (Advanced Tip at the End of the CantileverTM Non Contact) (Nanosensors, Neuchatel, Switzerland) aus Silizium verwendet. Diese Scansonden besitzen auf der Rückseite keine Reflexbeschichtung, sind chemisch inert und hoch dotiert, um statische Aufladungen zu vermeiden. Außerdem haben sie einen hohen mechanischen Gütefaktor und sind sehr sensitiv. Die Resonanzfrequenz an Luft liegt bei 335 ± 130 kHz und der Spitzenradius ist kleiner 10 nm. Die besondere Geometrie der Scansonde (Abb. 4.10) erlaubt eine genaue optische Justierung eines Laser auf den Apex der Spitze. Deshalb eignet sich diese Scansonde für die aSNOM-Experimente. Weitere wichtige Angaben des Herstellers sind in Tab. 4.6 aufgeführt.

AdvancedTEC TM NC	Typische Werte	Schwankung
Federkonstante	45 N/m	12 – 110 N/m
Länge	160 μ m	150 – 170 μ m
Breite	45 μ m	40 – 50 μ m
Dicke	4,6 μ m	3,6 – 5,6 μ m
Spitzenhöhe	17 μ m	15 – 20 μ m
Resonanzfrequenz	335 kHz	210 – 490 kHz

Tab. 4.6: Angaben des Herstellers über die Eigenschaften, Geometrie und Federkonstante für die ATEC-NC Sonden.

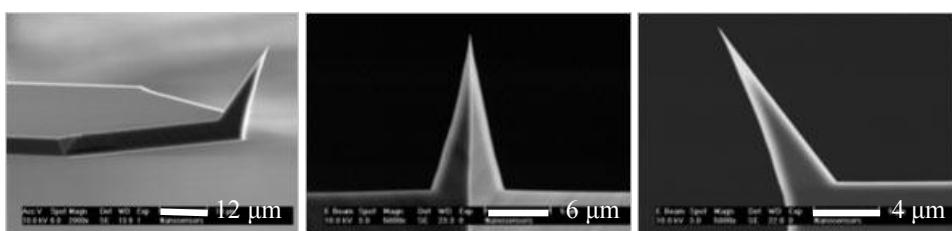
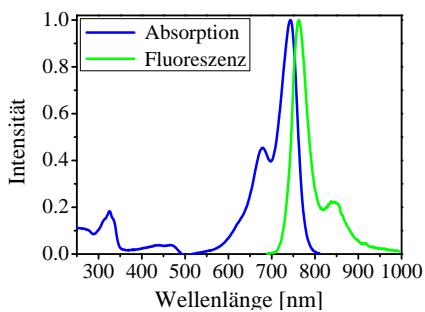


Abb. 4.10: Mikroskopische Ansichten der verwendeten Scansonden ATEC-NC. (Bild: NanosensorsTM)

4.2.4 Farbstoff

Als Fluoreszenzfarbstoff ist Atto740-maleimide (Atto-Tec, Siegen, Germany) für alle aSNOM-Messungen verwendet worden. Dieser Farbstoff ist sehr photostabil, verbunden mit einer geringen Quantenausbeute $Q = 10\%$. Atto740 eignet sich hervorragend für die aSNOM-Experimente, da durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen von Scansonde und Farbstoff die Emissions-Rate verstärkt wird, und das wiederum erhöht die Quantenausbeute (Abschn. 2.2.1). In Tab. 4.7 sind weitere wichtige Parameter des Atto740 aufgeführt und das Absorptions- und Emissionsspektrum gezeigt.



Eigenschaft	Wert
Absorptions-Wellenlänge λ_A	740 nm
Extinktionskoeffizient ϵ_{\max}	$1,2 \cdot 10^5$ L/mol cm
Fluoreszenz-Wellenlänge λ_F	764 nm
Quantenausbeute Q	10%
Fluoreszenz-Lebensdauer τ_F	0,6 ns

Tab. 4.7: Absorptions- und Emissionsspektrum des Atto740 und andere Angaben des Herstellers.

4.2.5 Biologische Systeme

Die **Tabakmosaikviren (TMV)** sind aus einer infizierten *Nicotiana tabacum* 'Samsun' nn Pflanze isoliert worden nach dem Protokoll von Gooding und Hebert [296]. Für unsere Experimente ist eine TMV-Mutante (TMV_{Cys}) genutzt worden [297]. Dieses besondere TMV_{Cys} besitzt an jedem Hüllenprotein des Kapsids eine Thiol-Gruppe, die für das Anbinden des Farbstoffes Atto740-maleimide genutzt werden kann. Die Fluoreszenz-Markierung des TMV_{Cys} erfolgt in 100 μ L SPP-Puffer (10 mM Natrium Kalium Phosphat Puffer mit pH 7,2) mit einer TMV_{Cys} Konzentration von 1 μ g/ μ L im Verhältnis der Stoffmengen von 0,02:1 des Atto740-maleimide zu TMV_{Cys}. Diese Lösung wird dann 9 h bei 30°C im Dunklen mit 300 rpm (revolutions per minute) im Thermomixer (Thermomixer Compact, Eppendorf, Hamburg, Germany) gerührt. Danach werden 300 μ L des SPP-Puffers dazugegeben, um die ungebundenen Farbstoffe mittels Ultrazentrifuge (Sorvall Ultra Pro 80, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) zu entfernen. Die-

se Prozedur wird für 2 h bei 15°C unter 120.000g durchgeführt. Der übrig gebliebene Niederschlag der gelabelten TMV_{Cys} wird anschließend wieder in 100 µL SPP-Puffer gelöst. Der Markierungsgrad ist mit dem Absorptionsspektrum (NanoDrop ND-1000, PEQLAB, Erlangen, Germany) zu DOL = 1,8% bestimmt worden.

Desmin-Proteine sind in *E.coli* exprimiert und nach [37] isoliert sowie aufgereinigt worden. Da die Desmin-Monomere ein einzelnes Cystein enthalten, ist es möglich diese spezifisch mit einem Farbstoff zu versehen. Dazu haben wir die Vorgehensweise von [298] für die Fluoreszenz-Markierung verwendet. Zunächst wird Desmin 1 h lang bei Raumtemperatur gegen den Markierungspuffer (5 M Urea, 5 mM Tris-HCl, pH 7,0 – 7,5) dialysiert. Danach wird Atto740-maleimide, gelöst im wasserfreien DMSO zu einer Konzentration von 5 mg/mL, in einem überschüssigen Stoffmengenverhältnis von 10:1 dazugegeben. Nach 30 min werden die überflüssigen Farbstoffe mit Zugabe von 100 mM Cysteamin (Sigma Aldrich, München, Germany) abgebunden. Dieser Prozess dauert 1 h bei Raumtemperatur. Nun wird das markierte Desmin von dem freien Farbstoff mittels Dialyse gegen 8 M Urea, 5 mM Tris-HCl, 1 mM DTT pH 8,4 getrennt. Danach werden die markierten Proteine zunächst bei –80°C gelagert. Kurz vor dem Experiment werden native und markierte Desmin-Proteine im Stoffmengenverhältnis 1:10 gemischt und schrittweise gegen 5 mM Tri-HCl, 1 mM DTT bei pH 8,4 dialysiert. Die Zugabe der gleichen Menge des Assemblierungspuffers (200 mM NaCl, 45 mM Tris-HCl, pH 7) ergibt eine Desmin-Lösung von 0,55 g/L. Diese Lösung wird bei 37°C 1 h lang inkubiert und katalysiert die Assemblierung des Desmins. Der Markierungsgrad ist mit dem Absorptionsspektrum zu DOL = 2,2% bestimmt worden.

4.2.6 Probenimmobilisierung

Als Substrat für die aSNOM-Experimente sind 0,2 mm dicke Deckgläser (Menzel Gläser, Braunschweig, Germany) verwendet worden. Dazu sind die Deckgläser zunächst gründlich im Aceton-Ultraschallbad gereinigt und danach mit Ethanol und MilliQ-Wasser gewissenhaft gespült worden. Als nächstes werden die Deckgläser in 65% iger Salpetersäure (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) geätzt, um die Glasoberfläche zu aktivieren. Anschließend wird das gesäuberte Deckglas mit Stickstoff getrocknet und mit 5 µL von den jeweiligen fluoreszenz-markierten Molekülen (TMV_{Cys}: 1 ng/µL oder Desmin: 130 ng/µL) benetzt. Dieses Volumen wird dann mit Stickstoffgas auf der Oberfläche vorsichtig und gleichmäßig verteilt, was die Immobilisierungs-Zeit verkürzt und

den Salzrand verhindert. Folgend wird das Deckgläschen noch ein letztes Mal mit MilliQ-Wasser gespült und mit Stickstoff getrocknet, um störende Salzreste zu entfernen. Nun kann das Deckgläschen für das aSNOM-Experiment verwendet werden. Die mit Desmin präparierten Deckgläser sind sofort verwendet und höchstens 48 h benutzt worden. Deckgläser mit TMV_{Cys} sind auch sofort verwendbar, können aber auch bis zu einem Jahr in lichtundurchlässigen Petrischalen gelagert werden.

4.2.7 Abbildungsparameter

Alle aSNOM-Abbildungen sind mit dem AM-AFM Modus (*tappingTM mode*, Abschn. 2.1.2) bei einer Scanrate von 0,5 Hz an Luft mit der Standard-Software von NanonisTM, die laufend aktualisiert wurde, aufgenommen worden. Um Schäden an der Scansonde zu vermeiden, wird der Scanbereich während der Annäherung auf Null gesetzt. Erst danach wird ein geeigneter Scanbereich gewählt, der zwischen $3 - 10 \mu\text{m}^2$ liegt. Dann werden die Regelparameter mittels *integral gain* und *proportional gain* für die jeweilige Probe individuell angepasst, sodass Hin- und Rückspur deckungsgleich sind.

4.2.8 Auswertung und Aufbereitung der aSNOM-Daten

Für die Auswertung der aSNOM-Abbildungen werden die Topografie und das Fluoreszenz-Signal verwendet. Pro Scanzyklus werden zwei Fluoreszenz-Signale aufgenommen. Eins enthält das optische Nahfeld-Signal mit parasitären Fernfeld-Komponenten und das andere nur des Fernfeld-Signal (Abschn. 5.2.2, Abb. 5.22). Durch Subtrahieren dieser beiden Fluoreszenz-Signale voneinander, mit zusätzlicher Tiefpass-Filterung Linie für Linie, entsteht ein korrigiertes Nahfeld-Signal mit deutlich reduzierten Fernfeld-Störungen. Die erhaltenen AFM-Topografie-Daten werden zunächst durch einen Planefit erster beziehungsweise zweiter Ordnung Linie für Linie korrigiert. Defekte Scanlinien oder Sprünge in den Bildern werden einzeln anhand der Daten von benachbarten Scanlinien entfernt. Die vorbereitende Bearbeitung und Auswertung der aSNOM-Daten erfolgt mittels des Programms Scanning Probe Image Processor 4.6.0 (Image Metrology A/S, Hørsholm, Denmark) und teilweise auch mit der Open Source SPM-Software Gwyddion. Nach dem Export der Bild-Daten im *Tagged Image File Format* (Tiff) werden das Topografie-Bild und das korrigierte Nahfeld-Signal in Adobe Photoshop CS5 übereinandergelegt.

5 Ergebnisse und Diskussion

Im ersten Teil dieses Kapitels werden die Ergebnisse der kraftspektroskopischen Experimente an der HD aus Sulf1 mit den verschiedenen GAG-Systemen (Hep, HS+6S, DS, HS-6S und K5NS) vorgestellt und diskutiert. Dazu sind Messungen mit konstanter Geschwindigkeit (dynamische Kraftspektroskopie) sowie mit konstanter Kraft (*Force Clamp*) gemacht worden.

Im zweiten Teil werden die technischen Besonderheiten des aSNOM präsentiert sowie die erzielten Ergebnisse an zwei verschiedenen biologischen Systemen: dem TMV und dem Desmin.

5.1 Kraftspektroskopie

Für die Kraftspektroskopie sind die gleichen Funktionalisierungen und Messbedingungen sowohl für Experimente mit konstanter Geschwindigkeit als auch mit konstanter Kraft verwendet worden. Lediglich die Federkonstanten der Kraftsensoren unterscheiden sich (Abschn. 4.1.4). Für die Experimente mit konstanter Kraft ist ein längerer und weicherer Kraftsensor verwendet worden. Um den Messfehler klein zu halten und Vergleichbarkeit zu gewähren, ist pro Messreihe beziehungsweise Experiment bei der dynamischen Kraftspektroskopie derselbe lange Kraftsensor ($k = 0,006 \text{ N/m}$) und bei *Force Clamp* derselbe kurze Kraftsensor ($k = 0,03 \text{ N/m}$) für das jeweilige GAG verwendet worden.

Als Interaktionspartner für die HD sind die GAG Hep, HS+6S, DS, HS-6S und K5NS gewählt worden. Hep und DS dienen als Referenz zu dem natürlichen Substrat HS+6S. Mit den GAG HS-6S und K5NS soll auch die Rolle der 6-*O*-Sulfate überprüft werden. Da HS-6S nur sehr schwach 6-*O*-sulfatiert ist und K5NS gar keine 6-*O*-Sulfate trägt (Abschn. 4.1.2, Abb. 4.2), werden diese GAG als Negativkontrolle benutzt. Die vorgestellten kraftspektroskopischen Messungen sind bei Raumtemperatur in PBS-Puffer mit pH 7,3 durchgeführt worden.

In Abb. 5.1 a) ist das Messprinzip zwischen HD und GAG schematisch dargestellt.

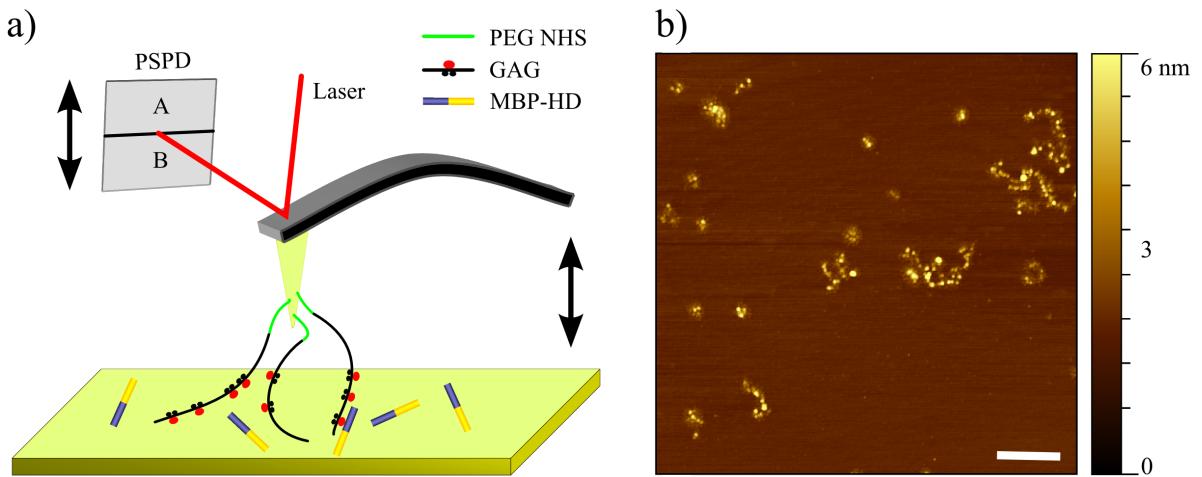


Abb. 5.1: a) Schematische Darstellung des Messprinzips zwischen HD und GAG. Die Kreise an dem GAG symbolisieren Sulfat-Gruppen, wobei die roten Kreise die 6-O-Sulfate repräsentieren.
 b) Eine $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ AFM-Aufnahme der MBP-HD auf Glimmer. Aufgenommen an Luft im Tapping-Modus ($C_{\text{MBP-HD}} = 2 \mu\text{g/ml}$). Der Skalenbalken repräsentiert 500 nm.

Abb. 5.1 b) zeigt eine $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ AFM-Aufnahme der MBP-HD auf Glimmer* (Plano GmbH, Wetzlar, Germany). Demnach ist die MBP-HD ein globuläres Protein mit einem Durchmesser von $11 \pm 0,53 \text{ nm}$. Auffällig ist die Oligomerisierung der MBP-HD (*coiled-coil*-Vorhersage in der Sequenz der HD [208, 209]), die in [185] genauer untersucht wurde. Die Experimente in dieser Arbeit sind dadurch nicht beeinträchtigt worden, da immer mit frisch aufgereinigter MBP-HD[†] gemessen worden ist.

5.1.1 Spezifität der HD und ihrer Subdomänen zu Hep und DS

Die Interaktion zwischen der HD und den GAG ist hochkomplex und basiert im Wesentlichen auf der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen den negativ geladenen Sulfat-Gruppen der GAG mit den positiv geladenen Aminosäureresten der HD. Da aber alle GAG eine negative Ladung tragen, interagieren diese zwangsläufig mit der HD, wobei diese Ereignisse nicht unbedingt spezifisch sind. Deshalb ist zunächst versucht worden Unterschiede der Interaktion zwischen verschiedenen GAG mit der HD und ihren Sub-

*Glimmer (engl.: mica) ist ein Schichtsilikat ($KAl_2(OH)_2(AlSi_3O_{10})$), das durch abziehen mit Klebestreifen eine saubere, atomar flache, negativ geladene und hydrophile Oberfläche liefert.

[†]Im Weiteren auch HD genannt.

domänen (Abschn. 4.1.1) festzustellen.

Dazu sind die GAG Dermatansulfat (DS) und Heparin (Hep) verwendet worden. DS besitzt einen gewissen IdoA Anteil, der teilweise eine 2-*O*-Sulfatierung tragen kann. Zudem kann auch der GalNAc an den 4-*O*- und 6-*O*-Positionen sulfatiert sein (Abschn. 3.1.1). Somit besteht eine gewisse Ähnlichkeit mit dem nativen GAG der HD dem Heparansulfat (HS+6S). Als zweites GAG ist Heparin ersatzweise für HS+6S benutzt worden, da HS+6S sehr heterogene Sulfat-Strukturen annehmen kann, die zu Schwankungen in der Reproduzierbarkeit bei den Messungen führen können. Heparin dagegen enthält über 70% des tri-sulfatierten Disaccharids IdoA(2S)-GlcNS(6S) und entspricht deshalb einer langen S-Domäne von HS+6S-Ketten. Somit haben wir mit DS ein HS+6S ähnliches GAG-System und Heparin, das das HS+6S mimt.

Um die Spezifität der Wechselwirkung zwischen der HD und den GAG zu prüfen, sind Experimente mit konstanter Ziehgeschwindigkeit $v = 500 \text{ nm/s}$ gemacht worden. Dabei sind die ganze MBP-HD sowie ihre Subdomänen MBP-HD_I, MBP-HD_III und MBP-HD_V gegen DS und Hep vermessen worden. Zusätzlich sind auch als Negativkontrolle nur MBP und eine saubere Goldoberfläche als Interaktionspartner für die beiden GAG getestet worden. Dabei liegt die Bindungswahrscheinlichkeit für die saubere Goldoberfläche unter 1%. Außerdem sind die Persistenzlängen l_p mittels WLC für HD mit Hep $l_p^{\text{Hep}} = 0,16 \pm 0,02 \text{ nm}$ und DS $l_p^{\text{DS}} = 0,18 \pm 0,06 \text{ nm}$ bestimmt worden. Diese Werte decken sich gut mit anderen Glycosaminoglycan beziehungsweise Proteoglycan Persistenzlängen wie für die Interaktion zwischen den Aggregationsfaktoren (MAF) $l_p^{\text{MAF}} = 0,48 \text{ nm}$ aus dem Meeresschwamm *Microciona prolifera* [299], den Aggrecanen $l_p^{\text{Agg}} = 0,31 \pm 0,04 \text{ nm}$ aus dem artikulären Knorpel [18] und der Wechselwirkung zwischen P-Selectin und PSGL-1 $l_p^{\text{PSGL}} = 0,35 \pm 0,05 \text{ nm}$ [143]. Somit ist gewährleistet, dass die gemessenen Ereignisse auf Glycosaminoglycan-Protein-Wechselwirkungen zurückzuführen sind.

Für den Vergleich der Spezifität der beiden GAG zu der HD sind die Bindungswahrscheinlichkeit W_{ges} und die Adhäsionsenergie E_{ad} (Abb. 4.6) ausschlaggebend, die für die jeweilige Subdomäne in Abb. 5.2 angegeben sind. Die durchschnittliche Adhäsionsenergie E_{ad} wird aus jedem Histogramm durch eine Anpassung mit einer Gaußfunktion der Form:

$$y(f) = c_1 \exp\left(-\left(\frac{f - c_3}{c_2}\right)^2\right) + c_4 \quad (5.1)$$

5 Ergebnisse und Diskussion

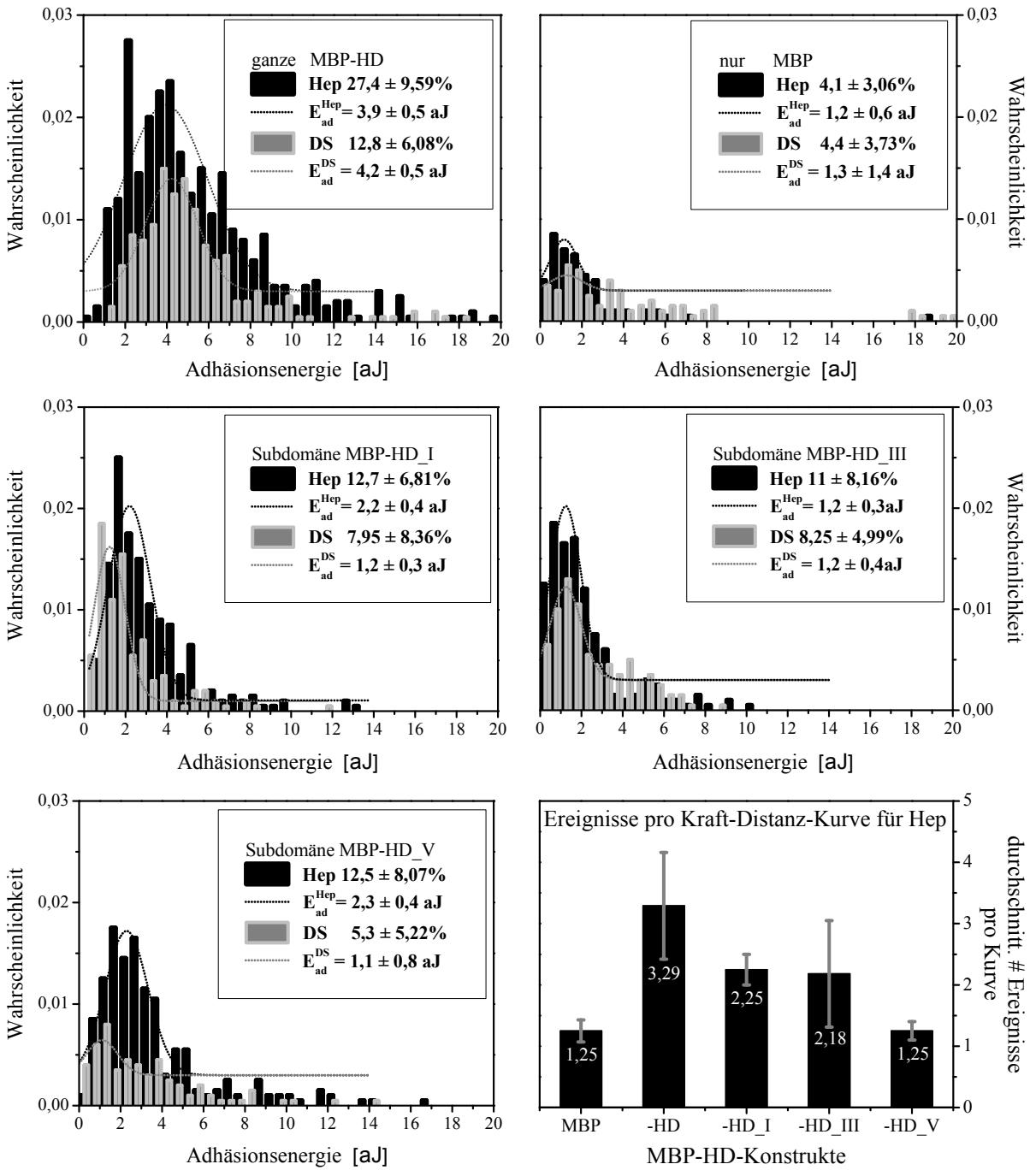


Abb. 5.2: Histogramme aus den Messungen mit konstanter Ziehgeschwindigkeit $v = 500 \text{ nm/s}$ für die Untersuchungen der Spezifität von verschiedenen MBP-HD Konstrukten sowie MBP allein zu den GAG Hep und DS. Die Verteilungen in schwarz repräsentieren die Adhäsionsenergie E_{ad} der Interaktionen mit Hep und in grau mit DS. Die schwarzen Punkte zeigen die Gauß-Anpassung von E_{ad} für Hep und die grauen Punkte für DS. Die Bindungswahrscheinlichkeit [%] und die Adhäsionsenergie [aJ] ist für die verschiedenen Konstrukte in der jeweiligen Grafik angegeben. (rechts unten) Auszählung der Dissoziationen pro Kraft-Distanz-Kurve für Hep mit den MBP-HD Konstrukten.

ermittelt, wobei c_1, \dots, c_4 die Fit-Parameter sind. In Abb. 5.2 sind die Unterschiede der Wechselwirkungen zwischen MBP, MBP-HD sowie den Subdomänen der MBP-HD mit den GAG DS und Hep dargestellt. Die Studie zeigt, dass Hep zu allen Konstrukten eine höhere Bindungswahrscheinlichkeit $W_{\text{ges}}^{\ddagger}$ hat. Das komplette Konstrukt MBP-HD zeigt erwartungsgemäß die höchste Bindungswahrscheinlichkeit ($27,4 \pm 9,59\%$) zu Hep im Gegensatz zu DS ($12,8 \pm 6,08\%$). Die Subdomänen MBP-HD_I ($12,7 \pm 6,81\%$), MBP-HD_III ($11 \pm 8,16\%$) und MBP-HD_V ($12,5 \pm 8,07\%$) liefern für Hep ähnliche Werte wie auch bei DS (MBP-HD_I $7,95 \pm 8,36\%$, MBP-HD_III $8,25 \pm 4,99\%$, MBP-HD_V $5,3 \pm 5,22\%$), die etwas niedriger ausfallen. Auch bei den Adhäsionsenergien E_{ad} zeigt sich die gleiche Tendenz für Hep (MBP-HD $3,9 \pm 0,5$ aJ, MBP-HD_I $2,2 \pm 0,4$ aJ, MBP-HD_III $1,2 \pm 0,3$ aJ, MBP-HD_V $2,3 \pm 0,4$ aJ) und DS (MBP-HD $4,2 \pm 0,5$ aJ, MBP-HD_I $1,2 \pm 0,3$ aJ, MBP-HD_III $1,2 \pm 0,4$ aJ, MBP-HD_V $1,1 \pm 0,8$ aJ).

Auffällig ist dabei die Subdomäne MBP-HD_V, die das basische Cluster enthält (Abb. 3.4). Diese scheint eine große Rolle bei der spezifischen Erkennung der GAG zu spielen, da diese nämlich nach der ganzen MBP-HD den größten Unterschied sowohl bei der Bindungswahrscheinlichkeit als auch der Adhäsionsenergie zwischen Hep ($W_{\text{ges}} = 12,5 \pm 8,07\%$, $E_{\text{ad}} = 2,3 \pm 0,4$ aJ) und DS ($W_{\text{ges}} = 5,3 \pm 5,22\%$, $E_{\text{ad}} = 1,1 \pm 0,8$ aJ) zeigt. MBP allein liefert ähnlich niedrige Werte sowohl für Hep ($W_{\text{ges}} = 4,1 \pm 3,06\%$, $E_{\text{ad}} = 1,2 \pm 0,6$ aJ) als auch für DS ($W_{\text{ges}} = 4,4 \pm 3,73\%$, $E_{\text{ad}} = 1,3 \pm 1,4$ aJ) und kann als unspezifischer Hintergrund angesehen werden.

Viele erhaltenen Kraft-Distanz-Kurven aus den Experimenten mit konstanter Ziehgeschwindigkeit haben die Form eines Sägezahn-Profils. Diese Charakteristik ist auch für weitere Glycosaminoglycan beziehungsweise Proteoglycan Bindungsstudien wie bei den schon erwähnten Aggregationsfaktoren MAF [300] und dem Aggrecan [18] bekannt (Abb. 5.3). Diese Mehrfachereignisse für die verschiedenen MBP-HD Konstrukte und Hep sind näher untersucht worden. Dazu sind jeweils 160 Kraft-Distanz-Kurven pro MBP-HD Konstrukt ausgewertet worden. Es ergibt sich folgende durchschnittliche Anzahl von Dissoziationen pro Kraft-Distanz-Kurve: ganze MBP-HD $3,29 \pm 0,87$, Subdomänen MBP-HD_I $2,25 \pm 0,25$, MBP-HD_III $2,18 \pm 0,87$, MBP-HD_V $1,25 \pm 0,15$ und nur MBP $1,25 \pm 0,18$ (Abb. 5.2 (rechts unten)). Auch hier zeigt die ganze MBP-HD die meisten Interaktionen pro Kurve. Aber auch das Indiz, dass die Subdomäne MBP-HD_V eine essentielle Bedeutung für die Spezifität zu Hep hat, wird bekräftigt. Denn im Vergleich

[†]Der Fehler für W_{ges} stellt die Standardabweichung der Ereignisse in einem Intervall von 500 Kraft-Distanz-Kurven dar.

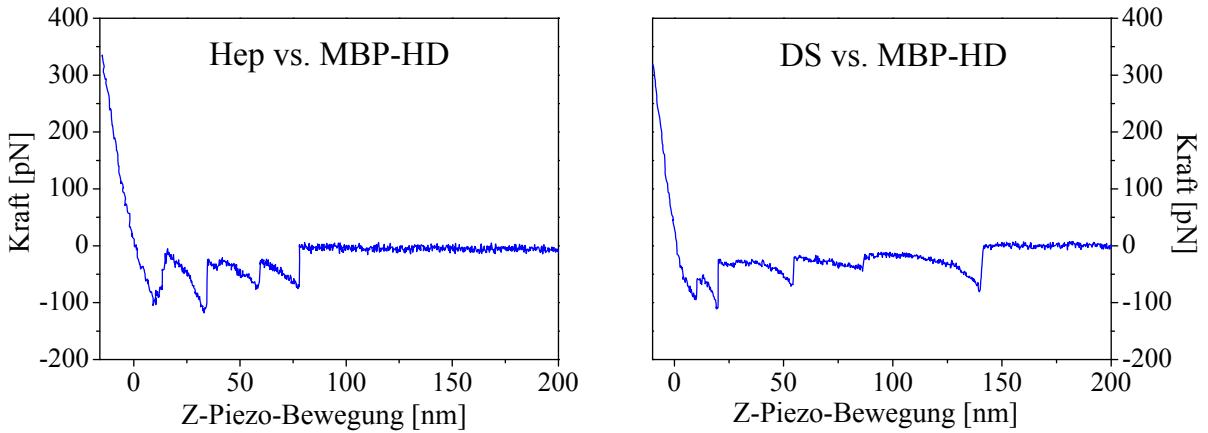


Abb. 5.3: Typische Kraft-Distanz-Kurven für die Interaktion zwischen MBP-HD und den GAG mit Sägezahn-Profil. Sowohl Hep wie auch DS zeigen dieses Verhalten.

zu den anderen Subdomänen sind bei MBP-HD_V häufiger Kraft-Distanz-Kurven mit Einzelereignissen aufgetreten. Das wiederum spricht für eine spezifische Interaktion.

Diese Resultate korrespondieren nicht ganz mit den Messungen der Live-staining Immunfluoreszenzen an HT1080 Zellen aus [287], wo für die MBP-HD_I keine Wechselwirkung mit den GAG an der Zelloberfläche beobachtet wurde. Das hat in unserem Fall vermutlich sterische Gründe, bedingt durch die Geometrie im AFM-Experiment. Erwähnenswert ist auch, dass die bestimmte relative Bindungsaffinität mittels Affinitätschromatographie in [287] für HD_V[§] (1150 mM NaCl) mit Hep am höchsten gewesen ist, sogar höher als für die ganze HD (1040 mM NaCl).

Insgesamt hat sich bei diesen Experimenten herausgestellt, dass Hep deutlich stärker an die ganze MBP-HD bindet als DS. Ob diese stärkere Bindung nur auf die höhere negative Ladung beziehungsweise den Sulfatierungsgrad [173] von Hep (0,9 – 1,25) im Vergleich zu DS (~ 0,7) oder auf besondere Sulfatierungsmuster (S-Domänen, Abb. 3.2) zurückzuführen ist, wird im Weiteren genauer untersucht.

5.1.2 HD-GAG Dissoziation bei konstanten Ziehgeschwindigkeiten

Um die Spezifität der verschiedenen GAG zu der ganzen MBP-HD qualitativ einzuordnen, sind mittels dynamischer Kraftspektroskopie nach dem Kramers-Bell-Evans Modell (Abschn. 2.3.2) die jeweiligen thermischen Off-Ratenkonstanten k_{off}^0 bestimmt worden

[§]Hier ist das MBP über eine *PreScission*-Protease Spaltung entfernt worden, um nur die Interaktion zwischen GAG und HD sowie ihren Subdomänen zu beobachten.

sowie die damit verbundenen mittleren Lebensdauern $\tau = \frac{1}{k_{off}^0}$. Dazu sind Messungen bei vier verschiedenen Ziehgeschwindigkeiten (100 nm/s, 500 nm/s, 2000 nm/s und 5000 nm/s) für die GAG Hep, HS+6S, DS, HS-6S und K5NS durchgeführt worden.

Beim Auswerten der Messdaten ist festgestellt worden, dass es bei der Interaktionslänge zwischen HD und GAG zwei Populationen gibt, insbesondere bei Hep und DS (Abb. 5.4). Bei HS+6S, HS-6S und K5NS ist das nicht beobachtet worden. Die Anhäufungen der Ereignisse liegen bei einer Interaktionslänge von ~ 50 nm und ~ 125 nm. Die vorangegangenen Experimente von [18, 164] mit Chondroitinsulfat liefern aber eine Längenverteilung zwischen 34 – 61 nm für die GAG. Deshalb sind für die Auswertung nur die Ereignisse genommen worden, die zwischen 40 – 80 nm liegen. Die zweite Population ist verworfen worden, da diese vermutlich Entfaltungs-Ereignisse der MBP-HD zeigt (Abb. 5.4 (rechts)). Diese Entfaltungs-Ereignisse könnten durch die hohe negative Ladung von Hep beziehungsweise DS begründet sein, die unspezifische Mehrfachbindungen begünstigt. Die dadurch entstehenden hohen Bindungskräfte könnten zur Entfaltung der Domänen-Struktur von MBP-HD führen.

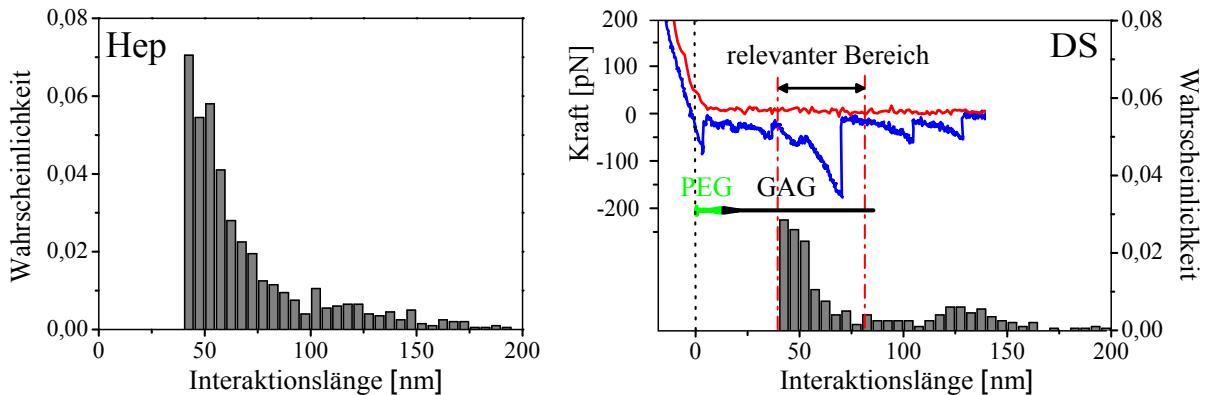


Abb. 5.4: Verteilungen von Interaktionslängen links für Hep und rechts für DS mit MBP-HD. Es sind deutlich zwei Populationen bei beiden Verteilungen erkennbar: bei ~ 50 nm und ~ 125 nm. Da aber die durchschnittliche Länge der GAG bei 34 – 61 nm liegt, ist die zweite Population nicht für die Auswertung berücksichtigt worden. In der linken Verteilung ist anhand einer Kraft-Distanz-Kurve gezeigt, welcher Bereich für die Auswertung relevant ist. Die Verwendung des PEG-NHS-Ester Disulfid-Linkers verlängert das System um ~ 10 nm, deshalb müssten alle spezifischen Ereignisse in der Verteilung zwischen 40 – 80 nm liegen.

Verteilungen von Dissoziationskräften der GAG

Die wahrscheinlichste Dissoziationskraft F_{max} wird für jede Ziehgeschwindigkeit mit einer Gauß-Anpassung der jeweiligen Verteilungen von Dissoziationskräften bestimmt. Dabei setzt sich der Fehler für die wahrscheinlichste Dissoziationskraft aus dem Standardfehler des Mittelwerts der Gaußverteilung für eine 95,4%-ige Konfidenz ($2\sigma/\sqrt{N}$) und dem Fitfehler für die wahrscheinlichste Dissoziationskraft zusammen. Die Werte für die Elastizitäten k_{eff} (Abschn. 4.1.8, Abb. 4.6) sind auf gleiche Weise ermittelt worden, diese liegen zwischen 3 und 16 pN/nm. Mit k_{eff} und der jeweiligen Ziehgeschwindigkeit lässt sich die Belastungsrate $r = k_{eff} \cdot v$ errechnen. Die erhaltenen Verteilungen von Dissoziationskräften für die vier Ziehgeschwindigkeiten sowie die bestimmten Werte für F_{max} und r sind in Abb. 5.5 für Hep, Abb. 5.6 für HS+6S, Abb. 5.7 für DS, Abb. 5.8 für HS-6S und Abb. 5.9 für K5NS dargestellt.

Eine Zunahme der wahrscheinlichsten Dissoziationskraft F_{max} mit wachsender Ziehgeschwindigkeit v ist nur für die GAG Hep, HS+6S und DS beobachtet worden (Abb. 5.5 – 5.7). Die GAG HS-6S und K5NS zeigen keine Belastungsraten-Abhängigkeit (Abb. 5.8 und 5.9). Auffälligerweise steigt auch die Bindungswahrscheinlichkeit zwischen der

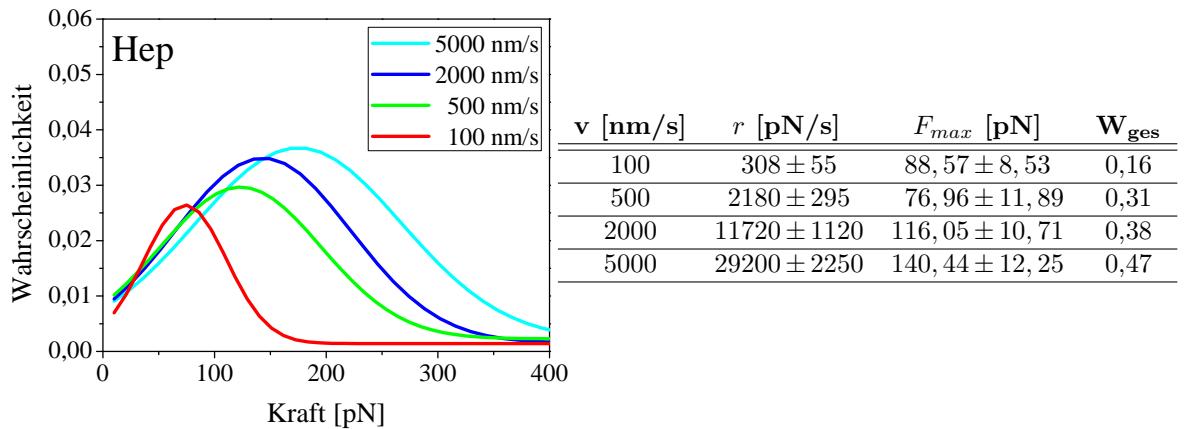


Abb. 5.5: Mit Gauß-Kurven angepasste Verteilungen der Dissoziationskräfte für die Ziehgeschwindigkeiten 100 nm/s bis 5000 nm/s für Hep mit MBP-HD. Es ist deutlich eine Zunahme der Bindungswahrscheinlichkeit W_{ges} mit wachsender Ziehgeschwindigkeit v zu erkennen, die mit rot 100 nm/s, grün 500 nm/s, blau 2000 nm/s und cyan 5000 nm/s kodiert sind. Auf der rechten Seite ist die Tabelle mit extrahierten Werten aus den kraftspektroskopischen Experimenten für Hep gezeigt, wobei F_{max} und r im Weiteren für die Bestimmung der thermischen Off-Ratenkonstante benutzt werden (Abb. 5.10).

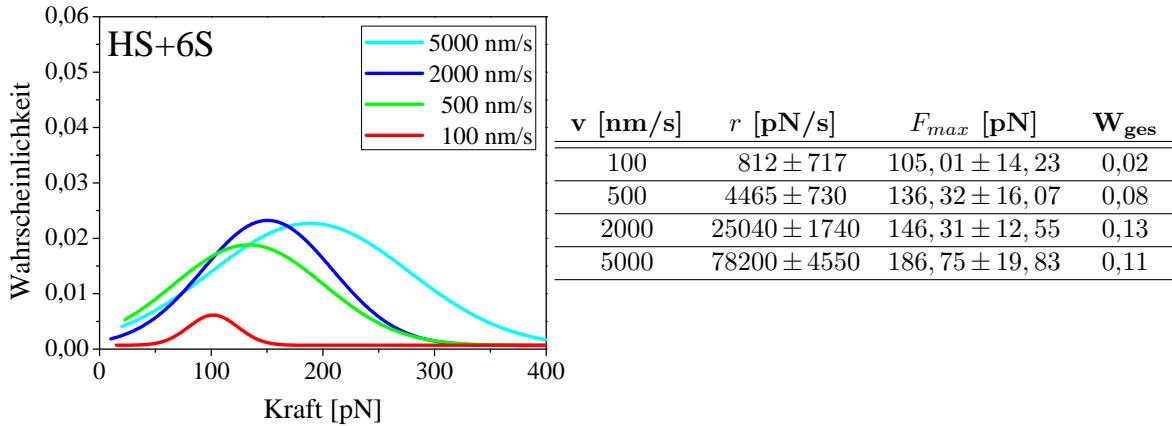


Abb. 5.6: Mit Gauß-Kurven angepasste Verteilungen der Dissoziationskräfte für die Ziehgeschwindigkeiten 100 nm/s bis 5000 nm/s für HS+6S mit MBP-HD. Auch hier ist eine Zunahme der Bindungswahrscheinlichkeit W_{ges} mit wachsender Ziehgeschwindigkeit v deutlich zu erkennen, obwohl die Bindungswahrscheinlichkeiten insgesamt etwas niedriger ausfallen als bei Hep. Diese Beobachtung korreliert mit dem niedrigeren Sulfatierungsgrad von HS+6S verglichen mit dem von Hep. Die rechte Seite zeigt die Tabelle mit extrahierten Werten aus den kraftspektroskopischen Experimenten für HS+6S, wobei F_{max} und r im Weiteren für die Bestimmung der thermischen Off-Ratenkonstante benutzt werden.

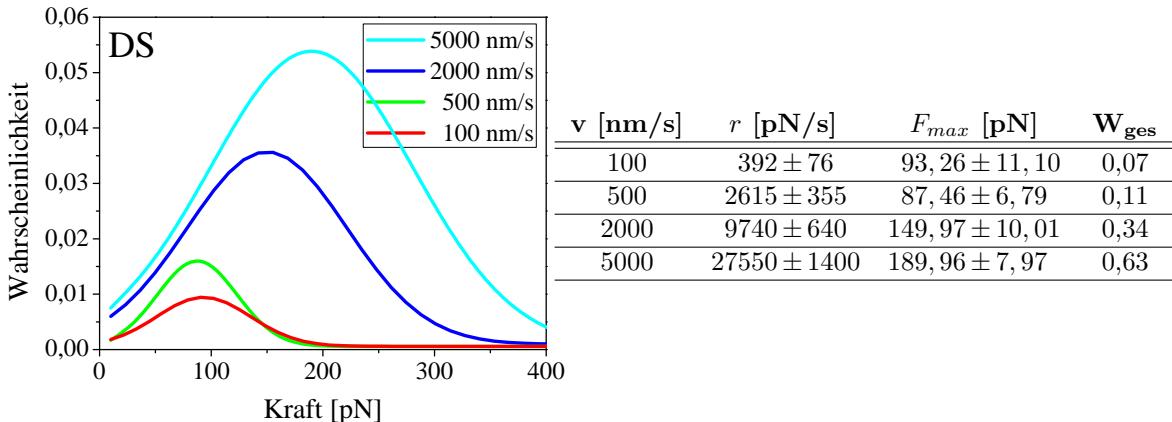


Abb. 5.7: Mit Gauß-Kurven angepasste Verteilungen der Dissoziationskräfte für die Ziehgeschwindigkeiten 100 nm/s bis 5000 nm/s für DS mit MBP-HD. Das Steigen der Bindungswahrscheinlichkeit W_{ges} mit wachsender Ziehgeschwindigkeit v zeigt sich auch bei DS. Für die Ziehgeschwindigkeit 5000 nm/s ist eine höhere Bindungswahrscheinlichkeit als bei Hep beobachtet worden. Vermutlich wird diese durch unspezifische Wechselwirkungen von DS mit MBP-HD verfälscht, die aufgrund der höheren Dynamik mehr ins Gewicht fallen als bei langsamen Ziehgeschwindigkeiten. Rechts ist die Tabelle mit extrahierten Werten aus den kraftspektroskopischen Experimenten für DS gezeigt, wobei F_{max} und r im Weiteren für die Bestimmung der thermischen Off-Ratenkonstante benutzt werden.

5 Ergebnisse und Diskussion

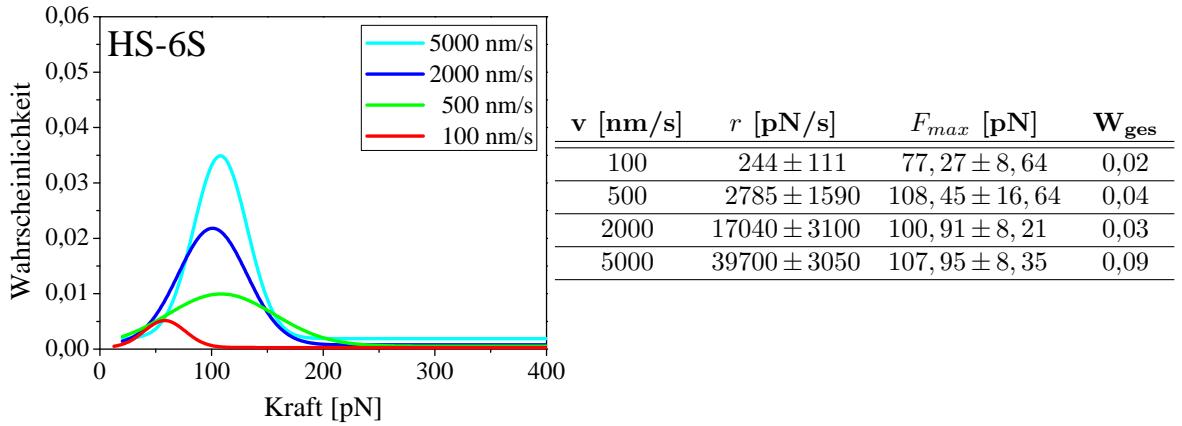


Abb. 5.8: Mit Gauß-Kurven angepasste Verteilungen der Dissoziationskräfte für die Ziehgeschwindigkeiten 100 nm/s bis 5000 nm/s für HS-6S mit MBP-HD. Hier steigt die Bindungswahrscheinlichkeit W_{ges} mit wachsender Ziehgeschwindigkeit v zwar an, jedoch zeigt die Interaktion von HS-6S mit MBP-HD keine Belastungsraten-Abhängigkeit, da die Dissoziationskräfte für alle Ziehgeschwindigkeiten annähernd konstant bleiben. Auffällig ist auch, dass die Verteilungen relativ schmal sind im Vergleich zu Hep, HS+6S und DS. Rechts ist die Tabelle mit extrahierten Werten aus den kraftspektroskopischen Experimenten für HS-6S gezeigt. Die ermittelten F_{max} Werte zeigen nicht den vorhergesagten Zusammenhang nach Kramers-Bell-Evans aus Abschn. 2.3.2, deshalb ist eine Bestimmung der thermischen Off-Ratenkonstante für HS-6S nicht möglich.

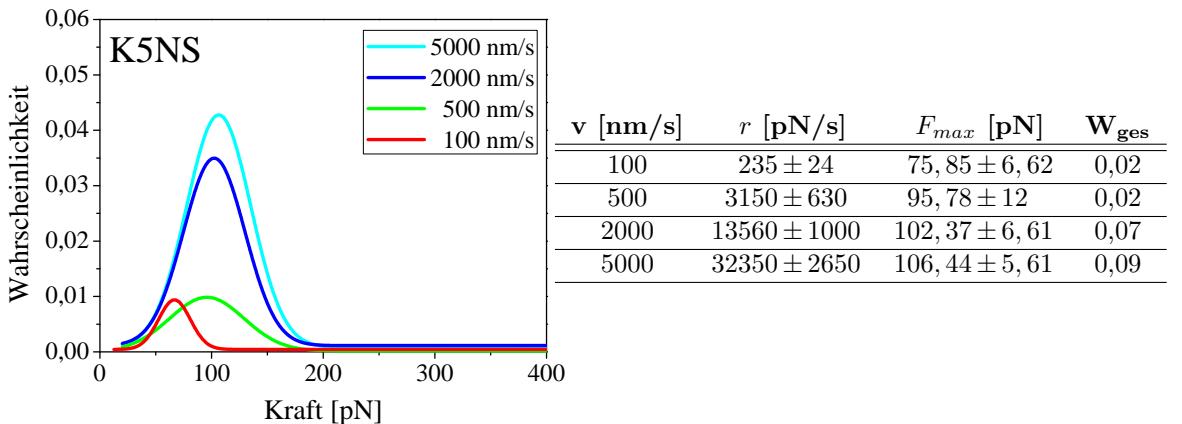


Abb. 5.9: Mit Gauß-Kurven angepasste Verteilungen der Dissoziationskräfte für die Ziehgeschwindigkeiten 100 nm/s bis 5000 nm/s für K5NS mit MBP-HD. Auch hier zeigt die Interaktion von K5NS mit MBP-HD keine Belastungsraten-Abhängigkeit mit relativ schmal verteilten Dissoziationskräften. Auf der rechten Seite ist die Tabelle mit extrahierten Werten aus den kraftspektroskopischen Experimenten für K5NS gezeigt. Die ermittelten F_{max} Werte zeigen nicht den vorhergesagten Zusammenhang nach Kramers-Bell-Evans aus Abschn. 2.3.2, deshalb ist eine Bestimmung der thermischen Off-Ratenkonstante für K5NS analog zu HS-6S nicht möglich.

MBP-HD und den GAG mit wachsender Ziehgeschwindigkeit an. Dieses Phänomen zeigt zum Beispiel auch P-Selectin mit seinem primären Liganden PSGL-1 [143]. Seit 2003 [135] ist bekannt, dass ein solches Verhalten vermutlich für *Catch Bond* (Abschn. 2.3.4) spricht. Genauere Untersuchungen und Ergebnisse dazu werden im folgenden Abschn. 5.1.3 vorgestellt.

Anzumerken ist auch, dass die Verteilungen der Dissoziationskräfte sowie die Bindungswahrscheinlichkeiten mit dem Sulfatierungsgrad der GAG Hep (0,9 – 1,25), HS+6S (0,4 – 0,9) und DS ($\sim 0,7$) korrelieren [173]. Dabei spiegeln die relativ breiten Verteilungen der Dissoziationskräfte die Diversität der Sulfatierungsmuster bei diesen GAG wider (Abschn. 3.1.1). Bei den GAG HS-6S und K5NS sind im Gegensatz dazu schmalere Verteilungen beobachtet worden (Abb. 5.8 und 5.9). Zudem verdeutlicht die fehlende Belastungsraten-Abhängigkeit die essentielle Rolle der 6-*O*-Sulfate bei der Wechselwirkung der GAG mit der HD, da diese bei HS-6S nur sporadisch auftreten und bei K5NS gänzlich fehlen.

Allerdings zeigt DS bei 5000 nm/s einen Ausreißer mit einer Bindungswahrscheinlichkeit von 63%, die sogar höher ist als die von Hep mit 47%. Das kann damit zusammenhängen, dass bei DS allgemein nur 10 – 15% der Disaccharide nicht sulfatiert sind [301–303]. Ein geringer Anteil der Disaccharide des DS ist sogar zweifach sulfatiert [304]. Aus diesem Grund können viele unspezifische Bindungen entstehen. Diese fallen aber erst bei höheren Geschwindigkeiten ins Gewicht, da sie sehr kurzlebig sind und eine größere Dynamik brauchen, um detektiert werden zu können.

Bestimmung der thermischen Off-Ratenkonstanten

Die thermischen Off-Ratenkonstanten k_{off}^0 für die Interaktion zwischen den GAG und MBP-HD werden bestimmt, indem die Werte der wahrscheinlichsten Dissoziationskräfte halblogarithmisch gegen die jeweiligen Belastungsraten aufgetragen werden (Abb. 5.5 – 5.9). In Abb. 5.10 zeigt sich auch der von Kramers-Bell-Evans vorhergesagte Zusammenhang (Abschn. 2.3.2) für die GAG Hep, HS+6S und DS aus Gleichung 2.36:

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

Durch die lineare Anpassung der jeweiligen Datensätze und der folgenden Extrapolation auf die verschwindende äußere Kraft $F_{max} = 0$ ist die Belastungsrate r_0 ($r_0^{\text{Hep}} = 0,49 \pm 4,14 \text{ pN/s}$, $r_0^{\text{HS+6S}} = 1,76 \pm 3,74 \text{ pN/s}$, $r_0^{\text{DS}} = 39,89 \pm 73,11 \text{ pN/s}$) zugänglich.

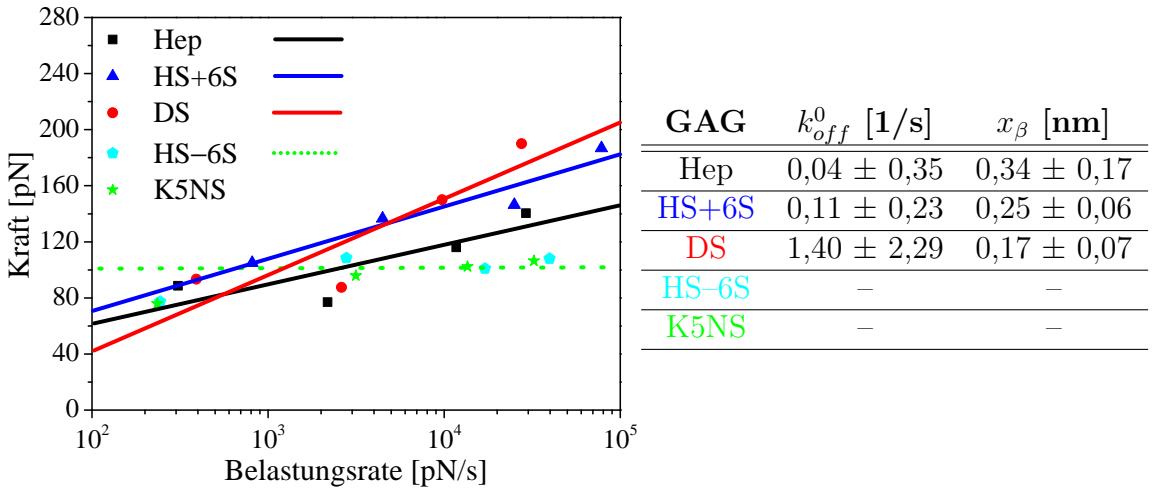


Abb. 5.10: Halblogarithmische Auftragung der wahrscheinlichsten Dissoziationskräfte F_{max} gegen die jeweiligen Belastungsraten r für die GAG inklusive der linearen Anpassung des jeweiligen Datensatzes in Farben kodiert, und zwar schwarz für Hep, blau für HS+6S, rot für DS, cyan für HS-6S und grün für K5NS. Bei Hep, HS+6S und DS zeigt sich der von Kramers-Bell-Evans vorhergesagte Zusammenhang, bei HS-6S und K5NS nicht. Bei der linearen Anpassung der Daten von HS-6S und K5NS ergaben sich nicht verwendbare Fit-Parameter für die Bestimmung der Off-Ratenkonstante. Deshalb ist die lineare Anpassung dieser Datensätze mit einer gestrichelten grünen Linie angedeutet. Rechte Seite zeigt die Tabelle mit den berechneten thermischen Off-Ratenkonstanten k_{off}^0 und molekularen Bindungslängen x_β für die jeweiligen GAG.

lich, bei der die Dissoziation thermisch getrieben ist. Die inverse Steigung der Geraden aus der linearen Anpassung ist proportional zu der molekularen Bindungslänge x_β . Mit der Beziehung:

$$k_{off}^0 = \frac{1}{k_B T} x_\beta r_0 \quad (5.2)$$

lässt sich die thermische Off-Ratenkonstante k_{off}^0 errechnen. Die Werte von x_β und k_{off}^0 sind in Abb. 5.10 für das jeweilige GAG aufgeführt. Mit der Beziehung $\tau = \frac{1}{k_{off}^0}$ kann die Lebensdauer der Bindung berechnet werden. Erwartungsgemäß ist die Lebensdauer für Hep mit MBP-HD $\tau^{Hep} = 25$ s am höchsten und für DS $\tau^{DS} = 0,7$ s am niedrigsten. Die Lebensdauer für HS+6S $\tau^{HS+6S} = 9$ s liegt um den Faktor drei unter der von Hep $\tau^{Hep} = 25$ s. Die GAG HS-6S und K5NS zeigen keine Belastungsraten-Abhängigkeit (Abb. 5.10 cyan und grün kodiert), deshalb kann die Lebensdauer für diese GAG mit der

dynamischen Kraftspektroskopie nicht bestimmt werden. Deren Bindungen sind vermutlich sehr kurzlebig und benötigen sehr viel höhere Ziehgeschwindigkeiten, damit diese eine Belastungsraten-Abhängigkeit zeigen. Das ist jedoch durch die Bandbreite der Datenerfassung und die Resonanzfrequenz des Kraftsensors limitiert.

Die Resultate aus den Experimenten der dynamischen Kraftspektroskopie zeigen, dass nicht nur die Gesamtladung der GAG eine wichtige Rolle für das Zustandekommen einer spezifischen Interaktion mit der MBP-HD spielt, sondern dass auch gewisse Sulfatierungsmuster (S-Domänen), insbesondere das 6-*O*-Sulfat, essentiell dafür sind.

5.1.3 HD-GAG Dissoziation bei konstanten Kräften (*Force Clamp*)

Bei den in Abschn. 5.1.2 vorgestellten kraftspektroskopischen Experimenten mit konstanten Ziehgeschwindigkeiten an MBP-HD mit GAG, hat sich eine Erhöhung der Bindungswahrscheinlichkeit mit wachsender Ziehgeschwindigkeit gezeigt. Dieses Verhalten legt die Vermutung nahe, dass es sich bei der Interaktion zwischen MBP-HD und GAG um ein *Catch Bond* handeln könnte. Denn die bisherigen Systeme, denen ein *Catch Bond* Verhalten nachgewiesen worden ist (Absch. 2.3.4, [30, 132–139]), zeigen alle eine ansteigende Bindungswahrscheinlichkeit mit wachsender Ziehgeschwindigkeit.

Verifizierung des *Catch Bond* Verhaltens

Für die Verifizierung des *Catch Bond* Verhaltens sind zusätzlich kraftspektroskopische Experimente mit konstanten Kräften (Abschn. 4.1.7) an MBP-HD und den GAG im Kräfte-Bereich von 7,5 – 40 pN durchgeführt worden. In Tab. 5.1 – 5.4 sind die ermittelten Lebensdauern τ zu den jeweiligen externen Kräften aus den *Force Clamp* Experimenten aufgelistet. Dabei sind die Datensätze auf zwei verschiedene Arten ausgewertet worden:

- Zum einen durch lineare Anpassung des logarithmischen Zerfalls analog zum Zerfallsgesetz von radioaktiven Substanzen:

$$N(t) = N_0 \cdot \exp \left\{ -\frac{t}{\tau} \right\}. \quad (5.3)$$

Die linearen Anpassungen für den *Catch Bond* Bereich sind in Abb. 5.11 – 5.14 b) gezeigt. Hier gleicht die negative inverse Steigung (-1/Steigung) der durchschnittlichen Lebensdauer τ des Komplexes. R^2 stellt den Determinationskoeffizienten

Heparin

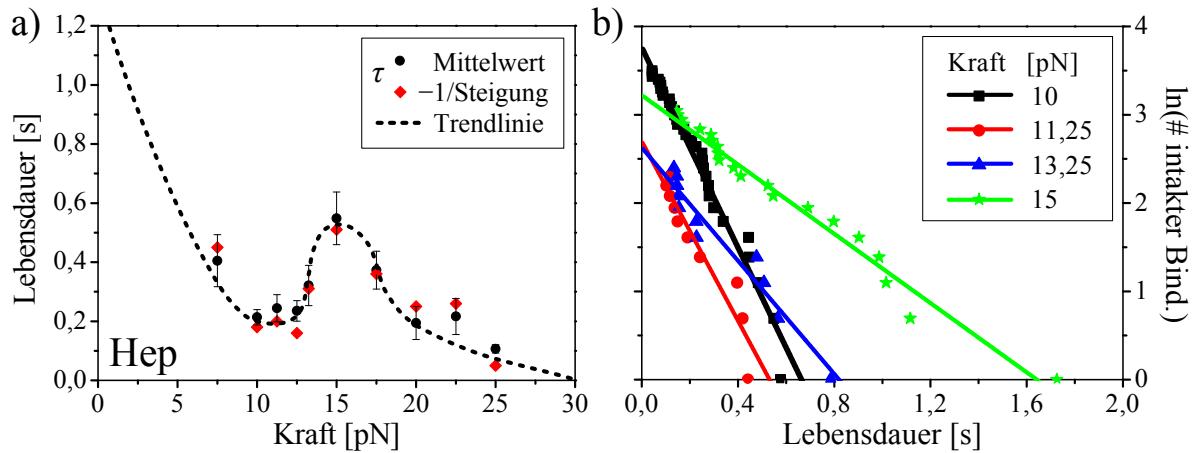


Abb. 5.11: a) Auftragung der Lebensdauer gegen die Kraft für Hep, dabei repräsentieren die schwarzen Kreise die Mittelwerte und die roten Rauten die negative inverse Steigung der linearen Anpassung des logarithmischen Zerfalls. Um die Entwicklung der Lebensdauer mit zunehmender Kraft zu verdeutlichen, ist der Verlauf mit einer gestrichelten Trendlinie angedeutet.
b) Halblogarithmische Auftragung aller detektierten Ereignisse der jeweiligen Kraft gegen die Lebensdauer für Hep im Catch Bond Bereich inklusive der linearen Anpassungen. Hier wird deutlich, wie die Lebensdauer des Komplexes mit wachsender Kraft ansteigt.

F [pN]	Mittelwert τ [s]	$-1/\text{Steigung} \tau$ [s]	R^2
7,5	$0,405 \pm 0,09$	0,45	0,94
10	$0,214 \pm 0,03$	0,18	0,98
11,25	$0,244 \pm 0,05$	0,20	0,88
12,5	$0,235 \pm 0,04$	0,16	0,94
13,25	$0,321 \pm 0,07$	0,31	0,94
15	$0,548 \pm 0,09$	0,51	0,98
17,5	$0,373 \pm 0,06$	0,36	0,94
20	$0,194 \pm 0,06$	0,25	0,81
22,5	$0,216 \pm 0,06$	0,26	0,87
25	$0,107 \pm 0,01$	0,05	0,57

Tab. 5.1: Auflistung der ausgewerteten Messwerte aus den Force Clamp Experimenten für Hep.

Natives Heparansulfat

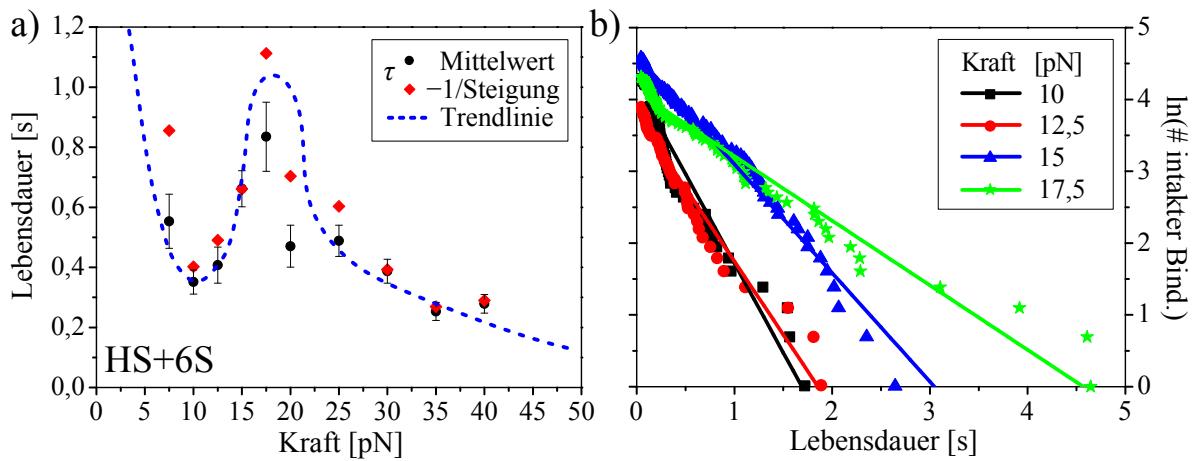


Abb. 5.12: a) Auftragung der Lebensdauer gegen die Kraft für HS+6S, dabei repräsentieren die schwarzen Kreise die Mittelwerte und die roten Rauten die negative inverse Steigung der linearen Anpassung des logarithmischen Zerfalls. Um die Entwicklung der Lebensdauer mit zunehmender Kraft zu verdeutlichen, ist der Verlauf mit einer gestrichelten Trendlinie angedeutet. Im Vergleich zu Hep ist der Catch Bond Bereich bei HS+6S stärker ausgeprägt.
 b) Halblogarithmische Auftragung aller detektierten Ereignisse der jeweiligen Kraft gegen die Lebensdauer für HS+6S im Catch Bond Bereich inklusive der linearen Anpassungen. Auch hier zeigt sich deutlich, wie die Lebensdauer des Komplexes mit wachsender Kraft ansteigt, wobei sich hier die Lebensdauer allgemein sogar zu höheren Werten verschiebt.

F [pN]	Mittelwert τ [s]	$-1/\text{Steigung } \tau$ [s]	R^2
7,5	$0,553 \pm 0,09$	0,86	0,89
10	$0,351 \pm 0,04$	0,40	0,92
12,5	$0,521 \pm 0,09$	0,72	0,94
15	$0,662 \pm 0,06$	0,66	0,98
17,5	$0,835 \pm 0,12$	1,11	0,96
20	$0,470 \pm 0,07$	0,70	0,89
25	$0,488 \pm 0,05$	0,60	0,97
30	$0,387 \pm 0,04$	0,39	0,98
35	$0,253 \pm 0,03$	0,27	0,96
40	$0,279 \pm 0,03$	0,29	0,95

Tab. 5.2: Auflistung der ausgewerteten Messwerte aus den Force Clamp Experimenten für HS+6S.

Dermatansulfat

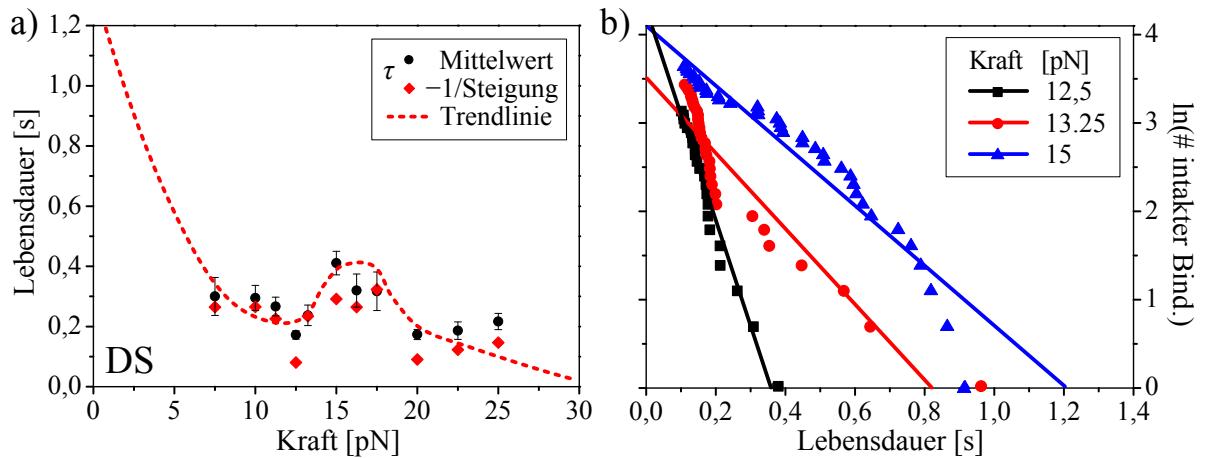


Abb. 5.13: a) Auftragung der Lebensdauer gegen die Kraft für DS, dabei repräsentieren die schwarzen Kreise die Mittelwerte und die roten Rauten die negative inverse Steigung der linearen Anpassung des logarithmischen Zerfalls. Um die Entwicklung der Lebensdauer mit zunehmender Kraft zu verdeutlichen, ist der Verlauf mit einer gestrichelten Trendlinie angedeutet. Hier ist der Anstieg der Lebensdauer nur schwach ausgeprägt. Das hängt mit der geringen 6-O-Sulfatierung zusammen wie die folgenden Experimente mit K5NS zeigen werden.
b) Halblogarithmische Auftragung aller detektierten Ereignisse der jeweiligen Kraft gegen die Lebensdauer für DS im Catch Bond Bereich inklusive der linearen Anpassungen. Auch hier ist das Ansteigen der Lebensdauer des Komplexes mit wachsender Kraft zu beobachten.

F [pN]	Mittelwert τ [s]	$-1/\text{Steigung}$ τ [s]	R^2
7,5	$0,299 \pm 0,06$	0,26	0,98
10	$0,295 \pm 0,04$	0,26	0,93
11,25	$0,266 \pm 0,03$	0,23	0,93
12,5	$0,172 \pm 0,01$	0,08	0,97
13,25	$0,237 \pm 0,03$	0,23	0,87
15	$0,411 \pm 0,04$	0,29	0,92
16,25	$0,319 \pm 0,06$	0,26	0,97
17,5	$0,317 \pm 0,06$	0,32	0,96
20	$0,174 \pm 0,02$	0,09	0,97
22,5	$0,186 \pm 0,03$	0,12	0,93
25	$0,217 \pm 0,03$	0,15	0,97

Tab. 5.3: Auflistung der ausgewerteten Messwerte aus den Force Clamp Experimenten für DS.

beziehungsweise das Bestimmtheitsmaß dar und gibt Auskunft über die Genauigkeit der Anpassung. Der Wert 1 entspricht der maximalen Übereinstimmung.

- Zum anderen durch simple Bildung des Mittelwerts, wobei die Unsicherheit dem Standardfehler entspricht, der mit σ/\sqrt{N} berechnet worden ist.

Bei beiden Verfahren ergibt sich eine sehr ähnliche Tendenz für die Entwicklung der Lebensdauer in Abhängigkeit von der anlegten Zugkraft. In Abb. 5.11 – 5.14 a) sind die Werte der Lebensdauer τ gegen die jeweilige externe Kraft aufgetragen, dabei sind die Mittelwerte mit schwarzen Kreisen kodiert und die Werte für -1/Steigung mit roten Rauten. Tatsächlich zeigt sich für die Interaktion zwischen MBP-HD und den GAG Hep, HS+6S und DS ein „unintuitiver“ Charakter, bei dem die Lebensdauer τ des Komplexes ansteigt, obwohl eine externe mechanische Kraft F anliegt. Die Stabilisierung der Bindung ist für Hep im Kräfte-Bereich zwischen 10 – 16 pN beobachtet worden (Abb. 5.11, Tab. 5.1). Bei HS+6S ist dieses Verhalten im Kräfte-Bereich zwischen 10 – 18 pN stark ausgeprägt (Abb. 5.12, Tab. 5.2). Auch bei DS ist es im Kräfte-Bereich zwischen 12 – 16 pN zu beobachten (Abb. 5.13, Tab. 5.3), jedoch nur in sehr geringem Maße. Um das „unintuitive“ Verhalten der Bindung zu verdeutlichen, ist der Verlauf der Lebensdauer mit zunehmender Zugkraft mit einer gestrichelten Trendlinie unterlegt worden. Diese Trendlinie verdeutlicht, dass die Interaktion der MBP-HD mit Hep, HS+6S und DS sich außerhalb der genannten Kräfte-Intervalle wie ein klassischer *Slip Bond* verhält (Abschn. 2.3.3). Außerdem wird dadurch erkennbar, dass die bisherigen Modelle für die Beschreibung von *Catch Bond* [20–30] bei unserem System nicht greifen. Insbesondere das in Abschn. 2.3.5 vorgestellte *One-State, two-path Catch Bond* Modell liefert für eine verschwindende externe Kraft $F \rightarrow 0$ eine sehr kurze Lebensdauer für den Komplex. Das ist bei der Interaktion zwischen HD und GAG offensichtlich nicht der Fall. Auf die mathematische Beschreibung sowie die Interpretation der Bindung von HD und GAG wird in Abschn. 5.1.4 und 5.1.6 eingegangen.

Der Vergleich zwischen den Datensätzen für Hep, HS+6S und DS und der Struktur der GAG weist daraufhin, dass nicht die Gesamtladung der GAG ausschlaggebend für das *Catch Bond* Verhalten der MBP-HD mit den GAG sein kann, sondern vermutlich das Sulfatierungsmuster (S-Domänen).

Relevanz der 6-O-Sulfate für das *Catch Bond* Verhalten

Vorangegangene Experimente von [185] deuten daraufhin, dass das Sulfatierungsmuster, vor allem die 6-O-Sulfate eine essentielle Rolle bei der Interaktion zwischen der HD und den GAG spielen. Um zu prüfen, ob die 6-O-Sulfate auch essentiell für das *Catch Bond* Verhalten sind, ist auch in diesem Fall das synthetische GAG K5NS für die Negativkontrolle verwendet worden. Messungen mit dem HS-6S sind nicht durchgeführt worden, da hier noch eine geringe 6-O-Sulfatierung vorhanden ist. Somit ist ein kompletter Ausschluss der Interaktion über 6-O-Sulfate bei HS-6S nicht gegeben.

Bei den *Force Clamp* Messungen mit K5NS ist kein *Catch Bond* Verhalten beobachtet worden. Im Gegenteil: die Interaktion zwischen MBP-HD und K5NS, dem die 6-O-Sulfatierung gänzlich fehlt, verhält sich wie ein *Slip Bond* (Abb. 5.14, Tab 5.4) und

N-sulfatiertes K5-polysaccharid

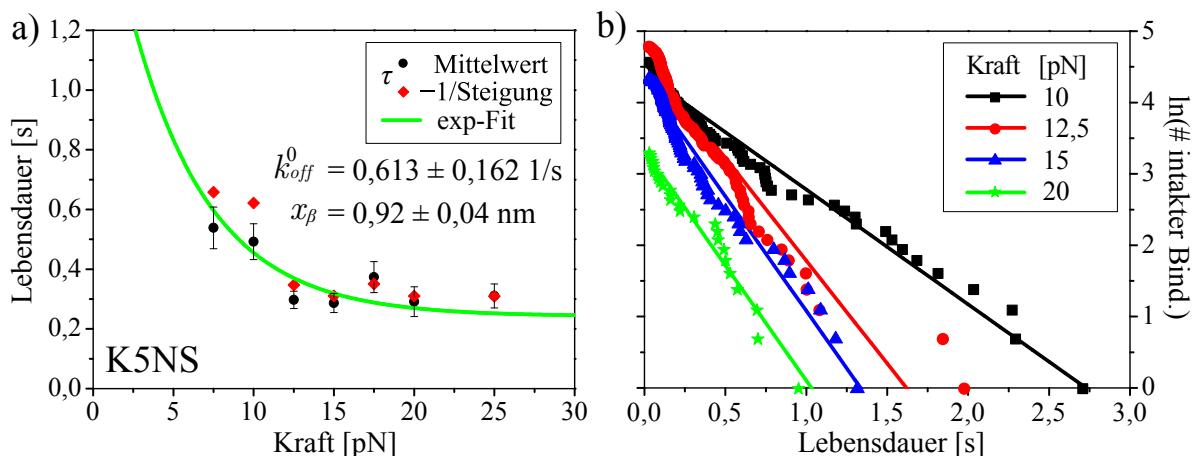


Abb. 5.14: a) Auftragung der Lebensdauer gegen die Kraft für K5NS, dabei repräsentieren die schwarzen Kreise die Mittelwerte und die roten Rauten die negative inverse Steigung der linearen Anpassung des logarithmischen Zerfalls. K5NS zeigt das klassische *Slip Bond* Verhalten nach Kramers-Bell-Evans und kann mit Gleichung 2.31 angepasst werden, dabei repräsentiert die grüne Kurve den Fit des Datensatzes.

b) Halblogarithmische Auftragung aller detektierten Ereignisse der jeweiligen Kraft gegen die Lebensdauer für K5NS im vermeintlichen *Catch Bond* Bereich inklusive der linearen Anpassungen. In diesem Fall sinkt die Lebensdauer des Komplexes mit wachsender Kraft, somit entspricht die Bindung einem *Slip Bond*. Die Änderung der Bindungseigenschaft ist vermutlich auf das Fehlen der 6-O-Sulfate zurückzuführen.

kann mit der Beziehung nach Kramers-Bell-Evans (Gleichung 2.31):

$$k_{off}(F) = k_{off}^0 \exp \left\{ \frac{F \cdot x_\beta}{k_B T} \right\}$$

beschrieben werden. Damit ergibt sich für die thermische Off-Ratenkonstante des K5NS $k_{off}^0 = 0,613 \pm 0,162 \text{ 1/s}$ und für die molekulare Bindungslänge $x_\beta = 0,92 \pm 0,04 \text{ nm}$.

F [pN]	Mittelwert τ [s]	- 1/Steigung τ [s]	R^2
7,5	$0,538 \pm 0,07$	0,66	0,95
10	$0,492 \pm 0,06$	0,62	0,97
12,5	$0,298 \pm 0,03$	0,35	0,93
15	$0,287 \pm 0,03$	0,31	0,96
17,5	$0,373 \pm 0,05$	0,35	0,92
20	$0,291 \pm 0,05$	0,31	0,96
25	$0,311 \pm 0,04$	0,31	0,97

Tab. 5.4: Auflistung der ausgewerteten Messwerte aus den Force Clamp Experimenten für K5NS.

Die *Force Clamp* Experimente manifestieren die zentrale Rolle der 6-*O*-Sulfate für die Interaktion zwischen HD und GAG. Sie zeigen, dass die 6-*O*-Sulfate nicht nur für die spezifische Erkennung essentiell sind, sondern auch für die Art der Bindung. Es ist offensichtlich, dass nicht die 6-*O*-Sulfate allein die spezifische Interaktion ausmachen, sondern ihre Anordnung in S-Domänen. Das ist deutlich beim Vergleich der Datensätze für Hep und HS+6S erkennbar. Obwohl Hep einen deutlichen Überschuss an 6-*O*-Sulfaten besitzt als HS+6S, ist trotzdem das *Catch Bond* Verhalten bei HS+6S stärker ausgeprägt. Das natürliche Substrat HS+6S der HD zeigt *Catch Bond* Verhalten über einen breiteren Kräfte-Bereich als Hep mit der höchsten gemessenen Lebensdauer $\tau = 0,835 \text{ s}$ bei einer relativ hohen Zugkraft von $F = 17,5 \text{ pN}$ (Tab. 5.2).

5.1.4 Ansatz für die Beschreibung der Interaktion von HD mit GAG

Wie schon erwähnt, ist die Beschreibung des *Catch Bond* Verhaltens der GAG Hep und HS+6S mit der HD durch gängige Modelle wie dem *One-State, two-path Catch Bond* Modell nicht zufriedenstellend (Anschn. 2.3.5), da insbesondere die Anpassung der Datensätze mit diesem Modell für Kräfte $\rightarrow 0$ divergiert.

Two-State Two-Path Modell

Für die Beschreibung des Systems HD/GAG wird der Ansatz von [305] benutzt und das vorgestellte Modell als *Two-State Two-Path* bezeichnet. Dieses Modell ist zwar nicht neu, wurde aber bisher auf kein *Catch Bond* System angewendet. Hier kann der molekulare Komplex in zwei verschiedenen Bindungszuständen vorliegen (S_1 oder S_2), die sich in einer Potentiallandschaft (Abb. 5.15) bestehend aus zwei Potentialmulden jeweils ansiedeln können. Ohne der Einwirkung einer externen Kraft ist der Zustand S_1 bevorzugt. Wird jedoch eine externe Kraft auf den Komplex ausgeübt, kann dieser dissoziieren oder sukzessiv jenseits einer Schwellkraft in den Zustand S_2 überführt werden. Somit hat das System zwei alternative Pfade zu zerfallen: vom Zustand S_1 über x_1 oder S_2 über x_2 ,

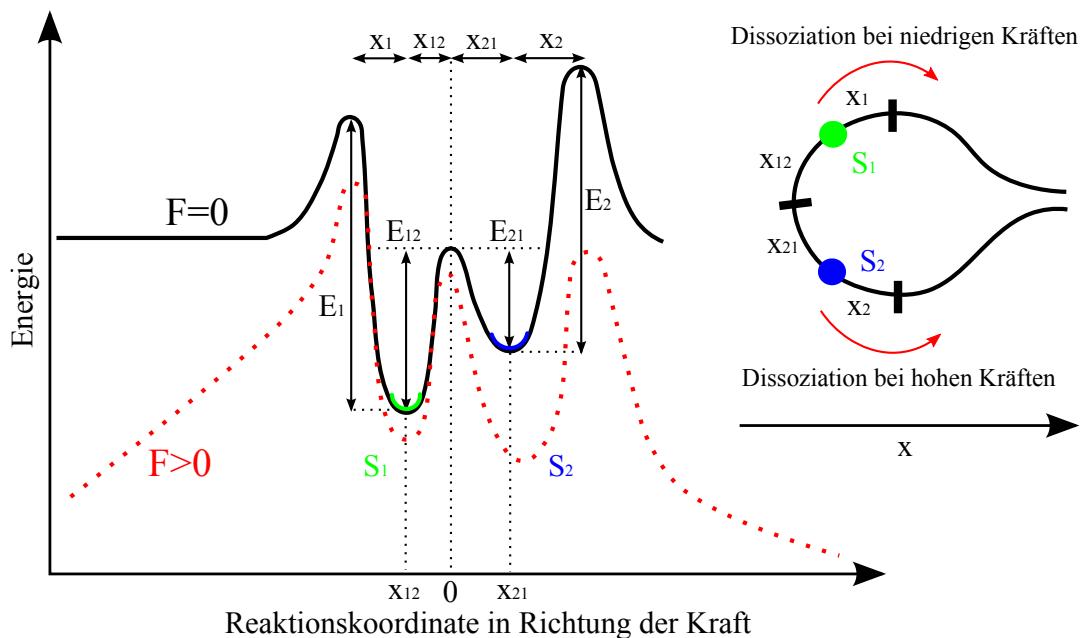


Abb. 5.15: Modellierte Potentiallandschaft für die Interaktion von HD mit 6-O-Sulfat enthaltenden GAG mit zwei Potentialmulden, in denen sich die Zustände S_1 und S_2 jeweils ansiedeln können. Bei Kraft $F = 0$ ist der Zustand S_1 bevorzugt. Ab einer gewissen Schwellkraft liegt das System nur im Zustand S_2 vor. Die Zerfälle beider Zustände entsprechen zwei verschiedenen Slip Bond Dissoziationen. Der Übergang zwischen den beiden Slip Bond Dissoziationen bewirkt eine Änderung der Konformation des Komplexes und damit das *Catch Bond* Verhalten. Rechts ist eine vereinfachte Darstellung der beiden möglichen Zerfallspfade bei niedrigen Kräften für S_1 über x_1 und bei hohen Kräften für S_2 über x_2 gezeigt.

indem es die jeweilige Potentialbarriere überwindet. Dabei wird angenommen, dass die beiden Bindungszustände S_1 und S_2 jeweils verschiedenen Konformationen der HD entsprechen. Zudem findet die konformationelle Relaxation von Proteinen sehr viel schneller statt als ein einzelner *Force Clamp* Zyklus und liegt im Bereich von $t \approx 10^{-6} - 10^{-3}$ s [306–308]. Das gilt auch für die HD. Deshalb werden die Möglichkeiten für Dissoziationen höherer Ordnung wie zum Beispiel S_1 über x_{12} und x_2 oder aus Übergangszuständen vernachlässigt. Somit befindet sich das System HD/GAG zu jedem Zeitpunkt des Experiments im thermodynamischen Gleichgewicht und der Pfad der Dissoziation ist nur von der Besetzungswahrscheinlichkeit der Zustände S_1 und S_2 abhängig. Beschrieben wird dies mit der kraftabhängigen Zustandssumme für die beiden Zustände:

$$Z(F) = \exp \left\{ \frac{E_{12} - Fx_{12}}{k_B T} \right\} + \exp \left\{ \frac{E_{21} - Fx_{21}}{k_B T} \right\}. \quad (5.4)$$

Daraus folgt für die kraftabhängigen Besetzungswahrscheinlichkeiten p_1 und p_2 :

$$p_1(F) = \frac{1}{Z} \exp \left\{ \frac{E_{12} - Fx_{12}}{k_B T} \right\} \quad (5.5)$$

$$p_2(F) = \frac{1}{Z} \exp \left\{ \frac{E_{21} - Fx_{21}}{k_B T} \right\}. \quad (5.6)$$

Die Gleichungen 5.5 und 5.6 lassen sich vereinfachen zu:

$$\begin{aligned} \frac{1}{p_1(F)} &= \frac{\exp \left\{ \frac{E_{12} - Fx_{12}}{k_B T} \right\} + \exp \left\{ \frac{E_{21} - Fx_{21}}{k_B T} \right\}}{\exp \left\{ \frac{E_{12} - Fx_{12}}{k_B T} \right\}} \\ &= \frac{\exp \left\{ \frac{E_{12} - Fx_{12}}{k_B T} \right\}}{\exp \left\{ \frac{E_{12} - Fx_{12}}{k_B T} \right\} + \exp \left\{ \frac{E_{21} - Fx_{21}}{k_B T} \right\}} \\ &= 1 + \exp \left\{ \frac{E_{21} - Fx_{21} - E_{12} + Fx_{12}}{k_B T} \right\}. \end{aligned}$$

Mit $\Delta E = E_{21} - E_{12}$ der Energiedifferenz zwischen den beiden Zuständen und $\Delta x = x_{21} - x_{12}$ der Übergangslänge ergibt sich für $p_1(F)$:

$$p_1(F) = \frac{1}{1 + \exp \left\{ \frac{\Delta E - F\Delta x}{k_B T} \right\}}.$$

Analog gilt für $p_2(F)$:

$$p_2(F) = \frac{1}{1 + \exp \left\{ \frac{-\Delta E + F \Delta x}{k_B T} \right\}}.$$

Damit lässt sich die kraftabhängige Dissoziationsrate $k_{off}(F)$ des Komplexes mit geeigneten Parametern E_{12} , E_{21} , x_{12} und x_{21} bestimmen:

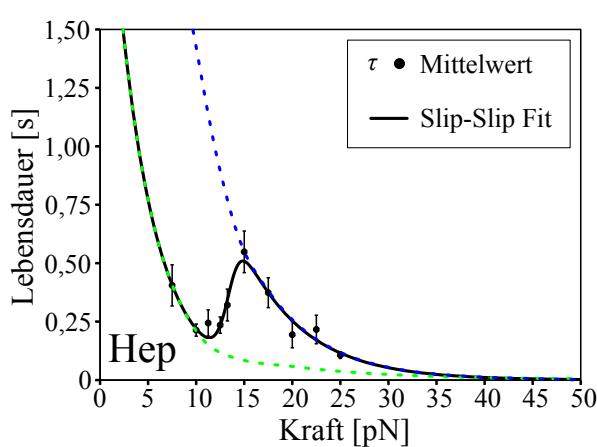
$$k_{off}(F) = p_1(F) \cdot k_1^0 \cdot \exp \left\{ \frac{Fx_1}{k_B T} \right\} + p_2(F) \cdot k_2^0 \cdot \exp \left\{ \frac{Fx_2}{k_B T} \right\}, \quad (5.7)$$

wobei k_1^0 und k_2^0 die thermischen Off-Ratenkonstanten und x_1 und x_2 die molekularen Bindungslängen des jeweiligen Zerfallspfades sind (Abb. 5.15). Der Zustand, aus dem das System dissoziiert, ist ausschließlich von der Energiedifferenz ΔE zwischen den beiden Zuständen S_1 und S_2 abhängig.

Mit dem vorgestellten Modell können unsere *Force Clamp* Datensätze für Hep und HS+6S sehr gut angepasst werden und damit auch die Wechselwirkung zwischen HD und GAG mathematisch beschrieben werden (Abb. 5.16 und 5.17 schwarze Kurve). Dabei werden die Zerfälle der jeweiligen Zustände S_1 und S_2 , aufgrund der andersartigen Konformation der beiden Zustände, als zwei verschiedene *Slip Bond* Dissoziationsbehandlungen betrachtet. Die beiden *Slip Bond* Dissoziationsbehandlungen sind jeweils in den Abb. 5.16 für Hep und in Abb. 5.17 für HS+6S mit einer gestrichelten Linie angedeutet. Grün repräsentiert den niedrigen Kräfte-Bereich und blau den Bereich für hohe Kräfte. Das bedeutet für unseren Fall, dass das beobachtete *Catch Bond* Verhalten in einem mittleren Kräfte-Intervall vermutlich durch die Änderung der Konformation des Komplexes zustande kommt. Dieser Konformationswechsel wird hier als *Slip-Slip* Übergang bezeichnet. Dadurch wird eine Stabilisierung respektive Straffung der Bindung bewirkt, die sich in einer längeren Lebensdauer τ widerspiegelt. Das *Catch Bond* Verhalten verschwindet bei höheren Zugkräften, da die Besetzungswahrscheinlichkeit des Zustands S_1 gegen 0 geht und damit die Koexistenz nicht mehr gegeben ist. Das System verhält sich danach wie ein klassischer *Slip Bond*. Die erhaltenen Werte ΔE und Δx für den *Slip-Slip* Übergang sowie die jeweiligen Off-Ratenkonstanten k_1^0 und k_2^0 und die molekularen Bindungslängen x_1 und x_2 aus der Anpassung sind jeweils in Abb. 5.16 für Hep und in Abb. 5.17 für HS+6S auf der rechten Seite aufgelistet. Deren Vergleich und die mögliche Bedeutung für die Interaktion zwischen HD und diesen GAG wird im Abschn. 5.1.6 diskutiert.

Laut diesem Modell müsste die Koexistenz der beiden *Slip Bond* Dissoziationsbehandlungen auch

Heparin



für niedrige Kräfte

$$k_1^0 = 0,362 \text{ 1/s}$$

$$x_1 = 1,04 \text{ nm}$$

für hohe Kräfte

$$k_2^0 = 0,17 \pm 0,19 \text{ 1/s}$$

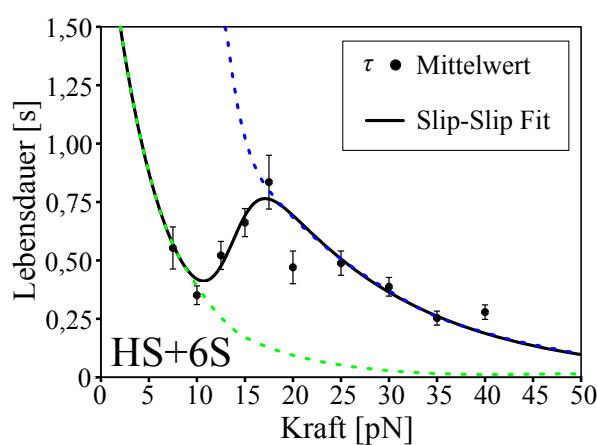
$$x_2 = 0,64 \pm 0,3 \text{ nm}$$

$$\Delta E = 48,82 \pm 23,93 \text{ kJ/mol}$$

$$\Delta x = 6,62 \pm 2,6 \text{ nm}$$

Abb. 5.16: Anpassung der Mittelwerte für die Lebensdauer τ der Force Clamp Daten aus Tab. 5.1 für Hep mit dem Two-State Two-Path Modell (Slip-Slip Fit). Die beiden Slip Bond Dissoziationen der verschiedenen Konformationen des Systems sind mit gestrichelten Linien angedeutet. Grün repräsentiert den niedrigen Kräfte-Bereich und blau den Bereich für hohe Kräfte. Rechts sind die ermittelten Werte aus der Anpassung der Daten für Hep aufgelistet.

Natives Heparansulfat



für niedrige Kräfte

$$k_1^0 = 0,462 \text{ 1/s}$$

$$x_1 = 0,74 \text{ nm}$$

für hohe Kräfte

$$k_2^0 = 0,378 \pm 0,14 \text{ 1/s}$$

$$x_2 = 0,269 \pm 0,06 \text{ nm}$$

$$\Delta E = 21,92 \pm 15,22 \text{ kJ/mol}$$

$$\Delta x = 3,127 \pm 1,8 \text{ nm}$$

Abb. 5.17: Anpassung der Mittelwerte für die Lebensdauer τ der Force Clamp Daten aus Tab. 5.2 für HS+6S mit dem Two-State Two-Path Modell (Slip-Slip Fit). Die beiden Slip Bond Dissoziationen der verschiedenen Konformationen des Systems sind mit gestrichelten Linien angedeutet. Grün repräsentiert den niedrigen Kräfte-Bereich und blau den Bereich für hohe Kräfte. Rechts sind die ermittelten Werte aus der Anpassung der Daten für HS+6S aufgelistet.

in den Experimenten mit konstanten Ziehgeschwindigkeiten auftreten. Dabei sollten die Verteilungen der Dissoziationskräfte zwei Populationen zeigen. Das ist jedoch in vorangegangenen Messungen der dynamischen Kraftspektroskopie nicht beobachtet worden (Abb. 5.6). Die Ursache dafür könnten möglicherweise die verwendeten Belastungsraten sein, die im Vergleich mit dem Kräfte-Intervall aus den *Force Clamp* Messungen für den *Catch Bond* Bereich relativ hoch sind. Deshalb wird im Folgenden die Abhängigkeit der Besetzungswahrscheinlichkeit der beiden Zustände S_1 und S_2 von der Ziehgeschwindigkeit beziehungsweise der Belastungsrate genauer untersucht.

5.1.5 Messungen bei niedrigen Belastungsraten für HD mit Heparansulfat

Um einen Überblick zu erhalten, werden zunächst mit den erhaltenen *Force Clamp* Daten für HS+6S (Abb. 5.17) die möglichen Verteilungen der Dissoziationskräfte für die dynamische Kraftspektroskopie simuliert. Dazu wird entsprechend dem Kramers-Bell-Evans Modell aus Abschn. 2.3.2 die Gleichung 5.7 in Gleichung 2.32 eingesetzt:

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

und diese Differentialgleichung für Belastungsraten im Intervall von $10 - 10^5$ pN/s gelöst. Analog zu den Experimenten mit konstanten Kräften entspricht die Simulation für Experimente mit konstanten Geschwindigkeiten der Vorhersage des *Two-State Two-Path* Modells. In Abb. 5.19 sind die simulierten Daten der Kraft halblogarithmisch gegen die Belastungsraten aufgetragen worden. Dabei repräsentieren die mit Graustufen unterlegten Bereiche die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Kraft und der Belastungsrate aus der Simulation. Es sind deutlich zwei verschiedene Bereiche mit unterschiedlichen Steigungen zu erkennen, die zwei verschiedenen *Slip Bond* Dissoziationen entsprechen. Dabei findet eine Dissoziation bei sehr niedrigen Belastungsraten statt und die andere bei hohen Belastungsraten. Es gibt aber auch einen Übergangsbereich, in dem die Zustände S_1 und S_2 koexistieren und jeweils mit charakteristischen molekularen Bindungskräften zerfallen. Diese Superposition der beiden Zustände im Übergangsbereich schlägt sich auf die Verteilungen der Dissoziationskräfte nieder, indem wie vermutet zwei Populationen in den Verteilungen beobachtet werden können.

In den vorangegangenen Experimenten mit konstanten Ziehgeschwindigkeiten ist dieses

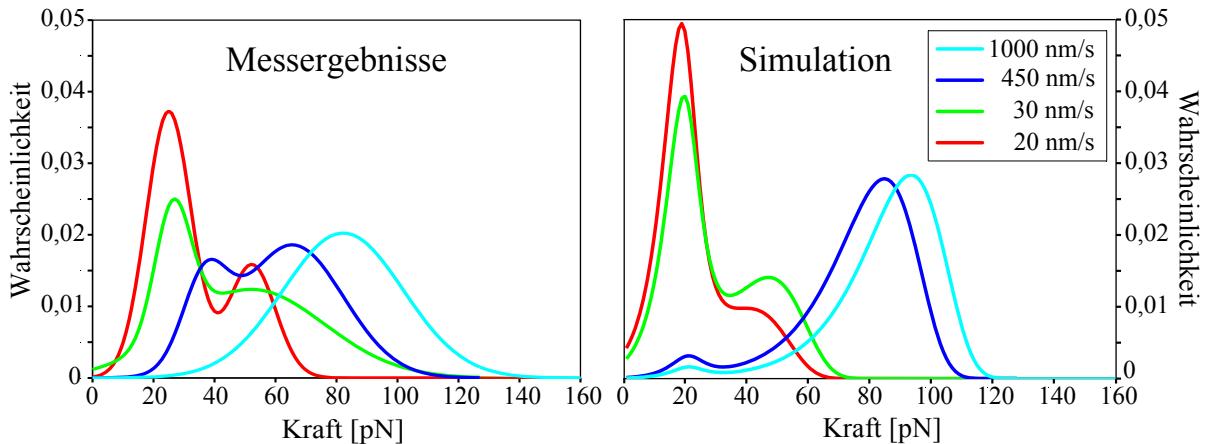


Abb. 5.18: Verteilungen von Dissoziationskräften der Interaktion zwischen HD und HS+6S für vier repräsentative Ziehgeschwindigkeiten links aus der experimentellen Messung und rechts aus der Simulation mit den Force Clamp Daten. Beide Verteilungen zeigen große Ähnlichkeit und die Koexistenz zweier Zustände bei Ziehgeschwindigkeiten zwischen 20 – 450 nm/s.

Phänomen nicht beobachtet worden. Da zum einen die Belastungsraten relativ hoch gewesen sind und zum anderen die Bindungswahrscheinlichkeit für niedrige Ziehgeschwindigkeiten relativ klein, ist diese Koexistenz der Zustände S_1 und S_2 verborgen geblieben. Dennoch stimmt der Wert der Off-Ratenkonstante für die hohen Belastungsraten $k_2^0 = 0,37 \pm 0,14 \text{ 1/s}$ aus der Simulation mit dem von uns $k_{off}^0 = 0,11 \pm 0,23 \text{ 1/s}$ vorher gemessenen und kürzlich publizierten Wert gut überein [287].

Aufgrund dieser Erkenntnisse werden unsere vorangegangenen Experimente auf niedrigere Ziehgeschwindigkeiten ausgeweitet und der Bereich zwischen 20 – 450 nm/s genauer untersucht[¶]. Tatsächlich zeigt sich auch experimentell die Koexistenz der zwei Zustände. In Abb. 5.18 sind vier repräsentative Ziehgeschwindigkeiten aus den Messungen links und der Simulation rechts dargestellt. Bei den Ziehgeschwindigkeiten 20 nm/s (rot), 30 nm/s (grün) und 450 nm/s (blau) ist die Koexistenz der beiden Zustände deutlich bei beiden Verteilungen erkennbar. Bei 1000 nm/s (cyan) ist im Experiment nur noch eine Population zu erkennen, wohingegen bei der Simulation die Koexistenz noch schwach angedeutet ist, aber langsam verschwindet.

In Abb. 5.19 ist die Simulation mit der realen Messung in einer halblogarithmischen Auftragung der wahrscheinlichsten Dissoziationskräfte F_{max} für den jeweiligen Zustand

[¶]Diese Messungen sind von Ann-Kristin Möller im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführt worden [309].

5 Ergebnisse und Diskussion

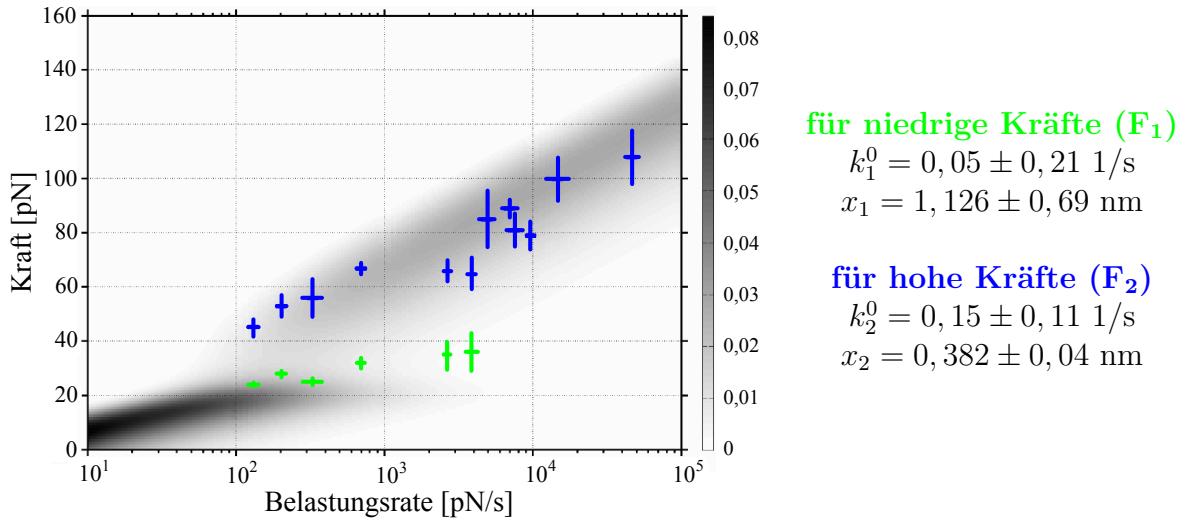


Abb. 5.19: Halblogarithmische Auftragung der wahrscheinlichsten Dissoziationskräfte F_{max} für den jeweiligen Zustand S_1 in grün und S_2 in blau gegen die jeweiligen Belastungsraten r . Die in Graustufen unterlegten Bereiche zeigen die Schar der Simulation. Bei beiden Datensätzen sind eindeutig zwei separate Steigungen zu erkennen. Auf der rechten Seite sind die berechneten Werte nach Kramers-Bell-Evans für die Zerfälle der Zustände S_1 und S_2 dargestellt.

v [nm/s]	r [pN/s]	F_1 [pN]	F_2 [pN]
20	130 ± 12	$24 \pm 0,4$	45 ± 3
30	201 ± 15	28 ± 1	53 ± 4
50	325 ± 50	25 ± 1	56 ± 7
100	690 ± 50	32 ± 2	67 ± 2
300	2610 ± 150	35 ± 5	66 ± 4
450	3825 ± 225	36 ± 7	65 ± 6
600	4920 ± 600	—	85 ± 10
700	9520 ± 700	—	79 ± 5
900	9630 ± 900	—	89 ± 3
1000	7500 ± 1000	—	81 ± 6
1300	14690 ± 2600	—	100 ± 8
5000	46500 ± 5000	—	108 ± 10

Tab. 5.5: Auflistung der Messwerte aus den Experimenten mit konstanten Ziehgeschwindigkeiten für die Interaktion von der MBP-HD mit HS+6S. In diesem Fall wird unsere frühere Messung (Abb. 5.6) an HS+6S auf langsame Ziehgeschwindigkeiten ausgeweitet. Die Kräfte F_1 und F_2 repräsentieren die charakteristischen Dissoziationskräfte der jeweiligen Zerfälle aus den Zuständen S_1 und S_2 .

S_1 und S_2 gegen die jeweiligen Belastungsraten r übereinander gelegt worden. Dabei stellen die grünen Kreuze den Zerfall des Zustands S_1 und die blauen des Zustands S_2 dar. Die simulierten Daten decken sich ganz gut mit den Messdaten. Bei Belastungsraten im Bereich zwischen $10^2 - 10^4$ pN/s ist die Koexistenz der beiden Zustände S_1 und S_2 deutlich erkennbar. Analog zu den *Force Clamp* Daten werden die Zerfälle der beiden Zustände auch bei der dynamischen Kraftspektroskopie separat nach Kramers-Bell-Evans behandelt. Deshalb werden die beiden *Slip Bond* Dissoziationen jeweils mit Gleichung 2.36:

$$F_{max} = \frac{k_B T}{x_i} \ln \frac{x_i r}{k_i^0 k_B T}.$$

angepasst. Dabei repräsentiert der Index $i = 1, 2$ den jeweiligen Zustand S_i . Nun kann die jeweilige thermische Off-Ratenkonstante k_i^0 und die molekulare Bindungslänge x_i mit Gleichung 5.2:

$$k_i^0 = \frac{1}{k_B T} x_i r_0$$

analog zum Abschn. 5.1.2 berechnet werden. Es haben sich für den Zerfall des Zustands S_1 folgende Werte für $k_1^0 = 0,05 \pm 0,21$ 1/s und $x_1 = 1,126 \pm 0,69$ nm ergeben. Der Zustand S_2 hat die Werte für $k_2^0 = 0,15 \pm 0,11$ 1/s und $x_2 = 0,382 \pm 0,04$ nm. Auch die experimentellen Werte für hohe Belastungsraten (Zerfall des Zustands S_2) haben eine gute Übereinstimmung mit unserer früheren Messung an HS+6S mit $k_{off}^0 = 0,11 \pm 0,23$ 1/s und $x_\beta = 0,25 \pm 0,06$ nm (Abb. 5.10).

Dieses Experiment zeigt, dass bei Untersuchungen von vermeintlichen *Catch Bond* Systemen mit dynamischer Kraftspektroskopie ein genaues Augenmerk auf die niedrigen Belastungsraten gelegt werden muss, da sonst nur der Zerfall des Zustands S_2 beobachtet werden kann. Andererseits könnte die Koexistenz der beiden Zustände bei moderaten Ziehgeschwindigkeiten, wie in unserem Fall < 500 nm/s, die Werte der thermischen Off-Ratenkonstante und der molekularen Bindungslänge verfälschen.

5.1.6 Interpretation der Wechselwirkung zwischen HD und Heparansulfat

Die präsentierten Experimente der dynamischen Kraftspektroskopie (Abschn. 5.1.2 und 5.1.5) und ebenfalls die Resultate aus den *Force Clamp* Messungen (Abschn. 5.1.3) zei-

gen alle eindeutig, dass die 6-*O*-Sulfatierung essentiell für eine spezifische Erkennung der Wechselwirkung zwischen der HD aus Sulf1 und den GAG ist. Darüber hinaus ist das *Catch Bond* Verhalten nur bei GAG mit 6-*O*-Sulfatierung beobachtet worden (Abb. 5.14). Diese Erkenntnisse und die hervorragende Übereinstimmung der Datensätze mit dem vorgestellten *Two-State Two-Path* Modell deuten auf einen allosterischen Charakter dieser Wechselwirkung hin. Dabei fungieren die 6-*O*-Sulfate anscheinend als allosterische Effektoren beim konformationellen Übergang zwischen den Zuständen S_1 und S_2 . Dieser *Slip-Slip* Übergang bewirkt eine Festigung der Bindung zwischen HD/GAG und verlängert damit die Lebensdauer τ des Komplexes während eines gewissen Kräfte-Intervalls ($\approx 10 - 18$ pN).

Heparansulfat bindet effizienter als Heparin an HD

Die Beobachtungen sowohl aus den Experimenten mit konstanten Ziehgeschwindigkeiten als auch mit konstanten Kräften zeigen, dass 6-*O*-Sulfate zwar essenziell für die spezifische Erkennung und die Art der Bindung sind, aber ihre besondere Anordnung in S-Domänen macht die Wechselwirkung zwischen HD und GAG effizienter.

Beim direkten Vergleich der Wechselwirkungen von Hep mit HD und HS+6S mit HD ist bei beiden kraftspektroskopischen Methoden eine höhere Affinität von Hep als von HS+6S zu HD festgestellt worden. Die dynamische Kraftspektroskopie liefert folgende Werte für niedrige Kräfte (Zustand S_1):

- **Heparansulfat:** $k_1^0 = 0,05 \pm 0,21$ 1/s (Abb. 5.19)

und für hohe Kräfte (Zustand S_2):

- **Heparin:** $k_{off}^0 = 0,04 \pm 0,35$ 1/s (Abb. 5.10)

- **Heparansulfat:** $k_{off}^0 = 0,11 \pm 0,23$ 1/s (Abb. 5.10)

und $k_2^0 = 0,15 \pm 0,11$ 1/s. (Abb. 5.19)

Dabei ist auffällig, dass die thermische Off-Ratenkonstante für HS+6S bei niedrigen Kräften zu der für Hep bei hohen Kräften sehr ähnlich ist. Hier ist bei Hep vermutlich eine Überlagerung der beiden *Slip Bond* Dissoziationen detektiert worden, da bei früheren Messungen die Zustände nicht separat betrachtet worden sind.

Auch bei den *Force Clamp* Resultaten zeigt sich die gleiche Tendenz für niedrige Kräfte (Zustand S_1):

- **Heparin:** $k_1^0 = 0,362 \text{ 1/s}$ (Abb. 5.16)

- **Heparansulfat:** $k_1^0 = 0,462 \text{ 1/s}$ (Abb. 5.17)

und für hohe Kräfte (Zustand S_2):

- **Heparin:** $k_2^0 = 0,17 \pm 0,19 \text{ 1/s}$ (Abb. 5.16)

- **Heparansulfat:** $k_2^0 = 0,378 \pm 0,14 \text{ 1/s.}$ (Abb. 5.17)

Bei näherer Betrachtung der Energiedifferenz ΔE und der Übergangslänge Δx zwischen den beiden Zuständen, die notwendig sind für den konformationellen Übergang, zeigt sich das natürliche Substrat der HD, das Heparansulfat und damit die spezielle Anordnung der 6-*O*-Sulfate in S-Domänen als effizienterer Partner. Beim HS+6S (Abb. 5.17) beträgt die Energiedifferenz zwischen Zustand S_1 und S_2 $\Delta E = 36,41 \pm 25,27 \text{ pN} \cdot \text{nm}$ ($\approx 9k_B T$), also um etwa den Faktor zwei kleiner als bei Hep (Abb. 5.16) $\Delta E = 81,08 \pm 39,73 \text{ pN} \cdot \text{nm}$ ($\approx 20k_B T$). Auch die Übergangslängen von HS+6S $\Delta x = 3,127 \pm 1,8 \text{ nm}$ und Hep $\Delta x = 6,62 \pm 2,6 \text{ nm}$ verhalten sich ähnlich. Somit benötigt der Übergang zwischen den Konformationen bei der Interaktion HD/HS+6S die Hälfte der Energie von HD/Hep. Dabei liegt die benötigte Energie für das Überwinden der Potentialbarriere, und damit für die Änderung der Konformation bei der Interaktion HD/HS+6S, im Bereich einer typischen Wasserstoffbrückenbindung [310]. Außerdem belegen diese verhältnismäßig niedrigen Potentialbarrieren ΔE die Annahme, dass das System HD/GAG sich während des Experiments zu jedem Zeitpunkt im thermodynamischen Gleichgewicht befand.

Fundamentale Indizien für Allosterie

Konformationelle Übergänge sind bereits als Grund für das *Catch Bond* Verhalten beim bakteriellen Adhäsin [133], dem Aktin [311] und den Cadherinen [140] identifiziert worden. Im Falle der HD aus Sulf1 liegt noch keine 3D-Struktur des Proteins vor und über allosterische Effekte wurde bislang nicht berichtet. Zudem wirft sich die Frage nach physiologischer Relevanz und Notwendigkeit dieser speziellen Wechselwirkung auf. Die bisher bekannten *Catch Bond* Systeme sind physiologisch molekularen Scherkräften ausgesetzt, wie zum Beispiel der Fluss im Blutkreislauf oder das Anspannen des Muskels. Deshalb ist die Erklärung für das *Catch Bond* Verhalten bei diesen Systemen naheliegend. Die Moleküle müssen sich fixieren, da diese sonst ihre Funktionen nicht ausüben

5 Ergebnisse und Diskussion

könnten. Die Sulf1 ist aber ein Enzym und eine Beeinflussung durch Scherkräfte ist in physiologischer Umgebung bisher nicht bekannt. Somit wird das *Catch Bond* Verhalten vermutlich auf enzymatischer Ebene generiert und wäre damit bisher einzigartig. Kürzlich konnten Seffouh und Kollegen zeigen, dass sowohl die humane Sulf1 als auch die humane Sulf2 richtungsorientiert prozessieren und dadurch die 6-O-Sulfate des Heparansulfats (HS+6S) innerhalb der S-Domänen entfernen, allerdings mit verschiedenen Ratenkonstanten [31]. Dabei hat die HD eine zentrale Rolle bei der Erkennung des Sub-

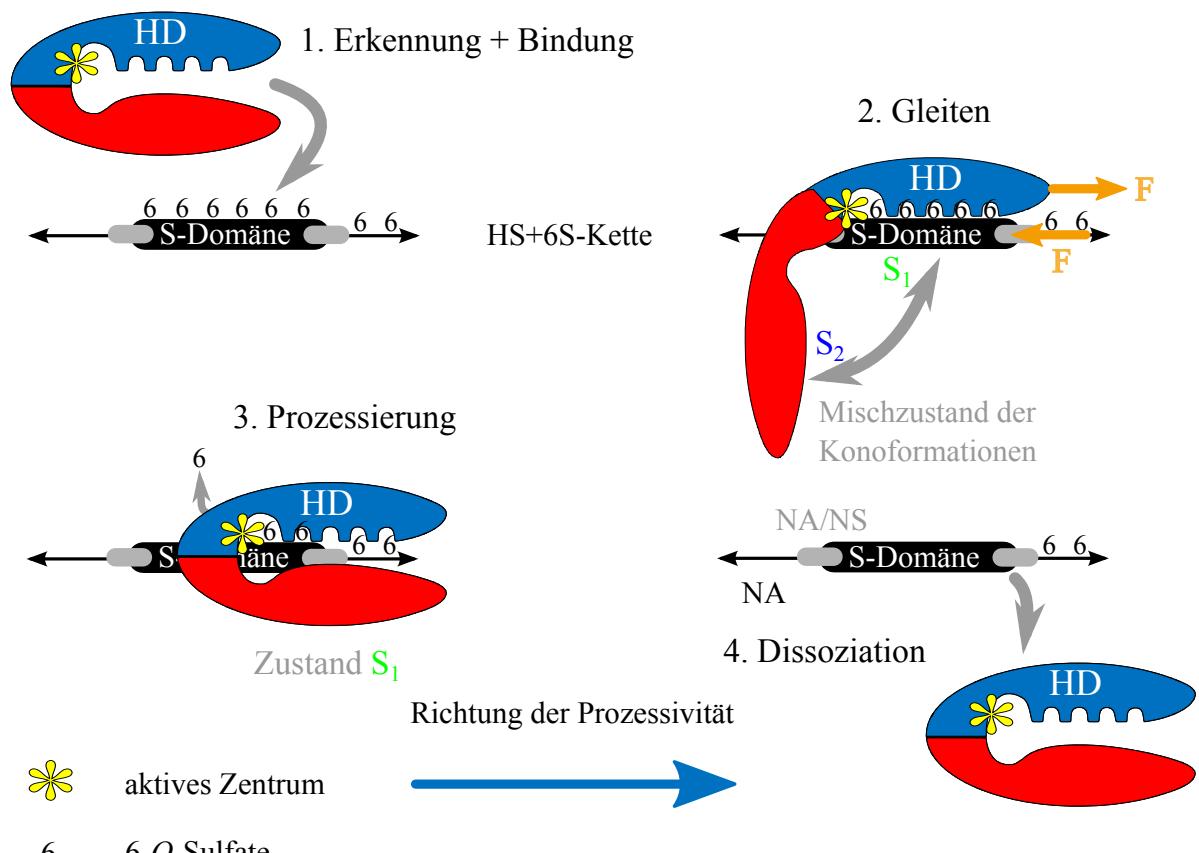


Abb. 5.20: Hypothetisches Modell der Bindung zwischen Sulf1 und HS+6S. Dabei sind die Resultate von Seffouh [31] und die Beobachtungen aus dieser Arbeit kombiniert worden. Die Wechselwirkung der Sulf1 mit einer HS+6S-Kette wird zum größten Teil durch die HD gesteuert. Die HD ist für die Erkennung, die Bindung und für die gerichtete Führung während der Prozessierung verantwortlich. Innerhalb dieser Prozesse findet laut unseren Ergebnissen wahrscheinlich eine wiederkehrende Änderung der Konformation innerhalb der HD statt. Nach erfolgreicher Entfernung aller 6-O-Sulfate innerhalb der jeweiligen S-Domäne dissoziiert die HD und damit das komplette Enzym von der HS+6S-Kette.

strats, der Desulfatierungs-Effizienz und der Prozessivität. Nach Seffouh bindet die HD an die Saccharide mit 6-*O*-Sulfaten auf dem Heparansulfat, sodass das aktive Zentrum des Enzyms dem gegenläufig weitestentfernten 6-*O*-Sulfat zugewendet ist. Somit kann die Ausrichtung des Heparansulfats beziehungsweise der S-Domänen durch die HD für die enzymatische Katalyse beeinflusst werden. Die prozessive Desulfatierung der 6-*O*-Sulfate entlang des Heparansulfats findet dann in Richtung der HD statt, geführt durch die Bindung der HD mit den 6-*O*-sulfatierten Sacchariden auf der gegenläufigen Seite der Kette. Das Erreichen des Endes einer S-Domäne induziert das Lösen der HD und damit der ganzen Sulf von der Heparansulfat-Kette.

Bei diesem Zusammenspiel zwischen Erkennung, Bindung, richtungsorientierter Prozessierung und Dissoziation sind allosterische Effekte nicht nur möglich, sondern vorausgesetzt und notwendig. Dabei ist hier eindeutig gezeigt worden, dass die 6-*O*-Sulfate anscheinend als allosterische Effektoren beim konformationellen Übergang zwischen den Zuständen S_1 und S_2 fungieren. Der mögliche Ablauf dieser hochkomplexen und physiologisch sehr essentiellen Interaktion zwischen den Sulfen und dem Heparansulfat ist in Abb. 5.20 gezeigt. Dabei ist die HD für die Erkennung und die Bindung an die HS+6S-Kette verantwortlich. Die HD der ungebundenen Sulf1 erkennt eine S-Domäne auf einer HS+6S-Kette. Diese wird dann durch die HD ausgerichtet und an die Sulf1 gebunden. Nach erfolgreicher Bindung prozessiert die Sulf1 gerichtet und gleitet dabei entlang der HS+6S-Kette innerhalb der S-Domäne bis zum letzten 6-*O*-Sulfat, geführt durch die HD. Sind alle 6-*O*-Sulfate der S-Domäne entfernt, löst sich die HD und damit das komplette Enzym von der HS+6S-Kette. Es wird angenommen, dass die Prozessierung in der Konformation des Zustands S_1 stattfindet. Beim Gleiten befindet sich die HD in einem konformationellen Mischzustand zwischen S_1 und S_2 . Dabei wird der konformationelle Übergang der HD wahrscheinlich durch auftretende Scherkräfte beim Gleiten induziert. Dadurch wird die Bindung zwischen HD/HS+6S abgesichert und eine vorzeitige Dissoziation wird unterbunden → *Catch Bond*. Wird das nächste 6-*O*-Sulfat erreicht, verankert sich die HD und liegt nur im Zustand S_1 vor. Das Enzym kann ungestört das 6-*O*-Sulfat entfernen und gleitet zum nächsten 6-*O*-Sulfat. Das geht so weiter, bis das letzte 6-*O*-Sulfat der S-Domäne entfernt ist und die HD beziehungsweise die Sulf1 sich von der HS+6S-Kette wieder löst.

5.2 Optische Rasternahfeldmikroskopie (aSNOM)

Für die Realisierung einer optischen Auflösung weit unter der Beugungsgrenze an Biomolekülen bis hin zu 17 nm ist in dieser Arbeit ein zum Teil selbst entwickeltes und konstruiertes aperturloses optisches Rasternahfeldmikroskop (engl.: apertureless Scanning Near-Field Optical Microscope, aSNOM) verwendet worden.

Metallische oder mit Metall beschichtete Scansonden liefern in der Regel eine deutlich höhere Fluoreszenz-Emission [312–315], aber die erzeugte Fluoreszenz von einzelnen Farbstoffen mit metallischen Scansonden zeigt häufig ein komplexes Muster auf [100, 316, 317], das nicht einfach interpretiert werden kann. In dieser Arbeit werden als Scansonden kommerziell erhältliche monolithische Silizium AFM-Kraftsensoren (Abschn. 4.2.3) benutzt. Silizium hat zwar eine schwächere Feld-Überhöhung und eine kaum nennenswerte Dipol-Dipol-Wechselwirkung [39], erzeugt jedoch eine lokale punktuelle Fluoreszenz ohne komplexe Muster (Abb. 5.23). Um ein möglichst hohes Auflösungsvermögen zu erzielen, wird die Regelung der z-Richtung mit einem Lichtzeigersystem (Abschn. 2.1.1) über zwei verschiedene Piezos realisiert sowie eine besondere phasenengekoppelte Detektion des Fluoreszenz-Signals verwendet. Auf diese technischen Finessen wird im Folgenden eingegangen.

5.2.1 Regelung der z-Richtung

Die Anregung und die Detektion der Fluoreszenz erfolgt unterhalb der Probe über ein TIRF[¶] Objektiv mit hoher $NA = 1,49$. Das entstehende und exponentiell abnehmende evaneszente Feld hat eine Eindringtiefe von 100 – 200 nm. Dadurch wird nur ein sehr kleines Volumen beleuchtet, was wiederum zur einer starken Reduzierung der Hintergrundfluoreszenz führt. Jedoch muss der Spalt zwischen Objektiv und Probe mit einer Immersionsflüssigkeit gefüllt werden, um den Brechungsindex anzupassen. Hier wird das Immersionsöl 518 F von Zeiss verwendet. Diese relativ zähe Flüssigkeit koppelt nun das Objektiv über die Probe mit dem 3D Piezo-Nanopositionierer (Scanner). Somit wäre bei dieser Konstellation eine z-Regelung über die Probenhalterung nicht vorteilhaft, da auftretende Oszillationen im Immersionsöl zu störenden Abbildungs-Artefakten führen würden. Dieses Problem ist mit einer Quasi-Entkopplung der z-Regelung durch Verwen-

[¶]TIRF Mikroskopie wurde von Ambrose 1956 eingeführt [318] und hat sich über Jahre zu einer mächtigen Methode entwickelt [40, 41].

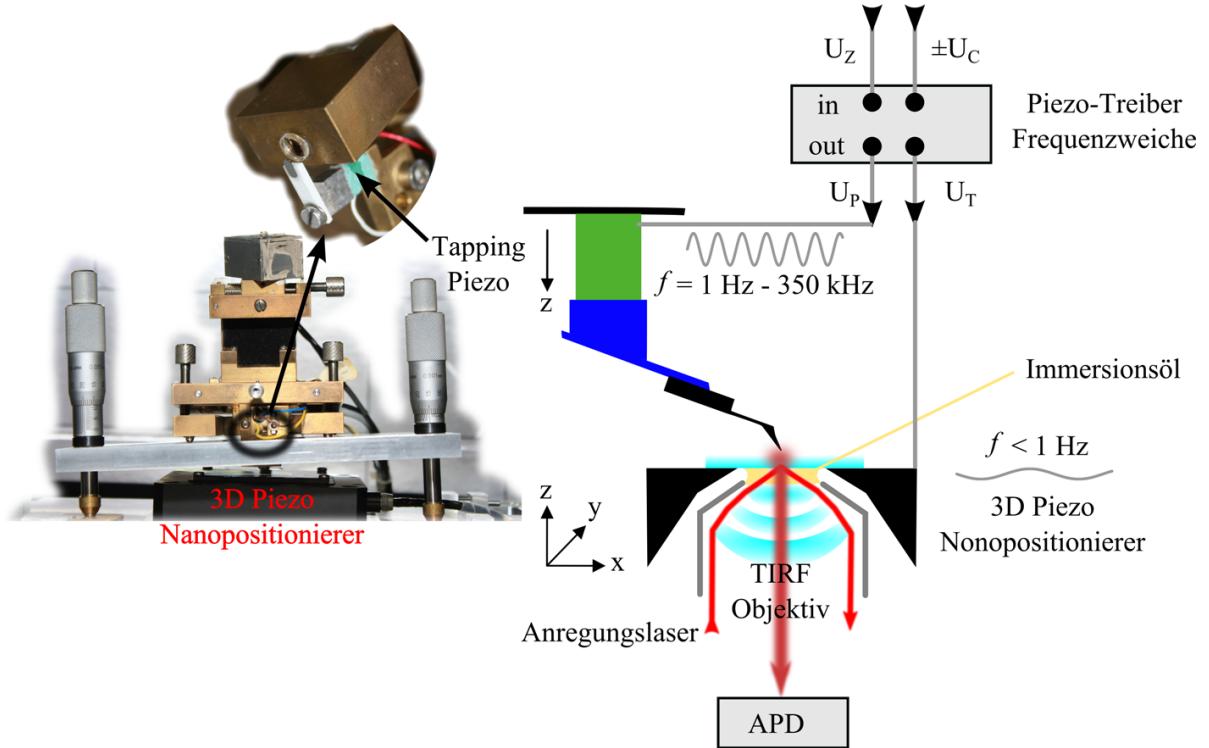


Abb. 5.21: Auf der linken Seite ist ein Foto von dem 3D Piezo-Nanopositionierer und dem AFM-Kopf samt dem Tapping-Piezo gezeigt. Rechts ist eine Schematische Darstellung des Zusammenspiels der beiden Piezos bei der Abstandsregelung zwischen Scansonde und Probe in z-Richtung abgebildet.

dung eines zweiten Piezos in der z-Richtung gelöst worden (Abb. 5.21). Ein zweiter Piezo (Tapping-Piezo) ist ohnehin für die mechanische Anregung der Scansonde erforderlich gewesen, da alle Aufnahmen in dem AM-AFM Modus (Abschn. 2.1.2) durchgeführt worden sind. Somit ist die günstigste Realisierung eine Frequenzen-Trennung durch einen Tiefpassfilter, wobei alle Frequenzen $> 1 \text{ Hz}$ auf den Tapping-Piezo von Piezomechanik geführt werden und die tiefen Frequenzen auf die z-Richtung des Scanners von Physik Instrumente, auf dem die Probe befestigt ist. Im Detail:

$$U_P = G \cdot (U_Z - U_T) \pm U_C + 75V. \quad (5.8)$$

Dabei repräsentiert U_Z das Gesamt-Signal für die z-Position und kann Werte von 0 – 10 V annehmen. U_T ist das tiefpassgefilterte Signal mit Grenzfrequenz $f \approx 1 \text{ Hz}$ und Spannungen von 0 – 10 V, das auf die z-Richtung des Scanners geht. U_C ist die Anregungs-Spannung des Tapping-Piezos mit Werten von einigen Millivolt bei 100 –

350 kHz. Die Verstärkung G ist von 40 – 60 einstellbar und liefert Spannungen von 0 – 135 V. Somit enthält U_P das Anregungs-Signal der Scansonde und das Regel-Signal mit Frequenzen > 1 Hz. Außerdem wird der Tapping-Piezo mit 75 V vorgespannt. Allgemein kann die Endstufe eine kapazitive Last von 90 nF bei einer Bandbreite größer 10 kHz treiben. Mit dieser Konfiguration wird nun die z-Richtung des 3D Piezo-Nanopositionierers, auf dem die Probe befestigt ist, für die langsamen Bewegungen benutzt, wie das Annähern der Scansonde und der Tapping-Piezo für die schnellen Bewegungen. Somit wird quasi die ganze Abstands-Regelung zwischen Scansonde und Probe mit dem Tapping-Piezo realisiert, wobei Partikel mit bis zu 2 μm Höhe abgescannt werden können. Mit dieser Technik ist eine kostengünstige und stabile Lösung gefunden worden. Die Schaltpläne für den Piezo-Treiber können im Appendix gefunden werden.

5.2.2 Phasengekoppelte Fluoreszenz-Detektion

Die Extraktion des Nahfeld-Signals aus dem detektierten Fluoreszenz-Signal ist beim aSNOM eine Herausforderung, die sehr komplex und kostenintensiv sein kann. Beispiele dafür sind interferometrische Techniken [89–91] oder die Ausnutzung der materialabhängigen Phonon-Polariton Resonanz [92, 93]. Bei dem hier verwendeten aSNOM-Gerät ist die so genannte phasengekoppelte Fluoreszenz-Detektion benutzt worden [39, 319]. Bei diesem Verfahren wird die Detektion des Fluoreszenz-Signals und die Laserbeleuchtung mit der Oszillation der Scansonde synchronisiert (AM-AFM Modus, Abschn. 2.1.2). Es werden in jedem Schwingungszyklus jeweils an dem Umkehrpunkt zwei Fluoreszenz-Signale aufgenommen (Abb. 5.22 a)), wenn sich die Scansonde in unmittelbarer Nähe der Probenoberfläche befindet (Nahfeld) und am weitesten davon entfernt (Fernfeld). Die Amplitude der Schwingung beträgt ca. 100 nm und wird konstant gehalten. Die Detektion erfolgt jeweils über ein Phasenfenster von 20 – 40° der Schwingung und kann individuell angepasst werden. Die Schaltvorgänge von Detektor und Laserbeleuchtung sind ebenfalls einstellbar. Eine Übersicht über die Schaltpläne für den Dioden-Treiber kann im Appendix gefunden werden.

Das erhaltene Nahfeld-Signal ist jedoch noch durch ein beugungsbegrenztes parasitäres Fernfeld-Signal überlagert, weil das charakteristische fokale Volumen einen Radius von ≈ 300 nm hat. Die Verstärkung der Fluoreszenz-Emission wird allerdings nur durch die Feld-Überhöhung (Abschn. 2.1.5) an dem Apex der Scansonde hervorgerufen bei Abständen ≈ 10 nm von Farbstoff und Scansonde. Hier kommt nun das zusätzlich auf-

genommene Fernfeld-Signal ins Spiel. Es wird von dem Nahfeld-Signal subtrahiert, des Weiteren werden diese Daten noch mit einem Tiefpass linienweise gefiltert. Somit entsteht ein korrigiertes Nahfeld-Signal mit deutlich reduzierten Fernfeld-Störungen und Rauschartefakten. Nun kann das korrigierte Nahfeld-Signal ohne weitere Anpassungen mit der Topografie überlagert werden. Beide Datensätze sind von vornherein deckungsgleich, da die Scansonde beim aSNOM gleichzeitig als Abtaster der Topografie und als optische Nano-Antenne des Nahfeld-Signals fungiert. In Abb. 5.23 ist das korrigierte

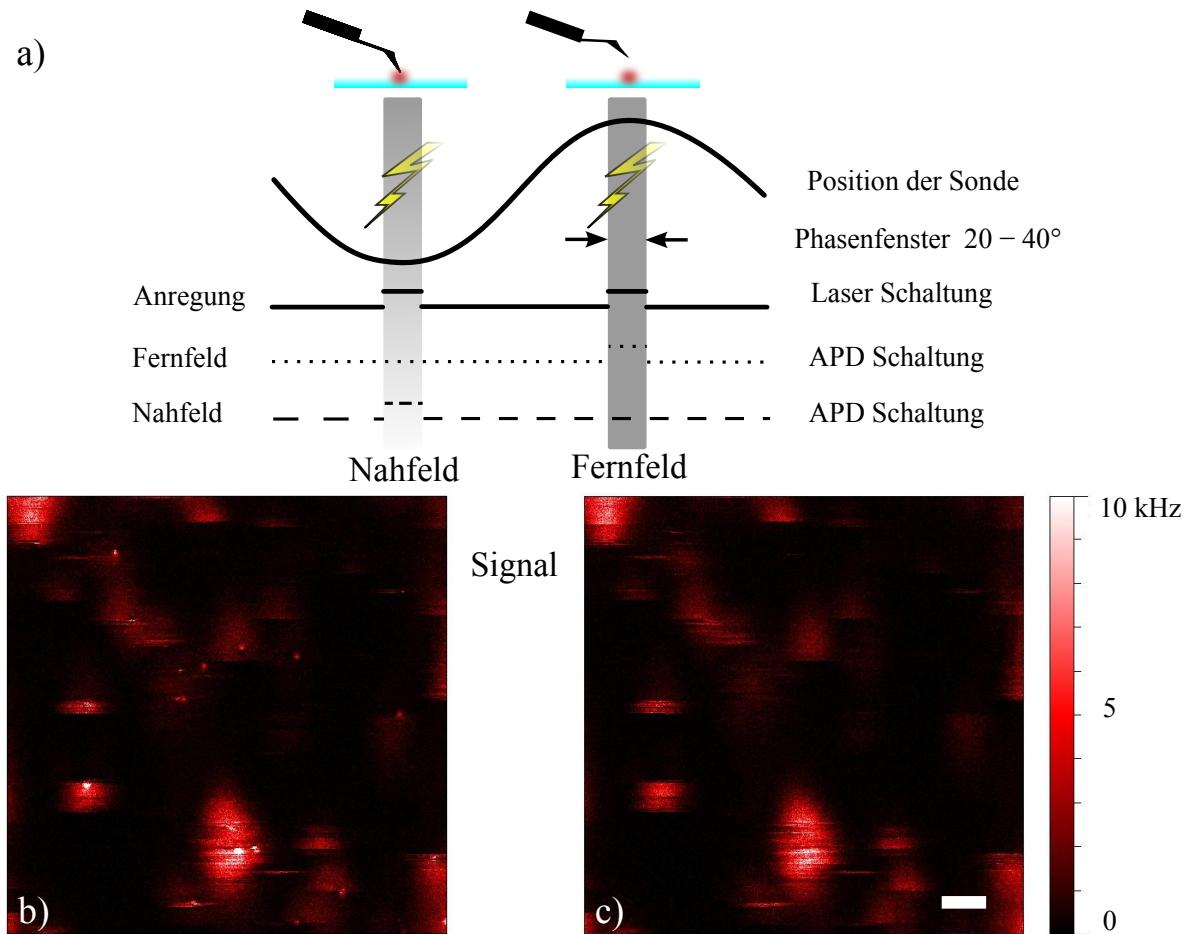


Abb. 5.22: a) Schematische Darstellung der phasengekoppelten Fluoreszenz-Detektion. Die Anregung und die Detektion erfolgen zweimal pro Schwingungszyklus in einem Phasenfenster von $20 - 40^\circ$ und sind abhängig von der Position der Scansonde. Dabei entstehen zwei Fluoreszenz-Datensätze, einer vom Nahfeld und der andere vom Fernfeld.
b) und c) $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ Scanfläche von fluoreszenz-markiertem Desmin. b) Ungefiltertes Nahfeld-Signal. c) Fernfeld-Signal. Der Skalenbalken repräsentiert 500 nm.

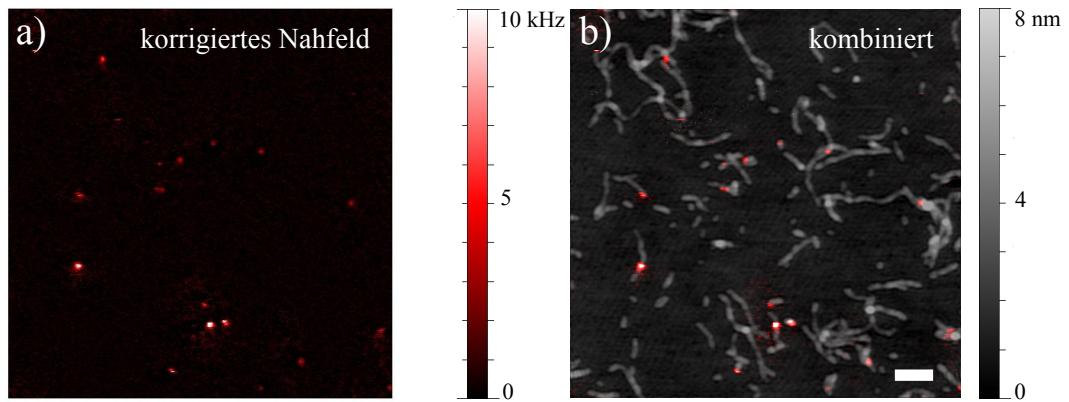


Abb. 5.23: Die aufbereiteten Daten aus Abb. 5.22 der Desmin-Filamente.
a) Korrigiertes Nahfeld nach Subtraktion des Fernfeld-Signals und der Tiefpass-Filterung Linie für Linie.
b) Die Überlagerung der Topografie mit dem korrigierten Nahfeld-Signal. Der Skalenbalken repräsentiert 500 nm.

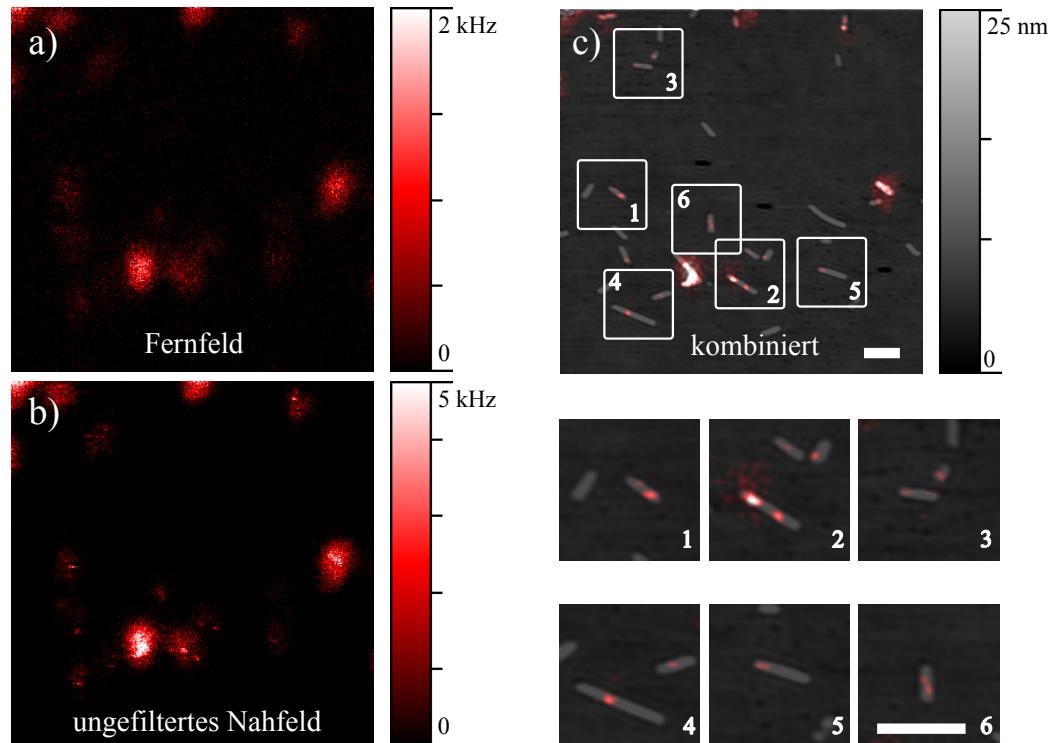


Abb. 5.24: Ein weiteres Beispiel für hochauflösende optische Mikroskopie mittels aSNOM. Hier handelt es sich um einen $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ Scan von fluoreszenz-markiertem TMV.
a) Fernfeld-Signal. b) Ungefiltertes Nahfeld-Signal.
c) Die Kombination beziehungsweise Überlagerung der Topografie mit dem korrigierten Nahfeld-Signal. Die Zoom-Ausschnitte verdeutlichen die Vorteile der phasen gekoppelten Fluoreszenz-Detektion. Der Skalenbalken repräsentiert 500 nm.

Nahfeld-Signal der Fluoreszenz und das kombinierte Fluoreszenz-Topografie-Signal des Intermediärfilaments Desmin (Abschn. 3.3) gezeigt.

Ein weiteres Beispiel für die Leistungsfähigkeit dieser Detektionsmethode ist in Abb 5.24 dargestellt. Hier handelt es sich um das Tabakmosaikvirus (Abschn. 3.4). Das TMV ist als Test- und Modellsystem in dieser Arbeit verwendet worden.

5.2.3 Auflösungsvermögen des aSNOM

Topografische Auflösung

Die erreichbare topografische Auflösung unseres aSNOM ist etwas niedriger verglichen mit kommerziell erhältlichen AFM-Geräten, die insbesondere einen Piezo-Tube-Scanner verwenden. Ein Beispiel ist in Abb. 5.25 gezeigt. Beide AFM-Bilder zeigen das Intermediärfilament Desmin, wobei der Scanbereich $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ beträgt. Bild 5.25 a) ist mit einem Nanoscope IIIa Multimode (Digital Instruments, Santa Barbara, USA) aufgenommen worden. Links oben ist zusätzlich noch ein hochauflösender Zoom-Ausschnitt gezeigt. Abb. 5.25 b) zeigt die gleiche Scanfläche aufgenommen mit dem aSNOM. Es ist deutlich zu sehen, dass das aSNOM die Morphologie des Desmins nicht so gut auf-

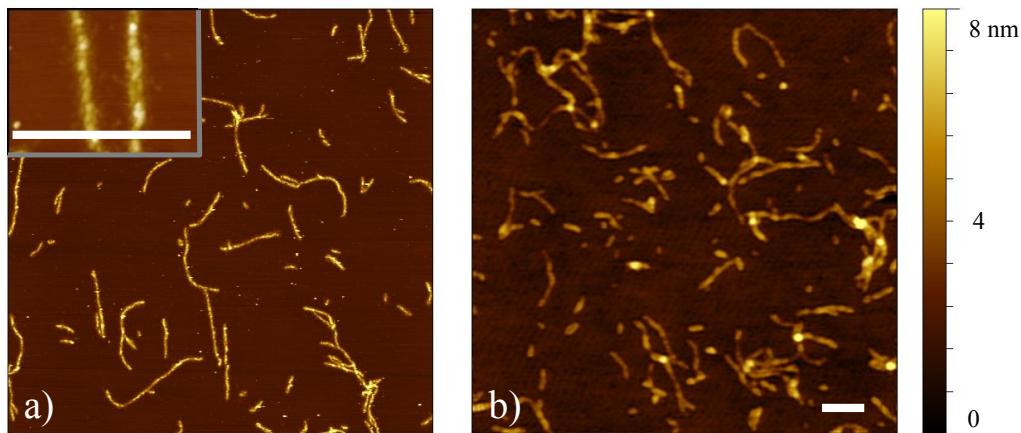


Abb. 5.25: a) Ein $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ AFM-Scan von Desmin, der mit einem Nanoscope IIIa Multimode gemacht worden ist. Links in der Ecke ist zusätzlich ein hochauflösender Zoom-Ausschnitt gezeigt. (AFM-Bild: Mareike Dieding) b) Ein $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ AFM-Scan von Desmin, der mit unserem aSNOM gemacht worden ist. Der Vergleich zeigt, dass beim aSNOM aufgrund des Konzepts Einbußen bei der topografischen Auflösung hingenommen werden müssen. Der Skalenbalken repräsentiert 500 nm.

löst wie das Multimode. Die schlechtere Auflösung ist ein konzeptionelles Problem von AFM-Geräten, bei denen die x-y-Richtung von der z-Richtung des Scanners entkoppelt ist. Außerdem muss die Probe beim aSNOM von unten und oben zugänglich sein, und da hier mit einem TIRF Objektiv gearbeitet wird, müssen als Substrate 0,2 mm dünne Deckgläser verwendet werden. Diese Bedingungen machen das aSNOM und die Probe anfällig für störende Schwingungen, die die Topografie überlagern. Abb. 5.26 zeigt einen Schnitt durch die in Abb. 5.25 gezeigten Datensätze. Im direkten Vergleich erscheinen die Desmin-Filamente beim aSNOM im Durchschnitt 10 nm breiter als beim Multimode. Somit ist die topografische Auflösung ca. 15% niedriger. Fairerweise ist zu erwähnen, dass das Multimode eines der einfachsten und robustesten AFM-Geräte auf dem Markt ist für das Abbilden bei Umgebungsbedingungen.

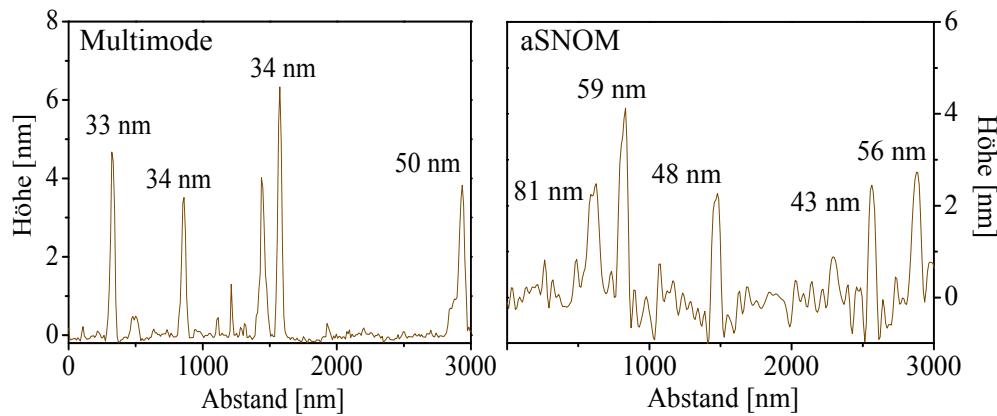


Abb. 5.26: Ein Schnitt gelegt durch einen Topografie-Datensatz von Desmin. Der linke Datensatz ist mit einem Nanoscope IIIa Multimode aufgenommen worden und der rechte mit unserem aSNOM. Bedingt durch das Konzept des aSNOM ergibt sich eine etwas niedrigere topografische Auflösung. Die Abstands-Werte in den Graphen repräsentieren die FWHM-Werte der Peaks.

Optische Auflösung

Die optische Auflösung ist mittels Anpassung der Fluoreszenz-Peaks mit einer Gaußfunktion bestimmt worden, wobei der FWHM-Wert (engl.: Full Width Half Maximum) der Gaußfunktion die Auflösung repräsentiert. Optische Auflösungen bis zu 17 nm sind an Biomolekülen erreicht worden (Abb. 5.27). Die durchschnittliche optische Auflösung des verwendeten aSNOM liegt bei $\Delta x = 24 \pm 1$ nm (Abb. 5.27 c)) bei einem Signal-Rausch-Verhältnis (engl.: Signal to Noise Ratio, SNR) von besser als 10, was sich hervorragend

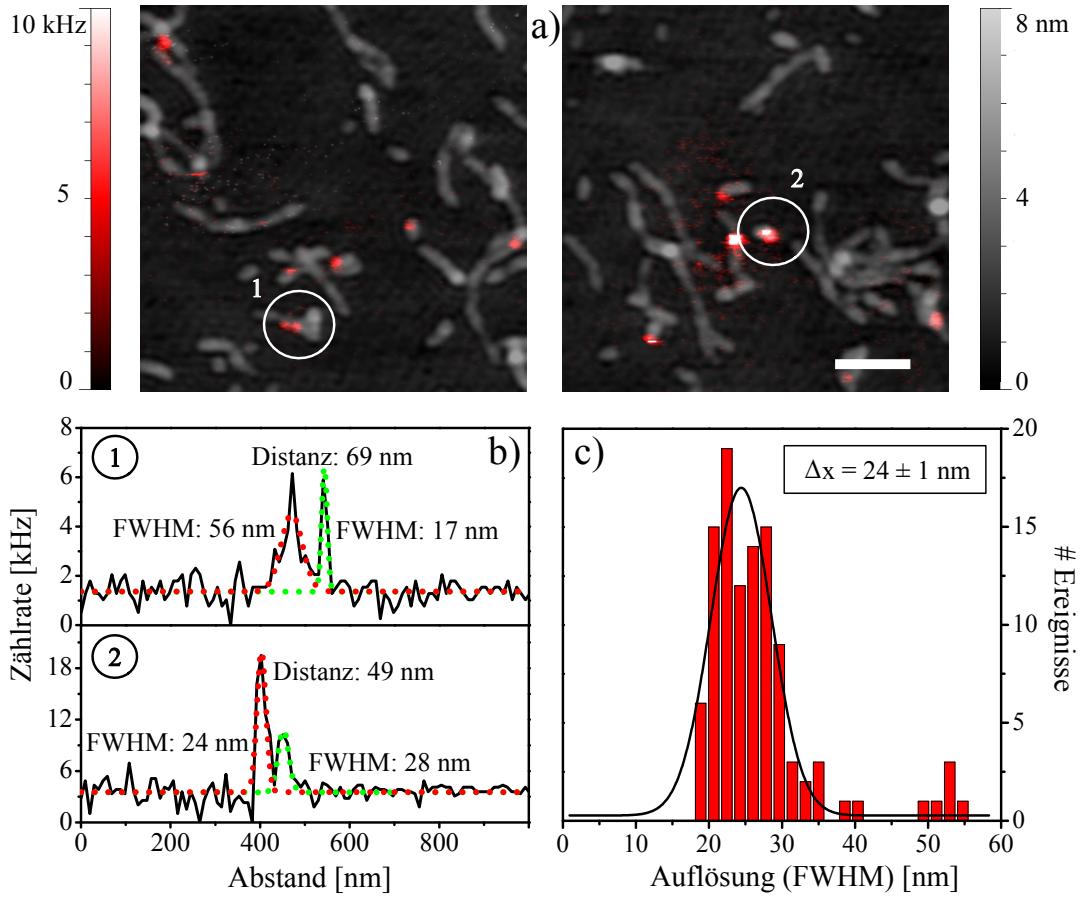


Abb. 5.27: a) Die Kombination der Topografie mit dem korrigierten Nahfeld-Signal des Desmins. Die eingekreisten Bereiche markieren die untersuchten Fluoreszenz-Spots. Der Skalenbalken repräsentiert 500 nm.
 b) Schnitt des Fluoreszenz-Signals der in a) markierten Bereiche: 1 gehört zum linken Bild und 2 zum rechten. Die gefundenen Abstände zwischen zwei benachbarten Fluoreszenz-Spots entsprechen der Länge eines ULF. c) Verteilung der gemessenen FWHM-Werte an Desmin-Daten. Die daraus resultierende optische Auflösung unseres aSNOM beträgt im Durchschnitt $\Delta x = 24 \pm 1 \text{ nm}$.

mit den publizierten Daten aus [320] deckt. In Abb. 5.27 c) ist auffällig, dass einige FWHM-Werte relativ stark von dem Durchschnitt abweichen. Das hängt mit der Orientierung und der Position der Farbstoffe zusammen. Die Farbstoffe können innenliegend oder unter dem Molekül sein und somit für die Scansonde nicht immer erreichbar. Da aber der Abstand zwischen Apex der Scansonde und dem Farbstoff signifikant für die maximale Auflösung ist, erscheint der Fluoreszenz-Peak verbreitet.

Die beschriebenen Fluoreszenzlöschungs-Effekte, die auch durch Scansonden aus Silizium bei sehr kleinen Abständen hervorgerufen werden können [321], sind hier nicht beobachtet worden, vermutlich weil die detektierte Fluoreszenz über ein relativ breites Phasenfenster von $20 - 40^\circ$ aufintegriert wird und das Signal somit nie Null werden kann.

5.2.4 Das aSNOM als Diagnosewerkzeug

Die Leistungsfähigkeit unseres aSNOM ist an zwei verschiedenen biologischen Systemen, dem TMV und Desmin, demonstriert worden. Insbesondere die Experimente mit dem Desmin zeigen das große Potential des aSNOM. Bei der Auswertung der Desmin-Daten sind öfters zwei benachbarte Fluoreszenz-Signale mit Abständen zwischen 50 – 70 nm aufgefallen (Abb. 5.27 a) und b)). Diese Abstände repräsentieren die Länge eines ULF (Unit Length Filaments), die etwa 60 nm beträgt (Abschn. 3.3.1) [261]. Damit ist es prinzipiell möglich gewisse Mutationen des Desmins durch Abstände der Fluoreszenz-Spots zu bestimmen, da einige mutierte Desmin-Monomere anders assemblieren als der Wild-Typ [322–324]. Erwähnenswert ist jedoch, dass die Desmin-Filamente mit benachbarten Fluoreszenz-Spots relativ kurz waren, sodass vermutlich die Fluoreszenz-Markierung die Assemblierung stört. Beispiele dafür sind in Abb. 5.28 gegeben. Dieses Phänomen muss noch näher untersucht werden.

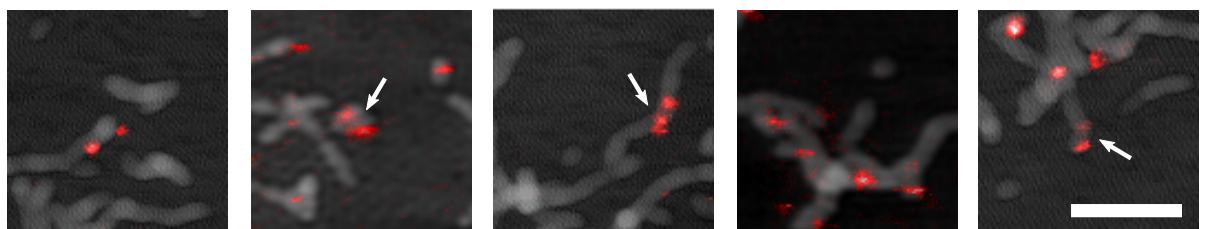


Abb. 5.28: Zoom-Ausschnitte der kombinierten Topografie mit dem korrigierten Nahfeld-Signal des Desmins. Benachbarte Fluoreszenz-Spots treten oft auf relativ kurzen Desmin-Filamenten auf. Der Skalenbalken repräsentiert 500 nm.

Die Kombination aus zwei etablierten Methoden der TIRF Mikroskopie und dem AFM zum aSNOM bringt ein sehr vielseitiges Werkzeug zu Tage. Das aSNOM bündelt die Rastersonden-Methode mit leistungsfähiger optischer Mikroskopie und erhält dadurch die einzigartige Eigenschaft simultan topografische und optische Informationen mit hoher Präzision im nm-Bereich zu liefern. Wegen der Benutzung von kommerziell erhältlichen Scansonden aus Silizium entfällt die komplexe Eigenherstellung der Sonden, was finan-

5.2 Optische Rasternahfeldmikroskopie (aSNOM)

zielle und zeitliche Vorteile mitbringt. Außerdem sind die optischen und topografischen Signale von vornherein synchron und bedürfen keiner weiteren Anpassung. Sie können einfach übereinander gelegt werden und zeigen auf Anhieb sehr genau die Lokalisierung der Farbstoffe und damit auch der speziellen funktionellen Gruppen. Zusätzlich kann aus der Fluoreszenz der Markierungsgrad der Moleküle bestimmt werden. Zudem erlaubt das aSNOM Messungen in Flüssigkeit und ist somit prädestiniert für biologische Anwendungen. Die phasengekoppelte Fluoreszenz-Detektion verhindert das frühzeitige Fotobleichen und verlängert die Messzeit, da die Beleuchtung nur auf das Wesentliche minimiert wird (Abschn. 5.2.2). Es ist ein vielseitiges Gerät, das durch kleine Umbaumaßnahmen auch für zweifarbige Fluoreszenz-Detektion eingesetzt werden kann. Folglich eignet sich das aSNOM für Untersuchungen von verschiedenen Molekülen, insbesondere Biomolekülen, wo die genaue Lokalisierung auf Einzelmolekülniveau von gewissen funktionellen Gruppen auf Oberflächen essentiell ist. Auch die strukturelle Beschaffenheit der Moleküle kann mittels aSNOM analysiert werden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Das Rasterkraftmikroskop ist ein vielseitiges Werkzeug, das sowohl spektroskopische als auch mikroskopische Analysen von strukturellen und funktionellen Eigenschaften unterschiedlicher Systeme ermöglicht.

Im ersten Projekt dieser Arbeit sind kraftspektroskopische Untersuchungen der Wechselwirkung zwischen der HD aus Sulf1 und den jeweiligen GAG Hep, HS+6S, DS, HS-6S und K5NS durchgeführt worden. Dazu sind die dynamische Kraftspektroskopie sowie *Force Clamp* für die Bestimmung der thermischen Off-Ratenkonstante beziehungsweise der Lebensdauer des Komplexes verwendet worden. Alle Datensätze zeigen, dass nicht die Gesamtladung, sondern die Anwesenheit der 6-*O*-Sulfate eine zentrale Rolle für die Erkennung und die Bindung zwischen HD und GAG hat. Außerdem sind starke Indizien gefunden worden, dass die Subdomäne MBP-HD_V der HD eine Schlüsselrolle bei der Erkennung und Bindung haben könnte. Des Weiteren ist auch die Notwendigkeit der 6-*O*-Sulfate für das *Catch Bond* Verhalten gezeigt worden, da nur GAG mit 6-*O*-Sulfatierung solch eine Charakteristik aufweisen. Insbesondere beim natürlichen Substrat HS+6S und seinem engen Verwandten Hep ist dieses Verhalten im Bereich zwischen 10 – 18 pN stark ausgeprägt. Darüber hinaus war es möglich mit dem in dieser Arbeit vorgestellten *Two-State Two-Path* Modell diese besondere Interaktion mathematisch zu beschreiben und zu zeigen, dass die spezielle Anordnung der 6-*O*-Sulfate in S-Domänen die Wechselwirkung zwischen HD und HS+6S effizienter macht im Gegensatz zu HD/Hep. Außerdem bekräftigt die hervorragende Übereinstimmung des *Two-State Two-Path* Modells mit den Messergebnissen die Hypothese der Allosterie für die Wechselwirkung zwischen HD und 6-*O*-sulfatierten GAG. Damit lässt sich das *Catch Bond* Verhalten ansatzweise erklären. Über die physiologische Relevanz und Notwendigkeit dieser Charakteristik kann derzeit keine genaue Aussage gemacht werden. Jedoch wird auf der Basis der Ergebnisse von Seffouh und Kollegen und den Messergebnissen aus dieser Arbeit angenommen, dass die Prozessierung und das Gleiten der Sulf1 auf der HS+6S-Kette bei verschiedenen Konformationen der HD stattfinden. Dabei entstehen wahrscheinlich während des Gleitens Scherkräfte, die den konformationellen Übergang und damit auch das *Catch Bond*

6 Zusammenfassung und Ausblick

Verhalten verursachen. Diese Konformationsänderung sichert vermutlich die Bindung zwischen HD/HS+6S ab (Mischzustand zwischen S₁ und S₂), um eine vorzeitige Dissoziation zu unterbinden. Wird das nächste 6-*O*-Sulfat erreicht, verankert sich die HD (Zustand S₁), damit das Enzym ungestört das 6-*O*-Sulfat entfernen kann. Dieser Zyklus findet solange statt, bis das letzte 6-*O*-Sulfat der S-Domäne entfernt ist und die HD beziehungsweise die Sulf1 sich von der HS+6S-Kette wieder löst. Für ein detailliertes Verständnis der Wechselwirkung und der Physiologie, müssen weitere kraftspektroskopische Experimente mit der vollständigen Sulf1 durchgeführt werden. Außerdem ist zu prüfen, inwiefern die Subdomänen der HD, insbesondere die MBP-HD_V, Einfluss auf das *Catch Bond* Verhalten haben. Zudem wäre die Kenntnis über die 3D-Struktur der HD sehr hilfreich für die Beschreibung und Modellierung der Wechselwirkung.

Zum zweiten Projekt dieser Arbeit gehört die Weiterentwicklung sowie Anwendung eines aperturlosen optischen Rasternahfeldmikroskops (aSNOM). Dazu ist die bewährte AFM-Technik mit der TIRF Mikroskopie kombiniert worden. Charakteristisch für unser aSNOM sind insbesondere die Benutzung kommerzieller Scansonden aus Silizium, die Regelung der z-Richtung mit einem Lichtzeigersystem über zwei separate Piezos sowie eine besondere phasengekoppelte Detektion des Fluoreszenz-Signals. Diese technischen Finessen ermöglichen molekulare Auflösungen sowohl topografisch als auch optisch. Mit dem aSNOM ist auf zwei verschiedenen biologischen Systemen, dem TMV und Desmin, eine optische Auflösung kleiner 20 nm demonstriert worden. Die Kombination aus Topografie und der hohen optischen Auflösung zeigt das enorme Potential dieser Applikation für diagnostische Zwecke. Diese Methode eignet sich besonders für Systeme, die sich aus mehreren gleichen oder gemischten Untereinheiten zusammensetzen, wo definierte Abstände zwischen gewissen funktionellen Gruppen die strukturellen Beschaffenheiten beschreiben. Das haben besonders die Untersuchungen an Desmin offenbart, bei denen Abstände von 50 – 70 nm zwischen benachbarten Fluoreszenz-Signalen gefunden worden sind. Diese Abstände decken sich hervorragend mit der Länge eines ULF, die etwa 60 nm beträgt. Somit kann die Kombination der Topografie mit der optischen Information Aufschluss über Strukturmerkmale des Systems geben. Dabei kann eine Veränderung dieser speziellen Abstände mit einer möglichen Mutation in der Aminosäuresequenz assoziiert werden. Für die Prüfung der Aussagekraft dieser Methode sollten im nächsten Schritt insbesondere Messungen mit Mutanten von Desmin durchgeführt werden. In der Zukunft kann außerdem unser aSNOM ohne besondere Umbaumaßnahmen auch für zweifarbig Fluoreszenz-Detektion eingesetzt werden. Damit können gleichzeitig zwei verschiedene funktionelle Gruppen beobachtet werden.

Literaturverzeichnis

- [1] FISCHER, E.: *Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme*. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 27:2985–2993, 1894.
- [2] HORTON, H. ROBERT, LAURENCE A. MORAN, K. GRAY SCRIMGEOUR, MARC D. PERRY und J. DAVID RAWN: *Principles of Biochemistry*. Pearson Education, 4th edition Auflage, 2006.
- [3] BINNIG, G., C.F. QUATE und C. GERBER: *Atomic Force Microscope*. Physical Review Letters, 56:930–933, 1986.
- [4] KRAMERS, H. A.: *Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions*. Physica, 7:284–304, 1940.
- [5] EVANS, E. und K. RITCHIE: *Dynamic strength of molecular adhesion bonds*. Biophysical Journal, 72:1541–1555, 1997.
- [6] BELL, G. I.: *Models for the Specific Adhesion of Cells to Cells*. Science, 200:618–627, 1978.
- [7] LEE, G. U., D. A. KIDWELL und R. J. COLTON: *Sensing Discrete Streptavidin-Biotin Interactions with Atomic Force Microscopy*. Langmuir, 10:354–357, 1994.
- [8] MOY, V. T., E. L. FLORIN und H. E. GAUB: *Intermolecular forces and energies between ligands and receptors*. Science, 266(5183):257–259, Oct 1994.
- [9] FLORIN, E. L., V. T. MOY und H. E. GAUB: *Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs*. Science, 264(5157):415–417, Apr 1994.
- [10] DAMMER, U., O. POPESCU, P. WAGNER, D. ANSELMETTI, H. J. GUNTHE-RODT und G. N. MISEVIC: *Binding strength between cell adhesion proteoglycans measured by atomic force microscopy*. Science, 267:1173–1175, 1995.

- [11] DAMMER, U., M. HEGNER, D. ANSELMETTI, P. WAGNER, M. DREIER, W. HUBER und H. J. GÜNTHERODT: *Specific antigen/antibody interactions measured by force microscopy*. Biophysical Journal, 70:2437–2441, 1996.
- [12] HINTERDORFER, P., W. BAUMGARTNER, H. J. GRUBER, K. SCHILCHER und H. SCHINDLER: *Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 93(8):3477–3481, Apr 1996.
- [13] ECKEL, RAINER, SVEN DAVID WILKING, ANKE BECKER, NORBERT SEWALD, ROBERT ROS und DARIO ANSELMETTI: *Single-molecule experiments in synthetic biology: an approach to the affinity ranking of DNA-binding peptides*. Angew Chem Int Ed Engl, 44(25):3921–3924, Jun 2005.
- [14] ECKEL, RAINER, ROBERT ROS, BJÖRN DECKER, JOCHEN MATTAY und DARIO ANSELMETTI: *Supramolecular chemistry at the single-molecule level*. Angew Chem Int Ed Engl, 44(3):484–488, Jan 2005.
- [15] SEWALD, NORBERT, SVEN D. WILKING, RAINER ECKEL, SILVIA ALBU, KATRIN WOLLSCHLÄGER, KATHARINA GAUS, ANKE BECKER, FRANK W. BARTELS, ROBERT ROS und DARIO ANSELMETTI: *Probing DNA-peptide interaction forces at the single-molecule level*. J Pept Sci, 12(12):836–842, Dec 2006.
- [16] BARTELS, FRANK WILCO, MATTHEW MCINTOSH, ALEXANDER FUHRMANN, CHRISTOPH METZENDORF, PATRIK PLATTNER, NORBERT SEWALD, DARIO ANSELMETTI, ROBERT ROS und ANKE BECKER: *Effector-stimulated single molecule protein-DNA interactions of a quorum-sensing system in *Sinorhizobium meliloti**. Biophys J, 92(12):4391–4400, Jun 2007.
- [17] ANSELMETTI, DARIO, FRANK WILCO BARTELS, ANKE BECKER, BJÖRN DECKER, RAINER ECKEL, MATTHEW MCINTOSH, JOCHEN MATTAY, PATRIK PLATTNER, ROBERT ROS, CHRISTIAN SCHÄFER und NORBERT SEWALD: *Reverse engineering of an affinity-switchable molecular interaction characterized by atomic force microscopy single-molecule force spectroscopy*. Langmuir, 24(4):1365–1370, Feb 2008.

- [18] HARDER, ALEXANDER, VOLKER WALHORN, THOMAS DIERKS, XAVIER FERNÀNDEZ-BUSQUETS und DARIO ANSELMETTI: *Single-molecule force spectroscopy of cartilage aggrecan self-adhesion*. Biophys J, 99(10):3498–3504, Nov 2010.
- [19] RITZEFELD, MARKUS, VOLKER WALHORN, DARIO ANSELMETTI und NORBERT SEWALD: *Analysis of DNA interactions using single-molecule force spectroscopy*. Amino Acids, 44(6):1457–1475, Jun 2013.
- [20] LOU, JIZHONG, TADAYUKI YAGO, ARKADIUSZ G. KLOPOCKI, PADMAJA MEHTA, WEI CHEN, VERONIKA I. ZARNITSYNA, NICOLAI V. BOVIN, CHENG ZHU und RODGER P. MCEVER: *Flow-enhanced adhesion regulated by a selectin inter-domain hinge*. J Cell Biol, 174(7):1107–1117, Sep 2006.
- [21] LOU, JIZHONG und CHENG ZHU: *A structure-based sliding-rebinding mechanism for catch bonds*. Biophys J, 92(5):1471–1485, Mar 2007.
- [22] PEREVERZEV, YURIY V. und OLEG V. PREZHDO: *Force-induced deformations and stability of biological bonds*. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 73(5 Pt 1):050902, May 2006.
- [23] PEREVERZEV, YURIY V., OLEG V. PREZHDO, MANU FORERO, EVGENI V. SOKURENKO und WENDY E. THOMAS: *The two-pathway model for the catch-slip transition in biological adhesion*. Biophys J, 89(3):1446–1454, Sep 2005.
- [24] PEREVERZEV, YURIY V., EUGENIA PREZHDO und EVGENI V. SOKURENKO: *The two-pathway model of the biological catch-bond as a limit of the allosteric model*. Biophys J, 101(8):2026–2036, Oct 2011.
- [25] BARSEGOV, V. und D. THIRUMALAI: *Dynamics of unbinding of cell adhesion molecules: transition from catch to slip bonds*. Proc Natl Acad Sci U S A, 102(6):1835–1839, Feb 2005.
- [26] LIU, FEI und ZHONG-CAN OU-YANG: *Force modulating dynamic disorder: a physical model of catch-slip bond transitions in receptor-ligand forced dissociation experiments*. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 74(5 Pt 1):051904, Nov 2006.

- [27] BESTE, MICHAEL T. und DANIEL A. HAMMER: *Selectin catch-slip kinetics encode shear threshold adhesive behavior of rolling leukocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 105(52):20716–20721, Dec 2008.
- [28] BJÖRNHAM, OSCAR und OVE AXNER: *Catch-bond behavior of bacteria binding by slip bonds*. Biophys J, 99(5):1331–1341, Sep 2010.
- [29] SUZUKI, YOHICHI und OLGA K. DUDKO: *Single-molecule rupture dynamics on multidimensional landscapes*. Phys Rev Lett, 104(4):048101, Jan 2010.
- [30] EVANS, EVAN, ANDREW LEUNG, VOLKMAR HEINRICH und CHENG ZHU: *Mechanical switching and coupling between two dissociation pathways in a P-selectin adhesion bond*. Proc Natl Acad Sci U S A, 101(31):11281–11286, Aug 2004.
- [31] SEFFOUH, AMAL, FABIAN MILZ, CÉDRIC PRZYBYLSKI, CÉDRIC LAGURI, ARIE OOSTERHOF, SÉBASTIEN BOURCIER, RABIA SADIR, ELODIE DUTKOWSKI, RÉGIS DANIEL, TOIN H. VAN KUPPEVELT, THOMAS DIERKS, HUGUES LORTAT-JACOB und ROMAIN R. VIVÈS: *HSulf sulfatases catalyze processive and oriented 6-O-desulfation of heparan sulfate that differentially regulates fibroblast growth factor activity*. FASEB J, 27(6):2431–2439, Jun 2013.
- [32] FERNANDEZ, JULIO M. und HONGBIN LI: *Force-Clamp Spectroscopy Monitors the Folding Trajectory of a Single Protein*. Science, 303(5664):1674–1678, 2004.
- [33] RAIBLE, M., M. EVSTIGNEEV, F.W. BARTELS, R. ECKEL, M. NGUYEN-DUONG, R. MERKEL, R. ROS, D. ANSELMETTI und P. REIMANN: *Theoretical Analysis of Single-Molecule Force Spectroscopy Experiments: Heterogeneity of Chemical Bonds*. Biophys J, 90(11):3851–3864, Juni 2006.
- [34] POHL, D. W., W. DENK und M. LANZ: *Optical stethoscopy: Image recording with resolution lambda/20*. Applied Physics Letters, 44(7):651–653, 1984.
- [35] VAN TINTELEN, J PETER, ISABELLE C. VAN GELDER, ANGELIKI ASIMAKI, ALBERT J H. SUURMEIJER, ANS C P. WIESFELD, JAN D H. JONGBLOED, ARTHUR VAN DEN WIJNGAARD, JAN B M. KUKS, KARIN Y. VAN SPAENDONCK-ZWARTS, NICOLETTE NOTERMANS, LUDOLF BOVEN, FREEK VAN DEN HEUVEL, HERMINE E. VEENSTRA-KNOL, JEFFREY E. SAFFITZ, ROBERT M W. HOFSTRA und MAARTEN P. VAN DEN BERG: *Severe cardiac phenotype with right ventricular*

- predominance in a large cohort of patients with a single missense mutation in the DES gene.* Heart Rhythm, 6(11):1574–1583, Nov 2009.
- [36] OTTEN, ELLEN, ANGELIKI ASIMAKI, ALEXANDER MAASS, IRENE M. VAN LANGEN, ALLARD VAN DER WAL, NICOLAAS DE JONGE, MAARTEN P. VAN DEN BERG, JEFFREY E. SAFFITZ, ARTHUR A M. WILDE, JAN D H. JONGBLOED und J PETER VAN TINTELEN: *Desmin mutations as a cause of right ventricular heart failure affect the intercalated disks.* Heart Rhythm, 7(8):1058–1064, Aug 2010.
- [37] KLAUKE, BAERBEL, SABINE KOSSMANN, ANNA GAERTNER, KRISTINA BRAND, INES STORK, ANDREAS BRODEHL, MAREIKE DIEDING, VOLKER WALHORN, DARIO ANSELMETTI, DÉSIRÉE GERDES, BIRTE BOHMS, UWE SCHULZ, EDZARD ZU KNYPHAUSEN, MATTHIAS VORGERD, JAN GUMMERT und HENDRIK MILLING: *De novo desmin-mutation N116S is associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy.* Hum Mol Genet, 19(23):4595–4607, Dec 2010.
- [38] HEDBERG, CAROLA, ATLE MELBERG, ANGELIKA KUHL, DIETER JENNE und ANDERS OLDFORS: *Autosomal dominant myofibrillar myopathy with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy 7 is caused by a DES mutation.* Eur J Hum Genet, 20(9):984–985, Sep 2012.
- [39] FREY, HEINRICH, JAN PASKARBEIT und DARIO ANSELMETTI: *Tip-enhanced single molecule fluorescence near-field microscopy in aqueous environment.* Appl. Phys. Lett., 94(24):241116, 2009.
- [40] AXELROD, D.: *Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence.* J Cell Biol, 89(1):141–145, Apr 1981.
- [41] AXELROD, D.: *Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology.* Traffic, 2(11):764–774, Nov 2001.
- [42] HÖPPENER, CHRISTIANE: *Scanning Near-Field Optical Microscopy for Investigations of Bio-Matter.* In: FORNASIERO, EUGENIO F. und SILVIO O. RIZZOLI (Herausgeber): *Super-Resolution Microscopy Techniques in the Neurosciences*, Band 86 der Reihe *Neuromethods*, Seiten 189–223. Humana Press, 2014.
- [43] BINNIG, G. und H. ROHRER: *Scanning tunneling microscopy.* Helvetica Physica Acta, 55:726–735, 1982.

- [44] BINNIG, G., H. ROHRER, C. GERBER und E. WEIBEL: *Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy*. Physical Review Letters, 49:57–61, 1982.
- [45] INOUYE, YASUSHI und SATOSHI KAWATA: *Near-field scanning optical microscope with a metallic probe tip*. Opt. Lett., 19(3):159–161, Feb 1994.
- [46] GOMEZ, LEWIS, RENAUD BACHELOT, ALEXANDRE BOUHELIER, GARY P. WIEDERRECHT, SHIH HUI CHANG, STEPHEN K. GRAY, FENG HUA, SEOKWOO JEON, JOHN A. ROGERS, MIGUEL E. CASTRO, SYLVAIN BLAIZE, ILAN STEFANON, GILLES LERONDEL und PASCAL ROYER: *Apertureless scanning near-field optical microscopy: a comparison between homodyne and heterodyne approaches*. J. Opt. Soc. Am. B, 23(5):823–833, May 2006.
- [47] HECHT, BERT, BEATE SICK, URS P. WILD, VOLKER DECKERT, RENATO ZENOBI, OLIVIER J. F. MARTIN und DIETER W. POHL: *Scanning near-field optical microscopy with aperture probes: Fundamentals and applications*. The Journal of Chemical Physics, 112(18):7761–7774, 2000.
- [48] SARID, D. und V. ELINGS: *Review of scanning force microscopy*. Journal of Vacuum Science and Technology B, 9:431–437, 1991.
- [49] MEYER, E.: *Atomic Force Microscopy*. Progress in Surface Science, 41:3–49, 1992.
- [50] ISRAELACHVILI, J. N. und D. TABOR: *The Measurement of Van Der Waals Dispersion Forces in the Range 1.5 to 130 nm*. Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences, 331:19–38, 1972.
- [51] ALEXANDER, S., L. HELLEMANS, O. MARTI, J. SCHNEIR, V. ELINGS und P. K. HANSMA: *An atomic-resolution atomic-force microscope implemented using an optical lever*. Journal of Applied Physics, 65:164, 1989.
- [52] MEYER, G. und N.M. AMER: *Novel optical approach to atomic force microscopy*. Applied Physics Letters, 53:1045–1047, 1988.
- [53] MEYER, G. und N.M. AMER: *Simultaneous Measurement of Lateral and Normal Forces with an Optical-Beam-Deflection Atomic Force Microscope*. Applied Physics Letters, 57:2089–2091, 1990.
- [54] RUGAR., D., H. J. MAMIN und P. GUETHNER: *Improved fiber-optic interferometer for atomic force microscopy*. Applied Physics Letters, 55:2588–2590, 1989.

- [55] NEUBAUER, G., S. R. COHEN, G. M. MCCLELLAND, D. HORNE und C. M. MATE: *Force microscopy with a bidirectional capacitance sensor*. Review of Scientific Instruments, 61:2296–2308, 1990.
- [56] MAGONOV, S. N.: *Surface Characterization of Materials at Ambient Conditions by Scanning Tunneling Microscopy (STM) and Atomic Force Microscopy (AFM)*. Applied Spectroscopy Reviews, 28:1–121, 1993.
- [57] BURNHAM, N. A., R. J. COLTON und H. M. POLLOCK: *Interpretation issues in force microscopy*. Journal of Vacuum Science and Technology, 9:2548–2555, 1991.
- [58] BHUSHAN, BHARAT, JACOB N. ISRAELACHVILI und UZI LANDMAN: *Nanotribology: friction, wear and lubrication at the atomic scale*. Nature, 374(6523):607–616, April 1995.
- [59] MARTIN, Y., C. C. WILLIAMS und H. K. WICKRAMASIGHE: *Atomic force microscope-force mapping and profiling on sub 100-Å scale*. Journal of Applied Physics, 61:4723–4729, 1987.
- [60] LEE, MANHEE und WONHO JHE: *General theory of amplitude-modulation atomic force microscopy*. Phys Rev Lett, 97(3):036104, Jul 2006.
- [61] SADER, JOHN E. und SUZANNE P. JARVIS: *Accurate formulas for interaction force and energy in frequency modulation force spectroscopy*. Applied Physics Letters, 84(10):1801–1803, 2004.
- [62] FUKUMA, TAKESHI, JASON I. KILPATRICK und SUZANNE P. JARVIS: *Phase modulation atomic force microscope with true atomic resolution*. Review of Scientific Instruments, 77(12):123703, 2006.
- [63] MULLER, P.: *Glossary of Terms Used in Physical Organic Chemistry*. Pure and Applied Chemistry, 66:1077–1184, 1994.
- [64] ZHONG, Q., D. INNISS, K. KJOLLER und V.B. ELINGS: *Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy*. Surface science letter, 290:L688–L692, 1993.
- [65] GARCÍA, R., J. TAMAYO, M. CALLEJA und F. GARCÍA: *Phase contrast in tapping-mode scanning force microscopy*. Applied Physics A Materials Science & Processing, 66:309–312, 1998.

- [66] TAMAYO, J. und R. GARCÍA: *Deformation, Contact Time, and Phase Contrast in Tapping Mode Scanning Force Microscopy*. Langmuir, 12:4430–4435, 1996.
- [67] GIESSIBL, F. J.: *Atomic resolution of silicon (111)7x7 by atomic force microscopy through repulsive and attractive forces*. Science, 267:1451–1455, 1995.
- [68] FUKUMA, T., T. ICHII, K. KOBAYASHI, H. YAMADA und K. MATSUSHIGE: *True-molecular resolution imaging by frequency modulation atomic force microscopy in various environments*. Applied Physics Letters, 86:034103–3, 2005.
- [69] FUKUMA, T., M. J. HIGGINS und S. P. JARVIS: *Direct Imaging of Individual Intrinsic Hydration Layers on Lipid Bilayers at Ångstrom Resolution*. Biophysical Journal, 92:3603–3609, 2007.
- [70] ABBE, E.: *Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung*. Arch Mikroskop Anat Entwicklungsmech, 9:413–468, 1873.
- [71] SYNGE, E. H.: *A suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region*. Philos. Mag., 6:356–262, 1928.
- [72] LEWIS, A., M. ISAACSON, A. HAROOTUNIAN und A. MURAY: *Development of a 500 Å... spatial resolution light microscope: I. light is efficiently transmitted through $\lambda/16$ diameter apertures*. Ultramicroscopy, 13(3):227 – 231, 1984.
- [73] VEERMAN, J. A., A. M. OTTER, L. KUIPERS und N. F. VAN HULST: *High definition aperture probes for near-field optical microscopy fabricated by focused ion beam milling*. Applied Physics Letters, 72(24):3115–3117, 1998.
- [74] BETZIG, E., J. K. TRAUTMAN, T. D. HARRIS, J. S. WEINER und R. L. KOSTELAK: *Breaking the diffraction barrier: optical microscopy on a nanometric scale*. Science, 251(5000):1468–1470, Mar 1991.
- [75] ESSAIDI, N., Y. CHEN, V. KOTTLER, E. CAMBRIL, C. MAYEUX, N. RON-ARCH und C. VIEU: *Fabrication and characterization of optical-fiber nanoprobes for scanning near-field optical microscopy*. Appl Opt, 37(4):609–615, Feb 1998.
- [76] PUYGRANIER, B. A. und P. DAWSON: *Chemical etching of optical fibre tips—experiment and model*. Ultramicroscopy, 85(4):235–248, Dec 2000.

- [77] VALASKOVIC, G. A., M. HOLTON und G. H. MORRISON: *Parameter control, characterization, and optimization in the fabrication of optical fiber near-field probes.* Appl Opt, 34(7):1215–1228, Mar 1995.
- [78] LAZAREV, ALEXANDER, NICHOLAS FANG, QI LUO und XIANG ZHANG: *Formation of fine near-field scanning optical microscopy tips. Part II. By laser-heated pulling and bending.* Review of Scientific Instruments, 74(8):3684–3688, 2003.
- [79] HOFFMANN, PATRIK, BERTRAND DUTOIT und RENÉ-PAUL SALATHÉ: *Comparison of mechanically drawn and protection layer chemically etched optical fiber tips.* Ultramicroscopy, 61:165 – 170, 1995.
- [80] LAMBELET, PATRICK, ABDELJALIL SAYAH, MICHAEL PFEFFER, CLAUDE PHILIPONA und FABIENNE MARQUIS-WEIBLE: *Chemically Etched Fiber Tips for Near-Field Optical Microscopy: A Process for Smoother Tips.* Appl. Opt., 37(31):7289–7292, Nov 1998.
- [81] SAYAH, A, C PHILIPONA, P LAMBELET, MR PFEFFER und F MARQUIS-WEIBLE: *Fiber tips for scanning near-field optical microscopy fabricated by normal and reverse etching.* Ultramicroscopy, 71(1):59–63, 1998.
- [82] MURAMATSU, H, K HOMMA, N CHIBA, N YAMAMOTO und A EGAWA: *Dynamic etching method for fabricating a variety of tip shapes in the optical fibre probe of a scanning near-field optical microscope.* Journal of microscopy, 194(2-3):383–387, 1999.
- [83] ADIGA, VIVEKANANDA P., PAUL W. KOLB, GEOFFREY T. EVANS, MAX A. CUBILLOS-MORAGA, DON C. SCHMADEL, RICHARD DYOTT und H DENNIS DREW: *Development of high-throughput, polarization-maintaining, near-field probes.* Appl Opt, 45(12):2597–2600, Apr 2006.
- [84] MIHALCEA, C., W. SCHOLZ, S. WERNER, S. MÜNSTER, E. OESTERSCHULZE und R. KASSING: *Multipurpose sensor tips for scanning near-field microscopy.* Applied Physics Letters, 68(25):3531–3533, 1996.
- [85] OESTERSCHULZE, E., RUDOW O., MIHALCEA C., SCHOLZ W. und WERNER S.: *Cantilever probes for SNOM applications with single and double aperture tips.* Ultramicroscopy, 71(1):85–92, 1998.

- [86] MINH, P. N., T. ONO, S. TANAKA und M. ESASHI: *Spatial distribution and polarization dependence of the optical near-field in a silicon microfabricated probe.* Journal of Microscopy, 202(1):28–33, 2001.
- [87] SQALLI, O., M.-P. BERNAL, P. HOFFMANN und F. MARQUIS-WEIBLE: *Improved tip performance for scanning near-field optical microscopy by the attachment of a single gold nanoparticle.* Applied Physics Letters, 76(15):2134–2136, 2000.
- [88] FARAHANI, JAVAD N, DIETER W POHL, H-J EISLER und B HECHT: *Single quantum dot coupled to a scanning optical antenna: a tunable superemitter.* Physical Review Letters, 95(1):017402, 2005.
- [89] HILLENBRAND, R. und F. KEILMANN: *Complex Optical Constants on a Subwavelength Scale.* Phys. Rev. Lett., 85:3029–3032, Oct 2000.
- [90] HILLENBRAND, R. und F. KEILMANN: *Material-specific mapping of metal/semiconductor/dielectric nanosystems at 10 nm resolution by backscattering near-field optical microscopy.* Applied Physics Letters, 80(1):25–27, 2002.
- [91] TAUBNER, T., F. KEILMANN und R. HILLENBRAND: *Nanomechanical Resonance Tuning and Phase Effects in Optical Near-Field Interaction.* Nano Letters, 4(9):1669–1672, 2004.
- [92] HILLENBRAND, R., T. TAUBNER und F. KEILMANN: *Phonon-enhanced light matter interaction at the nanometre scale.* Nature, 418(6894):159–162, Jul 2002.
- [93] OCELIC, N. und R. HILLENBRAND: *Subwavelength-scale tailoring of surface phonon polaritons by focused ion-beam implantation.* Nat Mater, 3(9):606–609, September 2004.
- [94] PATANÈ, S, PG GUCCIARDI, M LABARDI und M ALLEGRIANI: *Apertureless near-field optical microscopy.* Rivista Del Nuovo Cimento, 27(1):1–46, 2004.
- [95] WESSEL, JOHN: *Surface-enhanced optical microscopy.* J. Opt. Soc. Am. B, 2(9):1538–1541, Sep 1985.
- [96] SÁNCHEZ, ERIK J, LUKAS NOVOTNY und X SUNNEY XIE: *Near-field fluorescence microscopy based on two-photon excitation with metal tips.* Physical review letters, 82(20):4014–4017, 1999.

- [97] HARTSCHUH, ACHIM, MICHAEL R. BEVERSLUIS, ALEXANDRE BOUHELIER und LUKAS NOVOTNY: *Tip-enhanced optical spectroscopy*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A:Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 362(1817):807–819, 2004.
- [98] MARTIN, YVES C., HENDRIK F. HAMANN und H. KUMAR WICKRAMASINGHE: *Strength of the electric field in apertureless near-field optical microscopy*. Journal of Applied Physics, 89(10):5774–5778, 2001.
- [99] BOUHELIER, A., M. BEVERSLUIS, A. HARTSCHUH und L. NOVOTNY: *Near-Field Second-Harmonic Generation Induced by Local Field Enhancement*. Phys. Rev. Lett., 90:013903, Jan 2003.
- [100] FREY, H G, C BOLWIEN, A BRANDENBURG, R Ros und D ANSELMETTI: *Optimized apertureless optical near-field probes with 15 nm optical resolution*. Nanotechnology, 17(13):3105, 2006.
- [101] HAFNER, C. und N. KUSTER: *Computations of electromagnetic fields by the multiple multipole method (generalized multipole technique)*. Radio Science, 26(1):291–297, 1991.
- [102] BOUHELIER, A, JB RENGER, MR BEVERSLUIS und L NOVOTNY: *Plasmon-coupled tip-enhanced near-field optical microscopy*. Journal of microscopy, 210(3):220–224, 2003.
- [103] JANUNTS, NA, KS BAGHDASARYAN, KH V NERKARARYAN und B HECHT: *Excitation and superfocusing of surface plasmon polaritons on a silver-coated optical fiber tip*. Optics communications, 253(1):118–124, 2005.
- [104] JABLONSKI, A.: *Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren*. Z Phys, 94:38–46, 1935.
- [105] STOKES, G.G.: *On the change of refrangibility of light*. Phil Trans R Soc (London), 142:463–562, 1852.
- [106] FRANCK, J. und E. G. DYMOND: *Elementary processes of photochemical reactions*. Trans. Faraday Soc., 21:536–542, 1926.
- [107] CONDON, EDWARD: *A Theory of Intensity Distribution in Band Systems*. Phys. Rev., 28:1182–1201, Dec 1926.

- [108] KASHA, M.: *Characterization of electronic transitions in complex molecules*. Disc Faraday Soc, 9:14–19, 1950.
- [109] HERSCHEL, SIR J. F. W.: *On a case of superficial colour presented by a homogeneous liquid internally colourless*. Phil Trans Roy Soc (London), 135:143–145, 1845.
- [110] LAKOWICZ, JOSEPH R: *Principles of fluorescence spectroscopy*, Kapitel 1. Introduction to Fluorescence, Seiten 1–26. Springer, 2007.
- [111] GERSTEN, JOEL und ABRAHAM NITZAN: *Spectroscopic properties of molecules interacting with small dielectric particles*. The Journal of Chemical Physics, 75(3):1139–1152, 1981.
- [112] DAS, PURNA und HORIA METIU: *Enhancement of molecular fluorescence and photochemistry by small metal particles*. The Journal of Physical Chemistry, 89(22):4680–4687, 1985.
- [113] LAKOWICZ, J. R.: *Radiative decay engineering: biophysical and biomedical applications*. Anal Biochem, 298(1):1–24, Nov 2001.
- [114] BUTT, H. J., B. CAPPELLA und M. KAPPL: *Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications*. Surface Science Reports, 59:1–152, 2005.
- [115] RIEF, M., M. GAUTEL, F. OESTERHELT, J. M. FERNANDEZ und H. E. GAUB: *Reversible Unfolding of Individual Titin Immunoglobulin Domains by AFM*. Science, 276:1109–1112, 1997.
- [116] HUGEL, THORSTEN, MATTHIAS GROSHOLZ, HAUKE CLAUSEN-SCHAUMANN, ANDREAS PFAU, HERMANN GAUB und MARKUS SEITZ: *Elasticity of Single Polyelectrolyte Chains and Their Desorption from Solid Supports Studied by AFM Based Single Molecule Force Spectroscopy*. Macromolecules, 34(4):1039–1047, 2001.
- [117] AKSU, S. B. und J. A. TURNERA: *Calibration of atomic force microscope cantilevers using piezolevers*. Review of Scientific Instruments, 78:043704.1–043704.8, 2007.
- [118] HUTTER, JEFFREY L. und JOHN BECHHOFER: *Calibration of atomic-force microscope tips*. Review of Scientific Instruments, 64(7):1868–1873, 1993.

- [119] WALHORN, V.: *Rasterkraftmikroskopie mit kleinen Cantilevern.* Diplomarbeit, Universität Bielefeld, 2004.
- [120] PROKSCH, R., T. E. SCHÄFFER, J. P. CLEVELAND, R. C. CALLAHAN und M. B. VIANI: *Finite optical spot size and position corrections in thermal spring constant calibration.* Nanotechnology, 15:1344–1350, 2004.
- [121] GIBSON, C. T., B. L. WEEKSA, C. ABELLA, T. RAYMENTA und S. MYHRAB: *Calibration of AFM cantilever spring constants.* Ultramicroscopy, 97:113–118, 2002.
- [122] LÉVY, R. und M. MAALOUM: *Measuring the spring constant of atomic force microscope cantilevers: thermal fluctuations and other methods.* Nanotechnology, 13:33–37, 2002.
- [123] HÄNGGI, P., P. TALKNER und M. BORKOVEC: *Reaction-rate theory: fifty years after Kramers.* Reviews of Modern Physics, 62:254–342, 1990.
- [124] EYRING, H.: *The Activated Complex and the Absolute Rate of Chemical Reactions.* Chemical Reviews, 17:65–77, 1935.
- [125] FISHER, ROBERT J und MATTHEW FIVASH: *Surface plasmon resonance based methods for measuring the kinetics and binding affinities of biomolecular interactions.* Current Opinion in Biotechnology, 5(4):389 –395, 1994.
- [126] HOMOLA, JIRI, SINCLAIR S. YEE und GÜNTER GAUGLITZ: *Surface plasmon resonance sensors: review.* Sensors and Actuators B: Chemical, 54(1–2):3 –15, 1999.
- [127] BIZZARRI, ANNA RITA und SALVATORE CANNISTRARO: *$1/f^\alpha$ Noise in the Dynamic Force Spectroscopy Curves Signals the Occurrence of Biorecognition.* Phys. Rev. Lett., 110:048104, Jan 2013.
- [128] ARRHENIUS, S.: *Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei Inversion von Rohrzucker durch Säuren.* Zeitschrift für physikalische Chemie, 4:226–248, 1889.
- [129] EVANS, E.: *Energy landscapes of biomolecular adhesion and receptor anchoring at interfaces explored with dynamic force spectroscopy.* Faraday Discussions, 111:1–16, 1998.

- [130] EVANS, E.: *Probing the Relation between Force—Lifetime—and Chemistry in Single Molecular Bonds*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 30:105–128, 2001.
- [131] DEMBO, M., D. C. TORNEY, K. SAXMAN und D. HAMMER: *The reaction-limited kinetics of membrane-to-surface adhesion and detachment*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 234(1274):55–83, Jun 1988.
- [132] THOMAS, WENDY E., ELENA TRINTCHINA, MANU FORERO, VIOLA VOGEL und EVGENI V. SOKURENKO: *Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force*. Cell, 109(7):913–923, Jun 2002.
- [133] THOMAS, WENDY, MANU FORERO, OLGA YAKOVENKO, LINA NILSSON, PAOLO VICINI, EVGENI SOKURENKO und VIOLA VOGEL: *Catch-bond model derived from allostery explains force-activated bacterial adhesion*. Biophys J, 90(3):753–764, Feb 2006.
- [134] YAKOVENKO, OLGA, SHIVANI SHARMA, MANU FORERO, VERONIKA TCHESNOKOVA, PAVEL APRIKIAN, BRIAN KIDD, ALBERT MACH, VIOLA VOGEL, EVGENI SOKURENKO und WENDY E. THOMAS: *FimH forms catch bonds that are enhanced by mechanical force due to allosteric regulation*. J Biol Chem, 283(17):11596–11605, Apr 2008.
- [135] MARSHALL, BRYAN T., MIAN LONG, JAMES W. PIPER, TADAYUKI YAGO, RODGER P. McEVER und CHENG ZHU: *Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules*. Nature, 423(6936):190–193, May 2003.
- [136] SARANGAPANI, KRISHNA K., TADAYUKI YAGO, ARKADIUSZ G. KLOPOCKI, MICHAEL B. LAWRENCE, CLAUDIA B. FIEGER, STEVEN D. ROSEN, RODGER P. McEVER und CHENG ZHU: *Low force decelerates L-selectin dissociation from P-selectin glycoprotein ligand-1 and endoglycan*. J Biol Chem, 279(3):2291–2298, Jan 2004.
- [137] GUO, BIN und WILLIAM H. GUILFORD: *Mechanics of actomyosin bonds in different nucleotide states are tuned to muscle contraction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 103(26):9844–9849, Jun 2006.

- [138] KONG, FANG, ANDRÉS J. GARCÍA, A PAUL MOULD, MARTIN J. HUMPHRIES und CHENG ZHU: *Demonstration of catch bonds between an integrin and its ligand.* J Cell Biol, 185(7):1275–1284, Jun 2009.
- [139] YAGO, TADAYUKI, JIZHONG LOU, TAO WU, JUN YANG, JONATHAN J. MINER, LESLIE COBURN, JOSÉ A. LÓPEZ, MIGUEL A. CRUZ, JING-FEI DONG, LARRY V. MCINTIRE, RODGER P. MCEVER und CHENG ZHU: *Platelet glycoprotein Ibalpha forms catch bonds with human WT vWF but not with type 2B von Willebrand disease vWF.* J Clin Invest, 118(9):3195–3207, Sep 2008.
- [140] RAKSHIT, SABYASACHI, YUNXIANG ZHANG, KRISTINE MANIBOG, OMER SHAFRAZ und SANJEEVI SIVASANKAR: *Ideal, catch, and slip bonds in cadherin adhesion.* Proc Natl Acad Sci U S A, 109(46):18815–18820, Nov 2012.
- [141] THOMAS, WENDY E., VIOLA VOGEL und EVGENI SOKURENKO: *Biophysics of Catch Bonds.* Annual Review of Biophysics, 37(1):399–416, 2008. PMID: 18573088.
- [142] MCEVER, R. P., K. L. MOORE und R. D. CUMMINGS: *Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions.* J Biol Chem, 270(19):11025–11028, May 1995.
- [143] FRITZ, J., A. G. KATOPODIS, F. KOLBINGER und D. ANSELMETTI: *Force-mediated kinetics of single P-selectin/ligand complexes observed by atomic force microscopy.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 95:12283–12288, 1998.
- [144] ISBERG, RALPH R. und PENELOPE BARNES: *Dancing with the host; flow-dependent bacterial adhesion.* Cell, 110(1):1–4, Jul 2002.
- [145] KONSTANTOPOULOS, KONSTANTINOS, WILLIAM D. HANLEY und DENIS WIRTZ: *Receptor-ligand binding: 'catch' bonds finally caught.* Curr Biol, 13(15):R611–R613, Aug 2003.
- [146] JEFFREY D ESKO, KOJI KIMATA und ULF LINDAHL: *In: Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1900/>*, Kapitel 16. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.

- [147] HASSELL, J. R., J. H. KIMURA und V. C. HASCALL: *Proteoglycan core protein families*. Annual Review of Biochemistry, 55:539–567, 1986.
- [148] BÜLOW, HANNES E. und OLIVER HOBERT: *The molecular diversity of glycosaminoglycans shapes animal development*. Annu Rev Cell Dev Biol, 22:375–407, 2006.
- [149] SEIDLER, DANIELA G., JASNA PETER-KATALINIĆ und ALINA D. ZAMFIR: *Galactosaminoglycan function and oligosaccharide structure determination*. ScientificWorldJournal, 7:233–241, 2007.
- [150] ROUGHLEY, P. J.: *The structure and function of cartilage proteoglycans*. European Cells & Materials Journal, 12:92–101, 2006.
- [151] RHODES, K. E. und J. W. FAWCETT: *Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS?* J Anat, 204(1):33–48, Jan 2004.
- [152] FTHENOU, E., A. ZAFIROPOULOS, A. TSATSAKIS, A. STATHOPOULOS, N. K. KARAMANOS und G. N. TZANAKAKIS: *Chondroitin sulfate A chains enhance platelet derived growth factor-mediated signalling in fibrosarcoma cells*. Int J Biochem Cell Biol, 38(12):2141–2150, 2006.
- [153] LINDAHL, ULF, MARION KUSCHE, KERSTIN LIDHOLT und LARS-GÅ-RAN OS-CARSSON: *Biosynthesis of Heparin and Heparan Sulfatea*. Annals of the New York Academy of Sciences, 556(1):36–50, 1989.
- [154] ESKO, J. D. und U. LINDAHL: *Molecular diversity of heparan sulfate*. J Clin Invest, 108(2):169–173, Jul 2001.
- [155] ESKO, JEFFREY D. und SCOTT B. SELLECK: *Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate*. Annu Rev Biochem, 71:435–471, 2002.
- [156] HABUCHI, HIROKO, OSAMI HABUCHI und KOJI KIMATA: *Sulfation pattern in glycosaminoglycan: does it have a code?* Glycoconj J, 21(1-2):47–52, 2004.
- [157] LIN, XINHUA: *Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development*. Development, 131(24):6009–6021, Dec 2004.

- [158] FARACH-CARSON, MARY C., JACQUELINE T. HECHT und DANIEL D. CARSON: *Heparan sulfate proteoglycans: key players in cartilage biology.* Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 15(1):29–48, 2005.
- [159] HUNTINGTON, J. A., S. T. OLSON, B. FAN und P. G. GETTINS: *Mechanism of heparin activation of antithrombin. Evidence for reactive center loop preinsertion with expulsion upon heparin binding.* Biochemistry, 35(26):8495–8503, Jul 1996.
- [160] CARDIN, A. D. und H. J. WEINTRAUB: *Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions.* Arteriosclerosis, 9(1):21–32, 1989.
- [161] SOBEL, M., D. F. SOLER, J. C. KERMODE und R. B. HARRIS: *Localization and characterization of a heparin binding domain peptide of human von Willebrand factor.* J Biol Chem, 267(13):8857–8862, May 1992.
- [162] HILEMAN, R. E., J. R. FROMM, J. M. WEILER und R. J. LINHARDT: *Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins.* Bioessays, 20(2):156–167, Feb 1998.
- [163] FUNDERBURGH, J. L.: *Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function.* Glycobiology, 10(10):951–958, Oct 2000.
- [164] NG, LAUREL, ALAN J. GRODZINSKY, PARTH PATWARI, JOHN SANDY, ANNA PLAAS und CHRISTINE ORTIZ: *Individual cartilage aggrecan macromolecules and their constituent glycosaminoglycans visualized via atomic force microscopy.* J Struct Biol, 143(3):242–257, Sep 2003.
- [165] CONRAD, H. EDWARD: *Structure of Heparan Sulfate and Dermatan Sulfate.* Annals of the New York Academy of Sciences, 556(1):18–28, 1989.
- [166] SUGAHARA, KAZUYUKI, TADAHISA MIKAMI, TORU UYAMA, SOUHEI MIZUGUCHI, KAZUYA NOMURA und HIROSHI KITAGAWA: *Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate.* Curr Opin Struct Biol, 13(5):612–620, Oct 2003.
- [167] SUGAHARA, KAZUYUKI und HIROSHI KITAGAWA: *Heparin and heparan sulfate biosynthesis.* IUBMB Life, 54(4):163–175, Oct 2002.
- [168] SARRAZIN, STEPHANE, WILLIAM C. LAMANNA und JEFFREY D. ESKO: *Heparan sulfate proteoglycans.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 3(7), Jul 2011.

- [169] MURPHY, KEVIN J., CATHERINE L R. MERRY, MALCOLM LYON, JAMES E. THOMPSON, IAN S. ROBERTS und JOHN T. GALLAGHER: *A new model for the domain structure of heparan sulfate based on the novel specificity of K5 lyase.* J Biol Chem, 279(26):27239–27245, Jun 2004.
- [170] GALLAGHER, J. T., J. E. TURNBULL und M. LYON: *Heparan sulphate proteoglycans: molecular organisation of membrane-associated species and an approach to polysaccharide sequence analysis.* Adv Exp Med Biol, 313:49–57, 1992.
- [171] MACCARANA, M., Y. SAKURA, A. TAWADA, K. YOSHIDA und U. LINDAHL: *Domain structure of heparan sulfates from bovine organs.* J Biol Chem, 271(30):17804–17810, Jul 1996.
- [172] BERNFIELD, M., M. GÖTTE, P. W. PARK, O. REIZES, M. L. FITZGERALD, J. LINCECUM und M. ZAKO: *Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans.* Annu Rev Biochem, 68:729–777, 1999.
- [173] HÄNSEL, RUDOLF, OTTO STICHER und ERNST STEINEGGER: *Pharmakognosie-Phytopharmazie (Springer-Lehrbuch)(German Edition)*, Kapitel 20 Kohlenhydrate III: Aminoglykane und Glykosaminoglykane, Seiten 592–632. Springer Science & Business, 2010.
- [174] CAPILA, ISHAN und ROBERT J. LINHARDT: *Heparin-protein interactions.* Angew Chem Int Ed Engl, 41(3):391–412, Feb 2002.
- [175] HANSON, SARAH R., MICHAEL D. BEST und CHI-HUEY WONG: *Sulfatases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility.* Angew Chem Int Ed Engl, 43(43):5736–5763, Nov 2004.
- [176] SCHMIDT, B., T. SELMER, A. INGENDOH und K. VON FIGURA: *A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency.* Cell, 82(2):271–278, Jul 1995.
- [177] SELMER, T., A. HALLMANN, B. SCHMIDT, M. SUMPER und K. VON FIGURA: *The evolutionary conservation of a novel protein modification, the conversion of cysteine to serinesemialdehyde in arylsulfatase from Volvox carteri.* Eur J Biochem, 238(2):341–345, Jun 1996.

- [178] DIERKS, T., C. MIECH, J. HUMMERJOHANN, B. SCHMIDT, M. A. KERTESZ und K. VON FIGURA: *Posttranslational formation of formylglycine in prokaryotic sulfatases by modification of either cysteine or serine*. J Biol Chem, 273(40):25560–25564, Oct 1998.
- [179] MIECH, C., T. DIERKS, T. SELMER, K. VON FIGURA und B. SCHMIDT: *Arylsulfatase from Klebsiella pneumoniae carries a formylglycine generated from a serine*. J Biol Chem, 273(9):4835–4837, Feb 1998.
- [180] UHLHORN-DIERKS, GUNTHER, THOMAS KOLTER und KONRAD SANDHOFF: *How Does Nature Cleave Sulfuric Acid Esters? A Novel Posttranslational Modification of Sulfatases*. Angewandte Chemie International Edition, 37(18):2453–2455, 1998.
- [181] MÜLLER, ILKA, ANTJE KAHNERT, THOMAS PAPE, GEORGE M. SHELDICK, WOLFRAM MEYER-KLAUCKE, THOMAS DIERKS, MICHAEL KERTESZ und ISABEL USÓN: *Crystal structure of the alkylsulfatase AtsK: insights into the catalytic mechanism of the Fe(II) alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase superfamily*. Biochemistry, 43(11):3075–3088, Mar 2004.
- [182] HAGELUEKEN, GREGOR, THORSTEN M. ADAMS, LUTZ WIEHLMANN, UTE WIDOW, HARALD KOLMAR, BURKHARD TÜMMLER, DIRK W. HEINZ und WOLFDIETER SCHUBERT: *The crystal structure of SdsA1, an alkylsulfatase from Pseudomonas aeruginosa, defines a third class of sulfatases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 103(20):7631–7636, May 2006.
- [183] VON BÜLOW, R., B. SCHMIDT, T. DIERKS, K. VON FIGURA und I. USÓN: *Crystal structure of an enzyme-substrate complex provides insight into the interaction between human arylsulfatase A and its substrates during catalysis*. J Mol Biol, 305(2):269–277, Jan 2001.
- [184] BOLTES, I., H. CZAPINSKA, A. KAHNERT, R. VON BÜLOW, T. DIERKS, B. SCHMIDT, K. VON FIGURA, M. A. KERTESZ und I. USÓN: *1.3 Å structure of arylsulfatase from Pseudomonas aeruginosa establishes the catalytic mechanism of sulfate ester cleavage in the sulfatase family*. Structure, 9(6):483–491, Jun 2001.
- [185] MILZ, FABIAN: *Die humane Sulfatase Sulf1: funktionale, biochemische und biophysikalische Studien zur Interaktion mit dem Substrat Heparansulfat*. Dissertation, Universität Bielefeld (Fakultät für Chemie), 2012.

- [186] NEUFELD, E.F., J. MUENZER: *The metabolic and molecular bases of inherited disease (8th ed.)*, Band III, Kapitel 136. The mucopolysaccharidoses, Seiten 3421–3453. McGraw-Hill Education - Europe, 2001.
- [187] DIEZ-ROUX, GRACIANA und ANDREA BALLABIO: *Sulfatases and human disease*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 6:355–379, 2005.
- [188] SARDIELLO, M., I. ANNUNZIATA, G. ROMA und A. BALLABIO: *Sulfatases and sulfatase modifying factors: an exclusive and promiscuous relationship*. Hum Mol Genet, 14(21):3203–3217, Nov 2005.
- [189] FRESE, MARC-ANDRÉ, STEFANIE SCHULZ und THOMAS DIERKS: *Arylsulfatase G, a novel lysosomal sulfatase*. J Biol Chem, 283(17):11388–11395, Apr 2008.
- [190] KOWALEWSKI, BJÖRN, WILLIAM C. LAMANNA, ROGER LAWRENCE, MARCUS DAMME, STIJN STROOBANTS, MICHAEL PADVA, INA KALUS, MARC-ANDRÉ FRESE, TORBEN LÜBKE, RENATE LÜLLMANN-RAUCH, RUDI D’HOOGE, JEFFREY D. ESKO und THOMAS DIERKS: *Arylsulfatase G inactivation causes loss of heparan sulfate 3-O-sulfatase activity and mucopolysaccharidosis in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 109(26):10310–10315, Jun 2012.
- [191] ANNUNZIATA, IDA, VALENTINA BOUCHÈ, ALESSIA LOMBARDI, CARMINE SETTEMBO und ANDREA BALLABIO: *Multiple sulfatase deficiency is due to hypomorphic mutations of the SUMF1 gene*. Hum Mutat, 28(9):928, Sep 2007.
- [192] VON FIGURA, K., B. SCHMIDT, T. SELMER und T. DIERKS: *A novel protein modification generating an aldehyde group in sulfatases: its role in catalysis and disease*. Bioessays, 20(6):505–510, Jun 1998.
- [193] DHOOT, G. K., M. K. GUSTAFSSON, X. AI, W. SUN, D. M. STANDIFORD und CP EMERSON, JR: *Regulation of Wnt signaling and embryo patterning by an extracellular sulfatase*. Science, 293(5535):1663–1666, Aug 2001.
- [194] OHTO, TATSUYUKI, HIROSHI UCHIDA, HIROSHI YAMAZAKI, KAZUKO KEINOMASU, AKIRA MATSUI und MASAYUKI MASU: *Identification of a novel nonlysosomal sulphatase expressed in the floor plate, choroid plexus and cartilage*. Genes Cells, 7(2):173–185, Feb 2002.

- [195] MORIMOTO-TOMITA, MEGUMI, KENJI UCHIMURA, ZENA WERB, STEFAN HEMMERICH und STEVEN D. ROSEN: *Cloning and characterization of two extracellular heparin-degrading endosulfatases in mice and humans.* J Biol Chem, 277(51):49175–49185, Dec 2002.
- [196] BRAQUART-VARNIER, CHRISTINE, CATHY DANESIN, CATHERINE CLOUSCARD-MARTINATO, ERIC AGIUS, NATHALIE ESCALAS, BERTRAND BENAZERA, XING-BIN AI, CHARLES EMERSON, PHILIPPE COCHARD und CATHY SOULA: *A subtractive approach to characterize genes with regionalized expression in the gliogenic ventral neuroepithelium: identification of chick sulfatase 1 as a new oligodendrocyte lineage gene.* Mol Cell Neurosci, 25(4):612–628, Apr 2004.
- [197] BOWLER, TIMOTHY, DAVID KOSMAN, JONATHAN D. LICHT und LESLIE PICK: *Computational identification of *Ftz/Ftz-F1* downstream target genes.* Dev Biol, 299(1):78–90, Nov 2006.
- [198] FREEMAN, STEPHEN D., WENDY M. MOORE, EMILY C. GUIRAL, ALEXANDRA D. HOLME, JEREMY E. TURNBULL und MARY E. POWNALL: *Extracellular regulation of developmental cell signaling by *XtSulf1*.* Dev Biol, 320(2):436–445, Aug 2008.
- [199] FUJITA, KAZUMASA, ERIKO TAKECHI, NAOAKI SAKAMOTO, NORIKO SUMIYOSHI, SHUNSUKE IZUMI, TATSUO MIYAMOTO, SHINYA MATSUURA, TOKO TSURUGAYA, KOJI AKASAKA und TAKASHI YAMAMOTO: *HpSulf, a heparan sulfate 6-O-endosulfatase, is involved in the regulation of VEGF signaling during sea urchin development.* Mech Dev, 127(3-4):235–245, Apr 2010.
- [200] GORSI, BUSHRA, SIMON WHELAN und SALLY E. STRINGER: *Dynamic expression patterns of 6-O endosulfatases during zebrafish development suggest a subfunctionalisation event for *sulf2*.* Dev Dyn, 239(12):3312–3323, Dec 2010.
- [201] FRESE, MARC-ANDRÉ, FABIAN MILZ, MARINA DICK, WILLIAM C. LAMANNA und THOMAS DIERKS: *Characterization of the human sulfatase *Sulf1* and its high affinity heparin/heparan sulfate interaction domain.* J Biol Chem, 284(41):28033–28044, Oct 2009.
- [202] NAGAMINE, SATOSHI, KAZUKO KEINO-MASU, KENSUKE SHIOMI und MASAYUKI MASU: *Proteolytic cleavage of the rat heparan sulfate 6-O-endosulfatase *SulfP2**

- by furin-type proprotein convertases.* Biochem Biophys Res Commun, 391(1):107–112, Jan 2010.
- [203] AMBASTA, RASHMI K., XINGBIN AI und CHARLES P EMERSON, JR: *Quail Sulf1 function requires asparagine-linked glycosylation.* J Biol Chem, 282(47):34492–34499, Nov 2007.
- [204] ROSEN, STEVEN D. und HASSAN LEMJABBAR-ALAOUI: *Sulf-2: an extracellular modulator of cell signaling and a cancer target candidate.* Expert Opin Ther Targets, 14(9):935–949, Sep 2010.
- [205] AI, XINGBIN, ANH-TRI DO, OLGA LOZYNSKA, MARION KUSCHE-GULLBERG, ULF LINDAHL und CHARLES P EMERSON, JR: *QSulf1 remodels the 6-O sulfation states of cell surface heparan sulfate proteoglycans to promote Wnt signaling.* J Cell Biol, 162(2):341–351, Jul 2003.
- [206] AI, XINGBIN, ANH-TRI DO, MARION KUSCHE-GULLBERG, ULF LINDAHL, KE LU und CHARLES P EMERSON, JR: *Substrate specificity and domain functions of extracellular heparan sulfate 6-O-endosulfatases, QSulf1 and QSulf2.* J Biol Chem, 281(8):4969–4976, Feb 2006.
- [207] TANG, RENHONG und STEVEN D. ROSEN: *Functional consequences of the sub-domain organization of the sulfs.* J Biol Chem, 284(32):21505–21514, Aug 2009.
- [208] GRIGORYAN, GEVORG und AMY E. KEATING: *Structural specificity in coiled-coil interactions.* Curr Opin Struct Biol, 18(4):477–483, Aug 2008.
- [209] <http://groups.csail.mit.edu/cb/paircoil2/>.
- [210] MILZ, FABIAN: *Biochemische und zellbiologische Charakterisierung der Hydrophilen Domäne der humanen Sulfatase Sulf1.* Diplomarbeit, Universität Bielefeld, 2008.
- [211] VIVIANO, BETH L., STEPHENIE PAINE-SAUNDERS, NIJOLE GASUNAS, JOHN GALLAGHER und SCOTT SAUNDERS: *Domain-specific modification of heparan sulfate by QSulf1 modulates the binding of the bone morphogenetic protein antagonist Noggin.* J Biol Chem, 279(7):5604–5611, Feb 2004.

- [212] SAAD, OLA M., HEINER EBEL, KENJI UCHIMURA, STEVEN D. ROSEN, CAROLYN R. BERTOZZI und JULIE A. LEARY: *Compositional profiling of heparin/heparan sulfate using mass spectrometry: assay for specificity of a novel extracellular human endosulfatase*. Glycobiology, 15(8):818–826, Aug 2005.
- [213] LAMANNA, WILLIAM C., MARC-ANDRÉ FRESE, MARTINA BALLEININGER und THOMAS DIERKS: *Sulf loss influences N-, 2-O-, and 6-O-sulfation of multiple heparan sulfate proteoglycans and modulates fibroblast growth factor signaling*. J Biol Chem, 283(41):27724–27735, Oct 2008.
- [214] STAPLES, GREGORY O., XIAOFENG SHI und JOSEPH ZAIA: *Glycomics analysis of mammalian heparan sulfates modified by the human extracellular sulfatase HSulf2*. PLoS One, 6(2):e16689, 2011.
- [215] AI, XINGBIN, TOSHIO KITAZAWA, ANH-TRI DO, MARION KUSCHE-GULLBERG, PATRICIA A. LABOSKY und CHARLES P EMERSON, JR: *SULF1 and SULF2 regulate heparan sulfate-mediated GDNF signaling for esophageal innervation*. Development, 134(18):3327–3338, Sep 2007.
- [216] WANG, SHOUWEN, XINGBIN AI, STEPHEN D. FREEMAN, MARY E. POWNALL, QUN LU, DANIEL S. KESSLER und CHARLES P EMERSON, JR: *QSulf1, a heparan sulfate 6-O-endosulfatase, inhibits fibroblast growth factor signaling in mesoderm induction and angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 101(14):4833–4838, Apr 2004.
- [217] UCHIMURA, KENJI, MEGUMI MORIMOTO-TOMITA, ANNETTE BISTRUP, JESSICA LI, MALCOLM LYON, JOHN GALLAGHER, ZENA WERB und STEVEN D. ROSEN: *HSulf-2, an extracellular endoglycosamine-6-sulfatase, selectively mobilizes heparin-bound growth factors and chemokines: effects on VEGF, FGF-1, and SDF-1*. BMC Biochem, 7:2, 2006.
- [218] SALA-NEWBY, GRACIELA B., SARAH J. GEORGE, MARK BOND, GURTEJ K. DHOOT und ANDREW C. NEWBY: *Regulation of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and death by heparan sulfate 6-O-endosulfatase1*. FEBS Lett, 579(28):6493–6498, Nov 2005.
- [219] DANESIN, CATHY, ERIC AGIUS, NATHALIE ESCALAS, XINGBIN AI, CHARLES EMERSON, PHILIPPE COCHARD und CATHY SOULA: *Ventral neural progenitors*

- switch toward an oligodendroglial fate in response to increased Sonic hedgehog (Shh) activity: involvement of Sulfatase 1 in modulating Shh signaling in the ventral spinal cord.* J Neurosci, 26(19):5037–5048, May 2006.
- [220] KALUS, INA, BENEDIKT SALMEN, CHRISTOPH VIEBAHN, KURT VON FIGURA, DIETMAR SCHMITZ, RUDI D’HOOGE und THOMAS DIERKS: *Differential involvement of the extracellular 6-O-endosulfatases Sulf1 and Sulf2 in brain development and neuronal and behavioural plasticity.* J Cell Mol Med, 13(11-12):4505–4521, 2009.
- [221] ZHAO, WANFENG, GRACIELA B. SALA-NEWBY und GURTEJ K. DHOOT: *Sulf1 expression pattern and its role in cartilage and joint development.* Dev Dyn, 235(12):3327–3335, Dec 2006.
- [222] OTSUKI, SHUHEI, SARAH R. HANSON, SHIGERU MIYAKI, SHAWN P. GROGAN, MITSUO KINOSHITA, HIROSHI ASAHARA, CHI-HUEY WONG und MARTIN K. LOTZ: *Extracellular sulfatases support cartilage homeostasis by regulating BMP and FGF signaling pathways.* Proc Natl Acad Sci U S A, 107(22):10202–10207, Jun 2010.
- [223] LAI, JINPING, JEREMY CHIEN, JULIE STAUB, RAJESWARI AVULA, EDDIE L. GREENE, TORI A. MATTHEWS, DAVID I. SMITH, SCOTT H. KAUFMANN, LEWIS R. ROBERTS und VIJI SHRIDHAR: *Loss of HSulf-1 up-regulates heparin-binding growth factor signaling in cancer.* J Biol Chem, 278(25):23107–23117, Jun 2003.
- [224] LAI, JIN-PING, JEREMY R. CHIEN, DAVID R. MOSER, JULIE K. STAUB, ILEANA ADERCA, DAMIAN P. MONTOYA, TORI A. MATTHEWS, DAVID M. NAGORNEY, JULIE M. CUNNINGHAM, DAVID I. SMITH, EDDIE L. GREENE, VIJI SHRIDHAR und LEWIS R. ROBERTS: *hSulf1 Sulfatase promotes apoptosis of hepatocellular cancer cells by decreasing heparin-binding growth factor signaling.* Gastroenterology, 126(1):231–248, Jan 2004.
- [225] LAI, JIN-PING, JEREMY CHIEN, SCOTT E. STROME, JULIE STAUB, DAMIAN P. MONTOYA, EDDIE L. GREENE, DAVID I. SMITH, LEWIS R. ROBERTS und VIJI SHRIDHAR: *HSulf-1 modulates HGF-mediated tumor cell invasion and signaling in head and neck squamous carcinoma.* Oncogene, 23(7):1439–1447, Feb 2004.

- [226] LAI, JIN-PING, DALBIR S. SANDHU, CHUNRONG YU, TAO HAN, CATHERINE D. MOSER, KENARD K. JACKSON, RUBEN BONILLA GUERRERO, ILEANA ADERCA, HAJIME ISOMOTO, MEGAN M. GARRITY-PARK, HONGZHI ZOU, ABDIRASHID M. SHIRE, DAVID M. NAGORNEY, SCHUYLER O. SANDERSON, ALEX A. ADJEI, JU-SEOG LEE, SNORRI S. THORGEIRSSON und LEWIS R. ROBERTS: *Sulfatase 2 up-regulates glypican 3, promotes fibroblast growth factor signaling, and decreases survival in hepatocellular carcinoma.* Hepatology, 47(4):1211–1222, Apr 2008.
- [227] MORIMOTO-TOMITA, MEGUMI, KENJI UCHIMURA, ANNETTE BISTRUP, DAVID H. LUM, MIKALA EGEBLAD, NANCY BOUDREAU, ZENA WERB und STEVEN D. ROSEN: *Sulf-2, a proangiogenic heparan sulfate endosulfatase, is upregulated in breast cancer.* Neoplasia, 7(11):1001–1010, Nov 2005.
- [228] LI, JUNSHENG, JÖRG KLEEFF, IVANE ABIATARI, HANY KAYED, NATHALIA A. GIESE, KLAUS FELIX, THOMAS GIESE, MARKUS W. BÜCHLER und HELMUT FRIESS: *Enhanced levels of Hsulf-1 interfere with heparin-binding growth factor signaling in pancreatic cancer.* Mol Cancer, 4(1):14, 2005.
- [229] DAHL, EDGAR, GLEN KRISTIANSEN, KATHRIN GOTTLÖB, IRINA KLAMAN, ELKE EBNER, BERND HINZMANN, KLAUS HERMANN, CHRISTIAN PILARSKY, MATTHIAS DÜRST, MONIKA KLINKHAMMER-SCHALKE, HAGEN BLASZYK, RUTH KNUECHEL, ARNDT HARTMANN, ANDRÉ ROSENTHAL und PETER J. WILD: *Molecular profiling of laser-microdissected matched tumor and normal breast tissue identifies karyopherin alpha2 as a potential novel prognostic marker in breast cancer.* Clin Cancer Res, 12(13):3950–3960, Jul 2006.
- [230] NARITA, KEISHI, JEREMY CHIEN, SALLY A. MULLANY, JULIE STAUB, XIANG QIAN, WILMA L. LINGLE und VIJI SHRIDHAR: *Loss of HSulf-1 expression enhances autocrine signaling mediated by amphiregulin in breast cancer.* J Biol Chem, 282(19):14413–14420, May 2007.
- [231] BACKEN, A. C., C. L. COLE, S. C. LAU, A. R. CLAMP, R. MCVEY, J. T. GALLAGHER und G. C. JAYSON: *Heparan sulphate synthetic and editing enzymes in ovarian cancer.* Br J Cancer, 96(10):1544–1548, May 2007.
- [232] ZHAO, WANFENG, STEVE ALLEN und GURTEJ K. DHOOT: *FGF mediated Sulf1 regulation.* FEBS Lett, 581(25):4960–4964, Oct 2007.

- [233] NAWROTH, ROMAN, ANNEMIEKE VAN ZANTE, SARA CERVANTES, MICHAEL McMANUS, MATTHIAS HEBROK und STEVEN D. ROSEN: *Extracellular sulfatases, elements of the Wnt signaling pathway, positively regulate growth and tumorigenicity of human pancreatic cancer cells.* PLoS One, 2(4):e392, 2007.
- [234] CASTRO, NADIA P., CYNTHIA A B T. OSÓRIO, CÉSAR TORRES, ELEN P. BASTOS, MÁRIO MOURÃO-NETO, FERNANDO A. SOARES, HELENA P. BRENTANI und DIRCE M. CARRARO: *Evidence that molecular changes in cells occur before morphological alterations during the progression of breast ductal carcinoma.* Breast Cancer Res, 10(5):R87, 2008.
- [235] MATUSIEWICZ, MALGORZATA, MALGORZATA KRZYSZTEK-KORPACKA, DOROTA DIAKOWSKA, KRZYSZTOF GRABOWSKI, KATARZYNA AUGOFF, KATARZYNA BLACHUT, LESZEK PARADOWSKI, IRENA KUSTRZEBIA-WOJCICKA, MICHAL PIAST und TERESA BANAS: *Serum sulfatase activity is more elevated in colonic adenomas than cancers.* Int J Colorectal Dis, 23(4):383–387, Apr 2008.
- [236] BRET, CAROLINE, DIRK HOSE, THIERRY REME, ANNE-CATHERINE SPRYNSKI, KARÈNE MAHTOUK, JEAN-FRANÇOIS SCHVED, PHILIPPE QUITTET, JEAN-FRANÇOIS ROSSI, HARTMUT GOLDSCHMIDT und BERNARD KLEIN: *Expression of genes encoding for proteins involved in heparan sulphate and chondroitin sulphate chain synthesis and modification in normal and malignant plasma cells.* Br J Haematol, 145(3):350–368, May 2009.
- [237] BRET, CAROLINE, JÉRÔME MOREAUX, JEAN-FRANÇOIS SCHVED, DIRK HOSE und BERNARD KLEIN: *SULFs in human neoplasia: implication as progression and prognosis factors.* J Transl Med, 9:72, 2011.
- [238] LEMJABBAR-ALAOUI, HASSAN, VIJAY DASARI, SUKHVINDER S. SIDHU, AKLILU MENGISTAB, WALTER FINKBEINER, MARIANNE GALLUP und CAROL BASBAUM: *Wnt and Hedgehog are critical mediators of cigarette smoke-induced lung cancer.* PLoS One, 1:e93, 2006.
- [239] LEMJABBAR-ALAOUI, H., A. VAN ZANTE, M. S. SINGER, Q. XUE, Y-Q. WANG, D. TSAY, B. HE, D. M. JABLONS und S. D. ROSEN: *Sulf-2, a heparan sulfate endosulfatase, promotes human lung carcinogenesis.* Oncogene, 29(5):635–646, Feb 2010.

- [240] JUNNILA, SIINA, ARTO KOKKOLA, TORU MIZUGUCHI, KOICHI HIRATA, MARJA-LIISA KARJALAINEN-LINDSBERG, PAULI PUOLAKKAINEN und OUTI MONNI: *Gene expression analysis identifies over-expression of CXCL1, SPARC, SPP1, and SULF1 in gastric cancer.* Genes Chromosomes Cancer, 49(1):28–39, Jan 2010.
- [241] LAI, JIN-PING, DALBIR S. SANDHU, ABDIRASHID M. SHIRE und LEWIS R. ROBERTS: *The tumor suppressor function of human sulfatase 1 (SULF1) in carcinogenesis.* J Gastrointest Cancer, 39(1-4):149–158, 2008.
- [242] YANG, JU DONG, ZHIFU SUN, CHUNLING HU, JINPING LAI, REBECCA DOVE, IKUO NAKAMURA, JU-SEOG LEE, SNORRI S. THORGEIRSSON, KOO JEONG KANG, IN-SUN CHU und LEWIS R. ROBERTS: *Sulfatase 1 and sulfatase 2 in hepatocellular carcinoma: associated signaling pathways, tumor phenotypes, and survival.* Genes Chromosomes Cancer, 50(2):122–135, Feb 2011.
- [243] TESSEMA, MATHEWOS, YANG Y. YU, CHRISTINE A. STIDLEY, EMI O. MACHIDA, KORNEL E. SCHUEBEL, STEPHEN B. BAYLIN und STEVEN A. BELINSKY: *Concomitant promoter methylation of multiple genes in lung adenocarcinomas from current, former and never smokers.* Carcinogenesis, 30(7):1132–1138, Jul 2009.
- [244] STEINERT, P. M., L. N. MAREKOV und D. A. PARRY: *Diversity of intermediate filament structure. Evidence that the alignment of coiled-coil molecules in vimentin is different from that in keratin intermediate filaments.* J Biol Chem, 268(33):24916–24925, Nov 1993.
- [245] FUCHS, E. und K. WEBER: *Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease.* Annu Rev Biochem, 63:345–382, 1994.
- [246] HERRMANN, H. und U. AEBI: *Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics.* Curr Opin Cell Biol, 12(1):79–90, Feb 2000.
- [247] HERRMANN, HARALD, HARALD BÄR, LAURENT KREPLAK, SERGEI V. STRELKOV und UELI AEBI: *Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics.* Nat Rev Mol Cell Biol, 8(7):562–573, Jul 2007.
- [248] HERRMANN, HARALD, SERGEI V. STRELKOV, PETER BURKHARD und UELI AEBI: *Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity.* J Clin Invest, 119(7):1772–1783, Jul 2009.

- [249] SZEVERENYI, ILDIKO, ANDREW J. CASSIDY, CHEUK WANG CHUNG, BERNETT T K. LEE, JOHN E A. COMMON, STEPHEN C. OGG, HUIJIA CHEN, SHU YIN SIM, WALTER L P. GOH, KEE WOEI NG, JOHN A. SIMPSON, LI LIAN CHEE, GOI HUI ENG, BIN LI, DECLAN P. LUNNY, DANNY CHUON, APARNA VENKATESH, KIAN HOE KHOO, W H IRWIN MCLEAN, YUN PING LIM und E BIRGITTE LANE: *The Human Intermediate Filament Database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases.* Hum Mutat, 29(3):351–360, Mar 2008.
- [250] ERIKSSON, JOHN E., THOMAS DECHAT, BORIS GRIN, BRIAN HELFAND, ME-LISSA MENDEZ, HANNA-MARI PALLARI und ROBERT D. GOLDMAN: *Introducing intermediate filaments: from discovery to disease.* J Clin Invest, 119(7):1763–1771, Jul 2009.
- [251] THOMPSON, B. J. und T. NIHEI: *Isolation of F-actin filaments. Comparison of F-actin filament preparations from normal and dystrophic mouse muscle.* Biochim Biophys Acta, 578(2):428–435, Jun 1979.
- [252] WADE, RICHARD H.: *Microtubules: an overview.* Methods Mol Med, 137:1–16, 2007.
- [253] ISHIKAWA, H., R. BISCHOFF und H. HOLTZER: *Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle.* J Cell Biol, 38(3):538–555, Sep 1968.
- [254] HYNES, R. O. und A. T. DESTREE: *10 nm filaments in normal and transformed cells.* Cell, 13(1):151–163, Jan 1978.
- [255] KIRMSE, ROBERT, ZHAO QIN, CARL M. WEINERT, ANDREAS HOENGER, ANDREA HOENGER, MARKUS J. BUEHLER und LAURENT KREPLAK: *Plasticity of intermediate filament subunits.* PLoS One, 5(8):e12115, 2010.
- [256] KIRMSE, ROBERT, STEPHANIE PORTET, NORBERT MÜCKE, UELI AEBI, HARALD HERRMANN und JÖRG LANGOWSKI: *A quantitative kinetic model for the in vitro assembly of intermediate filaments from tetrameric vimentin.* J Biol Chem, 282(25):18563–18572, Jun 2007.
- [257] SOKOLOVA, ANNA V., LAURENT KREPLAK, TATJANA WEDIG, NORBERT MÜCKE, DMITRI I. SVERGUN, HARALD HERRMANN, UELI AEBI und SERGEI V.

- STRELKOV: *Monitoring intermediate filament assembly by small-angle x-ray scattering reveals the molecular architecture of assembly intermediates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 103(44):16206–16211, Oct 2006.
- [258] BRENNICH, MARTHA ELISABETH, JENS-FRIEDRICH NOLTING, CHRISTIAN DAMMANN, BERND NÖDING, SUSANNE BAUCH, HARALD HERRMANN, THOMAS PFOHL und SARAH KÖSTER: *Dynamics of intermediate filament assembly followed in micro-flow by small angle X-ray scattering*. Lab Chip, 11(4):708–716, Feb 2011.
- [259] GEISLER, N., E. KAUFMANN und K. WEBER: *Antiparallel orientation of the two double-stranded coiled-coils in the tetrameric protofilament unit of intermediate filaments*. J Mol Biol, 182(1):173–177, Mar 1985.
- [260] KISS, BALÁZS, PÁL RÖHLICH und MIKLÓS S Z. KELLERMAYER: *Structure and elasticity of desmin protofibrils explored with scanning force microscopy*. J Mol Recognit, 24(6):1095–1104, 2011.
- [261] HERRMANN, HARALD und UELI AEBI: *Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds*. Annu Rev Biochem, 73:749–789, 2004.
- [262] MILNER, D. J., G. WEITZER, D. TRAN, A. BRADLEY und Y. CAPETANAKI: *Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin*. J Cell Biol, 134(5):1255–1270, Sep 1996.
- [263] BÄR, HARALD, SERGEI V. STRELKOV, GUNNAR SJÖBERG, UELI AEBI und HARALD HERRMANN: *The biology of desmin filaments: how do mutations affect their structure, assembly, and organisation?* J Struct Biol, 148(2):137–152, Nov 2004.
- [264] LUND, LINDA M., JACLYN P. KERR, JENNA LUPINETTI, YINGHUA ZHANG, MARY A. RUSSELL, ROBERT J. BLOCH und MEREDITH BOND: *Synemin isoforms differentially organize cell junctions and desmin filaments in neonatal cardiomyocytes*. FASEB J, 26(1):137–148, Jan 2012.
- [265] LAPOUGE, KARINE, LIONEL FONTAO, MARIE-FRANCE CHAMPLIAUD, FABIENNE JAUNIN, MIGUEL A. FRIAS, BERTRAND FAVRE, DENISE PAULIN, KATHLEEN J. GREEN und LUCA BORRADORI: *New insights into the molecular basis of*

- desmoplakin- and desmin-related cardiomyopathies.* J Cell Sci, 119(Pt 23):4974–4985, Dec 2006.
- [266] LOCKARD, V. G. und S. BLOOM: *Trans-cellular desmin-lamin B intermediate filament network in cardiac myocytes.* J Mol Cell Cardiol, 25(3):303–309, Mar 1993.
- [267] CAPETANAKI, YASSEMI: *Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function.* Trends Cardiovasc Med, 12(8):339–348, Nov 2002.
- [268] HIJIKATA, TAKAO, AKIO NAKAMURA, KEITARO ISOKAWA, MICHIIRO IMA-MURA, KATSUTOSHI YUASA, RYOKI ISHIKAWA, KAZUHIRO KOHAMA, SHINICHI TAKEDA und HIROSHI YORIFUJI: *Plectin 1 links intermediate filaments to cost-americ sarcolemma through beta-synemin, alpha-dystrobrevin and actin.* J Cell Sci, 121(Pt 12):2062–2074, Jun 2008.
- [269] LAZARIDES, E. und B. D. HUBBARD: *Immunological characterization of the subunit of the 100 Å filaments from muscle cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 73(12):4344–4348, Dec 1976.
- [270] NAKASHIMA, N., Z. TAMURA, S. OKAMOTO und H. GOTO: *Inclusion bodies in human neuromuscular disorder.* Arch Neurol, 22(3):270–278, Mar 1970.
- [271] KINOSHITA, M., E. SATOYOSHI und N. MATSUO: *"Myotubular Myopathy and "type I fiber atrophy in a family.* J Neurol Sci, 26(4):575–582, Dec 1975.
- [272] GOEBEL, H. H., J. MULLER, H. W. GILLEN und A. D. MERRITT: *Autosomal dominant spheroïd body myopathy*. Muscle Nerve, 1(1):14–26, 1978.
- [273] CALDERON, A., L. E. BECKER und E. G. MURPHY: *Subsarcolemmal vermiciform deposits in skeletal muscle, associated with familial cardiomyopathy: report of two cases of a new entity.* Pediatr Neurosci, 13(2):108–112, 1987.
- [274] GOEBEL, H. H.: *Desmin-related myopathies.* Curr Opin Neurol, 10(5):426–429, Oct 1997.
- [275] GOLDFARB, LEV G. und MARINOS C. DALAKAS: *Tragedy in a heartbeat: malfunctioning desmin causes skeletal and cardiac muscle disease.* J Clin Invest, 119(7):1806–1813, Jul 2009.

- [276] VIEGAS-PÉQUIGNOT, E., Z. L. LI, B. DUTRILLAUX, F. APIOU und D. PAULIN: *Assignment of human desmin gene to band 2q35 by nonradioactive in situ hybridization*. Hum Genet, 83(1):33–36, Aug 1989.
- [277] LI, Z. L., A. LILIENBAUM, G. BUTLER-BROWNE und D. PAULIN: *Human desmin-coding gene: complete nucleotide sequence, characterization and regulation of expression during myogenesis and development*. Gene, 78(2):243–254, May 1989.
- [278] GOLDFARB, LEV G., MONTSE OLIVÉ, PATRICK VICART und HANS H. GOEBEL: *Intermediate filament diseases: desminopathy*. Adv Exp Med Biol, 642:131–164, 2008.
- [279] BÄR, HARALD, NORBERT MÜCKE, HUGO A. KATUS, UELI AEBI und HARALD HERRMANN: *Assembly defects of desmin disease mutants carrying deletions in the alpha-helical rod domain are rescued by wild type protein*. J Struct Biol, 158(1):107–115, Apr 2007.
- [280] MAYER, ADOLF: *Über die Mosaikkrankheit des Tabaks*. Die Landwirtschaftliche Versuchs-stationen, 32:451–467, 1886. Translated into English in Johnson, J., Ed. Phytopathological classics (St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society) No. 7, pp. 11–24, 1942.
- [281] IWANOWSKI, D: *Über die Mosaikkrankheit der Tabakspflanze*. Bulletin Scientifique publié par l'Académie Impériale des Sciences de Saint-Pétersbourg / Nouvelle Serie III, 35:67–70, 1892. Translated into English in Johnson, J., Ed. Phytopathological classics (St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society) No. 7, pp. 27–30, 1942.
- [282] CASPAR, D. L.: *Assembly and stability of the tobacco mosaic virus particle*. Adv Protein Chem, 18:37–121, 1963.
- [283] KLUG, A.: *The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 354(1383):531–535, Mar 1999.
- [284] BÖRNER, HORST, KLAUS SCHLÜTER und JENS AUMANN: *Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, Band 1, Kapitel Viren, Seiten 23–42. Springer-Lehrbuch, 2009.

- [285] GERASOPOULOS, KONSTANTINOS, MATTHEW McCARTHY, ELIZABETH ROYSTON, JAMES N CULVER und REZA GHODSSI: *Nanostructured nickel electrodes using the Tobacco mosaic virus for microbattery applications*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 18(10):104003, 2008.
- [286] ATANASOVA, PETIA, DIRK ROTHENSTEIN, JÖRG J. SCHNEIDER, RUDOLF C. HOFFMANN, STEFAN DILFER, SABINE EIBEN, CHRISTINA WEGE, HOLGER JESKE und JOACHIM BILL: *Virus-templated synthesis of ZnO nanostructures and formation of field-effect transistors*. Adv Mater, 23(42):4918–4922, Nov 2011.
- [287] MILZ, FABIAN, ALEXANDER HARDER, PHILLIPP NEUHAUS, OLGA BREITKREUZ-KORFF, VOLKER WALHORN, TORBEN LÜBKE, DARIO ANSELMETTI und THOMAS DIERKS: *Cooperation of binding sites at the hydrophilic domain of cell-surface sulfatase Sulf1 allows for dynamic interaction of the enzyme with its substrate heparan sulfate*. Biochim Biophys Acta, 1830(11):5287–5298, Nov 2013.
- [288] BREITKREUZ-KORFF, OLGA: *Die Hydrophile Domäne der humanen Sulfatase Sulf1: Präparative Darstellung und Analyse ihrer Interaktion mit Glykosaminoglykanen*. Diplomarbeit, Universität Bielefeld, 2010.
- [289] YIGIT, S.: *Umklonierung der etablierten GST-Konstrukte der Hydrophilen Domäne zu MBP-Fusionsproteinen und Bindungsaffinitäten an Heparansulfat*. Diplomarbeit, Universität Bielefeld, 2010.
- [290] KOLB, A. F. und S. G. SIDDELL: *Genomic targeting with an MBP-Cre fusion protein*. Gene, 183(1-2):53–60, Dec 1996.
- [291] OSMOND, RONALD I W., WARREN C. KETT, SPENCER E. SKETT und DEIRDRE R. COOMBE: *Protein-heparin interactions measured by BIAcore 2000 are affected by the method of heparin immobilization*. Anal Biochem, 310(2):199–207, Nov 2002.
- [292] HEGNER, M., P. WAGNER und G. SEMENZA: *Ultralarge atomically flat template-stripped Au surfaces for scanning probe microscopy*. Surface science, 291:39–46, 1993.

- [293] LOMANT, A. J. und G. FAIRBANKS: *Chemical probes of extended biological structures: synthesis and properties of the cleavable protein cross-linking reagent [³⁵S]dithiobis(succinimidyl propionate)*. J Mol Biol, 104(1):243–261, Jun 1976.
- [294] STAROS, JAMES V.: *Membrane-impermeant crosslinking reagents: probes of the structure and dynamics of membrane proteins*. Acc. Chem. Res., 21 (12):435–441, 1988.
- [295] CUATRECASAS, P. und I. PARIKH: *Adsorbents for affinity chromatography. Use of N-hydroxysuccinimide esters of agarose*. Biochemistry, 11(12):2291–2299, Jun 1972.
- [296] GOODING, JR, GV und T. T. HEBERT: *A simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large quantities*. Phytopathology, 57(11):1285, Nov 1967.
- [297] GEIGER, FANIA C., FABIAN J. EBER, SABINE EIBEN, ANNA MUELLER, HOLGER JESKE, JOACHIM P. SPATZ und CHRISTINA WEGE: *TMV nanorods with programmed longitudinal domains of differently addressable coat proteins*. Nanoscale, 5(9):3808–3816, May 2013.
- [298] WINHEIM, STEFAN, AARON R. HIEB, MARLEEN SILBERMANN, EVA-MARIA SURMANN, TATJANA WEDIG, HARALD HERRMANN, JÖRG LANGOWSKI und NORBERT MÜCKE: *Deconstructing the late phase of vimentin assembly by total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM)*. PLoS One, 6(4):e19202, 2011.
- [299] FRITZ, JÜRGEN, DARIO ANSELMETTI, JANINA JARCHOW und XAVIER FERNÀNDEZ-BUSQUETS: *Probing Single Biomolecules with Atomic Force Microscopy*. Journal of Structural Biology, 119(2):165 – 171, 1997.
- [300] GARCIA-MANYES, S., I. BUCIOR, R. ROS, D. ANSELMETTI, F. SANZ, M. M. BURGER und X. FERNÀNDEZ-BUSQUETS: *Proteoglycan Mechanics Studied by Single-molecule Force Spectroscopy of Allotypic Cell Adhesion Glycans*. Journal of Biological Chemistry, 281:5992–5999, 2006.
- [301] SENO, N., K. ANNO, Y. YAEGASHI und T. OKUYAMA: *Microheterogeneity of chondroitin sulfates from various cartilages*. Connect Tissue Res, 3(1):87–96, 1975.

- [302] FALTYNEK, C. R. und J. E. SILBERT: *Copolymers of chondroitin 4-sulfate and chondroitin 6-sulfate in chick embryo epiphyses and other cartilage.* J Biol Chem, 253(21):7646–7649, Nov 1978.
- [303] KNUDSON, W., M. W. GUNDLACH, T. M. SCHMID und H. E. CONRAD: *Selective hydrolysis of chondroitin sulfates by hyaluronidase.* Biochemistry, 23(2):368–375, Jan 1984.
- [304] SUZUKI, S., H. SAITO, T. YAMAGATA, K. ANNO, N. SENO, Y. KAWAI und T. FURUHASHI: *Formation of three types of disulfated disaccharides from chondroitin sulfates by chondroitinase digestion.* J Biol Chem, 243(7):1543–1550, Apr 1968.
- [305] BARTOLO, DENIS, IMRE DERÉNYI und ARMAND AJDARI: *Dynamic response of adhesion complexes: beyond the single-path picture.* Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 65(5 Pt 1):051910, May 2002.
- [306] KLEPEIS, JOHN L., KRESTEN LINDORFF-LARSEN, RON O. DROR und DAVID E. SHAW: *Long-timescale molecular dynamics simulations of protein structure and function.* Curr Opin Struct Biol, 19(2):120–127, Apr 2009.
- [307] LEE, JENNIFER C., I-JY CHANG, HARRY B. GRAY und JAY R. WINKLER: *The cytochrome c folding landscape revealed by electron-transfer kinetics.* J Mol Biol, 320(2):159–164, Jul 2002.
- [308] YANG, WEI YUAN und MARTIN GRUEBELE: *Folding at the speed limit.* Nature, 423(6936):193–197, May 2003.
- [309] MÖLLER, ANN-KRISTIN: *Dynamische Kraftspektroskopie an Heparansulfat-Sulfatase-Interaktion zum Nachweis ihres Catch Bond-Verhaltens.* Diplomarbeit, Universität Bielefeld, 2014.
- [310] JIANG, LIN und LUHUA LAI: *CH...O hydrogen bonds at protein-protein interfaces.* J Biol Chem, 277(40):37732–37740, Oct 2002.
- [311] LEE, CHO-YIN, JIZHONG LOU, KUO-KUANG WEN, MELISSA MCKANE, SUZANNE G. ESKIN, SHOICHIRO ONO, SHU CHIEN, PETER A. RUBENSTEIN, CHENG ZHU und LARRY V. MCINTIRE: *Actin depolymerization under force is governed*

by lysine 113:glutamic acid 195-mediated catch-slip bonds. Proc Natl Acad Sci U S A, 110(13):5022–5027, Mar 2013.

- [312] ANGER, PASCAL, PALASH BHARADWAJ und LUKAS NOVOTNY: *Enhancement and quenching of single-molecule fluorescence*. Phys Rev Lett, 96(11):113002, Mar 2006.
- [313] ECKEL, RAINER, VOLKER WALHORN, CHRISTOPH PELARGUS, JÖRG MARTINI, JÖRG ENDERLEIN, THOMAS NANN, DARIO ANSELMETTI und ROBERT ROS: *Fluorescence-emission control of single CdSe nanocrystals using gold-modified AFM tips*. Small, 3(1):44–49, Jan 2007.
- [314] ZHANG, D., U. HEINEMEYER, C. STANCIU, M. SACKROW, K. BRAUN, L. E. HENNEMANN, X. WANG, R. SCHOLZ, F. SCHREIBER und A. J. MEIXNER: *Nanoscale spectroscopic imaging of organic semiconductor films by plasmon-polariton coupling*. Phys Rev Lett, 104(5):056601, Feb 2010.
- [315] YOSKOVITZ, EYAL, IDO HADAR, AMIT SITT, ITAI LIEBERMAN und URI BANIN: *Interplay of quenching and enhancement effects in apertureless near-field fluorescence imaging of single nanoparticles*. The Journal of Physical Chemistry C, 115(32):15834–15844, 2011.
- [316] GERSEN, H., M. F. GARCÍA-PARAJÓ, L. NOVOTNY, J. A. VEERMAN, L. KUIPERS und VAN HULST NF: *Influencing the angular emission of a single molecule*. Phys Rev Lett, 85(25):5312–5315, Dec 2000.
- [317] FREY, HEINRICH G., SUSANNE WITT, KARIN FELDERER und REINHARD GUCKENBERGER: *High-resolution imaging of single fluorescent molecules with the optical near-field of a metal tip*. Phys Rev Lett, 93(20):200801, Nov 2004.
- [318] AMBROSE, E. J.: *A surface contact microscope for the study of cell movements*. Nature, 178(4543):1194, Nov 1956.
- [319] HARDER, ALEXANDER, MAREIKE DIEDING, VOLKER WALHORN, SVEN DEGENHARD, ANDREAS BRODEHL, CHRISTINA WEGE, HENDRIK MILTING und DARIO ANSELMETTI: *Apertureless scanning near-field optical microscopy of sparsely labeled tobacco mosaic viruses and the intermediate filament desmin*. Beilstein J Nanotechnol, 4:510–516, 2013.

- [320] MA, ZIYANG, JORDAN M. GERTON, LAWRENCE A. WADE und STEPHEN R. QUAKE: *Fluorescence near-field microscopy of DNA at sub-10 nm resolution*. Phys Rev Lett, 97(26):260801, Dec 2006.
- [321] SCHULZ, OLAF, ZHAO ZHAO, ALEX WARD, MARCELLE KOENIG, FELIX KÖBERLING, YAN LIU, JÖRG ENDERLEIN, HAO YAN und ROBERT ROS: *Tip induced fluorescence quenching for nanometer optical and topographical resolution*. Optical Nanoscopy, 2(1):1–8, 2013.
- [322] BRODEHL, ANDREAS, PER NIKLAS HEDDE, MAREIKE DIEDING, AZRA FATIMA, VOLKER WALHORN, SUSAN GAYDA, TOMO ŠARIĆ, BÄRBEL KLAUKE, JAN GUMMERT, DARIO ANSELMETTI, MIKE HEILEMANN, GERD ULRICH NIENHAUS und HENDRIK MILTING: *Dual color photoactivation localization microscopy of cardiomyopathy-associated desmin mutants*. J Biol Chem, 287(19):16047–16057, May 2012.
- [323] BRODEHL, ANDREAS, MAREIKE DIEDING, HAMDIN CAKAR, BÄRBEL KLAUKE, VOLKER WALHORN, JAN GUMMERT, DARIO ANSELMETTI und HENDRIK MILTING: *Functional characterization of desmin mutant p.P419S*. Eur J Hum Genet, 21(6):589–590, Jun 2013.
- [324] BRODEHL, ANDREAS, MAREIKE DIEDING, BÄRBEL KLAUKE, ERIC DEC, SHRESTHA MADAAN, TAOSHENG HUANG, JOHN GARGUS, AZRA FATIMA, TOMO SARIC, HAMDIN CAKAR, VOLKER WALHORN, KATJA TÖNSING, TIM SKRZIPCZYK, RAMONA CEBULLA, DÉSIRÉE GERDES, UWE SCHULZ, JAN GUMMERT, JESPER HASTRUP SVENDSEN, MORTEN SALLING OLESEN, DARIO ANSELMETTI, ALEX HØRBØY CHRISTENSEN, VIRGINIA KIMONIS und HENDRIK MILTING: *The Novel Desmin Mutant p.A120D Impairs Filament Formation, Prevents Intercalated Disk Localization, and Causes Sudden Cardiac Death*. Circ Cardiovasc Genet, 6(6):615–623, Dec 2013.
- [325] LODISH, H., A. BERK, S. L. ZIPURSKY, P. MATSUDAIRA, D. BALTIMORE und J. E. DARNELL: *Molekulare Zellbiologie*. Spektrum, 2001.

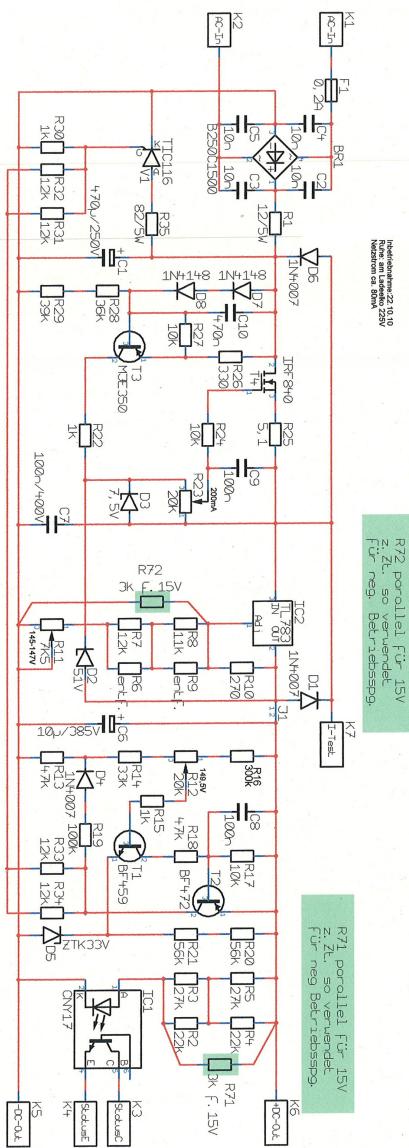
Appendix

Schaltpläne für den Piezo-Treiber



X-Y-Z Piezo-Driver
Z.Zt.: 0 - 145 V

-145V - +145V möglich

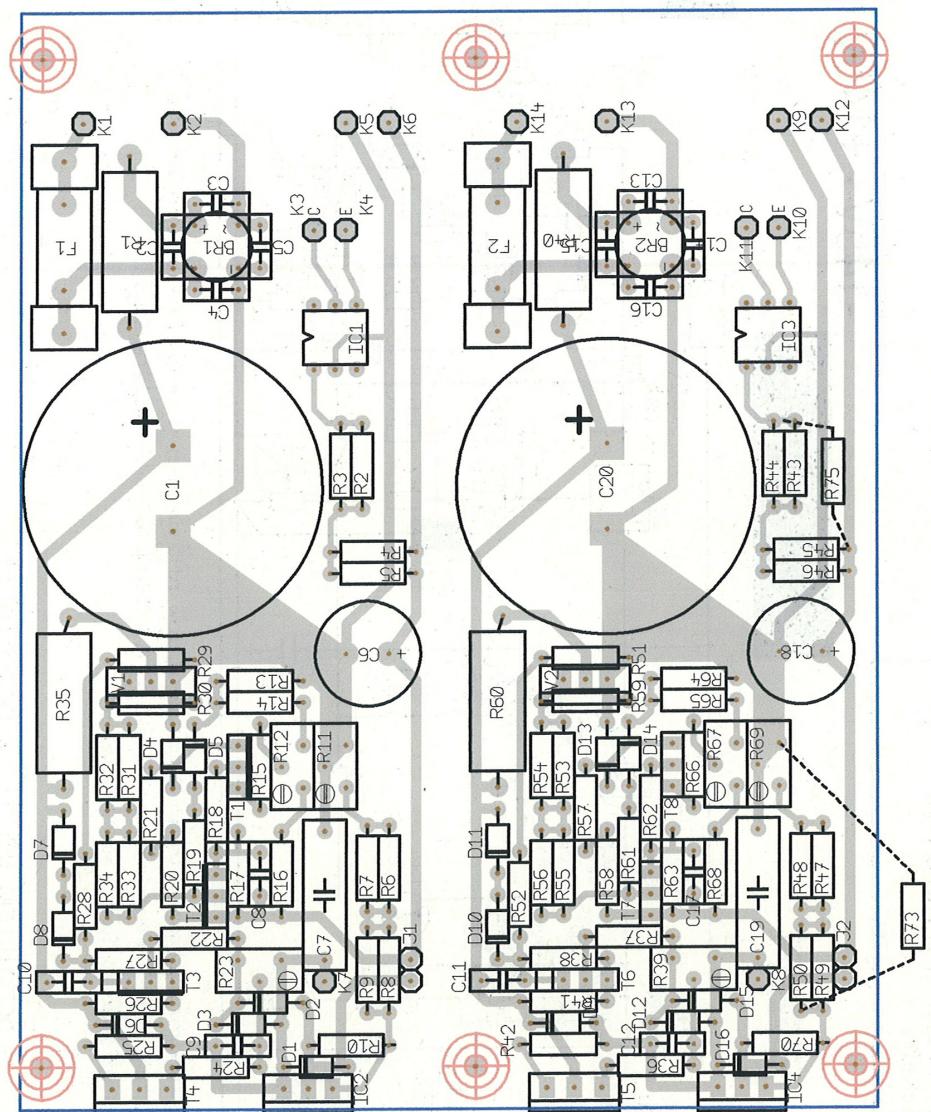


Erstellung Überspannungsauslösung: J1 trennen; Auslegespannung an K6 und K5 einpeisen; Ansteuerung für V1 an R33/J4 übernehmen; Schwellen mit R12 einstellen.
Erstellung Hochvoltstrom: Strommesser zwischen K7 (1-0-0) und K5 (-0-0-0); Hochvoltstrom mit R23 einstellen.
Erstellung Ausgangsspannung: Spannung mit R11 einstellen.

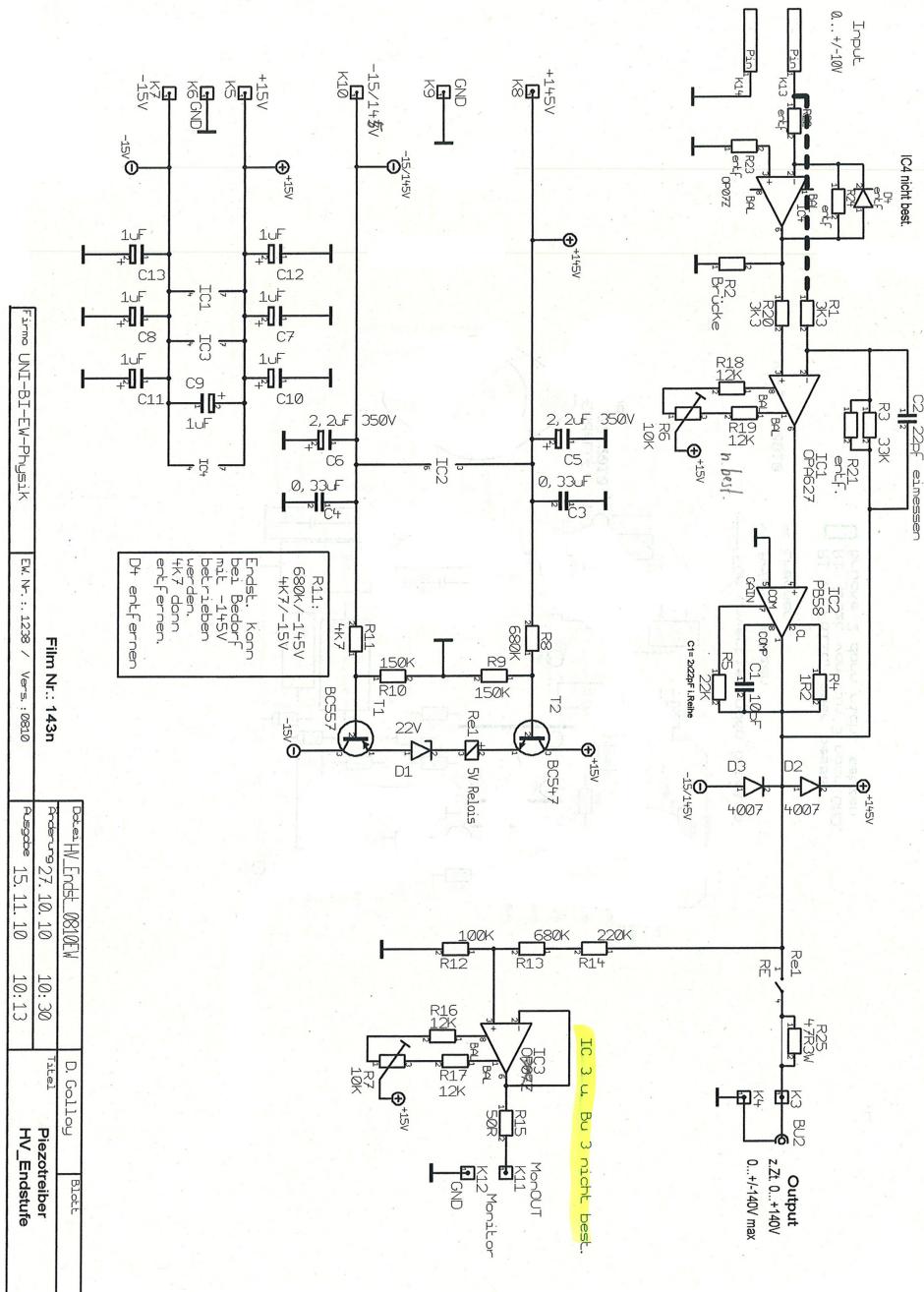
Schaltung wird 2 x benötigt!!

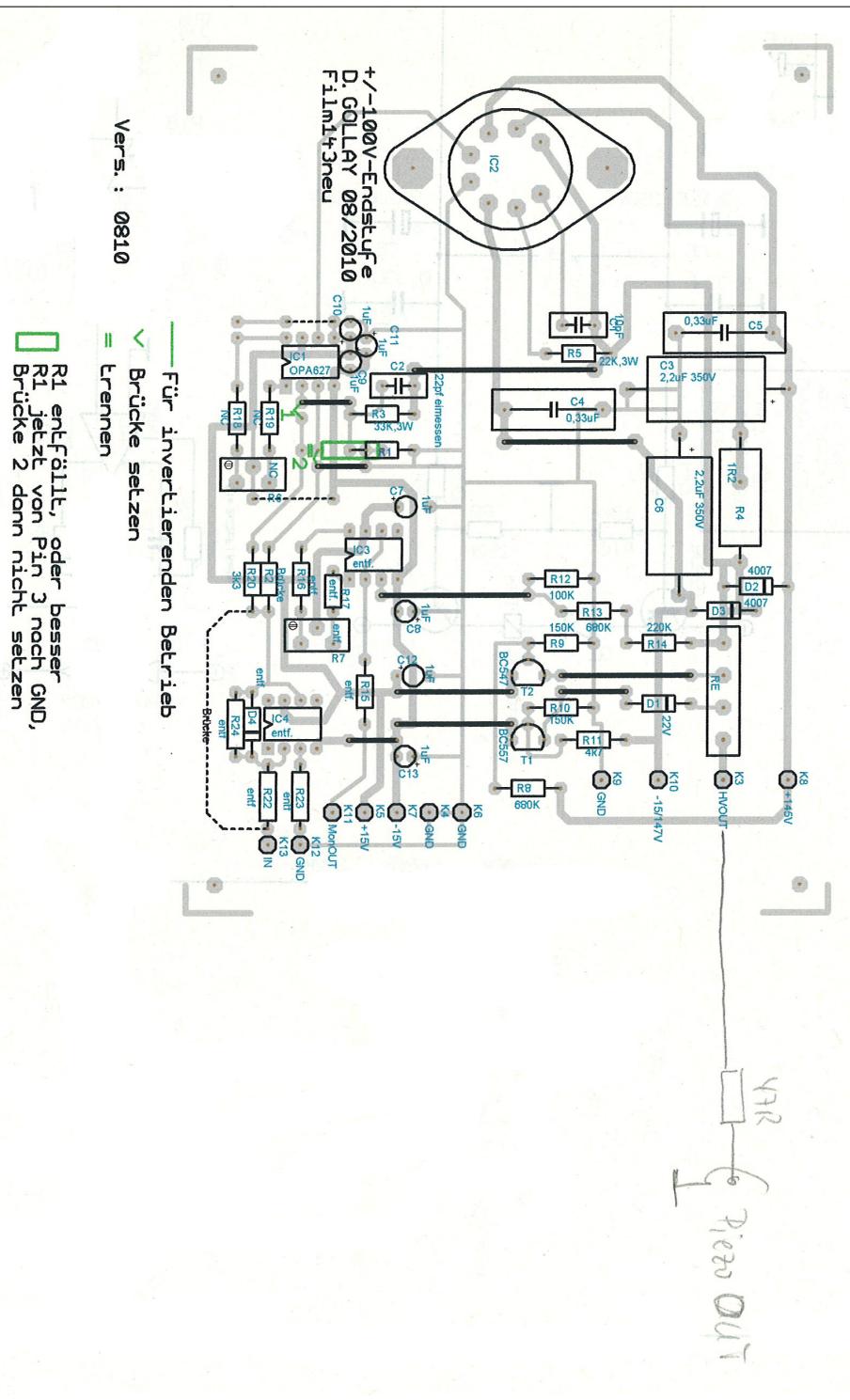
Entwicklungs: Horwathbach Film 218
etwa 4000 gezeichnete Piktogramme

Design-Nr. EN178.2	D. Gollay
Rechnung 22.10.10 15:55	HV-Netzteil
Rechnung 27.10.10 11:47	+145V-145V

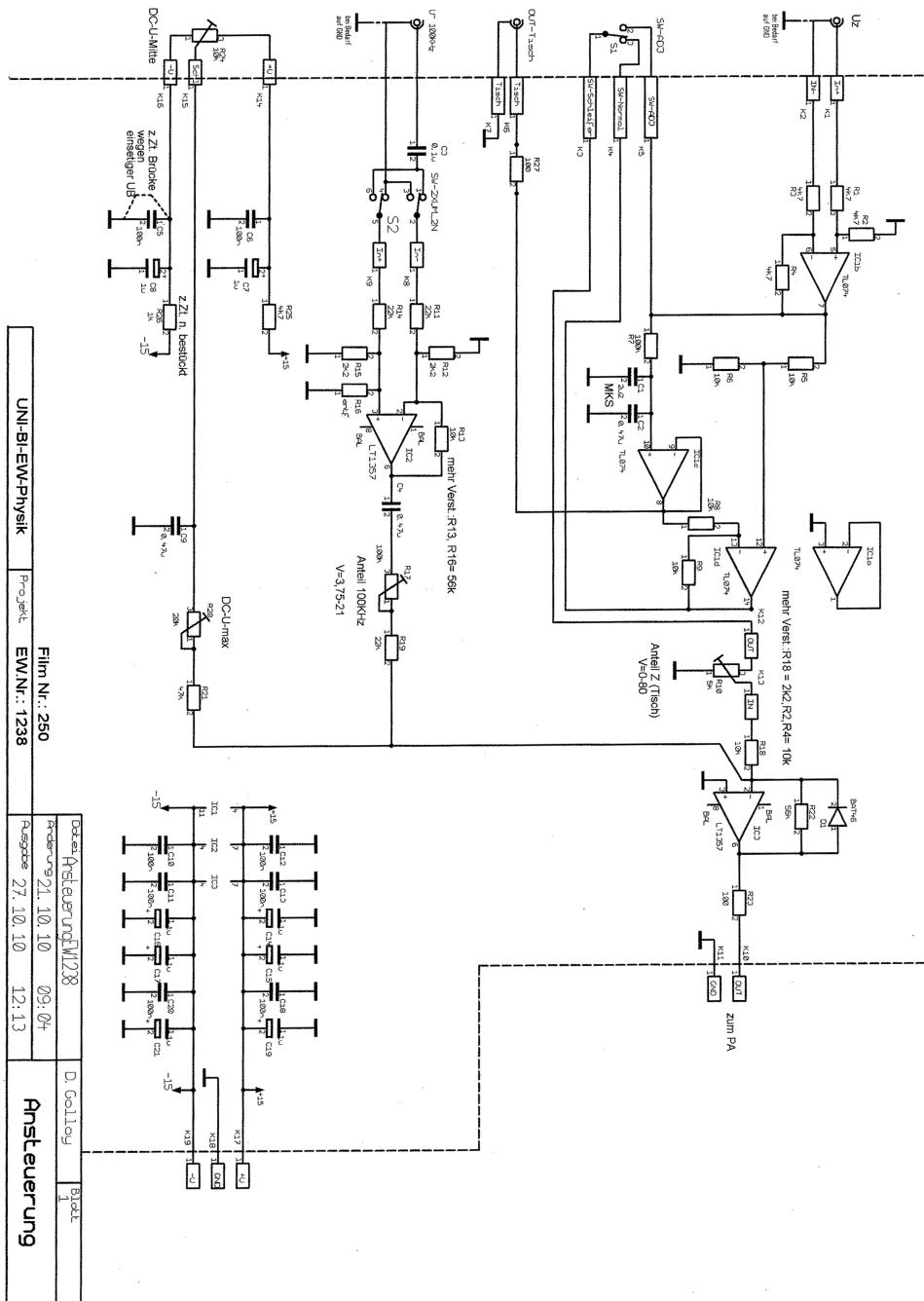


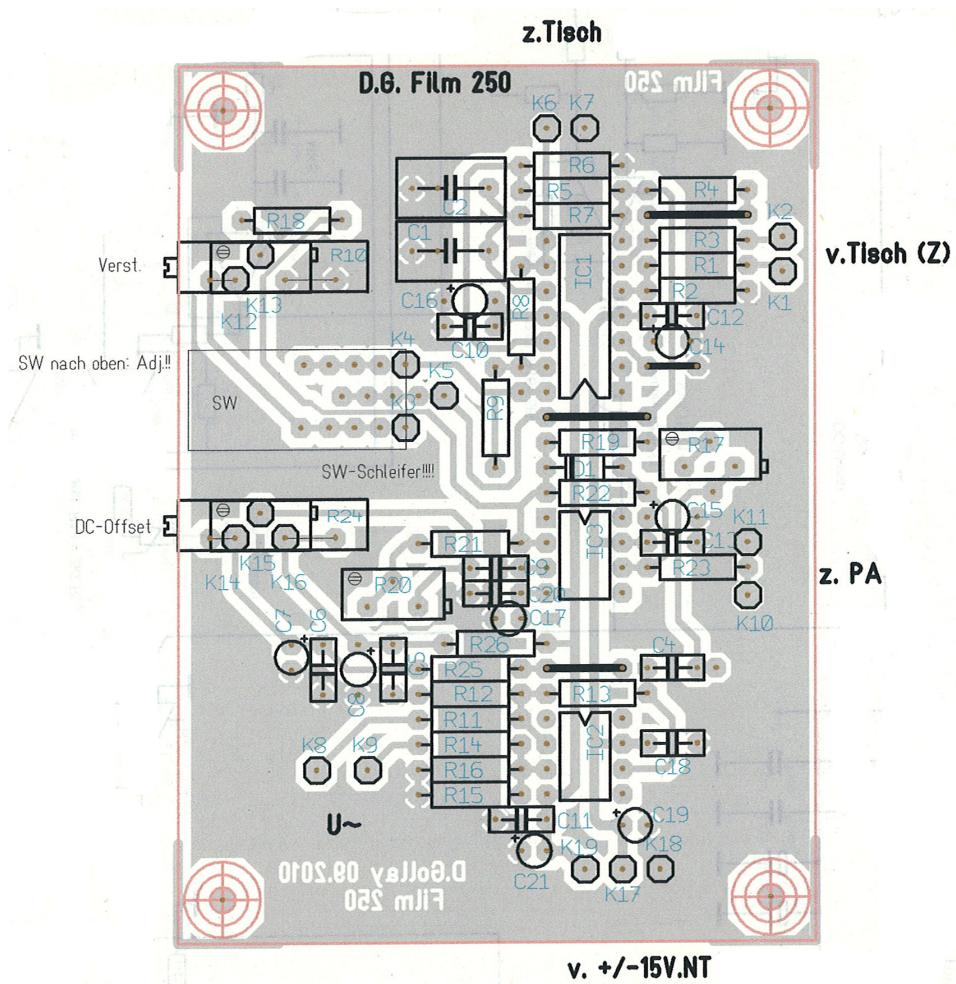
Schaltpläne für den Piezo-Treiber



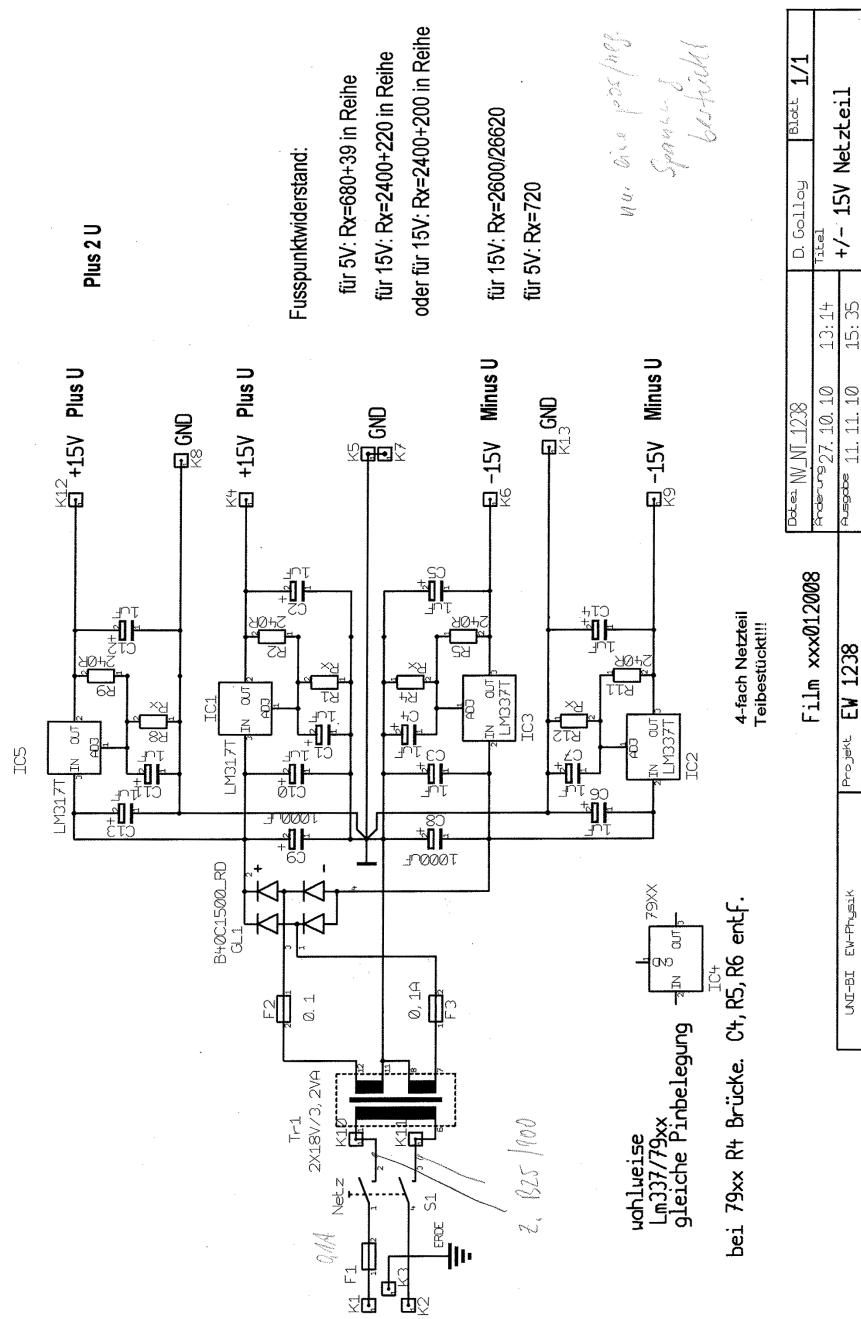


Schaltpläne für den Piezo-Treiber

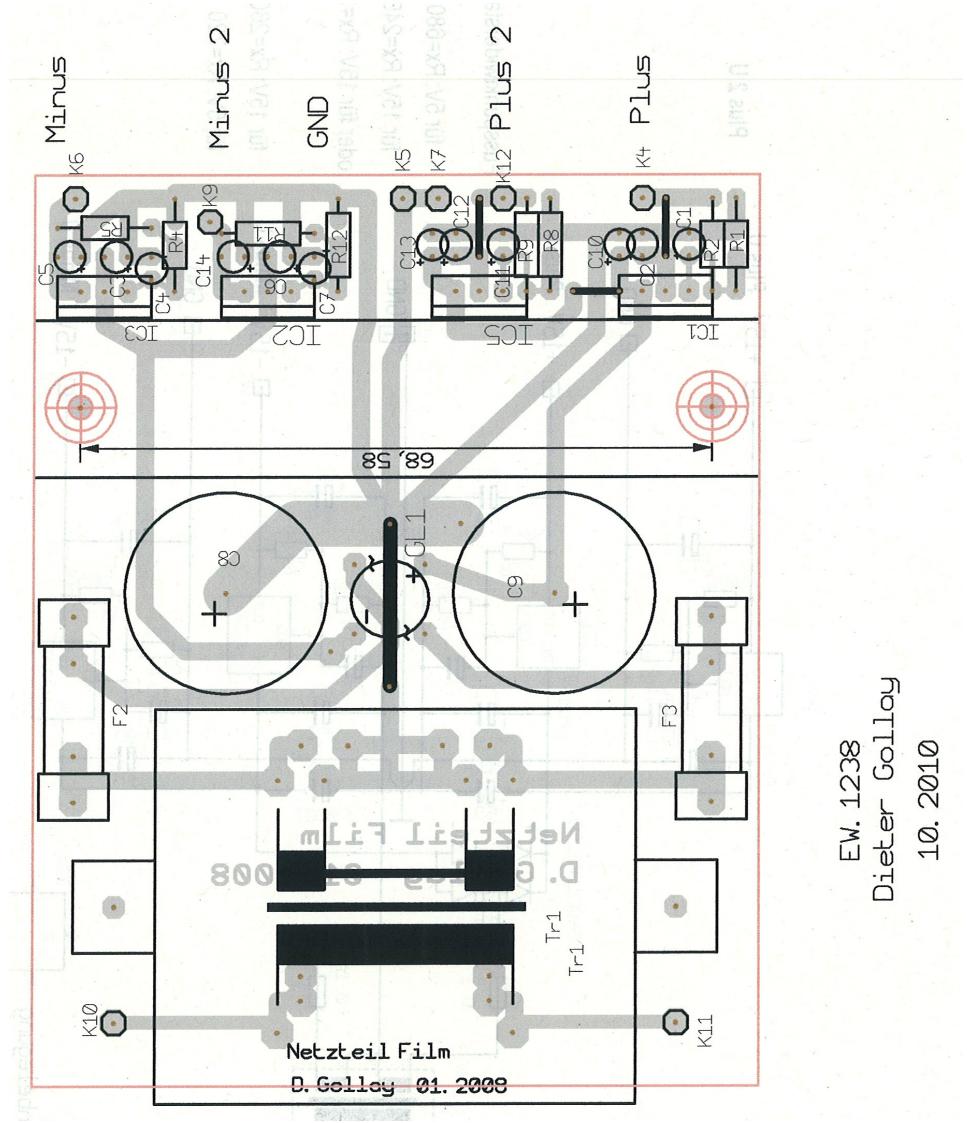




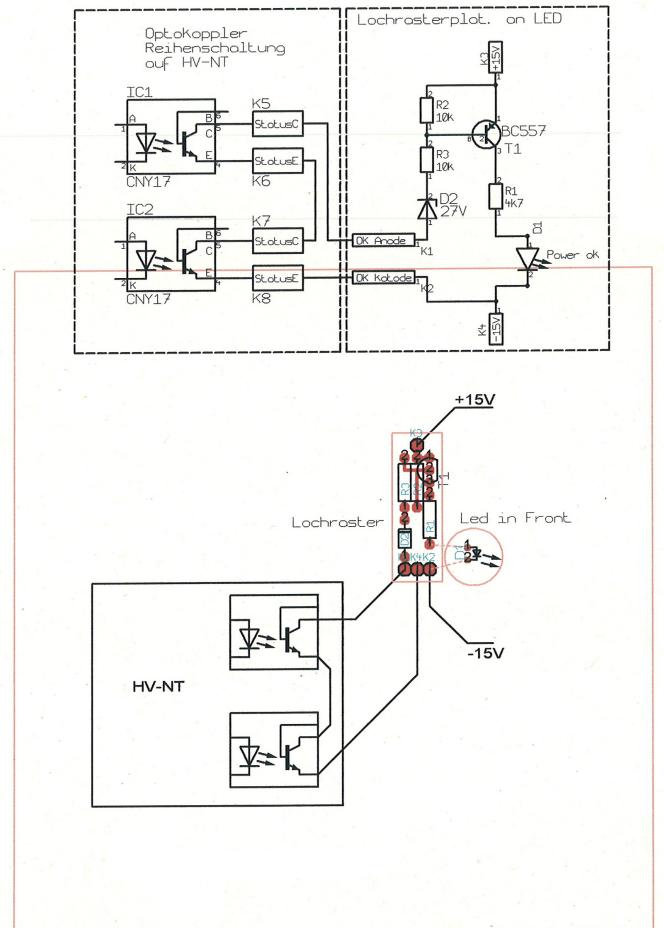
Schaltpläne für den Piezo-Treiber



Appendix

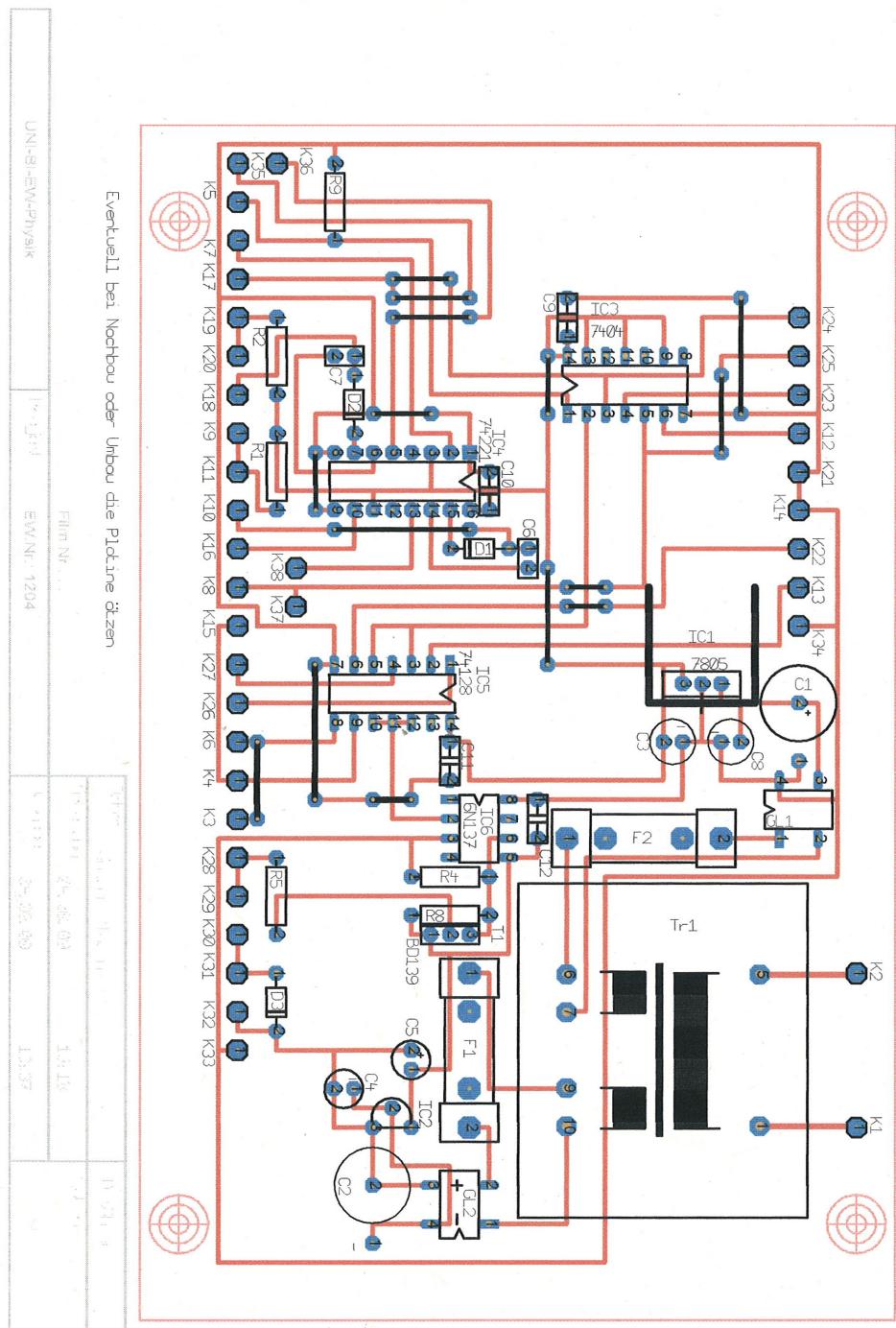


Schaltpläne für den Piezo-Treiber

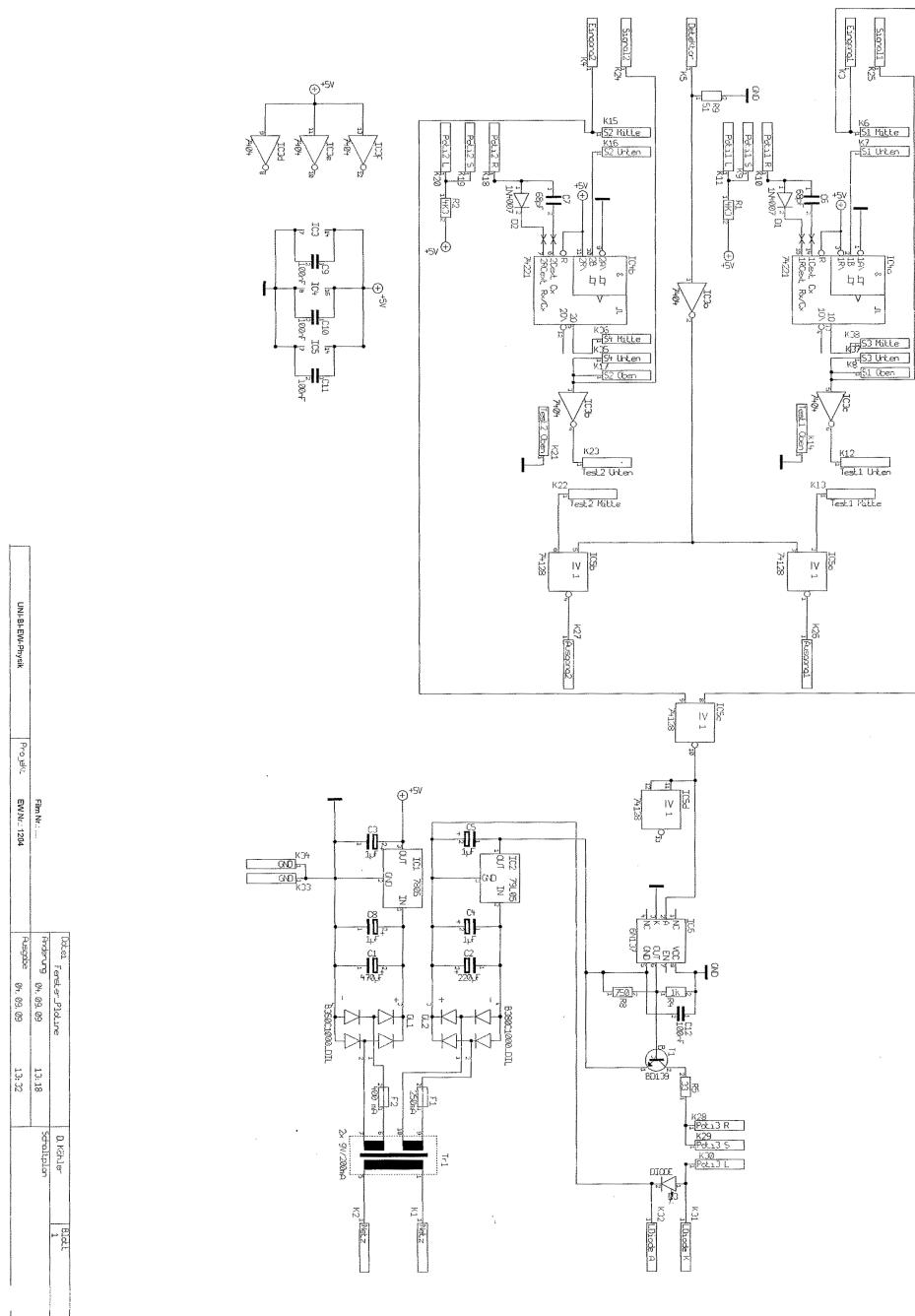


UNI-BI-EW-Physik	Projekt EW-Nr.: 1238	Daten: Überwachung_1238 Änderung 16.12.08 12:14	D. Golliot	Blatt 1
			Piezo-Driver Spg. Überwachung u. Anzeige	

Schaltpläne für den Dioden-Treiber



Schaltpläne für den Dioden-Treiber



Aminosäuren

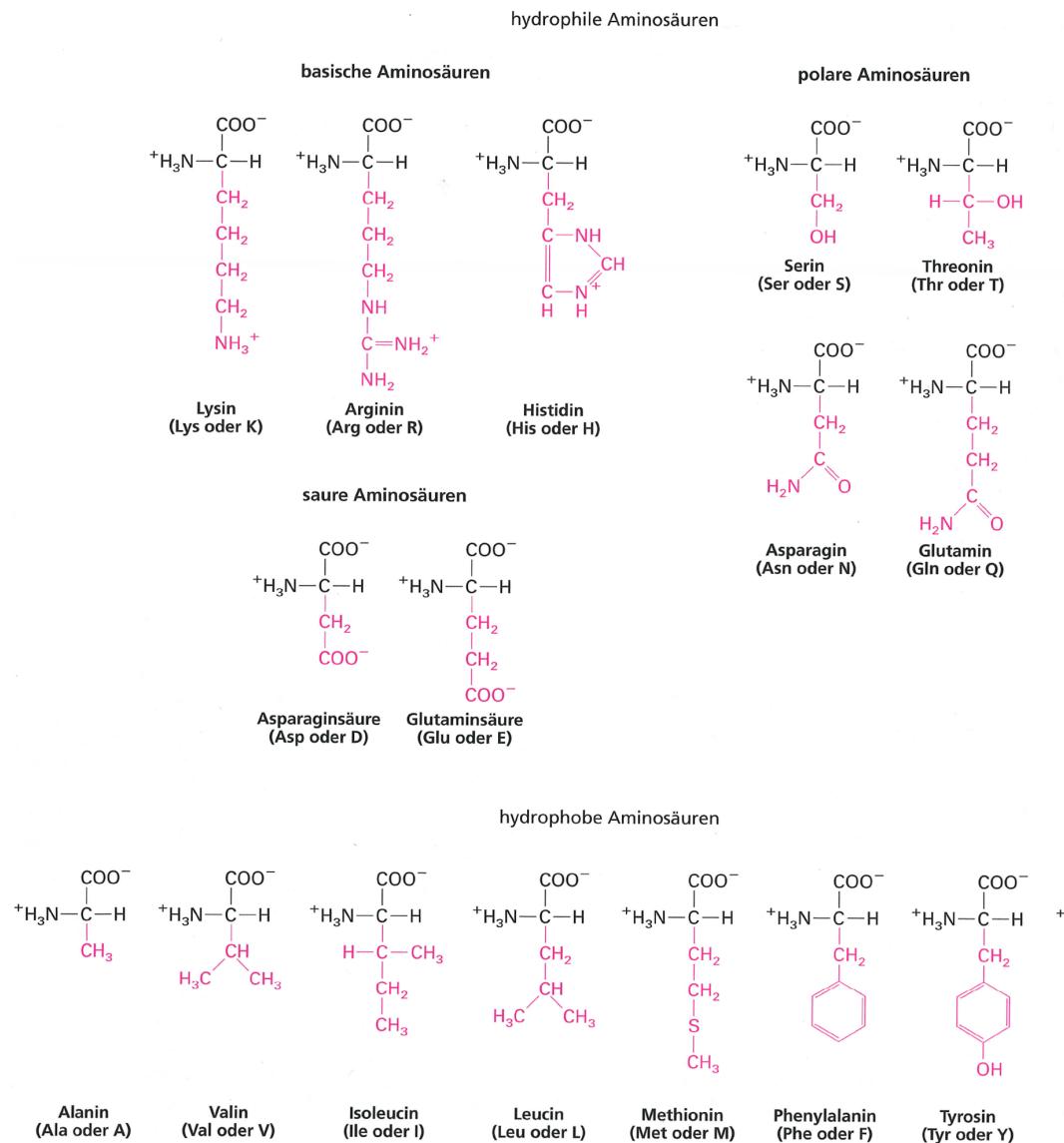


Abb. 6.1: Aufschlüsselung der Abkürzungen und der Buchstaben-Codes der Aminosäuren. (aus [325])

Veröffentlichungen

Publikationen

Teile dieser Arbeit sind in mehreren wissenschaftlichen Fachzeitschriften publiziert worden:

- [1] MILZ, FABIAN, ALEXANDER HARDER, PHILLIPP NEUHAUS, OLGA BREITKREUZ-KORFF, VOLKER WALHORN, TORBEN LÜBKE, DARIO ANSELMETTI und THOMAS DIERKS: *Cooperation of binding sites at the hydrophilic domain of cell-surface sulfatase Sulf1 allows for dynamic interaction of the enzyme with its substrate heparan sulfate*. *Biochim Biophys Acta*, 1830(11):5287–5298, Nov 2013.
- [2] HARDER, ALEXANDER, MAREIKE DIEDING, VOLKER WALHORN, SVEN DEGENHARD, ANDREAS BRODEHL, CHRISTINA WEGE, HENDRIK MILTING und DARIO ANSELMETTI: *Apertureless scanning near-field optical microscopy of sparsely labeled tobacco mosaic viruses and the intermediate filament desmin*. *Beilstein J Nanotechnol*, 4:510–516, 2013.
- [3] HARDER, ALEXANDER, ANN-KRISTIN MÖLLER, FABIAN MILZ, PHILLIPP NEUHAUS, VOLKER WALHORN, THOMAS DIERKS, und DARIO ANSELMETTI: *Catch bond interaction between cell surface sulfatase and glycosaminoglycans*. Submitted, 2014.

Weitere Publikationen, die aus Nebenprojekten hervorgegangen sind:

- [4] HARDER, ALEXANDER, VOLKER WALHORN, THOMAS DIERKS, XAVIER FERNÀNDEZ-BUSQUETS und DARIO ANSELMETTI: *Single-molecule force spectroscopy of cartilage aggrecan self-adhesion*. *Biophys J*, 99(10):3498–3504, Nov 2010.
- [5] WALHORN, VOLKER, JAN PASKARBEIT, HEINRICH GOTTHARD FREY, ALEXANDER HARDER und DARIO ANSELMETTI: *Distance dependence of near-*

field fluorescence enhancement and quenching of single quantum dots. Beilstein J Nanotechnol, 2:645–652, 2011.

- [6] HELMSTEDT, ANDREAS, MARC SACHER, AARON GRYZIA, **ALEXANDER HARDER**, ARMIN BRECHLING, NORBERT MÜLLER, ULRICH HEINZMANN, VEROPIKA HÖKE, ERICH KRICKEMEYER, THORSTEN GLASER, SAMUEL BOUVRON und MIKHAIL FONIN: *Exposure of [(Mn6CrIII)-Cr-III](3+) single-molecule magnets to soft X-rays: The effect of the counterions on radiation stability.* Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena, 184(11-12):583–588, 2012.
- [7] WALTHER, WOLFGANG, MARCO SCHMEER, DENNIS KOBELT, RUTH BAIER, **ALEXANDER HARDER**, VOLKER WALHORN, DARIO ANSELMETTI, JUTTA AUMANN, IDUNA FICHTNER und MARTIN SCHLEEF: *A Seven-Year Storage Report of Good Manufacturing Practice-Grade Naked Plasmid DNA: Stability, Topology, and In Vitro/In Vivo Functional Analysis.* Hum Gene Ther Clin Dev, 24(4):147–153, Dec 2013.

Konferenzbeiträge

Im Folgenden sind die wissenschaftlichen Beiträge auf nationalen und internationalen Konferenzen genannt:

- [1] **HARDER, ALEXANDER**, THOMAS DIERKS, XAVIER FERNÀNDEZ-BUSQUETS und DARIO ANSELMETTI: *Cartilage Proteoglycan Aggrecan Self-Adhesion at the Single Molecule Level.* 74th Annual Meeting of the DPG and DPG Spring Meeting, Dresden, Germany, 2010. *Poster*
- [2] **HARDER, ALEXANDER**, VOLKER WALHORN, THOMAS DIERKS, XAVIER FERNÀNDEZ-BUSQUETS und DARIO ANSELMETTI: *Single-molecule force spectroscopy of cartilage aggrecan self-adhesion.* Veeco Seeing at the Nanoscale VIII, Basel, Switzerland, 2010. *Poster*
- [3] **HARDER, ALEXANDER**, VOLKER WALHORN, THOMAS DIERKS, XAVIER FERNÀNDEZ-BUSQUETS und DARIO ANSELMETTI: *Single-molecule force spectroscopy of cartilage aggrecan self-adhesion.* XIII. Linz Winterworkshop, Advances in Single-Molecule Research for Biology & Nanoscience, Linz, Austria, 2011. *Poster*

- [4] **HARDER, ALEXANDER**, SVEN DEGENHARD, FABIAN EBER, FANIA C. GEIGER, JOACHIM P. SPATZ, HOLGER JESKE, CHRISTINA WEGE und DARIO ANSELMETTI: *High-Resolution Scanning Near-Field Optical Microscopy of Dye Labelled Single Tobacco Mosaic Viruses*. 75th Annual Meeting of the DPG and DPG Spring Meeting, Dresden, Germany, 2011. *Poster*
- [5] **HARDER, ALEXANDER**, MILZ, FABIAN, VOLKER WALHORN, THOMAS DIERKS und DARIO ANSELMETTI: *Single Molecule Force Spectroscopy of glycosaminoglycan interaction against the cell surface sulfatase Sulf1*. XIV. Annual Linz Winter Workshop, Linz, Austria, 2012. *Poster*
- [6] DIEDING, MAREIKE, **ALEXANDER HARDER**, VOLKER WALHORN, ANDREAS BRODEHL, HENDRIK MILTING und DARIO ANSELMETTI: *Investigation of desmin intermediate filament assembly by atomic force microscopy*. XIV. Annual Linz Winter Workshop, Linz, Austria, 2012. *Poster*
- [7] **HARDER, ALEXANDER**, FABIAN MILZ, VOLKER WALHORN, THOMAS DIERKS und DARIO ANSELMETTI: *Catch bonds between glycosaminoglycan and positively charged hydrophilic domain from the cell surface sulfatase Sulf1*. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik (DGfB) e.V. 2012, Göttingen, Germany. *Poster*
- [8] DIEDING, MAREIKE, **ALEXANDER HARDER**, NIKLAS BIERE, VOLKER WALHORN, ANDREAS BRODEHL, HENDRIK MILTING und DARIO ANSELMETTI: *Investigation of desmin intermediate filament assembly*. XVI. Annual Linz Winter Workshop, Linz, Austria, 2014. *Poster*

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die das Gelingen und das Vorankommen dieser Arbeit ermöglicht und unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem Mentor Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti, der mich ermutigt hat die Promotion anzugehen und mir dafür optimale Bedingungen in allerlei Hinsicht geboten hat. Außerdem möchte ich ihm für das entgegengebrachte Vertrauen und viele fruchtbare Anregungen danken. Seine inspirierende Begeisterung und Expertise waren stets motivierend und fördernd.

Herrn Prof. Dr. Thomas Dierks aus der Biochemie I möchte ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Dierks für die ergiebige und harmonische Kooperation, die bereits während meiner Diplom-Arbeit begonnen hatte. Insbesondere möchte ich hier Dr. Fabian Milz und Philipp Neuhaus danken, die mich stets mit frischen Proteinen und Chemikalien für die Messungen an der HD versorgt sowie mich mit Rat und Tat in biochemischen Fragestellungen unterstützt haben.

Für die Bereitstellung der fluoreszenz-markierten Moleküle TMV_{Cys} und Desmin für die optische Rasternahfeldmikroskopie möchte ich Dr. Sven Degenhard von der Universität Stuttgart und Mareike Dieding danken. Einen großen Dank auch an Herrn Dr. Heinrich Frey, der mir bei der Weiterentwicklung des aperturlosen optischen Rasternahfeldmikroskops geholfen hat.

Ein weiterer besonderer Dank gilt Herrn Dr. Volker Walhorn, der mich sowohl bei Fragen und Problemen in der Kraftspektroskopie als auch in der optischen Rasternahfeldmikroskopie beraten hat. Volker danke, dass Du mir immer den Rücken freigehalten hast, besonders in meiner bisher schwersten Zeit!

Der gesamten Arbeitsgruppe *Experimentelle Biophysik und Angewandte Nanowissenschaften* möchte ich für das sehr angenehme Arbeitsklima danken und die freundschaftliche Hilfsbereitschaft bei jedem auch noch so kleinen Problem privater oder beruflicher Natur. Insbesondere danke ich Dr. Daniel Wesner und Dr. Sebastian Zünkeler für ihre AFM-Expertise, die mir sehr viel Zeit erspart hat. Bei Dr. Katja Tönsing und Dr.

Danksagung

Dominik Greif möchte ich mich für die Beratung in chemischen Fragen bedanken. Christoph Pelargus und Dr. Sebastian Horstmeier danke ich für die technische Unterstützung. Christoph, ohne Dich würde nichts funktionieren! Ich danke auch meinen Bürokollegen Adeline Bieker, André Spiering, Sören Grannemann einschließlich Mareike Dieding und Tamara Münnich, für die stets freundschaftliche Atmosphäre, ein offenes Ohr und anregende Gespräche. Ann-Kristin Möller und Niklas Biere danke ich für die erfolgreiche Weiterführung meiner Projekte.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bei Dr. Volker Walhorn, André Spiering und Mareike Dieding bedanken.

Meiner Familie, besonders meinen Eltern Ludmila und Heinrich Harder, möchte ich für das unermessliche Vertrauen und die Unterstützung in allen Lebenslagen danken. Meiner lieben Ehefrau Alwina und meinem Sohn möchte ich für den Rückhalt und die Geborgenheit danken. Ihr gebt mir die Kraft und den Sinn für alle meine Bestrebungen!

«I am still confused, but on a higher level. »

Enrico Fermi

Curriculum Vitae

Persönliche Daten: DIPL.-PHYS. ALEXANDER HARDER

Geburtsdatum: 22.04.1981
Geburtsort: Frunse, jetzt Bischkek (ehem. UdSSR, Kirgistan)
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

1987–1991 Grundschule in der ehem. UdSSR, Kirgistan
1992–1992 Grundschule in Deutschland, Tonnenheide-Wehe
1992–1998 Realschule in Rahden und Espelkamp
1998–2001 Söderblom-Gymnasium in Espelkamp / Abitur

Studium

2002–2008 Universität Bielefeld: Studium der experimentellen Physik
2008–2009 Diplomarbeit in der AG Anselmetti, Titel: „Kraftmikroskopische und kraftspektroskopische Untersuchungen an Proteoglykanen“, Akademischer Grad: Diplom-Physiker
2008–2009 Laser-Zentrum Hannover e.V. (LZH): Studium der Laser-technik in Industrie und Medizin
2009–2014 Universität Bielefeld: Promotion in der AG Anselmetti, Titel: „Optomechanische Untersuchungen an Biomolekülen mittels Rastersondenmikroskopie“

Besondere Fähigkeiten

EDV-Kenntnisse: MS Office, LaTeX, OriginPro, Matlab, LabVIEW, HTML, CAD (Solid Edge), Adobe Photoshop, und weitere
Sprachen: Deutsch und Russisch: fließend, Englisch: gut in Wort und Schrift, Spanisch: Grundkenntnisse, Niveau A2

