

Universität Bielefeld

Fakultät für Physik

**Einzelmolekül - Kraftspektroskopie
an Desmoglein 2 Homokomplexen**

Diplomarbeit

vorgelegt von

Verena Mohaupt

12. Juni 2012

Erster Gutachter: Prof. Dr. Dario Anselmetti
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Dierks

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt und sämtliche verwendeten Hilfsmittel und Inhalte aus anderen Quellen als solche erwähnt und kenntlich gemacht zu haben.

Verena Mohaupt, Bielefeld, 12.06.2012

*Nur wenige wissen, wie viel man wissen muss,
um zu wissen, wie wenig man weiß.*

Werner Heisenberg

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Physikalische Grundlagen	4
2.1	Rasterkraftmikroskopie	4
2.1.1	Aufbau	5
2.1.2	Wechselwirkungskräfte	7
2.1.3	Messung der Topographie	9
2.2	Kraftspektroskopie	9
2.2.1	Aufnahme einer Kraft-Distanz-Kurve	11
2.2.2	Bestimmung der Federkonstanten	12
2.3	Kinetik der Bindungen	15
2.3.1	Kinetik im thermodynamischen Gleichgewicht	15
2.3.2	Theorie von Bell, Evans und Ritchie	17
3	Biologische Grundlagen	20
3.1	Zell-Zell-Adhäsionen	20
3.1.1	Desmosomen	23
3.1.2	Desmosomale Transmembranproteine	26
3.1.3	Desmoglein 2	27
3.2	Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC)	28
3.2.1	Mutationen von DSG2 als Ursache von ARVC	30
3.2.2	Die Punktmutation p.Arg46 Gln	31
4	Material und Methoden	33
4.1	Das Rasterkraftmikroskop	33
4.2	Cantilever	34
4.3	Substrate	35
4.3.1	Herstellung der TSG-Substrate	35
4.4	Weitere verwendete Geräte	36

4.5	Verwendete Chemikalien und Biomoleküle	37
4.5.1	Pufferlösungen	38
4.5.2	PEG-Crosslinker	38
4.6	Desmoglein 2	38
4.7	Präparation	39
4.7.1	Funktionalisierung der Cantilever	40
4.7.2	Funktionalisierung der Goldoberfläche	41
4.8	Kraftspektroskopische Parameter	42
4.9	Auswertung der Kraft-Distanz-Kurven	43
5	Kraftspektroskopische Messungen von DSG2	47
5.1	Untersuchung der Calciumabhängigkeit der DSG2-Komplexierung	50
5.2	Wildtyp	54
5.3	Mutante p.Arg46 Gln	58
6	Zusammenfassung und Ausblick	63
7	Danksagung	65

1 Einleitung

Ein erwachsener Mensch besteht aus ungefähr 100 Billionen Zellen [1] und aus mehreren hundert verschiedenen Zellarten. Sie schließen sich zu den unterschiedlichsten Geweben und Organen des Körpers zusammen und bestimmen deren Funktion und Form. Durch ein kontrolliertes Zusammenspiel gewährleisten sie den Erhalt lebenswichtiger Funktionen des Organismus. Essentiell für dieses Zusammenspiel sind vor allem Verbindungen zwischen den Zellen. Sie ermöglichen die Kommunikation der Zellen untereinander, den Austausch von Signalen und Molekülen, sie steuern das Verhalten und die Genexpressionsmuster der Zelle und beeinflussen so, wie der Organismus wächst, sich entwickelt und sich selbst repariert. Zelladhäsionsverbindungen halten die Zellen über Molekülverbindungen zusammen und verleihen dem Gewebe so Festigkeit und mechanische Stabilität. Defekte der Zell-Zell-Verbindungen beeinflussen das gesamte Zusammenspiel der Zellen und sind Ursache vieler Krankheiten [2, 3].

Um die genaue Funktion der Zell-Zell-Verbindungen verstehen zu können, muss man auch die Bindungsmechanismen der einzelnen Moleküle, die an der Verbindung beteiligt sind, untersuchen. Solche spezifischen, intermolekularen Bindungen beruhen auf schwachen Wechselwirkungen, wie der Van-der-Waals-Kraft, Ionenbindungen oder Wasserstoffbrückenbindungen. Die auftretenden Kräfte liegen im Bereich von einigen Zehn Pico-Newton und können somit nur mit einem sehr sensitiven Kraftsensor gemessen werden. Aufgrund der Größe der Moleküle von nur einigen Nanometern ist zusätzlich eine extrem genaue Positionierung des Kraftsensors gefordert. Das Rasterkraftmikroskop erfüllt diese Voraussetzungen und ermöglicht mit der dynamischen Kraftspektroskopie die Bindungskinetik von Einzelmolekülkomplexen zu untersuchen, wobei auch Messungen in Flüssigkeit möglich sind.

Bei dieser Methode werden zunächst die zu untersuchenden Moleküle an dem Kraftsensor und auf der Substratoberfläche immobilisiert. Der Kraftsensor, ein Federbalken mit einer sehr feinen Spitze, wird mit Hilfe eines Piezostellelements kontrolliert an die Oberfläche angenähert und wieder entfernt. Kommt es während der Kontaktzeit mit der Oberfläche zur Bildung eines Molekülkomplexes, so wird dieser Komplex beim Zu-

1 Einleitung

rückfahren des Kraftsensors durch die steigende Zugkraft immer weiter gestreckt, bis er wieder dissoziiert. Über die Verbiegung des Federbalkens lässt sich die Dissoziationskraft der Moleküle bestimmen. Durch Variation der Rückziehggeschwindigkeit wird die Abhängigkeit der Dissoziationskräfteverteilungen von derselben deutlich. Dadurch können die Wechselwirkungslänge sowie die Dissoziationsratenkonstante und die Lebensdauer des Komplexes bestimmt werden.

In dieser Arbeit wird mit Hilfe von Einzelmolekül-Kraftspektroskopie die Bindungskinetik von Desmoglein 2 Homokomplexen untersucht. Sie entstand in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. Hendrik Milting am Erich und Hanna Klessmann-Institut für kardiovaskuläre Forschung und Entwicklung des Herz- und Diabeteszentrums NRW (HDZ NRW) in Bad Oeynhausen. Die untersuchten Desmoglein 2 Moleküle wurden von Anna Gärtner am HDZ NRW exprimiert und aufgereinigt.

Desmoglein 2 ist ein Transmembranprotein und ein Bestandteil der Desmosomen, einer Zelladhäsionsverbindung. Über die Transmembranproteine wird das Cytoskelett der Zelle mit dem der Nachbarzelle verbunden. Es wurden verschiedene Mutationen von Desmoglein 2 bei Patienten entdeckt, bei denen Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) diagnostiziert wurde. ARVC ist eine Herzmuskelerkrankung, bei der es zu lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen oder Herzversagen kommt. Die genauen Mechanismen der Erkrankung sind noch nicht vollständig verstanden, aber bei sehr vielen Patienten liegt eine Mutation von Komponenten der Zelladhäsionsverbindungen vor. Ziel dieser Arbeit ist es nun das Bindungsverhalten von Wildtyp Desmoglein 2 mit dem der Punktmutation p.Arg46 Gln zu vergleichen, welche mit ARVC assoziiert wird. Mit diesem Vergleich sollen weitere Erkenntnisse über den Einfluss der Mutation auf das Bindungsverhalten und ihre Rolle bei der Entstehung von ARVC gewonnen werden.

Im folgenden Kapitel (Kapitel 2) werden die physikalischen Grundlagen der Kraftspektroskopie erläutert. Insbesondere wird auf die Kinetik von Molekülkomplexen eingegangen und der Zusammenhang von Thermodynamik und Bindungskraft erklärt.

Das dritte Kapitel behandelt die einzelnen Aspekte der Zell-Zell-Verbindungen und zeigt den Aufbau und die Funktionsweise der Desmosomen und von Desmoglein 2. Es werden außerdem das Krankheitsbild und die Ursachen von ARVC besprochen, insbesondere die Rolle von Desmoglein 2.

Ein wichtiger Faktor zur erfolgreichen Messung der Bindungskräfte ist die Funktionalisierung von Kraftsensor und Substratoberfläche. Die einzelnen Präparationsschritte werden

im vierten Kapitel zusammen mit den verwendeten Materialien vorgestellt, ebenso wie die Methode nach der die Messungen ausgewertet wurden.

Anschließend werden die Auswertung der Messdaten und die Ergebnisse dargestellt und diskutiert. Zum Schluss erfolgt eine Zusammenfassung sowie ein Ausblick auf mögliche weitere Experimente zur Fortführung der Forschung.

2 Physikalische Grundlagen

In diesem Kapitel werden die physikalischen Grundlagen dieser Arbeit erläutert. Es wird zunächst das Rasterkraftmikroskop vorgestellt und seine Funktionsweise sowie die auftretende Wechselwirkungskräfte erklärt. Darauf aufbauend wird das Prinzip der Kraftspektroskopie und die Kalibration des Cantilevers erläutert. Außerdem werden die theoretischen Grundlagen der Kinetik von Einzelmolekülbindungen und die Theorie von Bell, Evans und Ritchie besprochen, welche die Grundlage der dynamischen Kraftspektroskopie bildet.

2.1 Rasterkraftmikroskopie

Das *Rasterkraftmikroskop* (engl.: Atomic Force Microscope AFM) gehört zu den Rastersondenmikroskopen. Es wurde 1986 erstmals von Gerd Binnig, Calvin Quate und Christopher Gerber vorgestellt und beruht auf einer Weiterentwicklung des Rastertunnelmikroskops (engl.: Scanning Tunneling Microscope STM) [4, 5].

Alle Rastersondenmikroskope basieren darauf, dass eine sehr feine Sonde eine Oberfläche abrastert, während die Wechselwirkung zwischen Sonde und Oberfläche gemessen wird. Die Sonde liefert somit Punkt für Punkt Informationen über die Beschaffenheit der Oberfläche, welche dann in ein dreidimensionales Bild umgewandelt werden. Für jede Art von Rastersondenmikroskop ist eine andere Wechselwirkung charakteristisch. Beim Rastertunnelmikroskop (STM) wird ein sehr kleiner Tunnelstrom gemessen, was den Einsatz der STM auf leitende Oberflächen limitiert. Beim Rasterkraftmikroskop wird die Sonde über die Oberfläche geführt und misst sehr kleine Kräfte ($<1\text{nN}$ [6]). Diese beruhen auf Wechselwirkungen wie der elektrostatischen Wechselwirkung, der Van-der-Waals Wechselwirkung, oder der Pauliabstoßung zwischen Sonde und Probenoberfläche, aber auch auf Adhäsions- und Bindungskräften. Somit können auch nicht leitende Oberflächen oder Proben in Flüssigkeit untersucht werden, wodurch das Rasterkraftmikroskop zur Untersuchung von Biomolekülen *in situ* prädestiniert ist.

2.1.1 Aufbau

Die Messsonde eines Rasterkraftmikroskops ist eine sehr feine, meistens pyramidenförmige Spitze, die an einem Federbalken, dem *Cantilever* befestigt ist. Typischerweise beträgt der Spitzenradius 5-50 nm [6]. Der Cantilever, das Herzstück des Mikroskops wird durch die Wechselwirkungen zwischen seiner Spitze und der Probe ausgelenkt. Diese Auslenkung wird dann gemessen, um die Oberflächenstruktur wiederzugeben. Mit dieser Technik sind laterale Auflösungen von bis zu 0,1nm möglich [7]. Cantilever und Spitze sind meist aus Silizium oder Siliziumnitrit, es sind jedoch viele verschiedenen Formen, Beschichtungen und Größen erhältlich. Der grundlegende Aufbau eines Rasterkraftmikroskops ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

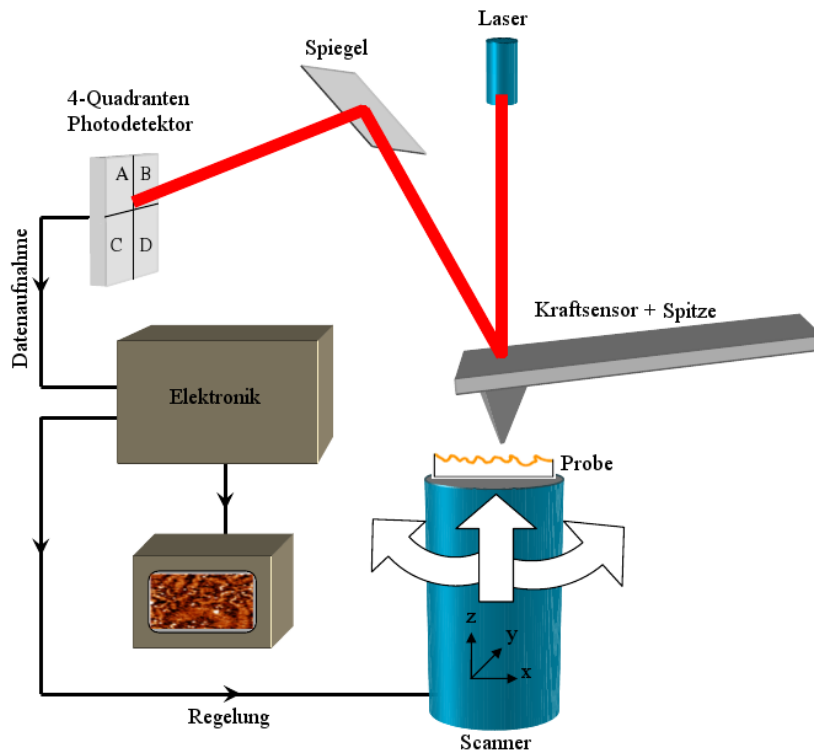


Abbildung 2.1: Grundlegender Aufbau eines Rasterkraftmikroskops [8].

Um die Oberfläche abbilden zu können, müssen zwei Dinge gegeben sein: Zum einen eine kontrollierte Bewegung des Cantilevers beim Annähern und Scannen der Oberfläche, zum anderen die Detektion der Cantileversauslenkung. Für eine kontrollierte Bewegung des Cantilevers wird ein *piezoelektrischer Scanner* eingesetzt. Dieser wird proportional zu einer angelegten Spannung ausgelenkt und kann sehr genau gesteuert werden (im Sub-

2 Physikalische Grundlagen

Ångström-Bereich [9]). Wenn die Messspitze an die Probenoberfläche angenähert wird, wird der Cantilever durch die auf ihn wirkenden Kräfte ausgelenkt. Diese Verbiegung wird meistens durch ein *Lichtzeigersystem* detektiert [10]. Dabei wird ein Laserstrahl auf die Rückseite des Cantilevers fokussiert, dort reflektiert und über einen Spiegel auf eine *4-Quadrantenphotodiode* gelenkt. Die Photodiode wandelt das Licht durch den Photoelektrischen Effekt in Strom um, welche als Rückkopplungssignal zur Steuerung der vertikalen Cantileverbewegung genutzt wird.

Innerhalb der einzelnen Quadranten fließt abhängig von der Position des Laserspots ein Strom, welcher durch Strom-Spannungs-Wandler in eine Spannung umgewandelt wird. Das *Summensignal* U_{Summe} , das die Summe der Spannungen aller vier Quadranten darstellt, wird zu Anfang jeder Messung durch Positionierung des Laserspots maximiert. Es gilt:

$$U_{Summe} = U_A + U_B + U_C + U_D. \quad (2.1)$$

Durch die Verbiegung des Cantilevers ändert sich der Winkel des reflektierten Strahls, was eine Verschiebung des Laserspots und somit der Spannung in den Quadranten mit sich zieht. Man kann nun sowohl die vertikale Auslenkung, als auch die laterale Auslenkung des Cantilevers aus der Spannungsänderung bestimmen (siehe Abb. 2.2). Die vertikale Auslenkung entspricht dem *Deflection-Signal* $U_{Deflection}$ (Gleichung 2.2). Die laterale Auslenkung wird mit dem *Lateral-Signal* $U_{Lateral}$ gemessen (Gleichung 2.3).

$$U_{Deflection} = U_A + U_B - (U_C + U_D), \quad (2.2)$$

$$U_{Lateral} = U_A + U_C - (U_B + U_D). \quad (2.3)$$

Bei der Kalibration des Cantilevers am Anfang der Messung wird der Spot so positioniert, dass er mittig zwischen den oberen und unteren sowie den rechten und linken Quadranten ist. Damit gilt $U_{Deflection} = 0$ und $U_{Lateral} = 0$.

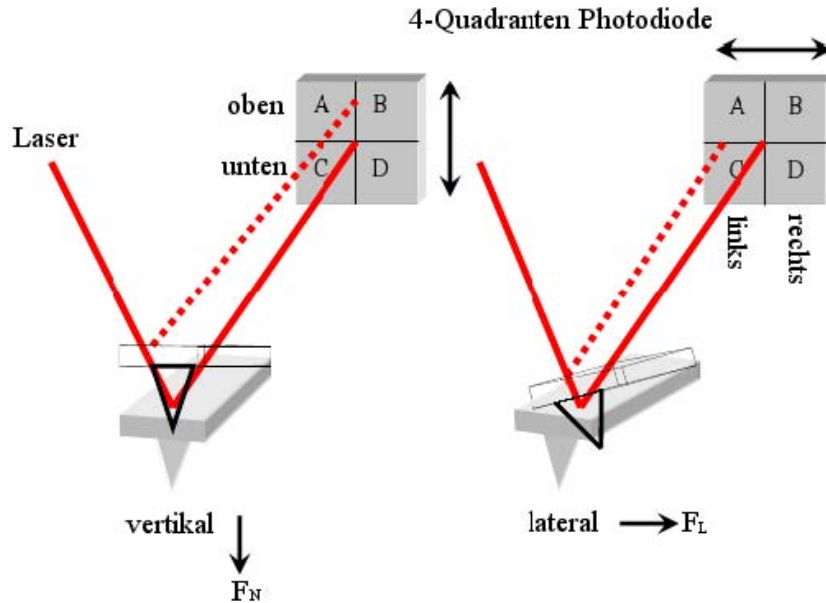


Abbildung 2.2: Die vertikale und laterale Verbiegung des Cantilevers kann über die Lichtzeigermethode gemessen werden [8].

2.1.2 Wechselwirkungskräfte

Die Wechselwirkungskräfte, die bei Annäherung des Cantilevers zwischen Spitze und Oberfläche wirken sind abhängig von äußeren Faktoren, wie dem umgebenden Medium, der Entfernung zwischen Oberfläche und Spitze und den verwendeten Materialien. Es gibt repulsive und attraktive Wechselwirkungen, die jeweils eine unterschiedliche Reichweite haben. Man unterscheidet generell zwischen kurzreichweitigen Kräften (im Bereich bis $1nm$) und langreichweitigen Kräften ($> 1nm$) [11].

Die **Pauli-Abstoßung** ist die Wechselwirkung mit der kleinsten Reichweite. Sie beruht auf dem Pauli-Prinzip, welches besagt, dass Elektronen, die in allen Quantenzahlen übereinstimmen nicht am selben Ort sein können. Beim Kontakt des Kraftsensors mit der Oberfläche kommt es aber nun zu einer Überlappung der Elektronenorbitale der Spitze mit denen der Probe und die Spitze erfährt eine starke repulsive Kraft. Diese reicht jedoch nur ca. $0,1nm$ weit [11].

Die **Kapillarkraft** ist die dominierende adhäsive Kraft bei Messungen an Luft [12]. Sie entsteht durch Kondensation von Wasserdampf zu einem dünnen Flüssigkeitsfilm auf Spitze und Probenoberfläche. Wird die Spitze an die Probe angenähert, kommt es

zu einer Meniskusbildung. Dadurch wird die Spitze mit $10 - 100nN$ angezogen [12]. Bei Messungen in Flüssigkeit tritt diese Wechselwirkung nicht auf.

Van-der-Waals-Kräfte wirken zwischen allen Teilchen über eine Entfernung von bis zu 100 nm [11]. Sie beruhen auf der Wechselwirkung zwischen permanenten und induzierten Dipolen. Man unterscheidet zwischen der Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen zwei permanenten Dipolen, der Wechselwirkung zwischen einem induzierten und einem permanenten Dipol sowie der Dispersionskraft, welche auf der Wechselwirkung zwischen zwei induzierten Dipolen beruht. Letztere entsteht aus zeitlichen Schwankungen der Ladungsverteilung in den Molekülen, welche ein Dipolmoment erzeugt. Für alle Arten der Van-der-Waals-Kraft gilt eine r^{-6} -Abhängigkeit, wobei r Abstand der beiden Teilchen und C eine Konstante ist (siehe 2.4).

$$V(r) = -\frac{C}{r^6}. \quad (2.4)$$

Elektrostatische Wechselwirkungen basieren auf der Coulombkraft, die zwischen zwei Ladungen Q_1 und Q_2 wirkt. Sie ist gegeben durch:

$$F_c = \frac{1}{4\pi\epsilon_r\epsilon_0} \frac{Q_1Q_2}{r^2}, \quad (2.5)$$

wobei r der Abstand und ϵ_0 und ϵ_r die Dielektrizitätskonstante im Vakuum und im Medium sind. Elektrostatische Kräfte haben eine Reichweite von mehreren 100 nm [11] und sind stark von dem umgebenden Medium abhängig. Aufgrund der höheren Dielektrizitätskonstante von Wasser gegenüber Luft, ist die elektrostatische Wechselwirkung in Wasser durch die ϵ_r -Abhängigkeit wesentlich geringer. Die Wechselwirkung wird außerdem durch die Ionenkonzentration und den pH-Wert der Lösung beeinflusst. Die Ionenkonzentration bestimmt die Reichweite des elektrischen Feldes und der pH-Wert beeinflusst den Ladungszustand der Oberflächen [12].

Wenn die Spitze nah genug an der Oberfläche ist, können sich Bindungen zwischen den Molekülen an Cantilever und Oberfläche ausbilden. Dabei kommen dann die **Erkennenden Kräfte und Bindungskräfte** ins Spiel. Spezifisches Erkennen und Binden von Biomolekülen ist eine wesentliche Grundlage für regulatorische Prozesse in biologischen Systemen (Zellen und Organismen). Das sogenannte Schlüssel-Schloss-Prinzip wurde erstmals von Emil Fischer anhand von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen be-

schrieben [13]. Moleküle binden mittels schwacher, nicht-kovalenter Wechselwirkungen wie der Van-der-Waals-Kraft oder Wasserstoffbrückenbindungen. Wasserstoffbrückenbindungen sind elektrostatischer Natur, und entstehen wenn zwei funktionelle Gruppen (Donor und Akzeptor) über Wassermoleküle in Verbindung treten. Ein Unterschied der Elektronegativität führt zu zwei Teilladungen und wenn die beiden Moleküle so ausgerichtet sind, dass das freie Elektronenpaar des Akzeptors in die Richtung des Wasserstoffatoms zeigt, bildet sich eine Wasserstoffbrückenbindung.

2.1.3 Messung der Topographie

Das Abrastern der Oberfläche kann nun in verschiedenen Messmodi geschehen. Diese unterscheiden sich vor allem durch die Art der Wechselwirkung mit der Probenoberfläche. Im *Kontaktmodus* ist der Cantilever in dauerndem Kontakt mit der Oberfläche und erfährt repulsive Kräfte. Es wird nun entweder die Kraft (constant force mode) oder die Position des z-Piezos (constant height mode) konstant gehalten. Im *Nicht-Kontakt-Modus*, auch dynamischer Modus genannt, wird der Cantilever in seiner Resonanzfrequenz angeregt und nah an die Oberfläche herangefahren. Wenn nun eine Kraft wirkt, ändert sich die Resonanzfrequenz und somit auch die Amplitude und die Phase zwischen Ausgangs- und Eingangssignal. Diese Frequenzverschiebung wird dann wieder als Regelgröße für die Abstandsregelung des Cantilevers zur Oberfläche verwendet. Außerdem gibt es noch den *Intermittierenden Modus*, bzw. englisch Tapping Mode. Hier wird der Cantilever zur Schwingen angeregt und hat eine sehr kurze Kontaktzeit im μs -Bereich mit der Oberfläche [14]. Die Spitze „tippt“ also auf die Oberfläche und bildet sie so ab. Dieses Verfahren ist besonders zum Abbilden von sensiblen Molekülen geeignet, da es schonender als der Kontaktmodus ist.

Mit dem Rasterkraftmikroskop können außerdem auch Bindungs- und Adhäsionskräfte gemessen werden, die Methode dazu wird im folgenden Abschnitt erläutert.

2.2 Kraftspektroskopie

Bei den Anfängen der Rastersondenmikroskopie lag der Fokus auf dem Abbilden von Oberflächen. Mit der Erfindung des AFMs taten sich neue Möglichkeiten zur Untersuchung von Biomolekülen auf [15]. Messungen in wässriger Lösung erlauben eine *in situ* Untersuchung und der intermittierende Modus garantiert ein schonendes Abbilden [12]. Die Kraftspektroskopie benutzt nun das Rasterkraftmikroskop, um Bewegungen und

2 Physikalische Grundlagen

Kräfte zwischen einzelnen Molekülen in Echtzeit zu messen [16]. Dazu wird der Cantilever als Feder gesehen, für die nach dem *Hook'schen Gesetz* gilt:

$$\Delta F = -k\Delta z, \quad (2.6)$$

wobei ΔF die Kraft auf die Feder ist, k die Federkonstante und Δz die Auslenkung. Es werden die zu untersuchenden Moleküle an der Oberfläche und dem Kraftsensor immobilisiert und dieser wird kontrolliert an die Oberfläche herangefahren. Ist es zu einer Bindung zwischen den Molekülen gekommen, wirkt beim Zurückziehen des Cantilevers eine stetig steigende Zugkraft auf den Komplex, bis es zur Dissoziation kommt [17]. Diese Bindungskräfte können mit einer Kraftauflösung im Bereich von Pico-Newton gemessen werden und sind nur durch das thermische Rauschen des Federbalkens begrenzt [12]. Die Kraft wird über die Auslenkung des Cantilevers mit Hilfe der Lichtzeigermethode bestimmt (siehe Abb. 2.2), die Position des Cantilevers wird über die am z-Piezo angelegte Spannung oder einem Differentialtransformator (engl.: Linear Variable Differential Transformer (LVDT)) gemessen. In einer Kraft-Distanz-Kurve werden Kraft und Position des Kraftsensors visualisiert (mehr dazu in Abschnitt 2.2.1). Durch Variation der Zugeschwindigkeit lassen sich weitere Informationen über die Kinetik der Bindung berechnen, mehr dazu in Abschnitt 2.3.

Ein wichtiger Punkt bei der Kraftspektroskopie ist die Funktionalisierung von Spitze und Substratoberfläche, auf die die zu untersuchenden Biomoleküle immobilisiert werden. Dabei ist vor allem darauf zu achten, dass die zu untersuchende Bindung schwächer ist, als die Bindungen zwischen Molekül und Messspitze bzw. Oberfläche, damit die zu untersuchende Bindung zuerst reißt. In der Natur beruhen viele Prozesse auf nicht-kovalenten Wechselwirkungen, also werden die Moleküle mittels kovalenten Bindungen immobilisiert. Oft werden noch Polyethylenglycol(PEG)-Crosslinker zwischen Spitze/Oberfläche und Molekül geschaltet. Diese sind lange Molekülketten und vergrößern den Aktionsradius des Moleküls um einen Bindungspartner zu finden. Vor allem jedoch ermöglicht der PEG-Linker eine eindeutige Unterscheidung eines spezifischen Dissoziationsereignisses von anderen, unspezifischen Ereignissen. Dies ist möglich, da er während des Zurückfahrens gestreckt wird, was sich in einem charakteristischen Aussehen der Kraft-Distanz-Kurve zeigt.

2.2.1 Aufnahme einer Kraft-Distanz-Kurve

Eine Kraft-Distanz-Kurve gibt die Verbiegung des Cantilevers gegenüber der Piezoposition im Verlauf eines Zyklus aus Annäherung und Entfernung wieder. Die Verbiegung des Kraftsensors ist ein Maß für die auf ihn wirkende Wechselwirkungskraft. Repulsive Kräfte bewirken eine Auslenkung des Sensors nach oben, attraktive Kräfte lenken ihn nach unten aus. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte einer Kraft-Distanz-Kurve anhand von Abbildung 2.3 erläutert.

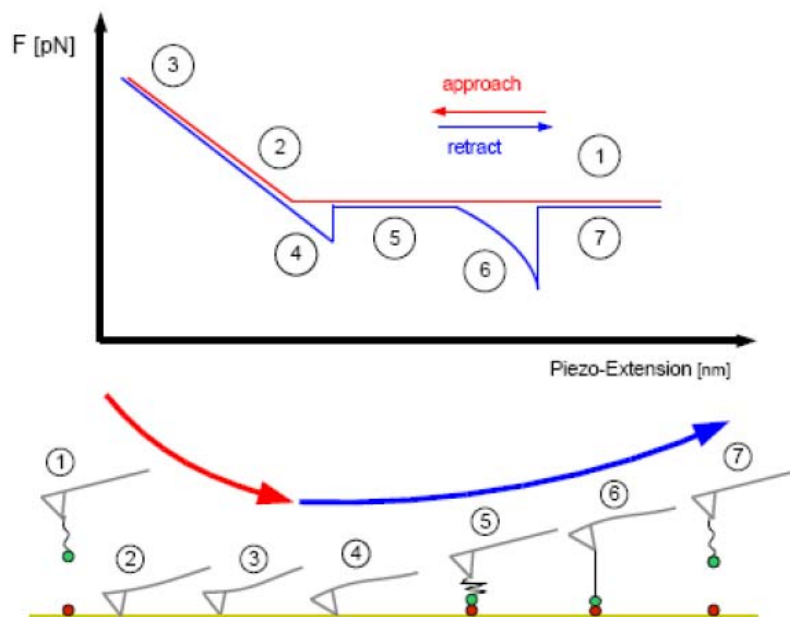


Abbildung 2.3: Verschiedene Phasen einer Kraft-Distanz-Kurve [7]. Oben: Die auf den Cantilever wirkende Kraft in Abhängigkeit des Abstandes zur Oberfläche. Unten: Die Auslenkung des Cantilevers an den verschiedenen Stellen des Zyklus. Die einzelnen Schritte werden im Text erläutert.

1. Der Kraftsensor wird an die Oberfläche herangefahren. Da noch keine Kräfte auf ihn wirken, befindet er sich noch in seiner Ruheposition.
2. Kommt der Sensor in Kontakt mit der Oberfläche, überwiegen die repulsiven Kräfte und er wird nach oben ausgelenkt.
3. Der Kraftsensor drückt auf die Oberfläche und wird nach oben verbogen, bis eine vorher festgesetzte Maximalkraft erreicht ist. Während der Kontaktzeit haben die immobilisierten Moleküle Zeit einen molekularen Komplex zu formen.

2 Physikalische Grundlagen

4. Der Cantilever wird langsam von der Oberfläche zurückgezogen. Die Auslenkung verringert sich hierbei kontinuierlich, bis er erneut seine Ruheposition erreicht. Im Falle einer unspezifischen Adhäsion wird die Spitze in Kontakt mit der Oberfläche gehalten und nach unten ausgelenkt.
5. Sobald die Adhäsionskraft überschritten ist, springt der Cantilever in seine Ruheposition zurück.
6. Ist es während des Kontaktes zu einer Bindung gekommen, wird der PEG-Linker jetzt bei weiterer Entfernung des Cantilevers von der Probenoberfläche gestreckt und die Feder nach unten ausgelenkt. Durch die Dehnung des Linkermoleküls entsteht die typische, nicht-lineare, konkave Ausbildung der Kurve.
7. Schließlich kommt es zur Dissoziation der Bindung. Der Cantilever springt hierbei in seine Ruheposition zurück (*Snap Off*).

Anhand der Form der Kraft-Distanz-Kurve können viele Informationen über die untersuchte Bindung gewonnen werden [18]. Elementar für die Analyse der Kurve und zur Bestimmung der Kraft ist aber zunächst die Bestimmung der Federkonstante des Cantilevers.

2.2.2 Bestimmung der Federkonstanten

Die Kraft, die auf den Cantilever wirkt, wird über das Hook'sche Gesetz über seine Auslenkung bestimmt. Um Einzelmolekülwechselwirkungen akkurat bestimmen zu können, ist eine genaue Kenntnis der physikalischen Eigenschaften der Spitze und des Cantilevers erforderlich. Besonders wichtig ist hierbei die Federkonstante des Cantilevers [9]. Bei der Herstellung der Kraftsensoren kommt es immer wieder zu Schwankungen im Herstellungsprozess, was zu Variationen in ihrer Geometrie oder kleinen strukturellen Defekten führt. Die Federkonstante weicht oft signifikant von der nominalen Angabe ab, und zeigt sogar innerhalb einer Charge deutlich Unterschiede [9, 19]. Die Herstellerangaben berücksichtigen auch nicht den Einfluss der chemischen Funktionalisierung der Spitze vor dem Experiment. Somit muss für jeden einzelnen Cantilever die Federkonstante experimentell bestimmt werden.

Es gibt mindestens ein Dutzend verschiedene Methoden, um die Federkonstante des Cantilevers zu bestimmen [20–23]. Die am einfachsten zugänglichste Methode ist wohl

die Berechnung der Federkonstante aus den geometrischen Dimensionen des Cantilevers, wie Länge, Breite und Dicke. Diese Angaben werden aber oft nur den Herstellerangaben entnommen und sind somit nicht immer genau genug. Auch wenn statt des einfachen, rechteckigen Federbalkens ein V-förmiger Cantilever verwendet wird, wird diese Methode sehr ungenau, da die geometrischen Eigenschaften sich verändern. Im übrigen sind Cantilever oft aus verschiedenen Materialien und dünn beschichtet, um z.B. die Reflexion des Lasers zu verbessern. Dadurch wird eine genaue mathematische Bestimmung ihrer elastischen Eigenschaften schwierig [9].

In dieser Arbeit wird die Federkonstante nach der *Thermal Noise Methode* bestimmt, darum wird nur diese hier explizit vorgestellt. Diese Methode wurde von J.L. Hutter und J. Bechhoefer entwickelt, und wurde mehrfach abgewandelt und weiterentwickelt [9, 20, 24, 25]. Die Federkonstante wird hierbei aus dem thermischen Rauschverhalten des Cantilevers abgeleitet. Einer der großen Vorteile ist, dass es ein nicht-destruktives Verfahren ist, welches es erlaubt die Federkonstante des fertig funktionalisierten Cantilevers zu bestimmen. Es sind außerdem keine weiteren Geräte notwendig als zur Kraftspektroskopie.

Im thermischen Gleichgewicht mit seiner Umgebung, und weit weg von der Oberfläche hängt die Bewegung des Cantilevers nur von seinem thermischen Rauschen ab. Als solches bezeichnet man die Auslenkungen des Cantilevers durch die Brownsche Molekularbewegung des umgebenden Mediums. Unter der Annahme, dass der Cantilever eine ideale Feder mit Federkonstante k ist, so kann er als harmonischer Oszillator betrachtet werden, welcher durch die Hamiltonfunktion beschrieben wird:

$$H = \frac{p^2}{2m} + \frac{1}{2}m\omega_0^2q^2. \quad (2.7)$$

Hierbei sind q und p die verallgemeinerte Ortskoordinate bzw. der verallgemeinerte Impuls, m ist die Masse des Cantilevers und ω_0 ist Resonanzfrequenz des Oszillators. Das Äquipartitionstheorem besagt, dass die thermische Energie pro Freiheitsgrad $k_B T/2$ beträgt. Damit gilt für den harmonischen Oszillator

$$\left\langle \frac{1}{2}m\omega_0^2q^2 \right\rangle = \frac{1}{2}k_B T. \quad (2.8)$$

2 Physikalische Grundlagen

Drückt man die Resonanzfrequenz nun durch k und m aus

$$\omega_0 = \sqrt{\frac{k}{m}}, \quad (2.9)$$

so folgt für die Federkonstante

$$k = \frac{k_B T}{\langle q^2 \rangle}. \quad (2.10)$$

$\langle q^2 \rangle$ ist die mittlere quadratische Auslenkung und entspricht der Rausleistungsdichte. Diese entspricht der Fläche unter dem Resonanzpeak im *thermischen Energiespektrum* des Cantilevers. Um sie zu berechnen, muss man die quadrierte Fouriertransformierte der Bewegungsgleichung bestimmen (Gleichung 2.11).

$$\langle q^2 \rangle = \left| \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} q(t) e^{i\omega t} dt \right|^2. \quad (2.11)$$

Der Resonanzpeak des thermischen Energiespektrums hat die Form einer Lorentzkurve

$$f(\omega) = y_0 + \frac{2A}{\pi} \frac{w}{4(\omega - \omega_c)^2 + w^2}, \quad (2.12)$$

wobei w und y_0 die breite des Peaks und den Offset darstellen und A die Amplitude. $\langle q^2 \rangle$ kann durch einen Fit an den Peak bestimmt werden.

Die Auslenkung des Cantilevers wird über die Spannungsänderung der Quadrantendiode ermittelt und zunächst in Volt gemessen. Also hat das gemessene Energiespektrum zunächst die Einheit V^2/Hz und muss nun in nm^2/Hz umgerechnet werden. Man nimmt hierzu eine Kraft-Distanz-Kurve auf hartem Untergrund (unpräpariertes Gold) auf und bestimmt die Steigung der Geraden im Kontaktbereich. Diese hat die Einheit V/nm und stellt invertiert die inverse optische Cantileversensitivität (engl: *inverted optical lever sensitivity*) *InvOLS* dar. Es gilt dann

$$Deflection[nm] = InvOLS \left[\frac{nm}{V} \right] \cdot Deflection[V]. \quad (2.13)$$

Mit dieser Umrechnung ergibt sich für die Federkonstante

$$k = \frac{k_B T}{\langle U^2 \rangle InvOLS^2 \chi^2}. \quad (2.14)$$

$\langle U^2 \rangle$ ist die mittlere quadratische Auslenkung in Volt und $\chi^2 \approx 1$ ist ein Korrekturfak-

tor, welcher die Auslenkung des Cantilevers durch Aufsetzen auf die Oberfläche mit der Auslenkung durch freie Oszillation vergleicht. Durch die Bestimmung der Federkonstanten können die, in den gemessenen Kraft-Distanz-Kurven auftretenden Kräfte bestimmt werden. Die weitere Auswertung dieser Daten wird im folgenden Abschnitt besprochen.

2.3 Kinetik der Bindungen

Mit der Kraftspektroskopie werden zunächst nur die Dissoziationkräfte des Komplexes bestimmt, es lassen sich jedoch noch weitaus mehr Aussagen über die Kinetik der Bindung und die Reaktionsparameter herleiten. Die Abrisskräfte eines Molekülkomplexes unterliegen einer stochastischen Verteilung und hängen zudem diese von der Ziehgeschwindigkeit ab. George Bell, Evan Evans und Ken Ritchie [26, 27] erkannten, dass die Dissoziation einer Bindung unter einer äußeren Kraft mit dem thermisch aktivierten Zerfall eines metastabilen Zustands verglichen werden kann, und mittels der Kramer'schen Reaktionsratentheorie [26, 28, 29] beschrieben werden kann. Sie haben durch die Entwicklung ihrer Theorie viel zum Verständnis der Zusammenhänge beigetragen.

Im Folgenden wird nun zunächst die Reaktionskinetik von Rezeptor-Ligand-Systemen im thermodynamischen Gleichgewicht beschrieben. Danach wird die Dissoziation unter Einfluss einer äußeren Kraft, basierend auf der Theorie von Bell, Evans und Ritchie erläutert.

2.3.1 Kinetik im thermodynamischen Gleichgewicht

Rezeptor-Ligand-Systeme sind durch eine definierte Bindungsstelle am Rezeptormolekül (R) charakterisiert, an welche der Ligand (L) spezifisch binden kann. Die beiden können mit einer *Assoziationsratenkonstante* k_a zu einem Rezeptor-Ligand-Komplex assoziieren (Gleichung 2.15) und mit der *Dissoziationsratenkonstante* k_d wieder dissoziieren (Gleichung 2.16).



[R], [L] und [RL] sind die Konzentrationen der freien Rezeptoren und Liganden, beziehungsweise Rezeptor-Ligand-Komplexe. Der Kehrwert der Dissoziationsratenkonstante $\tau = \frac{1}{k_d}$ ist die mittlere Lebensdauer der Bindung. Im thermodynamischen Gleichgewicht bilden sich genauso viele Rezeptor-Ligand-Komplexe aus, wie gleichzeitig auch

2 Physikalische Grundlagen

wieder dissoziieren. Es gilt $k_a[R][L] = k_d[RL]$ und man erhält so die Dissoziations-Gleichgewichtskonstante K_D (Gleichung 2.17) und die Assoziations-Gleichgewichtskonstante K_A (Gleichung 2.18):

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} = \frac{[R][L]}{[RL]}, \quad (2.17)$$

$$K_D = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[RL]}{[R][L]}. \quad (2.18)$$

Die Gleichgewichtskonstante K_D ist ein Maß für die Bindungsstärke eines Rezeptor-Ligand-Systems. Je größer k_a und je kleiner k_d , desto größer ist die Affinität der Bindung. Grundsätzlich gehorchen biologische oder chemische Reaktionen den Gesetzen der Thermodynamik. Für biologische Reaktionen bei konstantem Druck p und konstanter Temperatur T ist das thermodynamische Potential durch die freie Enthalpie G gegeben. Sie stellt die Differenz aus den Gibbschen freien Enthalpien von End- und Anfangszustand dar:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = G_E - G_A, \quad (2.19)$$

wobei ΔH die Reaktionsenthalpie und ΔS die Entropieänderung des Systems ist. Die freie Enthalpie gibt an, in welche Richtung eine Reaktion abläuft. Bei $\Delta G < 0$ läuft die Reaktion von selbst, das heißt ohne weitere Energiezufuhr ab, mit $\Delta G = 0$ befindet sie sich im Gleichgewicht und mit $\Delta G > 0$ kommt sie nur mit Energiezufuhr zustande.

Mit Einführung der freien Standardenthalpie ΔG^0 ergibt sich für die freie Enthalpie:

$$\Delta G = \Delta G^0 - RT \ln \frac{[R][L]}{[RL]} = \Delta G^0 - RT \ln K_D, \quad (2.20)$$

mit der universellen Gaskonstante $R = 8,314 \frac{J}{Kmol}$. Im thermodynamischen Gleichgewicht gilt $\Delta G = 0$ und somit ergibt sich für die freie Standardenthalpie

$$\Delta G^0 = RT \ln K_D. \quad (2.21)$$

Für Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen gilt $\Delta G < 0$, das heißt die Assoziation läuft selbständig ab und für die Dissoziation muss Energie zugeführt werden. Die Dissoziation kann aufgrund thermischer Fluktuationen auch als thermisch aktiviertes Überwinden einer endlich hohen Potentialbarriere betrachtet werden (siehe Abb. 2.4). Der Zusammenhang zwischen der Dissoziationsratenkonstante k_d und der Höhe der Potentialbarriere

ΔG^\ddagger ist nach Arrhenius [30] wie folgt gegeben:

$$k_d = C e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{k_B T}}. \quad (2.22)$$

C stellt hierbei einen Proportionalitätsfaktor dar, der durch Kramers [28] bestimmt wurde.

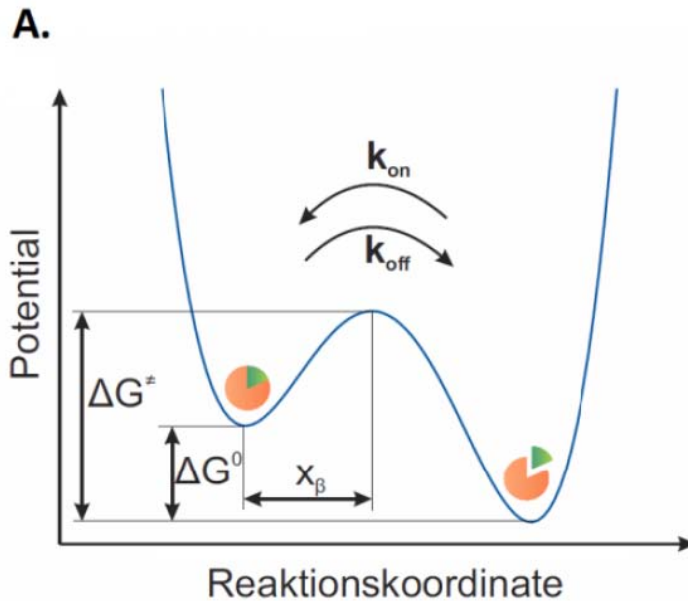


Abbildung 2.4: Reaktionssystem mit zwei metastabilen Zuständen die von einer Potentialbarriere getrennt werden. Diese kann durch thermische Fluktuationen überwunden werden, worauf es entweder zu Komplexbildung oder Dissoziation kommt [31].

2.3.2 Theorie von Bell, Evans und Ritchie

Die Theorie von Bell, Evans und Ritchie beschreibt die Kinetik von Bindungen unter Anlegen einer äußeren Kraft [26, 27] und ist die Grundlage für die Auswertung, der in dieser Arbeit verwendeten dynamischen Kraftspektroskopie. Eine konstante mechanische Kraft f induziert die Dissociation einer Bindung, indem sie die Potentialbarriere zwischen gebundenem und ungebundenem Zustand absenkt:

$$\Delta G^\ddagger(f) = \Delta G^\ddagger - f \cdot x_\beta. \quad (2.23)$$

2 Physikalische Grundlagen

Hierbei ist $x_\beta = x_{max} - x_{min}$ der Abstand zwischen dem Minimum des metastabilen Zustands und dem Maximum der Potentialbarriere (siehe Abb. 2.5).

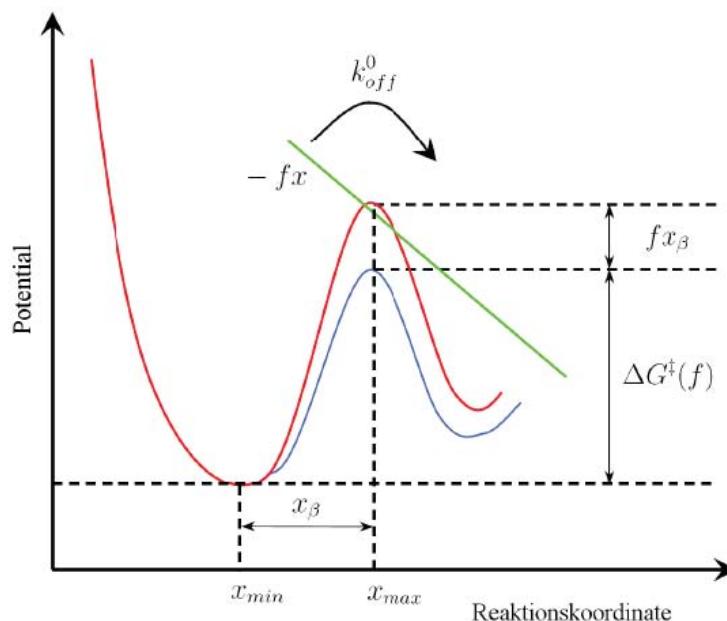


Abbildung 2.5: Die Potentialbarriere zwischen zwei metastabilen Zuständen wird durch eine externe Kraft um den Wert $f x_\beta$ abgesenkt. Die rote Kurve zeigt die freie Dissoziation eines Komplexes, die blaue Kurve zeigt den Verlauf des Potentials unter Einwirkung einer äußeren Kraft [8].

Die Dissoziationskonstante wird damit zeit- und kraftabhängig und Gleichung 2.22 wird zu

$$k_d(f) = k'_d e^{\frac{f x_\beta}{k_B T}}. \quad (2.24)$$

Die Lebensdauer eines Komplexes ist durch die Dissoziationsratenkonstante gegeben und wird somit durch eine äußere Kraft verringert. daraus folgt, dass die Zerfallswahrscheinlichkeit des Komplexes erhöht wird. Da alle Übergänge zu einem metastabilen Zustand auf einer größeren Zeitskala stattfinden als lokale Ortsschwankungen [29], und im thermischen Gleichgewicht die vorherigen Zustände des Systems keinen Einfluss auf den aktuellen Zustand nehmen, ist die Dissoziationsratenkonstante nur von der momentan wirkenden Kraft abhängig. Die Reaktionskinetik kann somit beschrieben werden durch

$$\frac{dp(t)}{dt} = -k'_d(f(t))p(t), \quad (2.25)$$

und $p(t)$ ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Bindung bis zum Zeitpunkt t überlebt.

Nimmt man weiter an, dass die Kraft $f(t)$ nicht von der Ziehgeschwindigkeit sondern nur von der Auslenkung $s = v \cdot t$ abhängt, so gilt:

$$f(t) = F(v \cdot t) = F(s). \quad (2.26)$$

Ist die Ziehgeschwindigkeit konstant, so gilt

$$f(t) = k_{eff} \cdot v \cdot t = r \cdot t. \quad (2.27)$$

k_{eff} ist die *effektive Federkonstante* des Systems, welche aus der Federkonstante des Cantilever und der Elastizität der Moleküle besteht; $r = k_{eff} \cdot v$ ist die sogenannte *Belastungsrate*, engl. loading rate. Mit $p_v(f(t)) = p(t)$ und $p(t=0) = p_v(f = f_{min}) = 1$ ergibt sich aus Gleichung 2.25 und Gleichung 2.26 für die Bindungswahrscheinlichkeit einer Bindung unter Einfluss einer äußeren Kraft

$$p_v(f) = \exp \left[-\frac{1}{v} \int_{f_{min}}^f df' \frac{k'_d(f')}{F'(F^{-1}(f'))} \right]. \quad (2.28)$$

f_{min} ist hier der Schwellenwert, unterhalb dessen die Dissoziationskräfte nicht mehr von den thermischen Fluktuationen unterschieden werden können. Damit die Inverse der Funktion F^{-1} existiert, muss $F(s)$ monoton wachsen. Mit Gleichung 2.24 kann man aus dem Maximum der Verteilung $-\frac{dp_v(f)}{df}$ auf die *wahrscheinlichste Abrisskraft* F_{max} schließen:

$$F_{max} = \frac{k_B T}{x_\beta} \ln \frac{x_\beta r}{k_d k_B T}. \quad (2.29)$$

Diese Gleichung zeigt den Zusammenhang zwischen wahrscheinlichster Abrisskraft F_{max} und der Belastungsrate r und bildet die Basis der dynamischen Kraftspektroskopie. Es werden hierbei die Dissoziationskräfte für verschiedene Belastungsraten bestimmt. Trägt man die Kräfte nun halblogarithmisch gegen die Belastungsrate auf, so erhält man eine lineare Abhängigkeit. Die Steigung der Regressionsgeraden ist proportional zur *Reaktionslänge* x_β und durch Extrapolation zum Wert $F_{max} = 0$ kann die Dissoziationsratenkonstante k_d bestimmt werden.

3 Biologische Grundlagen

Eine einzelne Zelle ist nur einige Mikrometer groß, verformbar und von einer sehr dünnen Membran umgeben. Im Zusammenschluss mit Millionen von anderen Zellen können Zellen jedoch so komplexe und stabile Systeme wie einen Elefanten oder einen Baum bilden. Im Laufe der Evolution haben sich viele spezialisierte Zellarten entwickelt, die sich zu unterschiedlichen Geweben mit verschiedenen Funktionen zusammenschließen. Das koordinierte Zusammenspiel dieser diversen Zell- und Gewebearten ermöglicht dem Organismus den Erhalt lebenswichtiger Funktionen wie Stoffwechsel, Bewegung und Reproduktion. Es gibt zwei grundlegende Baustrategien, um den vielen Belastungen, die auf vielzellige Gebilde wirken können zu entgegen: zum einen eine feste extrazelluläre Matrix (EZM), zum anderen die Stärke der Zell-Zell-Verbindungen.

In diesem Kapitel werden die verschiedenen Zell-Zell-Verbindungen erläutert, insbesondere die für diese Arbeit wichtigen Desmosomen und eine ihrer Hauptkomponenten, das Desmoglein 2 (DSG2). Außerdem werden die Ursachen und Hauptcharakteristika der Arrhythmogenen Rechtsventrikulären Kardiomyopathie (ARVC) besprochen sowie der Zusammenhang von ARVC und Desmoglein 2.

3.1 Zell-Zell-Adhäsionen

Bei Wirbeltieren werden abhängig von der Art des Gewebes beide der oben genannten Baustrategien verwendet. Bindegewebe beinhaltet hauptsächlich extrazelluläre Matrix. Diese besteht aus faserartigen Polymeren und ist hauptsächlich für die Stabilität des Gewebes verantwortlich. In Epithel- und Muskelgewebe hingegen ist die EZM dünner und die mechanische Belastung wird vor allem über die Zell-Zell-Verbindungen und das Cytoskelett von Zelle zu Zelle weitergegeben.

Bei Wirbeltieren gibt es vier verschiedene Klassen von Zell-Zell-Verbindungen [2] (siehe Abb. 3.1):

- a) *Ankerverbindungen*, die das Cytoskelett einer Zelle mit einer anderen Zelle oder

mit der extrazellulären Matrix verankern.

- b) *Undurchlässige Verbindungen (Tight Junctions)* dichten die Lücken zwischen den Epithelzellen ab und verhindern, dass Moleküle entweichen.
- c) *Kanalbildende Verbindungen (Gap Junctions)* ermöglichen den Transport von kleinen Molekülen und Ionen von einer Zelle zur anderen.
- d) *Signalübertragende Verbindungen* ermöglichen die Signalübertragung durch die Plasmamembran (alle vorher genannten Verbindungen können neben ihrer eigentlichen Funktion auch eine signalübertragende Rolle haben).

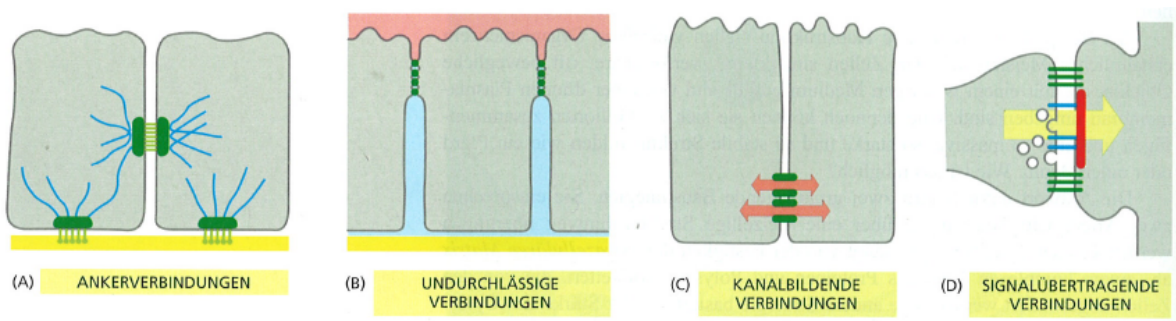


Abbildung 3.1: Verschiedene Arten von Zell-Zell-Verbindungen [2]

Ankerverbindungen sind hauptsächlich für die Zell-Zell-Adhäsion verantwortlich. Transmembrane Zell-Adhäsions-Moleküle (CAMs) durchspannen die Zellmembran und binden mittels Adapterproteinen an das Cytoskelett der Zelle. Die extrazelluläre Domäne vermittelt die Bindung mit dem Adhäsions-Protein der Nachbarzelle oder der Extrazellulären Matrix. Es gibt zwei Hauptklassen von transmembranen Zell-Adhäsions-Molekülen: Die Cadherine, welche Zell-Zell-Verbindungen vermitteln, und die Integrine, die eine Verbindung zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix darstellen. Innerhalb der Klassen gibt es noch weitere Spezialisierungen, abhängig von der Art des Cytoskelettfilaments, welches mit der Ankerverbindung verbunden ist. Die verschiedenen Arten von Ankerverbindungen werden in Tabelle 3.1 aufgeführt [2].

Cadherine unterscheidet man weiterhin in klassische Cadherine (hauptsächlich E-Cadherin, N-Cadherin und P-Cadherin), die sehr eng miteinander verwandt sind und nichtklassische Cadherine wie die Protocadherine des Gehirns und die desmosomalen Cadherine Desmoglein und Desmocollin. Gemein haben alle Cadherine, dass ihr N-terminaler, extrazellulärer Abschnitt aus mehreren Wiederholungen eines Motivs besteht,

3 Biologische Grundlagen

Verbindung	Transmembranprotein	extrazellulärer Ligand	verankertes Cytoskelettfilament
Adhäsionsverbindung	Cadherin	Cadherin der Nachbarzelle	Actinfilamente
Desmosomen	desmosomales Cadherin	desmosomale Cadherine der Nachbarzelle	Intermediärfilamente
Zell-Matrix-Adhäsion	Integrin	Proteine der EZM	Actinfilamente
Hemidesmosom	Integrin($\alpha6\beta4$)	Proteine der EZM	Intermediärfilamente

Tabelle 3.1: Ankerverbindungen und ihre Liganden [2]

der Cadherin- Domäne. Die Domänen sind untereinander über Gelenke verbunden, an denen sich Bindestellen für extrazelluläre Ca^{2+} -Ionen befinden. Diese Ionen verleihen dem Gelenk Steifigkeit und die Anordnung der gesamten Kette ändert sich zu einer langgestreckten Konformation [2, 32, 33]. Die steife Konformation stellt den funktionellen Zustand der Kette dar und äußert sich zudem in einer geringeren Empfindlichkeit gegenüber Proteolyse. Mit Hilfe von Elektronenmikroskopie kann die Verfestigung visualisiert werden [34]. Wird das Calcium aus der Umgebung entfernt, werden die Gelenke biegsam und die Kette wird schlaff (siehe Abbildung 3.2). Es wird vermutet, dass sich zusätzlich noch die Konformation des N-Terminus ändert und damit die Bindungsaffinität sinkt.

Die Funktionalität der Cadherine ist also abhängig von der Calciumkonzentration (Cadherine = calcium-dependent adhesion molecules). In der Regel binden Cadherine mit relativ geringer Bindungsaffinität. Die Bindung wird jedoch deutlich verstärkt, in dem viele Cadherine Seite an Seite parallele Bindungen ausbilden. Die Ankerverbindung funktioniert somit wie ein Klettverschluss: sie ist in ihrer Gesamtheit viel stärker als die Einzelverbindung, kann aber durch Lösen der einzelnen Verbindungen nacheinander auch leicht getrennt werden [2].

Genau diese dynamischen Bindungseigenschaften sind für Zellen wichtig. Sie gewährleisten einerseits die nötige Stabilität des Gewebes und halten den mechanischen Belastungen stand. Andererseits ermöglichen sie ein schnelles Lösen von Zellverbindungen zum Beispiel für den gezielten Transport von Zellen bei der Entwicklung von Gewebe.

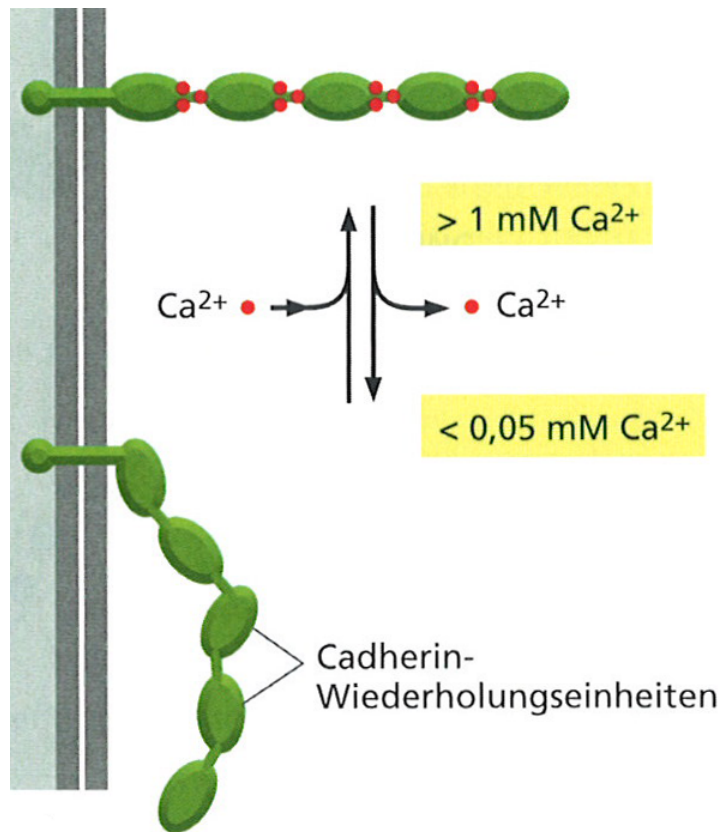


Abbildung 3.2: Calcium bindet an den Gelenken der extrazellulären Domäne und bringt das Cadherin so in eine funktionale Konformation [2].

3.1.1 Desmosomen

Desmosomen wurden 1864 von dem italienischen Pathologen Giulio Bizzazero (1846-1901) mittels Lichtmikroskopie entdeckt. Richtig benannt wurden sie jedoch erst 1920 durch Joseph Schaffner. Der Name Desmosom leitet sich ab von den griechischen Wörtern *desmos* was Bindung bedeutet, und *soma* was so viel wie Körper heißt [35]. Desmosomen verankern die Intermediärfilamente (IF) an der Plasmamembran und verbinden sie mit der Nachbarzelle. Die Intermediärfilamente sind Teil des Cytoskeletts und verleihen Epithelgewebe und Muskeln mechanische Stabilität.

In ihrem Aufbau erinnern Desmosomen an ein rundes oder ovales Sandwich aus verschiedenen dicken Schichten. Der Durchmesser dieses scheibenartigen Komplexes liegt meistens zwischen $0,1\text{-}0,5 \mu\text{m}$ [36], abhängig von der Art des Gewebes. Ein Desmosom besteht aus drei Zonen: Der inneren Plaque (*Inner Dense Plaque IDP*) im Inneren der Zelle, der äußeren Plaque (*Outer Dense Plaque ODP*) an der inneren Oberfläche der Plasmamem-

bran, sowie einer extrazellulären Kernregion dem *Desmoglea*. Die drei Zonen und ihre Bestandteile werden in Abbildung 3.3 dargestellt.

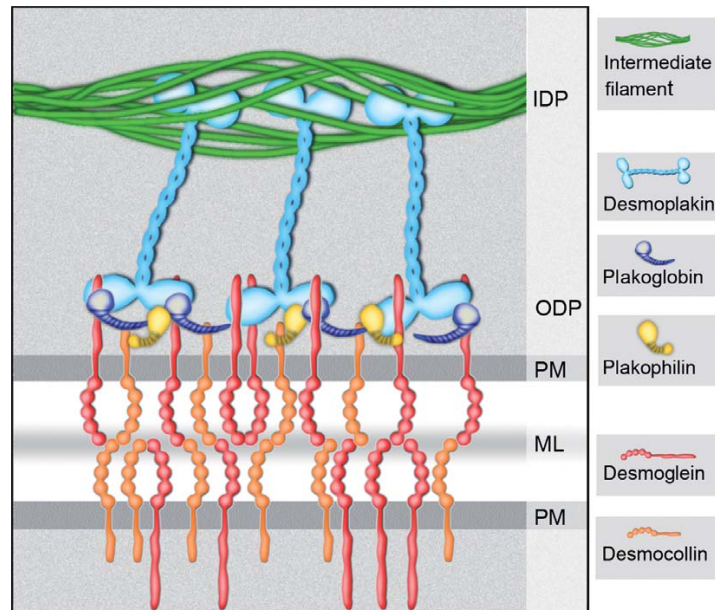


Abbildung 3.3: Aufbau eines Desmosoms mit den grundlegenden Bausteinen [37]. Das Schema zeigt ein komplettes Desmosom mit äußerer Plaque (ODP), innerer Plaque (IDP), der Mittellinie (ML) zwischen den beiden Zellen sowie der Plasmamembran (PM) beider Zellen.

Die Desmoglea ist ca. 20-50 *nm* groß, wasserdurchlässig und mit elektronendichtem Material gefüllt. Sie stellt den interzellulären Bereich eines Desmosoms dar, in welchem die extrazellulären Domänen der transmembranen desmosomalen Cadherine Desmoglein (DSG) und Desmocollin (DSC) hineinragen und mit den Cadherinen der Nachbarzelle interagieren.

Die cytoplasmatischen Domänen von Desmoglein und Desmocollin binden an die Ankerproteine der Armadillo- und Plakinfamilie und bilden die äußere Plaque. Die Ankerproteine Plakoglobin und Plakophilin binden an Desmoplakin, welches dann mit den Intermediärfilamenten assoziiert und somit das Cytoskelett an der Adhäsion beteiligt. Diese Interaktion bildet die innere Plaque. Die äußere Plaque ist dichter als die innere, beide sind ca. 15-20 *nm* gross und durch einen ca. 10-20 *nm* großen Spalt getrennt [32, 37].

In einer elektronentomografischen Aufnahme sind die einzelnen Bereiche des Desmosoms gut erkennbar (siehe Abb. 3.4(a)). Die Plasmamembran erscheint als dünne, helle

Linie. Auch wenn es auf Grund der Dichte nicht möglich ist, einzelne desmosomale Cadherine auszumachen, ist gut sichtbar wie sie den Zellzwischenraum überbrücken, welcher von der elektronendichten Mittellinie geteilt wird. In Abbildung 3.4(b) ist ein paralleler (A) sowie ein senkrechter (B) Querschnitt durch die tomografische Rekonstruktion zu sehen, welche eine noch höhere Auflösung liefern. Die Membran ist rot angefärbt, die Cadherine blau und die jeweiligen Plaques orange (ODP) und grün (IDP).

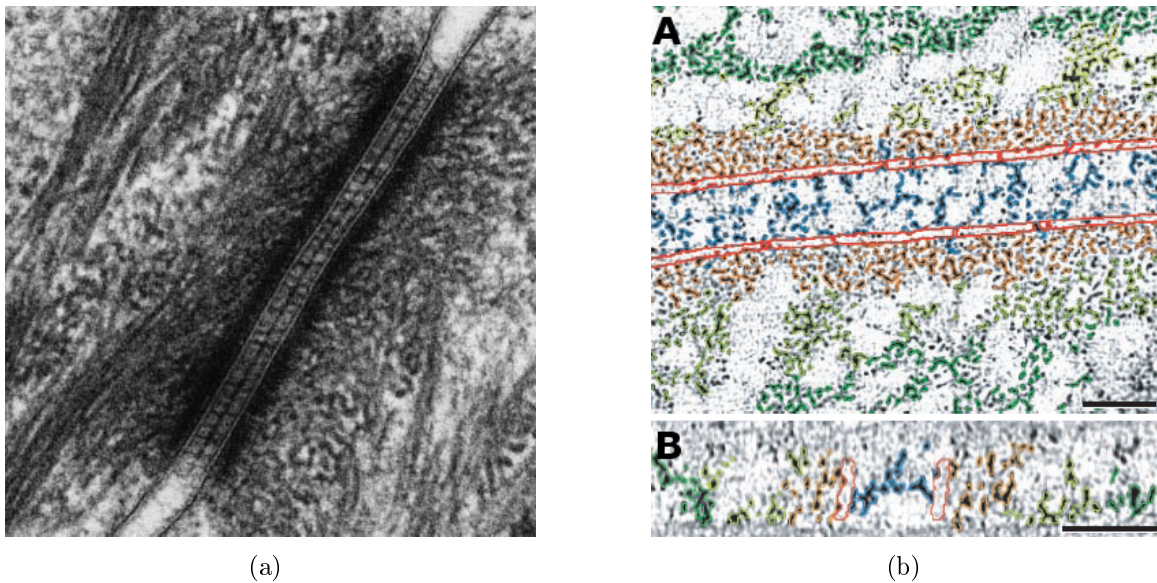


Abbildung 3.4: (a) Elektronentomografische Aufnahme eines Desmosoms (Skalierung 100 *nm*) und (b) Querschnitte durch die tomografische Rekonstruktion (**A** paralleler, **B** senkrechter Querschnitt, Skalierung 30 *nm*) [38].

Desmosome kommen hauptsächlich in Geweben vor, die großem mechanischem Stress ausgesetzt sind, ihre Anzahl variiert dabei mit der jeweiligen Gewebeart [36]. Auch wenn die strukturgebende Funktion sicherlich im Vordergrund steht, dienen Desmosomen nicht nur als interzellulärer Klettverschluss, sondern sind außerdem an der Zellkommunikation beteiligt und beeinflussen die Zellassemblierung. Sie kommen außerdem auch bei der Embryogenese vor und spielen somit vermutlich schon eine wichtige Rolle bei der Bildung von Gewebe und Organen [39].

Dynamische Bindungseigenschaften von Desmosomen sind notwendig für die Bildung und Bewahrung des dynamischen Gleichgewichts des Gewebes. Es existieren hochkomplexe Mechanismen um die Balance zwischen Bindung und Dissoziation zu gewährleisten. So kann die Adhäsionskraft den jeweiligen Anforderungen angepasst werden, um einerseits die strukturelle Funktion der Desmosomen zu erhalten, andererseits der Zelle ein dy-

3 Biologische Grundlagen

namisches Verhalten zu ermöglichen, welches schnelle Zell-Zell-Kontakt-Rearrangements erfordert. Die Adhäsionskraft wird unter anderem durch die Größe des Desmosoms, dem relativen Verhältnis von Desmoglein und Desmocollin und durch eine Substitution der beteiligten Cadherine reguliert [37].

Versuche zur Missexpression von desmosomalen Cadherinen zeigen, dass Missexpression zu schwerwiegenden Krankheiten und Defekten führen kann, welche häufig die Haut oder das Herz betreffen [36]. Mutationen in den Genen, die für DSG1 bzw. DSG4 kodieren, führen zu *Striate Palmoplantar Keratoderma*, einer Verdickung der Haut bzw. zu defekter Differenzierung der Haar-Follikel [32]. Mißexpression von Plakophilin, einem desmosomalen Ankerprotein, verursacht Ektodermale Dysplasie, eine seltene rezessive Störung bei der die Haut extrem empfindlich und leicht verletzbar ist [40]. Neben Mutationen kann es außerdem noch zu Autoimmunerkrankungen kommen. Bei der Autoimmunkrankheit Pemphigus zielen Autoantikörper auf die desmosomalen Cadherine DSG1 und DSG3 und verursachen so Blasenbildung der Haut [3, 32, 37, 41]. Mutationen der desmosomalen Gene werden auch mit der Arrhythmogenen Rechtsventrikulären Kardiomyopathie assoziiert, worauf in Abschnitt 3.2.1 näher eingegangen wird.

3.1.2 Desmosomale Transmembranproteine

Desmosomale Adhäsion erfordert die Anwesenheit beider desmosomaler Cadherine *Desmoglein* und *Desmocollin*, welche jeweils eine eigene Unterfamilie der Cadherine repräsentieren. Beim Menschen gibt es sieben verschiedene desmosomale Cadherine: drei Arten von Desmocollin (DSC1, DSC2, DSC3) und vier verschiedene Desmogleine (DSG1, DSG2, DSG3 und DSG4).

Alle Desmocollintypen unterlaufen ein alternatives Spleißen ihrer intrazellulären Domäne, dabei entstehen eine DSCa und eine kürzeren DSCb Form. Die beiden unterscheiden sich in der Länge ihres Carboxyl-Terminus [32] (siehe Abb. 3.5).

Der extrazelluläre Teil beider Unterfamilien besteht aus vier *extrazellulären Domänen (EC1-EC4)* sowie der *extrazellulären Ankerdomäne (EA)*. Jede Domäne ist ca. 110 Aminosäuren lang und ist aus siebensträngigen β -Barrels aufgebaut. Die Domänen sind über Gelenke verbunden, welche Calciumbindende Taschen formen und jeweils Platz für drei Ca^{2+} -Ionen bieten. Auf die membrandurchspannende Domäne (*Transmembrandomäne TM*) folgt der *intrazelluläre Anker (IA)* an der inneren Oberfläche der Plasmamembran. Desmoglein und die längere a-Form von Desmocollin besitzen eine *intrazelluläre cateninbindende Sequenz (ICS)*. Bei Desmoglein folgt darauf der *prolin-reiche Linker (IPL)*

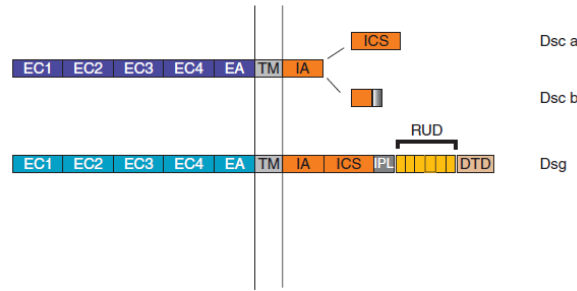


Abbildung 3.5: Grundlegender Aufbau von Desmoglein und Desmocollin [32]

und eine variierende Anzahl von Wiederholungseinheiten (*Repeat Unit Domain RUD*) sowie einer glycin-reichen *Carboxyl-Terminus Domäne* (*Desmoglein Terminus Domäne DTD*) [37].

Im Allgemeinen bilden Cadherine homophile Wechselwirkungen aus [3], was kraftspektroskopische Messungen für Desmoglein bestätigen [42, 43]. Bei Desmosomen wurden jedoch auch heterophile Wechselwirkungen zwischen DSG und DSC benachbarter Zellen beobachtet [32]. Mit Hilfe von Elektronentomografie konnten He et.al [38] die Struktur der Adhäsionsverbindung von Desmosomen weiter analysieren und visualisieren. Die dreidimensionale Rekonstruktion der Desmosomen lässt drei verschiedene Bindungsgeometrien erkennen: die trans-interaktive S- und W-Konformation, und die λ -Konformation, die einer S-Konformation noch eine Cis-Interaktion zufügt (siehe Abb. 3.3). Die Cadherine interagierten zu 42% in S-Konformation, 23% in W-Form und 40% in der cis-verbundenen λ -Form.

Wie genau die Adhäsion von Desmosomen im Einzelnen funktioniert, warum und wann es zu Heterooligomerisation, Homooligomerisation, Cis- oder Transinteraktion kommt ist noch unklar. Es werden aber beide Formen von desmosomalen Cadherinen für eine starke Bindung benötigt und es finden sowohl homophile, als auch heterophile Bindungen statt [32].

3.1.3 Desmoglein 2

Die einzelnen Desmogleinarten unterscheiden sich deutlich in ihren Aminosäuresequenzen. Sequenzalignments zeigen, dass die extrazellulären Domänen EC1-4 mitsamt ihren

Calciumbindestellen bei allen Typen sehr ähnlich sind (Übereinstimmungen von 37-47%), während sich die intrazellulären Domänen deutlicher unterscheiden. Insgesamt sind sich DSG1 und DSG3 näher als DSG2 [36]. Die intrazelluläre Domäne RUD besteht bei den DSG2 aus sechs Wiederholungen der Basiseinheit, bei DSG1 aus fünf, DSG3 hat zwei und DSG4 besitzt drei Basiseinheiten (siehe Abb. 3.6). Desmoglein 2 (DSG2) ist damit das größte der desmosomalen Cadherine [36, 44].

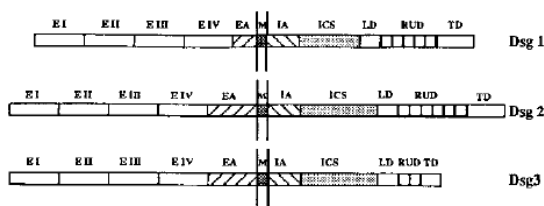


Abbildung 3.6: Grundlegender Aufbau von Desmoglein 1, 2 und 3 [36]

Die verschiedenen Typen von Desmoglein treten außerdem nicht alle gleich häufig auf. DSG1 und DSG3 kommen hauptsächlich im Epithelgewebe vor, DSG4 ist nur in den Haarfollikeln zu finden [32]. DSG2 dagegen ist als einziges desmosomales Cadherin in allen Gewebearten zu finden, die Desmosomen beherbergen und ist der einzig vorhandene Desmogleintyp in nicht epithelialen Gewebe wie dem Herzmuskel, der Milz oder den Lymphknoten [36].

3.2 Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC)

Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie, kurz ARVC, ist eine Herzmuskelkrankung, die hauptsächlich dominant, seltener auch rezessiv vererbt wird. Sie betrifft vorwiegend den rechten Ventrikel und führt zu lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen und Herzversagen. ARVC ist eine der Hauptursachen für den plötzlichen Herztod junger, scheinbar gesunder Menschen. Die Prävalenz der Erkrankung liegt bei einem von 5000 Menschen, die genaue Häufigkeit kann jedoch um einiges höher liegen aufgrund der hohen Anzahl an nicht- oder falsch diagnostizierten Fällen. Diese Krankheit geht typischerweise mit einer Verkümmernung des Herzmuskels sowie dem Ersatz von Herzmuskelgewebe durch Fett- und Bindegewebe einher. Der Prozeß schreitet mit der Zeit progressiv voran und beginnt mit der äußeren Schicht der Herzwand bis er schliesslich

3.2 Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC)

die gesamte Herzwand betrifft (siehe Abb.3.7 und 3.8). Die Ersetzung des Herzmuskelgewebes durch Fett- und Bindegewebe führt zu einer Vergrößerung der Herzkammer und behindert die intraventrikuläre Reizweiterleitung, was schließlich zu den oben genannten Symptomen führt.

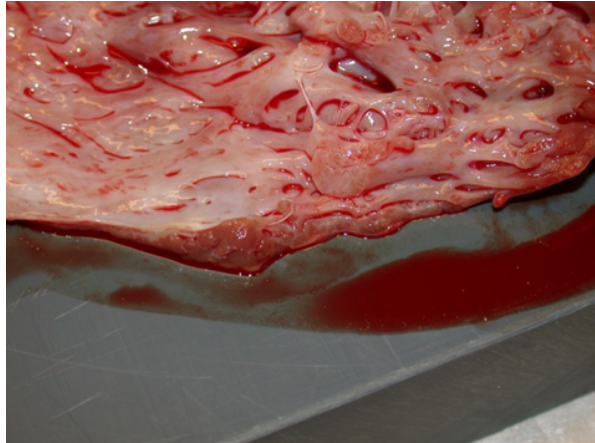


Abbildung 3.7: Abbildung des rechten Ventrikels eines ARVC Patienten aus dem Herz Diabeteszentrum NRW

Zur Behandlung von ARVC kann ein Kardioverter-Defibrillator implantiert werden, außerdem können verschiedene Medikamente helfen die Herzrhythmusstörungen zu unterdrücken. In vielen fortgeschrittenen Fällen bleibt jedoch eine Herztransplantation die einzige Therapie.

Sportliche Betätigung belastet den Herzmuskel und vergrößert das Risiko eines plötzlichen Herztodes um das fünffache, weswegen ARVC besonders als plötzliche Todesursache von Sportlern bekannt wurde. In einigen Ländern wird als präventive Maßnahme bereits ein vorsorgliches Screening durchgeführt und ARVC-Träger werden vom Sport ausgeschlossen [45].

Zur Diagnose von ARVC werden verschiedene Aspekte herangezogen, bei denen es jeweils Haupt- und Nebenkriterien gibt. Es wird untersucht, ob es eine strukturelle oder funktionelle Auffälligkeit des Ventrikels gibt, ob das Gewebe betroffen ist, ob das Elektrokardiogramm auffällig ist, ob Arrhythmien auftreten und ob eine familiäre Vorgeschichte vorliegt. Um die Diagnose zu bestätigen müssen mindestens zwei Hauptkriterien, ein Haupt- und zwei Nebenkriterien oder vier Nebenkriterien erfüllt werden [46].

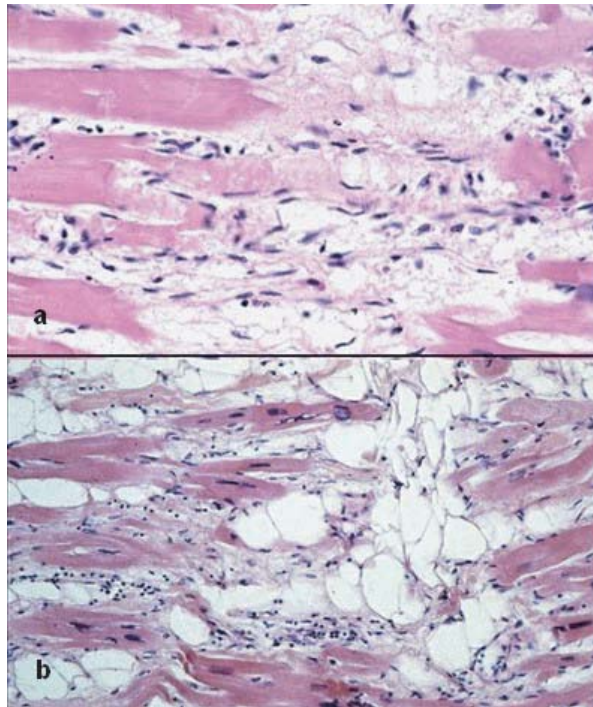


Abbildung 3.8: Gewebe mit fortschreitendem Absterben der Myozyten (a) und Einlagerung von Fett- und Bindegewebe (b) [45]

3.2.1 Mutationen von DSG2 als Ursache von ARVC

Die erste genetische Ursache von ARVC wurde bei einer rezessiven Variante der Krankheit, der Naxos-Krankheit entdeckt. Diese wird durch eine Missexpression von Plakoglobin hervorgerufen [45]. Bald darauf wurden weitere Defekte in Genen gefunden, die für desmosomale Proteine kodieren und die weiter verbreitete, dominant vererbte Variante von ARVC verursachen. Ungefähr 50% der Betroffenen beherbergen eine Mutation einer der fünf desmosomalen Hauptkomponenten Desmoglein 2, Desmocollin 2, Desmoplakin, Plakophilin 2 und Plakoglobin [46].

DSG2 und DSC2 bilden die essentiellen transmembranen Komponenten der Desmosomen im Herzen. Es wurden in verschiedenen Studien, bei denen Betroffene und ihre Familien getestet wurden Mutationen von DSG2 identifiziert, die ARVC verursachen [47, 48], wobei die Mehrheit der gefundenen Mutationen die extrazelluläre Domäne betrifft. Bei ungefähr 10% der Patienten mit ARVC sind Mutationen von DSG2 vorhanden [49]. Abbildung 3.9 zeigt eine schematische Darstellung von DSG2 und lokalisiert die Mutationen die in den verschiedenen Studien identifiziert wurden.

3.2 Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC)

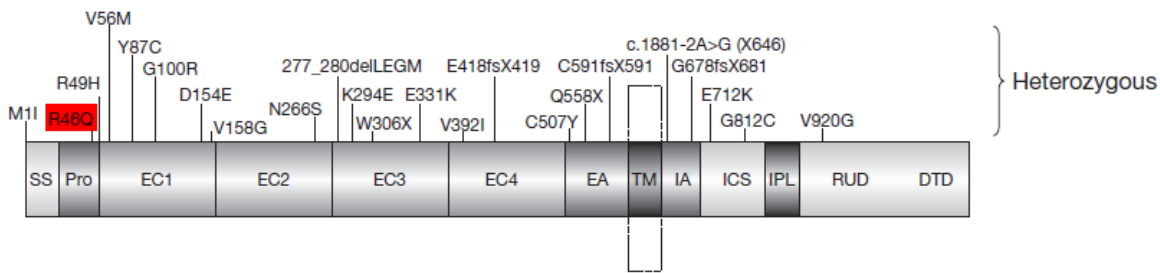


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung von DSG2. Die gefundenen Mutationen sind oberhalb des Diagramms dargestellt; die in dieser Arbeit verwendete Mutation wurde rot markiert. Das Protein ist aufgebaut aus der Signalsequenz (SS), der Prodomäne (Pro), den extrazellulären Domänen (EC1-EC2), dem extrazellulären Anker (EA), der Transmembrandomäne (TN), dem intrazellulären Anker (IA), der cateninbindenden Sequenz (ICS), dem Prolinrich-Linker (IPL), den Wiederholungseinheiten (RUD) und der Carboxyl-Terminus-Domäne (DTD) [46].

3.2.2 Die Punktmutation p.Arg46 Gln

Die Mutation p.Arg46 Gln (auch R46Q benannt), die in dieser Arbeit untersucht wird, wurde aus der ARVC-Datenbank ausgewählt [50]. Sie trat in einer Studie von Awad et al [47] bei einem Probanden mit ARVC auf (wurde hier allerdings als R45Q bezeichnet). Bei der Mutation p.Arg46 Gln von DSG2 wurde ein Basenaustausch detektiert, wie in Abbildung 3.10 zu sehen ist. Daraus wurde geschlossen, dass eine Aminosäure ausgetauscht und Arginin durch Glutamin ersetzt wurde. Diese Aminosäure liegt jedoch in der Prodomäne des Proteins (siehe Abb. 3.9), in einer potentiellen Erkennungssequenz für die Proproteinkonvertase, welche die Prodomäne von der extrazellulären Domäne abspaltet, so dass nur das „reife“ DSG2 übrig bleibt. Es wird vermutet, dass das Abspalten durch die Mutation verhindert wird und das DSG2 als „unreifes“ Molekül mit seiner Prodomäne vorliegt. Dies sollte dazu führen, dass das mutierte Protein nicht mehr in dem Maße interagieren kann wie das Wildtyp DSG2 [47].

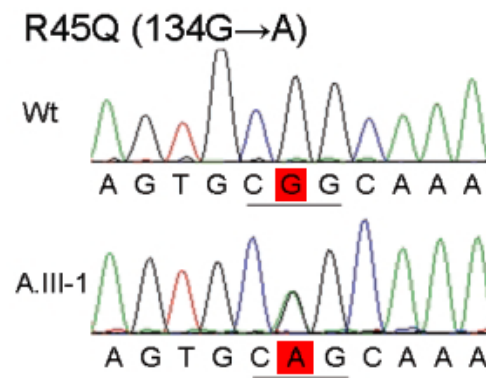


Abbildung 3.10: Chromatogramm des Wildtyps und der Mutation des Probanden A.III-1, bei der Guanin gegen Adenin ausgetauscht ist und so zu einer anderen Aminosäuresequenz führt, bei der Arginin gegen Glutamin ausgetauscht ist. Die Mutante wird hier R45Q genannt, ist aber laut ARVC-Datenbank identisch mit Mutante p.Arg46 Gln. Das veränderte Nucleotid wurde rot markiert [47].

4 Material und Methoden

In diesem Teil der Arbeit werden die benutzten Geräte und Chemikalien vorgestellt und die einzelnen Schritte zur Präparation der Cantilever und Substrate erklärt. Außerdem werden die für die kraftspektroskopischen Messungen relevanten Parameter, sowie die Software zur Auswertung der Kraft-Distanz-Kurven erläutert.

4.1 Das Rasterkraftmikroskop

Die kraftspektroskopischen Messungen werden mit dem MFP-3D-BIO TM (Asylum Research, Santa Barbara, CA 93117, USA) durchgeführt. Der Messkopf (siehe 4.1) ist das Herzstück des Mikroskops und beherbergt den Z-Piezo, der für die Steuerung des Cantilevers verantwortlich ist. Gut sichtbar wird dies im Querschnitt des Messkopfes in Abbildung 4.2. Das verwendete Gerät hat eine vergrößerte maximale Extensionslänge von $35\mu\text{m}$. Beim Verfahren des Cantilevers senkrecht zur Probenoberfläche eignet es sich so besonders zur Untersuchung von langen Molekülen, wie zum Beispiel Polymeren. Zur Steuerung des Gerätes sowie zur Aufnahme der Kraft-Distanz-Kurven und Kalibration der Kraftsensoren diente die Standard-Software von Asylum Research, basierend auf Igor Pro 6.04 (Wavemetrics, Lake Oswego, USA). Die Bestimmung der Federkonstanten erfolgte nach der Thermal-Noise-Methode (siehe Abschnitt 2.2.2).



Abbildung 4.1: MFP-3D-BIO TM Messkopf [51]

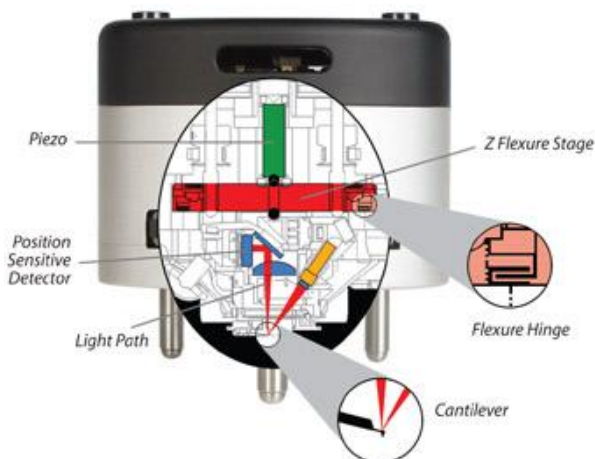


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Messkopfes [52]

4.2 Cantilever

Für diese Arbeit werden MSCT-Microlever (Bruker AXS, Madison, USA) verwendet. Hierbei handelt es sich um Si_3N_4 -Chips mit unbeschichteten, pyramidenförmigen Spitzen. Am Microlever-Chip sitzen je sechs verschiedene Si_3N_4 -Cantilever - fünf davon dreieckig und einer rechteckig - mit unterschiedlicher Größe, Federkonstante und Resonanzfrequenz. Für die Messungen wurden ausschließlich die dreieckigen Cantilever C und D benutzt (siehe Abb. 4.3(a)). Die Rückseite der Cantilever ist goldbeschichtet, was eine Verbesserung der Reflexion und somit im Ganzen ein besseres Signal ermöglicht. Der nominale Spitzenradius beträgt 10 nm , die Federkonstanten und Resonanzfrequenzen sind in Tabelle 4.1 angegeben [53]. Die Federkonstante wird jedoch vor jeder Messung wie in Abschnitt 2.2.2 erklärt, bestimmt.

Cantilever	C	D
Resonanzfrequenz	7 kHz	15 kHz
Federkonstante	10 pN/nm	30 pN/nm

Tabelle 4.1: Federkonstanten und Resonanzfrequenzen der Cantilever (Herstellerangaben nach [53])

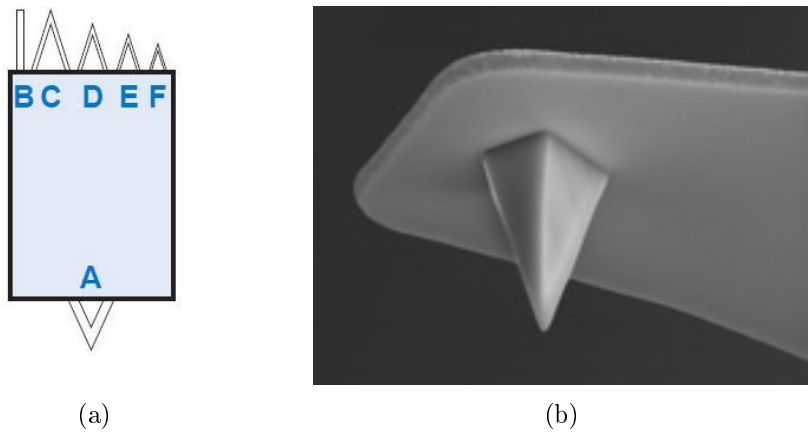


Abbildung 4.3: (a) Anordnung und Bezeichnung der Cantilever am Microlever-Chip [53] und (b) Pyramidenförmige Si_3N_4 -Spitze [53]

4.3 Substrate

Die Immobilisierung der Moleküle erfolgte auf selbst hergestellten TSG -Substraten (Template Stripped Gold) nach [54] sowie auf beschichteten Borosilikat-Glasplättchen (Arrandee TM, Werther, Deutschland). Diese bestehen aus $0,7\text{mm}$ Borosilikatglas, das mit einer $2,5\text{nm}$ dicken Schicht Chrom und einer 250nm dicken Lage Gold beschichtet ist [55].

4.3.1 Herstellung der TSG-Substrate

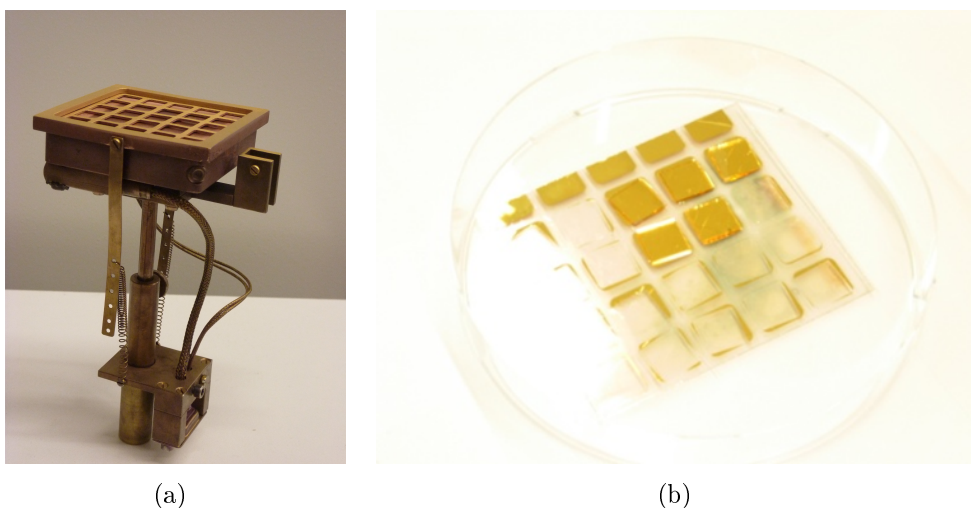


Abbildung 4.4: (a) Halterung für die Sputteranlage und (b) Mica mit aufgeklebten TSGs

Zuerst wird ein großes Stück Mica (Glimmer) (5 x 5,5 cm) vorsichtig mit einem Skalpell gespalten und mit der sauberen Seite nach oben in der Halterung mit der Lochmaske befestigt (siehe Abb. 4.4). Diese wird dann in eine Hochvakuum-Kleinbeschichtungsanlage MED 020 (Leica Microsystems, Deutschland) eingebracht und bei über 300°C und einem Druck von $2 \cdot 10^{-5} \text{ mbar}$ über Nacht ausgeheizt. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wird nun durch eine Lochblende 150nm Gold bei einem Sputterstrom von etwa 50mA auf das Mica aufgebracht. Auf diese Goldflächen werden nun im Ultraschallbad gereinigte Glasplättchen von 8x8 mm (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) geklebt. Als Kleber wird Epoxyharz EPO-TEK[®] 337 (Polytec PT GmbH, Waldbronn, Deutschland) verwendet, welcher zwei Stunden bei 150°C im Trockenofen aushärten muss. Wird das MICA abgezogen, bleibt nur die Goldschicht auf dem Glasplättchen zurück und man erhält eine sehr glatte Goldoberfläche mit Rauheiten von $RMS < 2nm$ (root mean square) auf $500 \times 500nm^2$ [31]. Dies ermöglicht neben den kraftspektroskopischen Messungen auch das Abbilden der Proben.

4.4 Weitere verwendete Geräte

Des Weiteren wurden folgende Geräte verwendet:

- Plasmaanlage (Eigenbau),
- Hochvakuum-Kleinbeschichtungsanlage MED 020 (Leica Microsystems, Deutschland),
- Ultraschallbad (Transsonic DigitalS von Schalltec GmbH),
- Teflonhalterungen für die Cantileverpräparation (Eigenbau) (Siehe Abb. 4.5),
- Trockenofen zum Trocknen der Glasobjekte (APT.Linie Serie BD/ED/FD(E2) von Binder, Tuttlingen, Deutschland),
- Autoklav zum Autoklavieren der Pipettenspitzen (Tischautoklav ZIRBUS LTA 300, ZIRBUS Technology).

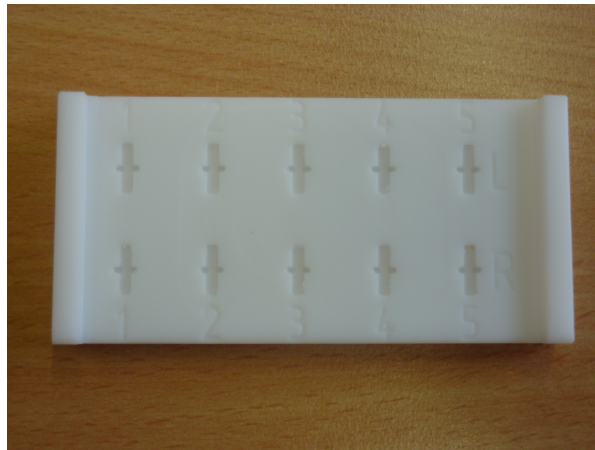


Abbildung 4.5: Teflonhalterung für die Cantilever

4.5 Verwendete Chemikalien und Biomoleküle

Chemikalie

Aceton
 Calciumchlorid dihydrat, p.a.
 Dimethylsulfoxyd (DMSO), trocken
 Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
 Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-
 N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA), Reinheit
 $\geq 99\%$
 Ethanol
 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-
 ethansulfonsäure (HEPES)
 PEG-Crosslinker (MAL-PEG-SVA), Molare
 Masse 3400 g/mol
 (3-Mercaptopropyl)triethoxy-silan (Mercap-
 tosilan)
 Milli-Q-Wasser 18, $2M\Omega/cm$
 Natriumchlorid
 PEG-Crosslinker (PEG-NHS-ester disulfide),
 Molare Masse 1109,3 g/mol
 Salpetersäure p.a. 65%
 Toluol, trocken, Reinheit $\geq 99\%$

Hersteller

VWR, Darmstadt, Deutschland
 Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
 Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
 Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
 Roth, Karlsruhe Deutschland

 VWR, Darmstadt, Deutschland
 Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA

 Laysan Bio, Arab, USA

 Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA

 Millipore
 Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
 Polypure, Oslo, Norwegen

 Roth, Karlsruhe, Deutschland
 Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA

4.5.1 Pufferlösungen

In den folgenden Messreihen werden drei verschiedene Pufferlösungen verwendet. Einerseits werden Puffer mit verschiedenen Konzentrationen von Ca^{2+} -Ionen, welche für die Funktionalität der Proteine benötigt werden, verwendet. Zum anderen kommen Puffer mit EGTA, bzw. EDTA zum Einsatz. Wird dieser zugegeben, bindet EGTA/EDTA an die zweiwertigen Calcium-Ionen.

- **EDTA-Puffer:** 10mM HEPES, 150mM NaCl, 5mM EDTA, pH=7,5,
- **EGTA-Puffer:** 10mM HEPES, 150mM NaCl, 5mM EGTA, pH=7,5,
- **Calciumpuffer:** 10mM HEPES, 150mM NaCl, sowie CaCl-Konzentrationen von 0,5 bis 5 mM, pH=7,4.

4.5.2 PEG-Crosslinker

Zur Immobilisierung der Biomoleküle auf der Oberfläche und an den Cantilevern werden zwei verschiedene PEG-Linker benutzt.

- **Maleimide-PEG-Succinimidyl Valerate (MAL-PEG-SVA)** von Laysan Bio zur Immobilisierung am Cantilever. Der Linker hat eine Länge von etwa 30nm. Das Molekül besitzt eine Maleimid-Gruppe, mit der es kovalent an die Thiol-Gruppe des Mercaptosilans binden kann sowie eine NHS-Gruppe interagiert, die kovalent mit einer Aminogruppe des Desmogleins 2 wechselwirkt.
- **PEG-NHS-ester disulfide** von Polypure zur Immobilisierung der Moleküle auf der Substratoberfläche. Die Moleküllänge beträgt ungefähr 10 nm. Das Linkermolekül bindet mit der Sulfid-Gruppe an die Goldoberfläche, die NHS-Gruppe interagiert wiederum kovalent mit einer Aminogruppe des Desmoglein 2.

4.6 Desmoglein 2

In dieser Arbeit wurden rekombinant hergestellte Fragmente des DSG2, genauer die ersten vier Cadherin-Domänen (DSG2-EC1-4) verwendet. Die Moleküle werden von Anna

Gärtner am Herz- und Diabeteszentrum NRW in Bad Oeynhausen hergestellt.

Die kodierende Sequenz der extrazellulären Domäne (DSG-ECD1-4) wird aus humaner cDNA amplifiziert und dann in den Expressionsvektor umkloniert. Es wird ausserdem ein C-terminaler HIS-Tag angefügt, der später bei der Aufreinigung zum Einsatz kommt. Die mit ARVC assoziierten Mutationen werden über *Site Directed Mutagenesis* generiert. Für die Expression werden stabil transfizierte fibrosarkomale Zellen (HT-1080-Zellen) verwendet. Für die Aufreinigung werden die Proteine aus den Zellkulturüberständen mit Ammoniumsulfat ausgefällt. Die Präzipitate werden gegen einen geeigneten Puffer dialysiert und über Affinitätschromatographie an *His-Trap HP Columns* (GE Healthcare) unter Verwendung des HIS-Tags aufgereinigt.

Mittels eines *Western Blots* werden die Proteine durch Antikörper als DSG2 identifiziert und mit einer *Coomassie-R-250*-Färbung wird eine Reinheit von > 90% und ein apparentes Molekulargewicht von ca. 70 kDa detektiert. Hierbei werden die Proteine nach einer SDS-PAGE mit dem *Coomassie*-Farbstoff angefärbt. Für den *Western-Blot* werden die Proteine mit zwei verschiedenen Antikörpern behandelt. Der erste Antikörper erkennt spezifisch DSG2, der zweite Antikörper erkennt den ersten und ist außerdem mit einer Peroxidase gekoppelt. Die Peroxidase kann ein Substrat umsetzen, so dass es zu einer Chemilumineszenz kommt, welche dann in einer speziellen Anlage detektiert wird.

4.7 Präparation

Bei der Immobilisierung der Proteine auf der Oberfläche und am Cantilever werden verschiedene Präparationsschritte durchgeführt und verschiedene Linker-Moleküle benutzt. Um sicherzustellen, dass der Molekülkomplex bei den Messungen auch tatsächlich an der gewünschten Stelle dissoziiert, muss diese Bindung die schwächste im Molekülkomplex sein. Deswegen werden die Moleküle mittels kovalenter Bindungen an die Oberfläche und den Cantilever gebunden, um ein Abreißen an diesen Stellen zu vermeiden.

Im Vorfeld der Präparation werden die Pipettenspitzen autoklaviert. Außerdem werden alle benötigten Glaswaren wie Petrischalen und Messbecher gründlich gereinigt: Durch Lagerung über Nacht in einem KOH-Isopropanol-Bad werden organische Rückstände entfernt. Die Glaswaren werden gründlich unter fließendem lauwarmen Wasser abgespült und dann wieder für eine Nacht in einem 2-3%igem HCL-Bad neutralisiert. Das HCL-Bad fügt die durch das KOH-Bad entzogenen H^+ -Ionen wieder zu. Nach dem

Spülen mit Milli-Q-Wasser kommen die Glaswaren bei 120°C für eine Stunde in den Trockenofen.

4.7.1 Funktionalisierung der Cantilever

Im Folgenden wird die Immobilisierung der Proteine an den Cantilever beschrieben.

1. Die Cantilever werden für jeweils 10 Sekunden in Aceton, Ethanol und MilliQ-Wasser getaucht.
2. Daraufhin werden sie für 45 Sekunden in Salpetersäure getaucht, um die Oberfläche zu aktivieren.
3. Die Cantilever werden zuvor für 10 Sekunden in Milli-Q-Wasser gewaschen,
4. und dann für 90 Minuten in eine Glaspetrischale mit 5ml trockenem Toluol und 100 μ l Mercaptosilan gelegt (2% ige Toluol-Silan-Lösung). Das Silan bindet an die, durch die Salpetersäure entstandenen, freien OH-Gruppen.
5. Danach werden sie erneut für je 10 Sekunden in Toluol und Ethanol gewaschen.
6. Die Cantilever werden nun in die Teflonhalterung gelegt und inkubieren über Nacht bei Raumtemperatur mit jeweils 50 μ l PEG-Linker-Lösung. Die Linker-Lösung enthält 0,1mM MAL-PEG-SVA in DMSO.
7. Nach der Inkubationszeit werden sie für je 10 Sekunden in DMSO, Ethanol und Milli-Q-Wasser getaucht und
8. erneut in der Teflonhalterung platziert und für eine halbe Stunde mit jeweils 50 μ l Proteinlösung inkubiert. Die Lösung besteht aus EDTA-Puffer und 43 nmol/l Protein.
9. Als Letztes werden die Cantilever mit Pufferlösung gespült und können für die Messungen verwendet werden.

Bei Lagerung der Cantilever in EDTA-Pufferlösung im Kühlschrank bei 4°C waren Messungen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen möglich.

4.7.2 Funktionalisierung der Goldoberfläche

Es werden nun die einzelnen Schritte erläutert, die zur Immobilisierung der Proteine auf der Goldoberfläche notwendig sind.

1. Die Goldsubstrate werden jeweils für 10 Minuten in Aceton und Ethanol im Ultraschallbad gereinigt und mit Stickstoff getrocknet.
2. Die TSG-Substrate werden nur vom MICA abgezogen und müssen nicht im Ultraschallbad gereinigt werden.
3. Die Substrate werden für 60 Sekunden in der Plasmaanlage gereinigt.
4. Nun werden die Substrate auf Gummiringen in einem Petrischälchen platziert, um eine rutschfeste Auflage zu garantieren. Es wird schnellstmöglich je $50\mu\text{l}$ Linker-Lösung aufpipettiert, um zu verhindern, dass Verunreinigungen aus der Raumluft auf die Oberfläche adsorbieren. Die Linker-Lösung besteht aus 1mM PEG-NHS-ester-disulfid in DMSO. Die Substrate inkubieren dann über Nacht bei Raumtemperatur.
5. Die Substrate werden je 10 Sekunden in DMSO, Ethanol und Milli-Q-Wasser getaucht.
6. Danach inkubieren sie für 30 Minuten mit $50\mu\text{l}$ Proteinlösung. Diese besteht aus EDTA-Puffer und $4\text{-}7\text{ nmol/l}$ DSG2.
7. Die Substrate werden mit Pufferlösung gespült und für die Messungen verwendet.

Wie in Abschnitt 3.1.2 bereits erwähnt, kann es bei DSG2 auch zu Mehrfachbindungen kommen. Außerdem können auch die Proteine auf der Substratoberfläche miteinander interagieren, wenn sie zu nah beieinander sind. Um sicherzustellen, dass die Substratoberflächen ausreichend, aber auch nicht zu dicht belegt sind, wurden verschiedene Oberflächenkonzentrationen mit dem Rasterkraftmikroskop abgebildet. Dazu wurden die in Abschnitt 4.3.1 beschriebenen TSGs verwendet. Man sieht deutlich, dass bei 29 nmol/l DSG2 (Abb. 4.6(b)) die Oberfläche deutlich dichter belegt ist als bei 7 nmol/l (Abb. 4.6(a)). Die Länge des PEG-Linkers auf der Substratoberfläche beträgt ca. 10 nm . Bei den folgenden Messungen werden Konzentrationen von $4\text{-}7\text{ nmol/l}$ DSG2 verwendet.

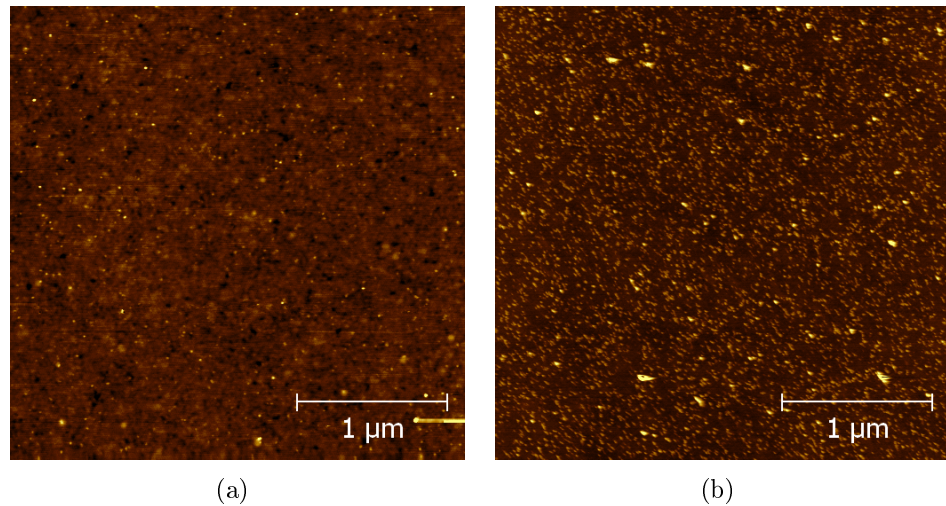


Abbildung 4.6: Rasterkraftspektroskopische Aufnahme der TSGs mit (a) 7 nmol/l und (b) 29 nmol/l DSG2

4.8 Kraftspektroskopische Parameter

Im Anschluss werden die Parameter vorgestellt, die für die kraftspektroskopischen Messungen relevant sind:

1. *force distance*: Die Distanz, die der Z-Piezo in einem Zyklus zurücklegt.
2. *approach velocity*: Die Geschwindigkeit, mit der der Cantilever an die Oberfläche angenähert wird. Diese Geschwindigkeit beträgt bei allen Messungen 3000 nm/s .
3. *retract velocity*: Die Geschwindigkeit, mit der der Cantilever zurückgezogen wird. Diese wird bei den verschiedenen Messungen variiert.
4. *sample rate*: Gibt die Anzahl der aufgenommenen Datenpunkte pro Sekunde für die Rückziehkurve an. Sie wird bei jeder Messung passend eingestellt und sollte immer etwas mehr als den doppelten Wert der Geschwindigkeit betragen.
5. *dwell time*: Verweilzeit des Kraftsensors auf der Oberfläche in Sekunden. Es wurde eine Dwell time von $0,1 \text{ s}$ gewählt.
6. *trigger point*: Die maximale Kraft, die der Kraftsensor auf die Oberfläche ausübt. Der Trigger Point betrug etwa 600 pN .

4.9 Auswertung der Kraft-Distanz-Kurven

Die einzelnen Kraft-Distanz-Kurven werden mit einer auf Matlab (Version 2010b, MathWorks, Natick, MA, USA) basierenden Software ausgewertet, welche von Lennart Ochel und Jan Lettau von der Fachhochschule Bielefeld geschrieben wurde. So wird ermöglicht, dass die Kraft-Distanz-Kurven, die mit Rasterkraftmikroskopen verschiedener Hersteller aufgenommen werden, mit einer einheitlichen Methode ausgewertet werden können.

Anhand von Abbildung 4.7 soll exemplarisch dargestellt werden, wie eine Kraft-Distanz-Kurve ausgewertet wird. Es wird zunächst darauf eingegangen, wie die Messdaten für die Auswertung konditioniert werden. Anschließend wird erklärt nach welcher Methode die Software vorgeht und welche Parameter abgefragt werden.

Zuerst werden für jede Kurve aus den *ibw*-Dateien der Igor-Software die Auslenkung des Z-Piezos in m sowie die Auslenkung des Cantilevers (Deflection) ausgelesen. Die Annäherungskurve sowie die Anhäufung von Punkten aufgrund der Verweildauer des Cantilevers auf der Oberfläche werden nicht dargestellt, da für die weitere Auswertung nur die Rückziehkurve relevant ist.

Durch Beseitigen des Offsets zwischen aufgenommener Kurve und Deflection-Position-Koordinatensystem wird eine Nulllinie (Baseline) berechnet und die Kurve auf die Nulllinie des Koordinatensystems verschoben. Dies ist der Teil der Kurve, in der der Kraftsensor nicht in Kontakt mit der Oberfläche ist und abgesehen vom thermischen Rauschen keine Auslenkung zeigt.

Aus der Steigung der Kurve im Kontaktbereich des Cantilevers mit der Oberfläche wird mittels linearer Regression eine zweite Gerade berechnet (siehe Abb. 4.7). Der Schnittpunkt S der Baseline (rote Linie) und dieser Geraden (grüne Linie) gibt den Punkt wieder, ab dem der Cantilever von der Oberfläche abhebt und in seine Ruheposition gelangt - wenn er nicht durch Wechselwirkungskräfte ausgelenkt wird.

Nun wird anhand der Form der Kurve bestimmt, ob sie für die Auswertung verwendet werden kann.

Ausschluss eines Adhäsionspeaks: Zuerst wird ausgeschlossen, dass es sich bei dem Ereignis um einen Adhäsionspeak handelt. Dazu wird zunächst die durchschnittliche Steigung der Kurve in 2nm Intervallen bestimmt und mit der Steigung der Regressionsgeraden im

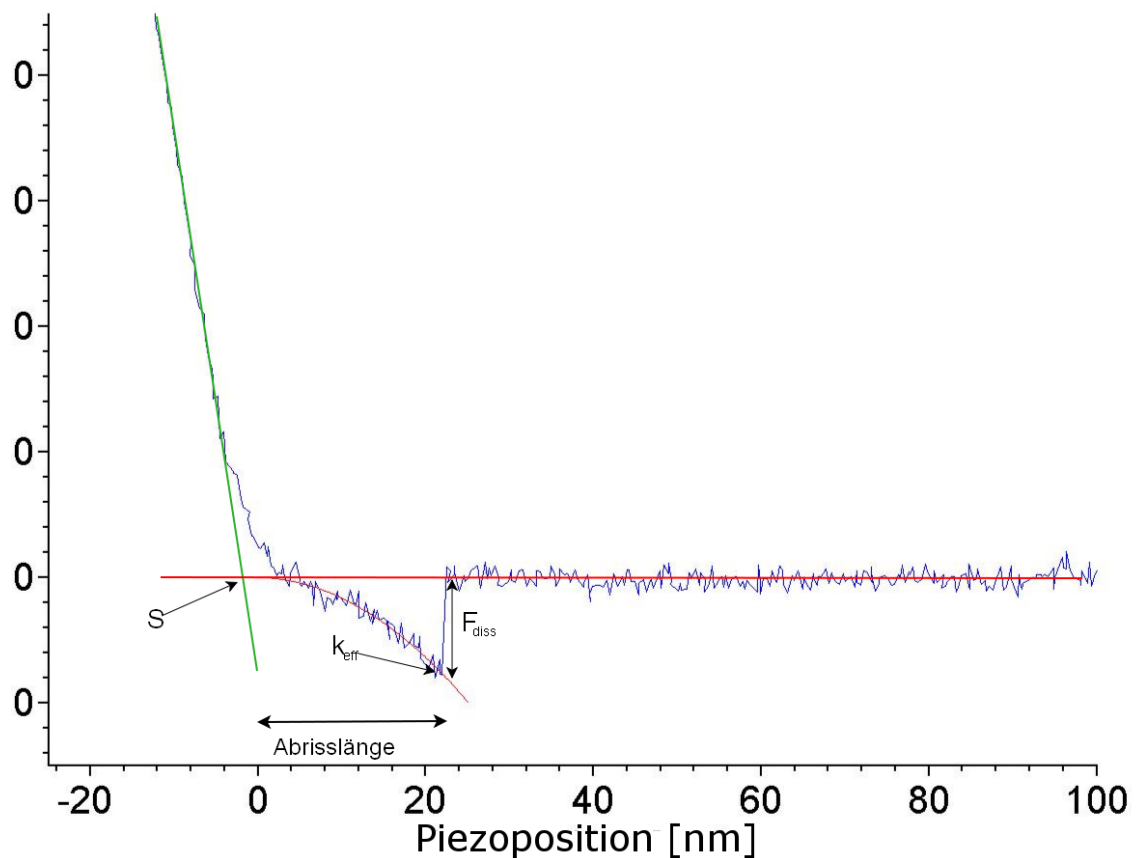


Abbildung 4.7: Eine Kraft-Distanz-Kurve aus einer zu dieser Arbeit durchgeführten Messung mit 200nm/s

Kontaktbereich verglichen. Im Falle eines Adhäsionspeaks bliebe die Steigung konstant, der Peak wird nicht weiter ausgewertet. Zum Teil sind die Adhäsionspeaks jedoch sehr schmal und liegen noch vor dem Analyseintervall. Dann kann dahinter noch ein weiteres Ereignis gemessen werden.

Prüfen auf Dissoziationsereignis: Nun wird nach einem Dissoziationsereignis gesucht, bei welchem es ab dem Schnittpunkt S zu einer sprunghaften Änderung der Steigung kommt. Die Kurve muss konkav verlaufen, die Steigung also kleiner werden. Liegt ein solches Ereignis vor, wird durch den Dissoziationspunkt ein Polynom 2. Grades an die Kurve gefittet (siehe Abb. 4.7 braune Linie). Die Steigung dieser Parabel im Dissoziationspunkt entspricht der Elastizität k_{eff} des Systems aus Cantilever und Komplex. Der Abstand vom Dissoziationspunkt zum Schnittpunkt S gibt die Dissoziationslänge wie-

der, der Abstand von Dissoziationspunkt und Baseline entspricht der Abrisskraft F_{diss} .

Damit ein Abriss für die Auswertung gewertet wird, muss er folgende Kriterien erfüllen:

- Die Abrisslänge muss innerhalb des minimalen und maximalen Abrissabstandes liegen.
- Die Dissoziation muss zurück auf die Nulllinie erfolgen.
- Die Dissoziationskraft muss größer sein als die minimale Kraft, mindestens aber größer, als der dreifache Wert des minimalen Rauschens.
- Der Abriss darf nicht zu kurz sein.
- Das Polynom 2. Grades muss eine nach unten offene Parabel darstellen.
- Die Steigung im Dissoziationspunkt muss negativ sein.

Das Programm fragt die einzelnen Parameter ab und nur wenn alle Punkte zutreffen, wird die Kurve als Abriss gewertet.

Bei den Messungen dieser Arbeit werden folgende Parameter verwendet, die vor der Analyse festgelegt werden:

Minimaler Abrissabstand	20 nm
Maximaler Abrissabstand	150 nm
Anzahl der gewerteten Abrisse	1
Federkonstante	in der jeweiligen Messung bestimmt
Minimale Länge	5nm
Minimale Dissoziationskraft	20 pN

Die erkannten Ereignisse werden noch einmal gesichtet, um nicht erkannte Mehrfachereignisse auszuschließen. Betrachtet man die Abrisslängen der gefundenen Ereignisse in einem Histogramm, wird deutlich, dass es eine Häufung bei ca. 30 nm gibt (siehe Abb. 4.8). Dies passt zu der Länge der Linkermoleküle und zeigt, dass die Funktionalisierung erfolgreich war.

Es ist auch gut sichtbar, dass ab einer Länge von ca. 60nm kaum noch Ereignisse auftreten. Mit Hilfe von Matlab werden die gefundenen Ereignisse also noch weiter aussortiert.

4 Material und Methoden

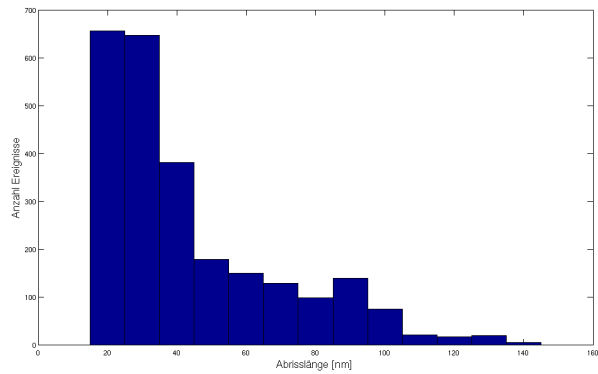


Abbildung 4.8: Histogramm der Abrisslängen der durch die Software detektierten Ereignisse einer Messung

Es werden nur Ereignisse verwendet mit einer Abrisslänge $l < 80nm$, einer Dissoziationskraft $F_{Diss} < 300pN$ und einer Elastizität $k_{eff} < 20pN/nm$.

Im nachfolgenden Kapitel werden die Ergebnisse der kraftspektroskopischen Messungen vorgestellt und ausgewertet.

5 Kraftspektroskopische Messungen von DSG2

In diesem Kapitel werden die gemessenen Daten im Zuge der Untersuchung der Bindungskinetik von Wildtyp DSG2 und der Mutante p.Arg46 Gln ausgewertet und die Ergebnisse interpretiert. Es wurden zum einen Messungen durchgeführt, um die Calciumabhängigkeit der Bindung zu überprüfen. Zum anderen wurden mittels dynamischer Kraftspektroskopie das Bindungsverhalten von Wildtyp und mutiertem DSG2 untersucht.

Im Folgenden wird die Analyse der Ergebnisse der kraftspektroskopischen Messungen erläutert und die Ergebnisse diskutiert. Die dynamische Kraftspektroskopie fußt auf der Theorie von Bell, Evans und Ritchie, nach der die Lebensdauer eines Komplexes durch eine äußere Kraft beeinflusst wird. Für die wahrscheinlichste Dissoziationskraft gilt Gleichung 2.29

$$F_{max} = \frac{k_B T}{x_\beta} \ln \frac{x_\beta r}{k_d k_B T},$$

aus der man die Wechselwirkungslänge x_β und die Dissoziationsratenkonstante k_d im thermodynamischen Gleichgewicht berechnen kann, und damit auch die mittlere Lebensdauer $\tau = 1/k_d$ des Komplexes. Bei den Messungen wurde die wahrscheinlichste Dissoziationskraft F_{max} in Abhängigkeit von der Belastungsrate $r = k_{eff} \cdot v$ bestimmt. Dazu wurden kraftspektroskopische Messungen mit unterschiedlichen Rückziehggeschwindigkeiten v , und somit unterschiedlichen Belastungsraten durchgeführt. Die Konzentration der Proteinlösung welche auf die Substratoberfläche gegeben wurde betrug jeweils 4 nmol/l und alle Messungen fanden in einer 1 mM -Calciumpufferlösung statt. Die Annäherungsgeschwindigkeit war bei allen Messungen 3000 nm/s .

Die aufgenommenen Kurven werden wie in Abschnitt 4.9 dargelegt analysiert und von den erkannten Ereignissen werden die relevanten Daten wie Dissoziationskraft F_{max} , Elastizität k_{eff} von Cantilever und Molekülkomplex sowie die Abrisslänge l bestimmt.

Die Verteilungen der jeweiligen Größe wird in einem Histogramm dargestellt. Durch einen Fit mit einer Gaußfunktion der Form

$$y = y_0 + \frac{A}{\omega\sqrt{\pi/2}} e^{-2\frac{(x-x_c)^2}{\omega^2}}, \quad (5.1)$$

werden die wahrscheinlichste Abrisskraft F_{max} , die wahrscheinlichste Abrisslänge l und die wahrscheinlichste Elastizität k_{eff} bestimmt. Hierbei sind y_0, A, ω und x_c die Fitparameter. x_c entspricht dann F_{max} , bzw. k_{eff} oder l und ω beschreibt die Breite der Kurve auf der halben Höhe des Maximums.

Die Histogramme dienen auch zur Kontrolle der mit der Analysesoftware detektierten Dissoziationsereignisse. Die Dissoziationslänge des Molekülkomplexes wird hauptsächlich durch die Länge der verwendeten PEG-Crosslinker vorgegeben, also erwartet man eine Abrisslänge von ca. 30 nm. Die Linker können gedehnt werden und führen so zu der charakteristischen Form der Kraft-Distanz-Kurve. Auch wenn der Linker über seine eigentliche Länge hinaus gedehnt werden kann und die Auslenkung des Cantilevers in die Dissoziationslänge mit eingeht, werden Ereignisse mit einer Dissoziationslänge von mehr als 80 nm nicht berücksichtigt, da es sich um andere, unspezifische Wechselwirkungen handeln muss.

Es wird außerdem zu jeder Messung ein 2-dimensionales Diagramm aus Dissoziationskraft und Elastizität erstellt (Abbildung 5.1), welches die beiden Größen in Beziehung zueinander setzt. Nach der Theorie von Bell, Evans und Ritchie folgt die Kurve jedes Dissoziationsereignisses einer sogenannten Masterkurve, also größere Elastizität bei größerer Kraft. Wird dies in den 2D-Diagrammen gut sichtbar, ist die Wahrscheinlichkeit einer spezifischen Bindung hoch [56].

Zur Berechnung von x_β und k_d werden die Werte der wahrscheinlichsten Dissoziationskräfte halblogarithmisch gegen die Belastungsrate aufgetragen. Da der Wert der wahrscheinlichsten Dissoziationskraft mit zunehmender Ziehgeschwindigkeit steigen soll, sollte sich eine ansteigende Gerade ergeben. Durch Umformung wird aus Gleichung 2.29

$$F_{max} = \frac{k_B T}{x_\beta} \ln \frac{x_\beta}{k_d k_B T} + \frac{k_B T}{x_\beta} \ln(r), \quad (5.2)$$

was einer Geradengleichung der Form $y = A + mx$, mit einem Y-Achsenabschnitt $A = \frac{k_B T}{x_\beta} \ln \frac{x_\beta}{k_d k_B T}$ und der Steigung $m = \frac{k_B T}{x_\beta}$ entspricht.

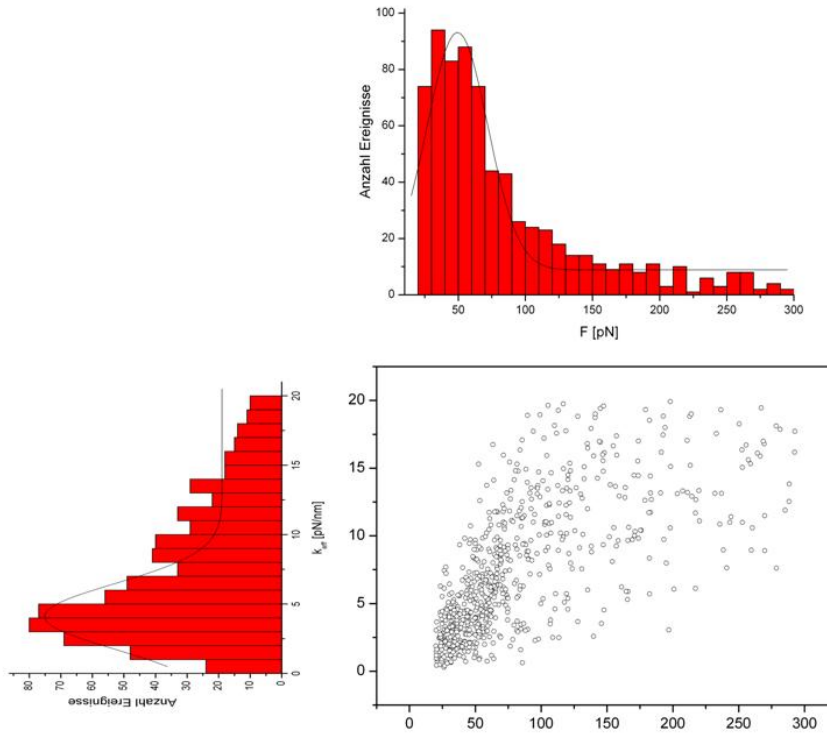


Abbildung 5.1: Aufbau des 2D-Diagramms am Beispiel einer Messung mit einer Rückziehggeschwindigkeit von 2000 nm/s für den Wildtyp.

Aus der linearen Regression der Daten kann durch Extrapolation auf eine verschwindende äußere Kraft $F_{max}(r_0) = 0$ die Belastungsrate r_0 bestimmt werden, bei der die Dissoziation nur noch durch thermische Fluktuationen verursacht wird. Aus der inversen Steigung der Regressionsgeraden lässt sich die Wechselwirkungslänge x_β berechnen:

$$x_\beta = \frac{k_B T}{m}. \quad (5.3)$$

Die Dissoziationsratenkonstante k_d erhält man aus der Beziehung

$$k_d = \frac{1}{k_B T} x_\beta r_0. \quad (5.4)$$

Der Fehler für die wahrscheinlichste Dissoziationskraft ergibt sich aus dem Fitfehler und der Summe des Standardfehlers des Mittelwerts der Gaußverteilung für eine 94,5%-ige Konfidenz ($2\sigma/\sqrt{N}$). Die Belastungsrate r setzt sich aus Rückziehggeschwindigkeit und

wahrscheinlichster Elastizität zusammen, welche ebenfalls durch einem Gaußfit ermittelt wird. Als Fehler wird der Fehler von r_o angenommen, welcher mit der Gaußschen Fehlerfortpflanzung berechnet wurde, ebenso wie die Fehler von x_β und k_d . Der Fehler der Federkonstante wird mit $\pm 10\%$ abgeschätzt.

5.1 Untersuchung der Calciumabhängigkeit der DSG2-Komplexierung

DSG2 Moleküle gehören zur Gruppe der Cadherine und benötigen für die Bindung freie Calciumionen (siehe Abschnitt 3.1). Diese Abhängigkeit wurde beim DSG2 Wildtyp und der Mutante p.Arg46 Gln mit Messungen bei verschiedenen Calciumkonzentrationen überprüft. Die Proteine wurden, wie in Abschnitt 4.7 erklärt, auf Substrat und Cantilever immobilisiert. Anschließend wurden drei Serien von kraftspektroskopische Messungen durchgeführt, mit jeweils anderer Pufferlösung, wobei Puffer mit $0,5mM$, $1mM$ und $2mM$ Calcium vermessen wurden. Danach wurde ein Puffer mit $5mM$ EDTA zugegeben, welches die freien Ca^{2+} -Ionen bindet. Dadurch sollten weniger Bindungsergebnisse auftreten.

Cantilver und Substrat wurden vor jeder Messung mit einer Pipette mit dem jeweiligen Puffer gespült. Die Rückziehggeschwindigkeit betrug bei allen Messungen 2000 nm/s . Die Daten wurden, wie in Abschnitt 4.9 erläutert, ausgewertet und aus den Ergebnissen Histogramme erstellt. Die Abbildungen 5.2 und 5.4 zeigen die Verteilung der Dissoziationslängen von Wildtyp und Mutante für die verschiedenen Salzkonzentrationen sowie unter Zugabe von EDTA. Außerdem wurde die Bindungswahrscheinlichkeit gegen die Salzkonzentration aufgetragen (Abbildung 5.3 und 5.5).

Es ist in den Abbildungen zu sehen, dass die Bindungswahrscheinlichkeit mit der Calciumkonzentration ansteigt und bei Zugabe von EDTA klar absinkt, bzw. fast gar keine Bindung mehr auftritt. Bei der Messung mit der Mutante und $2mM$ -Calciumpuffer, ist die Bindungswahrscheinlichkeit im Vergleich zur Messung mit $1mM$ -Calciumpuffer geringer. Dies kann daran liegen, dass es durch die höhere Calciumkonzentration zu Mehrfachbindungen oder cis-Bindungen gekommen ist. Vor allem aber kann es bei der Präparation der Probe zu lokalen Schwankungen der Oberflächenbelegung kommen, so dass an einigen Stellen eine geringere Bindungsaktivität festgestellt wird.

5.1 Untersuchung der Calciumabhängigkeit der DSG2-Komplexierung

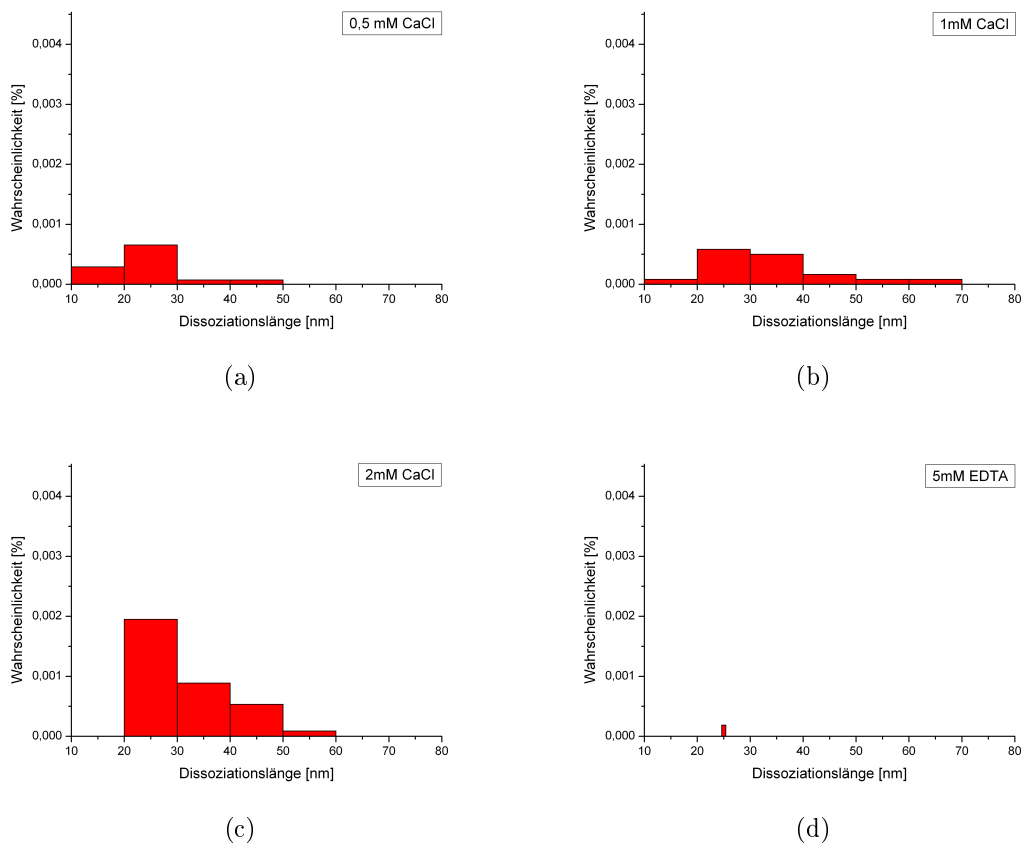


Abbildung 5.2: Kraftspektroskopische Messungen zum Nachweis der Calciumabhängigkeit der Bindung von Wildtyp DSG2 bei (a) $0,5\text{mM}$ CaCl, (b) 1mM CaCl, (c) 2mM CaCl und (d) 5mM EDTA.

Der Nachweis der Calciumabhängigkeit der Bindung dient auch zur Überprüfung des Immobilisierungsprotokolls. Bindungen treten fast ausschließlich in Gegenwart von Calcium auf, es werden also keine Artefakte durch unspezifische oder elektrostatische Adhäsion gemessen. Diese würden hauptsächlich bei geringen Salzkonzentrationen auftreten, und werden bei hohen Salzkonzentrationen durch die Ionen in der Lösung abgeschirmt.

5 Kraftspektroskopische Messungen von DSG2

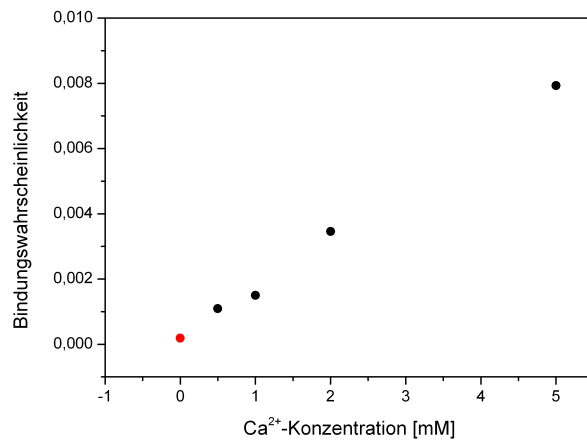


Abbildung 5.3: Bindungswahrscheinlichkeiten von Wildtyp DSG2 bei verschiedenen Calciumkonzentrationen sowie bei Zugabe von EDTA (rot).

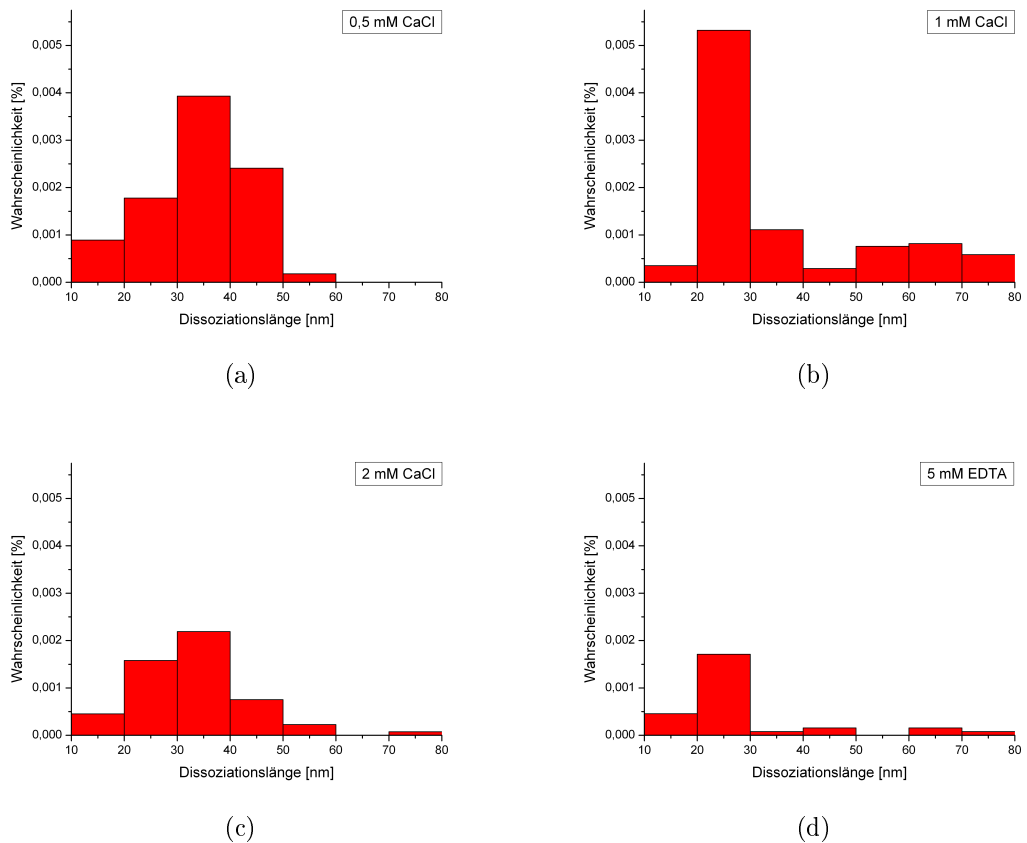


Abbildung 5.4: Kraftspektroskopische Messungen zur Überprüfung der Calciumabhängigkeit der Bindung der DSG2 Mutante p.Arg46 Gln bei (a) 0,5 mM CaCl, (b) 1 mM CaCl, (c) 2 mM CaCl und (d) 5 mM EDTA.

5.1 Untersuchung der Calciumabhängigkeit der DSG2-Komplexierung

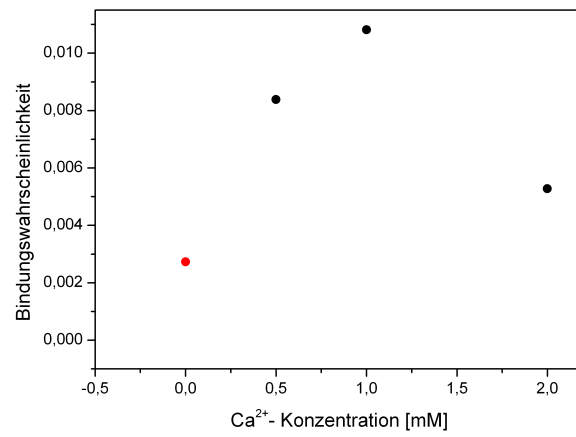


Abbildung 5.5: Bindungswahrscheinlichkeiten der Mutante p.Arg46 Gln bei verschiedenen Calciumkonzentrationen sowie bei Zugabe von EDTA (rot).

5.2 Wildtyp

Für den Wildtyp von DSG2 wurden an zwei Tagen Messungen mit variierenden Rückziehggeschwindigkeiten durchgeführt. Am 30.11.11 wurden Kraft-Distanz-Kurven mit 50 nm/s , 200 nm/s , 500 nm/s und 5000 nm/s gemessen, die Federkonstante des Cantilevers wurde mit $20,45 \text{ pN/nm}$ bestimmt. Am 7.12.11 wurden 100 nm/s , 1000 nm/s und 2000 nm/s gemessen, die Federkonstante betrug $33,06 \text{ pN/nm}$. Die Annäherungsgeschwindigkeit betrug bei allen Messungen 3000 nm/s . In Abbildung 5.6, 5.7 und 5.8 sind die Verteilungen der Dissoziationskraft für die jeweiligen Geschwindigkeiten zusammen mit den 2D-Diagrammen von Abrisskraft und Elastizität dargestellt. Es ist gut zu erkennen, dass die Verteilungen in den 2D-Diagrammen dem erwarteten Verlauf entsprechen.

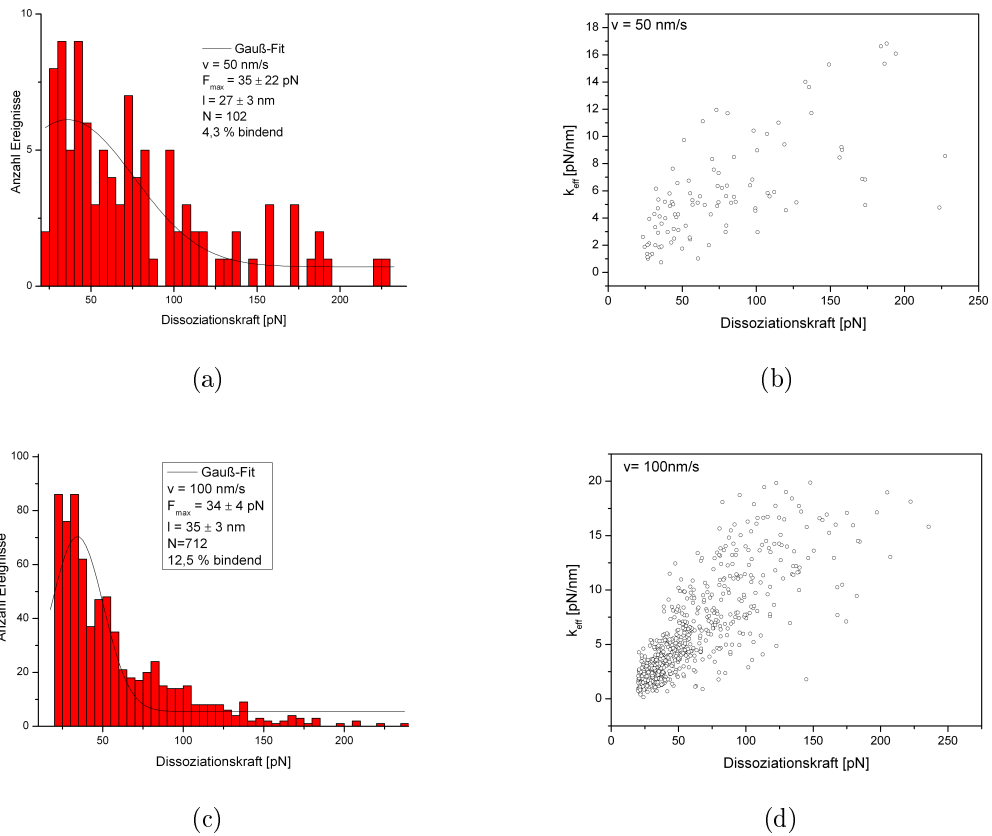
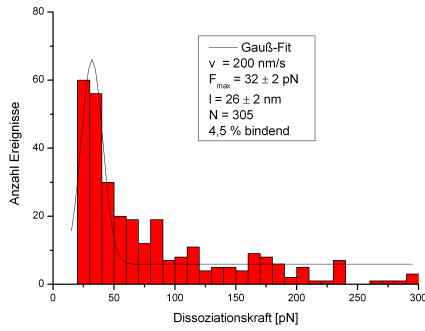
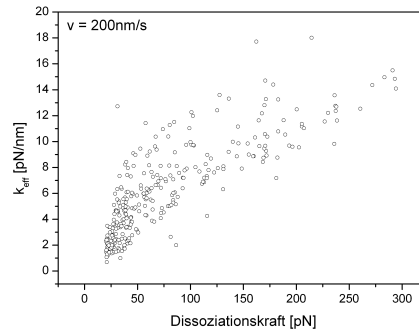


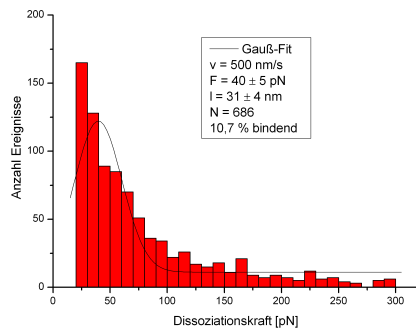
Abbildung 5.6: Dissoziationskräfteverteilungen und 2D-Diagramm für eine Rückziehggeschwindigkeit von 50 nm/s (a) & (b) sowie 100 nm/s (c) & (d)



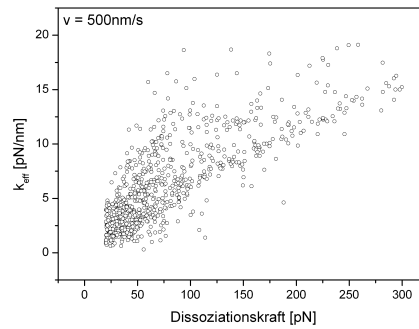
(a)



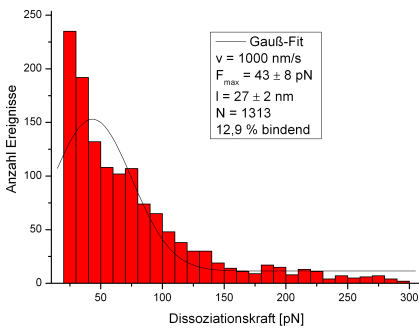
(b)



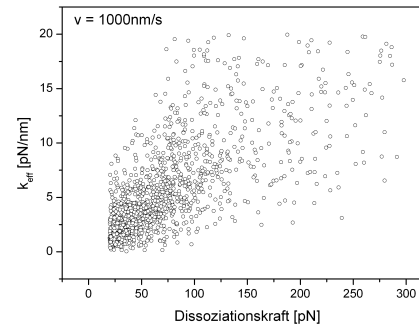
(c)



(d)



(e)



(f)

Abbildung 5.7: Dissoziationskräfteverteilungen und 2D-Diagramme für Rückziehg-
 schwindigkeiten von 200 nm/s (a) & (b); 500 nm/s (c) & (d) und 1000
 nm/s (e) & (f)

Aus den Histogrammen ergeben sich jeweils die Werte für die wahrscheinlichste Disso-
 ziationskraft und die Belastungsrate (Tabelle 5.1):

5 Kraftspektroskopische Messungen von DSG2

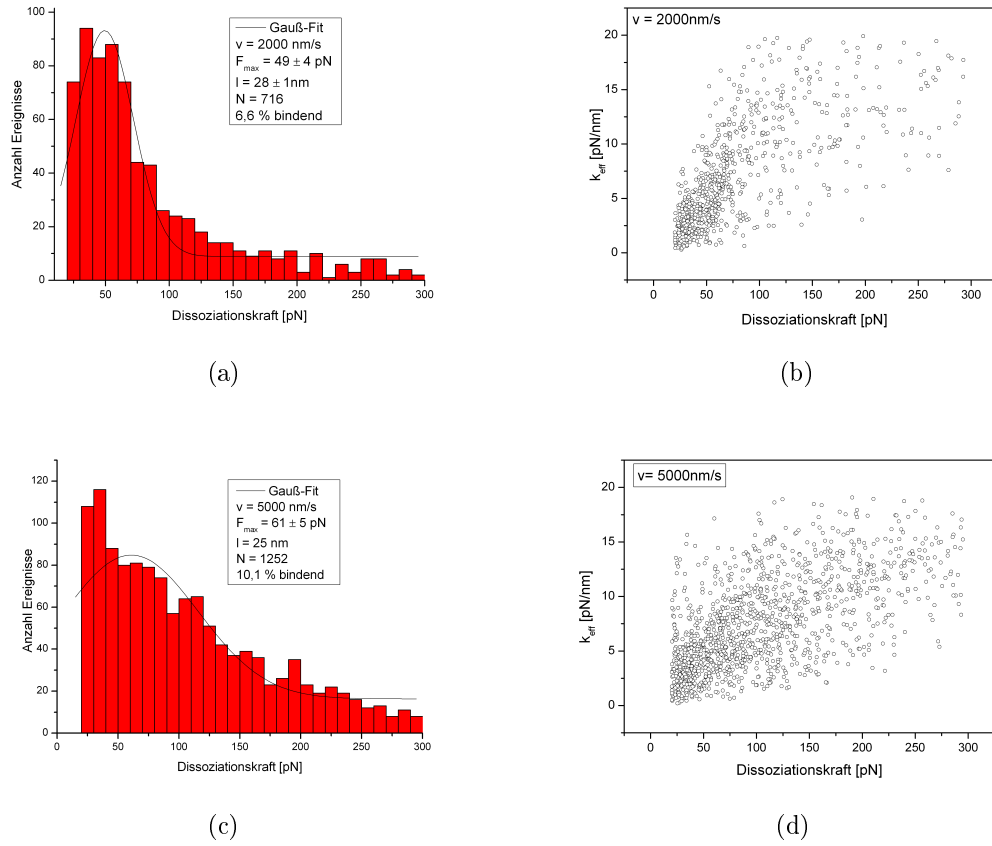


Abbildung 5.8: Dissoziationskräfteverteilungen und 2D-Diagramme für Rückziehggeschwindigkeiten von 2000 nm/s (a) & (b) und 5000 nm/s (c) & (d)

Geschwindigkeit [nm/s]	Belastungsrate r [pN/s]	Dissoziationskraft F_{\max} [pN]
50	226,64	$35,99 \pm 22,34$
100	279,3	$34,29 \pm 0,3$
200	1006,65	$31,95 \pm 2,17$
500	1486,08	$39,67 \pm 4,8$
1000	3283,53	$43,31 \pm 7,8$
2000	8216,1	$49,45 \pm 3,77$
5000	30511,5	$60,87 \pm 4,51$

Tabelle 5.1: Ergebnisse der Gauß-Fits für Wildtyp DSG2

Die aus den Verteilungen ermittelte wahrscheinlichste Dissoziationskraft wird halblogarithmisch gegen die Belastungsrate aufgetragen (siehe Abbildung 5.9).

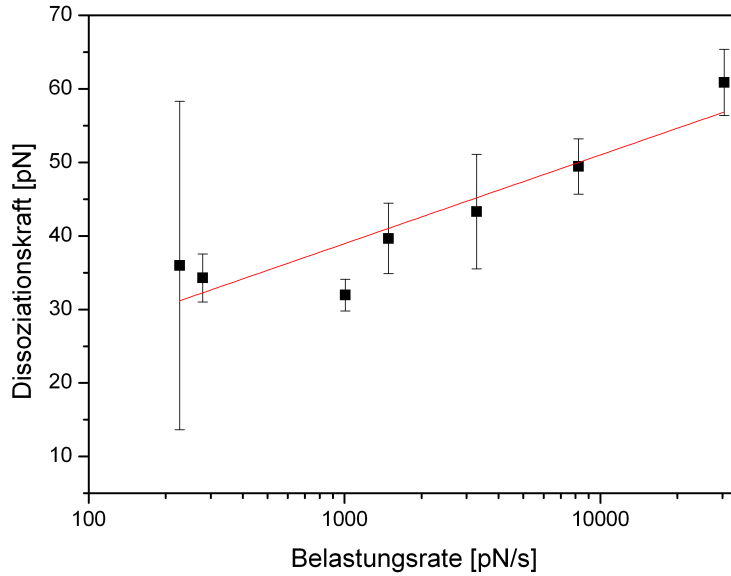


Abbildung 5.9: Halblogarithmische Auftragung der wahrscheinlichsten Dissoziationskraft F_{max} gegen die Belastungsrate r bei Wildtyp DSG2

Aus der linearen Regression ergibt sich eine Steigung der Gerade von $m = (5,2 \pm 1,02)pN$ und ein Y-Achsenabschnitt von $A = (2,77 \pm 7,89)pN$. Daraus ergibt sich für die Belastungsrate r_0 , die Wechselwirkungslänge x_β sowie die Dissoziationsratenkonstante k_d :

$$r_0 = (0,5899 \pm 0,9048)pN/s, \quad (5.5)$$

$$x_\beta = (0,772 \pm 0,105)nm, \quad (5.6)$$

$$k_d = (0,1126 \pm 0,3279)\frac{1}{s}. \quad (5.7)$$

Der Komplex hat somit eine mittlere Lebensdauer von $\tau = \frac{1}{k_d} = 8,88s$. Waschke et.al.[57] haben für DSG1 mit Hilfe von dynamischer Kraftspektroskopie eine Lebensdauer von ca. $0,17s$ gemessen. Auch wenn sich DSG1 und DSG2 in ihrer Struktur ähneln, gibt es jedoch auch grundlegende Unterschiede. DSG1 kommt nur im Bindegewebe vor, DSG2

hingegen auch im Herzmuskel, auf welchen eine wesentlich höhere mechanische Belastung wirkt. In diesem Kontext erscheint die längere Lebensdauer von DSG2 plausibel.

5.3 Mutante p.Arg46 Gln

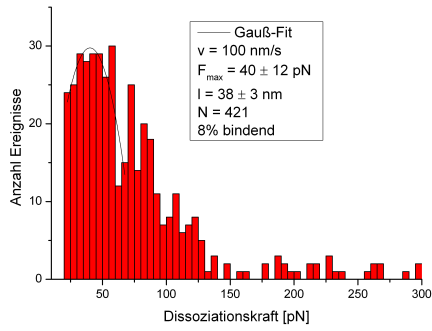
Für die Mutante p.Arg46 Gln wurden ebenfalls Messungen an zwei Tagen vorgenommen. Am 11.01.12 wurden Kraft-Distanz-Kurven mit einer Rückziehggeschwindigkeit von 100 nm/s , 500 nm/s , 1000 nm/s und 2000 nm/s gemessen. Die Federkonstante wurde mit 26,24 pN/nm bestimmt. Am 01.03.12 wurde eine weitere Messung mit 200 nm/s durchgeführt, der Cantilever hatte eine Federkonstante von 40,59 pN/nm . Die Abbildungen 5.10 und 5.11 zeigen die Verteilungen der Dissoziationskräfte, sowie das zugehörige 2D-Diagramm aus Elastizität gegen Dissoziationskraft. Die Verteilungen in den 2D-Plots zeigen gut, dass mit steigender Dissoziationskraft höhere Elastizitäten vorliegen. Die Kurven folgen demnach der von Evans und Ritchie beschriebenen Masterkurve. Die Einzige Ausnahme bildet die Messung mit einer Rückziehggeschwindigkeit von 1000 nm/s . Die Verteilung der Dissoziationskräfte zeigt drei Peaks und auch im 2D-Diagramm sind drei Cluster zu erkennen. Obwohl alle Messungen mit dem gleichen Cantilever und derselben Probe durchgeführt wurden, zeigt keine der anderen Messungen von diesem Tag ein ähnliches Verhalten. Es ist nicht genau zu erklären wie es dazu kommt. Lokale Schwankungen der Oberflächenbelegung können eine Ursache sein. Für die weitere Auswertung der Daten wurde der Gauß-Fit an den ersten Peak verwendet.

Durch einen Gauß-Fit an die Histogramme ergaben sich die Werte für die wahrscheinlichste Dissoziationskraft und die Belastungsrate (Tabelle 5.2).

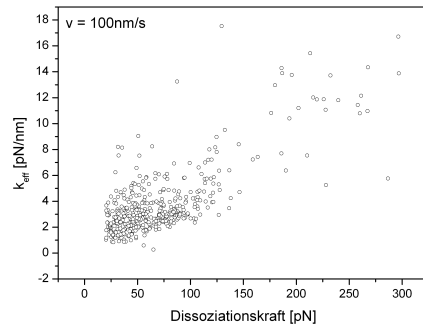
Geschwindigkeit [nm/s]	Belastungsrate r [pN/s]	Dissoziationskraft F_{max} [pN]
100	287,13	$40,22 \pm 11,72$
200	753,11	$40,56 \pm 1,39$
500	1861,65	$38,09 \pm 1,51$
1000	5661,34	$33,72 \pm 1,41$
2000	4682,64	$42,16 \pm 0,53$

Tabelle 5.2: Ergebnisse der Gauß-Fits für die DSG2 Mutante p.Arg46 Gln

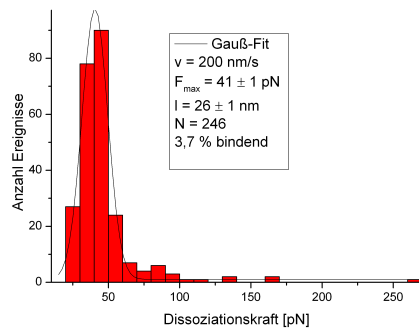
Die ermittelten Dissoziationskräfte wurden halblogarithmisch gegen die Belastungsraten aufgetragen, um die Abhängigkeit der Dissoziationskraft von der Rückziehggeschwindigkeit



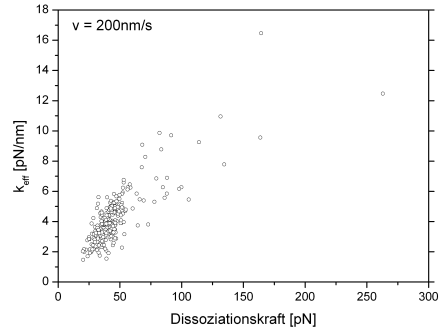
(a)



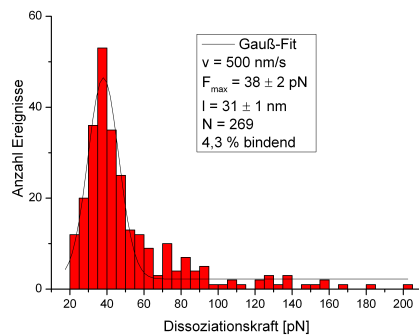
(b)



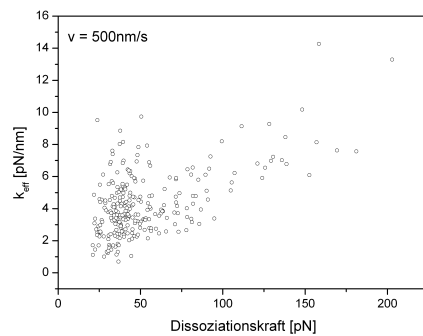
(c)



(d)



(e)



(f)

Abbildung 5.10: Dissoziationskräfteverteilungen und 2D-Diagramme für Rückziehgesehwindigkeiten von 100 nm/s (a) & (b); 200 nm/s (c) & (d) und 500 nm/s (e) & (f)

keit zu zeigen (Abbildung 5.12).

Die Dissoziationskraft zeigt, im Gegensatz zum Wildtyp, hier praktisch keine Abhängigkeit von der Ziehgeschwindigkeit. Die Gerade hat in diesem Fall die Steigung $m = 0$. Dies

5 Kraftspektroskopische Messungen von DSG2

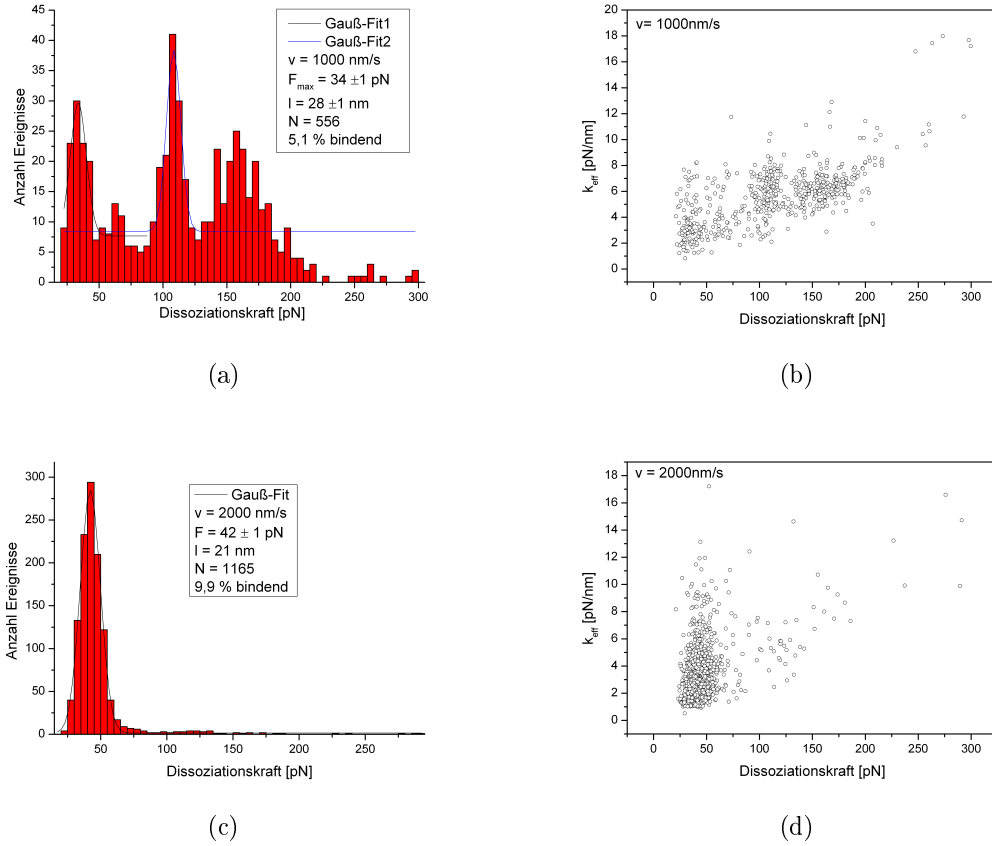


Abbildung 5.11: Dissoziationskräfteverteilungen und 2D-Diagramme für Rückziehggeschwindigkeiten von 1000 nm/s (a) & (b) und 2000 nm/s (c) & (d)

macht es unmöglich die Bindungsparameter r_0 , x_β und k_d zu berechnen. Zum direkten Vergleich von Wildtyp DSG2 und der Mutation p.Arg46 Gln zeigt Abbildung 5.13 beide Geraden nebeneinander.

Es gibt Molekülkomplexe mit einer Bindungskinetik, die für die Zeitskalen der dynamischen Kraftspektroskopie zu schnell abläuft und somit keinerlei Abhängigkeit mehr von der Belastungsrate zeigt [58, 59]. Die Abhängigkeit kann nur mit wesentlich höheren Rückziehggeschwindigkeiten nachgewiesen werden, was mit dem in dieser Arbeit verwendeten Rasterkraftmikroskop technisch nicht möglich ist.

Bei der Mutante p.Arg46 Gln ist gegenüber dem Wildtyp eine Aminosäure ausgetauscht. Diese sitzt an der Prodomäne der extrazellulären Domäne, welche normalerweise von einer Proproteinkonvertase abgespalten wird. Es wird vermutet, dass die betreffende Aminosäure die Proproteinkonvertasenerkennungssequenz betrifft und somit das Abspalten

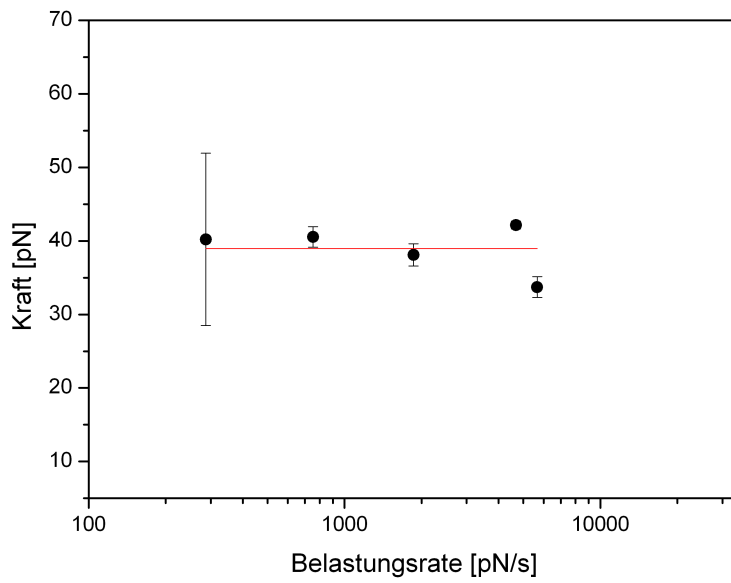


Abbildung 5.12: Halblogarithmische Auftragung der wahrscheinlichsten Dissoziationskraft F_{max} gegen die Belastungsrate r bei der Mutante p.Arg46 Gln

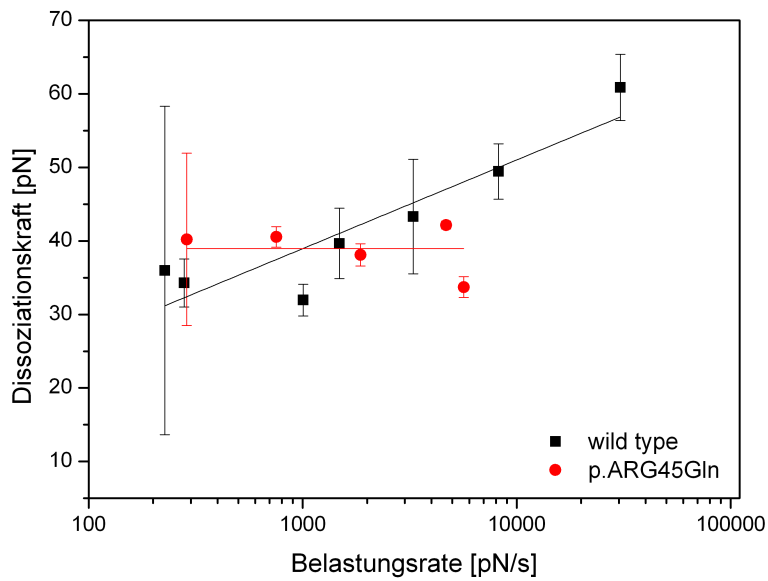


Abbildung 5.13: Halblogarithmische Auftragung der wahrscheinlichsten Dissoziationskraft F_{max} gegen die Belastungsrate r von Wildtyp DSG2 und der Mutante p.Arg46 Gln

verhindert wird. Dies konnte in den Messungen von Anna Gärtner nachgewiesen werden [60]. Die Mutation ist demnach länger als der Wildtyp, was zu der Hypothese führt, dass sie nur noch eingeschränkt interagieren kann. Bei qualitativen Untersuchungen an einem zellbasierten Bindungsassay am Durchflusszytometer konnte eine zweifach höhere relative Bindungsfähigkeit festgestellt werden [60]. Dies widerspricht nicht den Ergebnissen dieser Messung, da die Dissoziations- und Assoziationsraten auch wesentlich höher sind als beim Wildtyp, bzw. die Komplexierung so schnell abläuft, dass es zu einem Quasi-Gleichgewicht kommt.

Die vollständig veränderte Bindungskinetik der Mutation erscheint vor allem in Anbetracht der Schwere des Krankheitsbildes plausibel. Zur Absicherung könnten weitere Untersuchungen an Mutationen durchgeführt werden die den gleichen Phänotyp zeigen. Zur genauen quantitativen Bestimmung der Affinität der Bindung muss neben der Dissoziationsratenkonstante k_d auch die Assoziationsratenkonstante k_a bestimmt werden. Weiterführend könnten zum Beispiel Messungen mit Oberflächenplasmonenresonanz durchgeführt werden, um $K_D = \frac{k_d}{k_a}$ vollständig zu bestimmen.

6 Zusammenfassung und Ausblick

AFM-Einzelmolekülkraftspektroskopie ist ein geeignetes experimentelles Verfahren um die Kinetik intramolekularer Bindungen auf Einzelmolekülniveau quantitativ zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurde durch dynamische Kraftspektroskopie an Desmoglein 2 Homokomplexen zum einen die Abhängigkeit der Bindung von der Calciumkonzentration der Lösung nachgewiesen, zum anderen wurde die Bindungskinetik von Wildtyp DSG2 und der Punktmutation p.Arg46 Gln analysiert und miteinander verglichen.

Die Mutatante p.Arg46 Gln wird mit der Herzmuskelerkrankung ARVC assoziiert, bei welcher es zu einer Ersetzung des Herzmuskels mit Fett- und Bindegewebe kommt, was schlussendlich zu schweren Herzrhythmusstörungen und Herzversagen führt. Durch die Mutation wird nur eine Aminosäure ausgetauscht, diese ist jedoch an der Erkennungssequenz für die Proproteinkonvertase lokalisiert und verhindert bei der Mutante wahrscheinlich die Abspaltung der Prodomäne [60].

Es wurden sowohl mit Wildtyp DSG2, als auch mit der Mutante kraftspektroskopische Messungen in Pufferlösungen mit verschiedenen Konzentrationen von Ca^{2+} -Ionen durchgeführt. Außerdem wurden Messungen in einer EDTA-Pufferlösung durchgeführt, um die freien Calciumionen zu binden. Im Zuge dieser Messungen wurde sichtbar, dass die Bindungswahrscheinlichkeit der Homokomplexe mit steigender Calciumkonzentration ansteigt und ohne Calcium (also nach Zugabe von EDTA) fast keine Bindung mehr nachgewiesen werden kann. Somit kann zum einen die Abhängigkeit der Bindung von der Calciumkonzentration gezeigt werden, zum anderen dient es zur Überprüfung der Funktionalisierung. Diese ist demnach positiv verlaufen.

Außerdem wurden durch kraftspektroskopische Messungen die Dissoziationsratenkonstante k_d und somit die Lebensdauer τ der Bindung bestimmt. Auch wenn es keinen genauen Vergleich gibt, so stimmen die Ergebnisse doch von der Größenordnung her mit den Ergebnissen von kraftspektroskopischen Messungen an DSG1 überein [57].

Für die Mutante p.Arg46 Gln war es nicht möglich, die Bindungskonstanten und die Lebensdauer zu bestimmen, da die Verteilung der Dissoziationskräfte im Gegensatz zum Wildtyp keine Abhängigkeit von der Ziehgeschwindigkeit zeigt. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Bindungskinetik des Komplexes zu schnell für die Zeitskalen der Messungen abläuft, und es somit zu einem Quasigleichgewicht kommt. Qualitative Bindungsstudien an Wildtyp DSG2 und der Mutante p.Arg46 Gln haben eine zweifach höhere Bindung der Mutante festgestellt (nach Anna Gärtner). Dies passt durchaus zu den Ergebnissen dieser Arbeit, welche nur den Schluss zulassen, dass die Komplexierungs- und Dekomplexierungsraten der Mutante wesentlich höher sind als für den Wildtyp; es kann aber trotzdem zur stärkeren Bindung kommen.

Um eine vollständige qualitative Aussage über die Affinität der Bindungen treffen zu können, muss neben der Dissoziationsratenkonstante k_d auch die Assoziationsratenkonstante k_a bestimmt werden. Dies ist Bestandteil eines weiterführenden Projektes und soll mit Hilfe von Oberflächenplasmonenresonanz untersucht werden.

Es wäre ebenso möglich, die Messungen mit sehr viel höheren Rückziehgeschwindigkeiten zu wiederholen, um so in die zeitlichen Größenordnungen zu gelangen, in denen eine Abhängigkeit der Dissoziationskraft von der Belastungsrate noch nachweisbar ist.

Da es in den Desmosomen nicht nur zu homophilen Wechselwirkungen kommt, könnte in zukünftigen Messungen die Bindung zwischen Heterokomplexen von Desmoglein 2 und Desmocollin 2 untersucht werden.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den vielen Menschen danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Als erstes gilt mein Dank Herrn Professor Dr. Dario Anselmetti für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Ermöglichung dieser Diplomarbeit.

Herrn Professor Dr. Thomas Dierks danke ich für seine freundliche Bereitschaft, das Zweitgutachten zu erstellen.

Ich danke Herrn Dr. Volker Walhorn für seine ausgezeichnete Betreuung meiner Diplomarbeit und die viele Zeit, die er diesem Projekt gewidmet hat. Er hat mich in vielen Situationen stets gut beraten und motiviert.

Ein großer Dank geht auch an Herrn PD Dr. Hendrik Milting vom *Herz- und Diabeteszentrums NRW* in Bad Oeynhausen für die Möglichkeit an diesem interessantem Thema forschen zu dürfen. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Anna Gärtner für das Herstellen und das zur Verfügung stellen der Proben bedanken. Darüber hinaus hatte sie stets ein offenes Ohr für meine Fragen bezüglich der biologischen Zusammenhänge und zeigte großes Interesse an meiner Arbeit.

Ich bedanke mich bei der gesamten Arbeitsgruppe *Experimentelle Biophysik und angewandte Nanowissenschaften* für das angenehme Arbeitsklima und die Unterstützung bei den diversen Fragen und Problemen die im Zuge dieser Arbeit aufgetreten sind. Hier geht ein besonderer Dank an Adeline Bieker und Alexander Harder, für die intensive Einführung in die Arbeitsabläufe im Labor sowie die fabelhafte Unterstützung bei der gesamten Arbeit. Bei Mareike Dieding möchte ich mich für den Beistand über die gesamte Zeit hinweg bedanken. Gleiches gilt für meine Bürokollegin Martina Viefuss. Für die technische Unterstützung möchte ich Christoph Pelargus danken, der stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Mein allergrößter Dank gilt meinen Eltern, für die nie endende Unterstützung und Motivation nicht nur im Rahmen dieser Arbeit, sondern über das ganze Studium hinweg. Ebenso danke ich meinem Freund Jo, dass er meine stressbedingten Launen in den letzten Wochen geduldig ertragen hat.

Danken möchte ich auch sämtlichen Korrekturlesern, besonders Nadine Klages für das

7 Danksagung

Auffinden der vielen „Prödomänen“, die sich in die Arbeit einschleichen wollten.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner LaTeX-Nothilfe Sven Willner bedanken, der rund um die Uhr für mich da war.

Literaturverzeichnis

- [1] Wie viele Zellen hat der Mensch? - Spektrum.de.
- [2] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH-Verl, Weinheim, 5 edition, 2011.
- [3] Harvey Lodish and Christina Lange. *Molekulare Zellbiologie*. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg [u.a.], 4 edition, 2001.
- [4] G. Binnig, C. F. Quate, and Ch Gerber. Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, 56(9):930–933, 1986.
- [5] G. Binnig, Ch Gerber, E. Stoll, T. R. Albrecht, and C. F. Quate. Atomic resolution with atomic force microscope: Proceedings of the ninth european conference on surface science. *Surface Science*, 189–190(0):1–6, 1987.
- [6] Bharat Bhushan, editor. *Springer handbook of nanotechnology: With 71 tables*. Springer, Berlin [u.a.], 2004.
- [7] Michael Birlo. *Einzelmolekül-Kraftspektroskopie an PhoB-DNA-Komplexen*. PhD thesis, Universität Bielefeld, Bielefeld, 2009.
- [8] Alexander Harder. *Kraftmikroskopische und kraftspektroskopische Untersuchungen an Proteoglykanen*. PhD thesis, Universität Bielefeld, Bielefeld, 2009.
- [9] J. Bechhoefer J.L. Hutter. Calibration of atomic-force microscope tips. *Review of Scientific Instruments*, 64(7):1868–1873.
- [10] Gerhard Meyer and Nabil M. Amer. Novel optical approach to atomic force microscopy. *Applied Physics Letters*, 53(12):1045–1047.
- [11] Peter Barth. *Hochauflösende Strukturierung von Siliziumoberflächen mittels Mikrokontaktdruck-Technik untersucht mit Rasterkraftmikroskopie*. PhD thesis, 21.09.2006.

- [12] Andreas Janshoff, Marcus Neitzert, York Oberdörfer, and Harald Fuchs. Kraftspektroskopie an molekularen systemen – einzelmolekülspektroskopie an polymeren und biomolekülen. *Angewandte Chemie*, 112(18):3346–3374, 2000.
- [13] Emil Fischer. *Berichte der deutschen chemikalischen Gesellschaft*, (28):1429–1438, 1895.
- [14] *Rasterkraftmikroskopie und Kraftspektroskopie an einzelnen Biomolekülen: Bartels, Frank Wilco*. PhD thesis, Universität Bielefeld, Bielefeld, 2002.
- [15] David P. Allison, Peter Hinterdorfer, and Wenhai Han. Biomolecular force measurements and the atomic force microscope. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(1):47–51, 2002.
- [16] Carlos Bustamante, Jed C. Macosko, and Gijs J. L. Wuite. Grabbing the cat by the tail: manipulating molecules one by one. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(2):130–136, 2000.
- [17] Hermann J. Gruber Peter Hinterdorfer Andreas Ebner. Molekulare kraftmikroskopie und kraftspektroskopie. *Biospektrum*, 12(5):501–503, 2006.
- [18] Jordanka Zlatanova, Stuart M. Lindsay, and Sanford H. Leuba. Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscope: Single molecule biochemistry and molecular biology. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 74(1–2):37–61, 2000.
- [19] R. Lévy and M. Maaloum. Measuring the spring constant of atomic force microscope cantilevers: thermal fluctuations and other methods. *Nanotechnology*, 13(1):33–37, 2002.
- [20] N. A. Burnham, X. Chen, C. S. Hodges, G. A. Matei, E. J. Thoreson, C. J. Roberts, M. C. Davies, and S. J. B. Tendler. Comparison of calibration methods for atomic-force microscopy cantilevers. *Nanotechnology*, 14(1):1–6, 2003.
- [21] James W. M. Chon Paul Mulvaney John E. Sader. Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments*, 70(10):3967–3969.
- [22] Christopher T. Gibson, Brandon L. Weeks, Chris Abell, Trevor Rayment, and Sverre Myhra. Calibration of afm cantilever spring constants: Proceedings of the fourth international conference on scanning probe microscopy, sensors and nanostructures. *Ultramicroscopy*, 97(1–4):113–118, 2003.

- [23] Joseph A. Turner Saltuk B. Aksu. Calibration of atomic force microscope cantilevers using piezolevers. *Faculty Publications from the Department of Engineering Mechanics*, 2007.
- [24] H-J Butt and M. Jaschke. Calculation of thermal noise in atomic force microscopy. *Nanotechnology*, 6(1):1–7, 1995.
- [25] Robert W. Stark, Tanja Drobek, and Wolfgang M. Heckl. Thermomechanical noise of a free v-shaped cantilever for atomic-force microscopy: Proceedings of the second international conference on scanning. *Ultramicroscopy*, 86(1–2):207–215, 2001.
- [26] G. Bell. Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science*, 200(4342):618–627, 1978.
- [27] E. Evans and K. Ritchie. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophysical Journal*, 72(4):1541–1555, 1997.
- [28] H. A. Kramers. Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions. *Physica*, 7(4):284–304, 1940.
- [29] Peter Hänggi, Peter Talkner, and Michal Borkovec. Reaction-rate theory: fifty years after kramers. *Reviews of Modern Physics*, 62(2):251–341, 1990.
- [30] S. Arrhenius. Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, (4):226–248, 1889.
- [31] Volker Walhorn. *Photonische Rasterkraftmikroskopie an fluoreszierenden Nanokristallen und molekularen Photoschaltern*. PhD thesis, Universität Bielefeld, Bielefeld, 2009.
- [32] E. Delva, D. K. Tucker, and A. P. Kowalczyk. The desmosome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(2):a002543, 2009.
- [33] Daniel Häussinger, Thomas Ahrens, Hans-Jürgen Sass, Olivier Pertz, Jürgen Engel, and Stephan Grzesiek. Calcium-dependent homoassociation of e-cadherin by nmr spectroscopy: Changes in mobility, conformation and mapping of contact regions. *Journal of Molecular Biology*, 324(4):823–839, 2002.
- [34] Sabine Pokutta, Kurt Herrenknecht, Rolf Kemler, and Jürgen Engel. Conformational changes of the recombinant extracellular domain of e-cadherin upon calcium binding. *European Journal of Biochemistry*, 223(3):1019–1026, 1994.

- [35] Calkins. Spotting desmosomes: The first 100 years. *Journal of Investigative Dermatology*, 2007.
- [36] Stephan Schäfer, Peter J. Koch, and Werner W. Franke. Identification of the ubiquitous human desmoglein, dsg2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins. *Experimental Cell Research*, 211(2):391–399, 1994.
- [37] Bastian Holthöfer, Reinhard Windoffer, Sergey Troyanovsky, and Rudolf E. Leube. Structure and function of desmosomes. *International Review of Cytology*, (264):65–163, 2007.
- [38] W. He. Untangling desmosomal knots with electron tomography. *Science*, 302(5642):109–113, 2003.
- [39] David L. Stokes. Desmosomes from a structural perspective. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(5):565–571, 2007.
- [40] M. Delmar and W. J. McKenna. The cardiac desmosome and arrhythmogenic cardiomyopathies: From gene to disease. *Circulation Research*, 107(6):700–714, 2010.
- [41] O. Huber. Structure and function of desmosomal proteins and their role in development and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(9):1872–1890, 2003.
- [42] W.M Heupel, W. Baumgartner, B. Laymann, D. Drenckhahn, and N. Golenhofen. Different ca^{2+} affinities and functional implications of the two synaptic adhesion molecules cadherin-11 and n-cadherin. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 37(3):548–558, 2008.
- [43] Jens Waschke, Paola Bruggeman, Werner Baumgartner, Detlef Zillikens, and Detlev Drenckhahn. Pemphigus foliaceus igg causes dissociation of desmoglein 1-containing junctions without blocking desmoglein 1 transinteraction. *Journal of Clinical Investigation*, 115(11):3157–3165, 2005.
- [44] Hisham Bazzi, Amalia Martinez-Mir, Ana Kljuic, and Angela M. Christiano. Desmoglein 4 mutations underlie localized autosomal recessive hypotrichosis in humans, mice, and rats. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 10(3):222–224, 2005.

- [45] Gaetano Thiene, Domenico Corrado, and Cristina Basso. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Orphanet journal of rare diseases*, 2:45, 2007.
- [46] Mark M. Awad, Hugh Calkins, and Daniel P. Judge. Mechanisms of disease: molecular genetics of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 5(5):258–267, 2008.
- [47] Mark M. Awad, Darshan Dalal, Eunpi Cho, Nuria Amat-Alarcon, Cynthia James, Crystal Tichnell, April Tucker, Stuart D. Russell, David A. Bluemke, Harry C. Dietz, Hugh Calkins, and Daniel P. Judge. Dsg2 mutations contribute to arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *The American Journal of Human Genetics*, 79(1):136–142, 2006.
- [48] P. Syrris, D. Ward, A. Asimaki, A. Evans, S. Sen-Chowdhry, S. E. Hughes, and W. J. McKenna. Desmoglein-2 mutations in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a genotype-phenotype characterization of familial disease. *European Heart Journal*, 28(5):581–588, 2006.
- [49] Katja Gehmlich, Angeliki Asimaki, Thomas J. Cahill, Elisabeth Ehler, Petros Syrris, Elisabetta Zachara, Federica Re, Andrea Avella, Lorenzo Monserrat, Jeffrey E. Saffitz, and William J. McKenna. Novel missense mutations in exon 15 of desmoglein-2: Role of the intracellular cadherin segment in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy? *Heart Rhythm*, 7(10):1446–1453, 2010.
- [50] arvcdatabase.info.
- [51] Asylum Research Atomic Force Microscopes. Mfp-3dtm atomic force microscope installation and operation manual, 25.10.2004.
- [52] Mfp-3d stand alone afm.
- [53] Bruker AFM Probes. Afm probes | afm cantilever | afm tips: Msct cantilever.
- [54] Martin Hegner, Peter Wagner, and Giorgio Semenza. Ultralarge atomically flat template-stripped au surfaces for scanning probe microscopy. *Surface Science*, 291(1–2):39–46, 1993.
- [55] arrandeeTM - our products.
- [56] Alexander Fuhrmann. *Single Molecule Force Spectroscopy on Protein-Nucleicacid-Complexes*. PhD thesis, 03.11.2006.

- [57] Jens Waschke, Carlos Menendez-Castro, Paola Bruggeman, Rainer Koob, Masayuki Amagai, Hermann J. Gruber, Detlev Drenckhahn, and Werner Baumgartner. Imaging and force spectroscopy on desmoglein 1 using atomic force microscopy reveal multivalent Ca^{2+} -dependent, low-affinity trans-interaction. *Journal of Membrane Biology*, 216(2-3):83–92, 2007.
- [58] Holger Schönherr, Marcel W. J. Beulen, Jürgen Bügler, Jurriaan Huskens, Frank C. J. M. van Veggel, David N. Reinhoudt, and G. Julius Vancso. Individual supramolecular host–guest interactions studied by dynamic single molecule force spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 122(20):4963–4967, 2000.
- [59] Shan Zou, Holger Schönherr, and G. Julius Vancso. Force spectroscopy of quadruple h-bonded dimers by afm: Dynamic bond rupture and molecular time–temperature superposition. *Journal of the American Chemical Society*, 127(32):11230–11231, 2005.
- [60] Anna Gärtner. *In vitro-Funktionsanalysen Kardiomyopathie-assoziiierter Desmoglein-2-Varianten*. PhD thesis, Bielefeld, Bielefeld, 2012.