

---

# Kraftmikroskopische und kraftspektroskopische Untersuchungen an Proteoglykanen

---

Diplomarbeit

Alexander Harder  
Fachbereich Physik



Juli 2009



*«Das Experiment irrt nie, es irren nur eure Vorurteile, die sich  
eine andere Wirklichkeit versprechen, als sie in unserer  
Erfahrung begründet sind.»*

*Leonardo da Vinci*



## ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und dabei keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Bielefeld, den 31.07.2009

(Alexander Harder)

Gutachter:

Prof. Dr. Dario Anselmetti (Fakultät für Physik)

Prof. Dr. Thomas Dierks (Fakultät für Chemie)

Abgabedatum der Arbeit: 31.07.2009



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Physikalische Grundlagen</b>	<b>3</b>
2.1	Rasterkraftmikroskopie . . . . .	3
2.1.1	Aufbau . . . . .	4
2.1.2	Wechselwirkungskräfte . . . . .	6
2.1.3	Messmodi . . . . .	8
2.2	Kraftspektroskopie . . . . .	10
2.2.1	Kalibration des Kraftsensors . . . . .	12
2.2.2	Kinetik, Thermodynamik und Kräfte . . . . .	14
<b>3</b>	<b>Biologische Grundlagen</b>	<b>19</b>
3.1	Proteine . . . . .	19
3.2	Proteoglykane . . . . .	21
3.2.1	Aggrecan . . . . .	23
3.3	Aggregationsfaktoren . . . . .	24
3.3.1	Aggregationsfaktor aus dem Meeresschwamm <i>Microciona prolifera</i> . . . . .	24
<b>4</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>27</b>
4.1	Biologische Systeme . . . . .	27
4.2	Rasterkraftmikroskopie . . . . .	28
4.2.1	Instrument . . . . .	28
4.2.2	Kraftsensoren . . . . .	28
4.2.3	Substrate . . . . .	28
4.2.4	Chemikalien . . . . .	29
4.2.5	Probenpräparation . . . . .	29
4.2.6	Abbildungsparameter . . . . .	30

4.2.7	Auswertung der AFM-Bilder . . . . .	30
4.3	Kraftspektroskopie . . . . .	31
4.3.1	Instrument . . . . .	31
4.3.2	Kraftsensoren . . . . .	31
4.3.3	Substrate . . . . .	32
4.3.4	Chemikalien . . . . .	33
4.3.5	Funktionalisierung . . . . .	33
4.3.6	Kraftspektroskopische Parameter . . . . .	34
4.3.7	Auswertung der Kraft-Distanz-Kurven . . . . .	35
<b>5</b>	<b>Resultate</b>	<b>39</b>
5.1	Aggrecan . . . . .	39
5.1.1	Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen . . . . .	39
5.1.2	Kraftspektroskopische Untersuchungen . . . . .	45
5.1.2.1	Calcium-Abhängigkeit der Bindung . . . . .	46
5.1.2.2	Calcium-Selektivität der Bindung . . . . .	48
5.1.2.3	Verifizierung der Bindung . . . . .	51
5.1.2.4	Dynamische Kraftspektroskopie . . . . .	53
5.2	Aggregationsfaktor aus dem Meeresschwamm <i>Microciona prolifera</i> . . . . .	56
5.2.1	Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen . . . . .	56
5.2.2	Kraftspektroskopische Untersuchungen . . . . .	59
5.2.2.1	Verifizierung der Bindung . . . . .	60
5.2.2.2	Dynamische Kraftspektroskopie . . . . .	63
5.3	Aggrecan vs. MAF . . . . .	65
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>67</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>69</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>79</b>



# 1 Einleitung

Die gerichtete Wechselwirkung zwischen Biomolekülen ist essentiell für Prozesse in lebenden Systemen. Sie bildet die Grundlage für die Selbstorganisation und den Aufbau funktioneller Strukturen. Dabei muss ein Biomolekül seinen Bindungspartner aus einer Vielzahl von konkurrierenden Molekülen erkennen können und mit diesem eine reversible Bindung eingehen. Dieser Prozess basiert auf dem so genannten Schlüssel-Schloss-Prinzip [1] und wird molekulare Erkennung genannt. Solch eine spezifische Bindung wird von einer Reihe schwacher und lokal begrenzter Wechselwirkungen wie Ionenbindung, Wasserstoffbrücken und Van-der-Waals-Kräften induziert und kann nur von Molekülen mit komplementären Strukturen, die räumlich und chemisch zu einander passen, eingegangen werden. Der reversible Charakter von spezifischen Bindungen zwischen Biomolekülen, und die damit verbundene begrenzte mittlere Lebensdauer der gebildeten Komplexe, ist für eine adaptive Steuerung der organischen Prozesse auf äußere und zeitlich variable Einflüsse verantwortlich.

In der klassischen Molekularbiologie werden mittels biosensorischen Methoden wie zum Beispiel das SPR (Surface Plasmon Resonance) [2] Molekülensembles untersucht. Hierbei bleiben jedoch oft Informationen über die Wechselwirkung schwach bindender oder in geringer Konzentration vorhandener Moleküle verborgen. Um diese Defizite auszugleichen und Messungen auf dem Einzelmolekülniveau durchführen zu können wird die *dynamische Kraftspektroskopie* als experimentelle Methode verwendet [3]. Für die Realisierung solcher Experimente benötigt man einen sehr sensitiven Kraftmesser mit einer präzisen Positionierung, da die Wechselwirkungskräfte im pN-Bereich und die Abstände im nm-Bereich liegen. Diese Voraussetzung erfüllt das Rasterkraftmikroskop (engl: Atomic Force Microscope, AFM) [4]. Dabei werden die zu untersuchenden Biomoleküle sowohl auf der Spitze eines mikrofabrizierten Kraftsensors, als auch auf einem geeigneten Substrat kovalent immobilisiert und durch ein piezoelektrisches Stellelement in Kontakt gebracht und wieder von einander entfernt. Hat während der Kontaktzeit eine Bindung stattgefunden, wird der Kraftsensor beim Zurückziehen solange ausgelenkt bis die äußere

Kraft gleich der Bindungskraft ist. Über die mechanische Auslenkung des Kraftsensors erlangt man dann direkt eine Information über die Dissoziationskräfte der Biomoleküle. Werden solche Experimente bei verschiedenen Rückziehggeschwindigkeiten gemacht, erhält man die Abhängigkeit der Kraftverteilungen von den verschiedenen Belastungsraten und somit die Information über die kinetische Off-Ratenkonstante ( $k_{off}^0 = \frac{1}{\tau}$  mit  $\tau$  mittlere Lebensdauer).

Die Kraftspektroskopie fand erfolgreich ihre Anwendung bereits in einer Vielzahl von Experimenten, wie z.B. bei Untersuchungen von Rezeptor-Ligand-Systemen [5], Immunerkennenden-Systemen [6] und Zelladhäsiven-Wechselwirkungen [7, 8].

Diese Arbeit präsentiert rasterkraftmikroskopische und kraftspektroskopische Messungen an Proteoglykanen. Die biologischen Aufgaben der Proteoglykane sind sehr vielfältig und erstrecken sich von relativ einfachen mechanischen Funktionen, Effekten mit dynamischen Prozessen wie Zelladhäsion und -beweglichkeit bis zu hoch komplexen und immer noch nicht ganz verstandenen Aufgaben in Zelldifferentiation und -entwicklung [9, 10]. Untersucht werden zwei verschiedene Systeme, die Aggregationsfaktoren aus dem Meeresschwamm *Microciona prolifera* und die Aggrecane aus dem bovinen artikulären Knorpel. Primär wird die Selbstadhäsion zwischen den Proteoglykanen untersucht, die vermutlich durch Glykan-Glykan Wechselwirkungen in Verbindung mit  $\text{Ca}^{2+}$  hervorgerufen wird.  $\text{Ca}^{2+}$  ist das Schlüsselement in vielen molekularerkennenden Ereignissen von Biomolekülen, einschließlich der Rolle des Boten in synaptischen Transmissionen, Zelladhäsion und Kontraktion der Muskeln. Die Charakterisierung solcher Glykan-Glykan Wechselwirkungen könnte ein tieferes Verständnis der Embryogenese [11], der Metastase [12, 13] und vielen anderen zellulären Proliferationsprozesse fördern, in denen auch selbsterkennende Glykan-Glykan Wechselwirkungen involviert sind.

Im Folgenden (Kapitel 2) wird auf die physikalischen Grundlagen der Rasterkraftmikroskopie und Kraftspektroskopie eingegangen. Anschließend (Kapitel 3) werden die untersuchten biologischen Systeme vorgestellt. Danach (Kapitel 4) werden die verwendeten Materialien und Methoden angegeben und die erlangten Resultate (Kapitel 5) diskutiert. Abschließend (Kapitel 6) folgen eine Zusammenfassung und ein Ausblick für mögliche weitere Experimente.

## 2 Physikalische Grundlagen

In diesem Kapitel wird die allgemeine Funktionsweise des Rasterkraftmikroskops beschrieben, sowie die Kraftspektroskopie anhand einer Kraft-Distanz-Kurve erläutert. Die zugehörigen theoretischen Grundlagen wie die Thermodynamik und die Kinetik der wirkenden Kräfte werden diskutiert.

### 2.1 Rasterkraftmikroskopie

Im Jahre 1986 wurde das Rasterkraftmikroskop erstmals der Öffentlichkeit durch seine Entwickler Binnig, Gerber und Quate [4] vorgestellt. Es gehört zu den so genannten Rastersondenmikroskopen (engl: Scanning Prob Microscope, SPM) und basiert auf einer Weiterentwicklung des Rastertunnelmikroskops (engl: Scanning Tunneling Microscope, STM) [14, 15]. Die Rastersondenmikroskope besitzen alle eine sehr feine, fast atomare Sonde, die im Kontakt oder im Nahfeld (Abstände von wenigen Nanometern) über die Probe gerastert wird und somit punktweise Informationen über die Probenoberfläche liefert. Die unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen Sonde und Oberfläche charakterisieren das jeweilige Gerät. Beim Rastertunnelmikroskop wird ein sehr kleiner Tunnelstrom (nA - pA) gemessen, was eine leitfähige Sonde und Oberfläche voraussetzt. In der Rasterkraftmikroskopie wird die atomare Kraftwechselwirkung zwischen Oberfläche und Sonde als bildgebende Information benutzt. Dieses Messverfahren erlaubt Untersuchungen an Luft und in Flüssigkeit. Damit ist es prädestiniert für das Abbilden von Biomolekülen. Im Falle des optischen Nahfeldmikroskops (engl: Scanning Near-Field Optical Microscope, SNOM) [16] dient die Lichtwechselwirkung (evaneszentes Feld) zur Bilderzeugung.

### 2.1.1 Aufbau

Die Sonde bzw. der Kraftsensor des Rasterkraftmikroskops besteht aus einem Federbalken (engl: cantilever) und einer sehr feinen Spitze (engl: tip) mit einem Radius von wenigen Nanometern. Mit Hilfe von piezoelektrischen Stellelementen (Scanner) wird die Probe an den Kraftsensor angenähert und gerastert. Die piezoelektrischen Stellelemente lassen sich proportional zu einer angelegten Spannung strecken bzw. stauchen. Welcher Prozess eintritt ist abhängig von der Polarität der Spannung. Alternativ kann die Probe festgehalten werden und mit dem Kraftsensor angefahren werden.

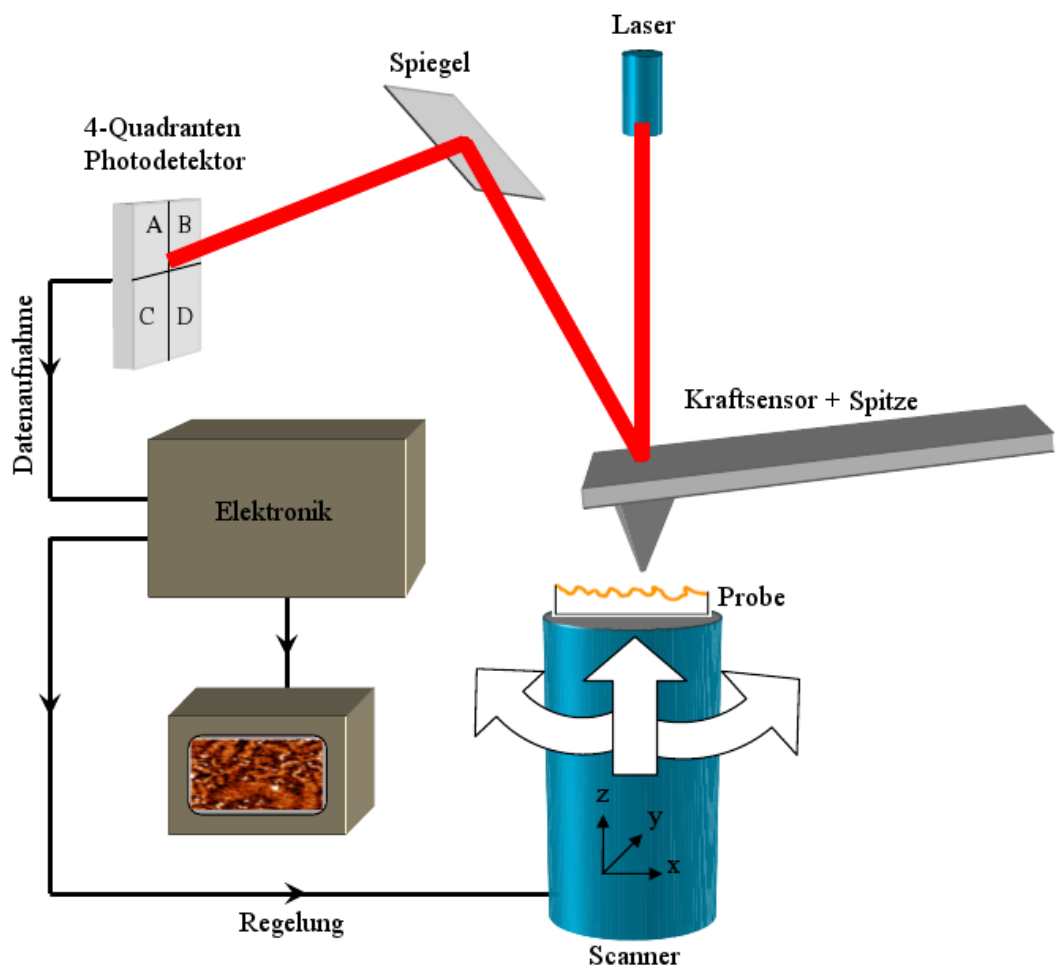
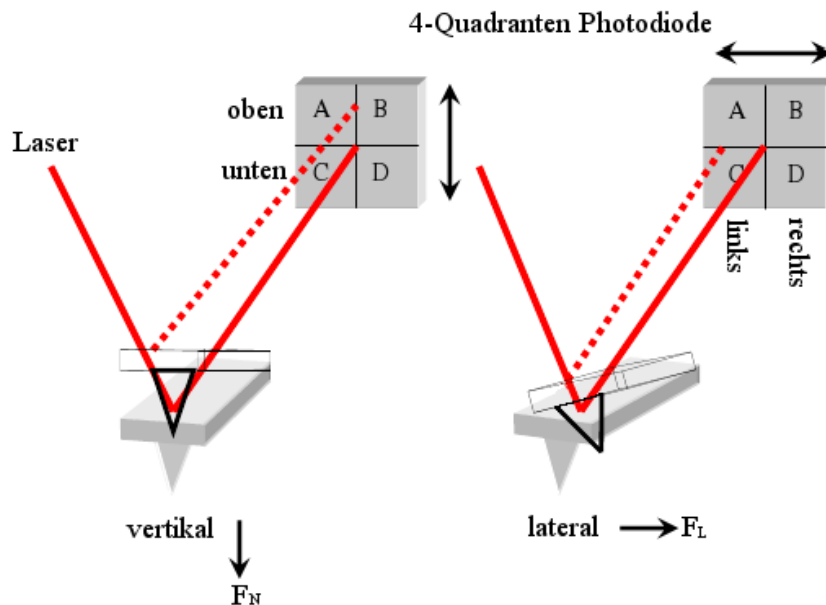


Abbildung 2.1: Prinzip des Rasterkraftmikroskops

Wenn sich die Spitze in der Nähe der Oberfläche einer Probe befindet, wird der Kraftsensor durch die wirkenden molekularen Kräfte ausgelenkt. Diese Auslenkung wird meist

durch ein Lichtzeigersystem (optical beam deflection) [17], bestehend aus Laser und Photodioden, detektiert. Abbildung 2.1 zeigt so ein System. Ein Laserstrahl wird auf die Rückseite des Kraftsensors fokussiert und reflektiert, wobei die Reflektion über einen Spiegel auf eine 4-Quadrantenphotodiode [18] projiziert wird. Die auf diese Weise gemessenen Kräfte dienen als Rückkopplungssignal zur Steuerung der Bewegung des Kraftsensors in vertikaler Richtung (Feedback-Regelkreis). Mit diesem Verfahren ist sowohl die vertikale als auch die laterale Verformung des Kraftsensors sehr präzise messbar [19] (Abbildung 2.2). Die Verbiegung des Kraftsensors verändert den Ausfallwinkel des Laserstrahls und bewirkt somit eine Verschiebung des Laserspots auf dem Detektor. Dadurch ändert sich der Stromfluss in der Detektoreinheit. Eine vertikale Auslenkung des Kraftsensors entspricht einer Normalkraft  $F_N$ , die proportional zu der Differenz der Teilspannungen der oberen und unteren Segmente ist ( $U_N = (U_A + U_B) - (U_C + U_D)$ ). Die Torsionsauslenkung bedingt durch Lateralkräfte  $F_L$ , ist proportional zur Differenz der Teilspannungen linker und rechter Segmente ( $U_L = (U_A + U_C) - (U_B + U_D)$ ). Es existieren weitere Methoden, um die Verformung des Kraftsensors zu detektieren z.B. mit Hilfe des Tunnelstroms [4], über die Interferometrie [20] oder kapazitiv [21]. Jedoch ist das Lichtzeigersystem das etablierteste.



**Abbildung 2.2:** Messung der normalen und lateralen Verformung des Kraftsensors mit dem Lichtzeigersystem im Kontaktmodus

### 2.1.2 Wechselwirkungskräfte

Für die Art der atomaren Wechselwirkungskräfte zwischen Kraftsensor und Probenoberfläche sind Faktoren wie der Abstand zwischen Kraftsensor und Oberfläche, das umgebende Medium (Vakuum, Luft, Flüssigkeit) und das Proben- bzw. Kraftsensormaterial von Bedeutung. Man unterscheidet grundsätzlich zwischen kurzreichweitigen und langreichweitigen Kräften [22]. Im Folgenden werden kurz einige für die AFM-Messung relevanten Wechselwirkungen [23] beschrieben.

- **Pauli-Abstoßung:** Beim Kontakt zwischen Kraftsensor und Oberfläche überlappen sich die Elektronenwellenfunktionen der Spitzenatome mit denen der Oberfläche. Nach dem Pauli-Prinzip können Elektronen, die in allen Quantenzahlen übereinstimmen, nicht am selben Ort sein. Folglich kann man eine stark repulsive Kraft erst unterhalb einer Reichweite von 0,1 nm nachweisen.
- **Van-der-Waals-Kraft:** Diese Kraft beinhaltet alle inter- und intramolekularen Wechselwirkungen, welche auf permanenten oder induzierten Dipolen basieren [24], jedoch nicht elektrostatische oder bindungsbildende Wechselwirkungen. Das Van-der-Waals-Potential  $\Phi_{vdw}$  setzt sich aus Dipol-Dipol-Wechselwirkung<sup>1</sup>  $\Phi_{pol}$ , Dipolinduzierter-Wechselwirkung<sup>2</sup>  $\Phi_{ind}$  und London'scher Dispersionswechselwirkung<sup>3</sup>  $\Phi_{disp}$  [25] zusammen. Der Dispersionsanteil dominiert in der Regel gegenüber den anderen, außer bei stark polaren Molekülen wie  $H_2O$ . Diese Wechselwirkung hat einen langreichweitigen Bereich, der etwa 100 nm beträgt. Im Vakuum ist sie immer attraktiv, kann aber auch in bestimmten Medien repulsiv werden. Für zwei makroskopische Körper mit Abstand  $r$  lässt sie sich näherungsweise durch

$$\Phi_{vdw} = \frac{-C}{r^6} \quad (2.1)$$

darstellen.

- **Kapillarkraft:** Praktisch alle Festkörper sind unter Atmosphärenbedingungen mit einem permanenten molekularen wässrigen Kondensatfilm benetzt [26]. Kommen

---

<sup>1</sup>ausrichten permanenter Dipole relativ zueinander

<sup>2</sup>ein Dipolmoment wird im Feld eines Dipols erzeugt

<sup>3</sup>Wechselwirkung zwischen fluktuierenden Dipolen und der in ihrem Feld induzierten Dipolen

Spitze und Probe mit einander in Kontakt, bildet sich eine Flüssigkeitskapillare aus, die zusätzliche dominierende Adhäsionskräfte von 10-100 nN hervorruft. Diese Kräfte haben einen attraktiven Charakter und eine Reichweite von etwa 10 nm, abhängig von der Dicke des Kondensatfilms. Durch Benutzung ultra scharfer Spitzen können sie reduziert werden [27]. Neutralisieren kann man sie nur in Flüssigkeiten oder im Vakuum.

- **Elektrostatische Wechselwirkung:** Diese Wechselwirkung resultiert aus der Tatsache, dass zwischen zwei Ladungen  $Q_1$  und  $Q_2$  im Abstand  $r$  eine Kraft existiert, die Coulombkraft:

$$F_C = \frac{1}{4\pi\epsilon\epsilon_0} \frac{Q_1 Q_2}{r^2} \quad (2.2)$$

mit den Dielektrizitätskonstanten  $\epsilon_0$  des Vakuums und  $\epsilon$  des Mediums<sup>4</sup>. Je nach Vorzeichen kann diese Kraft sowohl repulsiv als auch attraktiv sein. Sie gehört zu den langreichweitigen Kräften mit mehreren 100 nm Reichweite. Durch Messung in Flüssigkeit kann sie reduziert werden, da z.B. Wasser bei Raumtemperatur ein  $\epsilon$  von 81 hat und dieses mit  $\frac{1}{\epsilon}$  in die Coulombkraft eingeht (Gleichung 2.2).

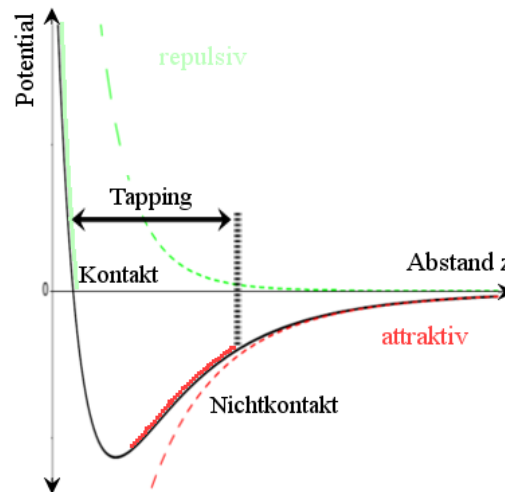
Das Gesamtpotential lässt sich qualitativ in Form eines Lennard-Jones-Potentials  $\Phi(z)$  darstellen:

$$\Phi(z) = 4\epsilon \left[ \left(\frac{\sigma}{z}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{z}\right)^6 \right] \quad (2.3)$$

mit der Tiefe des Potentialtopfes  $\epsilon$ , Abstand zwischen den Atomzentren  $\sigma$  und dem Kontaktabstand  $z$ , wobei  $\epsilon$  und  $\sigma$  Materialkonstanten sind. Für  $z < \sigma$  steigt der  $\left(\frac{\sigma}{z}\right)^{12}$  Term stark an. In diesem Fall ist die Wechselwirkung kurzreichweitig und stark repulsiv, da wegen des Pauliprinzips kein Quantenzustand mehrfach besetzt sein darf. Wenn  $z > \sigma$  ist, gibt der  $-\left(\frac{\sigma}{z}\right)^6$  Term überwiegend das Van-der-Waals-Potential wieder und ist für die langreichweitigen Kräfte, die attraktiv sind, verantwortlich. Dieses Modell liefert im Vakuum bei ungeladenen Proben eine brauchbare Näherung. Für geladene Proben kommt der Coulomb-Anteil hinzu. Wird die Probe unter Atmosphärenbedingungen vermessen, muss auch die Kapillarwirkung des Feuchtigkeitsfilms betrachtet werden. In

<sup>4</sup>im Vakuum ist  $\epsilon = 1$

Abbildung 2.3 ist ein Lennard-Jones-Potential graphisch dargestellt mit den jeweiligen Wechselwirkungsbereichen für die im nächsten Abschnitt erwähnten Messmodi.



**Abbildung 2.3:** Lennard-Jones-Potential mit Wechselwirkungsbereichen für die verschiedenen Messmodi. Der Kontakt Modus arbeitet im repulsiven Bereich. Der Tapping<sup>TM</sup> Modus arbeitet sowohl im repulsiven als auch im attraktiven Bereich und der Nichtkontakt Modus arbeitet ausschließlich im attraktiven Bereich.

### 2.1.3 Messmodi

Prinzipiell unterscheidet man zwischen zwei Messmodi für die Topographiedarstellung: Dem Kontakt Modus (engl: contact mode) und dem Dynamischen Modus, der sich wiederum in einen berührungslosen Modus (engl: non contact mode) und einen Modus mit kurzzeitiger Berührung (engl: intermittent contact mode bzw. tapping<sup>TM</sup> mode) unterteilen lässt.

Im **Kontakt Modus** [4] befinden sich der Kraftsensor und die Oberfläche in ständigem mechanischen Kontakt. Dieser Modus ist relativ stabil und nicht anfällig für den Wasserfilm, weil er von der Spitze des Kraftsensors durchstoßen wird. In diesem Fall werden repulsive Kräfte von  $10^{-10}$  N bis  $10^{-6}$  N detektiert. Da diese Kräfte sehr abstands-sensitiv sind, ist die Auflösung in z-Richtung ca. 0,01 nm [26]. Die mögliche Auflösung in x- und y-Richtung beträgt aufgrund der Spitzengeometrie etwa 0,1 nm. Für die Oberflächendarstellung kann entweder die Kraftsensorverbiegung konstant gehalten werden



(constant force mode) oder die z-Richtung der Oberfläche (constant height mode). Im ersten Fall wird die vertikale Position der Spitze detektiert und beim zweiten wird die direkte Auslenkung des Kraftsensors erfasst bzw. die Bewegung des Laserspots auf der Photodiode. Mit dem Kontakt Modus lassen sich hohe Auflösungen erreichen, außerdem erhält man zusätzlich Informationen über Reibungskräfte und plastische Verformung. Jedoch eignet er sich weniger für weiche Oberflächen oder Biomoleküle, da diese durch die Spitze zerstört werden können.

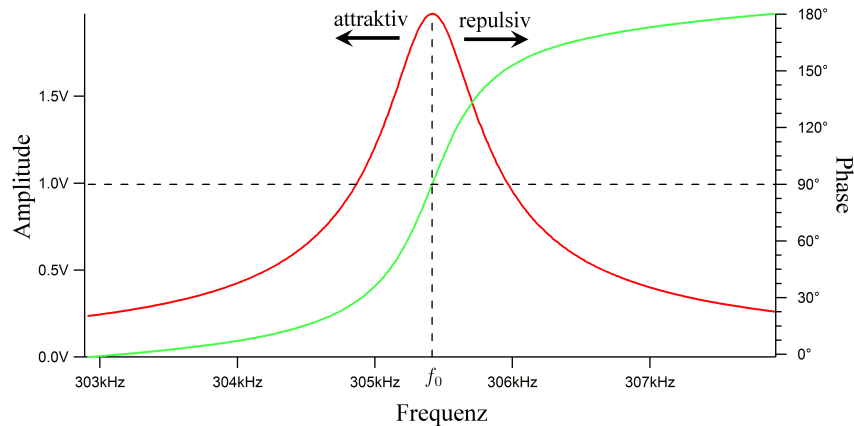
In den **Dynamischen Modi** [28] wird der Kraftsensor mit einem Piezo in Schwingung gebracht, der zunächst in der Nähe seiner Resonanzfrequenz  $f_0$  mit der Amplitude  $A_0$  schwingt (Abbildung 2.4). Wird der Abstand Oberfläche-Spitze auf typischerweise 10 bis 100 nm reduziert, kommt es aufgrund der Kraftgradienten zur Wechselwirkung. Die dominierenden meist attraktiven Van-der-Waals-Kräfte bewirken eine Verschiebung der Resonanzfrequenz um  $\Delta f$ , was auch eine Variation der Oszillationsamplitude  $A_0$  und der Phase  $\varphi_0$  zwischen Anregungs- und Detektionssignal mit sich bringt. Als Abstandsregelung kann sowohl das Amplitudensignal (AM-detection) wie auch das Frequenzsignal (FM-detection) benutzt werden. Somit erhält man ein Topographie-Bild (height image), ein Amplituden-Bild (amplitude image) und ein Phasen-Bild (phase image). Anhand des Phasen-Bildes kann man Informationen über die Energiedissipation gewinnen und dadurch Aufschluß über die Oberflächeneigenschaften erhalten [29].

- Der Nichtkontakt Modus fordert hohe Ansprüche an Messaufbau und Regelelektronik, da hier auf den Kontakt zwischen Probe und Kraftsensor gänzlich verzichtet wird. Erst 1995 gelangen Aufnahmen mit atomarer Auflösung [30]. Weil der Abstand Probe-Kraftsensor zwischen 1 bis 200 nm beträgt, ist ein absolut zerstörungsfreies Abbilden möglich. Für einen stabilen Betrieb in diesem Modus ist eine Vakuum-Umgebung notwendig. Mittlerweile ist es aber gelungen sowohl an Luft als auch in Flüssigkeit mit diesem Modus molekulare Auflösung zu erreichen [31, 32].
- Beim Tapping<sup>TM</sup> Modus berührt der Kraftsensor die Oberfläche nur für kurze Zeit ( $\mu\text{s}$ -Bereich) [33] im unteren Umkehrpunkt der Schwingung. Der Kraftsensor tippt bzw. klopft (engl: to tap)<sup>5</sup> also auf die Oberfläche. Auf diese Weise werden

---

<sup>5</sup>deswegen auch der Name tapping<sup>TM</sup> mode

die lateralen Kräfte minimiert [34], was eine höhere Auflösung für weiche Materialien impliziert. Dieser Modus kann an Luft und auch in Flüssigkeiten betrieben werden, deshalb eignet er sich sehr für die Untersuchung von biologischen Proben.



**Abbildung 2.4:** Resonanzkurve eines frei schwingenden Siliziumkraftsensors an Luft. Die rote Kurve zeigt den Resonanzpeak bei  $f_0$  mit Amplitude  $A_0$  und die grüne Kurve die Phasen. Kommt der Kraftsensor in den Wechselwirkungsbereich der Probenoberfläche, so wird die Resonanzfrequenz bei attraktiven Kräften verkleinert und bei repulsiven Kräften vergrößert.

Alle in dieser Arbeit präsentierten AFM-Bilder werden an Luft im Tapping<sup>TM</sup> Modus aufgenommen.

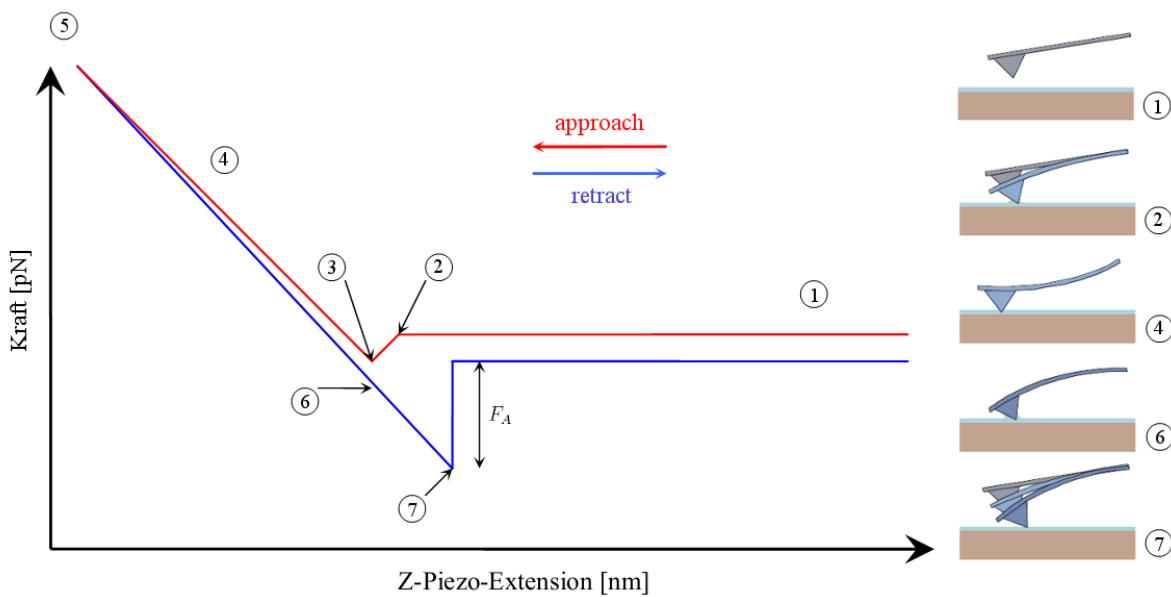
## 2.2 Kraftspektroskopie

Die Kraftspektroskopie ist eine weitere Anwendung des AFM. Da der Kraftsensor dem Hooke'schen Gesetz

$$\Delta F = -k\Delta z \quad (2.4)$$

gehört (mit  $\Delta F$  Kraft auf den Kraftsensor,  $k$  dessen Federkonstante und  $\Delta z$  seine Auslenkung), können sehr kleine Kräfte detektiert werden. Ihre Anwendung findet die Kraftspektroskopie unter anderem in der Bestimmung der thermodynamischen Dissoziationsrate von Rezeptor-Ligand-Bindungen [3] oder in Untersuchungen von Proteinfaltungsstrukturen [35]. Bei dieser Technik wird nur der Abstand zwischen Kraftsensor und Probenoberfläche variiert und die Verbiegung (engl: deflection) des Kraftsensors mit

dem Lichtzeigersystem (Abschnitt 2.1.1) detektiert. Das heißt der Kraftsensor wird mit dem Piezo so lange an die Oberfläche gefahren, bis er mit einer bestimmten Kraft (engl: trigger point) darauf drückt und dann wieder über eine definierte Distanz zurückgezogen. Diese Distanz wird durch einen so genannten LVDT-Positionssensor (Linear Variable Differential Transformator) gemessen. Die Messdaten aus Kraft auf den Kraftsensor und Distanz des Piezo werden über eine Kraft-Distanz-Kurve visualisiert. In Abbildung 2.5 ist eine typische Kraft-Distanz-Kurve dargestellt.



**Abbildung 2.5:** Graphische Darstellung einer typischen Kraft-Distanz-Kurve. Rechts ist die charakteristische Kraftsensorauslenkung für die verschiedenen Phasen gezeigt.

Im Bereich (1) ist der Kraftsensor weit von der Probenoberfläche entfernt; er ist im Ruhezustand, demnach keine Auslenkung. Ab einer bestimmten vertikalen Position (2) überwiegen attraktive Kräfte (Van-der-Waals-, Elektrostatische- und Kapillarkräfte), so dass der Kraftsensor zur Oberfläche „springt“ (snap-in), was eine negative Auslenkung bewirkt. Bei weiterer Annäherung verbiegt sich der Kraftsensor aufgrund der nun dominierenden repulsiven Kräfte, zunächst in seine Ruheposition (3) und dann bei Kontakt mit der Probenoberfläche in die andere Richtung (4), also positive Auslenkung. Der Kraftsensor wird solange ausgelenkt, bis eine vorgegebene Kraft erreicht ist (5). Bei dieser Kraft wird der Kraftsensor wieder zurückgezogen, verlässt jedoch die Probenoberfläche nicht (6), wegen der unspezifischen Adhäsionskräfte. Erst wenn die Rückstellkraft die anziehenden Kräfte ( $F_A$ ) überwiegt (7), springt der Kraftsensor von der Proben-

berfläche weg und ist wieder kräftefrei.

Für die Anwendung der Kraftspektroskopie müssen die zu untersuchenden Moleküle auf dem Kraftsensor und Substrat immobilisiert werden, was in vielen Fällen eine Reihe von chemischen Präparationsschritten erfordert [36]. Zu beachten ist, dass die Bindungskräfte der immobilisierten Moleküle, sowohl auf dem Kraftsensor wie auch auf dem Substrat, um Größenordnungen stärker (kovalent) sind als die Dissoziationskräfte der wechselwirkenden Moleküle zwischen Kraftsensor und Substrat. Dies gewährleistet die Messung der gewünschten Ereignisse. Um physiologische Bedingungen zu schaffen, werden Messungen an Biomolekülen in Flüssigkeit durchgeführt.

### 2.2.1 Kalibration des Kraftsensors

Um die Dissoziationskräfte möglichst genau zu bestimmen muss der Kraftsensor vor jeder Messung kalibriert bzw. seine Federkonstante verifiziert werden. Dazu gibt es mehrere Verfahren, die sich in statische und dynamische Methoden unterteilen lassen [37]. Bei den statischen Methoden wird eine exakt bekannte Kraft auf den Kraftsensor ausgeübt und aus der resultierenden Auslenkung auf die Federkonstante geschlossen. Bei den dynamischen Methoden wird der Kraftsensor in Schwingung versetzt, über die man an die Federkonstante gelangt, da die Schwingung von dieser abhängt. Im Folgenden wird auf die dynamische Methode *Thermal Noise Methode* eingegangen, mit der in dieser Arbeit gearbeitet wird. Mit dieser Methode lassen sich „weiche“ Kraftsensoren bis zu einer Federkonstante von  $k = 200 \frac{pN}{nm}$  kalibrieren [38]. Der Kraftsensor wird hierbei als harmonischer Oszillator angesehen, der im thermischen Gleichgewicht durch die Hamiltonfunktion

$$H = \frac{p^2}{2m_{eff}} + \frac{1}{2}m_{eff}\omega_0^2q^2 \quad (2.5)$$

beschrieben wird. Mit  $p$  dem Impuls,  $m_{eff}$  der effektiven Masse,  $\omega_0$  der Resonanzfrequenz und  $q$  der Auslenkung des Oszillators. Aus dem Äquipartitionstheorem folgt:

$$\left\langle \frac{1}{2}m_{eff}\omega_0^2q^2 \right\rangle = \frac{1}{2}k_B T, \quad (2.6)$$

wobei  $k_B$  die Boltzmannkonstante und  $T$  die absolute Temperatur ist. Mit der Beziehung  $\omega_0^2 = \frac{k}{m_{eff}}$  folgt für die Federkonstante des Kraftsensors:

$$k = \frac{k_B T}{\langle q^2 \rangle}. \quad (2.7)$$

Um  $\langle q^2 \rangle$  zu berechnen muss man die Langevin Gleichung betrachten. Für einen gedämpften harmonischen Oszillator mit erzwungener Schwingung ist diese durch

$$\frac{d^2 q}{dt^2} + 2\alpha \frac{dq}{dt} + \omega_0^2 q = \frac{F_0}{m_{eff}} \exp i\omega t \quad (2.8)$$

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

$$q(t) = \frac{F_0}{2m_{eff}\omega \sqrt{(\omega_0 - \omega)^2 + \alpha^2}} \cos(\omega t + \varphi) \quad (2.9)$$

mit  $\varphi = \arctan\left(\frac{\alpha\omega}{\omega^2 - \omega_0^2}\right)$  dem Phasenwinkel. Integriert man nun das Quadrat der Fouriertransformierten dieser Lösung:

$$\tilde{q}(\omega)^2 = \frac{A_0^2 \omega_0^4}{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + \left(\frac{\omega\omega_0}{Q}\right)^2} \quad (2.10)$$

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

$$\langle q^2 \rangle = \int_0^\infty d\omega \tilde{q}(\omega)^2. \quad (2.11)$$

Die Parameter  $A_0$ ,  $\omega_0$  und  $Q$  werden durch einen Fit ermittelt. Nun muss man noch beachten, dass die Auslenkung in  $Defl[V]$  gemessen wird, wegen dem Lichtzeigersystem (Abbildung 2.2). Hierfür wird eine Kraft-Distanz-Kurve auf hartem Untergrund (Mica, Gold) aufgenommen und die Steigung im Kontaktbereich bestimmt. Invertiert man diese Steigung, erhält man die so genannte inverse optische Cantileversensitivität (engl: invertical optical lever sensetivity)  $InvOLS[nm/V]$ . Damit kann man nun die Auslenkung in  $Defl[nm]$  umrechnen:

$$Defl[nm] = Defl[V] \cdot InvOLS[nm/V]. \quad (2.12)$$

Somit wird Gleichung 2.7 zu:

$$k = \frac{k_B T}{\langle \delta V^2 \rangle \cdot \chi^2 \cdot InvOLS^2} \quad (2.13)$$

mit  $\chi$  Korrekturfaktor und  $\langle \delta V^2 \rangle$  mittlere quadratische Auslenkung in Volt. Der Korrekturfaktor stellt das Verhältnis zwischen dem *InvOLS*-Wert für frei schwingenden Kraftsensor und dem *InvOLS*-Wert im Kontakt, außerdem hängt er von der Position und Größe des Laserspots ab [39]. Mit diesen Parametern ist nun die auf den Kraftsensor wirkende Kraft zugänglich:

$$F[pN] = Defl[nm] \cdot k \left[ \frac{pN}{nm} \right]. \quad (2.14)$$

Die Ungenauigkeit liegt, wie auch bei allen anderen Methoden, bei 10 - 15% [40, 41].

## 2.2.2 Kinetik, Thermodynamik und Kräfte

Über die Kraftspektroskopie an z.B. Rezeptor-Ligand-Systemen sind zunächst nur die Dissoziationskräfte zugänglich. Wie diese Kräfte mit biochemisch relevanten Reaktionsparametern zusammenhängen, war zu Anfang der Einzelmolekül-Kraftspektroskopie nicht ganz klar. Die vorherrschende Überzeugung war, dass eine definierte Kraft die Stärke einer bestimmten Bindung wiedergebe. Diese Annahme hat sich als falsch erwiesen, denn die gemessenen Abrissereignisse unterliegen einer statistischen Verteilung und diese Verteilung variiert mit der Ziehgeschwindigkeit. Ein entscheidender Betrag zum Verständnis der Zusammenhänge erfolgte 1997 durch Evan Evans und Ken Ritchie [3]. Sie erkannten, dass der Zerfall einer Bindung unter einer äußeren Kraft mit dem thermisch aktivierten Zerfall eines metastabilen Zustands verglichen werden kann und somit mit der **Reaktionsratentheorie** [42–45] beschrieben werden kann.

- **Dissoziation im thermodynamischen Gleichgewicht**

Im Folgenden werden als Beispiel ein Rezeptor  $R$  und ein Ligand  $L$  betrachtet, die mit einer On-Ratenkonstante  $k_{on}^0 \left[ \frac{1}{sM} \right]$  zu einem Rezeptor-Ligand-Komplex  $RL$  assoziieren und mit einer Off-Ratenkonstante  $k_{off}^0 \left[ \frac{1}{s} \right]$  wieder dissoziieren:



Der Kehrwert der Off-Ratenkonstante  $\tau = \frac{1}{k_{off}^0}$  ist die mittlere Lebensdauer der Bindung. Die thermodynamische Beschreibung von biologischen Reaktionen erfolgt bei konstanter Temperatur  $T$  und konstantem Druck  $p$ , durch die freie Enthalpie  $G(T, p) = H - TS$ . In welche Richtung nun eine Rezeptor-Ligand-Reaktion abläuft, wird durch die Differenz der freien Enthalpien von End- und Anfangszustand  $\Delta G$  ausgedrückt:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = G_E - G_A \quad (2.16)$$

mit  $\Delta H$  Reaktionsenthalpie und  $\Delta S$  Entropieänderung im System. Mit der freien Standardenthalpie  $\Delta G^0$  lässt sich  $\Delta G$  schreiben als

$$\Delta G = \Delta G^0 - RT \ln \frac{[R][L]}{[RL]}, \quad (2.17)$$

wobei  $R = 8,314 \frac{J}{Kmol}$  die universelle Gaskonstante,  $[R]$  und  $[L]$  die Konzentration der freien Rezeptoren bzw. Liganden und  $[RL]$  die Konzentration der Rezeptor-Ligand-Komplexe ist. Im thermodynamischen Gleichgewicht gilt  $\Delta G = 0$  und

$$\frac{[R][L]}{[RL]} = \frac{k_{off}^0}{k_{on}^0} = K_D \quad (2.18)$$

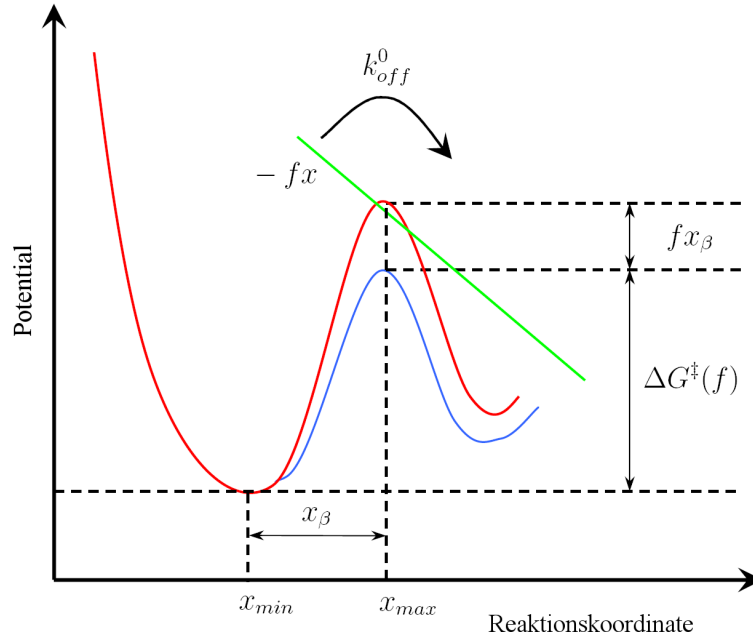
mit  $K_D [M]$  Dissoziationsgleichgewichtskonstante des Komplexes. Somit gilt dann für die freie Standardenthalpie

$$\Delta G^0 = RT \ln K_D. \quad (2.19)$$

Bei Rezeptor-Ligand-Reaktionen läuft die Assoziation spontan ab ( $\Delta G^0 < 0$ ) und für die Dissoziation muss Energie zugeführt werden. Aufgrund thermischer Fluktuationen kann die Dissoziation eines Komplexes als das thermisch aktivierte Überwinden einer endlich hohen Potentialbarriere angesehen werden. Nach Arrhenius [46] ist dann der Zusammenhang zwischen der Höhe der Potentialbarriere  $\Delta G^\ddagger$  und der Off-Ratenkonstante gegeben durch:

$$k_{off}^0 = C \exp \left\{ -\frac{\Delta G^\ddagger}{k_B T} \right\} \quad (2.20)$$

mit dem Proportionalitätsfaktor  $C$ , der von Kramers [44] bestimmt wurde.



**Abbildung 2.6:** Die rote Kurve stellt die frei Dissoziation eines Komplexes dar, der aus einem metastabilen Zustand  $x_{min}$  über die Potentialbarriere  $x_{max}$  in einen freien Zustand bzw. in einen zweiten metastabilen Zustand übergeht, falls vorhanden. In diesem Fall ist die Kinetik und damit die Off-Ratenkonstante  $k_{off}^0$  von der Temperatur und der Höhe der Potentialbarriere abhängig. Die blaue Kurve zeigt den Verlauf des Potentials bei einer wirkenden äußeren Kraft. Die Potentialbarriere wird hier um den Wert  $fx_{\beta}$  abgesenkt.

### • Dissoziation unter einer äußeren Kraft

In kraftspektroskopischen Experimenten wird die Dissoziation von Komplexen durch eine äußere Kraft induziert. Nach Evans und Ritchie [3] sowie Bell [47] wird durch eine konstante mechanische Kraft  $f$  die Höhe der Potentialbarriere verkleinert:

$$\Delta G^{\ddagger}(f) = \Delta G^{\ddagger} - fx_{\beta}, \quad (2.21)$$

wobei  $x_{\beta} = x_{max} - x_{min}$  der Abstand zwischen dem Minimum des metastabilen Zustands und dem Maximum der Potentialbarriere ist (Abbildung 2.6). Mit dieser Annahme folgt für die Gleichung 2.20:

$$k_{off}(f) = k_{off}^0 \exp \left\{ \frac{fx_{\beta}}{k_B T} \right\}. \quad (2.22)$$



Somit erhält man die Off-Ratenkonstante als Funktion einer wirkenden mechanischen Kraft. Nach dem Postulat von Evans und Ritchie entspricht die Dissoziation einem thermisch aktivierten Zerfall eines metastabilen Zustands, infolge dessen kann die Reaktionskinetik beschrieben werden mit:

$$\frac{dp(t)}{dt} = -k_{off}(f(t))p(t), \quad (2.23)$$

wobei  $p(t)$  die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der die Bindung bis zum Zeitpunkt  $t$  überlebt. Dabei wird vorausgesetzt, dass die Dissoziationswahrscheinlichkeit nur von der instantan wirkenden Kraft abhängt und nicht von der Vergangenheit des Systems. Da die Relaxationszeit ( $t \approx 10^{-10} - 10^{-9}$  s) [48, 49] von intramolekularen thermischen Prozessen in das thermodynamische Gleichgewicht sehr viel schneller ist als eine Änderung der angelegten Kraft  $f(t)$  ( $\sim 10^{-4}$  s bis min) [49] und auch die Lebensdauer der Bindung, ist die Voraussetzung erfüllt. Eine zweite wichtige Annahme ist, dass die Kraft  $f(t)$  nicht von der Ziehgeschwindigkeit abhängt, sondern nur von der gesamten Auslenkung  $s = v \cdot t$  aller elastischen Komponenten (Moleküle, Kraftsensor etc.).

$$f(t) = F(v \cdot t) = F(s) \quad (2.24)$$

Bei einer konstanten Ziehgeschwindigkeit  $v$  des Kraftsensors von der Probenoberfläche, ergibt sich dann eine zeitliche Änderung der auf den Komplex wirkenden Kraft:

$$f(t) = k_{eff}v \cdot t = r \cdot t \quad (2.25)$$

mit der effektiven Federkonstante des Systems  $k_{eff}$ , deren Wert sich aus den Federkonstanten des Kraftsensors und der Elastizität des Moleküls zusammensetzt. Der Parameter  $r$  stellt die Belastungsrate (engl: loading rate) dar.

Mit Gleichung 2.23 und Gleichung 2.24 ergibt sich dann für die Wahrscheinlichkeit des Überlebens der Bindung unter einer äußeren Kraft  $f$  mit  $p_v(f(t)) = p(t)$  und  $p(t=0) = p_v(f = f_{min}) = 1$  der Ausdruck:

$$p_v(f) = \exp \left\{ -\frac{1}{v} \int_{f_{min}}^f df' \frac{k_{off}(f')}{F'(F^{-1}(f'))} \right\}, \quad (2.26)$$

wobei  $f_{min}$  der Schwellenwert ist, unter dem die Dissoziationskräfte im Experiment nicht mehr von den thermischen Fluktuationen unterschieden werden können. Außer-

dem muss  $F(s)$  für die Existenz der inversen Funktion  $F^{-1}$  monoton wachsend sein. Nun kann man aus dem Maximum der Verteilung  $-\frac{dp_v(f)}{df}$  mit Gleichung 2.22 auf die wahrscheinlichste Abrisskraft  $F_{max}$  bei einer gegebenen Belastungsrate  $r$  schließen:

$$F_{max} = \frac{k_B T}{x_\beta} \ln \frac{x_\beta r}{k_{off}^0 k_B T}. \quad (2.27)$$

Dieser Zusammenhang zwischen der wahrscheinlichsten Abrisskraft  $F_{max}$  und der Belastungsrate  $r$  bildet die Basis für die dynamische Kraftspektroskopie (engl: Dynamic Force Spectroscopy, DFS). Um die Off-Ratenkonstante zu erhalten, werden Kräfteverteilungen für verschiedene Belastungsraten aufgenommen, indem man die Ziehgeschwindigkeiten über mehrere Größenordnungen variiert. Die erhaltenen Werte der wahrscheinlichsten Abrisskräfte sollten in einer halblogarithmischen Darstellung eine lineare Abhängigkeit von den verschiedenen Belastungsraten zeigen. Die inverse Steigung der erhaltenen Regressionsgeraden ist proportional zu der Reaktionslänge  $x_\beta$  und durch Extrapolation der Regressionsgeraden zum Wert  $F_{max} = 0$  erhält man die Off-Ratenkonstante  $k_{off}^0$ .

# 3 Biologische Grundlagen

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

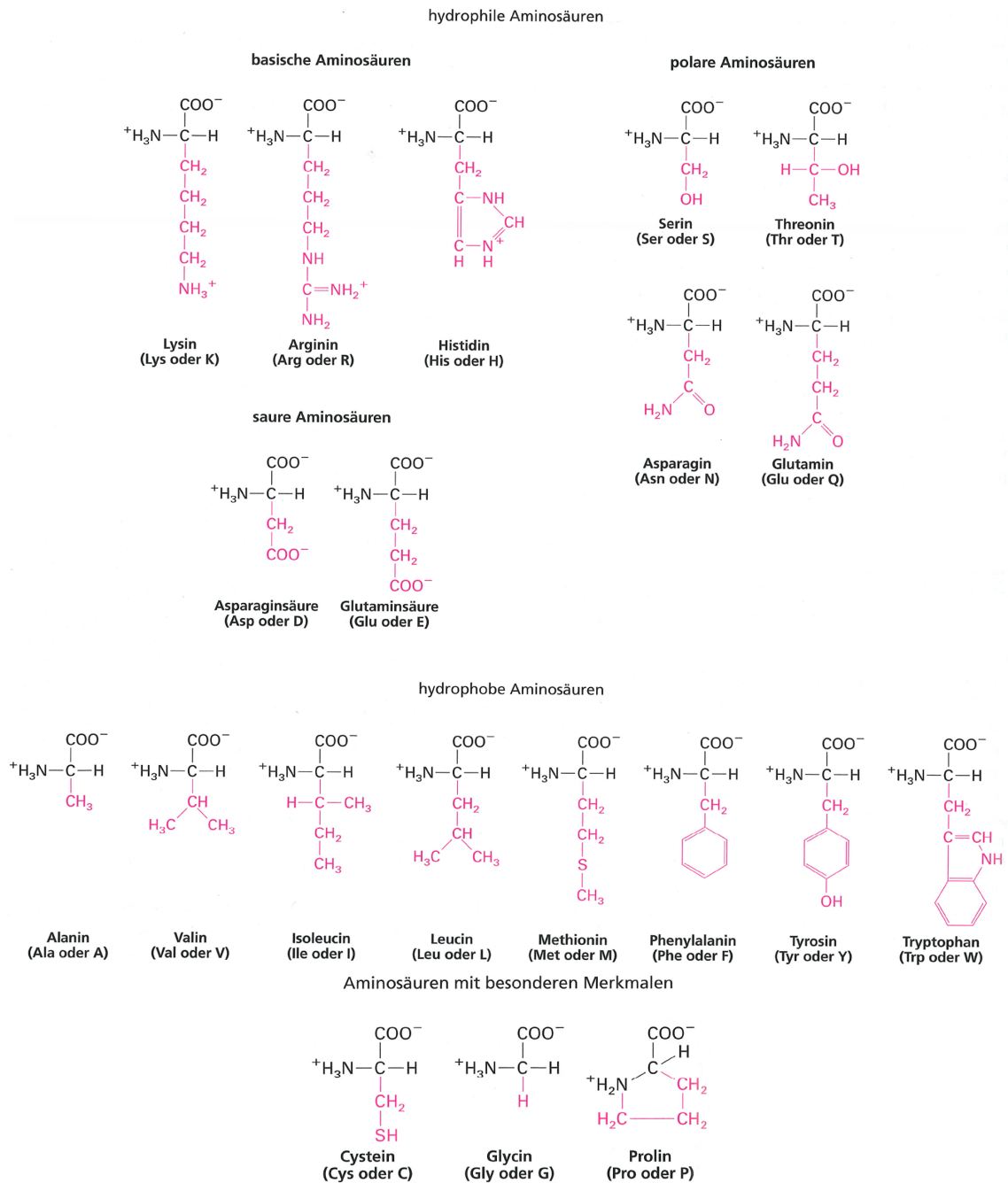
## 3.1 Proteine

Proteine<sup>1</sup> sind polymere Makromoleküle, deren monomere Bausteine die Aminosäuren sind. Dabei werden die Aminosäuren in einer exakt definierten Reihenfolge zu einer linearen, unverzweigten Kette über die so genannte Peptidbindung (Abbildung 3.2) zu Proteinen zusammengesetzt. Es gibt 20 verschiedene proteinogene Aminosäuren, die sich nur in ihren Seitenketten bzw. ihrer Restgruppe (R) unterscheiden. Ansonsten besitzen alle Aminosäuren ein zentrales C-Atom ( $C_\alpha$ ), woran ein H-Atom, eine Carboxylgruppe (-COOH), eine Aminogruppe (-NH<sub>2</sub>) und die individuelle Seitenkette gebunden sind. Die individuelle Seitenkette ist charakteristisch für jede Aminosäure und legt ihre Form, ihre Polarität und ihre chemische Reaktivität fest. Aufgrund der unterschiedlichen Polaritäten der Seitenketten, lassen sich die Aminosäuren in einige definierte Kategorien einteilen (Abbildung 3.1).

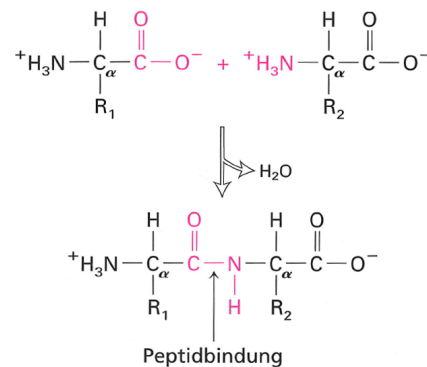
Proteine können nur in der korrekten dreidimensionalen Konformation ihre volle biologische Wirkung entfalten. Die spezifische Form erhalten sie aufgrund nichtkovalenter Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Bereichen der linearen Sequenz (Primärstruktur) der Aminosäuren. Die gesamte dreidimensionale Konformation setzt sich außerdem noch aus der Sekundärstruktur ( $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt), der Tertiärstruktur (dreidimensionale Anordnung alle Aminosäurenreste der Polypeptidkette) und der Quartärstruktur zusammen. Die Quartärstruktur beschreibt die Anzahl (Stöchiometrie) und die räumliche Anordnung von multimeren Proteinen, die aus mehreren Polypeptidketten bestehen. Genaueres dazu findet man z.B. in [50].

---

<sup>1</sup>Eine Kette von 20 bis 30 Aminosäuren wird Peptid genannt, alles darüber hinaus wird als Polypeptid bzw. Protein bezeichnet. Ein Protein kann bis zu 4000 Aminosäuren enthalten.



**Abbildung 3.1:** In dieser Abbildung ist die chemische Struktur der 20 proteinogenen Aminosäuren, unterteilt in drei Gruppen, dargestellt: hydrophile und hydrophobe Aminosäuren sowie drei Aminosäuren mit besonderen Merkmalen. Die Besonderheit von Cystein ist die Fähigkeit Disulfidbrücken auszubilden (kovalente Bindung zwischen Polypeptiden). Glycin ist die kleinste Aminosäure und Prolin kann als einzige Aminosäure eine Ringstruktur mit der Aminogruppe des  $C_\alpha$  ausbilden. Aus [50]



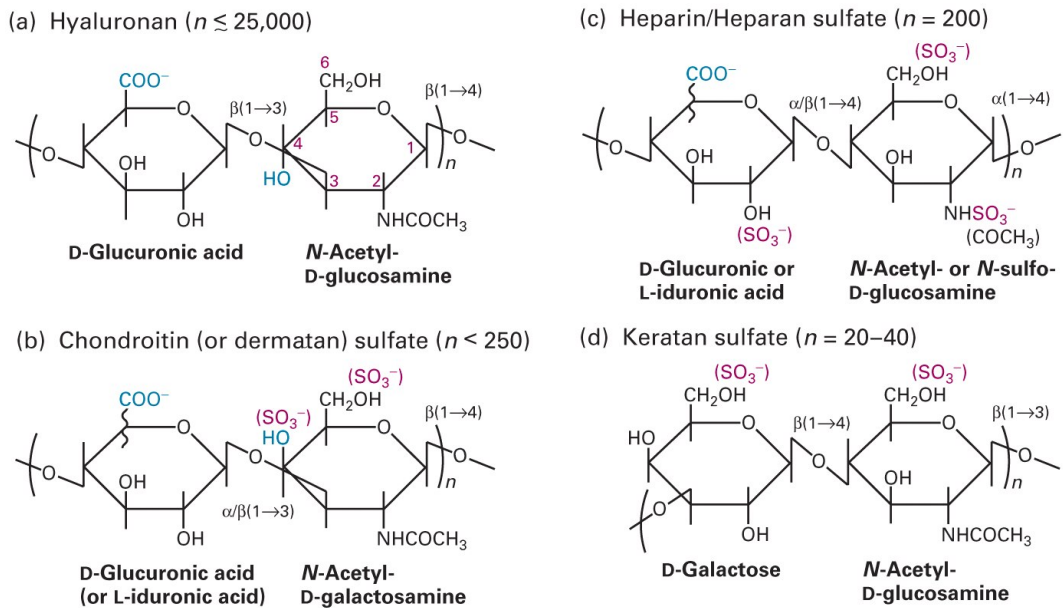
**Abbildung 3.2:** Die Peptidbindung, die zwei benachbarte Aminosäurenreste zu einer Proteinkette verknüpft, bildet eine Kondensation zwischen zwei Aminosäuren. Aus [50]

## 3.2 Proteoglykane

Proteoglykane sind vielfältige Makromoleküle bestehend aus einer oder mehreren bis zu 100 Glykosaminoglykan-Ketten, die kovalent an ein Kernprotein gebunden sind [51]. Sie kommen in der extrazellulären Matrix und auf der Oberfläche vieler Zellen vor. Die Glykosaminoglykane sind lange, repetitive, unverzweigte Polymere bestimmter Disaccharide. Die Struktur ist meist durch die Disaccharide einer der beiden Uronsäuren D-Glucuronsäure und L-Iduronsäure oder auch aus N-Acetylglycosamin oder N-Acetylgalactosamin gegeben. Die Verknüpfung der Glykosaminoglykane mit dem Kernprotein erfolgt im Golgi-Apparat. Dort reagiert ein definiertes Verbindungstrisaccharid mit Serinseitenketten, das als „Keim“ für die schrittweise enzymatische Polymerisation der Glykosaminoglykane dient. In Abbildung 3.3 sind die vier Hauptgruppen der Glykosaminoglykane dargestellt: Hyaluronan, Chondroitinsulfat/Dermatansulfat, Heparin/Heparansulfat und Keratansulfat. Die Glykosaminoglykane sind negativ geladen, weil mindestens einer der beiden Zuckerreste eine Sulfatgruppe enthält. Für die relativen Molmassen und für die Ladungsverteilung von Proteoglykanen können nur Mittelwerte angegeben werden, da in einer Matrix verschiedene Kernproteine vorkommen, an die eine unterschiedliche Zahl von Glykosaminoglykanen mit variabler Länge und Zusammensetzung gebunden sein können.

Es existieren zwei Gruppen von Proteoglykanen die SLRP (small-leucine-rich-proteoglycans) und die modularen Proteoglykane. Die SLRP sind kompakte Proteine, die sich aus kurzen, wiederholenden Einheiten zusammensetzen, in denen die Position der Leucinres-

te konserviert ist. Die modularen Proteoglykane sind große aus verschiedenen Bausteinen bzw. Modulen zusammengesetzte Proteoglykane, die aus zwei Subfamilien bestehen, den Hyaluronan<sup>2</sup> und Lektin bindenden Proteoglykanen (Aggrecan, Brevikan, Neurokan und Versikan) und den nicht Hyaluronan bindenden Proteoglykanen (Perlekan, Agrin und Testikan) [52].



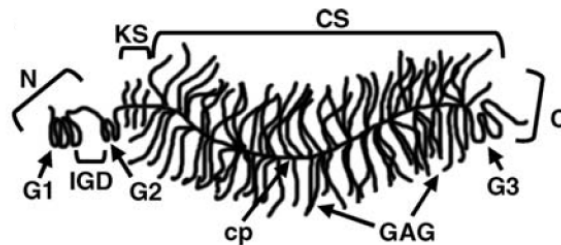
**Abbildung 3.3:** Strukturformeln einiger Glykosaminoglykane, die den Polysaccharidanteil von Proteoglykanen bilden. Alle Glykosaminoglykane entstehen durch Polymerisation spezifischer Disaccharide. ( $n$ ) ist die charakteristische Anzahl der involvierten Disaccharide. Aus [50]

Die Proteoglykane haben vielfältige Funktionen in der extrazellulären Matrix und bestimmen durch ihr Wasserbindungsvermögen ganz wesentlich die biomechanischen Eigenschaften. Zum Beispiel wirken sie in den Basalmembranen als biologische Filter und haben zellbindende und zellabstoßende Aufgaben. Sie dienen auch als Corezeptoren für zahlreiche Wachstumsfaktoren und andere Hormone. Diese Vielfalt der Funktionen macht die Proteoglykane sehr interessant für die Forschung. Als Paradebeispiel dient das Aggrecan, da die Zusammensetzung relativ gut bekannt ist [53, 54] und es kommerziell erhältlich ist.

<sup>2</sup>Hyaluronan ist ein lineares Polysaccharid in der extrazellulären Matrix, das ebenfalls aus Disaccharideinheiten (*N*-Acetylglucosamin und *D*-Glucuronsäure) besteht und an das keine Sulfatreste oder Proteine gebunden sind.

### 3.2.1 Aggrecan

Das Aggrecan ist ein wichtiges, strukturgebendes Proteoglykan aus der extrazellulären Matrix von Knorpeln. Es ist ein modulares Proteoglykan mit mannigfaltigen funktionellen Domänen, dessen Struktur stark an eine Flaschenbürste erinnert (Abbildung 3.4). Zusammengesetzt ist es aus einem Kernprotein vom etwa 300 kDa mit drei globulären Regionen [54], die als G1, G2, und G3 bezeichnet werden. Jede von diesen Domänen besitzt Cystein Reste, die die Disulfid-Bindungen hervorrufen [55]. Die G1 und G2 Regionen sind durch eine kurze interglobuläre Domäne (IGD) getrennt. Zwischen den G2 und G3 Domänen liegt eine große Region, an die Glykosaminoglykane (GAG), etwa 100 Chondroitinsulfat-Ketten (CS) und bei manchen Spezies auch Keratansulfat-Ketten (KS), gebunden sind.



**Abbildung 3.4:** Graphische Darstellung des Aggrecans mit N, Amin-Terminus; G1, G2, G3, globuläre Domänen; IGD, interglobuläre Domäne zwischen G1 und G2; cp, Kernprotein (engl: core protein); KS, Keratansulfat Region; CS, Chondroitinsulfat Region; GAG, Glykosaminoglykan-Ketten; C, Carboxyl-Terminus. Aus [56]

Das Aggrecan gehört zu der Familie von Hyaluronan und Lektin bindenden Proteoglykanen auch Hyalektane genannt. Durch nichtkovalente Assoziation mit dem Hyaluronan über den Amin-Terminus an G1 und einem etwa 45 kDa schweren Link-Glykoprotein<sup>3</sup> [57] bildet es Aggregate von >200 MDa. Im Knorpel formen diese Aggregate ein dicht gepacktes, hydratisiertes Gel, das durch Kollagen-Fasern verstärkt wird. Durch die starke negative Ladung der GAG wirken elektrostatische Repulsionskräfte, die für mehr als 50% des Gleichgewichts-Kompressionsmoduls vom Knorpel verantwortlich sind [58]. Die Struktur des Aggrecans kann leicht variieren und ist abhängig vom Alter, Krankheit und Spezies. Die Variation macht sich in der Länge und der Anzahl der Glykosaminoglykan-Ketten bemerkbar [59].

<sup>3</sup>Verbindungsprotein

### 3.3 Aggregationsfaktoren

Die Aggregationsfaktoren (AF) bestehen hauptsächlich aus Proteinen und Glykanen, wobei der Anteil an Proteinen sich von 40 bis 74% erstreckt [60]. Aufgrund ihrer Zusammensetzung und Struktur wurden sie als proteoglykanähnliche Moleküle eingestuft. Man findet diese Proteoglykane in der extrazellulären Matrix von Meeresschwämmen. Sie sind dort maßgeblich für die spezies-spezifische Aggregation der Schwammzellen verantwortlich und wurden in etlichen Meeresschwämmen nachgewiesen [61, 62]. Diese Zell-Aggregation der Meeresschwämme ist abhängig von der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von etwa 10 mM. Ähnliche Konzentrationen findet man auch im Meerwasser.

Die spezies-spezifische  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Zell-Aggregation wurde bereits 1907 von Wilson [63] beobachtet. Er dissoziierte die Schwammzellen mechanisch, indem er sie durch ein feines Tuch presste. Die Zellen setzten sich ab und fingen an sich zu bewegen. Kamen die Zellen in Kontakt mit einander, so bildeten sie zunächst größere Aggregate und reorganisierten sich bis hin zu kleinen funktionsfähigen Schwämmen [64]. Wenn Zellen von verschiedenen Arten dissoziiert und vermischt wurden, so haben nur die Zellen gleicher Art aggregiert. Im Gegensatz dazu fand dieser Prozess ohne  $\text{Ca}^{2+}$  nicht mehr statt bzw. es wurden nur lediglich kleine Klumpen gebildet [62].

Um zu zeigen, dass die AF die spezies-spezifische Zelladhäsion bewirken, wurden zellfreie Systeme untersucht. Man reinigte AF von drei verschiedenen Schwammarten auf und koppelte sie mit farbigen bzw. fluoreszierenden Kügelchen, um das Verhalten in Lösung besser zu beobachten. Auch hier aggregierten AF von gleicher Art  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig [65]. Dies hat gezeigt, dass diese Proteoglykane eine zentrale Rolle in der spezies-spezifischen Zelladhäsion einnehmen.

Als verlässlich und relativ einfach erweist sich die Aufreinigung der AF aus *Microciona prolifera*, dessen AF auch in dieser Arbeit verwendet werden.

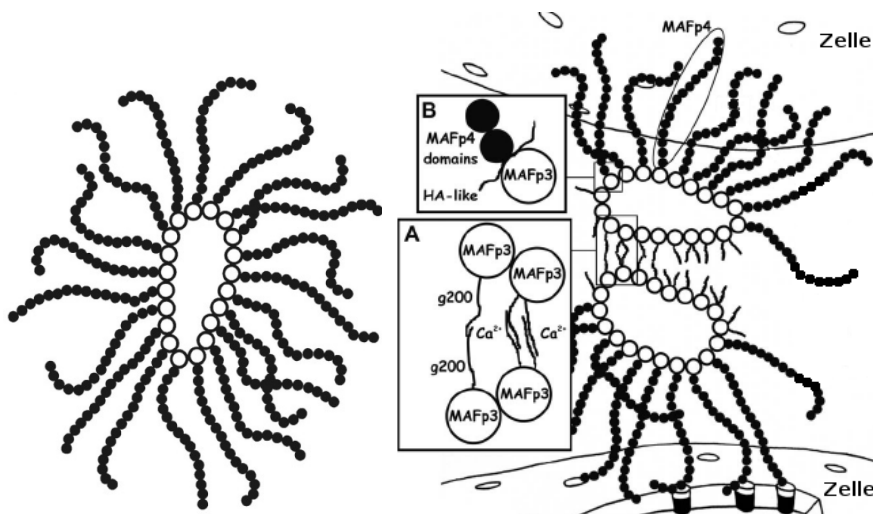
#### 3.3.1 Aggregationsfaktor aus dem Meeresschwamm *Microciona prolifera*

Der *Microciona* Aggregationsfaktor (MAF) wird aus dem Meeresschwamm *Microciona prolifera* extrahiert [61]. Dieses Proteoglykan ist ein riesiges Makromolekül mit einer Molmasse von  $2 \times 10^7$  Da. Demzufolge ist es nicht kristallisierbar und man hat keine



Kenntnis über die atomaren Strukturen von diesem Proteoglykan.

Der Aggregationsfaktor ist für die spezies-spezifische Zelladhäsion zuständig, welche von einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen und einer  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Wechselwirkung induziert wird. Der MAF bindet über ein kleines 6 kDa Glykan (g6) [66] an die Zellmembran-Rezeptoren  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig und interagiert mit anderen MAF über ein 200 kDa Glykan (g200) [67]  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig. Die Struktur ist „sonnenartig“ (Abbildung 3.5) und besteht aus einem Ring mit etwa 20 globulären Einheiten und daran nicht kovalent gebundenen Armen. Der Ring fungiert als Rückgrat, dessen globulären Einheiten jeweils einem 30-50 kDa Protein MAFp3 entsprechen, die ein oder zwei g200 tragen. Die Arme werden auch aus globulären Einheiten, die dem Protein MAFp4 mit ca. 400 kDa entsprechen, zusammengesetzt und enthalten g6 Moleküle. Neben den MAFp3 und MAFp4 wurden noch zwei andere Glykoproteine identifiziert [68]. Außerdem konnte noch gezeigt werden, dass bei der Entfernung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Lösung die MAF in mindestens 11 verschiedene Untereinheiten dissoziieren [69].



**Abbildung 3.5:** Links graphische Darstellung des MAF und rechts das Modell der MAF vermittelten Schwamm-Zellen-Adhäsion mit A:  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Interaktion zwischen MAFp3 über die g200; und B: MAFp3 und MAFp4 interagieren mit einander über ein Hyaluronan ähnliches Molekül. Aus [70]

Die häufigsten vorkommenden Saccharide in der Komposition des MAF sind Fucose, D-Glucuronsäure, Mannose, Galactose und N-Acetylglycosamin [71, 72]. Der Aufbau der beiden wichtigen Glykane g6 und g200 ist trotzdem recht unbekannt. Mittlerweile ist es gelungen einige Strukturen zu identifizieren, wie ein pyruviliertes Trisaccharid [73], das

sowohl im g200 wie auch im g6 enthalten ist, und ein sulfatisiertes Disaccharid, das nur im g200 vorkommt [74]. Obwohl die MAF D-Glucuronsäure und *N*-Acetylglycosamin enthalten, scheinen sie keine der Hauptgruppen der Glykosaminoglykane von höheren Lebewesen zu repräsentieren [67]. Aber man fand über verschiedene Experimente heraus, dass Hyaluronan eine wichtige Rolle bei der Schwamm-Zell-Adhäsion spielt [75, 76]. Jedoch konnte man keine hyaluronanähnlichen Polysaccharide in den MAF nachweisen [75]. Man geht deshalb von der Existenz eines neuartigen Glykosaminoglykans aus, welches dem Hyaluronan sehr ähnlich sein soll, dessen Art aber noch nicht bekannt ist. Das einzige bisher bekannte gemeinsame Glykosaminoglykan von Schwämmen und höheren Lebewesen ist Chondroitin-4-Sulfat<sup>4</sup> [77]. Hyaluronan, Chondroitin-6-Sulfat/Dermatansulfat, Heparin/Heparansulfat und Keratansulfat sind bis jetzt noch nicht in Schwämmen gefunden worden.

---

<sup>4</sup>Chondroitin-4-Sulfat hat die Sulfatgruppe vorwiegend am Kohlenstoffatom 4 des *N*-Acetylgalactosamins (Abbildung 3.3).

# 4 Materialien und Methoden

In diesem Kapitel werden die verwendeten Materialien und Geräte sowie die angewendeten Präparationsschritte für die Rasterkraftmikroskopie und Kraftspektroskopie genannt.

## 4.1 Biologische Systeme

In dieser Arbeit werden die Proteoglykane Aggrecan (Sigma-Aldrich, München, Germany) aus dem bovinen artikulären Knorpel und MAF (Institute for Bioengineering of Catalonia, Parc Scientific Barcelona, Spain) aus dem Schwamm *Microciona prolifera* untersucht.

- **Isolierung der MAF:** Die Schwammzellen des Schwammes *Microciona prolifera* sind vom Department of the Marine Biological Laboratory (Woods Hole, Massachusetts, USA) gesammelt worden und von Prof. Dr. Xavier Fernández-Busquets (Universität Barcelona) zur Verfügung gestellt. Die Microciona Aggregationfaktoren sind dann nach dem in [61, 71] beschriebenen Verfahren isoliert worden.
- **Isolierung der Aggrecane:** Die Aggrecane sind aus dem artikulären Knorpel extrahiert worden, chromatographisch aufgereinigt, entwässert und vor der Gefriertrocknung sterilgefiltert. Die lyophilisierten Aggrecane sind im Wesentlichen salzfrei. Die Aggrecane sind von Prof. Dr. Thomas Dierks (Universität Bielefeld) zur Verfügung gestellt worden.

## 4.2 Rasterkraftmikroskopie

### 4.2.1 Instrument

Alle in dieser Arbeit präsentierten AFM-Bilder werden mit einem Nanoscope IIIa Multimode (Digital Instruments, Santa Barbara, USA) im Tapping<sup>TM</sup> Modus an Luft aufgenommen. Für das Abbilden wird sowohl ein J-Scanner (Scanbereich 115  $\mu\text{m}$ ) wie auch ein E-Scanner (Scanbereich 15,6  $\mu\text{m}$ ) verwendet. Beide Scanner werden regelmäßig (alle drei Monate) mit der Funktion *Capture Calibration* aus der Standard-Software (Version 5.30r3.sr3) kalibriert.

### 4.2.2 Kraftsensoren

Für die Aufnahmen im Tapping<sup>TM</sup> Modus werden monolithische Kraftsensoren Tap300AI aus Silizium (NanoAndMore GmbH, Wetzlar, Germany) verwendet. Diese Kraftsensoren besitzen auf der Rückseite eine 30 nm dicke Aluminium Reflexbeschichtung für bessere Signaldetektion und eine pyramidenförmige Spitze. Die Resonanzfrequenz liegt bei 300  $\pm$  100 kHz und der Spitzenradius ist  $<$  10 nm. Sonstige wichtige Angaben des Herstellers sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Budget Sensors	Typische Werte	Schwankung
Federkonstante	40 N/m	20 - 75 N/m
Länge	125 $\mu\text{m}$	$\pm$ 10 $\mu\text{m}$
Breite	30 $\mu\text{m}$	$\pm$ 5 $\mu\text{m}$
Dicke	4 $\mu\text{m}$	$\pm$ 1 $\mu\text{m}$
Spitzenhöhe	15 $\mu\text{m}$	$\pm$ 5 $\mu\text{m}$

**Tabelle 4.1:** Angaben des Herstellers über die Geometrie und Federkonstante für die Budget Sensors.

### 4.2.3 Substrate

Für die hochauflösende Rasterkraftmikroskopie wird Glimmer<sup>1</sup>(Plano GmbH, Wetzlar, Germany) als Substrat verwendet. Dieses Material besteht aus vielen dünnen kristallinen ( $KAl_2(OH)_2(AlSi_3O_{10})$ ) Schichten, die sich leicht mit einem Klebestreifen von einander

---

<sup>1</sup>auch Muskovit oder Mica genannt

trennen lassen. Der gespaltene Glimmer bietet eine saubere und atomar flache Oberfläche von einigen  $\mu\text{m}^2$ , die negativ geladen und hydrophil ist. Solche Eigenschaften sind wichtig für hochauflösende Bilder.

#### 4.2.4 Chemikalien

Für die Rasterkraftmikroskopie werden für die Präparation folgende Chemikalien verwendet:

Name	Hersteller und Herkunft
Aceton p.A.	AnalaR NOMAPUR, Chemikalienlager
Ethanol p.A.	AnalaR NOMAPUR, Chemikalienlager
3-Aminopropyl-triethoxysilan <sup>2</sup> $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich, München, Germany
MilliQ-Wasser 18,2M $\Omega$ /cm	Millipore, Eschborn, Germany

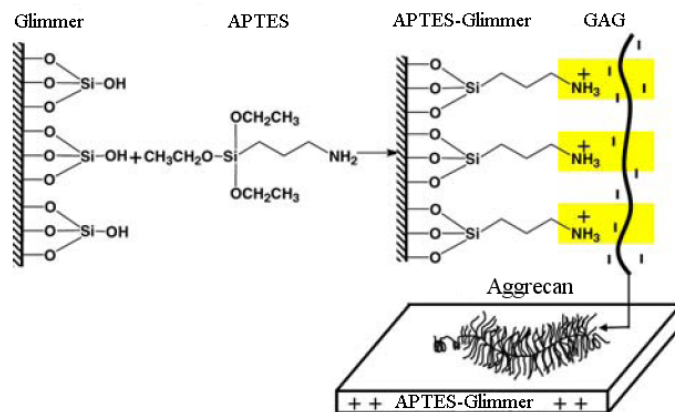
**Tabelle 4.2:** *Verwendete Chemikalien für die rasterkraftmikroskopischen Experimente.*

#### 4.2.5 Probenpräparation

- APTES-Glimmer:** Als erstes werden alle benötigten Materialien wie Pinzette, Bechergläser und Tischoberfläche penibel mit Aceton und Ethanol gereinigt. Für die Probenpräparation werden zunächst einige Glimmerplättchen (1 x 1 cm) zugeschnitten und gespalten, um eine saubere und glatte Oberfläche zu erhalten. Wegen der negativen Sulfat-Gruppen sowohl bei den Aggrecanen [78] als auch bei den MAF [74], bietet es sich an, die Glimmeroberfläche mit positiven Gruppen zu modifizieren. Dieses erreicht man mit APTES, indem man die Glimmerplättchen und ein Gefäß mit ca. 100  $\mu\text{l}$  APTES in einem Exsikkator platziert. Der Exsikkator wird 30 min lang evakuiert und dann 30 min bei einem Druck von 0,3 mbar stehen gelassen, damit das APTES mit der Glimmeroberfläche reagieren kann. Als nächstes wird der Exsikkator vorsichtig belüftet und man erhält glatte, positiv geladene Oberflächen. Auf diese funktionalisierten Glimmerplättchen (APTES-Glimmer) werden dann 20  $\mu\text{l}$  MAF-Lösung (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) bzw. Aggrecan-Lösung (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) gegeben und 15 min inkubiert. Danach werden die Glimmerplättchen gründlich mit MilliQ-Wasser aus der Spritzflasche gespült, mit Stickstoff trocken geblasen und abgerastert.

<sup>2</sup>Desweiteren wird die Abkürzung APTES verwendet.

- **Glimmer:** Die Probenpräparation kann auch direkt auf den gespaltenen Glimmerplättchen erfolgen. Bei den Aggrecanen werden 5  $\mu\text{l}$  Aggrecan-Lösung (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) auf den Glimmer gegeben und etwa 30 min eingetrocknet, dann vorsichtig mit MilliQ-Wasser gespült und mit Stickstoff trocken geblasen. Bei den MAF wird auf Glimmer eine MAF-Lösung von 0,1 mg/ml benutzt, ansonsten läuft die Probenpräparation wie auf APTES-Glimmer ab.



**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung der Funktionalisierung am Beispiel des Aggrecans auf APTES-Glimmer. Für die MAF gilt es analog. Aus [56]

#### 4.2.6 Abbildungsparameter

Für alle rasterkraftmikroskopischen Abbildungen wird der Tapping<sup>TM</sup> Modus benutzt, wobei als Regelung das Amplitudensignal dient. Vor Beginn der Messung wird der Offset des AFM auf Null gesetzt, ein geeigneter Scanbereich (1-5  $\mu\text{m}$ ) eingestellt und eine Scanrate von 0,9 Hz gewählt. Nach dem Annähern werden die möglichst besten Parameter (integral gain und proportional gain) für die Regelung eingestellt, indem man die Hin- und Rückspur vergleicht und in Einklang bringt. Diese Einstellungen erfolgen individuell für die jeweilige Probe.

#### 4.2.7 Auswertung der AFM-Bilder

Die aufgenommenen AFM-Bilder werden mit der Standard-Software (Version 5.30r3.sr3) des Nanoscope IIIa Multimode bearbeitet. Zunächst werden die Bilder durch einen Planefit erster bzw. zweiter Ordnung korrigiert. Falls defekte Scanlinien in den Bildern

vorhanden sind, werden sie einzeln mit der Option erase scan line entfernt.

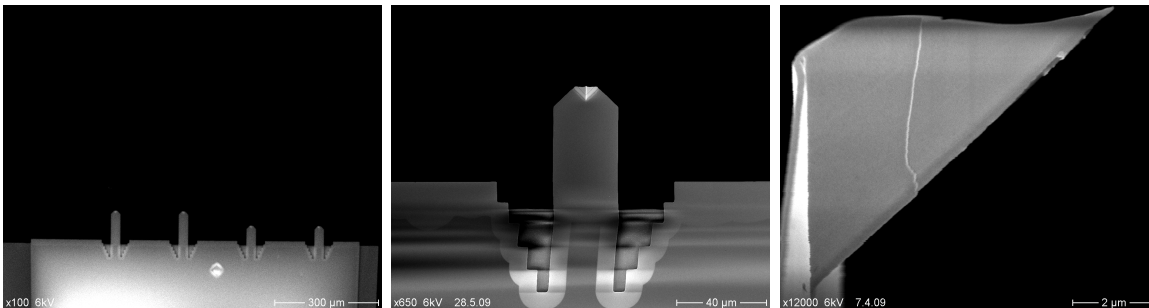
Die Datenauswertung für die Dimensionen der Biomoleküle erfolgt mittels des Programms Scanning Probe Image Processor 4.6.0 und für die Bildausgabe in .png wird die Open Source SPM-Software Gwyddion 2.14 benutzt.

## 4.3 Kraftspektroskopie

### 4.3.1 Instrument

Die kraftspektroskopischen Messungen erfolgen mit einem MFP-3D-BIO<sup>TM3</sup> (Asylum Research, Santa Barbara, USA). Die Besonderheit an diesem Gerät ist die maximale Extensionslänge von 35  $\mu\text{m}$  des Z-Piezos. Das ermöglicht kraftspektroskopische Untersuchungen von großen Molekülen, wie z.B. Zellen. Die Steuerung, sowie Datenaufnahme und Kalibration der Kraftsensoren erfolgt über die Standard-Software von Asylum Research, basierend auf Igor Pro 6.04 Wavemetrics.

### 4.3.2 Kraftsensoren



**Abbildung 4.2:** Rasterelektronenmikroskopische Bilder eines Biolevers; Links die Ansicht der vier Kraftsensoren von unten; In der Mitte die Ansicht eines kurzen Kraftsensors von unten vergrößert; Rechts ist die Spitzengeometrie von der Seite dargestellt.

Für die kraftspektroskopischen Messungen werden die Biolever BL-RC150VB (Olympus, Tokyo, Japan) als Kraftsensoren verwendet. Der Biolever-Chip<sup>4</sup> besitzt vier Kraft-

<sup>3</sup>Das MFP-3D-BIO<sup>TM</sup> ist ein vollwertiges AFM, jedoch erweist sich das Abbilden von sehr flachen Strukturen (0,6 nm) mit dem Multimode als stabiler.

<sup>4</sup>Der Chip ist das Substrat an dem die Kraftsensoren befestigt sind.

sensoren, zwei kurze sehr rauscharme und zwei lange mit einer sehr kleinen Federkonstante. Diese Kraftsensoren aus  $Si_3N_4$  haben eine rechteckige Form und sind beidseitig mit Gold beschichtet. Die Spitze ist V-förmig mit einer einzigartigen Geometrie, bestehend aus einer hohlen dünnwandigen Pyramide, die unter  $45^\circ$  an dem Kraftsensor befestigt ist. Diese Geometrie ermöglicht eine genauere Positionierung der Spitze mit Hilfe eines Lichtmikroskops.

<b>Biolever</b>	Kurzer Kraftsensor	Langer Kraftsensor
Federkonstante	0,03 N/m	0,006 N/m
Resonanzfrequenz	37 kHz	13 kHz
Länge	60 $\mu\text{m}$	100 $\mu\text{m}$
Breite	30 $\mu\text{m}$	30 $\mu\text{m}$
Dicke	180 nm	180 nm
Spitzenhöhe	7 $\mu\text{m}$	7 $\mu\text{m}$
Spitzenradius	30 nm	30 nm

**Tabelle 4.3:** Angaben des Herstellers über die Geometrie und mechanische Eigenschaften für die Biolever. Für die kraftspektroskopischen Experimente in dieser Arbeit wird der kurze Kraftsensor verwendet.

### 4.3.3 Substrate

- **Gold:** Als Substrate für die kraftspektroskopischen Experimente dienen selbst hergestellte TSG (Template Stripped Gold) nach [79]. Hierbei wird zunächst ein großes Stück (5 x 5,5 cm) Glimmer gespalten und mit der sauberen Seite nach oben in eine Vorrichtung eingespannt. Diese Vorrichtung wird in einer Hochvakuum-Kleinbeschichtungsanlage MED 020 (Vakuumtechnik Wetzlar GmbH, Asslar, Germany) platziert und bei einem Druck von etwa  $2 \times 10^{-5}$  mbar 20 h bei  $300^\circ\text{C}$  geheizt. Danach werden 200 nm Gold über eine Maske mit definierten Flächen von  $1 \text{ cm}^2$  auf die Glimmeroberfläche gedampft. Auf diese Goldflächen auf dem Glimmer werden dann Glasplättchen von 8 x 8 mm (Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany) mit einem Epoxydharz EPO-TEK<sup>®</sup> 377 (Polytec PT GmbH, Waldbronn, Germany) geklebt. Die Glasplättchen werden vorher im Aceton-Ultraschallbad gründlich gereinigt. Durch das Abziehen der Glasplättchen erhält man sehr große und glatte Goldoberflächen mit Rauigkeiten von 2 Å.



- **Plasmaoxidierte Glasoberfläche:** Für diesen Zweck werden die gleichen 8 x 8 mm Glasplättchen verwendet. Und zwar werden diese, nach einer gründlichen Reinigung in Aceton- und Ethanol-Ultraschallbad, mit MilliQ-Wasser gespült und mit Stickstoff trocken geblasen. Es folgt dann eine 10 s lange Behandlung dieser Glasplättchen im Sauerstoffplasma bei einem Druck von  $8 \times 10^{-2}$  mbar. Dazu wird eine selbstgebaute Sauerstoffplasmaanlage in Anlehnung an [80] benutzt. Die Plasmaoxidierung der Glasplättchen bewirkt eine Hydrophilisierung der Glasoberfläche, so dass die Anzahl der Silanolgruppen (SiOH) und SiO<sup>-</sup> auf der Oberfläche erhöht wird und man eine Netto negative Oberflächenladung bekommt [81, 82].

#### 4.3.4 Chemikalien

Neben den schon genannten Chemikalien im Abschnitt 4.2.4 werden für die Kraftspektroskopie zusätzlich folgende selbst hergestellte Puffer und Salzlösungen für die jeweiligen Systeme verwendet:

- Für die **MAF** wird ein CMF<sup>5</sup>-Puffer nach MBL (Marine Biological Laboratory) verwendet mit 461,85 mM NaCl, 10,73 mM KCl, 7,04 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, der mit 20 mM Tris auf pH=7,4 gepuffert wird. Um die MAF zu lagern, wird dieser Puffer noch zusätzlich mit 2 mM Ca<sup>2+</sup> versetzt. Für die kraftspektroskopische Messungen wird ein CMF-Puffer mit 10 mM Ca<sup>2+</sup> verwendet.
- Die **Aggrethane** werden in MilliQ-Wasser gelagert. Für die kraftspektroskopischen Experimente wird eine 100 mM NaCl Lösung mit pH=5,6 und eine 100 mM NaCl + 10 mM Ca<sup>2+</sup> Lösung mit pH=5,6 verwendet. Zusätzlich wird noch eine 100 mM NaCl + 15 mM EDTA<sup>6</sup> Lösung benutzt, die mit 20 mM Tris auf pH=5,6 gepuffert wird und eine 100 mM NaCl + 10 mM Mg<sup>2+</sup> Lösung mit pH=5,6, um die Calcium-Abhängigkeit bzw. Calcium-Selektivität zu zeigen.

#### 4.3.5 Funktionalisierung

Für die Funktionalisierung werden mit Gold beschichtete Kraftsensoren und Substrate benutzt, da sowohl die Aggregationsfaktoren [60, 68] wie auch die Aggrethane [78] Cystein-Reste besitzen, die über die Thiol-Gruppe mit dem Gold kovalent wechselwirken.

<sup>5</sup>CMF = Calcium-Magnesium-freies Meerwasser

<sup>6</sup>Ethylendiamintetraacetat (Chemikalienlager, Uni-Bielefeld)

Vor der Funktionalisierung werden alle benutzten Instrumente mit den Lösungsmitteln Aceton, Ethanol im Ultraschallbad gereinigt, dann mit MilliQ-Wasser gespült und mit Stickstoff trockengeblasen.

- **Immobilisierung der Proteoglykane auf dem Kraftsensor:** Für diese Prozedur werden drei Bechergläser mit Aceton, Ethanol und MilliQ-Wasser gefüllt, um die Kraftsensoren zu reinigen. Dies geschieht, indem die Kraftsensoren mit einer Pinzette jeweils in die Flüssigkeiten für 20 s gehalten werden. Danach werden sie auf ein Kraftsensorhalter<sup>7</sup> aus Teflon für 15 min abgelegt, um abzutrocknen. Als nächstes werden die Furchen des Kraftsensorhalters mit 60  $\mu$ l Molekül-Lösung (MAF: 0,1 mg/ml; Aggrecan: 0,3 mg/ml) gefüllt und dort die Kraftsensoren vorsichtig mit einer Pinzette platziert. Nach 60 min Inkubationszeit werden die Kraftsensoren mit dem jeweiligen Puffer (Abschnitt 4.3.4) gespült und in dem jeweiligen Puffer im Kraftsensorhalter bei 4°C gelagert. Diese Kraftsensoren können mindestens 96 h für die kraftspektroskopischen Experimente verwenden werden.
- **Immobilisierung der Proteoglykane auf dem Goldsubstrat:** Die auf den mit Gold bedampften Glimmer geklebten Glasplättchen (Abschnitt 4.3.3) werden mit einer Pinzette abgezogen und auf Gummiringe<sup>8</sup> mit der Goldoberfläche nach oben gelegt. Als nächstes werden 20  $\mu$ l Molekül-Lösung (MAF: 0,1 mg/ml; Aggrecan: 0,3 mg/ml) auf das Substrat gegeben und 60 min lang inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden die Substrate mit dem Molekül abhängigen Puffer (Abschnitt 4.3.4) gründlich gespült und bei 4°C im zugehörigen Puffer gelagert. Auch die Substrate können mindestens 96 h lang für die kraftspektroskopischen Experimente genutzt werden.

### 4.3.6 Kraftspektroskopische Parameter

Im Folgenden werden die relevanten Parameter für die kraftspektroskopischen Messungen genannt:

- *force distance*: Gibt die Länge der Kraft-Distanz-Kurve an bzw. die Strecke, die der Z-Piezo, während eines Kraft-Distanz-Zyklus zurück legt.

---

<sup>7</sup>Der Kraftsensorhalter ist in der M-Werkstatt der Universität Bielefeld angefertigt worden.

<sup>8</sup>Die Gummiringe dienen als rutschfeste Unterlage, damit die Substrate beim Transport nicht auf die funktionalisierte Oberfläche fallen.

- *approach velocity*: Ist die Geschwindigkeit mit der sich der Kraftsensor der Probenoberfläche annähert.
- *retract velocity*: Ist die Rückziehggeschwindigkeit des Kraftsensors.
- *dwell time*: Die Dauer der Kontaktzeit zwischen Kraftsensor und Probenoberfläche.
- *trigger point*: Ist die maximale Kraft, die der Kraftsensor auf die Probenoberfläche ausübt.

In Tabelle 4.4 sind die benutzten Parameter für die kraftspektroskopischen Experimente in dieser Arbeit aufgelistet.

Parameter	Wert
force distance	0,2-1,5 $\mu\text{m}$
approach velocity	3000 nm/s
retract velocity	100-5000 nm/s
trigger point	400 pN
dwell time	1 s
Anzahl Kurven	1000-2000
Temperatur	293 K

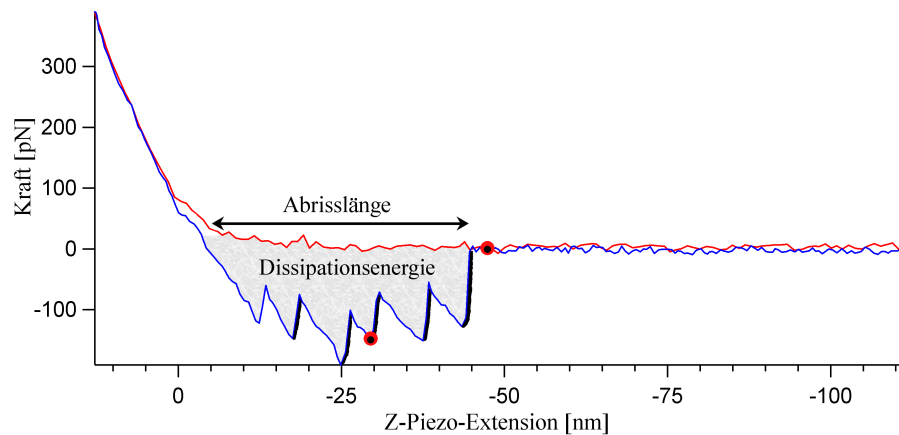
**Tabelle 4.4:** Die verwendeten Parameter für die Kraftspektroskopie.

### 4.3.7 Auswertung der Kraft-Distanz-Kurven

Die Analyse der erhaltenen Kraft-Distanz-Kurven erfolgt teilweise mit einer auf Matlab 7.3.0 (The Mathworks, Inc.) basierenden Software, die in enger Zusammenarbeit mit Lennart Ochel (Fachhochschule Bielefeld) entwickelt wurde. Im folgenden wird die Arbeitsweise des Algorithmus kurz erläutert:

- Der Algorithmus verarbeitet zunächst eine von der Igor-Software ausgegebene *ibw*-Datei (Kraft-Distanz-Kurve). Dabei wird für jeden Messpunkt der Kraft-Distanz-Kurve die Z-Piezo-Position in [m] und die Kraftsensorauslenkung (deflection) in [m] eingelesen, sowie die mit der Igor-Software bestimmte Federkonstante in [pN/nm]. Nach einer Umrechnung der Z-Piezo-Position und der Kraftsensorauslenkung in [nm], wird nur die Rückziehkurve (blaue Kurve in Abbildung 4.3) untersucht.

Diese wird als erstes stückweise von hinten linear gefittet, bis eine nennenswerte Änderung in der Steigung auftritt. Bis zu dieser Stelle wird dann die Baseline („Nulllinie“) gefittet und für die ganze Kurve extrapoliert. Nun wird der Fit von der Kurve subtrahiert und man erhält eine ausgerichtete und gerade Kurve. Der Kontaktpunkt zwischen Kraftsensor und Probenoberfläche ist dann die erste Nullstelle der Kurve. Jetzt wird noch die Kraftsensorauslenkung in [pN] umgerechnet (Abschnitt 2.2.1), geglättet (gleitender Durchschnitt) und danach numerisch differenziert. Dieser Datensatz wird nun auf große Sprünge untersucht (Signal-Rausch-Verhältnis). Die gefundenen Sprünge lassen Abrisse vermuten. Am Ende der Auswertung jeder Kurve überprüft der Algorithmus, ob sie überhaupt Ereignisse enthalten. Wenn ja so wird diese Kurve in einen extra Ordner kopiert und eine txt-Datei erzeugt mit der ermittelten **Abrisslänge** und **Dissipationsenergie**. Die Berechnung der Dissipationsenergie erfolgt durch numerisches integrieren vom Kontaktpunkt bis zum Ende der Kurve: Die Summe der deflection-Werte multipliziert mit den Abständen zum nächsten Positions-Wert.



**Abbildung 4.3:** Diese Kraft-Distanz-Kurve von einer Aggrecan-Aggrecan Wechselwirkung demonstriert die wichtigen Parameter für die Auswertung. Die grau unterlegte Fläche, die die Kurve einschließt, stellt die Dissipationsenergie dar. Die Abrisslänge beschreibt den Abstand zwischen dem Kontaktpunkt des Kraftsensors mit der Probenoberfläche, bis er wieder kräftefrei ist. Die Schwarz markierten Ereignisse zeigen die Art der Ereignisse, die für die Auswertung relevant sind.

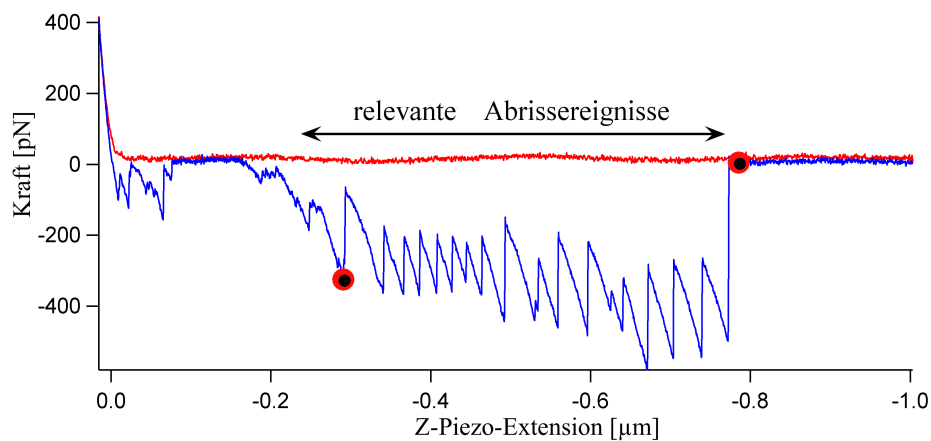
In Abbildung 4.3 sind die relevanten Parameter für die Auswertung dargestellt: Die grau unterlegte Fläche ist die Dissipationsenergie. Der Abstand zwischen dem Kontakt-

punkt und dem letzten Ereignis in der Kraft-Distanz-Kurve ist die Abrisslänge.

Die Bestimmung der Abrisskräfte wird per Hand ausgeführt. Dazu wird die Standard-Software von Asylum Research verwendet, indem ein Cursor (rot-schwarze Markierung in Abbildung 4.3) auf die Baseline gesetzt wird und einer auf ein Abrisspunkt, dadurch wird die Differenz zwischen den beiden Cursor ermittelt und somit die Abrisskraft.

Bei den **Aggrecan** Messungen werden auf diese Weise alle Ereignisse in der Kurve vermessen, die die Form der schwarz markierten Ereignisse in Abbildung 4.3 haben. Der erste Peak wird grundsätzlich nicht in Betracht gezogen, da er meist eine unspezifische Wechselwirkung zwischen Kraftsensor und Probenoberfläche darstellt.

Bei den **MAF** Messungen variiert die Form der Kraft-Distanz-Kurven stark, deshalb werden nur charakteristische Kurven (Abbildung 4.4) auf die gleiche Weise ausgewertet, bei denen man davon ausgehen kann, dass die Wechselwirkungen von Glykan-Glykan Interaktionen herrühren.



**Abbildung 4.4:** Eine Kraft-Distanz-Kurve aus einer MAF-MAF Messung bei 2000 nm/s. Für die Auswertung der Abrisskräfte zwischen MAF werden nur Kurven mit solcher Form betrachtet, wobei nur das Sägezahnprofil vermessen wird.



# 5 Resultate

In diesem Kapitel werden die erlangten Resultate präsentiert und diskutiert. Da zwei verschiedene Biomoleküle in dieser Arbeit untersucht worden sind, erfolgt eine Unterteilung. Zunächst wird das Aggrecan besprochen und im Anschluss der MAF.

## 5.1 Aggrecan

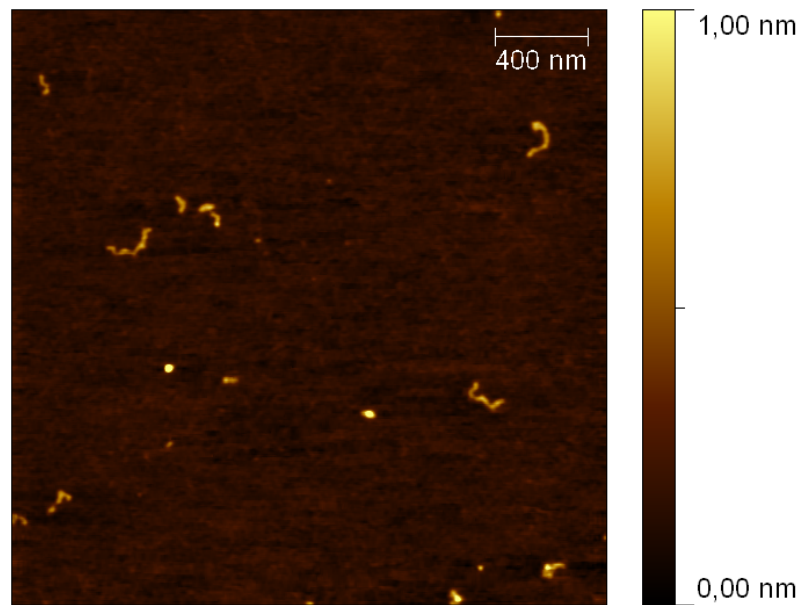
### 5.1.1 Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen

Um sich ein Bild über die Dimensionen des Aggrecans zu verschaffen, sind als erstes AFM-Bilder aufgenommen worden. Dabei sind die Aggrecane entweder einfach auf den Glimmerplättchen eingetrocknet oder auf den mit APTES funktionalisierten Glimmerplättchen immobilisiert worden (Abschnitt 4.2.5) und im Tapping<sup>TM</sup> Modus an Luft abgerastert. Es sind folgende Bilder entstanden, aus denen die Mittelwerte<sup>1</sup> der interessanten Größen bestimmt worden sind, als Fehler ist die Standardabweichung angegeben.

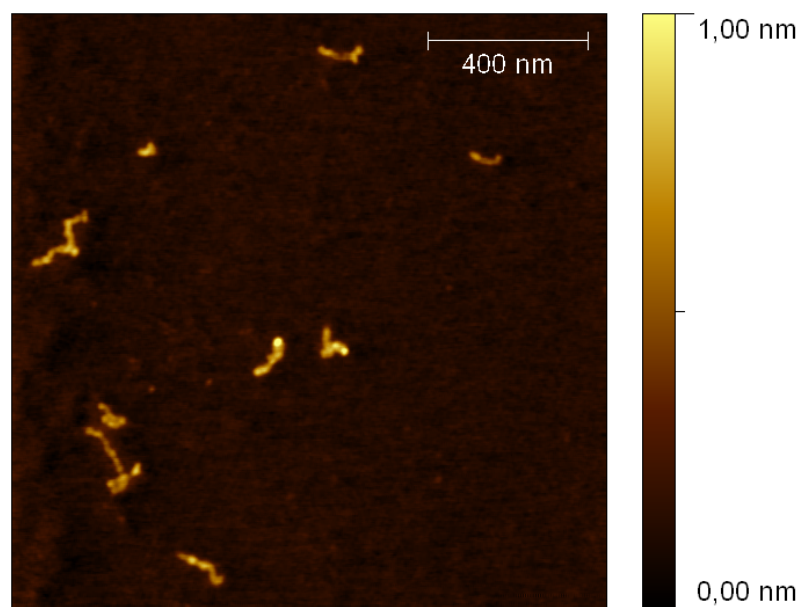
Für die Messungen auf einfachem Glimmer ergibt sich für die Länge des Aggrecans  $L_G = 216,86 \pm 35,40$  nm, für die Breite  $B_G = 20,56 \pm 4,46$  nm und für die Höhe  $H_G = 0,78 \pm 0,18$  nm (Abbildungen 5.1 und 5.2). Die fadenartige Erscheinung des Aggrecans auf einfachem Glimmer verändert sich deutlich, wenn der Glimmer mit APTES funktionalisiert wird. Hier wird die im Abschnitt 3.2.1 beschriebene Struktur einer „Flaschenbürste“ erst sichtbar (Abbildungen 5.3 bis 5.6). In Abbildung 5.3 kann man auch erkennen, dass die Aggrecane einen gewissen Abstand zu einander einhalten und sich nicht überkreuzen, was seinen Ursprung in den negativ geladenen Glykosaminoglykanen hat. Mit diesem Verfahren gewinnt man nun auch Informationen über die Glykosaminoglykane, die auf einfachem Glimmer verborgen bleiben. Für die Abmessungen des

---

<sup>1</sup>Für die Bestimmung der Mittelwerte wird eine Anzahl von  $n = 50$  Messwerten benutzt.

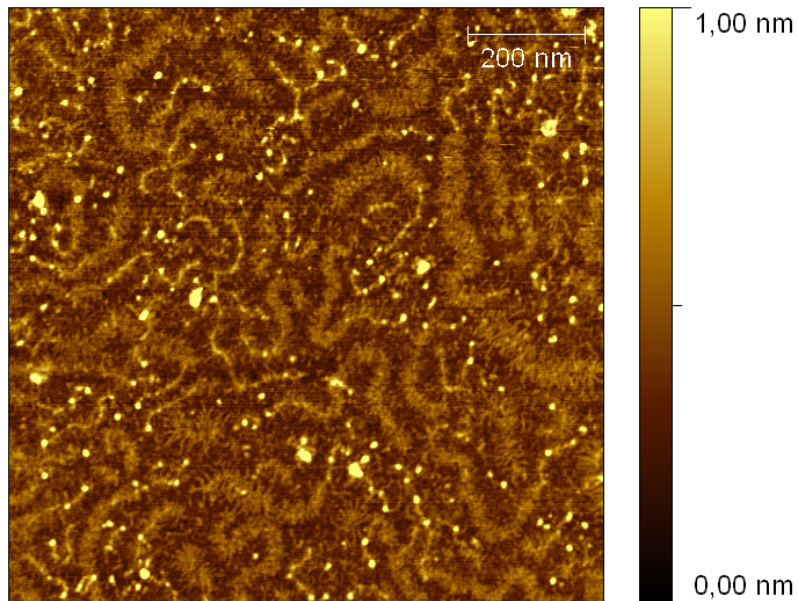


**Abbildung 5.1:** *Aggrecan (10 µg/ml in MilliQ-Wasser) auf Glimmer: Man sieht eine lange fadenartige Struktur, aber keine Information über die Glykosaminoglykane.*

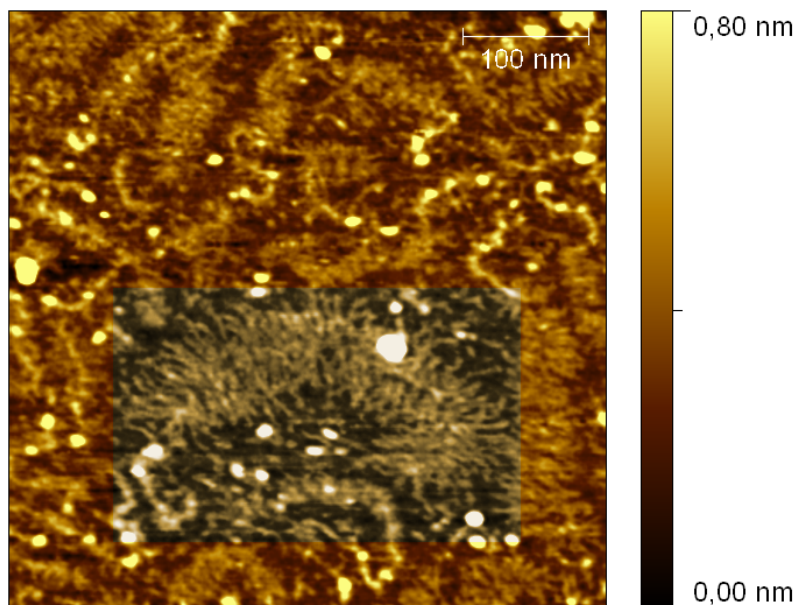


**Abbildung 5.2:** *Aggrecan (10 µg/ml in MilliQ-Wasser) auf Glimmer*

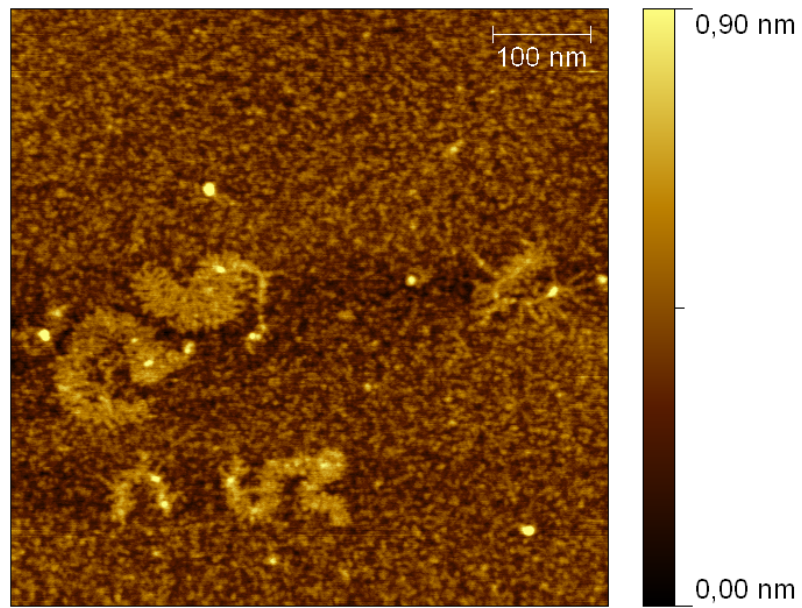




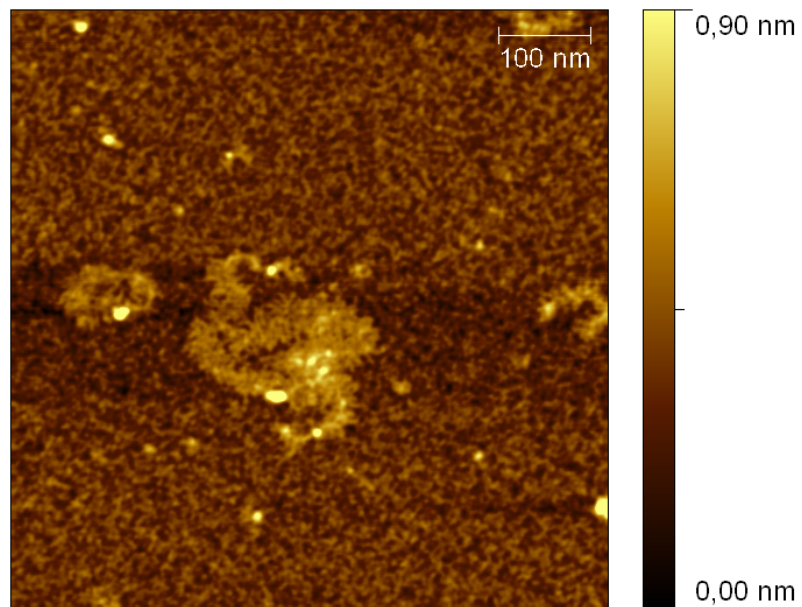
**Abbildung 5.3:** *Aggrecan (250 µg/ml in MilliQ-Wasser) auf APTES-Glimmer: Dieses Bild verdeutlicht die große Variation der Längen der Aggrecane. Außerdem wird hier die „Flaschenbürste“ ersichtlich.*



**Abbildung 5.4:** *Aggrecan (250 µg/ml in MilliQ-Wasser) auf APTES-Glimmer: Hier kann man die an das Kernprotein gebundenen negativ geladenen Glykosaminoglykan recht gut erkennen.*



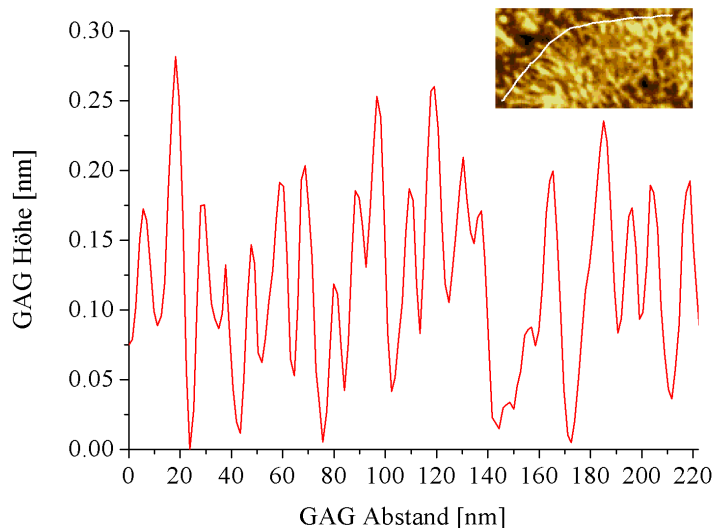
**Abbildung 5.5:** *Aggrecan (10 µg/ml in MilliQ-Wasser) auf APTES-Glimmer*



**Abbildung 5.6:** *Aggrecan (10 µg/ml in MilliQ-Wasser) auf APTES-Glimmer*

Aggrecans auf APTES hat sich ergeben: Länge  $L_A = 348 \pm 73$  nm, Höhe  $H_A = 0,166 \pm 0,036$  nm, Länge der Glykosaminoglykane  $L_{GAG} = 48,35 \pm 11,85$  nm, d.h. für die Breite des Aggrecans auf APTES ergibt sich etwa das Doppelte und für den Abstand zwischen den Glykosaminoglykanen  $A_{GAG} = 5,22 \pm 1,45$  nm. Diese Ergebnisse mit dem angegebenen Fehlerrahmen korrespondieren mit den Ergebnissen aus [56, 83].

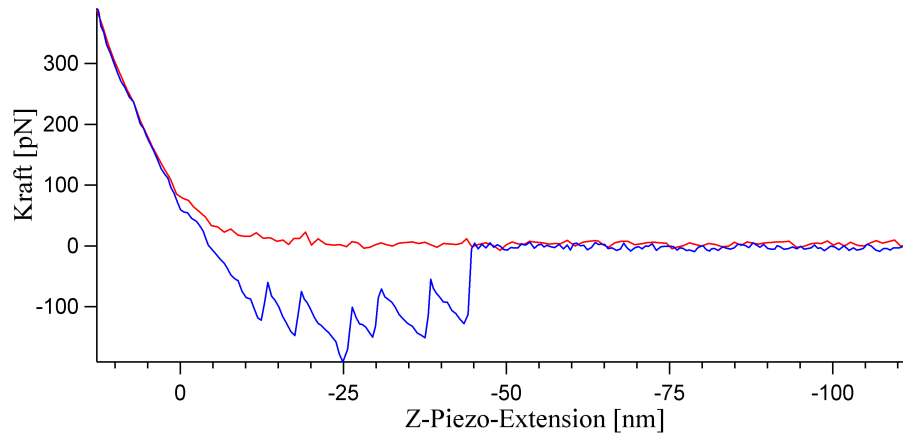
Der ermittelte Abstand Zwischen den Glykosaminoglykanen spiegelt sich auch teilweise in den aufgenommenen Kraft-Distanz-Kurven (Abbildung 5.8) wieder, was ein Indiz dafür ist, dass die beobachteten Wechselwirkungen in den kraftspektroskopischen Experimenten (Abschnitt 5.1.2.4) zwischen den Aggrecanen auf die Glykosaminoglykane zurückzuführen sein könnten.



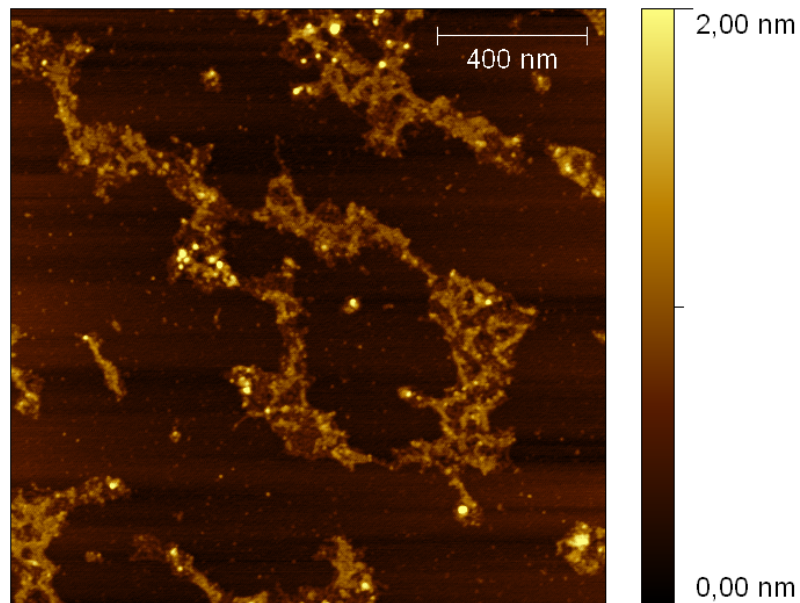
**Abbildung 5.7:** *Querschnittsprofil der Glykosaminoglykane (GAG) entlang des Kernproteins, das der weißen Linie im Bild rechts oben entspricht.*

Die Unterschiede in den Dimensionen der Aggrecane auf einfachem Glimmer und APTES-Glimmer, sind mit der Ladung der Oberfläche zu erklären. Die Oberfläche von einfachem Glimmer ist negativ geladen sowie auch die Glykosaminoglykane des Aggrecans, somit versucht das Aggrecan sich auf dem Glimmer so auszurichten, dass ein möglichst großer Abstand zwischen den negativen Ladungen vorliegt, dadurch wird es schmaler und kürzer. APTES-Glimmer hat an Luft eine positive Oberfläche (Abschnitt 4.2.5), deshalb können sich die Glykosaminoglykane gut ausrichten und das Aggrecan erscheint sehr breit und lang, jedoch sehr flach, was die AFM-Messung in hohem Maße

erschwert.



**Abbildung 5.8:** Eine Kraft-Distanz-Kurve zwischen Aggrecanen aufgenommen bei 2000 nm/s. Man kann erkennen, dass die Abstände zwischen den Abrissen sich mit dem ermittelten Abstand  $A_{GAG} = 5,22 \pm 1,45$  nm für die Glykosaminoglykane aus den AFM-Bildern decken.



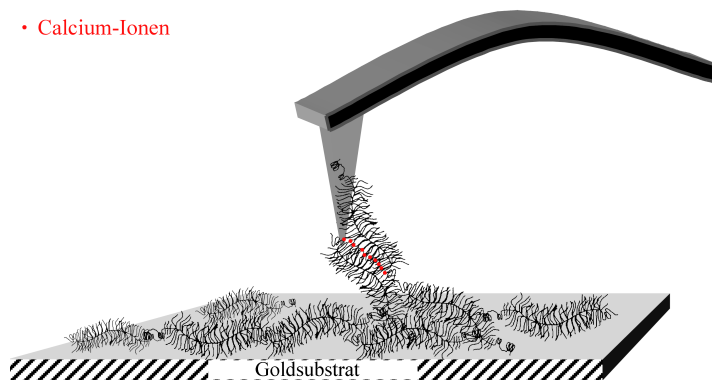
**Abbildung 5.9:** Aggrecan (250  $\mu\text{g/ml}$  in MilliQ-Wasser + 100 mM NaCl + 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) auf Glimmer: Bei Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  während der Präparation findet man Aggrecan-Aggregate auf der Glimmeroberfläche.

Wenn man bei der Probenpräparation zu der Aggrecan-Lösung auf den Glimmer noch

etwas calciumhaltige Lösung (100 mM NaCl + 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH=5,6) hinzugibt, die auch für die kraftspektroskopischen Experimente benutzt wird, so kann man Aggregate der Aggrecanen auf den AFM-Bildern (Abbildung 5.9) erkennen. Diese Aggregation zeugt von der Selbstadhäsion der Aggrecanen in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 5.1.2 Kraftspektroskopische Untersuchungen

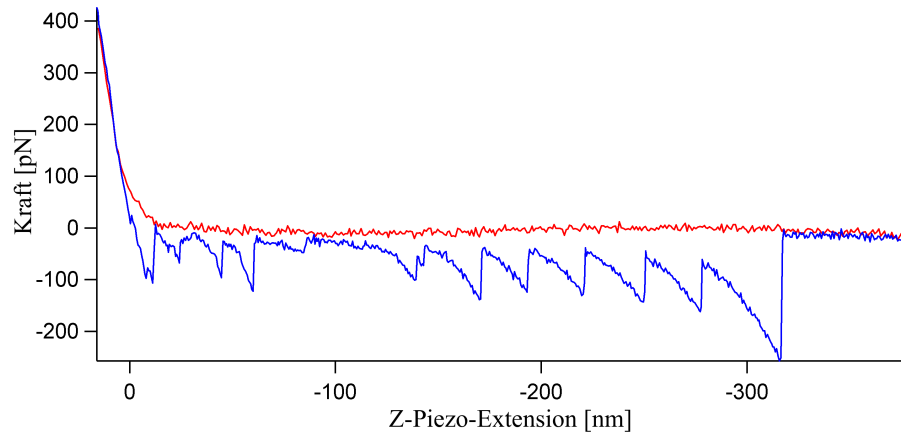
Bei den kraftspektroskopischen Experimenten an Aggrecanen ergeben sich hoch interessante Kraft-Distanz-Kurven mit einem Sägezahnprofil (Abbildung 5.10). Dabei hat sich gezeigt, dass das Vorhandensein von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in der verwendeten Lösung extrem wichtig für die Beobachtung solcher Ereignisse ist. Dass die Aggrecanen in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  Selbstadhäsion zeigen, wurde auch schon in [84] gezeigt, jedoch nicht auf Einzelmolekülniveau. Die Vermutung liegt nahe, dass die auftretenden Bindungsereignisse von den negativ geladenen Glykosaminoglykanen herrühren könnten, wobei  $\text{Ca}^{2+}$  die Vermittlerrolle spielt. In Abbildung 5.11 ist eine mögliche Geometrie eines Bindungsereignisses zwischen zwei Aggrecanen schematisch dargestellt:



**Abbildung 5.10:** Schematische Darstellung einer möglichen Geometrie für Bindungsereignisse zwischen Aggrecanen. Die roten Punkte stellen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen dar, die die Bindung zwischen den einzelnen Glykosaminoglykanen vermitteln.

In [84] hat man aber auch Wechselwirkungen zwischen Aggrecanen und OH-SAM (Self Assembled Monolayer) beobachtet. Um die Wechselwirkung zwischen Aggrecan-Aggrecan und Aggrecan-OH-Gruppen näher zu beleuchten, werden kraftspektroskopische Experimente in verschiedenen Lösungen mit auf Gold immobilisierten Aggrecanen (Abschnitt 4.3.5) und plasmaoxidierten Glasoberflächen (Abschnitt 4.3.3) durchgeführt, die im Folgenden erläutert werden. Es werden pro Messung 1000 bis 2000 Kurven aufge-

nommen. Die kraftspektroskopischen Parameter (Abschnitt 4.3.6) werden für alle Experimente festgehalten, wobei eine Rückziehggeschwindigkeit von 2000 nm/s benutzt wird.



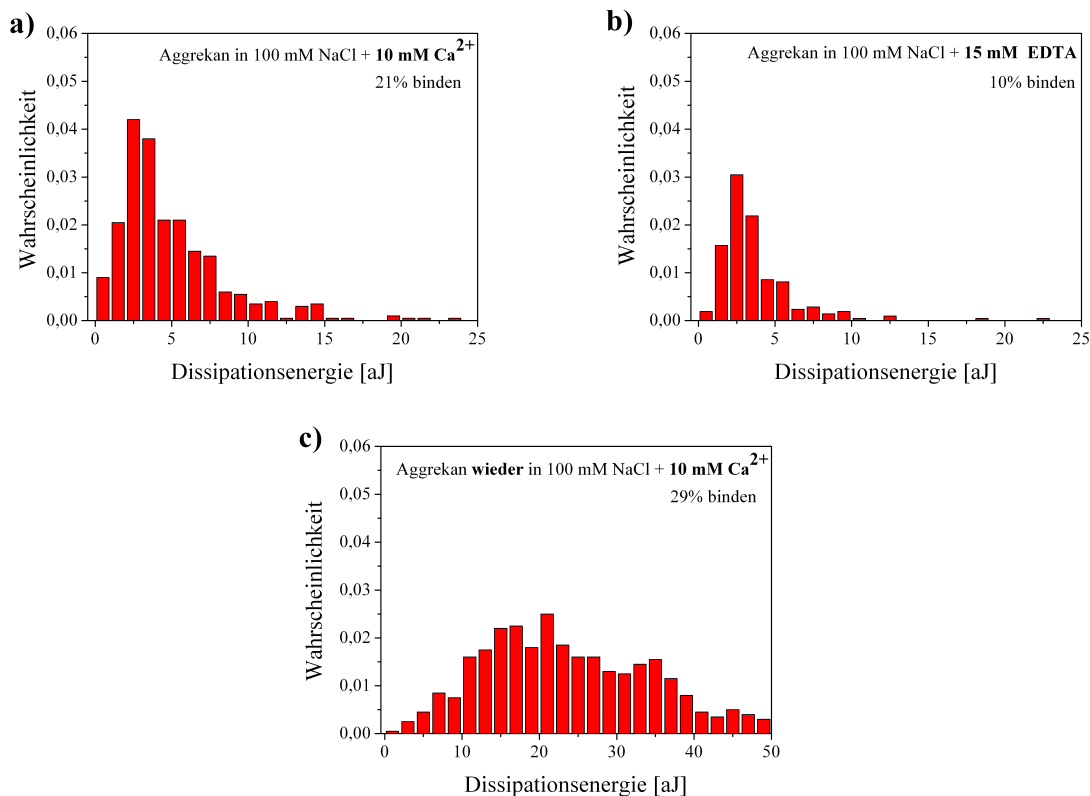
**Abbildung 5.11:** *Eine Kraft-Distanz-Kurve bei einer Rückziehggeschwindigkeit von 2000 nm/s mit Sägezahnprofil, die die Wechselwirkung zwischen Aggrecan-Aggrecan in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  zeigt. Die einzelnen Abrissereignisse werden dabei jeweils dem Brechen einer Bindung zwischen zwei Glykosaminoglykanen zugeordnet.*

### 5.1.2.1 Calcium-Abhängigkeit der Bindung

Für den Nachweis der  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit wird zunächst eine kraftspektroskopische Messung zwischen Aggrecanen in 100 mM NaCl + 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  Lösung<sup>2</sup> gemacht. Die verwendete Probe (Aggrecane auf Gold) wird dann mit 100 mM NaCl + 15 mM EDTA Lösung (mit 20 mM Tris auf pH=5,6 gepuffert) gespült und 8 h in dieser Lösung gelagert. Ethylendiamintetraacetat (EDTA) bildet besonders stabile Chelat-Komplexe mit divalenten Kationen [85]. So kann der sechszählige Ligand EDTA einen sehr stabilen Komplex mit dem Calcium-Ion bilden und es somit in der Lösung neutralisieren, so dass kein freies  $\text{Ca}^{2+}$  vorliegt. Um sicher zu stellen, dass möglichst viel  $\text{Ca}^{2+}$  gebunden wird, ist die Konzentration von EDTA (15 mM) höher angesetzt worden als die von  $\text{Ca}^{2+}$  (10 mM). Als nächstes erfolgt eine kraftspektroskopische Messung in 100 mM NaCl + 15 mM EDTA Lösung. Nach dieser Messung wird die Probe wieder mit 100 mM NaCl + 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  Lösung gespült und auch 8 h in dieser Lösung gelagert. Es folgt dann eine

<sup>2</sup>Alle verwendeten Lösungen für die kraftspektroskopischen Messungen an Aggrecanen haben einen pH=5,6.

dritte Messung in 100 mM NaCl + 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  Lösung. Für diese drei Messungen ist derselbe funktionalisierte Kraftsensor verwendet worden, der in MilliQ-Wasser gelagert worden ist. Die Auswertung der Kraft-Distanz-Kurven erfolgt nach Abschnitt 4.3.7, wobei hier die aussagende Größe die Dissipationsenergie bzw. die eingeschlossene Fläche von einer Kraft-Distanz-Kurve ist. Je größer die Dissipationsenergie, desto größer ist die Anzahl der Bindungen zwischen den Biomolekülen.

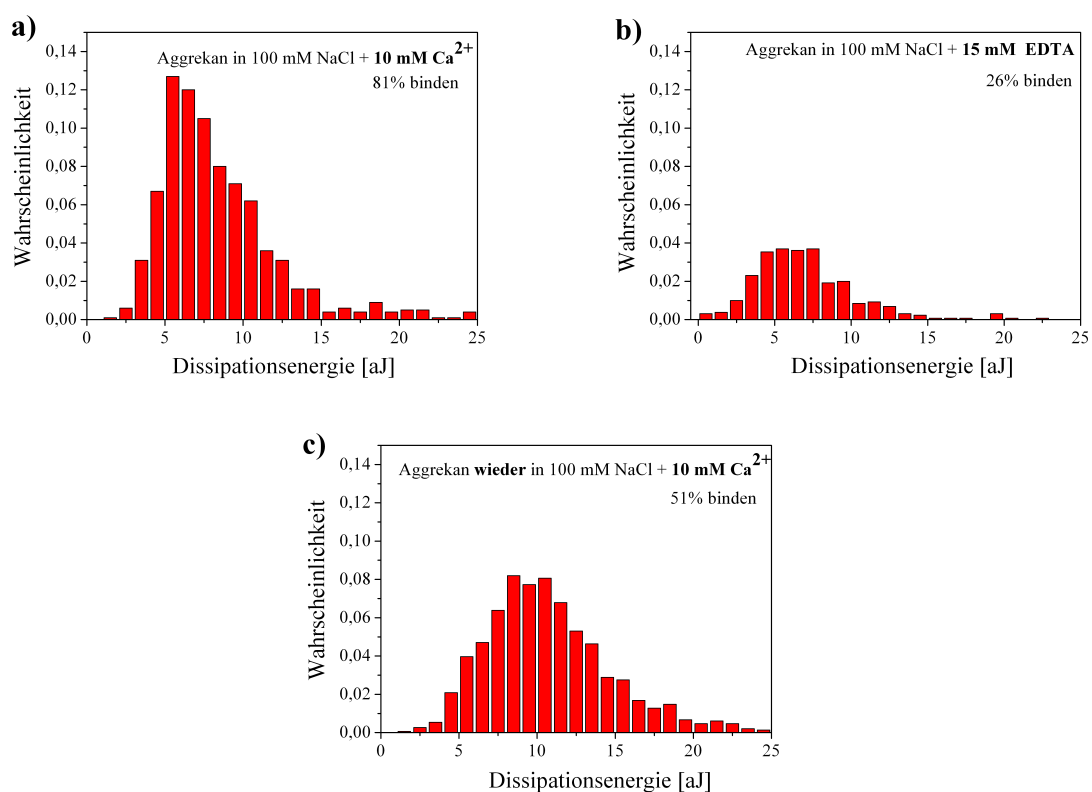


**Abbildung 5.12:** Kraftspektroskopische Messungen für die Überprüfung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Selbstadhäsion der Aggrekane: **a)** Messung in  $\text{Ca}^{2+}$ ; **b)** Messung in EDTA mit abnehmender Bindungswahrscheinlichkeit; **c)** Messung wieder in  $\text{Ca}^{2+}$  mit steigender Bindungswahrscheinlichkeit

Aus den erhaltenen Histogrammen (Abbildung 5.12) ist zu entnehmen, dass bei Zugabe von EDTA die Bindewahrscheinlichkeit um mehr als 50% abnimmt. Wird die Messung wieder mit  $\text{Ca}^{2+}$  durchgeführt so steigt die Bindewahrscheinlichkeit wieder an. Um dieses Ergebnis zu stützen, ist diese Experiment noch einmal wiederholt worden (Abbildung 5.13). Auch hier nimmt die Bindewahrscheinlichkeit bei Zugabe von EDTA um mehr als 50% ab und nimmt wieder zu, wenn die Messung wieder in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Lösung statt-

fidet. Dieses Experiment belegt, dass die Selbstadhäsion der Aggrethane  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig ist.

Die erhaltenen Dissipationsenergien aus diesem Experiment (Abbildungen 5.12 und 5.13) sind im Vergleich mit den Resultaten für die Dissipationsenergien aus [84] um ein Faktor 100-1000 kleiner, was wiederum zeigt, dass die kraftspektroskopischen Messungen an den Aggrethanen in dieser Arbeit auf Einzelmolekülniveau stattgefunden haben.



**Abbildung 5.13:** Wiederholte kraftspektroskopische Messungen für die Überprüfung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Selbstadhäsion der Aggrethane: **a)** Messung in  $\text{Ca}^{2+}$ ; **b)** Messung in EDTA mit abnehmender Bindungswahrscheinlichkeit; **c)** Messung wieder in  $\text{Ca}^{2+}$  mit steigender Bindungswahrscheinlichkeit

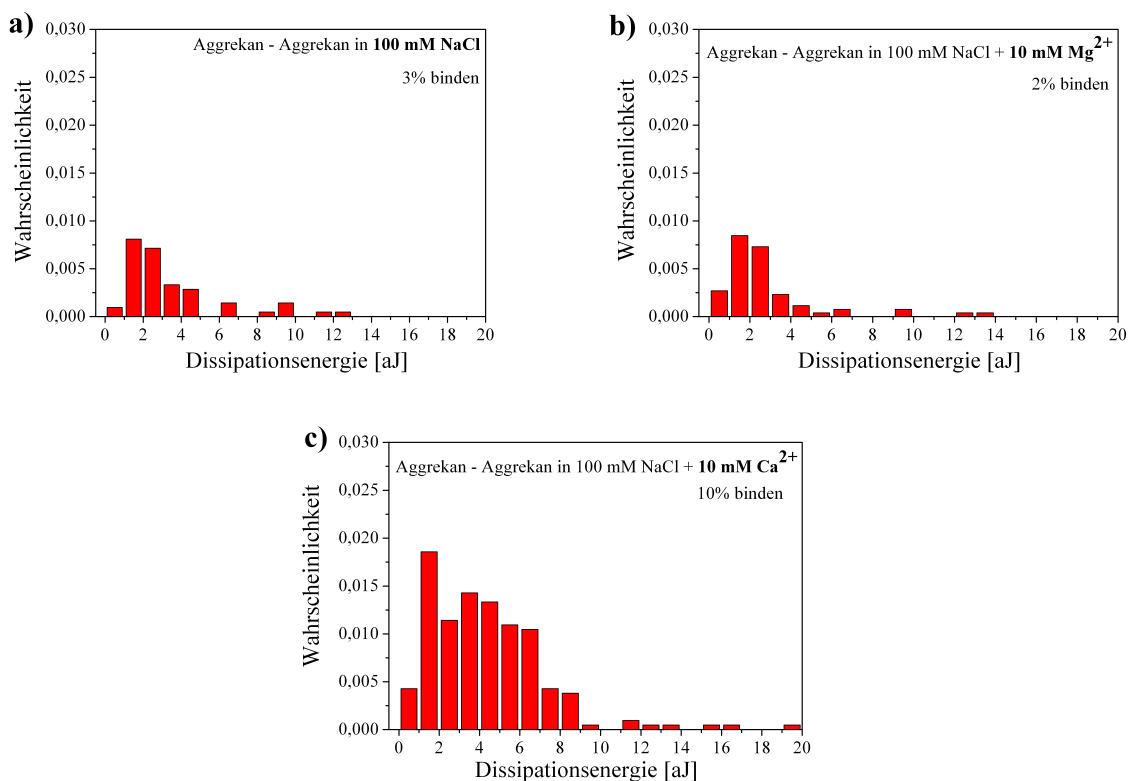
### 5.1.2.2 Calcium-Selektivität der Bindung

Da man im vorangegangenen Experiment die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Selbstadhäsion der Aggrethane bestätigt hat, stellt sich die Frage, ob die Wechselwirkung zwischen den Aggrethanen nicht nur  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig sondern auch  $\text{Ca}^{2+}$ -selektiv ist. Dazu werden kraft-



spektroskopische Messungen in drei verschiedenen Salzlösungen durchgeführt. Weil die lyophilisierten Aggrecanen im Wesentlichen salzfrei (Abschnitt 4.1) sind und im MilliQ-Wasser gelöst werden, sind auch die funktionalisierten Proben und Kraftsensoren (Abschnitt 4.3.5) zunächst salzfrei.

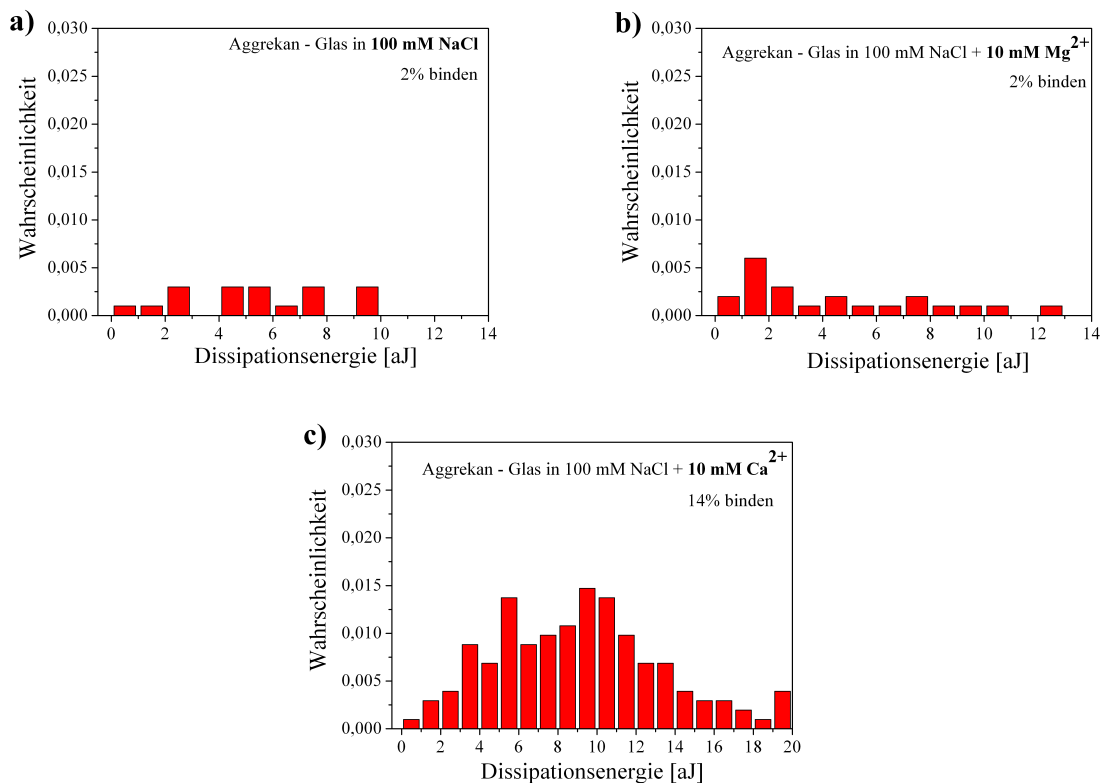
Hierzu wird als erstes eine kraftspektroskopische Messung nur in 100 mM NaCl Lösung gemacht, dann wird die Probe (Aggrecan auf Gold) mit 100 mM NaCl + 10 mM Mg<sup>2+</sup> Lösung gespült und die nächste Messung in dieser Lösung durchgeführt.



**Abbildung 5.14:** Kraftspektroskopische Messung für die Untersuchung der Ca<sup>2+</sup>-Selektivität der Bindung zwischen den Aggrecanen: **a)** Aggrecan nur in 100 mM NaCl mit geringer Bindungswahrscheinlichkeit; **b)** Aggrecan mit 10 mM Mg<sup>2+</sup>. Auch hier zeigt sich eine geringe Bindungsaktivität; **c)** Aggrecan mit 10 mM Ca<sup>2+</sup>. In diesem Fall steigt die Bindungsaktivität deutlich an.

Nach der Messung in Mg<sup>2+</sup> Lösung wird die Probe mit 100 mM NaCl + 10 mM Ca<sup>2+</sup> Lösung gespült und anschließend eine Messung in Ca<sup>2+</sup> Lösung gemacht. Für die Messung ist derselbe funktionalisierte Kraftsensor und Probe verwendet worden. Auch hier ist die aussagende Größe die Dissipationsenergie.

In den Histogrammen (Abbildung 5.14) kann man deutlich erkennen, dass in den Messungen ohne  $\text{Ca}^{2+}$  die Bindewahrscheinlichkeit sehr gering ist. Dieses Experiment zeigt, dass nicht nur divalente Kationen wie in diesem Fall  $\text{Mg}^{2+}$  für die Selbstadhäsion der Aggreane verantwortlich sind. Nur in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Lösung ist die Selbstadhäsion der Aggreane vermehrt beobachtet worden. Daraus lässt sich schließen, dass die Wechselwirkung zwischen den Aggreanen  $\text{Ca}^{2+}$ -selektiv ist. Da die zweifache Ladung eines Kations nicht ausreichend ist, um die Wechselwirkung zu induzieren, ist höchst wahrscheinlich die Größe der Ionen für eine Bindung entscheidend. Denn der Ionenradius von  $\text{Ca}^{2+}$  beträgt etwa 100 pm und der von  $\text{Mg}^{2+}$  etwa 72 pm [85].



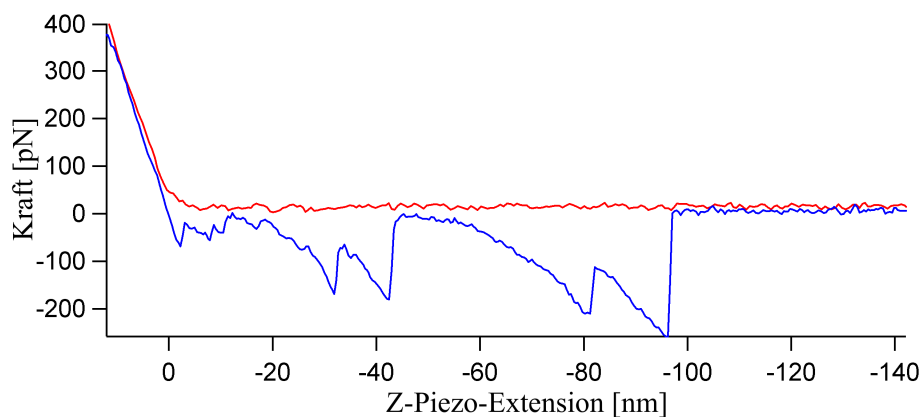
**Abbildung 5.15:** Kraftspektroskopische Messung für die Untersuchung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Selektivität der Bindung zwischen einem Aggrekan und einer plasmaoxidierten Glasoberfläche: **a)** Aggrekan nur in 100 mM NaCl mit geringer Bindungswahrscheinlichkeit; **b)** Aggrekan mit 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$ . Auch hier zeigt sich nur eine geringe Bindungsaktivität; **c)** Aggrekan mit 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . In diesem Fall steigt die Bindungsaktivität deutlich an.

Zur Stützung dieses Ergebnisses wird das Experiment wiederholt. Nur diesmal dient

als Substrat eine einfache plasmaoxidierte Glasoberfläche, die im Wesentlichen bei  $\text{pH}=5,6$  mit  $\text{O}^-$  und  $\text{OH}$ -Gruppen bedeckt ist und eine negative Nettoladung hat [81]. Die Verfahrensweise ist dieselbe. Zuerst hat eine Messung nur in 100 mM NaCl Lösung stattgefunden, dann in 100 mM NaCl + 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$  Lösung und anschließend in 100 mM NaCl + 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  Lösung. Auch hier ist für die Messungen derselbe funktionalisierte Kraftsensor verwendet worden. Aber für jede Messung ist jeweils eine frisch plasmaoxidierte Glasoberfläche benutzt worden, weil der Effekt der Plasmaoxidierung nur eine gewisse Zeit anhält. Auch auf einer plasmaoxidierten Glasoberfläche zeigt sich das gleiche Verhalten. Wenig Ereignisse in 100 mM NaCl Lösung und 100 mM NaCl + 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$  Lösung und eine starke Zunahme der Bindungsereignisse bei 100 mM NaCl + 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  Lösung (Abbildung 5.15). Also ist die Bindung zwischen einer plasmaoxidierten Glasoberfläche und einem Aggrecan auch  $\text{Ca}^{2+}$ -selektiv.

### 5.1.2.3 Verifizierung der Bindung

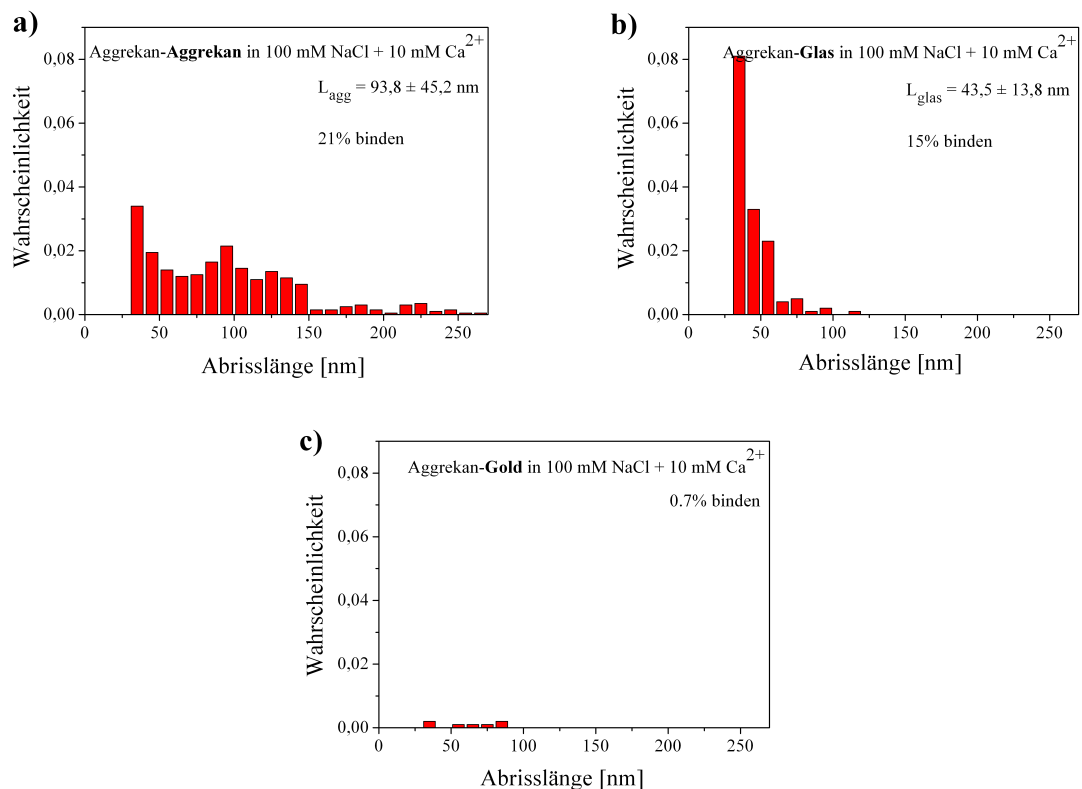
Es stellt sich nun die Frage, ob die Bindung zwischen Aggrecan-Aggrecan und Aggrecan-plasmaoxidierten Glasoberfläche der gleichen Natur ist. Denn auch die aufgenommenen Kraft-Distanz-Kurven aus der Messung zwischen Aggrecan-plasmaoxidierten Glasoberfläche zeigen teilweise das Sägezahnprofil (Abbildung 5.16), wie bei der Aggrecan-Aggrecan Wechselwirkung (Abbildung 5.11).



**Abbildung 5.16:** Eine Kraft-Distanz-Kurve bei einer Rückziehggeschwindigkeit von 2000 nm/s mit Sägezahnprofil, die die Wechselwirkung zwischen einem Aggrecan und einer plasmaoxidierten Glasoberfläche zeigt.

Aufgrund dieser Beobachtung, dass Aggrecane unter gewissen Bedingungen mit einer

einfachen Glasoberfläche wechselwirken, ist es angebracht eine Testmessung auf reinem Gold zu machen. Diese Messung soll der Überprüfung dienen, dass die beobachtete Wechselwirkung in den Aggrecan-Aggrecan Experimenten von den Biomolekülen herrührt und nicht von Aggrecan-Goldoberfläche. Dazu wird ein frisch abgezogenes Goldsubstrat (Abschnitt 4.3.3) in 100 mM NaCl + 10 mM Ca<sup>2+</sup> Lösung mit einem funktionalisierten Kraftsensor vermessen.



**Abbildung 5.17:** Kraftspektroskopisches Experiment zur Verifizierung der Bindung: **a)** Wechselwirkung zwischen Aggrecanen. Man sieht, dass die Verteilung der Abrisslängen sehr breit ist und die Bindungswahrscheinlichkeit recht hoch; **b)** Wechselwirkung zwischen Aggrecan und plasmaoxidierte Glasoberfläche. Diesem Histogramm kann man entnehmen, dass die Verteilung der Abrisslängen deutlich schmaler wird, was auch der Erwartung entspricht, da sich hier Aggrecane nur auf dem Kraftsensor befinden; **c)** Die Messung Aggrecan auf Goldoberfläche ergibt so gut wie keine Ereignisse. Demnach rühren die beobachteten Bindungsereignisse auf dem mit Aggrecanen immobilisierten Gold von den Biomolekülen her.

Für die Aussage über die Wechselwirkung zwischen Aggrecan-Aggrecan und Aggrecan-

plasmaoxidiertes Glasoberfläche werden schon vorhandene Messungen verwendet. Zudem wird als aussagende Größe die Abrisslänge (Abschnitt 4.3.7) betrachtet.

Vergleicht man die erhaltenen Resultate in Abbildung 5.17 c), so zeigt sich, dass die Aggrecane mit der Goldoberfläche fast gar nicht und nur unspezifisch wechselwirken, denn es konnte kein Sägezahnprofil beobachtet werden. Im Gegensatz dazu ist die Aktivität bei den Experimenten mit Aggrecanen funktionalisierter Goldoberfläche deutlich höher und spezifischer Natur. Also kann man davon ausgehen, dass die auftretenden Wechselwirkungen zwischen den Biomolekülen stattfinden und nicht mit der Goldoberfläche. Außerdem ist den Histogrammen zu entnehmen (Abbildung 5.17 b)), dass der Mittelwert der Abrisslänge bei der Messung Aggrecan-plasmaoxidierte Glasoberfläche  $L_{glas} = 43,5 \pm 13,8$  nm beträgt und sich somit gut deckt mit dem experimentell bestimmten Wert für die Länge eines Glykosaminoglykans  $L_{GAG} = 48,4 \pm 11,9$  nm aus den AFM-Bildern (Abschnitt 5.1.1). Dies würde bedeuten, dass die Abrisslänge bei der Messung Aggrecan-Aggrecan etwa doppelt so groß sein müsste. Und genau das ist beobachtet worden, denn der ermittelte Mittelwert für die Abrisslänge zwischen Aggrecan-Aggrecan beträgt  $L_{agg} = 93,8 \pm 45,2$  nm. Diese Resultate belegen die Vermutung, dass die Selbstadhäsion der Aggrecane in Gegenwart von  $Ca^{2+}$  auf die Glykosaminoglykane zurückzuführen ist.

Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass die Selbstadhäsion der Aggrecane einen elektrostatischen Charakter besitzt und  $Ca^{2+}$  spezifisch ist.

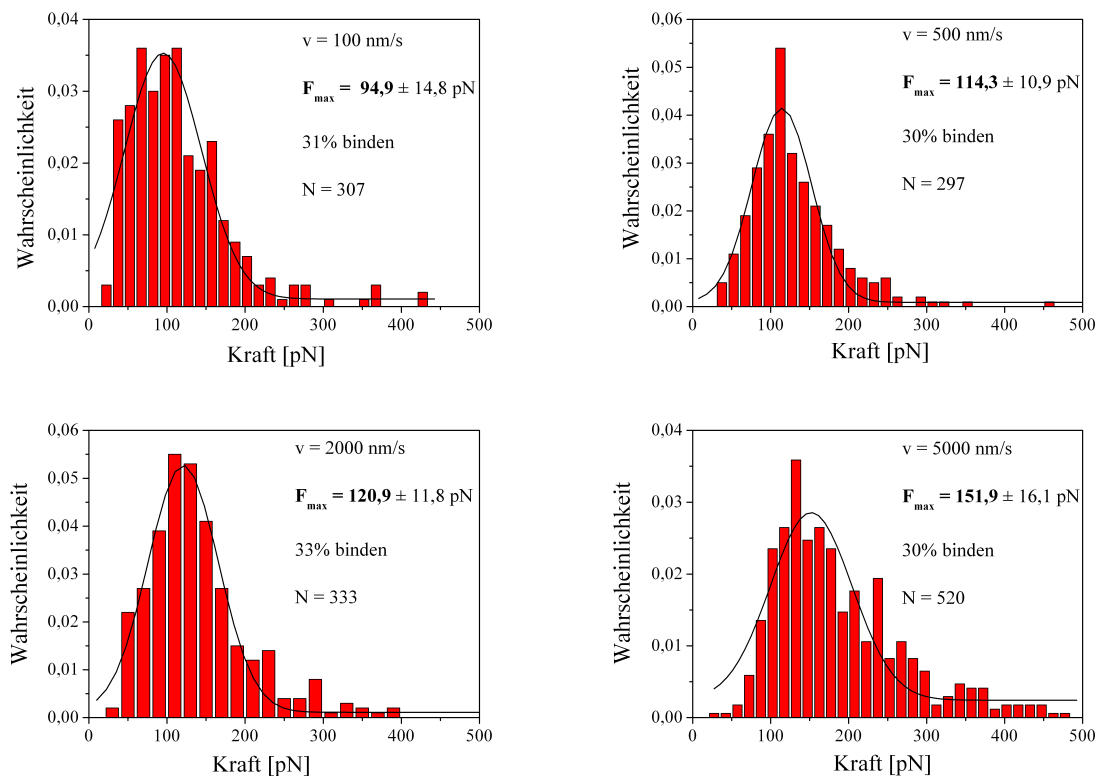
#### 5.1.2.4 Dynamische Kraftspektroskopie

Mit der dynamischen Kraftspektroskopie wird die Off-Ratenkonstante  $k_{off}^0$  des Aggrecans bestimmt und die damit verbundene mittlere Lebensdauer  $\tau = 1/k_{off}^0$ . Dazu werden kraftspektroskopische Messungen in 100 mM NaCl + 10 mM  $Ca^{2+}$  Lösung bei vier verschiedenen Rückziehggeschwindigkeiten durchgeführt (100 nm/s, 500 nm/s, 2000 nm/s und 5000 nm/s). Um den Fehler zu minimieren wird bei dieser Messung derselbe funktionalisierte Kraftsensor sowie dieselbe Probe (Aggrecan auf Gold) verwendet. Die erhaltenen Verteilungen von Dissoziationskräften sind in Abbildung 5.18 dargestellt.

Die wahrscheinlichste Abrisskraft  $F_{max}$  aus jedem Histogramm wird durch einen Fit mit einer Gaußfunktion der Form:

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

ermittelt, wobei  $c_1, \dots, c_4$  die Fitparameter sind. Der Fehler für die wahrscheinlichste Abrisskraft setzt sich aus dem Standardfehler des Mittelwerts der Gaußverteilung für eine 95,4%-ige Konfidenz ( $2\sigma/\sqrt{N}$ ) und dem Fitfehler für die wahrscheinlichste Abrisskraft zusammen. Die Belastungsraten für die verschiedenen Geschwindigkeiten ergeben sich aus  $r = k_{eff} \cdot v$  (1878 pN/s, 9392 pN/s, 37568 pN/s, 93920 pN/s), wobei  $k_{eff} = k \cdot 0,8$  ist, mit  $k_{eff}$  effektive Federkonstante des Systems und  $k$  ermittelte Federkonstante des Kraftsensors. Diese Annahme wird gemacht, weil die Kraftkurven per Hand ausgewertet werden und demzufolge keine Information über die Elastizität der Moleküle vorhanden ist.



**Abbildung 5.18:** Die Dissoziationskräfte-Verteilungen für die Rückziehggeschwindigkeiten 100 nm/s bis 5000 nm/s. Rechts oben ist die wahrscheinlichste Abrisskraft, die Bindungswahrscheinlichkeit und die absolute Anzahl der Dissoziationsereignisse  $N$  angegeben.

Erfahrungsgemäß verkleinert sich aber der Wert der Federkonstante  $k$  aufgrund der Elastizität der Moleküle um mehr als 20% [86, 87], somit ist dieser Kompromiss tragbar. Werden die Werte der wahrscheinlichsten Abrisskräfte halblogarithmisch gegen die Be-

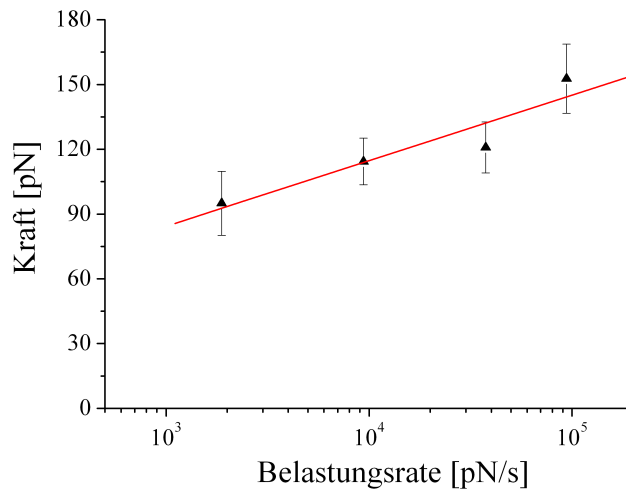
lastungsraten aufgetragen (Abbildung 5.19), so wird der von Evans und Ritchie [3] (Abschnitt 2.2.2) vorhergesagte Zusammenhang deutlich (Gleichung 2.27):

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

dass mit zunehmender Ziehgeschwindigkeit auch der Wert der wahrscheinlichsten Abrisskraft wächst. Durch eine lineare Regression dieser Daten mit der folgenden Extrapolation auf verschwindende äußere Kraft  $F_{max} = 0$ , erhält man die Belastungsrate  $r_0 = 1,679 \pm 0,94$  pN/s, bei der die Dissoziation des Aggrecans thermisch getrieben ist. Die inverse Steigung dieser Regressionsgeraden ist die Reaktionslänge des Aggrecans  $x_\beta = 0,31 \pm 0,08$  nm und mit der Beziehung:

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

erhält man für die Off-Ratenkonstante des Aggrecans  $k_{off}^0 = 0,127 \pm 0,08$  s<sup>-1</sup>. Damit folgt für die mittlere Lebensdauer des Aggrecans  $\tau = 7,85 \pm 4,96$  s.



**Abbildung 5.19:** Halblogarithmische Auftragung der wahrscheinlichsten Abrisskräfte  $F_{max}$  gegen die Belastungsraten  $r$ .

In der Auswertung sind, wegen dem Sägezahnprofil, teilweise von einander abhängige Dissoziationsereignisse vermessen worden. Solche Ereignisse können die zeitliche Entwicklung der Kräfte beeinflussen und diese zu einem höheren Wert verschieben, was zur einer Verfälschung des Ergebnisses führen könnte. Um Aussagen über die ermittel-

te Off-Ratenkonstante zu machen, sind kraftspektroskopische Experimente an einzelnen Glykosaminoglykanen des Aggrecans unabdingbar, damit ein Vergleich vorhanden ist. Dieses Experiment kann im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden, da diese Moleküle nicht zur Verfügung gestanden haben.

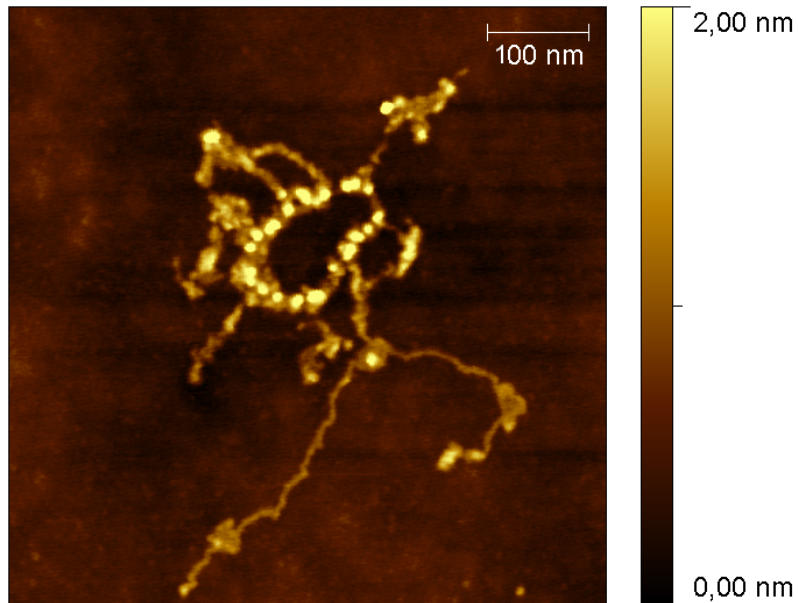
## 5.2 Aggregationsfaktor aus dem Meeresschwamm

### *Microciona prolifera*

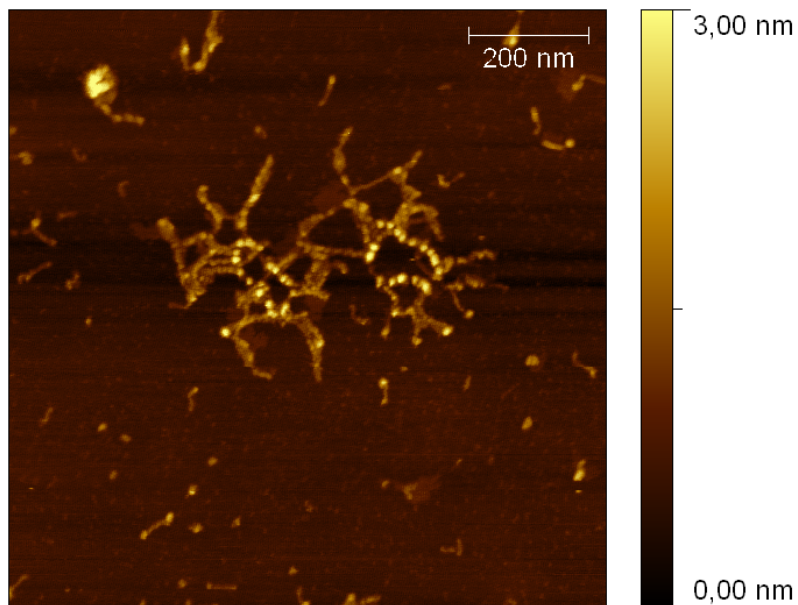
#### 5.2.1 Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen

Die rasterkraftmikroskopische Untersuchungen des MAF auf Glimmer (Abbildungen 5.20 und 5.21) erbringen folgende Resultate: Anzahl der globulären Einheiten des Ringes etwa 20 mit einer Höhe  $H_{GR} = 2,18 \pm 0,29$  nm, Höhe der Arme  $H_{GA} = 1,11 \pm 0,34$  nm und Umfang des Ringes  $U = 299,33 \pm 23,17$  nm. Bei Abbildungen auf APTES-Glimmer (Abbildungen 5.22 und 5.23) kann man keine gravierenden Veränderungen der Erscheinung des Moleküls feststellen. Auffällig ist, dass auf Glimmer weniger Arme vorhanden sind, als auf APTES-Glimmer und eine leichte Reduzierung der Höhe des gesamten Moleküls auftritt. Für die Abmessungen des MAF auf APTES-Glimmer ergibt sich: Höhe der globulären Einheiten des Ringes  $H_{AR} = 1,63 \pm 0,32$  nm und Höhe der Arme  $H_{AA} = 0,75 \pm 0,17$  nm. Die Höhenänderung könnte mit der APTES-Schicht zusammenhängen. Da die APTES-Schicht vermutlich nicht homogen ist und Fehlstellen besitzt, würde das Molekül in diese absacken und damit eine minimale Höhenänderung implizieren. Die abnehmende Anzahl der Arme auf dem Glimmer könnte ein Zeichen dafür sein, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Domäne sich an den globulären Einheiten des Ringes befindet, weil die Immobilisierung der MAF auf Glimmer mit CMF-Puffer + 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  erfolgt und nur Calcium in diesem Puffer ein divalentes Kation ist, das die negative Oberfläche des Glimmers mit dem Ring des MAF verbinden könnte. Dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Wechselwirkung zwischen MAF von den g200 herrührt, die an den globulären Einheiten (MAFp3) des Ringes gebunden sind, wurde schon in [70] gezeigt. Man muss jedoch sagen, dass für die Präparation auf Glimmer eine MAF-Lösung von 0,1 mg/ml benutzt wird und im Gegensatz dazu für die Präparation auf APTES-Glimmer nur eine 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  MAF-Lösung. Die Bindung der MAF auf Glimmer ist also recht schwach, da nicht viele Moleküle auf der Oberfläche haften bleiben,

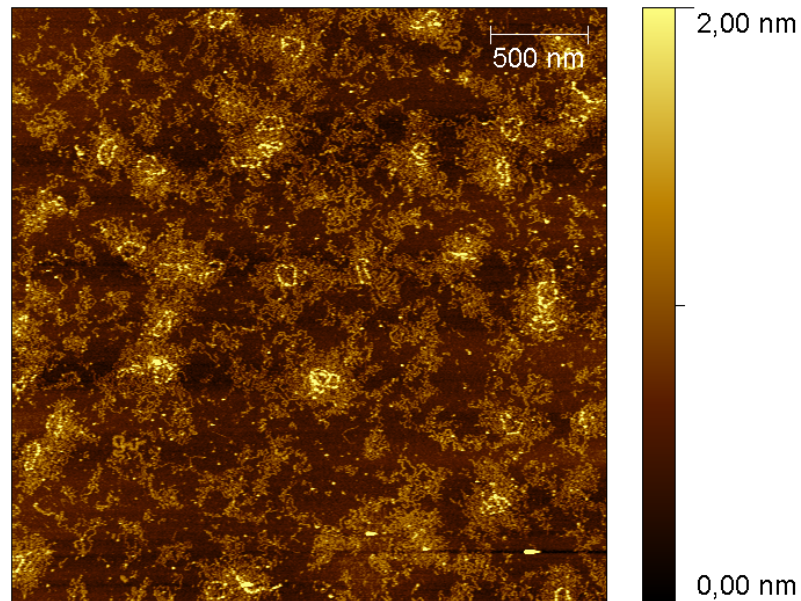




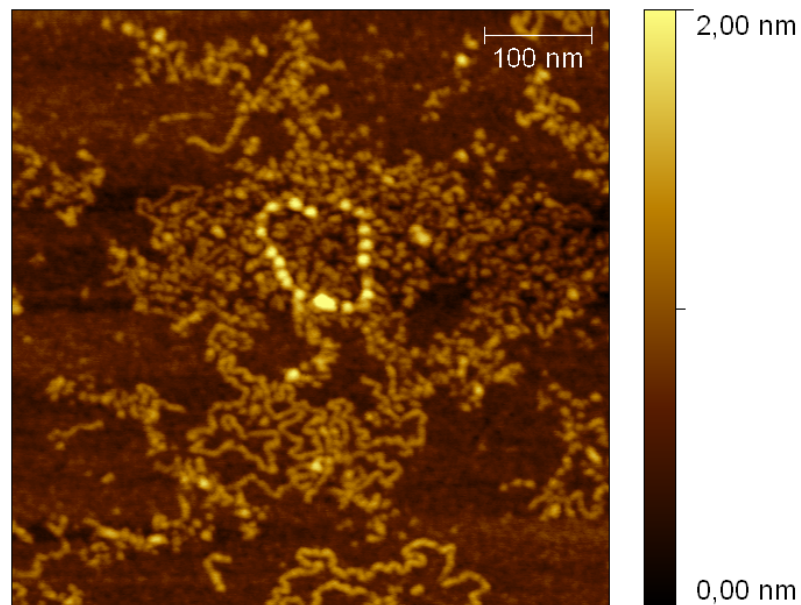
**Abbildung 5.20:** *MAF (0,1 mg/ml in CMF-Puffer + 10 mM Ca<sup>2+</sup>) auf Glimmer: Ein hochauflösendes Bild des Ringes eines MAF. Auffällig ist das Fehlen einiger Arme.*



**Abbildung 5.21:** *MAF (0,1 mg/ml in CMF-Puffer + 10 mM Ca<sup>2+</sup>) auf Glimmer: Auch hier fehlen einige Arme.*



**Abbildung 5.22:** *MAF (1  $\mu\text{g/ml}$  in CMF-Puffer + 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) auf APTES-Glimmer: Dieses Bild zeigt einen größeren Scanbereich und man sieht deutlich mehr Arme an den Ringen als auf einfachem Glimmer. Man erkennt auch, dass häufig zwei oder mehr MAF neben einander liegen.*



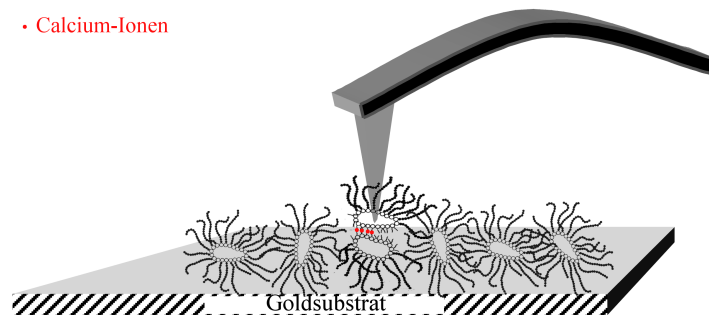
**Abbildung 5.23:** *MAF (1  $\mu\text{g/ml}$  in CMF-Puffer + 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) auf APTES-Glimmer: Ein Zoom aus dem vorigen Bild.*

obwohl die Konzentration 100 mal so groß ist.

Es ist anzumerken, dass im Vergleich zu Abbildungen aus früheren Arbeiten [75] sich die Erscheinung der MAF verändert hat, besonders in Hinsicht auf die Arme. Die Ursachen könnten das Altern oder eine eventuelle Verschmutzung der Probe sein.

## 5.2.2 Kraftspektroskopische Untersuchungen

Dass die Bindung zwischen den MAF abhängig von der Calciumkonzentration ist, sowie die Kraft-Distanz-Kurven mit Sägezahnprofil, wurde bereits 1995 beobachtet [7]. Auch in weiteren kraftspektroskopischen Experimenten mit den MAF in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Puffern hat man Kraft-Distanz-Kurven mit Sägezahnprofil gesehen [70]. Als Bindungs-Akteure vermutete man die g200-Glykaneinheiten (Abschnitt 3.3.1). Ergebnisse aus den kraftspektroskopischen Messungen an den g200 haben diese Vermutung bekräftigt [88]. Aber die Herkunft des Sägezahnprofils in den Kraft-Distanz-Kurven in den MAF-MAF Experimenten ist dennoch nicht ganz klar.

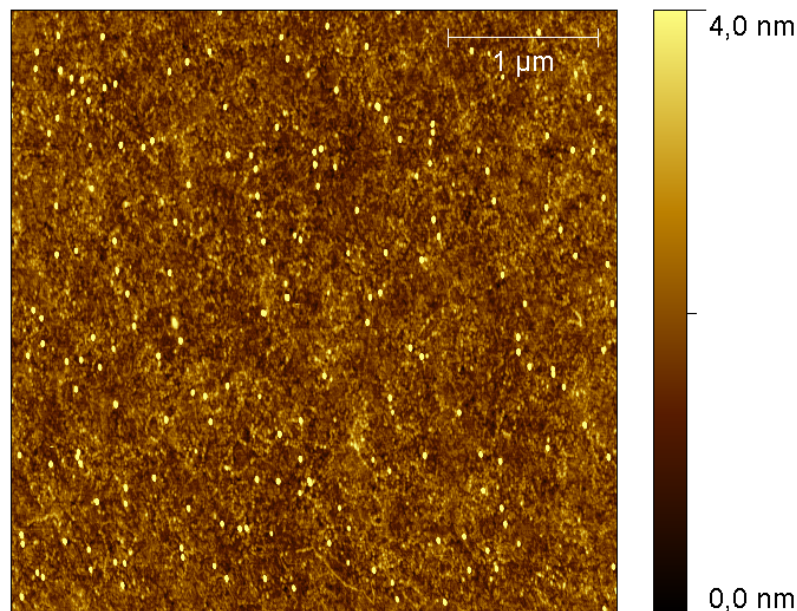


**Abbildung 5.24:** Schematische Darstellung einer möglichen Geometrie für Bindungsereignisse zwischen MAF. Die roten Punkte stellen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen dar, die die Bindung zwischen den g200 vermitteln.

In dieser Arbeit wird versucht mittels einiger kraftspektroskopischer Experimente den Ursprung der Bindungsereignisse in den MAF-MAF Experimenten zu analysieren. Dazu werden Experimente auf mit MAF funktionalisiertem Gold (Abbildung 5.24) und auf einer plasmaoxidierten Glasoberfläche in CMF-Puffer + 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  gemacht. In allen Messungen wird ein mit MAF funktionalisierter Kraftsensor (Abschnitt 4.3.5) verwendet. Die kraftspektroskopischen Parameter (Abschnitt 4.3.6) werden festgehalten. Wenn nicht explizit genannt, wird eine Rückziehggeschwindigkeit von 2000 nm/s verwendet.

### 5.2.2.1 Verifizierung der Bindung

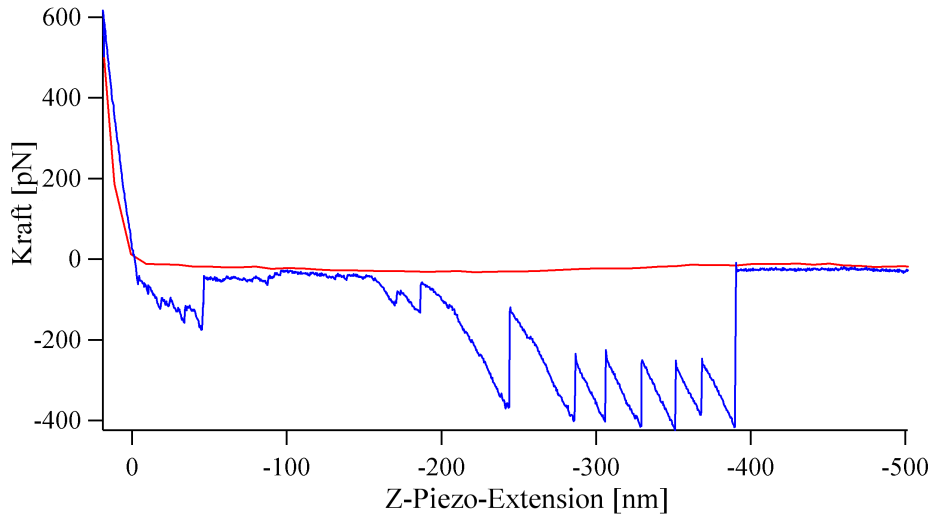
Um die Bindungsereignisse in den kraftspektroskopischen Messungen zwischen den MAF nachzuvollziehen, werden zunächst Experimente auf funktionalisierten Goldsubstraten (Abschnitt 4.3.5) in CMF-Puffer + 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  durchgeführt. Abbildung 5.25 zeigt eine mögliche Verteilung der MAF auf dem Goldsubstrat, während einer Messung. In diesen Experimenten hat man auch wie in [7, 70] Kraft-Distanz-Kurven mit Sägezahnprofil beobachten können. Zwei solche Kraft-Distanz-Kurven aus kraftspektroskopischen Experimenten zwischen den MAF bei Rückziehggeschwindigkeiten von 100 nm/s und 2000 nm/s sind in den Abbildungen 5.26 und 5.27 dargestellt.



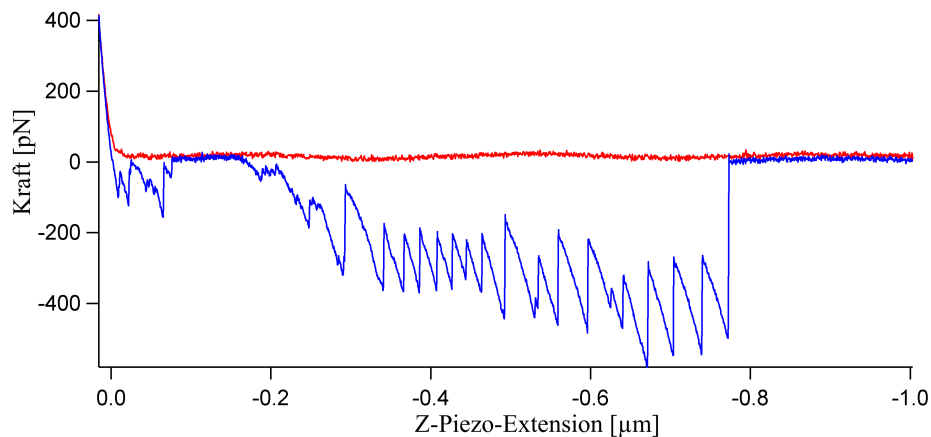
**Abbildung 5.25:** *MAF (0,1 mg/ml in CMF-Puffer + 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) auf Gold: Hier soll die mögliche Verteilung der MAF auf dem Goldsubstrat, während des kraftspektroskopischen Experiments gezeigt werden.*

Da sich bei den Aggrecanen gezeigt hat, dass charakteristische Bindungsereignisse (Sägezahnprofil) auch nur zwischen einer plasmaoxidierten Glasoberfläche und den Aggrecanen auftreten, werden deshalb auch bei den MAF kraftspektroskopische Experimente auf einer plasmaoxidierten Glasoberfläche durchgeführt, wo die MAF nur auf dem Kraftsensor immobilisiert sind. Auch in diesem Fall hat man Kraft-Distanz-Kurven mit Sägezahnprofil erhalten (Abbildung 5.28). Außerdem wird noch eine Messung auf einem

reinen Goldsubstrat gemacht, um sicherzustellen, dass die observierten Bindungsereignisse die MAF-MAF Wechselwirkung zeigen, wenn die MAF auf dem Gold immobilisiert werden.



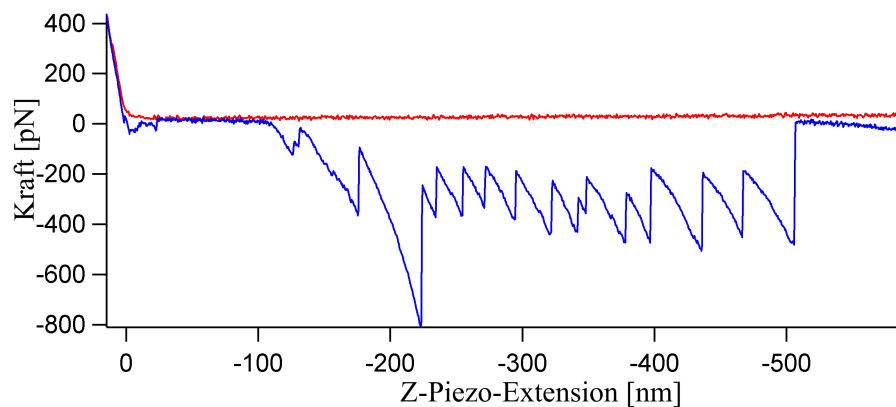
**Abbildung 5.26:** Eine Kraft-Distanz-Kurve bei einer Rückziehggeschwindigkeit von 100 nm/s mit Sägezahnprofil, die die Wechselwirkung zwischen MAF-MAF in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  zeigt. Die einzelnen Abrissereignisse zeigen vermutlich jeweils das Brechen einer Bindung zwischen zwei g200-Glykanen.



**Abbildung 5.27:** Hier eine Kraft-Distanz-Kurve bei einer Rückziehggeschwindigkeit von 2000 nm/s mit Sägezahnprofil, die die Wechselwirkung zwischen MAF-MAF darstellt.

Bei den MAF kristallisiert sich ein ähnliches Verhalten wie bei den Aggrecanen her-

aus. Denn auch bei Experimenten mit nur einer plasmaoxidierten Glasoberfläche als Substrat sind Kraft-Distanz-Kurven mit Sägezahnprofil beobachtet worden (Abbildung 5.28), wobei auf reinem Gold als Substrat die Bindungsaktivität verschwindend gering und unspezifisch ist (Abbildung 5.29 c)). Dieses wiederum bedeutet, dass die ermittelten Bindungsereignisse die MAF-MAF Wechselwirkung zeigen, wenn MAF auf Gold immobilisiert werden.

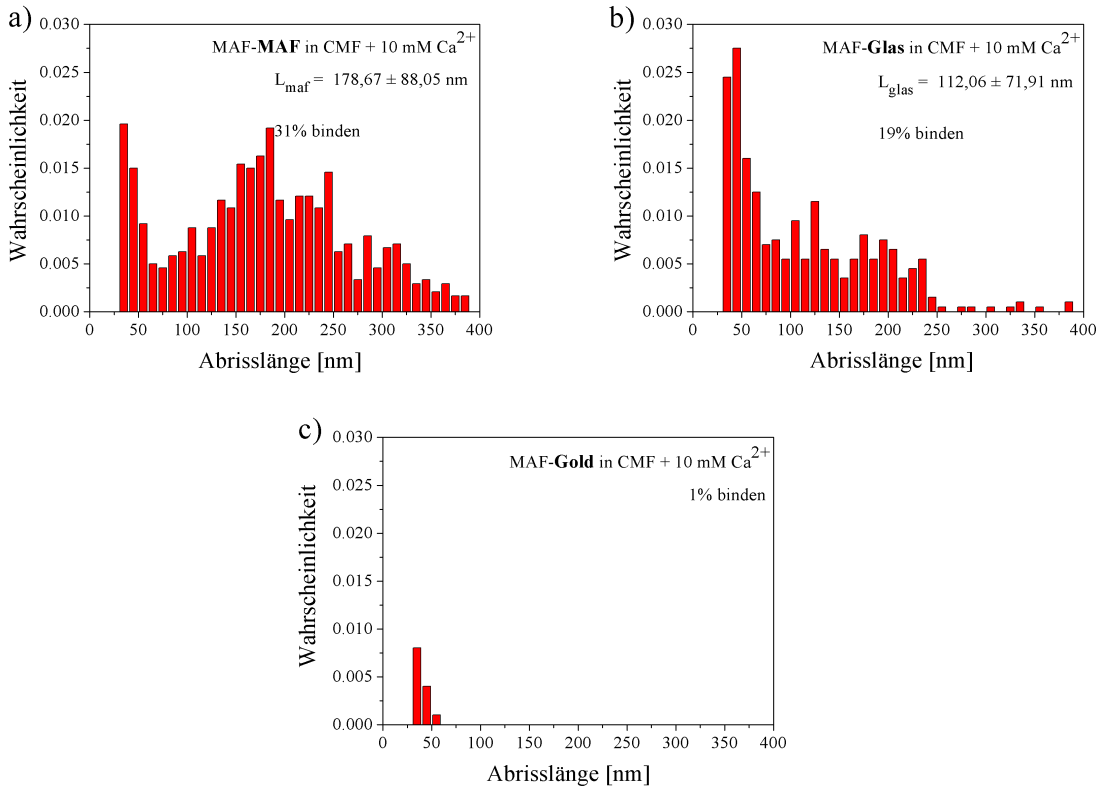


**Abbildung 5.28:** Eine Kraft-Distanz-Kurve bei einer Rückziehggeschwindigkeit von 2000 nm/s mit Sägezahnprofil, die die Wechselwirkung zwischen MAF und einer plasmaoxidierten Glasoberfläche zeigt. Man beachte in allen drei präsentierten Kraft-Distanz-Kurven (Abbildungen 5.26 und 5.27) die ähnlichen Kräfte.

Die erhaltenen Resultate aus den drei Messungen sind in Abbildung 5.29 dargestellt. Als aussagende Größe ist die Abrisslänge betrachtet worden. Für die MAF-MAF Messungen ergibt sich eine recht breite Verteilung der Abrisslängen mit einer mittleren Abrisslänge von  $L_{maf} = 178,67 \pm 88,05$  nm und einer Bindungswahrscheinlichkeit von 31%. Erwartungsgemäß sollte sich die Abrisslänge bei dem Experiment MAF-plasmaoxidierte Glasoberfläche verkleinern, da sich hier die MAF nur auf dem Kraftsensor befinden. Das tut sie auch und zwar beträgt die mittlere Abrisslänge aus der Messung MAF-plasmaoxidierte Glasoberfläche  $L_{glas} = 112,06 \pm 71,91$  nm, wobei hier die Bindewahrscheinlichkeit auf 19% zurückgegangen ist (Abbildung 5.29 b)).

Diese Resultate zeigen eine vergleichbare Tendenz zu den Ergebnissen der Messungen für das Aggrecan (Abschnitt 5.1.2.3), wo die observierten Bindungsereignisse mit einer möglichen Wechselwirkung zwischen den negativ geladenen Glykosaminoglykanen identifiziert worden sind. Denn auch die g200 enthalten ein sulfatisiertes Disaccharid (Abschnitt 3.3.1) und somit negativ geladene Gruppen, die höchstwahrscheinlich über

$\text{Ca}^{2+}$  mit den negativen Gruppen auf der plasmaoxidierten Glasoberfläche interagieren. Also könnte das beobachtete Sägezahnprofil in den MAF-MAF Experimenten durchaus von der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen g200 Wechselwirkung herrühren.

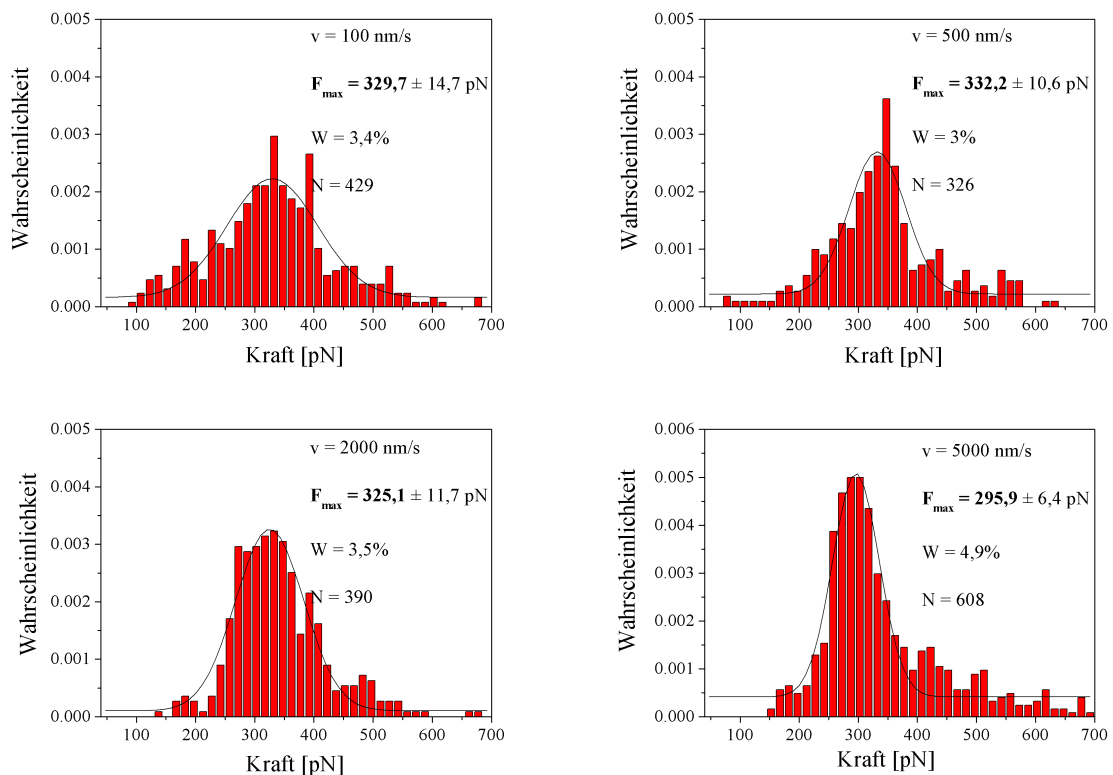


**Abbildung 5.29:** Kraftspektroskopische Messung in CMF-Puffer + 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  für die Untersuchung des Bindungsvermögens an: **a)** MAF-MAF: Hier zeigt sich eine recht hohe Bindungswahrscheinlichkeit von 31%; **b)** MAF-plasmaoxidierte Glasoberfläche: mit einer geringeren Bindungsaktivität von 19%; **c)** MAF-Goldoberfläche: fast keine und nicht spezifische Bindungsaktivität.

### 5.2.2.2 Dynamische Kraftspektroskopie

Mittels der dynamischen Kraftspektroskopie wird versucht die Off-Ratenkonstante  $k_{\text{off}}^0$  des MAF zu bestimmen. Dazu werden kraftspektroskopische Messungen bei vier verschiedenen Rückziehggeschwindigkeiten in CMF-Puffer + 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  durchgeführt (100 nm/s, 500 nm/s, 2000 nm/s und 5000 nm/s). Dabei wird für alle Messungen dieselbe Probe (MAF auf Gold) verwendet und für die Rückziehggeschwindigkeiten 100 nm/s,

500 nm/s und 2000 nm/s auch derselbe funktionalisierte Kraftsensor. Die erhaltenen Verteilungen von Dissoziationskräften sind in Abbildung 5.30 dargestellt, wobei die wahrscheinlichste Abrisskraft  $F_{max}$  aus jedem Histogramm durch einen Fit mit einer Gaußfunktion (Abschnitt 5.1.2.4) ermittelt wird.



**Abbildung 5.30:** Die Dissoziationskräfte-Verteilungen für die Rückziehggeschwindigkeiten 100 nm/s bis 5000 nm/s. Rechts oben ist die wahrscheinlichste Abrisskraft, die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Kurven mit Sägezahnprofil und die absolute Anzahl der Dissoziationsereignisse  $N$  in diesen Kurven angegeben.

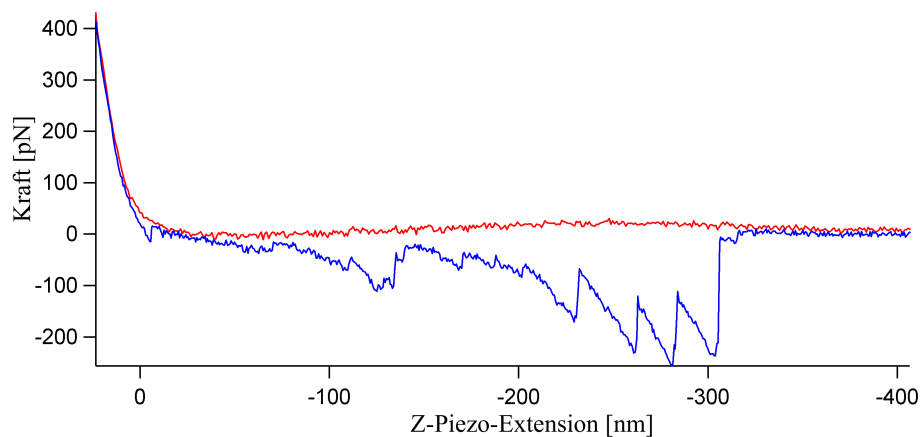
Den Histogrammen kann man entnehmen, dass die wahrscheinlichsten Abrisskräfte  $F_{max}$  sehr nah bei einander liegen, abgesehen von der Geschwindigkeit 5000 nm/s, die aber auch mit einem anderen Kraftsensor aufgenommen worden ist. Die Verwendung eines anderen Kraftsensors ist jedoch mit einem Fehler von 10 - 15% behaftet, wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben wird. Zieht man diesen Fehler in betracht, so verschiebt sich auch die wahrscheinlichste Abrisskraft für die Geschwindigkeit 5000 nm/s in den Bereich der wahrscheinlichsten Abrisskräfte der anderen Geschwindigkeiten. In diesem Fall kann der von Evans und Ritchie [3] (Abschnitt 2.2.2) vorhergesagte Zusammenhang



nicht beobachtet werden. Das bedeutet aber nicht, dass die Standard-Theorie falsch ist. Wohl eher liegt es an der hohen Komplexität der aufgenommenen Kraft-Distanz-Kurven, deren Handhabung nicht so trivial ist, wie man es sich vorgestellt hat. Hier zeigt sich, dass die einfache Vermessung der Kräfte in den Kraft-Distanz-Kurven nicht zufriedenstellend ist. Dieses Ergebnis ist zu erwarten gewesen. Da aber derzeit noch keine theoretische Beschreibung für solche Ereignisse existiert, ist die angewandte Auswertungsmethode ein Versuch gewesen, um eventuelle Zusammenhänge zu erkennen.

### 5.3 Aggrecan vs. MAF

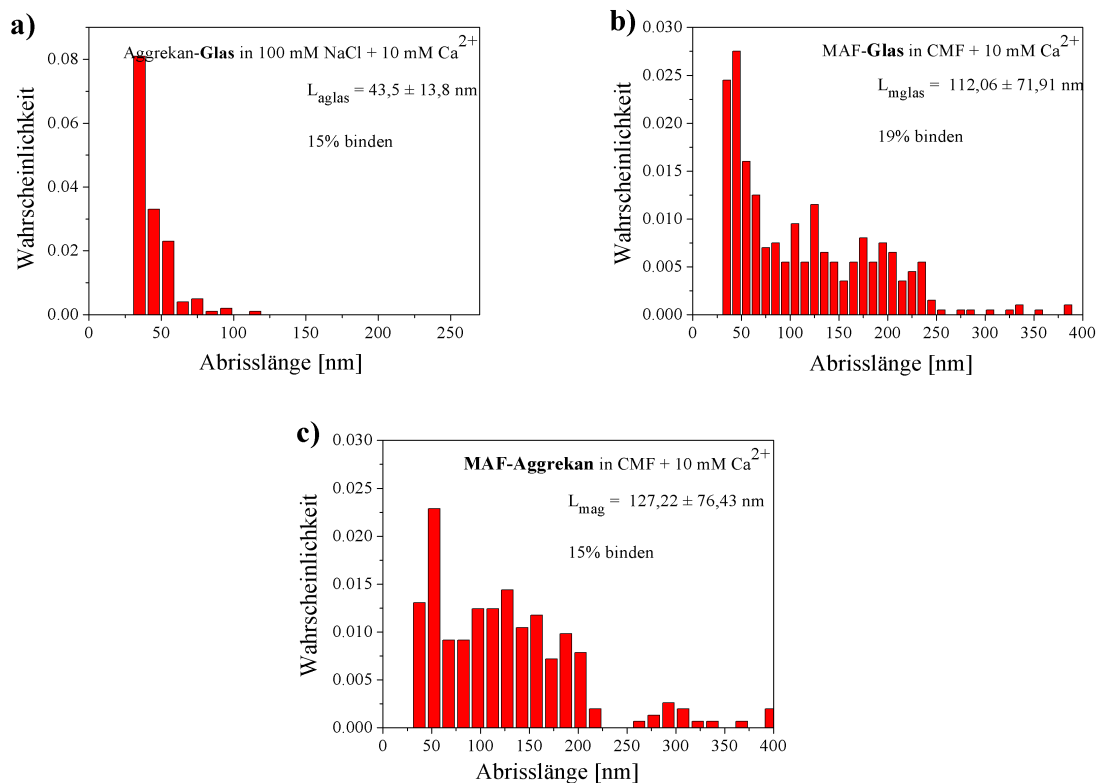
Da Einiges darauf hin deutet, dass die Selbstadhäsion zwischen den untersuchten Proteoglykanen höchstwahrscheinlich auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Glykan-Glykan Wechselwirkung zurückzuführen ist, stellt sich die Frage, ob MAF und Aggrecane auch untereinander wechselwirken. Dazu wird ein kraftspektroskopisches Experiment in CMF-Puffer + 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  durchgeführt, in dem ein mit Aggrecanen funktionalisierter Kraftsensor und ein mit MAF funktionalisiertes Goldsubstrat verwendet werden. Man kann auch in dieser Messung Kraft-Distanz-Kurven mit Sägezahnprofil aufnehmen, von denen eine in Abbildung 5.31 gezeigt ist.



**Abbildung 5.31:** Eine Kraft-Distanz-Kurve bei einer Rückziehggeschwindigkeit von 2000 nm/s mit Sägezahnprofil, die die Wechselwirkung zwischen MAF-Aggrecan in CMF-Puffer + 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  zeigt.

In Abbildung 5.32 sind die erhaltenen mittleren Abrisslängen zwischen Aggrecan-plasmaoxidiertes Glasoberfläche  $L_{\text{aglas}} = 43,5 \pm 13,8$  nm und MAF-plasmaoxidiertes

Glasoberfläche  $L_{mglas} = 112,06 \pm 71,91$  nm noch einmal aufgeführt. Vergleicht man diese mit der erhaltenen mittleren Abrisslänge für MAF-Aggregan  $L_{mag} = 127,22 \pm 76,43$  nm, so wird ersichtlich, dass auch die Bindung zwischen MAF-Aggregan auf jeden Fall von den involvierten Proteoglykanen herrührt und vermutlich auch auf die Glykan-Glykan Wechselwirkung zurückzuführen ist.



**Abbildung 5.32:** Vergleich der Abrisslängen zwischen: **a)** Aggregan-plasmaoxidierte Glasoberfläche; **b)** MAF-plasmaoxidierte Glasoberfläche; **c)** MAF-Aggregan. Rechts in dem jeweiligen Histogramm ist die mittlere Abrisslänge und die Bindungswahrscheinlichkeit angegeben.

Über die Spezifität der Bindung der untersuchten Proteoglykane mit sich selbst und untereinander kann hier keine genaue Aussage getroffen werden, denn wie man gesehen hat, binden beide auch an eine plasmaoxidierte Glasoberfläche. Dazu muss man anmerken, dass eine plasmaoxidierte Glasoberfläche nicht physiologisch ist. Aber man kann mit Sicherheit sagen, dass Ca<sup>2+</sup> eine zentrale Rolle in diesen Bindungen einnimmt.

## 6 Zusammenfassung

Das Rasterkraftmikroskop ist ein vielseitiges Werkzeug, das Analysen an sehr unterschiedlichen Systemen ermöglicht. In dieser Arbeit wurden rasterkraftmikroskopische sowie kraftspektroskopische Untersuchungen an zwei verschiedenen Proteoglykanen durchgeführt: das Aggrecan aus dem bovinen artikulären Knorpel und der Aggregationsfaktor aus dem Meeresschwamm *Microciona prolifera*.

An beiden Systemen gelang es, durch Optimierung der APTES-Beschichtung des Glimmers, hochauflösende AFM-Aufnahmen zu erzeugen, die für eine „präzise“ Vermessung der Proteoglykane dienten.

Bei kraftspektroskopischen Untersuchungen an den Aggrecanen hat man im Gegensatz zu den Experimenten aus [84] erstmalig Kraft-Distanz-Kurven mit einem Sägezahnprofil aufnehmen können, wodurch sich einzelne Bindungsereignisse beobachten ließen. Auch die erhaltenen Dissipationsenergien, die um einen Faktor 100-1000 kleiner sind als in [84], spiegeln kraftspektroskopische Messungen an Aggrecanen auf Einzelmolekülniveau wieder. Zudem wurde durch kraftspektroskopische Messungen in verschiedenen Salzlösungen und auf verschiedenen Substratoberflächen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit sowie die  $\text{Ca}^{2+}$ -Selektivität der Selbstadhäsion des Aggrecans nachgewiesen. Außerdem konnte man mit diesen Messungen die Glykosaminoglykane als die Verursacher der Bindung zwischen den Aggrecanen identifizieren. Desweiteren konnte man mit der *dynamischen Kraftspektroskopie* die Off-Ratenkonstante  $k_{off}^0$  des Aggrecans bestimmen. Um diese Off-Ratenkonstante bewerten zu können, sind jedoch Messungen an einzelnen (chemisch aufgereinigten) Glykosaminoglykanen des Aggrecans nötig, damit ein Vergleich möglich wird.

Für die MAF konnte das kraftspektroskopische Experiment aus [70] erfolgreich wiederholt werden. Außerdem wird durch die erhaltenen Ergebnisse die Annahme verstärkt, dass für den Ursprung des in den Kraft-Distanz-Kurven beobachteten Sägezahnprofils die g200-Glykaneinheiten des MAF verantwortlich sind. Die Ermittlung der Off-Ratenkonstante für die MAF mit der *dynamischen Kraftspektroskopie* ist aufgrund der

hohen Komplexität der Kraft-Distanz-Kurven bisher nicht möglich gewesen. Hier zeigt sich der hohe Anspruch an die Interpretation und Auswertungsmethode von multiplen Ereignissen.

Obwohl die Struktur der beiden untersuchten Proteoglykane recht verschieden ist, hat sich gezeigt, dass  $\text{Ca}^{2+}$  bei beiden die zentrale Rolle in der Selbstadhäsion der Moleküle einnimmt und somit ein wichtiges Element für die Glykan-Glykan Wechselwirkungen ist.

# Literaturverzeichnis

- [1] FISCHER, E.: *Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme*. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 27:2985–2993, 1894.
- [2] HOMOLA, DR. JIRÍ: *Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors*. Springer Verlag, 2006.
- [3] EVANS, E. und K. RITCHIE: *Dynamic strength of molecular adhesion bonds*. Biophysical Journal, 72:1541–1555, 1997.
- [4] BINNIG, G., C.F. QUATE und C. GERBER: *Atomic Force Microscope*. Physical Review Letters, 56:930–933, 1986.
- [5] LEE, G. U., D. A. KIDWELL und R. J. COLTON: *Sensing Discrete Streptavidin-Biotin Interactions with Atomic Force Microscopy*. Langmuir, 10:354–357, 1994.
- [6] DAMMER, U., M. HEGNER, D. ANSELMETTI, P. WAGNER, M. DREIER, W. HUBER und H. J. GÜNTHERODT: *Specific antigen/antibody interactions measured by force microscopy*. Biophysical Journal, 70:2437–2441, 1996.
- [7] DAMMER, U., O. POPESCU, P. WAGNER, D. ANSELMETTI, H. J. GUNTHERODT und G. N. MISEVIC: *Binding strength between cell adhesion proteoglycans measured by atomic force microscopy*. Science, 267:1173–1175, 1995.
- [8] FRITZ, J., A. G. KATOPODIS, F. KOLBINGER und D. ANSELMETTI: *Force-mediated kinetics of single P-selectin/ligand complexes observed by atomic force microscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95:12283–12288, 1998.
- [9] KJELLÉN, L. und U. LINDAHL: *Proteoglycans: structures and interactions*. Annual Review of Biochemistry, 60:443–475, 1991.

- [10] KRESSE, H. und E. SCHÖNHERR: *Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control*. Journal of Cell Physiology, 189:266–274, 2001.
- [11] EGGENS, I., B. FENDERSON, T. TOYOKUNI, B. DEAN, M. STROUD und S. HAKOMORI: *Specific interaction between Lex and Lex determinants. A possible basis for cell recognition in preimplantation embryos and in embryonal carcinoma cells*. Journal of Biological Chemistry, 264:9476–9484, 1989.
- [12] SANDERSON, R. D.: *Heparan sulfate proteoglycans in invasion and metastasis*. Seminars in Cell and Developmental Biology, 12:89–98, 2001.
- [13] BLACKHALL, F. H., C. L. MERRY, E. J. DAVIES und G. C. JAYSON: *Heparan sulfate proteoglycans and cancer*. British Journal of Cancer, 85:1094–1098, 2001.
- [14] BINNIG, G. und H. ROHRER: *Scanning tunneling microscopy*. Helvetica Physica Acta, 55:726–735, 1982.
- [15] BINNIG, G., H. ROHRER, C. GERBER und E. WEIBEL: *Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy*. Physical Review Letters, 49:57–61, 1982.
- [16] POHL, D. W., W. DENK und M. LANZ: *Optical stethoscopy: Image recording with resolution  $\lambda/20$* . Applied Physics Letters, 44:651–653, 1984.
- [17] ALEXANDER, S., L. HELLEMANS, O. MARTI, J. SCHNEIR, V. ELINGS und P. K. HANSMA: *An atomic-resolution atomic-force microscope implemented using an optical lever*. Journal of Applied Physics, 65:164, 1989.
- [18] MEYER, G. und N.M. AMER: *Novel optical approach to atomic force microscopy*. Applied Physics Letters, 53:1045–1047, 1988.
- [19] MEYER, G. und N.M. AMER: *Simultaneous Measurement of Lateral and Normal Forces with an Optical-Beam-Deflection Atomic Force Microscope*. Applied Physics Letters, 57:2089–2091, 1990.
- [20] RUGAR., D., H. J. MAMIN und P. GUETHNER: *Improved fiber-optic interferometer for atomic force microscopy*. Applied Physics Letters, 55:2588–2590, 1989.
- [21] NEUBAUER, G., S. R. COHEN, G. M. MCCLELLAND, D. HORNE und C. M. MATE: *Force microscopy with a bidirectional capacitance sensor*. Review of Scientific Instruments, 61:2296–2308, 1990.

- [22] SARID, D. und V. ELINGS: *Review of scanning force microscopy*. Journal of Vacuum Science and Technology B, 9:431–437, 1991.
- [23] MEYER, E.: *Atomic Force Microscopy*. Progress in Surface Science, 41:3–49, 1992.
- [24] MULLER, P.: *Glossary of Terms Used in Physical Organic Chemistry*. Pure and Applied Chemistry, 66:1077–1184, 1994.
- [25] ISRAELACHVILI, J. N. und D. TABOR: *The Measurement of Van Der Waals Dispersion Forces in the Range 1.5 to 130 nm*. Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences, 331:19–38, 1972.
- [26] BURNHAM, N. A., R. J. COLTON und H. M. POLLOCK: *Interpretation issues in force microscopy*. Journal of Vacuum Science and Technology, 9:2548–2555, 1991.
- [27] MAGONOV, S. N.: *Surface Characterization of Materials at Ambient Conditions by Scanning Tunneling Microscopy (STM) and Atomic Force Microscopy (AFM)*. Applied Spectroscopy Reviews, 28:1–121, 1993.
- [28] MARTIN, Y., C. C. WILLIAMS und H. K. WICKRAMASIGHE: *Atomic force microscope-force mapping and profiling on sub 100-Å scale*. Journal of Applied Physics, 61:4723–4729, 1987.
- [29] GARCÍA, R., J. TAMAYO, M. CALLEJA und F. GARCÍA: *Phase contrast in tapping-mode scanning force microscopy*. Applied Physics A Materials Science & Processing, 66:309–312, 1998.
- [30] GIESSIBL, F. J.: *Atomic resolution of silicon (111)7x7 by atomic force microscopy through repulsive and attractive forces*. Science, 267:1451–1455, 1995.
- [31] FUKUMA, T., T. ICHII, K. KOBAYASHI, H. YAMADA und K. MATSUSHIGE: *True-molecular resolution imaging by frequency modulation atomic force microscopy in various environments*. Applied Physics Letters, 86:034103–3, 2005.
- [32] FUKUMA, T., M. J. HIGGINS und S. P. JARVIS: *Direct Imaging of Individual Intrinsic Hydration Layers on Lipid Bilayers at Ångstrom Resolution*. Biophysical Journal, 92:3603–3609, 2007.

- [33] TAMAYO, J. und R. GARCÍA: *Deformation, Contact Time, and Phase Contrast in Tapping Mode Scanning Force Microscopy*. Langmuir, 12:4430–4435, 1996.
- [34] ZHONG, Q., D. INNISS, K. KJOLLER und V.B. ELINGS: *Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy*. Surface science letter, 290:L688–L692, 1993.
- [35] RIEF, M., M. GAUTEL, F. OESTERHELT, J. M. FERNANDEZ und H. E. GAUB: *Reversible Unfolding of Individual Titin Immunoglobulin Domains by AFM*. Science, 276:1109–1112, 1997.
- [36] BUTT, H. J., B. CAPPELLA und M. KAPPL: *Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications*. Surface Science Reports, 59:1–152, 2005.
- [37] AKSU, S. B. und J. A. TURNER: *Calibration of atomic force microscope cantilevers using piezolevers*. Review of Scientific Instruments, 78:043704.1–043704.8, 2007.
- [38] WALHORN, V.: *Rasterkraftmikroskopie mit kleinen Cantilevern*. Diplomarbeit, Universität Bielefeld, 2004.
- [39] PROKSCH, R., T. E. SCHÄFFER, J. P. CLEVELAND, R. C. CALLAHAN und M. B. VIANI: *Finite optical spot size and position corrections in thermal spring constant calibration*. Nanotechnology, 15:1344–1350, 2004.
- [40] GIBSON, C. T., B. L. WEEKSA, C. ABELLA, T. RAYMENTA und S. MYHRAB: *Calibration of AFM cantilever spring constants*. Ultramicroscopy, 97:113–118, 2002.
- [41] LÉVY, R. und M. MAALOU: *Measuring the spring constant of atomic force microscope cantilevers: thermal fluctuations and other methods*. Nanotechnology, 13:33–37, 2002.
- [42] HÄNGGI, P., P. TALKNER und M. BORKOVEC: *Reaction-rate theory: fifty years after Kramers*. Reviews of Modern Physics, 62:254–342, 1990.
- [43] EYRING, H.: *The Activated Complex and the Absolute Rate of Chemical Reactions*. Chemical Reviews, 17:65–77, 1935.



- [44] KRAMERS, H. A.: *Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions*. Physica, 7:284–304, 1940.
- [45] BELL, G. I.: *Models for the specific adhesion of cells to cells*. Science, 200:618–627, 1978.
- [46] ARRHENIUS, S.: *Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei Inversion von Rohrzucker durch Säuren*. Zeitschrift für physikalische Chemie, 4:226–248, 1889.
- [47] BELL, G. I.: *Models for the Specific Adhesion of Cells to Cells*. Science, 200:618–627, 1978.
- [48] EVANS, E.: *Energy landscapes of biomolecular adhesion and receptor anchoring at interfaces explored with dynamic force spectroscopy*. Faraday Discussions, 111:1–16, 1998.
- [49] EVANS, E.: *Probing the Relation between Force—Lifetime—and Chemistry in Single Molecular Bonds*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 30:105–128, 2001.
- [50] LODISH, H., A. BERK, S. L. ZIPURSKY, P. MATSUDAIRA, D. BALTIMORE und J. E. DARNELL: *Molekulare Zellbiologie*. Spektrum, 2001.
- [51] HASSELL, J. R., J. H. KIMURA und V. C. HASCALL: *Proteoglycan core protein families*. Annual Review of Biochemistry, 55:539–567, 1986.
- [52] GANTEN, D. und W. K. AICHER: *Molekularmedizinische Grundlagen von rheumatischen Erkrankungen*. Springer Verlag, 2003.
- [53] OLDBERG, A., P. ANTONSSON und D. HEINEGÅRD: *The partial amino acid sequence of bovine cartilage proteoglycan, deduced from a cDNA clone, contains numerous Ser-Gly sequences arranged in homologous repeats*. Biochemical Journal, 243:255–259, 1987.
- [54] DOEGE, K. J., M. SASAKI, T. KIMURA und Y. YAMADA: *Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms*. Journal of Biological Chemistry, 266:894–902, 1991.

- [55] SANDY, J. D., C. R. FLANNERY, R. E. BOYNTON und P. J. NEAME: *Isolation and characterization of disulfide-bonded peptides from the three globular domains of aggregating cartilage proteoglycan*. Journal of Biological Chemistry, 265:21108–21113, 1990.
- [56] NG, L., A. J. GRODZINSKY, P. PATWARI, J. SANDY, A. PLAAS und C. ORTIZ: *Individual cartilage aggrecan macromolecules and their constituent glycosaminoglycans visualized via atomic force microscopy*. Journal of Structural Biology, 143:242–257, 2003.
- [57] HASCALL, V. C.: *Interaction of cartilage proteoglycans with hyaluronic acid*. Journal of Supramolecular Structure, 7:101–120, 1977.
- [58] BUSCHMANN, M. D. und A. J. GRODZINSKY: *A molecular model of proteoglycan-associated electrostatic forces in cartilage mechanics*. Journal of biomechanical engineering, 117:179–192, 1995.
- [59] PLAAS, A. H., S. WONG-PALMS, P. J. ROUGHLEY, R. J. MIDURA und V. C. HASCALL: *Chemical and immunological assay of the nonreducing terminal residues of chondroitin sulfate from human aggrecan*. Journal of Biological Chemistry, 272:20603–20610, 1997.
- [60] HENKART, P., S. HUMPHREYS und T. HUMPHREYS: *Characterization of sponge aggregation factor. Unique proteoglycan complex*. Biochemistry, 12:3045–3050, 1973.
- [61] HUMPHREYS, T.: *Chemical dissolution and in vitro reconstruction of sponge cell adhesions: Isolation and functional demonstration of the components involved*. Developmental Biology, 8:27–47, 1963.
- [62] MOSCONA, A. A.: *Studies on Cell Aggregation: Demonstration of Materials with Selective Cell-Binding Activity*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 49:742–747, 1963.
- [63] WILSON, H. V.: *On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges*. Journal of Experimental Zoology, 5:245–258, 1907.
- [64] GALTSOFF, P. S.: *Regeneration after dissociation (an experimental study on sponges). I. Behavior of dissociated cells of microciona prolifera under normal and altered conditions*. Journal of Experimental Zoology, 42:183–221, 1925.

- [65] JARCHOW, J. und M. M. BURGER: *Species-specific association of the cellaggregation molecule mediates recognition in marine sponges*. Cell Adhesion Commun, 6:405–414, 1998.
- [66] MISEVIC, G. N. und M. M. BURGER: *The species-specific cell-binding site of the aggregation factor from the sponge Microciona prolifera is a highly repetitive novel glycan containing glucuronic acid, fucose, and mannose*. Journal of Biological Chemistry, 265:20577–20584, 1990.
- [67] MISEVIC, G. N. und M. M. BURGER: *Carbohydrate-carbohydrate interactions of a novel acidic glycan can mediate sponge cell adhesion*. Journal of Biological Chemistry, 268:4922–4929, 1993.
- [68] FERNÁNDEZ-BUSQUETS, X., R. A. KAMMERER und M. M. BURGER: *A 35 kDa Protein is the Basic Unit of the Core from the  $2 \times 10^4$  kDa Aggregation Factor Responsible for Species-specific Cell Adhesion in the Marine Sponge Microciona prolifera*. Journal of Biological Chemistry, 271:23558–23565, 1996.
- [69] RICE, D. J. und T. HUMPHREYS: *Two  $Ca^{2+}$  functions are demonstrated by the substitution of specific divalent and lanthanide cations for the  $Ca^{2+}$  required by the aggregation factor complex from the marine sponge, Microciona prolifera*. Journal of Biological Chemistry, 258:6394–6399, 1983.
- [70] GARCIA-MANYES, S., I. BUCIOR, R. ROS, D. ANSELMETTI, F. SANZ, M. M. BURGER und X. FERNÁNDEZ-BUSQUETS: *Proteoglycan Mechanics Studied by Single-molecule Force Spectroscopy of Allotypic Cell Adhesion Glycans*. Journal of Biological Chemistry, 281:5992–5999, 2006.
- [71] MISEVIC, G. N., J. FINNE und M. M. BURGER: *Involvement of carbohydrates as multiple low affinity interaction sites in the self-association of the aggregation factor from the marine sponge Microciona prolifera*. Journal of Biological Chemistry, 262:5870–5877, 1987.
- [72] MISEVIC, G. N. und M. M. BURGER: *Reconstitution of high cell binding affinity of a marine sponge aggregation factor by cross-linking of small low affinity fragments into a large polyvalent polymer*. Journal of Biological Chemistry, 261:2853–2859, 1986.

- [73] SPILLMANN, D., K. HARD, J. THOMAS-OATES, J. F. Vliegenthart, G. MISEVIC, M. M. BURGER und J. FINNE: *Characterization of a novel pyruvylated carbohydrate unit implicated in the cell aggregation of the marine sponge *Microciona prolifera**. Journal of Biological Chemistry, 268:13378–13387, 1993.
- [74] SPILLMANN, D., J. E. THOMAS-OATES, J. A. VAN KUIK, J. F. Vliegenthart, G. MISEVIC, M. M. BURGER und J. FINNE: *Characterization of a novel sulfated carbohydrate unit implicated in the carbohydrate-carbohydrate-mediated cell aggregation of the marine sponge *Microciona prolifera**. Journal of Biological Chemistry, 270:5089–5097, 1995.
- [75] JARCHOWA, J., J. FRITZ, D. ANSELMETTI, A. CALABROD, V. C. HASCALL, D. GEROSA, M. M. BURGER und X. FERNÁNDEZ-BUSQUETS: *Supramolecular Structure of a New Family of Circular Proteoglycans Mediating Cell Adhesion in Sponges*. Journal of Structural Biology, 132:95–105, 2000.
- [76] KUHNS, W. J., X. FERNÁNDEZ-BUSQUETS, M. M. BURGER, M. HO und E. TURLEY: *Hyaluronic Acid-Receptor Binding Demonstrated by Synthetic Adhesive Proteoglycan Peptide Constructs and by Cell Receptors on the Marine Sponge *Microciona prolifera**. Biological Bulletin, 195:216–218, 1998.
- [77] MÜLLER, W. E.: *Molecular phylogeny of Metazoa (animals): monophyletic origin*. Naturwissenschaften, 82:321–329, 1995.
- [78] ROUGHLEY, P. J.: *The structure and function of cartilage proteoglycans*. European Cells & Materials Journal, 12:92–101, 2006.
- [79] HEGNER, M., P. WAGNER und G. SEMENZA: *Ultralarge atomically flat template-stripped Au surfaces for scanning probe microscopy*. Surface science, 291:39–46, 1993.
- [80] AEBI, U. und T. D. POLLARD: *A Glow Discharge Unit to Render Electron Microscope Grids and Other Surfaces Hydrophilic*. Journal of Electron Microscopy Technique, 7:29–33, 1987.
- [81] KUHN, R. und S. HOFFSTETTER-KUHN: *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*. Springer Verlag, 1993.

- [82] GESCHKE, O., H. KLANK und P. TELLEMAN: *Microsystem Engineering of Lab-on-a-chip Devices*. Wiley-VCH Verlag, 2004.
- [83] NG, L., ANNA PLAAS, A. GRODZINSKY und C. ORTIZ: *Structure, Conformation, and Self-Assembly of Cartilage Polyelectrolyte Macromolecules Studied Via Atomic Force Microscopy*. The American Chemical Society National Meeting, Division of Polymer Chemistry, 224:351–poly part 2, 2002.
- [84] LIN, H., D. DEAN, L. A. DAHER, A. J. GRODZINSKY und C. ORTIZ: *Cartilage Aggrecan Can Undergo Self-Adhesion*. Biophysical Journal, 95:4862–4870, 2008.
- [85] MORTIMER, C. E. und U. MÜLLER: *Das Basiswissen der Chemie*. Georg Thieme Verlag, 2003.
- [86] ECKEL, R.: *Messung und Simulation der mechanischen Elastizität einzelner DNA-Ligand-Komplexe*. Diplomarbeit, Universität Bielefeld, 2002.
- [87] BARTELS, F. W.: *Kraftspektroskopische Bindungsstudien an einzelnen Protein-DNA-Komplexen*. Dissertation, Universität Bielefeld, 2005.
- [88] KÖRNIG, A.: *Einzelmolekülkraftspektroskopie an molekularerkennenden Systemen*. Diplomarbeit, Universität Bielefeld, 2008.
- [89] DIGITAL INSTRUMENTS VEECO METROLOGY GROUP: *MultiMode<sup>TM</sup> SPM Instruction Manual*, Version 4.31ce Auflage, 1997.
- [90] VEECO: *A Practical Guide to SPM Scanning Probe Microscopy*, 08.2005.



# Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Diplomarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können. Außerdem möchte ich ihm für das entgegengebrachte Vertrauen und fruchtbare Anregungen danken, die auf den Fortgang dieser Arbeit großen Einfluss hatten. Sein Interesse und Optimismus haben mich stets ermuntert und motiviert.

Für das Überlassen der Aggrethane und fundamentale Diskussionen möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Dierks aus der Fakultät für Chemie danken. Ich danke ihm auch, dass er als Zweitgutachter für diese Arbeit auftritt. Herren Prof. Dr. Xavier Fernández-Busquets (Universität Barcelona) danke ich für das Stellen der Aggregationsfaktoren aus dem Meeresschwamm *Microciona prolifera*.

Der gesamten Arbeitsgruppe *Experimentelle Biophysik und angewandte Nanowissenschaften* möchte ich für das sehr angenehme Arbeitsklima danken und die Hilfsbereitschaft bei jedem auch noch so kleinen Problem. Insbesondere danke ich Volker Walhorn und Sebastian Zünkler für die Beantwortung meiner AFM-Fragen. Bei Dr. Katja Tönsing, Daniel Wesner und Dominik Greif möchte ich mich für die Beratung in chemischen Fragen bedanken und bei Christoph Pelargus und Sebastian Horstmeier für die technische Unterstützung. Bei André Körnig bedanke ich mich für die anregenden Gespräche und Hilfestellungen in kraftspektroskopischen Experimenten an den Aggregationsfaktoren. Lennart Ochel danke ich für die Analysesoftware, die die Auswertung der Kraft-Distanz-Kurven erst ermöglicht hat. Ich danke auch meinen Bürokollegen Christoph Kleimann, Matthias Schürmann, Sören Grannemann, einschließlich Michael Birlo und Sven Proppert, die mir bei Fragen stets mit Rat und Tat bei Seite standen.

Meiner Familie möchte ich für das unermessliche Vertrauen und die Unterstützung in allen Lebenslagen danken. Meiner Freundin Alwina Hübert möchte ich danken für den Rückhalt und die Geborgenheit auch in sehr schwierigen Phasen meines Studiums. Das

## *Danksagung*

---

hat mir immer Kraft gegeben und mir mein Studium erleichtert.