

Dynamische Kraftspektroskopie von einzelnen Rezeptor-Ligand Paaren zu Interaktionen von Zellen

**Dissertation an der Fakultät für Physik
der Ludwig-Maximilians-Universität
München**

vorgelegt von

**Wolfgang Dettmann
aus Garmisch-Partenkirchen**

München, den 5. November 1999

Erster Gutachter:
Zweiter Gutachter:
Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. Hermann Gaub
Prof. Dr. Jürgen Köhler
20. Dezember 1999

1.	ZUSAMMENFASSUNG	4
2.	EINLEITUNG	6
3.	KRAFTSPEKTROSKOPIE	8
3.1.	Aufbau des Kraftspektroskops	9
3.2.	Kraftspektroskop für Adhäsionsmessungen von Zellen	9
3.3.	Kraftkurven	10
4.	DYNAMISCHE KRAFTSPEKTROSKOPIE AN REZEPTOR-LIGAND BINDUNGEN	12
4.1.	Einführung	12
4.2.	Bindungspotentiale	14
4.2.1.	Thermodynamische Größen und allgemeine Potentiale	14
4.2.2.	Dissoziationsrate und Zerfallswahrscheinlichkeit	16
4.2.3.	Kramers Relation	17
4.3.	Theoretische Modelle für die Experimente	19
4.3.1.	Kopplung der Bindung an einen Polymerspacer	19
4.3.2.	Wahrscheinlichkeitsdichte für die Bindungskraft	21
4.3.3.	Näherungslösung für die Wahrscheinlichkeitsdichte	22
4.3.4.	Monte Carlo Simulation für die Abrißkraft	23
4.4.	Bindungskraft Experimente	24
4.4.1.	Die verwendeten Systeme	24
4.4.2.	Experimenteller Ablauf	28
4.5.	Resultate	32
4.5.1.	Blockexperimente und pH-Variation	32
4.5.2.	Daten der Rezeptor-Ligand Paar Interaktionen	35
4.6.	Diskussion der Resultate	41
4.7.	Überblick über die Abhängigkeit der Abrißkraft von der Ladungsrate	43
5.	KRAFTSPEKTROSKOPIE AN ZELLULÄREN BINDUNGEN	46

5.1.	Einführung	46
5.2.	Uterus Epithel- und Trophoblast- Zellen	49
5.3.	Zelladhäsions-Experimente	51
5.3.1.	Experimenteller Ablauf	51
5.3.2.	JAR-Zellen auf HEC/RL konfluenten Monolayer	52
5.3.3.	BSA und Amylose beschichtete Kugel auf HEC/RL-Zellmonolayer	54
5.3.4.	Fibronektin beschichtete Kugel auf HEC/RL-Zellmonolayer	56
5.4.	Theoretische Beschreibung	57
5.4.1.	Bindungsbildung	57
5.4.2.	Die Bindungstrennung	60
5.4.2.1.	Der Bindungsanteil	60
5.4.2.2.	Der Zellanteil	62
5.5.	Modell für die Wechselwirkung der Zellen mit dem Kraftsensor	63
5.6.	Diskussion	67
5.7.	Ausblick	69
6.	AFFINITÄTSABBILDUNG VON ZELLEN MITTELS KRAFTSPEKTROSKOPIE	70
6.1.	Einleitung	70
6.2.	Helix Pomatia Agglutinin- spezifische Wechselwirkung mit Erythrozyten der Blutgruppe A	70
6.2.1	Kraftkurven auf Erythrozyten	71
6.2.2	Affinitätsabbildung und Topologie eines Gruppe A/O Monolayers	73
6.2.3	Kraftkurven auf Agarosekugeln	74
6.3	Diskussion der Ergebnisse	76
6.4	Zusammenfassung und Ausblick	77
7.	AUSBLICK	78
ANHANG		79
A.1	Eichung und Federkonstante des Kraftsensors	79
A.2	Funktionalisierung des Kraftsensors	81

A.3	Methode für die automatische Messung der Abrißkraft und der Ladungsrate am Abriß	83
A.4	Mittelwerte der Abrißkräfte und Regressionsgerade zu den experimentellen Daten	84
A.5	Präparation der Kraftsensoren und der Zellen für die Zelladhäsionsmessungen	86
A.6	Präparation des Erythrozytenmonolayers	86
LITERATURVERZEICHNIS		88
DANKSAGUNG		92
LEBENS LAUF		93

1. Zusammenfassung

In dieser Arbeit werden Anwendungen der Kraftspektroskopie zur Erforschung und Anwendung von nicht-kovalenten biologischen Bindungen vorgestellt. Analysiert wurde die Bindungsstärke einzelner Rezeptor-Ligand Bindungen und die Wechselwirkung von Zellmonolayern. Als Anwendung der molekularen Erkennung wird die Lokalisation von Zellen auf Grund ihrer spezifischen Wechselwirkung vorgestellt. Durch den Vergleich der Bindungskräfte mehrerer Rezeptoren zu einem Liganden lassen sich Aussagen über die biologische Wirkung und Aufgabe einer Rezeptor-Ligand Bindung treffen. Die Analyse der Trennkurven von biologisch relevanten Zell/Zellmonolayer- oder großflächigen Zell/Protein-Kontakten ergeben Einblicke in zeitliche Abläufe und involvierte Proteine bei der Zelladhäsion.

- Dynamische Kraftspektroskopie mit drei verschiedenen Lektinen und zwei Liganden zeigten, daß die jeweilige Bindungskraft in dem experimentell zugänglichen Bereich der Ladungsrate über 3 Größenordnungen (100-10000 pN/sec) eine lineare Abhängigkeit vom Logarithmus der Ladungsrate aufweist. Zusätzlich sind die einzelnen Rezeptor-Ligand Systeme auf Grund ihrer Bindungsstärke bei Ladungsraten größer als 700 pN/sec eindeutig zu unterscheiden. Die Bindungsstärke, die für das schwächste Paar 34 pN und für das stärkste 58 pN bei 3000 pN/sec Ladungsrate beträgt, läßt sich in Relation zur biologischen Wirkung setzen.
- Mit Monte Carlo und Wahrscheinlichkeitsdichte Simulationen konnte wegen der experimentell gemessenen linearen Abhängigkeit der Bindungskraft vom natürlichen Logarithmus der Ladungsrate die Breite oder Reichweite des Bindungspotentials der jeweiligen Rezeptor-Ligand Bindung bestimmt werden (4-10 Å). Die für die verschiedenen Bindungen durchgeführten Simulationen zeigten, daß die berechnete Breite des Potentials reziprok mit der gemessenen Dynamik der Bindungsstärke korreliert.
- Am Beispiel von Uterusepithel- und Trophoblastzellen wurde gezeigt, daß mit dem Kraftmikroskop die Bindungsfähigkeit von Zellen gemessen werden kann. Experimente mit verschiedenen Modelloberflächen und die Variation der Kontaktzeit machten deutlich, daß die Präsenz von Rezeptoren für Zelladhäsionsproteine, wie z.B. Integrine für Fibronectin, in der apikalen Membran und Kontaktzeiten länger als 20 min die notwendige Voraussetzung für stabile interzelluläre Kontakte zwischen Epithelzellen

sind. Für kürzere Kontaktzeiten ist ein Modell mit nicht vernetzten, membrangebundenen Bindungspartnern und deren möglicher viskoser Anbindung an die Zelle erstellt worden.

- In einem gemischten Zellmonolayer aus Erythrozyten der Blutgruppe A und O, sind die Zellen der Gruppe A, auf Grund der spezifischen Wechselwirkung mit dem funktionalisierten Kraftsensor, mit einer Affinitätsabbildung lokalisiert worden. Die spezifische Lokalisation von Liganden an lebenden Zellen mit dem Kraftmikroskop ist demnach mit dieser Technik möglich.

2. Einleitung

Experimente mit einzelnen Molekülen sind mittlerweile in der Forschung etabliert. Die ersten Messungen der Bindungskraft mit Rezeptor-Ligand Modellsystemen, wie dem Biotin/Avidin Bindungspaar (1, 2), den Analysen des Dehnungsverhaltens von Polymeren, wie dem Dextran (3), und der Entfaltung von Proteinen, wie Titin oder Fibronectin (4), zeigen das große Anwendungsspektrum dieser Technik. Klassische Methoden, wie die kalorimetrische Bestimmung des Bindungsverhaltens von Rezeptor-Ligand Bindungen oder die Ermittlung der Strukturdaten von Proteinkristallen mit NMR oder Röntgenstreuung, liefern Daten aus Molekülensembeln. Sie werden jedoch nicht immer unter natürlichen Bedingungen, wie zum Beispiel unter dem Einfluß von Strömungen und Bewegungen auf die Bindung, ermittelt. Messungen mit einzelnen Molekülen ergänzen die vorhandenen Daten aus Ensemblemessungen und geben Einblicke in die Potentiallandschaft einer Rezeptor-Ligand Bindung mit der Möglichkeit der Manipulation der Randbedingungen (5). Die Forderung der Pharmaindustrie nach hochspezifisch bindenden Pharmazeutika mit geringsten Nebenwirkungen wird mit intelligentem Drug Design gelöst. Die Bestimmung der in der Bindungstasche dominierenden Aminosäuren mit ihren Seitenketten oder der relevanten Atome des Liganden ist eine grundlegende Voraussetzung für das optimale Design von neuen Pharmazeutika (6). Experimente mit einzelnen Molekülen zur Messung der Bindungsstärke sind eine sehr gute Methode zur Bestimmung der relevanten Daten.

Die Erweiterung der Analyse einzelner Bindungskräfte zur Bestimmung der Bindungskräfte zwischen Zellen, und damit einer Vielzahl von biologischen Wechselwirkungen, ergibt neue Erkenntnisse über Zellverbindungen und deren Aufbau (7). Welche Proteine sind für interzelluläre Verbindungen essentiell und wie ist der zeitliche Verlauf von Zellinteraktionen (8)? Diese Fragen werden mit Fluoreszenzanalysen teilweise beantwortet, jedoch liefert diese Methode keine Information über den Widerstand gegen äußere Kräfte, die im Körper, z.B. im Blutstrom, auftreten.

In dieser Arbeit wird gezeigt, daß mit dem Kraftmikroskop (9) oben aufgestellte Fragen teilweise beantwortet werden können. Das Bindeglied zwischen der Biologie und dem Experimentator ist dabei der hochsensitive Kraftsensor, der wegen seiner kleinen Geometrie Einzelmolekülexperimente erlaubt. Durch die Modifizierung der Kontaktfläche sind aber auch Experimente zu Vorgängen bei der Zelladhäsion möglich, ohne die Kraftauflösung zu verlieren. Vorgestellt werden vergleichende Messungen der Bindungskraft zwischen verschiedenen

Rezeptor-Ligand Paaren, Zelladhäsionsmessungen und die Lokalisation von Zellen auf Grund ihrer spezifischen Wechselwirkung mit dem Kraftsensor.

3. Kraftspektroskopie

Die Kraftspektroskopie ist die Technik, mit der die mechanischen Eigenschaften einzelner Moleküle und Bindungskräfte von Einzelmolekülpaaren erforscht werden können. Das Kraftspektroskop ist eine, hinsichtlich der Kraftauflösung (>10 pN) und der vertikalen Positionierbarkeit (Genauigkeit $< \text{\AA}$ über mehrere Mikrometer), optimierte Variante des Rasterkraftmikroskops (AFM) (9). Wegen der Möglichkeit unter physiologischen Bedingungen (Pufferlösung für die Probe, Temperierbarkeit, Begasung mit CO_2) zu arbeiten, ist das Kraftspektroskop universell einsetzbar für Einzelmolekülmessungen, die Lokalisation molekularer Wechselwirkungen auf Oberflächen und die Messung zellulärer Bindungskräfte.

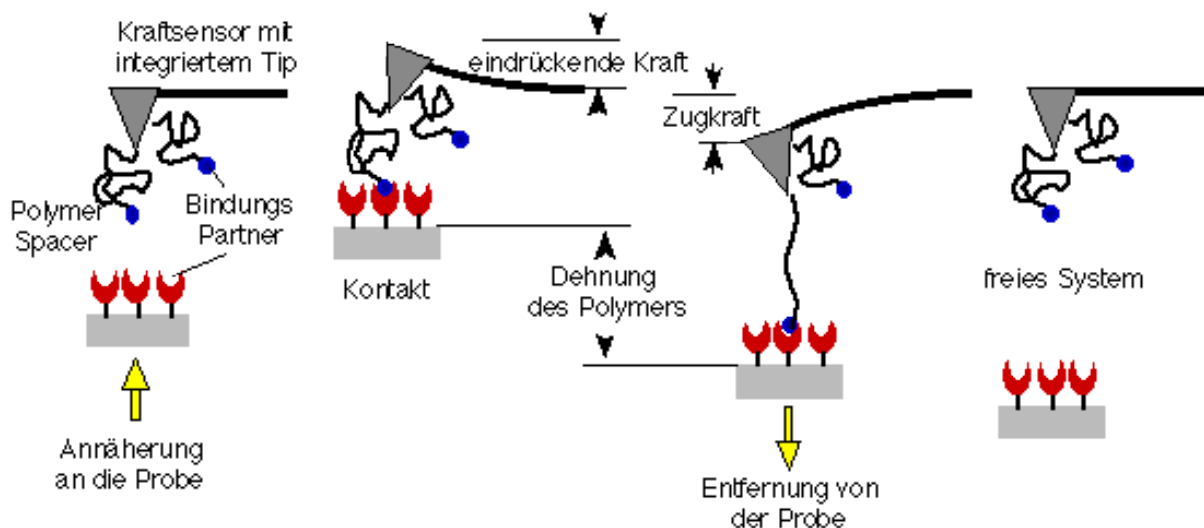


Abb. 3.1: Einzelmolekülexperiment mit dem Kraftspektroskop. Analysiert wird die Auslenkung des Kraftsensors in Abhängigkeit von der Position des Piezos, die in der Abbildung der Position der Probe entspricht. Informationen über die Dehnungscharakteristik einzelner Polymerstränge oder über die Bindungskraft einzelner Rezeptor-Ligand Paare können so gewonnen werden.

In Abb. 3.1 ist das Prinzip eines Einzelmolekülexperiments mit dem Kraftspektroskop gezeigt. Die zu untersuchenden Moleküle werden zwischen dem Kraftsensor und der Oberfläche eingespannt und hinsichtlich ihrer mechanischen oder ihrer Bindungseigenschaften untersucht. Dabei gibt es mehrere Möglichkeiten zur Ankopplung der Bindungspartner, von Proteinen oder Polymeren. Für Messungen der Dehnungscharakteristik von Polymeren (z.B. Dextran oder Amylose) oder Proteinen (z.B. Titin oder Fibronectin) genügt die

unspezifische Adhäsion an den Kraftsensor über eine hohe Kontaktkraft. Für die, in dieser Arbeit vorgestellten, Messungen von Bindungskräften zwischen Rezeptor-Ligand Paaren sind, wie im Anhang beschrieben, die Moleküle kovalent an den Kraftsensor gekoppelt worden.

3.1. Aufbau des Kraftspektroskops

Der Aufbau des verwendeten Kraftspektroskops ist in Abb. 3.1.1 gezeigt. Die Wechselwirkungskraft zwischen Kraftsensor und Probe wird mit dem Prinzip des Lichtzeigers gemessen. Dabei wird ein auf den Kraftsensor fokussierter Laserstrahl in eine segmentierte Photodiode reflektiert. In den Piezo für die z-Bewegung ($16\ \mu\text{m}$) ist ein Dehnmeßstreifen integriert, der die Ausdehnung des Stellelements fortlaufend detektiert. Die Auslenkung des Kraftsensors wird in Abhängigkeit von der Position des Piezos gemessen.

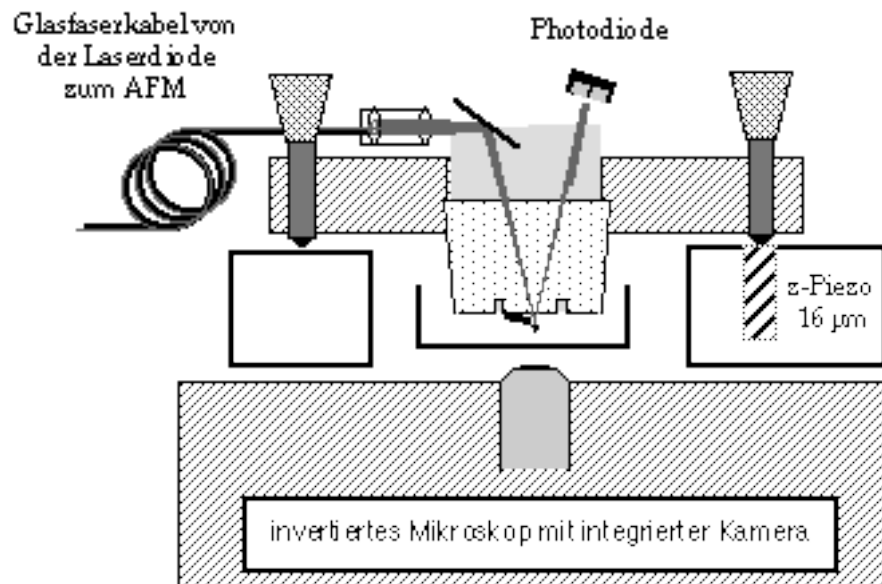


Abb. 3.1.1: Aufbau des Kraftspektroskops. Die Detektion der Kraftsensorauslenkung erfolgt über das Prinzip des Lichtzeigers.

Mit dem invertierten Mikroskop kann die Positionierung des Kraftsensors auf der Probe kontrolliert werden.

Für die Lokalisation molekularer Wechselwirkungen wird zusätzlich ein x-y-Piezo (maximal $100 \times 100\ \mu\text{m}$) zur lateralen Positionierung verwendet.

3.2. Kraftspektroskop für Adhäsionsmessungen von Zellen

Für die Adhäsionsmessungen von Zellen ist das, im vorigen Abschnitt präsentierte, Kraftspektroskop modifiziert worden (Abb. 3.2.1). Um Messungen mit

aktiven, lebenden Zellen über längere Zeiträume durchführen zu können, sind Brutschrank Bedingungen mit 37°C und 5% CO₂ Gehalt in der Luft notwendig. Diese Bedingungen werden durch eine Probenkammer für das AFM mit CO₂-Anschluß, CO₂-Sensor und einer integrierten Heizung, eingebaut in die Grundplatte, erfüllt. Wie sich in den Experimenten gezeigt hat, sind die Interaktionen von Zellen sehr langreichweitig, deswegen wurde Wert auf die maximal mögliche vertikale Auslenkung gelegt und die Probe selbst mit einem 100 µm Piezo bewegt. Da die Zellmonolayer nur stellenweise perfekt wachsen, ist ein großer lateraler Stellbereich notwendig. Dieser ist durch einen manuell verstellbaren x-y Tisch (6x6 mm), auf den der Piezo montiert ist, realisiert. Mit dem invertierten Mikroskop kann wiederum die Kontaktfläche mit der Probe kontrolliert werden.

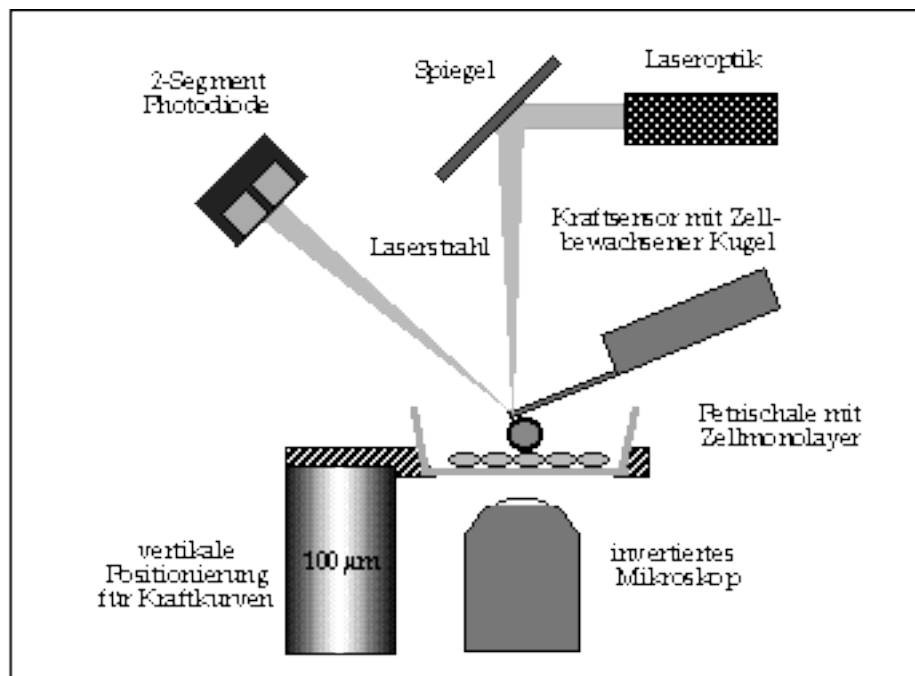


Abb. 3.2.1 Kraftspektroskop für Zelladhäsionsmessungen.

3.3. Kraftkurven

Einzelkraftkurven können mit 4096 oder 32750 Punkten Auflösung, jeweils für die Annäherung und Entfernung von der Probe, aufgenommen werden. Die Kraftkurve beinhaltet Informationen über die Höhe, die Elastizität und die Adhäsionskraft des Kraftsensors mit der Probe. Mit der im Anhang beschriebenen Kalibrierung des Kraftsensors und des Diodensignals erhält man aus der Auslenkung des Kraftsensors die Wechselwirkungskräfte. Ein schematisches

Beispiel einer Kraftkurve, aufgetragen gegen die Position des Piezos, ist in Abb. 3.3.1 gezeigt.

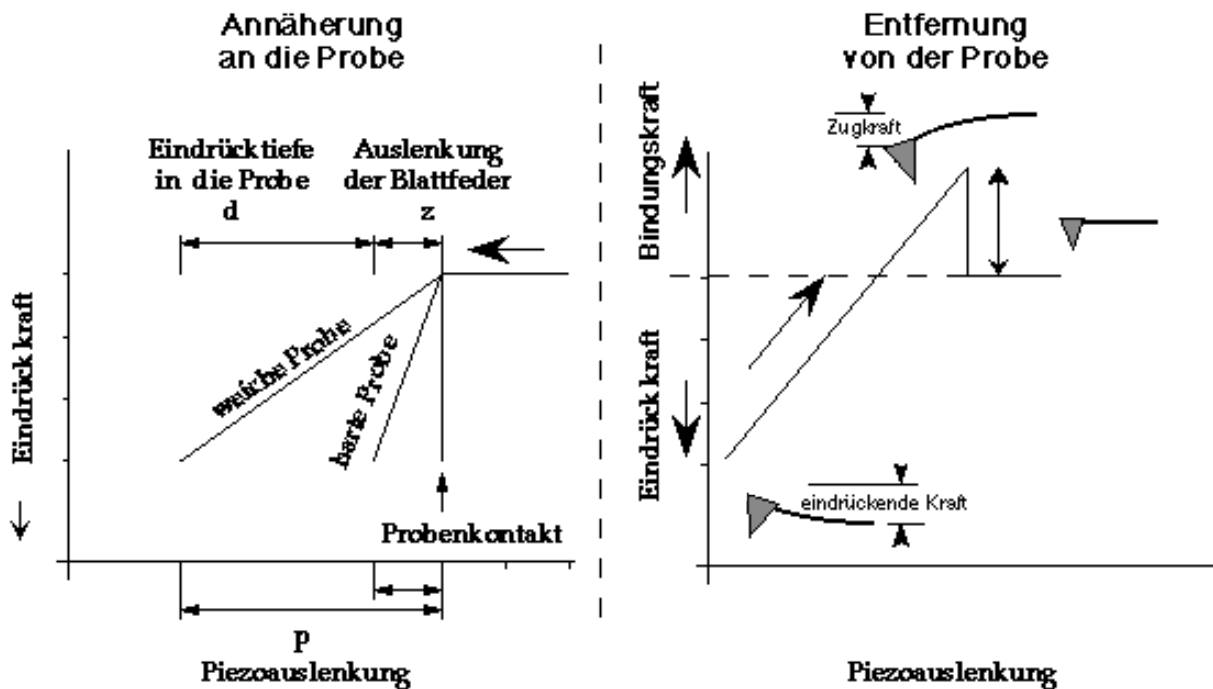


Abb. 3.3.1: Prinzip einer Kraftkurve: Bei der Annäherung zur Probe wird mit der Kontaktaufnahme der Kraftsensor ausgelenkt. Bei harten Proben (z.B. Glas) entspricht die Auslenkung der Blattfeder der Piezoauslenkung, bei weichen wird bis zur vergleichbaren Eindrückkraft zusätzlich die Probe deformiert. Bei der Entfernung des Kraftsensors von der Probe wird die adhäsive Wechselwirkung über die Zugkraft detektiert.

Die Bindungskraftdaten für die Einzelmolekülmessungen, vorgestellt in Kapitel 4, sind aus mehreren tausend Kraftkurven ermittelt worden. Diese wurden wegen der großen Datenmenge mit der reduzierten Auflösung von 255 Punkten pro Kraftkurve aufgenommen und nach der Bindungskraft des letzten Abrisses untersucht (siehe Anhang).

4. Dynamische Kraftspektroskopie an Rezeptor-Ligand Bindungen

4.1. Einführung

Die molekulare Erkennung einzelner Proteine (Rezeptoren) von ihren hochspezifischen Bindungspartnern (Liganden) wird als Rezeptor-Ligand Wechselwirkung bezeichnet. Bei dieser wird der Ligand, z.B. eine Peptidsequenz oder mehrere verbundene Zuckermomere, nicht kovalent, sondern über Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe und -phile Wechselwirkungen, in der Bindungstasche des Rezeptors gebunden. Die Bindungstasche besteht aus der räumlichen Anordnung von Aminosäuren, deren Seitenketten mit dem Liganden wechselwirken. Das bekannteste auf Rezeptor-Ligand Wechselwirkungen basierende Instrument des Körpers ist das Immunsystem. Ebenso basiert die Interaktion von Zellen untereinander auf der Wechselwirkung von ganz bestimmten Rezeptor-Ligand Paaren (siehe Kapitel 5). Erkenntnisse über die wesentlichen Aspekte der Bindung, Bindungsstärke, Assoziations- und Dissoziationsrate, können bei der Entwicklung von hochspezifischen Medikamenten, die nur an ihrem gewünschten Ziel (Zelle) anbinden und deswegen Nebenwirkungen vermeiden, weiterhelfen. Eine weitere pharmakologische Anwendung ist die Besetzung von Rezeptoren, z.B. bei Tumorzellen, durch lang bindende inaktive Liganden, die die Kommunikation mit anderen Zellen unterdrücken und dadurch z.B. die Metastasenbildung bei Tumoren verhindern. Die Kenntnis der essentiellen Wechselwirkungen bei der Bindungsbildung ist für diese Prozesse sehr von Vorteil. Die gezielte Manipulation zur Stärkung der Bindung, z.B. über eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung, wäre ein Schritt in der Entwicklung von substituierenden Pharmazeutika.

Wegen seiner hohen Kraftauflösung und guten Positionierbarkeit ist es mit dem AFM möglich einzelne Bindungspaare zu analysieren und Eigenschaften der Bindungspotentiale zu erforschen. Die ersten Einzelmolekülmessungen sind mit dem Prototyp der Rezeptor-Ligand Paare, dem Biotin/Avidin oder Streptavidin Paar, durchgeführt (1, 2) und durch Molekulardynamik-Simulationen ergänzt worden (10, 11). Aus den Simulationen mit Strukturdaten ist es möglich, die an der Bindung beteiligten Aminosäuren des Rezeptors und die Stärke dieser Wechselwirkung zu bestimmen. Publiziert sind bereits verschiedene Messungen der Bindungskraft von Antikörper/Antigen Systemen worden. Dazu gehören die Messungen mit den Systemen Biotin/Antibiotin IgG (12), Lysozym/Lysozym-

Antikörper (13) und Fluoreszein/Fluoreszein-Antikörper F_{ab} Fragmente (14). In diesen Messungen ist für eine bestimmte Kraftladungsrate die Abrißkraft einer einzelnen Rezeptor-Ligand Bindung gemessen worden. Eine linear logarithmische Abhängigkeit der Abrißkraft von der Ladungsrate wurde in theoretischen Arbeiten (11, 15) für ein Bindungspotential, bei dem dessen Breite für einen definierten Kraftbereich unabhängig von der angelegten Kraft ist, vorausgesagt. Dies ist erst kürzlich in Arbeiten zu P-Selectin (16) und zu Biotin/Avidin sowie Streptavidin (5) gezeigt worden. Dabei ist die Ladungsrate mittels der angelegten Zuggeschwindigkeit an die Bindung über einen großen Bereich variiert worden. Die Energielandschaft für die Biotin/Avidin Bindung wurde dabei als ein mehrstufiges Potential mit verschiedenen Breiten, von sehr eng (1.2 Å) für die feste Anbindung, bis sehr weit (30 Å) für die lockere Anbindung zum Einfangen des Liganden, ermittelt (5).

Das Konzept der Variation der Ladungsrate ist in den im Folgenden dargestellten Messungen an verschiedenen Lektinen, zwei pflanzlichen und einem tierischen, und einem Zuckerantikörper angewandt worden. Lektine sind Proteine, die Liganden aus Zuckerstrukturen spezifisch binden. Mit Hilfe theoretischer Modelle (11, 15), der Monte Carlo Simulation der Abrisse und der Berechnung der Wahrscheinlichkeitsdichte für die Dissoziation unter einer angelegten Kraft, kann aus den experimentellen Resultaten die Potentialbreite der verwendeten Systeme und die kraftaktivierte off-Rate für den gemessenen Ladungsratenbereich bestimmt werden. Die Eigenschaften der gemessenen Lektine unterscheiden sich in ihrer Art der Zellwechselwirkung. Die beiden pflanzlichen Lektine (*Ricinus Communis* Agglutinin (RCA) und *Viscum Album* Agglutinin (VAA)) werden über Endozytose in die Zelle aufgenommen und bringen dabei ihre toxische Seitenkette in die Zelle mit ein (17). Das tierische Lektin (Galektin-1) ist über transmembrane Signalprozesse an Vorgängen bei der Anlagerung von Zellen aneinander (Zelladhäsion/ -interaktion), Zellteilungen (Proliferation) oder dem Zelltod (Apoptosis) beteiligt (18).

4.2. Bindungspotentiale

4.2.1. Thermodynamische Größen und allgemeine Potentiale

Die bestimmenden Größen für molekulare Bindungen sind die freie Energie G und Enthalpie H , die Dissoziationsrate (natürliche off-Rate) k_{off} , die Assoziationsrate k_{on} und die aus dem Verhältnis von k_{off} und k_{on} gebildete Dissoziationskonstante k_{diss} . Diese Größen sind in Abb. 4.2.1.1 am Beispiel eines willkürlichen Potentials dargestellt.

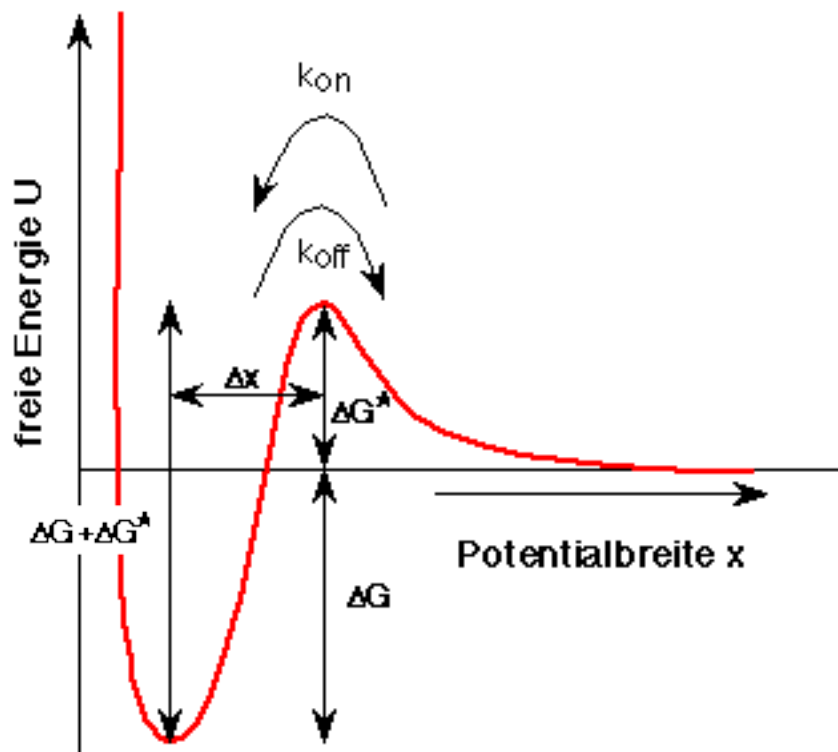


Abb. 4.2.1.1: Schematische Darstellung eines Bindungspotentials mit der Energiebarriere $G + G^*$, bestehend aus der freien Energie G , der Aktivierungsenergie G^* , den Assoziations- und Dissoziationsraten k_{on} und k_{off} und der Breite des Bindungspotentials x .

Die Energien können über kalorimetrische Messungen bestimmt werden (z.B. für Laktose gebunden an die Lektine RCA: $H=31.4$ kJ/mol, $G=25.3$ kJ/mol, $k_{\text{diss}}=3.5 \cdot 10^{-5}$ M bei $T=292.1$ K und VAA: $H=34.3$ kJ/mol, $G=17.3$ kJ/mol, $k_{\text{diss}}=8.1 \cdot 10^{-4}$ M bei $T=293.1$ K (19)).

$$G = H - T \Delta S = -R T \ln k_{\text{diss}} \quad (4.2.1)$$

Eine andere Methode die Dissoziationskonstante k_{diss} zu bestimmen ist die Oberflächenplasmonen Spektroskopie (SPR). Mit dieser sind die Assoziations-

und Dissoziationsraten für RCA bestimmt worden ($k_{\text{on}}=3.4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$, $k_{\text{off}}=2.1 \cdot 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ und damit $k_{\text{diss}}=6.2 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ (20, 21)). Ebenfalls mit dieser Technik hat Martin Benoit die Raten für die in dieser Arbeit verwendeten Systeme gemessen (Tabelle 4.5.2.T.1a&b).

Die enthalpischen und entropischen Beiträge zur freien Energie können folgenderweise unterteilt werden:

$$G = H_{\text{Bindung}} + H_{\text{Konformation}} - T \left(S_{\text{rot+trans}} + S_{\text{flex}} + S_{\text{Solvation}} \right) \quad (4.2.2)$$

Diese Unterteilung ist in Abb. 4.2.1.1 schematisch dargestellt.

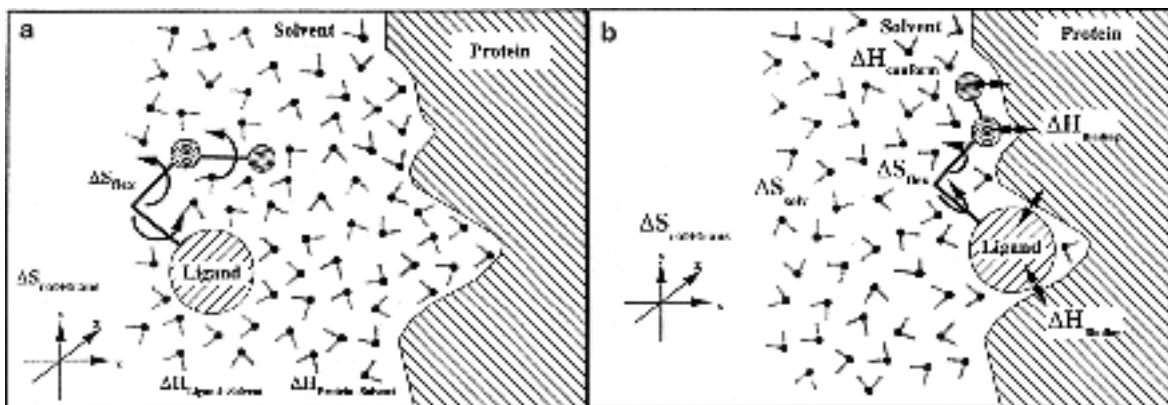


Abb. 4.2.1. H_{Bindung} : positive Beiträge der Wechselwirkung von elektrostatischen und van der Waals Kräften sowie durch die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen Rezeptor und Ligand; $H_{\text{Konformation}}$: negativer Beitrag aus der Änderung der bevorzugten Konformation des Liganden oder Rezeptors in eine erzwungene Form bei der Bindung; $S_{\text{rot+trans}}$: negativer Beitrag aus dem Verlust von Translations- und Rotationsfreiheitsgraden; S_{flex} : negativer Beitrag aus dem Verlust von Entropie durch Einfrierung von Torsionswinkeln; $S_{\text{Solvation}}$: positiver oder negativer Beitrag aus der Änderung der Entropie, verursacht durch Entfernung der solvatisierten Moleküle aus der Bindungstasche und von dem Liganden (aus (22)).

Das Verhalten der molekularen Bindung im thermodynamischen Gleichgewicht kann mit den Methoden der Oberflächenplasmonen Spektroskopie und der Titrationskalorimetrie bestimmt werden. Aus diesen Messungen ergibt sich allerdings keine Aussage zur Form des Bindungspotentials. Dagegen wird beim Anlegen einer Kraft an die molekulare Bindung das Bindungspotential, wegen der Verringerung der Potentialbarriere, verändert und die Erforschung des Potentialverlaufs ermöglicht (siehe Abb. 4.2.3.1). Somit können weitere Erkenntnisse über das Bindungsverhalten, in Ergänzung zu den rein thermodynamischen Daten, gewonnen werden.

4.2.2. Dissoziationsrate und Zerfallswahrscheinlichkeit

Die Manipulation am Potential durch das Anlegen einer Kraft erniedrigt die Potentialbarriere für die Bindung. Das Absenken der Energiebarriere erhöht die Zerfallswahrscheinlichkeit der Bindung und verringert ihre Lebensdauer, die durch die Dissoziationsrate bestimmt ist, drastisch (5). Wenn keine Kraft auf die Bindung wirkt, so ist die natürliche off-Rate k_{off} die relevante Dissoziationsrate. Als zuerst zeitabhängige und dann, wegen den AFM Experimenten durch Substitution, als kraftabhängige Größe, wird hier die Dissoziationsrate betrachtet und zur Herleitung der kraftabhängigen Zerfallswahrscheinlichkeit einer Bindung verwendet.

Die Dissoziationsrate bestimmt die mittlere Zeit, in der eine Bindung sich löst oder ein Komplex in zwei Bestandteile zerfällt und wird durch folgende Relation definiert:

$$\frac{dP_{\text{komplex}}}{dt} = - (t) P_{\text{komplex}} \quad (4.2.3)$$

Die Überlebenswahrscheinlichkeit des Komplexes zum Zeitpunkt $t=T$ ist:

$$P_{\text{komplex}}(t = T) = 1 - P_{\text{zerfallen}}(t = T) \quad (4.2.4)$$

Mittels der Dissoziationsrate (t) und der Überlebenswahrscheinlichkeit des Komplexes, ist die Zerfallswahrscheinlichkeit für den Komplex nach der Zeit t im Intervall dt :

$$dP_{\text{zerfallen}} = P_{\text{komplex}}(t) dt = (1 - P_{\text{zerfallen}}(t)) (t) dt \quad (4.2.5)$$

Die Gesamtwahrscheinlichkeit des Zerfalls bis $t=T$ unter der Randbedingung $P_{\text{zerfallen}}(t=0)=0$ ist dann:

$$P_{\text{zerfallen}}(T) = 1 - e^{-\int_0^T (t) dt} \quad (4.2.6)$$

Bei den Messungen mit dem Kraftmikroskop ist die angelegte Kraft an die Bindung und die Verteilung der einzelnen Abrißkräfte bekannt. Für die theoretische Beschreibung der Experimente wird deswegen die Zeit durch die Kraft substituiert und die kraftabhängige Zerfallswahrscheinlichkeit ermittelt:

$$(t)dt = (t(f)) \frac{dt}{df} df \quad (4.2.7)$$

und damit folgt die **kraftabhängige Zerfallswahrscheinlichkeit**:

$$\frac{dP_{\text{zerfallen}}}{dF}(F) = (F) \frac{1}{F} e^{-\int_0^F \frac{1}{f}} \quad (4.2.8)$$

4.2.3. Kramers Relation

Der Übergang von einem metastabilen in einen stabilen Zustand eines Potentials wird durch Theorien zur Reaktionsrate beschrieben (11, 23). All den Übergängen mit einem metastabilen Minimum ist gemeinsam, daß sie auf einer viel längeren Zeitskala stattfinden als lokale Ortsschwankungen (24) und daß die Energiebarriere größer als die thermisch anregbare ist. Die erste Theorie zur Reaktionsrate hat Arrhenius eingeführt. Die Übergangs- oder Dissoziationsrate folgt dabei dem Van't Hoff-Arrhenius Gesetz:

$$= e^{-U} \quad (4.2.9)$$

U ist die Potentialbarriere und ein Vorfaktor, der die Abtastfrequenz der Bindung beschreibt. Kramers (25) hat die Bewegungsgleichung für die Bindung im Potential, angeregt durch Kraftfluktuationen und gedämpft durch Viskosität und Reibung aufgestellt. Diese hat er für zwei Grenzfälle, Energiediffusions limitiert bei schwacher Dämpfung und räumlich diffusions limitiert bei starker Dämpfung, gelöst (23). Die Diffusion der Energie bestimmt die Reaktionsrate, wenn die dissipierte Energie für einen Bindungszyklus (Assoziation und Dissoziation) kleiner als die thermische Energie $k_B T$ ist. Der letztere Grenzfall gilt, wenn die dissipierte Energie, wegen der hohen Dämpfung, bei einem Zyklus größer als $k_B T$ ist und wird im Folgenden betrachtet. Die Kramers Relation für die Beschreibung der kraftabhängigen Dissoziationsrate gilt unter den Randbedingungen der AFM Messungen.

Kramers Relation:

$$(F) = e^{-U^\#} = \frac{\omega_{\min} \omega_{\max}}{2} e^{-U^\#} \quad (4.2.10)$$

ω_{\min} und ω_{\max} sind die Wurzeln der Krümmung des Potentials am Maximum und Minimum. Das Produkt von ω_{\min} und ω_{\max} bildet die ungedämpfte Oszillationsfrequenz des Liganden in der Bindungstasche. Durch die Dämpfung (Viskosität und Reibung) wird diese auf die Abtastfrequenz gedämpft. Die Dämpfung in der Bindungstasche muß für die Gültigkeit der Kramers Relation zusätzlich wesentlich größer als ω_{\max} sein. Die gedämpfte Oszillationsfrequenz des Liganden in der Bindungstasche gilt in der Kramers Theorie als kraftunabhängige Größe und ist somit als konstant zu betrachten ($\omega_0 = \text{const}$).

Die durch Krafteinwirkung verringerte Potentialbarriere, die die Bindung überwinden muß, ist dann:

$$U^\#(F) = U[x_{\max}(F)] - U[x_{\min}(F)] - F(x_{\max}(F) - x_{\min}(F)) \quad (4.2.11)$$

und wird durch folgende Grafik (Abb. 4.2.3.1) veranschaulicht:

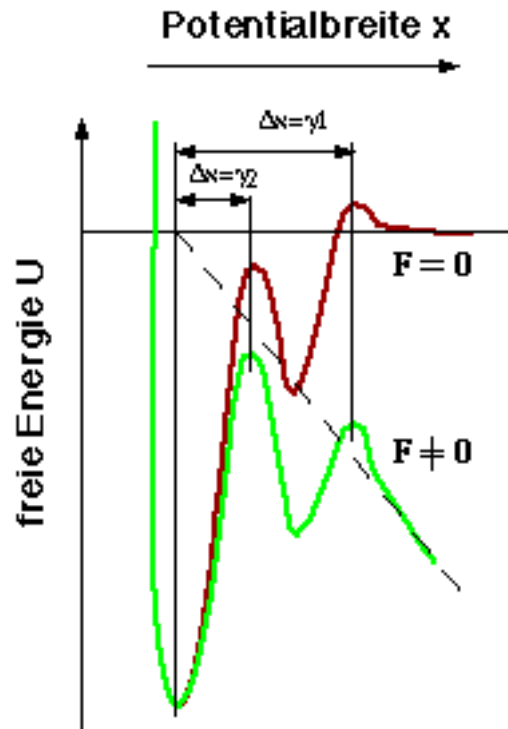


Abb. 4.2.3.1: Bindungspotential mit 2 Minima; unter dem Einfluß der angelegten Kraft, dargestellt durch die gestrichelte Linie, werden die Potentialbarrieren abgesenkt und ein Einblick in die Potentialform ist möglich.

Durch die angelegte Kraft wird die Potentialbarriere abgesenkt. Für kleine Kräfte bestimmt $x = x_1$ die Dissoziation. Ab der Kraft, bei der die äußere Potentialbarriere gleich der inneren ist, bestimmt die innere Potentialbreite $x = x_2$ die Dissoziation. Die äußere Potentialbarriere ist ab dieser mit zunehmender Kraft dann immer kleiner als die innere, wie in Abb. 4.2.3.1 skizziert ist, und irrelevant für die Dissoziation. Die Verringerung der Potentialbarriere in diesem linearen Modell mit dem Faktor F^* erfolgt gemäß einem „Hebelgesetz“. Für große Potentialbreiten genügen kleine Kräfte um die Überwindung der Barriere zu ermöglichen, für kleine Breiten sind größere Kräfte nötig. Die Potentialbreite ist somit ein Maß für die Kraftabhängigkeit der Bindung. Das Potential ist schematisch so dargestellt, daß die Krümmungen des Potentials an den Extrema und die laterale Position der Extrema unter der Einwirkung der Kraft konstant

bleiben. Damit ist die Voraussetzung der Kramers Theorie, eine konstante Oszillationsfrequenz ν_0 in der Bindungstasche, erfüllt.

Unterstützt wird die Annahme der konstanten Oszillationsfrequenz durch Molekuldynamik-Simulationen von Heymann & Grubmüller zu einem Antikörper-Hapten Paar (26), in dem gezeigt worden ist, daß die Frequenz der Eigenbewegungen des Liganden unter Kraftereinwirkung im Vergleich zum Gleichgewichtszustand des Systems maximal um den Faktor 2 gestört wird.

Unter der zusätzlichen Annahme, daß die Potentialbreiten, wie es in Abb. 4.2.3.1 für Δ_1 und Δ_2 veranschaulicht ist, kraftunabhängig sind, gilt für die kraftabhängige Dissoziationsrate:

$$k_{\text{off}}(F) = \nu_0 e^{-\beta(U - Fx)} = k^* e^{-\beta Fx} \quad (4.2.12)$$

Für $F=0$ ist k^* die thermodynamisch ermittelte Größe k_{off} . Für $F > 0$ ist sie für Potentiale mit einer einzigen Potentialbreite im Kraftbereich $0 < F < F_{\text{maxgemessen}}$ ebenso k_{off} . Besteht das Bindungspotential wie in Abb. 4.2.3.1 aus mehreren Barrieren mit den Breiten Δ_1 und Δ_2 im gemessenen Kraftbereich, so ist k^* für die größte Breite äquivalent zu k_{off} für kleinere aber größer als k_{off} . Für innere Potentialbarrieren kann $k^*(\Delta_i)$ als kraftaktivierte off-Rate bei der Basiskraft für den geltenden Kraftbereich der jeweiligen Potentialbreite betrachtet werden. Analog zur natürlichen off-Rate k_{off} die das Maß für die Lebensdauer einer Bindung ist, ist k^* das Maß für die Lebensdauer der Bindung im relevanten Kraftbereich. k^* und Δ beschreiben die Stärke einer biologischen Bindung unter Kraftereinwirkung.

4.3. Theoretische Modelle für die Experimente

Mit Hilfe theoretischer Modelle lassen sich aus den experimentellen Daten dynamischer Bindungskraftmessungen Informationen über die Bindungspotentialstruktur herleiten. Die Ankopplung der Bindung an einen Polymerspacer, die oben eingeführte kraftabhängige Dissoziationsrate $k_{\text{off}}(F)$ und die Zerfallswahrscheinlichkeit werden dabei für die Modellierung des Systems verwendet.

4.3.1. Kopplung der Bindung an einen Polymerspacer

Die Funktionalisierung der Abtastnadel findet über die Ankopplung des Liganden oder Rezeptors an kovalent angebundene Amylose statt. Bei den Kraftexperimenten wird diese somit immer, mit der an der Bindung anliegenden Kraft F , gedehnt. Die Dehnungscharakteristik von Polymeren kann theoretisch beschrieben werden. Die Basis bildet dabei eine Aneinanderkettung von einzelnen

Elementen, deren Beweglichkeit zueinander eingeschränkt werden kann (Rotations- und Winkeleinschränkung). Das FJC-Modell (freely jointed chain) ist das einfachste Modell für Polymere, bei dem N Segmente der Länge l , ohne Einschränkung der Beweglichkeit, aneinandergereiht werden (27). Die experimentell bestimmte Dehnungscharakteristik der Amylose, des in den Experimenten verwendeten Polymers, läßt sich mit dem um die Einzelsegmentelastizität D erweiterten FJC-Modell beschreiben (28):

$$\langle x \rangle = N l L \left(\frac{F l}{k T} + \frac{N}{D} F \right) \quad (4.3.1)$$

Dabei ist N die Anzahl der Monomere, l die Kuhn Länge (5.6 Å), D die Federkonstante eines Monomers (1100 pN/Å) (29), F die anliegende Kraft und L die Langevin Funktion. Die Einzelsegmentlänge l (Kuhn Länge) entspricht dabei nicht exakt der realen Monomerlänge der Amylose (4.5 Å). Die einzelnen Monomere sind in ihrer Beweglichkeit gegeneinander eingeschränkt und erst für ein längeres Segment gilt die vollkommen freie Beweglichkeit des FJC-Modells.

Unter Berücksichtigung des Hook'schen Gesetz für die Abtastnadel gilt folgende Gesamtdehnungscharakteristik:

$$\langle x \rangle = N l L \left(\frac{F l}{k_B T} + \frac{N}{D} F + \frac{F}{k_c} \right) \quad (4.3.2)$$

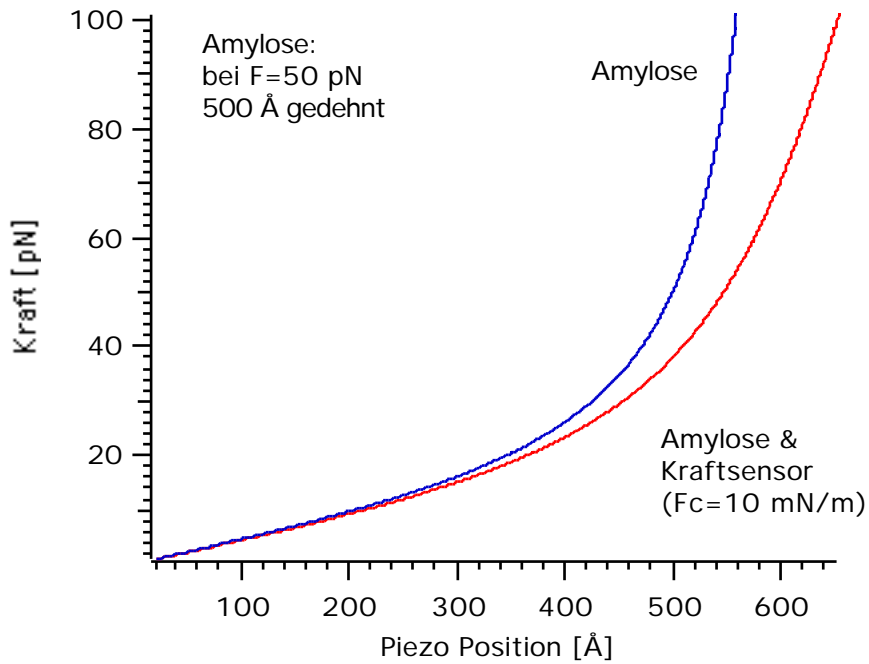


Abb. 4.3.1.1: Dehnungscharakteristik der Amylose. Ohne und mit zusätzlicher Auslenkung des Kraftsensors (Federkonstante: 10 mN/m=1 pN/Å)

4.3.2. Wahrscheinlichkeitsdichte für die Bindungskraft

Ein Einsetzen der kraftabhängigen Dissoziationsrate (F), unter der Voraussetzung der konstanten Krümmungen und der konstanten Breite des Potentials in bestimmten Kraftbereichen, in die Zerfallsdichte (4.2.10) ergibt folgende Relation:

$$\frac{dP_{\text{zerfallen}}}{dF}(F) = (F) \frac{1}{F} e^{-\frac{F}{k_B T}} = k^* \frac{1}{F} e^{-\frac{F}{k_B T}} \quad (4.3.3)$$

Die Wahrscheinlichkeitsdichte ist in Abb. 4.3.2.1a) für drei verschiedene Zuggeschwindigkeiten ($v= 0.2-1.1-4.5 \mu\text{m}/\text{sec}$) und einen Polymerspacer mit 500 Å Länge für die Bindungskraft von Laktose an RCA skizziert ($\lambda = 4.1 \text{ Å}$; $k^* = 0.8 \text{ sec}^{-1}$). In Abb. 4.3.2.1b) ist die Kraft gegen die Ladungsrate (dF/dt) für die drei Geschwindigkeiten gezeigt. Die gestrichelte Linie symbolisiert den Verlauf der Maxima der Wahrscheinlichkeitsdichte bei kontinuierlich variierten Zuggeschwindigkeiten.

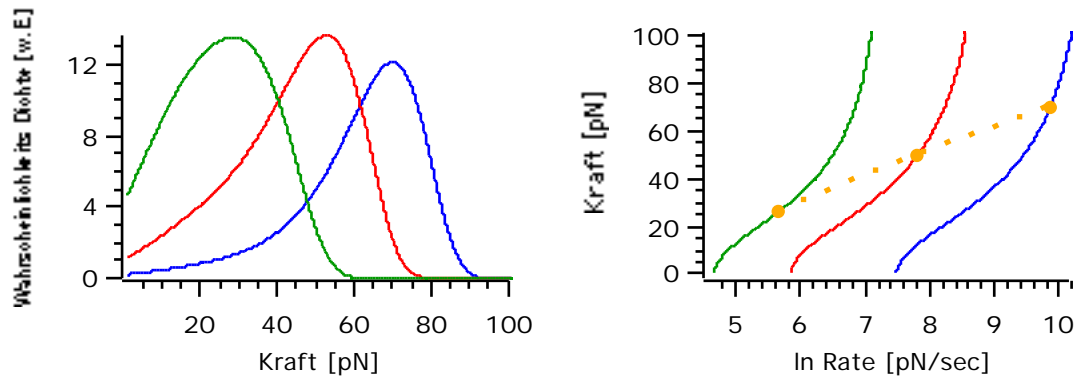


Abb. 4.3.2.1: a) Abbildung der Wahrscheinlichkeitsdichte für drei verschiedene Zuggeschwindigkeiten. b) Ladungsratenverlauf abhängig von der Polymereigenschaft (Länge: 500 Å), dargestellt für drei verschiedene Zuggeschwindigkeiten. Die Punkte sind die Werte der Maxima der Wahrscheinlichkeitsdichte für die Abrißkraft. Die gestrichelte Verbindungslinie symbolisiert die Lage der Maxima bei kontinuierlicher Variation der Zuggeschwindigkeit.

4.3.3. Näherungslösung für die Wahrscheinlichkeitsdichte

Das Maximum der Wahrscheinlichkeitsdichte erhält man aus der Ableitung nach der Kraft:

$$\frac{d}{dF} \frac{dP_z}{dF}(F) = 0 \quad (4.3.4)$$

Diese Gleichung läßt sich wegen der nicht linearen Dehnungseigenschaften der Amylose (Gln. 4.3.2) nur numerisch lösen. Eine Näherung ist die Annahme einer konstanten Ladungsrate für eine Zuggeschwindigkeit. Dies wäre bei der direkten Ankopplung der Bindung an den Kraftsensor ohne Polymerspacer der Fall. Die Ladungsrate entspricht dann dem Produkt der Federkonstante des Kraftsensors multipliziert mit der Ziehgeschwindigkeit und liegt bei dieser Näherung immer an der Bindung an. Vernachlässigt wird bei dieser Annahme der Bereich der niedrigen Ladungsraten am Beginn der Dehnung. Die Ableitung der Wahrscheinlichkeitsdichte (Gln. 4.3.3) in Abhängigkeit von einer konstanten Ladungsrate ergibt sich zu:

$$F_{\text{Abriss}}(F) = \frac{k_B T}{k} \ln \frac{F}{k^*} \frac{1}{k_B T} = F_{\text{therm}} \ln \frac{F}{k^*} \frac{1}{F_{\text{therm}}} \quad (4.3.5)$$

Diese Gleichung beschreibt eine lineare Abhängigkeit der Abrißkraft vom natürlichen Logarithmus der Ladungsrate. F_{therm} ist die theoretisch niedrigste Kraft für eine Potentialbreite, unter der entweder die nächst äußere Barriere die

Dissoziation dominiert oder, bei keiner weiteren Barriere, die spontane Dissoziation der Bindung erfolgt. Die mit dieser Näherung resultierende Gerade der Maxima der Abrißkräfte (Geradengleichung 4.3.6), abhängig vom natürlichen Logarithmus der Ladungsrate, entspricht ungefähr der mit den selben k^* und Werten erhaltenen Relation der Maxima der Wahrscheinlichkeitsdichte in Abb. 4.3.2.1b.

$$F_{\text{Abriss}}(F) = \frac{k_B T}{k^*} \ln \frac{F}{k_B T} = \frac{k_B T}{k^*} \ln F + \frac{k_B T}{k^*} \ln \frac{1}{k_B T} \quad (4.3.6)$$

Die Steigung der Geraden ergibt die Potentialbreite und die Lage, bestimmt durch den Schnittpunkt mit der x-Achse, ergibt den Faktor k^* für den entsprechenden Ladungsratenbereich.

$$k^* = \frac{F(F=0)}{k_B T} = \frac{F(F_{\text{Abriss}}=0)}{F_{\text{therm}}} \quad (4.3.7)$$

4.3.4. Monte Carlo Simulation für die Abrißkraft

Die Verteilung der Abrißkräfte läßt sich auch mit einer Monte Carlo Simulation bestimmen. Mit dieser wurde schon die Potentialbreite bei der Entfaltung von Ig- und Fibronektin-Domänen des Muskelproteins Titin bestimmt (30).

Die Kraft F ist wieder durch die Ausdehnung des Piezos ($x=v \cdot t$), der Federkonstante der Abtastnadel und der Dehnungscharakteristik des Polymers bestimmt. Die Wahrscheinlichkeit für den Abriß bei der Kraft F wird, mit der oben berechneten kraftabhängigen Dissoziationsrate (Gln. 4.2.12), für einen Zeitraum t berechnet:

$$P_{\text{zerfallen}} = 1 - e^{-k^* \frac{F}{k_B T} t} \quad (4.3.8)$$

Wenn diese Wahrscheinlichkeit größer als eine Zufallszahl zwischen 0 und 1 ist, dann bricht die Bindung auf. Ist sie kleiner, wird die Ausdehnung um $t \cdot v$ (v =Geschwindigkeit des Piezos) erhöht und die Wahrscheinlichkeit erneut berechnet. Aus jeweils 50 unabhängigen Simulationen ist so ein Mittelwert für die Abrißkraft und Ladungsrate für verschiedene Geschwindigkeiten gewonnen worden. In Abb. 4.3.4.1 ist exemplarisch die mit der Monte Carlo Simulation berechnete Abrißkraftverteilung für die Bindungskraft von Laktose an RCA, bei

einer Zuggeschwindigkeit von $v=1.2 \mu\text{m}/\text{sec}$, einem Polymerspacer mit 500 \AA Länge, der Potentialbreite $=4.1 \text{ \AA}$ und mit der kraftaktivierten off-Rate $k^*=0.8 \text{ sec}^{-1}$, skizziert.

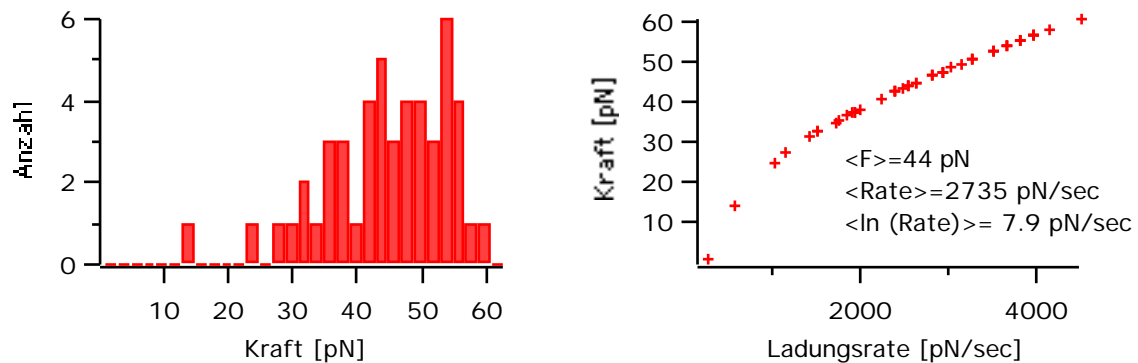


Abb. 4.3.4.1: Mit 50 Monte Carlo Simulationen ermitteltes Histogramm der Abrißkräfte und die zugehörigen Ladungsrate für die Bindungskraft von Laktose an RCA.

4.4. Bindungskraft Experimente

4.4.1. Die verwendeten Systeme

Die hier vorgestellten Experimente zur dynamischen Bestimmung der Bindungskraft sind mit Lektinen, das sind Zucker Liganden erkennende Proteine, die in Pflanzen und Lebewesen vorkommen, durchgeführt worden. In hier nicht gezeigten Vorexperimenten mit WGA (Wheat Germ Agglutinin), Concanavilin A und mit dem Helix Pomatia Agglutinin (siehe Kapitel 6, Affinitätsabbildung), ist festgestellt worden, daß mit den Lektinen Kraftexperimente durchgeführt werden können. Eine Kooperation mit H.-J. Gabius (Institut für Physiologische Chemie, Tierärztliche Fakultät, LMU) ergab sich aus der Frage nach einem physiologischen Hintergrund für die Messungen der Bindungskraft. Physiologisch gesehen ist das Bindungsverhalten verschiedener Rezeptoren, die die gleiche Monosaccharidspezifität teilen, aber keine Homologie der Bindungstasche aufweisen, interessant. Deswegen sind für diese Arbeit drei verschiedene Typen an Rezeptoren, zwei pflanzliche und ein tierisches Lektin und ein humaner Zucker Antikörper, verwendet worden. Mit diesen wurde das dynamische Bindungsverhalten zu zwei verschiedenen Zuckerliganden gemessen.

Das tierische Lektin Galektin-1 (Bovine Heart Lectin, BHL) spielt eine Rolle bei Zelladhäsionsprozessen, Proliferation und Apoptosis von Zellen. Es bindet an Glykolipide und triggert über transmembrane Signalgebung die Zelle (18). Es ist

aus zwei homologen Monomeren aufgebaut und weist jeweils an der Außenseite eine Bindungstasche auf (siehe Abb. 4.4.1.1).



Abb. 4.4.1.1: Röntgenstrukturaufnahme (1.9 Å Auflösung) von Galektin-1 (Brookhaven Proteindatenbank: 1slt) mit jeweils im Monomer gebundenen N-Acetylglucosamin (31).

Das pflanzliche Lektin VAA (*Viscum Album* Agglutinin) wird in der Onkologie als Krebsbekämpfungsmittel bei der Misteltherapie eingesetzt. Die Aufgabe der Lektine in den Pflanzen ist nicht bekannt. VAA ist aus einer toxischen A-Kette und der mit der Bindungstasche für Zuckerliganden ausgestatteten B-Kette aufgebaut. Über Endozytose wird VAA in die Zelle aufgenommen. Die Toxizität der A-Kette, einer RNA N-glycosidase, besteht in der Verhinderung der Biosynthese von Proteinen in der Zelle durch die Abspaltung der Adenosin-Gruppe Purin in einer hoch konservierten Schleife der ribosomalen 28S RNA. Das pflanzliche Lektin RCA (*Ricinus Communis* Agglutinin) ist zu VAA weitgehend homolog (61% Sequenzhomologie) und wirkt ebenso extrem toxisch auf Zellen (17). Wegen des vergleichbaren Aufbaus der Bindungstasche und den schon bekannten energetischen und kinetischen Parametern aus Titrationskalorimetrie- und SPR-Messungen (19-21) ist RCA als zweites pflanzliches Lektin verwendet worden.

Der humane Zucker Antikörper (IgG) weist einen von den Lektinen verschiedenen Aufbau der Bindungstasche auf und ist als Modell für einen nur bindenden Rezeptor ohne sekundäre Eigenschaften gewählt worden (persönliche Mitteilung von H.-J. Gabius).

Alle verwendeten Rezeptoren binden an Laktose (Gal(1 4)Glc; Gal: Galaktose, Glc: Glucose) und Asialofetuin (ASF). Laktose ist ein Zuckerligand aus zwei Monomeren, die im ungebundenen Zustand frei rotieren können. Für die

Rezeptoren VAA und BHL ist mit trNOE-Messungen (transferred nuclear Overhauser effect) (6, 32) eine Konformationsselektivität, die durch die Rotationsfreiheit der beiden Monomere der Laktose erreicht wird, nachgewiesen worden. Die Rotationsfreiheitsgrade sind am Beispiel der Laktose in Abb. 4.4.1.2 abgebildet.

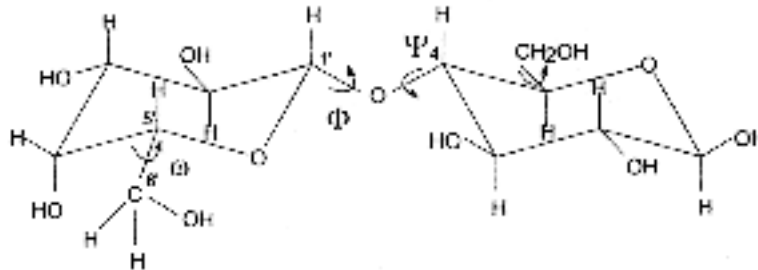


Abb. 4.4.1.2: Laktose mit Drehwinkeln Ψ_1 und Ψ_4 . Für bestimmte Winkelkombinationen liegen Energieminima der Konformation vor (aus (22)).

Asialofetuin (ASF) ist ein triantennäres Glykoprotein aus dem Rinderserum, das eine tannenbaumartige Struktur von Zuckerliganden aufweist. Diese besteht aus drei triantennären N-Glycan Ketten mit N-Acetyllactosamin (LacNAc 74%) oder seinem -1,3-isomer (9%) als Zuckerrest der Kette oder einer biantennären Kette die mit LacNAc (17%) terminiert ist (33, 34).

Die Bindung des Liganden in der Bindungstasche erfolgt zwischen den Endgruppen von Aminosäuren der Bindungstasche und den OH-Gruppen des Liganden über Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen. Schematisch dargestellt sind in der Abb. 4.4.1.3 diese Wechselwirkungen am Beispiel der Bindung von N-Acetylgalactosamin (galNAc) in einer der beiden Bindungstaschen des BHL.

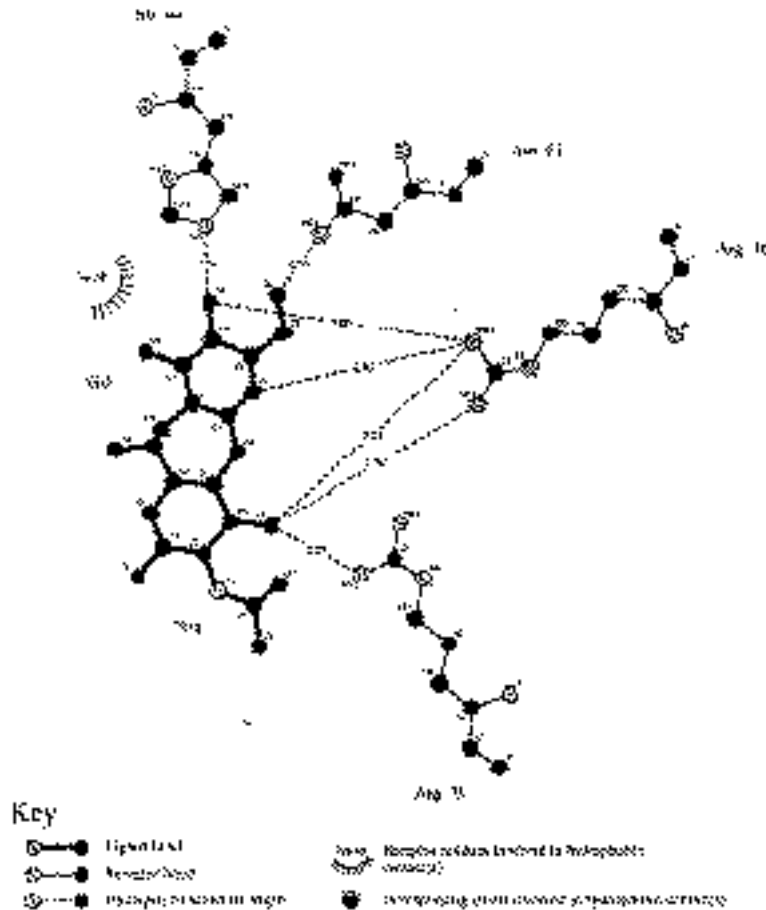


Abb. 4.4.1.3: Schematisierte 2-dimensionale Darstellung des gebundenen Liganden in der Bindungstasche von Galektin-1 (aus (22)).

Der Ligand wird in diesem Beispiel über 7 Wasserstoffbrückenbindungen und einen hydrophoben Kontakt gebunden. Wasserstoffbrückenbindungen tragen im wesentlichen zur Bildung und Stabilität (einige kJ pro Wasserstoffbrückenbindung) der Rezeptor-Ligand Bindung bei. Die OH-Gruppen des Zuckers können dabei als Akzeptor und Donor von Wasserstoffbrückenbindungen wirken. Wegen ihrer freien Rotationsmöglichkeit können sie die energetisch günstigste Position, die lineare Ausrichtung des Donors mit dem Akzeptor bei polaren Bindungen, in der Bindungstasche einnehmen und dadurch die Stabilität der Bindung erhöhen. Bindungspartner der OH-Gruppen sind dabei nicht nur Seitenketten der Aminosäuren sondern auch an der Proteinoberfläche angelagerte Wassermoleküle. Durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken, über Wassermoleküle in der Bindungstasche zwischen nicht direkt benachbarten Atomen des Liganden und des Rezeptors, wird die Bindung zusätzlich stabilisiert (22).

4.4.2 Experimenteller Ablauf

Für die Messungen mit einzelnen Molekülen sind entweder die Proteine oder die Liganden an den AFM Kraftsensor, wie im Anhang beschrieben, kovalent gekoppelt worden. Die getesteten Liganden oder Rezeptoren sind auf Agarosekugeln funktionalisiert (35) (siehe Abb. 4.4.2.1).

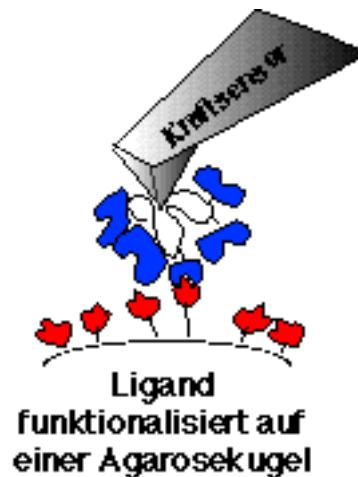


Abb. 4.4.2.1: Ein an Amylose kovalent angebundener Rezeptor bindet an seinen Liganden, funktionalisiert auf einer Agarosekugel.

Die Ankopplung von Proteinen und Liganden an Polymere verhindert unspezifische Wechselwirkungen und erhöht die spezifische Bindungsfähigkeit für Rezeptor Ligand Paare (36, 37). Die Länge der Amylose als Abstandhalter zum Kraftsensor variiert je nach Ankopplungspunkt von einigen nm bis zu μm . In den Experimenten sind zur Bestimmung der Abrißkraft Kraftkurven, wie sie in Kapitel 3 und im Anhang beschrieben sind, aufgezeichnet worden. Bei den Kraftkurven wird bei der Separation des Kraftsensors von der Probe bis zum Abriß des Rezeptors vom Liganden das verbindende Polymer zwischen dem Kraftsensor und dem Rezeptor gedehnt. Dieser Effekt erlaubt die Bestimmung von Einzelmolekülexperimenten, die die Dehnungscharakteristik der Amylose vor dem Abriß aufweisen (38).

In den durchgeführten Experimenten ist der Kraftsensor bis zu einer bestimmten Eindrückungskraft (40 pN bei RCA&VAA, 100 pN bei BHL&IgG) mit der Agarosekugel in Kontakt gebracht und wieder entfernt worden. Die Annäherungsgeschwindigkeit ist konstant gehalten, die Ziehgeschwindigkeit von 0.02-6 $\mu\text{m}/\text{sec}$ variiert worden. Durch diese Variation läßt sich die Bindungskraft des Rezeptor-Ligand Paares abhängig von der Ladungsrate bestimmen. In den Experimenten werden die Kraftkurven während der Annäherung und der

Separation aufgezeichnet und anschließend analysiert. Die in Abb. 4.4.2.2 exemplarische gezeigte Kraftkurve kann in drei Abschnitte unterteilt werden.

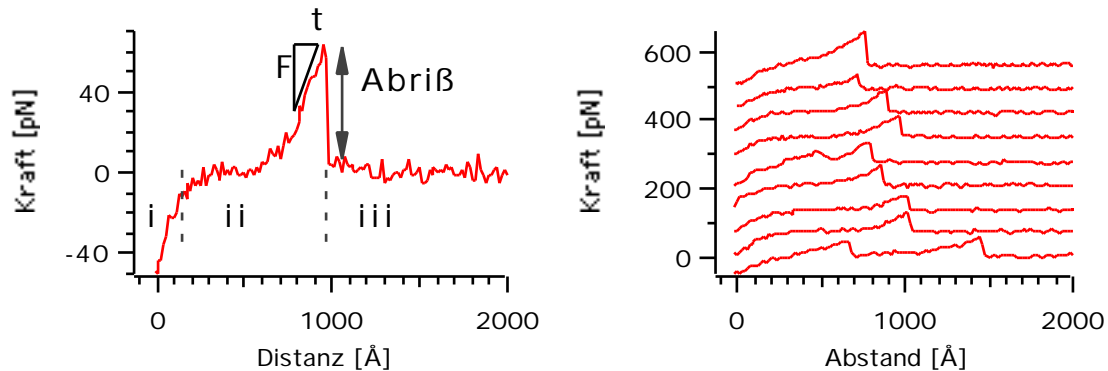


Abb. 4.4.2.2 links: Schematisierte Darstellung der Ladungsraten Bestimmung mit $t = \text{Distanz}/\text{Ziehgeschwindigkeit}$; rechts: Auswahl an Kraftkurven mit deutlicher Dehnung des Polymers vor dem Abriß, aufgenommen mit RCA funktionalisiertem Kraftsensor und Laktose auf der Agarosekugel.

Im ersten Abschnitt (i) ist die funktionalisierte Abtastnadel für eine bestimmte Zeit in Kontakt mit der Agarosekugel und die Separation des Kraftsensors von dieser beginnt. Die Kontaktzeit beträgt ungefähr 30 msec für 40 pN Eindrückkraft (RCA, VAA) ohne zusätzliche Wartezeit beim Kontakt und ungefähr 60 msec bei 100 pN Eindrückkraft (BHL, IgG). Im zweiten Abschnitt (ii) wird der Amylosepolymer, der den Rezeptor mit dem Kraftsensor verbindet, gedehnt und der Kraftsensor wegen der ausgeübten Kraft ausgelenkt. Im dritten Abschnitt (iii) entspricht der letzte Abriß der Abrißkraft der Rezeptor-Ligand Bindung. Die gemessene Abrißkraft entspricht der Kraft, bei der die Potentialbarriere ausreichend verringert wurde, so daß der Ligand aus der Bindungstasche gelöst werden konnte. Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, entspricht eine hohe Abrißkraft entweder einer hohen Ladungsrate mit einer kurzen Zeitspanne für die spontane Dissoziation über die verringerte Potentialbarriere, oder bei niedrigen Ladungsraten einer starken Bindung, die eine hohe Affinität des Rezeptor-Ligand Paares besitzt.

Die schematisch eingezeichnete Steigung in der Kraftkurve ($dF/dx = dF/(v \cdot dt)$) entspricht der maximal anliegenden Ladungsrate (dF/dt) an der Rezeptor-Ligand Bindung. Die maximale Ladungsrate am Abriß wird im Folgenden Ladungsrate genannt. Durch die Variation der Geschwindigkeit des Piezos (0.02-6 $\mu\text{m}/\text{sec}$) sind Ladungsraten im Bereich von 10-20000 pN/sec am Abriß erreicht worden. Für niedrige Ladungsraten ist dieser Bereich durch Drifteffekte und die Kraftauflösung limitiert. Wegen hydrodynamischer Effekte, die die aufgezeichneten Kraftkurven dämpfen und durch die hohe Zuggeschwindigkeit

verursacht werden, sind die Ladungsraten nach oben limitiert. Typische Kraftkurven, aufgezeichnet mit einer Piezugeschwindigkeit von $1.2 \mu\text{m}/\text{sec}$, sind in Abb. 4.4.2.2 für die RCA-Laktose Experimente gezeigt. Um Adhäsionen aus direkter Oberflächenwechselwirkung auszuschließen, sind aus allen verschiedenen Experimenten nur die Kraftkurven, die einen Abriß in einer Entfernung von mehr als 20 nm von der Probe aufweisen, analysiert worden.

Am Beispiel einer Messung am System RCA-Laktose für drei verschiedene Ziehgeschwindigkeiten, $4.6-1.1-0.2 \mu\text{m}/\text{sec}$, wird die Evaluierung der Daten vorgestellt. Um eine statistische Verteilung der Abrißkräfte unter gleichbleibenden experimentellen Bedingungen für ein Rezeptor-Ligand Paar zu erhalten, sind generell zwischen 500 und 5000 Kraftkurven mit demselben funktionalisierten Kraftsensor und einer gleichbleibenden Piezugeschwindigkeit aufgezeichnet worden. In Abb. 4.4.2.3 sind die 2-D Histogramme der Bindungskraft und die Verteilung der Bindungskraft gegen die Ladungsrate am Abriß als 3-D Histogramm gezeigt. Die schwarzen Pixel in dem 3-D Histogramm entsprechen dabei der maximalen Anzahl von gemessenen Abrissen in dem entsprechenden Ladungsratenbereich. Die Daten wurden alle mit dem selben Kraftsensor für die drei verschiedenen Geschwindigkeiten aufgenommen. Eindeutig ist eine Verschiebung des Maximums der Abrißkraft zu geringeren Werten bei geringerer Zuggeschwindigkeit in den 2-D Histogrammen zu erkennen ($70-50-35 \text{ pN}$ für $4.6-1.1-0.2 \mu\text{m}/\text{sec}$). Zugleich nimmt der Bereich der gemessenen Ladungsrate am Abriß ab, wie in den 3-D Histogrammen zu sehen ist.

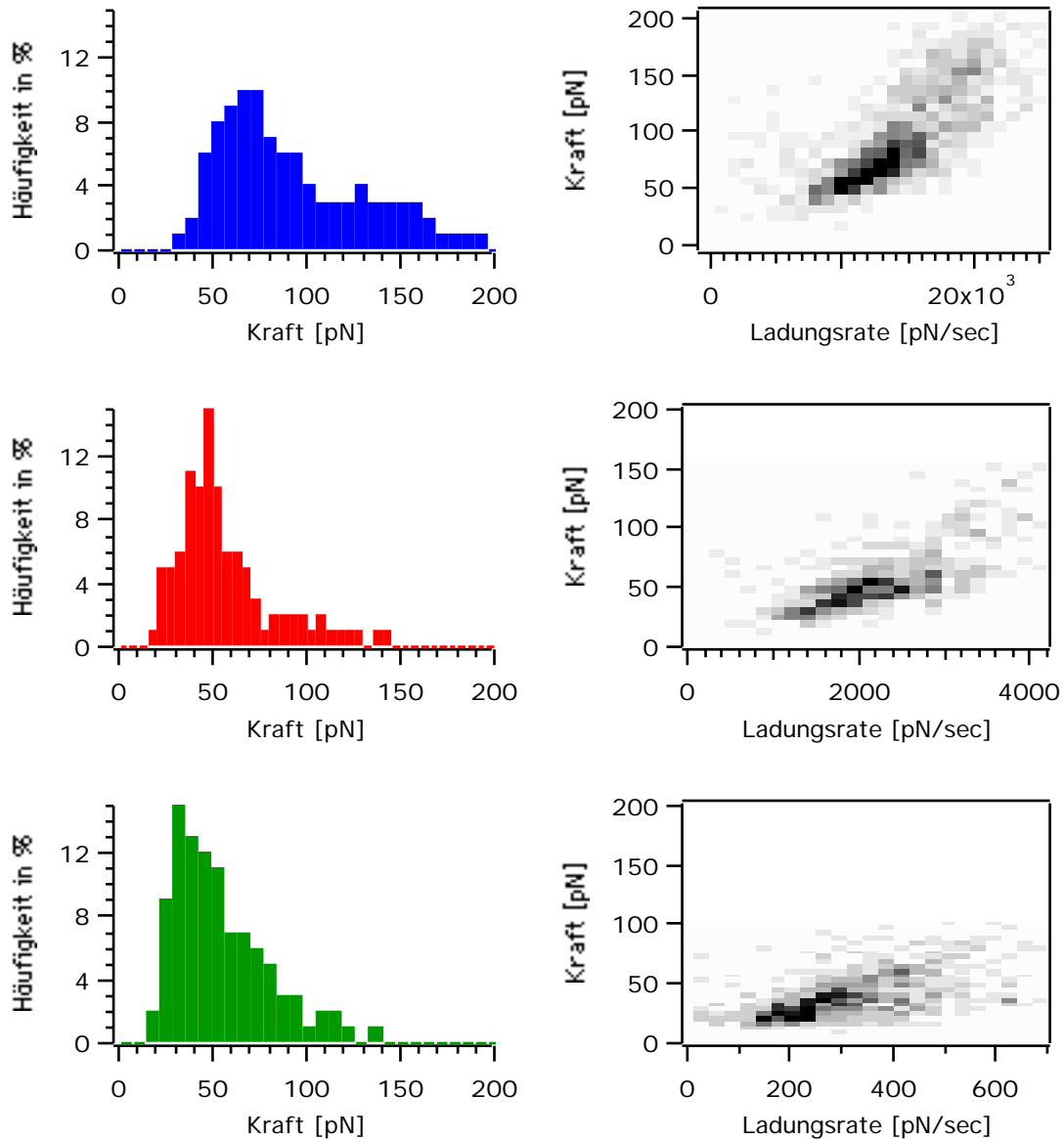


Abb. 4.4.2.3: Histogramme und Verteilung der Abrißkraft gegenüber der Kraftladungsrate als 3-D Histogramm von RCA Laktose Bindungen in PBS-Lösung mit 50 μM Laktose. Schwarz bedeutet maximale Häufigkeit, weiß kein Ereignis. Von oben nach unten: 4,6 μm/sec (3840 Kraftkurven; 28% mit Adhäsion); 1,1 μm/sec (2368 Kraftkurven; 21% mit Adhäsion); 0,2 μm/sec (4480 Kraftkurven; 15% mit Adhäsion).

Aus den Daten der Messungen für eine bestimmte Ziehgeschwindigkeit werden die Mittelwerte der Abrißkraft und der Ladungsrate gebildet. Um Mehrfachbindungen und Rauschen an der Auflösungsgrenze auszuschließen, sind für die Mittelwertbildung der Abrißkraft nur die Daten aus der Abrißkraft/Ladungsrate Verteilung mit mindestens 50% der maximalen Häufigkeit verwendet worden. Die Verteilung der Mittelwerte der Abrißkraft

gegenüber dem natürlichen Logarithmus der Ladungsrate, für die drei verschiedenen Ziehgeschwindigkeiten der in Abb. 4.4.2.3 gezeigten RCA Laktose Daten, ist in Abb. 4.4.2.4 links dargestellt. Die Fehlerbalken der Kreuze repräsentieren dabei die Standardabweichung vom Mittelwert, die Ausdehnung die zu Grunde liegende Datenanzahl. Daneben sind die zusammengefaßten Abrißkraft/Ladungsraten Verteilungen der drei verschiedenen Geschwindigkeiten gezeigt.

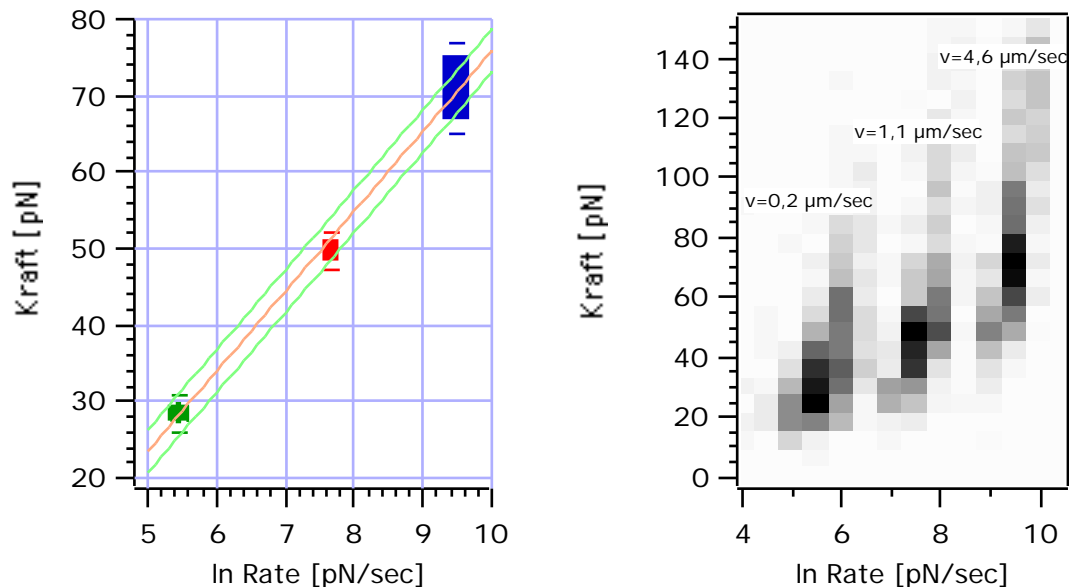


Abb. 4.4.2.4: links: Mittelwerte der Bindungskraft und der entsprechenden Ladungsrate für die drei verschiedenen Ziehgeschwindigkeiten ($0,2$ - $1,1$ - $4,6 \mu\text{m/sec}$). Angefittete Regressionsgerade mit $\Delta x = 4,0 \pm 0,3 \text{ \AA}$ und $k^* = 1,5 \pm 0,5 \text{ s}^{-1}$. Rechts: Zusammenfassung der Bindungskraft Ladungsraten Abhängigkeit der Einzeldaten.

Zusätzlich ist in der Abb. 4.4.2.4 ein Fit der Mittelwerte, die Regressionsgerade (siehe Anhang) mit ihrer Standardabweichung, eingezeichnet.

4.5. Resultate

4.5.1. Blockexperimente und pH-Variation

4.5.1.1. Blocken mit Laktose

Zum Nachweis der Spezifität der Bindungskraft ist jedes System mit freier Laktose in der PBS-Lösung, dem Meßmedium, geblockt worden. In einer 100 mM Laktose-Lösung ist die Wechselwirkung nahezu vollständig geblockt ($<1\%$ adhäsive Interaktionen). In Abb. 4.5.1.1.1&2 ist am Beispiel der VAA-Laktose

Rezeptor-Ligand Wechselwirkung die Abnahme der Interaktionshäufigkeit in einer 5 mM Laktose-Lösung (7% adhäsive Interaktionen) im Gegensatz zu einer Messung ohne freier Laktose in PBS (83% adhäsive Interaktionen) gezeigt.

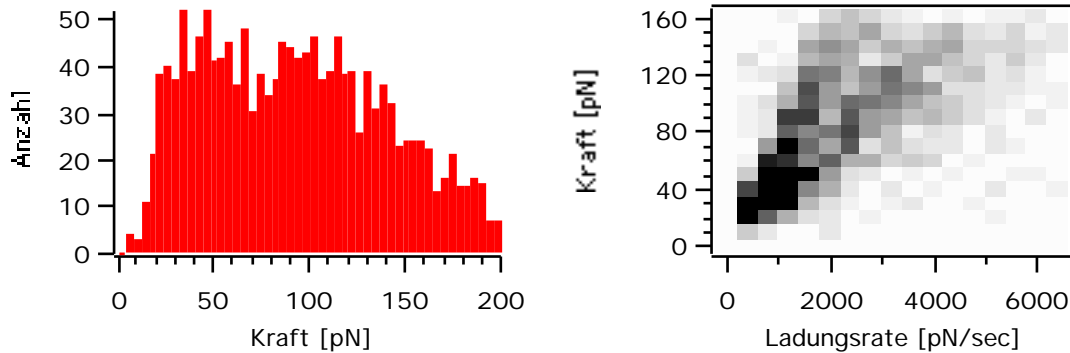


Abb. 4.5.1.1.1: VAA-Laktose Abrißkraftverteilung in PBS (pH 7,4) ohne freie Laktose in der PBS-Lösung (1920 Kraftkurven, 1587 Kraftkurven (=83%) mit Adhäsion)

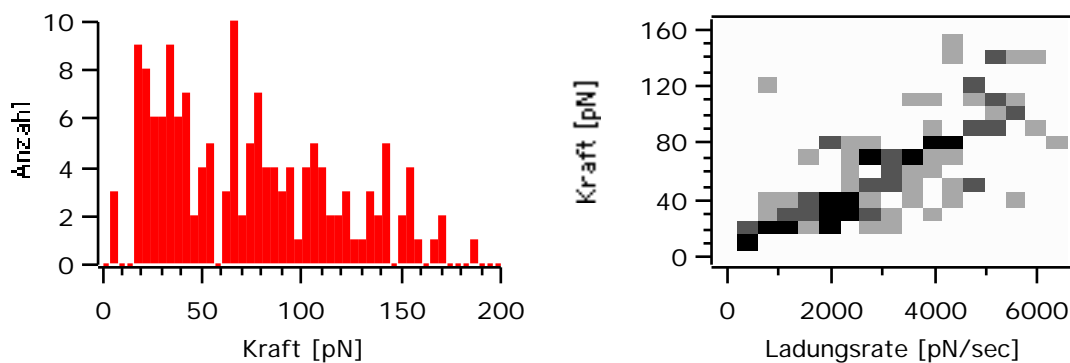


Abb. 4.5.1.1.2: VAA-Laktose Abrißkraftverteilung in PBS (pH 7,4) mit 5 mM freier Laktose in der PBS-Lösung (2240 Kraftkurven, 152 Kraftkurven (=7%) mit Adhäsion)

Im Gegensatz zum nahezu vollständigen Blocken der Lektin-Laktose Interaktionen mit 100 mM Laktose in PBS führte das Blocken der Lektin-ASF Wechselwirkung mit 100 mM freier Laktose nur zu einer Reduzierung der Interaktionshäufigkeit, wie in Abb. 4.5.1.1.3&4 gezeigt ist.

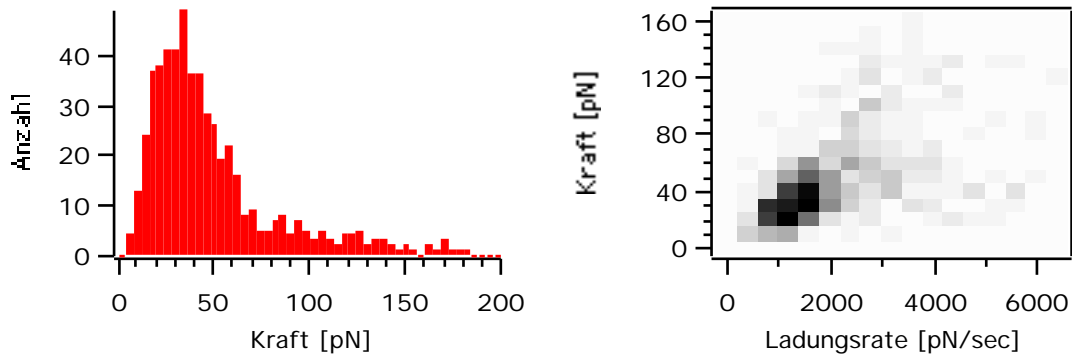


Abb. 4.5.1.1.3: VAA-ASF Abrißkraftverteilung in PBS (pH 7,4, 2624 Kraftkurven, 543 Kraftkurven (=21%) mit Adhäsion)

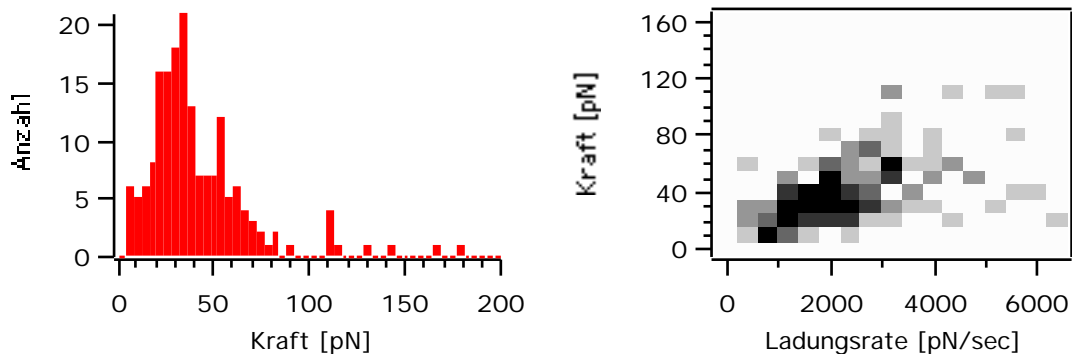


Abb. 4.5.1.1.3: VAA-ASF Abrißkraftverteilung in PBS (pH 7,4) mit 100 mM freier Laktose in der Lösung (3008 Kraftkurven, 180 Kraftkurven (=6%) mit Adhäsion)

Die Interaktionshäufigkeit verringerte sich auf ein Drittel der ursprünglichen Häufigkeit (6% mit 100 mM freier Laktose in PBS im Gegensatz zu 21% in purer PBS-Lösung). Wegen seiner triantennären Struktur mit der konzentrierten Präsentation von 9 Liganden, durch ein ASF-Protein im Bereich der Kontaktfläche mit dem Kraftsensor, ist eine Bindungsbildung anscheinend gegenüber dem einzelnen Laktoseliganden begünstigt.

4.5.1.2. Variation des pH-Wertes

Der Einfluß des pH-Wertes der Lösung hatte keinen wesentlichen Effekt auf die Bindungskraft, wie in Abb. 4.5.1.2.1&2 für die pH-Werte 7,4 und 9,0 gezeigt ist. Das Maximum der Verteilung der Abrißkräfte liegt für beide pH-Werte zwischen 25 und 30 pN. Abgebildet ist die Zucker IgG Wechselwirkung mit Laktose. Die Bindungsbildung in saurer Lösung (pH 5) wurde allerdings fast nahezu verhindert (<2%) und deswegen nicht abgebildet.

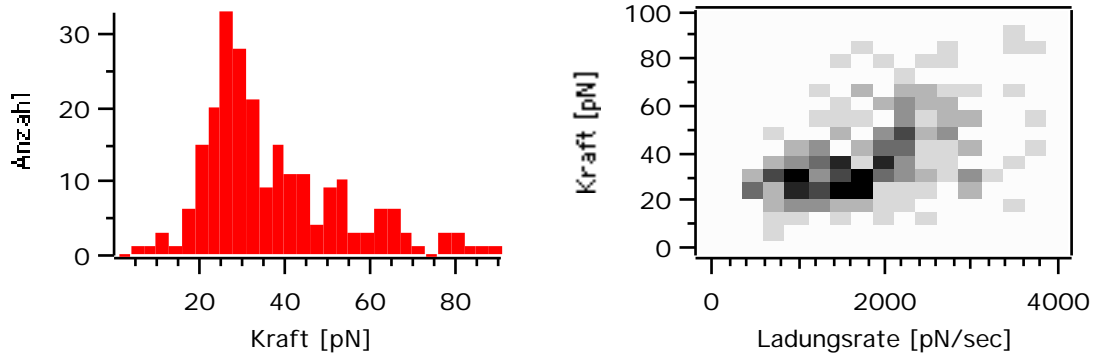


Abb. 4.5.1.2.1: IgG-Laktose Wechselwirkung bei pH 7,4 (3008 Kraftkurven, 230 Kraftkurven (=8%) mit Adhäsion)

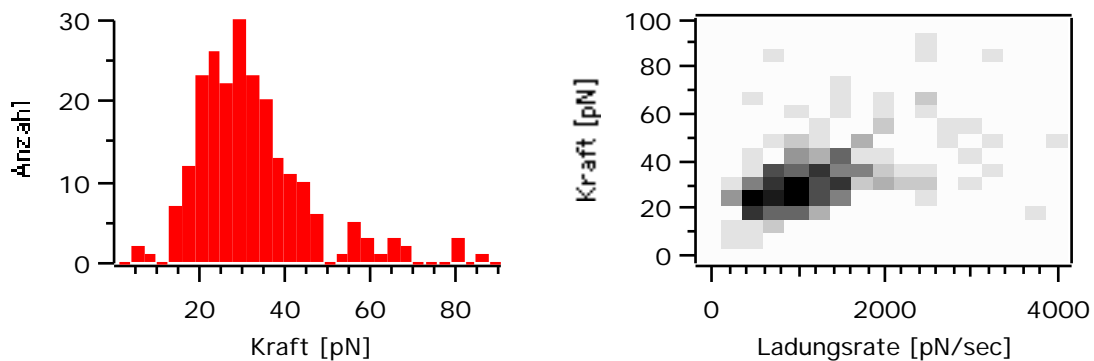


Abb. 4.5.1.2.2: IgG-Laktose Wechselwirkung bei pH 9,5 (2048 Kraftkurven, 226 Kraftkurven (=11%) mit Adhäsion)

Der verschwindende Effekt auf die Bindungskraft ist darin zu sehen, daß der Ligand in der Bindungstasche von dieser gegen äußere Einflüsse abgeschirmt ist und erst bei der Solvatisierung der Oberfläche den veränderten pH bemerkt. Die verhinderte Wechselwirkung bei pH 5 kann durch die geänderte Ladungsverteilung des Liganden in der Lösung oder der Bindungstasche, mit einer möglicherweise veränderten Struktur, bedingt sein, so daß keine Bindungen mehr eingegangen werden können.

4.5.2. Daten der Rezeptor-Ligand Paar Interaktionen

In Abschnitt 4.4.2 ist der experimentelle Ablauf der Rezeptor-Ligand Messungen, am Beispiel des Bindungspaares RCA-Laktose, beschrieben worden. Für einen Kraftsensor sind mit 3 verschiedenen Piezugeschwindigkeiten die jeweiligen Mittelwerte der Abrißkraft und der Ladungsrate bestimmt worden. Diese Messungen sind mit mehreren RCA-Lektin funktionalisierten Kraftsensoren und Laktose immobilisierten Agarosekugeln, für verschiedenste Piezoge-

schwindigkeiten, wiederholt worden. Die Zusammenfassung aller gemessenen Mittelwerte der Abrißkraft, aufgetragen gegenüber der Ladungsrate, ist in Abb. 4.5.2.1.RCA gezeigt. Die Häufung der Datenpunkte resultiert aus den meistens verwendeten Piezugeschwindigkeiten von 0.2-1.2-4.5 $\mu\text{m}/\text{sec}$. Die Streuung der Mittelwerte der Abrißkraft bei gleichen mittleren Ladungsraten ist durch die Verwendung verschiedener Kraftsensoren, deren Federkonstante mit einem Fehler von ungefähr 10% bestimmt wurde, bedingt. Die Dicke der Meßpunkte repräsentiert die Anzahl der zu Grunde liegenden Daten aus dem, in Abschnitt 4.4.2 erklärten, 50% Kriterium für die Mittelwert Bildung.

Ebenso sind die Messungen für die anderen 3 Rezeptor-Ligand Paare (VAA, IgG und BHL gegen Laktose durchgeführt worden und in Abb. 4.5.2.1 gezeigt. Die Datendichte bei den IgG- und BHL- Bindungskraft Experimenten ist, wegen einer beobachteten wesentlich geringeren Bindungswahrscheinlichkeit, niedriger. Die Datenverteilung zeigt die Limitierung durch das Meßinstrument. Höhere Raten sind wegen hydrodynamischer Dämpfung bei hohen Piezugeschwindigkeiten mit den verwendeten Kraftsensoren nicht erreichbar. Niedrigere Raten sind durch die Auflösungsgrenze des AFM begrenzt. Bei einer angelegten Ladungsrate von $\ln(\text{Rate})=5$ pN/sec liegt die Auflösungsgrenze für die Bildung des Mittelwerts bei 20 pN. Dieser Wert ist höher als die tatsächliche Kraftauflösung, jedoch müssen für den Mittelwert auch niedrigere Abrißkräfte als der Mittelwert selbst, in dem Fall 20 pN, gemessen werden können.

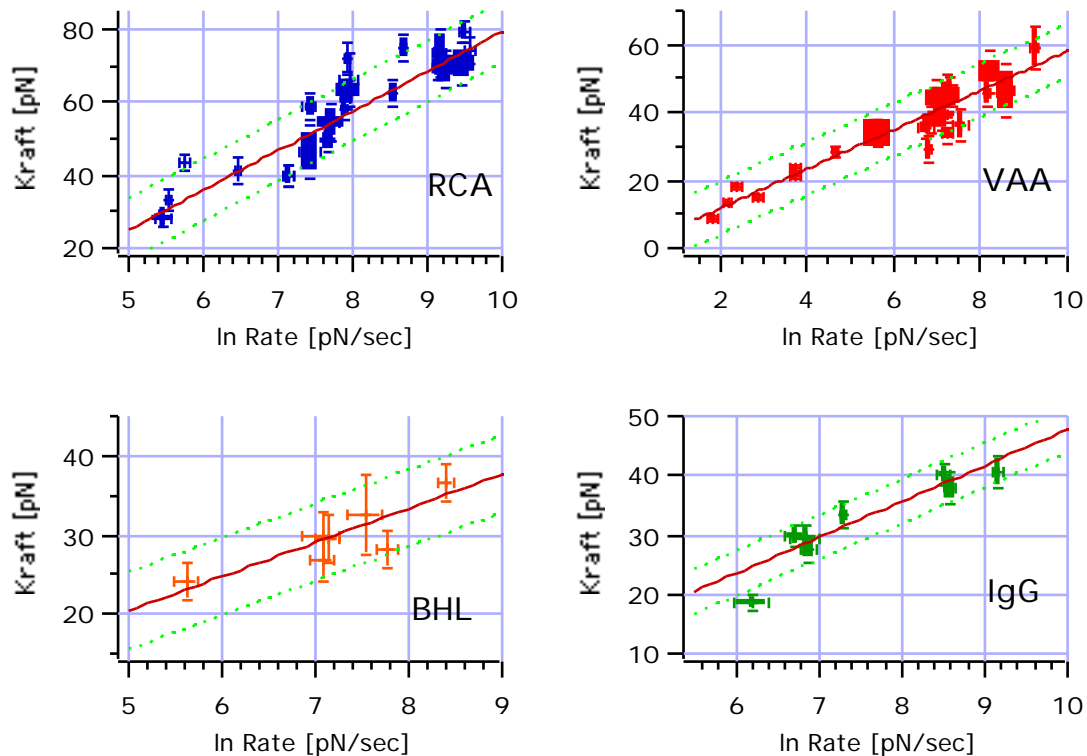


Abb. 4.5.2.1: Übersicht der Abrißkräfte der Interaktionen mit Laktose, aufgetragen gegen den natürlichen Logarithmus der Ladungsrate. Gesamtanzahl der nach dem 50% Kriterium zu Grunde liegenden Abrisse: RCA: 2600; VAA: 2400; BHL: 160; IgG: 250.

Wie aus den Messungen klar zu erkennen ist, besitzen die beiden pflanzlichen Lektine unterschiedliche Bindungseigenschaften zum Liganden Laktose. Für Ladungsraten, die größer als 700 pN/sec sind, sind die Mittelwerte der Abrißkräfte der RCA-Laktose Bindung höher und steigen mit wachsender Ladungsrate schneller an als die Mittelwerte der VAA-Laktose Abrißkräfte. Bei einer Ladungsrate von 3000 pN/sec ($\ln 3000=8$) beträgt die Abrißkraft für RCA-Laktose 58 ± 9 pN und für VAA-Laktose 47 ± 7 pN. Im Vergleich zu den Bindungseigenschaften der beiden pflanzlichen Lektine zum Liganden Laktose ist das tierische Lektin BHL gemessen worden. Im experimentell zugänglichen Bereich der Ladungsrate (150-10000 pN/sec) binden die pflanzlichen Lektine generell stärker den Liganden Laktose als das tierische Lektin. Bei einer Ladungsrate von 3000 pN/sec beträgt die Bindungskraft des BHL-Laktose Paares 34 ± 6 pN. Um die Bindungsstärke für einen IgG Antikörper zu bestimmen, ist die Laktose bindende IgG Fraktion aus humanen Serum verwendet worden. Die Bindungsstärke des IgG-Laktose Paares, mit einer mittleren Abrißkraft von 36 ± 4 pN bei einer Ladungsrate von 3000 pN/sec, ist im gesamten experimentell

zugänglichen Bereich der Ladungsrate von 150-10000 pN/sec generell mit der Bindungsstärke der BHL-Laktose Interaktion vergleichbar.

Im Vergleich zu den Messungen mit dem Liganden Laktose sind ebenso Messungen mit dem Protein ASF als Liganden durchgeführt worden. Die experimentellen Ergebnisse sind in Abb. 4.5.2.2 gezeigt.

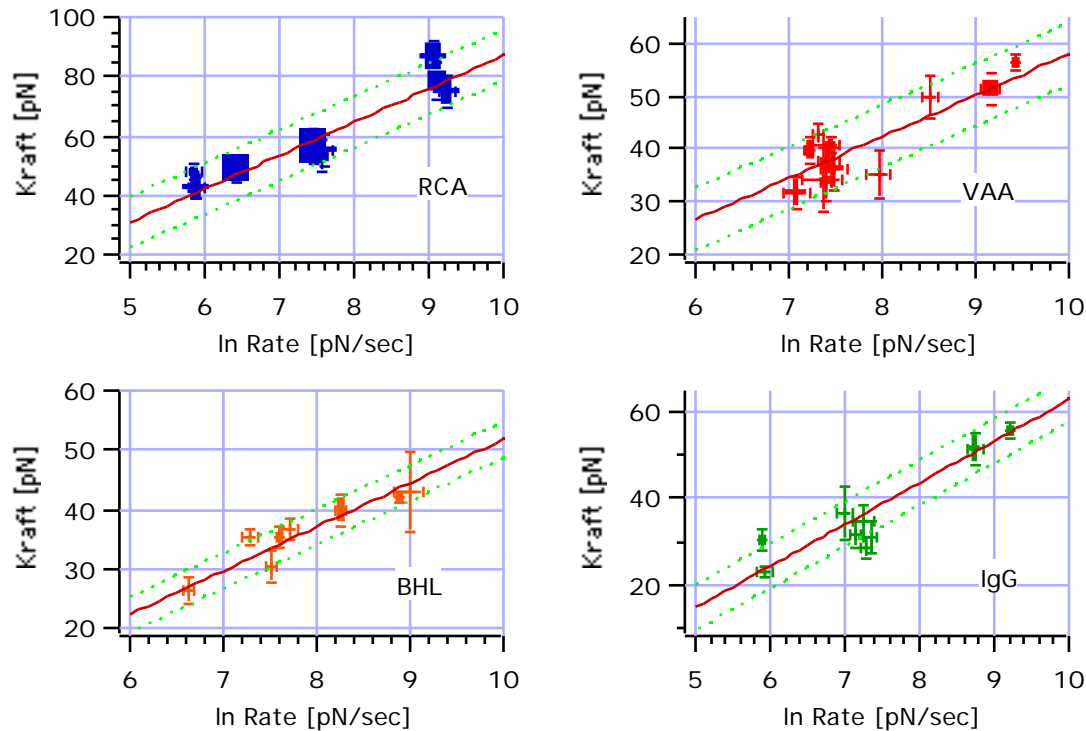


Abb. 4.5.2.2: Übersicht der Abrißkräfte der Interaktionen mit ASF, aufgetragen gegen den natürlichen Logarithmus der Ladungsrate. Gesamtanzahl der nach dem 50% Kriterium zu Grunde liegenden Abrisse: RCA: 4000; VAA: 600; IgG: 200; BHL: 170.

Wie bei den Lektin-Laktose Bindungskraftmessungen experimentell gemessen wurde, sind die Bindungskräfte der pflanzlichen Lektine bei der Wechselwirkung mit ASF im Vergleich zu dem tierischen Lektin wieder generell höher im experimentell zugänglichen Bereich der Ladungsrate (400-10000 pN/sec). Die mittleren Abrißkräfte für die RCA-ASF Interaktion waren die höchsten mit 65 ± 9 pN bei einer Ladungsrate von 3000 pN/sec im Vergleich zu 43 ± 5 pN (VAA-ASF) und 37 ± 3 (BHL-ASF) bei derselben Ladungsrate. Die Bindungsstärke für das IgG-ASF Paar, mit 45 ± 6 pN bei einer Ladungsrate von 3000 pN/sec, ist im gemessenen Bereich der Ladungsrate generell vergleichbar mit der des VAA-ASF Paares. ASF wird von dem IgG damit stärker als der Ligand Laktose gebunden.

Die Zusammenfassung der Abrißkraft/Ladungsratenverteilungen ist in Abb. 4.5.2.3 gezeigt.

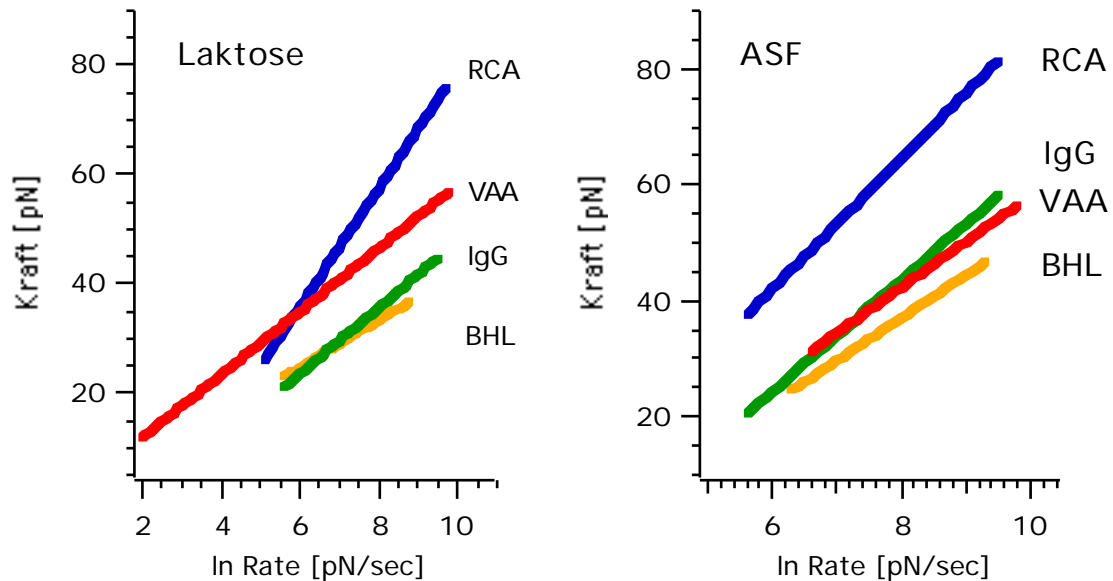


Abb. 4.5.2.3: Zusammenfassung der gemessenen Protein-Laktose bzw. Asialofetuin Bindungskraft Abhängigkeit von der Ladungsrate.

In der Zusammenfassung ist nochmal deutlich sichtbar, daß für die Laktose Interaktionen mit einer Ladungsrate größer als $\ln(\text{Rate})=7$ pN/sec und generell für die ASF Interaktionen, RCA eindeutig die größte Bindungsstärke aufweist. Ebenfalls deutlich ist der Unterschied in der Bindungsstärke zwischen VAA-Laktose gegenüber den IgG-Laktose oder BHL-Laktose Wechselwirkungen. Die Bindungsstärke von BHL zu Laktose zeigt eine leichte Tendenz zur schwächsten Laktose Wechselwirkung.

Abgesehen von der Bindungsstärke des RCA-ASF Paars sind die Unterschiede in der Bindungskraft zwischen den anderen Bindungspartnern zu ASF nicht so groß. BHL weist analog zur Laktose Interaktion auch zu ASF die schwächste Bindungskraft auf.

Aus den experimentell erhaltenen Bindungsstärken sind, mit den in Kapitel 4.3 vorgestellten theoretischen Modellen, die für das Bindungspotential relevanten Werte, die Potentialbreite $= x$ und die kraftaktivierte off-Rate k^* , für die Interaktionen berechnet worden und in Tabelle 4.5.2.T.1 zusammengefaßt. Die Werte wurden mit der Berechnung der Wahrscheinlichkeitsdichte, Monte Carlo Simulationen und der Näherungslösung ermittelt. Die SPR-Daten (Oberflächen Plasmonen Spektroskopie) sind von Martin Benoit gemessen worden.

Tab. 1a	[Å]	k* [sec ⁻¹]	k _{off} [sec ⁻¹]	Tab. 1b	[Å]	k* [sec ⁻¹]	k _{off} [sec ⁻¹]
RCA-Laktose			SPR	RCA-ASF			SPR
Wahrsch.-D.	4.1±0.7	0.8	0.0011	Wahrsch.-D.	4.1±0.6	0.4	0.0012
Monte Carlo	3.8±0.7	0.9	±6*10 ⁻⁴	Monte Carlo	3.8±0.6	0.3	±4*10 ⁻⁴
Näherungslsg.	3.7±0.7	1.3		Näherungslsg.	3.7±0.6	0.8	
VAA-Laktose			SPR	VAA-ASF			SPR
Wahrsch.-D.	7.5±1.6	0.09	0.0011	Wahrsch.-D.	6.0±0.9	0.9	0.0013
Monte Carlo	7.1±1.6	0.09	±2*10 ⁻⁴	Monte Carlo	5.3±0.9	0.8	±5*10 ⁻⁵
Näherungslsg.	7.2±1.6	0.2		Näherungslsg.	5.3±0.9	1.7	
IgG-Laktose			SPR	IgG-ASF			SPR
Wahrsch.-D.	7.2±0.9	0.9	0.0013	Wahrsch.-D.	4.8±0.7	1.6	0.00055
Monte Carlo	6.9±0.9	1.0	±3*10 ⁻⁴	Monte Carlo	4.3±0.7	1.6	±3*10 ⁻⁵
Näherungslsg.	6.8±0.9	1.4		Näherungslsg.	4.2±0.7	3.4	
BHL-Laktose			SPR	BHL-ASF			SPR
Wahrsch.-D.	10.2±1.	0.09	0.0005	Wahrsch.-D.	6.2±0.6	1.3	0.0011
Monte Carlo	9.6±1.7	0.1	±2*10 ⁻⁴	Monte Carlo	5.6±0.6	1.3	±5*10 ⁻⁴
Näherungslsg.	9.7±1.7	0.3		Näherungslsg.	5.6±0.6	2.7	

Tabelle 4.5.2.T.1: Zusammenfassung der ermittelten Daten für die Potentialbreite = x, die durch Krafteinfluß veränderte off-Rate k* und die mit SPR gemessene off-Rate k_{off}. a) Laktose-Interaktionen b) ASF-Interaktionen

Die mit den beiden Simulationsansätzen, Wahrscheinlichkeitsdichte und Monte Carlo Simulation, berechneten Werte für die kraftaktivierte off-Rate stimmen annähernd exakt miteinander überein. Die Breite der Potentialbarriere wird durch die Monte Carlo Methode etwas geringer berechnet. Die Simulationsmethoden sind demnach gleichwertig zur Ermittlung der Größen k* und . Die Näherungslösung der Wahrscheinlichkeitsdichte liefert dieselbe Potentialbreite, jedoch ungefähr den doppelten Wert für die kraftaktivierte off-Rate. Da sich die Werte der Näherungslösung direkt aus der linearen Regression ergeben, sind sie gute Abschätzungen für die zeitaufwendigeren Simulationen. Die SPR-Daten für die pflanzlichen Lektine (um 1.2*10⁻³ sec⁻¹) unterscheiden sich für beide Liganden nicht. Im Gegensatz dazu ist die natürliche off-Rate der beiden Liganden gemessen mit dem BHL-Laktose und dem IgG verschieden. Möglicherweise beeinflusst die Struktur der beiden Rezeptoren, y-Form des IgG und sich gegenüberliegende Bindungstaschen des BHL, im Wechselspiel mit der Ligandpräsentation, einfacher Laktose-Ligand und triantennäres Protein, das Bindungsverhalten.

4.6. Diskussion der Resultate

Die lineare Abhängigkeit der gemessenen Abrißkräfte vom natürlichen Logarithmus der Ladungsrate (Abb. 4.5.2.1-3) läßt eine Beschreibung der Bindungspotentiale mit der in Kapitel 4.2&3 eingeführten Theorie zu. Analog zu den schon publizierten Messungen mit P-Selectin (16) und Biotin/(Strept-)Avidin (5) dominiert auch für die hier gemessenen Lektine eine scharfe Potentialbarriere mit einer definierten Potentialbreite die Dissoziation unter Krafteinwirkung. Die mit der Wahrscheinlichkeitsdichte, Monte Carlo Simulation und der Näherungslösung berechneten Werte für die kraftaktivierte off-Rate (k^*) und die Potentialbreite (Δx) sind in der Tabelle 4.5.2.T.1 aufgelistet.

Die Potentialbreite ergibt einen Einblick in die Energielandschaft des Bindungspotentials, die der Ligand in der Bindungstasche spürt. Die Breite steigt für die Rezeptor-Laktose Wechselwirkung von 4 Å für RCA über 7 Å für VAA oder IgG auf 10 Å für BHL an. Bei der Rezeptor-ASF Wechselwirkung ist der Anstieg der Breite nicht so ausgeprägt aber tendenziell analog. Aus den Bindungskräften der Lektin-Laktose Wechselwirkungen ist eine reziproke Korrelation der Bindungsstärke (RCA: stärkste Bindung) mit der Breite des Potentials (RCA: geringste Breite) für $\ln(\text{Rate}) > 7$ pN/sec offensichtlich (Abb. 4.5.2.3). Die unterschiedliche Abhängigkeit der Abrißkraft von der Ladungsrate und die verschiedenen Potentialbreiten der gemessenen Rezeptor-Ligand Paare ergeben, daß auf den gleichen Liganden bei verschiedenen Rezeptoren, oder den gleichen Rezeptor bei verschiedenen Liganden, unterschiedliche Bindungspotentiale wirken und die Bindungsstärke bestimmen.

Einen Einblick in den Widerstand gegen die Dissoziation unter Kraft gibt die kraftaktivierte off-Rate (k^*), die für einen entsprechenden Kraft/Ladungsratenbereich bestimmt worden ist. Die drastische Diskrepanz von k^* gegenüber der natürlichen off-Rate (k_{off}) läßt sich mit inneren Energiebarrieren des Potentials erklären (Abb. 4.2.3.1). Dieses Modell ist von Merkel et al. zur Interpretation der von ihm gemessenen Biotin/Avidin Daten eingeführt worden (5). Gemäß diesem Modell dominieren bei gemessenen höheren kraftaktivierten off-Raten als k_{off} innere Potentialbereiche das Dissoziationsverhalten der Rezeptor-Ligand Bindung für den relevanten Kraft/Ladungsratenbereich. Wegen dieser Diskrepanz kann für die hier gemessenen Rezeptor-Ligand Paare zumindest ein Bindungspotential mit 2 Minima und 2 verschiedenen Potentialbreiten, wie in Abb. 4.2.3.1 skizziert, angenommen werden. Die minimale Abrißkraft f_{trans} für die experimentell zugängliche Potentialbreite läßt sich mit der thermischen Energie $k_B T$ abschätzen. Wenn f_{trans} kleiner als $f = k_B T / \Delta x$ ist, dann würde die Bindung bei der äußersten Potentialbreite durch thermische Anregung und nicht mehr wegen

einer steigenden Ladungsrate gelöst. Bei noch vorhandenen äußeren Potentialbreiten dominiert für kleinere Kräfte als f_{trans} die nächste Barriere die Dissoziation. Für 4 Å Potentialbreite entspricht $f=10$ pN, für 8 Å ist $f=5$ pN. Kleinere Kräfte als f verändern die Potentiallandschaft nur noch für breitere Potentiale, wie es auch z.B. mit 30 Å für Biotin/Avidin, für sehr niedrige Ladungsraten bei Abrißkräften kleiner als 9 pN, gemessen worden ist. Die kleinen Abrißkräfte lassen sich nur bei sehr niedrigen Zuggeschwindigkeiten erreichen, denn dann ist die Zeit, die die Bindung kleinen Kräften ausgesetzt ist lange genug, um die Bindung unter diesen Bedingungen aufgehen zu lassen. Bei hohen Geschwindigkeiten ist die Zeit für kleine Kräfte zu kurz und es werden immer höhere Abrißkräfte gemessen. Bei den Daten zu Biotin/Avidin ist bemerkenswert, daß der Übergang zu breiteren Potentialen bei $f_{\text{trans}} = 2 \cdot f$ stattfindet (=1.2 Å: $f_{\text{trans}} = 90$ pN statt $f = 40$ pN; =3 Å: $f_{\text{trans}} = 28$ pN statt $f = 14$ pN). Mit dem breiten Potential und der natürlichen Dissoziationsrate erreicht man im Abrißkraft/Ladungsraten Diagramm für die Lektin Messungen näherungsweise auch den Übergangspunkt zu dem engeren, gemessenen Potential (siehe Abb. 4.6.1). Mit Berücksichtigung der Avidin/Biotin Daten sollte die Übergangskraft (f_{trans}) für RCA-Laktose für die Breite von 4 Å im Bereich von 10-20 pN liegen, für die anderen 3 Systeme (8 Å) zwischen 5 und 10 pN. Die äußeren Potentialbreiten ergeben sich mit dieser Abschätzung zu ca. 15 Å (RCA, $f_{\text{trans}}=20$ pN, $k_{\text{off}}=0.001 \text{ sec}^{-1}$) und ca. 35 Å (VAA, IgG, BHL; bei natürlichem k_{off} und $f_{\text{trans}} = 10$ pN).

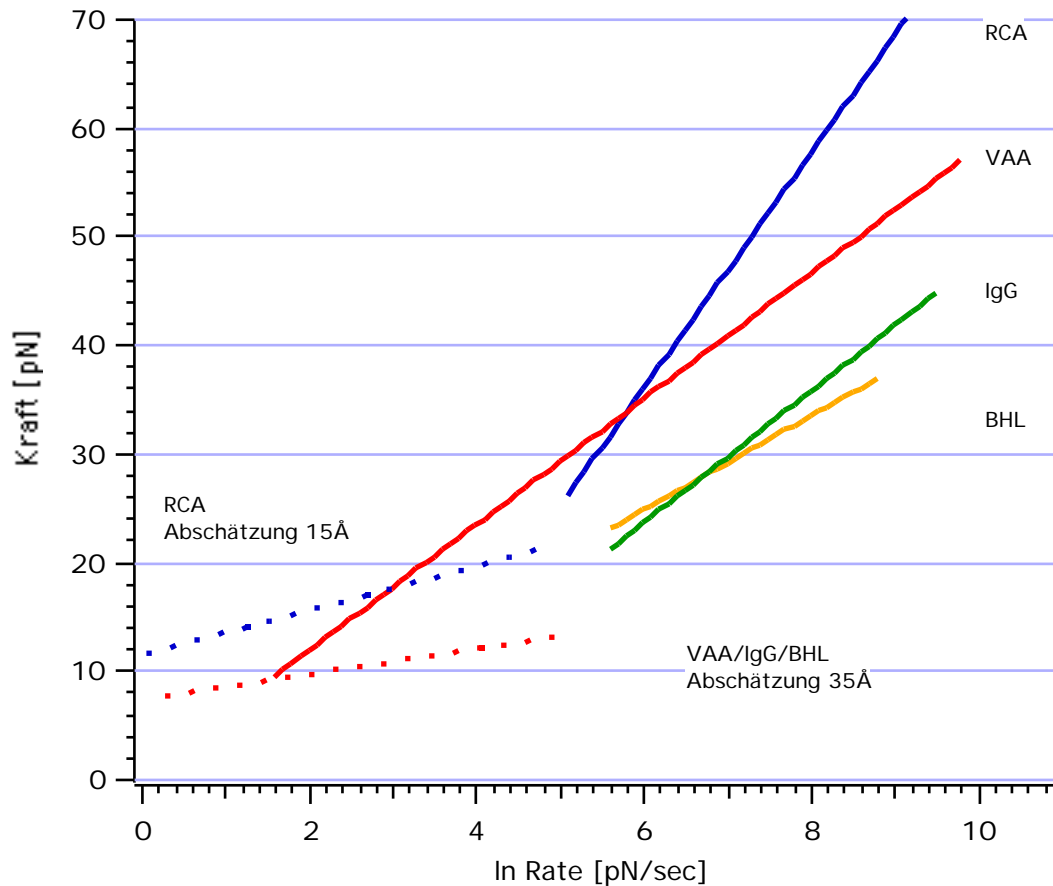


Abb. 4.6.1: Abschätzung der im Experiment nicht zugänglichen äußeren Potentialbreite mit 15 Å für RCA Laktose und 35 Å für VAA/IgG/BHL Laktose bei der natürlichen Dissoziationsrate $k_{\text{off}}=0.002\text{s}^{-1}$

4.7. Überblick über die Abhängigkeit der Abrißkraft von der Ladungsrate

In Abb. 4.7.1 sind bis jetzt gemessene Bindungsstärken, in Abhängigkeit von der Ladungsrate, verschiedener Rezeptor-Ligand Paare und die Entfaltungskraft von Ig-Domänen dargestellt. Allen Daten ist die lineare Abhängigkeit vom natürlichen Logarithmus der Ladungsrate, zumindest für die experimentell zugänglichen Bereiche der Ladungsrate, gemeinsam. Die beiden einzigen Messungen, bei denen die natürliche off-Rate mit der ermittelten kraftaktivierten übereinstimmt, sind die DNP-IgE Daten von Angelika Wehle und die Dictyostelium-csA Daten von Martin Benoit. Alle anderen weichen von der natürlichen off-Rate ab. Zusätzlich gezeigt sind die von anderen Gruppen gemessenen Daten der Biotin/(Strept-)Avidin (5) und P-Selectin/PSGL-1 (16) Rezeptor-Ligand Paare und die Abhängigkeit der Entfaltungskraft von Ig-Domänen (30). Die Biotin/(Strept-

)Avidin Daten sind mit eigenen Messungen im Bereich von $\ln(\text{Rate})=4-8$ pN/sec bestätigt worden.

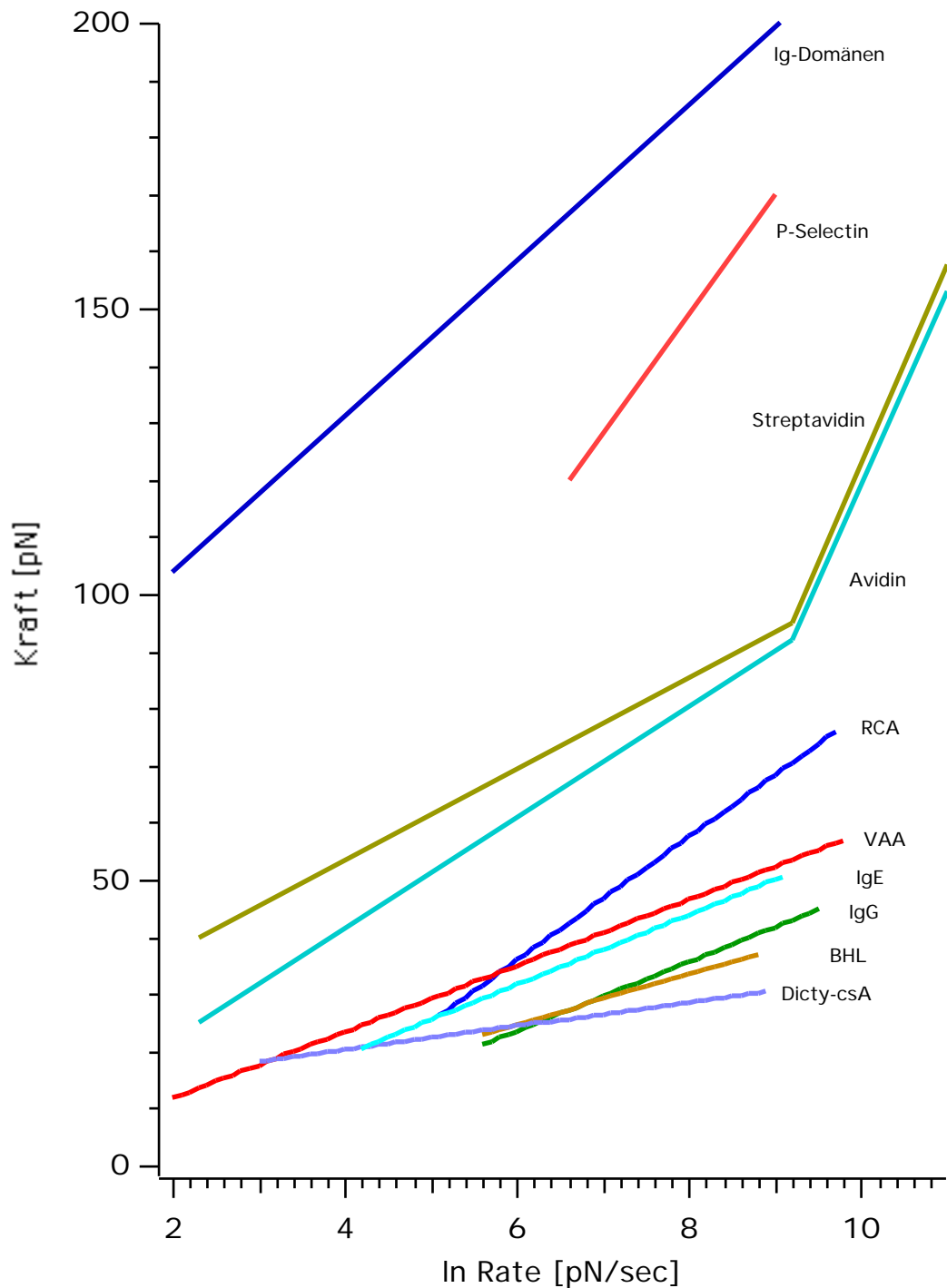


Abb. 4.7.1: Darstellung der aus dynamischer Kraftspektroskopie gemessenen Abhängigkeit der Bindungskraft vom natürlichen Logarithmus der Ladungsraten. Daten von: Streptavidin/Avidin (5), P-Selectin (16), Ig-Domänen (30), Dictyostelium-csA von Martin Benoit, DNP-IgE von Angelika Wehle und die hier vorgestellten Rezeptor-Laktose WW.

Alle aufgeführten biologischen Bindungen zeigen eine Abhängigkeit in der Bindungskraft von der Ladungsrate und damit ein von der Zeit abhängiges Entfaltungs- oder Dissoziationsverhalten. Schon kleine Kräfte beschleunigen die Dissoziation wegen der Verringerung der Potentialbarriere gegenüber der natürlichen Dissoziation enorm, denn die experimentelle Zeitskala (maximal 60 sec bei den langsamsten Zuggeschwindigkeiten, sonst Sekunden bis zu Millisekunden) liegt auch bei kleinen Zuggeschwindigkeiten um Größenordnungen über der natürlichen Lebensdauer ($=k_{\text{off}}^{-1}$). Eine Korrelation zwischen der natürlichen off-Rate und der Bindungsstärke ist allerdings nicht eindeutig zu beobachten. Dies ist auch bei den hier vorgestellten Lektin-Ligand Daten der Fall, die verschiedene Bindungsstärken aufweisen, sich jedoch in den natürlichen off-Raten nicht wesentlich unterscheiden. Allerdings wurden bei ihnen, im Vergleich zu (Strept-)Avidin/Biotin und P-Selectin/PSGL-1, niedrigere Bindungskräfte und größere natürlichen off-Raten gemessen, was ein Hinweis auf eine Korrelation zwischen natürlicher off-Rate und Bindungsstärke sein könnte. Gleiche Bindungsstärken bei verschiedenen natürlichen off-Raten sind bei der (Strept-)Avidin/Biotin Bindung ($k_{\text{offStrept}}=3 \cdot 10^{-6} \text{ sec}^{-1}$; $k_{\text{offAvidin}}=4 \cdot 10^{-8} \text{ sec}^{-1}$ (39)) gemessen worden (Abb. 4.7.1). Die im Vergleich zu der P-Selectin/PSGL-1 Bindung schwächere Bindungsstärke der (Strept-)Avidin/Biotin Bindung, die von der natürlichen off-Rate betrachtet zu den langlebigsten biologischen Bindungen zählt, ist bemerkenswert, da die P-Selectin/PSGL-1 Bindung eine um Größenordnungen größere natürliche off-Rate ($k_{\text{off}}=3 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$) aufweist. Da die P-Selectin Bindung eine wichtige Funktion bei der Rollbewegung der Leukozyten entlang den Endothelzellen der Blutbahnen im Blutstrom besitzt, ist diese Bindung sicher ihrer Aufgabe entsprechend optimiert, die einerseits Kräfte gegen den Blutstrom aushalten muß aber andererseits nicht „ewig“ halten darf. Avidin oder Streptavidin sind im Gegensatz dazu Sammler von Biotin und müssen von ihrer Funktion her keinen Kräften widerstehen. Dies zeigt, daß biologische Bindungen mit mehreren Methoden untersucht werden müssen, um umfassende Informationen zu gewinnen. Wie in diesem Abschnitt gezeigt wurde, ist die dynamische Kraftspektroskopie an einzelnen Bindungen zusammen mit theoretischen Modellen eine Methode um weitere Einblicke in die Grundlagen von biologischen Bindungen zu erhalten.

5. Kraftspektroskopie an zellulären Bindungen

5.1. Einführung

Die im vorherigen Kapitel vorgestellten Einzelmolekül Experimente geben Informationen über die Bindungstasche eines Rezeptor-Ligand Paares. Die Bindungsstärke erlaubt Rückschlüsse über die Funktion der Bindung im Organismus. Die Funktion auf Zellen kann z.B. aus der Markierung von Zellen für die Immunantwort bestehen. Insbesondere bei der Anbindung von Lektinen mit einer toxischen Domäne (RCA und VAA aus Kapitel 4), ist die Auslösung der Endozytose zur Aufnahme des Proteins in die Zelle eine Folge der molekularen Anbindung. Die Stimulation von Sekundärprozessen in der Zelle, wie die zytoskeletale Vernetzung bei der Anbindung von Fibronektin an die transmembran eingebauten Integrine oder der Produktion von bestimmten Proteinen, kann ebenfalls durch die Rezeptor-Ligand Wechselwirkung ausgelöst werden. Die Möglichkeit mit dem Kraftmikroskop unter physiologischen Bedingungen diese Prozesse zu untersuchen, ergab im Rahmen dieser Arbeit eine Kooperation mit Zellbiologen der Universität Essen. In Zusammenarbeit mit Michael Thie und René Röspel, beide vom Institut für Anatomie in Essen, und mit meinem Kollegen Martin Benoit sind Experimente zur Erforschung von Vorgängen bei der Adhäsion von Epithelzellen durchgeführt worden (7). Epithelzellen sind die Zellen, die den obersten Zellmonolayer eines Organs bilden und dieses nach außen abschließen. Nur in Spezialfällen, bei der Metastasierung von Tumoren und bei der Einnistung der befruchteten Eizelle in die Gebärmutter, interagieren sie mit anderen Zellen. Die Experimente mit ihnen galten dem Aufbau von interzellulären Kontakten zwischen konfluenten Epithelzellmonolayern im Vergleich zu Modellsystemen, die einen der Zellmonolayer ersetzen. Ergänzend wurde ein Modell zur quantitativen Beschreibung des Trennvorgangs von nicht zytoskeletal adhärierenden Zellen an Oberflächen erstellt.

Vielfältige Arbeiten zu interzellulären Wechselwirkungen geben einen Einblick in die involvierten Reaktionsabläufe und beteiligten Proteinsysteme. Dazu gehören die Experimente mit Mikropipetten, die Vesikeln oder Erythrozyten als Transducer verwenden (40), und die mit optischen Pinzetten bewegten, funktionalisierten Latexbeads (41), deren Auswirkungen auch mittels Mikronadeln und Fluoreszenzmikroskopie analysiert wurden (42). Mit den in dieser Arbeit gezeigten Zellsystemen wurden Zentrifugationsexperimente mit

Zellspheroiden (43) zur qualitativen Analyse des Adhäsionsverhaltens durchgeführt. Die viskoelastischen Eigenschaften der Zellen liefern einen wichtigen Beitrag zum Adhäsionsverhalten. Werte dazu erhält man durch Abbildungen von Zellen mit dem AFM im Kraftabbildungsmodus (44, 45), mit Zug- und Eindrückexperimenten wie beim Zell-Poking (46, 47) oder (etwas abgewandelt) durch die von Martin Benoit entwickelten viskoelastischen Relaxationsmessungen. Ergänzende Arbeiten behandeln Theorien über Vorgänge bei der Bindungstrennung (15) und grundlegende Mechanismen, wie die Ausbildung von molekularen Clustern (Kontaktinseln) und deren Loslösung (48-50). Aus bisherigen Messungen sind Abhängigkeiten von der Kontaktzeit im Adhäsionsverhalten (43) und der ausgelösten innerzellulären Aktivität (42, 51, 52) bekannt. Ebenso sind schon Daten zur Zellmechanik (53) und Viskosität von Zellmembranen (54, 55) bestimmt worden. Abschätzungen zur Anzahl und Art der beteiligten Proteine sind von Ward et al. (48, 49) publiziert worden.

In den hier vorgestellten Messungen werden Trophoblastzellen mit Uterusepithelzellen in Kontakt gebracht und so die Einnistung der befruchteten Eizelle in der Gebärmutter nachgestellt. Die Trophoblastzellen, die nach der Einnistung die Plazenta ausbilden, bilden sich bei den ersten acht Zellteilungsschritten der befruchteten Eizelle als Zellhülle um die Embryoblastzellen, aus denen sich der Embryo entwickelt. Für die Einnistung ist die Kontaktaufnahme und Vernetzung der Uterusepithelzellen mit den Trophoblastzellen von essentieller Bedeutung. Ein Verständnis der ablaufenden Prozesse könnte konkret die Erfolgsrate bei der künstlichen Embryoimplantation, die derzeit weniger als 20% beträgt, erhöhen.

Der allgemeine zellbiologische Hintergrund der hier vorgestellten Messungen besteht darin, daß die apikale Adhäsivität für Epithelzellen ungewöhnlich ist. Die apikale Zellmembran von Organen schließt diese nach außen ab und verhindert adhäsive Wechselwirkungen mit anderen. Nur in besonderen Situationen ist die apikale Adhäsivität von Epithelzellen zu beobachten. Eine dieser Situationen ist in der Frühphase der Embryoimplantation gegeben, wenn der sich entwickelnde Keim zum Zwecke der Einnistung in Kontakt mit dem Epithel der Uteruswand tritt. Ungewöhnlich an dieser Situation ist, daß Adhäsionsmoleküle und daran gekoppelte Signalwege, die für zytoskeletale Zellinteraktionen essentielle Bausteine sind, nicht nur an der basalen und lateralen Membran der Zelle, sondern auch im apikalen Pol einer Epithelzelle lokalisiert sind (siehe Abb. 5.1.1).

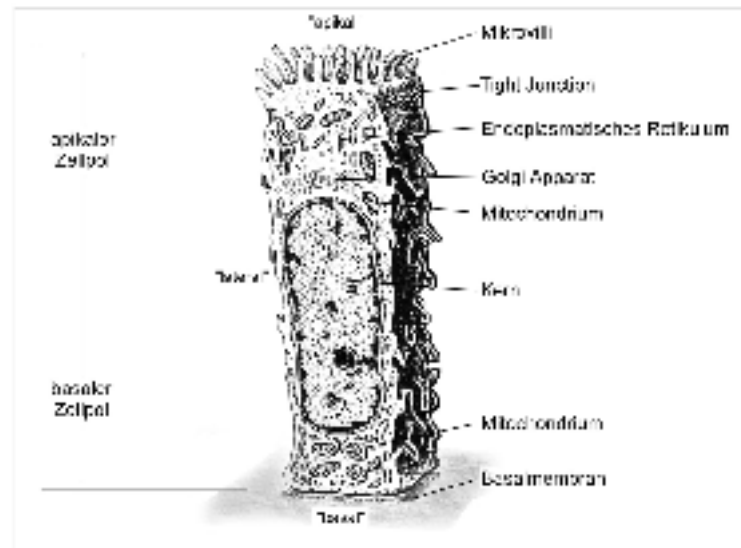


Abb. 5.1.1: Uterusepithelzelle (verändert nach (56)). Die Epithelzellen bilden den obersten Zellmonolayer eines Organs und verhindern, daß dieses mit anderen zusammenwächst. Die Epithelzellen sind polar aufgebaut und weisen damit eine Unterscheidung zwischen den Membranseiten, die an benachbarte Zellen des eigenen Organs angrenzen (Basal- und Lateralmembran) und der äußeren, das Organ nach außen abgrenzenden (apikalen Membran), auf.

Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß bei einigen physiologisch wichtigen, und bisher nur unzureichend verstandenen Vorgängen, gerade ein solches Signaling über unorthodox apikal lokalisierte Adhäsionsmoleküle an Epithelzellen eine erhebliche Bedeutung besitzt (57). Die hier untersuchte Interaktion zwischen Trophoblast und Uterusepithel ist ein Beispiel hierfür (siehe Abb. 5.1.2).

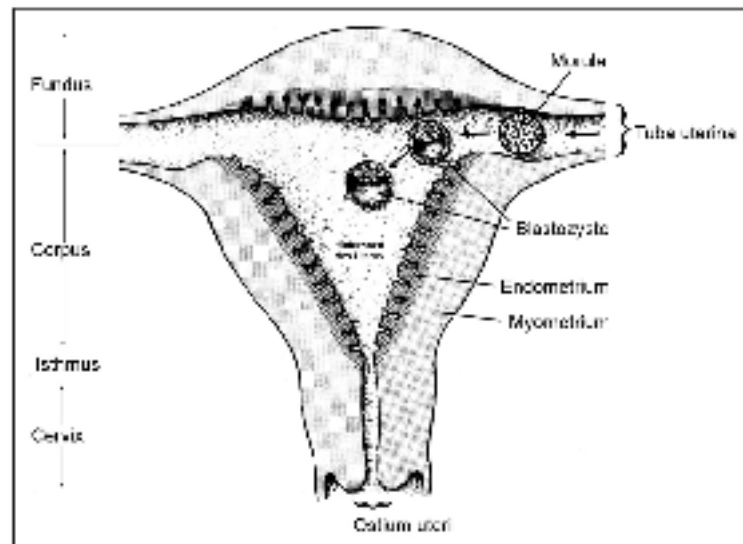


Abb. 5.1.2: Abbildung der Gebärmutter und der befruchteten Eizelle (Blastozyste) nach 8 Teilungsschritten. Die Hülle der Eizelle besteht aus Trophoblastzellen, im Inneren sind die Embryoblastzellen zu erkennen.

Weitere Beispiele sind die Interaktion von Leukozyten mit dem Gefäßwandendothel bei Entzündungen, die Metastasenbildung von Tumoren und verschiedene Prozesse im Rahmen der Embryonalentwicklung.

Die grundlegende Eigenschaft einschichtiger Epithelien, wie auch Trophoblast und Uterusepithel, ist das Auftreten einer polaren Organisation entlang der apiko-basalen Zellachse (58, 59). Damit verbunden ist unter anderem die Ausbildung und Aufrechterhaltung von definierten Membrandomänen, d.h. einer apikalen, einer lateralen und einer basalen Domäne. Während die basale und laterale Membrandomäne mit Adhäsionsmolekülen für Zell-Matrix- und Zell-Zell-Adhäsionen ausgestattet sind, fehlen den apikalen Membranen diese Moleküle. Die apikalen Plasmamembranen gelten in der Regel als nicht adhäsiv. Dennoch kommt es zu Beginn der Embryoimplantation zu einer Zell-Zell-Interaktion. Bei dieser treten die Trophoblastzellen mit ihrer apikalen Plasmamembrandomäne in Kontakt mit der apikalen Plasmamembrandomäne der Uterusepithelzellen. Im Falle des Uterusepithels ist die Änderung des Zellverhaltens hormongesteuert und ein wesentliches Element der sogenannten Rezeptivität (60).

5.2. Uterus Epithel- und Trophoblast- Zelllinien

Eine humane Trophoblastzelllinie und zwei humane Epithelzelllinien, die bezüglich der Adhäsionsbereitschaft bestimmte Funktionszustände des

Uterusepithels stabil und reproduzierbar repräsentieren, wurden verwendet (siehe Abb. 5.2.1).

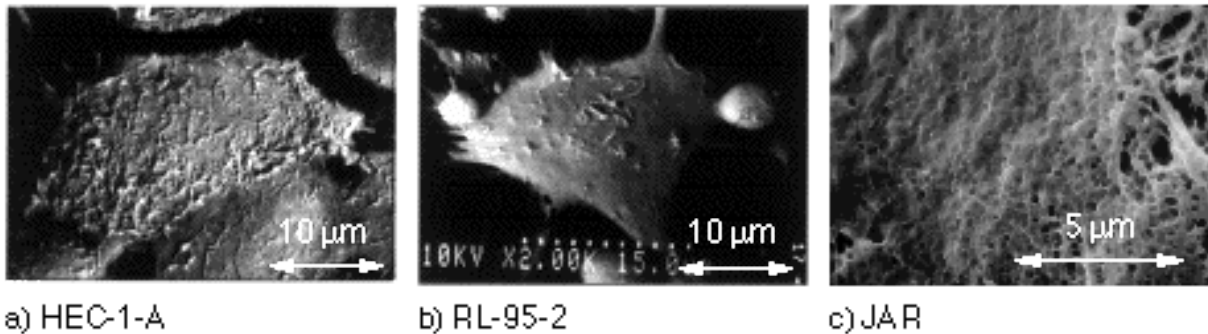


Abb. 5.2.1: EM-Aufnahmen der verwendeten Uterus Epithel- und der Trophoblastzellen

Apikal nicht-adhäsiver Phänotyp: HEC-1-A

Diese Zelllinie ähnelt nach allgemein-morphologischen Kriterien stark dem Uterusepithel in vivo. Wie in der Rasterelektronenmikroskop Aufnahme gezeigt, ist die freie Oberfläche der polaren HEC-1-A-Zellen dicht mit Mikrovilli besetzt (siehe auch Abb. 5.1.1). Die Glykokalyx ist besonders dick und kann als lockere, feinflockige Struktur beschrieben werden. Die transmembranen Proteine, CD44, E-Cadherin und $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$ -Integrin-Untereinheiten, die zytoskeletale Vernetzungen ausbilden können, werden von HEC-1-A-Zellen exprimiert, sind aber nicht in der apikalen Membran zu finden. Die freie Zelloberfläche der HEC-1-A-Zellen gleicht somit der einer normalen Uterusepithelzelle (7).

Apikal adhäsiver Phänotyp: RL95-2

Die wesentliche Veränderung der RL95-2-Zellen gegenüber normalen Uterusepithelzellen besteht im Verlust der apiko-basalen Zellpolarität. So befindet sich der Zellkern im Zentrum der Zellen, die Zellorganellen sind gleichmäßig verteilt. Die Oberfläche von RL95-2-Zellen ist glatt und weist nur einen geringfügigen Mikrovillibesatz auf. Die Glykokalyx dieser Zellen ist schwächer als bei HEC-1-A-Zellen ausgeprägt. Dagegen lassen sich CD44, E-Cadherin und $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$ -Integrin-Untereinheiten in der apikalen Membran nachweisen (61). Die $\alpha_6\beta_4$ - und $\alpha_6\beta_1$ -Integrine sind – soweit bekannt – Fibronektinrezeptoren und werden beim Anbinden von Fibronektin zytoskeletal verankert (52, 62).

Trophoblastoide Zellen: JAR

Die verwendeten Trophoblastzellen sind die JAR-Zellen (63). Sie stammen aus einer humanen Chorionkarzinomzelllinie und werden als Modell für humane implantationsbereite Trophoblastzellen eingesetzt.

5.3. Zelladhäsions-Experimente

5.3.1. Experimenteller Ablauf

Die hier vorgestellten Messungen sind mit dem in Kapitel 3 eingeführten, für die Zelladhäsions-Experimente modifizierten, AFM durchgeführt worden. An den Kraftsensor ist eine Kugel (ca. 50 μm) aus Sephacryl oder Glas, als Basis für aufwachsende Zellmonolayer und funktionalisierte Modelloberflächen angeklebt worden (siehe Anhang). Die Modellsysteme bestanden aus Fibronectin-, Amylose und BSA beschichteten Kugeln.

Die verschiedenen Kontaktbildungen zwischen den Proben aus JAR-Zellbeobachtungen und den Modellsystemen mit den RL- und HEC-Zellen sind in dieser Arbeit untersucht worden. Die Messungen wurden abhängig von der Kontaktzeit, der Kontaktkraft und der Trennungsgeschwindigkeit durchgeführt. In Abb. 5.3.1.1 ist das Schema der Kraftkurven für die Zelladhäsionsmessungen gezeigt.

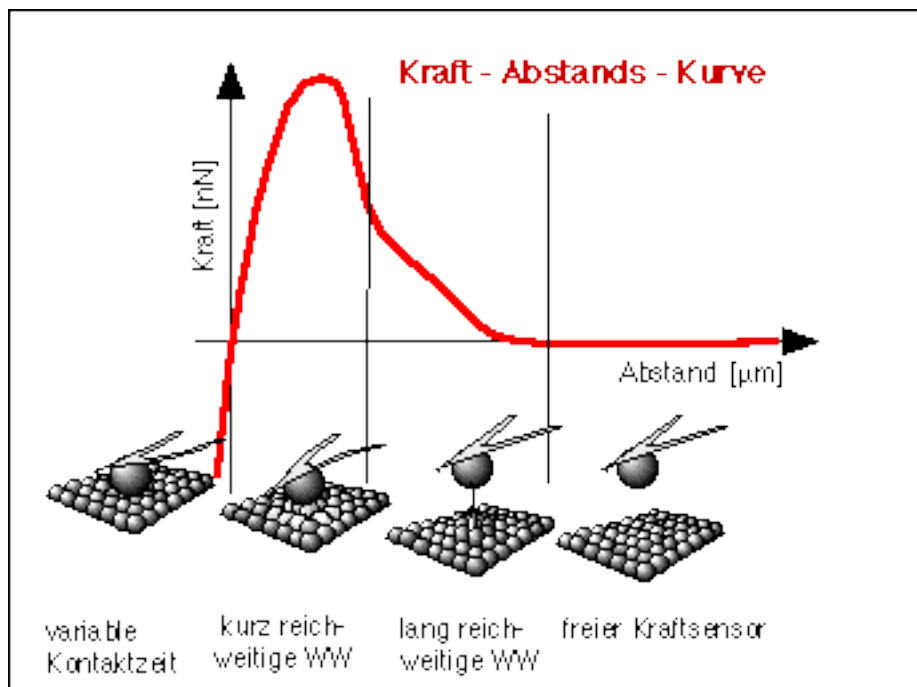


Abb. 5.3.1.1: Kraft Abstandskurve mit dem Zell-Kraftsensor. Der Abstand bezieht sich auf die Position des Piezos bezüglich dem Übergang zwischen repulsiver

und adhäsiver Wechselwirkung (1. Schnittpunkt der Kraftkurve mit der x-Achse)

Die beschichtete Kugel wird im Experiment mit 7 $\mu\text{m}/\text{sec}$ an die Oberfläche angenähert und bis zu einer Kraft von 3 nN eingedrückt. Dies erzeugt ungefähr eine Kontaktfläche von 500 μm^2 . Während des zeitlich, von 0 Sekunden bis 40 Minuten (0, 1, 20 sec, 1, 4, 10, 20 oder 30, 40 min), variierten Kontakts ist die Eindrückung über einen Nachregelungsmechanismus konstant gehalten worden. Allerdings ist diese Kontrolle durch thermische Drift und, bei den mit Zellen bewachsenen Kugeln, durch Störung des reflektierten Lichtzeigers, besonders bei langen Kontaktzeiten, behindert worden. Dies führte in einigen Fällen zu höheren oder niedrigeren Eindrückkräften. Die Separation von den Zellen erfolgte wiederum mit 7 $\mu\text{m}/\text{sec}$ Ziehgeschwindigkeit.

Die Kraftkurven sind gegen den Piezo-Positions Abstand vom Übergangspunkt der abstoßenden in eine anziehende Kraft abgebildet (bei der Separation der 1. Schnittpunkt der Kraftkurve mit der x-Achse: $F=0$ und Abstand=0).

5.3.2. JAR-Zellen auf HEC/RL konfluenten Monolayer

Die Abbildung 5.3.2.1.a zeigt typische Separationskurven des JAR/HEC Meßsystems. Diese sind durch ein scharfes Adhäsionsmaximum und dann mit zunehmender Entfernung durch eine kontinuierliche Abnahme der Adhäsion vom Übergangspunkt (das ist der Punkt, an dem bei der Separation die abstoßende Kraft in eine anziehende übergeht) gekennzeichnet. Das Maximum der Adhäsion tritt bei verschiedenen Messungen im Bereich von 4-15 μm Distanz vom Kontaktpunkt auf. Die Distanz, die zur vollständigen Separation benötigt wird, beträgt im gezeigten Beispiel 60 μm bei 40 min Kontaktzeit, kann aber auch mehr als 80 μm betragen.

Die Adhäsion bei der Separation wird dabei durch viele verschiedene Einzelbindungen und Oberflächenwechselwirkungen zwischen den beiden Zelloberflächen vermittelt. Diese können aus membrangebundenen Rezeptor-Ligand Paaren, Glykoprotein-Lektin, hydrophober/-philer oder elektrostatischer Wechselwirkung bestehen. Dabei findet vermutlich keinerlei Vernetzung der Bindungen untereinander statt, da die Separation ein gleichmäßiges Auseinandergleiten darstellt.

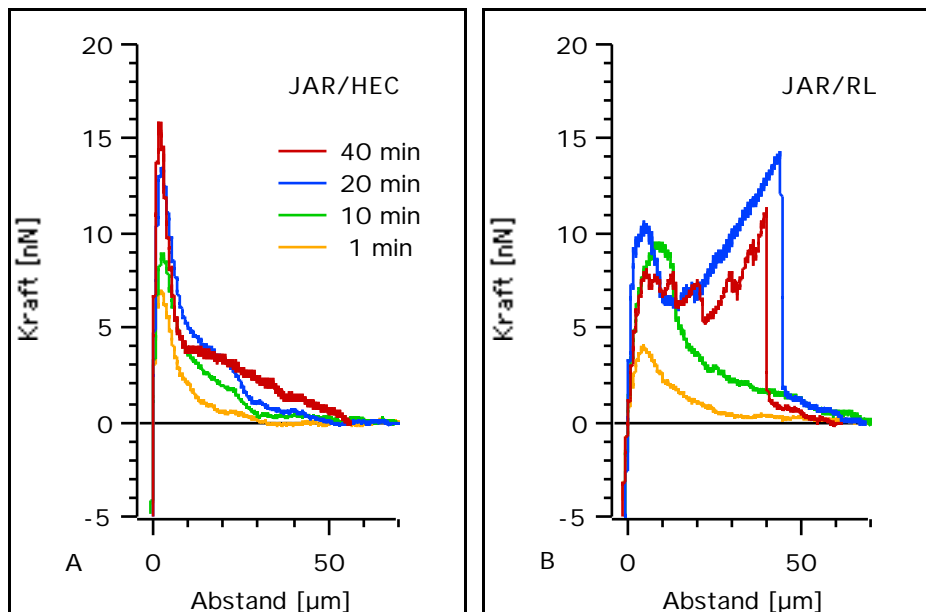


Abb. 5.3.2.1: Typische Separationskurven von JAR/Epithelzell-Kontakten nach 1-40 min Wechselwirkungszeiten.

Die Abbildung 5.3.2.1.b zeigt typische Separationskurven für das System JAR- auf RL-Zellen. Bei mehr als 20 min Kontakt sind diese in der Mehrheit der Messungen deutlich verschieden zu den JAR/HEC Separationen. Charakterisiert werden sie durch einen breiten Verlauf der Adhäsion mit mehreren Einzelabrissen und einem finalen im Bereich von 10-45 µm Distanz zum Kontaktpunkt. Die Kräfte der Einzelabriss betragen 1-3 nN in Abständen von 7-15 µm beim 40 min Kontakt. Der finale Abriß weist Kräfte bis zu 15 nN, je nach Experiment, auf. Der Verlauf der einzelnen Separationen in dem Bereich bis 45 µm Distanz bei langen Kontaktzeiten ist, systembedingt durch die Verwendung lebender Zellen, immer unterschiedlich. Allerdings sind die Separationen bei Kontaktzeiten größer als 20 min in der Mehrheit der Versuche (75%) durch die Abrisse charakterisiert.

Die Abrisse sind ein Hinweis auf die Ausbildung von großflächigen Zellkontakten, den molekularen Clustern. Dabei werden durch den Zellkontakt über Zelladhäsionsproteine zytoskeletale Verankerungen gebildet und diese über das Zytoskelet vernetzt. Die Integrin-Fibronectin-, die E-Cadherin- oder eine andere Protein-Wechselwirkung kann dabei das auslösende Moment sein (52, 62). Die Zeitabhängigkeit ergibt sich möglicherweise aus der Diffusionsgeschwindigkeit (5 µm/min) (41) der nicht zytoskeletal gebundenen Adhäsionsproteine, wie z.B. den Integrinen, und der innerzellulären Abläufe. Die Proteine benötigen mit ihrer Diffusionsgeschwindigkeit 10-20 min, um über die Zelloberfläche zu diffundieren und dann durch Vernetzung mit anderen schon ausgebildeten Kontakten zur Bildung der molekularen Cluster beizutragen.

Ein wiederholter einminütiger Kontakt mit insgesamt 30 Minuten Kontaktzeit hat ebenso wie ein wiederholter 10 minütiger Kontakt mit insgesamt 40 Minuten Kontaktzeit nicht zur Beobachtung von Abrissen geführt (siehe Abb. 5.3.2.2).

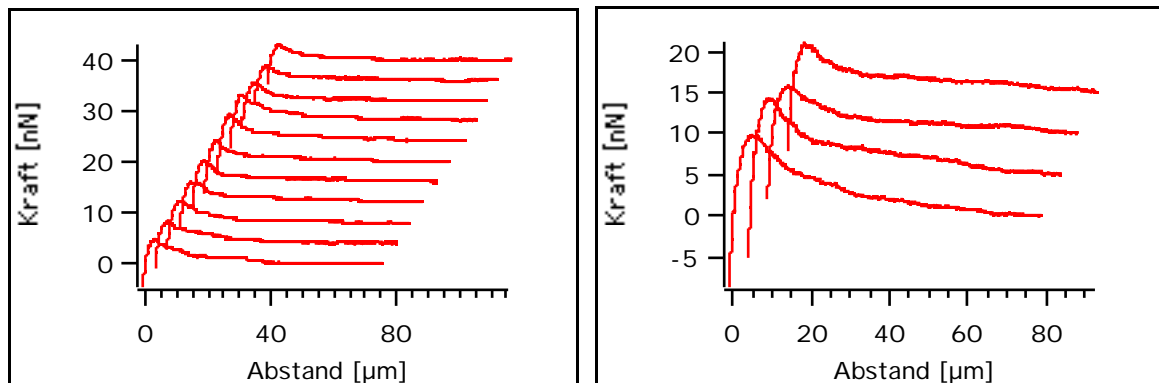


Abb. 5.3.2.2: Wiederholte Kontakte mit den JAR- auf dem RL-Zellmonolayer. links: jeweils 1 min Kontakt; rechts: jeweils 10 min Kontakt.

Die Separationen entsprechen dabei den gezeigten 1 und 10 Minuten Werten in Abb. 5.3.2.1. Dabei ist zwischen den Einzelkontakten immer 1 Minute gewartet worden. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die Ausbildung von molekularen Clustern diffusionsbestimmt ist und damit bei jedem Kontakt von neuem beginnt. Eine Aktivierung bzw. Triggerung der Zelle, die durch den ersten Kontakt mit einer anderen Oberfläche ausgelöst wird, ist nicht beobachtet worden.

5.3.3. BSA und Amylose beschichtete Kugel auf HEC/RL-Zellmonolayer

Die Kontrollmessung zu den JAR/Zell-Interaktionen ist mit einer BSA und einer Amylose beschichteten Kugel durchgeführt worden. BSA wurde wegen seiner Etablierung als Protein zur Unterdrückung von unspezifischer Wechselwirkung gewählt. Die Messungen mit Amylose wurden im Vergleich zu den später gezeigten Fibronectin Messungen durchgeführt, da das Fibronectin an die Amylose kovalent angebunden worden ist.

In Abbildung 5.3.3.1a&b sind typische Separationsverläufe der BSA beschichteten Kugeln von HEC und RL Zellmonolayern gezeigt. Die Form und Zeitabhängigkeit entspricht den in Abb.5.3.2.1a&b dargestellten JAR/HEC Zellseparationen. Die ähnlich hohe adhäsive Wechselwirkung ist durch einen teilweisen Austausch der BSA-Proteine durch zelleigene (Vroman Effekt (64)) und durch eine nicht vollkommen gegen weitere Proteinanlagerung geschützte Kugeloberfläche bedingt. Diese Annahme wird durch die, in Abb. 5.3.3.1.c gezeigten, Vergleichsmessungen mit Amylose beschichteten Glaskugeln, bei denen die adhäsive Wechselwirkung wesentlich reduziert worden ist, unterstützt.

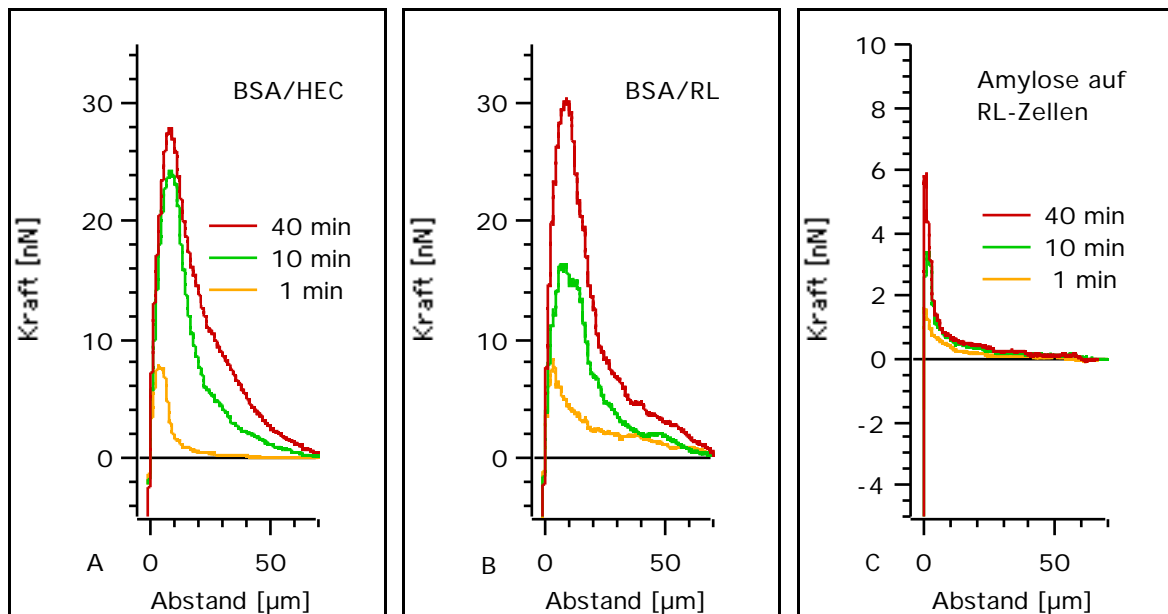


Abb.5.3.3.1: a, b: Typische Separationskurven von BSA/Epithelzell-Kontakten nach 1-40 min Wechselwirkungszeiten. c: Amylose/RL-Zellkontakte mit wesentlich geringerer Adhäsionswechselwirkung

5.3.4. Fibronektin beschichtete Kugel auf HEC/RL-Zellmonolayer

Die Abbildung 5.3.4.1 zeigt typische Separationskurven für das System Fibronektin- auf RL-Zellen. Bei mehr als 20 min Kontakt sind diese in der Mehrheit der Messungen von der Charakteristik der Separationen ähnlich zu den JAR/RL Separationen. Charakterisiert werden sie durch einen sehr hohen breiten Verlauf der Adhäsion mit mehreren Einzelabrissen und einem finalen im Bereich von 20-50 μm Distanz zum Kontaktpunkt. Das Adhäsionsmaximum der gezeigten Separation bei 40 min Kontakt beträgt 41 nN mit einem finalen Abriß von 8 nN.

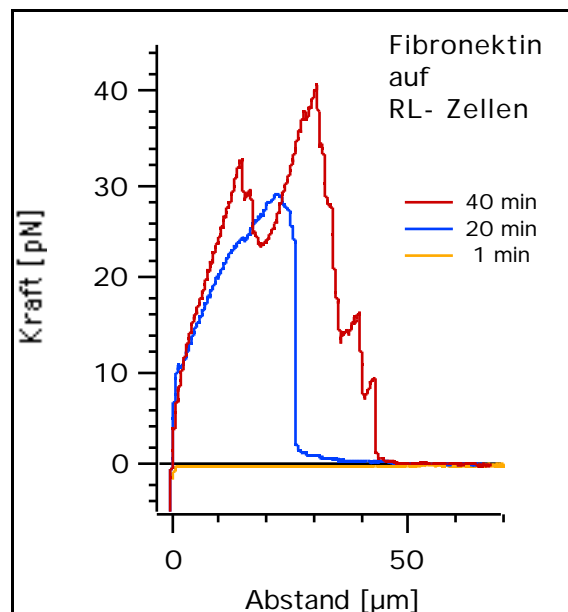


Abb. 5.3.4.1: Typische Separationskurven von Fibronektin/RL-Epithelzell-Kontakten nach 20-40 min Wechselwirkungszeiten

Wegen der bekannten, durch die Anbindung von Fibronektin induzierten, zytoskeletalen Vernetzung von Integrinen ist Fibronektin als Modellsystem gewählt worden (siehe Abb. 5.3.4.2). Die Ausbildung von Abrissen mit einer Fibronektin Modelloberfläche bestätigt die, bei der Diskussion der JAR/RL Zellwechselwirkung aufgestellte, Vermutung, daß über zytoskeletale Verankerungen gebildete molekulare Cluster bei der Separation aufgebrochen werden.

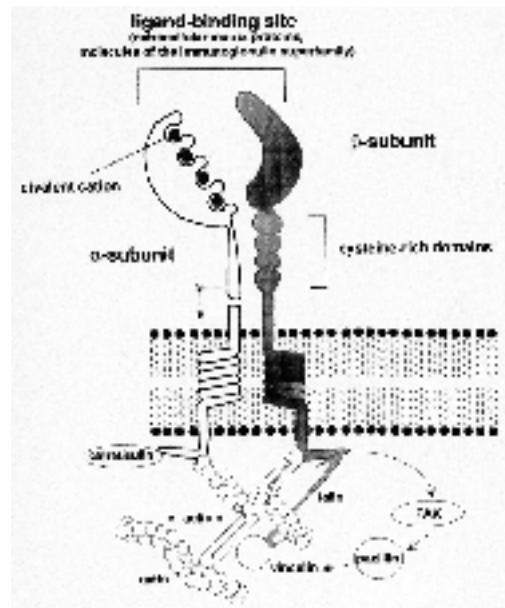


Abb.5.3.4.2: Schematische Darstellung eines Integrins (aus (65)). Integrine binden kurze Peptidsequenzen von Fibronectin, Laminin oder aus Ig-Domänen aufgebauten Zelladhäsionsproteinen. Die extrazelluläre Anbindung induziert die indirekte, über Talin, -Aktinin und/oder Vinculin, zytoskeletale Verankerung an Aktin Filamente.

5.4. Theoretische Beschreibung

Mit den vorgestellten Daten und einigen vereinfachenden Annahmen wird in diesem Kapitel ein Modell zur Beschreibung der Separationskurven, ohne die zytoskeletalen Wechselwirkungen, aufgestellt. Zusätzlich werden die von Martin Benoit experimentell ermittelten Werte für die Viskoelastizität der verschiedenen Zelltypen und das Adhäsionsverhalten der Zellen bei variierten Eindrückungen zu Grunde gelegt.

5.4.1. Bindungsbildung

Mit dem Beginn des Kontaktes zwischen dem Zellmonolayer und dem Kraftsensor bilden sich zwischen beiden Systemen Bindungen aus. Diese können aus entropischer Verknäuelung langer Moleküle, elektrostatischer, hydrophober oder hydrophiler Wechselwirkung oder durch spezifische Wechselwirkungen von Rezeptor-Ligand Paaren bestehen.

Vereinfachend wird in dem hier erstellten Modell angenommen, daß es nur eine Art von Bindungen gibt, diese für alle entstehenden Bindungen gleich stark ist und die Bindungen sich mit der gleichen Wahrscheinlichkeit binden oder lösen. Die mögliche Bindungsdichte ist im Modell zusätzlich begrenzt.

Aus den experimentell erhaltenen Separationskurven ergibt sich bei einer definierten Eindrückkraft eine Sättigung der Adhäsionsmaxima mit der Kontaktzeit (Abb. 5.4.1.1). Die Werte der gezeigten Adhäsionsmaxima steigen mit zunehmender Kontaktzeit bis zu 10 Minuten sehr stark an, bei längeren Kontaktzeiten wurde nur noch eine schwache Zunahme beobachtet.

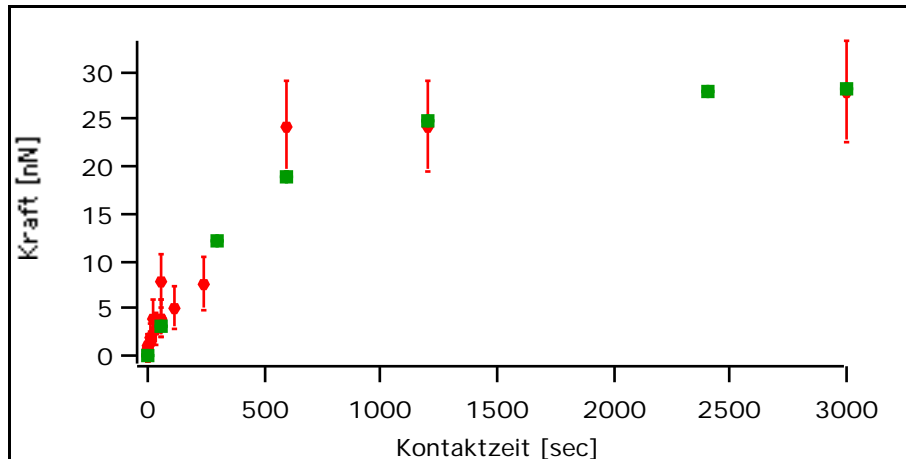


Abb. 5.4.1.1: Mit der Kontaktzeit in Sättigung laufende Adhäsionskraft; rot: Adhäsionsmaxima aus einer Messung, grün: Simulation.

Diese Beobachtung führt zu der Annahme, daß, abhängig von der Länge der Kontaktzeit t_{Kontakt} , die der Verlauf der Bindungsbildung eine exponentielle Charakteristik aufweist und folgender Gleichung genügt:

$$b(t_{\text{Kontakt}}) = b_{\text{max}} \cdot 1 - e^{-t_{\text{Kontakt}}} \quad (5.4.1)$$

Dabei ist $b_{\text{max}} = K^*$ die maximal mögliche Bindungszahl bei einer gegebenen Kontaktfläche K und einer konstanten Eindrückkraft f_e . Die Abklingkonstante bestimmt sich aus dem von der Kontaktzeit abhängigen Verhalten der Maxima der Adhäsionskraft bei der Separation.

Die Abhängigkeit der Separationskurven von der Eindrückung und der Ziehgeschwindigkeit sind in Abbildung 5.4.1.2 am Beispiel des Systems JAR- auf HEC-Zellen bei 1 min Kontaktzeit gezeigt. Die Höhe der Adhäsion und die zurückgelegte Distanz bis zur vollständigen Separation steigen mit zunehmender Eindrückung. Die höhere Ziehgeschwindigkeit resultiert in höheren Adhäsionskräften, allerdings bleibt die Abhängigkeit von der Eindrückkraft bestehen.

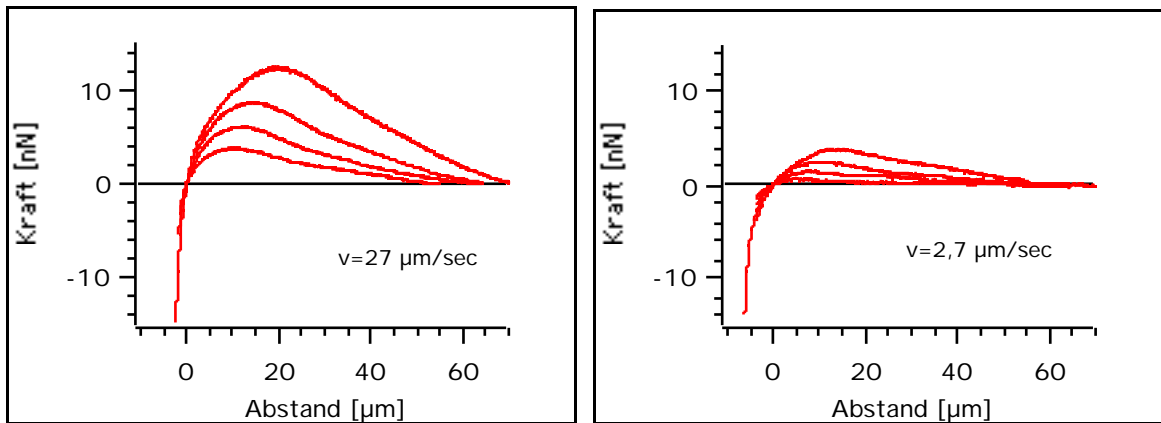


Abb. 5.4.1.2: Variation der Eindrückung und der Ziehgeschwindigkeit bei jeweils 1 min Kontaktzeit (JAR/HEC Zellen).

In Abbildung 5.4.1.3 sind die Adhäsionsmaxima der einminütigen Kontakte des Systems JAR- auf HEC-Zellen gegen die Eindrückkraft bei den beiden verwendeten Zuggeschwindigkeiten gezeigt. Die gemessenen Adhäsionsmaxima für den 1 min Kontakt liegen für 27 $\mu\text{m}/\text{sec}$ Ziehgeschwindigkeit bei $f_{\text{max}}=1,5$ nN für $f_e=4,0$ nN und $f_{\text{max}}=17$ nN bei $f_e=20$ nN Eindrückung. Bei 2,7 $\mu\text{m}/\text{sec}$ betragen die Werte $f_{\text{max}}=1,0$ nN für das Adhäsionsmaximum bei $f_e=1,5$ nN und $f_{\text{max}}=7$ nN bei $f_e=16$ nN Eindrückung.

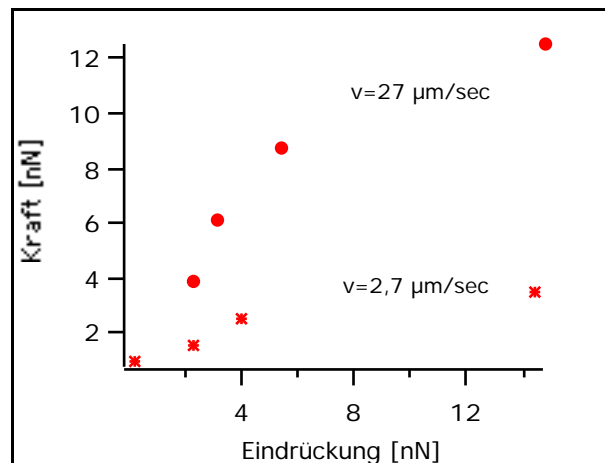


Abb. 5.4.1.3: Gegen die Eindrückkraft aufgetragene Maxima der Separationskurven aus Abb. 5.4.1.2 bei 27 und 2,7 $\mu\text{m}/\text{sec}$ Piezugeschwindigkeit und jeweils 1 min Kontaktzeit (JAR/HEC Zellen).

Die Erhöhung der Eindrückkraft resultiert in einer höheren maximalen Adhäsionskraft. Die Ursache liegt in der Zunahme der Kontaktfläche und damit einer höheren Gesamtanzahl der Bindungen. Je stärker die Kugel (Durchmesser D) auf und in die elastischen Zellen gedrückt wird (Eindrücktiefe z , $z \ll D$), desto größer wird die Kontaktfläche $K = \pi(D - z - z^2)$ und folglich auch die Zahl der

Bindungen. Die Variation der Eindrückkraft f_e bei verschiedenen Geschwindigkeiten ergibt ein annähernd linear proportionales Verhalten der Adhäsionsmaxima (siehe Abb. 5.4.1.3). Die Abhängigkeit der Bindungszahl von der Eindrückkraft f_e kann demnach durch Linearisierung mit dem Faktor vereinfacht werden. So ergibt sich als Formel für die Anzahl der geschlossenen Bindungen b_0 pro Flächeneinheit in Abhängigkeit von der Kontaktzeit t_{kontakt} und der Eindrückkraft f_e :

$$b_0(t_{\text{kontakt}}, f_e) = f_e b(t_{\text{kontakt}}) \quad (5.4.2)$$

5.4.2. Die Bindungstrennung

Auf die wichtigsten Eigenschaften der Bindungen kann aus dem Trennungsverhalten der Zellen, das hier in zwei Teile gegliedert wird, geschlossen werden (Abb. 5.3.1.1). Die Unterteilung erfolgt am Adhäsionsmaximum der Separationskurve in den Bereich mit ansteigender Adhäsionskraft und den mit abklingender bei zunehmendem Abstand.

Beim ansteigenden Teil bis zum Maximum der Adhäsionskraft wird angenommen, daß mit der gemessenen Adhäsionskraft primär die Zelle gedehnt wird. Mit vielen noch gebundenen Bindungspaaren, die einer kleinen Einzelkraft ausgesetzt sind und bei dieser noch nicht dissoziieren, kann diese hohe Gesamtkraft auf die Zelle vermittelt werden. Der Bereich des Adhäsionsmaximums stellt den Übergang zwischen der maximalen Zelldehnung und dem dominierenden Effekt der Abrisse der Einzelbindungen dar. Mit zunehmendem Abstand werden die Bindungsverankerungen gedehnt und die Einzelbindungen gelöst. Durch die Abnahme der Gesamtbindungsanzahl ergibt sich der abklingende Teil der Separationskurve.

5.4.2.1. Der Bindungsanteil

Im abklingenden Bereich existiert eine Verbindung zwischen Zelle und Kraftsensor, obwohl die Zelle schon maximal gedehnt ist.

In Abb. 5.4.2.1.1 ist eine Separationskurve für das System BSA/HEC gezeigt. Ein Ausschnitt aus dem abklingenden Bereich der Kraftkurve, im Abstand von mehr als 55 μm , indiziert eine überwiegend viskose Ankopplung der Bindungsproteine an das System Zelle: die Trennungskurve zeigt kleine Stufen, die nicht durch einen Kraftanstieg vor dem Abriß gekennzeichnet sind, wie von einer federartigen Ankopplung zu erwarten wäre (siehe Kapitel 4).

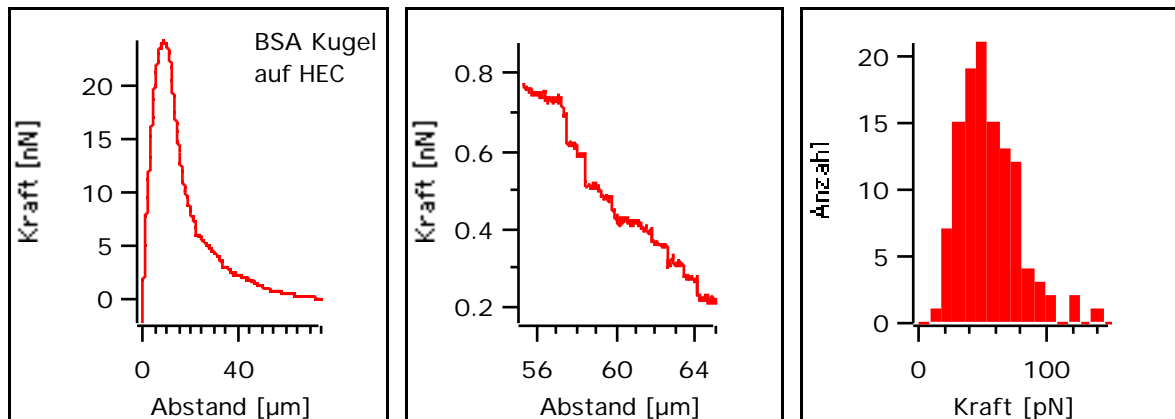


Abb. 5.4.2.1.1: links: gesamte BSA/HEC-Zellen Kraftkurve bei 10 min Kontakt; Mitte: Zoom in den Abstandsbereich von 55-65 μm mit vielen kleinen Einzelabrissen; rechts: Histogramm der kleinen Einzelabrißkräfte

Solche Stufen ohne größere Abrisse sind bei Separationen von BSA Kugeln von RL oder HEC Monolayern generell zu beobachten. Bei den Wechselwirkungen von mit Fibronectin beschichteten Kugeln auf RL Monolayern treten sie nur bei kurzen Kontaktzeiten auf. Die Höhe der bis zu 300 Stufen liegt bei 50 ± 20 pN, wie in dem Histogramm in Abb.5.4.2.1.1 zu sehen ist..

Experimente mit optischen Pinzetten oder Glasküvetten (54, 55) zeigen, daß bei Zugexperimenten an Zellen Tether, das sind Membranschläuche aus der Überschußmembran der Zellen, gebildet werden. Diese verhalten sich beim Ziehen fast rein viskos mit Werten von z.B. $2.8 \text{ pNsec}/\mu\text{m}$ für Erythrozyten (53). Die langreichweitigen Stufen in der Separation wurden damit sehr wahrscheinlich durch die Dehnung von Tethern und dem anschließenden Aufbrechen der Anbindung verursacht.

Im Modell werden daher die Bindungsstellen durch ein rein viskoses Element an der Zelloberfläche verankert, die über das, im Folgenden beschriebene, System Zelle an das Substrat gekoppelt sind.

5.4.2.2. Der Zellanteil

Von Martin Benoit sind mit dem AFM die viskoelastischen Eigenschaften der verschiedenen Zellen bestimmt worden. Als Modell für die Zelle dient dabei der Kelvin-Körper (Abb. 5.4.2.2.1):

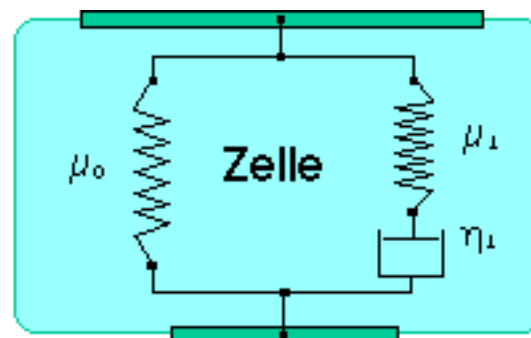


Abb. 5.4.2.2.1: Die viskoelastischen Eigenschaften einer Zelle werden mit einem Kelvin-Körper beschrieben.

Aus den Messungen ergeben sich für die verwendeten Zellen, bei der Beschreibung durch den Kelvin-Körper, folgende Größen:

	μ_0 [nN/ μm]	μ_1 [nN/ μm]	η_1 [nN*s/ μm]
JAR	0.7	2.1	25
HEC	0.4	1	4.9
RL	5.3	3.5	27

Tabelle 5.4.2.2.T.1: viskoelastische Eigenschaften der Zellen

5.5. Modell für die Wechselwirkung der Zellen mit dem Kraftsensor

Mit den experimentell bestimmten Eigenschaften zur Dehnung der Zelle und der viskosen Tether, läßt sich das in Abb. 5.5.1 gezeigte Zellmodell aufstellen. Die Zelle besteht dabei aus dem in Abb. 5.4.2.2.1 gezeigten Kelvin-Körper, dessen Parameter für die verschiedenen Zellen in Tabelle 5.4.2.2.T.1 gezeigt sind. Die Anbindung der Zelle an die Kugel, befestigt am Kraftsensor, erfolgt über eine Parallelschaltung von viskosen Elementen gleicher Stärke und mit gleicher Dissoziationswahrscheinlichkeit.

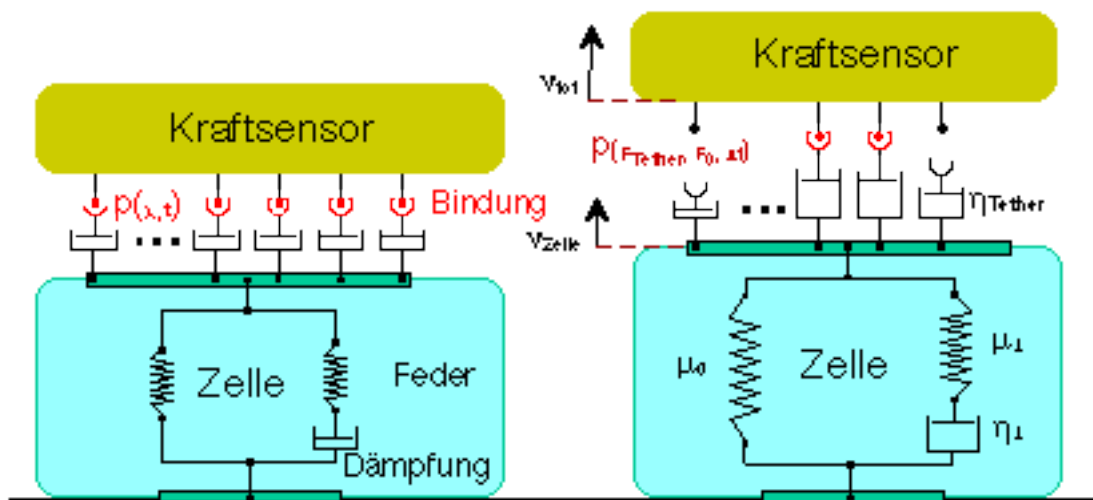


Abb. 5.5.1: Zellmodell: Die Zelle als Kelvin-Körper verbunden über eine Parallelschaltung viskoser Elemente mit den Bindungen an den Kraftsensor

Wegen der seriellen Kopplung liegt die Gesamtkraft (F) an der Zelle und an den parallel geschalteten Tethern an. Die Einzelkraft auf eine Bindung, und damit auf einen Tether (F_{Tether}), ergibt sich aus der Division der Gesamtkraft (F) durch die Anzahl n der Bindungen (n_{Tether}):

$$F = F_{\text{Zelle}} = n_{\text{Tethers}} F_{\text{Tether}} \quad (5.5.1)$$

Den zeitlichen Verlauf der am Kraftsensor anliegenden Gesamtkraft erhält man durch die Analyse der Dissoziation der Bindungen. Die Dissoziation wird durch die angelegte Kraft und die Zeitdauer der Krafteinwirkung beeinflusst. Dazu wird im Folgenden dargestellt, mit welcher Kraft und Geschwindigkeit an einer einzelnen Bindung gezogen wird. Die Zuggeschwindigkeit (v_{tot}) des Piezos läßt sich in die Einzelgeschwindigkeiten v_{Zelle} und v_{Tether} separieren. Mit v_{Zelle} wird die Geschwindigkeit der Zelloberfläche und mit v_{Tether} die Geschwindigkeit der Bindung beschrieben (siehe Abb. 5.5.1).

$$V_{tot} = V_{Zelle} + V_{Tether} \quad (5.5.2)$$

Da die Tether als viskose Elemente angesehen werden, ist die Kraft auf einen Tether durch das Produkt der Geschwindigkeit v_{Tether} mit der Viskosität η_{Tether} gegeben:

$$F_{Tether} = \eta_{Tether} \frac{dz_{Tether}}{dt} = \eta_{Tether} V_{Tether} \quad (5.5.3)$$

Mit Gln. 5.5.1 ergibt sich ein Ausdruck für die Geschwindigkeit v_{Tether} durch die anliegende Gesamtkraft:

$$V_{Tether} = \frac{F_{Tether}}{\eta_{Tether}} = \frac{F}{n \eta_{Tethers}} = \frac{F_{Zelle}}{n \eta_{Tethers}} \quad (5.5.4)$$

Die Kraft auf die Zelle entspricht der anliegenden Gesamtkraft, die mit dem Kraftsensor gemessen wird. Im Modell wird sie iterativ ermittelt, in dem die Zelle bei jedem Iterationsschritt zusätzlich um $v_{Zelle} \cdot t$ ausgelenkt wird und anschließend für das Zeitintervall t relaxiert. Für jeden i-ten Einzelschritt gilt:

$$F_{Zelle(i)} = const \cdot z_{Zelle(i-1)} + \frac{dz_{Zelle(i)}}{dt} \cdot t \quad (5.5.5)$$

Die Konstante $const$ beschreibt die viskoelastischen Eigenschaften des Kelvin-Körpers der Zelle mit den Parametern aus Tabelle 5.4.2.2.T.1:

$$const = \mu_0 \cdot \frac{1}{1 + \frac{\mu_0}{\mu_1}} \cdot e^{-t/\tau} \quad (5.5.6)$$

mit:

$$\frac{1}{\mu_0} \cdot \frac{1}{1 + \frac{\mu_0}{\mu_1}} \quad \& \quad \tau = \frac{1}{\mu_1}$$

Die Auslenkung der Zelle aus der Ruhelage ergibt sich über die Summe der Iterationen:

$$z_{Zelle(i-1)} = \sum_{k=0}^{i-1} t \cdot \frac{dz_{Zelle(k)}}{dt} \quad (5.5.7)$$

Mit den obigen Gleichungen und Bedingungen läßt sich die Zuggeschwindigkeit der Tethers zum Zeitpunkt i berechnen:

$$V_{Tether(i)} = \frac{dz_{Tether(i)}}{dt} = \frac{F_{Zelle(i)}}{n \eta_{Tethers(i-1)} \cdot \eta_{Tether}} = \frac{const}{n \eta_{Tethers(i-1)} \cdot \eta_{Tether}} \cdot \frac{V_{tot} \cdot t + z_{Zelle(i-1)}}{const \cdot t} + 1 \quad (5.5.8)$$

Mit der bekannten Zuggeschwindigkeit v_{Tether} , mit der an dem Tether und damit auch an der Bindung gezogen wird, ist gemäß Gln. 5.5.3 mit der bekannten Viskosität η_{Tether} die Kraft auf einen Tether (F_{Tether}) und auf eine Bindung bekannt. Die Dissoziation einer Bindung kann durch eine Wahrscheinlichkeit, abhängig von der anliegenden Kraft (F_{Tether}), der natürlichen Dissoziationskraft F_0 , unter den anliegenden Bedingungen, und der Dauer des beobachteten Zeitintervalls t , beschrieben werden (15, 66, 67). Für die Wahrscheinlichkeit des noch Vorhandenseins einer Bindung gilt:

$$p(F_{\text{Tether}}; F_0; t) = e^{-\frac{F_{\text{Tether}}}{F_0} t} \quad (5.5.9)$$

Damit ergibt sich die Anzahl der, nach der Zugzeit t^*i noch vorhandenen, Bindungen $n_{\text{Tethers}(i)}$ zu:

$$n_{\text{Tethers}(i)} = n_{\text{Tethers}(i-1)} p(F_{\text{Tether}(i)}; F_0; t) \quad (5.5.10)$$

Die Gesamtkraft, gebildet aus dem Produkt der Einzelkraft mit der Anzahl der noch vorhandenen Bindungen, im Schritt i ist damit:

$$F_{(i)} = n_{\text{Tethers}(i)} F_{\text{Tether}(i)} = n_{\text{Tethers}(i)} \eta_{\text{Tether}} v_{\text{Tether}(i)} \quad (5.5.11)$$

Diese Kraft wird vom Kraftsensor im Experiment aufgezeichnet. Mit der schrittweisen Berechnung der Kraft läßt sich somit eine Separationskurve simulieren. Dabei gehen die in Tabelle 5.5.1.T.1 aufgelisteten Größen in das Modell ein:

Äußere einstellbare Parameter:	
Kontaktzeit (t_c)	(0 sec...40min)
Eindrückkraft (f_0)	(1nN20nN)
Zuggeschwindigkeit (v)	(1...30 mm/sec)
direkt meßbare Parameter:	
Kontaktfläche (K)	(500±100 μm^2)
Dauer der Zugbelastung (t_r)	(1sec -100sec)
Experimentell bestimmte Parameter zum Bindungsaufbau:	
Linearisierungsfaktor (λ)	(1/3)
Abklingkonstante (τ)	(0.05/min)
Experimentell von Martin Benoit bestimmte Parameter zur Mechanik der Zelle:	
Kelvin-Element elastisch (μ_0)	(0,4 -5 nN/ μm)
Kelvin-Element elastisch (μ_1)	(1 -4 nN/ μm)
Kelvin-Element viskos (η)	(5-20 nN*s/ μm)
Aus dem Modell und Literatur angenäherte unbekannt Parameter:	
potentielle Bindungsdichte (ρ)	(? 0.2 -2/ μm^2)
Belastbarkeit der Einzelbindung (f_0)	(? 50±20pN/sec)
Bindungselement viskos (τ)	(? 3 ± 2pNsec/ μm)

Tabelle 5.5.1.T.1: Dem Modell zu Grunde liegende Größen.

Die potentielle Bindungsdichte ρ und der Viskositätsanteil η der Bindungen sind bisher noch nicht befriedigend meßbar. Die Werte können aber durch Variation im Rahmen der Literaturdaten mit dem Modell gut angenähert werden.

Die angenommene Belastbarkeit der Einzelbindung mit 50 pN, ermittelt aus den Kraftstufen, ist sicherlich zu hoch angesetzt, da wahrscheinlich etliche Bindungen während der Experimente aufreißen, die unter der Auflösungsgrenze (10-25 pN) dieses AFMs liegen. Dagegen ist die potentielle Bindungsdichte ρ sicherlich zu niedrig angesetzt, weil sie alle diese schwachen Bindungen nicht einbezieht. In der Summe gleichen sich beide Faktoren in gewissen Grenzen jedoch wieder aus.

Dieses Modell ist in der Lage die Charakteristiken der Kraft-Abstandskurvenscharen für, durch unabhängige Membranproteine vermittelte, Zellbindungen zu beschreiben. Für die verschiedenen Zelltypen liefert das Modell typische Kurvenverläufe in Abhängigkeit deren verschiedener viskoelastischer Eigenschaften. Natürlich sind dabei gravierende Einschränkungen in den Annahmen gemacht worden, jedoch werden die Separationskurven in der selben Größenordnung, hinsichtlich Kraft und Separationsdistanzen, wie bei den Experimenten, beschrieben. Die Abbildung 5.5.2 zeigt eine Simulationen der

Zugkraft bei einer Zuggeschwindigkeit von $7 \mu\text{m}/\text{sec}$ und anfänglichen 2000 Bindungen bei 50 pN Belastbarkeit. Das Maximum der Kraft liegt bei 29 nN im Abstand von $10 \mu\text{m}$. In der gleichen Abbildung ist die Abnahme der Bindungsanzahl (grüne Kurve) aufgezeigt. Dazu sind die momentanen Geschwindigkeiten der Zelle und der Tethers abgebildet, die zusammen immer die konstante Zuggeschwindigkeit ergeben. Die maximale Tetherzuggeschwindigkeit beträgt $7,6 \mu\text{m}/\text{sec}$. Die negative Zellgeschwindigkeit entspricht dem Relaxieren der Zelle nach dem Überschreiten der maximalen Gesamtdehnung an der Zelle.

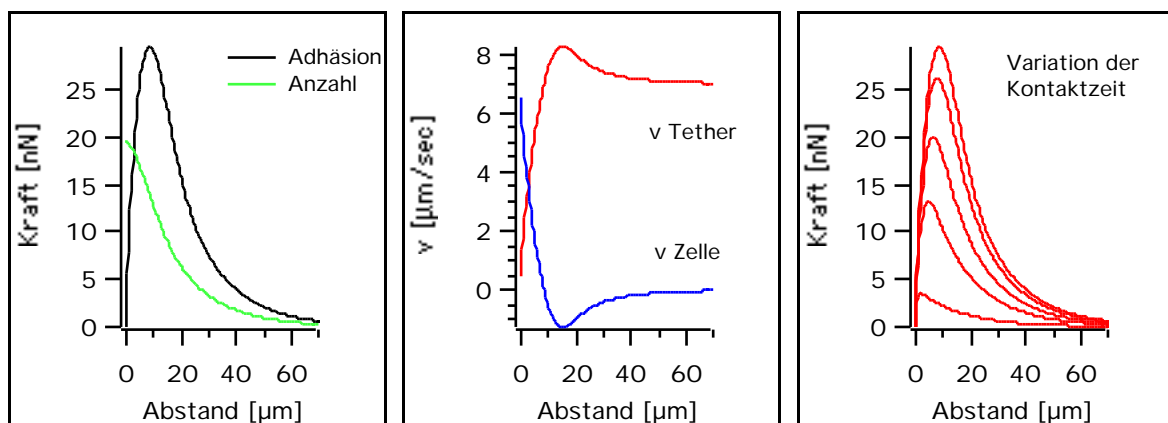


Abb. 5.5.2: links Adhäsionsverlauf für ursprünglich 2000 Bindungen und Abnahme der Bindungsanzahl für den Zelltyp RL; Mitte: konstante Zuggeschwindigkeit $7\mu\text{m}/\text{sec}$, aufgeteilt auf v_{Tether} und v_{Zelle} ; rechts: Adhäsionsverlauf für Kontaktzeiten von 1-5-10-20-40 Minuten

Für Bindungen die molekulare Cluster ausbilden, kann das Modell in dieser Form nicht mehr angewendet werden.

Es liefert jedoch eine physikalische Grundlage zum Verständnis der Vorgänge und der wichtigen Parameter zur Bindungsbildung zwischen Zellen und zum Verlauf der Kräfte beim Trennen der Zellen. Qualitativ sind mit dem Modell Aussagen über die Abhängigkeit der Trennkurven von äußeren Parametern möglich. Eine Erhöhung der Zuggeschwindigkeit bewirkt einen größeren Wert und Abstand vom Kontaktpunkt der Adhäsionsmaxima im Experiment und bei der Simulation (Abb. 5.4.1.2).

5.6. Diskussion

Die Messungen und die zugehörigen Simulationen ergeben einen Einblick in die Abläufe bei Kontakten mit Zelloberflächen. Sofern keine molekularen Cluster stimuliert werden können, erfolgt die Dissoziation von Zell/Zell- oder

Zell/Substrat-Kontakten durch ein unabhängiges Auseinandergleiten der verschiedenen eingegangenen Kopplungen. Dafür muß nur eine geringe Zugkraft aufgebracht werden. Die Anzahl der Kontakte bestimmt die Zeit bis zur Trennung und die maximale Adhäsionskraft.

Im Gegensatz dazu stehen die Zellkontakte, bei denen molekulare Cluster ausgebildet werden. Die Bindungen von mehreren Partnern müssen zugleich, also abhängig voneinander, gelöst werden. Dies ergibt die multiplen Abrisse in den JAR/RL und Fibronectin/RL Kontakten nach längerer Kontaktzeit. Bei der Fibronectin/Zellwechselwirkung ist das Bindungsverhalten teilweise bekannt. Ein Anbinden von Fibronectin an Integrin (siehe Abb. 5.3.4.2) bewirkt eine Anbindung der Integrine an das Zytoskelett. Dadurch sind diese fest verankert und immobil. Durch multiple Verankerung mit dem Zytoskelett entsteht ein molekularer Cluster. Damit kann man auf die Prozesse bei den JAR/RL Zellen schließen, allerdings noch ohne die Kenntnis, welche Adhäsionsproteine die Verbindung auslösen. Wichtig ist, daß mit den Messungen gezeigt worden ist, daß ein normaler epitheler Phänotyp wie die HEC Zellen keine Zellverbindungen mit den JAR Trophoblastzellen eingehen. Im Gegensatz dazu sind diese bei der Wechselwirkung mit den RL Zellen beobachtet worden, wobei die epithelen RL Zellen somit wohl einen Umschaltvorgang (Aktivierung?) von der nicht-Adhäsivität zur möglichen Adhäsivität vollzogen haben. Diese apikale Adhäsivität ist eine Eigenschaft der Epithelzellen, die wie in den einleitenden Kapiteln betont wurde, nicht den normalen Zustand der Epithelzellen repräsentiert. Im Falle der Uterusepithelzellen wird dieser Zustand allerdings als Voraussetzung für die Einnistung der befruchteten Eizelle angenommen.

Mit der Bildung der großflächigen Zellkontakte, den molekularen Clustern, erklärt sich auch, warum z.B. die HEC Zellen im Zentrifugationsexperiment (43) die JAR Zellen nicht festhalten konnten, obwohl sie in den hier vorgestellten Experimenten meist ähnlich hohe maximale Bindungskräfte zeigen wie die RL Zellen, die dennoch die JAR Zellen nach dem Zentrifugieren festhielten: Je langsamer die Zuggeschwindigkeit ist, desto niedriger wird die Maximalkraft bei der Dissoziation der nicht vernetzten Membranbindungen (Abb. 5.4.1.2). Bei der Ausbildung von molekularen Clustern ist, für das Aufbrechen einer solchen Kontaktinsel, eine insgesamt höhere Kraft notwendig, als für das Lösen von einzelnen Bindungen nacheinander. Im Experiment sind dies die finalen Abrißkräfte. Diese sind bei langsameren Zuggeschwindigkeiten sicher etwas niedriger als bei den experimentellen Bedingungen, jedoch nicht niedrig genug um durch die geringen Zentrifugationskräfte, es wird statt 10 sec gezogen 5 min zentrifugiert, überwunden zu werden. Wegen der starken Drifteffekte bei sehr langsamen Zuggeschwindigkeiten waren solche langsamen Messungen noch

nicht möglich. Zentrifugiert man daher lange genug mit einer Kraft, die unter der Maximalkraft der vernetzten Bindung liegt, werden nur die HEC Zellen von den JAR Zellen getrennt.

5.7. Ausblick

Die Verwendung des AFM für Zelladhäsionsmessungen eröffnet ein weites Anwendungsspektrum für die Erforschung der Kontaktaufnahme von einzelnen Zellen oder Zellverbänden. Wegen der nicht invasiven Meßmethode unter physiologischen Bedingungen können Sekundärprozesse in Zellen erforscht und in Ergänzung zu anderen Techniken, wie der Fluoreszenzmarkierung, neue Erkenntnisse liefern.

Die apikale Adhäsivität von Epithelzellen – wie in der Frühphase der Embryoimplantation oder bei der Metastasenbildung von Tumoren – zu verstehen, ist eine Herausforderung an nachfolgende Forschungsprojekte.

Messungen mit einzelnen Dictyostelium Mutanten, denen genetische Defekte zur Unterdrückung der Expression von bestimmten Adhäsionsproteinen beigefügt worden sind, ermöglichen Aussagen über involvierte intrazelluläre Prozesse für die Adhäsionsfähigkeit, die bisher noch nicht möglich waren (68). In diesem Bereich kann die Stärke des Kraftmikroskops, Adhäsionskräfte unter physiologischen Bedingungen zu messen, in Verbindung mit den Erkenntnissen aus jahrzehntelanger Zellforschung optimal genutzt werden.

6. Affinitätsabbildung von Zellen mittels Kraftspektroskopie

6.1. Einleitung

Die ursprüngliche Anwendung des Kraftmikroskops lag in der Abbildung von Oberflächenstrukturen mit hoher Präzision. Grundlegendes Prinzip für das bildgebende Verfahren ist die genaue Positionierung und die Detektion der lokalen Wechselwirkung zwischen Abtastnadel und Probe. Die universelle Anwendbarkeit des Kraftmikroskops für Proben an Luft und in Medium erlaubt die Untersuchung vielfältigster Wechselwirkungen. Durch Bindungskraftmessungen an einzelnen Rezeptor-Ligand Paaren (Kapitel 4) und die Untersuchung der Eigenschaften von Polymeren (3) und globulären Proteinen (4) ist die Kraftspektroskopie, die über Kraftkurven die Wechselwirkung analysiert, mittlerweile sehr gut etabliert. Die Verbindung von lokalen Kraftkurven mit lateraler Positionierung ermöglicht die Untersuchung von viskoelastischen Eigenschaften von Materialien und Zellen (69) sowie Affinitätsabbildungen von strukturierten Oberflächen (70).

In diesem Kapitel wird die Erweiterung des Konzepts der Affinitätsabbildung an lebenden Zellen vorgestellt. Erythrozyten der Blutgruppe A sind wegen ihrer spezifischen Affinität zu dem Lektin Helix Pomatia Agglutinin (HPA) in einem gemischten Zellmonolayer aus A/O-Erythrozyten lokalisiert worden.

6.2. Helix Pomatia Agglutinin- spezifische Wechselwirkung mit Erythrozyten der Blutgruppe A

Erythrozyten sind über sterische Abstoßung gegen unerwünschte Adhäsionen von anderen Zellen geschützt. Erreicht wird die Abstoßung über die Glykokalix, die auf der Außenseite der Zellmembran aus den Zuckerresiduen von Glykolipiden und Glykoproteinen besteht (71). Die in der Glykokalix vorhandenen Glykolipide und -Proteine können aber auch als Vermittler in der molekularen Erkennung von Zellen (72) über die Wechselwirkung mit Lektinen dienen. Als Beispiel wird hier die spezifische Bindung von N-Acetylgalactosamin (galNAc) an das Lektin Helix Pomatia Agglutinin (HPA) gezeigt. galNAc terminierte Glykolipide sind in der Glykokalix der Erythrozyten der Blutgruppe A vorhanden, bei denen der Gruppe O nicht. HPA besitzt 6 äquivalente Untereinheiten, die jeweils an galNAc spezifisch binden. Ein Vergleich der

gemessenen Abrißlängen auf Erythrozyten (μm -Bereich, unabhängig vom Polymerspacer) mit Messungen auf galNAc funktionalisierten Agarosekugeln (je nach Polymerspacer bis maximal $1\ \mu\text{m}$) ergibt, daß die galNAc terminierten Glykolipide nur in der Zellmembran, aber nicht am Zytoskelett verankert sind.

Mit einem HPA funktionalisierten Kraftsensor konnten aufgrund der spezifischen Affinität zu galNAc die Gruppe A Zellen in einem gemischten Erythrozyten Monolayer (Gruppe A und O) lokalisiert werden (Schema in Abb. 6.2.1). Die Spezifität der Wechselwirkung ist durch die Elimination der Adhäsion, bei Zugabe von überschüssigem galNAc in die Meßlösung, nachgewiesen worden. In Abb. 6.2.1 ist der experimentelle Aufbau für die Lokalisation der Gruppe A Erythrozyten gezeigt. Die vergleichenden Adhäsionsmessungen mit den galNAc funktionalisierten Agarosekugeln sind, wie in Kapitel 4 beschrieben, durchgeführt worden.

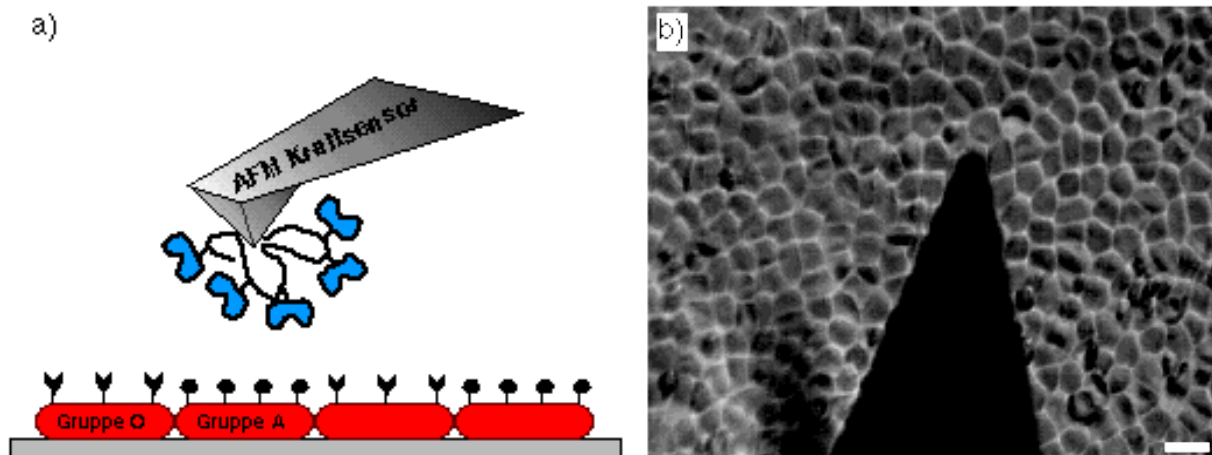


Abb. 6.2.1: a) Kraftsensor funktionalisiert mit Helix Pomatia Agglutinin. b) Aufnahme des invertierten optischen Mikroskops im AFM Aufbau des Erythrozyten Monolayers der Gruppen A/O mit Kraftsensor über den Zellen

6.2.1 Kraftkurven auf Erythrozyten

Wie in Kapitel 3.3.2 und im Anhang beschrieben, wird die Abrißkraft durch die Analyse des letzten Abrisses der Kraftkurve ermittelt. Mit der gewählten Eindrückkraft von $200\ \text{pN}$ betrug die Wahrscheinlichkeit für eine Bindung auf einer Gruppe A Zelle nahezu 100% . Um Wechselwirkungen zwischen den Oberflächen des Kraftsensors und der des Objektträgers auszuschließen, sind für die Affinitätsabbildung nur Abrisse mit mindestens $25\ \text{nm}$ Abrißlänge berücksichtigt worden, wobei die mittlere Abrißlänge im Mikrometerbereich lag. Die einzelnen Kraftkurven wurden mit einer Zuggeschwindigkeit von $6\ \mu\text{m}/\text{sec}$

aufgenommen. In Abb. 6.2.1.1 sind exemplarisch Kraftkurven, aufgenommen auf einem Gruppe A Erythrozyten mit HPA funktionalisiertem Kraftsensor, gezeigt.

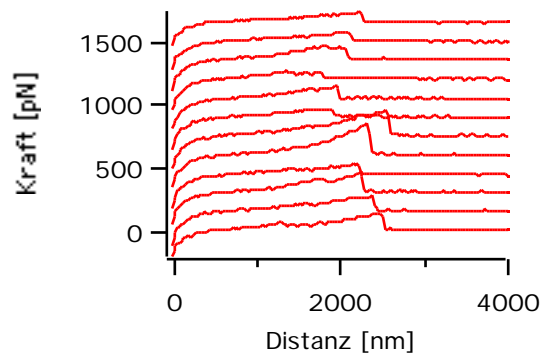


Abb. 6.2.1.1: Kraftkurven mit HPA auf Erythrozyten der Gruppe A.

Die Ladungsraten, berechnet aus der Steigung der Kraftkurve am Abriß, liegen im Bereich von 1 nN/sec. Die Abrißkräfte liegen zwischen 30 und 140 pN und weisen ein Maximum der Verteilung bei 65 pN auf. Die Distanzen der Abrisse lagen zwischen 1-6 μm . Das Histogramm der Abrißkräfte und die Verteilung der Abrißkräfte gegen die Ladungsraten ist in Abb.6.2.1.2 zu sehen.

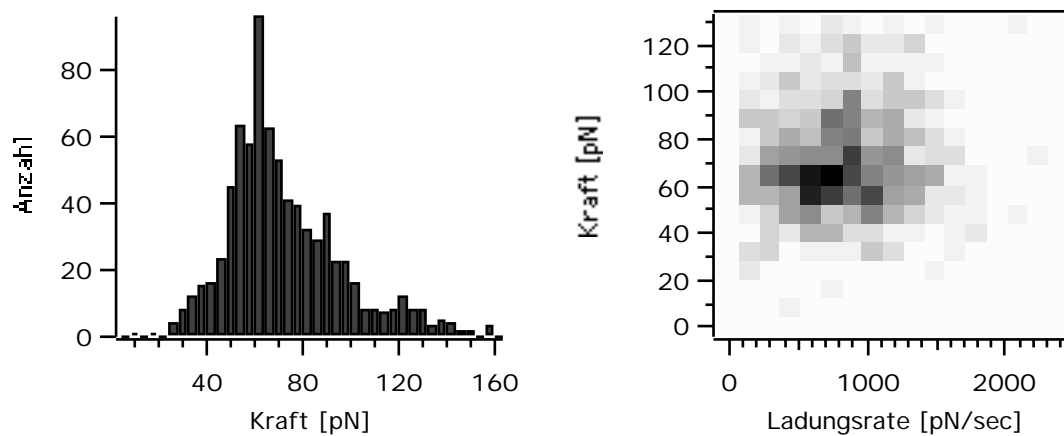


Abb. 6.2.1.2: Histogramm und Kraft/Ladungsraten Verteilung der HPA Wechselwirkung.

Der zeitliche Verlauf des Experiments ist in Abb. 6.2.1.3 dargestellt. Während den ersten Kraftkurven ist eine drastische Abnahme der gemessenen Abrißkraft mit im weiteren Verlauf anschließend einigermaßen konstanten Werten zu beobachten.

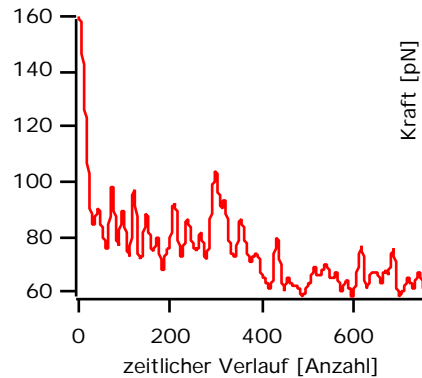


Abb. 6.2.1.3: Zeitlicher Verlauf der gemessenen Adhäsionskraft auf einem Erythrozyten.

6.2.2 Affinitätsabbildung und Topologie eines Gruppe A/O Monolayers

Die gemischten Erythrozyten der Gruppe A/O wurden, mit dem im Anhang beschriebenen Protokoll, auf einen Glas Objektträger angebunden (Abb. 6.2.1). Die gute Durchmischung der A/O Zellen im Monolayer ist mit Fluoreszein markiertem HPA (20 μ M HPA-FITC) analysiert worden. In Abb. 6.2.2.1 ist die mit Fluoreszenzmikroskopie erhaltene Aufnahme abgebildet.

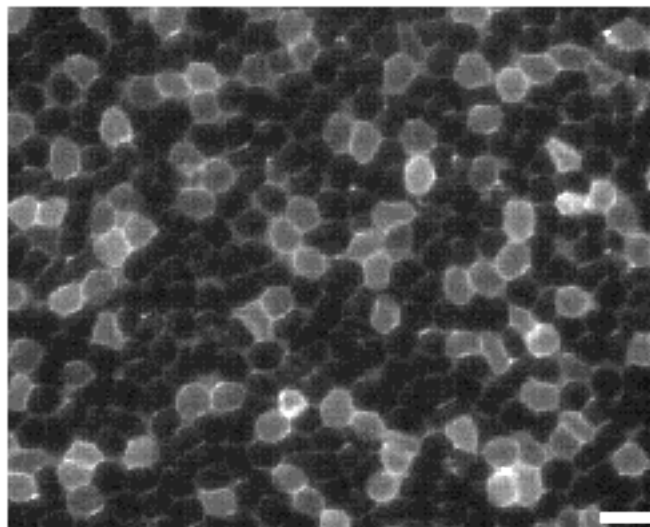


Abb. 6.2.2.1.: Epifluoreszenzaufnahme eines Erythrozyten Monolayers aus Blutgruppe A/O Zellen im Mischungsverhältnis von 1:3. Die Gruppe A Zellen sind eindeutig durch Fluoreszein markiertes HPA identifizierbar. (Skalierungsbalken 5 μ m)

Die Erythrozyten der Gruppe A können wegen der hohen Intensität der Fluoreszenz, durch die spezifische Bindung der Fluoreszein markierten HPA Lektine, eindeutig lokalisiert werden. Da die Fluoreszenzaufnahme nicht mit einem

konfokalen Mikroskop, das einzelne Schichtebenen in der Bildtiefe analysieren kann und nicht nur vertikal die gesamte Fluoreszenz integriert, aufgenommen wurde, ist die Intensität der Fluoreszenz am Rand wesentlich größer als im Zentrum der Zellen. Das mit der Fluoreszenz erhaltene Mischungsverhältnis der Zellen beträgt ungefähr 1:3 (Gruppe A zu O).

Ein ebenso präparierter Monolayer aus Erythrozyten beider Blutgruppen ist, über die spezifische Wechselwirkung des HPA mit den Gruppe A Zellen, mit dem Kraftmikroskop abgebildet worden:

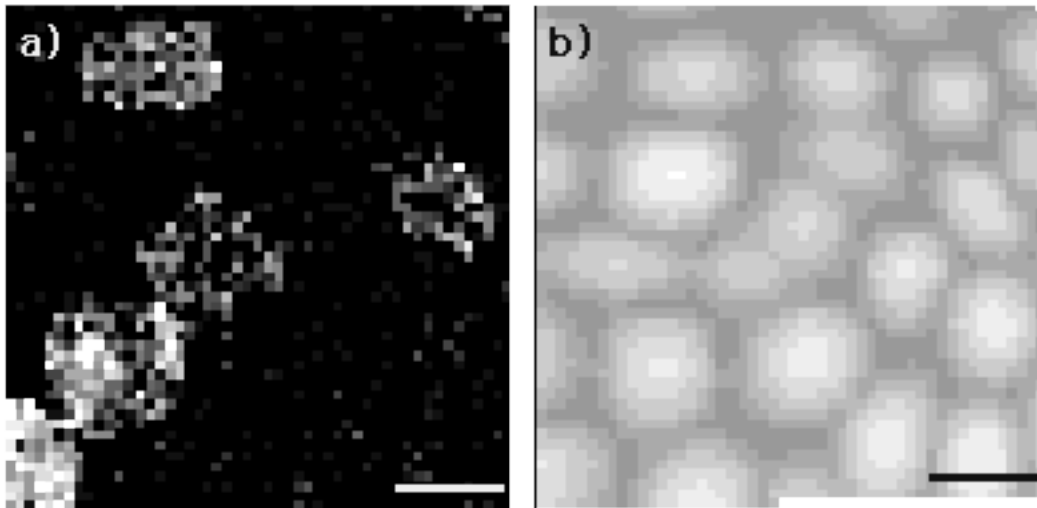


Abb. 6.2.2.1: a) Affinitätsabbildung des Erythrozyten Monolayers der Gruppen A/O. Die Abbildung besteht aus 3025 Kraftkurven und wurde links unten begonnen und zeilenweise nach oben fortgeführt. b) Synchron ermittelte Topographieabbildung aus der vertikalen Auslenkung bei Zellkontakt mit 200 pN Eindrückung. (Skalierungsbalken 5 μm)

Für die Abbildung der Zellen ist ein Bereich des Zellmonolayers von $25 \times 25 \mu\text{m}$ mit 55×55 Kraftkurven untersucht worden. Die Abbildungen, gezeigt in Abb. 6.2.2.2, zeigen das Affinitätsbild und die Topologie des Zellmonolayers. Das Höhenprofil wurde durch die Analyse der vertikalen Auslenkung des Piezos bei einer Eindrückung von 200 pN des Kraftsensors in die Oberfläche ermittelt. Das detektierte Mischungsverhältnis der A/O Zellen beträgt 1:4 bei insgesamt 24 abgebildeten Zellen.

6.2.3 Kraftkurven auf Agarosekugeln

Abb. 6.2.3.1 zeigt Kraftkurven, aufgenommen mit einem HPA funktionalisierten Kraftsensor auf galNAc funktionalisierten Agarosekugeln. Die Eindrückung des Kraftsensors bei jeder Kraftkurve in die Kugel wurde konstant bei 40 pN gehalten.

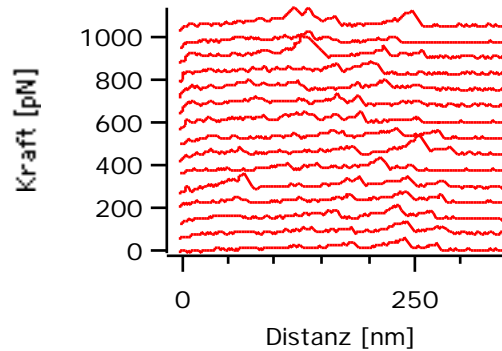


Abb. 6.2.4.1: Kraftkurven mit einem HPA funktionalisierten Kraftsensor auf einer galNAc funktionalisierten Agarosekugel.

Unter dieser Bedingung lag die Bindungswahrscheinlichkeit bei 10%. Die Kraftkurven wurden mit ca. $1 \mu\text{m}/\text{sec}$ Ziehgeschwindigkeit aufgenommen. Die Ladungsraten am Abriß liegen im Bereich von $1 \text{ nN}/\text{sec}$. Dies ist im Vergleich zu den auf Erythrozyten aufgenommenen Kraftkurven ($6 \mu\text{m}/\text{sec}$) durch die wesentlich größeren Steigungen der Kraftkurven am Abriß bedingt. Die Abrißkräfte liegen im Bereich von 20 bis 100 pN mit einer Häufung bei 35 pN. Die maximal detektierte Distanz der Abrisses betrug 300 nm.

Das Histogramm der Abrißkräfte und die Verteilung der Abrißkräfte gegen die Ladungsrate, ermittelt aus den Daten von 4000 Kraftkurven und auf der selben Stelle der Kugel aufgenommen, ist in Abb. 6.2.4.2 gezeigt.

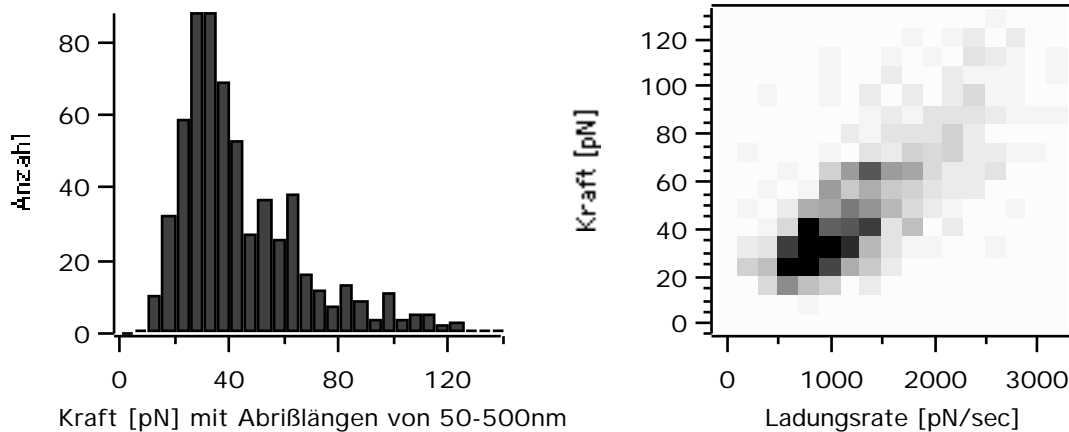


Abb. 6.2.4.2: Histogramm der Abrißkräfte und 3-D Histogramm der Kraft/Ladungsraten Verteilung (Grauskala der Verteilung mit schwarz ab 70% der maximalen Häufigkeit)

6.3 Diskussion der Ergebnisse

Die Affinitätsabbildung (Abb. 6.2.2.1) weist Bereiche mit hoher Bindungswahrscheinlichkeit auf, die im Vergleich mit der Topographie des Zellmonolayers eindeutig mit dort lokalisierten Zellen korrelieren. Das ermittelte Mischungsverhältnis (1:4) ist mit dem aus der Fluoreszenz Markierung erhaltenem (1:3) vergleichbar, die Abweichung läßt sich durch den kleinen Ausschnitt des Monolayers, bestehend aus insgesamt 24 Zellen, erklären. Die Adhäsion ist spezifisch, da sie sich durch Zugabe von 100 mM galNAc unterdrücken läßt.

Damit ist gezeigt, daß Erythrozyten der Blutgruppe A, in einem Zellmonolayer gemischt mit Erythrozyten der Blutgruppe O, über die spezifische Wechselwirkung des galNAc mit HPA lokalisiert werden können. Eine Ortsauflösung der Verteilung der Liganden auf der Zelloberfläche war allerdings nicht möglich. Dies ist wegen der homogenen Verteilung, und der, im Vergleich zur Dauer der Abbildung (30 min.), hohen Beweglichkeit der Liganden auch nicht erwartet worden.

Die relativ hohen Bindungskräfte bei den ersten 500 Kraftkurven, zu sehen an dem starken Kontrast der linken unteren Zelle, pendeln sich bei der weiteren Abbildung auf Kräfte im Bereich von 65 pN ein. Dieser Effekt kann möglicherweise durch nicht kovalent angebondenes Lektin, das sich mit der Zeit löst, verursacht werden. Die andere Möglichkeit besteht in der Bindung von aus den Zellen gelöstem galNAc in den Bindungstaschen von HPA. Die, im Vergleich zur experimentellen Zeitskala von 30 min, größere natürliche off-Rate (10^{-3} sec^{-1}) des galNAc könnte jedoch auch zu einer Selbstreinigung des Kraftsensors führen und

sich damit ein Gleichgewicht zwischen der Anlagerung, durch den Kontakt mit den Zellen, und natürlicher off-Rate einstellen. Eine weitere Abnahme der mittleren Bindungskraft ist nicht zu beobachten, es gibt also keinen Ermüdungseffekt des Kraftsensors. Dies gilt auch nach 5000 Kraftkurven auf der Agarosekugel. Die, im Vergleich mit dem Modellsystem der Agarosekugel, höhere mittlere Bindungskraft bei den Zellen ist auf mögliche Vielfachinteraktionen durch die, wegen der gewünschten hohen Bindungswahrscheinlichkeit zur Kontrastgebung, höhere Eindrückung, und damit einer größeren Kontaktfläche, zurückzuführen. Dagegen ist bei der geringen Bindungsrate von 10% im Modellexperiment die Wahrscheinlichkeit von Einzelmolekülbindungen sehr hoch. Für das bildgebende Verfahren durch die Detektion von spezifischer Affinität genügen also bereits wenige Molekülpaare. Die unterschiedliche Verteilung der Abrißlängen, für die Zellen und das Agarose Modellsystem, legen die Vermutung nahe, daß die galNAc terminierten Glykolipide nur Membran verankert sind und beim Zug an ihnen vor dem Abriß zuerst Membrantether aus der Zelle herausgezogen werden. Da auch in dem Kontrollexperiment auf einer einzelnen Gruppe A Zelle keinerlei Ermüdungserscheinungen zu beobachten sind, sollte die Bindung in der Bindungstasche gelöst werden, denn sonst wäre der Kraftsensor nach ein paar Kraftkurven auf der gleichen Zelle blockiert.

6.4 Zusammenfassung und Ausblick

Mit der Affinitätsabbildung von Erythrozyten der Gruppe A ist gezeigt worden, daß mit spezifischen Bindungskräften biologisch relevante Oberflächen analysiert werden können. Die quantitative Analyse der Bindungskräfte ergab, daß Affinitätsabbildungen durch die Wechselwirkung von wenigen Molekülpaaren möglich sind und mehrere tausend Kraftkurven ohne Detektionsverlust aufgezeichnet werden können. Der Vorteil der Technik gegenüber den Fluoreszenzmarkierungen liegt in der nicht Invasivität und darin, daß dynamische Prozesse auf Zelloberflächen detektiert werden könnten, da die Zelle nicht permanent markiert wird und auf ein und derselben Zelle unter physiologischen Bedingungen über große Zeiträume gemessen werden kann. Die lokale Auflösung von Molekülverteilungen auf einzelnen Zellen ist allerdings noch nicht gelungen. Mit der spezifischen Lokalisation von Zellen, nach der Affinitätsabbildung von strukturierten Modelloberflächen (70), ist jedoch ein wesentlicher Schritt in diese Richtung unternommen worden.

7. Ausblick

Ein breites Anwendungsspektrum des Kraftmikroskops zeigen die in dieser Arbeit vorgestellten Messungen an Einzelmolekülbindungen und Zellwechselwirkungen. Die Verwendung der experimentell ermittelten Daten für die Berechnung der relevanten Parameter der Bindungskinetik, die Potentialbreite und die Dissoziationsrate unter Kraftereinfluß, zeigt, daß neue Informationen und Erkenntnisse über biologische Bindungen gewonnen werden können. Weiterführende Experimente mit veränderten Liganden, seien es nur andere Seitengruppen oder auch Restriktionen der Konformationsfreiheit, geben sicher in Zukunft nähere Informationen über die Form der Bindungspotentiale. Die Modellierung von neuen Pharmazeutika kann mit diesen Informationen sicher auf eine bessere Basis gestellt werden.

Die prinzipiell mögliche Lokalisierung von Bindungspartnern auf Zellen erlaubt die Beobachtung von zeitlich dynamischen Prozessen, wie z.B. der Akkumulation von Rezeptoren in bestimmten Bereichen bei der Migration von Zellen. Ebenfalls möglich sollte die Detektion von Poren- oder Kanalumgebungen in der Zelloberfläche auf Grund der Häufung spezifischer Bindungspartner in deren Umgebung sein. Die Analyse der Abrißlängen kann Informationen über die Art der Kopplung des Rezeptors oder Liganden, zytoskeletal, transmembran oder nur in der Membran gebunden, mit der Zelle liefern.

Die Kombination der Zelladhäsionsexperimente mit Fluoreszenzmikroskopie wäre in der Zukunft eine Verbindung zweier analytischer Methoden zur dynamischen Bestimmung von Zellwechselwirkungen und induzierten Sekundärprozessen. Die aktive Steuerung von Zellen, mit Aktivierungsproteinen oder Zytostatika, bei der Wechselwirkung mit Modelloberflächen oder anderen Zellen, erlaubt weitergehende Analysen dynamischer Prozesse bei der Zelladhäsion.

Die Bedeutung dieser hier durchgeführten Grundlagenforschung, zum besseren Verständnis der einzelnen molekularen Systeme, ist in der damit möglichen physikalischen Beschreibung der Wechselwirkungen zu sehen. Mit physikalischen Größen ist weitergehend die physikalische Anwendung der Einzelmolekülsysteme auf der Nanometerskala denkbar und vor allen Dingen in ihren grundlegenden Eigenschaften fundiert. Damit eröffnet sich generell auch für die Physik ein faszinierendes Anwendungsgebiet basierend auf der Wechselwirkung einzelner Moleküle.

Anhang

A.1 Eichung und Federkonstante des Kraftsensors

Die Kraftkurven mit dem AFM werden über die Auslenkung des an dem Kraftsensor in eine Photodiode reflektierten Laserstrahls detektiert. Über einen Strom/Spannungswandler, angeschlossen an die Photodiode, sind die Meßwerte als Spannungen bekannt. Von Interesse sind aber die Kräfte, die der Auslenkung des Kraftsensors zu Grunde liegen. Die Federkonstante des Kraftsensors bestimmt die anliegende Kraft bei der jeweiligen Auslenkung. Wie in Abb. A.1.1 gezeigt ist, kann die Auslenkung des Kraftsensors direkt mit einer Kraftkurve auf einem harten Substrat gemessen werden. In dieses wird der Kraftsensor auf Grund der Härte nicht Probe eingedrückt und die Ausdehnung des Piezos, gemessen über den eingebauten Dehnmeßstreifen, entspricht der Federauslenkung. Diese Kraftkurve ergibt die Eichung des Kraftsensors in der Einheit Spannung/Auslenkung. Mit der Federkonstante des Kraftsensors und der Eichung lassen sich die detektierten Spannungssignale in Kräfte umrechnen.

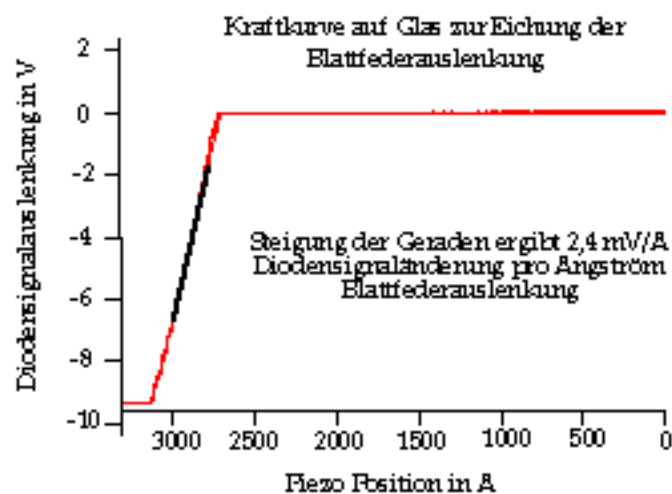


Abb. A.1.1: Eichung der Blattfederauslenkung. Die Auslenkung des Kraftsensors ist direkt korreliert zur Ausdehnung des Piezos, da bei Glas keine Eindrückung in das Substrat erfolgt.

Die Ermittlung der Federkonstante des Kraftsensors erfolgt mit der in (73-75) dargestellten Methode des thermischen Rauschens.

Nach dem Gleichverteilungssatz hat jeder Freiheitsgrad eines Systems die Energie $1/2 k_B T$. Die Freiheitsgrade der Abtastnadel sind durch die thermische Anregung induzierte Schwingungen der Spitze und Schwingungen höherer Ordnung der

Blattfeder. Die Auslenkung der Blattfeder, die durch die Ablenkung des Lichtzeigers detektiert wird, ist durch die höheren Schwingungsmodi nicht signifikant beeinflusst. Damit ist die Federkonstante des Kraftsensors direkt mit der zeitlichen Mittelung der Schwingungen der Spitze in folgender Weise verbunden:

$$\frac{k_c \langle x^2 \rangle}{2} = \frac{k_B T}{2} \quad \text{A.1.1}$$

mit der Federkonstante k_c , Boltzmannkonstante k_B , dem mittleren Auslenkungsquadrat $\langle x^2 \rangle$ der Blattfeder und der Temperatur T .

Um den Anteil an Geräteschwingungen vom thermischen Rauschen zu trennen, wird die Rauschanalyse im Frequenzraum durchgeführt. Die Fouriertransformierte ist dabei:

$$x(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} x(t) e^{-i\omega t} dt \quad \text{A.1.2}$$

Gemäß dem Parseval Theorem entspricht das Integral über das Betragsquadrat im Zeitraum demjenigen im Frequenzraum.

$$\int_{-\infty}^{\infty} x(t) x^*(t) dt = \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{x}(\omega) \tilde{x}^*(\omega) d\omega \quad \text{A.1.3}$$

Die Auslenkungen $x(t)$ sind dabei immer reell. Das mittlere Auslenkungsquadrat läßt sich, unter der Beachtung, daß die gemessenen Werte der spektralen Dichte pro Zeiteinheit Einzelwerte sind und für den Grenzübergang für $T \rightarrow \infty$ alle Integrale in eine Summen übergehen, folgendermaßen schreiben:

$$\langle x^2 \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{x}(\omega) \tilde{x}^*(\omega) d\omega \quad \text{A.1.4}$$

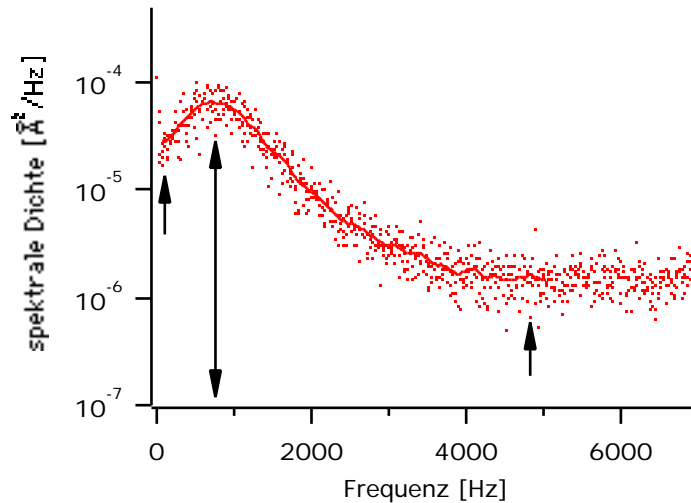


Abb. A.1.2: Logarithmisch dargestellte, aus 10 Einzelmessungen gemittelte, spektrale Dichte $1/T \cdot \langle \dot{x}^2 \rangle$, mit T gleich der Zeitdauer der Aufnahme, einer Abtastfeder unter Wasser. Die durchgezogene Linie ist die geglättete Kurve des Spektrums innerhalb des Integrationsbereichs. Die Resonanzfrequenz dieser Feder liegt bei 800 Hz, der Integrationsbereich ist durch die kleinen Pfeile begrenzt. Kleinere Frequenzen sind durch mechanische Geräteschwingungen, höhere durch Schwingungen höherer Ordnung bedingt und werden bei der Integration ausgeschlossen.

Der Hauptbeitrag zur spektralen Dichte stammt aus dem Resonanzbereich der Blattfeder. Durch das Integral über die aufgenommene spektrale Dichte kann der thermische Beitrag zum mittleren Auslenkungsquadrat $\langle x^2 \rangle$ bestimmt werden.

Die Federkonstante ergibt sich zu:

$$k_c = \frac{k_B T}{\langle x^2 \rangle} \quad \text{A.1.5}$$

Typische Federkonstanten der verwendeten Kraftsensoren lagen im Bereich von 7-15 mN/m. Der durch thermisches Rauschen verursachte Fehler für Kraftmessungen liegt im Bereich von 15%.

A.2 Funktionalisierung des Kraftsensors

In Abb. A.2.1 ist die schematische Darstellung der Funktionalisierung des Kraftsensors gezeigt:

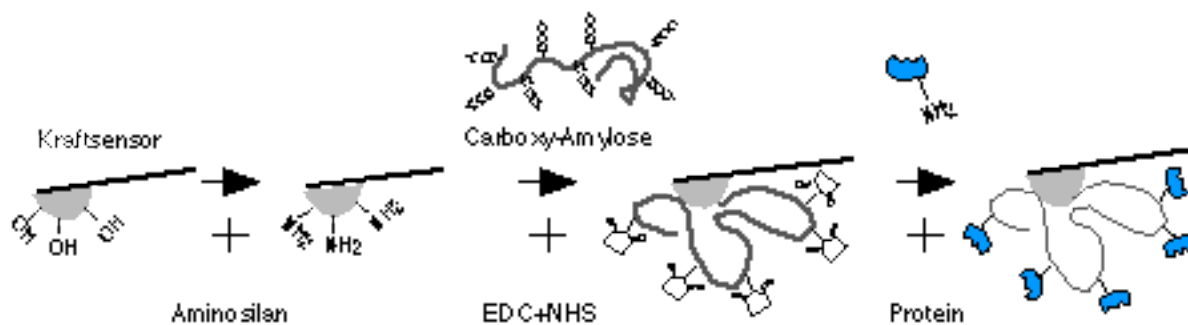


Abb. A.2.1: Funktionalisierung des Kraftsensors gemäß dem im Text angegebenen Protokoll.

Das Protokoll wurde von dem der Funktionalisierung der SPR-Sensorchips der Firma Biacore abgeleitet (76). Die Oberfläche der Abtastnadel aus Siliziumnitrit (Si_3N_4) besteht aus einer dünnen Siliziumoxid Schicht (Abb. A.2.1 OH-Gruppen). Im ersten Schritt der Funktionalisierung werden an die OH-Gruppen der Siliziumoxid Schicht kovalent Aminogruppen über die Silanisierung in Aminosilan (N'-[3-(Trimethoxysilyl)-propyl]-diethylentriamin, Aldrich, Steinheim) angebunden. Die kovalente Anbindung der Amylose (Carboxymethylamylose, Sigma, Deisenhofen), die pro Zuckermonomer eine Carboxygruppe (COO) aufweist, erfolgt über die Katalysatoren für die Bildung von Amidbindungen, NHS und EDC (N-hydroxysuccinimide (NHS), Aldrich; 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), Sigma). Über die, wie in Abb. A.2.1 schematisch gezeigt, noch freien Aktivester können Proteine mit einer freien Aminogruppe angebunden werden.

Protokoll:

1. Aminosilanisierung

Einlegen der Kraftsensoren für 10 min in 70°C Aminosilan (pur), anschließend schwenken in Ethanol, dann einlegen für 10 min in 70°C Millipore Reinstwasser (Millipore, Molsheim), herausnehmen und trocknen.

2. kovalente Anbindung der Amylose

Lösung aus 50 mg/ml Carboxymethylamylose, 10 mg/ml NHS, und 50 mg/ml EDC in PBS (Phosphatpuffer, pH 7.4, Tabletten von Sigma) für eine Minute mischen. Für 8 min die silanisierten Kraftsensoren einlegen und anschließend in PBS schwenken, um die nicht angebundene Amylose wegzuspülen. Über die Konzentrationen von EDC und NHS kann Einfluß auf die Länge der Polymerspacer genommen werden (weniger NHS bedeutet längere ungebundene Amylosesequenzen).

3. kovalente Anbindung der Proteine/Liganden

Die spezifisch Laktose bindenden Proteine (0.5 mg/ml) sind in einer 20 mM Laktose-Lösung in PBS (pH 7.4) gelöst worden. Die freie Laktose verhindert eine Anbindung des Proteins mit eventuellen Aminogruppen der Bindungstasche. Die in Schritt 2 mit Amylose und Aktivestern aktivierten Kraftsensoren werden für mindestens 1 Stunde in die Proteinlösung gelegt und anschließend ausführlich in PBS geschwenkt und in frischer PBS-Lösung aufbewahrt. Alle verwendeten Proteine (RCA, VAA, BHL, der Zucker IgG, HPA, Concanavilin A, WGA und weitere Lektine) konnten mit dieser Methode kovalent an den Kraftsensor gekoppelt werden. Ebenso sind die in Kapitel 4 verwendeten Liganden ASF und Laktose, diese als p-aminophenyl Laktose, an den Kraftsensor funktionalisiert worden.

Das für die Zelladhäsionsmessungen verwendete Fibronectin ist ebenfalls bei einer Konzentration von 0.5 mg/ml an die ebenso präparierten Glaskugeln, angeklebt an den Kraftsensor, kovalent angebunden worden.

A.3 Methode für die automatische Messung der Abrißkraft und der Ladungsrate am Abriß

Die Kraftkurven der Rezeptor-Ligand Messungen (Kapitel 4) und die der Affinitätsabbildungen sind automatisch analysiert worden. Dabei ist von jeder Kraftkurve die Ableitung gebildet, gezeigt in Abb. A.3.1rechts, und der erste signifikante Sprung dieser, vom Ende der Kraftkurve aus, gesucht worden (durch den Pfeil gekennzeichnet). Die Kraftkurven, gebildet aus der Aufzeichnung des Diodensignals gegen die vertikale Auslenkung des Piezos, bestehen jeweils aus 255 Punkten. Aus den 40 letzten Punkten der Ableitung der Kraftkurve, der Bereich ist durch die Box eingerahmt, wurde der Rauschpegel der Steigung ermittelt. Der maximale negative Wert wurde mit einem frei wählbaren Faktor multipliziert (meistens Faktor 4.5) und anschließend ist nach einer Steigung in der Ableitung mit mindestens diesem Wert gesucht worden (symbolisiert durch den Pfeil am Sprung der Ableitung). In der Kraftkurve selbst wurde dann der maximale und minimale Wert im Bereich des Sprungs der Ableitung ermittelt und als Abrißkraft aufgezeichnet. Der frei wählbare Faktor wurde an Hand der detektierten Abrißkräfte im Rauschen der Kraftkurve (bei 1.2 $\mu\text{m}/\text{sec}$ Zuggeschwindigkeit ca. 14 pN) eingestellt.

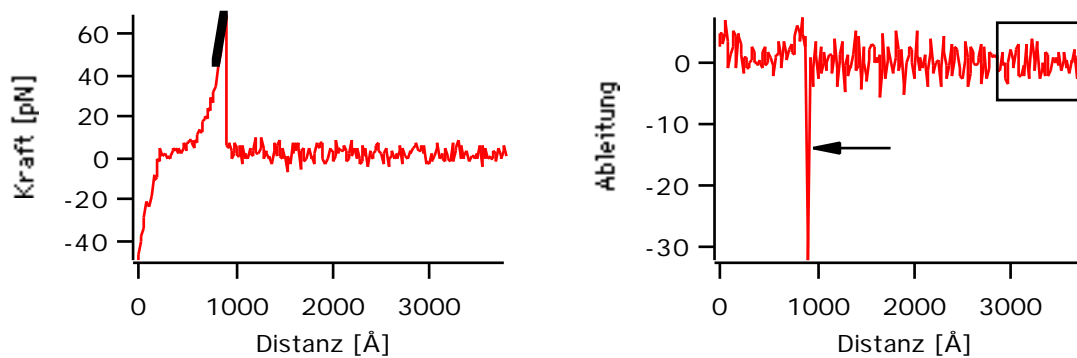


Abb. A.3.1: Detektion des letzten Abrisses. Rechts: Ableitung der Kraftkurve mit Pfeil für die Steigung am Abriß und eingezeichneter Box, in der der Rauschlevel detektiert wird. Links: Kraftkurve mit Bestimmung der Ladungsrate, symbolisiert durch die Steigung der Kurve am Peak.

Ausgehend vom Maximum der detektierten Abrißkraft ist die Kraftkurve nach links, für mindestens 3 und maximal 10 Datenpunkte, nach zunehmend kleineren Werten abgesucht worden. Von dem minimal gefundenen Wert ist eine Gerade zum Maximum gezogen (kurze Linie in Abb. A.3.1links) und deren Steigung ($F/(z \cdot \text{Ziehgeschwindigkeit})$) berechnet worden.

A.4 Mittelwerte der Abrißkräfte und Regressionsgerade zu den experimentellen Daten

Die Mittelwerte der Bindungskraft und Ladungsrate für eine Zuggeschwindigkeit bei einem Experiment sind nach dem in Kapitel 4.4.2 beschriebenen Protokoll ermittelt worden. In Abb. A.4.1 sind die, schon in der Abb. 4.6.2.1 gezeigten, Mittelwerte der VAA-Laktose Daten zur Veranschaulichung gezeigt. Für verschiedene Kraftsensoren ergibt sich eine Schwankung der Mittelwerte. Die Anzahl der Kraftkurven mit Abriß, aus der ein Mittelwert gebildet worden ist, ist in der Dicke des Datenpunkts dargestellt (bis 50 Werte dünn, kontinuierlich dicker werdend bis 300 Werte, ab dieser Zahl konstant dick). Die Standardabweichung eines Mittelwerts, ermittelt aus den 3-D Histogrammen (Kap. 4.4.2), ist durch die Fehlerbalken symbolisiert. Die Häufung der Datenpunkte bei bestimmten Bereichen der Ladungsrate ist durch die häufige Wahl der Zuggeschwindigkeit von 0,2-1,2-4,5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ bedingt. Die geringe Anzahl an Datenpunkten für kleine Ladungsraten hängt mit der langsamen Zuggeschwindigkeit, und dem damit verbundenen hohen Zeitbedarf für eine Messung (1 min pro Kraftkurve für $v=0,02 \mu\text{m}/\text{sec}$ im Gegensatz zu weniger als 1 sec für $v=1,2 \mu\text{m}/\text{sec}$), zusammen.

Die Mittelwerte der Abrißkraft sind mit einer linearen Regression und der zugehörigen Standardabweichung angefitet worden. Die Meßpunkte wurden dabei, gemäß der zugrunde liegenden Datenanzahl für die Mittelwert Bildung, gewichtet. Die Regressionsgerade und ihr Achsenabschnitt sind dabei durch folgende Gleichungen bestimmt:

Regressionsgerade:

$$y = b x + a$$

mit $x = \ln(\text{Rate})$; $y = \text{Kraft}$; $b = \text{Steigung}$; $a = \text{Achsenabschnitt}$

$$a = \bar{y} - b \bar{x} \quad (\text{A.4.1})$$

mit $\bar{y} = \text{Mittelwert aller Kräfte}$; $\bar{x} = \text{Mittelwert aller } \ln(\text{Rate}) \text{ Werte}$

Steigung der Regressionsgerade (n Gesamtanzahl):

$$b = \frac{n \sum x y - \left(\sum x \right) \left(\sum y \right)}{n \sum x^2 - \left(\sum x \right)^2} \quad (\text{A.4.2})$$

Steigungsfehler aus der Standardabweichung der Regressionsgerade:

$$b_{\text{Fehler}} = \sqrt{\frac{1}{n(n-2)} \left[n \sum y^2 - \left(\sum y \right)^2 - \frac{\left[n \sum x y - \left(\sum x \right) \left(\sum y \right) \right]^2}{n \sum x^2 - \left(\sum x \right)^2} \right]} \quad (\text{A.4.3})$$

Die Standardabweichung aus dem Steigungsfehler ist die Grundlage für die Bereichsabschätzung der Daten für die Potentialbreite und die kraftaktivierte Dissoziationsrate (siehe Tabelle 4.5.2.T.1). In die Näherungslösung (Kapitel 4, Gln. (4.3.5)) werden die Werte für die Steigung und dem Steigungsfehler folgendermaßen eingesetzt:

$$= \frac{k_B T}{b}; \quad = -\frac{k_B T}{b + b_{\text{Fehler}}} \quad (\text{A.4.4})$$

$$k^* \left(\bar{x}, \bar{y} \right) = e^{\bar{x}} \frac{1}{k_B T} \frac{1}{e^{\frac{\bar{y}}{k_B T}}}; \quad k^* \text{ aus } k^* \left(\pm \bar{x}, \bar{y} \right) \quad (\text{A.4.5})$$

In der Abb. A.4.1 ist die lineare Regression als Fit an die Mittelwerte der Messungen eingezeichnet. Mit den in die Näherungslösung (Gln. (4.3.5)) eingesetzten Werten, k^* , für die untere Bereichsabschätzung, und k^* , für die obere Bereichsabschätzung, wurden die Abweichungen von der linearen Regression abgeschätzt und eingezeichnet.

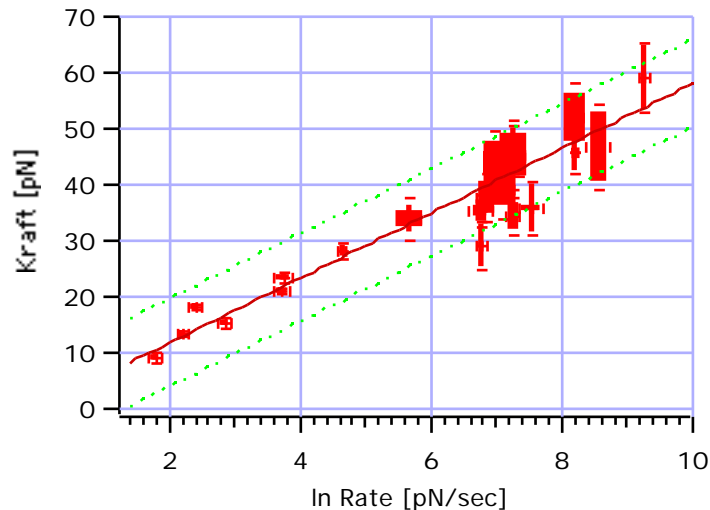


Abb. A.4.1: Mittelwerte der VAA-Laktose Abrißkräfte und der Ladungsraten. Die eingezeichnete Gerade ist die lineare Regression zu den Mittelwerten, die gestrichelt eingezeichneten sind die Standardabweichungen.

A.5 Präparation der Kraftsensoren und der Zellen für die Zelladhäsionsmessungen

Die Messungen der Zelladhäsion sind mit modifizierten Kraftsensoren durchgeführt worden. An die Spitze der Blattfeder sind Sephacryl (Sephacryl-S-1000, Pharmacia, Freiburg) oder Glaskugeln (G 4649, Sigma) mit einem Durchmesser von ca. 50 μm angeklebt worden (UHU plus endfest, 45 min bei 110°C ausgehärtet). An die, in 70% Ethanol für 2 h sterilisierten, Sephacryl Kugeln wurde unspezifisch Poly-D-Lysin (0,01% PBS-Lösung), als Beschichtung für die Zellkultur von JAR-Zellen, oder BSA (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS, A 8022, Sigma) adsorbiert (7). Die Glaskugeln sind, nach dem in A.2 beschriebenen Protokoll, mit Fibronectin funktionalisiert worden (Dettmann et al., 1999).

Alle Messungen mit Zellen (Kapitel 5) sind in Zellkulturmedium durchgeführt worden (RPMI 1640, Gibco-Life Technologie, Eggenstein).

Die verwendeten Zellen wurden gemäß dem in Thie et al. (7) publizierten Protokoll im Zelllabor kultiviert.

A.6 Präparation des Erythrozytenmonolayers

Jeweils ca. 50 μl Blut der Blutgruppe A und O wurden separat 3 mal mit PBS in einem Eppendorf Gefäß (1.5 ml) verdünnt und die Erythrozyten abzentrifugiert. Anschließend wurden die beiden Lösungen (jeweils 500 μl) vermischt und ein

Tropfen auf einen mit Polylysin beschichteten Objektträger (Sigma) aufgebracht. Vorsichtiges Spülen mit PBS nach 1 h entfernte nicht adsorbierte Erythrozyten und ergab einen Monolayer aus Erythrozyten, wie er in Abb. 6.2.1 abgebildet ist. Alternativ ist eine spezifische Anbindung, über, auf beiden Zelltypen vorhandenen, Glukosamin terminierte Lipide an WGA (Wheat Germ Agglutinin, Sigma), das nach dem in A.2 aufgeführten Protokoll auf einen Glas Objektträger funktionalisiert wurde, möglich.

Literaturverzeichnis

1. Florin, E.-L., Moy, V. T., and Gaub, H. E. (1994) *Science* **264**, 415-417.
2. Moy, V. T., Florin, E.-L., and Gaub, H. E. (1994) *Science* **266**, 257-259.
3. Rief, M., Oesterhelt, F., Heymann, B., and Gaub, H. E. (1997) *Science* **275**, 1295-1298.
4. Rief, M., Gautel, M., Oesterhelt, F., Fernandez, J. M., and Gaub, H. E. (1997) *Science* **276**, 1109-1112.
5. Merkel, R., Nassoy, P., Leung, A., Ritchie, K., and Evans, E. (1999) *Nature* **397**, 50-53.
6. Siebert, H.-C., von der Lieth, C.-W., and Gabius, H.-J. (1999) *Deutsche Apotheker Zeitung* **139**, 272-282.
7. Thie, M., Roespel, R., Dettmann, W., Benoit, M., Ludwig, M., Gaub, H. E., and Denker, H. W. (1998) *Human Reproduction* **13**, 3211-3219.
8. Yauch, R. L., Felsenfeld, D. P., Kraeft, S.-K., Chen, L. B., Sheetz, M. P., and Hemler, M. E. (1997) *Journal of Experimental Medicine* **186**, 1347-1355.
9. Binnig, G., Quate, C. F., and Gerber, C. (1986) *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930.
10. Grubmüller, H., Heymann, B., and Tavan, P. (1995) *Science* **271**, 997-999.
11. Izrailev, S., Stepaniants, S., Balsera, M., Oono, Y., and Schulten, K. (1997) *Biophysical J.* **72**, 1568-1581.
12. Dammer, U., Hegner, M., Anselmetti, D., Wagner, P., Dreier, M., Huber, W., and Güntherodt, H.-J. (1996) *Biophysical J.* **70**, 2437-2441.
13. Hinterdorfer, P., Baumgartner, W., Gruber, H. J., Schilcher, K., and Schindler, H. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3477-3481.
14. Ros, R., Schwesinger, F., Anselmetti, D., Kubon, M., Schäfer, R., Plueckthun, A., and Tiefenauer, L. (1998) *Biophysics* **95**, 7402-7405.
15. Evans, E., and Ritchie, K. (1997) *Biophysical J.* **72**, 1541-1555.
16. Fritz, J., Katopodis, A. G., Kolbinger, F., and Anselmetti, D. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12283-12288.
17. Krauspenhaar, R., Eschenburg, S., Perbandt, M., Kornilov, V., Konareva, N., Mikailova, I., Stoeva, S., Wacker, R., Maier, T., Singh, T., Mikhailov, A., Voelter, W., and Betzel, C. (1999) *Biochem Biophys Res Commun* **257**, 418-24.
18. Kopitz, J., von Reitzenstein, C., Burchert, M., Cantz, M., and Gabius, H. J. (1998) *J Biol Chem* **273**, 11205-11.
19. Sharma, S., Bharadwaj, S., Surolia, A., and Podder, S. K. (1998) *Biochem. J.* **333**, 539-542.
20. Shinohara, Y., Kim, F., Shimizu, M., Goto, M., Tosu, M., and Hasegawa, Y. (1994) *Eur. J. Biochem.* **223**, 189-194.

21. Okazaki, I., Hasegawa, Y., Shinohara, Y., Kamasaki, T., and Bhikhabhai, R. (1995) *J. Mol. Recognit.* **8**, 95-99.
22. Gabius, H.-J., and Gabius, S. (1997) *Glycosciences: Status and Perspectives*, Chapman & Hall GmbH, Weinheim.
23. Hänggi, P., Talkner, P., and Borkovec, M. (1990) *Rev. Mod. Phys.* **62**, 251-341.
24. Hänggi, P., Grabert, H., Ingold, G. L., and Weiss, U. (1985) *Phys. Rev. Lett.* **55**, 761.
25. Kramers, H. A. (1940) *Physica* **7**, 284.
26. Heymann, B., and Grubmüller, H. (1999) *Chem. Phys. Lett.* **303**, 1-9.
27. Smith, S. B., Cui, Y., and Bustamante, C. (1996) *Science* **271**, 795-798.
28. Rief, M. (1997) , pp. 85, LMU, München.
29. Marszalek, P. E., Oberhauser, A. F., Pang, Y. P., and Fernandez, J. M. (1998) *Nature* **396**, 661-664.
30. Rief, M., Fernandez, J. M., and Gaub, H. E. (1998) *Phys. Rev. Lett.* **81**, 4764-4767.
31. Liao, D. I., Kapadia, G., Ahmed, H., Vasta, G. R., and Herzberg, O. (1994) *PNAS* **91**, 1428-32.
32. von der Lieth, C.-W., Siebert, H.-C., Kozar, T., Burchert, M., Frank, M., Gilleron, M., Kaltner, H., Kayser, G., Tajkhorshid, E., Bovin, N. V., Vliegenthart, J. F. G., and Gabius, H.-J. (1998) *Acta Anat.* **161**, 91-109.
33. Gupta, D., and Brewer, C. F. (1994) *Biochemistry* **33**, 5526-5530.
34. Gupta, D., Kaltner, H., Dong, X., Gabius, H.-J., and Brewer, C. F. (1996) *Glycobiology* **6**, 843-849.
35. Gabius, H.-J., Wosgien, B., Hendry, M., and Bardosi, A. (1991) *Histochemistry* **95**, 269-277.
36. Löfås, S. (1995) *Pure & Appl. Chem.* **67**, 829-834.
37. Löfås, S., Johnsson, B., Edström, Å., Hansson, A., Lindquist, G., Müller Hillgren, R.-M., and Stigh, L. (1995) *Biosensors & Bioelectronics* **10**, 813-822.
38. Grandbois, M., Beyer, M., Rief, M., Clausen-Schaumann, H., and Gaub, H. E. (1999) *Science* **283**, 1727-1730.
39. Green, N. M. (1975) *Adv. Prot. Chem* **29**, 85-133.
40. Evans, E., Ritchie, K., and Merkel, R. (1995) *Biophys. J.* **68**, 2580-2587.
41. Choquet, D., Felsenfeld, D. P., and Sheetz, M. P. (1997) *Cell* **88**, 39-48.
42. Suter, C. M., Errante, L. E., Belotserkovsky, V., and Forscher, P. (1998) *The Journal of Cell Biology* **141**, 227-240.
43. John, N., Linke, M., and Denker, H.-W. (1993) *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **29 A**, 461-468.
44. Hoh, J. H., and Schoenenberger, C.-A. (1994) *J. Cell Sci.* **107**, 1105-1114.

45. Radmacher, M., Fritz, M., Kacher, C. M., Cleveland, J. P., and Hansma, P. K. (1996) *Biophysical Journal* **70**, 556-567.
46. Zahalak, G. I., McConnaughey, W. B., and Elson, E. L. (1990) *J. Biomech. Eng.* **112**, 283-294.
47. Goldmann, W. H., Galneder, R., Ludwig, M., Kromm, A., and Ezzell, R. (1998) *FEBS Letters* **424**, 139-142.
48. Ward, M. D., and Hammer, D. A. (1993) *Biophysical Journal* **64**, 936-959.
49. Ward, M. D., Dembo, M., and Hammer, D. A. (1994) *Biophysical Journal* **67**, 2522-2534.
50. Kuo, S. C., Hammer, D. A., and Lauffenburger, D. A. (1997) *Biophysical Journal* **73**, 517-531.
51. Thie, M., Herter, P., Pommerenke, H., Dürr, F., Sieckmann, F., Nebe, B., Rychly, J., and Denker, H.-W. (1997) *Molecular Human Reproduction* **3**, 275-283.
52. Felsenfeld, D. P., Choquet, D., and Sheetz, M. P. (1996) *Nature* **383**, 438-440.
53. Hochmuth, R. M., Wiles, H. C., Evans, E. A., and McCrown, J. T. (1982) *Biophysical Journal* **39**, 83-89.
54. Dai, J., and Sheetz, M. P. (1995) *Biophysical Journal* **68**, 988-996.
55. Hochmuth, R. M., Shao, J.-Y., Dai, J., and Sheetz, M. P. (1996) *Biophysical Journal* **70**, 358-369.
56. Krstic, R. V. (1991) *Human microscopic anatomy: an atlas for students of medicine and biology.*, Springer Verlag, Berlin/Heidelberg.
57. Thie, M., Fuchs, P., Butz, S., Sieckmann, F., Hoschützky, H., Kemler, R., and Denker, H.-W. (1996) *European Journal of Cell Biology* **70**, 221-232.
58. Drubin, D. G., and Nelson, W. J. (1996) *Cell* **84**, 335-44.
59. Rodriguez-Boulan, E., and Nelson, W. J. (1989) *Science* **245**, 718-725.
60. Psychoyos, A. (1995) *Nidation window: from basic to clinic*, Springer Verlag, New York.
61. Thie, M., Harrach-Ruprecht, B., Sauer, H., Fuchs, P., Albers, A., and Denker, H.-W. (1995) *European Journal of Cell Biology* **66**, 180-191.
62. Regen, C. M., and Horwitz, A. F. (1992) *The Journal of Cell Biology* **119**, 1347-1359.
63. Patillo, R. A., Ruckert, A., Hussa, R., Bernstein, R., and Delfs, E. (1971) *In Vitro* **6**, 398.
64. Scott, C. F. (1991) *J Biomater Sci Polym Ed* **2**, 173-81.
65. Kaltner, H., and Stierstorfer, B. (1998) *Acta Anat.* **161**, 162-179.
66. Evans, E., Berk, D., and Leung, A. (1991) *Biophys. J.* **59**, 838-848.
67. Evans, E. (Ed.) (1995) *Physical Actions in Biological Adhesion*.

-
68. Benoit, M., Gabriel, D., Gerisch, G., and Gaub, H. E. (1999) *Nat. Struc. Biol.* **submitted**.
 69. Domke, J., Rotsch, C., Hansma, P. K., Jacobson, K., and Radmacher, M. (1998) in *ACS Symposium Series - Scanning Probe Microscopy of Polymers* (Ratner, B. D., and Tsukruk, V. V., Eds.), American Chemical Society, Washington, DC.
 70. Ludwig, M., Dettmann, W., and Gaub, H. E. (1997) *Biophys. J.* **72**, 445-448.
 71. Bongrand, P., Claesson, P. M., and Curtis, A. S. G. e. (1994) *Studying cell adhesion*, Springer, Berlin.
 72. Weis, R. M., and McConnell, H. M. (1982) *Cell Function and Differentiation, Part A* , 331-336.
 73. Butt, H.-J., and Jaschke, M. (1995) *Nanotechnology* **6**, 1-7.
 74. Florin, E. L., Rief, M., Lehmann, H., Ludwig, M., Dornmair, C., Moy, V. T., and Gaub, H. E. (1995) *Biosensors Bioelectr.* **10**, 895 - 901.
 75. Hutter, J. L., and Bechhoefer, J. (1994) *Rev. Sci. Instrum.* **64**, 1868-1873.
 76. Johnsson, B., Löfas, S., and Lindquist, G. (1991) *Anal. Biochem* **198**, 268-277.

Danksagung

Vielen Dank erstmal an alle, damit ist auch jede/r des Lehrstuhls für Angewandte Physik gemeint, die zur guten, produktiven, menschlichen Atmosphäre an unserem Institut beigetragen haben. Ob das gemeinsame Kuchen schlemmen, die Eisfeiern von Abgaben und Neuanfängen, die Feiern eines frischen Dottores, die Gardasee Seminare oder die halb lebensmüden Schlittenfahrten mit den selbstgebastelten Wunderschlitten, es gibt auch soziale Events neben der Forschung die einfach eine gute Grundstimmung bringen.

Danke natürlich an die aufmerksamen Zuhörer von Vorträgen, die immer mal wieder Zelladhäsionen zum Inhalt hatten, ob vom Martin Benoit oder von mir, jedoch mit kritischen und konstruktiven Kommentaren verbessert worden sind.

Für die Rahmenbedingungen an unserem Institut, der freien Forschungsmöglichkeit und finanziellen Ausstattung, der Diskussionen, der Inspiration und Motivation danke ich meinem Doktorvater Hermann E. Gaub.

Riesendank gebührt Martin Benoit für die Zusammenarbeit während unserer Promotion. Sein Ideenreichtum, Elan, Geist, Sinn fürs Leben und Forschergeist sind weitgehend unvergleichlich und waren Ansporn und Basis einer auch manchmal konfusen Zusammenarbeit.

Für die gute Zusammenarbeit danke ich Michel Grandbois, der doch manchmal vor lauter Wald trotzdem noch Bäume sah, die Funktionalisierung unser Abtastnadeln etablierte und die Relevanz der Lektine erkannte. Gleich dabei der Dank an Daniela Gabriel, die uns überhaupt auf die Lektine brachte, leider hatte ihr csA bei mit kein Glück, doch bei Martin, da tut es endlich.

Unvergessen ist und bleibt Matthias Rief, der jederzeit meine Fragen beantwortete, durch kritisches Hinterfragen wesentliches klarstellte und mir das notwendige Wissen um die Kraftmikroskope beigebracht hat.

Vielen Dank natürlich noch an Angelika Wehle für die nette Zusammenarbeit und die Anregungen zu dieser Promotion.

Für gute Zusammenarbeit bei den Zellexperimenten noch vielen Dank an Michael Thie und René Röspel aus dem Norden mit den faszinierenden Einblicken in die Welt der Zellen.

Angelika Kardinal sei gedankt für Ihre Mühe mit den Antikörpern, den Zellkultur Arbeiten und für die nette Zusammenarbeit beim Biophysik Praktikum.

Nochmal Riesendank an alle aus unserem Institut, sei es für die Erklärung der Regressionsgerade, die Korrekturfassungen von Veröffentlichungen, Abstracts und Postern oder auch das Kuchenholen bei Hildegard.

Lebenslauf

Name: Wolfgang Dettmann

geboren am: 6. November 1968

in: Garmisch-Partenkirchen

Staatsangehörigkeit: deutsch

1975-79 Besuch der Grundschule Partenkirchen.

1979-85 & 87-90 Besuch des Werdenfels-Gymnasiums in Garmisch-P.

1985-87 Berufsausbildung zum Raumausstatter

1990-96 Studium der Technischen Physik an der Technischen Universität München.

WS 1993/94 Studium der Technischen Physik an der TU Wien

1996 Hauptdiplom.

seit Juli 1996 Promotion an der Ludwig Maximilians Universität München bei Prof. Dr. Hermann Gaub.