

Einzelmolekül-Kraftspektroskopie an Sulfatase/Glykosaminoglykan-Komplexen

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Sören Grannemann

Fakultät für Physik

Universität Bielefeld

Bielefeld, August 2019

Erklärung

Hiermit erkläre ich,

- dass mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät für Physik bekannt ist.
- dass ich meine Dissertation selbst angefertigt habe und keine Textabschnitte von Dritten oder eigener Prüfungsarbeiten ohne Kennzeichnung übernommen habe sowie alle von mir genutzten Hilfsmittel und Quellen in der Arbeit angegeben habe.
- dass Dritte weder mittelbar noch unmittelbar geldwerte Leistungen für Vermittlungstätigkeiten oder für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Zustandekommen oder dem Inhalt der Dissertation stehen.
- dass ich diese Dissertation oder wesentliche Teile davon nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe.

Ich habe weder diese, noch eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Porta Westfalica, den 21.08.2019

(Sören Grannemann)

Gutachter:

Prof. Dr. D. Anselmetti

Prof. Dr. T. Dierks

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Physikalische Grundlagen	3
2.1	Rasterkraftmikroskopie	3
2.1.1	Aufbau und Funktionsweise	4
2.2	Rezeptor-Ligand-Bindungen	7
2.2.1	Rezeptor-Ligand-Bindungen ohne externe Kräfte	9
2.2.2	Rezeptor-Ligand-Bindungen unter externen Kräften	11
2.3	Kraftspektroskopie	20
2.3.1	Force Clamp Spektroskopie	20
2.3.2	Bestimmung der Federkonstanten	22
3	Biologische Grundlagen	24
3.1	Glycosaminoglykane	24
3.2	Sulfatasen	26
4	Material und Methoden	30
4.1	Biologische Moleküle	30
4.2	Herstellung der Goldsubstrate	32
4.3	Präparation für Messungen mit Sulf2HD	32
4.4	Präparation für Messungen mit Sulf1	34
4.5	Force-Clamp-Messung	36
4.6	Auswertung der Force-Clamp-Daten	38
4.7	Liste der verwendeten Materialien	43
5	Ergebnisse und Diskussion	45
5.1	Sulf2HD: Ergebnisse und Diskussion	45
5.1.1	Sulf2HD und HS	45

5.1.2	Vergleich mit Sulf1HD	48
5.1.3	Sulf2HD und K5-NS	50
5.2	Sulf1: Ergebnisse und Diskussion	53
5.2.1	Sulf1 und HS	53
5.2.2	Sulf1 und K5-NS	61
5.2.3	Interpretation	64
5.2.4	Sulf1CA und HS	77
5.2.5	Sulf1CA und K5-NS	80
6	Zusammenfassung	83
	Literaturverzeichnis	86
	Publikationen	103

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Darstellung eines AFM mit Lichtzeigermethode.	5
2.2	Qualitative Darstellung des Lennard-Jones-Potentials.	7
2.3	Schematische Potentiallandschaft ohne äußere Kraft.	9
2.4	Potentiallandschaft einer <i>slip bond</i> mit äußerer Kraft.	12
2.5	P-Selectin/sPSGL-1 bzw. G1 und Sulf1HD/HS Ergebnisse.	13
2.6	Potential mit zwei Zuständen ohne Kraft.	15
2.7	Potential mit zwei Zuständen unter Krafteinwirkung.	16
2.8	Energielandschaft zur Erklärung von ideal bonds.	19
2.9	Ablauf eines Messzyklus bei FCS.	21
3.1	Disaccharid-Einheiten von HS und K5-NS.	25
3.2	Schematische Darstellung der Domänen der Sulfatasen Sulf1 und Sulf2.	27
3.3	Aminosäuresequenz der hydrophilen Domäne der Sulf1.	27
4.1	Screenshot des Auswertungsskriptes.	39
4.2	Bestimmung der mittleren Lebensdauer.	40
5.1	Beispielhafte Steigungen Sulf2HD/HS.	46
5.2	Lebensdauer-Kraft-Graph Sulf2HD/HS.	47
5.3	Beispielhafte Steigungen für Sulf2HD/K5-NS.	50
5.4	Lebensdauer-Kraft-Graph Sulf2HD/K5-NS.	51
5.5	Beispielhafte Steigungen Sulf1/HS.	54
5.6	Lebensdauer-Kraft-Graph Sulf1/HS.	55
5.7	Beispielhafte Steigungen Sulf1/K5-NS.	61
5.8	Lebensdauer-Kraft-Graph Sulf1/K5-NS.	62
5.9	Schematisches Modell zur Abschirmung der Wechselwirkung der hydrophilen Domäne mit dem Substrat.	66

5.10	Schematisches Modell unmittelbar vor Anbindung der hydrophilen Domäne an das Substrat	66
5.11	Schematisches Modell der Bindung des vollständigen Proteins an HS in Zustand S_1	68
5.12	Schematisches Modell der Bindung des vollständigen Proteins an HS in Zustand S_2	69
5.13	Schematisches Modell zum Übergang von S_1 in S_2 durch Kraft. . .	72
5.14	Schematisches Modell zum Übergang von S_1 in S_2 durch thermische Aktivierung.	72
5.15	Beispielhafte Steigungen Sulf1CA/HS.	77
5.16	Lebensdauer-Kraft-Graph Sulf1CA/HS.	78
5.17	Beispielhafte Steigungen Sulf1CA/K5-NS.	80
5.18	Lebensdauer-Kraft-Graph Sulf1CA/K5-NS.	81

1 Einleitung

In einer ganzen Reihe von biologischen Prozessen, wie Zelladhäsion, Katalyse und Signalweiterleitung, spielt molekulare Erkennung eine entscheidende Rolle. Molekulare Erkennung basiert auf hochgradig spezifischen und selektiven Bindungen, die durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zustande kommen. Diese Wechselwirkungen umfassen Wasserstoffbrücken, die Van-der-Waals-Kraft sowie elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen. Diese Bindungen sind hochkomplexe Vorgänge, die von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst werden. Zu diesen Faktoren zählen unter anderem Bindungsaffinitäten, allosterische Effekte, Spezifität und wirkende Kräfte.

Interessanterweise können unterschiedliche Phänomene auftreten, wenn solche Wechselwirkungen unter externen Kräften betrachtet werden:

In vielen Fällen führt das Anlegen einer solchen Kraft dazu, dass die Lebensdauer sinkt, je größer die Kraft wird [1–8]. Bindungen, die dieses Verhalten zeigen, sind als *slip bonds* bekannt und können mit der Ratentheorie nach Kramers-Bell-Evans beschrieben werden [9, 10]. Es gibt jedoch auch Systeme, deren Lebensdauer innerhalb eines Kraftintervalls bei einer Zunahme der Kraft ansteigt [11–15]. Die Möglichkeit, dass Bindungen, die sich so verhalten, existieren, wurde dabei bereits 1988 von Dembo et al. vorausgesagt [16]. Solche sogenannten *catch bonds* wurden 2003 das erste Mal experimentell von Marshall et. al bei dem Bindungspaar L-Selectin:PSGL-1 nachgewiesen [11].

Dieses unerwartete Verhalten ist hauptsächlich bei Systemen verbreitet, die physiologisch einer Kraft ausgesetzt sind. Bekannte Systeme, die dieses Verhalten zeigen, sind unter anderem das bereits erwähnte L-Selectin:PSGL-1-Paar bei Leukozyten sowie die Bindung von FimH und Mannose bei *Escherichia coli* [12]. Ebenso wurde es bereits für Cadherine [17] sowie für das Motorprotein Myosin nachgewiesen [13].

Ein Wechselwirkungspaar, bei dem in jüngerer Vergangenheit ebenfalls *catch-bond*-Verhalten beobachtet wurde [18], ist die hydrophile Domäne der Sulf1 und

ihr physiologisches Substrat, Heparansulfat. Die Aufgabe dieser extrazellulären Sulfatase und ihrer Isoform Sulf2 umfasst die 6-O-Desulfatierung der Heparansulfate, wodurch diese Sulfatasen über das Sulfatierungsmuster der Heparansulfate Einfluss auf viele biologische Prozesse haben, darunter die embryonale Entwicklung [19], die Reparatur von Gewebe [20] sowie die Tumorentstehung [21, 22].

Trotz der großen Relevanz ist es bis dato nicht gelungen, eine vollständige Struktur der Sulfatasen zu bestimmen. Auch über die molekularen Mechanismen der Wechselwirkung gibt es bisher nur Vermutungen [23], bei denen das Vorhandensein von *catch bonds* aber eine große Rolle spielen könnte.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, weitere Experimente zum Bindungsverhalten der Sulfs an ihre physiologischen Substrate durchzuführen. Insbesondere galt es zu überprüfen, ob auch die hydrophile Domäne der Sulf2 mit Heparansulfat *catch bonds* ausbildet und falls ja, welche Implikationen sich aus den gewonnenen Parametern ergeben könnten.

Kernstück der Experimente war allerdings, das vollständige Protein Sulf1 auf Einzelmolekülniveau mittels *Force-Clamp*-Spektroskopie zu untersuchen. Die Beantwortung der Frage, inwiefern sich das Bindungsverhalten des gesamten Proteins von dem der hydrophilen Domäne unterscheidet, erlaubt möglicherweise Einsichten in die Rolle der katalytischen Domäne während der Bindung und in den Ablauf des katalytischen Prozesses.

Die Funktionsweise der Sulfs, ebenso wie die Mechanismen der *catch bonds*, sind Forschungsfelder, die viel Potential sowohl für sehr grundlegende Erkenntnisse als auch für praxisnähere Anwendungen bieten. Der Weg zu einem umfassenden Verständnis dieser Systeme erscheint aus der heutigen Sicht noch lang. Diese Arbeit ist ein Versuch, einen Schritt voran zu kommen.

2 Physikalische Grundlagen

In diesem Kapitel sollen die notwendigen Grundlagen für das Verständnis der verwendeten Methoden und der Ergebnisse vorgestellt werden. Dazu gehören Aufbau und Funktionsweise eines Rasterkraftmikroskops (engl. *Atomic force microscope*, *AFM*), die in Kapitel 2.1 aufgezeigt werden, die Thermodynamik und Kinetik der Bindungsreaktion von Rezeptor-Ligand-Paaren, deren Darstellung in Kapitel 2.2 zu finden ist, und die Möglichkeiten zur Untersuchung der wirkenden Wechselwirkungen mittels Kraftspektroskopie mit dem *AFM*, die in Kapitel 2.3 diskutiert werden.

2.1 Rasterkraftmikroskopie

Das Rasterkraftmikroskop wurde 1986 von Binnig et al. vorgestellt [24] und gehört zur Gruppe der Rastersondenmikroskope. Rastersondenmikroskope verwenden eine Sonde, mit der die Probe untersucht wird. Beispielsweise kann die Auslenkung der Sonde detektiert werden (*AFM*) oder ein Tunnelstrom zwischen Sonde und Oberfläche gemessen werden (engl. *Scanning Tunneling Microscope*, Rastertunnelmikroskop, *STM*).

Im Falle eines *AFM*, das für diese Arbeit wesentlich ist, ist diese Sonde eine kleine Spitze, die an einem Federarm (engl. *cantilever*) sitzt.

Das *AFM* kann für eine ganze Reihe von Anwendungen genutzt werden: In der Nanolithographie kann es zum Strukturieren von Oberflächen verwendet werden [25, 26], ebenso können magnetische Eigenschaften der Probe mit dem *magnetic force microscope (MFM)* untersucht [27, 28] oder Informationen über die Topographie einer Oberfläche durch die Auslenkung des *cantilevers* [29] gesammelt werden.

Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Bestimmung von Kräften zwischen Molekülen [4, 6, 30]. Letztere Verwendung wird in Kapitel 2.3 dargestellt.

Die Weiterentwicklung sowohl des AFM selbst als auch der Methodik ist auch heute noch Gegenstand aktueller Forschung. So gibt es AFMs, die besonders kleine *cantilever* mit hoher Resonanzfrequenz verwenden und so in sehr kurzer Zeit Abbildungen erstellen können [31], bei anderen dringt die Auflösung unter Umgebungsbedingungen und in Flüssigkeiten in den atomaren Bereich vor [32, 33]. Allen Anwendungsformen sind jedoch einige grundlegende Prinzipien gemein, die im Folgenden kurz dargestellt werden sollen.

2.1.1 Aufbau und Funktionsweise

Das AFM kann, wie schon erwähnt, für verschiedene Messungen genutzt werden; es gibt daher eine Vielzahl unterschiedlicher Betriebsmodi. Von diesen wurde für die Experimente dieser Arbeit jedoch nur ein kleiner Teil verwendet.

Für den Teil der möglichen Verwendungen eines AFM, der hier besprochen werden soll, macht man sich zu Nutzen, dass der *cantilever* eine Auslenkung erfährt, sobald Kräfte auf ihn wirken. Detektiert man diese Auslenkung, können Rückschlüsse auf die wirkenden Kräfte gezogen werden.

Dies kann mit einem Aufbau, wie er in Abb. 2.1 schematisch gezeigt wird, realisiert werden. In dieser Abbildung erfolgt die Detektion der Auslenkung durch einen am *cantilever* reflektierten Laserstrahl, der auf eine Vier-Quadranten-Photodiode fällt.

Diese Methode ist als Lichtzeigermethode bekannt [34] und ist die kommerziell am weitesten verbreitete Option zur Detektion der wirkenden Kräfte. Es gibt jedoch noch verschiedene andere Möglichkeiten, die Auslenkung zu messen: Es gibt Geräte, die Kapazitätsänderungen als Maß für die Kräfte verwenden [35] oder sog. *self sensing cantilevers* verwenden [36]. Ebenso ist es möglich, die Spitze eines Rastertunnelmikroskops zu verwenden und über den Tunnelstrom die Auslenkung zu messen. Diese Methodik wurde für das erste *AFM*, das vorgestellt wurde, verwendet [24].

Das Signal, zum Beispiel die Spannung an der Diode im Fall der Lichtzeigermethode, kann dann über eine Regelungseinheit weiter verarbeitet werden und entweder als Feedback in den Regelkreis gespeist werden, wie es bei Abbildun-

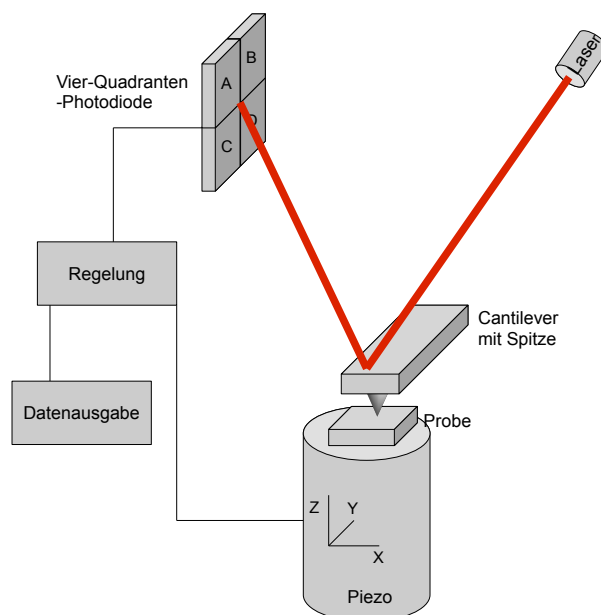


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung eines AFM mit Lichtzeigermethode.

gen im *constant-force*-Modus oder der Kraftspektroskopie der Fall ist, oder direkt als Maß für die wirkende Kraft verwendet werden (*constant-height*-Modus).

Für abbildende Anwendungen wird der *cantilever* in einem definierten Raster über die zu untersuchende Oberfläche geführt und an den Punkten dieses Rasters die Wechselwirkung mit dem *cantilever* bestimmt. Diese kann, je nach verwendetem Betriebsmodus, eine Auslenkung, aber auch eine Änderung der Amplitude, Frequenz oder Phase bewirken (*non-contact* und *Tapping*TM-Modus). Durch die Verbindung von Position und Wechselwirkung können so Abbildungen erstellt werden. Die Wechselwirkung kommt hier zustande, da in der Nähe der Oberfläche verschiedene Kräfte auf die Spitze wirken [29, 37].

Die wirkenden Kräfte in der Nähe der Probenoberfläche sind durch verschiedene Ursachen bedingt [29, 37]:

- Die Pauli-Abstoßung gehört zu den kurzreichweitigen Kräften und tritt auf, da die elektronischen Wellenfunktionen von Probe und Sonde überlappen, sobald ein Abstand von etwa 1 nm unterschritten wird. Die Abstoßung kommt zustande, da Teilchen, die in allen Quantenzahlen übereinstimmen, nach dem Pauli Prinzip nicht am selben Ort sein dürfen.
- Die Van-der-Waals-Kraft, zusammengesetzt aus Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und London'scher Dispersionswechselwirkung, ist im Regelfall attraktiv, kann jedoch in einigen Medien auch repulsiv sein. Es handelt sich um eine langreichweitige Kraft. Sie wird von der Dispersionswechselwirkung dominiert, sofern es sich nicht um sehr stark polare Moleküle handelt.
- Die Coulomb-Kraft ist ebenfalls langreichweitig und tritt zwischen geladenen Körpern auf. Sie kann über

$$F_C = \frac{1}{4\pi\epsilon\epsilon_0} \cdot \frac{Q_1 Q_2}{r^2}$$

beschrieben werden. Hierbei ist ϵ_0 bzw. ϵ die Dielektrizitätskonstante des Vakuums bzw. des Mediums, r der Abstand der beiden Körper und Q_1 bzw. Q_2 sind die Ladungen der beiden Körper.

- Die Kapillarkraft tritt bei Messungen an Luft auf und ist nicht konservativ. Sie kommt durch einen Kondensatfilm zustande, der sich an Luft an den Oberflächen bildet und zusätzliche Adhäsionskräfte verursacht.
- Zusätzlich kann bei Messungen unter Flüssigkeit Dämpfung auftreten, die beispielsweise zu einer Verschiebung der Resonanzfrequenz des *cantilevers* führen kann.

Die Pauli-Abstoßung und die Van-der-Waals-Kraft können zusammenfassend mit dem empirischen Lennard-Jones-Potential beschrieben werden, dass in Abbildung 2.2 qualitativ dargestellt ist. Es kann über den Zusammenhang

$$V(r) = \epsilon \left(\frac{r_m^{12}}{r^{12}} - 2 \cdot \frac{r_m^6}{r^6} \right) \quad (2.1)$$

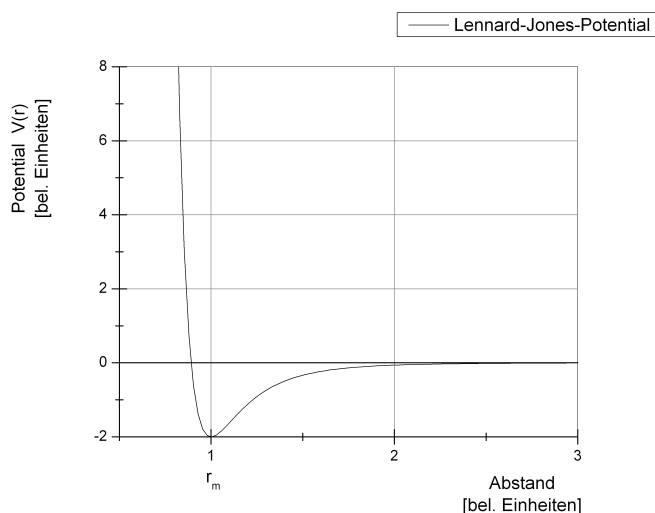


Abbildung 2.2: Qualitative Darstellung des Lennard-Jones-Potentials.

beschrieben werden. Hierbei ist ϵ ein Maß für die Größe des Potentialminimums und r_m ist der Abstand des Potentialminimums vom Ursprung.

Bei der Kraftspektroskopie wird im Kontrast zu den abbildenden Verfahren eine Bindung untersucht. Einer der Bindungspartner wird an einer Oberfläche angebunden, der andere am *cantilever*. Entfernt man nun den *cantilever* von der Oberfläche, löst sich die Bindung. Die Auslenkung des *cantilevers* im Moment des Lösens erlaubt dann Aussagen zur Kraft, die auf die Bindung gewirkt hat. Eine genauere Betrachtung hierzu findet sich in 2.3.

2.2 Rezeptor-Ligand-Bindungen

Molekulare Erkennung zwischen Rezeptoren und ihren (physiologischen) Liganden ist hochgradig spezifisch und wird als Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung bezeichnet. Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen spielen in vielen Bereichen eine große Rolle, so basiert beispielsweise das menschliche Immunsystem in vielen Teilen auf genau diesen Wechselwirkungen.

Diese Wechselwirkung ist in der Regel reversibel und wird über nicht-kovalente Wechselwirkungen, wie beispielsweise Ionenbindungen, Van-der-Waals-Kräfte,

Wasserstoffbrücken und hydrophobe Effekte vermittelt. Die Thermodynamik und Kinetik der Bindung eines solchen Paares wird in Kapitel 2.2 diskutiert.

Die Bindung zwischen den in dieser Arbeit verwendeten Enzymen basiert auf diesen Wechselwirkungen. Die Bindung zwischen Sulfatasen, die in Kapitel 3.2 näher beschrieben werden, und dem zugehörigen Substrat Heparansulfat, das in Kapitel 3.1 in Grundzügen vorgestellt wird, hat Einfluss auf Zellwachstum und -teilung.

Diese Wechselwirkungen sind jedoch – insbesondere für das Rezeptor-Ligand-Paar Sulfatase/Heparansulfat – noch nicht vollständig verstanden. Die bereits erwähnte AFM-gestützte Kraftspektroskopie bietet hier die Möglichkeit, Dissoziationskräfte oder Lebensdauern zu bestimmen und daraus auf thermodynamische Ratenkonstanten zu schließen.

Hierfür werden die zwei Bindungspartner am *cantilever* bzw. der Probenoberfläche immobilisiert. Durch die Annäherung des *cantilevers* an die Oberfläche kann es dann zu einer Bindung kommen, die durch das Zurückziehen des Federbalkens von der Oberfläche wieder dissoziiert.

Hierbei gibt es zwei Möglichkeiten, das Verhalten der Bindung zu untersuchen: Zum einen kann der *cantilever* mit einer konstanten Geschwindigkeit zurückgezogen werden. Dies wird als Dynamische Kraftspektroskopie (DFS) bezeichnet und ist eine weit verbreitete Technik [8, 38–40]. Für die direkte Untersuchung der Lebensdauern molekularer Komplexe, die Ziel dieser Arbeit war, bietet sich jedoch die im Folgenden beschriebene Methode der *Force-Clamp*-Spektroskopie (FCS) an. Daher soll die dynamische Kraftspektroskopie hier nicht weiter diskutiert werden.

Bei der FCS wird eine definierte, konstante Kraft auf den zu untersuchenden Komplex ausgeübt, in dem der *cantilever* eine bestimmte Distanz zurückgezogen und dort angehalten wird. Nun wartet man, bis die Bindung dissoziiert. Diese experimentelle Methode wird in Kapitel 2.3.1 beschrieben.

Beiden Varianten der Kraftspektroskopie ist gemein, dass es bei der experimentellen Umsetzung dazu kommen kann, dass auch Kräfte Einfluss auf die Messung haben, die nicht untersucht werden sollten. Hierzu zählen beispielsweise Wechselwirkungen zwischen einem Bindungspartner und der Oberfläche sowie Mehr-

fachbindungen. Dies erfordert eine angepasste Präparation und eine genaue Auswertung, um den Einfluss dieser Faktoren zu minimieren.

2.2.1 Rezeptor-Ligand-Bindungen ohne externe Kräfte

Die Wechselwirkung eines Rezeptors und eines Liganden lässt sich durch die Rantentheorie [41] beschreiben. Eine schematische Darstellung einer zugehörigen Potentiallandschaft samt der relevanten Raten findet sich in Abbildung 2.3.

Für den Zusammenhang zwischen der Konzentration des Rezeptors [R] und der Konzentration des Liganden [L] mit der Konzentration des Rezeptor-Ligand-Paares [LR] im thermodynamischen Gleichgewicht gilt:

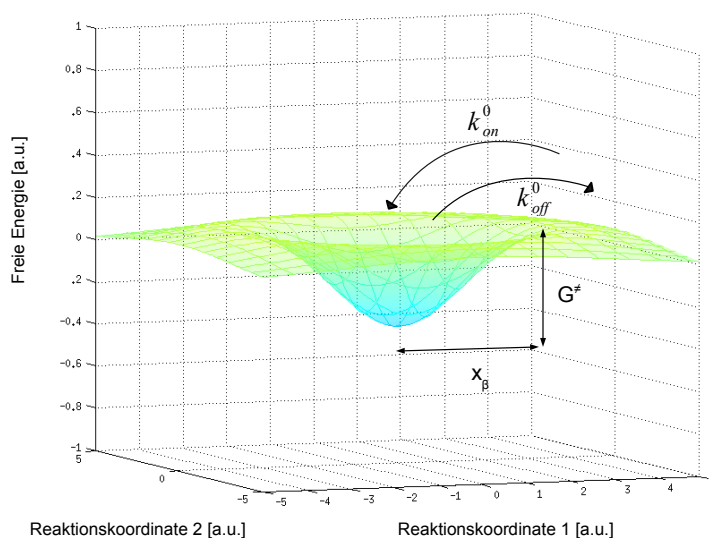
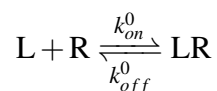


Abbildung 2.3: Schematische Potentiallandschaft einer Rezeptor-Ligand-Bindung ohne Einwirkung einer äußeren Kraft. Für eine Dissoziation aus dem gebundenen Zustand (blau) in den ungebundenen Zustand muss eine Energiebarriere G^\ddagger überwunden werden.

k_{on}^0 ist hierbei die sog. Assoziationsratenkonstante im thermodynamischen Gleichgewicht, während k_{off}^0 die Dissoziationsratenkonstante im thermodynamischen

Gleichgewicht bezeichnet. Die inverse Dissoziationsrate entspricht gerade der Lebensdauer des Komplexes τ und ist einer der Parameter, der in dieser Arbeit untersucht wurde.

Im thermodynamischen Gleichgewicht ist das Verhältnis von Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante konstant und wird als Gleichgewichtskonstante der Dissoziation K_D bezeichnet:

$$K_D = \frac{k_{off}^0}{k_{on}^0} \quad (2.2)$$

K_D ist ein Maß für die Affinität einer Bindung.

Eine Größe, um chemische Reaktionen thermodynamisch zu charakterisieren, ist die Freie Reaktionsenthalpie ΔG . Sie lässt sich schreiben als

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (2.3)$$

mit der Reaktionsenthalpie H , der Temperatur T und der Entropieänderung ΔS . Dieser Zusammenhang gilt für konstante Temperatur und konstanten Druck.

Die Freie Standardreaktionsenthalpie ΔG^0 hängt mit der Freien Reaktionsenthalpie zusammen über:

$$\Delta G = \Delta G_0 - RT \cdot \ln K_D \quad (2.4)$$

Hier ist R die ideale Gaskonstante.

Im thermodynamischen Gleichgewicht gilt $\Delta G = 0$, so dass folgt:

$$\Delta G^0 = RT \ln K_D \quad (2.5)$$

Für $\Delta G^0 < 0$ läuft die Assoziation des Rezeptor-Ligand-Paares spontan ab. Die für die Dissoziation des Komplexes notwendige Energie stammt im Gleichgewicht aus thermischen Fluktuationen. Diese Dissoziation kann somit als thermische Überwindung einer Potentialbarriere aufgefasst werden [42]. Für die Off-

Rate, also die Dissoziationsgeschwindigkeit, gilt dann [9]:

$$k_{off}^0 = C \cdot \exp^{-\beta \Delta G^\ddagger} \quad (2.6)$$

Hierbei ist $\beta = \frac{1}{k_B T}$, ΔG^\ddagger die Höhe der Potentialbarriere und C ist die Frequenz mit der das System Anläufe unternimmt, die Potentialbarriere zu überwinden.

Dieser Zusammenhang gilt nur für Systeme, die ohne externe Kraft betrachtet werden. Eine Diskussion über den Einfluss einer solchen Kraft findet sich im folgenden Abschnitt.

2.2.2 Rezeptor-Ligand-Bindungen unter externen Kräften

Die bisher dargestellte Beschreibung der Wechselwirkung eines Rezeptor-Ligand-Paares ist geeignet, das Verhalten eines solchen Systems ohne Einfluss einer äußeren Kraft zu beschreiben.

Mit angelegter externer Kraft verändert sich dieses Verhalten. Dabei können drei grundlegend verschiedene Änderungen auftreten:

- Mit steigender externer Kraft sinkt die Lebensdauer τ bzw. die Off-Rate $k_{off}(f)$ steigt. Bindungen, die dieses Verhalten zeigen, werden als *slip bonds* bezeichnet.
- Mit steigender externer Kraft nimmt – innerhalb eines bestimmten Kraftintervalls – die Lebensdauer τ zu bzw. die Off-Rate $k_{off}(f)$ ab. Bindungen mit diesem Verhalten sind als *catch bonds* bekannt.
- Die Lebensdauer der Bindung ist unabhängig von der angelegten externen Kraft. Für Bindungen, die sich so verhalten, wird die Bezeichnung *ideal bonds* verwendet.

Diese drei Zusammenhänge zwischen Kraft und Lebensdauer sollen im Folgenden dargestellt werden.

Slip bonds

Bindungen, die *slip-bond*-Verhalten zeigen, also eine Abnahme der Lebensdauer bei steigender, an den Komplex angelegter externer Kraft f , stellen die überwiegende Mehrheit der bis dato untersuchten Bindungen dar [1–8].

Die vereinfachte Repräsentation der Potentiallandschaft einer slip bond lässt sich schematisch wie in Abb. 2.4 gezeigt darstellen.

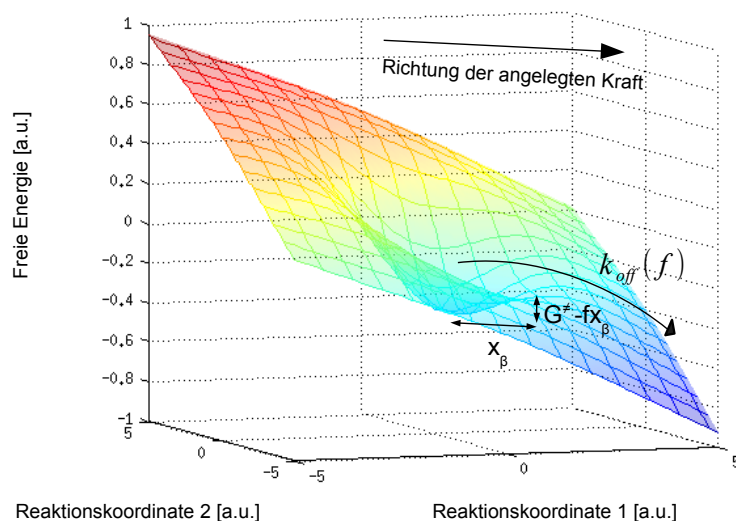


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Potentiallandschaft einer Bindung mit slip-bond-Charakter unter Einfluss einer äußeren Kraft. Das Potential setzt sich aus einer Superposition des Potentials der Bindung ohne Kraft sowie des harmonischen Potentials des cantilevers zusammen. Es kommt zu einer Absenkung der Energiebarriere ΔG^\ddagger , die zur Dissoziation überwunden werden muss, und somit zu einem Anstieg der Dissoziationsrate.

Die angelegte Kraft nimmt Einfluss auf die Höhe der Potentialbarriere ΔG^\ddagger , da das Potential „gekippt“ wird. Hieraus resultiert eine Absenkung dieser Barriere, die zu einer Zunahme der Off-Rate führt [43]:

$$k_{off}(f) = C \cdot e^{-\beta(\Delta G^\ddagger - f x_\beta)} \quad (2.7)$$

Dieser Zusammenhang zwischen externer Kraft und Off-Rate lässt sich mit Gleichung 2.6 auch ausdrücken als

$$k_{off}(f) = k_{off}^0 \cdot e^{\beta f x_{\beta}} \quad (2.8)$$

mit f als auf die Bindung wirkende Kraft, $\beta = \frac{1}{k_B T}$, und x_{β} als dem Abstand zwischen dem Maximum der Potentialbarriere und dem Minimum.

Wie aus Gleichung 2.8 ersichtlich ist, führt eine Zunahme der Kraft f zu einer exponentiellen Zunahme der Off-Rate $k_{off}(f)$ und damit zu einer niedrigeren Lebensdauer.

Catch bonds

Eine Zunahme der Lebensdauer bei steigender Kraft innerhalb eines bestimmten Kraftintervalls, also *catch-bond*-Verhalten, lässt sich mit diesem Ansatz jedoch nicht erklären. Dieses Verhalten wurde bisher nur in wenigen Systemen nachgewiesen [11–15, 18, 44]. Die Kraftabhängigkeit der Lebensdauer zweier ausgewählter *catch-bond*-Systeme ist in Abb. 2.5 abgebildet.

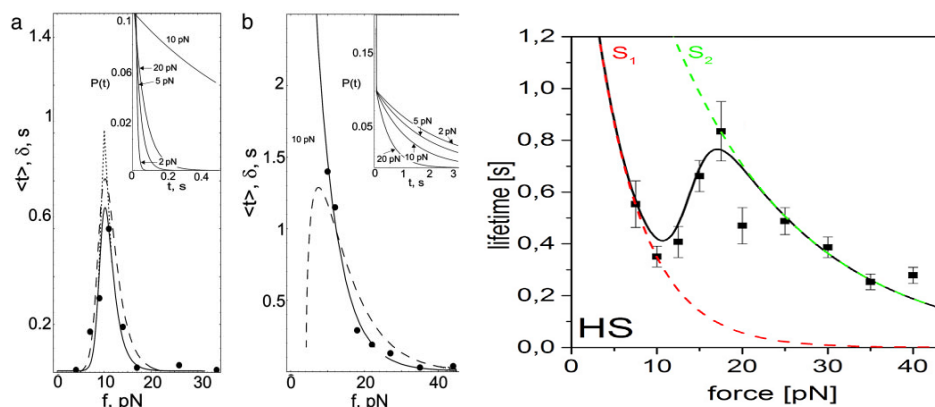


Abbildung 2.5: Links: *catch-bond*-Verhalten beim Komplex P-Selectin/sPSGL-1 bzw. G1 [44]. Rechts: Ergebnisse kraftspektroskopischer Messungen an der hydrophilen Domäne der humanen Sulfatase 1 und ihrem Substrat Heparansulfat [18]. In beiden Fällen ist die charakteristische Zunahme der Lebensdauer innerhalb eines bestimmten Kraftintervalls zu erkennen.

Für die Erklärung dieses Phänomens wurden eine ganze Reihe von Konzepten entwickelt [45]. Von den phänomenologischen Modellen wurden sowohl für das *one state two pathway model* [46] als auch für das *two state two pathway model* [44] Übereinstimmungen mit experimentellen Daten gefunden.

Ersteres Modell geht, wie der Name schon zeigt, davon aus, dass die betrachtete Wechselwirkung bzw. Bindung mit einem einzelnen gebundenen Zustand beschrieben werden kann. Dieses Minimum in der Potentiallandschaft kann über zwei Pfade – und damit zwei unterschiedlich hohe Energiebarrieren – verlassen werden [47].

Einer dieser Pfade wird dabei einem *slip-bond*-Übergang zugeordnet, der andere entspricht einer *catch-bond*-Dissoziation.

Dieses Modell ist jedoch nicht geeignet, das hier untersuchte System Sulfatase/Glycosaminoglykan zu beschreiben, da es für verschwindende externe Kräfte eine Lebensdauer nahe Null vorhersagt, die sich experimentell für dieses System nicht bestätigen lässt [18]. Daher soll es hier nicht näher betrachtet werden.

Das *two state two path model* basiert auf einer Potentiallandschaft, die zwei gebundene Zustände enthält. Eine vereinfachte Darstellung einer solchen Landschaft findet sich in Abbildung 2.6.

Für die Herleitung eines *catch-bond*-Modells mit diesem Potentialverlauf samt zugehöriger Lebensdauern bzw. Dissoziationsraten gibt es verschiedene Ansätze:

- Für die Beschreibung eines Systems mit zwei gebundenen Zuständen können vier Raten verwendet werden, die auch in Abbildung 2.6 dargestellt sind: je Zustand eine Rate für die direkte Dissoziation aus dem Zustand, k_1 bzw. k_2 , sowie je eine Rate für den Wechsel von Zustand S_1 in Zustand S_2 und umgekehrt (k_{12} bzw. k_{21}). Aus der Betrachtung der insgesamt vier Übergangs- und Dissoziationsraten folgen Differentialgleichungen für die Besetzung der beiden Zustände. Diese können mit Annahmen zu den Ausgangsbedingungen gelöst werden. Durch die auf den Komplex wirkende

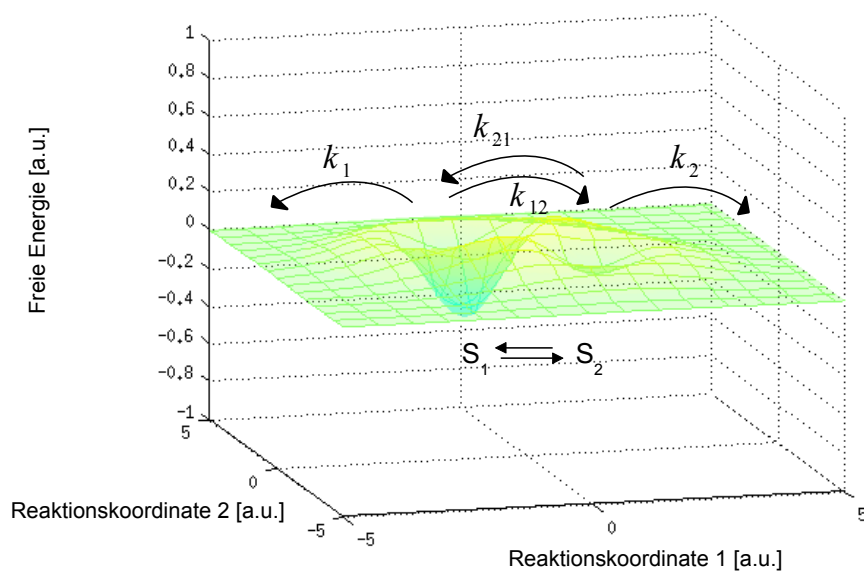


Abbildung 2.6: Vereinfachte Darstellung eines Potentialverlaufs mit zwei (meta-)stabilen Zuständen S_1 und S_2 ohne Einwirkung äußerer Kräfte.

Kraft kommt es zu einer Änderung der Raten und dadurch zu einer Verschiebung der Besetzung der beiden Zustände und des bevorzugten Dissoziationsweges. Eine genaue Diskussion inklusive mathematischer Ableitung der Dissoziationsraten findet sich in [44, 48, 49]. Da dieser Ansatz für die Analyse und Interpretation der experimentellen Daten in dieser Arbeit nicht verwendet wird, soll er hier nicht näher diskutiert werden.

- Beim thermodynamischen Ansatz werden die relevanten Zeitskalen betrachtet. Die Relaxation eines Proteins läuft auf Zeitskalen von Mikro- bis Millisekunden ab [50–52], ein Kraftspektroskopie-Experiment dauert jedoch einige Sekunden. Daher kann angenommen werden, dass sich die Besetzung der Zustände S_1 bzw. S_2 zu jedem Zeitpunkt im thermodynamischen Gleichgewicht befindet und somit die kanonische Zustandssumme samt zugehöriger Besetzungswahrscheinlichkeiten verwendet werden kann [18]. Dieser Ansatz soll im Folgenden detaillierter dargestellt werden.

Da sich das System im thermodynamischen Gleichgewicht befindet, kann davon ausgegangen werden, dass eine Dissoziation des Komplexes entweder direkt aus S_1 über x_1 oder direkt aus S_2 über x_2 erfolgt. Eine Dissoziation höherer Ordnung, zum Beispiel von S_2 über S_1 , wird folglich nicht betrachtet. Die relevanten Übergänge sind in Abbildung 2.7 vereinfacht dargestellt.

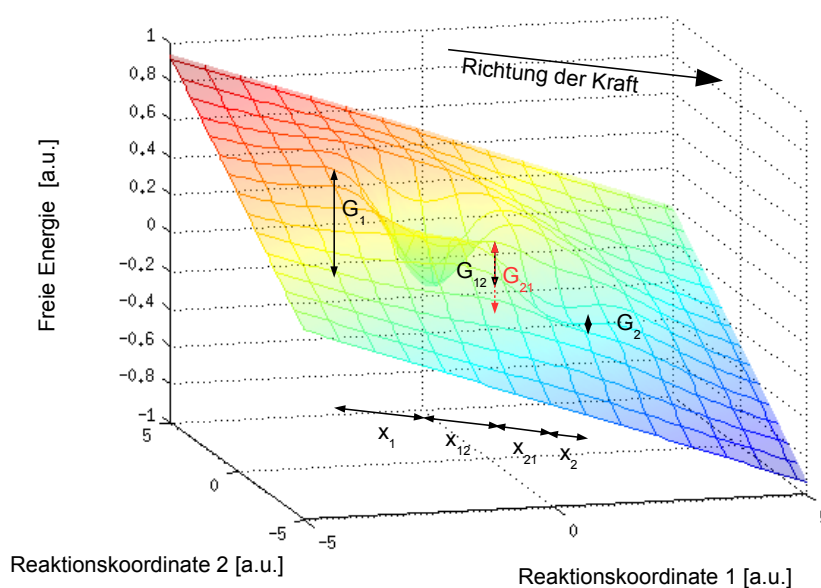


Abbildung 2.7: Vereinfachte Darstellung eines Potentialverlaufs mit zwei (meta-)stabilen Zuständen unter Einwirkung einer äußeren Kraft. Eingezeichnet sind die Potentialbarrieren entlang der durch die Kraft ausgezeichneten Richtung.

Die kanonische Zustandssumme ist in diesem Modell abhängig von der externen Kraft f :

$$Z(f) = \exp\left(\frac{G_{12} - fx_{12}}{k_B T}\right) + \exp\left(\frac{G_{21} - fx_{21}}{k_B T}\right) \quad (2.9)$$

Damit folgt auch für die Besetzungswahrscheinlichkeit p_1 bzw. p_2 der beiden

Zustände S_1 und S_2 eine Kraftabhängigkeit:

$$p_1(f) = \left(1 + \exp\left(-\frac{\Delta G - f\Delta x}{k_B T}\right) \right)^{-1} \quad (2.10)$$

$$p_2(f) = \left(1 + \exp\left(\frac{\Delta G - f\Delta x}{k_B T}\right) \right)^{-1} \quad (2.11)$$

Hierbei ist $\Delta G = G_{12} - G_{21}$ die Energiedifferenz der beiden Zustände und $\Delta x = x_{12} - x_{21}$ die Differenz der Wechselwirkungslängen entlang der wirkenden Kraft. Eine Zunahme der Kraft führt also, wie in Gleichung 2.10 und Gleichung 2.11 zu erkennen ist, zu einer Verschiebung der Besetzung der Zustände hin zum stärker gebundenen Zustand S_2 .

Analog zu Gleichung 2.8 kann jetzt die Dissoziationsrate des gesamten Systems aufgestellt werden:

$$k(f) = p_1(f)k_1 \exp\left(\frac{fx_1}{k_B T}\right) + p_2(f)k_2 \exp\left(\frac{fx_2}{k_B T}\right) \quad (2.12)$$

Das phänomenologische Verhalten von *catch bonds* lässt sich auf Basis dieses Zusammenhanges wie folgt interpretieren:

- Für große oder kleine Kräfte sind nur S_2 bzw. S_1 besetzt. Es kommt ausschließlich zu Dissoziation aus einem Zustand und damit zu *slip-bond*- Verhalten, wie es in der rechten Grafik in Abbildung 2.5 zu sehen ist. Bei diesem System tritt der *slip-bond*-Charakter für Kräfte größer 20 pN bzw. kleiner 10 pN zutage.
- Für Kräfte, die gerade im *catch-bond*-Intervall liegen, kann der Rezeptor-Ligand-Komplex jedoch aus jedem der beiden Zuständen dissoziieren. Der Anteil der Dissoziationsereignisse aus dem Zustand S_2 steigt dabei, je höher die Kraft wird. Die mittlere Lebensdauer, die sich aus vielen Einzelmessungen zusammensetzt und damit Dissoziationen aus S_1 und S_2 enthält, steigt damit ebenfalls für höhere Kräfte. Für diese Betrachtung ist es notwendig, dass im *catch-bond*-Bereich $k_2 < k_1$ gilt. Inwieweit eine Nicht-

Erfüllung dieser Voraussetzung in biologischen Systemen vorstellbar ist, soll hier nicht diskutiert werden. Für die in dieser Arbeit untersuchten Systeme ist die Bedingung erfüllt.

Nicht alle *catch-bond*-Systeme zeigen jedoch sowohl für große als auch für kleine Kräfte *slip-bond*-Charakteristik, wie in Abbildung 2.5 zu sehen ist. Der Grund hierfür wurde noch nicht abschließend geklärt, es wird jedoch vermutet, dass die untere Grenze F_{min} des *catch-bond*-Regimes bei den meisten bisher untersuchten Komplexen so niedrig liegt, dass eine Detektion des *slip-bond*-Verhaltens unterhalb von F_{min} aufgrund experimenteller Limitierungen nicht möglich ist [45].

Ideal bonds

Die Existenz von Bindungen, deren Lebensdauer nicht von einer angelegten Kraft abhängt, wurden bereits 1988 theoretisch vorhergesagt [16]. Seit diesem Zeitpunkt wurden im Wesentlichen zwei Erklärungsmodelle für dieses ungewöhnliche Phänomen gefunden [53] und der Term *ideal bond* geprägt [54].

Eine der Erklärungen kommt zu dem Schluss, dass für ein solches Verhalten insbesondere das Wechselwirkungspotential sowohl des gebundenen als auch des Übergangszustandes harmonisch sein muss und sowohl die Ruhelänge der Interaktion, als auch die Federkonstante beider Potentiale gleich sein muss [54].

Der zweite Ansatz nimmt an, dass es Fälle geben kann, in denen die Beschränkung der Potentiallandschaft auf die Dimension, die durch die angelegte Kraft ausgezeichnet ist, nicht in allen Fällen haltbar ist. Stattdessen wird hier eine zweite Dimension, zumeist mit Q bezeichnet, eingeführt und damit die Anzahl der Freiheitsgrade erhöht. Solche multidimensionalen Energielandschaften wurden bisher berichtet für die Ausbildung von RNA *hairpins* [55] und für das Strecken von DNA in denaturierte Zustände [56].

Eine ideale Bindung kann in diesem Bild auftreten, wenn die molekulare Ausdehnung x entlang der Kraftrichtung für den Bindungs- und Übergangszustand gleich ist [57].

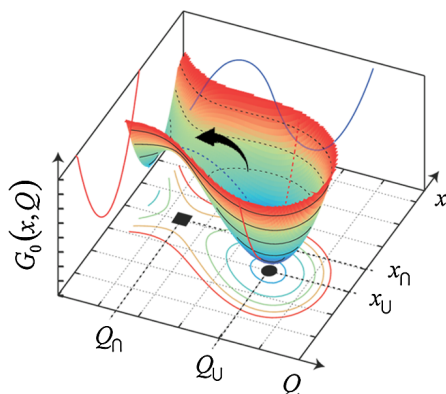


Abbildung 2.8: Energielandschaft zur Erklärung von ideal bonds [57].

Die unterschiedlichen Positionen von Übergangs- und Bindungszustand kommen in diesem zweidimensionalen Bild also durch einen Unterschied in der Koordinate Q zustande. In der Abbildung 2.8 ist dies für den allgemeinen Fall dargestellt, daher liegt hier zusätzlich ein Unterschied in Koordinate x vor. Dieser würde für ideale Bindungen gerade entfallen. Die Koordinate Q ist hierbei bewusst allgemein gehalten. Sie wurde in einem Fall beschrieben als „[...] some other molecular coordinate that captures the difference

between the native and unfolded states of the biomolecule [...]“ [58].

Diese Koordinate Q wird verknüpft [57] mit großen konformationellen Änderungen, insbesondere der Torsionswinkel, die für das erneute Falten der RNA *hairpins* gezeigt werden konnten [55]. Eine weitere Interpretationsmöglichkeit bietet die vermutete Abhängigkeit der Ausdehnung eines Proteins unter externer Kraft von dem Anteil der Aminosäuren-Kontakte, die noch ausgebildet sind [59]. Hier wird angenommen, dass Q gerade dem Anteil der Aminosäuren-Kontakte entsprechen könnte [57].

Neben diesem allgemeinen Modell, dass die prinzipielle Existenz von idealen Bindungen erlaubt, wurde 2012 der experimentelle Nachweis von idealen Bindungen an Cadherinen erbracht [17].

Hier wurden die idealen Bindungen in Cadherin-Mutanten beobachtet, deren Dimere in einem Übergangszustand statt in einem Bindungszustand vorliegen. Es wurde vermutet, dass der Übergangszustand ermöglicht, dass es unter Zug zu einer Umlagerung oder Konformationsänderung senkrecht zur Zugrichtung kommen kann, da im Gegensatz zu einem Bindungszustand im Übergangszustand einige Bindungen fehlen und die Dimere so wesentlich beweglicher sind [60].

Eine solche Konformationsänderung könnte von statten gehen ohne Einfluss auf die molekulare Ausdehnung x zu nehmen und stattdessen eine Veränderung aus-

schließlich entlang der Koordinate Q auslösen, die hier mit der Konformation assoziiert ist. So wäre die Bedingung für ideale Bindungen, dass Übergangszustand und Bindungszustand die gleiche molekulare Ausdehnung x haben, erfüllt [60].

2.3 Kraftspektroskopie

Durch kraftspektroskopische Experimente sind Untersuchungen von verschiedenen Konstanten der betrachteten Systeme möglich. Da es sich um Einzelmolekül-Ereignisse handelt, bietet sich hier die Möglichkeit, Ergebnisse, die aus Ensemble-Messungen bekannt sind, zu verifizieren. Ebenso ist die Technik sensitiv bezüglich Subpopulationen der untersuchten Moleküle, die in Ensemble-Messungen durch Mittelung nicht erfasst werden, und ermöglicht zudem Einblicke in die Bindungsereignisse auf molekularer Ebene.

2.3.1 Force Clamp Spektroskopie

Force Clamp Spectroscopy (FCS) ist ein Verfahren, bei dem eine molekulare Bindung einer konstanten, externen Kraft ausgesetzt wird und die Lebensdauer dieser Bindung gemessen wird. Es gibt verschiedene Methoden, die hierfür verwendet werden können [11, 61–64], in dieser Arbeit wurde jedoch ausschließlich das bereits in Kapitel 2.1 diskutierte AFM verwendet.

Wie in Gleichung 2.8 dargestellt wurde, ist die Dissoziationsrate einer Bindung abhängig von der Kraft, die auf die Bindung wirkt. Da Dissoziationsrate $k_{off}(f)$ und Lebensdauer τ über

$$k_{off} = \frac{1}{\tau} \quad (2.13)$$

verknüpft sind, lässt sich aus der Messung der Lebensdauer auf die Dissoziationsrate schließen.

Ebenso kann die Lebensdauer direkt zur weiteren Analyse verwendet werden. Diese Analyse ist in Kapitel 4.6 beschrieben.

Zur experimentellen Messung der Lebensdauer einer Bindung mit dem AFM über FCS wird einer der beiden Bindungspartner an den *cantilever* angebunden. Der

andere Bindungspartner wird auf einer Oberfläche, typischerweise bestehend aus Gold, immobilisiert.

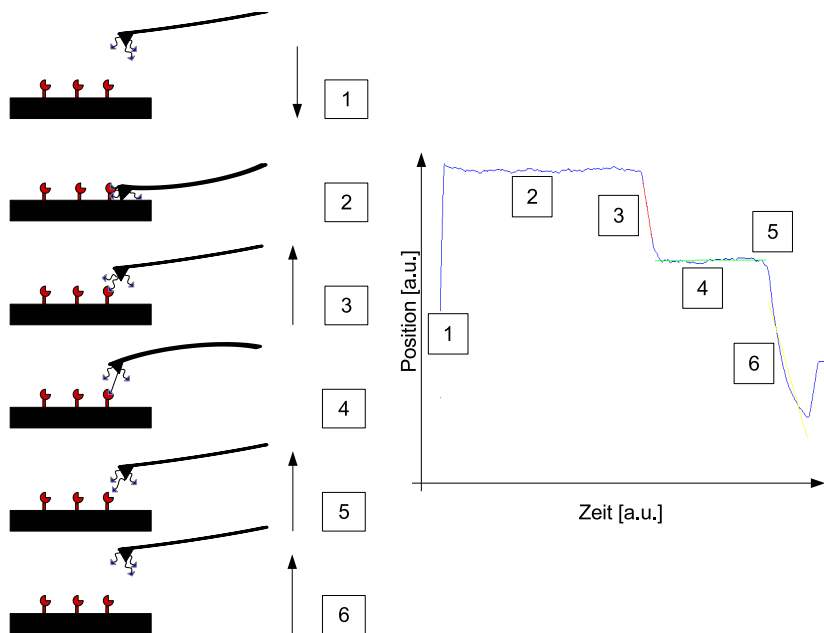


Abbildung 2.9: Links: stark vereinfachte schematische Darstellung des Ablaufs eines FCS-Zyklus. Rechts: Experimentelle Daten mit Markierung der einzelnen Phasen, die im Text und in der linken Grafik besprochen werden.

Abbildung 2.9 stellt den Verlauf einer einzelnen FCS-Messung schematisch dar. Der Ablauf soll im Folgenden grob skizziert werden:

1. Zu Beginn eines Messzyklus befindet sich der nicht ausgelenkte *cantilever* weit entfernt von der Oberfläche und wird an diese angenähert.
2. Der Federbalken befindet sich in Kontakt mit der Oberfläche. Dies ermöglicht das Ausbilden der molekularen Bindungen.
3. Der *cantilever* wird zurückgezogen. Die Kraft, die auf die Bindung wirkt, bleibt jedoch null bis die Linkermoleküle gestreckt sind.
4. Die Kraft, die der *cantilever* auf die Bindung ausübt, entspricht der vorher gewählten Kraft F_{Clamp} . Eine *closed-loop*-Regelschleife hält die Kraft

konstant.

5. Die Bindung dissoziiert und der Federbalken springt zurück in seine Ruhelage.
6. Der *cantilever* wird von der Oberfläche zurückgezogen und in die Ausgangsposition gebracht.

Über die Messung der Auslenkung des *cantilevers* kann hier also direkt die Lebensdauer der Bindung bestimmt werden.

2.3.2 Bestimmung der Federkonstanten

Zur korrekten Einstellung der Kraft F_{Clamp} ist es nötig, die Federkonstante des *cantilevers* zu kennen.

Die Herstellerangaben zur Federkonstante der in dieser Arbeit verwendeten Federbalken sind jedoch mit einer Unsicherheit behaftet, ebenso verändert sich die Federkonstante durch die Funktionalisierung. Daher ist es nötig, für jeden verwendeten *cantilever* die Federkonstante experimentell zu bestimmen [65].

Hierfür können verschiedene Methoden verwendet werden: Man kann den Federbalken mit Hilfe einer Standardfeder kalibrieren [66], mit und ohne zusätzlich angebrachte kleine Massen die Resonanzfrequenz bestimmen [67] oder die Federkonstante auf Basis geometrischer Überlegungen berechnen [68].

In dieser Arbeit wird die als *thermal noise method* [69] bezeichnete Methode angewendet. Sie soll im Folgenden kurz skizziert werden: Ein *cantilever* kann für hinreichend kleine Auslenkungen als eindimensionaler harmonischer Oszillator aufgefasst werden. Damit folgt für seinen Hamilton-Operator:

$$\hat{H} = \frac{p^2}{2m} + \frac{1}{2}m\omega_0^2 q^2 \quad (2.14)$$

Hierin ist m die Masse des Oszillators, p der Impuls, q die Auslenkung und ω_0 die Resonanzfrequenz des Federbalkens, die über $\omega_0 = \sqrt{\frac{k}{m}}$ mit der Federkonstanten

zusammenhängt. Mit dem Äquipartitionstheorem

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

folgt für die Federkonstante:

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

Für die Bestimmung der Federkonstanten muss nun also die mittlere quadratische Auslenkung $\langle q^2 \rangle$ bestimmt werden.

Hierfür wird mehrfach die Auslenkung des *cantilevers* über einen Zeitraum gemessen und danach fouriertransformiert. Das Resultat der Fouriertransformation ermöglicht die Bestimmung der spektralen Leistungsdichte in Abhängigkeit der Frequenz. Die spektrale Leistungsdichte kann durch eine Lorentzfunktion approximiert werden. Die Fläche unterhalb dieser Funktion entspricht dann gerade $\langle q^2 \rangle$ und die Federkonstante kann bestimmt werden.

Die Auslenkung des *cantilevers* wird jedoch als Spannungssignal gemessen. Daher ist es nötig, einen Umrechnungsfaktor zu bestimmen, um wirkende Kräfte in Newton angeben zu können. Hierfür wird die sogenannte Sensitivität verwendet. Diese entspricht der inversen Steigung des Kontaktbereiches bei einer harten Probe [70] und erlaubt die Umrechnung des Signals von einer Spannung in eine Auslenkung.

Nun kann über das Hooke'sche Gesetz

$$F = -k \cdot q \quad (2.17)$$

die Kraft berechnet werden, da die Federkonstante berechnet wurde und q als *Sensitivität* \cdot *Signal* ausgedrückt werden kann.

3 Biologische Grundlagen

In dieser Arbeit wurde die Wechselwirkung zweier Molekülgruppen untersucht: Enzyme aus der Gruppe der Sulfatasen und ihre physiologischen Substrate, die Glycosaminoglykane (GAGs). Die folgende, kurze Besprechung dieser Moleküle beschränkt sich hierbei auf die vier Moleküle, die für diese Arbeit verwendet wurden: Die beiden humanen Sulfatasen Sulf1 und Sulf2 (Sulfs) sowie die GAGs Heparansulfat (HS) und Heparosansulfat (K5-NS).

Sulf1 und Sulf2 sind Enzyme, die Sulfatester spalten und so das Sulfatierungsmuster der GAGs ändern können [71].

Einige zelluläre Wachstumsfaktoren sind abhängig von GAGs und ihrem Sulfatierungsmuster [72]. Die Sulfatasen beeinflussen also durch die Desulfatierung der GAGs viele Prozesse auf zellulärer Ebene [73], darunter die embryonale Entwicklung [19], die Reparatur von Gewebe [20] sowie die Tumorentstehung [21, 22].

Die Wechselwirkung zwischen Sulf1 bzw. Sulf2 und HS wurde hierbei noch nicht restlos aufgeklärt [74].

3.1 Glycosaminoglykane

Glycosaminoglykane sind eine Gruppe von Molekülen, die aus sich wiederholenden Disacchariden zusammengesetzt sind. Diese Disaccharide bestehen dabei aus einer Uronsäure, die 1-3-glycosidisch mit einem Aminozucker verbunden ist.

Verschiedene Moleküle zählen zu den GAGs, darunter Hyaluronsäure (HA), Chondroitinsulfat (CS), Keratansulfat (KS) und das bereits erwähnte Heparansulfat (HS). HS und das eng verwandte K5-NS sollen hier näher beschrieben werden, da sie die beiden GAGs sind, die für die Experimente dieser Arbeit verwendet wurden. K5-NS hat dabei einen Aufbau, der dem von HS stark ähnelt. Ein Unterschied ist jedoch, dass K5-NS ausschließlich N-sulfatiert ist.

Diese beiden Moleküle wurden ausgewählt, um die Relevanz und Auswirkungen der 6-O-Sulfate, über die HS verfügt und K5-NS gerade nicht und die von Sulf1

bzw. Sulf2 abgespalten werden, beurteilen zu können.

Heparansulfat-Moleküle bestehen aus 50 - 150 Disaccharid-Einheiten. Innerhalb dieser Polymerkette gibt es sog. S-Regionen, die hochgradig sulfatiert sind. Die S-Regionen bestehen aus bis zu acht Disacchariden [75]. Die Struktur der in den S-Regionen am häufigsten vorkommenden Untereinheit ist in Abbildung 3.1 (links) abgebildet.

Die Uronsäure dieses Disaccharids besitzt eine 2-O-Sulfatgruppe (blau eingezeichnet) und kann als Glucuronsäure (GlcA) oder epimerisiert als Iduronsäure (IdoA) vorliegen. Das Glucosamin ist N-sulfatiert (rot) und häufig zudem 6-O-sulfatiert (ebenfalls rot).

Zwischen den einzelnen S-Regionen befinden sich Bereiche von 16-20 Untereinheiten, die kaum oder gar nicht sulfatiert sind [76].

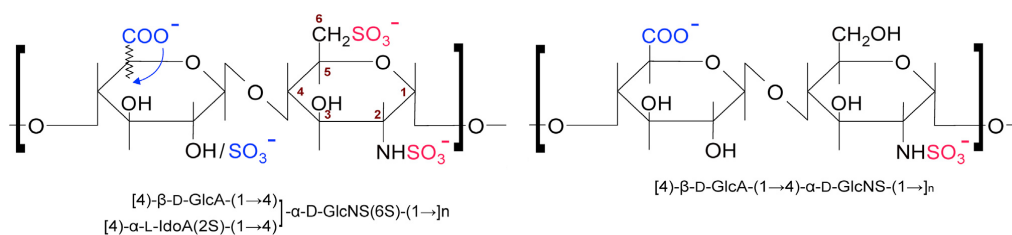


Abbildung 3.1: Links: Disaccharid-Einheit, aus der die S-Region von Heparansulfat zusammengesetzt ist. Rechts: Disaccharid-Einheit von K5-NS. Beide entnommen aus [18].

Das in Abbildung 3.1 (rechts) dargestellte Heparosan-N-Sulfat besteht aus 30-40 $\beta\text{-D-GlcA}-(1 \rightarrow 4)-\alpha\text{-D-GlcNS}$ -Einheiten [77]. Wie aus dem Vergleich der beiden gezeigten Disaccharid-Einheiten ersichtlich ist, fehlt K5-NS damit, neben dem 2-O-Sulfat und der C5 Epimerisierung der Uronsäure, insbesondere die 6-O-Sulfatierung des Glucosamins.

HS ist, unter anderem über seinen Sulfatierungsgrad, in der Lage, die biologische Funktion vieler Signalproteine zu modulieren [78, 79]:

- durch Beeinflussung ihrer Lagerung oder durch strukturelle Modifikationen
- durch Inhibition oder Promotion der Bildung der Signalkomplexe
- durch Unterstützung bei der Ausbildung supramolekularer Komplexe

- durch Stabilisierung von zum Beispiel chemotaxischen oder morphogenen Gradienten

Im Wesentlichen werden alle diese Prozesse durch das Sulfatierungsmuster von HS beeinflusst. Hierbei spielen insbesondere die bereits erwähnten S-Regionen eine Rolle, deren Sulfatierung über einen komplexen, geregelten Biosynthese-Prozess kontrolliert wird [80, 81].

Eine postsynthetische Veränderung der 6-O-Sulfatierung der S-Regionen kann im Organismus durch die im folgenden Kapitel besprochenen Sulfatasen vorgenommen werden [82, 83].

3.2 Sulfatasen

Nachdem die Suche nach Sonic hedgehog – einem Molekül, das in der Ausdifferenzierung von Stammzellen eine Rolle spielt – responsiven Genen zur Entdeckung der ersten Sulfatase geführt hat [82], wurden Orthologe der dort entdeckten Sulfatase in Ratten [84], Mäusen und Menschen gefunden. Bei Mäusen und Menschen wurde zusätzlich eine Isoform, die bereits erwähnte Sulf2, gefunden [83].

Sulf1 und Sulf2 sind Moleküle, die zur extrazellulären Matrix einer Zelle gehören. In der Regel sind beide Isoformen in Organismen vorhanden, auch wenn sich ihre Expression signifikant und dynamisch unterscheiden kann [85].

Ihre Aminosäure-Sequenz ist etwa ~ 870 Aminosäuren lang. Hiervon entfallen etwa ~ 415 Aminosäuren auf die katalytische Domäne, die in Abbildung 3.2 rot dargestellt ist, und ~ 320 Aminosäuren auf die hydrophile Domäne (HD) (blau). Die restlichen AS teilen sich auf ein Signalpeptid (schwarz) und eine C-terminale Domäne (braun) auf.

Sulf1 und Sulf2 sind sich strukturell sehr ähnlich, es gibt jedoch einige Unterschiede. So findet sich in der hydrophilen Domäne der Sulf1 ein zusätzlicher, stark saurer Cluster. Ebenso wird vermutet, dass trotz der großen Ähnlichkeit funktionale Unterschiede bestehen [87], da nachgewiesen werden konnte, dass das Sulfatierungsmuster von Heparansulfat unterschiedlich ist, falls nur Sulf1 oder Sulf2

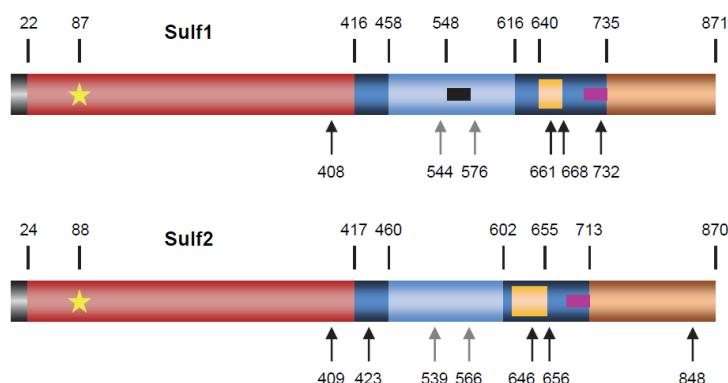


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Domänen der Sulfatasen Sulf1 und Sulf2 [86].

vorhanden ist [87, 88].

Die HD ist ansonsten spezies- und isoform-übergreifend stark konserviert und besteht zu etwa 27 % aus basischen und zu 14 % aus sauren Aminosäuren. In Abbildung 3.3 findet sich eine Darstellung der Aminosäuresequenz der HD von Sulf1.

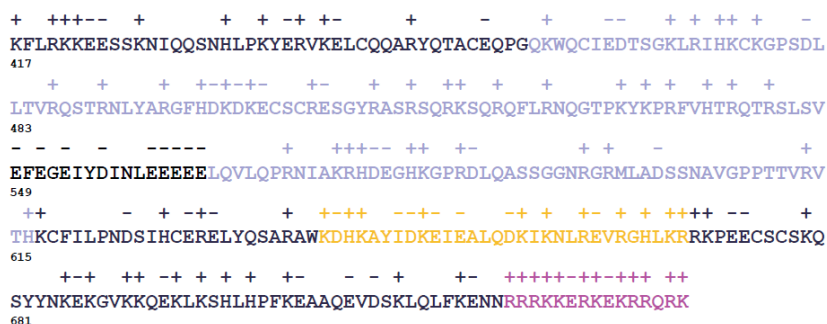


Abbildung 3.3: Aminosäuresequenz der hydrophilen Domäne der Sulf1 [86]. + bezeichnet basische, - saure Aminosäurenreste. Pink markiert den basischen Cluster der HD, schwarz saure Cluster.

Wie bereits gezeigt werden konnte [89, 90], ist diese hydrophile Domäne, die zwei Bindungsstellen für die Bindung von GAGs besitzt, an der Bindung der Sulfatasen an ihre Liganden beteiligt. Obwohl die HD alleine keinerlei enzymatische Aktivität zeigt, ist sie entscheidend für die Erkennung der Sulfatierungsstellen von HS.

Ist die HD nicht vorhanden, kann keine prozessive Aktivität des Substrates mehr beobachtet werden [23].

Die alleinstehende HD von Sulf1 bindet jedoch sowohl an das physiologische Substrat des Gesamtproteins, Heparansulfat, als auch an strukturell stark ähnliche Liganden, wie beispielsweise K5-NS. Im Fall der Bindung HD und HS tritt hierbei *catch-bond*-Verhalten auf [18], das jedoch für andere Liganden nicht beobachtet werden kann.

Es gibt starke Hinweise darauf, dass die Desulfatierung von GAGs durch die Sulfatasen ein gerichteter Prozess ist [23]. Die HD ist hierbei vermutlich dafür verantwortlich, die S-Regionen der GAGs zu erkennen und so zu binden, dass das katalytische Zentrum in Kontakt mit dem ersten 6-O-Sulfat einer Domäne kommt. Als erstes 6-O-Sulfat wird hier das dem nicht-reduzierenden Ende der Domäne am nächsten gelegene Sulfat bezeichnet.

Das katalytische Zentrum, das in der katalytischen Domäne liegt, desulfatiert dann diese Sulfatierungsstelle, woraufhin die Sulfatase eine Bewegung am GAG-Strang entlang durchführt, bis das aktive Zentrum das nächste Sulfat lösen kann [23].

Dieser Prozess kommt zum Erliegen, wenn in Richtung der Sulfatasen-Bewegung kein weiteres 6-O-Sulfat vorhanden ist, also beispielsweise am Ende einer S-Region.

Das *catch-bond*-Verhalten von HD und HS, das durch das bereits in Kapitel 2.2.2 diskutierte *two-state-two-path*-Modell beschrieben werden kann, könnte mit dieser prozessoralen Aktivität zusammen hängen [91]. Der Wechsel zwischen stärker und schwächer gebundenem Zustand des *two-state-two-path*-Modells geht, wie bereits erläutert, vermutlich mit einer Konformationsänderung einher. Es ist denkbar, dass allosterische Effekte hierbei eine Rolle spielen. Diese können durch die Sulfatierungsstellen zustande kommen.

So könnte der beobachtete Prozess einen Wechsel zwischen den beiden Zuständen bedingen oder durch ihn getrieben bzw. unterstützt werden [91]:

Während eine initiale Anbindung der Sulfatase, die in einem relaxierten Zustand vorliegt, an das HS im Zustand S_1 des *two-state-two-path*-Modells erfolgt, kann ein thermisch aktivierter Wechsel, der durch allosterische Effekte gefördert wird,

in eine gestrecktere Konformation erfolgen. Somit wäre der Bindungszustand S_2 , der stabiler ist, zugänglich. Es wird vermutet, dass in diesem Zustand die Desulfatierung des HS erfolgt. Hierdurch wird ausreichend Energie frei, um wieder zurück in den relaxierten Zustand der Sulfatase zu wechseln - und damit in Bindungszustand S_1 .

Ein Wechsel des Zustandes von stark gebunden für den Vorgang der Desulfatierung zu schwach gebunden würde die Bewegung entlang des GAGs erleichtern. Diese Bewegung könnte raupenartig erfolgen, indem beim Übergang vom stark gebundenen zum schwach gebundenen Zustand ein Teil des Sulfs vom GAG abgelöst wird, bevor es erneut zum spontan ablaufenden Wechsel in den stärker gebundenen Zustand kommt.

4 Material und Methoden

Für diese Arbeit wurden *Force-Clamp*-Experimente mit einem AFM durchgeführt. Hierbei wurden sowohl die hydrophile Domäne von Sulf2 als auch das Volllängenprotein Sulf1 untersucht. Von Sulf1 wurde zudem noch eine Mutante, Sulf1CA, vermessen, die im aktiven Zentrum mutiert ist und somit über keine enzymatische Aktivität verfügt.

Als Bindungspartner für diese (Teil-)Enzyme wurden die GAGs Heparansulfat (HS) und Heparosansulfat (K5-NS) verwendet.

In diesem Kapitel soll die Vorbereitung der Messung durch die Funktionalisierung der *cantilever* und der Oberflächen ebenso dargestellt werden wie die Auswertung der aufgenommenen Position-Zeit-Kurven.

4.1 Biologische Moleküle

Die Proteine und Protein-Domänen wurden von Christian Bartz, Arbeitskreis Biochemie 1, Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld, bereitgestellt. In diesem Abschnitt soll daher nur ein kurzer und sehr grober Abriss der verwendeten Protokolle dargestellt werden. Genauere Informationen finden sich zum Beispiel in [86].

Die Bereitstellung der Sulf2HD als Fusionsprotein mit N-terminalem MBP (*maltose binding protein*)-tag erfolgte analog zu dem erprobten Verfahren für die Sulf1HD [18], also im ersten Schritt durch Expression in *e.coli* Rosetta 2 (DE3). Um für die spätere Aufreinigung den MBP-Tag einzuführen, wurde die DNA, die für die Expression der HD notwendig ist, in einen Vektor (pMAL-c5X) kloniert [90]. So entsteht ein Fusionsprotein zwischen der HD und dem o. g. MBP. Wie gezeigt wurde, beeinflusst die Anwesenheit von MBP die Bindungseigenschaften der HD nicht [92].

Nach erfolgreicher Expression wird das Fusionsprotein wie im Folgenden dargestellt für die Messungen angereichert:

- Die pelletierten Zellen werden lysiert.
- Die Fusionsproteine werden über eine Amylose-Affinitäts-Säule angereichert. Dabei wurde mit mehreren Säulenvolumina gewaschen, um ungebundene Verunreinigungen abzutrennen. Anschließend wurde das Fusionsprotein mit 10mM Maltose in PBS eluiert.
- Die Fraktionen werden in 2 ml Aliquots bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Das Protein Sulf1 und seine Mutante Sulf1CA werden, ergänzt um einen C-terminalen RGS-His6-Tag, in humaner HT1080-Zellkultur exprimiert [72, 86]. Zur Aufreinigung und Anreicherung wird das folgende Protokoll verwendet:

- Die zu verwendenden Zellkulturüberstände werden zentrifugiert, um abgestorbene Zellen und Zelltrümmer zu entfernen.
- Das enthaltene Protein wird durch Ammoniumsulfat aus den Überständen präzipitiert.
- Nun erfolgt eine Dialyse gegen Bindepuffer.
- Erneute Zentrifugation und steriles Filtrieren dienen zur Entfernung von Partikeln.
- Anschließend erfolgt eine Anreicherung über eine HisTrap-Säule mit Ni^{2+} -Ionen. Durch Waschen mit Bindepuffer werden unspezifisch gebundene Proteine entfernt, und mit der nachfolgenden Elution sind die Proteine angereichert.
- Die Elutionsfraktion wird in 1mL Aliquots bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Für die AFM-Messungen wurden die Fraktionen verwendet, deren Western-Blot-Analyse das stärkste Signal aufwies.

4.2 Herstellung der Goldsubstrate

Die Oberflächen für die *Force-Clamp*-Experimente waren mit Gold beschichtete Glasplättchen, die mit magnetischen Metallplättchen verklebt wurden. Die Oberflächen wurden für jedes Experiment frisch nach folgender Prozedur hergestellt:

1. Sowohl die Gläschen (8x8mm, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) als auch die Metallplättchen wurden für je zehn Minuten in Aceton, Ethanol und MilliQ-Wasser gereinigt und anschließend mit Stickstoff getrocknet.
2. Für das Verkleben von Glas und Plättchen wurde ein Zwei-Komponenten-Epoxidharzkleber verwendet. Dieser Kleber härtete mindestens 24 Stunden aus. Während dieser Zeit wurden die Gläser in PE-Petri-Schalen in einer Flowbox gelagert.
3. Im Anschluss wurden die Gläser mit Aceton, Ethanol und Milli-Q-Wasser gespült und mit Stickstoff getrocknet.
4. Für das Aufbringen der Goldschicht wurden die Gläser in die Bedampfungsanlage (MED020 Coating System, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) eingeschleust. Dann wurde die Bedampfungsanlage evakuiert.
5. Anschließend wurden zunächst ca. 3 nm Chrom aufgedampft, gefolgt von 120 nm Gold (AU Granulat 99,99 %, Hauner Metallische Werkstoffe, Röttenbach, Deutschland).

Nach der Entnahme aus der Bedampfungsanlage wurden die Oberflächen direkt, das heißt ohne Lagerung, für die Funktionalisierung weiterverwendet.

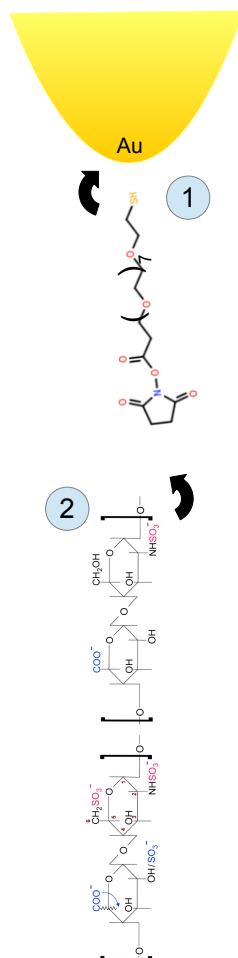
4.3 Präparation für Messungen mit Sulf2HD

Für die Messungen an Sulf2HD wurde die gleiche Funktionalisierung wie in [93, 94] verwendet. Dies soll die Vergleichbarkeit der Ergebnisse für die Messungen an hydrophilen Domänen gewährleisten.

Daraus folgt, dass die hydrophile Domäne an der Oberfläche immobilisiert wird, während die GAGs an den *cantilever* gebunden werden.

Der genaue Ablauf der einzelnen Teilpräparationen wird im Folgenden beschrieben.

Zur Anbindung der GAGs an die im Experiment verwendeten *cantilever* (Biolever BL-RC150VB, Olympus, Tokio, Japan) wurde folgende Strategie zur Funktionalisierung verwendet:



In der linken Abbildung ist der Ablauf der Funktionalisierung schematisch dargestellt. Die Anbindung des Linkers nach der Reinigung des *cantilevers* erfolgt über Thiolchemie (1). Die dann vorhandenen, freien N-Hydroxysuccinimid-Ester reagieren mit den terminalen Aminogruppen, die in die GAGs eingebracht wurden, und binden so das zu untersuchende Molekül an den Federbalken (2). Durch die eingebrachten terminalen Aminogruppen ist eine Direktionalität gegeben. Zudem bietet der Linker den Vorteil größerer räumlicher Flexibilität für die im Experiment auszubildende Bindung und einen größeren Abstand zwischen *cantilever* und Oberfläche im Moment des Abrisses. Dies reduziert unspezifische Wechselwirkungen.

Hieraus ergibt sich das bereits aus [93, 94] bekannte Protokoll:

1. Die *cantilever* werden in Bechergläsern mit Aceton (p.a.), Ethanol (p.a.) und MilliQ-Wasser gereinigt.
2. Im Anschluss werden die Federbalken zum Trocknen 15 Minuten auf einen (vorher gereinigten) Teflon-Block, der spezielle Vertiefungen für die *cantilever* enthält, gelegt.

3. Die *cantilever* werden in einer Lösung von 1mM PEG-NHS-Ester Disulfit in wasserfreiem DMSO für 60 Minuten inkubiert. Dies geschieht ebenfalls auf dem Teflonblock. Es werden etwa $30\mu\text{l}$ der Lösung verwendet, um den Federbalken im Teflon-Block vollständig zu bedecken.
4. Nun wird der Federbalken in DMSO, Ethanol und MilliQ-Wasser gespült.
5. Der *cantilever* wird nun in einer 0,2 M NaHCO_3 -Lösung mit einem pH-Wert von 8,2 gebadet, die die GAGs enthält. Die Konzentration der GAGs beträgt $1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$. Auch hierfür werden etwa $30\mu\text{l}$ der Lösung verwendet.
6. Der *cantilever* wird nun in PBS-Puffer gespült und kann unter diesem bei 4°C gelagert werden.

Die Präparation der hergestellten Goldsubstrate für die Messungen erfolgt in einem einzigen Schritt:

Das frisch bedampfte Glas wird unmittelbar nach Entnahme aus der Bedampfungsanlage weiter verwendet. Es werden $100\mu\text{l}$ einer MBP-HD-Lösung mit $c = 100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ aufpipettiert und für eine Stunde inkubiert.

Die Bindung an Gold erfolgt durch die im MBP vorhandenen Cystein-Gruppen.

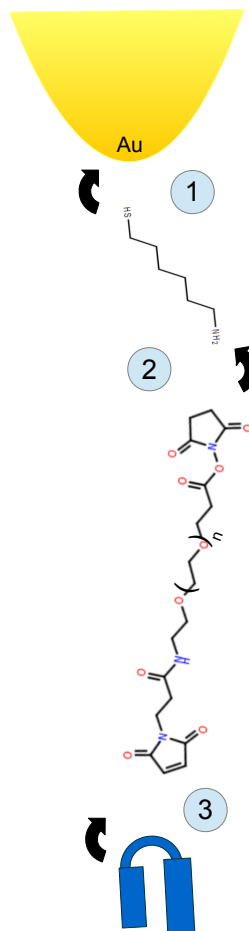
4.4 Präparation für Messungen mit Sulf1

Für die Messungen am Gesamtprotein Sulf1 war es nötig, die Funktionalisierung anzupassen. Da das volle Protein katalytisch aktiv ist, muss es während der Messungen an HS stetig mit „frischem“, sprich noch 6-O-sulfatiertem, HS versorgt werden. Das experimentelle Setup kann das gewährleisten, sofern das GAG auf der Oberfläche angebunden ist: Zwischen den einzelnen Kraft-Zeit-Zyklen, die aufgenommen werden, wird die Oberfläche lateral verschoben.

Für die Funktionalisierung der Oberfläche mit GAGs wurde für diese Messungen das Protokoll für den *cantilever* aus Kapitel 4.3 verwendet. Da sowohl die Oberfläche als auch die verwendeten *cantilever* goldbeschichtet sind, war es nur notwendig, die Konzentration der GAGs auf der Oberfläche zu reduzieren. Hierfür wurde die Konzentration der GAG-Lösung um den Faktor 20 auf $c = 0,05 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ verdünnt. Zudem wurde die Konzentration des PEG-NHS-Disulfit Ester-Linkers

um den Faktor 10 auf 0,1 mM verringert.

Um das Protein an den *cantilever* anzubinden, wurde die im Folgenden vorgestellte Strategie verfolgt:



In der linken Abbildung ist der gewünschte Ablauf der Funktionalisierung schematisch dargestellt. Die 6-Amino-1-Hexanthiole (AHT) binden über Thiolchemie an den mit Gold beschichteten *cantilever* (1). Die freien Aminogruppen der AHTs können nun genutzt werden, um einen MAL-PEG-SVA Linker über seine NHS-Funktionalität anzubinden (2). Die freistehenden Maleimid-Gruppen wiederum können Cysteine im Protein binden und so das Protein mit dem Linkerkonstrukt und somit auch mit dem *cantilever* verknüpfen (3). Das Protein ist hier nur abstrakt schematisch dargestellt, da es bisher kaum Informationen über die Struktur gibt. Lediglich die für diese Arbeit relevante Existenz zweier Domänen soll hier angedeutet werden.

Hieraus ergab sich das im Folgenden beschriebene, neue Protokoll für die Funktionalisierung des *cantilevers*:

1. Die *cantilever* werden in Bechergläsern mit Aceton (p.a.), Ethanol (p.a.) und MilliQ-Wasser gereinigt.
2. Im Anschluss werden die Federbalken zum Trocknen 15 Minuten auf einen (vorher gereinigten) Teflon-Block gelegt.

3. Die *cantilever* werden in einer Lösung aus 5 ml Ethanol mit 1mM 6-Amino-1-Hexanthiol für 60 Minuten gebadet.
4. Anschließend erfolgt eine Reinigung mit Ethanol und DMSO.
5. Nun werden die *cantilever* auf einem Teflon-Block für eine Stunde in einer 0,1 mM Lösung von MAL-PEG-SVA belassen.
6. Die anschließende Reinigung wird mit DMSO und Ethanol durchgeführt.
7. Für die Anbindung des Proteins werden die *cantilever* für 60 Minuten mit einer Lösung von Sulf1 in PBS von $c \approx 1\mu M$ inkubiert.
8. Eine Reinigung mit PBS-Puffer schließt die Präparation ab.

4.5 Force-Clamp-Messung

Die *Force-Clamp*-Messungen wurden mit einem AFM (MFP-3D-BIO™, Asylum Research, Santa Barbara, USA) bei Raumtemperatur durchgeführt. Um möglichst physiologische Bedingungen während des Experimentes zu gewährleisten, wurde in Flüssigkeit, in diesem Fall PBS-Puffer mit pH 7,4, gearbeitet. Hierfür wurde das Substrat mittels eines kleinen Magneten in einer Petri-Schale (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) befestigt. Diese Schale wurde dann mit ca. 5 ml PBS-Puffer gefüllt.

Die hier verwendeten *Biolever* verfügen über zwei unterschiedliche Arten von *cantilevern* mit unterschiedlichen Resonanzfrequenzen und Federkonstanten. In den Messungen wurde der größere *cantilever* verwendet, dessen Resonanzfrequenz bei $\omega_R = 13 \text{ kHz}$ liegt und dessen Federkonstante mit $k_C = 6 \frac{\text{pN}}{\text{nm}}$ sehr niedrig ist.

Zur Durchführung des Experimentes wurde die Software Igor Pro 6.22 A Wave-metrics verwendet. Über diese Software wurden die relevanten Parameter auf die in Tabelle 4.1 dargestellten Werte eingestellt.

Parameter	Wert
force distance	80 nm
pull off	30 nm
approach velocity	3000 nm/s
retract velocity	500 nm/s
trigger point	30 pN
dwel time	1 s
pull trigger	-6 - -35 pN
hold time limit	10 s

Tabelle 4.1: Parameter und zugehörige Werte für die Force-Clamp-Messungen.

Die Bedeutung der einzelnen Parameter wird im Folgenden kurz dargestellt:

- *force distance* bezeichnet den Verfahrensweg des *cantilevers* bzw. Piezos über die gesamte Position-Zeit-Kurve hinweg.
- *pull off* gibt die Distanz an, wie weit der Federbalken von der Oberfläche zurückgezogen wird, bevor die Haltekraft F_C eingestellt wird. Hierdurch wird die Länge des Linkers berücksichtigt und unspezifische Adhäsion ausgeschlossen.
- *approach velocity* und *retract velocity* sind die Geschwindigkeiten für Annäherung bzw. Entfernung des *cantilevers* von der Oberfläche.
- *trigger point* ist die Kraft, mit der der Federbalken in der Kontaktregion auf die Oberfläche gedrückt wird.
- *dwel time* ermöglicht die Einstellung der Zeit, die der *cantilever* in Kontakt mit der Oberfläche verbringen soll.
- *pull trigger* ist die Kraft, die an dem *cantilever* anliegen soll, also gerade die Clamp Kraft F_C . Dies ist der Parameter, der über verschiedene Experimente hinweg variiert wurde.
- *hold time limit* bezeichnet die maximale Zeit, die unter Ausübung von F_C auf eine Dissoziation gewartet wird. Nach Überschreitung dieser Zeit wird der *cantilever* weiter von der Oberfläche zurückgezogen um so die Bindung

aufzulösen. Die hier gewählte Zeit von 10 s schließt ausschließlich langlebige Adhäsion und Mehrfachbindungen aus und hilft somit, das Experiment zu beschleunigen.

4.6 Auswertung der Force-Clamp-Daten

Die Auswertung der in den AFM-Experimenten aufgenommenen Daten erfolgt in mehreren Schritten:

1. Zunächst werden aus den Rohdaten die Lebensdauern bestimmt.
2. Dann wird aus den Lebensdauern für eine Kraft die mittlere Lebensdauer für diese Kraft bestimmt.
3. Für die weitere Auswertung werden die mittleren Lebensdauern dann entweder nach dem Modell für *slip bonds* oder *catch bonds* approximiert, die im Kap.2.2.2 vorgestellt wurden.

Diese Schritte sollen im Folgenden detaillierter dargestellt werden.

Für die Auswertung der Lebensdauern wird ein MATLAB-Skript, das von Volker Walhorn entwickelt wurde, verwendet. Dieses Skript konvertiert die Rohdaten aus dem proprietären IBW-Format der Igor-Pro-Software in ein MATLAB-kompatibles Format. Für die Auswertung wurde MATLAB (The MathWorks, Inc., Massachusetts, USA) in der Version R2008b verwendet.

Im Anschluss werden die verschiedenen Bereiche einer Distanz-Zeit-Kurve – Zurückziehen des *cantilevers* unmittelbar nach dem Kontaktbereich (rot in Abbildung 4.1), Haltebereich (grün) und der Bereich, in dem der *cantilever* nach Dissoziation einer Bindung zurückgezogen wird (gelb)– jeweils linear approximiert.

Diese Approximation erfolgt durch eine Einteilung der Kurve in verschiedene, kleine Intervalle, deren Steigung nach einer Glättung der Daten bestimmt werden kann. Angrenzende Intervalle mit ähnlicher Steigung gehören zum gleichen Bereich der Kurve, ein abrupter Wechsel der Steigung zwischen zwei benachbarten Intervallen ist jedoch ein Indiz dafür, dass hier das Plateau, der Haltebereich, beginnt oder endet. Hierbei sollte die Steigung der linearen Approximation des

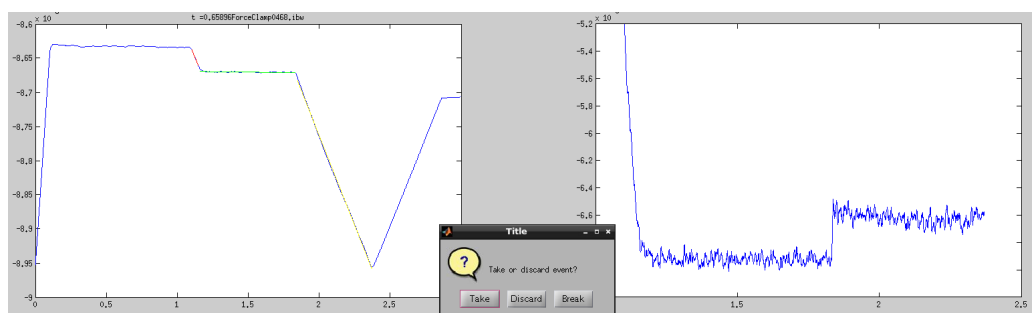


Abbildung 4.1: Screenshot des zur Auswertung benutzten M Skripts. Links im Bild ist die Auftragung der Position über die Zeit zu sehen. Rechts der Verlauf der Kraft in Abhängigkeit der Zeit.

Haltebereichs nahe null liegen, die Steigung der anderen Fits sollte von Null verschieden sein und sich ähneln.

Sind diese Bedingungen erfüllt, wird der entsprechende Datensatz, gemeinsam mit der korrespondierenden Kraft-Zeit-Kurve, grafisch dargestellt, wie in Abbildung 4.1 zu sehen ist. Der Auswertende hat nun die Möglichkeit zu entscheiden, ob das Skript wirklich ein Abrissereignis detektiert hat oder es sich um eine falsch positive Meldung handelt.

Zeigen die Kurven ein echtes Ereignis, kann semi-automatisch die Lebensdauer durch Markieren von Anfang und Ende des Plateaus bestimmt werden. Zusätzlich bestimmt das Skript die gemessene Lebensdauer aus den Schnittpunkten der linearen Fits.

Die automatische Bestimmung ist in Fällen, in denen das Skript alle drei Steigungen einwandfrei bestimmen kann, überlegen. Dies ist jedoch bei einer signifikanten Anzahl der aufgenommenen Datensätze nicht der Fall.

Wie sich im Ergebnis Teil der Arbeit zeigen wird, war eine Anpassung des Skriptes insofern notwendig, als dass die Intervalllänge länger war als ein Teil der Ereignisse und das Plateau so nicht bestimmt werden konnte. Daher wurde die Intervallgröße deutlich reduziert von ehemals 15 ms auf 7,5 ms. Dies hat allerdings zur Folge, dass die Bestimmung der Steigung stärker durch das Rauschen des Signals beeinflusst ist und somit fehleranfälliger wird. Die automatische Bestimmung der Schnittpunkte wird damit ebenfalls ungenauer. Daher wurden für diese Arbeit die halb-manuell bestimmten Lebensdauern verwendet.

Diese Auswertung wird für alle aufgenommenen Kurven durchgeführt. Alle Dissoziationsereignisse einer Kraft, die als richtig positiv bestimmt wurden, werden dabei zu einem Datensatz zusammengefasst. Pro Kraft erhält man damit eine Schar von Lebensdauern, die statistisch verteilt sind.

Für die Bestimmung der mittleren Lebensdauer einer solchen Schar werden die vorhandenen Lebensdauern zunächst mit MATLAB absteigend sortiert. Die Anzahl insgesamt betrachteter Bindungen N_0 entspricht der Anzahl der Dissoziationsereignisse. Die Anzahl der zu einem Zeitpunkt t noch existenten Bindungen lässt sich dann bestimmen als N_0 minus der Anzahl der gemessenen Lebensdauern, die kleiner als t sind.

Dieser Verlauf genügt dem Zusammenhang $N(t) = N_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$ mit τ als der mittleren Lebensdauer. Abbildung 4.2 zeigt eine entsprechende Auftragung der logarithmierten Anzahl der Bindung über die Zeit samt eines angelegten linearen Fits. Die Steigung p dieses Fits entspricht gerade der inversen mittleren Lebensdauer τ .

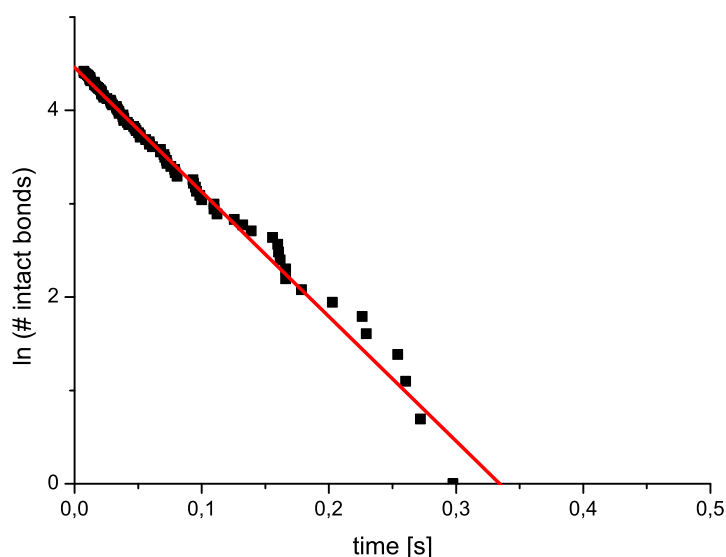


Abbildung 4.2: Auftragung des Logarithmus der Anzahl noch existenter Bindungen gegen die Zeit. Durch die lineare Approximation kann die mittlere Lebensdauer aus der Steigung bestimmt werden.

Die so bestimmten Lebensdauern sind aber natürlich fehlerbehaftet. Zum einen ist das Anlegen des linearen Fits bereits mit einem Fehler, insbesondere auch der Steigung, verbunden. Dieser Fehler Δp wird direkt von MATLAB nach dem Fit ausgegeben. Da die Lebensdauer τ und die Steigung p reziprok verknüpft sind, folgt nach der Gauß'schen Fehlerfortpflanzung für $\Delta\tau$:

$$\Delta\tau = \frac{\delta\tau}{\delta p} \cdot \Delta p = -\frac{1}{p^2} \cdot \Delta p = -\tau^2 \cdot \Delta p \quad (4.1)$$

Neben diesem Fehler, der sich aus der Bestimmung der Steigung ergibt, ist jedoch die Bestimmung jeder einzelnen Lebensdauer bereits mit einer Ungenauigkeit behaftet.

Diese kommt durch die endliche Auflösung des verwendeten Skriptes und der letztlich mit einer unteren Grenze versehenen Genauigkeit beim halb-manuellen Bestimmen der Plateaulänge zustande. Dieser Teil des Fehlers, der mit $\Delta l = 0,015$ s angenommen wird, hat den größeren Einfluss auf den Gesamtfehler, der sich folglich als

$$\Delta\tau_{Gesamt} = \frac{-1}{p^2} \cdot \Delta p + \Delta l = -\tau^2 \cdot \Delta p + \Delta l \quad (4.2)$$

bestimmen lässt. Streng genommen handelt es sich bei dieser Betrachtung des Fehlers um eine zu große Abschätzung: Die Ungenauigkeit in der Bestimmung jeder einzelnen Lebensdauer nimmt Einfluss auf die Genauigkeit der Steigung, da jeder einzelne Datenpunkt fehlerbehaftet ist. Die lineare Regression zur Steigungsbestimmung reduziert aber den Einfluss der Ableseungenauigkeit durch Mittelung, so dass zwar der Fehler in der Steigung größer wird, der Gesamtfehler jedoch kleiner.

In Anbetracht des großen Einflusses der Ableseungenauigkeit wurde entschieden, die Ableseungenauigkeit direkt zu verwenden, was zu größeren Gesamtfehlern führt. Diese Fehler werden in Form von Fehlerbalken in den Grafiken repräsentiert.

Die mittleren Lebensdauern, die wie hier dargestellt bestimmt wurden, können nun für die Auswertung nach dem bereits diskutierten *two-state-two-path*-Modell

im Fall von *catch bonds* oder dem *one-state-one-path*-Modell im Fall von *slip bonds* verwendet werden. Hierfür werden die mittleren Lebensdauern gegen die Kraft aufgetragen.

Die Nutzung von Gleichung 2.12 erfordert hierbei zunächst die Bestimmung von k_1 und x_1 bzw. k_2 und x_2 aus der Approximation des ersten bzw. zweiten *slip-bond*-Bereichs des Lebensdauer-Kraft-Graphen nach der Theorie von Kramers-Bell-Evans und damit nach Gleichung 2.8.

Im Fall von *slip bonds* kann die Auswertung unmittelbar durch Verwendung von Gleichung 2.8 erfolgen.

Im Anschluss können dann nach dem *two-state-two-path*-Modell ΔE und Δx aus einem Fit über den gesamten Datenbereich, der die zuvor bestimmten Parameter verwendet, erschlossen werden. Dies wird detailliert im Ergebnisteil präsentiert.

4.7 Liste der verwendeten Materialien

Reagenz	Hersteller
Heparansulfat (HS)	Celsus Glycoscience Inc., Cincinnati, USA
N-sulfatiertes K5-Polysaccharid	Iduron Ltd., Manchester, Großbritannien
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol p.a.	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Aceton p.a.	Sigma Aldrich, München, Deutschland
MilliQ-Wasser	Millipore, Eschborn, Deutschland
PBS Puffer	Sigma Aldrich, München, Deutschland
6-Amino-1-Hexanthiol	Sigma Aldrich, München, Deutschland
NHS-PEG-Disulfit Ester Linker	Polypure AS (MW 1109,3) , Oslo, Norwegen
Maleimid-PEG-Succinimidyl Valerat Linker (MW 3400)	Laysan Bio Inc., Arab, Alabama, USA
Toolcraft 1347647 Epoxy Transparent 5	Conrad Electronic SE, Hirschau , Deutschland

Tabelle 4.2: Liste der verwendeten Chemikalien.

5 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Abschnitt der Arbeit werden die Ergebnisse der durchgeführten Experimente präsentiert und diskutiert. Im Anschluss werden Interpretationsansätze zu den Daten vorgestellt.

Im Rahmen der Messreihen dieser Arbeit werden Bindungsparameter der hydrophilen Domäne der Sulfatase 2 (Sulf2HD), des vollständigen Proteins Sulfatase 1 (Sulf1) und einer Mutante der Sulfatase 1 (Sulf1CA) charakterisiert. Für jedes der Proteine bzw. Proteinfragmente wurde sowohl die Wechselwirkung mit dem physiologischen Substraten Heparansulfat (HS) als auch mit Heparosansulfat (K5-NS), einem verwandten GAG, dem die 6-O-Sulfate und 2-O-Sulfate fehlen, experimentell gemessen. Die Durchführung der Experimente ist in Kapitel 4 detailliert beschrieben.

5.1 Sulf2HD: Ergebnisse und Diskussion

Zunächst wurden die Experimente für die hydrophile Domäne der Sulfatase 2 durchgeführt. Daher sollen diese hier auch zuerst vorgestellt werden.

5.1.1 Sulf2HD und HS

Es wurde die Wechselwirkung zwischen Sulf2HD und dem GAG Heparansulfat untersucht. Die aufgezeichneten experimentellen Daten wurden ausgewertet, wie in Kapitel 4.6 beschrieben. Hierbei besteht ein Zwischenschritt darin, die mittlere Lebensdauer bei einer bestimmten Haltekraft zu bestimmen über die Auftragung des Logarithmus der intakten Bindungen über die Zeit. Einige Beispiele dieser Auftragung sind in Abbildung 5.1 dargestellt. Wie in der Grafik zu erkennen ist, führt eine Zunahme der angelegten Haltekraft, hier von 11 pN über 12 pN und 14 pN auf 16 pN, zu einer sukzessiven Abnahme der Steigung einer an die Messdaten angelegten, linearen Approximation.

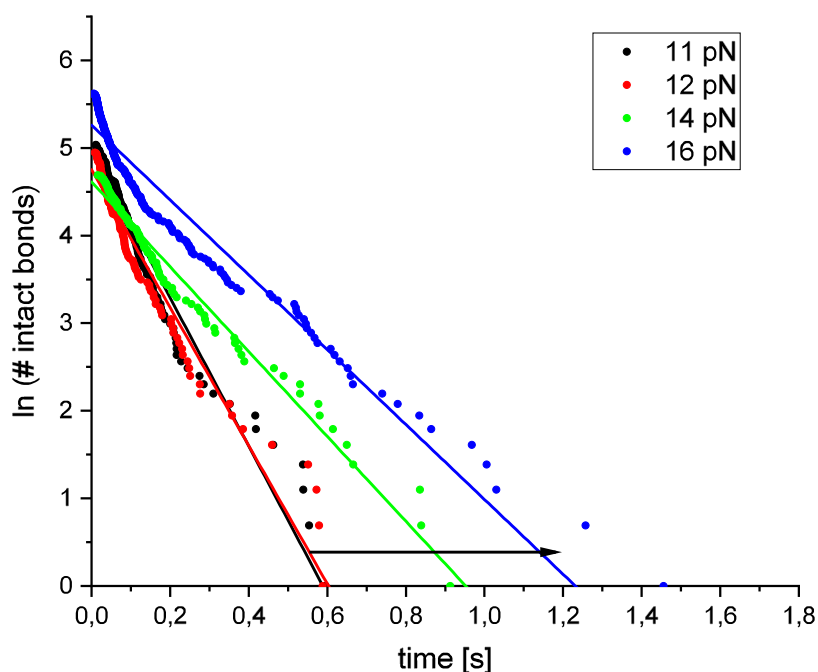


Abbildung 5.1: Messdaten (Punkte) sowie lineare Approximationen (Linien) bei verschiedenen Haltekräften für das System Sulf2HD/HS. Es kommt zu einer Abnahme der Steigung im gezeigten Kraftintervall.

Da, wie bereits diskutiert, diese Steigung und die Lebensdauer reziprok verknüpft sind, entspricht die Abnahme der Steigung einer Zunahme der mittleren Lebensdauer. Diese Änderung der Lebensdauer deutet auf *catch-bond*-Verhalten hin.

Auf Basis dieses Verhaltens wurde für die weitere Analyse das *two-state-two-path*-Modell, das in Kapitel 2.2.2 beschrieben ist, verwendet.

Die so bestimmten exponentiellen Approximationen für die Zustände S_1 und S_2 sowie die Approximation für den Verlauf nach dem *two-state-two-path*-Modell über den gesamten Kraftbereich sind in Abbildung 5.2 gezeigt. Die Grafik zeigt deutlich dreiphasiges *catch-bond*-Verhalten (*slip-catch-slip*). Dieses Verhalten konnte bereits für die hydrophile Domäne der homologen Sulf1 nachgewiesen werden [18].

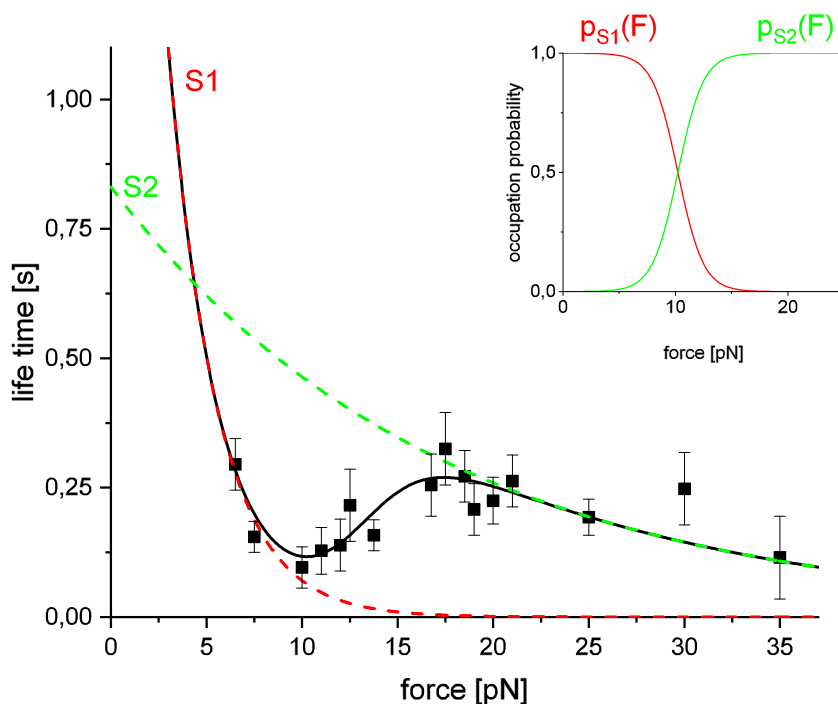


Abbildung 5.2: Berechnete mittlere Lebensdauern für das System Sulf2HD/HS. Es sind sowohl die Approximationen für die beiden Zustände S_1 (rot) bzw. S_2 (grün) eingezeichnet als auch die kombinierte Approximation nach dem two-state-two-path-Modell. Inset: Veränderung der Besetzungswahrscheinlichkeit der beiden Zustände unter Zunahme der externen Kraft.

Im Intervall zwischen 10 pN und 18 pN kommt es mit ansteigender Kraft zu einer Zunahme der Lebensdauer von $\tau = 0,096$ s auf $\tau = 0,325$ s. Während in diesem Intervall die Lebensdauer um den Faktor 3 zunimmt, zeigt sich für Kräfte kleiner als 10 pN oder größer als 18 pN ein exponentieller Abfall der Lebensdauer bei Zunahme der Kraft. Dies entspricht gerade den Vorhersagen des *two-state-two-path*-Modells, da sich das System in diesen Kraftintervallen nahezu ausschließlich in S_1 (niedrige Kräfte) bzw. S_2 (hohe Kräfte) befindet und somit klassisches *slip-bond*-Verhalten zeigt.

Aus den Anpassungen nach dem *two-state-two-path*-Modell folgt für den Zustand S_1 eine Dissoziationsratenkonstante von $k_1^0 = (0,28 \pm 0,20) \text{ s}^{-1}$, die einer Le-

bensdauer von $\tau_1^0 = (3,57 \pm 2,55) s$ entspricht. Die Reaktionslänge ergibt sich zu $x_1 = (1,59 \pm 0,61) nm$. Die entsprechenden Werte für den Zustand bei hohen Kräften S_2 konnten als $k_2^0 = (1,23 \pm 0,92) s^{-1}$, entsprechend einer Lebensdauer von $\tau_2^0 = (0,83 \pm 0,63) s$, und $x_2 = (0,24 \pm 0,17) nm$ berechnet werden.

Der Unterschied in der freien Energie der beiden Zustände S_1 und S_2 lässt sich durch Gleichung 2.12 bestimmen als $\Delta G = (36,8 \pm 15,6) \frac{kJ}{mol}$, während die Differenz der Wechselwirkungslängen entlang der wirkenden Kraft als $\Delta x = (3,6 \pm 1,2) nm$ kalkuliert wurde.

5.1.2 Vergleich mit Sulf1HD

Untersuchungen wie diese wurden bereits für die hydrophile Domäne der isoformen Sulf1 durchgeführt [18]. In Tabelle 5.1 sind die jeweiligen berechneten Größen gegenübergestellt.

HD	x_1 [nm]	x_2 [nm]	Δx [nm]	k_1^0 [s^{-1}]	k_2^0 [s^{-1}]	ΔG [kJ/Mol]
Sulf1HD	1,23	0,32	3,2	0,12	0,24	21,9
Sulf2HD	1,59	0,24	3,6	0,28	1,23	36,8

Tabelle 5.1: Daten der two-state-two-path-Analyse der hydrophilen Domäne von Sulf1 und Sulf2.

Während zwar grundlegend ähnliche Eigenschaften der Bindungen bei beiden Isoformen zu sehen sind, wie beispielsweise vergleichsweise große x_1 und k_2^0 und nahezu identische Δx , zeigt sich, dass die Dissoziationsratenkonstanten der Sulf2HD bedeutend größer sind als die Raten für Sulf1HD. Dies entspricht kürzeren Lebensdauern für das System Sulf2HD/HS. Zudem ist der Unterschied in der freien Energie zwischen beiden Zuständen, ΔG , für die Bindung Sulf2HD/HS signifikant größer.

Für eine mögliche Interpretation dieser Unterschiede ist es hilfreich, sich die Rolle der HD während der Desulfatierung von HS durch Sulf2 zu vergegenwärtigen: Es konnte gezeigt werden, dass Sulf2 ohne HD zwar weiterhin katalytisch aktiv ist, jedoch über keinerlei prozessive Aktivität mehr verfügt [23]. Die HD ermöglicht

also das gerichtete, prozessive Entlanggleiten der Sulfatase an ihrem Substrat. Siehe hierzu auch Kapitel 3.2.

Änderungen in den Bindungsparametern, wie sie zwischen Sulf1HD und Sulf2HD nachgewiesen werden konnten, sollten Einfluss auf diesen katalytischen Prozess nehmen. Mögliche Erklärungsansätze für die Bedeutung der Unterschiede in der Lebensdauer der Bindung und der Differenz der freien Energien zwischen Sulf1HD und Sulf2HD lassen sich aus dem Modell des Prozesses entwickeln: So könnte sich die Geschwindigkeit des Durchlaufens des Prozesses von S_1 nach S_2 und zurück verändern – und damit die Bewegungsgeschwindigkeit entlang des Heparansulfats. Ebenso ist denkbar, dass die Reproduzierbarkeit des Prozesses zwischen Sulf1 und Sulf2 unterschiedlich ist.

Um eine vollständige Desulfatierung einer S-Region ohne vorherige Dissoziation zu gewährleisten, obwohl die Lebensdauer der Bindung Sulf2HD/HS wesentlich niedriger ist, müsste der katalytische Prozess mit seinem Wechsel von S_1 in S_2 und zurück wesentlich schneller durchlaufen werden.

Es ist jedoch bekannt, dass Sulf2 kleine Heparinfragmente deutlich langsamer desulfatiert als Sulf1 [23]. Hier liegt also der Schluss nahe, dass der Prozess nicht bedeutend schneller durchlaufen wird, sondern eher beeinträchtigt wird durch die niedrigeren Lebensdauern, beispielsweise durch vorzeitige Dissoziation.

Hierfür könnte auch sprechen, dass sich die Sulfatierungsmuster von Heparansulfat unterscheiden, falls nur Sulf1 oder Sulf2 vorliegen [87, 88]. Eine Beeinträchtigung des katalytischen Prozesses hat vermutlich Auswirkungen auf Effizienz und Effektivität der Arbeit der Sulfatase und somit auch auf den Sulfatierungsgrad.

Durch fehlende Informationen zur Struktur der Sulfatasen muss die Diskussion der Unterschiede zwischen Sulf1HD und Sulf2HD hier leider rein phänomenologisch bleiben und sich auf funktionale Aspekte beschränken.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass gezeigt werden konnte, dass die hydrophile Domäne von Sulf2 wie erwartet *catch-bond*-Verhalten zeigt. Es gibt deutliche Unterschiede in den Bindungsparametern zwischen Sulf1HD und Sulf2HD; hier wurden mögliche Interpretationsansätze aufgezeigt.

5.1.3 Sulf2HD und K5-NS

Als Kontrollexperiment zur Untersuchung der Bedeutung der 6-O-Sulfate des Heparansulfats wurde zusätzlich die Bindung von S2HD und K5-NS, einem GAG ohne 6-O-Sulfate und 2-O-Sulfate, mittels *Force-Clamp*-Spektroskopie untersucht.

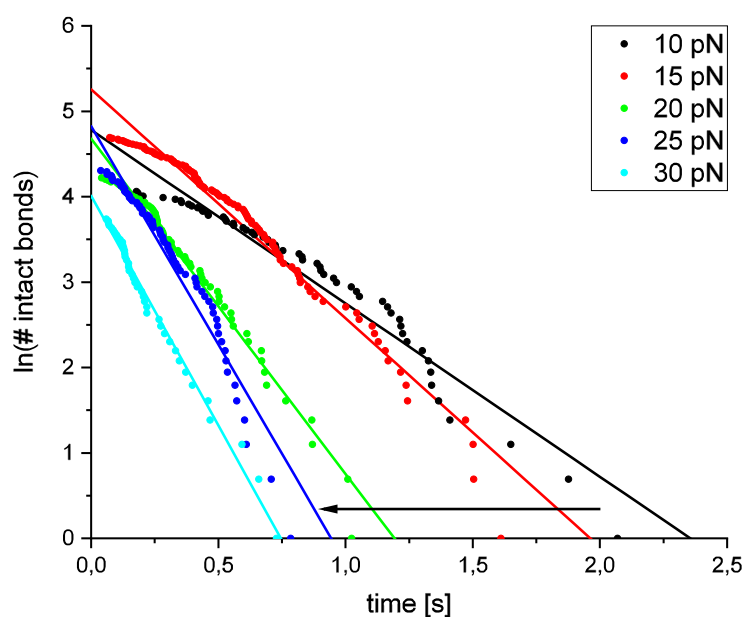


Abbildung 5.3: Messdaten (Punkte) sowie lineare Approximationen (Linien) bei verschiedenen Haltekräften für das System Sulf2HD/K5-NS. Es kommt zu einer Zunahme der Steigung im gesamten untersuchten Kraftbereich. Daten von A. Erol.

Die Bestimmung der mittleren Lebensdauer ergibt hier ein anderes Bild: Für zunehmende externe Kräfte nimmt die Steigung aus den bereits mehrfach betrachteten Auftragungen immer weiter zu. Dies korrespondiert mit einer Abnahme der Lebensdauer und ist in Abbildung 5.3 für einige exemplarische Haltekräfte dargestellt.

Diese monotone Abnahme der Lebensdauer entspricht gerade *slip-bond*-Verhalten. Daher wurden diese Daten nach dem entsprechenden *one-state-one-path*-Modell nach Kramers, Bell und Evans analysiert. Die sich hieraus ergebende exponenti-

elle Approximation ist in Abbildung 5.4 dargestellt. Für dieses System ergibt sich

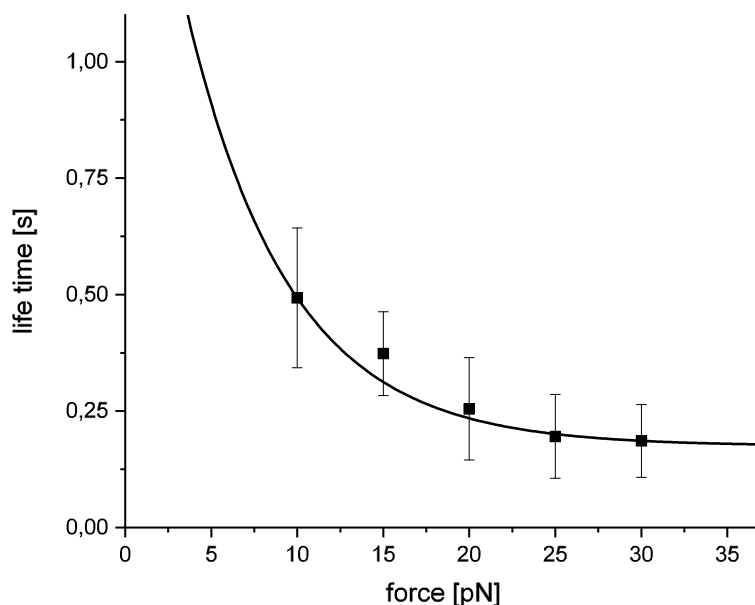


Abbildung 5.4: Berechnete mittlere Lebensdauern für das System Sulf2HD/K5-NS samt approximierten exponentiellem Verlauf. Daten von A. Erol.

eine Dissoziationsratenkonstante von $k_{off}^0 = 0,6 \text{ s}^{-1}$, aus der eine Lebensdauer von $\tau^0 = 1,67 \text{ s}$ folgt, sowie eine Reaktionslänge von $x = 0,4 \text{ nm}$.

Relevanz der 6-O-Sulfate

Das für Experimente mit K5-NS im Vergleich zu Experimenten mit HS ausbleibende *catch-bond*-Verhalten deutet auf die große Relevanz der 6-O-Sulfate der GAGs für die Bindung hin. Dieser Unterschied zwischen der Bindung an HS und an K5-NS wurde bereits in Experimenten mit Sulf1HD beobachtet [18].

Verknüpft man den hier fehlenden zweiten Bindungszustand mit den Überlegungen, die bezüglich des Zusammenhangs zwischen dem *two-state-two-path*-Modell und dem Ablauf des katalytischen Prozesses bereits in Kapitel 3.2 vorgestellt wurden [91], deutet sich an, dass die Anwesenheit der 6-O-Sulfate wesentlich ist für die Anbindung nach der Konformationsänderung während des Prozesses oder die

Konformationsänderung fördert:

Der zweite Zustand des *two-state-two-path*-Modells ist, sofern keine externe Kraft vorliegt, nicht unmittelbar zugänglich. Er kann erreicht werden, wenn es aufgrund thermischer Fluktuationen zu einer Streckung des Moleküls kommt [91]. Die Richtung dieser Streckung kann hierbei durch die Anwesenheit von 6-O-Sulfaten in Richtung der Bewegung der Sulfatase beeinflusst werden. Ebenso ist es vorstellbar, dass die Anwesenheit von 6-O-Sulfaten das notwendige Überschreiten der Energiebarriere für den Wechsel von S_1 in S_2 begünstigt. Am Ende einer S-Region, wenn weitere 6-O-Sulfate fehlen, kann es dann zu einer Ablösung vom Substrat kommen, da der allosterische Effektor für den Wechsel des Bindungszustandes fehlt.

Für Substrate ohne diese 6-O-Sulfate – wie K5-NS – entfallen diese allosterischen Effekte und der Wechsel zwischen zwei gebundenen Zuständen kann nicht erfolgen und es ergibt sich, dem *one-state-one-path*-Modell folgend, ein *slip bond*.

Ebenso ist es vorstellbar, dass die Konformation der Bindung an K5-NS eine völlig andere ist als bei der Bindung an Heparansulfat. So wurde bereits für die Bindung der hydrophilen Domäne der Sulfatase 1 an K5-NS vermutet, dass es sich um rein elektrostatische Wechselwirkungen handelt [18]. Ein solcher, völlig anders gearteter Bindungszustand hätte möglicherweise gar keine Möglichkeit, in einen fester gebundenen Zustand überzugehen. In diesem Bild wären es also nicht die fehlenden 6-O-Sulfate, die einen Zustandswechsel samt anschließender Bindung verhindern, sondern ein völlig anderer Ausgangszustand.

Da die Relevanz der 6-O-Sulfate aber in Messungen mit HS-6S bestätigt werden konnte [90], lässt sich vermuten, dass hier ein Zusammenspiel beider Faktoren, also des anders gearteten Bindungszustandes und des Mangels an Bindungsstellen für die gestreckte Konformation, zum Ausreten von *slip-bond*-Verhalten führt.

5.2 Sulf1: Ergebnisse und Diskussion

5.2.1 Sulf1 und HS

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Experimente mit dem vollständigen Protein Sulf1 vorgestellt. Für die folgende Diskussion und spätere Interpretation ist zu bedenken, dass das vollständige Protein vermutlich über wenigstens vier Bindungsstellen, die an Heparansulfat binden können, verfügt. Zwei dieser Bindungsstellen liegen dabei in der hydrophilen Domäne, zwei weitere konnten vor kurzem in der katalytischen Domäne von Sulf2 identifiziert werden [95]. Der Schluss, dass also auch die katalytische Domäne von Sulf1 über zwei eigenen Bindungsstellen verfügt, liegt hier nahe. Hierauf wird im Verlauf dieses Kapitels noch an verschiedenen Stellen eingegangen.

Für die Experimente mit dem vollständigen Protein war es zunächst notwendig, eine neue Funktionalisierungsstrategie zu entwickeln und zu testen. Diese ist in Kapitel 4.4 dargestellt.

Verifikation der Funktionalisierung

Für die Verifikation, dass die mit dieser Funktionalisierung gemessenen Dissoziationseignisse durch die Wechselwirkung der Sulf1 und HS zustande kommen und nicht durch Wechselwirkungen zwischen Linkern o.ä., wurden eine Reihe von Kontrollexperimenten durchgeführt.

Für diese Experimente wurde die vollständige Präparation mit einer Teilpräparation verglichen. Für die Teilpräparation wurde die Funktionalisierung exakt genauso durchgeführt wie bei der vollständigen Präparation; der Schritt in dem das Protein Sulf1 hinzugefügt wird, wurde jedoch ausgelassen.

Nun konnte für beide Präparationen die Wahrscheinlichkeit, ein richtig positives Ereignis zu detektieren, über viele Messzyklen hinweg bestimmt werden. Es ergab sich eine Wechselwirkungswahrscheinlichkeit von 1,5 % für die vollständige Präparation. Diese auf den ersten Blick niedrige Wahrscheinlichkeit ist für Einzelmolekülexperimente vorteilhaft, um beispielsweise multiple Bindungen zu reduzieren und wurde daher bewusst so niedrig gewählt.

Die Wechselwirkungswahrscheinlichkeit für die unvollständige Präparation lag

bei 0,19 %. Dies bedeutet, dass knapp 0,2 % aller Kurven für Messungen mit der unvollständigen Präparation ein Dissoziationsereignis zeigen. Damit ist nicht vollständig auszuschließen, dass auch einzelne Dissoziationsereignisse für die vollständige Präparation falsch positive Ereignisse sind; ihr Anteil an allen Ereignissen beträgt jedoch nur etwa 12,7 %, wie aus dem Verhältnis der Wechselwirkungswahrscheinlichkeiten hervorgeht. Von diesen falsch positiven Ereignissen wird durch die Auswertung zudem ein signifikanter Teil entfernt, da jede einzelne Kraft-Zeit-Kurve geprüft wird. Zeigt diese Kurve einen untypischen Verlauf, wird sie verworfen. Unspezifische Bindungen sind zudem in der Regel langlebig [17] und können so größtenteils bei der Bestimmung der mittleren Lebensdauer ausgeschlossen werden.

Ergebnisse

Für diese Experimente wurde die Auswertung vorgenommen, wie sie in Kapitel 4.6 beschrieben und auch für die Versuche mit der hydrophilen Domäne angewendet wurde. Zur Bestimmung der Lebensdauern wurde folglich eine Approximati-

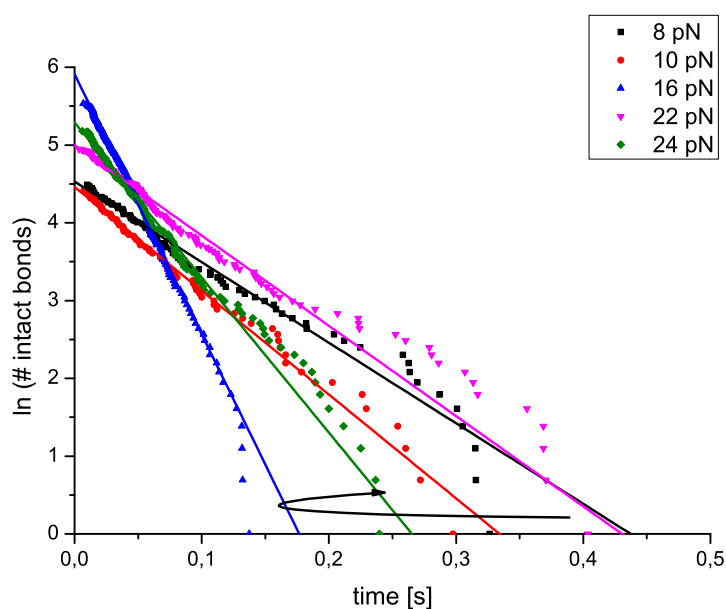


Abbildung 5.5: Beispielhafte Steigungen für das System Sulf1/HS. Der Pfeil deutet den Verlauf der Steigungen an, die erst zunehmen, dann jedoch wieder abflachen.

on benutzt, die an den exponentiellen Zerfallsverlauf der Dissoziationsereignisse angepasst wurde. Hierbei ergab sich eine Änderung der Lebensdauer in Abhängigkeit der Haltekraft F_C . Beispielhafte lineare Approximationen sind in Abbildung 5.5 dargestellt.

Wie in der Abbildung zu erkennen ist, führt eine Zunahme der Haltekraft von 8 pN (schwarz) über 10 pN (rot) auf 16 pN (blau) zu einer Zunahme der Steigung. Dies entspricht einer Abnahme der Lebensdauer. Für Haltekraften von 22 bzw. 24 pN nimmt die Steigung jedoch wieder ab und die Lebensdauer somit zu. Es handelt sich also um *catch-bond*-Verhalten.

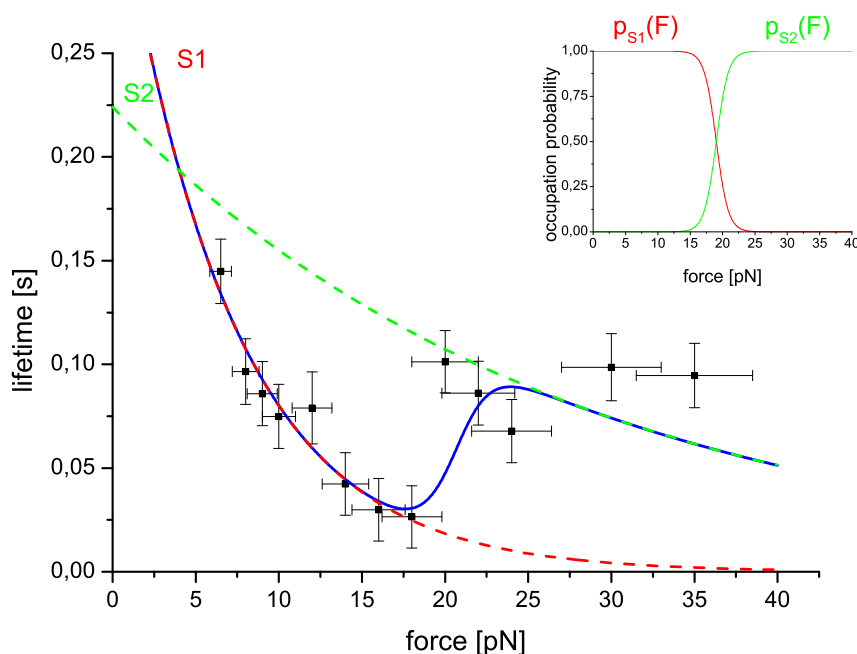


Abbildung 5.6: Lebensdauer in Abhängigkeit der Kraft für das System Sulf1/HS. Eingezeichnete Kurven für die Zustände S_1 (rot), S_2 (grün) und für die Überlagerung beider Zustände (blau) sind Trendlinien. Inset: Veränderung der Besetzungswahrscheinlichkeit $p_{S_1}(F)$ bzw. $p_{S_2}(F)$ der Zustände S_1 (rot) und S_2 (grün) in Abhängigkeit der Kraft.

Eine Auftragung aller mittleren Lebensdauern in Abhängigkeit der externen Kraft ist in Abbildung 5.6 gezeigt. Auch hier ist der *catch-bond*-Verlauf zwischen etwa 17 pN und 24 pN zu erkennen. Für dieses System handelt es sich um ein dreiphasiges Verhalten: Die Lebensdauern nehmen zunächst ab (*slip bond*), dann zu (*catch*

bond) und im Anschluss wieder ab (*slip bond*). Dieses Verhalten zeigen auch die bereits untersuchten hydrophilen Domänen, wie in Kapitel 5.1.1 dargestellt und in [18] veröffentlicht. Auch für das Vollprotein wurde daher das *two-state-two-path*-Modell für die weitere Analyse verwendet.

Wie in Abbildung 5.6 zu sehen ist, liegt das Intervall, in dem die Lebensdauer der Bindung zunimmt, für dieses System zwischen 17 pN und 24 pN und damit deutlich über dem Kraftbereich von 10 - 20 pN, in dem *catch-bond*-Verhalten für die hydrophile Domäne auftritt. Damit einhergehend ist der Zustand S_2 , den das System bei hohen externen Kräften einnimmt, in dieser Messung nur durch wenige Datenpunkte charakterisiert, die zudem noch eine nicht zu vernachlässigende Streuung aufweisen. Eine Diskussion über mögliche Gründe für diesen Verlauf findet sich später in diesem Kapitel.

Trotz oben genannter Einschränkungen wurde das *two-state-two-path*-Modell verwendet, um das System zu charakterisieren. Es ergab sich eine Dissoziationsratenkonstante aus dem Zustand S_1 von $k_1^0 = (2,86 \pm 2,28) s^{-1}$. Dies entspricht einer Lebensdauer von $\tau_1^0 = (0,35 \pm 0,28) s$. Die Reaktionslänge konnte als $x_1 = (0,60 \pm 0,38) nm$ abgeschätzt werden.

Für den Zustand S_2 ergab sich die Dissoziationsratenkonstante als $k_2^0 = (4,46 \pm 3,014) s^{-1}$, entsprechend einer Lebensdauer von $\tau_2^0 = (0,22 \pm 0,15) s$. Die Reaktionslänge als Fit-Parameter wurde mit künstlichen Grenzen bestimmt und liegt bei $x_2 = 0,15 nm$. Für das gesamte System wurde nun die Differenz der freien Energie zwischen den beiden gebundenen Zuständen S_1 und S_2 bestimmt zu $\Delta G_{S_1S_2} = (52,3 \pm 72,6) \frac{kJ}{Mol}$.

Eine solche quantitative Analyse in Hinblick auf Ratenkonstanten und Energien ist aufgrund der Streuung der Datenpunkte ungenau und, wie oben zu sehen, mit hohen Fehlern behaftet. Die in Abbildung 5.6 gezeigten Kurvenverläufe sind aus eben diesen Gründen als Trendlinien zu verstehen, die lediglich ein mögliches Verhalten des Systems darstellen. Insbesondere für die Approximation, die zum Zustand S_2 gehört, liegen für eine korrekte Quantifizierung der Parameter der Approximation nicht ausreichend Datenpunkte vor, daher wurde hier über das Setzen von künstlichen Grenzen für die Parameter eine Trendlinie erzeugt. Da diese Parameter auch für die Bestimmung weiterer, charakteristischer Größen wie der

Differenz der freien Energie der beiden Zustände verwendet werden, sind sämtliche berechneten Größen mit hoher Unsicherheit behaftet und können höchstens eine ungefähre Orientierung geben.

Vergleich mit Sulf1HD

Ein Vergleich zu den Daten, die für die hydrophile Domäne des Proteins erhoben wurden [18], ist in Tabelle 5.2 gezeigt. Während auch hier, ähnlich wie beim Vergleich der HDs der beiden Isoformen Sulf1 und Sulf2, grundlegende Tendenzen gleich bleiben, gibt es signifikante Unterschiede in den abgeschätzten Parametern. Hierbei fallen insbesondere zwei Unterschiede zwischen der hydrophilen Domä-

	x_1 [nm]	x_2 [nm]	Δx [nm]	k_1^0 [s^{-1}]	k_2^0 [s^{-1}]	$\Delta G_{S_1S_2}$ [kJ/Mol]
Sulf1HD	1,23	0,32	3,2	0,12	0,24	21,9
Sulf1	0,6	0,15	4,4	2,86	4,46	52,3

Tabelle 5.2: Daten der two-state-two-path-Analyse der hydrophilen Domäne von Sulf1 sowie des Vollproteins Sulf1.

ne und dem vollständigen Protein ins Auge:

Die wesentlich erhöhten Dissoziationsratenkonstanten k_1^0 und k_2^0 , die von $0,12 s^{-1}$ auf $2,86 s^{-1}$ bzw. von $0,24 s^{-1}$ auf $4,46 s^{-1}$ angestiegen sind, sowie eine bedeutend höhere Differenz der freien Energien zwischen Zustand S_1 und Zustand S_2 ΔG , die für das vollständige Protein $52,3 kJ/Mol$ beträgt, für die hydrophile Domäne jedoch $21,9 kJ/Mol$.

Zudem findet, wie bereits erwähnt, der Übergang zwischen S_1 und S_2 für das vollständige Protein bei höheren Kräften statt und der *two-state-two-path*-Verlauf aus Abbildung 5.6 für hohe Kräfte weist eine höhere Streuung der Datenpunkte auf.

Diskussion

Im Folgenden werden diese vier Aspekte – die erhöhte Differenz der freien Energie, die erhöhten Dissoziationsraten, die höhere Kraft für den Zustandswechsel und der *two-state-two-path*-Verlauf für hohe Kräfte – diskutiert und mögliche Erklärungen präsentiert. Eine hierauf aufbauende Interpretation der vorliegenden

Daten und Erklärungen in Bezug auf den katalytischen Prozess findet sich in Kapitel 5.2.3.

Vor dem Hintergrund, dass hier das vollständige Protein vermessen wurde – und nicht nur die Domäne, die vermutlich für die Bindung verantwortlich ist – erscheint es plausibel, dass es bei einer prozessoralen Aktivität, die eine Bewegung entlang des Substrates ermöglicht [23, 91], zu einem beständigen, koordinierten Wechsel zwischen Dissoziation und Assoziation einzelner Bindungsstellen kommen sollte. Dies würde durch höhere Dissoziationsratenkonstanten – womöglich gepaart mit höheren Assoziationsraten – unterstützt.

Interessanterweise wurde auch gezeigt, dass die Affinität zu Heparansulfat der HD alleine höher ist als die des gesamten Proteins [90]. Dies könnte zumindest einen Teil des hier beobachteten Unterschiedes in den Dissoziationsratenkonstanten erklären: Eine niedrigere Affinität, wie sie für das gesamte Protein gemessen wurde, kann mit einer höheren Dissoziationskonstante - und damit höheren Dissoziationsratenkonstanten - korrespondieren. Dies gilt allerdings nur, sofern die Assoziationsratenkonstante der beiden Systeme in etwa vergleichbar ist. In den hier durchgeführten Experimenten konnte die Assoziationsratenkonstante jedoch nicht bestimmt werden, daher ist ein Zusammenhang der beiden Beobachtungen bisher nur eine Vermutung.

Wie zu Beginn der Präsentation der Ergebnisse für dieses System bereits erwähnt wurde, ist mittlerweile zudem bekannt, dass auch die katalytische Domäne der Sulfatase 2 über Bindungsstellen für Heparansulfat verfügt [95]. Diese beiden Bindungsstellen werden, nach den Aminosäuren, aus denen die Bindungsmotive zusammengesetzt sind, als LKKK und VKEK bezeichnet. Es wird vermutet, dass diese Bindungsstellen die Aufgabe übernehmen, die Zuführung des Substrates zum katalytischen Zentrum zu stabilisieren. Hierfür bilden die Bindungsstellen elektrostatische Wechselwirkungen zwischen einem 6-O-Sulfat und einer Lysin-Seitenkette (LKKK) bzw. eine Salzbrücke zwischen einem 2-O-Sulfat und einer Aminogruppe (VKEK) aus. Das auch die CAT-D von Sulf1 über Bindungsstellen verfügt erscheint aufgrund der großen Ähnlichkeit der beiden Isoformen plausibel.

Die Veränderung der Energiedifferenz gegenüber der hydrophilen Domäne deutet auf Änderungen im Bindungsverhalten gegenüber dem System Sulf1HD/HS hin. Eine Erhöhung der Differenz der freien Energie der beiden Zustände $\Delta G_{S_1S_2}$ gegenüber den Zuständen für die Bindung der HD mit HS könnte dabei durch verschiedene Faktoren zustande kommen. Eine Möglichkeit ist eine stärkere Absenkung des stärker gebundenen Zustandes S_2 aus dem *two-state-two-path*-Modell. Eine solche Absenkung könnte durch die Ausbildung zusätzlicher Bindungen in Zustand S_2 , beispielsweise von der katalytischen Domäne, bedingt sein.

Zusätzliche Bindungen als Grund für die Absenkung des stärker gebundenen Zustandes wird bereits für das Zusammenspiel der beiden Bindungsstellen in der HD und der Konformationsänderung hin zu einer gestreckten Konformation vermutet [91]. Eine noch stärkere Absenkung des Zustandes S_2 durch zusätzliche Bindungen der CAT-D erscheint daher vorstellbar.

Die beobachtete Verschiebung des Überganges zwischen den beiden Zuständen S_1 und S_2 zu höheren Kräften spricht möglicherweise auch für eine gewisse Stabilisierung des Systems, wie sie ebenfalls durch zusätzliche Bindungen denkbar ist.

Hier wäre es nötig, weitere Messungen mit dynamischer Kraftspektroskopie durchzuführen und mittels der Gleichung von Jarzynski zu analysieren. Dies würde einen Zugang zu der freien Energie der einzelnen Zustände und insbesondere der Aktivierungsbarriere zu ermöglichen.

Weiterhin kann der in Abbildung 5.6 gezeigte *catch-bond*-Verlauf für den Zustand S_1 sehr gut approximiert werden, zeigt jedoch einen undeutlicheren, sprich stärker streuenden, Verlauf für den Zustand S_2 . Dies könnte ein Hinweis auf ein Zusammenspiel zwischen CAT-D und HD sein, in dem Bindungen der CAT-D im Zustand S_2 ausgebildet sind, worauf die oben diskutierte Differenz der freien Energie ebenfalls hindeutet: Wird ein Dissoziationsereignis bei hohen Kräften detektiert, kann das System vorher in unterschiedlichen Zuständen sein. So wird vermutlich die HD in gestreckter Konformation gebunden sein, ob und welche der schwächeren Bindungen der CAT-D [95] ausgebildet sind, ist jedoch nicht ohne Weiteres zu unterscheiden. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass eine

vermutlich nicht zu vernachlässigende artifizielle Kraft auf das System wirkt, ist vorstellbar, dass die schwächeren Bindungen der CAT-D zeitweilig gelöst werden. So könnten die beobachteten Ereignisse aus Überlagerungen von Unterzuständen bestehen. Der undeutlichere Verlauf der *two-state-two-path*-Approximation würde hier also dadurch zustande kommen, dass im physiologischen, also kraftfreien, System im Zustand S_2 Bindungsstellen der CAT-D gebunden haben, es hier im Experiment jedoch durch die Kraft zu Störeinflüssen auf diese Bindungen samt partieller Dissoziation kommt.

Dieses Phänomen ist für kleine externe Kräfte nicht zu beobachten. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Kräfte dann zu klein sind, um die Bindungen teilweise zu lösen. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass im Zustand S_1 , also bei kleinen externen Kräften, weniger Bindungen der katalytischen Domäne ausgebildet sind.

Im Zusammenspiel der hier diskutierten Überlegungen mit den Erklärungen für die erhöhte Energiedifferenz lässt sich also begründet vermuten, dass in S_2 mehr Bindungen der CAT-D ausgebildet sind als in S_1 .

Die hier diskutierten Punkte werden später in Kapitel 5.2.3 noch einmal aufgegriffen und in Beziehung zum katalytischen Prozess gesetzt.

5.2.2 Sulf1 und K5-NS

Für die Messungen des gesamten Proteins Sulf1 mit K5-NS wurde ebenfalls die Auswertung aus Kapitel 4.6 verwendet.

Ergebnisse

Die Auftragung des Logarithmus der noch intakten Bindungen über die verstrichene Zeit, wie sie in Abbildung 5.7 zu sehen ist, zeigt sehr ähnliche Verläufe sowohl für eine Kraft von 10 pN, die vermutlich vor einem möglichen *catch-bond*-Intervall liegen müsste, als auch für eine Kraft von 15 pN. Eine Kraft von 15 pN war für das System Sulf1/HS schon in der Nähe des Lebensdauer-Minimums. Bei einer Kraft von 20 pN, die bisher zum oberen Ende des Regimes der ansteigenden Lebensdauern gehörte, war auch keine signifikante Änderung der Steigung zu erkennen. Diese ausbleibenden signifikanten Änderungen in der Steigung resultieren in sehr geringen Änderungen in der Lebensdauer.

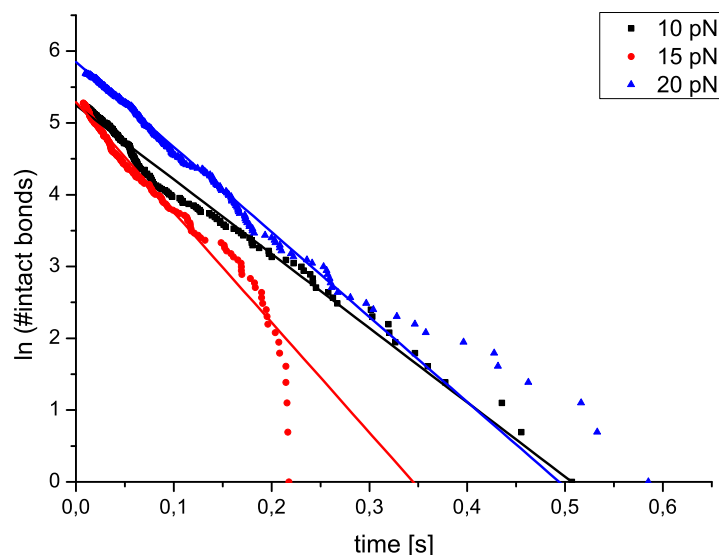


Abbildung 5.7: Beispielhafte Steigungen für das System Sulf1/K5-NS. Anscheinend nimmt die Kraft keinen Einfluss auf die Steigung.

Wie in Abbildung 5.8 zu erkennen ist, scheinen die Lebensdauern sich nur wenig zu verändern. Hier liegt also eine Unabhängigkeit zwischen angelegter externer Kraft und Lebensdauer vor. Es ist weder *slip-bond*-Verhalten mit einem exponentiellen Abfall der Lebensdauer noch *catch-bond*-Verhalten mit einem zwischenzeitlichen Anstieg der Lebensdauer zu beobachten.

Dieser Verlauf ist unerwartet, insbesondere da die Messungen der hydrophilen

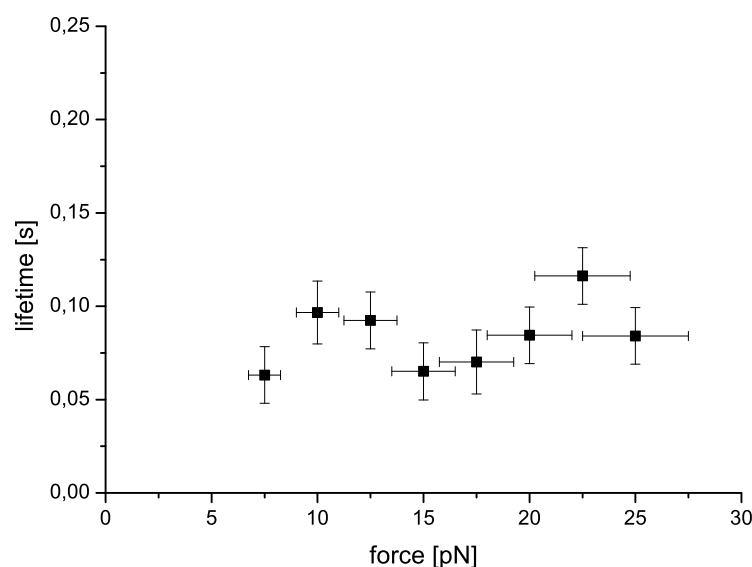


Abbildung 5.8: Lebensdauer-Kraft-Graph für das System Sulf1/K5-NS. Die Lebensdauer scheint nicht von der Kraft abzuhängen.

Domänen im Zusammenspiel mit K5-NS einen *slip-bond*-artigen Verlauf aufweisen, wie in Kapitel 5.1.3 und in [18, 93] gezeigt wurde.

Da eine Approximation nach keinem der vorgestellten Modelle sinnvoll erscheint, wurde darauf verzichtet. Die folgende Diskussion bleibt also vollständig qualitativ.

Hierbei ist festzustellen, dass das gesamte Protein sich anders verhält als die hydrophile Domäne alleine. Der Unterschied im Verhalten scheint also in der zusätzlich vorhandenen Domäne CAT-D zu liegen.

Diskussion

Im Folgenden soll kurz besprochen werden, ob es eine Erklärung für das Vorliegen dieser Kraftunabhängigkeit der Lebensdauer geben kann. Mögliche Interpretationsansätze im Hinblick auf den katalytischen Prozess werden in Kapitel 5.2.3 diskutiert.

Wie bereits in Kapitel 2.2.2 erläutert wurde, wurden kraftunabhängige Bindungen bereits für Cadherine experimentell bestätigt [17]. Das Auftreten dieses ungewöhnlichen Verhaltens konnte dort mit größerer Beweglichkeit der Mutanten, die ideale Bindungen ausbildeten, begründet werden [60]. Diese größere Beweglichkeit kam in den Experimenten mit Cadherinen dadurch zustande, dass weniger Bindungen zwischen den Bindungspartnern ausgebildet wurden. Dies ermöglichte Umlagerungen bzw. Konformationsänderungen, die zu keiner Änderung der molekularen Ausdehnung des Komplexes durch die Kraft führten und somit die Bedingung für das Vorliegen von idealen Bindungen erfüllten [60].

Eine Erklärung der Unterschiede zwischen der Bindung von Sulf1HD bzw. Sulf1 an K5-NS könnte also möglicherweise mit einer größeren Beweglichkeit des gesamten Proteins zusammen hängen. Dies würde es unter einer externen Zugkraft ermöglichen, dass es zu Torsions- oder Drehbewegungen kommt und nicht zu einer Vergrößerung der molekularen Ausdehnung bzw. einem „Auseinanderziehen“ der beiden Bindungspartner.

Wie eine solche Änderung des Bindungszustandes mit der katalytischen Domäne verknüpft sein könnte, soll im Folgenden diskutiert werden.

Die Bindung zwischen der hydrophilen Domäne und K5-NS lässt sich durch die hohe Ladung und damit vorhandene elektrostatische Wechselwirkung begründen [18]. Anscheinend nimmt hierauf aber die Anwesenheit der katalytischen Domäne Einfluss, so dass die Bindung in einem Zustand vorliegt, der mehr Beweglichkeit oder Freiheitsgrade in der Bewegung bietet.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass im gesamten Protein die hydro-

phile Domäne nicht frei zugänglich ist. Es ist vorstellbar, dass beispielsweise Teile der katalytischen Domäne die Ausbildung der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen HD und Substrat abschirmen, anderweitig verhindern oder zumindest reduzieren. Kommt es über das gesamte Protein zu weniger Wechselwirkung mit dem Substrat, ist denkbar, dass ein Ziehen am Komplex eher eine Umlagerung oder Konformationsänderung hervorruft, da das Protein an weniger Punkten am Substrat assoziiert ist. Dies würde sich mit der Überlegung, die weiter oben für Cadherine vorgestellt wurde, verknüpfen lassen und so das Vorliegen einer idealen Bindung erklären. Dieser Gedanke wird in Kapitel 5.2.3 fortgeführt.

5.2.3 Interpretation

In diesem Abschnitt soll versucht werden, die gewonnenen Daten und ihre vorgestellten Erklärungen in Beziehung zum Modell des katalytischen Prozess zu setzen. Für diese Diskussion, die sich an vielen Stellen mit Bindungszuständen befassen wird, ist es wichtig, die verschiedenen Zustände zu unterscheiden. Daher werden im Folgenden die Bindungszustände des vollständigen Proteins an Heparansulfat mit S_1 bzw. S_2 bezeichnet. Sofern Bezug auf den Zustand der Bindung der hydrophilen Domäne genommen werden soll, werden diese als S_1^{HD} und S_2^{HD} bezeichnet.

Das Modell des katalytischen Prozesses nimmt an, dass eine Desulfatierung im gestreckten Zustand der HD und damit im stärker gebundenen Zustand S_2^{HD} der Bindung zwischen HD und HS stattfindet [91]. Eine Bewegung entlang des Substrates wird durch den Wechsel in den relaxierten Zustand und damit in Bindungszustand S_1^{HD} ermöglicht [91].

Die folgenden Ergebnisse und Erklärungen konnten bisher in dieser Arbeit für die Experimente mit Sulf1 präsentiert werden und sollen im Verlauf der Interpretation erneut aufgegriffen werden:

- Bei der Wechselwirkung mit K5-NS kommt es zu einer idealen Bindung, die ein Hinweis auf eine erhöhte Beweglichkeit sein könnte. Diese könnte durch eine Abschirmung der hydrophilen Domäne durch die katalytische Domäne bedingt sein.

- Bei der Wechselwirkung mit HS erfolgt der Übergang von S_1 nach S_2 im Vergleich zur hydrophilen Domäne bei höheren Kräften. Hier könnte ein Hinweis auf eine Stabilisierung des Systems vorliegen, möglicherweise ausgelöst durch zusätzliche Bindungsstellen. Die Vermutung, dass hier die CAT-D beteiligt ist, liegt nahe.
- Die Differenz der freien Energie der beiden Zustände S_1 und S_2 $\Delta G_{S_1S_2}$ nimmt im Vergleich zum System Sulf1HD/HS zu, was durch die Ausbildung zusätzlicher Bindungen, vermutlich von der katalytischen Domäne, in Zustand S_2 zustande kommen könnte.
- Die Datenpunkte für hohe Kräfte sind für das System Sulf1/HS mit einer vergleichsweise hohen Streuung behaftet. Das Vorliegen der Bindungsstellen der CAT-D und einer externen Kraft, die diese Bindungen teilweise lösen könnte, könnte zu verschiedenen Unterzuständen führen, deren Überlagerung einen undeutlicheren Verlauf zur Folge hat. Zusammen mit dem vorherigen Ergebnis ergibt sich hier die Vermutung, dass in S_2 mehr Bindungen der CAT-D ausgebildet sind.

Aus diesen Daten und dem bisherigen Verständnis des katalytischen Prozesses ergeben sich Interpretationsansätze, die hier vorgestellt werden sollen.

Gating-Funktion der katalytischen Domäne

Eine Abschirmung der Wechselwirkung zwischen hydrophiler Domäne und K5-NS durch die katalytische Domäne, die zu einer höheren Beweglichkeit und damit zu einer Kraftunabhängigkeit führt, lässt sich möglicherweise mit einer Art Gating-Funktion erklären: Über die Sulfatase ist bekannt, dass sie Substrate bindet, die über 2-O-Sulfate oder 6-O-Sulfate verfügen [90]. Dies korrespondiert mit der Identifizierung zweier Bindungsstellen in der katalytischen Domäne, je eine für 2-O-Sulfate und 6-O-Sulfate [95]. K5-NS, das Substrat bei dem eine ideale Bindung festgestellt wurde, verfügt jedoch weder über 2-O-Sulfate noch über 6-O-Sulfate und verfügt daher nicht über Bindungsstellen für die katalytische Domäne.

Zudem wurde gezeigt, dass die Spezifität der Bindung an Heparansulfat im Wesentlichen durch die hydrophile Domäne bedingt ist [90]. Dies führt zu der Überlegung, dass die Bindung des Proteins an sein Substrat ein koordinierter Prozess der katalytischen und hydrophilen Domäne ist [23, 90].

Bedenkt man den Aufbau der katalytischen Domäne und die physiologische Aufgabe der Sulfatase, lässt sich ein spekulatives Bild entwerfen, in dem die CAT-D die HD abschirmt und unzugänglich macht. Dies ist schematisch in Abbildung 5.9 gezeigt.

Eine solche Gating-Funktion der CAT-D könnte in Abhängigkeit zum Vorliegen von 2-O-Sulfaten und 6-O-Sulfaten am Substrat stehen: Liegen am Substrat 2-O-Sulfate oder 6-O-Sulfate vor, an die die katalytische Domäne binden könnte, kommt es zu einer konformationellen Änderung des Proteins mit einer partiellen Bindung der CAT-D, bei der die hydrophile Domäne zugänglich wird.

Hier würden also beispielsweise allosterische Effekte oder andere Wechselwirkungen mit partieller Bindung der CAT-D eine „Demaskierung“ der HD

auslösen, wie es in Abbildung 5.10 dargestellt ist. Diese käme aber nur bei Vorliegen der 2-O-Sulfate und 6-O-Sulfate zustande. Bei einer Wechselwirkung mit K5-NS bliebe die HD also unzugänglich oder abgeschirmt.

Das Vorliegen von *slip-bond*-Verhalten beim System Sulf1HD/HS [18] würde die-

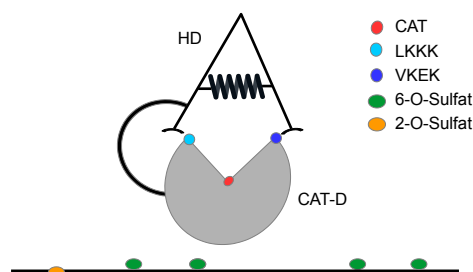


Abbildung 5.9: Modell zur Abschirmung der hydrophilen Domäne. Die Abschirmung kommt durch die katalytische Domäne zustande.

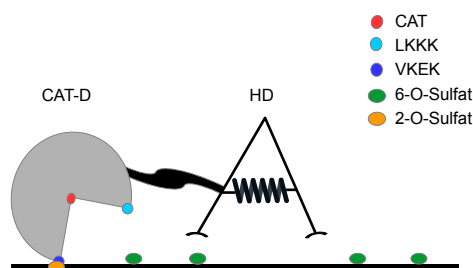


Abbildung 5.10: Modell unmittelbar vor Anbindung der hydrophilen Domäne an das Substrat. Es kann nicht entschieden werden, welche der Bindungsstellen der CAT-D beteiligt ist.

se Vermutung stützen, da ohne CAT-D auch keine Maskierung der hydrophilen Domäne zu erwarten ist.

Das Phänomen, dass das Vorhandensein eines Liganden die Konformation eines Proteins beeinflussen kann, wurde schon mehrfach beobachtet [96].

Vor dem Hintergrund der biologischen Funktion der Sulf1 erscheint dies plausibel: GAGs, die gar nicht oder nur N-sulfatiert sind, können nicht an der 6-O-Position desulfatiert werden und sind daher für das Protein nicht relevant. Liegt jedoch eine solche Sulfatierung vor, kommt es zu einem „Aufklappen“ des Proteins und die HD kann binden.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wäre es sinnvoll, *Force-Clamp*-Experimente mit Sulf1 und beispielsweise HS-6S, also HS, dessen 6-O-Sulfat-Gruppen bereits entfernt wurden, durchzuführen. Hier sind zwei mögliche Resultate denkbar: Kommt es zu einer partiellen Bindung der CAT-D, sind die 2-O-Sulfate, die hier noch vorliegen, daran beteiligt. Der Lebensdauer-Kraft-Graph sollte dann *slip-bond*-Verhalten zeigen. Das Vorliegen einer *catch bond* wäre hier unerwartet, da bereits gezeigt werden konnte, dass hierfür die 6-O-Sulfate notwendig sind [18]. Bei einer Kraftunabhängigkeit der Lebensdauer, also einer idealen Bindung, liegt der Schluss nahe, dass es nicht zu einer partiellen Bindung kommt und somit die 6-O-Sulfate auch für die initiale, partielle Bindung der CAT-D entscheidend sind.

Idealerweise ließen sich diese Experimente mit Substraten wiederholen, die über 6-O-Sulfate, aber nicht 2-O-Sulfate, verfügen. Sind die 6-O-Sulfate an der partiellen Bindung der katalytischen Domäne, die für die Zugänglichkeit der HD nötig ist, beteiligt, sollte ein *catch-bond*-Verlauf des Lebensdauer-Kraft-Graphen beobachtet werden können. Die hydrophile Domäne wäre aufgrund der partiellen Bindung der CAT-D zugänglich; das Vorhandensein von 6-O-Sulfaten ermöglicht dann die Ausbildung des stärker gebundenen Zustandes der HD und damit *catch-bond*-Verhalten.

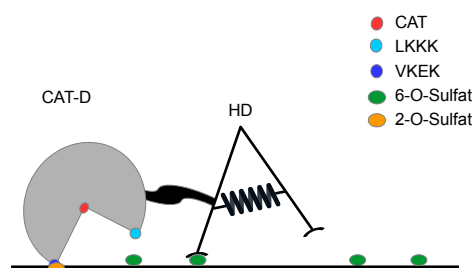
Sind die 6-O-Sulfate nicht an der partiellen Bindung der CAT-D beteiligt, wäre hier auch eine ideale Bindung möglich.

Durch die Kombination der Experimente mit beiden Substraten ließe sich also

potentiell feststellen, welche Bindungsstelle der katalytischen Domäne an der Gating-Funktion beteiligt ist.

Zustand S_1

Bei Experimenten mit der hydrophilen Domäne und Heparansulfat wird vermutet, dass die initiale Anbindung im Zustand S_1^{HD} erfolgt [91]. Für das hier betrachtete System lässt sich also vermuten, dass nach der partiellen Anbindung der CAT-D, die durch die Gating-Funktion plausibel erscheint, initial zunächst die hydrophile Domäne im Zustand S_1^{HD} anbindet, wie es in Abbildung 5.11 schematisch dargestellt ist. Ein weiterer Hinweis hierfür könnte in der geringeren Affinität [95] der CAT-D zu HS im Vergleich zur HD liegen .



s

Abbildung 5.11: Modell einer möglichen Bindung des Proteins an HS in Zustand S_1 .

Die höhere Kraft, die für den Übergang in S_2 nötig ist, spricht dafür, dass der Zustand S_1 stabiler ist als der Zustand S_1^{HD} . Eine höhere Stabilität könnte durch mehr Bindungen erreicht werden und ist somit ein weiteres Indiz für eine zumindest partielle Anbindung der CAT-D und damit für die Gating-Funktion.

Die bisherigen Überlegungen korrespondieren weiterhin mit den experimentellen Daten insofern, als dass der Zustand S_1 der Bindung im Lebensdauer-Zeit-Graphen eindeutig als exponentieller Abfall der Lebensdauer mit der Kraft approximiert werden kann. Dies könnte ein Hinweis auf einen eindeutigen Bindungszustand – Bindung des Substrates durch eine Bindungsstelle der HD und eine Bindungsstelle der CAT-D – sein.

Der (Bindungs-) Zustand S_1 des gesamten Proteins würde sich somit aus dem Bindungszustand S_1^{HD} , in dem die hydrophile Domäne in einer relaxierten Konformation vorliegt, und einer partiellen Bindung der CAT-D zusammensetzen.

Zustand S_2

Die bereits diskutierte Differenz der freien Energie der Zustände S_1 und S_2 , $\Delta G_{S_1S_2}$, könnte ein Hinweis auf Bindungen im Zustand S_2 , die im Zustand S_1 nicht vorliegen, sein. Möglicherweise deutet die im Vergleich zum System Sulf1HD/HS erhöhte Energiedifferenz auf zusätzliche Bindungen hin, die im System Sulf1HD/HS nicht vorhanden sind. Nach den bisher geschilderten Überlegungen zur Gating-Funktion und zum Zustand S_1 liegt es daher nahe, dass im Zustand S_2 beide Bindungsstellen der CAT-D an das Substrat assoziiert sind und die HD in ihrer gestreckten Konformation, also in S_2^{HD} , vorliegt. Eine schematische Darstellung hiervon findet sich in Abbildung 5.12.

Die Vermutung, dass der undeutliche Verlauf der *two-state-two-path*-Approximation für hohe Kräfte durch eine Überlagerung von Unterzuständen zustande kommt, lässt sich hiermit verknüpfen: Sind im physiologischen Zustand S_2 alle vier Bindungen ausgeprägt, kann die externe Kraft Unterzustände induzieren, deren Unterschied in der Anzahl der ausgebildeten Bindungen der CAT-D liegt.

Die Hypothese, dass hier alle vier Bindungsstellen assoziiert sind, lässt sich ebenfalls damit verknüpfen, dass gezeigt werden konnte, dass die CAT-D auch alleine das Substrat binden kann [90], was den Schluss nahelegt, dass es sich um einen koordinierten Vorgang der beiden Domänen handelt [95]. Dies könnte wiederum ein Hinweis auf eine Gating-Funktion sein.

Die Hypothese, dass sämtliche Bindungen der CAT-D und die Streckung der HD, entsprechend Zustand S_2^{HD} , im physiologischen System im Zustand S_2

gleichzeitig vorhanden sind, unterstützt die Vermutung, dass im Zustand S_2^{HD} die Desulfatierung erfolgt [91]. Das Vorhandensein der Bindungen an der CAT-D, die mutmaßlich für die Zuführung des Substrates an das katalytische Zentrum mitver-

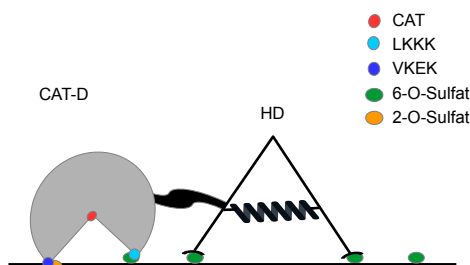


Abbildung 5.12: Schematisches Modell der Bindung des vollständigen Proteins an HS in Zustand S_2 . Die Bindungsstellen der CAT-D haben auch an das Substrat koordiniert.

antwortlich sind [95], wäre hier zu erwarten.

Die eingangs erwähnte Differenz der freien Energie liegt mit $\Delta G_{S_1S_2} = 52,3 \frac{\text{kJ}}{\text{Mol}}$ interessanterweise etwas oberhalb der Energie, die durch eine einzelne Desulfatierung von HS frei wird. Diese konnte zu $51,6 \frac{\text{kJ}}{\text{Mol}}$ bestimmt werden [91].

Unter Betrachtung der weiter oben ausgeführten Überlegungen zu den Fehlern der quantitativen Daten ist eine solche Interpretation allerdings schwierig. Aufgrund der vergleichbaren Größe der Zahlen lässt sich höchstens die Hypothese aufstellen, dass die Desulfatierung auch im gesamten Protein vermutlich ausreichend Energie bereitstellen könnte, um den Wechsel zurück in den schwächer gebundenen Zustand zu ermöglichen. Für eine genauere Analyse wären hier eine Untersuchung nach Jarzynski und zudem mehr Datenpunkte für eine bessere Qualität der Approximation nach dem *two-state-two-path*-Modell nötig.

Um ein, möglicherweise raupenartiges, Entlangbewegen der Sulfatase am Substrat zu ermöglichen, müsste es zu zyklischen Dissoziationen und Assoziationen sowie koordinierten Konformationsänderungen kommen. Im bisherigen Bild der prozessoralen Abläufe führt die Desulfatierung, die im gestreckten Zustand der HD S_2^{HD} stattfindet, zur (Teil-)Dissoziation und der Bewegung entlang des Stranges [91], die dann in Zustand S_1^{HD} endet. Dies lässt sich mit dem hier diskutierten Überlegungen verbinden: Die Desulfatierung kann dazu führen, dass auch die Bindungen, die von der CAT-D ausgebildet wurden, partiell dissoziieren und in einem koordinierten Wechselspiel mit der Bindung der hydrophilen Domäne die Beweglichkeit wiederherstellen bzw. erhöhen, ohne dass es zu einer vollständigen Dissoziation kommt. Würden beide Bindungen der CAT-D hingegen in Zustand S_1 der Bindung dauerhaft vollständig vorhanden sein, wäre das Entlangbewegen am Substrat durch die zusätzlichen Bindungen möglicherweise beeinträchtigt.

Zusammenfassend lässt sich für das physiologische System begründet vermuten, dass sich die Bindungen der CAT-D in Zustand S_1 partiell ausbilden und im Zusammenspiel mit der Streckung der HD eine vollständige Anbindung der CAT-D erfolgt. Im Zustand S_2 des Proteins würde also die CAT-D vollständig gebunden sein und die hydrophile Domäne in Zustand S_2^{HD} vorliegen.

Übergang von S_1 in S_2

Da nun Überlegungen zu den beiden Zuständen, in denen sich die Bindung zwischen Protein und Substrat befinden kann, angestellt wurden, liegt die Frage nahe, wie der Übergang, insbesondere von S_1 nach S_2 , zustande kommen könnte. Hierbei sollte, sofern die oben geäußerte Interpretation der Daten Bestand hat, das System also von einem Zustand S_1 , in dem die HD im Zustand S_1^{HD} gebunden hat und die CAT-D partiell angebinden ist, in einen Zustand S_2 übergehen, in dem die Bindung der HD in Zustand S_2^{HD} vorliegt und zudem die Bindungen der CAT-D ausgebildet sind.

Im Folgenden sollen zwei mögliche Abläufe für diesen Übergang skizziert und diskutiert werden, deren Unterschied in den zugrundeliegenden Mechanismen für den Zustandswechsel besteht:

- Der Übergang der CAT-D von partiell gebunden zu vollständig an das Substrat koordiniert führt zu einer Kraft, die einen Wechsel der hydrophilen Domäne in den gestreckten Zustand S_2^{HD} ermöglicht.
- Die Streckung der HD samt Anbindung im Zustand S_2^{HD} wird durch externe Faktoren ausgelöst. Dies könnte bedeuten, dass die Streckung der HD möglicherweise zu einer vollständigen Anbindung der katalytischen Domäne führt.

Übergang durch intramolekulare Kraft

Die Überwindung der Aktivierungsbarriere zwischen S_1^{HD} und S_2^{HD} , um den Übergang der hydrophilen Domäne in den stärker gebundenen Zustand zu ermöglichen, war bisher in Experimenten mit der HD nur durch das Anlegen einer externen Kraft möglich [91]. Es wurde vermutet, dass im gesamten Protein, das ohne externe Haltekraft mit seinem Substrat wechselwirkt, ein Mechanismus vorliegt, der die Kraft zur Streckung der HD und Ausbildung des Bindungszustandes S_2 aufbringen kann [91].

Die Vermutung, dass die Bindungsstellen der CAT-D hier beteiligt sein könnten, ist naheliegend. So ist vorstellbar, dass nach der Anbindung der HD in S_1 die CAT-D von einem partiell gebundenen Zustand in einen vollständig gebundenen Zustand übergeht und so die Kraft aufbringt, die für den Übergang der HD in die gestreckte Konformation nötig ist. Dies ist schematisch dargestellt in Abbildung 5.13.

Es käme hier also durch einen Ablauf innerhalb des Proteins zur Konformationsänderung der HD und damit zu einem Übergang des Systems Sulf1/HS in den Zustand S_2 .

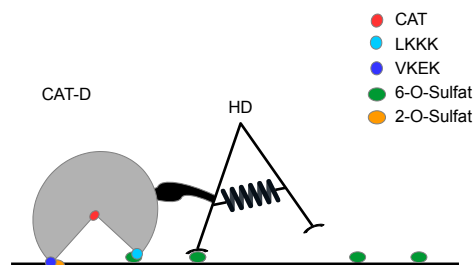


Abbildung 5.13: Modell zum Übergang von S_1 in S_2 . Die CAT-D bindet vollständig an das Substrat, was eine Konformationsänderung der HD auslösen könnte.

Übergang durch thermische Aktivierung

Alternativ ist es denkbar, dass der Übergang von S_1 zu S_2 durch eine thermisch aktivierte Streckung der HD ausgelöst wird. Ein spontaner Übergang ist aufgrund der Differenz der freien Energie für die HD von $\Delta G_{S_1 \rightarrow S_2} = -20 \frac{kJ}{Mol}$ [91] potentiell vorstellbar, auch wenn hier die Daten für das gesamte Protein nicht vorliegen.

Eventuell sind die allosterischen Effekte im gesamten Protein ausgeprägter als in der HD alleine, die Aktivierungsbarriere ist abgesenkt, zum Beispiel durch die Anwesenheit der CAT-D, und der spontane Wechsel über die Ak-

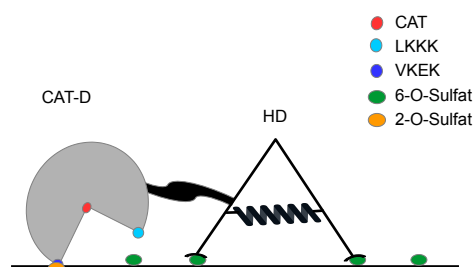


Abbildung 5.14: Modell zum Übergang von S_1 in S_2 . Hier kommt es zur Streckung der HD, was die vollständige Anbindung der CAT-D ermöglichen oder auslösen könnte.

tivierungsbarriere hinweg wird möglich [91]. Hier wäre die Konformationsänderung der HD also durch Faktoren, die außerhalb des Proteins liegen, bedingt. Es ist hier vorstellbar, dass die thermisch aktivierte Streckung der HD mit anschließender Bindung möglicherweise Auslöser, oder zumindest beteiligt, an der vollständigen Ausbildung der Bindungen der CAT-D ist. Ein solcher Ablauf ist in Abbildung 5.14 dargestellt. Ebenso könnte auch die vollständige Anbindung der CAT-D notwendig sein, um die Aktivierungsbarriere entsprechend stark abzusenken.

Diskussion beider Übergangsszenarien

In einem *Force-Clamp*-Experiment wären beide Übergangsszenarien nur schwer zu unterscheiden, da die HD durch die hier vorhandene externe Kraft gestreckt werden kann.

Der Verlauf der Approximation für kleine Kräfte aus dem Lebensdauer-Kraft-Graphen gibt hier möglicherweise einen Hinweis, welcher der beiden vorstellbaren Abläufe der Konformationsänderung zutreffend ist: Offensichtlich befindet sich das System, wenn nur kleine externe Kräfte vorliegen, im schwächer gebundenen Zustand S_1 . Es scheint also nicht ohne Weiteres möglich zu sein, dass das Protein selbstständig in den Zustand S_2 übergeht, in dem die hydrophile Domäne gestreckt vorliegt. Dies spricht gegen einen gerichteten und spezifischen Prozess, bei dem die vollständige Anbindung der CAT-D durch das Aufbringen einer Kraft oder durch eine Absenkung der Aktivierungsbarriere zu einer Streckung der HD führt. Ein solcher Prozess müsste eben auch bei kleinen externen Kräften insofern sichtbar sein, als dass auch bei diesen Kräften zumindest zum Teil der Zustand S_2 besetzt sein müsste.

Hier lässt sich also spekulieren, dass ein Übergang, der nicht durch das Protein selbst bedingt ist wahrscheinlicher ist. Bei niedrigen Kräften wäre die Wahrscheinlichkeit, dass eine solche zufällige Streckung auftritt und zu einer Bindung in S_2 führt, niedrig und es würden nur wenige bis keine Dissoziationen aus S_2 beobachtet werden, was zu den Daten des Lebensdauer-Kraft-Graphen in Abbildung 5.6 passen würde.

Die geringe Wahrscheinlichkeit, dass das System ohne externe Kraft in den Zustand S_2 wechselt, könnte allerdings darauf hindeuten, dass das Protein auch *in vivo* einer externen Kraft unterliegt. Es wurde bereits vermutet, dass die Sulfatasen an mehrere GAGs zugleich assoziieren können [90], was eine potentielle Quelle für eine solche Kraft sein könnte. Vor dem Hintergrund der dichten Besetzung der extrazellulären Matrix erscheint dies plausibel. Die für Einzelmolekülexperimente notwendige Reduktion von Konzentrationen würde jedoch idealerweise ausschließen, dass es zu mehreren Bindungen kommt. Somit wäre dieses Phänomen in den Experimenten dieser Arbeit nicht zu beobachten und daher eine artifizielle Kraft notwendig, um den Übergang in Zustand S_2 zu ermöglichen.

Allerdings ist gezeigt worden, dass Sulf2 enzymatische Aktivität in Lösung aufweist [23]. Während diese Beobachtung eine Kraft von außerhalb auf den Protein-Substrat-Komplex nicht ausschließt, erscheint das Vorliegen der Kraft vor diesem Hintergrund bedeutend unwahrscheinlicher und eher widersprüchlich.

An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass in einem solchen Experiment eben nicht die physiologischen Bedingungen herrschen und daher eine solche Interpretation, die sich auf das Vorliegen von einem deutlichen Zustand S_1 stützt, eher hypothetisch ist. Es ist ebenfalls vorstellbar, dass das Vorliegen beispielsweise der Linker-Moleküle, aber insbesondere der externen Kraft, die katalytische Aktivität des Proteins verhindert oder unterdrückt. Das Phänomen, das eine solche Kraft nötig ist, um den Zustand zu wechseln, wäre dann dem experimentellen Setup geschuldet.

Die kleinste in diesem Experiment auf den Komplex ausgeübte Kraft beträgt 6 pN. Hier ist es vorstellbar, dass diese externe Kraft die Abläufe im Protein blockiert und das Protein einen nicht-physiologischen Zustand einnimmt.

Dies könnte zum Beispiel der Fall sein für die Überlegung, dass eine Konformationsänderung der CAT-D den Wechsel von S_1 in S_2 bedingt. Möglicherweise führt die externe Kraft dazu, dass die katalytische Domäne nicht vollständig binden kann oder das Bindungsverhalten auf andere Weise gestört ist und so der Übergang nicht möglich ist. Die Zugkraft im Experiment streckt aber die HD und könnte so den Übergang extern herbeiführen. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass nicht notwendigerweise die hier über den *cantilever* ausgeübte Kraft die gleiche

Richtung hat wie die Kraft, die die CAT-D vielleicht auf die hydrophile Domäne ausübt, ist vorstellbar, dass die artifizielle Kraft den Prozess stört. Ein Hinweis hierauf könnte sein, dass die Haltekräfte des Experiments vergleichsweise groß sind. Möglicherweise wirkt nur ein kleiner Teil dieser Kraft in die eigentlich notwendige Richtung und der andere Teil stört das Verhalten des Proteins.

Ebenso kann auch die Bewegung entlang des Substrates, die durch die Bewegung des *cantilevers* ausgelöst wird, entgegen der Richtung des intramolekularen Prozesses erfolgen. Hier wäre es denkbar, dass die Streckung des Proteins, die durch die externe Kraft hervorgerufen wird, nicht in der physiologischen Richtung erfolgt.

Es lässt sich hier aufgrund dieser experimentellen Limitierungen nicht abschließend klären, ob die Streckung der HD zu einer Ausbildung der Bindungen der katalytischen Domäne führt, wie es bei thermischer Aktivierung – oder externer Kraft – der Fall sein könnte, die Anbindung der katalytischen Domäne die Aktivierungsbarriere absenkt und so den Übergang der HD in die gestreckte Konformation ermöglicht oder aber die vollständige Bindung der CAT-D an HS die Konformationsänderung der hydrophilen Domäne durch eine Kraft auslöst. Dennoch erscheinen alle Möglichkeiten aufgrund der hier gezeigten Daten und Messungen anderer Arbeitsgruppen vorstellbar.

Denkbar ist auch, dass die gemessenen Haltekräfte nicht das vollständige *catch-bond*-Intervall zeigen. Um dies auszuschließen und zudem mehr Datenpunkte für das Approximieren des Zustandes S_2 zu bekommen, wäre es nötig, weitere Messungen bei höheren Haltekräften vorzunehmen. Dies würde es unter Umständen auch ermöglichen, mehr Informationen über den Ablauf des katalytischen Prozesses zu bekommen, auch wenn es aufgrund der begrenzten Auflösung – sowohl in Bezug auf Kräfte als auch für Zeiten – unwahrscheinlich ist, die hypothetischen Unterzustände detektieren zu können.

Eine Messung bei kleineren Haltekräften würde es ermöglichen, den Einfluss des experimentellen Setups zu minimieren und so möglicherweise enzymatische Aktivität beobachten zu können oder sich zumindest einem physiologischen Zustand

des untersuchten Systems stärker anzunähern. Eine Möglichkeit, ein System mit kleineren Kräften zu belasten, bietet beispielsweise die optische Pinzette [97]. Hier ist allerdings die Ortsauflösung vergleichsweise limitiert [97].

Ebenfalls hilfreich wäre es, ein mutiertes Protein zu vermessen, in dem eine oder beide Bindungsstellen der CAT-D so verändert wurden, dass dort keine Bindung mehr ausgebildet wird. Dies würde es ermöglichen, genauer einzugrenzen, welche hier beobachteten Phänomene durch welche Domäne oder Bindungsstelle ausgelöst werden.

Experimente, in denen nur die CAT-D verwendet wird, würden potentiell auch interessante Einsichten ermöglichen. Insbesondere wäre es hier denkbar, neue Erkenntnisse über die durch zwei Domänen koordinierte Bindung zu gewinnen.

5.2.4 Sulf1CA und HS

Die Daten, die aus Experimenten mit dem mutierten gesamten Protein Sulf1CA und dem Substrat Heparansulfat gewonnen wurden, wurden analog den anderen hier vorgestellten Daten nach Kapitel 4.6 ausgewertet.

Ergebnisse

Betrachtet man den Verlauf der noch intakten Bindungen über die Zeit, wie er beispielhaft für einige Haltekräfte in Abbildung 5.15 zu sehen ist, fällt auf, dass es Änderungen in den Steigungen zu geben scheint.

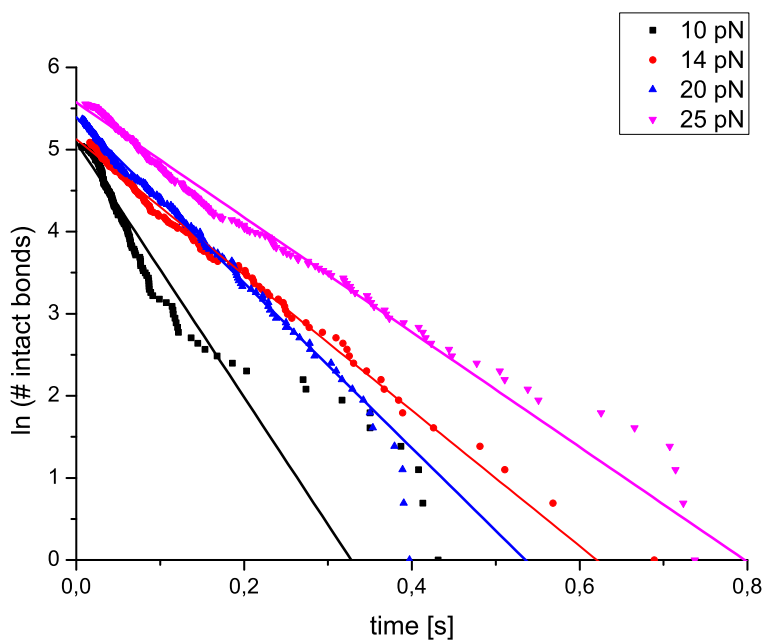


Abbildung 5.15: Beispielhafte Steigungen für das System Sulf1CA/HS.

Allerdings folgen diese bei genauerer Betrachtung keinem eindeutigen Muster: So ist die Steigung für eine Kraft von 10 pN am größten, was einer geringen Lebensdauer entspricht. Eine Zunahme der Kraft auf 14 pN führt zu einer Abnahme der Steigung, eine Erhöhung der Kraft auf 20 pN allerdings wieder zu einer Zunahme, während bei einer Haltekraft von 25 pN die Steigung am geringsten ausfällt.

Zudem ist hier zu beobachten, dass sich die Steigungen in absoluten Zahlen wesentlich weniger ändern als es beim nicht-mutierten Protein der Fall ist.

Die Auftragung der Lebensdauer über die Kraft, wie sie Abbildung 5.16 zeigt, bestätigt diese Andeutung.

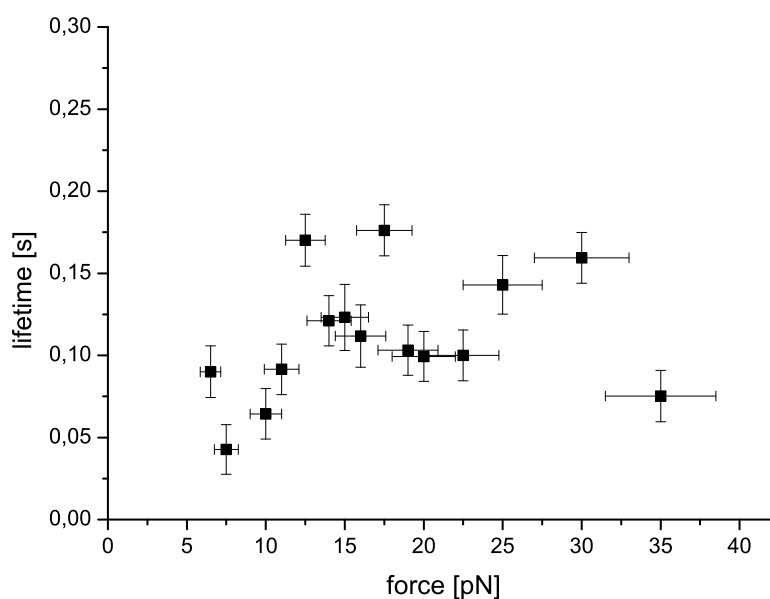


Abbildung 5.16: Lebensdauer-Kraft-Graph für das System Sulf1CA/HS.

Die Entwicklung der Lebensdauer ist hier undeutlich und verstreut, und es ist schwer zu entscheiden, ob es sich hier möglicherweise auch um eine Kraftunabhängigkeit, also eine ideale Bindung handelt, oder aber womöglich doch um einen spezifischen Verlauf.

Diskussion und Interpretation

Das hier betrachtete System sollte vergleichbar mit der Messung an Sulf1/HS sein, da in bisherigen Experimenten das mutierte Protein genutzt werden konnte, um beispielsweise Affinitäten zu bestimmen [90]. Ein solch unklares Verhalten, wie

es in diesem Graphen zu sehen ist, ist daher unerwartet. Allerdings ist hier eine Wechselwirkung zu beobachten; es kam also zu einer Form der Bindung zwischen Sulf1CA und Heparansulfat.

Der Vergleich zwischen dem Verlauf hier und dem Verlauf für die analoge Messung des nicht-mutierten Proteins legt nahe, dass die Mutation am katalytischen Zentrum zu einer Störung des Bindungsverhaltens führt. Derzeit wird vermutet, dass die Bindungsstellen der CAT-D unter anderem das Entlangführen des Substrates am katalytischen Zentrum beeinflussen [95]. Eine Mutation an eben diesem katalytischen Zentrum könnte diesen Teilschritt des Prozesses beeinflussen und damit unter Umständen Einfluss auf die Bindung der CAT-D nehmen. Ein hierdurch hervorgerufener Einfluss auf das Bindungsverhalten der hydrophilen Domäne ist denkbar, was einen Zustand nicht klar ausgeprägter Bindung bedingen könnte und so zu einer höheren Beweglichkeit führen könnte. Dies könnte das Vorliegen einer idealen Bindung erklären.

Aufgrund des Verlaufes der Lebensdauer ist allerdings nicht klar zu entscheiden, ob es sich um eine ideale Bindung handelt. Wie oben bereits erwähnt, wurden bisher zudem sehr schlüssige Ergebnisse und Experimente unter Verwendung von Sulf1CA durchgeführt, in denen der einzige Unterschied zum nicht-mutierten Protein die nicht vorhandene Aktivität ist [90, 98]. Zwar nutzten diese Experimente keine Einzelmolekülmethodik mit Zugang zu einzelnen Bindungsereignissen, doch ist das Verhalten in den Experimenten dieser Arbeit so unklar, dass es nicht möglich ist, ein deutliches Bild dieser Vorgänge zu entwickeln. Ohne dieses klare Bild, dass sich unter Umständen mit den Ergebnissen aus Ensemble-Experimenten verbinden lässt, stehen diese Daten zunächst im Widerspruch zu den bekannten Daten. Eine Auflösung dieses Widerspruchs, wie oben dargestellt, ist an dieser Stelle rein spekulativ und muss damit an dieser Stelle weitestgehend ausbleiben.

Ein möglicher Ansatz könnte sein, zunächst mit diesem experimentellen Aufbau weitere Kräfte zu vermessen, insbesondere in den Randregionen des jetzt genutzten Kraftintervalls. Die Verwendung niedrigerer Haltekräfte ist jedoch aufgrund experimenteller Limitierungen, insbesondere bzgl. der Auflösung, schwer umsetzbar.

Möglicherweise bietet die dynamische Kraftspektroskopie die Möglichkeit, ungewöhnliches Bindungsverhalten unter anderen experimentellen Parametern zu beobachten und damit weitere Daten zur Auflösung dieses scheinbaren Widerspruchs bereitzustellen.

5.2.5 Sulf1CA und K5-NS

Ergebnisse

Nach der Auswertung der experimentellen Daten für das System Sulf1CA/K5-NS nach dem in Kapitel 4.6 beschriebenen Verfahren ergibt sich für die Anzahl Bindungen, die zu einem gegebenen Zeitpunkt noch intakt sind, ein Zusammenhang, wie er beispielhaft in Abbildung 5.17 zu sehen ist.

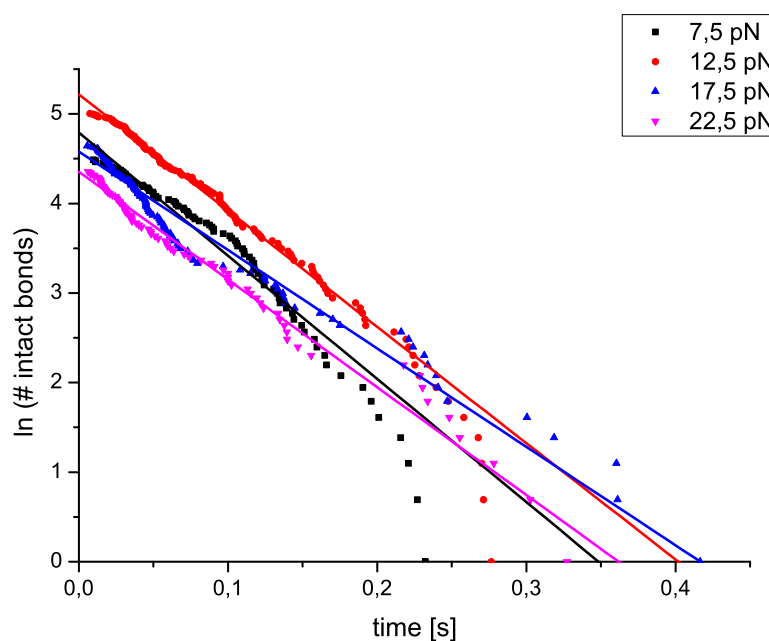


Abbildung 5.17: Beispielhafte Steigungen für das System Sulf1CA/K5-NS.

In diesem Graphen sind die intakten Bindungen für Kräfte von 7,5 pN, 12,5 pN, 17,5 pN und 22,5 pN aufgetragen, die sich somit über das gesamte gemessene Kraftintervall erstrecken. Hier deutet sich bereits an, dass die Steigung anschei-

nend nicht systematisch mit der externen Kraft variiert.

Die aus diesen Steigungen bestimmte Lebensdauer ist, wie Abbildung 5.18 zeigt, kraftunabhängig. Dies wurde bereits für die Wechselwirkung des nicht-mutierten Proteins mit K5-NS beobachtet, wie in Kapitel 5.2.2 besprochen wurde. Hier wie dort ist eine quantitative Analyse der Daten nicht möglich.

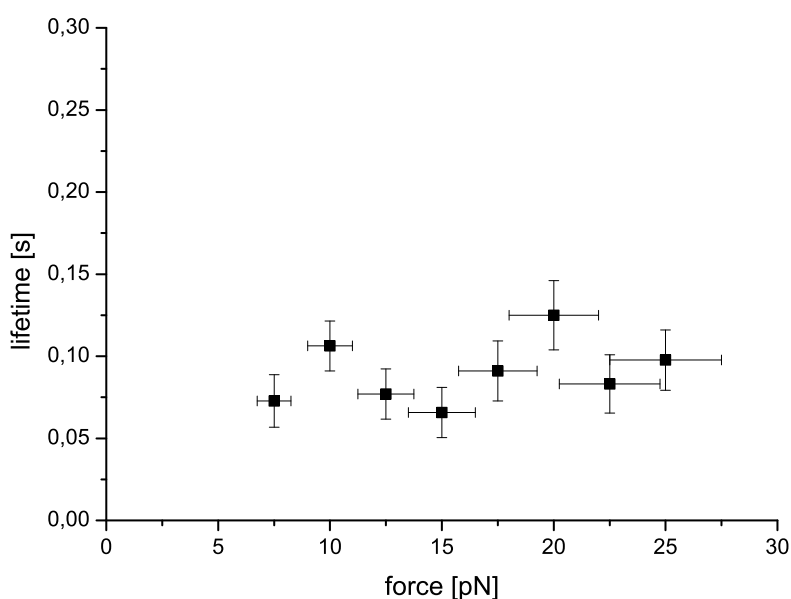


Abbildung 5.18: Lebensdauer-Kraft-Graph für das System Sulf1CA/K5-NS.

Diskussion und Interpretation

Die Erklärung, die im o. g. Kapitel dargestellt wurde, könnte prinzipiell auch auf dieses System zutreffen. Der Unterschied zwischen den beiden betrachteten Systemen liegt in einer Mutation im katalytischen Zentrum, die offensichtlich nur geringen Einfluss auf die Bindung an K5-NS hat. Dies lässt sich mit den Überlegungen zu den Ergebnissen der Messungen mit dem System Sulf1CA/HS und der möglichen Gating-Funktion verknüpfen. Die Mutation sollte nur dann das Bindungsverhalten beeinflussen können, wenn das katalytische Zentrum zugänglich

ist. Sollte eine Gating-Funktion vorliegen, wäre es hier vorstellbar, dass das katalytische Zentrum unzugänglich ist, da hier die vermutlich für die „Demaskierung“ notwendigen 2-O-Sulfate und 6-O-Sulfate fehlen. Entsprechend würde das katalytische Zentrum nur wenig Einfluss auf die Bindung nehmen.

Dieser Erklärungsansatz ist allerdings noch spekulativer als das Bild, das in Kapitel 5.2.2 entworfen wurde. Solange nicht mehr Informationen zur Struktur des mutierten und nicht-mutierten Proteins und eine weitergehende Analyse der Implikationen, die sich auf molekularer Ebene aus idealen Bindungen ergeben, vorliegen, muss eine abschließende Erklärung ausbleiben. Es konnten hier also nur Denkanstöße und potentiell vorstellbare Ansätze zur Interpretation dargelegt werden.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Einzelmolekül-*Force-Clamp*-Experimente mit einem Rasterkraftmikroskop an molekularen Komplexen aus Sulfatasen, oder einer Domäne der Sulfatase, und Glykosaminoglykanen durchgeführt. Für die Auswertung der gewonnenen experimentellen Daten wurde die Raten­theorie von Kramers-Bell-Evans, zum Teil erweitert zum *two-state-two-path*-Modell, verwendet.

Die Experimente, die mit der hydrophilen Domäne der Sulf2 durchgeführt wurden, zeigten hierbei das, aufgrund der weitgehenden Homologie zu Sulf1, erwartete *catch-bond*-Verhalten für das Substrat Heparansulfat. Während der qualitative Verlauf der *two-state-two-path*-Approximation an die Lebensdauer-Daten vergleichbar mit bekannten Ergebnissen für die hydrophilen Domäne von Sulf1 ist, zeigten sich in der quantitativen Analyse Unterschiede. Insbesondere bei den Dissoziationsratenkonstanten wurden signifikante Unterschiede festgestellt, die vor dem Hintergrund anderer Ergebnisse zu den beiden Isoformen [87, 88] jedoch plausibel erscheinen. Die Ergebnisse zu den veränderten Ratenkonstanten sind hier konsistent mit Messungen, die von einer geringeren Effektivität der Desulfatierung berichten [23]. Hier konnten also Befunde aus Ensemble-Experimenten auf eine molekulare Ursache zurückgeführt werden.

Die Messreihen zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Sulf2HD und K5-NS konnten die Relevanz der 6-O-Sulfate für das Vorliegen von *catch bonds* verifizieren.

Im Zentrum der Experimente stand die Untersuchung des Bindungsverhaltens des vollständigen Proteins Sulf1. Eine Charakterisierung mittels Einzelmolekülkraftspektroskopie konnte hier zum ersten Mal erfolgreich durchgeführt werden. Hierfür wurde eine neue Funktionalisierungsstrategie entwickelt und erfolgreich angewendet.

Die Wechselwirkung zwischen Sulf1 und Heparansulfat zeigte hierbei auch typi-

sches *catch-bond*-Verhalten. Der Verlauf der Lebensdauern für hohe Kräfte war bei diesem System allerdings etwas unklarer als bei den Messungen für die hydrophile Domäne und Heparansulfat. Hieraus, und aus quantitativen Unterschieden in den Dissoziationsratenkonstanten und der Differenz der freien Energie, wurde versucht, ein hypothetisches Bild über den Ablauf und Zusammenhang der einzelnen Bindungsereignisse bei der Wechselwirkung zwischen Sulf1 und HS zu entwickeln.

Insbesondere hier empfiehlt es sich, weitere Messungen durchzuführen: Dynamische Kraftspektroskopie kann – über die Jarzynski-Gleichung – genaueren Einblick in die Energielandschaft der Wechselwirkung liefern. Messungen, bei denen die Wechselwirkung zwischen der alleinstehenden katalytischen Domäne und HS auf Einzelmolekülniveau untersucht wird, könnten Aufschluss über die Bindungen der katalytischen Domäne bringen.

Die Wechselwirkung zwischen Sulf1 und K5-NS, die ebenfalls experimentell charakterisiert wurde, zeigte überraschendes Verhalten: Eine Kraftunabhängigkeit widersprach der Erwartungshaltung, dass ein *slip bond*, ähnlich wie bei Sulf1HD/HS, vorliegen könnte. Eine solche kraftunabhängige, also ideale, Bindung war bisher nur in wenigen Systemen beobachtet worden. Das Vorliegen einer solchen idealen Bindung lässt sich mit der Hypothese einer Gating-Funktion der katalytischen Domäne erklären. Hierbei schirmt die katalytische Domäne die Wechselwirkungen zwischen der hydrophilen Domäne und K5-NS ab und sorgt so für eine höhere Beweglichkeit der Bindungspartner. Liegen am Substrat 2-O-Sulfate oder 6-O-Sulfate vor, kommt es zu einer Konformationsänderung mit partieller Bindung der CAT-D, und die hydrophile Domäne wird nicht länger abgeschirmt.

Die Messungen, die mit dem mutierten Protein Sulf1CA und Heparansulfat durchgeführt wurden, zeigten ein deutlich anderes Bild, das sich nicht ohne Weiteres klar einem Verhalten zuordnen ließ. Hier könnte es sinnvoll sein, die weiteren Experimente analog zu den Vorschlägen für das nicht-mutierte Protein durchzuführen und so zu überprüfen, ob sich auch das Verhalten der mutationstragenden katalytischen Domäne unterscheidet.

Die abschließend vorgestellte Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen Sulf1CA und K5-NS wiederum zeigte eine deutliche Kraftunabhängigkeit. Eine Mutation im katalytischen Zentrum scheint also für dieses System keine Änderung im Bindungsverhalten hervorzurufen; diese Beobachtung lässt sich mit der Hypothese einer Gating-Funktion verknüpfen, bei der das katalytische Zentrum zu Anfang eines Bindungsprozesses nicht zugänglich wäre.

Insgesamt brachten die ersten Einzelmolekülexperimente am vollständigen Protein Sulf1 Ergebnisse, die sowohl vorhandene Daten unterstützen, wie bei den *catch bonds* bei der Bindung an Heparansulfat, als auch neue Fragen über die molekularen Prozesse aufwerfen, deren vollständige Beantwortung eine spannende Herausforderung bleibt. Sowohl die Sulfatasen als auch *catch bonds* sind Themengebiete, in denen viele Aspekte noch nicht vollständig aufgeklärt wurden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind daher nur ein kleiner, aber aufschlussreicher Beitrag auf dem Weg zu einem umfassenden Verständnis der hier beteiligten molekularen Vorgänge.

Literaturverzeichnis

- [1] U. Dammer, M. Hegner, D. Anselmetti, P. Wagner, M. Dreier, W. Huber, and H.-J. Güntherodt, “Specific antigen/antibody interactions measured by force microscopy,” *Biophysical Journal*, vol. 70, pp. 2437–2441, 1996.
- [2] R. Eckel, R. Ros, B. Decker, J. Mattay, and D. Anselmetti, “Supramolecular chemistry at the single-molecule level,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 44, no. 3, pp. 484–488, jan 2005.
- [3] E.-L. Florin, V. T. Moy, and H. E. Gaub, “Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs,” *Science*, vol. 264, pp. 415–417, 1994.
- [4] A. Harder, V. Walhorn, T. Dierks, X. Fernández-Busquets, and D. Anselmetti, “Single-molecule force spectroscopy of cartilage aggrecan self-adhesion,” *Biophysical Journal*, vol. 99, no. 10, pp. 3498–3504, 2010.
- [5] V. T. Moy, E.-L. Florin, and H. E. Gaub, “Intermolecular forces and energies between ligands and receptors,” *Science*, vol. 266, pp. 257–259, 1994.
- [6] P. Hinterdorfer, W. Baumgartner, H. J. Gruber, K. Schilcher, and H. Schindler, “Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, pp. 3477–3481, 1995.
- [7] V. Walhorn, C. Schäfer, T. Schröder, J. Mattay, and D. Anselmetti, “Functional characterization of a supramolecular affinity switch at the single molecule level,” *Nanoscale*, vol. 3, no. 11, p. 4859, 2011.
- [8] M. Dieding, J. D. Debus, R. Kerkhoff, A. Gaertner-Rommel, V. Walhorn, H. Milting, and D. Anselmetti, “Arrhythmogenic cardiomyopathy related DSG2 mutations affect desmosomal cadherin binding kinetics,” *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, oct 2017.

- [9] H. Kramers, “Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions,” *Physica*, vol. 7, no. 4, pp. 284–304, apr 1940.
- [10] G. I. Bell, “Models for the specific adhesion of cells to cells,” *Science*, vol. 200, pp. 618–627, 1978.
- [11] B. T. Marshall, M. Long, J. W. Piper, T. Yago, R. P. McEver, and C. Zhu, “Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules,” *Nature*, vol. 423, no. 6936, pp. 190–193, may 2003.
- [12] W. E. Thomas, E. Trintchina, M. Forero, V. Vogel, and E. V. Sokurenko, “Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force,” *Cell*, vol. 109, pp. 913–923, 2002.
- [13] B. Guo and W. H. Guilford, “Mechanics of actomyosin bonds in different nucleotide states are tuned to muscle contraction,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, no. 26, pp. 9844–9849, jun 2006.
- [14] T. Yago, R. P. McEver, and C. Zhu, “Platelet glycoprotein α IIb β 3 forms catch bonds with human wt vwf but not with type 2b von willebrand disease vwf,” *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 118, no. 9, pp. 3195–3207, 2008.
- [15] F. Kong, A. J. Garcia, A. P. Mould, M. J. Humphries, and C. Zhu, “Demonstration of catch bonds between an integrin and its ligand,” *The Journal of Cell Biology*, vol. 185, no. 7, pp. 1275–1284, 2009.
- [16] M. Dembo, D. Torney, K. Saxman, and D. Hammer, “The reaction-limited kinetics of membrane-to-surface adhesion and detachment,” *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, vol. 234, no. 1274, pp. 55–83, jun 1988.
- [17] S. Rakshit, Y. Zhang, K. Manibog, O. Shafraz, and S. Sivasankar, “Ideal, catch, and slip bonds in cadherin adhesion,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, no. 46, pp. 18 815–18 820, 2012.

- [18] A. Harder, A.-K. Möller, F. Milz, P. Neuhaus, V. Walhorn, T. Dierks, and D. Anselmetti, “Catch bond interaction between cell-surface sulfatase sulf1 and glycosaminoglycans,” *Biophysical Journal*, vol. 108, no. 7, pp. 1709–1717, apr 2015.
- [19] W. Zhao, G. B. Sala-Newby, and G. K. Dhoot, “Sulf1 expression pattern and its role in cartilage and joint development,” *Developmental Dynamics*, vol. 235, no. 12, pp. 3327–3335, dec 2006.
- [20] S. Otsuki, S. R. Hanson, S. Miyaki, S. P. Grogan, M. Kinoshita, H. Asahara, C.-H. Wong, and M. K. Lotz, “Extracellular sulfatases support cartilage homeostasis by regulating BMP and FGF signaling pathways,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no. 22, pp. 10 202–10 207, may 2010.
- [21] J. Lai, J. Chien, J. Staub, R. Avula, E. L. Greene, T. A. Matthews, D. I. Smith, S. H. Kaufmann, L. R. Roberts, and V. Shridhar, “Loss of HSulf-1 up-regulates heparin-binding growth factor signaling in cancer,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 25, pp. 23 107–23 117, apr 2003.
- [22] K. Narita, J. Chien, S. A. Mullany, J. Staub, X. Qian, W. L. Lingle, and V. Shridhar, “Loss of HSulf-1 expression enhances autocrine signaling mediated by amphiregulin in breast cancer,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 19, pp. 14 413–14 420, mar 2007.
- [23] A. Seffouh, F. Milz, C. Przybylski, C. Laguri, A. Oosterhof, S. Bourcier, R. Sadir, E. Dutkowski, R. Daniel, T. H. van Kuppevelt, T. Dierks, H. Lortat-Jacob, and R. R. Vivès, “Hsulf sulfatases catalyze processive and oriented 6-odesulfation of heparan sulfate that differentially regulates fibroblast growth factor activity,” *The FASEB Journal*, vol. 27, no. 6, pp. 2431–2439, 2013.
- [24] G. Binnig, C. F. Quate, and C. Gerber, “Atomic Force Microscope,” *Physical Review Letters*, vol. 56, no. 9, pp. 930–933, 1986.

- [25] R. Zhu, A. Ebner, M. Kastner, J. Preiner, S. Howorka, and P. Hinterdorfer, "Topography and recognition imaging of protein-patterned surfaces generated by afm nanolithography," *Chemphyschem*, vol. 10, pp. 1478–1481, 2009.
- [26] J. Liang, M. Castronovo, and G. Scoles, "DNA as Invisible Ink for AFM Nanolithography," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 134, pp. 39–42, 2012.
- [27] J. Jalli, Y.-K. Hong, G. S. Abo, S. Bae, J.-J. Lee, J.-H. Park, B. C. Choi, and S.-G. Kim, "Mfm studies of magnetic domain patterns in bulk barium ferrite (baf₆(12)o(19)) single crystals," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 323, pp. 2627–2631, 2011.
- [28] Y. Endo, M. Watanabe, Y. Mitsuzuka, Y. Shimada, and M. Yamaguchi, "Measurement of magnetic near field on a coplanar waveguide using a mfm tip," *Journal of Applied Physics*, vol. 109, 2011.
- [29] D. Sarid and Vir, "Review of scanning force microscopy," in *Fifth international conference on scanning tunneling microscopy spectroscopy*, 1991.
- [30] R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, and E. Evans, "Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy," *Letters to Nature*, vol. 397, pp. 50–53, 1999.
- [31] N. K. D. Yamamoto, R. Ishikawa, and T. Ando, "Video imaging of walking myosin v by high-speed atomic force microscopy," *Nature*, vol. 468, pp. 72–76, 2010.
- [32] T. Fukuma, T. Ichii, K. Kobayashi, H. Yamada, and K. Matsushige, "true-molecular resolution imaging by frequency modulation atomic force microscopy in various environments," *Applied Physics Letters*, vol. 86, 2005.
- [33] T. Fukuma, M. J. Higgins, and S. P. Jarvis, "direct imaging of individual intrinsic hydration layers on lipid bilayers at angstrom resolution," *Biophysical Journal*, vol. 92, pp. 3603–3609, 2007.

- [34] G. Meyer and N. M. Amer, "Simultaneous measurement of lateral and normal forces with an optical-beam-deflection atomic force microscope," *App*, vol. 57, pp. 2089–2091, 1990.
- [35] G. Neubauer, S. R. Cohen, G. M. McClelland, D. Horne, and C. M. Matte, "Force microscopy with a bidirectional capacitance sensor," *Review of scientific instruments*, vol. 61, pp. 2296–2308, 1990.
- [36] C. Lee, T. Itoh, and T. Suga, "Self-excited piezoelectric PZT microcantilevers for dynamic SFM—with inherent sensing and actuating capabilities," *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 72, no. 2, pp. 179–188, jan 1999.
- [37] E. Meyer, "Atomic force microscopy," *Progress in Surface Science*, vol. 41, pp. 3–49, 1992.
- [38] G. Andre, R. Brasseur, and Y. F. Dufrêne, "Probing the interaction forces between hydrophobic peptides and supported lipid bilayers using AFM," *Journal of Molecular Recognition*, vol. 20, no. 6, pp. 538–545, 2007.
- [39] D. Anselmetti, F. W. Bartels, A. Becker, B. Decker, R. Eckel, M. McIntosh, J. Mattay, P. Plattner, R. Ros, C. Schäfer, and N. Sewald, "Reverse engineering of an affinity-switchable molecular interaction characterized by atomic force microscopy single-molecule force spectroscopy†," *Langmuir*, vol. 24, no. 4, pp. 1365–1370, feb 2008.
- [40] B. Basnar, R. Elnathan, and I. Willner, "Following aptamer-thrombin binding by force measurements," *Analytical Chemistry*, vol. 78, no. 11, pp. 3638–3642, jun 2006.
- [41] P. Hänggi, P. Talkner, and M. Borkovec, "Reaction-rate theory: fifty years after kramers," *Reviews of Modern Physics*, vol. 62, pp. 254–342, 1990.
- [42] S. Arrhenius, "Über die reaktionsgeschwindigkeit bei der inversion von rohrzucker durch säuren," *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, vol. 4U, no. 1, jan 1889.

- [43] E. Evans, K. Ritchie, and R. Merkel, "Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces," *Biophysical Journal*, vol. 68, pp. 2580–2587, 1995.
- [44] V. Barsegov and D. Thirumalai, "Dynamics of unbinding of cell adhesion molecules: transition from catch to slip bonds," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 106, pp. 1835–1839, 2005.
- [45] S. Chakrabarti, M. Hinczewski, and D. Thirumalai, "Phenomenological and microscopic theories for catch bonds," *Journal of Structural Biology*, vol. 197, pp. 50–56, 2017.
- [46] Y. V. Pereverzev, O. V. Prezhdo, M. Forero, E. V. Sokurenko, and W. E. Thomas, "The two-pathway model for the catch-slip transition in biological adhesion," *Biophysical Journal*, vol. 89, pp. 1446–1454, 2005.
- [47] Y. V. Pereverzev, E. Prezhdo, and E. V. Sokurenko, "The two-pathway model of the biological catch-bond as a limit of the allosteric model," *Biophysical Journal*, vol. 101, pp. 2026–2036, 2011.
- [48] W. Thomas, M. Forero, O. Yakovenko, L. Nilsson, P. Vicini, E. Sokurenko, and V. Vogel, "Catch-bond model derived from allostery explains force-activated bacterial adhesion," *Biophysical Journal*, vol. 90, pp. 753–764, 2006.
- [49] E. Evans, A. Leung, V. Heinrich, and C. Zhu, "Mechanical switching and coupling between two dissociation pathways in a p-selectin adhesion bond," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 31, pp. 11 281–11 286, 2004.
- [50] J. L. Klepeis, K. Lindorff-Larsen, R. O. Dror, and D. E. Shaw, "Long-timescale molecular dynamics simulations of protein structure and function," *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 19, no. 2, pp. 120–127, apr 2009.

- [51] T.-H. Lee, J. I. Gonzalez, and R. M. Dickson, “Strongly enhanced field-dependent single-molecule electroluminescence,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 99, no. 16, pp. 10 272–10 275, jul 2002.
- [52] W. Y. Yang and M. Gruebele, “Folding at the speed limit,” *Nature*, vol. 423, no. 6936, pp. 193–197, may 2003.
- [53] S. Rakshit and S. Sivasankar, “Biomechanics of cell adhesion: how force regulates the lifetime of adhesive bonds at the single molecule level,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 16, no. 6, p. 2211, 2014.
- [54] M. Dembo, “On peeling an adherent cell from a surface,” *Lectures on Mathematics in the Life Sciences*, vol. 24, pp. 51–77, 1994.
- [55] C. Hyeon and D. Thirumalai, “Measuring the energy landscape roughness and the transition state location of biomolecules using single molecule mechanical unfolding experiments,” *Journal of Physics: Condensed Matter*, vol. 19, no. 11, p. 113101, feb 2007.
- [56] J. Gore, Z. Bryant, M. Nöllmann, M. U. Le, N. R. Cozzarelli, and C. Bustamante, “DNA overwinds when stretched,” *Nature*, vol. 442, no. 7104, pp. 836–839, jul 2006.
- [57] Y. Suzuki and O. K. Dudko, “Single-molecule rupture dynamics on multidimensional landscapes,” *Physical Review Letters*, vol. 104, no. 4, pp. 1–4, 2010.
- [58] ———, “Biomolecules under mechanical stress: A simple mechanism of complex behavior,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 134, no. 6, p. 065102, feb 2011.
- [59] J. P. K. Doye and D. J. Wales, “On potential energy surfaces and relaxation to the global minimum,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 105, no. 18, pp. 8428–8445, nov 1996.
- [60] K. Manibog, K. Sankar, S.-A. Kima, Y. Zhange, R. L. Jernigana, and S. Sivasankara, “Molecular determinants of cadherin ideal bond formation: conformation-dependent unbinding on a multidimensional landscape,”

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, pp. E5711–E5720, 2016.

- [61] M. Bugiel, A. Mitra, S. Girardo, S. Diez, and E. Schäffer, “Measuring microtubule supertwist and defects by three-dimensional-force-clamp tracking of single kinesin-1 motors,” *Nano Letters*, vol. 18, no. 2, pp. 1290–1295, feb 2018.
- [62] M. Bugiel and E. Schäffer, “Three-dimensional optical tweezers tracking resolves random sideward steps of the kinesin-8 kip3,” *Biophysical Journal*, vol. 115, no. 10, pp. 1993–2002, nov 2018.
- [63] B. Liu, W. Chen, B. D. Evavold, and C. Zhu, “Accumulation of dynamic catch bonds between TCR and agonist peptide-MHC triggers t cell signaling,” *Cell*, vol. 157, no. 2, pp. 357–368, apr 2014.
- [64] C. D. Buckley, J. Tan, K. L. Anderson, D. Hanein, N. Volkmann, W. I. Weis, W. J. Nelson, and A. R. Dunn, “The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force,” *Science*, vol. 346, no. 6209, pp. 1 254 211–1 254 211, oct 2014.
- [65] S. Aksu and J. Turnera, “Calibration of atomic force microscope cantilevers using piezolevers,” *Rev*, vol. 78, 2007.
- [66] C. T. Gibson, G. S. Watson, and S. Myhra, “Determination of the spring constants of probes for force microscopy/spectroscopy,” *Nanotechnology*, vol. 7, pp. 259–262, 1996.
- [67] J. Cleveland, S. Manne, D. Bocek, and P. Hansma, “A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy,” *Review of Scientific Instruments*, vol. 64, pp. 403–405, 1993.
- [68] J. M. Neumeister and W. A. Ducker, “Lateral, normal, and longitudinal spring constants of atomic force microscopy cantilevers,” *Review of Scientific Instruments*, vol. 65, pp. 2527–2531, 1994.
- [69] J. L. Hutter and J. Bechhoefer, “Calibration of atomic-force microscopy tips,” *Review of Scientific Instruments*, vol. 64, pp. 1868–1873, 1993.

- [70] R. Proksch, T. Schäfer, J.P.Cleveland, R.C.Callahan, and M. Viani, "Finite optical spot size and position corrections in thermal spring constant calibration," *Nanotechnology*, vol. 15, pp. 1344–1350, 2004.
- [71] S. R. Hanson, M. D. Best, and C.-H. Wong, "Sulfatases: Structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 43, no. 43, pp. 5736–5763, nov 2004.
- [72] W. C. Lamanna, M.-A. Frese, M. Balleininger, and T. Dierks, "Sulf loss influences n-, 2-o-, and 6-o-sulfation of multiple heparan sulfate proteoglycans and modulates fibroblast growth factor signaling," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 41, pp. 27 724–27 735, 2008.
- [73] W. C. Lamanna, I. Kalus, M. Padva, R. J. Baldwin, C. L. Merry, and T. Dierks, "The heparanome—the enigma of encoding and decoding heparan sulfate sulfation," *Journal of Biotechnology*, vol. 129, no. 2, pp. 290–307, apr 2007.
- [74] R. R. Vivès, A. Seffouh, and H. Lortat-Jacob, "Post-synthetic regulation of HS structure: The yin and yang of the sulfs in cancer," *Frontiers in Oncology*, vol. 3, 2014.
- [75] J. Gallagher, "Multiprotein signalling complexes: regional assembly on heparan sulphate," *Biochemical Society Transactions*, vol. 34, no. 3, pp. 438–441, jun 2006.
- [76] K. J. Murphy, C. L. R. Merry, M. Lyon, J. E. Thompson, I. S. Roberts, and J. T. Gallagher, "A new model for the domain structure of heparan sulfate based on the novel specificity of k5 lyase," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 26, pp. 27 239–27 245, mar 2004.
- [77] D. Leali, M. Belleri, C. Urbinati, D. Coltrini, P. Oreste, G. Zoppetti, D. Ribbatti, M. Rusnati, and M. Presto, "Fibroblast growth factor-2 antagonist activity and angiostatic capacity of sulfated Escherichia coli K5 polysaccharide derivatives," *Journal of Biological Chemistry*, 2001.

- [78] S. Sarrazin, W. C. Lamanna, and J. D. Esko, "Heparan sulfate proteoglycans," *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 3, no. 7, pp. a004952–a004952, jun 2011.
- [79] H. Lortat-Jacob, "The molecular basis and functional implications of chemokine interactions with heparan sulphate," *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 19, no. 5, pp. 543–548, oct 2009.
- [80] U. Lindahl and J. ping Li, "Chapter 3 interactions between heparan sulfate and proteins—design and functional implications," in *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier, 2009, pp. 105–159.
- [81] J. D. Esko and S. B. Selleck, "Order out of chaos: Assembly of ligand binding sites in heparan sulfate," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 71, no. 1, pp. 435–471, jun 2002.
- [82] G. K. Dhoot, "Regulation of wnt signaling and embryo patterning by an extracellular sulfatase," *Science*, vol. 293, no. 5535, pp. 1663–1666, aug 2001.
- [83] M. Morimoto-Tomita, K. Uchimura, Z. Werb, S. Hemmerich, and S. D. Rosen, "Cloning and characterization of two extracellular heparin-degrading endosulfatases in mice and humans," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 51, pp. 49175–49185, oct 2002.
- [84] T. Ohto, H. Uchida, H. Yamazaki, K. Keino-Masu, A. Matsui, and M. Masu, "Identification of a novel nonlysosomal sulphatase expressed in the floor plate, choroid plexus and cartilage," *Genes to Cells*, vol. 7, no. 2, pp. 173–185, feb 2002.
- [85] A. Ratzka, I. Kalus, M. Moser, T. Dierks, S. Mundlos, and A. Vortkamp, "Redundant function of the heparan sulfate 6-o-endosulfatases sulf1 and sulf2 during skeletal development," *Developmental Dynamics*, vol. 237, no. 2, pp. 339–353, jan 2008.

- [86] F. Milz, “Die humane Sulfatase Sulf1: funktionale, biochemische und biophysikalische Studien zur Interaktion mit dem Substrat Heparansulfat,” Ph.D. dissertation, Fakultät für Chemie, 2012.
- [87] S. Nagamine, M. Tamba, H. Ishimine, K. Araki, K. Shiomi, T. Okada, T. Ohto, S. Kunita, S. Takahashi, R. G. P. Wismans, T. H. van Kuppevelt, M. Masu, and K. Keino-Masu, “Organ-specific sulfation patterns of heparan sulfate generated by extracellular sulfatases sulf1 and sulf2 in mice,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 12, pp. 9579–9590, feb 2012.
- [88] I. Kalus, S. Rohn, T. M. Puvirajesinghe, S. E. Guimond, P. J. Eyckerman-Kölln, G. ten Dam, T. H. van Kuppevelt, J. E. Turnbull, and T. Dierks, “Sulf1 and sulf2 differentially modulate heparan sulfate proteoglycan sulfation during postnatal cerebellum development: Evidence for neuroprotective and neurite outgrowth promoting functions,” *PLOS ONE*, vol. 10, no. 10, p. e0139853, oct 2015.
- [89] M.-A. Frese, F. Milz, M. Dick, W. C. Lamanna, and T. Dierks, “Characterization of the human sulfatase sulf1 and its high affinity heparin/heparan sulfate interaction domain,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 41, pp. 28 033–28 044, aug 2009.
- [90] F. Milz, A. Harder, P. Neuhaus, O. Breitzkreuz-Korff, V. Walhorn, T. Lübke, D. Anselmetti, and T. Dierks, “Cooperation of binding sites at the hydrophilic domain of cell-surface sulfatase sulf1 allows for dynamic interaction of the enzyme with its substrate heparan sulfate,” *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1830, pp. 5287–5298, 2013.
- [91] V. Walhorn, A.-K. Mäller, C. Bartz, T. Dierks, and D. Anselmetti, “Exploring the sulfatase 1 catch bond free energy landscape using jarzynski’s equality,” *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, nov 2018.
- [92] A. F. Kolb and S. G. Siddell, “Genomic targeting with an MBP-cre fusion protein,” *Gene*, vol. 183, no. 1-2, pp. 53–60, jan 1996.

- [93] A. Harder, "Optomechanische Untersuchungen an Biomolekülen mittels Rastersondenmikroskopie," Ph.D. dissertation, Fakultät für Physik, 2014.
- [94] A.-K. Möller, "Dynamische Kraftspektroskopie an Heparansulfat-Sulfatase-Interaktion zum Nachweis ihres Catch Bond-Verhaltens," Master's thesis, Fakultät für Physik, 2014.
- [95] A. Seffouh, R. E. Masri, O. Makshakova, E. Gout, Z. el Oula Hassoun, J. pierre Andrieu, H. Lortat-Jacob, and R. R. Vivès, "Expression and purification of recombinant extracellular sulfatase HSulf-2 allows deciphering of enzyme sub-domain coordinated role for the binding and 6-o-desulfation of heparan sulfate," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 76, no. 9, pp. 1807–1819, feb 2019.
- [96] T. R. Weikl and F. Paul, "Conformational selection in protein binding and function," *Protein Science*, vol. 23, no. 11, pp. 1508–1518, sep 2014.
- [97] K. C. Neuman and A. Nagy, "Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy," *Nature Methods*, vol. 5, no. 6, pp. 491–505, may 2008.
- [98] S. A. Ramsbottom, R. J. Maguire, S. W. Fellgett, and M. E. Pownall, "Sulf1 influences the shh morphogen gradient during the dorsal ventral patterning of the neural tube in xenopus tropicalis," *Developmental Biology*, vol. 391, no. 2, pp. 207–218, jul 2014.
- [99] P. Carlsson, J. Presto, D. Spillmann, U. Lindahl, and L. Kjellen, "Heparin/heparan sulfate biosynthesis," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 29, pp. 20 008–20 014, 2008.
- [100] K. Sarangapani, J. Qian, W. Chen, V. I. Zarnitsyna, P. Mehta, T. Yago, R. P. McEver, and C. Zhu, "Regulation of catch bonds by rate of force application," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, pp. 32 749–32 761, 2011.

- [101] R. Tang and S. D. Rosen, "Functional consequences of the subdomain organization of the sulfs," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, pp. 21 505–21 514, 2009.
- [102] R. Wolfenden and Y. Yuan, "Monoalkyl sulfates as alkylating agents in water, alkylsulfatase rate enhancements, and the energy-rich nature of sulfate half-esters," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 1, pp. 83–86, 2007.
- [103] G. Binnig and D. P. E. Smith, "Single-tube three-dimensional scanner for scanning tunneling microscopy," *Review of Scientific Instruments*, vol. 57, no. 8, pp. 1688–1689, 1986.
- [104] G. Binnig and H. Rohrer, "Scanning tunneling microscopy," *Surface Science*, vol. 126, pp. 236–244, 1983.
- [105] C. Bustamante, Y. R. Chemla, N. R. Forde, and D. Izhaky, "Mechanical processes in biochemistry," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 73, pp. 705–7048, 2004.
- [106] O. K. Dudko, A. E. Filippov, J. Klafter, and M. Urbakh, "Beyond the conventional description of dynamic force spectroscopy of adhesion bonds," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 20, pp. 11 378–11 381, 2003.
- [107] G. Hummer and A. Szabo, "Kinetics from nonequilibrium single-molecule pulling experiments," *Biophysical Journal*, vol. 85, pp. 5–15, 2003.
- [108] M. Raible, M. Evstigneev, P. Reimann, F. W. Bartels, and R. Ros, "Theoretical analysis of dynamic force spectroscopy experiments on ligand-receptor complexes," *Journal of Biotechnology*, vol. 112, pp. 13–23, 2004.
- [109] C. Ray, J. R. Brown, and B. B. Akhremitchev, "Correction of systematic errors in single-molecule force spectroscopy with polymeric tethers by atomic force microscopy," *Journal of Physical Chemistry*, vol. 111, pp. 1963–1974, 2007.

- [110] E. Evans and K. Ritchie, "Strength of a weak bond connecting flexible polymer chains," *Biophysical Journal*, vol. 76, pp. 2439–2447, 1999.
- [111] M. Raible, M. Evstigneev, F. Bartels, R. Eckel, R. Ros, D. Anselmetti, and P. Reimann, "Theoretical analysis of single-molecule force spectroscopy experiments: Heterogeneity of chemical bonds," *Biophysical Journal*, vol. 90, pp. 3851–3864, 2006.
- [112] M. Raible and P. Reimann, "Single-molecule force spectroscopy: Heterogeneity of chemical bonds," *Europhysics Letters*, vol. 73, pp. 628–634, 2006.
- [113] K. Wollschläger, K. Gaus, A. Körnig, R. Eckel, S.-D. Wilking, M. McIntosh, Z. Majer, A. Becker, R. Ros, D. Anselmetti, and N. Sewald, "Single-molecule experiments to elucidate the minimal requirement for dna recognition by transcription factor epitopes," *small*, vol. 5, pp. 484–495, 2009.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den vielen Personen danken, die für das Gelingen dieses Projektes mit verantwortlich waren.

Prof. Dr. Dario Anselmetti danke ich für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe „Experimentelle Biophysik und Angewandte Nanowissenschaften“ eine Promotion erfolgreich zum Abschluss zu bringen. Ihr Enthusiasmus und ihre wissenschaftliche Neugier waren Vorbild und Ansporn zugleich. Ihre Unterstützung und ihr Verständnis, auch und gerade in einer äußerst schwierigen Phase, waren entscheidend für das Gelingen dieser Arbeit und darüber hinaus.

Prof. Dr. Thomas Dierks hat sich bereit erklärt, als zweiter Gutachter tätig zu werden und hat als Leiter der Arbeitsgruppe Biochemie I maßgeblichen Anteil an der Verfügbarkeit der hier untersuchten Moleküle.

Christian Bartz, Doktorand in der Arbeitsgruppe von Prof. Dierks, schulde ich Dank für die unkomplizierte Bereitstellung der Proteine und viele erhellende Diskussionen über Ergebnisse, Möglichkeiten und Strategien. Dein Überblick ist beeindruckend.

Dr. Volker Walhorn möchte ich ebenfalls danken. Nicht nur für das Korrekturlesen der Arbeit oder die vielen geduldigen und engagierten fachlichen Diskussionen, die experimentelle Hilfestellung oder die „Wartung“ der Software, sondern vor allem auch für den Zuspruch und die aufbauenden Worte. War mit Sicherheit nicht einfach mit mir.

Christoph Pelargus gebührt dank für seine Unterstützung bei allen Dingen, die mit Software zu tun hatten. Dass du auch an Wochenenden kurzfristig technische Probleme behoben hast, weiß ich sehr zu schätzen.

Meinen ehemaligen Bürokollegen Dr. Alexander Harder, Dr. André Spiering, Dr. Alexander Beel, Niklas Biere und Dennis Kreft sowie allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Experimentelle Biophysik und Angewandte Nanowissenschaften“ danke ich für die moralische Unterstützung, anregende Gespräche und interessante Diskussionen.

Dr. Marlis Brielmann-Thümmeler und Mario Kreutler danke ich für die Unterstützung, Rücksichtnahme und Flexibilität, die sie mir und meinem Wunsch, trotz meines neuen Jobs die Promotion zu einem erfolgreichen Ende zu bringen, entgegen gebracht haben. Ohne euch hätte ich „kurz vor dem Ziel“ aufhören müssen. Simone, Bert, Jens und Mirza schulde ich Dank für offenes Feedback, eine neue Perspektive und so manches „Du packst das!“.

Stefanie Bock hat kompetent, freundlich und schnell diese Dissertation lektoriert und so erheblich zur Qualität beigetragen.

Abschließend möchte ich meiner Frau Franziska danken, die mir immer und zu jeder Zeit den Rücken gestärkt hat und mich durch alle Höhen und Tiefen während dieser Jahre begleitet hat.

Publikationen

Veröffentlichungen

- H. Milting, B. Klauke, A. H. Christensen, J. Musebeck, V. Walhorn, S. Grannemann, T. Münnich, T. Saric, T. B. Rasmussen, H. K. Jensen, J. Mogensen, C. Baecker, E. Romaker, K. T. Laser, E. zu Knyphausen, A. Kassner, J. Gummert, D. P. Judge, S. Connors, K. Hodgkinson, T.-L. Young, P. A. van der Zwaag, J. P. van Tintelen and D. Anselmetti, „The TMEM43 Newfoundland mutation p.S358L causing ARVC-5 was imported from Europe and increases the stiffness of the cell nucleus“, *European Heart Journal*, vol. 36, no. 14, pp. 872-881, 2014
- S. Grannemann, Ch. Barz, A. Erol, V. Walhorn, Th. Dierks and D. Anselmetti, „Catch bond interaction between cell surface sulfatase Sulf2 and glycosaminoglycans“, *submitted to European Biophysics Journal*, 2019

Tagungsbeiträge

- S. Grannemann, T. Münnich, V. Walhorn and D. Anselmetti, „Planar gold nanocrystals as photonic substrates for single-molecule mechano-optical investigations“, *Spring Meeting of the German Physical Society*, 2012
- S. Grannemann, M. Ritzefeld, V. Walhorn, N. Sewald and D. Anselmetti, „Study of protein-DNA interaction by simultaneous AFM force spectroscopy and single molecule fluorescence detection“, *Spring Meeting of the German Physical Society*, 2013
- S. Grannemann, A. Erol, Ch. Barz, V. Walhorn, Th. Dierks and D. Anselmetti, „Catch bond interaction between cell surface sulfatase Sulf2 and glycosaminoglycans“, *Spring Meeting of the German Physical Society*, 2017