

Funktionale Charakterisierung Herzmuskelspezifischer Proteinvarianten

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
vorgelegt der Fakultät für Physik der Universität Bielefeld

von Dipl. Phys. Mareike Dieding
geboren am 13.02.1984

Bielefeld, 6. Oktober 2016

Erster Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Dario Anselmetti
Experimentelle Biophysik &
angewandte Nanowissenschaften
Fakultät für Physik, Universität Bielefeld

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hendrik Milting
Erich & Hanna Klessmann Institut
für kardiovaskuläre Forschung und Entwicklung
Herz- und Diabeteszentrum NRW
Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Biologische Grundlagen	3
2.1	Kardiomyopathien	3
2.2	Aufbau der Herzmuskulatur	5
2.2.1	Desmosom	7
2.2.2	Desmoglein2	8
2.2.3	Desmoglein2 Mutationen	11
2.2.4	Intermediärfilament Desmin	12
2.2.5	Desmin Mutationen	17
3	Physikalische Grundlagen	19
3.1	Rasterkraftmikroskop	19
3.2	Dynamische Kraftspektroskopie	20
3.2.1	Kraft-Distanzkurve	21
3.2.2	Modell der wurmartigen Kette	23
3.2.3	Theorie der dynamischen Kraftspektroskopie	24
	Reaktionskinetik	25
	Herleitung des Standardmodells	27
	Erweitertes Modell	29
	Grenzen der Modelle	31
3.3	Bestimmung der freien Enthalpie	32
3.4	Aperturloses SNOM	32
4	Materialien und Methoden	35
4.1	Desmin Präparation	35
4.1.1	Rekombinantes Desmin	35
4.1.2	<i>In vitro</i> Assemblierung von Desmin	36
	Dialyse	36
	Konzentrationsbestimmung	36

	Filamentassemblierung	37
4.1.3	Substratpräparation für das AFM	37
4.1.4	Fluoreszenzmarkierung von Desmin	37
4.1.5	Substratpräparation für das SNOM	38
4.2	Dsg2 Präparation	38
4.2.1	Rekombinantes Dsg2	38
4.2.2	Goldsubstrat Präparation für Kraftspektroskopie	39
4.2.3	Substrat- und Cantileverfunktionalisierung	39
4.3	Messmethoden und Analyse	41
4.3.1	Abbildung von Desmin mit AFM	41
4.3.2	Aperturlose optische Rasternahfeldmikroskopie an Desmin . . .	42
	Cantilever für SNOM	43
	Signalverarbeitung	43
4.3.3	Kraftspektroskopie an rDsg2	44
	Bestimmung der Federkonstante	44
	Durchführung der dynamischen Kraftspektroskopie an rDsg2 .	46
	Kraft-Distanzkurven Analyse	47
	Datenauswahl	48
	Datenauswertung nach Standardtheorie	49
	Parameterfehler durch Messunsicherheit	50
5	Ergebnisse	53
5.1	Strukturuntersuchung von Desmin	53
5.1.1	Abbildung von Desmin mit dem AFM	53
	Desmin Wildtyp	53
	Desmin <i>Missense</i> -Varianten	55
	Desmin Deletion	57
5.1.2	Koassemblierung von Desmin Wildtyp und Varianten	57
5.2	Kraftspektroskopie an rDsg2	62
5.2.1	rDsg2-WT im Calcium-Puffer	62
5.2.2	Einfluss kleiner Kräfte auf die Kraftverteilung kleiner Belas- tungsraten	63
5.2.3	Auswertung des rDsg-WT nach Standardtheorie	65
5.2.4	rDsg2-WT im EDTA-Puffer	66
	Auswertung der EDTA-Puffermessungen nach Standardtheorie	68
5.2.5	Kontrollmessung	70

5.2.6	rDsg2 Varianten im Calcium-Puffer	71
	Auswertung nach Standardtheorie	73
5.2.7	Vergleich verschiedener Modelle	75
5.2.8	Approximation der Bindungsenergie mit Jarzynskis Gleichung .	78
5.2.9	Energielandschaft und Reaktionskinetik von rDsg2	80
6	Diskussion	83
6.1	Desmin	83
6.2	Desmoglein2	86
7	Ausblick	93
	Literatur	97
	Abkürzungsverzeichnis	113
	Publikationen	116
	Danksagung	118

1 Einleitung

Genetisch bedingte Kardiomyopathien sind schwere Erkrankungen des Herzmuskels. Sie führen oft zu Herzinsuffizienz, deren einzige kausale Therapie die Herztransplantation ist. Die genetische Prädisposition der Kardiomyopathie ist zudem die Hauptursache für den plötzlichen Herztod bei jungen Sportlern (D'Silva u. a. 2015).

Ursächlich für die Erkrankung sind Mutationen in verschiedensten Genen. Die Mechanismen, die von der genetischen Veränderung zu einer Symptomatik führen, sind bisher nur teilweise verstanden. Häufig zeigt der Genotyp eine unvollständige Penetranz und bildet variable Phänotypen aus. Um die Mechanismen und damit die Ursache der Erkrankung zu verstehen, ist die interdisziplinäre Forschung von medizinischen, biochemischen und biophysikalischen Ansätzen erforderlich. Wird beispielsweise in Verbindung mit einer Erkrankung eine neue Genvariante entdeckt, helfen funktionale biophysikalische und biochemische Analysen die molekularen und zellularen Effekte der Genvariation aufzuklären und zu klassifizieren (Richards u. a. 2015). Die Klassifizierung findet Anwendung in der genetischen Beratung der betroffenen Familien.

Mutationen, die im Zusammenhang mit Kardiomyopathien stehen, kodieren verschiedene Proteine in Herzmuskelzellen. Von diesen wurden in der vorliegenden Arbeit die Proteine Desmin und Desmoglein2 biophysikalisch charakterisiert.

Das Intermediärfilament Desmin ist ein wichtiger Bestandteil des Cytoskeletts der Muskelzelle. Desminfilamente bilden ein flexibles Gerüst im Cytoplasma und geben der Zelle strukturellen und mechanischen Halt. Mutationen im Desmin-Gen (DES) verursachen eine große Bandbreite schwerer Skelett- und Herzmuskelerkrankungen.

Das Cadherin Desmoglein gehört zu den Desmosomen, welche punktuell zwei Zellen mechanisch miteinander verknüpfen. Desmoglein2 ist eines von zwei Transmembranproteinen des kardialen Desmosoms, deren extrazelluläre Domänen den Raum zwischen den Zellen überbrücken und mit gegenüberliegenden Domänen einen adhäsiven Kontakt herstellen. Somit erhalten Desmosomen die mechanische Integrität des Herzmuskels. Mutationen im Desmoglein2-Gen (DSG2) sind häufig Ursache der seltenen arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie.

Die Erforschung der Eigenschaften und Funktionen des Proteinwildtyps auf mole-

kularer Ebene und der zelluläre Kontext sind essenziell für das Verständnis der Pathomechanismen von Proteinvarianten. Vor diesem Hintergrund wurden die isolierten Proteine mittels Rasterkraftmikroskopie und -spektroskopie untersucht. Das Rasterkraftmikroskop (AFM) ist ein vielseitiges Instrument mit dem biologische Proben abgebildet und auf mechanische Eigenschaften untersucht werden können. Neben einem konventionellen AFM-Setup wurde ein aperturloses optisches Rasternahfeldmikroskop genutzt, welches - zusätzlich zur Topografie - Fluoreszenz detektieren kann.

Die Eigenschaft von Desmin zu Filamenten zu assemblieren lag im Fokus bei diesem Protein beziehungsweise Proteinkomplex. Die *in vitro* assemblierten Desminfilamente wurden mit AFM und aperturlosem optischen Rasternahfeldmikroskop abgebildet. Dabei lag der Forschungsschwerpunkt bei dem Vergleich des Assemblierungsverhaltens von verschiedenen Varianten mit dem Wildtyp. Es wurde sowohl die homophile Assemblierung als auch die heterophile Assemblierung, also ein Gemisch aus Wildtyp und der jeweiligen Variante, untersucht. Einige der untersuchten Desminvarianten zeigten schwere Beeinträchtigung bei der Bildung zu nativen Filamenten.

Unter dem Aspekt der Bindungseigenschaften wurde die adhäsive Region von Desmoglein2 untersucht. Mit dynamischer Kraftspektroskopie wurde die homophile Bindungskinetik von Desmoglein2-Proteinfragmenten betrachtet und darüber hinaus wurde die freie Enthalpie der Bindung abgeschätzt. Dabei zeigte der Wildtyp eine Bindungscharakteristik, die von homologen Cadherinen bekannt ist.

Neben des Erkenntnisgewinns des nativen Charakters von Desmin und Desmoglein2 wurden diese Methoden herangezogen, um Kardiomyopathie assoziierte Varianten dem jeweiligen Wildtyp gegenüberzustellen und funktionale Unterschiede aufzudecken. Die Ergebnisse können dabei helfen die Auswirkung der Genvariation auf molekularer Ebene zu verstehen und sind ein wichtiges Puzzlestück für die Klassifizierung der Varianten.

2 Biologische Grundlagen

2.1 Kardiomyopathien

Die Definition der Kardiomyopathien (gr. *kardía* Herz, gr. *mys* Muskel, gr. *páthos* Leiden) der *American Heart Association* lautet:

Kardiomyopathien sind eine heterogene Gruppe von Erkrankungen des Myokards, die mechanische und/oder elektrische Fehlfunktion des Herzens zur Folge haben. Meistens (aber nicht notwendigerweise) gehen sie einher mit ventrikulärer Hypertrophie (*Vergrößerung der Herzkammer*) oder Dilatation (*Erweiterung der Herzkammer*). Die Ursachen sind vielfältig, aber häufig genetisch bedingt. Kardiomyopathien sind auf das Herz beschränkt oder Teil einer generellen systemischen Erkrankung. Sie führen oft zu kardiovaskulär bedingtem Tod oder sich steigernder Behinderung, wegen Herzinsuffizienz. (Maron u. a. 2006)

Nach der *American Heart Association* lassen sich Kardiomyopathien in zwei Klassen - primär und sekundär - einteilen (Maron u. a. 2006). Die primären Kardiomyopathien betreffen vorwiegend den Herzmuskel und werden in genetisch bedingte, erworbene sowie gemischte (genetisch und erworbene) Kardiomyopathien eingeteilt. Die sekundären Kardiomyopathien sind Teil einer größeren Anzahl systemischer Erkrankungen mit Herzmuskelbeteiligung.

In einem Statement der *European society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases* wird eine Klassifizierung vorgeschlagen (Elliott u. a. 2008), welche die Kardiomyopathien nach morphologischen und funktionalen Phänotypen gruppiert. Demnach werden fünf Hauptgruppen klassifiziert: Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM), dilatative Kardiomyopathie (DCM), arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC), restriktive Kardiomyopathie (RCM) und unklassifizierte Kardiomyopathien.

Im Folgenden werden die vier klassifizierten Kardiomyopathien in der Reihenfolge ihrer Prävalenz kurz beschrieben und ihre genetischen Ursachen genannt.

Hypertrophe Kardiomyopathie

Die hypertrophe Kardiomyopathie ist eine autosomal-dominant vererbte Herzmuskelerkrankung. Sie ist wahrscheinlich die häufigste Form der Kardiomyopathie mit einer Prävalenz von 1:500 (Maron u. a. 1995). Die HCM zeichnet sich pathologisch durch eine Verdickung des Myokards ohne Dilatation des linken Ventrikels aus. Hauptsächlich sind Mutationen in einem von zehn Genen, die für Proteine des kardialen Sarkomers kodieren, verantwortlich (Maron u. a. 2003).

Dilatative Kardiomyopathie

Die dilatative Kardiomyopathie ist charakterisiert durch eine ventrikuläre Vergrößerung und systolischer Dysfunktion bei normaler Wandstärke des linken Ventrikels. DCM ist eine weit verbreitete und weitgehend irreversible Form der Herzmuskelerkrankung mit einer Prävalenz von etwa 1:2500 (Maron u. a. 2006). In 20 % bis 50 % der Fälle von DCM kann ein familiärer Zusammenhang gezeigt werden, welche dann vorwiegend autosomal-dominant sind (Burkett u. a. 2005). Bei der autosomal-dominanten DCM wurden Mutationen in Genen gefunden die für Proteine des Cytoskeletts, des Sarkomers, der Z-Scheiben, der Kernmembran und des Glanzstreifens kodieren (Elliott u. a. 2008).

Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie

Die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie ist eine Herzmuskelerkrankung, bei der Herzmuskelzellen durch Binde- oder Fettgewebe ersetzt werden. Die Prävalenz in der allgemeinen Bevölkerung liegt zwischen 1:2000 und 1:5000 und betrifft häufiger Männer als Frauen (3:1) (Pilichou u. a. 2016). ARVC wird üblicherweise autosomal-dominant mit einer unvollständigen Penetranz (Genotyp führt zu Phänotyp) und variabler klinischer Ausprägung vererbt (Norman u. a. 1999). Bis heute wurden 12 Gene identifiziert, die eine ARVC verursachen können: DES, DSC2, DSG2, DSP, JUP, PKP2, TGFB3, TMEM43, LMNA, PLN, CTNNA3 und TTN (Lazzarini u. a. 2015). Die meisten assoziierten Genvarianten kodieren für die Hauptbestandteile des kardialen Desmosoms: Desmoplakin (DSP), Desmoglein-2 (DSG2), Plakophilin-2 (PKP2), Desmocollin-2 (DSC2) und Plakoglobin (JUP).

Restriktive Kardiomyopathie

Die restriktive Kardiomyopathie ist die wahrscheinlich seltenste Form der Herzmuskelerkrankung. Sie ist durch ein normales oder verkleinertes Volumen in der Diastole

(Füllungsphase) eines oder beider Ventrikel mit normaler oder vergrößerter Wandstärke und normaler systolischer Funktion charakterisiert (Kushwaha u. a. 1997). Die RCM kann idiopathisch (ohne erkennbare Ursache), familiär oder durch verschiedene systematische Erkrankungen verursacht sein. Bei der familiären RCM wurden Mutationen in Genen gefunden, die Troponin I, Troponin T, α -Aktin und Desmin kodieren (Arbustini u. a. 2006; Parvatiyar u. a. 2010).

2.2 Aufbau der Herzmuskulatur

Das Muskelgewebe wird in die glatte Muskulatur (autonomes Nervensystem) und die quergestreifte Muskulatur (somatisches Nervensystem) eingeteilt. Zur quergestreiften Muskulatur zählen die Skelettmuskulatur, sowie die Herzmuskulatur. Beide bestehen aus regelmäßigen Grundeinheiten, den sogenannten Sarkomeren (Abb. 2.1). Die Sarkomere bestehen aus Bündeln von Aktin- und Myosinfilamenten und werden von den Z-Scheiben begrenzt. Die Aktinfilamente sind in der I-Bande (an den Z-Scheiben) lokalisiert, während die Myosinfilamente in der A-Bande (mittig zweier Z-Scheiben) vorherrschend sind. Der unterschiedliche Kontrast der Filamente ergibt den typisch quergestreiften Eindruck unter dem Licht- oder Elektronenmikroskop. Die freien Enden der Aktinfilamente ragen ein Stück in die I-Bande hinein, sodass die Aktin- und Myosinfilamente überlappen. Während der Muskelkontraktion gleiten die Aktinfilamente tiefer zwischen die Myosinfilamente und das Sarkomer verkürzt sich.

Während die Skelettmuskulatur aus, bis zu mehreren Zentimeter langen, vielkernigen Zellelementen (Muskelfasern) gebildet wird, besteht die Herzmuskulatur aus verzweigten, meist einkernigen Herzmuskelzellen von etwa 100 μm Länge. Die Herzmuskelzellen sind untereinander durch die sogenannten Adhäsionsverbindungen und *Gap junctions* an den Glanzstreifen (*Disci intercalares*) verbunden. Die *Gap junctions* sorgen hauptsächlich für die Signalweitergabe, während die Adhäsionsverbindungen die Zellen mechanisch verknüpfen.

Adhäsionsverbindungen werden in zwei Gruppen eingeteilt: Die Desmosomen (*Macula adhaerens*) und die *Adherens Junctions* (*Zonula adhaerens*, *Fascia adhaerens*, *Punctum adhaerens*) (Borrmann u. a. 2006). In den Glanzstreifen von Herzmuskelzellen treten Desmosomen und *Adherens Junctions* kolokalisiert auf, weshalb die Adhäsionsverbindung im Herzmuskel auch *Area composita* genannt wird (Borrmann u. a. 2006; Franke u. a. 2006; Li u. a. 2010).

Desmosomen und *Adherens Junctions* sind grundlegend ähnlich aufgebaut, unterscheiden sich aber anhand der beteiligten Proteine. Ihre Zell-Zell-Verbindung ist durch

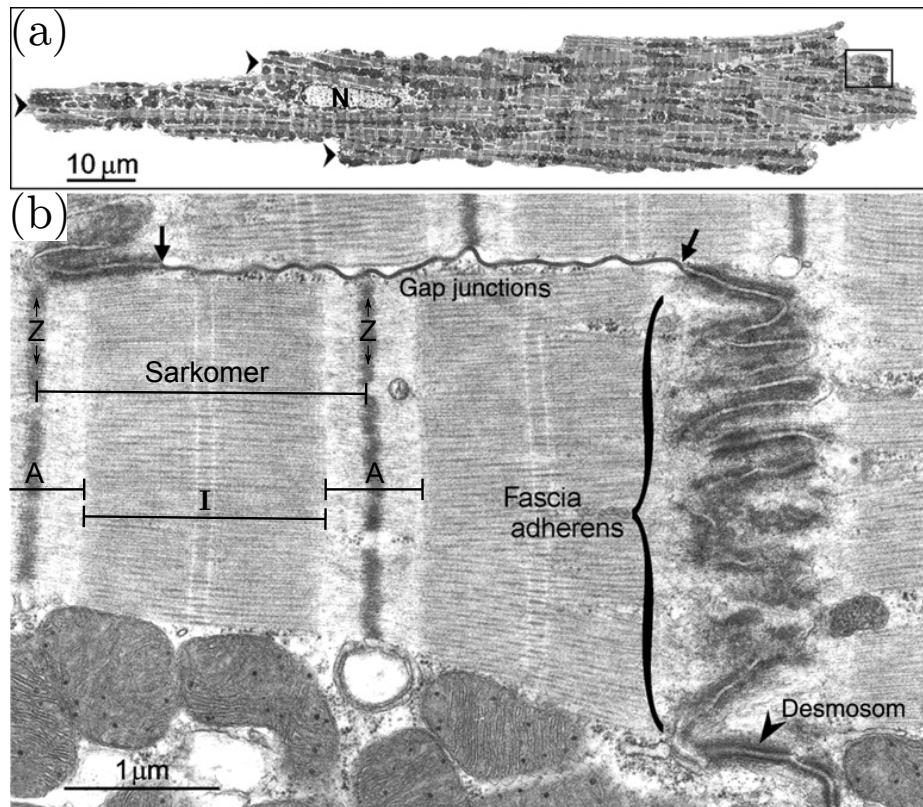


Abbildung 2.1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Herzmuskelzellen. (a) Schnitt durch eine einzelne ventrikuläre Herzmuskelzelle. Die Pfeilspitzen zeigen auf den Glanzstreifen an der linken Seite der Zelle, der hier seine typische Stufenform aufweist. N (Nucleus) markiert den Zellkern. Der gestreifte Eindruck der Zelle wird durch die regelmäßige Anordnung der Sarkomere hervorgerufen. (b) Vergrößerte Ansicht des Zell-Zell-Kontaktes zweier Herzmuskelzellen (für Größenverhältnis siehe schwarze Box in (a)). In der Vergrößerung sind die regelmäßigen Sarkomerstrukturen mit Z-Scheiben, A- und I-Banden erkennbar. Zusätzlich sind die drei Zell-Zell-Interaktionen zu erkennen: *Gap junctions* (zwischen Pfeilen), *Fascia adherens* (geschweifte Klammer) und *Desmosom* (Pfeilspitze). Vergrößerung in (a): $\times 1500$, (b): $\times 27\ 000$. Nach Severs u. a. (2008) (Original erschienen in Severs u. a. 1982 (a) und Severs 2000 (b)).

die große Proteinfamilie der Cadherine, calciumabhängige Transmembranproteine, charakterisiert. In Desmosomen befinden sich die desmosomalen Cadherine (Desmocollin und Desmoglein), in *Adherens Junctions* die Typ I Cadherine. Intrazellulär sind diese durch verschiedene Ankerproteine mit dem Cytoskelett der Zelle verbunden. Vorwiegend sind Desmosomen mit Intermediärfilamenten (im Herzmuskel hauptsächlich Desmin, Kartenbeck u. a. 1983) und *Adherens Junctions* mit Aktinfilamenten verankert (Franke u. a. 2006). Auf diese Weise ist der gesamte Herzmuskel durch ein transzelluläres Netzwerk miteinander verknüpft und jedes Element trägt zur strukturellen und mechanischen Integrität des Herzmuskels bei.

2.2.1 Desmosom

Desmosomen sind starke interzelluläre Adhäsionsverbindungen (Garrod u. a. 2008), die intrazellulär mit den Intermediärfilamenten verbunden sind. Sie sind in Gewebetypen, wie der Haut oder dem Herzmuskel, welche starker mechanischer Belastung ausgesetzt sind zu finden.

Desmosomen bestehen aus drei Proteinfamilien: Desmosomale Cadherine, Armadillo Proteine und Plakine. Die desmosomalen Cadherine, Desmocollin (Dsc) und Desmoglein (Dsg), sind Transmembran-Glykoproteine die mit ihren extrazellulären Domänen homo- und heterophile Zell-Zell-Verbindungen eingehen. Ihre cytoplasmatische Domäne bindet an die Armadillo Proteine Plakoglobin und Plakophilin, welche zusammen mit dem Plakin Protein Desmoplakin mit den Intermediärfilamenten verbunden sind. Abbildung 2.2a zeigt die Lage der spezifischen Proteine im Desmosom (Thomason u. a. 2010). Die elektronenmikroskopische Aufnahme in 2.2b zeigt das Desmosom mit seinem charakteristischen symmetrischen Streifenmuster, hervorgerufen durch unterschiedliche Elektronendichte. Zur cytoplasmatischen Seite liegt die äußere Plaque (ODP, *outer dense plaque*) gefolgt von der inneren Plaque (IDP, *inner dense plaque*). Mittig, im extrazellulären Raum erstreckt sich ebenfalls eine dunkle Linie (*DM, dense midline*), sie markiert den interzellulären Kontaktbereich. Untersuchungen mit Kryoelektronentomografie von Desmosomen menschlicher Epidermis bestimmen die Dicke der *dense midline* mit 70 \AA und den Membran zu Membran Abstand mit $35 \pm 3 \text{ nm}$ (Al-Amoudi u. a. 2007). Al-Amoudi u. a. (2007) kommen zu dem Schluss, dass sich gegenüberliegende desmosomale Cadherine in der *dense midline* überlappen und nur die erste extrazelluläre Domäne (EC1) an der Bindung beteiligt sein kann. Weiterhin bestimmen sie aus der dreidimensionalen Rekonstruktion eine Moleküldichte von $17 \text{ 500 } \mu\text{m}^{-2}$.

Ein fundamentaler Unterschied zwischen Desmosomen und *Adherens Junctions* ist, dass gereifte Desmosomen im extrazellulären Raum eine deutlich geordnetere Struktur

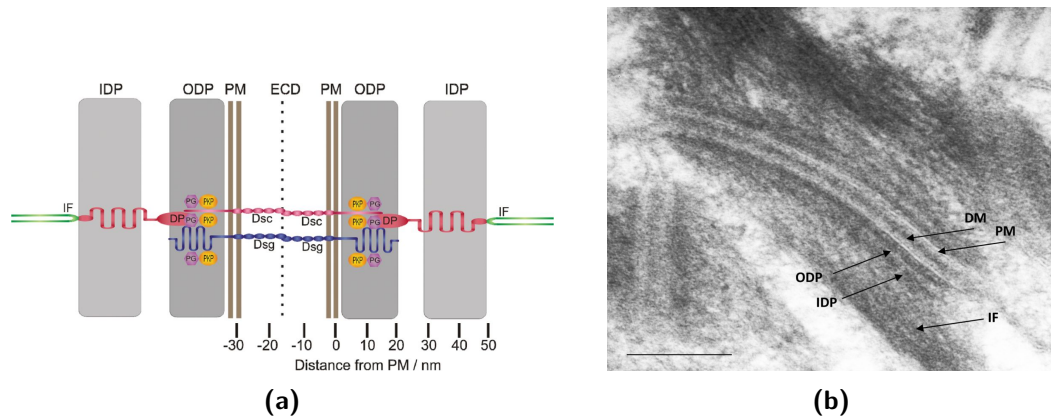


Abbildung 2.2: Das Desmosom. (a) Schematisches Diagramm des Desmosoms und die Lage der desmosomalen Proteine. Grau unterlegte Bereiche sind dem Kontrast im Elektronenmikroskopbild (b) zugeordnet (entnommen aus Thomason u. a. 2010). Bezeichnungen: IDP, inneres Plaques; ODP, äußeres Plaques; PM, Plasmamembran; ECD, Extrazelluläre Domäne; DM, *dense midline*; IF, Intermediärfilament; DP, Desmoplakin; PG, Plakoglobin; PKP, Plakophilin; Dsc, Desmocollin; Dsg, Desmoglein. Maßstabsbalken in (b) 160 nm.

aufweisen und einen sogenannten hyperadhäsiven Zustand annehmen, der calciumabhängig ist (Garrod u. a. 2005; Kimura u. a. 2007). Demgegenüber sind *Adherens Junctions* eher ungeordnet und ihre Bindung ist immer calciumabhängig (Wallis u. a. 2000; Kimura u. a. 2012).

Die Zellverbindung der Desmosomen erfolgt über Cadherine, welche Calciumbindestellen besitzen. Daher lässt sich vermuten, dass der Zell-Zell-Kontakt potentiell calciumabhängig ist. Dies wird auch in Zellkultur Experimenten bestätigt, bei denen sich Desmosomen erst ab einer gewissen Calciumkonzentration im Medium ausbilden (Watt u. a. 1984; Matthey u. a. 1986). Neuere Studien hingegen belegen, dass Desmosomen in der Epidermis der Maus auch nach sechs Stunden Inkubation in EGTA (ein Calcium Chelatligand) ihre Form und Adhäsion behalten (Garrod u. a. 2005). Vermutlich ist die Calciumunabhängigkeit der natürliche Zustand des *in vivo* gereiften Desmosoms (Garrod u. a. 2005).

2.2.2 Desmoglein2

Desmoglein (Dsg) und Desmocollin (Dsc) sind die Cadherine des Desmosoms. Ihre Isoformen Dsg1-4 und Dsc1-3 gehören zu den humanen desmosomalen Cadherinen. Dsg2 wird in sämtlichen Zellen die Desmosomen bilden exprimiert und ist somit das am weitesten verbreitete desmosomale Cadherin (Schäfer u. a. 1994). In Herzmuskelzellen werden ausschließlich Dsg2 und Dsc2 exprimiert (Schäfer u. a. 1994; Thomason u. a.

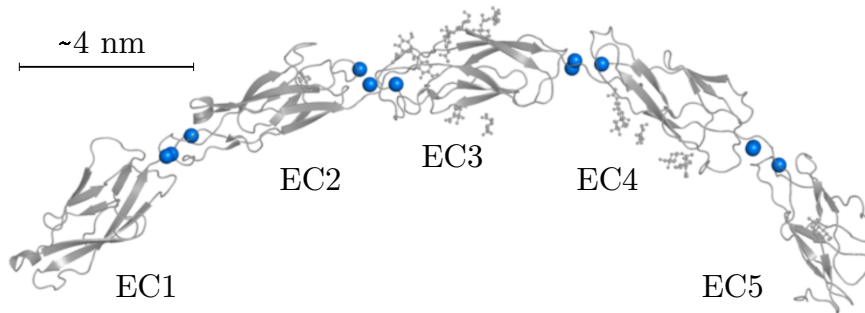


Abbildung 2.3: Ribbon-Darstellung eines Cadherins Proteinstruktur der fünf extrazellulären Cadherindomänen (EC1-5) von C-Cadherin (Typ I Cadherin) inklusive Calcium-Ionen (blau) zwischen den Domänen (pdb:1L3W, Boggon u. a. 2002).

2010).

Die Proteinsequenz der desmosomalen Cadherine weisen untereinander und im Vergleich zu klassischen Cadherinen eine hohe Übereinstimmung ($\sim 30\%$) und eine ähnliche extrazelluläre Domänen-Struktur auf (Garrod u. a. 2002). Klassische Cadherine (Typ I und Typ II) besitzen fünf extrazelluläre Cadherin-Domänen (EC1-5), die typischerweise ein siebensträngiges β -Fass aufweisen (Shapiro u. a. 1995; Boggon u. a. 2002; Häussinger u. a. 2004; Patel u. a. 2006). N- und C-Terminus der einzelnen Domänen liegen dadurch an gegenüberliegenden Enden und die Cadherin-Domänen sind in einer Kette gereiht (Abb. 2.3). Die Cadherin-Domänen werden durch Linker-Regionen getrennt, welche jeweils drei konservierte Calcium-Bindungsstellen besitzen (Boggon u. a. 2002).

Die Bindung von Calcium zwischen den Cadherin-Domänen versteift das Molekül, was zum Beispiel für die klassischen Cadherine E-Cadherin (Nagar u. a. 1996; Häussinger u. a. 2002), C-Cadherin (Boggon u. a. 2002) und N-Cadherin (Shapiro u. a. 1995) gezeigt wurde. Tariq u. a. (2015) bildeten die isolierte extrazelluläre Domäne (EC1-5) des Maus-Dsg2 in zwei unterschiedlichen Zuständen im Elektronenmikroskop ab: Ohne Calcium zeigte sich Dsg2 in kompakter Form mit einem Durchmesser von $6,91 \pm 1,13$ nm. Im Gegensatz dazu zeigte sich mit Calcium eine gestreckte Form mit einer Länge von $19,20 \pm 2,62$ nm. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Bindung von Calcium auch in Desmoglein zu einer Streckung des Moleküls führt.

Vor kurzem wurde die Kristallstruktur von desmosomalen Cadherinen (EC1-EC5 von Dsg2, Dsg3 und Dsc1) veröffentlicht (Harrison u. a. 2016), die bestätigt dass die Gesamtstruktur ähnlich der der klassischen Cadherine ist. Die EC-Domänen reihen sich in einem gestreckten Bogen und besitzen ebenfalls Calcium-Bindungsstellen zwischen den Domänen. Allerdings zeigt im Besonderen die Struktur von Dsg2 einen

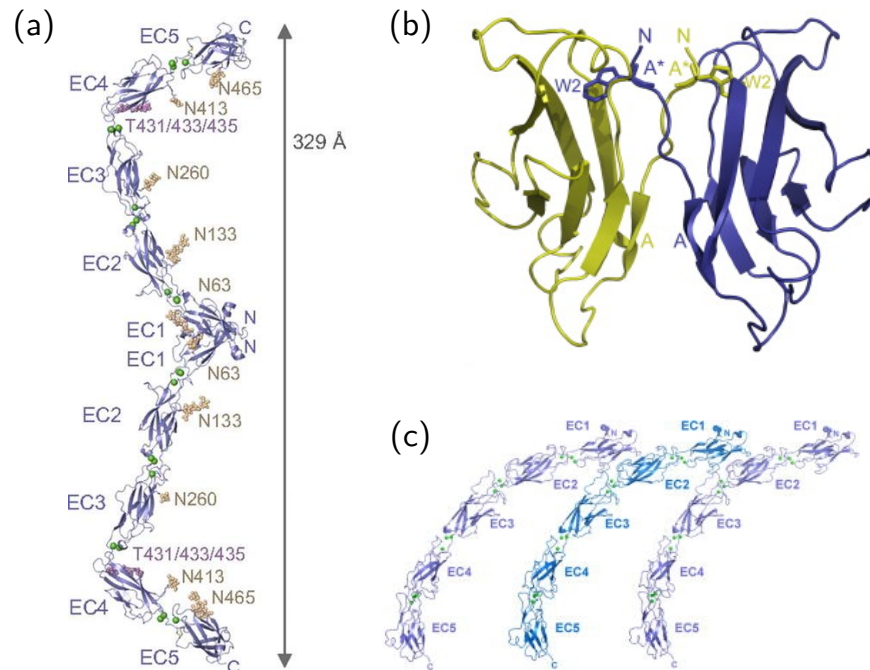


Abbildung 2.4: Cadherin Proteinstruktur und das Strangaustausch Bindungsmotiv. (a) Kristallstruktur des humanen Dsg2 Dimers (*ribbon*-Darstellung). Calcium-Ionen sind grün, N- und O-Glykosylierung jeweils orange und pink gefärbt. (b) Vergrößerte Ansicht der EC1-EC1-Domänen von C-Cadherin. Pfeile symbolisieren β -Faltblätter (*ribbon*-Darstellung). Der A* Strang am N-terminalen Ende (N) tauscht von einer Domäne zur Anderen. Das Trp-2 (W2) jeder Domäne ist im Stäbchenmodell dargestellt. (c) Laterale Anordnung von N-Cadherin mit *cis*-Bindung. Abbildung nach (a) Harrison u. a. (2016), (b) Posy u. a. (2008) und (c) Harrison u. a. (2011).

scharfen Knick zwischen der EC3-EC4 Domäne (Abb. 2.4a). Dies ist möglicherweise auf eine fehlende Calcium-Koordinierungsstelle in diesem Bereich zurückzuführen, weswegen nur zwei statt der üblichen drei Calciumionen binden (Harrison u. a. 2016). Bei den möglichen Adhäsionsmechanismen zwischen desmosomalen Cadherinen, dienen die klassischen Cadherine als Prototyp. In allen klassischen Cadherinen wurde eine Bindung charakterisiert, bei dem sich ein Großteil des N-terminalen β -Faltblattes (A*-Strang) in die EC1-Domäne des gegenüberliegenden Adhäsionspartners wechselt und vice versa (Shapiro u. a. 1995; Boggon u. a. 2002; Häussinger u. a. 2004). Diese Art von Strang- oder Domänenaustausch zur Bildung eines Proteinkomplexes ist ein allgemeines Phänomen und wird als *3D domain swapping* bezeichnet (Bennett u. a. 1995; Liu u. a. 2002). Neben hydrophoben Resten, die die Tasche für den ausgetauschten Strang bilden, ist das zentrale „Erkennungs-Element“ für den Strangaustausch der EC1 Domänen die konservierte Aminosäure Tryptophan-2 (Trp-2, zweite Aminosäure vom N-terminalen Ende aus gesehen, Abb. 2.4b). Mutationen von Trp-2 oder der

hydrophoben Reste verhindern die adhäsive Funktion der klassischen Cadherine (Tamura u. a. 1998; Pertz u. a. 1999; Shan u. a. 2000; Kitagawa u. a. 2000; Troyanovsky u. a. 1999) und Dsc2 (Nie u. a. 2011). Bei den desmosomalen Cadherinen sind die hydrophoben Merkmale und das Trp-2 vorhanden, sodass ein Strangaustausch wie bei den klassischen Cadherinen wahrscheinlich ist (Posy u. a. 2008; Boggon u. a. 2002; Nie u. a. 2011) und auch durch die Kristallstruktur bestätigt wurde (Harrison u. a. 2016, Abb. 2.4a).

In Desmosomen und *Adherens Junctions* ist das Strangaustausch-Motiv die so genannte *trans*-Bindung. Zwei Cadherine gegenüberliegender Zellmembranen binden im interzellularen Raum jeweils mit ihren EC1 Domänen parallel, das gesamte Cadherindimer bleibt dabei antiparallel ausgerichtet (Abb. 2.4a). Bei den Typ I Cadherinen in *Adherens Junctions* wird noch eine zweite, *cis*-Bindung vermutet, bei der zwei Cadherine auf der selben Membranseite lateral (EC1 mit EC2) binden (Abb. 2.4c, Harrison u. a. 2011). Ob *cis*-Bindungen auch bei desmosomalen Cadherinen eine Rolle spielen ist bislang umstritten (Tariq u. a. 2015; He u. a. 2003; Nie u. a. 2011; Al-Amoudi u. a. 2007).

2.2.3 Desmoglein2 Mutationen

Seit der ersten Entdeckung einer ARVC-assoziierten Mutation des desmosomalen Proteins Desmoplakin von Rampazzo u. a. (2002) wurden systematisch alle Gene, die für die desmosomalen Proteine kodieren getestet. Mittlerweile werden zahlreiche Dsg2 Varianten mit der ARVC in Verbindung gebracht (ARVC-Datenbank, Lazzarini u. a. 2015; van der Zwaag, Paul A u. a. 2009).

Im medizinischen Kontext wird zwischen Mutation und Variation unterschieden. Die Mutation wird dabei häufig als pathogene (krankheitsverursachende) Mutation innerhalb der Klassifizierung von Genvarianten verstanden. Weiterhin werden Varianten in wahrscheinlich pathogen, unbekannt signifikant und wahrscheinlich gutartig klassifiziert (Richards u. a. 2015). Die untersuchten Proteine werden in dieser Arbeit als Variante bezeichnet, womit eine Wertung beziehungsweise Einordnung innerhalb dieser Klassifizierung ausgenommen wurde.

Es wurden drei Dsg2 *Missense*-Varianten, die im Zusammenhang mit ARVC stehen untersucht. Diese sind Dsg2-D154E, -K294E und -V392I (Syrris u. a. 2007; Gärtner u. a. 2012; Pilichou u. a. 2006; Bauce u. a. 2010; Bhuiyan u. a. 2009). Abbildung 2.5 zeigt die Positionen der verschiedenen Varianten innerhalb der Aminosäuresequenz. Jede ist in der extrazellulären Sequenz von Dsg2 lokalisiert. Während K294E und V392I innerhalb der Cadherin-Domänen in EC3 und EC4 liegen, liegt D154E in der

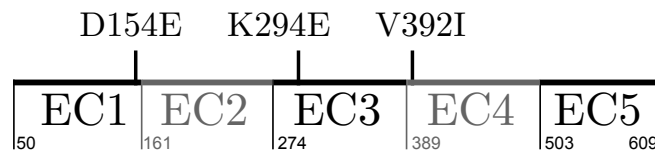


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der extrazellulären Domänen von Dsg2 und die Positionen der untersuchten Varianten in der Aminosäuresequenz. Die Domänen EC1-5 sind die extrazellulären Domänen des Dsg2. Die senkrechten Striche nach unten, markieren den Domänenanfang mit der Nummer der ersten Aminosäure. Die nicht dargestellten Sequenzen 1-23 und 24-49 sind eine Signalsequenz und eine Prodomäne, die während des Transports durch die Zelle abgespalten werden. Die Sequenzen 610-634 und 635-1118 sind die transmembrane Domäne und der cytoplasmatische Teil des Dsg2 (UniProtKB: Q14126). Bemerkung: Die Zählung der Aminosäureposition unterscheidet sich zu der im vorherigen Abschnitt. So entspricht Trp-2 in dieser Darstellung W51.

Linker-Region EC1-EC2 an einer konservierten Calcium-Koordinierungsstelle.

Die bioinformatische Analyse (*PolyPhen*-Algorithmus, Ramensky u. a. 2002 und *SIFT*-Algorithmus, Kumar u. a. 2009) der drei Dsg2 Varianten zeigt für D154E einen wahrscheinlichen Einfluss und für V392I einen unwahrscheinlichen Einfluss auf die Struktur und die Proteineigenschaften (Gärtner u. a. 2012). Für die Variante K294E ist das Ergebnis der Analysen ambivalent (Gärtner u. a. 2012). Weiterhin führten Gärtner u. a. (2012) ein Bindungs-Assay mit Durchflusszytometrie durch. Dabei ließen sie rekombinantes Dsg2 an Dsg2 exprimierende Säugerzellen binden. Sie stellten keine signifikanten Unterschiede im Bindungsverhalten der oben genannten Dsg2 Varianten und dem Wildtyp fest.

2.2.4 Intermediärfilament Desmin

Intermediärfilamente gehören neben den Aktinfilamenten und Mikrotubuli zum Cytoskelett eukaryotischer Zellen. Sie bilden ein flexibles Gerüst aus polymeren Filamenten im Cytoplasma und geben den Zellen strukturellen und mechanischen Halt. Die Funktion von Intermediärfilamenten geht jedoch über eine rein mechanische hinaus und Erkrankungen, die mit Mutationen bei Intermediärfilamenten in Zusammenhang stehen, können nicht einfach durch mechanische Defekte erklärt werden. Vielmehr sind sie mit einem breiten Funktionsspektrum verbunden, wie die Organisation und Funktionsregulierung von Zellorganellen, Signaltransduktion und Regulation der Transkription (Hnia u. a. 2015). Posttranslatale Modifikationen, wie Phosphorylierung-, Glykosylierung u.a., steuern die Organisation von Intermediärfilamenten und die Bindung zu assoziierten Proteinen, welche verschiedenste zelluläre Prozesse und zellspezifische Funktionen regulieren (Snider u. a. 2014).

Bisher wurden über 70 Gene identifiziert, die Intermediärfilamente kodieren (Szevenyi u. a. 2008). Somit bildet die Klasse der Intermediärfilamente eine große multigene Familie, die in sechs Homologie-Klassen eingeteilt wird: Typ 1 und Typ 2: saure und basische Keratine, Typ 3: Vimentin, Desmin und ähnliche Proteine, Typ 4: Neurofilament-Proteine, Typ 5: Lamine und Typ 6: Intermediärfilamente der Augenlinse.

Desmin wird in glatter wie auch in quergestreifter Muskulatur exprimiert und gilt als das wichtigste Intermediärfilament der Muskelzelle. Im Herzmuskel kommt Desmin sehr häufig (2 % der Proteine, Price 1984) und im Skelettmuskel weniger häufig (0,35 %, O'Shea u. a. 1981) vor. Weiterhin ist Desmin ein wichtiger Bestandteil der Purkinje-Fasern (50-70 %, Thornell u. a. 1981), spezialisierte Herzmuskelzellen des Erregungsleitungssystems.

Die Funktion von Desmin ist schematisch in Abbildung 2.6 gezeigt. Desminfilamente umgeben die Sarkomere lateral und sind an den Z-Scheiben konzentriert. Von dort verbinden sie die Zellorganellen und die Plasmamembran mit den Sarkomeren. Diese Anordnung sorgt dafür, dass die Ausrichtung der zellularen Strukturen während des Kontraktions-Relaxations-Zyklus des Muskels erhalten bleibt (Lazarides 1980).

Genetische Mausmodelle geben einen Einblick in Funktion, Einfluss und Bedeutung von Desmin. Desmin-Knockout-Mäuse zeigen schwerwiegende Defekte in allen Muskeltypen. Im Herzmuskel zeigte sich im besonderen Maße: Zelldegeneration, Zelltod, Fibrose, dilatative Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz (Li u. a. 1996; Milner u. a. 1999; Milner u. a. 1996; Thornell u. a. 1997; Psarras u. a. 2012).

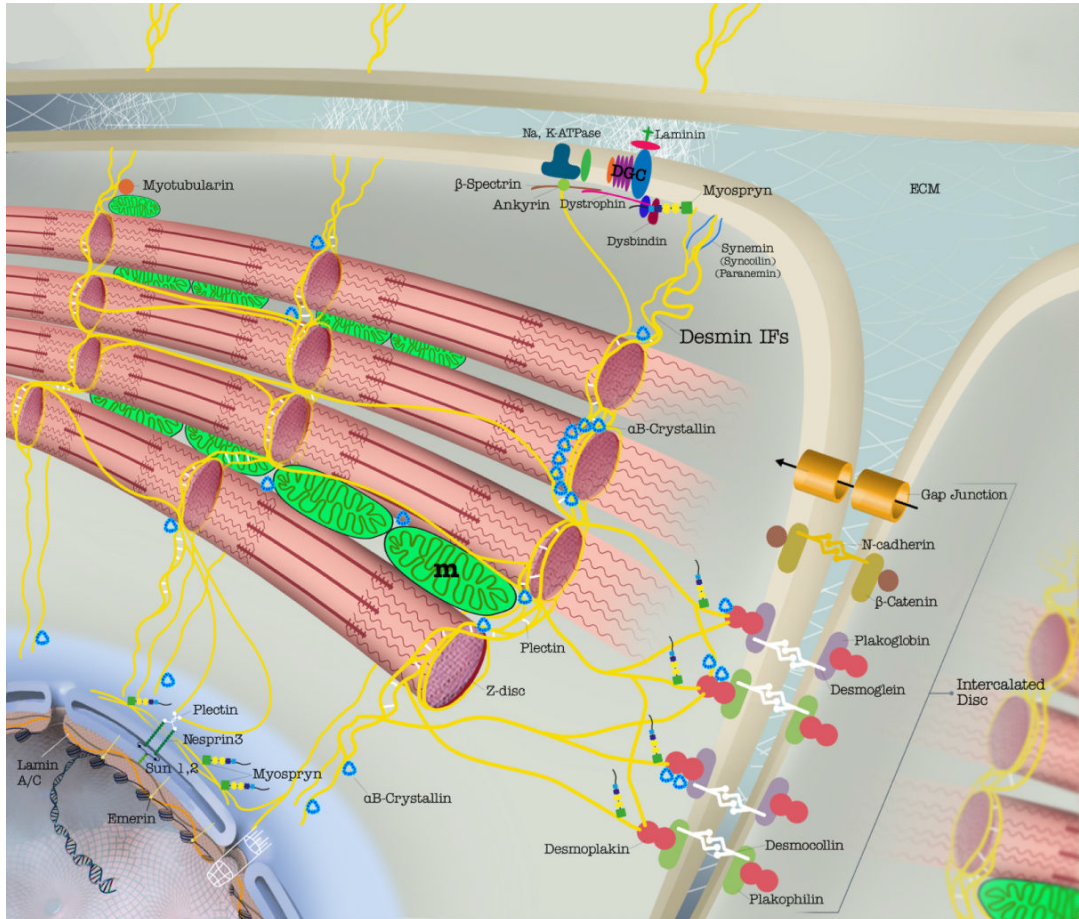


Abbildung 2.6: Die Rolle von Desmin in der intakten Herzmuskelzelle. Das intakte Desmin-Netzwerk (gelb) interagiert mit Proteinen und Zellorganellen. Desmin formt zusammen mit anderen Intermediärfilamenten (Synemin, blau) ein durchgehendes Netzwerk. Desminfilamente verbinden den kontraktile Apparat (rot) an den Z-Scheiben mit dem Glanzstreifen (*Intercalated Disc*, im Bild rechts), dem Costamer (im Bild oben), dem Zellkern (im Bild unten links) und den Mitochondrien (grün). Die meisten Proteine, die den Kontakt herstellen sind gezeigt (Desmoplakin, Myospryn, Ankyrin, Plectin). Desmin ist eng mit dem Chaperon α B-Kristallin assoziiert (blaues Dreieck). Abbildung aus Capetanaki u. a. 2015.

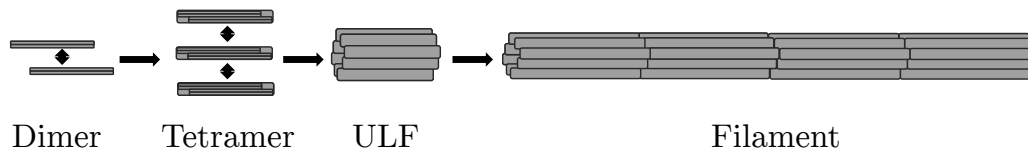


Abbildung 2.7: Assemblierungsmodell des Intermediärfilaments Desmin. Die Assemblierung vom Desmin-Dimer zum Desminfilament: Zwei Dimere fügen sich antiparallel versetzt zu einem Tetramer zusammen. Die Tetramere assemblieren lateral zu einem etwa 60 nm langen ULF (*unit length filament*), welche longitudinal zu einem Filament verschmelzen.

Desmin Struktur

Das humane Protein Desmin besteht aus 470 Aminosäuren mit einer berechneten Masse von 53,5 kDa (UniProtKB:P17661). Ähnlich wie alle Intermediärfilamente besitzt das Desmin eine zentrale, etwa 45 nm lange, vorwiegend α -helikale *rod*-Domäne, die von nicht- α -helikalen *head*- und *tail*-Domänen flankiert wird (Abb. 2.9). Das vorhandene Strukturmodell basiert auf der Strukturanalyse (Chernyatina u. a. 2012; Aziz u. a. 2010) des Intermediärfilaments Vimentin (Intermediärfilament Typ 3) mit dem es in über 70 % der Aminosäuresequenz übereinstimmt (Geisler u. a. 1982).

Das gereifte Intermediärfilament ist ein Proteinkomplex der durch Assemblierung vieler Proteinmonomere entsteht. Herrmann u. a. (2004) teilt die Intermediärfilamente in drei Assemblierungsgruppen ein, wonach Desmin zur zweiten Assemblierungsgruppe - den Vimentin-ähnlichen Intermediärfilamenten - gehört. Zunächst fügen sich zwei Monomere parallel zu einem *coiled-coil* zusammen (Herrmann u. a. 1996). Das *coiled-coil* ist ein grundsätzliches Oligomerisierungs-Motiv von Proteinen, bei dem sich die α -helikalen Domänen der einzelnen Moleküle um eine gemeinsame Achse winden (Burkhard u. a. 2001). Das Desmin-Dimer erhält so die Form eines Stabes. Anschließend fügen sich zwei Dimere antiparallel versetzt zu einem Tetramer mit einer Länge von etwa 60 nm zusammen (Kirmse u. a. 2010, s. Abb.2.7).

Die Tetramere fügen sich zunächst lateral und parallel zu 60 nm langen Filamenten mit vollem Durchmesser, den so genannten *unit-length filaments* (ULFs) zusammen (Herrmann u. a. 1996; Mücke u. a. 2004). Nachfolgend bilden sich lange Filamente, indem ULFs longitudinal zusammenwachsen (Kirmse 2007). Letztendlich folgt eine „Reifungsphase“, bei dem das Filament kompakter beziehungsweise der Radius kleiner wird (Stromer u. a. 1987; Herrmann u. a. 1999).

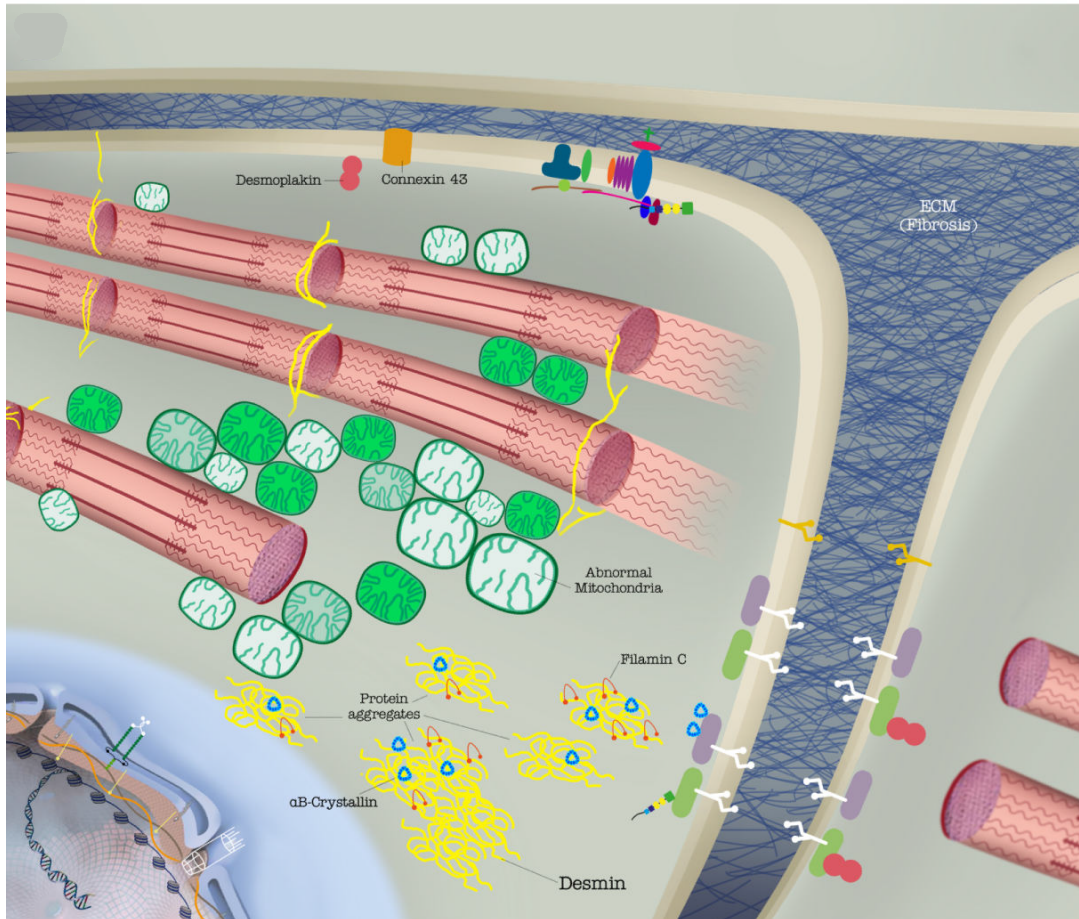


Abbildung 2.8: Die Auswirkungen einer Störung im Desmin-Netzwerk einer Herzmuskelzelle. Cytoplasmatische Desmin Aggregate sind ein Kennzeichen Desmin-assoziiierter Kardiomyopathien. Sie enthalten oft auch andere Proteine (hier α B-Kristallin und Filamin C). Weitere Defekte sind: Degenerierte Mitochondrien, Verformung des Zellkerns (aufgrund des fehlenden Kontakts mit Desminfilamenten), Defekte Zell-Zellkontakte und Delokalisation seiner Komponenten. Der Raum Zwischen den Zellen (extrazelluläre Matrix (ECM)) ist vergrößert und fibrös. Abbildung aus Capetanaki u. a. 2015.

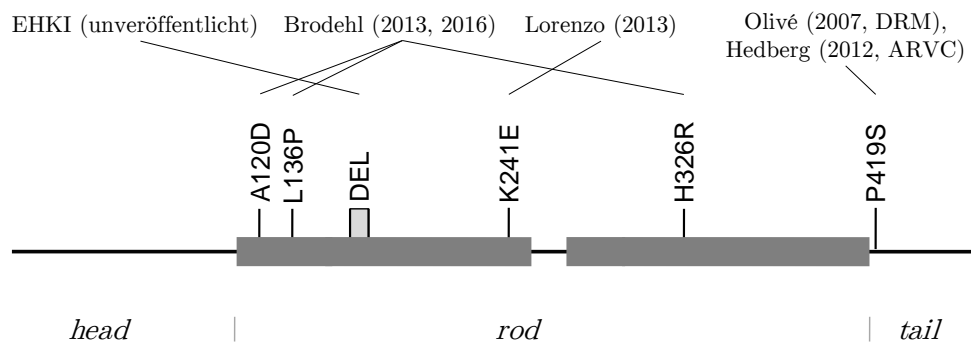


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der Positionen der untersuchten Varianten in der Aminosäuresequenz von Desmin. Desmin besteht aus 470 Aminosäuren. Die dickeren grauen Balken markieren die α -helikalen Bereiche auf der *rod*-Domäne. Diese werden von nicht-helikalen *head*- und *tail*-Domänen flankiert. Die Beschriftung der Varianten weist auf die jeweilige Erstveröffentlichung hin. Desmin-DEL wurde kürzlich am E. & H. Klessmann Institut (EHKI, Bad Oeynhausen, D) entdeckt. (DRM: *desmin related myopathy*).

2.2.5 Desmin Mutationen

Bisher stehen annähernd 70 Desmin Mutationen im Zusammenhang mit Skelett- oder Herzmuskelerkrankungen. Mehr als 70 % davon weisen einen kardialen Phänotyp auf (Capetanaki u. a. 2015). Die Phänotypen sind äußerst variabel - auch innerhalb einer Familie / der gleichen Mutation - und äußern sich in allen genetisch bedingten Kardiomyopathien (HCM, DCM, ARVC und RCM). So vielfältig die klinischen Phänotypen sind, so unterschiedlich sind auch die funktionalen Konsequenzen einer Variation von Desmin. Eine durch Aggregation verursachte Funktionsstörung des Desminnetzwerkes ist in Abbildung 2.8 gezeigt.

In der vorliegenden Arbeit wurden sechs Desmin Varianten untersucht. Die Desmin Varianten L136P und A120D stehen im Zusammenhang mit DCM, die Desmin Varianten H326R, K241E und P419S stehen im Zusammenhang mit ARVC (Lorenzon u. a. 2013; Brodehl u. a. 2016; Brodehl u. a. 2013a; Brodehl u. a. 2013b; Hedberg u. a. 2012). Weiterhin wurde eine Desmin Deletion (Desmin-DEL) untersucht. Bei dieser Variante fehlen die Basen 493-520 des Desmin-Gens, was zu einem Austausch von Q164A und A173S und zur Löschung der Aminosäuren 165 bis 172 führt. Abbildung 2.9 zeigt die Position der Desmin Varianten innerhalb der Aminosäuresequenz.

3 Physikalische Grundlagen

3.1 Rasterkraftmikroskop

Das Rasterkraftmikroskop (AFM, *atomic force microscope*) wurde von G. Binnig, C. Quate und C. Gerber entwickelt (Binnig u. a. 1986). Mit AFM kann man die Topografie von Oberflächen in Vakuum, Luft oder Flüssigkeiten messen. Des Weiteren ist es möglich sowohl atomare Strukturen als auch große Objekte im Mikrometerbereich abzubilden. Neben der Topografie können auch andere Materialeigenschaften wie mechanische, chemische, magnetische, elektrische oder optische Eigenschaften ortsaufgelöst untersucht werden.

Das Funktionsprinzip basiert auf der Messung der Wechselwirkung eines nanoskopischen Sensors mit der untersuchten Oberfläche. Der Sensor ist eine Spitze mit einem Radius von wenigen Nanometern, die sich am Ende einer Blattfeder kleiner Masse, genannt Cantilever, befindet. Diese feine Spitze wird in Wechselwirkungsreichweite der Oberfläche geführt, um dann Punktweise die Oberfläche abzutasten. Währenddessen wird die Auslenkung des Cantilevers gemessen, welche nur wenige Nanometer beträgt. Dies erfordert eine sensitive Messmethode und wird oft über die Lichtzeiger-Methode realisiert (Meyer u. a. 1990). Bei der Lichtzeiger-Methode wird Laserlicht auf die Rückseite des Cantilevers gerichtet, welches dann in eine Quadranten-Photodiode reflektiert wird (Abb. 3.1). Mithilfe, der über den Lichtzeiger gemessenen Auslenkung, kann in einem Regelkreis die Auslenkung, beziehungsweise Kraftwirkung des Cantilevers konstant gehalten werden. Durch das Regelsignal wird die Topografie der Oberfläche dargestellt.

Es existieren verschiedene Messmodi für das AFM. Eine erste grobe Einteilung erfolgt in den statischen und den dynamischen Modus. Beim statischen oder auch Kontakt-Modus wird der Cantilever durch direkten Kontakt des Sensors mit der Oberfläche ausgelenkt. Zu den dynamischen Modi gehört der vielfach verwendete intermittierende Modus (auch *TappingMode*TM). Der Cantilever wird hier durch ein Piezoelement zur Oszillation nahe seiner Resonanzfrequenz gebracht. Die Amplitude, Phase (zur anregenden Amplitude) und Frequenz des Cantilevers werden über den Lichtzeiger

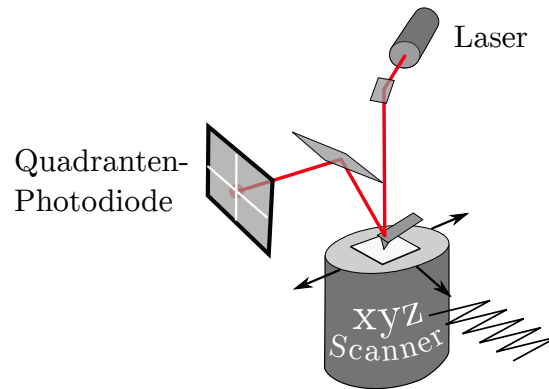


Abbildung 3.1: AFM-Messprinzip mit Lichtzeiger und Scanner-Einheit. Das Laserlicht fällt über einen Spiegel auf die Rückseite des Cantilevers, wird dort reflektiert und fällt über einen zweiten Spiegel auf die 4-Quadranten-Photodiode. In diesem Aufbau wird die Probe unter dem Cantilever gescannt.

gemessen. Diese drei Parameter verändern sich, wenn die Cantileverspitze in Kontakt mit der Oberfläche kommt. Im simplen Fall wird beim Scannen die Amplitude über den Regelkreis konstant gehalten (Amplituden-Modulation-Modus).

Der Spitzenkontakt mit der Oberfläche erfolgt nur sehr kurz im unteren Bereich der Oszillation, wodurch der Kraftübertrag auf die Oberfläche gegenüber dem Kontakt-Modus erheblich reduziert ist (Zhong u. a. 1993). Ein weiterer Vorteil gegenüber dem Kontakt-Modus ist, dass laterale Kräfte auf die Probe reduziert werden. Diese können gerade bei weichen oder schwach immobilisierten Proben zu unerwünschten Messartefakten führen und die Probe verformen oder beschädigen (Radmacher u. a. 1992; den Boef 1991). Da biologische Proben im Allgemeinen eher weich sind, werden diese vorzugsweise im dynamischen Messmodus abgebildet.

3.2 Dynamische Kraftspektroskopie

Neben den abbildenden Methoden des AFM's, kann es für die Untersuchung dynamischer Prozesse von biologischen Proben genutzt werden. Es eröffnet die Möglichkeit inter- und intramolekulare Kräfte einzelner Moleküle im Piconewtonbereich zu messen. Die Ergebnisse geben einen Einblick in die Energielandschaft der Bindungen (intermolekular) und/oder der gefalteten Moleküle (intramolekular) (Kellermayer u. a. 1997; Merkel u. a. 1999). Grundlegend werden für Experimente, bei denen intermolekulare Kräfte zwischen Molekülpaaren untersucht werden, das Molekülpaar (bzw. die Bindungspartner) an Cantileverspitze und Probenoberfläche kovalent gebunden. Die Kraftwechselwirkung mit dem AFM-Sensor wird in Kraft-Distanzkurven gemessen. Ei-

ne Kraft-Distanzkurve besteht aus dem Annähern des Sensors an die Probenoberfläche bis zum Kontakt, die Bindung des Molekülpaars und anschließendem Zurückziehen des Sensors. Während des Zurückziehens wird auf die Bindung eine Kraft ausgeübt, die die Lebensdauer der Bindung verkürzt bis sie bei einer kritischen Kraft dissoziiert (Dissoziationskraft).

3.2.1 Kraft-Distanzkurve

In Abbildung 3.2 ist eine Kraft-Distanzkurve dargestellt (Annäherung in blau, Zurückziehen in rot). Die Ordinate zeigt die Kraft, welche aus der Auslenkung des Cantilevers berechnet wird (s. Abschn.4.3.3, Abb.4.4). Die x-Achse entspricht der Distanz des Sensors zur Oberfläche. Repulsive Kräfte zwischen Oberfläche und Sensor führen zu einer Auslenkung des Cantilevers von der Oberfläche weg, welches als positive Kraft aufgetragen wird. Attraktive Kräfte führen zu einer Auslenkung des Cantilevers zur Oberfläche hin, was einer negativen Kraft in der Kraft-Distanzkurve entspricht. In Position A ist der Cantilever weit von der Oberfläche entfernt und die gemessene Kraft ist daher Null. Das bedeutet, es findet keine Wechselwirkung zwischen Sensor und der Oberfläche statt. Bei der weiteren Annäherung (Position B) des Cantilevers, bleibt die Kraft solange Null bis der Sensor die Oberfläche berührt (Position C in Abb. 3.2). Bei Berührung kommt es zu einer repulsiven Kraft und der Cantilever wird von der Oberfläche weg ausgelenkt. Der Umkehrpunkt D ist die maximale Auslenkung (vorgegebener Wert) bei dem der Sensor von der Elektronik wieder zurückgezogen wird. Verlässt er die Oberfläche an Position E, geht er in seine Ausgangslage ($F = 0$) zurück. Falls ein Molekül zwischen Oberfläche und Sensor gebunden hat, wird dieses im weiteren Verlauf gestreckt, bis es zum Abriss der Bindung (Dissoziation) kommt (Position F). Der Cantilever wird während der Streckung des Moleküls zur Oberfläche hin ausgelenkt und schwingt im Abrisspunkt in seine Ausgangslage zurück. Der zweite Teil der Kraft-Distanzkurven (in Abb. 3.2a rot) mit den gemessenen Dissoziationsereignissen kann zur Auswertung der Bindungsereignisse genutzt werden. Im Folgenden bezeichnet die Kraft-Distanzkurve nur den zweiten Part der Kurve.

In Abbildung 3.2b sind exemplarisch, verschiedene Kraft-Distanzkurven gezeigt. Im Regelfall sind diejenigen Kurven interessant, die Dissoziationsereignisse enthalten, welche auf spezifische Bindungen hinweisen. Um spezifische von unspezifischen Bindungen zu unterscheiden werden lange flexible Polymere als Linker-Moleküle eingesetzt. Sie erhöhen die Distanz bei der das Dissoziationsereignis stattfindet und sorgen für eine flexible Orientierung der Bindungspartner. Weiterhin können bekannte Eigenschaften, wie Länge und Elastizität der Linker-Moleküle dabei helfen die spezifische Bindung zu

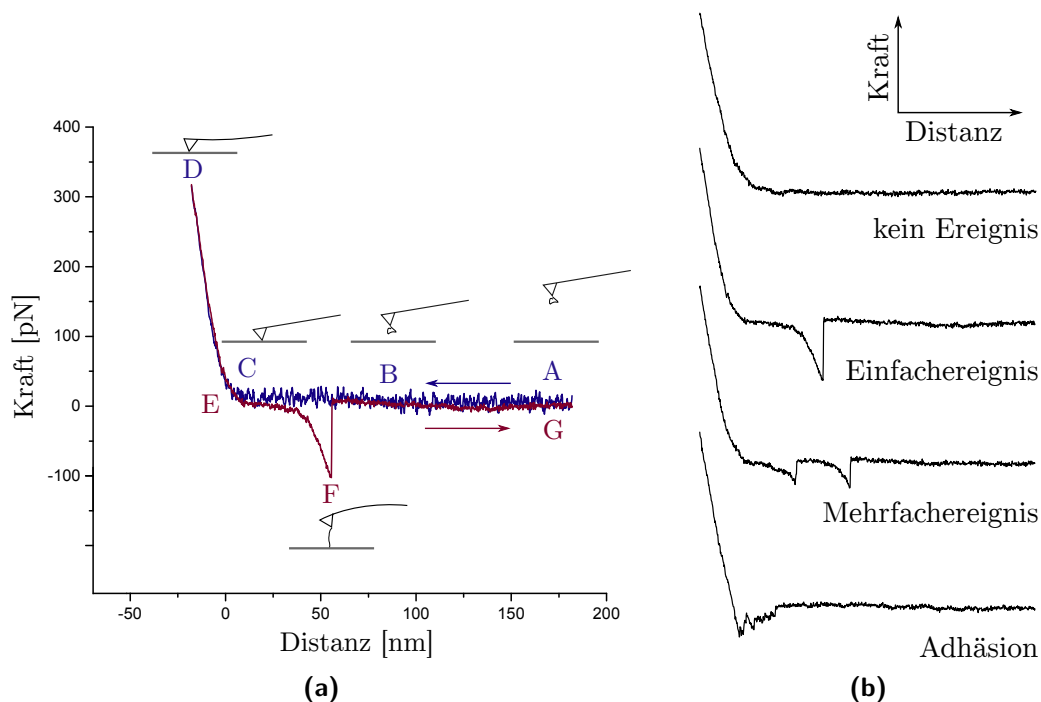


Abbildung 3.2: Kraft-Distanzkurven. (a) Der Graph zeigt exemplarisch eine Kraft-Distanzkurve. Die Annäherung des Cantilevers an die Oberfläche ist in blau, das Zurückziehen in rot dargestellt. Buchstaben und eingebetteten Skizzen zeigen die Auslenkung des Cantilevers und seine Position relativ zur Oberfläche während der Annäherung (A bis D) und des Zurückziehens (E bis G). (b) Verschiedene Kraft-Distanzkurven (nur das Zurückziehen), die typischerweise bei der Kraftspektroskopie auftreten können. Die oberste Kurve zeigt eine Kurve ohne Ereignis, dann ein einfach und ein doppeltes spezifisches Dissoziationsereignis und zu unterst ein unspezifisches Haften (Adhäsion) des Cantilevers an der Oberfläche.

identifizieren und von der Adhäsion abzugrenzen. Wird ein biege-elastisches Polymer gestreckt, zeigt es in der Kraft-Distanzkurve eine nichtlineare Auslenkung. Dieser Bereich ist in Abbildung 3.2a zwischen Position E bis F zu sehen. Mit einem geeigneten Modell (s. Abschn. 3.2.2) kann dieser Bereich der Kurve analysiert werden.

Die unterste Kurve in Abbildung 3.2b zeigt die Adhäsion. Dies sind unspezifische Bindungen zwischen Sensor und Substrat-Oberfläche. Diese führen dazu, dass die Cantileverspitze an der Oberfläche haften bleibt. Ist diese (z.B. elektrostatische) Wechselwirkung zwischen Oberfläche und Sensor sehr stark, werden mögliche Dissoziationsereignisse, die von spezifischen Bindungen hervorgerufen werden, durch das gemessene Adhäsionsereignis überlagert. Die Adhäsion kann über die Anbindung der Moleküle, die Materialien von Cantilever und Substrat und die Umgebungsbedingungen, z.B. Salzkonzentration oder pH-Wert, beeinflusst werden. Im Experiment ist es meist ein langwieriger Prozess bis eine geeignete Konfiguration gefunden wird, die diese störende

Adhäsion unterdrückt.

Die mittleren Kurven in Abbildung 3.2b zeigen spezifische Bindungen, erkennbar an der typischen nichtlinearen Form der Kurve. Treten mehrere Dissoziationsereignisse in einer Kraft-Distanzkurve auf, können mehrere Molekülpaar-Bindungen die Ursache sein. Allerdings können auch ähnliche Kurven mit mehreren Ereignissen bei Einzelmolekülexperimenten auftreten. So beobachten Rief u. a. (1997) in Kraft-Distanzkurven des Proteins Titin ein Sägezahnmuster (mehrere Ereignisse in einem regelmäßigen Abstand). Sie führen dies auf die Entfaltung von mehreren Immunoglobulin-Domänen innerhalb von Titin zurück.

3.2.2 Modell der wurmartigen Kette

Als wurmartige Kette (engl. *worm-like-chain*, WLC) bezeichnet man einen nicht dehnbaren aber biegsamen (biege-elastischen) Faden, der als Modell für ein Polymer verwendet wird. Porod (1949) und Kratky u. a. (1949) betrachteten ein Polymer (orig. Fadenmolekül) als statistisches, loses Knäuel und führten die Persistenzlänge als ein Maß für die Biegesteifigkeit des Polymers ein. In Einzelmolekülkraft-Experimenten wird ein Polymer an seinen Enden auseinander gezogen (s. Abb. (a)). Die Konfigurationen (Mikrozustände) die das Polymer einnehmen kann, werden durch das Festhalten und auseinanderziehen der Enden sukzessive reduziert. Die Arbeit die geleistet werden muss, um die Enden auseinander zu bringen kann mit einer Verringerung der Entropie gleichgesetzt werden.

Bustamante u. a. (1994) formulierten eine Formel die das Verhalten eines statistischen Knäuels, welches durch eine Kraft gestreckt wird, annähert. Sie wendeten sie erfolgreich bei Daten eines DNA-Molekül-Experiments an. Ihre Formel

$$F(x) = \frac{k_B T}{L_P} \left(\frac{1}{4 \left(\frac{1-x}{L_0} \right)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_0} \right), \quad (3.1)$$

beschreibt die Kraft F die notwendig ist, um ein Polymer mit der Konturlänge L_0 und der Persistenzlänge L_P auf die Länge x zu strecken. Vor der Anwendung des WLC-Modells muss die Kraftdistanz-Kurve (Abb. 3.2a) zunächst um die Cantileverauslenkung korrigiert werden (Abb. 3.3b, $F = k(z - x)$ mit Federkonstante k und Distanz z aus Abb. 3.2a). Die Streckung des Polymers kann mit dem WLC-Modell mit den Parametern Persistenzlänge L_P und Konturlänge L_0 angepasst werden (rote Kurve). Die Konturlänge ist die maximal mögliche Streckung (maximale End-zu-End-Abstand

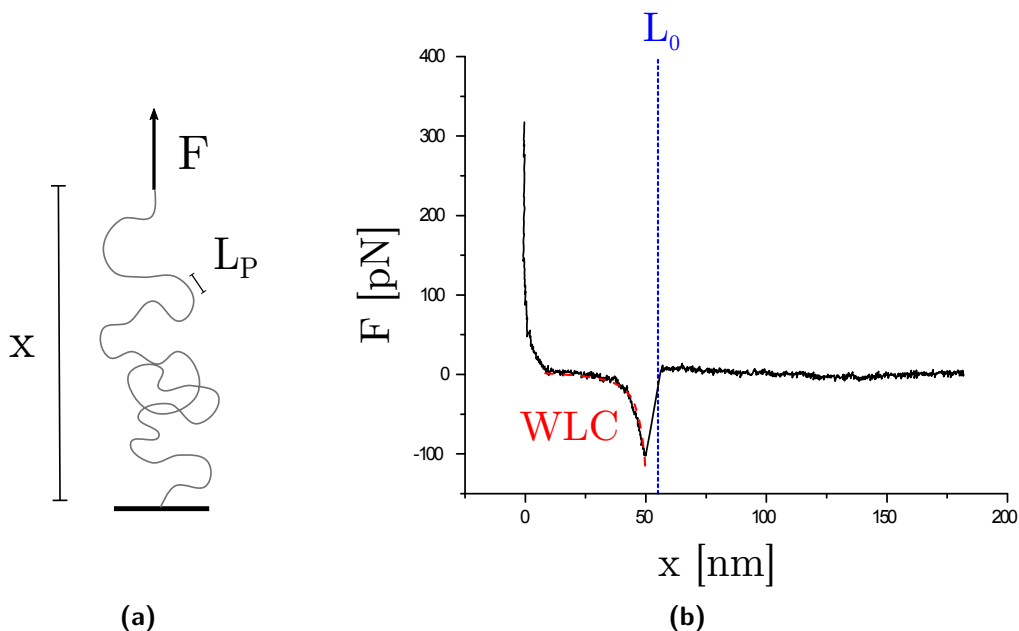


Abbildung 3.3: Das WLC-Modell. (a) Skizze eines Polymers in einem Einzelmolekülkraft-Experiment. Ein Ende des Polymers ist an das Substrat (unterer schwarze Balken) gebunden, das andere Ende wird mit der Kraft F gestreckt. (b) Kraft F gegen den End-zu-End-Abstand x des Polymers. Der WLC-Fit nach Gleichung 3.1 passt den Bereich der Kurve, über den das Polymer gestreckt wird, an. Die blau-gestrichelte Linie markiert die Konturlänge L_0 mit 55 nm. Bemerkung: In der Grafik wird die Kraft, die vom Cantilever verrichtet wird negativ dargestellt, entsprechend erhält die Gleichung 3.1 ein negatives Vorzeichen für die Anpassung an die Daten.

des Polymers).

Üblicherweise werden bei Kraftspektroskopie-Experimenten Polyethylenglycol-Linker (PEG-Linker) eingesetzt, um die zu untersuchenden Moleküle bzw. Proteine an die Substrat- und Sensoroberfläche kovalent zu binden. PEG ist ein Polymer und besteht aus der Grundeinheit $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$. Die Grundeinheit kann beliebig oft wiederholt werden, wodurch Molekülketten mit variablen Längen gewählt werden können. Der PEG-Linker besitzt weiterhin funktionelle Endgruppen, die je nach Einsatzzweck gewählt werden um das Protein oder die Oberflächen-Moleküle kovalent zu binden. PEG hat eine Persistenzlänge von $3,80 \pm 0,02 \text{ \AA}$ (Kienberger u. a. 2000).

3.2.3 Theorie der dynamischen Kraftspektroskopie

Der folgende Abschnitt gibt einen Einblick in die Entwicklung und Theorie der dynamischen Kraftspektroskopie.

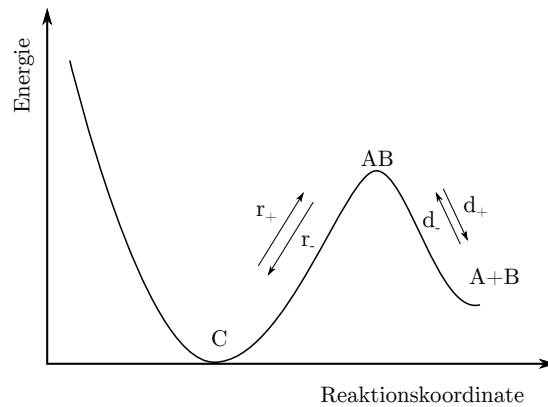


Abbildung 3.4: Darstellung der Reaktionsgleichung 3.2 in Dissoziationsrichtung. Die Reaktanden A und B sind durch einen Potentialwall vom gebundenen Zustand C getrennt. Am höchsten Punkt des Potentialwalls befindet sich der Übergangszustand AB.

Reaktionskinetik

Allgemein wird eine Bindung immer dann bevorzugt, wenn die freie Enthalpie des Komplexes kleiner als die Summe der freien Enthalpie der getrennten Moleküle ist. Dieser Unterschied in der freien Enthalpie ΔG , kann quantitativ mit der Affinität beschrieben werden. Je höher die Affinität, desto höher die Assoziationsgleichgewichtskonstante K_a und desto kleiner die Dissoziationsgleichgewichtskonstante K_d . Zwei getrennte Moleküle in Lösung mit einer gegenseitigen Affinität, werden sich nach einer gewissen Zeit diffusionsgetrieben treffen und assoziieren. Ebenso können sie nach einer gewissen Zeit thermisch getrieben wieder dissoziieren. Die Kinetik dieses Wechselspiels wird durch die Potentiallandschaft der freien Enthalpie bestimmt. Zur Beschreibung der Potentiallandschaft wird das System auf einen Freiheitsgrad, die Reaktionskoordinate x , beschränkt. Die Reaktionskoordinate repräsentiert die Distanz der Moleküle zueinander (Abbildung 3.4). Bell (1978) stellte die Reaktionsgleichung zweier Reaktionspartner A und B folgendermaßen auf:



wobei d_+ und d_- die Ratenkonstanten von Bildung und Zerfall des Übergangszustandes AB sind, während r_+ und r_- Ratenkonstanten für Hin- und Rückrichtung des gebunden Zustands C sind (*Transition state theory* (TST), Theorie des Übergangszustands; Eyring 1935; Evans u. a. 1935; Hänggi u. a. 1990).

Unter vielen Bedingungen ist die Konzentration des Übergangszustands klein gegen-

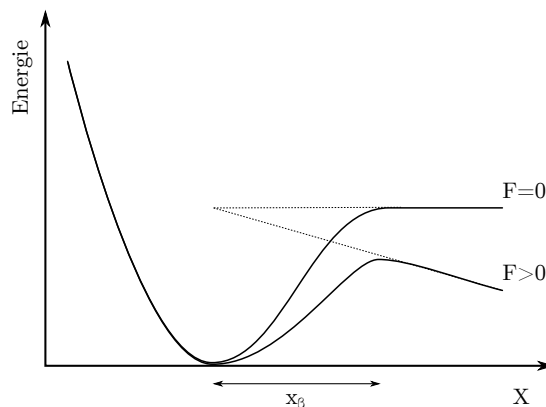


Abbildung 3.5: Darstellung einer Potentiallandschaft. Die Länge x_β beschreibt die Position der Energiebarriere relativ zum Energieminimum. Das Anlegen einer externen Kraft ($F > 0$) verringert die Energiebarriere gegenüber dem Gleichgewichtszustand ($F = 0$).

über den Edukten und dem Produkt. Für die globale Reaktionsgleichung $A + B \xrightleftharpoons[k_-]{k_+} C$ gilt dann

$$k_+ = \frac{d_+ r_+}{d_- + r_+}$$

und $k_- = \frac{d_- r_-}{d_- + r_+}$.

Bell formulierte im Weiteren erstmals die Abhängigkeit der Ratenkonstante k_- von einer extern angelegten statischen Kraft F (Bell 1978):

$$k_- = k_-^0 \exp\left(\frac{\gamma F}{k_B T}\right). \quad (3.3)$$

Der Faktor $\frac{\gamma}{k_B T}$ stellt für Bell die charakteristische Kraft der Bindung, in Einheiten der thermischen Energie $k_B T$ dar, welche empirisch bestimmt werden muss. Ist die Kraft $F = 0$ wird die Ratenkonstante zur Ratenkonstante im thermodynamischen Gleichgewicht k_-^0 . Die Dissoziation zweier Bindungspartner kann wie folgt beschrieben werden: Partner A befindet sich im Abstand x von Partner B. Im gebundenen Zustand C liegen sie in einem Potentialtopf und es muss erst eine Energiebarriere überwunden werden um die beiden voneinander zu trennen. Abbildung 3.5 zeigt eine mögliche Energielandschaft $U(x)$.

Der Abstand x_β ist definiert als der Abstand zwischen Energieminimum und dem

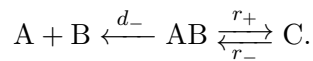
Maximum der Energiebarriere, bzw. zwischen dem gebundenen Zustand und dem Übergangszustand. Wird eine externe Kraft F entlang der Reaktionskoordinate x angelegt, verringert sich die Energiebarriere linear mit der angelegten Kraft ($U'(x) = U(x) - Fx$). Damit wird Bells Gleichung zu:

$$k_- = k_-^0 \exp\left(\frac{x_\beta F}{k_B T}\right). \quad (3.4)$$

Herleitung des Standardmodells

Ein wichtiges Ergebnis der Arbeit von Evans u. a. (1997) ist die Anwendbarkeit von Bells Gleichung auf reale Experimente. In realen Experimenten ist die Kraft, die auf eine Bindung ausgeübt wird, nicht konstant, sondern steigt mit der Zeit an. Die Kraft auf eine Bindung wird über einen Kraftsensor vermittelt. In einem typischen Experiment ist der Kraftsensor mit einem Bindungspartner verbunden, während der andere Bindungspartner fest auf einem Substrat fixiert ist. Der Kraftsensor wird nun mit einer konstanten Geschwindigkeit $v = \frac{\Delta x}{\Delta t}$ von dem Substrat weggezogen. Das System aus Kraftsensor, gestrecktem Molekül und Substrat wirkt wie eine Feder, die sich näherungsweise nach dem Hooke'schen Gesetz $\Delta F = -k_{\text{eff}} \Delta x$ verhält, wobei k_{eff} die effektive Federkonstante des Systems ist. Die Belastung auf die Bindung steigt demnach mit einer konstanten Rate $r = \frac{\Delta F}{\Delta t} = k_{\text{eff}} v$. Die Rate r wird im Allgemeinen als Belastungsrate bezeichnet.

Nachdem die Bindung unter der Belastung dissoziiert ist, kann eine erneute Assoziation ausgeschlossen werden, da die Bindungspartner räumlich weiter voneinander getrennt werden (Strunz u. a. 2000). Gleichung 3.2 wird zu



Nach Strunz u. a. (2000) ist diese Dissoziation ein stochastischer Prozess, der über die Mastergleichung beschrieben werden kann:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -k_- N(t). \quad (3.5)$$

$N(t)$ beschreibt die Wahrscheinlichkeit den gebundenen Zustand C unter der zeitabhängigen Krafteinwirkung $F = r t$ vorzufinden. Unter der Annahme, dass zum Zeitpunkt $t = 0$ die Wahrscheinlichkeit für den gebundenen Zustand $N(0) = 1$ ist, ergibt sich die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion der Dissoziationskräfte (Kraft bei der die Bindung

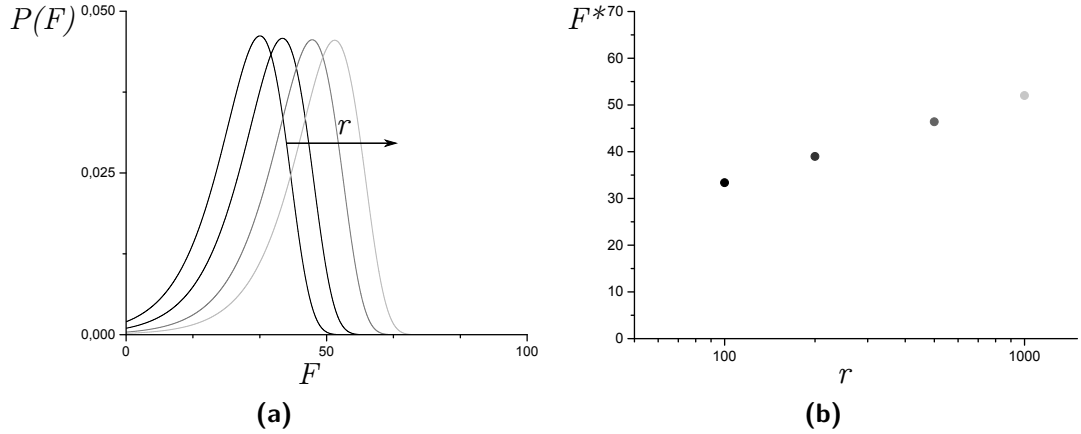


Abbildung 3.6: Die Standardtheorie nach Bell und Evans. (a) Simulierte Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion ($P(F)$, Gleichung 3.7) der Dissoziationskräfte F mit steigender Belastungsrate r ($r = 100, 200, 500$, und 1000 pN/s (von schwarz nach hellgrau), $x_\beta = 0,5$ nm und $k_-^0 = 0,2$ s $^{-1}$). (b) Die wahrscheinlichste Dissoziationskraft F^* aufgetragen gegen die Belastungsrate r . Werte passend zu den Wahrscheinlichkeitsdichten in (a) entsprechender Graustufe.

dissoziiert):

$$P(F) = \frac{k_-^0}{r} N(F/r). \quad (3.6)$$

Zusammen mit Gleichung 3.4 wird die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion der Dissoziationskräfte zu:

$$P(F) = \frac{k_-^0}{r} \exp\left(\frac{x_\beta F}{k_B T} + \frac{k_-^0 k_B T}{r x_\beta} \left[1 - \exp\left(\frac{x_\beta F}{k_B T}\right)\right]\right). \quad (3.7)$$

Abbildung 3.6a zeigt die Abhängigkeit der Funktion $P(F)$ mit ansteigender Belastungsrate r . Das Maximum der Wahrscheinlichkeitsdichte verschiebt sich mit ansteigender Belastungsrate zu größeren Kräften und liegt bei:

$$F^* = \frac{k_B T}{x_\beta} \ln \frac{x_\beta r}{k_-^0 k_B T}. \quad (3.8)$$

Wird die wahrscheinlichste Dissoziationskraft F^* (das Maximum von $P(F)$) gegen die Belastungsrate aufgetragen (s. Abb. 3.6b), kann x_β und k_-^0 direkt durch Anpassung der Gleichung 3.8 ermittelt werden. Dieser Zusammenhang und Gleichung 3.8 werden im Folgenden Standardtheorie und -modell genannt.

Die Ratenkonstante k_-^0 beschreibt die Dissoziation ohne äußere Krafteinwirkung im thermodynamischen Gleichgewicht und wird im Allgemeinen mit der Arrheniusglei-

chung (van't Hoff 1884; Arrhenius 1889) ausgedrückt:

$$k_-^0(T) = \nu \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{N_A k_B T}\right) \quad (3.9)$$

mit ν , N_A und ΔG^\ddagger einem Vorfaktor, der Avogadro-Konstanten und der Höhe der Energiebarriere. Nach Eyring (1935) ist der Vorfaktor für eine chemische Reaktion 1. Ordnung $\nu \sim \frac{k_B T}{h}$ mit der Planck-Konstante h . Bei Raumtemperatur liegt dann der Vorfaktor ν bei etwa $6 \frac{1}{ps}$ und es ist möglich die Energiebarriere ΔG^\ddagger abzuschätzen (Popa u. a. 2011). Eine Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten $K_d = \frac{k_-^0}{k_+^0}$ ist hingegen schwierig, da k_+^0 über die dynamische Kraftspektroskopie nicht zugänglich ist. Der Zugang zur Bindungsenergie im thermodynamischen Gleichgewicht ΔG_0 ist daher so nicht möglich. Sie könnte aus der Gleichgewichtskonstanten über die thermodynamische Definition:

$$\Delta G_0 = -N_A k_B T \ln K_d, \quad (3.10)$$

berechnet werden. In Absatz 3.3 wird ein alternativer Ansatz zur Abschätzung der Bindungsenergie im thermodynamischen Gleichgewicht beschrieben.

Erweitertes Modell

Das bisher vorgestellte und für die Auswertung genutzte Standardmodell ist ein gutes und relativ einfach anwendbares Modell der von Evans u. a. (1997) aufgestellten Theorie. In diesem Standardmodell sind jedoch mehrere Vereinfachungen enthalten. Zunächst ist die Breite der Potentialbarriere x_β eine feste Größe und unabhängig von der angelegten Kraft. Dies ist eine gute Näherung für einen tiefen und steilen Potentialtopf, bei dem sich x_β bei einer angelegten Kraft auf die Bindung nicht wesentlich verschiebt (Merkel u. a. 1999; Evans u. a. 1999).

Die ursprünglich von Evans u. a. (1997) aufgestellte Theorie berücksichtigt die Deformation der Potentialbarriere bei einer angelegten Kraft. Durch die Erweiterung von Kramers Theorie der diffusionsgetriebenen Kinetik in einer Lösung (Kramers 1940; Hänggi u. a. 1990) zu einer unter Krafteinwirkung dissoziierenden Bindung, zeigten sie, dass die Ratenkonstante (Gleichung 3.4) der allgemeineren Form

$$k_- = k_-^0 g(f) \exp\left(\frac{\Delta E_b(f)}{k_B T}\right) \quad (3.11)$$

folgen muss, wobei $g(f)$ und $\Delta E_b(f)$ von der Deformation der Barriere abhängen.

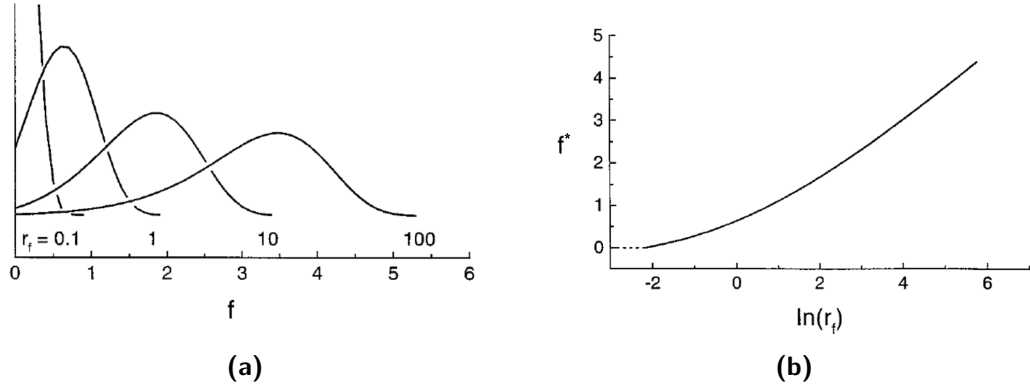


Abbildung 3.7: Simulation eines Bindungskomplexes mit einer steifen Verbindung zum Kraftsensor in einem idealisierten tiefen harmonischen Potential. (a) Wahrscheinlichkeitsdichten der Dissoziationskraft über drei Größenordnungen der Belastungsrate. Sowohl f als auch r_f sind einheitenlos und skalieren mit $\frac{k_B T}{x_\beta}$. (b) Die wahrscheinlichste Dissoziationskraft aufgetragen gegen die Belastung. Das Standardmodell (mit einer scharfen Energiebarriere) hätte in dieser Skalierung eine Steigung von Eins. Mit dem hier simulierten harmonischen Potential ist die Steigung geringer und für kleine Kräfte $f < 1$ nichtlinear. Abbildung nach Evans u. a. (1999).

Weiterhin geht das Standardmodell von konstanten Belastungsraten bei einer konstanten Ziehgeschwindigkeit aus. Diese Annahme ist gültig für eine steife Verbindung zwischen Kraftsensor und Molekül (Abbildung 3.7). Im Fall einer Verbindung mit einem weichen nichtlinearen Linker ist die Belastungsrate jedoch von der Kraft abhängig.

Eine vollständige Beschreibung der wahrscheinlichsten Kraft, die das veränderliche Potential und den Einfluss eines weichen Linkers mitberücksichtigt gibt Gleichung (4) aus Evans u. a. (1999):

$$f^* = \ln(r_f) + \ln \left\{ \frac{\frac{\partial \ln c}{\partial f} + \frac{\partial \ln g}{\partial f} + 1}{c(f) g(f)} \right\}_{f=f^*}, \quad (3.12)$$

mit den dimensionslosen Größen $f = \frac{F x_\beta}{k_B T}$ und $r_f = \frac{k v x_\beta}{k_B T k_-^0}$. Der Vorfaktor $g(f)$ ist $\sim f^a$. Für ein einfaches physikalisches Potential reicht der Exponent von $a = 0.5$ für inverse Potenzfunktionen bis $a = 1$ für eine tiefe harmonische Potentialfunktion (Evans u. a. 1997). Die Funktion $c(f)$ berücksichtigt die Elastizität des eingesetzten Linkers, welcher mit dem WLC-Modell (Gleichung 3.1) beschrieben wird. Die Definition aus Evans u. a. (1999) lautet

$$c(f) \approx \frac{1 + 2c_p(1 - x_p)^3}{1 + 2(1 - x_p)^3}, \quad (3.13)$$

mit $x_p = \frac{x}{L_0}$, wobei x und L_0 der Extension und Konturlänge des Linkers entsprechen und c_p das charakteristische Verhältnis aus Kraftsensor- zu Linker-Biegesteifigkeit mit $c_p = \frac{k L_0 L_P}{k_B T}$ ist.

Der Faktor c_p reicht von Null für eine steife Verbindung bis zu 10^4 für lange Linker ($L_0 \approx 100$ nm) und steife Cantilever ($k \approx \text{N m}^{-1}$). Für $c_p = 0$ wird $c(f) = 1$ und vernachlässigt man zusätzlich die Verformung der Energielandschaft, durch $g(f) = 1$, wird aus Gleichung 3.12 wieder das Standardmodell.

Weiterhin wird in Evans (2001) eine Näherungsgleichung angegeben, die zwar die Änderung des Potentials vernachlässigt aber das WLC-Modell einschließt:

$$f^* \approx \frac{k_B T}{x_\beta} \ln \frac{v}{v_\beta} + \frac{k_B T}{x_\beta} \left\{ \ln \left(\frac{f^* x_\beta}{k_B T} - \frac{3}{2} \right) + \frac{1}{2} \ln \frac{f^* x_\beta}{k_B T} \right\} \quad (3.14)$$

mit

$$v_\beta = \frac{L_0 k^0}{2} \left(\frac{x_\beta}{4 L_P} \right)^{\frac{1}{2}}.$$

Grenzen der Modelle

Die empirische Verteilung der Dissoziationskräfte kann durch das theoretische Modell nicht vollständig beschrieben werden. So ist die experimentell bestimmte Verteilung der Dissoziationskräfte wesentlich breiter als die des Standardmodells (Abbildung 3.6a) und rechtsschief statt linksschief.

Die Diskrepanz zwischen experimentellen Daten und den theoretischen Modellen ist Gegenstand lebhafter Diskussion. Eine mögliche Erklärung sind multiple Bindungsergebnisse, die fälschlicherweise in die Analyse mit einfließen (Getfert u. a. 2012; Guo u. a. 2008). Eine andere von Raible u. a. (2006) aufgestellte Hypothese ist die „Heterogenität von chemischen Bindungen“, welche von statistischen Schwankungen der kraftabhängigen Dissoziationsraten ausgeht. Mögliche Ursachen sind lokale chemische Schwankungen in der Umgebung und Konformationsänderungen der Moleküle. Des Weiteren kann eine veränderte geometrische Orientierung dazu führen, dass die Belastung auf die Bindung nicht entlang oder parallel zur Reaktionskoordinate bzw. x_β führt. Auch ein Einfluss auf die Breite der Verteilung aufgrund unterschiedlicher Ausrichtung der Moleküle durch die Immobilisierung auf einer Oberfläche ist möglich (Vijayendran u. a. 2001). Letztendlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere wenige aber nicht unbedingt vernachlässigbare unspezifische Bindungen mit ausgewertet werden (Raible u. a. 2006).

3.3 Bestimmung der freien Enthalpie

Obwohl Kraftspektroskopie-Experimente fern vom thermodynamischen Gleichgewicht durchgeführt werden, können Rückschlüsse auf die Reaktionskinetik im thermodynamischen Gleichgewicht gezogen werden. Dies zeigt die Abschätzung der Ratenkonstante k_-^0 und der Barrierenbreite x_β aus der Theorie von Bell und Evans. Seit der Formulierung der Jarzynski-Gleichung sind tiefere Einblicke möglich. So konnte die freie Enthalpie ΔG_0 zwischen zwei Zuständen (Bindungsenergie) und sogar die Potentiallandschaft aus Einzelmolekülexperimenten rekonstruiert werden (Hummer u. a. 2001; Dudko u. a. 2006; Liphardt u. a. 2002; Noy 2004; Gupta u. a. 2011; Harris u. a. 2007). Grundlage ist die Jarzynski-Gleichung (JE) (Jarzynski 1997b; Jarzynski 1997a):

$$\exp\left(-\frac{\Delta G_0^{JE}}{k_B T}\right) = \left\langle \exp\left(\frac{W_n}{k_B T}\right) \right\rangle_n \quad (3.15)$$

Die Energie ΔG_0^{JE} wird aus der Arbeit W_n aus einem beliebigen Prozess bestimmt, unabhängig davon ob der Prozess im thermodynamischen Gleichgewicht stattfindet oder nicht. Der Ensemblemittelwert für $n \rightarrow \infty$ führt zu einer exakten Schätzung der freien Enthalpie im thermodynamischen Gleichgewicht $\lim_{n \rightarrow \infty} \Delta G_0^{JE} = \Delta G_0$. Raman u. a. (2014) wendeten die Jarzynski-Gleichung bei einem Satz aus Kraft-Distanzkurven an und berechneten damit die Bindungsenergie von Säure-Basenpaarbindungen. Sie beobachteten, dass ΔG_0^{JE} sehr schnell (innerhalb der ersten 15 bis 20 Messungen) gegen einen konstanten Wert konvergiert. Sie verglichen ihr Ergebnis mit anderen Methoden und kommen zu dem Schluss, dass sich die Jarzynski Gleichung gut bei Kraftspektroskopie-Experimenten anwenden lässt.

3.4 Aperturloses SNOM

Das aperturlose optische Rasternahfeldmikroskop ist eine Kombination aus AFM und superhochauflösender Fluoreszenzmikroskopie. Kombiniert können diese beiden Techniken sowohl topografische als auch optische Auflösungen < 20 nm erreichen.

Das Auflösungsvermögen gewöhnlicher optischer Mikroskope ist durch Lichtbeugung auf etwa die Hälfte der Wellenlänge begrenzt (ca. 250 nm für sichtbares Licht). Diese von Abbe 1873 formulierte Gesetzmäßigkeit stellt die natürliche Grenze der optischen Auflösung dar. Von Synge (1928) wurde schon früh eine Idee beschrieben, wie dieses Beugungslimit umgangen werden könnte. Es dauerte allerdings noch einige Jahrzehnte bis Synges Idee durch das optische Rasternahfeldmikroskop (*Scanning near-field optical*

microscope, SNOM) umgesetzt wurde (Pohl u. a. 1984; Lewis u. a. 1984; Harootunian u. a. 1986; Betzig u. a. 1986).

Der wesentliche Teil des SNOMs ist eine Apertur (Öffnung). Diese ist kleiner als die Wellenlänge des Lichts, welches durch die Apertur fällt. Dadurch entsteht an der Apertur ein Nahfeld, dessen Intensität exponentiell mit dem Abstand abfällt (Evaneszenz). Wird nun eine Probe in dieses Nahfeld gebracht, wird lediglich ein sehr begrenzter Bereich beleuchtet. Somit ist die Auflösung prinzipiell von der Größe der Apertur abhängig. Wird die Apertur nun als Sonde wie beim AFM über die Probenoberfläche geführt erhält man gleichzeitig die Topografie und ein optisches Bild der Probe. Häufig werden metallbeschichtete optische Glasfasern als Sonde verwendet. Wegen ihres stumpfen Endes haben sie keine gute topografische Auflösung und die Intensität des Lichts ist wegen ihrer kleinen Öffnung nur gering.

Die Weiterentwicklung dieser Technik ist das aperturlose SNOM. Dabei ersetzt ein gewöhnlicher Cantilever die Apertur. Dies verbessert die topografische Auflösung wegen des kleineren Spitzenradius (Gerton u. a. 2004). Die Probe wird mit einem TIRF-Objektiv evaneszent beleuchtet (TIRF, interne Totalreflexionsfluoreszenz). Bei geeigneter Wahl der Polarisation und Wellenlänge des Anregungslichts wird an der Oberfläche der Cantileverspitze eine dipolare Resonanz induziert. Diese erzeugt ein lokalisiertes Feld an der Cantileverspitze mit stark erhöhter Intensität. Die erhöhte Intensität $|E_{\text{exc}}|^2$ führt zu einer erhöhten Anregungsrate γ_{exc} des Farbstoffes. Die Verstärkung wird in der relativen Anregungsrate Γ_{exc} ausgedrückt. Sie beschreibt das Verhältnis der Anregungsrate γ_{exc}^0 des ungestörten Systems (großer Abstand der Probenoberfläche zum Cantilever) zu der Anregungsrate γ_{exc} in der Nähe des Cantilevers (Walhorn u. a. 2011):

$$\Gamma_{\text{exc}} = \frac{\gamma_{\text{exc}}}{\gamma_{\text{exc}}^0} = \frac{|E_{\text{exc}}|^2}{|E_{\text{exc}}^0|^2},$$

mit der Intensität des elektrischen Feldes am Ort des Farbstoffes mit angenähertem Cantilever $|E_{\text{exc}}^0|^2$ und ohne Cantilever $|E_{\text{exc}}|^2$.

Neben der Kopplung des Anregungslichts mit der Cantileverspitze, koppelt der angeregte Farbstoff ebenfalls mit der Spitze. Dies führt zu einer Verringerung der Fluoreszenzlebensdauer, beziehungsweise einer Erhöhung der Fluoreszenzrate. Die Quantenausbeute q kann mit der Fluoreszenzrate γ_{r} und der Rate für strahlungslose Prozesse γ_{nr} ausgedrückt werden:

$$q = \frac{\gamma_{\text{r}}}{\gamma_{\text{nr}} + \gamma_{\text{r}}}.$$

Auch dieser Effekt zeigt eine starke Abstandsabhängigkeit, sodass analog zur relativen Anregungsrate Γ_{exc} die relative Quantenausbeute Q definiert werden kann:

$$Q = \frac{q}{q_0}.$$

Da die Quantenausbeute nicht größer als Eins werden kann ($Q \leq 1$), ist es sinnvoll Farbstoffe mit kleiner intrinsischer Quantenausbeute q_0 zu wählen, damit der Effekt der Fluoreszenzratenerhöhung deutlich hervortritt.

Beide Kopplungseffekte resultieren in einer Fluoreszenzverstärkung, denn die relative Emissionsrate des Fluorophors ist das Produkt aus der relativen Anregungsrate und der relativen Quantenausbeute:

$$\Gamma_{\text{em}} = \Gamma_{\text{exc}} Q.$$

Der Cantilever wird häufig mit einer Metallschicht bedampft, was die dipolare Wechselwirkung zwischen Spitze und Fluorophor vergrößert, aber ebenso den Fluorophor quenchen kann (Yoskovitz u. a. 2011; Anger u. a. 2006; Zhang u. a. 2010; Walhorn u. a. 2011; Eckel u. a. 2007). Aber auch übliche Silizium-Cantilever verstärken das elektromagnetische Feld und ihr Quenching-Effekt ist weniger ausgeprägt (Haefliger u. a. 2004). Die Benutzung kommerzieller Silizium-Cantilever erfordert keine aufwendige Vorbereitung und es kann eine optische Auflösung unter 20 nm erreicht werden (Frey u. a. 2009).

4 Materialien und Methoden

Die rekombinanten Proteine Desmin und Desmoglein2 wurden vom Erich und Hanna Klessmann Institut für Kardiovaskuläre Forschung und Entwicklung (EHKI, Herz und Diabeteszentrum NRW, Universitätsklinikum der Ruhr-Universität Bochum, Bad Oeynhausen, Deutschland) unter der Leitung von Prof. Dr. Hendrik Milting zur Verfügung gestellt. Die Expression und Reinigung von Desmin wurde von Dr. Andreas Brodehl (Desmin-L136P, -A120D, -H326R, -K241E, -P419S und -WT) und teilweise von Ilona Maria Schirmer (Desmin-DEL und -WT) durchgeführt. Die Expression und Reinigung von Desmoglein2 erfolgte durch Jana Davina Debus.

Die Präparation und Durchführung der kraftspektroskopischen Messungen von drei Dsg2 Varianten (rDsg2-D154E, rDsg2-K294E und rDsg2-V392I) wurden unter meiner Anleitung von Raimund Kerkhoff durchgeführt. Substratpräparation, Abbildung und Signalverarbeitung von Desmin mit aperturlosen SNOM erfolgte durch Niklas Biere.

4.1 Desmin Präparation

4.1.1 Rekombinantes Desmin

Das Protein Desmin wurde mit transformierten Bakterienzellen (*Escherichia coli* BL21-Star DE3) hergestellt. Für die Reinigung wurde dem rekombinanten Desmin ein Hexahistidin-Tag (His₆-Tag) hinzugefügt. Die Reinigung des Proteins erfolgte über Ionenaustauschchromatografie (DEAE-Sepharose-Säule, GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) und anschließender Nickel-Affinitätschromatografie (Ni²⁺-NTA-Sepharose-Säule, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Proteinreinheit wurde mit SDS-Polyacrylamidgel und Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung analysiert. Sie zeigte in allen Proben eine Reinheit über 90 %. Zum Schluss wurde das rekombinante Desmin im Elutionspuffer (8 M Urea, 20 mM Tris-HCl, 300 mM Imidazol, pH 6,9) bei -80 °C eingefroren.

Eine detaillierte Beschreibung der Herstellung von Plasmid-DNA und der Durchführung von Proteinexpression und Proteinisolierung befindet sich in Brodehl (2012).

4.1.2 *In vitro* Assemblierung von Desmin

Da Desmin in Wasser unlöslich ist, wurde für die Reinigung des rekombinanten Desmins ein stark denaturierender Puffer mit 8 M Urea eingesetzt. Um das Protein wieder in seinen nativen Zustand zu überführen, wurde es sukzessive per Dialyse in einen salzarmen Puffer, ohne Urea und physiologischen pH-Wert überführt. Während der Renaturierung durch die Dialyse startet der Assemblierungsprozess und es bilden sich Desmin-Oligomere. Diese können spontan unter Zugabe einer höheren, physiologischen Ionenstärke zu Filamenten assemblieren (s. Abschnitt 2.2.4).

Dialyse

Das rekombinante Desmin wurde über eine schrittweise Dialyse in DP-Puffer (5 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, pH 8,4) überführt. Dazu wurde die Proteinlösung in einen Dialyseschlauch (Servapor® dialysis tubing, MWCO 12 000 - 14 000 RC, SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland) gegeben und jeweils eine Stunde bei Raumtemperatur in einem Liter 8 M, 6 M, 4 M, 2 M und 0 M Urea DP-Puffer und anschließend über Nacht in DP-Puffer im Kühlschrank bei 4 °C bis 7 °C dialysiert.

Anschließend wurde das Protein in diesem Stadium (Assemblierungszwischenschritt) mit AFM abgebildet. Die weitere Assemblierung zu Filamenten wird im Abschnitt „Filamentassemblierung“ erläutert.

Konzentrationsbestimmung

Nach der Dialyse wurde die Proteinkonzentration über Absorptionsspektroskopie (UV-Vis Spectrophotometer UV 2450, Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japan) bestimmt. Es wurde eine Präzisionsküvette (QS, Hellma, Müllheim, Deutschland) mit 1,5 mm Lichtweg und 30 µl Volumen verwendet. Die Berechnung der Stoffmengenkonzentration erfolgte über das Lambert-Beer'sche Gesetz:

$$c = \frac{A_\lambda}{\epsilon_\lambda l} \quad (4.1)$$

mit der wellenlängenabhängigen Absorption A_λ , dem Extinktionskoeffizient ϵ_λ und dem Lichtweg l durch die Lösung. Es wurde ein aus der Proteinsequenz berechneter Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{280} = 26\,360 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ angenommen (ProtParam: P17661, Gasteiger u. a. 2005).

Filamentassemblierung

Die Assemblierung der Desmin-Oligomere zu Filamenten wurde mit dem AB-Puffer (200 mM NaCl, 45 mM Tris-HCl, pH 7,0) höherer Salzkonzentration initiiert. Dazu wurde die Proteinlösung mit DP-Puffer auf eine Desminkonzentration von $0,3 \text{ g l}^{-1}$ verdünnt und zu gleichen Volumenteilen mit AB-Puffer gemischt. Damit betrug die Endkonzentration von Desmin $0,15 \text{ g l}^{-1}$. Die Mischung wurde eine Stunde in einem Wasserbad von 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine auf einem Substrat immobilisiert und mit dem AFM abgebildet.

4.1.3 Substratpräparation für das AFM

Für die Immobilisierung von Desmin wurde das Schichtsilikat Glimmer als Substrat verwendet (*Muscovite Mica*, Plano, Wetzlar, Deutschland). Glimmer kann mit einem Klebeband abgezogen oder einer Messerklinge gespalten werden, wodurch eine sehr saubere und atomar flache Oberfläche erreicht wird. Diese eignet sich hervorragend als Untergrund für die Abbildung kleiner Strukturen.

Die Glimmer-Plättchen wurden auf eine Größe von ca. $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ geschnitten und mit einem Klebeband gespalten. Direkt im Anschluss werden $10 \mu\text{l}$ Desminlösung auf das Glimmer gegeben. Nach wenigen Sekunden wurde die Flüssigkeit vorsichtig mit Milli-Q-Wasser gespült. Die Restflüssigkeit wurde mit einem leichten Stickstoffstrom fortgeblasen. Der Glimmer wurde anschließend mit doppelseitigem Klebeband auf einer Metallscheibe fixiert und in das AFM eingesetzt.

4.1.4 Fluoreszenzmarkierung von Desmin

Für die SNOM-Messungen wurden rekombinante Desmin-Monomere (s. Abschn. 4.1.1) mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Aminosäuresequenz von Desmin weist ein einziges Cystein-Rest (C333) auf. Die Thiolgruppe dieses Cysteins wurde für die spezifische Kopplung mit dem Farbstoff Atto740-Maleimid ($MW = 690 \text{ g mol}^{-1}$, ATTO-TEC, Siegen, Deutschland) genutzt. Das Absorptionsmaximum von Atto740 liegt bei $\lambda_{\text{abs}} = 743 \text{ nm}$ und das Fluoreszenzmaximum bei $\lambda_{\text{fl}} = 763 \text{ nm}$. Atto-Farbstoff ist photostabil und hat eine Quantenausbeute von 10 %.

Es wurden $100 \mu\text{l}$ Desmin in einem Liter Label-Puffer (5 M Urea, 5 mM Tris-HCl, pH 7,5) eine Stunde dialysiert (vgl. Abschn. 4.1.2). Die Farbstoffmoleküle wurden in einem molaren Verhältnis von 10:1 mit Desmin-Monomeren gemischt. Dazu wurden der Desminlösung $2 \mu\text{l}$ ATTO740-Maleimid (5 g l^{-1} in DMSO) beigemischt und 30 Minuten auf einem Kleinschüttler (Vortex-Genie®, Scientific Industries, Bohemia, NY,

USA) inkubiert. Dann wurde das markierte Protein erneut in einen Dialyseschlauch gegeben und in einem Liter Label-Puffer eine Stunde dialysiert. Bei dieser Dialyse und weiteren Dialyseschritten wird die Proteinlösung von ungebundenen Farbstoffen gereinigt. Zuletzt wurde das markierte Protein gegen einen 8 M Urea Puffer (8 M Urea, 5 mM Tris HCl, 1 mM DTT, pH 8,4) dialysiert, aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Auf diese Weise können die Proben länger als ein Jahr gelagert werden. Ein Teil der Proben wurde genutzt, um den Markierungsgrad mit Absorptionsspektroskopie zu bestimmen.

Für eine Messung mit SNOM wurde das markierte Desmin in gewünschtem Verhältnis mit unmarkiertem Desmin gemischt und wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben dialysiert und assembliert.

4.1.5 Substratpräparation für das SNOM

Die verwendeten Substrate sind sehr dünne Deckgläser (130 - 160 μm , Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland). Die Deckgläser wurden mit Aceton in einem Ultraschallbad gereinigt, anschließend mit Ethanol und Milli-Q-Wasser gespült und zusätzlich in einer 65 %igen Salpetersäure geätzt um die Glasoberfläche zu aktivieren. Nach dem Säurebad wurden die Deckgläser wieder mit Milli-Q-Wasser gespült und durch anblasen mit einem Stickstoff-Strom getrocknet. Direkt im Anschluss wurden 5 μl des fluoreszenzmarkierten Desmin ($0,15\text{ g l}^{-1}$) auf die Glasoberfläche aufgebracht und vorsichtig mit einem Stickstoffstrom verteilt. Danach wurde wieder mit Milli-Q-Wasser gespült und mit einem Stickstoff-Strom getrocknet. Die präparierten Substrate wurden in den SNOM-Aufbau eingesetzt und wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben abgebildet.

4.2 Dsg2 Präparation

4.2.1 Rekombinantes Dsg2

Für die kraftspektroskopischen Untersuchungen wurden die extrazellulären Domänen EC1-EC4 des humanen Dsg2 rekombinant hergestellt. Hierfür wurden Säugerzellen (menschliche Fibrosarkom-Zelllinie HT1080) mit entsprechender Plasmid-DNA stabil transfiziert. Die Reinigung des Proteinfragments erfolgte über Nickel-Affinitätschromatografie (HisTrapTM excel Columns, GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK). Hierfür wurde dem Proteinfragment ein His₆-Tag am C-Terminus angefügt. Die Analyse des rekombinanten Dsg2 mit SDS-Polyacrylamidgel/ Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung zeigte eine Reinheit von $>90\%$. Nach der Reinigung lagen die Dsg2-Fragmente in ei-

nem HEPES-Puffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4) vor. Die Konzentrationen variierten zwischen 0,8 und 1,5 g l⁻¹. Sie wurden auf Eis gelagert und noch am selben Tag zur Funktionalisierung der Cantilever und Substrate genutzt. Im Folgenden werden rekombinantes Dsg2 Wildtyp und Dsg2 Varianten mit rDsg2-WT, rDsg2-D154E, rDsg2-K294E und rDsg2-V392I bezeichnet.

Die Proteinsequenz des Proteinfragments weist einen einzigen Cystein-Rest (C496, UniProtKB:Q14126) auf. Dieser befindet sich in der EC4 Domäne, welche sich *in vivo* am nächsten zur Zellmembran befindet. Das Cystein wurde für eine eine spezifische Thiol-Maleimid-Kopplung an das Linker-Molekül genutzt.

4.2.2 Goldsubstrat Präparation für Kraftspektroskopie

Kleine Deckgläser (Sonderanfertigung 8 mm x 8 mm Menzel-Gläser®, Braunschweig, Deutschland) wurden mit Chrom und Gold thermisch bedampft. Zur Vorbereitung der Deckgläser wurden sie in eine Teflonhalterung eingesetzt und nacheinander in ein Becherglas mit Aceton p.a., Chloroform p.a., Ethanol p.a. und Milli-Q-Wasser jeweils 15 Minuten in ein Ultraschallbad (Transsonic Digital S, Elma®, Singen, Deutschland) gestellt. Dann wurden die Gläser mit einem Stickstoffstrom getrocknet und in die Hochvakuumkammer des Beschichtungssystems (MED020 Coating System, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) eingesetzt. Es wurden 3 nm Chrom und 120 nm Gold (AU Granulat 99,99%, Hauner Metallische Werkstoffe, Röttenbach, Deutschland) mit 0,1 nm s⁻¹ auf das Glassubstrat abgeschieden.

Die so erhaltenen Goldsubstrate wurden direkt für die weitere Funktionalisierung verwendet, um eine saubere Goldoberfläche gewährleisten zu können.

4.2.3 Substrat- und Cantileverfunktionalisierung mit rDsg2 für Kraftspektroskopie

Für eine Messung wurden mehrere Cantilever und Goldsubstrate präpariert. Die Cantilever wurden zunächst gereinigt, indem sie hintereinander sechs Lösungsmittelbäder (3x Aceton p.a., 3x Ethanol p.a.) durchliefen. Die Cantilever verblieben etwa fünf Minuten in einem Lösungsmittelbad und wurden dann in das nächste gelegt. Währenddessen wurden 6AHT (6-Amino-1-hexanethiol HCl, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) in einer Glaspetrischale mit 5 ml Ethanol p.a. gelöst (6AHT-Endkonzentration 1 mM). Die Goldsubstrate wurden direkt aus der Vakuumbedampfungslage in dieser Petrischale platziert. Die Cantilever wurden nach dem letzten Ethanolbad zu den Goldsubstraten in die Petrischale gelegt. Cantilver und Substrate verblieben 1,5 Stunden

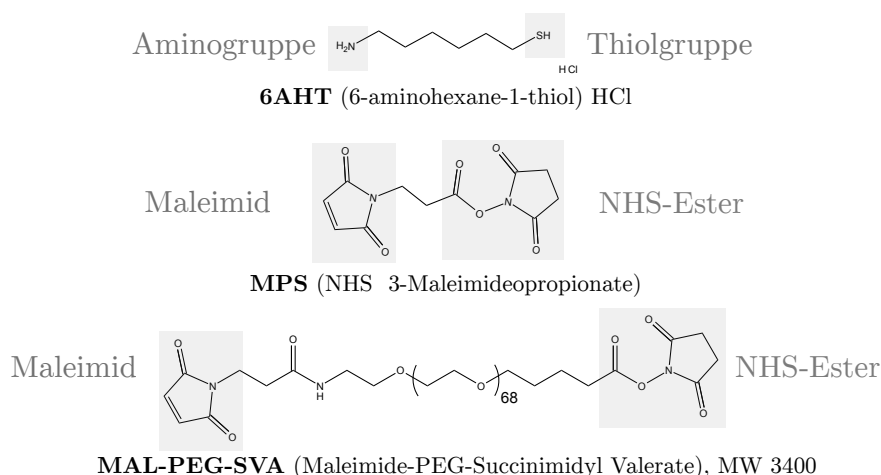


Abbildung 4.1: Molekülstruktur der eingesetzten Linker-Moleküle für die Kopplung von rDsg2 an Cantilever und Substrat. MPS und MAL-PEG-SVA-3400 weisen die funktionellen Gruppen auf. Das längere Molekül MAL-PEG-SVA-3400 wird zur Funktionalisierung des Cantilevers und MPS zur Funktionalisierung des Goldsubstrates genutzt. Die Wiederholungseinheit von MAL-PEG-SVA mit 68 Einheiten ist ein durchschnittlicher Wert. Der Polydispersitätsindex liegt zwischen 1,01 und 1,05.

in der Petrischale mit 6AHT, welches eine selbstorganisierte Monolage (SAM, *self-assembled monolayer*) bildet, in der die Aminogruppe als oberste Schicht verbleibt.

Die Cantilever und Goldsubstrate wurden anschließend hintereinander in drei Ethanolbädern (wie oben) gebadet. Dann wurden die Goldsubstrate in einer Glaspetrischale mit 0,1 mM MPS (N-Hydroxysuccinimidyl-3-maleimidopropionate, Celares, Berlin, Deutschland) in DMSO und die Cantilever in einer Glaspetrischale mit 0,1 mM MAL-PEG-SVA-3400 (Maleimide-Poly(Ethylene Glycol)-Succinimidyl Valerate, PDI = 1,01-1,05, $\overline{M}_W = 3400 \text{ g mol}^{-1}$, Laysan Bio Inc., Arab, AL, USA) in DMSO für 1,5 Stunden inkubiert. Beide Linker binden kovalent an die Aminogruppen der Monolage und es verbleibt die funktionelle Maleimidgruppe (s. Abb. 4.1). In der Zwischenzeit wurden vier frische Lösungsmittelbäder vorbereitet, jeweils zwei Kristallisationsschalen mit DMSO und Ethanol. Nach der Inkubationszeit in der Linkerlösung wurden die Cantilever zunächst in DMSO und dann in Ethanol gebadet. Vertiefungen eines Teflon-Blocks, welche einen einzelnen Cantilever fassen, wurden mit 20 μl Proteinlösung (rDsg2) gefüllt. Dann wurden die Cantilever aus dem Ethanolbad neben die Vertiefungen platziert. Nach wenigen Sekunden war das Ethanol abgedampft und die Cantilever wurden in die Proteinlösung getaucht. Auch die Goldsubstrate durchliefen die vier Bäder und wurden anschließend sanft mit einem Stickstoffstrom getrocknet und mit 20 μl Proteinlösung benetzt. Cantilever und Goldsubstrate wurden über Nacht bei 5 °C gelagert.

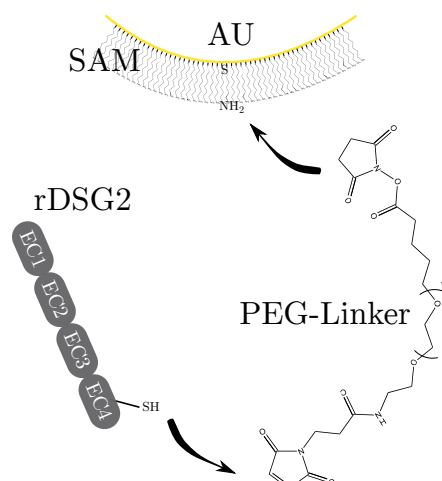


Abbildung 4.2: Darstellung der Funktionalisierungsschritte. Oben ist die goldbeschichtete Cantileverspitze zu sehen. Darauf organisiert sich 6AHT in einer Monolage (SAM). Der PEG-Linker (MAL-PEG-SVA-3400) bindet im nächsten Schritt an die freien Aminogruppen (NH₂). Zuletzt bindet die Thiolgruppe des Cysteins (-SH) im Protein an den PEG-Linker. Für die Funktionalisierung der Goldsubstrate gilt die Zeichnung entsprechend mit MPS- statt PEG-Linker.

Die Maleimidgruppe der Linker bindet kovalent an den Cystein-Rest des Proteins (s. Abb. 4.2).

Die Linker MPS und MAL-PEG-SVA-3400 müssen korrekt gelagert werden, da die funktionellen Gruppen in Verbindung mit Wasser hydrolysiert werden und ihre Aktivität verlieren. Um die Hydrolyse der funktionellen Gruppen zu verhindern, wurde der Linker in einer Stocklösung (10 bis 100-fach) mit wasserfreiem DMSO in einem Glasfläschchen im Kühlschrank aufbewahrt. Außerdem wurde nach jeder Öffnung das Fläschchen in einem Exsikkator evakuiert, mit Argon beflutet und anschließend Luftdicht verschlossen.

4.3 Messmethoden und Analyse

4.3.1 Abbildung von Desmin mit AFM

Für die Abbildung von Desmin werden wahlweise zwei verschiedene Multimode™-AFM-Systeme (Bruker, Santa Barbara, CA, USA) verwendet. Das erste AFM ist ein Multimode™ 2 mit NanoScope® IIIa-Controller und NanoScope® V5-Software und das zweite AFM ist ein Multimode™ 8 mit NanoScope® V5-Controller und NanoScope® V8-Software. Das AFM-Setup war Schwingungsgedämpft gelagert (aktiver Dämpfungstisch (TS-150 Table Stable, JRS Scientific Instruments, Mettmenstetten,

Schweiz) auf einer Granitplatte in einer Schallschutzbox (Park Systems, Suwon, Korea) um den Einfluss von externen Schwingungen zu minimieren.

Die Abbildungen wurden im TappingMode™ mit dem „E“-Scanner ($XY \approx 10 \mu\text{m}$, $Z \approx 3,5 \mu\text{m}$) durchgeführt. Die verwendeten Cantilever waren wahlweise Tap300Al-G (Budget Sensors, Sofia, Bulgarien) oder PPP-NCH (Nanosensors, Neuchatel, Schweiz). Beide Cantilever besitzen einen Spitzenradius von unter 10 nm. Tap300Al-G sind Siliziumcantilever mit einer rückseitigen Aluminium-Beschichtung. Ihre nominale Federkonstante ist 40 N m^{-1} und ihre Resonanzfrequenz liegt bei 300 kHz. PPP-NCH sind unbeschichtete Siliziumcantilever mit 42 N m^{-1} und 330 kHz.

Die Topografie-Rohdaten des Multimode-AFM wurden mit dem Visualisierungs- und Analyseprogramm *Gwyddion* (Freie Software, GPL Version 2.0) bearbeitet und analysiert.

4.3.2 Aperturlose optische Rasternahfeldmikroskopie an Desmin

Das in diesem Experiment verwendete aperturlose SNOM ist ein Eigenbau und eine Kombination aus einem TIRF-Mikroskop und einem AFM im Intermittierenden-Modus (Abb. 4.3a). Nachfolgend sind die wichtigsten Elemente des Aufbaus beschrieben (Harder u. a. 2013):

Die Cantileverspitze kann über einen motorisierten Verschiebetisch in das Detektionsvolumen positioniert werden. Der Probenhalter ist auf einem 3D-Piezoscanner (P-733.3, Physik Instrumente, Karlsruhe, Deutschland) montiert, welcher das laterale Rastern der Probe ermöglicht. Im AFM-Kopf befindet sich ein Piezostellelement (PSt 150/2x3/5, Piezomechanik, München, Deutschland) für die vertikale Distanzregulierung und die Anregung des Cantilevers in den Intermittierenden-Modus. Das System wird mit einem AFM-Controller (Nanonis OC4, Specs, Zürich, Schweiz) gesteuert. Die Probe wird durch ein Objektiv hoher numerischer Apertur (CFI Aplanachromat 100x TIRF Ölimmersion, $A_N = 1,49$, Nikon, Tokio, Japan) evaneszent beleuchtet. Das Licht der Laserdiode (RLT6830MG, $\lambda = 685 \text{ nm}$, 30 mW, Roithner Lasertechnik, Wien, Österreich) wird parallel zur Einfallsebene linear polarisiert, sodass der Polarisationsanteil senkrecht zur Probenoberfläche hoch ist und das evaneszente Feld entsteht. Die Detektion des Fluoreszenzlichts übernimmt eine Avalanche-Photodiode (SPCMAQR-13, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) mit einem vorgelagertem Fluoreszenz-Filter ($T = 715 - 855 \text{ nm}$ bei 86 %, Optische Laboratorien, Nabburg, Deutschland).

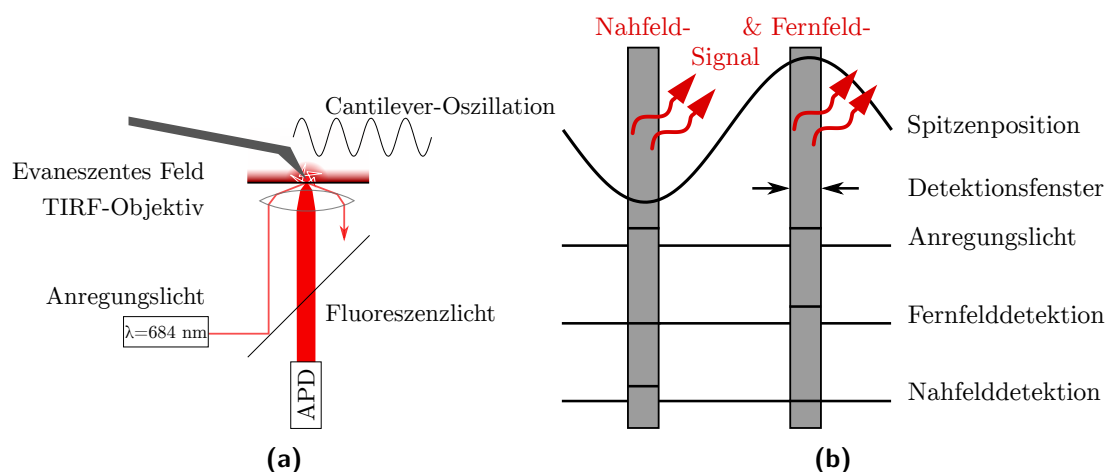


Abbildung 4.3: Funktion des aperturlosen SNOM. (a) Schematische Darstellung des SNOM-Aufbaus. Mit dem TIRF-Objektiv wird ein evaneszentes Feld auf der Substratoberfläche erzeugt, welches die Farbstoffe zum Fluoreszieren anregt. Das Fluoreszenzlicht wird von einer Avalanche-Photodiode (APD) detektiert. Der Cantilever oszilliert im Intermittierenden-Modus mit einer Amplitude von etwa 100 nm. An der Cantileverspitze kommt es zu einer Felderhöhung. Daher variiert das Fluoreszenzsignal, abhängig von der Distanz des Cantilevers zur Oberfläche bzw. Farbstoffes. Es werden zwei Signale, ein Nahfeld und ein Fernfeld, abhängig von der Position der Cantileverspitze detektiert. (b) Die Skizze zeigt den zeitlichen Ablauf der Detektion für einen Schwingungszyklus des Cantilevers. Befindet sich die Cantileverspitze im unteren Bereich der Schwingung (oberflächennah) wird das Nahfeld und im Oberen das Fernfeld aufgenommen. Bemerkung: Das Nahfeldsignal ist eigentlich eine Kombination aus Nahfeld und Fernfeld. Der Fernfeldanteil wird in der Nachbearbeitung gefiltert.

Cantilever für SNOM

Es wurden monolithische Siliziumcantilever aus der AdvancedTEC™-Serie (ATEC-NC, Nanosensors, Neuchatel, Schweiz) benutzt. Dies sind sehr spezielle Cantilever, da ihre Spitze unter dem Federbalken hervorragt und somit auch von der Aufsicht erkennbar ist. Dies erleichtert die Ausrichtung der Spitze in das Detektionsvolumen. Der typische Spitzenradius liegt unter 10 nm und die nominale Resonanzfrequenz bei 335 kHz.

Signalverarbeitung

Die Probenanregung und Fluoreszenzlichtdetektion sind mit der Schwingung des Cantilevers synchronisiert (Abb. 4.3b). Außerdem werden in verschiedenen Phasen der Cantileveroszillation zwei unterschiedliche Fluoreszenzbilder aufgenommen. Ist der Cantilever nah an der Probe, wird ein Signal detektiert und das zweite Signal (Fernfeld) wird bei großer Entfernung des Cantilevers detektiert. Das Signal nahe der Probe

besteht aus Nahfeld und Fernfeld. Der Fernfeldanteil wurde in der Nachbearbeitung reduziert, indem das Signal fern der Probe von dem Signal nahe der Probe subtrahiert und linienweise mit einem Tiefpass gefiltert wurde. Der dritte Kanal der aufgenommen wird ist die AFM-Topografie. Topografie- und Fluoreszenzbild können ohne weitere Ausrichtung überlagert werden.

4.3.3 Kraftspektroskopie an rDsg2

Die kraftspektroskopischen Messungen wurden mit dem AFM Multimode™ 8 (Abschn. 4.3.1) mit „J“-Scanner ($XY \approx 100 \mu\text{m}$, $Z \approx 6 \mu\text{m}$) durchgeführt. Die verwendeten Cantilever waren Biolever (BL-RC150VB-HW, Olympus, Tokio, Japan). Dies sind Siliziumnitridcantilever, die beidseitig mit 20 bis 30 nm Gold beschichtet sind. Der Biolever hat zwei Cantileverformate, A- und B-lever. Verwendet wurde der kürzere A-lever mit einer Blattfeder von $60 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$, einer Resonanzfrequenz von 37 kHz und einer Federkonstanten von nominal $0,03 \text{ N m}^{-1}$. Die Federkonstanten der Cantilever wurden mit der Methode des thermischen Rauschens unter Umgebungsbedingungen bestimmt.

Bestimmung der Federkonstante

Die Messgröße für die Auslenkung des Cantilevers ist nativ eine Spannung, welche von der Elektronik ausgegeben wird. Um die Kraft aus der gemessenen Spannung zu bestimmen, werden die Sensitivität und die Federkonstante des Cantilevers benötigt.

Die Sensitivität ist die Relation zwischen dem Spannungssignal der Quadranten-Photodiode und der Auslenkung des Cantilevers. Die Sensitivität entspricht der inversen Steigung der Kraft-Distanzkurve im Kontaktbereich des Cantilevers (s. Abb. 4.4). Weiterhin ändert sich die Sensitivität mit der Beschaffenheit und Größe der Reflektionsfläche des Cantilevers, sowie der Position des Lasers auf dem Cantilever. Die Federkonstante ist eine physikalische Eigenschaft des Cantilevers ihre Einheit ist N m^{-1} . Entsprechend des Hooke'schen Gesetz gibt sie das Verhältnis zwischen Kraft und Auslenkung des Federbalkens wieder. Die Federkonstante der verwendeten Cantilever wurden mit der Methode des thermischen Rauschens bestimmt (Hutter u. a. 1993; Butt u. a. 1995). Im Folgenden wird diese Methode näher erläutert.

Bei kleiner Auslenkung Δx verhält sich der Cantilever wie eine lineare Feder. Nach dem Hooke'schen Gesetz ist die Auslenkung der Feder proportional zur Kraft: $F = -k\Delta x$, mit der Federkonstanten k . Somit ist die Bewegungsgleichung die eines harmonischen Oszillators und die kinetische und potentielle Energie wird mit der Hamilton-

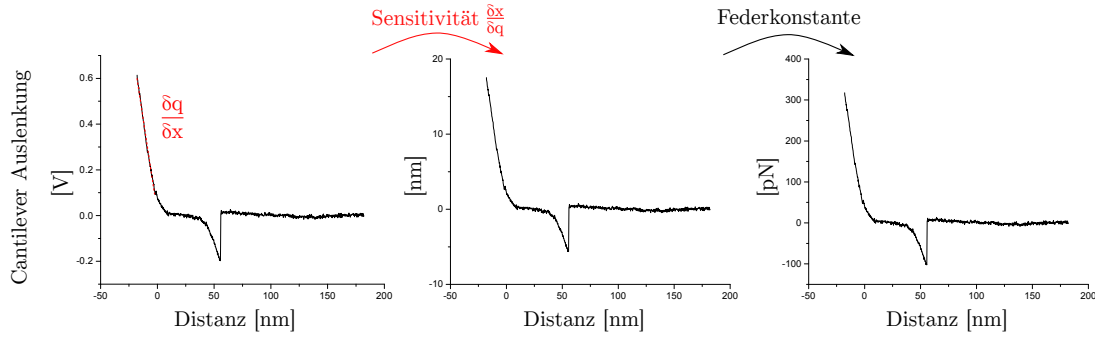


Abbildung 4.4: Die Grafik zeigt den Zusammenhang zwischen dem Signal der Photodiode (V) und der Messgröße Kraft (pN). Im Graphen links ist der Kontaktbereich, aus dem die Sensitivität bestimmt wird, rot markiert.

Funktion ausgedrückt:

$$\mathcal{H} = \frac{p^2}{2m} + \frac{m\omega_0^2 q^2}{2}, \quad (4.2)$$

mit p , q , m und ω_0 , dem Impuls, der Auslenkung, der Masse und der Resonanzfrequenz des Oszillators. Im thermodynamischen Gleichgewicht ist die mittlere potentielle Energie des eindimensionalen Oszillators nach dem Äquipartitionstheorem:

$$\left\langle \frac{m\omega_0^2 q^2}{2} \right\rangle = \frac{1}{2} k_B T, \quad (4.3)$$

wobei k_B und T die Boltzmannkonstante und die absolute Temperatur sind. Mit $\omega_0^2 = \frac{k}{m}$ kann Gleichung 4.3 nach der Federkonstanten umgestellt werden:

$$k = \frac{k_B T}{\langle q^2 \rangle}. \quad (4.4)$$

Demnach hat ein Cantilever mit einer Federkonstante von 30 pN nm^{-1} bei Raumtemperatur eine quadratisch gemittelte Auslenkung von $3,7 \text{ \AA}$.

Die Federkonstante kann nun bestimmt werden, indem die mittlere quadratische Auslenkung des frei schwingenden Cantilevers im thermischen Gleichgewicht gemessen wird. Dazu wird über eine Zeitspanne die Auslenkung eines frei schwingenden Cantilevers aufgenommen und anschließend fouriertransformiert. Dies wird mehrfach wiederholt, um die Amplitude $A(\nu)$ mitteln zu können. Abbildung 4.5 zeigt eine gemessene spektrale Leistungsdichte $A(\nu)^2$ als Funktion der Frequenz ν . Der Resonanzpeak wird mit einer geeigneten Anpassungsfunktion approximiert. In diesem Fall entspricht

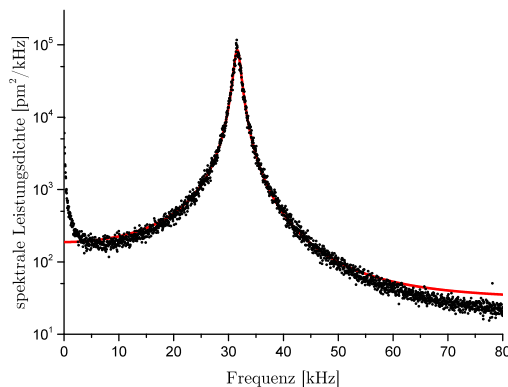


Abbildung 4.5: Leistungsdichtespektrum eines thermisch angeregten Cantilevers. Die Daten (schwarze Punkte) wurden über 65 Messzyklen gemittelt und mit dem Modell eines ungedämpften harmonischen Oszillators (Gleichung 4.5) angepasst (rote Kurve). Die Parameter waren $Q = 23,2$, $\nu_0 = 31,6$ kHz und $A(0)^2 = 185$ pm² Hz. Die berechnete Federkonstante war $22,43$ pN nm⁻¹.

die Anpassungsfunktion, der eines ungedämpften harmonischen Oszillators (Walters u. a. 1996):

$$A(\nu) = A(0) \frac{\nu_0^2}{\sqrt{(\nu_0^2 - \nu^2)^2 + \frac{\nu_0^2 \nu^2}{Q^2}}} \quad (4.5)$$

mit den Parametern ν_0 , Q und $A(0)$, der Resonanzfrequenz, dem Q-Faktor und der Amplitude bei $\nu = 0$ Hz. Die Fläche unter der gewählten Funktion entspricht der mittleren quadratischen Auslenkung $\langle q^2 \rangle = \int A(\nu)^2 d\nu$, wodurch mit Gleichung 4.4 die Federkonstante k berechnet werden kann.

Durchführung der dynamischen Kraftspektroskopie an rDsg2

In der folgend beschriebenen Durchführung wurden drei verschiedene HEPES-Puffer eingesetzt:

- **HEPES-Puffer:** 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4
- **Calcium-Puffer:** 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 7,4
- **EDTA-Puffer:** 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7,4

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) und EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure) sind Chelatliganden für zweiwertige Kationen und bilden mit Ca²⁺ einen stabilen Komplex. Der Calcium-Puffer und der EDTA-Puffer

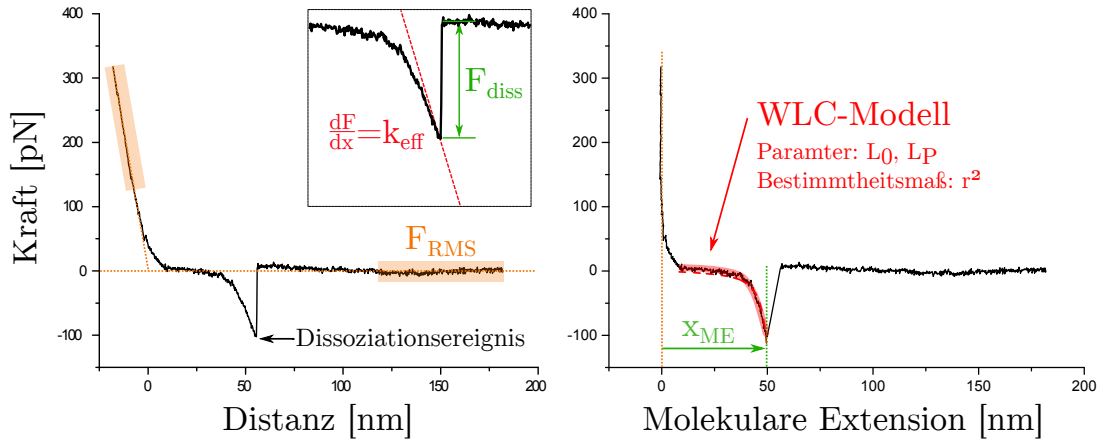


Abbildung 4.6: Analyse der Kraftspektroskopie-Rohdaten. Die beiden Graphen stellen das Prinzip der softwarebasierten Datenanalyse und die wichtigsten daraus ermittelten Größen dar. Der linke Graph zeigt eine Kraft-Distanz-Kurve. Die Basislinie bei $F = 0$ und der Kontaktbereich werden linear angepasst (orange gestrichelte Linien). Der Datenbereich, welcher für die lineare Regression verwendet wird, ist orange unterlegt. Das Inset zeigt eine Vergrößerung im Bereich des Dissoziationsereignisses, die Bestimmung von k_{eff} und F_{diss} . Der rechte Graph zeigt die, um die Auslenkung des Cantilevers korrigierte, Kraft-Distanzkurve. Die molekulare Extension am Punkt des Dissoziationsereignisses x_{ME} ist die Streckung des Molekülkomplexes aus Linker und Protein. Die Anpassung des WLC-Modells (rot) liefert r^2 , L_0 und L_P .

wurden während der Messungen eingesetzt. Der HEPES-Puffer wurde vorwiegend zum Spülen und Lagern der Proben verwendet.

Alle mit rDsg2 präparierten Goldsubstrate und Cantilever wurden zunächst mit HEPES-Puffer gespült, um eventuell ungebundenes rDsg2 zu entfernen. Anschließend wurden sie mit dem gewünschten Messpuffer (Calcium-Puffer oder EDTA-Puffer) gespült. Während des Einsetzens des Cantilevers und des Substrats in das AFM und während der Messung wurde darauf geachtet, dass Cantilever und Substratoberfläche ständig mit Pufferflüssigkeit benetzt sind. Zwischen einem Pufferwechsel oder zur Lagerung wurden Substrat und Cantilever mit HEPES-Puffer gespült. Cantilever und Substrate wurden nicht länger als vier Tage für Messungen verwendet.

Kraft-Distanzkurven Analyse

Die Rohdaten aus den Kraftspektroskopieexperimenten wurden mit einer auf Basis von MATLAB® (Version 2010b, The Mathworks, Natick, MA, USA) entwickelten Software analysiert. Der MATLAB-Code basiert auf einer Arbeit von Lennart Ochel und wird von Dr. Volker Walhorn ständig weiterentwickelt. Im Folgenden werden die generellen Funktionen der Analysesoftware anhand von Abbildung 4.6 beschrieben.

Beim Einlesen der Rohdaten muss zunächst die Basislinie ($F = 0$) gefunden werden. Dazu werden die Datenpunkte im hinteren Bereich der Kurve mit einer linearen Regression angepasst. Außerdem wird dort der quadratische Mittelwert (RMS) des Krafrauschens F_{RMS} bestimmt. Weiterhin wird mittels Regression die Steigung des Kontaktbereiches bestimmt. Der Schnittpunkt von Basislinie und der linearen Extrapolation des Kontaktbereiches markiert den Ursprung und somit die Position der Oberfläche. Als Nächstes muss ein Dissoziationsereignis bzw. die Stufe in der Kurve ermittelt werden. Die Kurve wird in kleine Abschnitte unterteilt um dann abschnittsweise die Steigung zu vergleichen. Kehrt sich die Steigung um, ist das ein Hinweis auf ein Dissoziationsereignis. Es werden allerdings noch weitere Bedingungen überprüft: 1. Nach der Stufe sollte die Kraft nahe Null sein. 2. Die Stufe muss größer als das Krafrauschen sein: Der Schwellwert für die Akzeptanz einer Stufe ist der dreifache F_{RMS} -Wert. Dieser Wert schließt zu 99,73 % eine durch Rauschen verursachte Stufe aus.

Wird ein Dissoziationsereignis erkannt, wird ein Polynom 2. Grades an den nicht-linearen Teil angepasst. Die Steigung des Polynoms am Dissoziationsereignis ist die effektive Federkonstante k_{eff} . Ferner ist die Stufenhöhe die Dissoziationskraft F_{diss} .

Über die Steigung des Kontaktbereichs kann die Auslenkung des Cantilevers berechnet und in der Kraft-Distanzkurve korrigiert werden. Damit ergibt sich die Kraft in Abhängigkeit der molekularen Extension (rechter Graph in Abb. 4.6). Die molekulare Extension kann als Abstand zwischen Cantileverspitze und Oberfläche aufgefasst werden und beschreibt die Streckung des Molekülkomplexes (Linker und Proteine) bei einem Bindungsereignis. Der Wert am Dissoziationsereignis x_{ME} ist somit die Streckung der Molekülkomplexe bis zur Dissoziation. Zuletzt werden die Datenpunkte im Bereich der Streckung mit dem WLC-Modell (Gleichung 3.1) angepasst. Aus dem WLC-Fit werden das Bestimmtheitsmaß r^2 und die Fitparameter L_0 und L_P bestimmt. Weiterhin wird die Fläche unter dem WLC-Fit vom Ursprung bis zum Dissoziationsereignis numerisch berechnet. Sie entspricht der Arbeit W , die am Molekülkomplex geleistet wird.

Durch die Nutzung dieser automatisierten Analyse konnte eine große Anzahl Kraft-Distanzkurven erfasst werden. Die erhaltenen Datensätze werden anschließend weiter selektiert.

Datenauswahl

Aus der WLC-Anpassung erhält man die Parameter L_0 und L_P , die in bestimmten Fällen dabei helfen spezifische von unspezifischen Ereignissen zu trennen. Wenn die

Persistenz- und Konturlänge des Linker-Moleküls bekannt sind, entspricht der nicht-lineare Teil in der Kraft-Extensionskurve dem Verhalten des Linker-Moleküls. Allerdings gilt dies nur, wenn der Anteil der zu untersuchenden Moleküle (hier Proteine) in der Extension keine Rolle spielen. Im Fall der untersuchten Proteinkomplexe ist der Einfluss nicht zu vernachlässigen. Angenommen es bildet sich ein rDsg2-Dimer, indem sich mindestens die ersten EC-Domänen überschneiden, dann entspricht die gestreckte Länge des Dimers etwa der siebenfachen Länge einer Domäne. Die Länge einer Domäne wird aus den Kristallstrukturdaten (pdb:1L3W) mit etwa 4,5 nm abgeschätzt. Demnach wäre das gestreckte Dimer etwa 31,5 nm lang. Das Linker-Molekül (PEG-Linker) hat eine Konturlänge von 25 nm (Tong u. a. 2013). Die gemessene Extension ist also eine Kombination aus zwei etwa gleich großen „Konturlängen“ und einer bekannten und unbekanntem Persistenzlänge. Diese Kombination wird im WLC-Modell nicht berücksichtigt und die Parameter entsprechen daher nicht ausschließlich den Eigenschaften des Linker-Moleküls.

Das Bestimmtheitsmaß r^2 der WLC-Anpassung ist dennoch hilfreich, denn die grundsätzliche Form der Kurve bleibt auch bei diesem Komplex erhalten. So sollte sich grundsätzlich ein Einzelereignis gut mit dem WLC-Modell anpassen lassen. Werden nur Datensätze mit $0,5 < r^2 \leq 1$ zugelassen, werden Adhäsion oder Mehrfachereignisse weitestgehend gefiltert.

Die maximale Distanz bis zur Dissoziation ergibt sich aus der Gesamtlänge des Komplexes aus Dsg2-Dimer und Linker (etwa 56,5 nm). Die Datensätze werden daher mit der molekularen Extension $x_{ME} \leq 60$ nm gefiltert.

Datenauswertung nach Standardtheorie

Die weitere Analyse der Daten wird mit Mathematica (Version 8.0, Wolfram Research, Champaign, IL, USA) durchgeführt.

Um die Wertepaare F^* und r zur Anpassung mit Gleichung 3.8 zu erhalten, müssen die wahrscheinlichste Kraft F^* und wahrscheinlichste effektive Federkonstante k_{eff}^* aus den Datensätzen bestimmt werden. Ein Datensatz ist definiert durch alle Dissoziationereignisse eines Cantilevers bei einer konstanten Rückziehggeschwindigkeit unter den gleichen Umgebungsbedingungen (Puffer).

Die Wahrscheinlichkeitsdichte der Dissoziationskraft F_{diss} und der effektiven Federkonstante k_{eff} aus einem Datensatz werden mit einer Kerndichteschätzung angenähert. Kerndichteschätzer erlauben eine stetige Schätzung einer unbekanntem Verteilung (Rosenblatt 1956; Parzen 1962). Aus der stetigen Funktion kann dann das Maximum präzise bestimmt werden. Der Kerndichteschätzer für die Kraft lautet:

$$\tilde{P}_n(F) = \frac{1}{n \sqrt{2\pi}} \sum_{i=1}^n \frac{1}{F_{\text{RMS } i}} \exp\left(-\frac{(F - F_{\text{diss } i})^2}{2 F_{\text{RMS } i}^2}\right) \quad (4.6)$$

wobei n die Anzahl der Ereignisse bzw. Kraft-Distanzkurven ist. Die Funktion $\tilde{P}_n(F)$ ist eine Kerndichteschätzung mit Gaußkern und einer variablen Bandbreite von $F_{\text{RMS } i}$, die der Unsicherheit in jeder Kraft-Distanzkurve entspricht.

Die wahrscheinlichsten Werte F^* und k_{eff}^* werden jeweils aus dem Maximum der Wahrscheinlichkeitsverteilung bestimmt. Die Belastungsrate wird mit $r = k_{\text{eff}}^* v$ berechnet, mit der Rückziegeschwindigkeit v . Weiterhin ist die einheitenlose Belastungsrate $\check{r} = \hat{r} r$ mit einem Einheitenkorrekturfaktor von $\hat{r} = 1 \text{ s pN}^{-1}$. Die Unsicherheit in F^* wird mit $\sigma_{F^*} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$ abgeschätzt, wobei σ die Standardabweichung der Kraftverteilung ist. Anschließend wird F^* gegen $\ln(\check{r})$ aufgetragen und entsprechend der Standardtheorie von Evans (Gleichung 3.8) mit dem Modell

$$F^*(\ln(\check{r}), x_\beta, k_-^0) = \frac{k_B T}{x_\beta} \left(\ln \frac{x_\beta}{k_-^0 k_B T \hat{r}} + \ln(\check{r}) \right), \quad (4.7)$$

angepasst. Dabei sind x_β und k_-^0 die Modellparameter und $k_B T = 4,045 \text{ pN nm}$ die thermische Energie bei Raumtemperatur. Die Modellanpassung erfolgt mit der Methode der kleinsten Quadrate (nach Levenberg-Marquardt). Die Messwerte werden jeweils mit $1/\sigma_{F^*}^2$ gewichtet. Die Standardabweichung der Parameter wird aus der Wurzel der Hauptdiagonalen der Kovarianzmatrix $\text{Cov}(\mathbf{x}_\beta, \mathbf{k}_-^0)$ berechnet.

Die Kovarianzmatrix ist

$$\text{Cov}(\mathbf{x}_\beta, \mathbf{k}_-^0) = \left(X^T W X \right)^{-1}, \quad (4.8)$$

wobei X die Designmatrix für die lineare Näherung des Modells und W die Diagonalmatrix der Gewichtungen ist. Das bedeutet die Standardabweichung der Parameter wird effektiv aus der Gewichtung, also der geschätzten Unsicherheit von F^* , berechnet.

Parameterfehler durch Messunsicherheit

Das Modell (Gleichung 4.7) benötigt die wahrscheinlichste Dissoziationskraft bei mindestens zwei unterschiedlichen Belastungsraten. Die Genauigkeit mit der die Parameter bestimmt werden können, hängt von der Genauigkeit in der Kraft, der Belastungsrate und dem Bereich den die Belastungsraten überspannen ab. Neben der korrekten Kalibrierung des Scanners ist es notwendig die Federkonstante und die Sensitivität zu

bestimmen, damit die Kraft und die Belastungsrate korrekt gemessen werden.

Da die Sensitivität in jeder Kraft-Distanzkurve neu bestimmt wird, ist der Fehler stochastischer Natur und wird mit der Anzahl an Kraft-Distanzkurven geringer. Somit können Unsicherheiten, die normalerweise durch die Photodetektion (nichtlineares Verhalten über den Detektionsbereich) einfließen, vernachlässigt werden.

Die Unsicherheit in der Bestimmung der Federkonstanten liegt bei etwa 10%. Eine fehlerhaft bestimmte Federkonstante beeinflusst die gemessene Kraft und die Belastungsrate auf systematische Weise. Unter der Voraussetzung, dass die Positionsbestimmung des kalibrierten Scanners exakt ist, ist der relative Fehler der Federkonstante gleich der relativen Fehler der Kraft und der Belastungsrate:

$$\frac{\delta k}{k} = \frac{\delta F^*}{F^*} = \frac{\delta r}{r} = 0,1 \quad (4.9)$$

und

$$\delta \ln(\check{r}) = \frac{\delta \check{r}}{\check{r}} = \frac{\delta r}{r}. \quad (4.10)$$

Der Parameter x_β hängt von der inversen Steigung des Modells (Gleichung 4.7) ab:

$$x_\beta = k_B T \frac{d \ln \check{r}}{d F^*}. \quad (4.11)$$

Wird x_β durch zwei Datenpunkte bestimmt, dann gilt

$$x_\beta = k_B T \frac{\ln \check{r}_2 - \ln \check{r}_1}{F_2^* - F_1^*} \quad (4.12)$$

und für zwei fehlerbehaftete Datenpunkte:

$$\begin{aligned} x'_\beta &= k_B T \frac{(\ln \check{r}_2 \pm \delta \ln \check{r}_2) - (\ln \check{r}_1 \pm \delta \ln \check{r}_1)}{(F_2^* \pm \delta F_2^*) - (F_1^* \pm \delta F_1^*)} \\ &= k_B T \frac{\ln \check{r}_2 \pm \frac{\delta r_2}{r_2} - \ln \check{r}_1 \mp \frac{\delta r_1}{r_1}}{F_2^* \left(1 \pm \frac{\delta F_2^*}{F_2^*}\right) - F_1^* \left(1 \pm \frac{\delta F_1^*}{F_1^*}\right)}. \end{aligned} \quad (4.13)$$

Sind die Datenpunkte mit demselben Cantilever gemessen, dann sind die relativen

Fehler der Datenpunkte identisch:

$$\frac{\delta r_1}{r_1} = \frac{\delta r_2}{r_2} = \frac{\delta r}{r},$$

$$\frac{\delta F_1^*}{F_1^*} = \frac{\delta F_2^*}{F_2^*} = \frac{\delta F^*}{F^*}$$

und Gleichung 4.13 wird zu:

$$\begin{aligned} x'_\beta &= k_B T \frac{\ln \check{r}_2 - \ln \check{r}_1}{F_2^* - F_1^*} \left(1 \pm \frac{\delta F^*}{F^*}\right)^{-1} \\ &= x_\beta \left(1 \pm \frac{\delta k}{k}\right)^{-1} \\ \Leftrightarrow \frac{\delta x_\beta}{x_\beta} &= \mp \left(1 \pm \frac{\delta k}{k}\right)^{-1} - 1 \\ &= \mp \frac{\delta k}{\delta k \pm k}. \end{aligned} \quad (4.14)$$

Daraus ergibt sich, dass ein Messfehler der Federkonstanten von +10% einen Fehler in x_β von -9% und ein Messfehler von -10% einen Fehler in x_β von +11% zur Folge hat. Einfach abgeschätzt ist (Williams 2008):

$$\frac{\delta x_\beta}{x_\beta} \approx -\frac{\delta k}{k} \quad \text{für} \quad \delta k \ll k. \quad (4.15)$$

Der Parameter k_-^0 berechnet sich aus der Extrapolation des Modells bis $F^* = 0$, entsprechend ist:

$$\begin{aligned} k_-^{0'} &= \frac{(r|_{F^*=0} \pm \delta r)(x_\beta \pm \delta x_\beta)}{k_B T} \\ \Leftrightarrow k_-^{0'} &= \frac{r|_{F^*=0} x_\beta}{k_B T} = k_-^0 \end{aligned} \quad (4.16)$$

und somit unabhängig von Fehlern in der Federkonstanten.

Für eine Reduzierung des Fehlers durch die Unsicherheit der Federkonstante müssen die Messungen mit verschiedenen Cantilevern durchgeführt werden. Obige Überlegungen zeigen aber, dass es besser ist die Daten, welche mit einem Cantilever gemessen wurden, getrennt von den Daten, die mit einem anderen Cantilevern gemessen wurden zu analysieren und individuell mit dem Modell anzupassen (vgl. Abb. 5.10).

5 Ergebnisse

5.1 Strukturuntersuchung von Desmin

5.1.1 Abbildung von Desmin mit dem AFM

Das rekombinante Desmin wurde *in vitro* assembliert (Abschn. 4.1.2) und auf einem Glimmer-Substrat immobilisiert (Abschn. 4.1.3). Anschließend wurde die Topografie der Probe mit einem AFM an Luft aufgenommen.

Das denaturierte Protein wurde durch schrittweise Dialyse in seinen nativen Zustand überführt. Am Ende der Dialyse lag das Protein in einem salzarmen Puffer (DP-Puffer) vor. Erst durch Erhöhung der Salzkonzentration (AB-Puffer) wird die Assemblierung zu Filamenten initiiert. Der Assemblierungsprozess wurde in zwei Stadien festgehalten. Zunächst wurde Protein im salzarmen Puffer (DP-Puffer) auf dem Substrat immobilisiert und abgebildet. Dies wird im Folgenden als Zwischenschritt der Assemblierung bezeichnet. Anschließend erfolgte die Immobilisierung der vollständig assemblierten Proteine im salzhaltigen Puffer (AB-Puffer). Diese zwei Stadien des Assemblierungsprozesse wurden mit dem vorherrschenden Assemblierungsmodell (Abschnitt 2.2.4) verglichen. Das Ergebnis der Desmin Wildtyp Assemblierung wurde mit den Assemblierungsergebnissen verschiedener Desmin Varianten verglichen, um Rückschlüsse auf den Einfluss der Variation auf den *in vitro* Assemblierungsprozess zu gewinnen.

Die Ergebnisse wurden durch wiederholte Messungen qualitativ reproduziert. Im Folgenden werden repräsentative AFM-Topografie-Bilder gezeigt.

Desmin Wildtyp

Der Desmin Wildtyp wurde wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben assembliert und abgebildet. Abbildung 5.1 zeigt AFM-Scans von charakteristischen Wildtypfilamenten. Die Filamentlänge und Belegungsdichte der Proben war von der Desminkonzentration bei der Initiierung der Assemblierung durch den AB-Puffer abhängig. Für die hier gezeigten Bilder wurde eine Konzentration ($0,15 \text{ g l}^{-1}$) gewählt, bei der noch vereinzelt lokalisierte Filamente auf dem Substrat zu messen waren. Wie in Abbildung

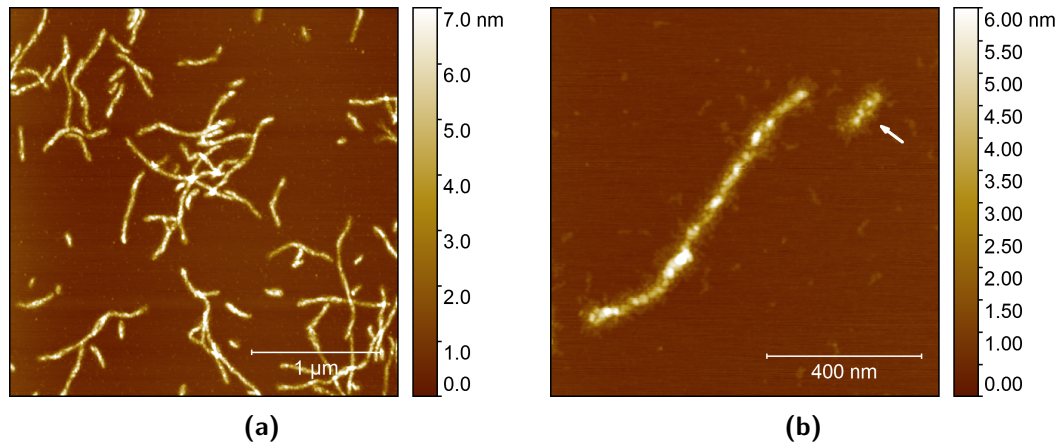


Abbildung 5.1: AFM-Topografie Aufnahmen von Desmin-WT Filamenten. Ein $3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$ -Scan (a) und ein $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ -Scan (b) von Desmin-WT. Die mittlere Filamentlänge in (a) ist $474 \pm 241\ \text{nm}$. Das Filament in (b) ist $100\ \text{nm}$ lang (Pfeil).

5.1a erkennbar ist, war die Länge der Filamente sehr unterschiedlich. Die Längenauswertung in diesem Bild ergab $474 \pm 241\ \text{nm}$ ¹ bei insgesamt 42 Filamenten und dem kürzesten Stück von $54\ \text{nm}$. Da die Filamente teilweise übereinander lagen, war eine Bestimmung der Filamentenden in einigen Fällen nicht eindeutig möglich. Aus diesem Grund wurde auf einen statistischen Vergleich der Längen von Wildtyp und Varianten, die Filamente bilden, verzichtet. Vielmehr wurde die generelle Fähigkeit Filamente bilden zu können beurteilt und eine Längenschwelle definiert: Lagen die Assemblierungsergebnisse der Varianten im Schnitt unter einer zweifachen ULF-Länge ($120\ \text{nm}$) wurden sie als „nicht filamentbildungsfähig“ eingeordnet.

Die Auswertung der Filamenthöhe wurde exemplarisch für das längere Filament (Länge $834\ \text{nm}$) in Abbildung 5.1b durchgeführt. Die mittlere Höhe dieses Filaments lag bei $3,8 \pm 1,1\ \text{nm}$. Die meisten Höhenprofile waren unregelmäßig, nur bei einigen Filamenten zeigte sich ein regelmäßiges Profil mit einer erkennbaren rechtshändigen Windung (Dieding 2011).

Neben den ausgereiften Filamenten waren auf dem Substrat kleine filamentöse Strukturen vorhanden. Sie lagen isoliert oder umsäumten die größeren, ausgereiften Filamente (Abb. 5.2b). Die filamentösen Strukturen waren deutlich flacher (Höhe kleiner $1\ \text{nm}$) als die ausgereiften Filamente. Um einen Zwischenschritt der *in vitro* Assemblierung zu zeigen (Abb. 5.2a), wurde Desmin immobilisiert bevor der salzhaltige AB-Puffer zugegeben wurde, welcher die Assemblierung zu Filamenten initiiert. Im Assemblier-

¹Angabe des arithmetischen Mittelwerts und Standardabweichung, gilt entsprechend für folgende Längen- oder Höhenauswertungen.

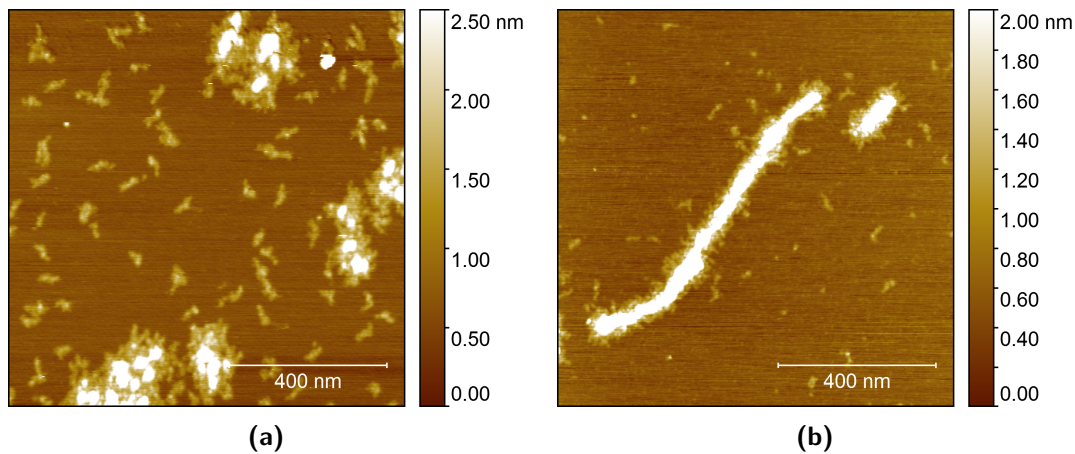


Abbildung 5.2: AFM-Topografie Aufnahmen von Desmin-WT in unterschiedlichen Assemblierungsstadien. In (a) ist ein Zwischenschritt im Assemblierungsprozess von Desmin-WT festgehalten (Desmin im DP-Puffer). Es zeigt flexible Untereinheiten von Desmin. Sie liegen isoliert auf dem Substrat oder sind agglomeriert. (b) zeigt Desmin nach einer Stunde Inkubation im AB-Puffer. Es ist die gleiche Abbildung wie 5.1b mit einer anderen Farbskalierung, um kleinere Strukturen deutlicher hervorzuheben. Die Untereinheiten sind auch hier vorhanden und umsäumen das Filament.

rungswischenschritt waren die flachen, filamentösen Strukturen ebenfalls vorhanden. Bei diesen handelt es sich vermutlich um Vorstufen im Assemblierungsprozess, beziehungsweise Untereinheiten des Desminfilaments. Die größeren Agglomerate in Abbildung 5.2a deuten darauf hin, dass die Untereinheiten zueinander affin sind. Weiterhin war die Form der Unterheiten nicht einheitlich oder linear, weshalb sie wahrscheinlich sehr flexibel sind. Die Untereinheiten passen anhand ihrer Größe und Struktur zu dem im Assemblierungsmodell beschriebenen Dimer oder Tetramer Assemblierungsschritt (Abschn. 2.2.4).

Desmin *Missense*-Varianten

Die rekombinanten Desmin Varianten A120D, L136P, K241E, H326R und P419S wurden mit der gleichen Konzentration, wie der Wildtyp assembliert und auf Glimmer immobilisiert. Die Abbildung 5.3 zeigt die Desmin Varianten in ihrer typischen Gestalt nach der vollständigen Assemblierungszeit (AB-Puffer). Die Varianten K241E, H326R und P419S bildeten Filamente, die in ihrer Länge und Erscheinung nicht vom Wildtyp zu unterscheiden waren.

Die Desmin Varianten L136P und A120D bildeten keine wildtypähnlichen Filamente aus. Eine Partikelanalyse von $3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$ Topografiescans ergab hier eine maximale Längenausdehnung von $65 \pm 25\ \text{nm}$ ($n = 434$, L136P) und $90 \pm 32\ \text{nm}$ ($n = 258$,

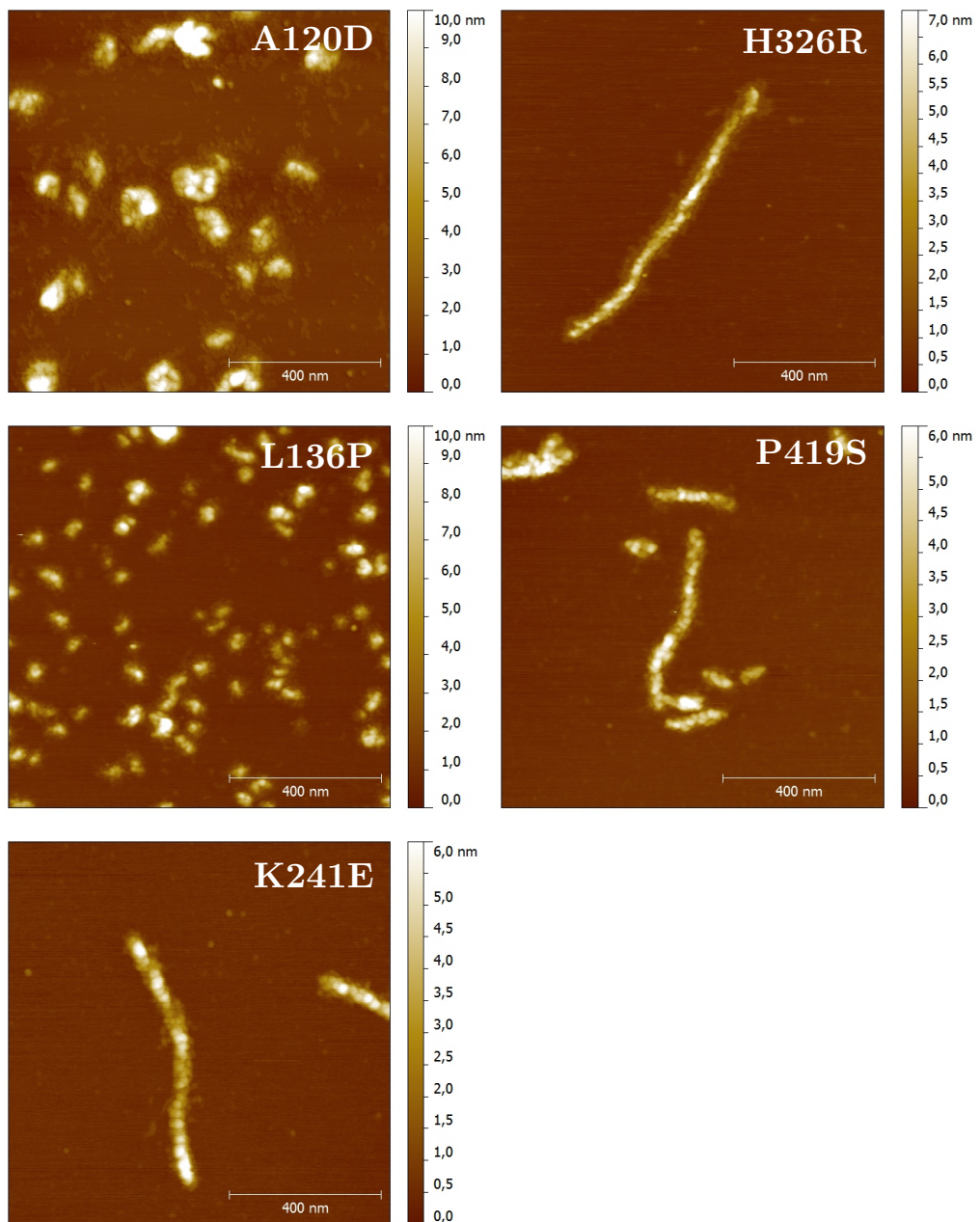


Abbildung 5.3: AFM-Topografie von Desmin Varianten. Jeweils $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ -Scans von Desmin Varianten A120D, L136P, K241E, H326R und P419S. Während die Varianten K241E, H326R und P419S Wildtyp-ähnliche Filamente bilden sind die Varianten A120D und L136P granular und bilden keine Filamente. Teilweise veröffentlicht in Brodehl u. a. (2013a) und Brodehl u. a. (2013b)

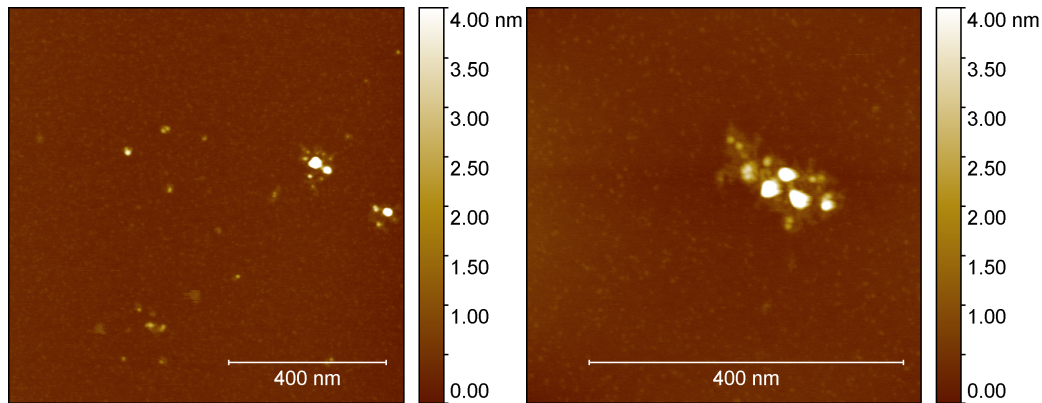


Abbildung 5.4: AFM-Topografie von Desmin-DEL. Zwei verschiedene Scans: links $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ und rechts $0,5\ \mu\text{m} \times 0,5\ \mu\text{m}$. In beiden Abbildungen sind Proteinaggregate, aber keine wildtypähnlichen Strukturen zu finden.

A120D). Diese Längen lagen somit deutlich unterhalb der mittleren Filamentlängen des Wildtyps und unterhalb einer zweifachen ULF-Länge. In beiden AFM-Scans waren ebenfalls flache Strukturen (Untereinheiten) wie beim Wildtyp in Abbildung 5.2 zu beobachten. Diese waren ebenso in der Assemblierungszwischenstufe vorhanden (Daten nicht gezeigt). Vermutlich handelte es sich um Dimere beziehungsweise Tetramere. Somit könnten die Varianten einen Einfluss auf die laterale Polymerisation zu ULFs oder die longitudinale Verschmelzung von ULFs zu Filamenten haben.

Desmin Deletion

Die Reinigung von Desmin-DEL ergab eine geringere Proteinkonzentration als in den vorangegangenen Experimenten, weswegen die übliche Konzentration von $0,15\ \text{g l}^{-1}$ nicht erreicht werden konnte. Aus diesem Grund erfolgte die Assemblierung bei der Hälfte der üblichen Konzentration ($0,075\ \text{g l}^{-1}$). Zur Kontrolle wurde der Desmin Wildtyp nochmals bei ebenso geringer Konzentration assembliert. Während das Assemblierungsverhalten und Filamentbildung des Wildtyps vergleichbar mit den vorherigen Messungen war (Messung nicht gezeigt), zeigte Desmin-DEL keine wildtypähnlichen Filamente oder Untereinheiten (Abb. 5.4).

5.1.2 Koassemblierung von Desmin Wildtyp und Varianten

Die hier beschriebenen Desmin Variationen sind heterozygot. Das heißt, *in vivo* wird potentiell sowohl der Desmin Wildtyp als auch die Variante exprimiert. Im Folgenden wurde untersucht inwieweit die Koexpression einer Variante mit dem Wildtyp Einfluss

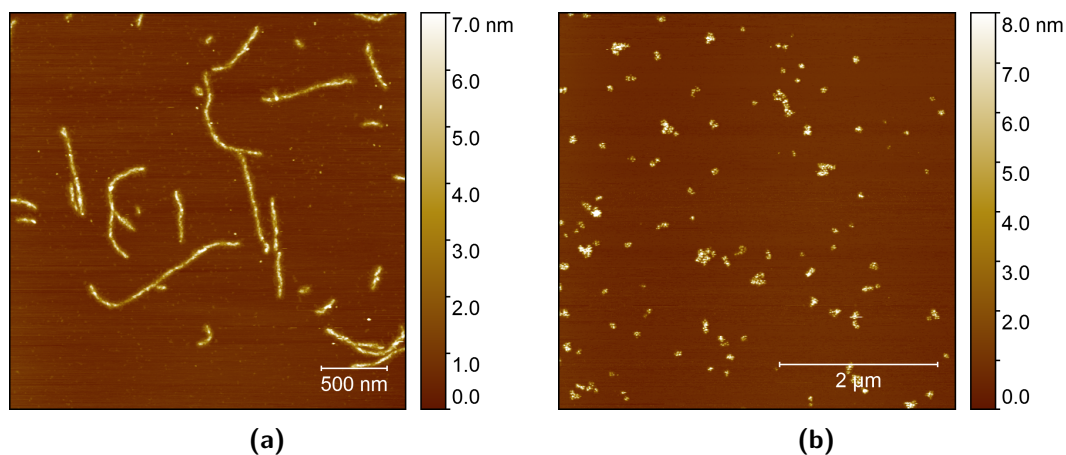


Abbildung 5.5: AFM-Topografie Aufnahmen von koassembliertem Desmin. (a) $3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$ -Scan von Desmin Wildtyp im molaren Verhältnis 10 zu 1 koassembliert mit fluoreszenzmarkiertem Wildtyp. Die Filamente sind normal ausgeprägt. (b) $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ -Scan von Desmin Wildtyp 10 zu 1 koassembliert mit fluoreszenzmarkiertem Desmin-L136P. Es liegen Proteincluster auf dem Substrat, Filamente sind nicht vorhanden.

auf die *in vitro* Assemblierung hat.

A priori waren drei Ergebnisse bei einer Koassemblierung vorstellbar. Entweder die Desmin Variante und der Wildtyp polymerisieren gemeinsam und bilden (1.) Filamente oder (2.) keine Filamente, oder (3.) Wildtyp und Variante polymerisieren getrennt in ihrer jeweiligen spezifischen Ausprägung.

Um Wildtyp und Variante voneinander unterscheiden zu können wurden die Monomere, wie in Abschnitt 4.1.4 beschrieben, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und mittels aperturlosem SNOM abgebildet. Der Markierungsgrad der Monomere lag bei etwa 100 %, wie durch Absorptionsspektroskopie ermittelt wurde.

Zur Kontrolle wurde der Desmin Wildtyp in einem molaren Mischungsverhältnis 10 zu 1 mit markiertem Wildtyp assembliert. Dieses Mischungsverhältnis eignete sich gut für die Auflösung einzelner fluoreszierender Monomere mit SNOM (Harder u. a. 2013). Ein Einfluss des Farbstoffes auf die Filamentbildung konnte nicht festgestellt werden (Abb. 5.5a). Anschließend erfolgte die Koassemblierung des Desmin Wildtyps mit (markierten) Varianten im gleichen Mischungsverhältnis (10:1) wie die Kontrollmessung.

Der Desmin Wildtyp wurde mit markiertem Desmin-L136P koassembliert. Der Einfluss der Variante auf die Filamentbildung war bereits bei diesem geringen Mischungsverhältnis gravierend. Es konnten keine Filamente in AFM-Scans gefunden werden (Abb. 5.5b). Es bildeten sich Cluster aus globulären Strukturen, die vergleichbar mit

denen der reinen Desmin-L136P-Assemblierung (Abb. 5.3) waren. Um dieses Ergebnis zu validieren wurde das koassemblierte Desmin mit aperturlosem SNOM abgebildet (Abb. 5.6).

Die SNOM-Topografie zeigte ähnliche Cluster wie die AFM-Topografie. Das Fluoreszenzsignal korrelierte mit dem Profil der Cluster, wie in der Überlagerung von Topografie und Fluoreszenzsignal 5.6c und dem Profilschnitt in 5.6d zu sehen ist.

Vermutlich verhindert in diesem Fall schon die geringe Menge der Desmin Variante die *in vitro* Filamentassemblierung. Die SNOM Messungen zeigten insbesondere, dass die Desmin-L136P Monomere gemeinsam mit Wildtyp Monomeren assemblierten und die Filamentbildung verhinderten.

Die Variante Desmin-DEL wurde ebenfalls mit dem Wildtyp koassembliert und mit AFM untersucht (Abb. 5.7). Anders als bei dem koassembliertem Desmin-L136P zeigten sich hier wildtypähnliche Filamente. Diese Variante wurde bisher nicht mit SNOM abgebildet. Es wäre interessant zu untersuchen, ob Desmin-DEL in das Filament eingebaut wird.

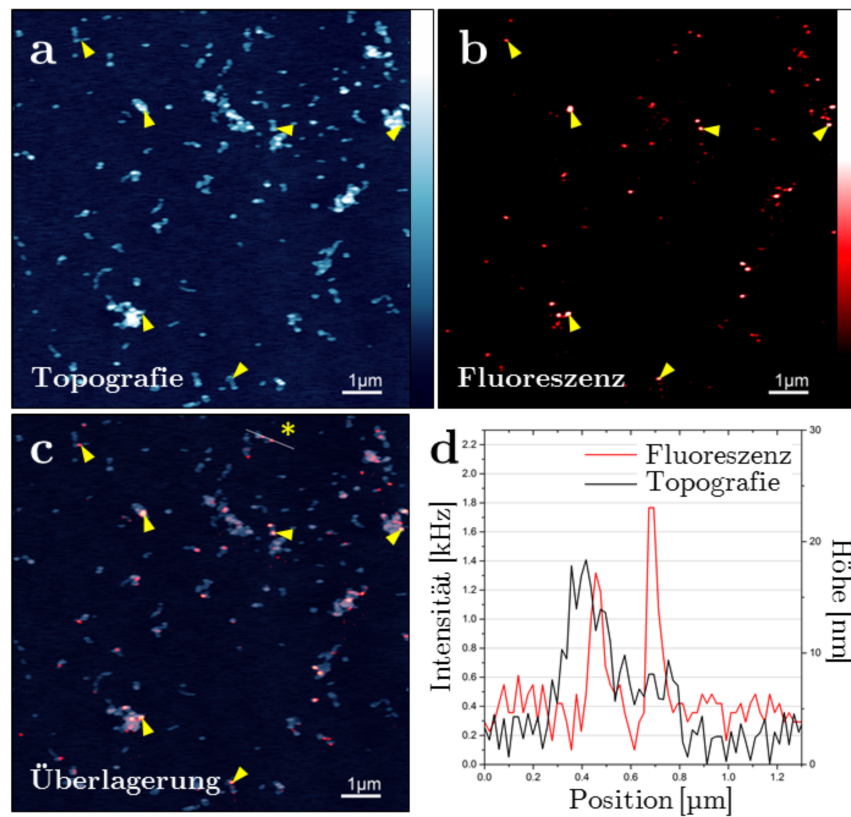


Abbildung 5.6: Aperturlose SNOM Aufnahmen von koassembliertem Desmin Wildtyp und fluoreszenzmarkiertem Desmin-L136P im molaren Verhältnis 10:1. (a) Topografie- und (b) gefiltertes Nahfeldfluoreszenzsignal der SNOM Messung. Die Farbskala beträgt 0 nm bis 30 nm in (a) und 0 kHz bis 2 kHz in (b). Die Überlagerung (c) von Topografie- und Fluoreszenzsignal zeigt eine Kolokalisierung des Fluoreszenzsignals mit Desmin (gelbe Pfeile). Der Profilschnitt (d) entspricht der Linie (bei Asterisk) in (c). Das ungefilterte Fluoreszenzprofil (rote Kurve) zeigt zwei scharfe, etwa 50 nm breite Peaks. Sie korrelieren mit dem Profil der Desmin Struktur (Topografie, schwarze Kurve). Veröffentlicht in Brodehl u. a. (2016).

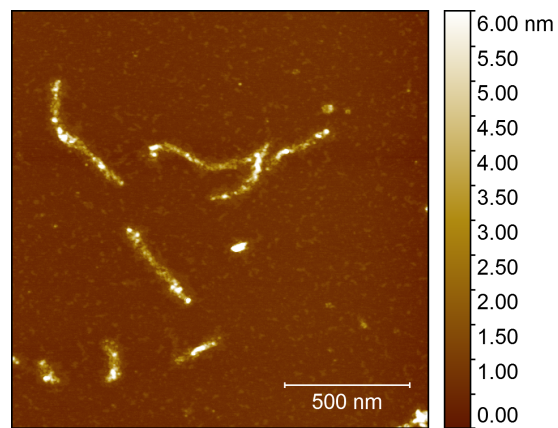


Abbildung 5.7: AFM-Topografie von koassembliertem Desmin Wildtyp und Desmin-DEL im molaren Verhältnis 10 zu 1. Es bilden sich wildtypähnliche Filamente.

5.2 Kraftspektroskopie an rDsg2

Das rekombinante Dsg2 wurde mittels dynamischer Kraftspektroskopie hinsichtlich der homophilen Wechselwirkung untersucht. Hierzu wurde zunächst der rDsg2-WT in zwei unterschiedlichen Umgebungsbedingungen gemessen. Die physiologische Umgebungsbedingung des extrazellulären Raums wurde mit dem Calcium-Puffer nachgestellt. Um zusätzlich den Einfluss der Calciumionen auf das Bindungsverhalten von rDsg2 zu untersuchen wurde die Messung in einem calciumfreien EDTA-Puffer wiederholt. In einer Kontrollmessung wurde ein rDsg2-funktionalisierter Cantilever mit einem Substrat ohne rDsg2 gemessen. Die Messreihen an drei rDsg2 Varianten wurden analysiert und dem Wildtyp gegenübergestellt.

Das für die Auswertung der kraftspektroskopischen Daten verwendete Standardmodell wurde mit weiteren Modellen verglichen. Abschließend erfolgte die Abschätzung der Bindungskinetik und Energielandschaft der rDsg2 homophilen Wechselwirkung.

5.2.1 rDsg2-WT im Calcium-Puffer

Es wurden drei voneinander unabhängige Messreihen mit rDsg2-WT durchgeführt. Eine Messreihe definiert die gesamte Präparation mit Beginn der Expression und Reinigung des rekombinanten Proteins bis zur kraftspektroskopischen Messung mit einem funktionalisierten Cantilever. Für die Cantilever der drei Messreihen wurden die folgenden Federkonstanten bestimmt: $18,1 \pm 1,8 \text{ pN nm}^{-1}$, $26,6 \pm 2,7 \text{ pN nm}^{-1}$ und $28,3 \pm 2,8 \text{ pN nm}^{-1}$.

In Abbildung 5.8 sind die Datensätze eines Cantilevers ($18,1 \pm 1,8 \text{ pN nm}^{-1}$) dargestellt, mit welchem unter vier verschiedenen Belastungsraten r gemessen wurde. Die Wahrscheinlichkeitsdichten für die Belastungsraten 761 pN s^{-1} , 3680 pN s^{-1} und $16\,602 \text{ pN s}^{-1}$ verhielten sich wie das theoretisch vorhergesagte Modell von Evans bezüglich der ansteigenden Kraft in Abhängigkeit der Belastungsrate (Evans u. a. 1997, Abschn. 3.2.3). Die Wahrscheinlichkeitsdichte des ersten Datensatzes mit $r = 251 \text{ pN s}^{-1}$ lässt sich nicht durch dieses Modell beschreiben, da die zugehörige wahrscheinlichste Kraft mit $20,7 \text{ pN}$ nur geringfügig von der nächst höheren Kraft mit $21,8 \text{ pN}$ abweicht (vgl. Abb. 5.8 und Graph des Standardmodells Abb. 5.10, der erste Datensatz ist mit einem Pfeil markiert). Eine Kraft um 20 pN beträgt nur wenige vielfache des quadratisch gemittelten Krafrauschens F_{RMS} . Der arithmetische Mittelwert aller $F_{\text{RMS}i}$ der jeweiligen Datensätze ist in Abbildung 5.8 aufgeführt. Der Mittelwert des ersten Datensatzes betrug $\bar{F}_{\text{RMS}} = 3,73 \text{ pN}$ und somit ist das Maximum nur rund fünfeinhalb Mal höher als das durchschnittliche Rauschen. Im Folgenden wird

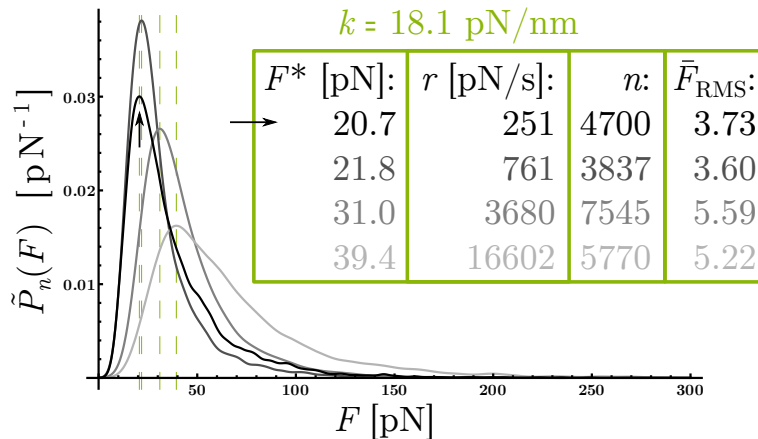


Abbildung 5.8: Wahrscheinlichkeitsdichten der Dissoziationskraft von rDsg2-WT im Calcium-Puffer einer Messreihe. Die verschiedenen Datensätze sind in Graustufen von der kleinsten Belastungsrate in schwarz bis zur größten Belastungsrate in hellgrau dargestellt. Die Maxima (F^*) sind mit vertikalen Linien gekennzeichnet. Die Pfeile markieren den ersten Datensatz mit der kleinsten Belastungsrate.

der Einfluss des Krafrauschens auf das Maximum der Verteilung genauer betrachtet.

5.2.2 Einfluss kleiner Kräfte auf die Kraftverteilung kleiner Belastungsraten

In erster Näherung sind Dissoziationsereignisse größere Kraftstufen (Sprünge) in der Kraft-Distanzkurve. Die Analyse-Software detektiert Kraftstufen die den Schwellwert von $3 F_{\text{RMS}}$ überschreiten automatisiert (s. Abschnitt 4.3.3). Dieser Schwellwert stellt sicher, dass das Krafrauschen der Kraft-Distanzkurve nicht als Dissoziationsereignis fehlinterpretiert wird. Mögliche Dissoziationsereignisse mit einer Kraft unter diesem Schwellwert können daher nicht erkannt werden und fehlen entsprechend in der Kraftverteilung und folgenden Analyse. Der gemittelte Kraftschwellwert für den ersten Datensatz (vgl. Abb.5.8) war etwa 11 pN. Vermutlich lag dieser Kraftschwellwert zu nah an dem Maximum der wahren, unbekanntenen Kraftverteilung. Eine einfache Überlegung soll dies verdeutlichen: Angenommen die Dissoziationskraft wäre normalverteilt mit einem Erwartungswert (Maximum) von 14 pN, so würden 45 % aller Ereignisse unterhalb eines Schwellwertes von 11 pN liegen und in der gemessenen Verteilung fehlen. Diese Überlegung ist stark vereinfacht, da die gemessenen Kräfte nicht normalverteilt sind. Das folgende Beispiel ist besser, da nun eine empirische Verteilung die Grundlage der Überlegung ist.

Um den Einfluss von kleinen Kräften auf die Kraftverteilung zu testen wurde ei-

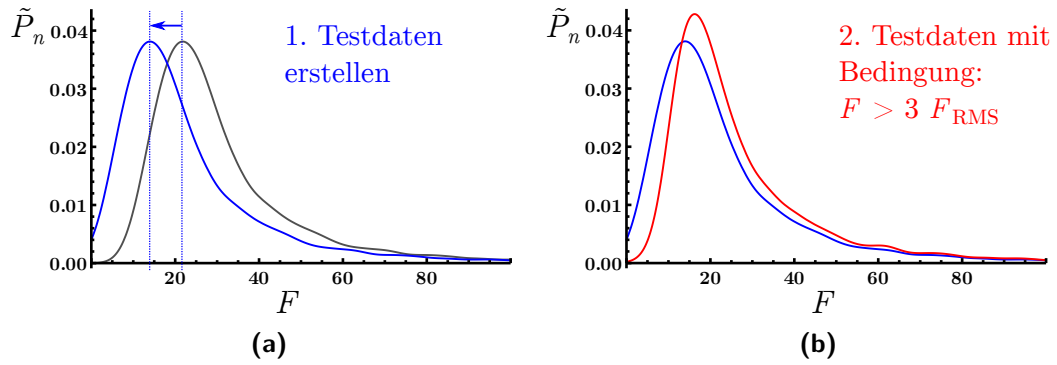


Abbildung 5.9: Simulation der Maximumverschiebung durch Kräfte kleiner $3 F_{\text{RMS}}$. (a) Zunächst wurde aus dem gemessenen Datensatz (grau) aus Abbildung 5.8 (761 pN s^{-1}) ein Testdatensatz (blau) durch Translation des Datensatzes erstellt. Das Maximum des generierten Testdatensatzes lag bei 14 pN. (b) Im nächsten Schritt wurden aus dem Testdatensatz (blau) alle Dissoziationskräfte entfernt, die kleiner als das Dreifache des quadratisch gemittelten Krafrauschens ($\leq 3 F_{\text{RMS}}$) sind. Das Resultat ist eine Verteilung (rot) deren Kräfte $F > 3 F_{\text{RMS}}$ sind und deren Maximum bei 16,3 pN lag.

ne empirische Verteilung als Grundlage für eine Abschätzung der Kraftverteilung bei kleiner Belastungsrate verwendet. Der zweite Datensatz aus Abbildung 5.8 ($r = 761 \text{ pN s}^{-1}$) wurde hierbei als Vorlage für eine Testverteilung genutzt. Der Datensatz besteht aus 3837 Kraftdistanzkurven mit jeweiliger Dissoziationskraft F und zugehörigem Krafrauschen F_{RMS} . Zunächst wurde von jeder Dissoziationskraft F ein fester Wert subtrahiert, so dass die Wahrscheinlichkeitsdichte der entstehenden Testverteilung ein Maximum von 14 pN hatte (s. Abb. 5.9a). Anschließend wurden alle Dissoziationskräfte F verworfen, die die Bedingung $F \leq 3 F_{\text{RMS}}$ erfüllen (s. Abb. 5.9b). In diese Bedingung fielen 19 % der Daten. Die verbliebenen Daten bildeten eine Wahrscheinlichkeitsdichte, deren Maximum nun bei 16,3 pN (Abb. 5.9b rote Kurve) lag. Das wahre Maximum ($F^* = 14 \text{ pN}$) wurde also durch den Verlust der kleinen Kräfte zu einer größeren wahrscheinlichsten Dissoziationskraft ($F^* = 16,3 \text{ pN}$) verschoben.

Das Ausmaß der Verschiebung reicht zwar nicht aus um den ersten Datensatz, keinsten Belastungsrate ($r = 251 \text{ pN s}^{-1}$) vollständig zu erklären. Allerdings zeigt es zumindest qualitativ, dass fehlende (nicht messbare) kleine Dissoziationskräfte das Maximum der Kraftverteilung bei kleinen Belastungsraten zu größeren Kräften hin verschiebt und damit die Bestimmung der wahrscheinlichsten Kraft F^* beeinflussen.

Zusammenfassend zeigen obige Überlegungen: Das Krafrauschen (F_{RMS}) ist die natürliche Kraftauflösungsgrenze des Mikroskops. Daher können kleine Dissoziationskräfte ($\lesssim 11 \text{ pN}$) nicht detektiert werden. Näherungsweise sind Kraftverteilungen deren wahrscheinlichste Kraft unter 20 pN liegen nicht messbar, denn fehlen die kleinen

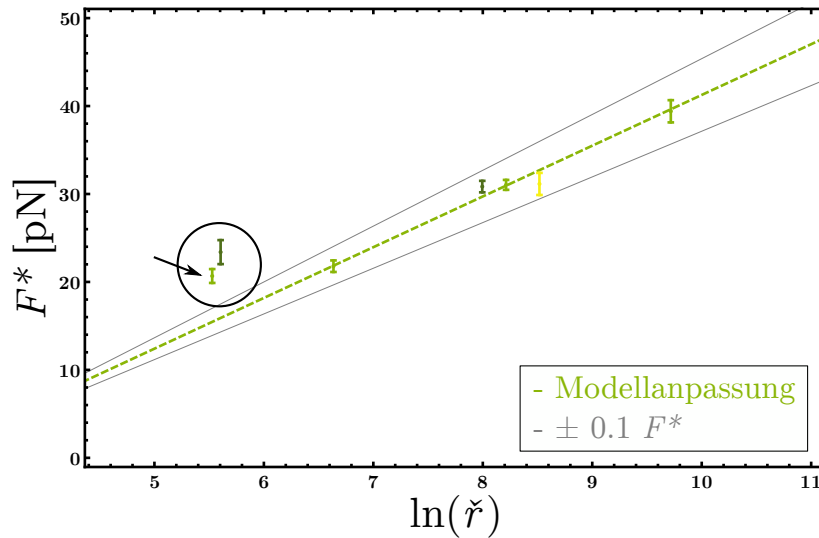


Abbildung 5.10: Graph des Standardmodells von rDsg2-WT. Der Graph zeigt drei Messreihen (Farbcode: hellgrün, dunkelgrün, gelb), die jeweils mit Cantilevern unterschiedlicher Federkonstante gemessen wurden. Für die Modellanpassung (gestrichelte Linie) wurden die mit einem Cantilever ermittelten Datensätze (hellgrün) verwendet (siehe detaillierte Erläuterung im Text). Die eingekreisten Punkte zeigen die Datensätze mit kleiner Belastungsrate, die ebenfalls nicht in die Auswertung einfließen (siehe Text, vgl. Abschn. 5.2.2). Die grauen Linien markieren den Bereich, in dem sich die Anpassung bei einem Fehler der Federkonstante von $\pm 10\%$ befindet. Der Pfeil markiert den Datensatz, der in Abschnitt 5.2.1 diskutiert wurde.

Dissoziationskräfte in der Kraftverteilung, folgt eine artifizielle Verschiebung des Verteilungsmaximums (wahrscheinlichste Dissoziationskraft F^*). Daraus folgt, dass die wahrscheinlichste Dissoziationskraft bei der kleinsten Belastungsrate in Abbildung 5.8 mit hoher Wahrscheinlichkeit durch dieses Artefakt beeinflusst wurde.

5.2.3 Auswertung des rDsg-WT nach Standardtheorie

Die Datensätze von drei Messreihen des rDsg2-Wildtyps im Calcium-Puffer sind in Abbildung 5.10 dargestellt. Im Diagramm ist die wahrscheinlichste Kraft F^* gegen die Belastungsrate $\ln(\dot{r})$ aufgetragen. Die Modellgleichung 4.7 wurde an die Datenpunkte angepasst, um daraus die Modellparameter x_β und k_-^0 zu bestimmen. Die eingekreisten Datenpunkte wurden aufgrund der vorhergehenden Überlegung (vgl. Abschn. 5.2.2) in der Modellanpassung nicht berücksichtigt. Zugunsten der Fehlerberechnung (vgl. Abschn. 4.3.3) wurden ausschließlich die Daten eines Cantilevers ($k = 18,1 \text{ pN nm}^{-1}$, hellgrün) berücksichtigt.

Die Fehlerberechnung resultiert aus den Unsicherheiten der wahrscheinlichsten Kraft F^* (vgl. Abschn. 4.3.3) und der Federkonstante k ($\pm 10\%$). Die Unsicherheiten von F^*

Tabelle 5.1: Parameter aus rDsg2-WT Standardmodellanpassung. Parameterschätzung und Standardabweichung der Modellanpassung entsprechend Abbildung 5.10. Der angegebene Fehler erweitert die Standardabweichung mit der Unsicherheit in der Bestimmung der Federkonstanten. Mittlere Lebensdauer $\tau = (k_-^0)^{-1}$.

Parameter	Schätzung	Standardabweichung	Fehler
x_β [nm]	0,70	$\pm 0,03$	$\pm 0,10$
k_-^0 [s^{-1}]	2,99	$\pm 0,43$	$\pm 0,43$
τ [s]	0,33		$\pm 0,05$

(entsprechen den Fehlerbalken in Abb. 5.10) fließen direkt in die Standardabweichung der Modellparameter (Gleichung 4.8) ein. Anschließend wurde die Standardabweichung der Parameter mit dem Fehler der Federkonstanten erweitert (vgl. Abschn. 4.3.3, Gleichung 4.15). In Tabelle 5.1 sind die Parameterschätzungen aus der Modellanpassung, die jeweiligen Standardabweichungen und korrigierten Fehler aufgeführt. Weiterhin ist die mittlere Lebensdauer $\tau = (k_-^0)^{-1}$ angegeben.

Der in Abbildung 5.10 gezeigte Unsicherheitsbereich der Modellanpassung (graue Linien) ergibt sich aus einer Unsicherheit der Federkonstante von 10 %. Die drei verschiedenfarbigen Datenpunkte (dunkelgrün, hellgrün und gelb) bei ca. 31 pN wurden mit drei unterschiedlichen Federkonstanten gemessen. Die zwei Datenpunkte (dunkelgrün und gelb) lagen sehr zentral im Unsicherheitsbereich der Modellanpassung (hellgrün). Daher ist es unwahrscheinlich, dass alle drei Cantilever und im Besonderen der mittlere hellgrüne Ausreißer darstellen. Die zwei Datenpunkte (dunkelgrün und gelb) unterstützen somit die Aussagekraft der Modellanpassung.

5.2.4 rDsg2-WT im EDTA-Puffer

Der rDsg2-WT wurde neben der physiologischen Umgebung mit Calciumionen auch in einer calciumfreien Umgebung kraftspektroskopisch untersucht. Als calciumfreies Medium wurde EDTA-Puffer verwendet (Abschn. 4.3.3). Dieser Puffer enthält sowohl EDTA als auch EGTA, beides sind Chelatoren für Calcium.

Abbildung 5.11 zeigt die Wahrscheinlichkeitsdichten der Dissoziationskräfte einer Messreihe im EDTA-Puffer. Im Unterschied zu den Messungen im Calcium-Puffer ist die Verteilung der Kräfte bei vergleichbaren Ziehgeschwindigkeiten wesentlich breiter. Die jeweiligen Standardabweichung der Kräfte lagen im EDTA-Puffer zwischen 43 pN und 61 pN und sind damit deutlich größer als im Calcium-Puffer (20 pN bis 54 pN).

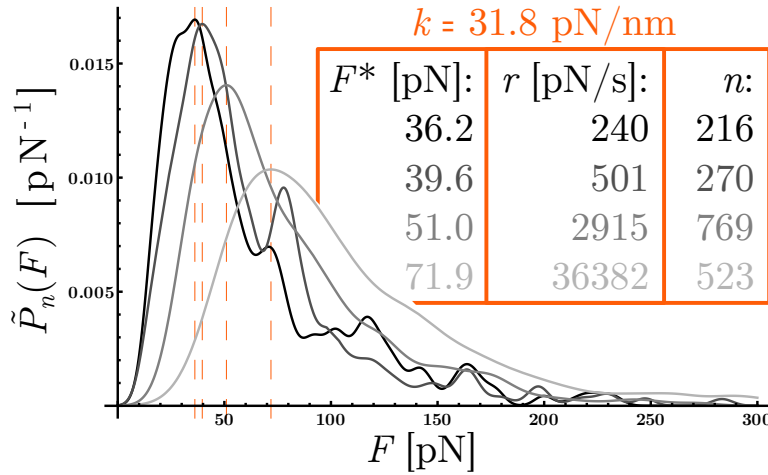


Abbildung 5.11: Wahrscheinlichkeitsdichten der Dissoziationskräfte von rDsg2-WT im EDTA-Puffer. Die verschiedenen Datensätze sind in Graustufen von der kleinsten Belastungsrate in schwarz bis zur größten Belastungsrate in hellgrau dargestellt. Die Position der Maxima (F^*) sind mit orangen vertikalen Linien gekennzeichnet.

Außerdem sind die Kurven im Vergleich weniger glatt und zeigen mehrere lokale Maxima.

Die Anzahl der Dissoziationsereignisse war im Vergleich zur Messung im Calcium-Puffer wesentlich geringer (vgl. Abb. 5.8 und Abb. 5.11). Dies hängt mit der geringeren absoluten Bindungswahrscheinlichkeit im EDTA-Puffer zusammen. Die Bindungswahrscheinlichkeit ist definiert über das Verhältnis der Kraft-Distanzkurven mit Dissoziationsereignis (bzw. Bindungsereignis) n zu allen gemessenen Kraft-Distanzkurven N . Wird die Wahrscheinlichkeitsdichte der Dissoziationskräfte mit der Bindungswahrscheinlichkeit $\frac{n}{N}$ multipliziert, erhält man die Wahrscheinlichkeitsdichte normiert auf die Bindungswahrscheinlichkeit:

$$\tilde{N}(F) = \frac{n}{N} \tilde{P}(F). \quad (5.1)$$

Die absolute Bindungswahrscheinlichkeit aller in Calcium-Puffer gemessenen Datensätze betrug 27%. Die absolute Bindungswahrscheinlichkeit im EDTA-Puffer betrug hingegen 9%. Ein Vergleich der Bindungswahrscheinlichkeiten in EDTA-Puffer mit einer Referenzmessung im Calcium-Puffer ist in Abbildung 5.12 gezeigt.

Zusammengefasst zeigen die calciumfreien Messungen eine breitere Kräfteverteilung und eine geringere Wahrscheinlichkeit an Bindungsereignissen als die Messungen mit Calciumbeteiligung.

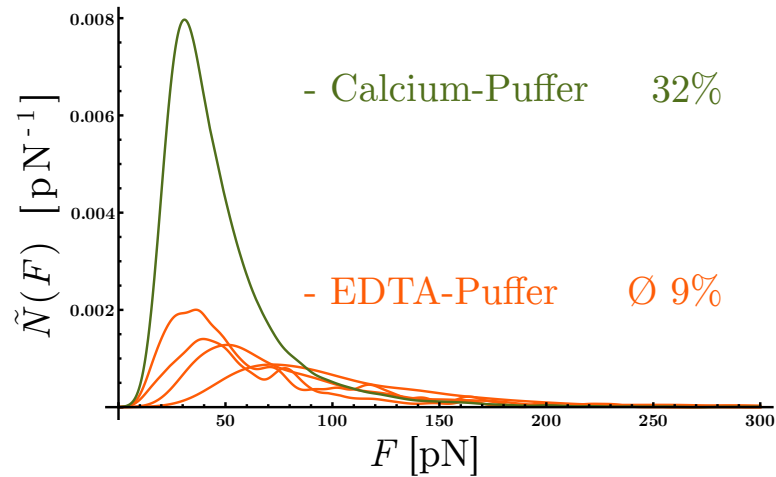


Abbildung 5.12: Vergleich der Bindungswahrscheinlichkeiten in verschiedenen Umgebungsbedingungen. Gezeigt sind die Wahrscheinlichkeitsdichten der Dissoziationskräfte normiert auf die Bindungswahrscheinlichkeit. Die Graphen entsprechen vier im EDTA-Puffer gemessenen Datensätzen (orange, absolute Bindungswahrscheinlichkeit 9 %) und zum Vergleich ein repräsentativer Datensatz aus einer Messreihe mit Calcium-Puffer (grün, Bindungswahrscheinlichkeit 32 %).

Tabelle 5.2: Parameter aus der rDsg-WT Standardmodellanpassung mit verschiedenen Puffern. Parameter entsprechend Abbildung 5.13 und berechnete Lebensdauer $\tau = (k_-^0)^{-1}$.

	EDTA-Puffer	Calcium-Puffer
x_β	$0,56 \pm 0,11 \text{ nm}$	$0,70 \pm 0,10 \text{ nm}$
k_-^0	$0,28 \pm 0,17 \text{ s}^{-1}$	$2,99 \pm 0,43 \text{ s}^{-1}$
τ	$3,59 \pm 2,19 \text{ s}$	$0,33 \pm 0,05 \text{ s}$

Auswertung der EDTA-Puffermessungen nach Standardtheorie

Der Graph in Abbildung 5.13 zeigt die Messreihen des rDsg2-WT mit und ohne Calciumbeteiligung, sowie die jeweilige Anpassung des Standardmodells. Die wahrscheinlichsten Dissoziationskräfte der Messreihe ohne Calcium (EDTA-Puffer, orange) waren größer als die Dissoziationskräfte der Messreihen mit Calciumbeteiligung (Calcium-Puffer, grün). Weiterhin waren die Unsicherheiten (entsprechen den Fehlerbalken in Abb. 5.13) der Messung im EDTA-Puffer deutlich größer als die der Messung im Calcium-Puffer. Die größere Unsicherheit folgt aus der oben beschriebenen breiteren Kräfteverteilung. Die Modellanpassung lieferte die in Tabelle 5.2 angegebenen Werte. Die Abschätzung der Fehler erfolgte wie oben beschrieben (Abschn. 5.2.3).

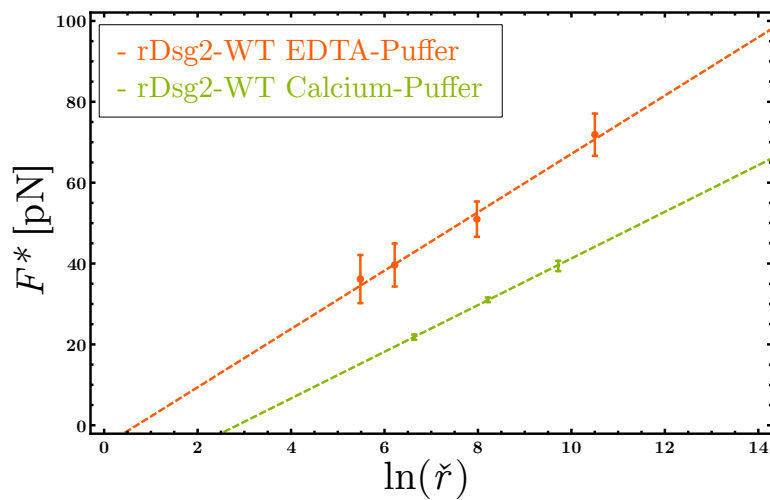


Abbildung 5.13: Graph des Standardmodells von rDsg-WT in EDTA- und Calcium-Puffer. Die Datensätze der Messreihe im EDTA-Puffer (orange) haben eine größere Unsicherheit (Fehlerbalken) und größere Dissoziationskraft F^* als im Calcium-Puffer (grün). Die Datensätze wurden jeweils mit dem Standardmodell (gestrichelte Linien) angepasst (vgl. Ergebnistabelle 5.2).

5.2.5 Kontrollmessung

Bei der Präparation von Substrat und Cantilever mit rDsg2 können viele Faktoren zu Störungen in den folgenden Messungen führen. Die Wahl der Materialien von Substrat und Cantilever und die chemische Kopplung durch Linker entscheiden darüber, ob ein Experiment funktioniert oder nicht. Die in dieser Arbeit dargestellte erfolgreiche Funktionalisierung ist das Endprodukt einer Reihe Fehlversuche. Fehlversuche sind durch kraftspektroskopische Messungen gekennzeichnet, die keine auswertbaren Kraft-Distanzkurven mit Dissoziationsereignis aufweisen. Das Spektrum der ergebnislosen Kraft-Distanzkurven reicht von Kurven, die ausschließlich oder zu viel unspezifische Adhäsion beinhalten bis zu Messreihen, die eine sehr geringe Zahl oder keine Dissoziationsereignisse zeigen.

Bei der dargestellten Präparation gab es bei den Messreihen keine nennenswerte unspezifische Adhäsion. Weiterhin war die unter selben Umgebungsbedingungen gemessene Bindungswahrscheinlichkeit zwischen mehreren unabhängigen Präparationen vergleichbar.

Eine durchgeführte Kontrollmessung gab Aufschluss darüber, ob eine spezifische Wechselwirkung zwischen rDsg2-rDsg2 oder ein Artefakt gemessen wurde. Die Kontrollmessung bestand aus einem, wie zuvor mit rDsg2 funktionalisierten, Cantilever der zusammen mit zwei unterschiedlich präparierten Substrate gemessen wurde. Beide Substrate wurden nach der üblichen wie in Abschnitt 4.2.3 beschriebenen Vorgehensweise präpariert, wobei auf einem Substrat (Kontrollsubstrat) kein rDsg2 aufgebracht wurde.

Es wurden drei Messungen mit demselben Cantilever durchgeführt. Zunächst wurde das rDsg2-freie Substrat im EDTA-Puffer und anschließend im Calcium-Puffer gemessen. Danach erfolgte eine Referenzmessung mit rDsg2-funktionalisiertem Substrat in Calcium-Puffer.

Abbildung 5.14 zeigt die normierten Wahrscheinlichkeitsdichten (Gleichung 5.1) der drei Messungen. Die Messungen mit rDsg2-freiem Substrat zeigten kaum unspezifische Adhäsion oder Dissoziationsereignisse (Abb. 5.14). Die Bindungswahrscheinlichkeit betrug mit EDTA-Puffer 4% und mit Calcium-Puffer 2%. Die Referenzmessung mit rDsg2-funktionalisiertem Substrat zeigte eine Bindungswahrscheinlichkeit von 32%.

Die Ereignisraten der Kontrollmessungen können als unspezifische Ereignisse ausgelegt werden, die auch in allen anderen Messungen auftraten. Die Kontrollmessung im Calcium-Puffer war mit einer Ereignisrate von 2% sehr gering, da sie nur etwa 6% der Ereignisse in der Referenzmessung betragen würden. Vor diesem Hintergrund ist es unwahrscheinlich, dass diese einen Einfluss auf die Ergebnisse der Messungen

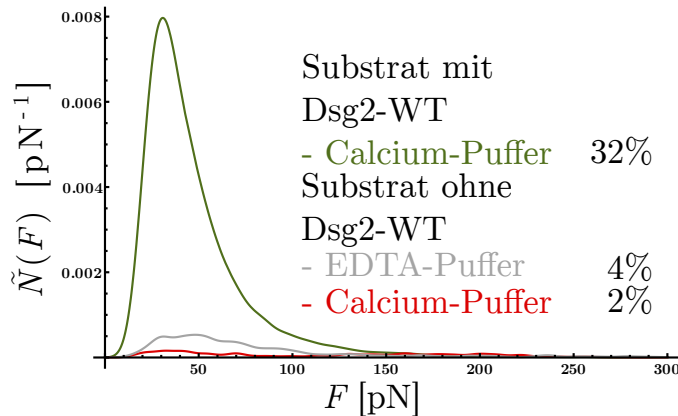


Abbildung 5.14: Vergleich der Bindungswahrscheinlichkeiten/Ereignisraten von Referenz- und Kontrollmessung. Wahrscheinlichkeitsdichten der Dissoziationskräfte normiert auf die Bindungswahrscheinlichkeit von drei verschiedenen Messungen: Kontrollmessung mit rDsg2-freiem Substrat im EDTA-Puffer (grau) und im Calcium-Puffer (rot) und Referenzmessung mit rDsg2-funktionalisiertem Substrat im Calcium-Puffer (grün). Die Messungen wurden mit demselben Cantilever durchgeführt. Die Prozentangaben entsprechen den Bindungswahrscheinlichkeiten.

im Calcium-Puffer haben. Die Ereignisrate der Kontrollmessung im EDTA-Puffer ist mit 4 % allerdings nicht vernachlässigbar. Diese würden etwa die Hälfte der Messdaten im EDTA-Puffer, mit einer durchschnittlichen Ereignisrate von 9 % (Abb. 5.13), ausmachen.

Der Vergleich zwischen Kontroll- und Referenzmessung im Calcium-Puffer bestätigt, dass die Funktionalisierung erfolgreich und die gemessene Wechselwirkung spezifisch war. Aus dem Vergleich der Messungen im EDTA-Puffer lässt sich vermuten, dass die gemessenen Ereignisse in diesem Puffer wahrscheinlich zu einem großen Teil unspezifischer Natur waren.

5.2.6 rDsg2 Varianten im Calcium-Puffer

Es wurden drei Messreihen mit verschiedenen rDsg2 Varianten analysiert. Die Varianten waren: rDsg2-D154E, rDsg2-K294E und rDsg2-V392I. Die Abbildungen 5.15a-c zeigen die Wahrscheinlichkeitsdichten, die wahrscheinlichste Kraft F^* , Belastungsraten r und die Anzahl der Dissoziationsereignisse n der drei Messreihen.

Die wahrscheinlichste Kraft der jeweiligen kleinsten Belastungsrate waren teilweise größer (rDsg2-K294E und rDsg2-V392I) oder etwa gleich (rDsg2-D154E) im Vergleich mit den Kräften, die bei nächst höherer Belastungsrate gemessen wurden. Damit liegt hier sehr wahrscheinlich der gleiche Messfehler vor, der in Abschnitt 5.2.2 diskutiert wurde.

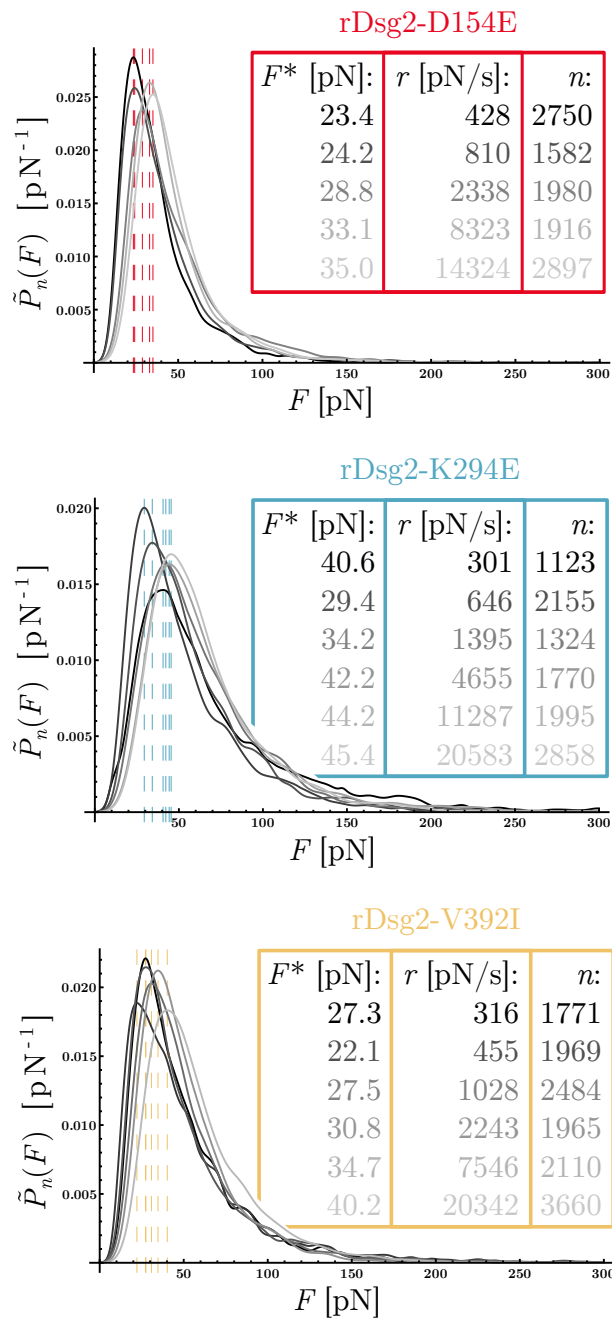


Abbildung 5.15: Wahrscheinlichkeitsdichten der Dissoziationskräfte von rDsg2 Varianten im Calcium-Puffer. Die verschiedenen Datensätze sind in Graustufen von der kleinsten Belastungsrate in schwarz bis zur größten Belastungsrate in hellgrau dargestellt. Die Maxima (F^*) sind mit gestrichelten Linien gekennzeichnet.

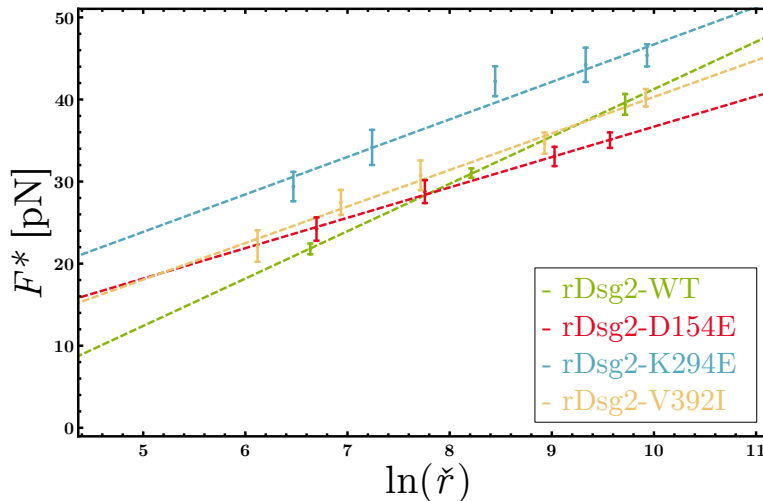


Abbildung 5.16: Graph des Standardmodells von rDsg2 Varianten und Wildtyp im Calcium-Puffer. Im Graphen ist die wahrscheinlichste Kraft F^* gegen die Belastungsrate $\ln(\check{r}_k)$ aufgetragen. Die Messdaten wurden mit dem Standardmodell (Gleichung 4.7) angepasst (gestrichelte Linien, Ergebnistabelle 5.3). Die Anpassungsgüte des Modells wurde mit einem χ^2 -Test überprüft (vgl. Tab. 5.4). Die gemessenen rDsg2 Varianten waren rDsg2-D154E (rot), rDsg2-K294E (blau) und rDsg2-V392I (gelb) sowie der Wildtyp (grün) (siehe auch Legende).

Weiterhin fiel die Messreihe rDsg2-K294E durch ihre im Vergleich zu den anderen Messreihen breitere Verteilung auf.

Auswertung nach Standardtheorie

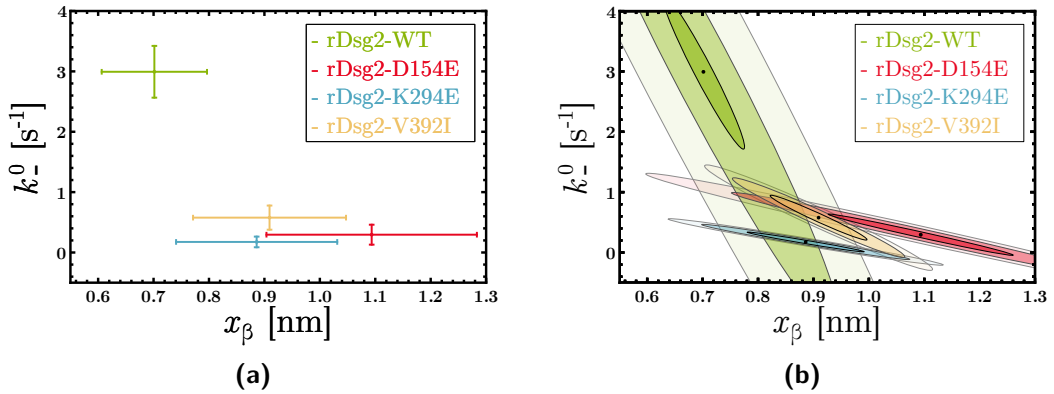
Die Messreihen der rDsg2 Varianten wurden mit der Standardtheorie ausgewertet. Die Datensätze der kleinsten Belastungsraten wurden dabei nicht weiter berücksichtigt und dargestellt (vgl. Abschn. 5.2.2).

Abbildung 5.16 zeigt die Datenpunkte und Modellanpassungen (Gleichung 4.7) der drei rDsg2 Varianten und des Wildtyps. Tabelle 5.3 fasst die Parameter x_β und k_-^0 aus den Modellanpassungen und die mittlere Lebensdauer $\tau = (k_-^0)^{-1}$ zusammen. Bei allen rDsg2 Varianten war die Barrierenbreite der Aktivierungsenergie x_β größer, die Ratenkonstante k_-^0 kleiner und damit die Lebensdauer τ größer als beim Wildtyp.

Die Parameterschätzungen sind mit ihren jeweiligen Fehlern im Parameterraum (x_β, k_-^0) in Abbildung 5.17a dargestellt. Die Parameter x_β überschneiden sich innerhalb der abgeschätzten Fehler. Lediglich die Variante rDsg2-D154E und der Wildtyp haben keine Überschneidung und sind somit deutlich verschieden. Abbildung 5.17b zeigt den Parameterraum mit Konfidenzintervallen (0.68, 0.9, 0.95), die aus der nicht-linearen Anpassung ermittelt wurden. Auch hier liegt die Parameterkoordinate von

Tabelle 5.3: Parameter aus der Standardmodellanpassung. Parameter von rDsg2 Wildtyp und Varianten entsprechend Abbildung 5.16 und berechnete Lebensdauer $\tau = (k_-^0)^{-1}$.

	rDsg2-WT	rDsg2-D154E	rDsg2-K294E	rDsg2-V392I
x_β [nm]	$0,70 \pm 0,10$	$1,09 \pm 0,19$	$0,89 \pm 0,15$	$0,91 \pm 0,14$
k_-^0 [s^{-1}]	$2,99 \pm 0,43$	$0,30 \pm 0,17$	$0,18 \pm 0,09$	$0,58 \pm 0,20$
τ [s]	$0,33 \pm 0,05$	$3,39 \pm 1,90$	$5,72 \pm 2,88$	$1,73 \pm 0,60$


Abbildung 5.17: Parameterraum der Parameter k_-^0 und x_β aus der Modellanpassung in Abbildung 5.16 (a) Parameterschätzungen und Fehlerbalken wurden entsprechend der Tabelle 5.3 eingezeichnet. (b) Parameterraum mit Konfidenzregionen. Die gefüllten Flächen aufsteigender Transparenz entsprechen Konfidenzintervallen von 0.68, 0.9 und 0.95 (vom Zentrum nach Außen).

rDsg2-D154E (schwarzer Punkt in roter Fläche) am deutlichsten außerhalb der Konfidenzregionen des Wildtyps (grün). Die Fehler und Konfidenzintervalle der Parameter werden nicht durch die Anpassungsgüte der jeweiligen Datenpunkten beeinflusst. Aus diesem Grund wurde die Güte der Modellanpassungen mit einem χ^2 -Test überprüft (siehe Tabelle 5.4). Bei einem Konfidenzlevel von $\alpha < 5\%$ werden die Daten (mit einer Wahrscheinlichkeit von $p = 1 - \alpha$) nicht durch das Modell beschrieben. Dies traf lediglich auf die Messreihe von rDsg2-K294E zu ($\alpha = 0,5\%$). Die restlichen Datensätze wurden somit gut durch das Standardmodell beschrieben.

Die Unverträglichkeit der Datensätze von rDsg2-K294E mit dem Standardmodell muss nicht bedeuten, dass die Modellfunktion nicht geeignet ist. Das Testergebnis weist vielmehr darauf hin, dass entweder eine systematische Abweichung oder eine zu klein gewählte Unsicherheit der Datenpunkte vorliegt. Die Modellanpassungen der anderen Datensätze weisen ein guten $\frac{\chi^2}{\nu}$ -Wert auf (vgl. Tab. 5.4), weswegen eine zu klein gewählte Unsicherheit unwahrscheinlich ist. Vielmehr folgt daraus, dass die Un-

Tabelle 5.4: χ^2 -Test der Modellanpassungen. Das normalisierte $\frac{\chi^2}{\nu}$ ist χ^2 pro Freiheitsgrad ν . Der Freiheitsgrad ν ist die Anzahl der Datenpunkte abzüglich der Anzahl der Parameter (hier 2 Parameter). Mit einer Konfidenz von $p = 1 - \alpha$ beschreibt das Modell die Daten nicht ausreichend (α ist die Wahrscheinlichkeit für $\chi^2 > \chi^2_{\nu}$).

	rDsg2-WT	rDsg2-D154E	rDsg2-K294E	rDsg2-V392I
$\frac{\chi^2}{\nu}$	0,26	0,22	4,22	1,48
α	61 %	79 %	0,5 %	22 %

sicherheit realistisch eingeschätzt wurde. Das Ergebnis des χ^2 -Tests zusammen mit der beobachteten breiteren Dissoziationskräfteverteilung der Variante rDsg2-K294E (vgl. Abschn. 5.2.4, Abb. 5.15) deuten darauf hin, dass diese Messreihe durch einen Messfehler beeinflusst wurde.

5.2.7 Vergleich verschiedener Modelle

Das für die Auswertung genutzte Standardmodell ist ein gutes und relativ einfach anwendbares Modell der von Evans u. a. (1997) aufgestellten Theorie. Im Folgenden soll nun das Standardmodell mit dem erweiterten Modell Gleichung 3.12 (Evans u. a. 1999) und dessen Näherungsgleichung 3.14 (Evans 2001) anhand der Datensätze von rDSG2-WT verglichen werden. Der wesentliche Unterschied dieser Modelle mit dem vorhergehend gezeigtem Standardmodell liegt in der Betrachtungsweise der Belastungsrate und der Berücksichtigung eines kraftabhängigen Potentials. Ein Vergleich der Standardmodelle zeigt im Besonderen den Unterschied zwischen der einfachen Belastungsrate $r_k = vk$ und der oben bereits angewendeten effektiven Belastungsrate $r = vk_{\text{eff}}$.

Alle drei Modelle wurden mit der lediglich aus Geschwindigkeit und Federkonstante berechneten Belastungsrate $r_k = vk$ angepasst. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurde das Standardmodell aus der vorherigen Auswertung (mit $r = vk_{\text{eff}}$) erneut, diesmal ohne Gewichtung, angepasst. Weiterhin wurde in das erweiterte Modell der kraftabhängige Vorfaktor aus Gleichung 3.11 mit $g(f) = f^1$ (harmonisches Potential) und $g(f) = f^{0.5}$ (Potential mit inverser Potenzfunktion) angenähert und einmal ganz vernachlässigt ($g(f) = 1$). Das WLC-Modell (Gleichung 3.1) ist Bestandteil des erweiterten und des angenäherten Modells, wodurch der biege-elastische Linker in diesen Modellen berücksichtigt wird. Die Parameterwerte für das WLC-Modell waren $L_P = 0,38$ nm und $L_0 = 25$ nm.

Tabelle 5.5: Parameter aus dem Modellvergleich. Das Standardmodell wurde mit zwei verschiedenen Belastungsraten angepasst: $r_k = v k$ und $r = v k_{\text{eff}}$, mit Federkonstante k , effektiver Federkonstante (Steigung der molekularen Extension am Dissoziationsereignis) k_{eff} und der Rückziehggeschwindigkeit v . Das ansonsten verwendete Standardmodell ist unterstrichen, $r_k = v k$ gilt für alle anderen Modelle. Das erweiterte Modell wurde mit verschiedenen Vorfaktoren $g(f)$ verwendet: $g(f) = f^1$ für ein harmonisches Potential, $g(f) = f^{0.5}$ für ein Potential mit inverser Potenzfunktion und $g(f) = 1$ für ein lineares Potential ohne Kraftabhängigkeit. Weiterhin gilt $g(f) = 1$ auch für das Standardmodell und das angenäherte Modell. Die mit Asterisk (*) markierten Modelle sind in Abbildung 5.18 gezeigt.

Modell	Gleichung	x_β [nm]	k_-^0 [s^{-1}]
Standardmodell* mit r_k	3.8	$0,53 \pm 0,06$	$74,67 \pm 25,59$
<u>Standardmodell</u> mit r	3.8	$0,70 \pm 0,01$	$2,91 \pm 0,20$
Erweitertes Modell* mit $g = f^1$	3.12	$0,51 \pm 0,06$	$7,16 \pm 3,59$
Erweitertes Modell mit $g = f^{0.5}$	3.12	$0,60 \pm 0,07$	$7,02 \pm 3,39$
Erweitertes Modell mit $g = 1$	3.12	$0,68 \pm 0,07$	$8,00 \pm 3,78$
Angenähertes Modell*	3.14	$0,78 \pm 0,08$	$5,08 \pm 2,41$

Tabelle 5.5 führt die Parameter aus den angepassten Modellen auf. Der Parameter k_-^0 des Standardmodells mit $r_k = v k$ wich extrem von den anderen ab. Dies macht deutlich, wie wichtig es ist das Standardmodell mit einer angepassten Federkonstante des Systems aus Linker und Cantilever zu versehen. Das heißt, bei Funktionalisierungen mit einem langen flexiblen Linker, muss eine effektive Federkonstante des Systems bestimmt werden, um es mit dem Standardmodell beschreiben zu können.

Ein Parametervergleich des erweiterten Modells mit verschiedenen Vorfaktoren $g(f)$ zeigte bei k_-^0 im Rahmen der Standardabweichung keine wesentlichen Unterschiede. Die Breite des Potentials x_β variierte ebenfalls nur leicht mit der Wahl von $g(f)$. Das Standardmodell (mit effektivem r) stimmte im Parameter x_β am besten mit dem erweiterten Modell ohne Beachtung des Vorfaktors ($g(f) = 1$, $x_\beta = 0,68 \pm 0,07$ nm) überein. Dies war zu erwarten, da im Standardmodell eine Verformung des unbekanntenen Potentials vernachlässigt wird.

Die Ratenkonstante k_-^0 lag bei dem erweiterten Modell zwischen 7 s^{-1} und 8 s^{-1} mit einer relativ hohen Standardabweichung von rund 50%. Im Vergleich zum verwendeten Standardmodell ergab sich mit $k_-^0 = 2,91 \pm 0,20 \text{ s}^{-1}$ eine relative Standardabweichung von 7%. Die relativ große Abweichung von k_-^0 zwischen dem verwendeten Standardmodell und den erweiterten Modellen kann mehrere Ursachen haben. Zum

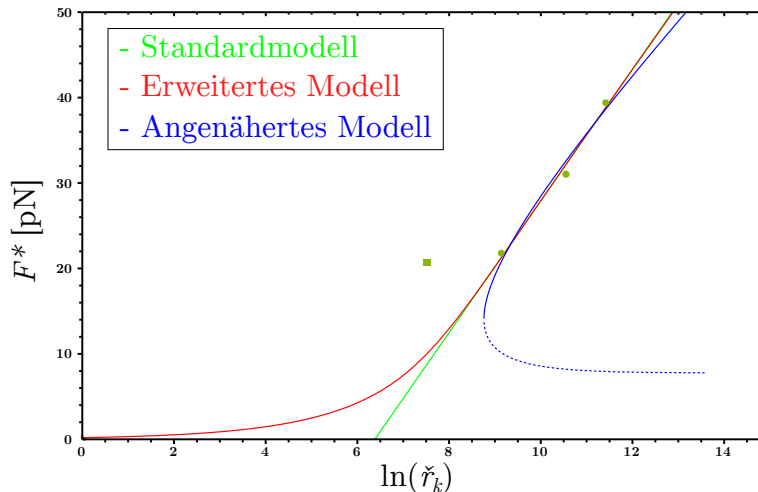


Abbildung 5.18: Vergleich verschiedener Modelle anhand von rDsg2-WT. Im aufgeführten erweiterten Modell ist $g(f) = f^1$. Die runden Datenpunkte wurden für die Anpassung genutzt. Die Modelle zeigen im ausgewerteten Datenbereich (runde Datenpunkte) ein lineares Verhalten. Der verworfene Datenpunkt (Quadrat) mit der kleinsten Belastungsrate (vgl. Abschnitt 5.2.3) lässt sich nicht durch die Modelle beschreiben.

Einen wurden Literaturwerte für Kontur- und Persistenzlänge des Linkers genutzt. Zum Anderen fließt die Elastizität des zu untersuchenden Objekts (rDsg) nicht in das erweiterte Modell mit ein. Zwar ist davon auszugehen, dass der PEG-Linker elastischer ist als das Protein, die geschätzte Länge von rDsg2 ist jedoch nicht unerheblich. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Elastizität des Proteins die effektive Belastungsrate beeinflusst.

Die Parameter des angenäherten Modells sollten das erweiterte Modell mit $g(f) = 1$ approximieren. Die Abweichung in x_β liegt außerhalb der Standardabweichung. Eine gute Übereinstimmung mit diesem ist daher nicht gegeben. Allerdings stimmen die Parameter des angenäherten Modells am besten mit denen des verwendeten Standardmodells überein.

Abbildung 5.18 zeigt drei ausgewählte Modelle aus Tabelle 5.5 angepasst an die Daten von rDsg2-WT. Das erweiterte Modell (rot) weicht bei kleinen Belastungsraten unter $\ln(\check{r}_k) \approx 7$ (entspricht hier einer Geschwindigkeit von 60 nm s^{-1}) deutlich von dem Standardmodell (grün) ab. Dabei handelt es sich speziell um den Bereich in dem der Einfluss des elastischen Linkers zum tragen kommt und der sich auch wesentlich mit der Wahl von $g(f)$ verändert. Das angenäherte Modell (blau) versagt bei der Beschreibung von kleinen Kräften (gepunkteter Teil der Kurve). Es zeigt aber in etwa die Geschwindigkeit an, ab der auch das erweiterte Modell mit $g(f) = 1$ (Kurve ist nicht

gezeigt) den linearen Bereich verlässt. Die Geschwindigkeit liegt bei etwa 250 nm s^{-1} . Das heißt, unabhängig von der Auflösung des Messinstrumentes mit $3F_{\text{RMS}}$ ist, für die Beschreibung der Daten mit dem Standardmodell, die untere Grenze der Geschwindigkeit zwischen 60 und 250 nm s^{-1} erreicht.

Aus Anschauungsgründen ist der Datensatz der kleinsten Belastungsrate ebenfalls gezeigt (Quadrat). Dieser Datenpunkt wurde aus den oben bereits diskutierten Gründen nicht für die Auswertung verwendet (Abschn. 5.2.2). Dieser Datenpunkt lag noch über der Geschwindigkeit bei dem die rote Kurve vom Standardmodell abweicht, aber unter der Geschwindigkeit bei der die blaue Kurve den linearen Verlauf verlässt. Auf Grund der Lage des Datenpunktes - links des Standardmodells - kann er nicht durch die Modelle beschrieben werden. Dies bekräftigt die Vermutung, dass bei dieser kleinen Belastungsrate (Geschwindigkeit) die Kräfteverteilung durch das Kraftrauschen verfälscht wurde (vgl. Abschn. 5.2.2).

Zusammengefasst zeigt die Anpassung der verschiedenen Modelle, dass die Datenpunkte im linearen Bereich der erweiterten Modelle und des angenäherten Modells liegen. Das heißt im relevanten Messbereich ist das Standardmodell gültig. Allerdings wird auch deutlich, dass es notwendig ist eine effektive Belastungsrate im Standardmodell zu verwenden. Das angenäherte Modell scheint eine alternative Möglichkeit zu sein die Messdaten zu beschreiben, falls die effektive Belastungsrate nicht experimentell bestimmt werden kann, jedoch die Elastizität des Systems beziehungsweise Eigenschaften des Linkers bekannt sind. Weiterhin zeigt sich, dass ein kraftabhängiges Potential, zumindest bei dem hier vorliegenden System, keine nennenswert abweichenden Ergebnisse liefert.

5.2.8 Approximation der Bindungsenergie mit Jarzynskis Gleichung

Aus der Anpassung der Kurven, Kraft gegen molekulare Extension, wurde die Fläche unterhalb der Kurve bis zum Dissoziationsereignis bestimmt (vgl. Abschnitt 4.3.3). Diese Fläche entspricht der Arbeit W , die an dem Bindungskomplex bis zu seiner Dissoziation geleistet wird. Aus dieser Arbeit wurde mit der Jarzynski-Gleichung 3.15 die freie Enthalpie ΔG_0^{JE} approximiert. Abbildung 5.19 zeigt die Entwicklung von ΔG_0^{JE} mit der Anzahl der Messwerte n bei vier verschiedenen Rückziehggeschwindigkeiten v des Cantilevers. Die freie Enthalpie ΔG_0^{JE} sollte für große Werte von n gegen einen konstanten Wert konvergieren. Dieser Endwert entspricht der Bindungsenergie ΔG_0 zwischen gebundenem und ungebundenem Bindungskomplex im thermodynamischen Gleichgewicht. Der Endwert sollte unabhängig von der Belastungsrate beziehungsweise der Geschwindigkeit v sein. Für die in Abbildung 5.19

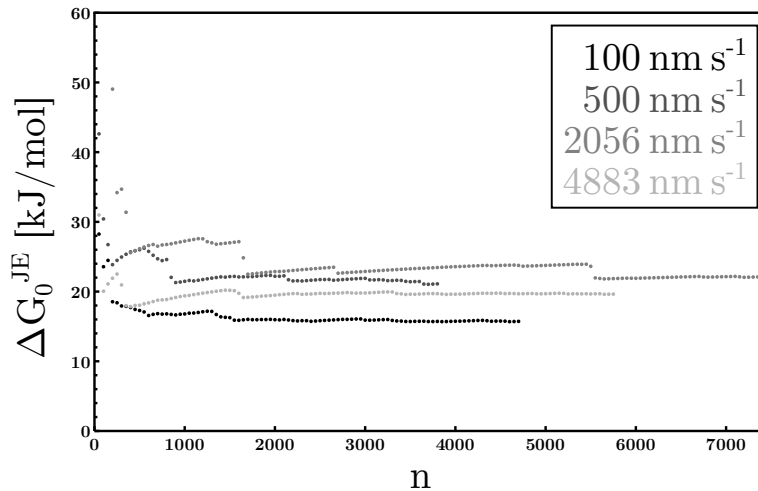


Abbildung 5.19: Entwicklung von ΔG_0^{JE} einer Messreihe von rDsg2-WT im Calcium-Puffer. Die freie Enthalpie ΔG_0^{JE} ist gegen die Anzahl der Messwerte n aufgetragen. Die vier Datensätze der Messreihe ($k = 18,1 \text{ pN nm}^{-1}$) sind mit ihrer jeweiligen Geschwindigkeit in Graustufen von der kleinsten (schwarz) bis zur größten Geschwindigkeit (hellgrau) dargestellt. Ein Punkt im Graphen entspricht einem Mittelwert aus 50 Messwerten.

gezeigten Datensätze sind die Endwerte von ΔG_0^{JE} mit aufsteigender Geschwindigkeit: $15,73 \text{ kJ mol}^{-1}$, $21,15 \text{ kJ mol}^{-1}$, $22,14 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $19,65 \text{ kJ mol}^{-1}$. Die niedrigste freie Enthalpie ΔG_0^{JE} wurde daher mit der kleinsten Geschwindigkeit ermittelt. Dies ist nicht verwunderlich, da bei kleinen Geschwindigkeiten die Dissoziation tendenziell eher eintritt. Daraus folgt erwartungsgemäß, dass die geleistete Arbeit W_n kleiner ist. In der Jarzynski-Gleichung wird die Arbeit W_n exponentiell aufsummiert und somit haben gerade kleine Werte der Arbeit W_n einen starken Einfluss auf das Ergebnis und ΔG_0^{JE} . Weiterhin ist aus dem Graphen ersichtlich, dass der Datensatz mit der kleinsten Geschwindigkeit am frühesten konvergiert (Abb. 5.19). Da kleine Belastungsraten dem thermodynamischen Gleichgewicht am nächsten kommen, ist dieses Verhalten zu erwarten.

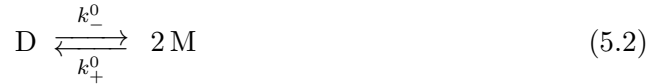
Werden alle Kurven des rDsg2-WT zusammengefasst, ist die geschätzte Bindungsenergie $\Delta G_0 = 18,99 \pm 3,53 \text{ kJ mol}^{-1}$ mit $n = 41\,648$. Der Fehler wurde mit der Standardabweichung des arithmetischen Mittels aller Endwerte bei verschiedenen Geschwindigkeiten abgeschätzt. Tabelle 5.6 fasst die berechneten Bindungsenergien von rDsg2 Wildtyp und Varianten zusammen.

Tabelle 5.6: Die freie Enthalpie ΔG_0 . Mit der Jarzynski-Gleichung 3.15 abgeschätzte freie Enthalpie ΔG_0 von rDsg2 Wildtyp und Varianten in Einheiten von kJ mol^{-1} und $k_B T$. Zusammenfassung aller Messungen im Calcium-Puffer bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten.

	rDsg2-WT	rDsg2-D154E	rDsg2-K294E	rDsg2-V392I
Messwerte n	41 648	11 125	11 225	13 959
ΔG_0 [kJ mol^{-1}]	$18,99 \pm 3,53$	$17,32 \pm 0,67$	$17,21 \pm 1,05$	$16,81 \pm 1,36$
ΔG_0 [$k_B T$]	$7,80 \pm 1,45$	$7,11 \pm 0,27$	$7,06 \pm 0,43$	$6,90 \pm 0,56$

5.2.9 Energielandschaft und Reaktionskinetik von rDsg2

Die gemessene Dissoziation der rDsg2 homophilen Wechselwirkung kann durch die Reaktionsgleichung



ausgedrückt werden. Das rDsg2-Dimer (D) dissoziiert in zwei Monomere (2M) mit der Dissoziationsgleichgewichtskonstanten $K_d = \frac{k_-^0}{k_+^0}$ und den Ratenkonstanten der Dissoziation k_-^0 und Assoziation k_+^0 . K_d kann mit

$$K_d = \exp\left(-\frac{\Delta G_0}{N_A k_B T}\right) \quad (5.3)$$

über die Bindungsenergie ΔG_0 abgeschätzt werden (Gleichung 3.10). Die Assoziationsratenkonstante im thermodynamischen Gleichgewicht k_+^0 erhält man dann über $K_d = \frac{k_-^0}{k_+^0}$ (vgl. Abschnitt 3.2.3). Mit der Arrheniusgleichung 3.9 und dem Vorfaktor $\nu = 6,11 \text{ ps}^{-1}$ bei Raumtemperatur kann zusätzlich die Höhe der Energiebarriere ΔG^\ddagger abgeschätzt werden. In Tabelle 5.7 werden die aus ΔG_0 und k_-^0 ermittelten Werte von rDsg2 Wildtyp und Varianten verglichen. Abbildung 5.20 zeigt den Zusammenhang von ΔG^\ddagger , ΔG_0 und x_β am Beispiel von rDsg2-WT im Calcium-Puffer.

Die entsprechende Reaktionsgleichung (vgl. Gleichung 5.2) ist:

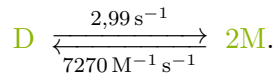


Tabelle 5.7: Abschätzung der Energielandschaft und Reaktionskinetik der rDsg2-rDsg2 Wechselwirkung im thermodynamischen Gleichgewicht. Aus der Bindungsenergie ΔG_0 und der Dissoziationsratenkonstanten k_-^0 wurde die Dissoziationsgleichgewichtskonstante K_d (Gleichung 5.3), Assoziationsratenkonstante $k_+^0 = \frac{k_-^0}{K_d}$ und die Aktivierungsenergie ΔG^\ddagger (Arrheniusgleichung 3.9, $\nu = 6,11 \text{ ps}^{-1}$) bestimmt. Die Fehler von k_+^0 und ΔG^\ddagger wurden aus dem Fehler von k_-^0 abgeleitet.

	rDsg2-WT	rDsg2-D154E	rDsg2-K294E	rDsg2-V392I
ΔG_0 [kJ mol ⁻¹]	18,99 ± 3,53	17,32 ± 0,67	17,21 ± 1,05	16,81 ± 1,36
k_-^0 [s ⁻¹]	2,99 ± 0,43	0,30 ± 0,17	0,18 ± 0,09	0,58 ± 0,20
K_d [μM]	412	817	855	1008
k_+^0 [M ⁻¹ s ⁻¹]	7270 ± 1041	361 ± 202	205 ± 103	573 ± 198
ΔG^\ddagger [kJ mol ⁻¹]	69,05 ± 0,35	74,7 ± 1,36	75,97 ± 1,23	73,06 ± 0,84

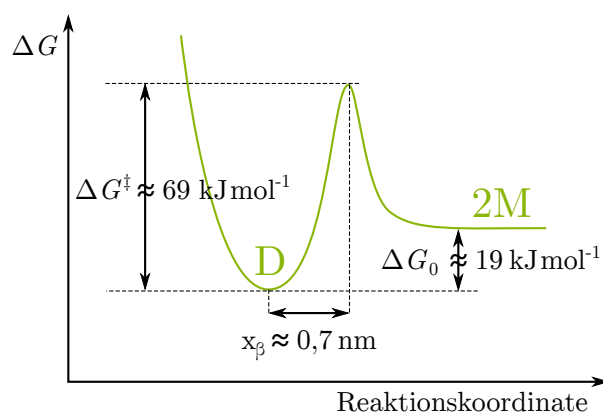


Abbildung 5.20: Abschätzung der Energielandschaft der rDsg2-WT-Dimer Dissoziation. Darstellung der freien Reaktionsenthalpie ΔG entlang der Reaktionskoordinate x von rDsg2-WT-Dimer (D) zu zwei Monomeren (2M), mit der Bindungsenergie ΔG_0 , der Aktivierungsenergie ΔG^\ddagger und der Breite der (Aktivierungs-)Barriere x_β .

6 Diskussion

6.1 Desmin

Das Assemblierungsverhalten des rekombinanten Desmin-Wildtyps wurde mit AFM in zwei Assemblierungsstadien untersucht (vgl. Abb. 5.2). Der erste Assemblierungszwischenschritt lag nach der Renaturierung des Proteins durch schrittweise Dialyse in einen salzarmen Puffer vor. Des Weiteren wurde die Assemblierung nach einer Stunde Inkubationszeit bei 37 °C im salzhaltigen Puffer betrachtet (Abschn. 4.1.2). In diesem letzten Stadium zeigten sich Filamente mit großem Durchmesser ($3,8 \pm 1,1$ nm) und variabler Länge von etwa 54 nm bis einige Mikrometer (vgl. Abb. 5.1). Ferner konnten filamentöse, flexible Strukturen in diesem und im Assemblierungszwischenschritt mit einem wesentlich geringeren Durchmesser (unter 1 nm) beobachtet werden. Die gefundenen Strukturen können mit dem Assemblierungsmodell (Abb. 2.7) in Einklang gebracht werden (vgl. Dieding 2011). Bei den kleinen Strukturen handelt es sich sehr wahrscheinlich um Untereinheiten des Filaments, also Desmin-Dimere und -Tetramere. Kirmse u. a. (2010) beobachten bei den Intermediärfilamenten Vimentin und Keratin Untereinheiten die auf dem Substrat einzeln vorzufinden sind und in derselben Weise das Filament umgeben wie bei dem hier untersuchten Desmin (Abb. 5.2b). Sie vermuten, dass die Untereinheiten erst durch die Adsorption auf der Oberfläche aus dem Filament entweichen, was für eine große Plastizität der Filamente spricht.

Die untersuchten Desmin Varianten K241E, H326R und P419S zeigten ein wildtypähnliches Assemblierungsverhalten. Daraus lässt sich schließen, dass die *in vitro* Assemblierung durch die Variation nicht gestört wird. Im Rahmen der Kooperation mit dem EHKI wurden von Dr. Andreas Brodehl Zelltransfektionsstudien mit Desmin-Expressionsvektoren durchgeführt. Hier wurden verschiedene Zellkulturen (H9c2, HeLa, C2C12, SW-13 und HL-1) transfiziert und mit Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Zellen exprimieren homozygot fluoreszenzmarkiertes Desmin. Die Fluoreszenzbilder der Zellen mit Desmin Varianten K241E, H326R und P419S zeigen - ebenso wie der Wildtyp - ein filamentöses Desminnetzwerk (Brodehl u. a. 2013a; Brodehl u. a. 2013b). Dieses Ergebnis bestärkt den Befund, dass diese Varianten fähig sind *in vitro*

Filamente zu bilden.

Die Desmin Variante P419S wurde von Olivé u. a. (2007) bei einer spanischen Familie mit Myopathie in Kombination mit RCM gefunden. Hedberg u. a. (2012) fanden dieselbe Variante in einer schwedischen Familie, deren Mitglieder an myofibrillärer Myopathie (Untergruppe der Desminopathie) und an ARVC erkrankt sind. Beide Forschergruppen untersuchten Muskelbiopsien der Betroffenen und fanden Desmineinlagerungen in cytoplasmatischen Aggregaten. Hedberg u. a. (2012) stufen die Desmin Variante P419S daher als pathogen ein. Allerdings deutet die Filamentbildung der hier und in Zellkultur gezeigten *in vitro* Assemblierung darauf hin, dass die Desmin Variante nicht allein ursächlich für die Bildung der *in vivo* Aggregation ist.

Bei der Desmin Variante H326R kommt es zu einem Austausch der basischen Aminosäure Histidin gegen die basische Aminosäure Arginin. Der Histidin-Rest H326 ist in der Desminsequenz von Wirbeltieren zwar konserviert, allerdings befindet sich an der homologen Stelle im humanen Vimentin ein Arginin-Rest, was die pathogene Interpretation erschwert (Brodehl u. a. 2013a). Der an ARVC erkrankte Indexpatient wurde auf die häufigsten ARVC-assoziierten und DCM-assoziierten Gene getestet. Dabei wurde nur diese Variation im Desmin-Gen gefunden. Die Familienanalyse zeigt eine unklare Pathogenität, da zwei erkrankte Familienmitglieder die Variation tragen, jedoch ein weiteres Familienmitglied zwar erkrankt aber kein Variationsträger ist (Brodehl u. a. 2013a). Bär u. a. (2005) untersuchten pathogene Desmin Varianten der *Rod*-Domäne, die in der *in vitro* Assemblierung normale Filamente ausbilden. Die Pathogenität und die Schwere der Erkrankung muss daher nicht direkt mit der *in vitro* Filamentbildung korrelieren. Zusammenfassend handelt es sich bei Desmin-H326R um eine seltene Variante mit bislang unbekannter pathogener Signifikanz.

Die hoch konservierte Desmin Variante K241E wurde von Lorenzon u. a. (2013) in einem Patienten mit einer schweren Form der ARVC entdeckt. Dieser Patient trägt gleichzeitig eine Variation in PKP2, welche schon früher im Zusammenhang mit ARVC gefunden wurde (Xu u. a. 2010). PKP2 kodiert für Plakophilin-2, einen Teil des kardialen Desmosoms. Mutationen in PKP2 sind häufig Ursache von ARVC-Erkrankungen (Gerull u. a. 2004). Die Familienanalyse zeigt keine Kosegregation der Desmin Variante K241E (Lorenzon u. a. 2013). Abschließend stufen Lorenzon u. a. (2013) Desmin K241E als seltene Variante mit möglichem modifizierendem Effekt ein. Die vorliegenden Ergebnisse der *in vitro* Assemblierung zeigten keinen Einfluss der Variation auf die Filamentbildung, daher konnte ein möglicher pathogener Effekt nicht bestätigt werden.

Die Desmin Variante A120D wurde am EHKI bei einer Patientin entdeckt, deren

drei Geschwister im jugendlichem Alter an plötzlichem Herztod verstorben waren. Die weitere Familienanalyse zeigt ein breites Spektrum von Kardiomyopathien und eine auffällige Anzahl von Arrhythmien und plötzlichem Herztod (Brodehl u. a. 2013a). Zelltransfektionsstudien mit der Variante A120D zeigen, dass das Protein ausschließlich cytoplasmatische Aggregate bildet. Bei Zelltransfektionsstudien mit endogenem Vimentin beeinträchtigt Desmin-A120D sogar die Filamentbildung von Vimentin (Brodehl u. a. 2013a). Der Alanin-Rest A120 ist hoch konserviert über verschiedensten humane Intermediärfilamente und unterschiedliche Gattungen. Bei der Variante A120D ist der hydrophobe Alanin-Rest gegen einen negativ geladenen Aspartat-Rest getauscht. In Zellkultur-Experimenten wurden verschiedene Modellvarianten, mit unterschiedlichen Aminosäuren an der Position A120 getestet (Brodehl u. a. 2013a). Die Experimente zeigen bei den geladenen Varianten A120R und A120E cytoplasmatische Aggregate während die hydrophoben Varianten A120L und A120V sowie die positiv geladene Variante A120K Filamente bilden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eher statische als sterische Gründe für die Aggregatbildung verantwortlich sind (Brodehl 2012). In der hier vorliegenden Assemblierungsstudie mit der Variante A120D konnten keine wildtyp-ähnlichen Filamente gefunden werden. Charakteristisch waren globuläre Strukturen (90 ± 32 nm) und vergleichbare Untereinheiten (Desmin-Tetramer, -Dimer) zum Wildtyp. Hieraus lässt sich schließen, dass die Variation entweder die laterale Polymerisation von Desmin-Tetrameren zu ULFs oder das longitudinale Filamentwachstum stört. Die Ergebnisse von AFM- und Zelltransfektions-Messungen stehen somit im Einklang und zeigen, dass die Desmin Variante A120D *in vitro* keine Filamente bildet. Abschließend wurde die Variante als pathogene Mutation mit hohem Risiko für plötzlichen Herztod eingestuft (Brodehl u. a. 2013a).

Die Desmin Variante L136P wurde in einem Herztransplantationspatienten mit DCM identifiziert (Brodehl u. a. 2016). In seiner näheren Verwandtschaft gibt es Fälle von plötzlichem Herztod. Die immunhistochemische Untersuchung des erkrankten Herzmuskels (des Indexpatienten) zeigt eine ungewöhnliche, unregelmäßige Desmin-Einfärbung an den Z-Scheiben (Brodehl u. a. 2016). Die durchgeführten Assemblierungsstudien von Desmin-L136P zeigten sowohl mit AFM als auch in Zellstransfektionsstudien, dass diese Variante nicht fähig ist Filamente auszubilden. Die AFM-Daten zeigten weiterhin, dass sie zu Strukturen in der Größenordnung eines ULFs und zu wildtypähnlichen Untereinheiten (Tetramer, Dimer) assemblieren. Dies deutet darauf hin, dass die Variation die laterale Assemblierung von ULFs zu Filamenten stört. Zusätzlich zu den Assemblierungsversuchen mit reinem Desmin-L136P wurde eine Koassemblierung von markiertem Desmin-L136P und Desmin-WT (1:10) durchgeführt

und mit aperturlosem SNOM untersucht. Die Ergebnisse zeigten einen dominanten, negativen Effekt der Variation auf die *in vitro* Assemblierung. Auch kotransfizierte Zellen mit Wildtyp und Variante, welche mit verschiedenen Farbstoffen (mRuby und eYFP) fusioniert wurden, zeigen Koaggregation bei ähnlich starkem Expressionslevel von Wildtyp und Variante (Brodehl u. a. 2016). Abschließend wurde die Variante als wahrscheinlich pathogen eingestuft (Brodehl u. a. 2016).

Die Variante Desmin-DEL wurde kürzlich bei einem Herztransplantations-Patienten am EHKI entdeckt. Die durchgeführte *in vitro* Assemblierung zeigte keine Filamente oder andere wildtypähnliche Strukturen. Im Unterschied zu der Koassemblierung von Desmin Wildtyp und L136P, zeigte die Koassemblierung von Wildtyp und A120D wildtyp-ähnliche Filamente. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Wildtyp und Variante nicht heterophil assemblieren. In Folgeexperimenten sollte dies durch Koassemblierung mit markiertem Wildtyp und Variante in Zellkultur oder mit SNOM untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das *in vitro* Assemblierungsverhalten von sechs verschiedenen Desmin Varianten untersucht. Die dabei gewonnenen Ergebnisse erweitern die klinischen und human genetischen Befunde und konnten dabei helfen einen funktionalen Einfluss der Variation zu beurteilen und die Varianten zu klassifizieren.

6.2 Desmoglein2

Die homophile Wechselwirkung der extrazellulären Domänen (EC1-4) des rekombinanten Dsg2 wurde mit dynamischer Kraftspektroskopie untersucht, um daraus die Ratenkonstante r_{-}^0 und die Barrierenbreite der Aktivierungsenergie x_{β} der rDsg2-rDsg2 Dissoziation zu bestimmen. Um die Messdaten mit der Bell-Evans Theorie beschreiben zu können, musste jeweils die wahrscheinlichste Dissoziationskraft und Belastungsrate bei verschiedenen Ziehgeschwindigkeiten bestimmt werden.

Die Auswertung der Daten erfolgte durch eine Kurvenanalyse, die Dissoziationskraft und Belastungsrate zum Zeitpunkt der Dissoziation aus mehreren tausend Kraft-Distanzkurven ermittelt. Anschließend wurden Wahrscheinlichkeitsdichten mit einer Kerndichteschätzung erstellt und die jeweiligen Maxima bestimmt. Im Vergleich zu anderen Methoden ist die Kerndichteschätzung eine präzise Methode die wahrscheinlichste Kraft zu bestimmen (Baumgartner u. a. 2000a; Williams 2008; Björnham u. a. 2009). Die Standardtheorie wurde mit anderen Modellen verglichen, die eine Veränderung der Potentialbarriere und einen biege-elastischen Linker berücksichtigen. Diese zeigten, dass das Standardmodell für den ausgewerteten Datenbereich (Geschwindig-

keit $> 200 \text{ nm s}^{-1}$) angewendet werden kann. Weiterhin zeigte eine Variation der Form des Potentials keinen wesentlichen Einfluss auf die erhaltenen Parameter. Die um eine Größenordnung abweichende Dissoziationsrate zwischen Standardmodell mit unkorrigierten Belastungsrate ($r = vk$) und den Modellen, die den Einfluss des Linkers durch das WLC-Modell berücksichtigen, zeigte die Notwendigkeit eine angepasste Belastungsrate zu benutzen. Letztendlich ist die hier durchgeführte Bestimmung aus den Daten selbst den anderen Modellen vorzuziehen, da sie den gesamten unbekanntem Molekülkomplex miteinbezieht.

Eine durchgeführte Kontrollmessung zeigte, dass nur etwa 6 % der gemessenen Ereignisse im Calcium-Puffer auf unspezifische Wechselwirkungen zurückzuführen und damit überwiegend spezifischer Natur waren. Das Ergebnis der kraftspektroskopischen Messung der rDsg2-rDsg2 Wildtyp Dissoziation ergab $x_\beta = 0,7 \pm 0,1 \text{ nm}$ und $k_-^0 = 3,0 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$.

Lowndes u. a. (2014) führten mit den extrazellulären Domänen von Dsc2 und Dsg2 sowohl homo- also auch heterophile Bindungsstudien mit Kraftspektroskopie durch. Die Dsc2-Dsc2 und Dsg2-Dsc2 Messungen zeigen im Vergleich zu Dsg2-Dsg2 eine erhöhte Bindungswahrscheinlichkeit. Ihre Schlussfolgerung, dass Dsg2 keine homophile Bindung eingeht steht im Gegensatz zu den hier gezeigten Messungen und zu anderen vorhergehenden Studien (Hartlieb u. a. 2013; Schlegel u. a. 2010). Da in diesen Studien lediglich die Bindungswahrscheinlichkeit gemessen wurde, gibt es bisher keine quantitative kraftspektroskopische Untersuchung der Dsg2-Dsg2 Bindung.

Baumgartner u. a. (2000b) ermittelten $x_\beta \approx 0,59 \text{ nm}$ und $k_-^0 \approx 1,8 \text{ s}^{-1}$ mit dynamischer Kraftspektroskopie an der extrazellulären Domäne des VE-Cadherins (klassisches Cadherin). Bei vergleichbaren Ziehgeschwindigkeiten haben sie etwas höhere Dissoziationskräfte gemessen (33 pN bis 54 pN bei 200 nm s^{-1} bis 4000 nm s^{-1}). Ein ähnliches Ergebnis erzielen Waschke u. a. (2007) bei Dsg1 Kraftspektroskopie bei denen die Kräfte zwischen 37 pN bis 68 pN bei 300 nm s^{-1} bis 6000 nm s^{-1} mit einer Dissoziationsratenkonstante von $k_-^0 = 5,88 \text{ s}^{-1}$ liegen. Die gemessene Dissoziationsratenkonstante von Dsg2 liegt zwischen der von VE-Cadherin (Baumgartner u. a. 2000b) und Dsg1 (Waschke u. a. 2007) und ist daher plausibel.

Der Vergleich zwischen der rDsg2-rDsg2 Interaktion in Calciumumgebung (2 mM Calcium) und calciumfreier Umgebung (EDTA/EGTA) zeigte eine erhebliche Reduzierung der Bindungsaktivität von 32 % auf 9 % Bindungswahrscheinlichkeit. Diese Calciumabhängigkeit wurde bereits bei den klassischen Cadherinen C-Cadherin (Shi u. a. 2010), VE-Cadherin (Baumgartner u. a. 2000b), N-Cadherin (Baumgartner u. a. 2003), E-Cadherin (Rakshit u. a. 2012) und den desmosomalen Cadherinen Dsg1 (Waschke

u. a. 2007), Dsc2 (Lowndes u. a. 2014) und ebenso Dsg2 (Schlegel u. a. 2010) festgestellt. Messungen die mit verschiedenen Calciumkonzentrationen durchgeführt wurden, zeigen eine Sättigung in der calciumabhängigen Bindungsaktivität ab etwa 1,1 mM Calcium (Waschke u. a. 2007; Baumgartner u. a. 2000b; Baumgartner u. a. 2003). Daher kann davon ausgegangen werden, dass eine maximale Bindungsaktivität der Cadherine in physiologischer Umgebung (1-2 mM Calcium) und in dem hier verwendeten Puffer (2 mM Calcium) erreicht wird.

Die kraftspektroskopischen Messungen des Wildtyps in EDTA-Puffer wurden, wie die Messungen im Calcium-Puffer, mit dem Standardgarnmodell ausgewertet. Die im calciumfreien EDTA-Puffer gemessenen Kräfte (vgl. Abb. 5.12) und die Bindungsdauer ($\tau = 3,6 \pm 2,2$ s) waren höher als im Calcium-Puffer ($\tau = 0,33 \pm 0,05$ s). Dieses Ergebnis aus der dynamischen Kraftspektroskopie sollte allerdings eher qualitativ beurteilt werden, da die Bindungswahrscheinlichkeit im EDTA-Puffer nur etwa doppelt so hoch wie die der Kontrollmessung waren. Aus diesem Grund sind die gemessenen Dissoziationen zu einem großen Teil als unspezifisch anzusehen, was auch durch die breitere Verteilung der Kräfte bestätigt wird. Die insgesamt größeren Dissoziationskräfte sprechen dafür, dass sich die Bindung (bzw. unspezifischen Bindungen) in calciumfreier Umgebung von der Bindung mit Calciumbeteiligung unterscheidet. Der Einbruch in der Bindungswahrscheinlichkeit ist ein Hinweis darauf, dass eine unter Calcium vorhandene Bindungsstelle, ohne Calcium nicht verfügbar ist. Dies könnte mit einer Konformationsänderung des Dsg2 zusammenhängen. Die Untersuchungen von Tariq u. a. (2015) zeigen, dass die Form der isolierten extrazellulären Domäne von Dsg2 calciumabhängig ist und das Calcium zu einer Streckung des Moleküls führt. Dies könnte *in vivo* wichtig sein, um den interzellulären Raum zu überbrücken und die EC1-Domänen gegenüberliegender Cadherine in nächste Nachbarschaft zu führen. Weiterhin weisen NMR-Experimente und molekulare Simulationen auf eine allosterische Funktion des Calciums hin (Vendome u. a. 2011; Sotomayor u. a. 2008; Miloushev u. a. 2008). Vendome u. a. (2011) zeigt, dass die besetzten Calcium-Bindungsstellen zwischen EC1-EC2 Domänen das Öffnen des A*/A-Strangs (N-terminales β -Faltblatt) in der EC1-Domäne und somit den Strangaustausch begünstigen, welcher das zentrale Bindungsmotiv der Zell-Zell-Adhäsion von Cadherinen ist (vgl. Abschnitt 2.2.2).

Mit der Jarzinsky-Gleichung wurde die Bindungsenergie und daraus die Dissoziationsgleichgewichtskonstante mit $\Delta G_0 = 19,0 \pm 3,5$ kJ mol⁻¹ und $K_d \approx 412$ μ M abgeschätzt. Häussinger u. a. (2004) untersuchten den Strangaustausch von E-Cadherin mit Röntgenstrukturanalyse und NMR-Spektroskopie. Sie bestimmen $K_d \approx 700$ μ M und $\Delta G_0 \approx 17$ kJ mol⁻¹ (Häussinger u. a. 2004). Die homologe Struktur zu E-Cadherin und

die übereinstimmende Bindungsenergie legen den Schluss nahe, dass die Dimerbindung von rDsg2 ebenfalls durch einen Strangaustausch charakterisiert ist.

Harrison u. a. (2016) untersuchten mit analytischer Ultrazentrifugation (AUC) und Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) die homo- und heterophile Wechselwirkung aller humanen desmosomalen Cadherine. Die Ergebnisse zeigen, dass die heterophile (Dsg-Dsc) gegenüber der homophilen (Dsg-Dsg, Dsc-Dsc) Bindung bevorzugt wird. Während das mit SPR gemessene heterophile Dissoziationsgleichgewicht zwischen $4\ \mu\text{M}$ und $44\ \mu\text{M}$ liegt, konnte die homophile Wechselwirkung nicht im SPR aufgelöst werden. Ihre Messungen mit AUC zeigen jedoch für alle homophilen desmosomalen Cadherinbindungen eine Gleichgewichtskonstante $K_d > 400\ \mu\text{M}$ und für die Dsg2-Dsg2 Interaktion $K_d = 433 \pm 102\ \mu\text{M}$ (Harrison u. a. 2016). Diese vergleichbare Gleichgewichtskonstante untermauert zusätzlich, die in dieser Arbeit über die Jarzinsky-Gleichung abgeschätzte Gleichgewichtskonstante ($K_d \approx 412\ \mu\text{M}$) der rDsg2-rDsg2 Wechselwirkung.

Diese niederaffine Bindung spielt eine zentrale Rolle in der Spezifität von Cadherin-Bindungen. Chen u. a. (2005) zeigen, dass kleine Unterschiede der Bindungsenergie nur bei niederaffinen Bindungen zu einer hohen spezifischen Wechselwirkung von Cadherinen führen. Die geringe Affinität ist charakteristisch für den Domänen austausch, da die A*-Domänen von der eigenen Bindungstasche im Monomer zur im Grunde gleichen Bindungstasche im Bindungspartner wechseln und so ein Dimer bilden. Die Monomere und das Dimer stehen daher in Konkurrenz, infolgedessen ist die Aktivierungsenergie dieses Bindungsmotivs hoch, die Energiedifferenz zwischen Monomer und Dimer jedoch klein und somit auch die Affinität der Bindung gering. Die abgeschätzte Aktivierungsenergie von $\Delta G^\ddagger \approx 69\ \text{kJ mol}^{-1}$ der Dissoziation beziehungsweise $\Delta G^\ddagger \approx 50\ \text{kJ mol}^{-1}$ der Assoziation von rDsg2-rDsg2 passt zu dieser Bindungscharakteristik.

Zusammengefasst bestätigen die Calciumabhängigkeit, die Bindungsenergie und die Gleichgewichtskonstante, dass durch die vorliegenden Messungen eine vollständige Bindungskinetik und thermodynamische Beschreibung des Strangaustausch-Motivs der homophilen Dsg2-Interaktion bestimmt wurde.

Die Messreihen von drei Dsg2 Varianten (D154E, K294E, V392I) wurden mit dem Standardmodell ausgewertet. Ein Vergleich der Parameter x_β und k_-^0 zeigte ein tendenziell höheres x_β und niedrigeres k_-^0 als beim Wildtyp (Tabelle 5.3). Da die Parameter sehr sensibel auf kleine Veränderungen reagieren und stark voneinander abhängen, wurde der Fehlerbereich der Parameter sorgfältig bestimmt. Die Fehler, die aus der Anpassung resultieren (Gleichung 4.8) spiegeln nicht die Anpassungsgüte wieder. Daher wurde zusätzlich ein χ^2 -Test durchgeführt, um die Anpassungsgüte des Modells mit

den Daten und deren Fehlereinschätzung zu beurteilen. Der Test ergab, dass die Daten der Variante K294E ungenügend durch das Modell beschrieben werden ($\alpha < 5\%$). Dies deutet auf schlechte Daten durch eine missglückte Funktionalisierung oder einen anderen unbekanntem Messfehler hin. Daher sollte dieses Experiment wiederholt werden. Weiterhin lagen nur die Parameter der Variante D154E außerhalb des abgeschätzten Unsicherheitsbereichs der Parameter von Dsg2-WT und unterscheiden sich somit signifikant zum Wildtyp.

Da die Aminosäure D154 zur Calciumbindungsstelle zwischen den EC1-EC2 Domänen gehört, könnte die Variante D154E die Bindung des Calciumions stören. Ein sichtbarer Unterschied im Bindungsverhalten hätte somit vergleichbare Gründe, wie sie bei der Betrachtung ohne Calcium ausgeführt wurden. Das fehlende Calciumion könnte die Mobilität des A*/A-Strangs herabsetzen (Vendome u. a. 2011). Da die Bindungsenergie und auch die Bindungswahrscheinlichkeit der D154E Variante aber vergleichbar zum Wildtyp war, ist vermutlich das Bindungsmotiv noch vorhanden. Die Dimerbildung ist gegenüber dem Wildtyp lediglich unwahrscheinlicher, was in der größeren Gleichgewichtskonstanten K_d (von etwa 412 auf 817 μM) und der kleineren Dissoziationsratenkonstante $k_-^0 \approx 0,3 \text{ s}^{-1}$ zum Ausdruck kommt.

Der gemessene Unterschied im Bindungsverhalten der Variante D154E zum Wildtyp bedeutet nicht zwangsläufig, dass *in vivo* ein Unterschied sichtbar werden muss. Die Untersuchungen von Harrison u. a. (2016) legen nahe, dass die Affinität der heterophilen Bindung zwischen Dsg2 und Dsc2 etwa zehnfach größer als die homophile Dsg2 und 20-fach größer als die homophile Dsc2 Wechselwirkung ist. Da das kardiale Desmosom aus Dsg2 und Dsc2 gebildet wird, würden nur etwa ein Zehntel des Zell-Zellkontakts durch die Dsg2-Dsg2 Interaktion hervorgerufen. Zukünftige Messungen sollten daher die heterophile Wechselwirkung der Dsg2 Varianten mit Dsc2 untersuchen.

Bei den in Abschnitt 2.2.3 beschriebenen Bindungs-Assays wurde kein Unterschied im Bindungsverhalten von rekombinanten Dsg2-WT und Varianten mit der Zellmembran festgestellt (Gärtner u. a. 2012). Da bei dem Bindungs-Assay untersucht wurde, ob rekombinante Proteine auf der Zellmembran haften bleiben oder nicht, stehen die Ergebnisse im Einklang mit den Bindungswahrscheinlichkeiten der hier durchgeführten Messungen, welche bei Varianten und Wildtyp vergleichbar waren.

Weiterhin weisen Untersuchungen die am EHKI von Jana Davina Debus durchgeführt wurden darauf hin, dass die drei Varianten im Vergleich zum Wildtyp unterschiedlich glykosiliert werden. Für Dsg2 sind bisher fünf N-Glykosilierungsstellen vorhergesagt (UniprotKB: Q14126, Abb. 2.4a). Eine N-Glykosilierung befindet sich in der EC1-Domäne, allerdings nicht im Bindungsmotiv des Strangaustauschs (Har-

rison u. a. 2016). Langer u. a. (2012) zeigen, dass die Glykosilierung von N-Cadherin nicht die Affinität der EC1-EC1 Domänenbindung beeinflusst, allerdings sind andere Cadherin Interaktionen, welche die dynamische interzelluläre Bindung regulieren, möglicherweise beeinträchtigt. So stellen Guo u. a. (2009) und Langer u. a. (2012) einen Zusammenhang zwischen der Zellmigration und Glykosilierung von N-Cadherin fest, die sie auf eine veränderte *cis*-Bindungsaffinität zurückführen. Obgleich die *cis*-Bindung bei desmosomalen Cadherinen nicht ausreichend belegt ist, soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass in dem vorliegenden experimentellen Aufbau die *cis*-Interaktion zwischen den rDsg2 Proteinen nicht ausgeschlossen wurde. Da die rDsg2-Funktionalisierung der Oberfläche über SAM's realisiert wurde, kann die Oberflächendichte der Proteine vergleichbar zu der Proteindichte des *in vivo* gereiften Desmosoms sein ($17\ 500\ \mu\text{m}^{-2}$, Al-Amoudi u. a. 2007). Aus diesem Grund ist es vorstellbar, dass die Proteine auf dem Substrat untereinander auch lateral interagieren und eine mögliche *cis*-Bindung die *trans*-Bindung unterstützt.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine vielseitige Methode angewendet, die es ermöglicht Abweichungen im Bindungsverhalten der Protein-Proteinwechselwirkung auf molekularer Ebene aufzuklären. Die Ergebnisse zeigen eine homophile calciumabhängige Wechselwirkung der Dsg2 extrazellulären Domäne. Sie erweitern den bisherigen Stand des Wissens bezüglich der desmosomalen Cadherine um eine umfassende Beschreibung der Bindungskinetik und Energielandschaft von Dsg2. Die gefundene thermodynamische Beschreibung der *trans*-Bindungscharakteristik lässt sich weiterhin auf homologe Cadherine übertragen. Die Ergebnisse der Kardiomyopathie assoziierten Dsg2 Varianten erlauben eine differenziertere Betrachtung der pathogenen Beurteilung der Varianten und deren Auswirkung auf den desmosomalen Zellkontakt.

7 Ausblick

Die *in vitro* Assemblierung der Variante Desmin-DEL zeigte einen schwerwiegenden Einfluss der Variation auf die Assemblierung zu Filamenten. Die Untersuchung der Koassemblierung mit Desmin-WT deutet darauf hin, dass dieser Defekt sich nicht auf die Assemblierung des Desmin Wildtyps auswirkt. Weiterführende Experimente könnten verifizieren, ob eine Koassemblierung stattfindet oder eine voneinander getrennte Assemblierung erfolgt. Dazu eignen sich zum einen die vorgestellte Methode mittels aperturlosem SNOM und zum anderen können auch Zelltransfektionsstudien mit unterschiedlich markiertem heterozygot exprimiertem Dsg2 darüber Aufschluss geben.

Die Desmin Varianten die keinen Einfluss auf die Filamentassemblierung haben, könnten weiterhin hinsichtlich ihre Interaktion mit assoziierten Proteinen untersucht werden. Dafür könnte mit dynamischer Kraftspektroskopie die Desminwechselwirkung mit Desmoplakin dem desmosomalen intrazellularen Ankerprotein zum Desmin Netzwerk oder dem Chaperon α B-Kristallin untersucht werden.

Obwohl die Assemblierungsmechanismen der Intermediärfilamente mit Elektronenmikroskopie oder AFM überwiegend nachvollzogen werden können, ist der innere Aufbau der Filamente noch ungeklärt. Daher wurden bereits erste Messungen von assembliertem Desmin mit Cryo-Elektronenmikroskopie durchgeführt (Abb. 7.1). Gegenüber herkömmlicher Elektronen- oder Rasterkraftmikroskopie hat diese Messtechnik den Vorteil, dass das Protein nicht auf einer Oberfläche immobilisiert werden muss. Die Proteinlösung wird auf einem Gitter schockgefroren, wodurch das Protein in einem weitgehend nativen Zustand in einer dünnen Schicht amorphen Eis verbleibt. Diese Proben werden dann mit einem Cryo-Elektronenmikroskop abgebildet. Anschließend kann *in silico* aus vielen Einzelbildern die dreidimensionale Struktur berechnet werden (Ecken u. a. 2016; Gatsogiannis u. a. 2016).

Des Weiteren wurde das homophile Bindungsverhalten der EC1-Domäne von Dsg2 mit dynamischer Kraftspektroskopie untersucht. Aktuelle Untersuchungen zeigen jedoch, dass die heterophile Wechselwirkung von Dsg2 mit Dsc2 der homophilen bevorzugt wird (Harrison u. a. 2016). Die kraftspektroskopischen Experimente könnten daher auf die Untersuchung dieser heterophilen Wechselwirkung erweitert werden.

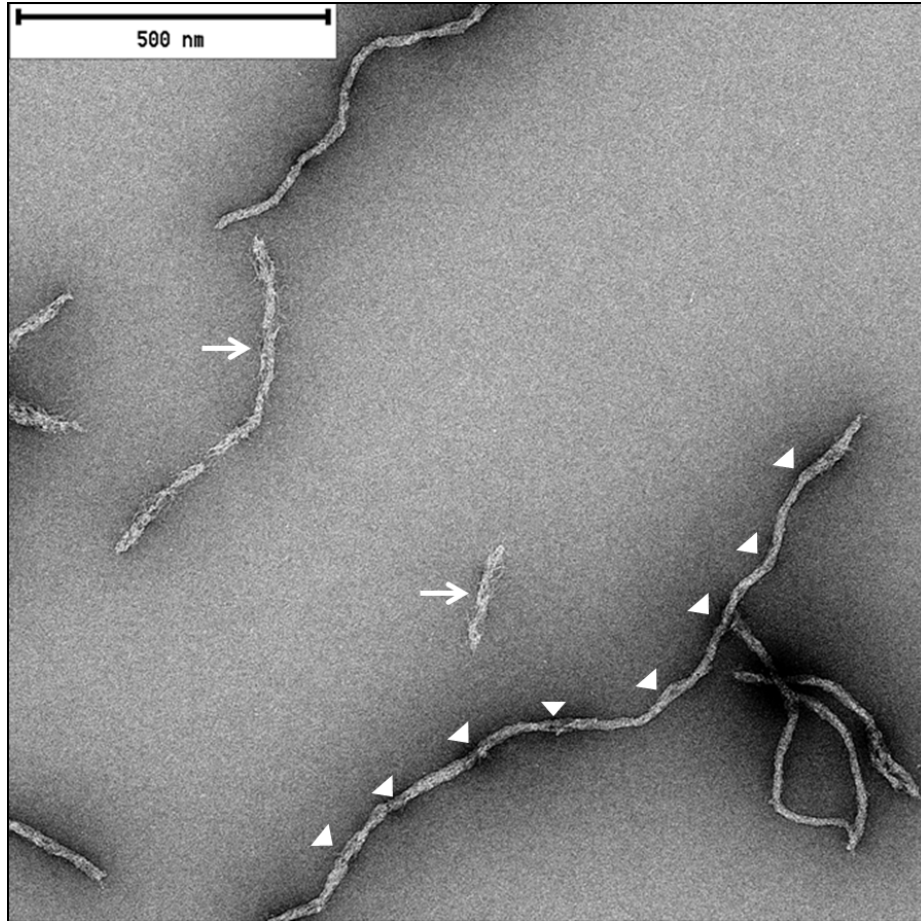


Abbildung 7.1: *Negative-stained Cryo-Eletronenmikroskopaufnahme von Desmin-Wildtypfilamenten.* Manche Filamente sind scheinbar auseinandergefallen (Pfeile), andere sind kompakter aber in sich selbst inhomogen. Die Pfeilspitzen markieren Stellen an denen das Filament loser erscheint. Dies könnte möglicherweise auf die laterale Assemblierung von ULF's zurückzuführen sein, die einen lockeren beziehungsweise unvollständig gebildeten Anknüpfungspunkt zurücklassen. Insgesamt erscheinen die Desminfilamente strukturell äußerst inhomogen, was eine weitergehende Analyse erschwert. Die Messung wurde von Dr. Felipe Merino in der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Stefan Rauser am MPI für Molekulare Physiologie in Dortmund durchgeführt.

Die Experimente, die am EHKI durchgeführt wurden, zeigen eine unterschiedliche Glykosilierung der Varianten. Dieser Teilaspekt könnte weiter verfolgt werden, indem gezielt Glykosilierungsstellen „ausgeschaltet“ werden. Anschließend könnte der jeweilige Einfluss auf das Bindungsverhalten mit dynamischer Kraftspektroskopie untersucht werden. Allerdings zeigen Untersuchungen, dass die Glykosilierung der Cadherine auch eine Rolle in zelldynamischen Prozessen spielen könnten (Langer u. a. 2012). Zelldynamische Prozesse, die zum Beispiel eine Migration der Cadherine innerhalb der Membran oder eine Interaktion mit Kofaktoren erfordern, können in dem hier gezeigten experimentellen Aufbau nur schwer nachgestellt werden. Dafür eignen sich Experimente, bei denen die vollständigen Proteine in der Zellmembran oder einem Liposom (*Biomembrane Force Probe*, Merkel u. a. 1999) eingebaut sind.

Literatur

- Abbe, E. (1873). „Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung“. In: *Archiv für Mikroskopische Anatomie* 9 (1), S. 413–418.
- Al-Amoudi, A., D. C. Díez, M. J. Betts und A. S. Frangakis (2007). „The molecular architecture of cadherins in native epidermal desmosomes“. In: *Nature* 450 (7171), S. 832–837.
- Anger, P., P. Bharadwaj und L. Novotny (2006). „Enhancement and quenching of single-molecule fluorescence“. In: *Physical Review Letters* 96 (11), S. 113002–113006.
- Arbustini, E., M. Pasotti, A. Pilotto, C. Pellegrini, M. Grasso, S. Previtalli, A. Repetto, O. Bellini, G. Azan, M. Scaffino, C. Campana, G. Piccolo, M. Viganò und L. Tavazzi (2006). „Desmin accumulation restrictive cardiomyopathy and atrioventricular block associated with desmin gene defects“. In: *European Journal of Heart Failure* 8 (5), S. 477–483.
- Arrhenius, S. (1889). „Über die Dissociationswärme und den Einfluss der Temperatur auf den Dissociationsgrad der Elektrolyte“. In: *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 4, S. 96–116.
- Aziz, A., J. F. Hess, M. S. Budamagunta, J. C. Voss und P. G. Fitzgerald (2010). „Site-directed spin labeling and electron paramagnetic resonance determination of vimentin head domain structure“. In: *The Journal of Biological Chemistry* 285 (20), S. 15278–15285.
- Bär, H., N. Mücke, A. Kostareva, G. Sjöberg, U. Aebi und H. Herrmann (2005). „Severe muscle disease-causing desmin mutations interfere with *in vitro* filament assembly at distinct stages“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (42), S. 15099–15104.
- Bauce, B., A. Nava, G. Boffagna, C. Basso, A. Lorenzon, G. Smaniotta, M. de Bortoli, I. Rigato, E. Mazzotti, A. Steriotis, M. P. Marra, J. A. Towbin, G. Thiene, G. A. Danieli und A. Rampazzo (2010). „Multiple mutations in desmosomal proteins encoding genes in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia“. In: *Heart Rhythm* 7 (1), S. 22–29.

-
- Baumgartner, W., P. Hinterdorfer, W. Ness, A. Raab, D. Vestweber, H. Schindler und D. Drenckhahn (2000a). „Cadherin interaction probed by atomic force microscopy“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (8), S. 4005–4010.
- Baumgartner, W., P. Hinterdorfer und H. Schindler (2000b). „Data analysis of interaction forces measured with the atomic force microscope“. In: *Ultramicroscopy* 82 (1-4), S. 85–95.
- Baumgartner, W., N. Golenhofen, N. Grundhöfer, J. Wiegand und D. Drenckhahn (2003). „Ca²⁺ dependency of N-adherin function probed by laser tweezer and atomic force microscopy“. In: *The Journal of Neuroscience* 23 (35), S. 11008–11014.
- Bell, G. I. (1978). „Models for the specific adhesion of cells to cells“. In: *Science* 200 (4342), S. 618–627.
- Bennett, M. J., M. P. Schlunegger und D. Eisenberg (1995). „3D domain swapping: A mechanism for oligomer assembly“. In: *Protein Science* 4 (12), S. 2455–2468.
- Betzig, E., A. Lewis, A. Harootunian, M. Isaacson und E. Kratschmer (1986). „Near Field Scanning Optical Microscopy (NSOM)“. In: *Biophysical Journal* 49 (1), S. 269–279.
- Bhuiyan, Z. A., J. D. H. Jongbloed, J. van der Smagt, P. M. Lombardi, A. C. P. Wiesfeld, M. Nelen, M. Schouten, R. Jongbloed, M. G. P. J. Cox, M. van Wolferen, L. M. Rodriguez, I. C. van Gelder, H. Bikker, A. J. H. Suurmeijer, M. P. van den Berg, M. M. A. M. Mannens, R. N. W. Hauer, A. A. M. Wilde und J. P. van Tintelen (2009). „Desmoglein-2 and desmocollin-2 mutations in dutch arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy patients: results from a multicenter study“. In: *Circulation: Cardiovascular Genetics* 2 (5), S. 418–427.
- Binnig, G., C. F. Quate und C. Gerber (1986). „Atomic Force Microscope“. In: *Physical Review Letters* 56 (9), S. 930–933.
- Björnham, O. und S. Schedin (2009). „Methods and estimations of uncertainties in single-molecule dynamic force spectroscopy“. In: *European Biophysics Journal* 38 (7), S. 911–922.
- Boggon, T. J., J. Murray, S. Chappuis-Flament, E. Wong, B. M. Gumbiner und L. Shapiro (2002). „C-Cadherin Ectodomain Structure and Implications for Cell Adhesion Mechanisms“. In: *Science* 296 (5571), S. 1308–1313.
- Borrmann, C. M., C. Grund, C. Kuhn, I. Hofmann, S. Pieperhoff und W. W. Franke (2006). „The *area composita* of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. II. Colocalizations of desmosomal and *fascia adhaerens* molecules in the intercalated disk“. In: *European Journal of Cell Biology* 85 (6), S. 469–485.

- Brodehl, A., M. Dieding, N. Biere, A. Unger, B. Klauke, V. Walhorn, J. Gummert, U. Schulz, W. A. Linke, B. Gerull, M. Vorgert, D. Anselmetti und H. Milting (2016). „Functional characterization of the novel *DES* mutation p.L136P associated with dilated cardiomyopathy reveals a dominant filament assembly defect“. In: *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 91, S. 207–214.
- Brodehl, A., M. Dieding, H. Cakar, B. Klauke, V. Walhorn, J. Gummert, D. Anselmetti und H. Milting (2013a). „Functional characterization of desmin mutant p.P419S“. In: *European Journal of Human Genetics* 21 (6), S. 589–590.
- Brodehl, A., M. Dieding, B. Klauke, E. Dec, S. Madaan, T. Huang, J. Gargus, A. Fatima, T. Saric, H. Cakar, V. Walhorn, K. Tonsing, T. Skrzypczyk, R. Cebulla, D. Gerdes, U. Schulz, J. Gummert, J. H. Svendsen, M. S. Olesen, D. Anselmetti, A. H. Christensen, V. Kimonis und H. Milting (2013b). „The novel desmin mutant p.A120D impairs filament formation, prevents intercalated disk localization, and causes sudden cardiac death“. In: *Circulation: Cardiovascular Genetics* 6 (6), S. 615–623.
- Brodehl, A. (2012). „Charakterisierung von kardiomyopathieassoziierten Desmin Mutanten“. Dissertation. Universität Bielefeld.
- Burkett, E. L. und R. E. Hershberger (2005). „Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy“. In: *Journal of the American College of Cardiology* 45 (7), S. 969–981.
- Burkhard, P., J. Stetefeld und S. V. Strelkov (2001). „Coiled coils. A highly versatile protein folding motif“. In: *Trends in Cell Biology* 11 (2), S. 82–88.
- Bustamante, C., J. Marko, E. Siggia und S. Smith (1994). „Entropic elasticity of λ -phage DNA“. In: *Science* 265 (5178), S. 1599–1600.
- Butt, H.-J. und M. Jaschke (1995). „Calculation of thermal noise in atomic force microscopy“. In: *Nanotechnology* 6 (1), S. 1–7.
- Capetanaki, Y., S. Papatheanasiou, A. Diokmetzidou, G. Vatsellas und M. Tsikitis (2015). „Desmin related disease: a matter of cell survival failure“. In: *Current Opinion in Cell Biology* 32, S. 113–120.
- Chen, C. P., S. Posy, A. Ben-Shaul, L. Shapiro und B. H. Honig (2005). „Specificity of cell-cell adhesion by classical cadherins. Critical role for low-affinity dimerization through β -strand swapping“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (24), S. 8531–8536.
- Chernyatina, A. A., S. Nicolet, U. Aebi, H. Herrmann und S. V. Strelkov (2012). „Atomic structure of the vimentin central alpha-helical domain and its implications

-
- for intermediate filament assembly“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (34), S. 13620–13625.
- den Boef, A. J. (1991). „The influence of lateral forces in scanning force microscopy“. In: *Review of Scientific Instruments* 62 (1), S. 88–92.
- Dieding, M. (2011). „Rasterkraftmikroskopische Untersuchung der *in vitro* Assemblierung und Struktur des Intermediärfilaments Desmin“. Diplomarbeit. Universität Bielefeld.
- D’Silva, A. und M. Papadakis (2015). „Sudden Cardiac Death in Athletes“. In: *European Cardiology Review* 10 (1), S. 48.
- Dudko, O., G. Hummer und A. Szabo (2006). „Intrinsic Rates and Activation Free Energies from Single-Molecule Pulling Experiments“. In: *Physical Review Letters* 96 (10), S. 108101.
- Eckel, R., V. Walhorn, C. Pelargus, J. Martini, J. Enderlein, T. Nann, D. Anselmetti und R. Ros (2007). „Fluorescence-emission control of single CdSe nanocrystals using gold-modified AFM tips“. In: *Small* 3 (1), S. 44–49.
- Ecken, J. von der, S. M. Heissler, S. Pathan-Chhatbar, D. J. Manstein und S. Raunser (2016). „Cryo-EM structure of a human cytoplasmic actomyosin complex at near-atomic resolution“. In: *Nature* 534 (7609), S. 724–728.
- Elliott, P., B. Andersson, E. Arbustini, Z. Bilinska, F. Cecchi, P. Charron, O. Dubourg, U. Kuhl, B. Maisch, W. J. McKenna, L. Monserrat, S. Pankuweit, C. Rapezzi, P. Seferovic, L. Tavazzi und A. Keren (2008). „Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases“. In: *European Heart Journal* 29 (2), S. 270–276.
- Evans, E. (2001). „Probing the Relation Between Force—Lifetime—and Chemistry in Single Molecular Bonds“. In: *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 30 (1), S. 105–128.
- Evans, E. und K. Ritchie (1997). „Dynamic strength of molecular adhesion bonds“. In: *Biophysical Journal* 72 (4), S. 1541–1555.
- (1999). „Strength of a Weak Bond Connecting Flexible Polymer Chains“. In: *Biophysical Journal* 76 (5), S. 2439–2447.
- Evans, M. G. und M. Polanyi (1935). „Some applications of the transition state method to the calculation of reaction velocities, especially in solution“. In: *Transactions of the Faraday Society* 31, S. 875–894.
- Eyring, H. (1935). „The Activated Complex in Chemical Reactions“. In: *The Journal of Chemical Physics* 3 (2), S. 107–115.

- Franke, W. W., C. M. Borrmann, C. Grund und S. Pieperhoff (2006). „The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. I. Molecular definition in intercalated disks of cardiomyocytes by immunoelectron microscopy of desmosomal proteins“. In: *European Journal of Cell Biology* 85 (2), S. 69–82.
- Frey, H. G., J. Paskarbit und D. Anselmetti (2009). „Tip-enhanced single molecule fluorescence near-field microscopy in aqueous environment“. In: *Applied Physics Letters* 94 (24), S. 241116.
- Garrod, D., M. Y. Berika, W. F. Bardsley, D. Holmes und L. Taberner (2005). „Hyper-adhesion in desmosomes: its regulation in wound healing and possible relationship to cadherin crystal structure“. In: *Journal of Cell Science* 118 (24), S. 5743–5754.
- Garrod, D. und T. E. Kimura (2008). „Hyper-adhesion. A new concept in cell–cell adhesion“. In: *Biochemical Society Transactions* 36 (2), S. 195–201.
- Garrod, D., A. J. Merritt und Z. Nie (2002). „Desmosomal cadherins“. In: *Current Opinion in Cell Biology* 14 (5), S. 537–545.
- Gärtner, A., B. Klauke, I. Stork, K. Niehaus, G. Niemann, J. Gummert, H. Milting und R. Dettman (2012). „In Vitro Functional Analyses of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy-Associated Desmoglein-2-Missense Variations“. In: *PLoS ONE* 7 (10), e47097.
- Gasteiger, E., C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel und A. Bairoch (2005). „Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server“. In: *The Proteomics Protocols Handbook*. Hrsg. von J. M. Walker. Totowa, NJ: Humana Press, S. 571–607.
- Gatsogiannis, C., F. Merino, D. Prumbaum, D. Roderer, F. Leidreiter, D. Meusch und S. Raunser (2016). „Membrane insertion of a Tc toxin in near-atomic detail“. In: *Nature Structural & Molecular Biology*.
- Geisler, N., U. Plessmann und K. Weber (1982). „Related amino acid sequences in neurofilaments and non-neuronal intermediate filaments“. In: *Nature* 296 (5856), S. 448–450.
- Gerton, J. M., L. A. Wade, G. A. Lessard, Z. Ma und S. R. Quake (2004). „Tip-enhanced fluorescence microscopy at 10 nanometer resolution“. In: *Physical Review Letters* 93 (18), S. 180801.
- Gerull, B., A. Heuser, T. Wichter, M. Paul, C. T. Basson, D. A. McDermott, B. B. Lerman, S. M. Markowitz, P. T. Ellinor, C. A. MacRae, S. Peters, K. S. Grossmann, J. Drenckhahn, B. Michely, S. Sasse-Klaassen, W. Birchmeier, R. Dietz, G. Breithardt, E. Schulze-Bahr und L. Thierfelder (2004). „Mutations in the desmosomal protein

-
- plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy“. In: *Nature Genetics* 36 (11), S. 1162–1164.
- Getfert, S. und P. Reimann (2012). „Hidden Multiple Bond Effects in Dynamic Force Spectroscopy“. In: *Biophysical Journal* 102 (5), S. 1184–1193.
- Guo, H.-B., H. Johnson, M. Randolph und M. Pierce (2009). „Regulation of homotypic cell-cell adhesion by branched N-glycosylation of N-cadherin extracellular EC2 and EC3 domains“. In: *The Journal of Biological Chemistry* 284 (50), S. 34986–34997.
- Guo, S., C. Ray, A. Kirkpatrick, N. Lad und B. B. Akhremitchev (2008). „Effects of multiple-bond ruptures on kinetic parameters extracted from force spectroscopy measurements: revisiting biotin-streptavidin interactions“. In: *Biophysical Journal* 95 (8), S. 3964–3976.
- Gupta, A. N., A. Vincent, K. Neupane, H. Yu, F. Wang und M. T. Woodside (2011). „Experimental validation of free-energy-landscape reconstruction from non-equilibrium single-molecule force spectroscopy measurements“. In: *Nature Physics* 7 (8), S. 631–634.
- Haefliger, D., J. M. Pitzko und R. Hillenbrand (2004). „Contrast and scattering efficiency of scattering-type near-field optical probes“. In: *Applied Physics Letters* 85 (19), S. 4466–4468.
- Hänggi, P., P. Talkner und M. Borkovec (1990). „Reaction-rate theory. fifty years after Kramers“. In: *Reviews of Modern Physics* 62 (2), S. 251–341.
- Harder, A., M. Dieding, V. Walhorn, S. Degenhard, A. Brodehl, C. Wege, H. Milting und D. Anselmetti (2013). „Apertureless scanning near-field optical microscopy of sparsely labeled tobacco mosaic viruses and the intermediate filament desmin“. In: *Beilstein Journal of Nanotechnology* 4, S. 510–516.
- Harootunian, A., E. Betzig, M. Isaacson und A. Lewis (1986). „Super-resolution fluorescence near-field scanning optical microscopy“. In: *Applied Physics Letters* 49 (11), S. 674.
- Harris, N. C., Y. Song und C.-H. Kiang (2007). „Experimental Free Energy Surface Reconstruction from Single-Molecule Force Spectroscopy using Jarzynski’s Equality“. In: *Physical Review Letters* 99 (6), S. 068101.
- Harrison, O. J., J. Brasch, G. Lasso, P. S. Katsamba, G. Ahlsen, B. Honig und L. Shapiro (2016). „Structural basis of adhesive binding by desmocollins and desmogleins“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (26), S. 7160–7165.
- Harrison, O. J., X. Jin, S. Hong, F. Bahna, G. Ahlsen, J. Brasch, Y. Wu, J. Vendome, K. Felsovalyi, C. M. Hampton, R. B. Troyanovsky, A. Ben-Shaul, J. Frank,

- S. M. Troyanovsky, L. Shapiro und B. Honig (2011). „The Extracellular Architecture of Adherens Junctions Revealed by Crystal Structures of Type I Cadherins“. In: *Structure* 19 (2), S. 244–256.
- Hartlieb, E., B. Kempf, M. Partilla, B. Vigh, V. Spindler und J. Waschke (2013). „Desmoglein 2 Is Less Important than Desmoglein 3 for Keratinocyte Cohesion“. In: *PLoS ONE* 8 (1), e53739.
- Häussinger, D., T. Ahrens, T. Aberle, J. Engel, J. Stetefeld und S. Grzesiek (2004). „Proteolytic E-cadherin activation followed by solution NMR and X-ray crystallography“. In: *The EMBO Journal* 23 (8), S. 1699–1708.
- Häussinger, D., T. Ahrens, H.-J. Sass, O. Pertz, J. Engel und S. Grzesiek (2002). „Calcium-dependent Homoassociation of E-cadherin by NMR Spectroscopy. Changes in Mobility, Conformation and Mapping of Contact Regions“. In: *Journal of Molecular Biology* 324 (4), S. 823–839.
- He, W., P. Cowin und D. L. Stokes (2003). „Untangling Desmosomal Knots with Electron Tomography“. In: *Science* 302 (5642), S. 109–113.
- Hedberg, C., A. Melberg, A. Kuhl, D. Jenne und A. Oldfors (2012). „Autosomal dominant myofibrillar myopathy with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy 7 is caused by a *DES* mutation“. In: *European Journal of Human Genetics* 20 (9), S. 984–985.
- Herrmann, H., M. Häner, M. Brettel, N. O. Ku und U. Aebi (1999). „Characterization of distinct early assembly units of different intermediate filament proteins“. In: *Journal of Molecular Biology* 286 (5), S. 1403–1420.
- Herrmann, H., M. Häner, M. Brettel, S. A. Müller, K. N. Goldie, B. Fedtke, A. Lustig, W. W. Franke und U. Aebi (1996). „Structure and assembly properties of the intermediate filament protein vimentin. the role of its head, rod and tail domains“. In: *Journal of Molecular Biology* 264 (5), S. 933–953.
- Herrmann, H. und U. Aebi (2004). „Intermediate Filaments. Molecular Structure, Assembly Mechanism, and Integration Into Functionally Distinct Intracellular Scaffolds“. In: *Annual Review of Biochemistry* 73 (1), S. 749–789.
- Hnia, K., C. Ramsbacher, J. Vermot und J. Laporte (2015). „Desmin in muscle and associated diseases: beyond the structural function“. In: *Cell and Tissue Research* 360 (3), S. 591–608.
- Hummer, G. und A. Szabo (2001). „Free energy reconstruction from nonequilibrium single-molecule pulling experiments“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (7), S. 3658–3661.

-
- Hutter, J. L. und J. Bechhoefer (1993). „Calibration of atomic-force microscope tips“. In: *Review of Scientific Instruments* 64 (7), S. 1868–1873.
- Jarzynski, C. (1997a). „Equilibrium free-energy differences from nonequilibrium measurements: A master-equation approach“. In: *Physical Review E* 56 (5), S. 5018–5035.
- (1997b). „Nonequilibrium Equality for Free Energy Differences“. In: *Physical Review Letters* 78 (14), S. 2690–2693.
- Kartenbeck, J., W. W. Franke, J. G. Moser und U. Stoffels (1983). „Specific attachment of desmin filaments to desmosomal plaques in cardiac myocytes“. In: *The EMBO Journal* 2 (5), S. 735–742.
- Kellermayer, M. S. Z., S. B. Smith, H. L. Granzier und C. Bustamante (1997). „Folding-Unfolding Transitions in Single Titin Molecules Characterized with Laser Tweezers“. In: *Science* 276 (5315), S. 1112–1116.
- Kienberger, F., V. P. Pastushenko, G. Kada, H. J. Gruber, C. Riener, H. Schindler und P. Hinterdorfer (2000). „Static and Dynamical Properties of Single Poly(Ethylene Glycol) Molecules Investigated by Force Spectroscopy“. In: *Single Molecules* 1 (2), S. 123–128.
- Kimura, T. E., A. J. Merritt und D. Garrod (2007). „Calcium-independent desmosomes of keratinocytes are hyper-adhesive“. In: *The Journal of Investigative Dermatology* 127 (4), S. 775–781.
- Kimura, T. E., A. J. Merritt, F. R. Lock, J. J. Eckert, T. P. Fleming und D. Garrod (2012). „Desmosomal adhesiveness is developmentally regulated in the mouse embryo and modulated during trophectoderm migration“. In: *Developmental Biology* 369 (2), S. 286–297.
- Kirmse, R. (2007). „Studium der Wachstumskinetik von Intermediärfilamenten mit Hilfe von Vimentin“. Dissertation. Heidelberg: Ruprecht-Karls-Universität.
- Kirmse, R., Z. Qin, C. M. Weinert, A. Hoenger, M. J. Buehler und L. Kreplak (2010). „Plasticity of Intermediate Filament Subunits“. In: *PLoS ONE* 5 (8), e12115.
- Kitagawa, M., M. Natori, S. Murase, S. Hirano, S. Taketani und S. T. Suzuki (2000). „Mutation analysis of cadherin-4 reveals amino acid residues of EC1 important for the structure and function“. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 271 (2), S. 358–363.
- Kramers, H. A. (1940). „Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions“. In: *Physica* 7 (4), S. 284–304.
- Kratky, O. und G. Porod (1949). „Röntgenuntersuchung gelöster Fadenmoleküle“. In: *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* 68 (12), S. 1106–1122.

- Kumar, P., S. Henikoff und P. C. Ng (2009). „Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm“. In: *Nature Protocols* 4 (7), S. 1073–1081.
- Kushwaha, S. S., J. T. Fallon und V. Fuster (1997). „Restrictive cardiomyopathy“. In: *The New England Journal of Medicine* 336 (4), S. 267–276.
- Langer, M. D., H. Guo, N. Shashikanth, J. M. Pierce und D. E. Leckband (2012). „N-glycosylation alters cadherin-mediated intercellular binding kinetics“. In: *Journal of Cell Science* 125 (Pt 10), S. 2478–2485.
- Lazarides, E. (1980). „Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space“. In: *Nature* 283 (5744), S. 249–255.
- Lazzarini, E., J. D. H. Jongbloed, K. Pilichou, G. Thiene, C. Basso, H. Bikker, B. Charbon, M. Swertz, J. P. van Tintelen und van der Zwaag, Paul A (2015). „The ARVD/C genetic variants database: 2014 update“. In: *Human Mutation* 36 (4), S. 403–410.
- Lewis, A., M. Isaacson, A. Harootunian und A. Muray (1984). „Development of a 500 Å spatial resolution light microscope“. In: *Ultramicroscopy* 13 (3), S. 227–231.
- Li, J. und G. L. Radice (2010). „A New Perspective on Intercalated Disc Organization. Implications for Heart Disease“. In: *Dermatology Research and Practice* 2010 (5), S. 1–5.
- Li, Z., E. Colucci-Guyon, M. Pinçon-Raymond, M. Mericskay, S. Pournin, D. Paulin und C. Babinet (1996). „Cardiovascular lesions and skeletal myopathy in mice lacking desmin“. In: *Developmental Biology* 175 (2), S. 362–366.
- Liphardt, J., S. Dumont, S. B. Smith, I. Tinoco und C. Bustamante (2002). „Equilibrium Information from Nonequilibrium Measurements in an Experimental Test of Jarzynski’s Equality“. In: *Science* 296 (5574), S. 1832–1835.
- Liu, Y. und D. Eisenberg (2002). „3D domain swapping. As domains continue to swap“. In: *Protein Science* 11 (6), S. 1285–1299.
- Lorenzon, A., G. Beffagna, B. Bauce, M. de Bortoli, I. E. Li Mura, M. Calore, E. Dazzo, C. Basso, A. Nava, G. Thiene und A. Rampazzo (2013). „Desmin mutations and arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy“. In: *The American Journal of Cardiology* 111 (3), S. 400–405.
- Lowndes, M., S. Rakshit, O. Shafraz, N. Borghi, R. M. Harmon, K. J. Green, S. Sivasankar und W. J. Nelson (2014). „Different roles of cadherins in the assembly and structural integrity of the desmosome complex“. In: *Journal of Cell Science* 127 (10), S. 2339–2350.

-
- Maron, B. J., J. M. Gardin, J. M. Flack, S. S. Gidding, T. T. Kurosaki und D. E. Bild (1995). „Prevalence of Hypertrophic Cardiomyopathy in a General Population of Young Adults. Echocardiographic Analysis of 4111 Subjects in the CARDIA Study“. In: *Circulation* 92 (4), S. 785–789.
- Maron, B. J., J. A. Towbin, G. Thiene, C. Antzelevitch, D. Corrado, D. Arnett, A. J. Moss, C. E. Seidman und J. B. Young (2006). „Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies. an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention“. In: *Circulation* 113 (14), S. 1807–1816.
- Maron, B. J. u. a. (2003). „American College of Cardiology/European Society of Cardiology Clinical Expert Consensus Document on Hypertrophic Cardiomyopathy“. In: *Journal of the American College of Cardiology* 42 (9), S. 1687–1713.
- Mattey, D. L. und D. Garrod (1986). „Splitting and internalization of the desmosomes of cultured kidney epithelial cells by reduction in calcium concentration“. In: *Journal of Cell Science* 85, S. 113–124.
- Merkel, R., P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie und E. Evans (1999). „Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy“. In: *Nature* 397 (6714), S. 50–53.
- Meyer, G. und N. M. Amer (1990). „Optical-beam-deflection atomic force microscopy: The NaCl (001) surface“. In: *Applied Physics Letters* 56 (21), S. 2100–2101.
- Milner, D. J., G. Weitzer, D. Tran, A. Bradley und Y. Capetanaki (1996). „Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin“. In: *The Journal of Cell Biology* 134 (5), S. 1255–1270.
- Milner, D. J., G. E. Taffet, X. Wang, T. Pham, T. Tamura, C. Hartley, M. A. Gerdes und Y. Capetanaki (1999). „The Absence of Desmin Leads to Cardiomyocyte Hypertrophy and Cardiac Dilation with Compromised Systolic Function“. In: *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 31 (11), S. 2063–2076.
- Miloushev, V. Z., F. Bahna, C. Ciatto, G. Ahlsen, B. Honig, L. Shapiro und A. G. 3. Palmer (2008). „Dynamic properties of a type II cadherin adhesive domain: implications for the mechanism of strand-swapping of classical cadherins“. In: *Structure* 16 (8), S. 1195–1205.
- Mücke, N., L. Kreplak, R. Kirmse, T. Wedig, H. Herrmann, U. Aebi und J. Langowski (2004). „Assessing the Flexibility of Intermediate Filaments by Atomic Force Microscopy“. In: *Journal of Molecular Biology* 335 (5), S. 1241–1250.

- Nagar, B., M. Overduin, M. Ikura und J. M. Rini (1996). „Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization“. In: *Nature* 380 (6572), S. 360–364.
- Nie, Z., A. Merritt, M. Rouhi-Parkouhi, L. Taberner und D. Garrod (2011). „Membrane-impermeable Cross-linking Provides Evidence for Homophilic, Isoform-specific Binding of Desmosomal Cadherins in Epithelial Cells“. In: *Journal of Biological Chemistry* 286 (3), S. 2143–2154.
- Norman, M. W. und W. J. McKenna (1999). „Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: Perspectives on disease“. In: *Zeitschrift für Kardiologie* 88 (8), S. 550–554.
- Noy, A. (2004). „Direct determination of the equilibrium unbinding potential profile for a short DNA duplex from force spectroscopy data“. In: *Applied Physics Letters* 85 (20), S. 4792–4794.
- Olivé, M., J. Armstrong, F. Miralles, A. Pou, M. Fardeau, L. Gonzalez, F. Martinez, D. Fischer, J. A. Martinez Matos, A. Shatunov, L. Goldfarb und I. Ferrer (2007). „Phenotypic patterns of desminopathy associated with three novel mutations in the desmin gene“. In: *Neuromuscular Disorders* 17 (6), S. 443–450.
- O’Shea, J. M., R. M. Robson, M. K. Hartzler, T. W. Huiatt, W. E. Rathbun und M. H. Stromer (1981). „Purification of desmin from adult mammalian skeletal muscle“. In: *Biochemical Journal* 195 (2), S. 345–356.
- Parvatiyar, M. S., J. R. Pinto, D. Dweck und J. D. Potter (2010). „Cardiac troponin mutations and restrictive cardiomyopathy“. In: *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010, S. 350706–350715.
- Parzen, E. (1962). „On Estimation of a Probability Density Function and Mode“. In: *The Annals of Mathematical Statistics* 33 (3), S. 1065–1076.
- Patel, S. D., C. Ciatto, C. P. Chen, F. Bahna, M. Rajebhosale, N. Arkus, I. Schieren, T. M. Jessell, B. Honig, Price und L. Shapiro (2006). „Type II cadherin ectodomain structures: implications for classical cadherin specificity“. In: *Cell* 124 (6), S. 1255–1268.
- Pertz, O., D. Bozic, A. W. Koch, C. Fauser, A. Brancaccio und J. Engel (1999). „A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation“. In: *The EMBO Journal* 18 (7), S. 1738–1747.
- Pilichou, K., A. Nava, C. Basso, G. Beffagna, B. Bauce, A. Lorenzon, G. Frigo, A. Vettori, M. Valente, J. Towbin, G. Thiene, G. A. Danieli und A. Rampazzo (2006).

-
- „Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy“. In: *Circulation* 113 (9), S. 1171–1179.
- Pilichou, K., G. Thiene, B. Bauce, I. Rigato, E. Lazzarini, F. Migliore, M. Perazzolo Marra, S. Rizzo, A. Zorzi, L. Daliento, D. Corrado und C. Basso (2016). „Arrhythmogenic cardiomyopathy“. In: *Orphanet Journal of Rare Diseases* 11 (1), S. 129.
- Pohl, D. W., W. Denk und M. Lanz (1984). „Optical stethoscopy. Image recording with resolution $\lambda/20$ “. In: *Applied Physics Letters* 44 (7), S. 651–653.
- Popa, I., J. M. Fernández und S. Garcia-Manyes (2011). „Direct Quantification of the Attempt Frequency Determining the Mechanical Unfolding of Ubiquitin Protein“. In: *The Journal of Biological Chemistry* 286 (36), S. 31072–31079.
- Porod, G. (1949). „Zusammenhang zwischen mittlerem Endpunktsabstand und Kettenlänge bei Fadenmolekülen“. In: *Monatshefte für Chemie und verwandte Teile anderer Wissenschaften* 80 (2), S. 251–255.
- Posy, S., L. Shapiro und B. Honig (2008). „Sequence and structural determinants of strand swapping in cadherin domains: do all cadherins bind through the same adhesive interface?“ In: *Journal of Molecular Biology* 378 (4), S. 954–968.
- Price, M. G. (1984). „Molecular analysis of intermediate filament cytoskeleton—a putative load-bearing structure“. In: *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 246 (4), H566–H572.
- Psarras, S., M. Mavroidis, D. Sanoudou, C. H. Davos, G. Xanthou, A. E. Varela, V. Panoutsakopoulou und Y. Capetanaki (2012). „Regulation of adverse remodelling by osteopontin in a genetic heart failure model“. In: *European Heart Journal* 33 (15), S. 1954–1963.
- Radmacher, M., R. Tillmann, M. Fritz und H. Gaub (1992). „From molecules to cells: imaging soft samples with the atomic force microscope“. In: *Science* 257 (5078), S. 1900–1905.
- Raible, M., M. Evstigneev, F. W. Bartels, R. Eckel, M. Nguyen-Duong, R. Merkel, R. Ros, D. Anselmetti und P. Reimann (2006). „Theoretical Analysis of Single-Molecule Force Spectroscopy Experiments. Heterogeneity of Chemical Bonds“. In: *Biophysical Journal* 90 (11), S. 3851–3864.
- Rakshit, S., Y. Zhang, K. Manibog, O. Shafraz und S. Sivasankar (2012). „Ideal, catch, and slip bonds in cadherin adhesion“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (46), S. 18815–18820.
- Raman, S., T. Utzig, T. Baimpos, B. Ratna Shrestha und M. Valtiner (2014). „Deciphering the scaling of single-molecule interactions using Jarzynski’s equality“. In: *Nature Communications* 5 (5539), S. 1–7.

- Ramensky, V., P. Bork und S. Sunyaev (2002). „Human non-synonymous SNPs: server and survey“. In: *Nucleic Acids Research* 30 (17), S. 3894–3900.
- Rampazzo, A., A. Nava, S. Malacrida, G. Beffagna, B. Bauce, V. Rossi, R. Zimbello, B. Simionati, C. Basso, G. Thiene, J. A. Towbin und G. A. Danieli (2002). „Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy“. In: *American Journal of Human Genetics* 71 (5), S. 1200–1206.
- Richards, S., N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das, J. Gastier-Foster, W. W. Grody, M. Hegde, E. Lyon, E. Spector, K. Voelkerding und H. L. Rehm (2015). „Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology“. In: *Genetics in Medicine* 17 (5), S. 405–424.
- Rief, M., M. Gautel, F. Oesterhelt, J. M. Fernandez und H. E. Gaub (1997). „Reversible Unfolding of Individual Titin Immunoglobulin Domains by AFM“. In: *Science* 276 (5315), S. 1109–1112.
- Rosenblatt, M. (1956). „Remarks on Some Nonparametric Estimates of a Density Function“. In: *The Annals of Mathematical Statistics* 27 (3), S. 832–837.
- Schäfer, S., P. J. Koch und W. W. Franke (1994). „Identification of the ubiquitous human desmoglein, Dsg2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins“. In: *Experimental Cell Research* 211 (2), S. 391–399.
- Schlegel, N., M. Meir, W. M. Heupel, B. Holthöfer, R. E. Leube und J. Waschke (2010). „Desmoglein 2-mediated adhesion is required for intestinal epithelial barrier integrity“. In: *AJP- Gastrointestinal and Liver Physiology* 298 (5), G774–G783.
- Severs, N. J. (2000). „The cardiac muscle cell“. In: *BioEssays* 22 (2), S. 188–199.
- Severs, N. J., A. F. Bruce, E. Dupont und S. Rothery (2008). „Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium“. In: *Cardiovascular Research* 80 (1), S. 9–19.
- Severs, N. J., A. M. Slade, T. Powell, V. W. Twist und R. L. Warren (1982). „Correlation of ultrastructure and function in calcium-tolerant myocytes isolated from the adult rat heart“. In: *Journal of Ultrastructure Research* 81 (2), S. 222–239.
- Shan, W.-S., H. Tanaka, G. R. Phillips, K. Arndt, M. Yoshida, D. R. Colman und L. Shapiro (2000). „Functional Cis-Heterodimers of N- and R-Cadherins“. In: *The Journal of Cell Biology* 148 (3), S. 579–590.
- Shapiro, L., A. M. Fannon, P. D. Kwong, A. Thompson, M. S. Lehmann, G. Gröbel, J.-F. Legrand, J. Als-Nielsen, D. R. Colman und W. A. Hendrickson (1995).

-
- „Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins“. In: *Nature* 374 (6520), S. 327–337.
- Shi, Q., V. Maruthamuthu, F. Li und D. Leckband (2010). „Allosteric Cross Talk between Cadherin Extracellular Domains“. In: *Biophysical Journal* 99 (1), S. 95–104.
- Snider, N. T. und M. B. Omary (2014). „Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions“. In: *Nature Reviews: Molecular Cell Biology* 15 (3), S. 163–177.
- Sotomayor, M. und K. Schulten (2008). „The allosteric role of the Ca²⁺ switch in adhesion and elasticity of C-cadherin“. In: *Biophysical Journal* 94 (12), S. 4621–4633.
- Stromer, M. H., M. A. Ritter, Y. Y. Pang und R. M. Robson (1987). „Effect of cations and temperature on kinetics of desmin assembly“. In: *Biochemical Journal* 246 (1), S. 75–81.
- Strunz, T., K. Oroszlan, I. Schumakovitch, H. Güntherodt und M. Hegner (2000). „Model energy landscapes and the force-induced dissociation of ligand-receptor bonds“. In: *Biophysical Journal* 79 (3), S. 1206–1212.
- Synge, E. H. (1928). „A suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region“. In: *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* 6 (35), S. 356–362.
- Syrris, P., D. Ward, A. Asimaki, A. Evans, S. Sen-Chowdhry, S. E. Hughes und W. J. McKenna (2007). „Desmoglein-2 mutations in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a genotype-phenotype characterization of familial disease“. In: *European Heart Journal* 28 (5), S. 581–588.
- Szeverenyi, I., A. J. Cassidy, C. W. Chung, B. T. Lee, J. E. Common, S. C. Ogg, H. Chen, S. Y. Sim, W. L. Goh, K. W. Ng, J. A. Simpson, L. L. Chee, G. H. Eng, B. Li, D. P. Lunny, D. Chuon, A. Venkatesh, K. H. Khoo, W. I. McLean, Y. P. Lim und E. B. Lane (2008). „The Human Intermediate Filament Database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases“. In: *Human Mutation* 29 (3), S. 351–360.
- Tamura, K., W.-S. Shan, W. A. Hendrickson, D. R. Colman und L. Shapiro (1998). „Structure-Function Analysis of Cell Adhesion by Neural (N-) Cadherin“. In: *Neuron* 20 (6), S. 1153–1163.
- Tariq, H., J. Bella, T. A. Jowitt, D. F. Holmes, M. Rouhi, Z. Nie, C. Baldock, D. Garrod und L. Taberner (2015). „Cadherin flexibility provides a key difference between

- desmosomes and adherens junctions“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (17), S. 5395–5400.
- Thomason, H. A., A. Scothern, S. McHarg und D. Garrod (2010). „Desmosomes. Adhesive strength and signalling in health and disease“. In: *Biochemical Journal* 429 (3), S. 419–433.
- Thornell, L. E. und A. Eriksson (1981). „Filament systems in the Purkinje fibers of the heart“. In: *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 241 (3), H291–H305.
- Thornell, L., L. Carlsson, Z. Li, M. Mericskay und D. Paulin (1997). „Null mutation in the desmin gene gives rise to a cardiomyopathy“. In: *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 29 (8), S. 2107–2124.
- Tong, Z., A. Mikheikin, A. Krasnoslobodtsev, Z. Lv und Y. L. Lyubchenko (2013). „Novel polymer linkers for single molecule AFM force spectroscopy“. In: *Methods: Nanoimaging Methods for Biomedicine* 60 (2), S. 161–168.
- Troyanovsky, R. B., J. Klingelhofer und S. Troyanovsky (1999). „Removal of calcium ions triggers a novel type of intercadherin interaction“. In: *Journal of Cell Science* 112 (23), S. 4379–4387.
- UniProtKB (2016). *Protein Knowledgebase: human Desmoglein2 (Q14126), human Desmin (P17661)*. URL: <http://www.uniprot.org/> (besucht am 06.09.2016).
- van der Zwaag, Paul A, J. D. H. Jongbloed, M. P. van den Berg, van der Smagt, Jasper J, R. Jongbloed, H. Bikker, R. M. W. Hofstra und J. P. van Tintelen (2009). „A genetic variants database for arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy“. In: *Human Mutation* 30 (9), S. 1278–1283.
- van't Hoff, M. J. H. (1884). „Études de dynamique chimique“. In: *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* 3 (10), S. 333–336.
- Vendome, J., S. Posy, X. Jin, F. Bahna, G. Ahlsen, L. Shapiro und B. Honig (2011). „Molecular design principles underlying beta-strand swapping in the adhesive dimerization of cadherins“. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 18 (6), S. 693–700.
- Vijayendran, R. A. und D. E. Leckband (2001). „A Quantitative Assessment of Heterogeneity for Surface-Immobilized Proteins“. In: *Analytical Chemistry* 73 (3), S. 471–480.
- Walhorn, V., J. Paskarbit, H. G. Frey, A. Harder und D. Anselmetti (2011). „Distance dependence of near-field fluorescence enhancement and quenching of single quantum dots“. In: *Beilstein Journal of Nanotechnology* 2, S. 645–652.

- Wallis, S., S. Lloyd, I. Wise, G. Ireland, T. P. Fleming und D. Garrod (2000). „The alpha Isoform of Protein Kinase C Is Involved in Signaling the Response of Desmosomes to Wounding in Cultured Epithelial Cells“. In: *Molecular Biology of the Cell* 11 (3), S. 1077–1092.
- Walters, D. A., J. P. Cleveland, N. H. Thomson, P. K. Hansma, M. A. Wendman, G. Gurley und V. Elings (1996). „Short cantilevers for atomic force microscopy“. In: *Review of Scientific Instruments* 67 (10), S. 3583.
- Waschke, J., C. Menendez-Castro, P. Bruggeman, R. Koob, M. Amagai, H. J. Gruber, D. Drenckhahn und W. Baumgartner (2007). „Imaging and Force Spectroscopy on Desmoglein 1 Using Atomic Force Microscopy Reveal Multivalent Ca^{2+} -Dependent, Low-Affinity Trans-Interaction“. In: *Journal of Membrane Biology* 216 (2-3), S. 83–92.
- Watt, F. M., D. L. Matthey und D. Garrod (1984). „Calcium-induced reorganization of desmosomal components in cultured human keratinocytes“. In: *The Journal of Cell Biology* 99 (6), S. 2211–2215.
- Williams, P. (2008). „Dynamic force spectroscopy with the atomic force microscope“. In: *Handbook of molecular force spectroscopy*. Hrsg. von A. Noy. New York: Springer.
- Xu, T., Z. Yang, M. Vatta, A. Rampazzo, G. Beffagna, K. Pilichou, S. E. Scherer, J. Saffitz, J. Kravitz, W. Zareba, G. A. Danieli, A. Lorenzon, A. Nava, B. Bauce, G. Thiene, C. Basso, H. Calkins, K. Gear, F. Marcus und J. A. Towbin (2010). „Compound and digenic heterozygosity contributes to arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy“. In: *Journal of the American College of Cardiology* 55 (6), S. 587–597.
- Yoskovitz, E., I. Hadar, A. Sitt, I. Lieberman und U. Banin (2011). „Interplay of Quenching and Enhancement Effects in Apertureless Near-Field Fluorescence Imaging of Single Nanoparticles“. In: *The Journal of Physical Chemistry C* 115 (32), S. 15834–15844.
- Zhang, D., U. Heinemeyer, C. Stanciu, M. Sackrow, K. Braun, L. E. Hennemann, X. Wang, R. Scholz, F. Schreiber und A. J. Meixner (2010). „Nanoscale spectroscopic imaging of organic semiconductor films by plasmon-polariton coupling“. In: *Physical Review Letters* 104 (5), S. 056601.
- Zhong, Q., D. Inniss, K. Kjoller und V. B. Elings (1993). „Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy“. In: *Surface Science Letters* 290 (1-2), S. L688–L692.

Abkürzungsverzeichnis

6AHT	6-Amino-1-hexanethiol HCl
A120D	Desmin Variante
AB-Puffer	Assemblierungspuffer
ADP	Avalanche Photodiode
AFM	Rasterkraftmikroskop
ARVC	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
AUC	Analytische Ultrazentrifugation
D154E	Desmoglein2 Variante
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DEL	Deletion
DM	<i>Dense midline</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	Protein Desmoplakin
DP-Puffer	Dialysepuffer
DRM	Desminopathy
Dsc	Protein Desmocollin
Dsg	Protein Desmoglein
DTT	Dithiothreitol
EC & ECD	Extrazelluläre Domäne
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure
EHKI	Erich und Hanna Klessmann Institut
H326R	Desmin Variante
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIS6-Tag	Hexahistidin-Tag

IDP	<i>Inner dense plaque</i>
IF	Intermediärfilament
K241E	Desmin Variante
K294E	Desmoglein2 Variante
L136P	Desmin Variante
MAL-PEG-SVA-3400	Maleimide-Poly(Ethylene Glycol)-Succinimidyl Valerate (PEG-Linker)
MPS	N-Hydroxysuccinimidyl-3-maleimidopropionate (PEG-Linker)
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
ODP	<i>Outer dense plaque</i>
P419S	Desmin Variante
pdb:1L3W	<i>Protein data base</i> ID für C-cadherin Ectodomain
PEG	Polyethylenglycol
PM	Plasmamembran
RCM	Restriktive Kardiomyopathie
rDsg	rekombinantes Desmoglein
RMS	Quadratischer Mittelwert
SAM	<i>Self assembled monolayer</i>
SNOM	Optisches Rasternahfeldmikroskop
SPR	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie
TIRF	Interne Totalreflexionsfluoreszenz
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl
TST	<i>Transition state theory</i>
ULF	<i>Unit length filament</i>
V392I	Desmoglein2 Variante
WLC	<i>Worm like chain</i>
WT	Wildtyp

Gene

CTNNA3	Catenin Alpha 3
DES	Desmin
DSC2	Desmocollin2
DSG2	Desmoglein2
DSP	Desmoplakin
JUP	Plakoglobin
LMNA	Lamin A/C
PKP2	Plakophilin-2
PLN	Phospholamban
TGFB3	Transforming growth factor beta 3
TMEM43	Transmembran Protein 43
TTN	Titin

Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Publikationen

- Brodehl, A., **M. Dieding**, N. Biere, A. Unger, B. Klauke, V. Walhorn, J. Gummert, U. Schulz, W. A. Linke, B. Gerull, M. Vorgert, D. Anselmetti und H. Milting (2016). „Functional characterization of the novel DES mutation p.L136P associated with dilated cardiomyopathy reveals a dominant filament assembly defect“. In: *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 91, S. 207–214.
- Brodehl, A., **M. Dieding**, H. Cakar, B. Klauke, V. Walhorn, J. Gummert, D. Anselmetti und H. Milting (2013). „Functional characterization of desmin mutant p.P419S“. In: *European Journal of Human Genetics* 21(6), S. 589–590.
- Brodehl, A., **M. Dieding**, B. Klauke, E. Dec, S. Madaan, T. Huang, J. Gargus, A. Fatima, T. Šaric, H. Cakar, V. Walhorn, K. Tonsing, T. Skrzypczyk, R. Cebulla, D. Gerdes, U. Schulz, J. Gummert, J. H. Svendsen, M. S. Olesen, D. Anselmetti, A. H. Christensen, V. Kimonis und H. Milting (2013). „The novel desmin mutant p.A120D impairs filament formation, prevents intercalated disk localization, and causes sudden cardiac death“. In: *Circulation: Cardiovascular Genetics* 6(6), S. 615–623.
- Harder, A., **M. Dieding**, V. Walhorn, S. Degenhard, A. Brodehl, C. Wege, H. Milting und D. Anselmetti (2013). „Apertureless scanning near-field optical microscopy of sparsely labeled tobacco mosaic viruses and the intermediate filament desmin“. In: *Beilstein Journal of Nanotechnology* 4, S. 510–516.
- Jany, T., A. Moreth, C. Gruschka, A. Sischka, A. Spiering, **M. Dieding**, Y. Wang, S. H. Samo, A. Stammner, H. Bögge, G. Fischer von Mollard, D. Anselmetti und T. Glaser (2015). „Rational design of a cytotoxic dinuclear Cu₂ complex that binds by molecular recognition at two neighboring phosphates of the DNA backbone“. In: *Inorganic Chemistry* 54(6), S. 2679–2690.
- Klauke, B., S. Kossmann, A. Gärtner, K. Brand, I. Stork, A. Brodehl, **M. Dieding**, V. Walhorn, D. Anselmetti, D. Gerdes, B. Bohms, U. Schulz, E. zu Knyphausen, M. Vorgert, J. Gummert und H. Milting (2010). „De novo desmin-

mutation N116S is associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy“. In: *Human Molecular Genetics* 19(23), S. 4595–4607.

- Rischmüller, A., M. Viefhues, **M. Dieding**, M. Blaesen, M. Schmeer, R. Baier, D. Anselmetti und M. Schleef (2013). „Analytical Tools in Minicircle Production“. In: *Minicircle and Miniplasmid DNA Vectors*. Hrsg. von M. Schleef. Weinheim, Germany: Wiley-Blackwell, S. 71–91.

Tagungsbeiträge

- Dieding, M., V. Walhorn, A. Brodehl, H. Milting, D. Anselmetti (2011). „Investigation of self-assembled desmin filament network by atomic force microscopy“. *75. Jahrestagung der DPG und DPG Frühjahrstagung der Sektion AMOP und der Sektion Kondensierte Materie, Dresden* (Poster)
- Dieding, M., A. Harder, V. Walhorn, A. Brodehl, H. Milting, D. Anselmetti (2012). „Investigation of desmin filament assembly by atomic force microscopy“. *XIV. Linz Winterworkshop*. (Poster)
- Dieding, M., A. Harder, V. Walhorn, A. Brodehl, H. Milting, D. Anselmetti (2012). „Investigation of desmin filament assembly by atomic force microscopy“. *76. Jahrestagung der DPG und DPG-Frühjahrstagung der Sektion Kondensierte Materie, Berlin*. (Poster)
- Dieding, M., V. Walhorn, A. Brodehl, H. Milting, D. Anselmetti (2013). „Investigation of desmin intermediate filament assembly by atomic force microscopy“. *XV. Linz Winterworkshop*. (Poster)
- Dieding, M., V. Walhorn, A. Brodehl, H. Milting, D. Anselmetti (2013). „Investigation of desmin intermediate filament assembly by atomic force microscopy“. *DPG-Frühjahrstagung der Sektion Kondensierte Materie, Regensburg*. (Poster)
- Dieding, M., A. Harder, N. Biere, V. Walhorn, A. Brodehl, H. Milting, D. Anselmetti (2014). „Investigation of desmin filament assembly“. *XVI. Linz Winterworkshop*. (Poster)

Danksagung

Während meiner Promotionszeit durfte ich viele hilfsbereite Menschen kennenlernen für deren Unterstützung ich mich an dieser Stelle bedanken möchte.

Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe erstellen durfte, für seine Anleitung und für die Begutachtung dieser Arbeit. Seine Begeisterung für die Forschung und die positive Einstellung haben mich immer motiviert. Weiterhin möchte ich mich für das entgegengebrachte Vertrauen und die uneingeschränkte Unterstützung herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Hendrik Mitling danke ich sehr für die Begutachtung dieser Arbeit, die stets gute Zusammenarbeit und für die Einführung in dieses interessante Themengebiet.

Volker Walhorn gebührt mein besonderer Dank. Seine Hilfe in allen Lebens- und Wissenschaftsfragen hat zu einem guten Teil meine Arbeit und die Zeit in dieser Arbeitsgruppe bereichert. Vielen Dank für die zahlreichen Gespräche und Diskussionen. Ich könnte mir keinen besseren Erklärbar vorstellen.

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen aus dem Labor von Prof. Milting bedanken: Im Besonderen möchte ich mich bei Andreas Brodehl (mit ihm hat alles angefangen) für die stets freundschaftliche Zusammenarbeit, bei Ilona Schirmer, Tim Skrzipzyk und Jana Davina Debus (Leidensgefährtin) für das Füttern der Zellen und das Putzen der Proteine ganz herzlich bedanken. Ohne ihre Arbeit hätte ich nichts zu Erforschen gehabt.

Ich möchte mich bei allen Biophysik-Gruppenmitgliedern - auch denen, die schon weitergezogen sind - für die Unterstützung im Laboralltag und das angenehme Arbeitsklima bedanken. Für ihre kompetente Hilfe möchte ich mich bei Katja Tönsing und Alexander Harder bedanken. Ich danke Raimund Kerkhoff und Niklas Biere für die gute Zusammenarbeit. Außerdem möchte ich Niklas für die Gestaltung des Umschlags und die netten (oder grafisch-schönen?) Gespräche zwischendurch danken. Bei Christoph Pelargus möchte ich mich bedanken, weil er ansonsten beleidigt wäre.¹ Martina Viefhues danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und die konstruktiven Diskussio-

¹Da er mir sehr ans Herz gewachsen ist, möchte ich das vermeiden.

nen. Ein besonderer Dank gilt meinen Bürokollegen: Sebastian Horstmeier (Phrasendrescher), Sebastian Zünkeler (AFM-Spezi), Orooba Al-Hamood (*master chef*) und Ying Wang (Kasusknackerin). Ohne die Hilfe von Ying wäre ich an mancher Rechenoperation gescheitert. Außerdem hat sie mich stets gut mit grünem Tee und Vitamin C versorgt.

Meinem guten Freund Volker Hofmann danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit. Seine Sicht von Außen hat mir geholfen neue Blickwinkel zu entdecken und seine Begeisterung, die er dem Thema entgegengebracht hat, hat mich bestärkt.

Meinem Partner Markus danke ich für seine umfassende Unterstützung während der Promotionszeit und die schönen, ablenkenden Momente.

Ein letztes DANKE in die Welt, denn ich habe bestimmt jemanden vergessen und derjenige soll sich JETZT angesprochen fühlen.