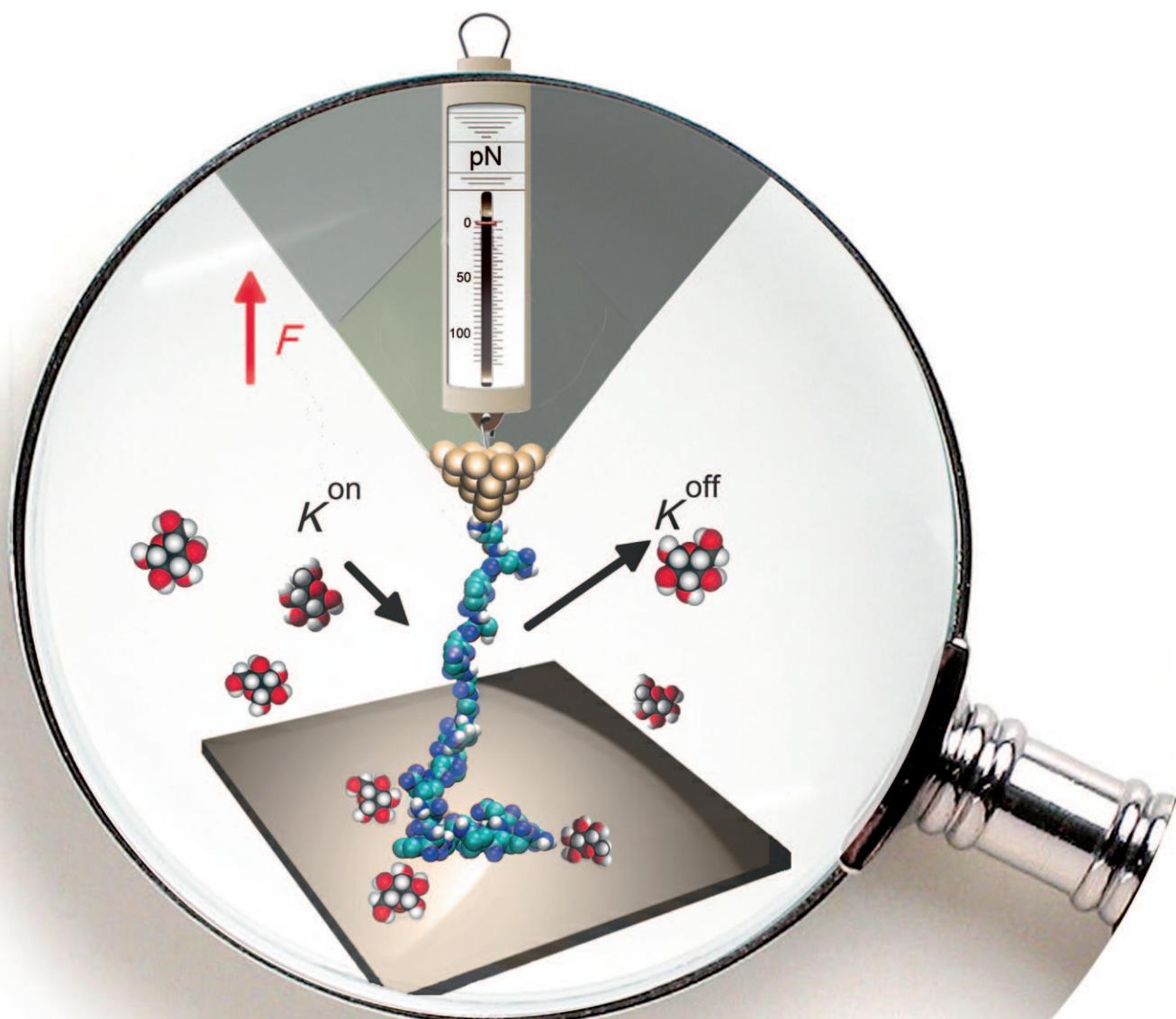


# Abziehen eines einzelnen Polymers von einem Substrat erschließt thermodynamische Parameter der Kosolubilitätsbindungen\*\*

Michael Geisler, Roland R. Netz und Thorsten Hugel\*



Kosolute wie Ionen, Liganden oder kleine Biomoleküle können die Faltung eines Proteins in seine biologisch funktionale Form, die Assoziation, die Adhäsion oder Desorption an einer Grenzschicht oder sogar die Änderung seiner mechanischen Eigenschaften bewirken.<sup>[1–5]</sup> Gleichzeitig wird die Wechselwirkung von Kosoluten mit Makromolekülen wie Proteinen, Lipiden und DNA ihrerseits durch Änderungen der Umgebung, insbesondere durch die Bindung an Oberflächen wie die der Zellmembran oder die Oberfläche von Histonen und Mikrotubuli beeinflusst.<sup>[6,7]</sup> Wir kombinieren Einzmolekül-Kraftspektroskopie mit thermodynamischer Modellierung und bestimmen dadurch die Parameter der Bindung der Kosolute an Makromoleküle in Lösung und im oberflächenadsorbierten Zustand. Wir erhalten Werte für die Länge einer Bindungsstelle (inverse maximale Liniendichte) und die Assoziationskonstanten. Die beträchtliche Auswirkung des Substrats auf die Kosolutbindung wird anhand von Glucose als Kosolut, Poly(allylamin) als Polymer und chirurgischem Edelstahl sowie oxidiertem Diamant als Substraten demonstriert.

Unlängst wurde die Thermodynamik der Ligandenbindung an ein Polymer mithilfe einer eindimensionalen Gibbs-Adsorptionsisotherme diskutiert.<sup>[8]</sup> In dieser Ausführung der klassischen Adsorptionsisotherme<sup>[9]</sup> sind die Oberflächenspannung durch eine Linienspannung  $\tau$  und der Gibbsche Grenzflächenüberschuss pro Fläche durch einen Linienüberschuss pro Länge,  $\Gamma$ , ersetzt. Für ein einzelnes Polymer unter Einwirkung einer konstanten mechanischen Kraft  $F_{\text{Des}}$  ist die Beziehung zwischen  $\Gamma$  und  $\tau$  durch Gleichung (1) gegeben.

$$\Gamma = \frac{\theta}{d} = -\left. \frac{\partial \tau}{\partial \mu} \right|_{F_{\text{Des}}} \quad (1)$$

Dabei ist  $\mu$  das chemische Potential der Liganden. Um eine anschauliche Vorstellung des Adsorptionsprozesses zu bekommen, teilen wir  $\Gamma$  in einen dimensionslosen Anteil von mit Liganden besetzten Bindungsstellen,  $\theta$ , und Bindungsstellenlänge  $d$ .<sup>[9]</sup> Durch Verknüpfen von Gleichung (1) mit

[\*] Dr. M. Geisler, Prof. Dr. T. Hugel  
Fakultät für Physik, IMETUM  
Technische Universität München, CeNS  
und  
Center for Integrated Protein Science  
Boltzmannstraße 11, 85748 Garching (Deutschland)  
Fax: (+49) 89-289-10805  
E-Mail: thorsten.hugel@ph.tum.de  
Homepage: <http://cell.e22.physik.tu-muenchen.de/Hugel>  
Prof. Dr. R. R. Netz  
Fakultät für Physik, CeNS  
Technische Universität München (Deutschland)

[\*\*] Wir danken der DFG (HU 997/4, NE 810/4, NE 810/7, SFB 863), NIM und dem Fonds der Chemischen Industrie für die finanzielle Unterstützung. Wir bedanken uns bei Simon Q. Lud und Jose A. Garrido für die Überlassung von Diamantsubstraten. M.G. wurde durch Stipendien des Elitenetzwerk Complnt und der Stiftung Industrieforschung unterstützt. Wir bedanken uns bei Nolan B. Holland, Jeffrey R. Moffitt, Dominik Horinek und Matthias Erdmann für hilfreiche Diskussionen.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200907098> zu finden.

der Langmuir-Isothermen  $\theta = aK/(1+aK)^{[10]}$  erhalten wir Gleichung (2) für den durch Ligandenbindung induzierten Linienspannungszuwachs.

$$\tau = -d^{-1}k_B T \ln(1 + aK) \quad (2)$$

Hier sind  $a = \exp(\mu/k_B T)$  die Ligandenaktivität,  $k_B$  die Boltzmann-Konstante,  $T$  die Temperatur und  $K$  die Assoziationskonstante. Wir definieren  $a$  und  $K$  als einheitenlos bezogen auf die Stoffmengenkonzentrationen (für Einzelheiten siehe Hintergrundinformationen). Dabei entspricht die Linienspannung  $\tau$  der Freien Energie, um das Polymer um eine Einheitslänge zu strecken, und ist deshalb nicht mit der mechanischen Kraft  $F_{\text{Des}}$  gleichzusetzen.

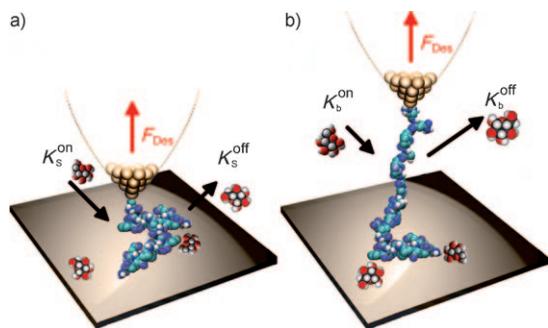
In unserem Einzmolekül-Desorptionsexperiment befinden sich die oberflächenadsorbierten und die desorbierten Polymerteile im mechanischen Gleichgewicht.<sup>[11–13]</sup> Deshalb müssen der Zustand als adsorbiertes Polymer, der durch die Assoziationskonstante  $K_s$  der Liganden und die Bindungsstellenlänge  $d_s$  charakterisiert ist, und der Zustand als Polymer in Lösung, charakterisiert durch  $K_b$  und  $d_b$ , unterschieden werden. Dies führt zu einem Beitrag zum Linienspannungsunterschied  $\Delta\tau$  zwischen Lösungs- und Oberflächenzustand, der von der Ligandenaktivität abhängig ist [Gleichung (3)].

$$\frac{\Delta\tau}{k_B T} = d_s^{-1} \ln(1 + aK_s) - d_b^{-1} \ln(1 + aK_b) \quad (3)$$

Dieser Linienspannungsunterschied bildet den Hauptbeitrag zu der von der Ligandenaktivität abhängigen Desorptionskraft, d.h.  $F_{\text{Des}}(a) = F_{\text{Des}}(a=0) + \Delta\tau$ . Die Anpassung von Gleichung (3) an die gemessenen Kräfte als Funktion von  $a$  ermöglicht die Bestimmung der vier Parameter  $d_b$ ,  $d_s$ ,  $K_b$  und  $K_s$ , insbesondere wenn die Ergebnisse für unterschiedliche Oberflächen mit der zusätzlichen Einschränkung, dass  $K_b$  und  $d_b$  unabhängig von der Art der Oberfläche sind, als Grundlage dienen.

Im Folgenden wird demonstriert, dass uns die vorgestellte Methode in die Lage versetzt, das Binden von Kosoluten an ein Polymer in beiden Zuständen zu quantifizieren: 1) adsorbiert an der Oberfläche und 2) gestreckt in Lösung (Abbildung 1). Als molekularen Sensor verwenden wir ein einzelnes Poly(allylamin)-Molekül (PAAm), das an die Spitze einer AFM-Blattfeder angebunden ist (siehe die Hintergrundinformationen für experimentelle Einzelheiten). Die kovalente Bindung des Polymers an die AFM-Spitze über eine lange flexible Poly(ethylenglycol)-Kette liefert die Langzeitstabilität,<sup>[11]</sup> die notwendig ist, um ein und dasselbe Sondenmolekül auf verschiedenen Substratmaterialien in wässrigen Lösungen mit unterschiedlichen D-Glucose-Konzentrationen zwischen 0 und 1M zu vermessen. Darüber hinaus wurde die Temperatur variiert, um deren Einfluss auf die Bindungsthermodynamik von Glucose zu bestimmen (siehe Abbildung S1 der Hintergrundinformationen).

Das Polymer an der Spitze wurde in Kontakt mit der festen Oberfläche gebracht und innerhalb einer Sekunde adsorbiert. Die nachfolgende Desorption des PAAm-Moleküls durch Zurückziehen der Blattfeder mit einer konstanten Geschwindigkeit von  $1 \mu\text{m s}^{-1}$  erfolgte unter Gleichgewichts-



**Abbildung 1.** Skizze der Glucosebindung an ein Polymer auf und entfernt von einer Oberfläche: Die „on“- und „off“-Rate des Kosoluts Glucose an ein Polymer adsorbiert auf einem Substrat ( $K_s$ ; Bild 1) und in Lösung ( $K_b$ ; Bild 2) sind gezeigt. Die Gleichgewichtsassoziationskonstante  $K = K^{on}/K^{off}$  und die Länge einer Glucosebindungsstelle  $d$  können anhand der gemessenen Kräfte als Funktion der Kosolutaktivität bestimmt werden.

bedingungen, was anhand der beobachteten geschwindigkeitsunabhängigen Kraftplateaus ersichtlich ist<sup>[14]</sup> (Abbildung 2).

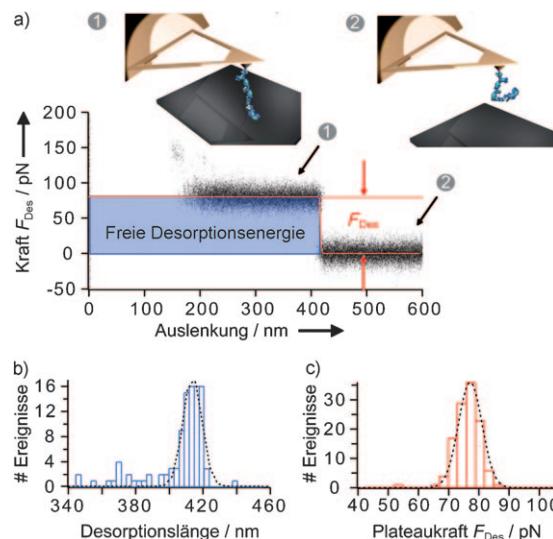
Kraft-Abstand-Kurven wurden an unterschiedlichen Stellen mithilfe des Verbiegungs-Piezoweg-Signals erhalten, wie bereits an anderer Stelle beschrieben.<sup>[15]</sup> (Eine vollständige Kraft-Abstand-Kurve zeigt Abbildung S2 der Hintergrundinformationen.)

Die Plateaukräfte, die auf Diamant erhalten wurden, wachsen mit steigender Glucosekonzentration, wohingegen die Werte auf Stahl eine nichtmonotone Abhängigkeit zeigen (Abbildung 3 A). Der Schlüssel zu unserem Anpassungsverfahren, das zu den Ausgleichsfunktionen in Abbildung 3 führte, ist die Anwendung identischer Parameter für den Lösungszustand, d.h. wir passen an beide Datensätze in Abbildung 3 gemeinsam an. Die erhaltenen Längen für eine Glucosebindungsstelle entlang des PAAm-Moleküls,  $d_b$  und  $d_s$ , sowie die zugehörigen Assoziationskonstanten sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

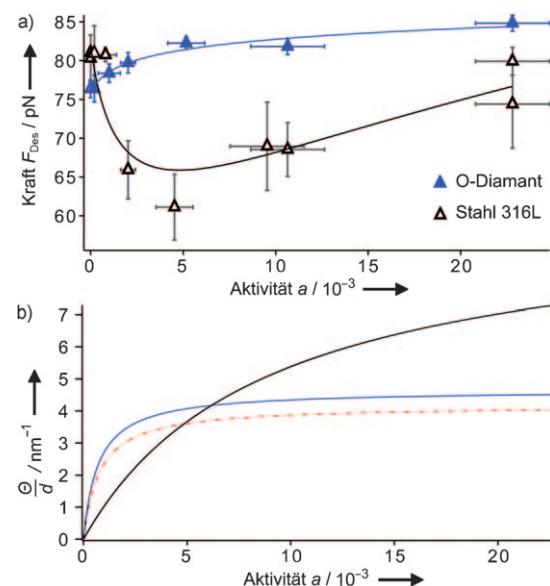
Die dimensionslose Lösungs-Assoziationskonstante  $K_b = \frac{K_b^{on}}{K_b^{off}} = 1300$  für Stahl entspricht  $K_b = 32 \text{ M}^{-1}$  in molaren Einheiten oder einer Dissoziationskonstante in molaren Einheiten von  $K_b^{\text{diss}} = \frac{K_b^{off}}{K_b^{on}} = 31 \text{ mM}$ .

Im Fall des Diamantsubstrats bei 31 °C ist  $K_s$  etwa 8 % größer als  $K_b$  und bei 46 °C sogar mehr als 20 % größer, was in einer verstärkten Bindung von Glucosemolekülen an das oberflächenadsorbierter Polymer begründet ist. Des Weiteren ist die Bindungsstellenlänge im adsorbierten Zustand  $d_s$  kleiner als  $d_b$ , was bedeutet, dass mehr Glucose an das Polymer an der Oberfläche binden kann. Diese Erkenntnis ist recht unerwartet, geht man von einer rein geometrischen Betrachtungsweise aus, d.h. von einer geringeren Zugänglichkeit des Polymers an der Oberfläche. In diesem Fall deuten die Ergebnisse auf ein ungewöhnliches Zusammenspiel der Glucosebindung an der Oberfläche und am Polymer hin. Beide Parameter verstärken die Glucose-Polymer-Bindung an der Oberfläche und erhöhen dadurch die Desorptionskraft mit steigender Glucosekonzentration.

Der nichtmonotone Verlauf der Kraftkurve für Stahl kann durch einen Wettstreit zweier Faktoren begründet werden:



**Abbildung 2.** Gleichgewichtsdesorption von PAAm von oxidiertem Diamant in 10 mM Glucoselösung. A) Überlagerung von 20 typischen Kraft-Abstand-Kurven, erhalten mit einem und demselben PAAm-Molekül unter Gleichgewichtsbedingungen, wie aus den (geschwindigkeitsunabhängigen) Kraftplateaus geschlossen werden kann. Vergleich von Verteilungen der Desorptionslänge (B) und der Kräfte (C) für jeweils 100 Hin-Rückfahrzyklen mit Gaußschen Ausgleichsfunktionen (gestrichelte Linien).



**Abbildung 3.** Glucosebindung an PAAm auf verschiedenen Oberflächen. A) Gezeigt sind die Desorptionskräfte von PAAm mit veränderter Glucoseaktivität bei 31 °C. Die durchgezogenen Linien stellen eine gemeinsame Anpassung beider Datensätze gemäß Gleichung (3) dar. B) Die Liniendichte assoziierter Glucosemoleküle am Polymer ab einer Glucosekonzentration von 0.2 M in unmittelbarer Nähe der Stahloberfläche (durchgezogene schwarze Linie) übersteigt diejenige in Lösung (rote Strich-Punkt-Linie). Zum Vergleich ist auch die Zahl gebundener Glucosemoleküle für das an Diamant adsorbierter Polymer dargestellt (blaue Linie).

Einerseits ist die Glucose-Polymer-Assoziation in Lösung stärker als an der Oberfläche, andererseits ist die Bindungsstellenlänge an der Oberfläche kleiner. Infolgedessen bindet

**Tabelle 1:** Bindungsparameter von D-Glucose an PAAm auf chirurgischem Edelstahl (316L) und oxidiertem Diamant (O-Diamant) bei unterschiedlichen Temperaturen.<sup>[a]</sup>

	Stahl 316L	O-Diamant	O-Diamant
Temperatur [°C]	31	31	46
$K_b$	1300	1300	1400
$d_b$ [Å]	2.40	2.40	2.68
$\Delta G_b$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	18.13	18.13	18.32
$K_s$	114	1404	1789
$d_s$ [Å]	0.99	2.15	2.55
$\Delta G_s$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	11.98	18.33	18.94

[a]  $\Delta G$  ist die Gibbssche Freie Energie der Bindung an eine einzelne Bindungsstelle, die mit der Temperatur  $T$  und der Gaskonstante  $R$  über  $\Delta G = RT \ln K$  zusammenhängt. Wird  $K$  in molaren Einheiten verwendet, sind 9.4 kJ mol<sup>-1</sup> von den tabellierten Werten von  $\Delta G$  zu subtrahieren.

bis zu einer Konzentration von 0.2 M ( $a \approx 5 \times 10^{-3}$ ) mehr Glucose an gelöst als an adsorbiertes Polymer, d.h. die Zahl assoziierter Glucosemoleküle steigt durch die erzwungene Desorption des Polymers an, und daher sinkt die Desorptionskraft mit wachsender Glucosekonzentration. Für Konzentrationen jenseits von 0.2 M hingegen ist die Lage gerade umgekehrt (Abbildung 3B). Die deutlich unterschiedlichen Oberflächenparameter und insbesondere die sehr kleine Bindungsstellenlänge auf Stahl im Vergleich zu Diamant spiegeln höchstwahrscheinlich unterschiedliche Affinitäten der blanken Substratmaterialien für Glucose wider.

Bis jetzt war die Ligandenadsorption in Lösung durch experimentelle Methoden wie Kalorimetrie,<sup>[16]</sup> Densiometrie<sup>[17]</sup> oder Gleichgewichtssedimentation<sup>[18]</sup> zugänglich. Das gebräuchlichste Verfahren stellt die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) dar, die hoher Konzentrationen an Polymeren bedarf, die ihrerseits gut löslich sein müssen und nicht zur Aggregation neigen dürfen.<sup>[16]</sup> Der hier vorgestellte Ansatz mit Einzelmolekül-AFM bietet eine ergänzende Methode, die sogar für unlösliche Polymere geeignet ist. Für ein Polymer, das sich in Kontakt mit einer Oberfläche befindet, fehlte bislang eine überzeugende Strategie zur Bestimmung der Ligandenbindung.

Zusammenfassend haben wir einen rasterkraftmikroskopischen Einzelmolekülsensor entwickelt und gemeinsam mit thermodynamischer Modellierung die Bindungsstellenlängen und Assoziationskonstanten von Kosoluten bestimmt, die sowohl an ein gelöstes Makromolekül binden, als auch an dasselbe Molekül, wenn es an einer Festkörperoberfläche adsorbiert ist. Unsere Untersuchungen mit PAAm und Glucose offenbaren, dass Oberflächen einen entscheidenden Einfluss auf die Bindungsaffinitäten kleiner Moleküle in

Kontakt mit Polymeren haben, der stark zwischen den unterschiedlichen Oberflächen variiert. Unser Verfahren kann auf beliebige Zusammenstellungen von Polymeren, Kosoluten und einer großen Vielfalt von Grenzflächen, von Festflüssig- über Flüssig-gasförmig- bis hin zu weichen Grenzflächen wie Lipiddoppelschichten, Zellmembranen oder mit Histonen bedeckte Oberflächen, angewendet werden. Daher ist unser vereinter Ansatz mit Experiment und Theorie vielseitig für das Studium der Wechselwirkungen von Kosoluten mit Makromolekülen in Lösung und an Grenzflächen einsetzbar. Schließlich können Unterschiede von  $K_s$  und  $K_b$  oder  $d_s$  und  $d_b$  genutzt werden, um die Polymeradsorption durch Veränderung der Kosolutkonzentration zu steuern, was wiederum eine Möglichkeit zur Kontrolle von Makromolekülanordnungen an Oberflächen eröffnet.

Eingegangen am 16. Dezember 2009,  
veränderte Fassung am 13. März 2010  
Online veröffentlicht am 31. Mai 2010

**Stichwörter:** Adsorption · Einzelmoleküluntersuchungen · Kraftspektroskopie · Ligandeneffekte · Polymere

- [1] Y. Cao, R. Kuske, H. B. Li, *Biophys. J.* **2008**, 95, 782.
- [2] M. K. Ghatkesar, V. Barwich, T. Braun, J. P. Ramseyer, C. Gerber, M. Hegner, H. P. Lang, U. Drechsler, M. Despont, *Nanotechnology* **2007**, 18, 445502.
- [3] J. A. Schellman, *Q. Rev. Biophys.* **2005**, 38, 351.
- [4] T. O. Street, D. W. Bolen, G. D. Rose, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 13997.
- [5] J. M. Kinsella, A. Ivanisevic, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, 2, 596.
- [6] P. Cunningham, I. Afzal-Ahmed, R. J. Naftalin, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 5797.
- [7] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, *Molecular Biology of the Cell*, 4. Aufl., Taylor & Francis, **2002**.
- [8] H. Y. Zhang, J. F. Marko, *Phys. Rev. E* **2008**, 77, 0.
- [9] A. W. Adamson, A. P. Gast, *Physical Chemistry of Surfaces*, 6. Aufl., Wiley, New York, **1997**.
- [10] O. Can, N. B. Holland, *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, 329, 24.
- [11] M. Geisler, T. Pirzer, C. Ackerschott, S. Lud, J. Garrido, T. Scheibel, T. Hugel, *Langmuir* **2008**, 24, 1350.
- [12] S. X. Cui, C. J. Liu, X. Zhang, *Nano Lett.* **2003**, 3, 245.
- [13] D. Horinek, A. Serr, M. Geisler, T. Pirzer, U. Slotta, S. Q. Lud, J. A. Garrido, T. Scheibel, T. Hugel, R. R. Netz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 2842.
- [14] M. Geisler, T. Hugel, *Adv. Mater.* **2010**, 22, 398.
- [15] T. Hugel, M. Seitz, *Macromol. Rapid Commun.* **2001**, 22, 989.
- [16] A. Velazquez-Campoy, E. Freire, *Nat. Protoc.* **2006**, 1, 186.
- [17] S. N. Timasheff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 9721.
- [18] C. Ebel, H. Eisenberg, R. Ghirlando, *Biophys. J.* **2000**, 78, 385.