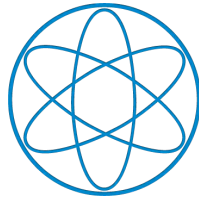


PHYSIK-DEPARTMENT



**Mechanische Anisotropie von Proteinen in
Einzelmolekülexperimenten**

**Dissertation
von**

Hendrik Dietz



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biophysik E22, Physik Department
Technische Universität München

Mechanische Anisotropie von Proteinen in
Einzelmolekülexperimenten

Hendrik Dietz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Roland R. Netz

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Matthias Rief
2. Univ.-Prof. Dr. Josef Friedrich

Die Dissertation wurde am 24.01.2007 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 22.02.2007 angenommen.

Mechanische Anisotropie von Proteinen in Einzelmolekülexperimenten

Dissertation am Physik Department
der Technischen Universität München

vorgelegt von
Hendrik Dietz
aus Dresden

München, den 24. Januar 2007

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	xv
Einleitung	xvii
1 Punktuelle Kraftbelastung einer Proteinstruktur	1
1.1 AFM-Kraftspektroskopie mit Proteinen	1
1.2 Cysteine Engineering	3
1.3 Das Grün Fluoreszierende Protein (GFP)	5
1.4 Kraft-Ausdehnungsantwort von GFP Polyproteinen	6
1.5 Zusammenfassung	10
2 Mechanische Strukturbestimmung an einzelnen Proteinmolekülen	11
2.1 Prinzip einer mechanischen intramolekularen Abstandsmessung	11
2.2 Messung von Längenzuwächsen	12
2.3 Kalibration von Längenzuwächsen	14
2.4 Intramolekulare Abstände im GFP	15
2.5 Mechanische Triangulation	17
2.6 Bestimmung von teilentfalteten Strukturen	17
2.7 Zusammenfassung	20
3 Dissoziation von Bindungen unter Kraft	21
3.1 Bindungspotentiale unter Kraft	21
3.2 Bindungsnetzwerke unter Kraft	24
3.3 Kooperativität von Bindungssystemen	27
3.4 Polyproteine als seriellles Bindungssystem und der N-Effekt	29
3.5 Zusammenfassung	30
4 Lokale Minima in der GFP Energielandschaft	31
4.1 Population von partiell gefalteten Strukturen	31
4.2 These 1: Externe Einflüsse	33
4.3 These 2: Intrinsische Ursachen	35
4.4 Zusammenfassung	38

5	Direktionale Mechanik einer Proteinstruktur	39
5.1	Direktionale Bruchkräfte der GFP Struktur	39
5.2	Direktionale Eigenschaften der Energielandschaft der GFP Struktur	42
5.3	Diskussion	43
5.4	Zusammenfassung	44
6	Minimalmodell der Mechanik einer Proteinstruktur	47
6.1	Sequentieller Bruch der GFP Raumstruktur	47
6.2	Bindungsbruch in einem Bindungsnetzwerk	49
6.3	Ein minimales Modell	50
6.4	Kraftwirkungsmatrix α_{lm}	52
6.5	Bruchkinetik des Minimalmodells	54
6.6	Diskussion	56
6.7	Zusammenfassung	58
7	Mechanische Anisotropie der GFP Struktur	59
7.1	Direktionale molekulare Federkonstanten	59
7.2	Anisotrope Energielandschaft des GFP	61
7.3	Stabilitätskarte der GFP Raumstruktur	61
8	Ausblick	63
8.1	Wie stabil sind Sekundärstrukturelemente?	63
8.2	Beitrag für die Strukturbiologie	65
8.3	Dynamik gefalteter Proteinstrukturen	67
8.4	Enzyme bei der Arbeit	68
8.5	Protein-Nanotechnologie	69
A	Fluoreszenzeigenschaften von GFP Polyproteinen	71
A.1	Spektrale Eigenschaften von GFP Polyproteinen	71
A.2	Fluoreszenz einzelner GFP Polyproteine verschiedener Länge	73
A.3	Reduktion einzelner GFP Polyproteine zu Monomeren	77
A.4	Cysteine Engineering Protokoll	79
A.5	Längendispersion von GFP Polyproteinen	81
B	Kontrolle des Reaktionspfades bei kraftinduziertem Bruch	85
B.1	Reaktionspfad bei N-C terminaler Belastung des GFP	85
B.2	Internes Cysteine Engineering	87
C	Superhelix-vermittelte Protein Polymerisation	89
C.1	Prinzip	89
C.2	Superhelix Polyproteine	91
C.3	Ausblick	94
C.4	Protokoll	95

D Methoden	97
D.1 Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie	97
D.2 Einzelmolekül-Kraftspektroskopie	99
D.3 Monte-Carlo Simulationen	100
Danksagung	110

Abbildungsverzeichnis

1	Untersuchung der Energielandschaft eines Proteins entlang verschiedener Reaktionspfade	xviii
1.1	Schema eines AFM-Kraftspektrometers	2
1.2	Cysteine Engineering Prinzip	4
1.3	Acht ausgewählte Belastungsgeometrien in der GFP-Struktur	5
1.4	Typische Kraft-Ausdehnungsantwort eines über das Aminosäurenpaar (6,221) polymerisierten GFP Polyproteins	7
1.5	Typische Kraft-Ausdehnungsantwort der acht verschieden verknüpften GFP Polyproteine	9
2.1	Prinzip einer mechanischen, intramolekularen Abstandsmessung	12
2.2	Entropische Elastizität entfalteter Aminosäureketten	13
2.3	Längenkalibration mit (3,88) verknüpften Ig27 Polyproteinen	14
2.4	Längenhistogramme und intramolekulare Abstände	16
2.5	Mechanische Triangulation von Aminosäurepositionen in der GFP Struktur	18
2.6	N-C terminale Längenhistogramme und intramolekulare Abstände	19
3.1	Bruchkinetik einer Einzelbindung	22
3.2	Bruchkinetik eines Bindungsnetzwerks	25
3.3	Bruchkinetik paralleler bzw. serieller Bindungsnetzwerke	26
3.4	Kooperative Bindungsnetzwerke	29
4.1	Bifurkation des Reaktionspfades bei Belastung des GFP über (3,212)	32
4.2	Argumente gegen externe Einflüsse	33
4.3	Copolyproteine	34
4.4	Relative Häufigkeit der Population des Zwischenzustandes unter Kraft	36
4.5	Besetzung von lokalen Minima	37
5.1	Direktionale Bruchkraftverteilungen	40
5.2	Nachweis statistisch unabhängiger Bruchereignisse: N-Effekt	41
6.1	Argumente für einen sequentiellen Zusammenbruch	48
6.2	Das GFP als elastisches Netzwerk	51
6.3	Bestimmung der Kraftwirkungsmatrix	52

6.4	Interne Spannungen im elastischen Netzwerk bei Belastung entlang der experimentell untersuchten Richtungen	54
6.5	Vergleich Bruchkinetik des Minimalmodells mit dem Experiment	55
7.1	Vergleich beobachtete, direktionale Federhärten mit den effektiven Federhärten eines elastischen Netzwerks	60
7.2	Stabilitätskarte der GFP Raumstruktur	62
8.1	Wie stabil ist ein einzelner β -Strang?	64
A.1	Absorptions- und Fluoreszenz Spektren von GFP Polyproteinen	72
A.2	Fluoreszenzsignal einzelner, verschieden langer eGFP Polyproteine	74
A.3	Fluoreszenzsignale einzelner Zweifach-Cystein modifizierter eGFP Moleküle	75
A.4	Fluoreszenzsignale einzelner eGFP Polyproteine verschiedener Länge	76
A.5	Mittleres Fluoreszenz-Zeitverhalten einzelner eGFP Polyproteine verschiedener Länge	77
A.6	Wirkung von DTT auf einzelne eGFP Polyproteine	78
A.7	Protokoll Cysteine Engineering	80
A.8	Kalibration einer Größenausschluß-Chromatographiesäule	82
A.9	Längendispersion (3,212) verknüpfte GFP Polyproteine	83
B.1	Sequentieller Bruch der GFP Raumstruktur bei N-C terminaler Belastung	86
B.2	Internes Cysteine Engineering	87
C.1	Superhelix-vermittelte Protein Polymerisation	90
C.2	Elementare Bausteine	91
C.3	Längendispersion Superhelix Polyproteine	92
C.4	Kraft-Ausdehnungsantwort von $Z \cdot Ig27 \cdot Z$ Superhelix Polyproteinen	93
C.5	Kraft-Ausdehnungsantwort von $Z \cdot GFP \cdot Z$ und $Z \cdot GFP \cdot Z_3$ Superhelix Polyproteinen	94
D.1	Schema des konstruierten Einzelmolekül-TIR Fluoreszenzmikroskops	98
D.2	Wahrscheinlichkeitsstrahl für Monte Carlo Simulationen	101

Tabellenverzeichnis

5.1	Die Mechanik der GFP Raumstruktur in Zahlen	45
6.1	Produkt aus mittlerer Bruchkraft und apparenter Potentialbreite	49

Zusammenfassung

Die Kenntnis der mechanischen Eigenschaften funktionaler Proteinmoleküle ist von großer Bedeutung für das Verständnis vieler biologischer Prozesse. Einzelmolekül-Techniken haben die Tür zur Untersuchung der Mechanik von Proteinen geöffnet. Technische Gründe schränkten den experimentellen Zugang bisher jedoch stark ein. In dieser Arbeit wird eine Technik entwickelt, die es ermöglicht, mechanische Stabilität und Elastizität der funktionalen Raumstruktur von Proteinen in ihrer nativen Umgebung in nahezu beliebig wählbarer Geometrie der Kraftbelastung zu untersuchen. Das Verfahren ermöglicht zudem die auf wenige Ångström genaue Messung von intramolekularen Abständen zwischen Aminosäuren in der gefalteten Raumstruktur von Proteinen. Die Technik basiert auf der Positionierung reaktiver Gruppen an gewünschten Punkten in der Raumstruktur eines Proteins. Dadurch können einzelne, über diese Punkte verknüpfte Polyproteine mit einem AFM-Kraftspektrometer mechanisch manipuliert werden.

Mit dieser Technik wurde das topologisch komplexe Grün Fluoreszierende Protein (GFP) in verschiedenen Belastungsgeometrien untersucht. Die Messung von acht intramolekularen Abständen und die Bestimmung der Position von drei Aminosäuren in der gefalteten Raumstruktur einzelner GFP Moleküle zeigte dabei im Rahmen des wenige Ångström kleinen Messfehlers Übereinstimmung mit der Kristallstruktur des GFP. Untersuchungen der Reaktion einzelner GFP Moleküle auf Kraftbelastung in verschiedenen Bereichen ihrer gefalteten Struktur offenbarten eine ausgeprägte mechanische Anisotropie. Für den kraftinduzierten Zusammenbruch der GFP Raumstruktur müssen je nach Belastungsgeometrie Kräfte zwischen 100 pN und 750 pN aufgewendet werden. In einer Belastungsrichtung konnte eine Bifurkation des Reaktionspfades identifiziert werden. Aus den Ergebnissen konnten Eigenschaften der hochdimensionalen Energielandschaft des GFP bestimmt werden. Es wurde ein Minimalmodell der Proteinmechanik entwickelt, das eine Proteinstruktur als diskretes, bruchfähiges Bindungsnetzwerk betrachtet. Die beobachteten Eigenschaften der GFP Struktur konnten mit dem Modell qualitativ beschrieben werden und damit mögliche Ursachen der beobachteten Anisotropie identifiziert werden. Die Untersuchungen ermöglichten die Bestimmung effektiver Elastizitätseigenschaften der GFP Raumstruktur. Es ergaben sich molekulare Federkonstanten im Bereich von 1 nN/nm bis zu 27 nN/nm in verschiedenen Bereichen der GFP Struktur.

Die entwickelte Technik liefert ein neues, wertvolles Werkzeug für die Proteinphysik. Die Ergebnisse der Untersuchung des GFP tragen zu einem besseren Verständnis der Faltung, Mechanik und Funktionsweise von Proteinen bei.

Einleitung

In der Evolution des Lebens sind faszinierende molekulare Maschinen entstanden, die zum überwiegenden Teil aus Proteinen aufgebaut sind. Diese molekularen Maschinen sind an allen zellulären Prozessen maßgeblich beteiligt. Die Bandbreite ihrer biologischen Funktion reicht von einfachen Schaltern über molekulare Motoren, die Ladung entlang molekularer Schienen transportieren, bis hin zu komplexen chemischen Syntheseeinheiten, in denen beispielsweise die Erbinformation repliziert wird. Viele zelluläre Prozesse sind mechanischer Natur und hängen kritisch von mechanischen Eigenschaften wie Elastizität oder Festigkeit der beteiligten Proteinmoleküle ab. Die biologische Funktion vieler Proteine erfordert zudem Konformationsänderungen, bei denen mechanische Kräfte erzeugt werden oder die durch mechanische Kräfte induziert werden können.

Proteine sind lineare Kettenmoleküle aus Aminosäuren mit verschiedenen chemischen Eigenschaften. Sie üben ihre vielfältigen biologischen Aufgaben erst nach der korrekten Faltung der Aminosäurekette in eine komplexe, dreidimensionale Raumstruktur aus. Die Aminosäuresequenz eines Proteins enthält alle Informationen, die für die Ausbildung der funktionalen Raumstruktur benötigt werden. Wie sich Proteine in ihre funktionale Raumstruktur falten ist jedoch unklar und Thema intensiver Forschung. Die mechanischen Eigenschaften funktionaler Proteinstrukturen sind weithin unbekannt. Es ist unklar, welche Prinzipien ihre mechanischen Eigenschaften wesentlich bestimmen könnten und ihnen die Ausübung ihrer vielfältigen mechanischen Aufgaben ermöglichen.

Die Kenntnis des Zusammenhanges zwischen Aminosäuresequenz und gefalteter Raumstruktur sowie die Kenntnis der mechanischen Eigenschaften funktionaler Proteinstrukturen würde jedoch nicht nur ein fundamentales Verständnis vieler biologischer Prozesse ermöglichen, sondern auch den Weg zu einer künstlichen Erschaffung von molekularen Maschinen für technologisch motivierte Anwendungen ebnen.

Einzelmolekül-Techniken haben die Tür zur Untersuchung der mechanischen Eigenschaften von Proteinmolekülen geöffnet. Technische Gründe begrenzten bisher den experimentellen Zugang auf zumeist nur eine mögliche Belastungsgeometrie. Es sind jedoch die dreidimensionalen Eigenschaften von Proteinstrukturen, die Proteinen die Erfüllung ihrer vielfältigen biologischen Aufgaben ermöglichen.

Diese Arbeit hat sich daher zum Ziel gesetzt, über eine Untersuchung der mechanischen Eigenschaften von Proteinen in verschiedenen Bereichen ihrer funktionalen Raumstruktur einen Beitrag zum besseren Verständnis dieser faszinierenden molekularen Maschinen zu leisten.

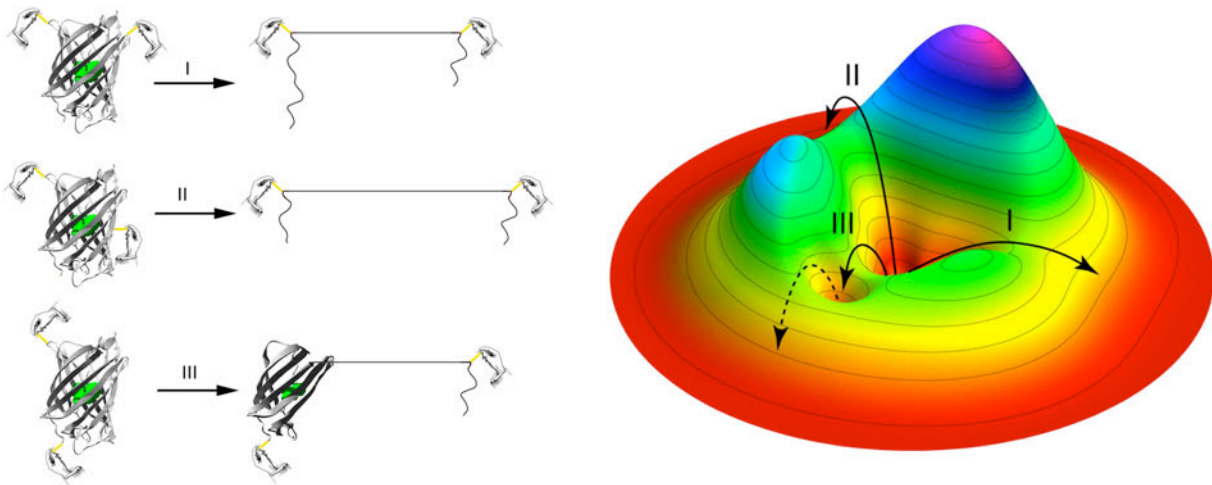


Abbildung 1: Die Untersuchung der mechanischen Eigenschaften einer Proteinstruktur in verschiedenen Bereichen der gefalteten Struktur liefert Informationen über Eigenschaften der hochdimensionalen Energielandschaft eines Proteins entlang kontrollierter Reaktionspfade.

Für dieses Ziel muss eine Technik entwickelt werden, die es ermöglicht, die Reaktion einzelner, funktionaler Proteinstrukturen auf lokale Belastung mit Kraft in frei wählbarer Geometrie zu messen.

Abb. 1 illustriert die Art der Informationen, die solche Messungen zur Verfügung stellen würden. Maßgeblich für die Faltung und Dynamik eines Proteins ist eine hochdimensionale Energielandschaft, die durch viele schwache Wechselwirkungen zwischen einzelnen Aminosäuren bestimmt wird. Abb. 1 stellt schematisch solch eine Energielandschaft dar. Es ist experimentell sehr schwierig, Details dieser Energielandschaft zu bestimmen. Kontrolle über die Geometrie der Kraftbelastung würde es jedoch ermöglichen, die Form dieser Energielandschaft entlang verschiedener Reaktionskoordinaten zu untersuchen. Teile der Struktur eines Proteins, die als sehr elastisch und mechanisch labil auftreten, werden durch breite und flache Bereiche der Energielandschaft bestimmt, während steife und mechanisch stabile Teile einer Proteinstruktur durch enge und hohe Potentialformen bestimmt werden (vgl. Pfad I und II in Abb. 1). Es ist zudem denkbar, dass durch die Wahl der Kraftangriffspunkte selektiv Partialstrukturen erzeugt werden können, die gleichbedeutend mit der Besetzung von lokalen Minima in der Energielandschaft eines Proteins sind (vgl. Pfad III in Abb. 1). Die Fülle an Informationen, die solche Messungen verfügbar machen würden, könnte zudem zur Entwicklung von einfachen Modellen zur Beschreibung der Dynamik gefalteter Proteinstrukturen beitragen.

In dieser Arbeit wird AFM-Kraftspektroskopie mit Cysteine Engineering kombiniert, um erstmals die Untersuchung der mechanischen Eigenschaften eines Proteinmoleküls in verschiedenen Teilen der gefalteten Raumstruktur zu ermöglichen. Mit dieser Technik wird die topologisch komplexe Raumstruktur des Grün Fluoreszierenden Protein (GFP) eingehend untersucht.

Kapitel 1

Punktuelle Kraftbelastung einer Proteinstruktur

1.1 AFM-Kraftspektroskopie mit Proteinen

Auf Atom-Kraftmikroskopen [12] basierende Kraftspektrometer haben sich als geeignete Werkzeuge für die Untersuchung der mechanischen Eigenschaften einzelner Polyprotein-Moleküle erwiesen. Mit AFM-basierter Kraftspektroskopie wurden seit den ersten Arbeiten von Rief et al. [89] die mechanischen Eigenschaften einer ganzen Reihe verschiedener Proteine untersucht, darunter Fibronectin [90], Spectrin [91], Ubiquitin [24][93], Filamin [97], Ankyrin [62][65], Spinnenseide [80], Heparin [73], Myomesin [9], Dihydrofolate Reductase [55][2], Dystrophin [10], Polycystin [86], Cadherin [6], Projectin [20], Superhelizes [98][13], SNARE-Komplexe [70], Protein L [17], E2Lip [18], Tenascin [23], Fibronogen [19], Photoactive Yellow Protein [119] und GFP [32][82] bis hin zu Membranproteinen wie z.B. Bacteriorhodopsin [78][57], OspA [45] und Protonen-Antiportern [56]. Kraftspektrometer zeichnen sich durch eine hohe Längenauflösung im Subnanometer-Bereich [25] und einer großen Bandbreite erreichbarer Kräfte (Piconewton [13] bis Nanonewton [40]) aus. Ein Kraftspektrometer ist schematisch in Abb. 1.1 a) dargestellt.

Ein in drei Achsen funktionierendes Positioniersystem auf Basis von Piezokristallen trägt die zu untersuchende Probe. Kapazitive Abstandssensoren gekoppelt mit einem Regelkreis ermöglichen eine Positionierung der Probe mit Subnanometer-Genauigkeit. Ein Lichtzeiger wird auf einen Cantilever mit bekannter Federkonstante fokussiert. Der reflektierte Strahl wird auf eine segmentierte Photodiode geworfen und ermöglicht die Detektion von kleinsten Verbiegungen des Cantilevers. Die Blattfeder trägt auf der Probenseite eine scharfe Spitze. Eine kraftspektroskopische Messung besteht aus der Detektion von am Cantilever anliegenden Kräften und des Abstandes zwischen Cantilever-Spitze und Probenoberfläche, während die Probenfläche kontrolliert an die Blattfeder angenähert und wieder entfernt wird. Besteht eine Wechselwirkung zwischen Spitze und Probenfläche, so kommt es zu Auslenkungen des Cantilevers. Trägt man die am Cantilever anliegende Kraft als Funktion des Probenabstandes auf, so ergeben sich Kraft-Ausdehnungs- oder Kraft-

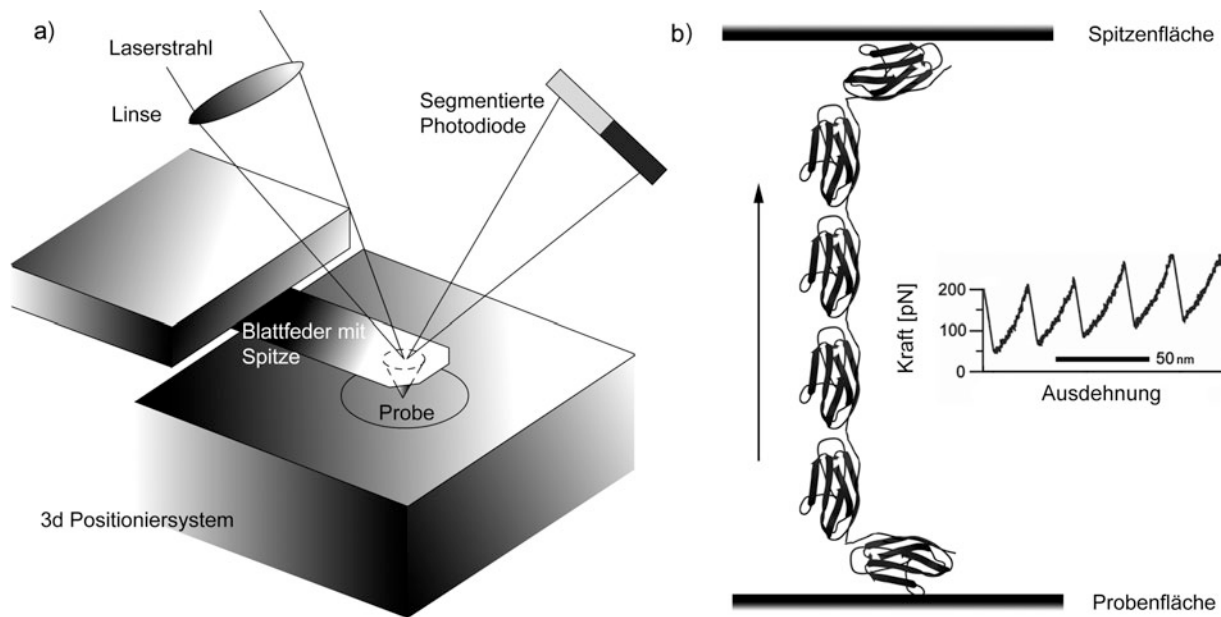


Abbildung 1.1: a) Schematische Darstellung eines AFM-Kraftspektrometers. b) Schematische Darstellung eines Polyproteins, das zwischen Cantilever und Probenfläche eines Kraftspektrometers gestreckt wird.

Relaxationskurven. Die Messungen können an Luft, in wässriger Lösung unter physiologischen Bedingungen oder auch in vielen anderen Lösungsmitteln durchgeführt werden.

AFM-Kraftspektroskopie mit Proteinen ist nur in Kombination mit Methoden der Molekularbiologie möglich. Die meisten globulären Proteinstrukturen sind nur wenige Nanometer groß. Der Krümmungsradius der Spitze eines Kraftspektrometers liegt im Bereich von etwa 30 nm. Die Untersuchung eines einzelnen, globulären Proteinmoleküls ist damit kaum möglich. Einerseits können die Kontaktflächen, über die das Molekül belastet wird, nicht genau definiert werden. Andererseits kann die Kraft-Ausdehnungsantwort einzelner Moleküle nicht vom experimentell dominanten Hintergrund multipler Wechselwirkungen unterschieden werden. Kraftspektroskopie an globulären Proteinen in Lösung ist jedoch möglich, wenn die zu untersuchenden Proteine in Form von linearen Polyproteinen vorliegen, wie in Abb. 1.1 b) schematisch dargestellt. Einzelne Untereinheiten des Polyproteins, die unspezifisch an Cantilever und Probenfläche gebunden werden, dienen als Griffe, über die ein solches Polyprotein zwischen Blattfeder und Probenfläche gestreckt werden kann. Die Bindungen zwischen den Untereinheiten des Polyproteins definieren die Punkte, über die auf diese Weise Kraft an einzelne Proteinmoleküle angelegt werden kann. Die Kraft-Ausdehnungsantwort einzelner solcher Polyproteine führt zu einer hochspezifischen, repetitiven Signatur (vgl. Abb. 1.1 b), die die Identifikation von Einzelmolekül-Kraftkurven ermöglicht [89][64]. Die große Mehrheit der in der Natur vorkommenden Proteine tritt nicht in Form von Polyproteinen auf. Es sind daher rekombinante Techniken zur Konstruktion von künstlich verknüpften Polyproteinen entwickelt worden [64][26]. Diese Protokolle basieren auf der mehrfachen Hintereinanderschaltung des für ein Protein kodierenden Gens

und der anschliessenden Expression dieses repetitiven Gens in einem Organismus. Eine anderer Weg basiert auf der Integration der DNA-Sequenz des Zielproteins in das Gen eines bereits in der Natur als Polyprotein auftretenden Proteins [97][32].

Die rekombinante Konstruktion von Polyproteinen unterliegt jedoch einer wichtigen Beschränkung: die Untereinheiten der genetisch konstruierten Polyproteine sind nur über die Amino- und Carboxytermini, d.h die erste und letzte Aminosäure in der Sequenz eines Proteins, verknüpfbar. Dieser Umstand hängt unmittelbar mit der Translation im Ribosom zusammen. Nahezu alle natürlich vorkommenden Polyproteine sind aus dem selben Grund über die Termini verknüpft¹. Der experimentelle Zugang ist damit auf die Untersuchung der mechanischen Eigenschaften einer Proteinstruktur bei Kraftbelastung über den N-C Terminus beschränkt.

1.2 Cysteine Engineering

Ein notwendiger Schritt ist daher die Entwicklung einer Technik, mit der die Kraftangriffspunkte an eine Proteinstruktur beliebig gewählt und exakt kontrolliert werden können. Ein möglicher Weg, dieses Ziel zu erreichen, basiert auf den chemischen Eigenschaften der Restgruppe einer der 20 verschiedenen Aminosäuren der Natur, des Cysteins. Abbildung 1.2 illustriert die Verfahrensweise. Cysteine besitzen ein Schwefelatom in der Restgruppe. Zwei Cysteine können damit über die Ausbildung einer Schwefelbrücke kovalent zu Cystin verbunden werden. Die Natur nutzt diese Möglichkeit aus, um bestimmte Teile innerhalb gefalteter Proteinstrukturen durch kovalente Bindungen punktuell zu stabilisieren. Cystein ist genetisch kodierbar. Durch Doppelmodifikation des für ein Protein kodierenden Gens [112] können zwei bestimmte Aminosäuren an den Positionen i und j in der Aminosäuresequenz eines Proteins gezielt durch zwei Cysteine ersetzt werden (Abb.1.2 a). Bei bekannter Raumstruktur des Proteins können die Positionen der zwei Cysteine in der Aminosäuresequenz des Proteins derart gewählt werden, dass ihre reaktiven Restgruppen an vorherbestimmten Positionen in der gefalteten Raumstruktur des Proteins erscheinen (Abb.1.2 b). Gelingt es, die reaktiven Proteinmoleküle über die Bildung von Cystein-Schwefelbrücken zu polymerisieren, erhält man somit Polyproteine, die mit atomarer Genauigkeit an zwei exakt kontrollierten und vorher gewählten Punkten verknüpft sind (Abb.1.2 c). Streckt man derart konstruierte Polyproteine mit einem Kraftspektrometer (Abb. 1.2 d), so wird Kraft über die kovalenten Schwefelbrückenbindungen exakt an das C_α -Atom im Peptidrückgrat der zwei verknüpfenden Aminosäuren an jedes einzelne Proteinmolekül im Polyprotein angelegt. Die Geometrie der Bindung des Polyproteins an Cantilever und Probenoberfläche ist dabei irrelevant. Über eine Variation der Aminosäuren, die durch Cysteine in der Sequenz des Proteins ersetzt werden, kann damit die Richtung, über die Kraft an eine Proteinstruktur angelegt wird, frei gewählt und exakt kontrolliert werden (Abb. 1.2 e). Dieser Ansatz wird im folgenden als Cysteine Engineering bezeichnet.

¹Eine Ausnahme ist z.B Ubiquitin, ein Polyprotein, das auf natürliche Weise in zwei verschiedenen Verknüpfungsgeometrien vorliegt [24].

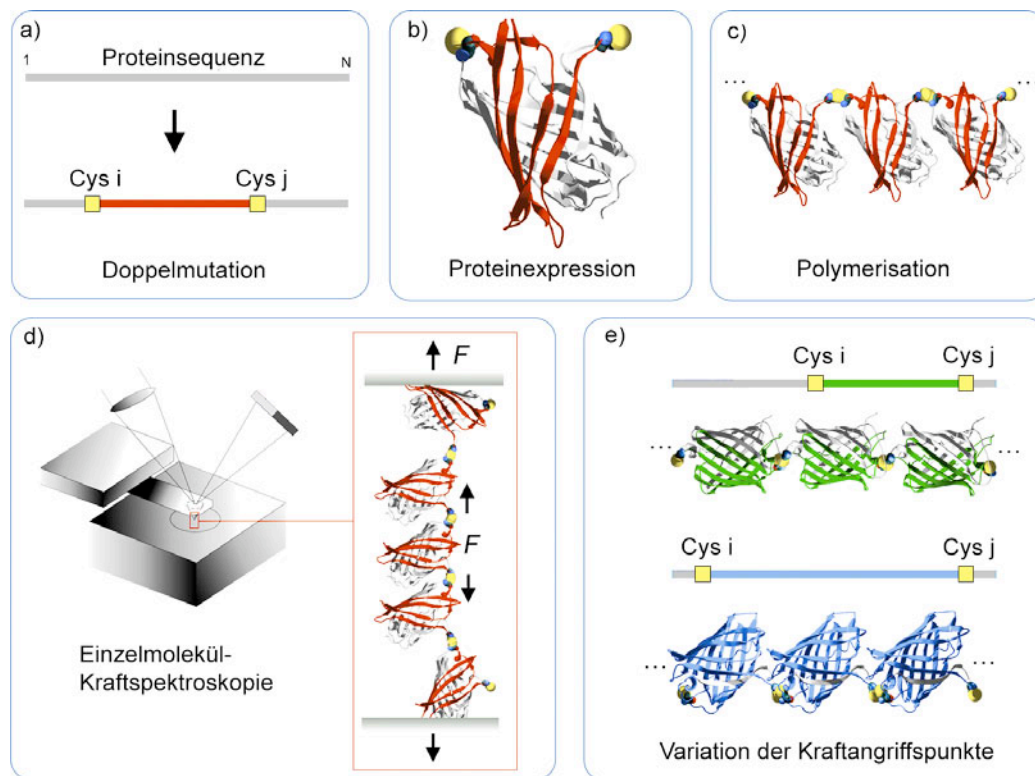


Abbildung 1.2: Cysteine Engineering Prinzip. a) Austausch von zwei nativen Aminosäuren i, j in der Sequenz eines Proteins durch Cysteine. b) Proteinexpression und Faltung in die intakte Raumstruktur. Die Cystein-Restgruppen sind übertrieben groß dargestellt. c) Polymerisation über Schwefelbrückenbindungen. d) Einzelmolekül-Experimente mit einem Kraftspektrometer. Kraft wird punktuell an das Peptidrückgrat der verknüpfenden Aminosäuren i, j angelegt. e) Variation der Kraftangriffspunkte über Variation der Cystein-Positionen in der Proteinsequenz.

Eine auf Cysteinen basierende Polymerisation wurde bereits durch Yang et al. demonstriert [115]. Der Ansatz von Yang et al. erforderte jedoch explizit eine Kristallisation der Proteinprobe, um Polyproteine mit mehr als 3 Untereinheiten zu erzeugen. Zudem ist es mit dieser Methode nicht möglich, Kraftangriffspunkte frei zu wählen.

Cysteine Engineering basiert auf einer Polymerisation über zwei identische reaktive Gruppen und erfordert freien Lösungsmittelzugang zu den Restgruppen der zwei reaktiven Cysteine. Es sind zwei um 180° gedrehte Orientierungen für die Untereinheiten in einer Polyproteinkette möglich. Die Untereinheiten der Polyproteine werden jedoch in mechanischen Experimenten punktuell über die beiden Cysteine mit Kraft belastet. Die Geometrie der Kraftbelastung ist inversionssymmetrisch. Damit ist die relative Orientierung der Untereinheiten in Polyproteinen für Kraft-Ausdehnungsexperimente irrelevant. Ein Problem könnte aus der Doppelmodifikation der Aminosäuresequenz eines Proteins resultieren. Die Mutationen könnten zu fehlgefalteten oder nicht funktionalen Proteinen führen. Aus diesem Grund muß eine Faltungskontrolle des zu untersuchenden Proteins ein wesentlicher Bestandteil eines Cysteine Engineering Protokolls sein.

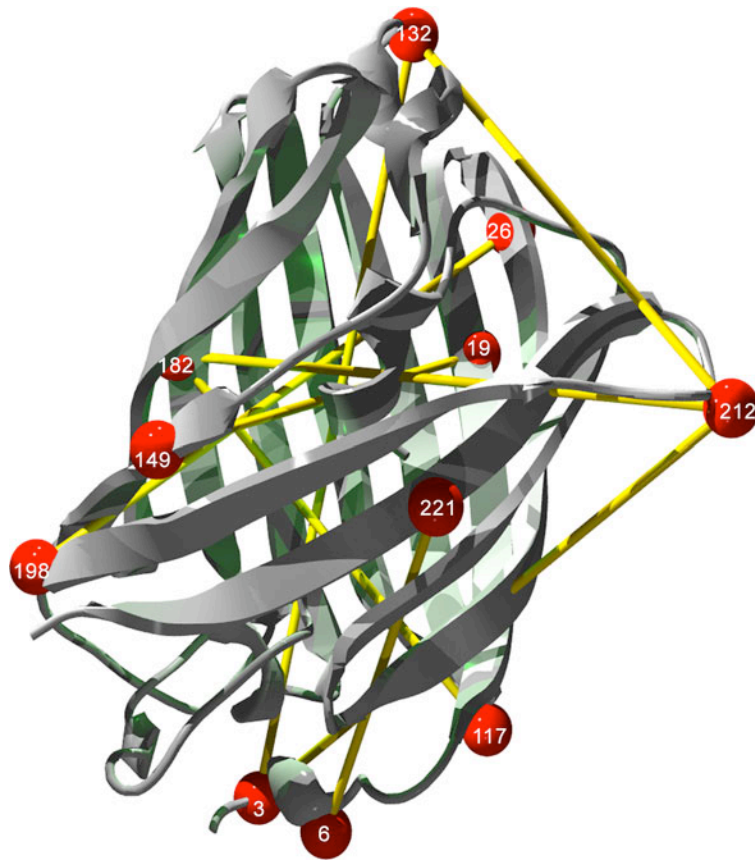


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Kristallstruktur 1EMB des GFP [8][15]. Die gelben Zylinder illustrieren die acht verschiedenen Belastungsrichtungen, deren mechanische Eigenschaften in dieser Arbeit untersucht werden. Rote Kugeln zeigen die Positionen der Aminosäuren in der nativen GFP Struktur an, die paarweise durch Cysteine ersetzt wurden. Die Bindungen der Restgruppen an das Peptidrückgrat dieser Aminosäurepaare definieren mit atomarer Genauigkeit die Punkte, über die Kraft an das Protein angelegt wird.

1.3 Das Grün Fluoreszierende Protein (GFP)

Für die folgenden Untersuchungen ist das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) als Modellprotein gewählt worden. GFP ist ein aus 238 Aminosäuren bestehendes, globuläres Protein. Die gefaltete Raumstruktur kristallisierter GFP Moleküle ist 1996 in atomarer Auflösung unabhängig voneinander durch Yang et al. [114] und durch Ormö et al. [79] bestimmt worden und ist in Abb. 1.3 im Band-Modell dargestellt. Das GFP ist ein topologisch komplexes Protein: elf β -Stränge sind derart aneinander gelagert, dass eine einem Fass ähnelnde Struktur entsteht. Diagonal durch das Fass verläuft eine α -Helix, die das für die Fluoreszenz des Moleküls verantwortliche Chromophor im Zentrum der Struktur positioniert. Das Chromophor wird aus den Aminosäuren Ser65, Tyr66 und Gly67 über einen autokatalytischen Ringschluss gebildet [106]. Die Raumstruktur des GFP ist in der Literatur als ein biochemisch nahezu inertes und thermodynamisch ausserordentlich stabi-

les Faltungsmotiv bekannt [106][120]. Faltungsstudien am GFP sind jedoch rar und werden durch die sehr langsame Kinetik des Proteins erschwert [38][53]. Erste Untersuchungen der mechanischen Eigenschaften des N-C Terminus des GFP zeigten jedoch eine überraschend niedrige mechanische Stabilität [32][1][82]. Die Fluoreszenzeigenschaften des GFP sind seit vielen Jahren Thema aktiver Forschung [67][77][83][84][102][108][109]. Ein wichtiges Ergebnis ist, dass die Fluoreszenzeigenschaften des GFP empfindlich von der Präsenz der intakten Raumstruktur des Proteins abhängen. Die Fluoreszenz des GFP ist ein Indikator für die korrekte Faltung des Proteins in die native Raumstruktur.

Das GFP ist damit ein ausgezeichnetes Modellprotein, um die mechanischen Eigenschaften einer komplexen Proteinstruktur mit der Kombination aus Cystein Engineering und Einzelmolekül-Kraftspektroskopie zu untersuchen. Die Fluoreszenzeigenschaften des Moleküls ermöglichen dabei auf einfache Weise eine Überprüfung der korrekten Faltung von Zweifach-Cystein modifizierten GFP Molekülen in die native Raumstruktur.

Für die folgenden Untersuchungen sind acht repräsentative Belastungsrichtungen ausgewählt worden, die schematisch in die Kristallstruktur des GFP in Abbildung 1.3 eingezeichnet worden sind. Die Belastungsrichtungen werden im folgenden durch das Indexpaar (i, j) der gewählten Aminosäuren bezeichnet.

1.4 Kraft-Ausdehnungsantwort von GFP Polyproteinen

Die acht ausgewählten Aminosäurepaare (i, j) sind in der GFP Sequenz jeweils durch Cysteine ersetzt worden und die mutierten GFP Moleküle polymerisiert worden. Das verwendete Protokoll ist in Anhang A.4 dargelegt. Die korrekte Faltung in die native GFP Struktur und die intakte Funktionalität aller untersuchten Zweifach-Cystein modifizierten und polymerisierten GFP Moleküle wird in Anhang A nachgewiesen. Die Kraft-Ausdehnungsantwort der verschieden verknüpften GFP Polyproteine wurde mit einem AFM-Kraftspektrometer untersucht. Experimentelle Details sind in Anhang D dargelegt. Abbildung 1.4 zeigt die Kraft-Ausdehnungsantwort eines über das Aminosäurepaar (6,221) verknüpften GFP-Polyproteins. Die Eigenschaften der Kraft-Ausdehnungsantwort einzelner Polyproteine sollen an dieser Kraftkurve exemplarisch erläutert werden.

Aufgetragen ist die am Cantilever des Kraftspektrometers wirkende Rückstellkraft in Abhängigkeit von der Ausdehnung des Moleküls. Bei kleinen Ausdehnungen (in Abb. 1.4 bis etwa 80 nm, grau markiert) beobachtet man komplexe, unreproduzierbare Muster in der Kraftkurve. Diese Muster werden durch Oberflächenwechselwirkungen und multiple Wechselwirkungen mit mehreren Molekülen bei noch geringen Abständen zwischen Cantilever und Probenoberfläche verursacht (Schema (1) in Abb.1.4). Im günstigen Fall wie in der Kraftkurve in Abb. 1.4 bleibt nach Zusammenbruch der Vielfachwechselwirkungen nur noch ein einzelnes Polyprotein-Molekül zwischen Cantilever und Probenoberfläche eingespannt. Für Ausdehnungen größer 80 nm beobachtet man nun eine reproduzierbare und äquidistante Abfolge von Kraftzacken. Dies ist die typische Signatur, die durch die

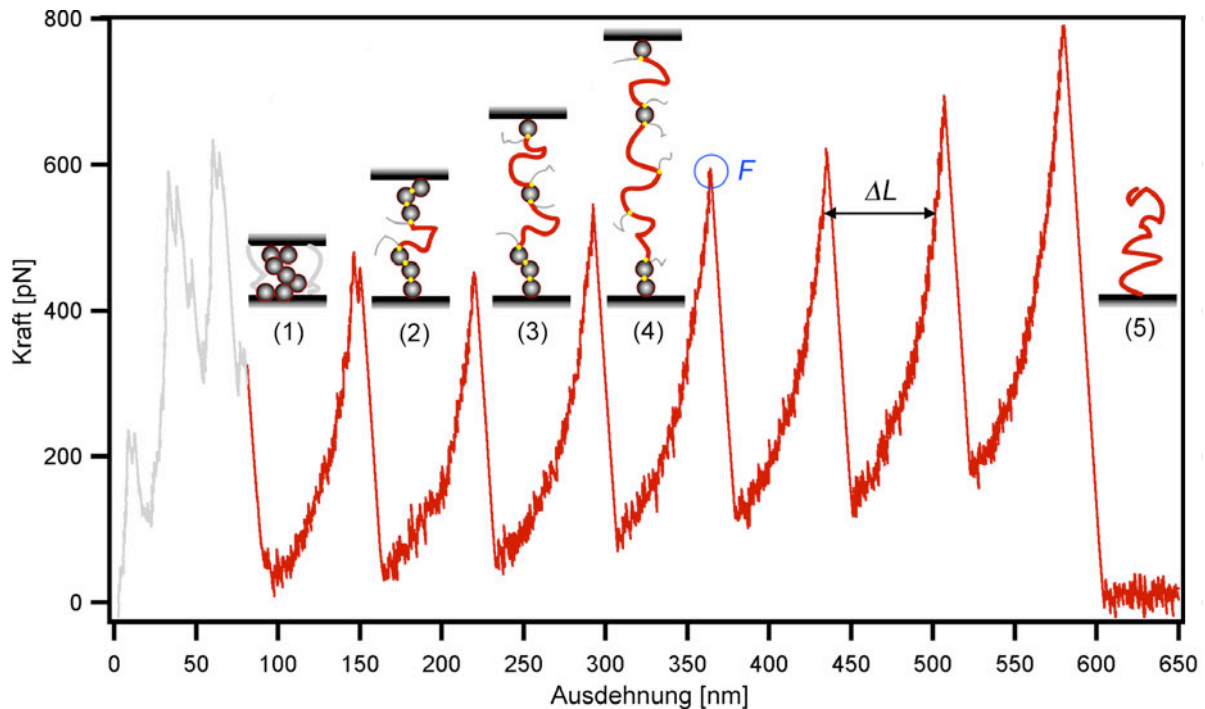


Abbildung 1.4: Typische Kraft-Ausdehnungsantwort eines einzelnen über die Geometrie (6,221) polymerisierten GFP Polyproteins.

Ausdehnung eines einzelnen Polyprotein-Moleküls verursacht wird [26]. Am Punkt der maximalen Kraft in jedem Zacken in Abb. 1.4 kommt es zu einem plötzlichen, kraftinduzierten Zusammenbruch einer einzelnen gefalteten Proteinstruktur in der gedehnten Polyproteinkette (vgl. Schemata (2)-(4) in Abb. 1.4). Dieser Bruch verlängert schlagartig die gestreckte Polyproteinkette um die Zahl der zwischen den Verknüpfungspunkten befindlichen Aminosäuren. Die Aminosäuren, die zwar ebenfalls Teil der zusammengebrochenen gefalteten Struktur sind, aber sich nicht zwischen den verknüpfenden Aminosäuren (i, j) befinden, tragen nicht zu dieser Verlängerung bei.

Die Rückstellkraft des gestreckten, aber nun längeren Moleküls ist deutlich geringer als vor dem Bruchereignis. Der Cantilever relaxiert daher ungestört auf ein Kraftniveau, das durch die entropische Elastizität der verlängerten Polyproteinkette bestimmt wird. Die Polyproteinkette ist eine Reihenschaltung von Abschnitten mit verschiedenen Federhärten. Entfaltete Aminosäurenketten haben eine um drei Größenordnungen kleinere Federhärte als gefaltete Strukturen. Das elastische Verhalten eines Polyproteins ist daher bereits ab der Präsenz von einigen zehn entfalteten Aminosäuren im Polyprotein vollständig durch die entfalteten Abschnitte dominiert [90]. Die gesamte Ausdehnung wird durch Dehnung der entfalteten Abschnitte verursacht. Die noch gefalteten Strukturen spüren jedoch aufgrund der Reihenschaltung die gleichen Kräfte. Die Präsenz von gefalteten Strukturen im gedehnten Polyprotein macht sich daher nur durch Bruchereignisse bemerkbar, die die Abschnitte entfalteter Aminosäureketten verlängern. Weiteres Ausdehnen des Moleküls nach einem

Bruchereignis erhöht wieder die Kraftbelastung in der Kette, bis es zu einem erneuten Zusammenbruch einer gefalteten Struktur kommt. Dieser Vorgang wiederholt sich, bis entweder die letzte noch gefaltete Proteinstruktur im gedehnten Polyprotein zusammenbricht oder das Molekül von Cantilever oder der Probenoberfläche abreißt. Beim Abriß des Moleküls sinkt die detektierte Kraftbelastung am Cantilever wieder auf Null ab (vgl. (5) in Abb. 1.4). In Abb. 1.4 sind ein teilweise verdecktes und sechs eindeutige Bruchereignisse zu beobachten. Es wurde also ein GFP Polyprotein gestreckt, das aus mindestens sieben GFP Molekülen bestand. Die Verknüpfung zwischen den einzelnen Untereinheiten ist dabei stabiler als die Raumstruktur des GFP. Kovalente Bindungen brechen erst ab Zugkräften um 1.5 nN [40]. Die kovalente Verknüpfung der einzelnen Moleküle über die selektiv eingeführten Cysteine wird daher direkt durch die Beobachtbarkeit der Kraftkurve in Abbildung 1.4 gezeigt. Würde es sich bei der Verknüpfung lediglich um eine durch die eingeführten Cysteine induzierte Kontaktflächenwechselwirkung zwischen benachbarten Domänen handeln, so müsste die Polyproteinkette beim Zusammenbruch der ersten gefalteten Proteinstruktur auseinander reißen. Abb. 1.4 zeigt, dass dies nicht der Fall ist.

Es konnte die Kraft-Ausdehnungsantwort von GFP Polyproteinen in allen acht Verknüpfungsgeometrien erfolgreich mit dem Kraftspektrometer untersucht werden. Abbildung 1.5 zeigt Ausschnitte typischer Einzelmolekül-Kraftkurven für alle untersuchten Belastungsrichtungen. Die bereits angesprochenen multiplen Wechselwirkungen und der Abriss der Moleküle (siehe Abb. 1.4) sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht abgebildet. Alle Kraftkurven zeigen die Eigenschaften, die durch die Kraft-Ausdehnungsantwort einzelner Polyprotein-Moleküle verursacht werden [26]: eine Abfolge von äquidistanten Kraftzacken².

Es fällt auf, dass die Längenskala, auf der Bruchereignisse stattfinden, stark zwischen den Verknüpfungsrichtungen variiert. Beispielsweise beträgt der Abstand zwischen einzelnen Kraftzacken für die Richtung (182,212) nur etwa 7 nm, während er für (6,221) verknüpfte GFP Polyproteine etwa 70 nm, also das Zehnfache, beträgt. Dies ist auf die unterschiedliche Verknüpfungsgeometrie der Polyproteine zurückzuführen. Während nach dem Zusammenbruch einer (182,212) verknüpften GFP Struktur nur 20 Aminosäuren für die weitere Ausdehnung innerhalb des gestreckten Polyproteins zur Verfügung stehen, werden bei (6,221) verknüpften GFP Strukturen 215 Aminosäuren, also auch die zehnfache Zahl an Aminosäuren, für die weitere Ausdehnung freigesetzt. Die Übereinstimmung im relativen Längenzuwachs und der relativen Zahl an freigesetzten Aminosäuren zeigt die spezifische Verknüpfung einzelner GFP Moleküle zu Polyproteinen an den gewünschten Positionen in der Raumstruktur des GFP. Eine genaue Analyse des Längenzuwachses wird im nächsten Kapitel vorgenommen.

Es fällt ebenfalls auf, dass die Kräfte, bei denen es zu Bruchereignissen in den Kraftkurven kommt, stark zwischen den verschiedenen Belastungsrichtungen variieren. Demnach

²Aufgrund der nichtlinearen Elastizität der Polyproteine müssen Abstände bei gleichen Kräften gemessen werden, also z.B entlang einer horizontalen Linie in Abb. 1.4. Die fluktuierenden Bruchkräfte erwecken den Eindruck von ebenfalls fluktuierenden Abständen zwischen den Zacken. Dies ist nicht der Fall.

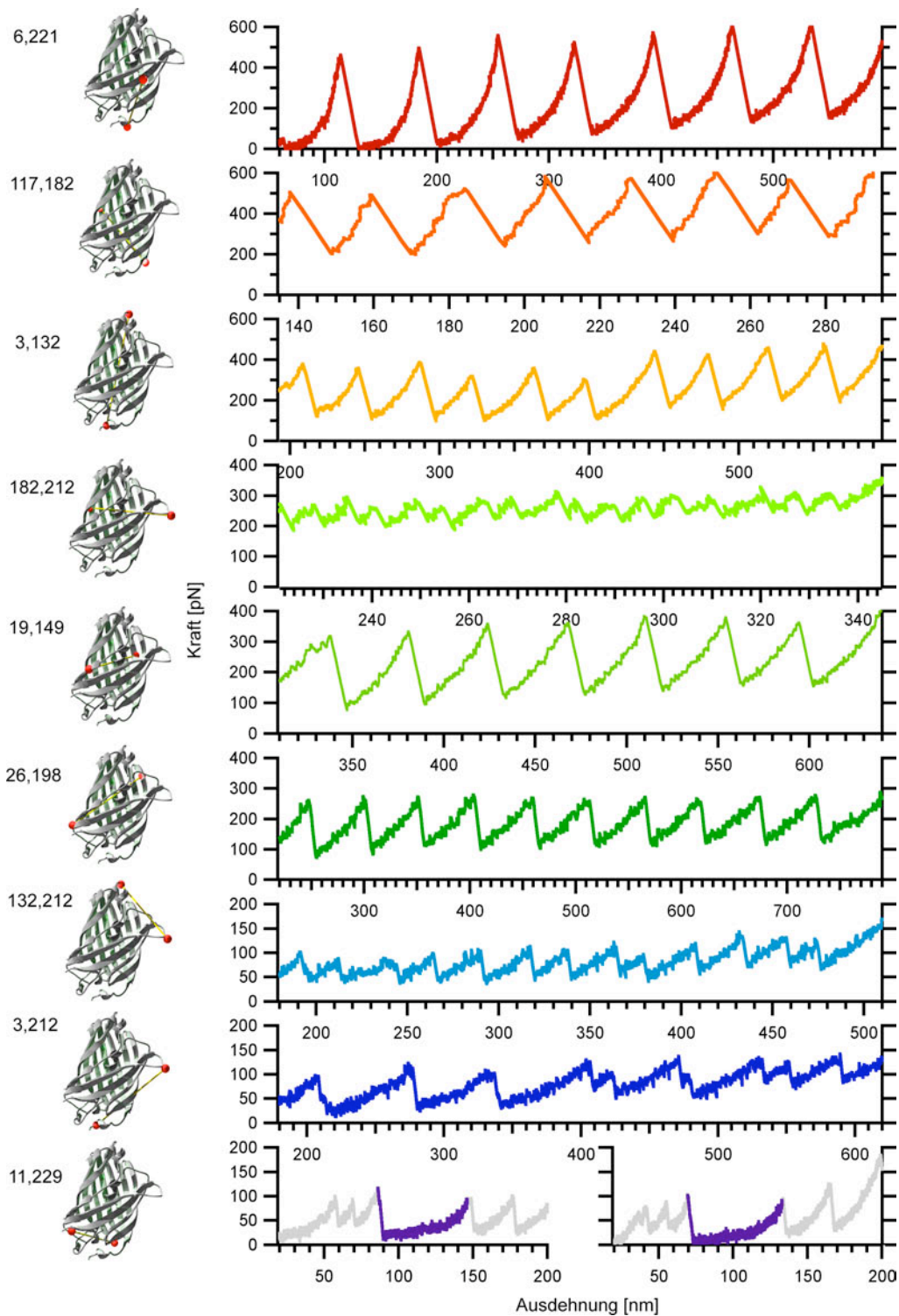


Abbildung 1.5: Links: Punkte, über die Kraft an einzelne GFP Moleküle in gedehnten Polyproteinen angelegt wird. Rechts: Ausschnitte typischer Kraftkurven, die an einzelnen GFP Polyproteinen gemessen wurden.

zeigt die GFP Raumstruktur eine ausgeprägte mechanische Anisotropie, deren Untersuchung Thema der Kapitel 5 und 6 sein wird.

In Abbildung 1.5 sind zusätzlich zwei Kraftkurven an Fusionspolyproteinen abgebildet, in denen jeweils nur ein einzelnes GFP Molekül über den N-C Terminus kovalent eingebunden war [32]. Aufgrund der Konstruktion dieser Fusionsproteine kann jeweils nur der Zusammenbruch eines einzelnen GFP Moleküls pro Kraftkurve beobachtet werden. Aussagekräftige Statistiken können mit solchen Fusionsproteinen nur unter deutlich höherem Aufwand als mit Polyproteinen erreicht werden.

1.5 Zusammenfassung

Es wurde die Kombination aus Einzelmolekül-Kraftspektroskopie mit Cysteine Engineering als Methode zur punktuellen Kraftbelastung der Raumstruktur einzelner Proteinmoleküle eingeführt und die Wahl des GFP als Modellsystem für die folgenden Untersuchungen begründet.

Es wurde die typische Kraft-Ausdehnungsantwort von GFP Polyproteinen vorgestellt, die in verschiedenen Geometrien über zwei Punkte in der Raumstruktur des GFP verknüpft sind und die spezifische und kovalente Verknüpfung der GFP Moleküle über die eingeführten Cysteine nachgewiesen.

Kapitel 2

Mechanische Strukturbestimmung an einzelnen Proteinmolekülen

In diesem Kapitel wird der Längenzuwachs analysiert, der durch den Zusammenbruch der GFP Raumstruktur bei Belastung mit Kraft über verschiedene Angriffspunkte entsteht. Aus dem Längenzuwachs können Information über die räumliche Anordnung der mit Kraft belasteten Aminosäuren in der gefalteten GFP Struktur vor dem Bruchereignis gewonnen werden.

2.1 Prinzip einer mechanischen intramolekularen Abstandsmessung

Die Tatsache, dass ein funktionales Proteinmolekül aus einer zwar kompliziert gefalteten, aber diskreten Aminosäurenkette besteht, führt zusammen mit der Möglichkeit zur punktgenauen Applikation von Kraft an eine Proteinstruktur zu einem vielversprechenden Aspekt, der anhand von Abbildung 2.1 schematisch erläutert wird. Mit Cystein Engineering ist es möglich, ein einzelnes Proteinmolekül exakt an zwei ausgewählten Aminosäuren i und j in einem Kraftspektrometer aufzugreifen (Abb. 2.1 a). Aminosäuren haben in gefalteten Proteinstrukturen einen endlichen Abstand d_{ij} voneinander, der typischerweise nur einige zehn Ångström beträgt. Über das Anlegen von genügend Kraft an die Aminosäuren i, j kann der Zusammenbruch der gefalteten Proteinstruktur erzwungen werden. Die Aminosäurenkette zwischen i und j kann nun vollständig ausgestreckt werden (Abb 2.1 b). Die gestreckte Länge L_{ij} der Aminosäurenkette ist jedoch exakt bestimmt und beträgt $(j - i)$ Aminosäuren. Weil die beiden Aminosäuren i und j aber bereits einen endlichen Abstand d_{ij} im gefalteten Ausgangszustand des Proteins haben, kann der nötige Weg ΔL_{ij} , um die Aminosäurenkette vollständig auszustrecken, nur immer etwas kleiner als die maximal mögliche Länge $L_{ij} = (j - i) \cdot d_{aa}$ sein. Der Faktor d_{aa} bezeichnet den Längenbeitrag einer einzelnen Aminosäure. Die Differenz aus der maximal möglichen Länge der Kette L_{ij} und dem Weg ΔL_{ij} bis zum Erreichen dieser Länge gibt daher den Abstand d_{ij} der beiden

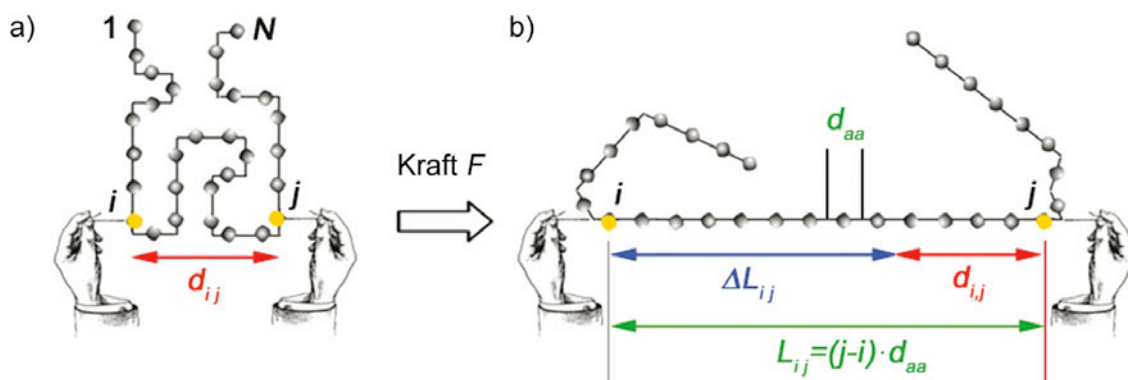


Abbildung 2.1: a) Aufgreifen eines Proteins an zwei Aminosäuren i und j . b) Durch Einwirkung einer mechanischen Zugkraft wird das Protein entfaltet und die Aminosäurenkette zwischen i und j ausgestreckt. Bei exakter Kenntnis von i, j kann aus dem nötigen Weg ΔL_{ij} , um die Kette auszustrecken, der intramolekulare Abstand d_{ij} der beiden Aminosäuren in der gefalteten Struktur des Proteins bestimmt werden.

Aminosäuren im gefalteten Zustand des Proteins wieder:

$$d_{ij} = (j - i) \cdot d_{aa} - \Delta L_{ij} \quad (2.1)$$

Der nötige Weg, um eine entfaltete Aminosäurenkette auszustrecken, entspricht dem Längenzuwachs ΔL_{ij} , der nach einem Bruchereignis in Einzelmolekülkraftkurven an Proteinen beobachtet wird. Dieser Längenzuwachs kann mit Subnanometer-Genauigkeit gemessen werden [25][90].

2.2 Messung von Längenzuwächsen

Entfaltete Proteine, d.h. *random coil* Aminosäureketten, verhalten sich mechanisch wie einfache Polymere. Zum Ausdehnen einer entfalteten Aminosäurenkette benötigt man eine Kraft (vgl. Abb. 2.2). Die Kraft-Ausdehnungsantwort von entfaltenen Aminosäureketten ist bei niedrigen Kräften (< 300 pN) entropisch bedingt, während es bei höheren Kräften zu enthalpischen Beiträgen durch Dehnung von Bindungen bzw. Biegung von Bindungswinkeln kommt [47]. Die Kraft-Ausdehnungsantwort entfalteter Aminosäurenketten lässt sich mit dem Worm-like Chain (WLC) Modell zur Polymerelastizität beschreiben [60]. Das WLC Modell verwendet dazu zwei Parameter, die Konturlänge L und die Persistenzlänge p . Die Konturlänge L beschreibt die Länge einer entfaltenen Aminosäurenkette im extrapolierten, vollständig gestreckten Zustand wie in Abb. 2.1 b). Der mit einem Entfaltungsereignis verbundene Längenzuwachs in den Kraftkurven an GFP-Polyproteinen wurde daher mit dem WLC Modell bestimmt. Dazu wurde die von Marko und Siggia eingeführte Interpolationsformel [22][72]

$$F_{WLC}(x) = \frac{k_B T}{p} \cdot \left(\frac{1}{4 \cdot (1 - x/L)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L} \right) \quad (2.2)$$

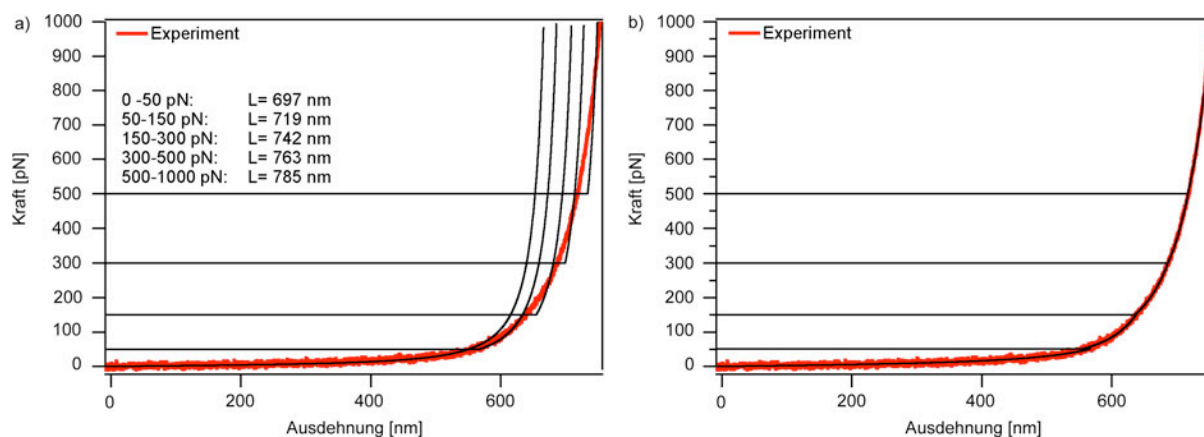


Abbildung 2.2: Kraft-Relaxationsantwort einer entfalteten Aminosäurenkette. Zwischen Cantilever und Oberfläche wurde ein GFP Polyprotein eingespannt und alle enthaltenen Strukturen vollständig entfaltet. Die entfaltete Aminosäurenkette wurde im Anschluss zehnmal relaxiert und wieder ausgedehnt und die erhaltenen Kraft-Relaxationskurven gemittelt. Kraft-Ausdehnungskurven konnten dafür nicht verwendet werden, da sich nach der Relaxation auf Null-Kraft Wechselwirkungen wie z.B. missgefaltete Strukturen in der Kette bilden, die zusätzliche Beiträge bei der erneuten Ausdehnung liefern.

des WLC-Modells an die experimentellen Kraftkurven angepasst. Die reale Elastizität entfalteter Aminosäurenketten weicht jedoch von der idealen WLC-Elastizität ab. Dies wird in Abb. 2.2 a) deutlich. An die experimentell bestimmte Kraft-Relaxationsantwort einer entfalteten Aminosäurenkette wurde das WLC Modell in verschiedenen Kraftbereichen mit konstanter Persistenzlänge $p = 0.5$ nm angefitet. Es zeigt sich zunehmend schlechter werdende Übereinstimmung mit dem Experiment in höheren Kraftbereichen. Lässt man auch den Parameter Persistenzlänge frei, so kann die experimentelle Kraft-Relaxationsantwort in Abb. 2.2 b) stückweise sehr gut reproduziert werden. Es zeigte sich, dass ein Wert von $p = 0.5$ nm im Kraftbereich von 50-150 pN die Kraft-Ausdehnungsantwort von entfalten Aminosäurenketten sehr gut reproduziert, während im Kraftbereich 150-500 pN $p = 0.35$ nm zu einer guten Übereinstimmung führt.

Abb. 2.2 a) macht deutlich, dass der Kraftbereich, in dem das WLC-Modell an die Daten angepasst wird, und die Wahl der Persistenzlänge den Ausgabewert Konturlänge L des Fits stark beeinflusst. Dabei führt ein Fit in höheren Kraftbereichen zu systematisch höheren Konturlängen. Die Zahl der Aminosäuren in der experimentell untersuchten Aminosäurenkette in Abb. 2.2 a) und damit die tatsächliche Konturlänge des untersuchten Moleküls ist jedoch in jedem Fall die gleiche.

Um WLC-Fits in verschiedenen Kraftbereichen und bei verschiedenen Persistenzlängen innerhalb des WLC-Modells zu vergleichen, müssen daher die aus einem Fit bestimmten Konturlängen mit einem Faktor γ auf eine gemeinsame Skala gebracht werden. Die Kraft-Ausdehnungsantwort der in dieser Arbeit untersuchten GFP-Polyproteine spielt sich in verschiedenen Kraftbereichen zwischen 50 und 700 pN ab (vgl. Abb. 1.5). Es wurde daher $L_{p=0.5;F \in [50,150]} = \gamma \cdot L_{p=0.35;F \in [150,500]}$ bestimmt. Dazu wurden experimentell 70

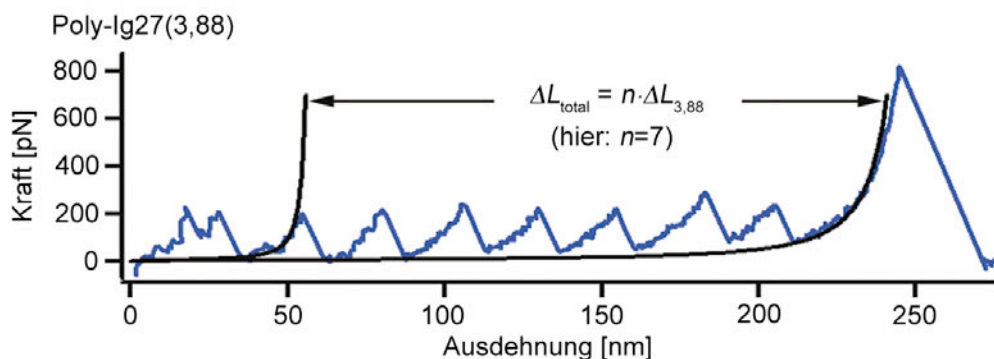


Abbildung 2.3: Typische Kraft-Ausdehnungsantwort von (3,88) verknüpften Ig27 Polyproteinen. Um den Konturlängenzuwachs ΔL pro Bruchereignis zu bestimmen, genügt es die Konturlänge des Polyproteins vor dem ersten (L_1) und nach dem letzten (n -ten) Bruchereignis (L_n) in einem äquidistanten Sägezahnmuster zu bestimmen und die Differenz $L_n - L_1$ aus beiden Konturlängen durch die Anzahl der beobachtete Bruchereignisse n zu dividieren. Dieses Verfahren ist äquivalent zu einer Mittelung.

Kraft-Ausdehnungskurven an entfaltenen Aminosäurenketten aufgenommen, die jeweils den gesamten Kraftbereich von 50 – 500 pN abdecken. Es wurden WLC-Kurven mit $p = 0.5$ nm im Kraftbereich 50-150 pN und WLC-Fits mit $p = 0.35$ nm im Kraftbereich 150 – 500 pN an Kraftkurven angefitet und die erhaltenen Konturlängen verglichen. Es ergab sich ein Wert von $\gamma = 0.966 \pm 0.0009$. Für die Analyse der Konturlängen in GFP(3,132), GFP(182,212), GFP(117,182), GFP(6,221), GFP(26,198), GFP(19,149) Kraftkurven wurde $p = 0.35$ nm verwendet, während für Kraftkurven an GFP(3,212) und GFP(132,212) $p = 0.5$ nm verwendet wurde. Die erhaltenen Ergebnisse wurden im Anschluss auf die Skala mit $F \in [50, 150]$ und $p = 0.5$ nm korrigiert.

2.3 Kalibration von Längenzuwächsen

Für strukturelle Interpretationen muss der Längenbeitrag d_{aa} in Gl. 2.1 einer einzelnen Aminosäure präzise bekannt sein. Dieser Faktor wurde für den Kraftbereich 50 pN bis 150 pN mit $p = 0.5$ nm experimentell kalibriert. Dazu wurden zwei verschiedene Proteine mit bekannter Raumstruktur verwendet, Ig27 und DdFLN(1-5).

Mit Cystein Engineering wurden dafür Polyproteine der Domäne Ig27 aus menschlichem Herzmuskeltitin konstruiert, die über das Aminosäurenpaar (3,88) verknüpft worden sind. Abb. 2.3 zeigt eine typische Kraft-Ausdehnungskurve an einem Ig27(3,88) Polyprotein. Der für die Skala mit $F \in [50, 150]$ pN und $p = 0.5$ nm bestimmte mittlere Konturlängenzuwachs pro Ig27(3,88) Bruchereignis beträgt $\langle \Delta L_{3,88} \rangle = 27.62 \pm 0.04$ nm ($N = 379$). Der Abstand der Aminosäuren 3 und 88 in einer gefalteten Ig27-Domäne beträgt laut der NMR-Strukturdatei 1TIT [50][8] $d_{3,88} = 3.52 \pm 0.1$ nm. Damit beträgt die Gesamtlänge der ausgestreckten Aminosäurenkette laut Gl. 2.1 $L_{3,88} = 31.14 \pm 0.1$ nm.

Mit $L_{3,88} = (88 - 3) \cdot d_{aa}$ folgt für den Längenbeitrag einer Aminosäure $d_{aa} = 0.366 \pm 0.002$ nm.

Zur unabhängigen Bestätigung des Kalibrationsfaktors wurde der Konturlängenzuwachs bestimmt, der mit der Entfaltung einzelner Proteindomänen aus *Dictyostelium discoideum* Filamin (DdFLN(1-5)) verbunden ist. DdFLN(1-5) ist ein aus fünf Domänen bestehendes, über die Termini verknüpftes modulares Polyprotein. Jede Domäne besteht aus exakt 100 Aminosäuren. Der mittlere Längenzuwachs $\langle \Delta L_{1,100} \rangle$ der durch das Entfalten einer einzelnen DdFLN-Domäne verursacht wird, beträgt $\langle \Delta L_{1,100} \rangle = 32.5 \pm 0.1$ nm [97][32]. Der Abstand der Aminosäuren 1 und 100 in der gefalteten DdFLN-Struktur beträgt $d_{1,100} = 4 \pm 0.1$ nm laut der NMR-Strukturdatei 1WLH [85][8]. Aus diesen zwei Werten erhält man eine Gesamtlänge von $L_{1,100} = 36.5 \pm 0.2$ nm. Aus Gl. 2.1 folgt demnach für den Längenbeitrag einer einzelnen Aminosäure $d_{aa} = 0.365 \pm 0.002$ nm.

Der Kalibrationsfaktor d_{aa} , der unabhängig mit zwei verschiedenen Proteinen und ihren NMR Strukturdaten bestimmt wurde, stimmt sehr gut überein. Es wird $d_{aa} = 0.365$ nm daher in der gesamten Arbeit für alle Strukturinterpretationen verwendet.

2.4 Intramolekulare Abstände im GFP

Abbildung 2.4 a) zeigt Histogramme des Längenzuwachses ΔL_{ij} , der durch den Zusammenbruch der Raumstruktur einzelner GFP Moleküle bei Belastung über verschiedene Aminosäuren (i, j) erzeugt wird. Die Histogramme in Abb. 2.4 a) geben die Anzahl an Polyprotein-Kraftkurven an, in denen ein bestimmter mittlerer Längenzuwachs pro Bruchereignis beobachtet wurde. Pro Kraftkurve sind in etwa 5 bis 15 Bruchereignisse beobachtet worden. Die roten Balken in Abb. 2.4 a) zeigen jeweils die maximal mögliche Länge $L_{ij} = (j - i) \cdot d_{aa}$ einer zwischen i und j ausgestreckten Aminosäurenkette an. Der Längenbeitrag einer Aminosäure d_{aa} beträgt wie oben beschrieben 0.365 nm. Abbildung 2.4 zeigt deutlich, dass der experimentell beobachtete Längenzuwachs in allen Verknüpfungsrichtungen immer etwas kleiner ist als die maximal mögliche Länge der ausgestreckten Aminosäurenkette. Der Unterschied beträgt dabei jeweils nur wenige Nanometer.

Bestimmt man entsprechend Gleichung 2.1 die Differenz aus der maximal möglichen Länge¹ L_{ij} und dem mittleren, experimentell beobachteten Längenzuwachs für jede der acht Verknüpfungsrichtungen, so ergeben sich die durch die farbigen Balken in Abbildung 2.4 b) dargestellten fehlenden Längen. Laut Gleichung 2.1 sollten diese Fehlbeträge den Abstand der aufgegriffenen Aminosäuren i, j im gefalteten Zustand des GFP wiedergeben. In Abbildung 2.4 b) sind zum Vergleich die intramolekularen Abstände der Aminosäuren i und j aus der Kristallstruktur des GFP als graue Balken eingetragen. Der absolute Fehler der mechanischen Messung ($\sigma = (j - i)\sigma_{aa} + \sigma_{ij}$, wobei σ_{aa} den Fehler der Kalibrati-

¹Für die Berechnung der maximal möglichen Länge muss eine Besonderheit im GFP beachtet werden: Das Chromophor des GFP wird durch kovalente Zyklisierung der drei Aminosäuren Ser-65, Tyr-66 und Gly-67 gebildet. Die Rückgrat-Länge des ausgestreckten Chromophores entspricht daher nur der zwei- statt dreifachen Länge d_{aa} einer Aminosäure [106]. Es muss daher $L_{ij} = (j - i - 1) \cdot d_{aa}$ statt $L_{ij} = (j - i) \cdot d_{aa}$ für alle Verknüpfungsrichtungen, deren Entfaltung das Chromophor einschliesst, verwendet werden.

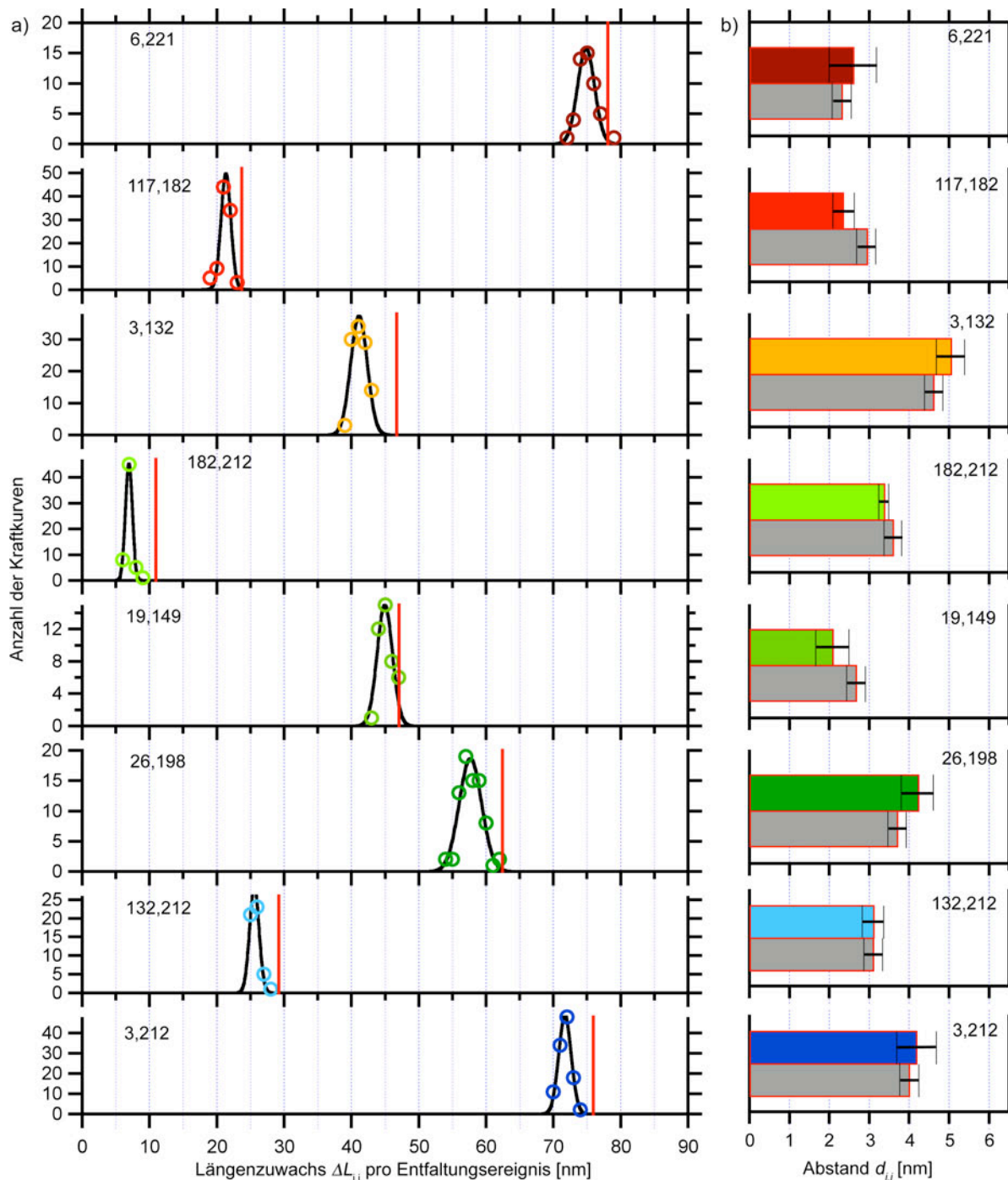


Abbildung 2.4: a) Kreise: Histogramme des mittleren Längenzuwachses ΔL_{ij} pro Entfaltungsereignis in GFP Polyproteinkraftkurven. Schwarze Linien: gefittete Normalverteilungen. Rote Balken: Länge einer $(j-i)$ langen, ausgestreckten Aminosäurekette. b) Farbige Balken: Experimentell bestimmte Differenz zwischen gemessenem Längenzuwachs pro Entfaltung und der Länge eines $(j-i)$ langen Aminosäurestranges. Graue Balken: Intramolekularer Abstand zwischen den C_α Atomen der jeweiligen Aminosäuren i, j laut GFP Kristallstruktur 1EMB [15][8]. Fehlerbreiten sind als schwarze Linien eingetragen.

on und σ_{ij} den Fehler des Mittelwertes des jeweiligen Längenzuwachses beschreibt), und die Auflösung der Kristallstruktur (2.1 Å) sind in Form von schwarzen Linien eingetragen. Es ist ersichtlich, dass in allen Verknüpfungsrichtungen die mechanisch bestimmten Abstände mit den intramolekularen Abständen in der Kristallstruktur des GFP bis auf wenige Ångström übereinstimmen. Die Abweichungen von den Kristallstrukturabständen liegen dabei innerhalb des Messfehlers. Es sind keinerlei systematische Abweichung von den Kristallstrukturabständen zu erkennen. Die Belastung mit Zugkraft führt offenbar zu keinerlei signifikanten Deformationen der GFP Struktur. Es lässt sich daher für alle untersuchten Belastungsrichtungen folgendes schliessen:

- Die GFP Moleküle sind bis zum Bruchereignis vollständig intakt.
- Die Raumstruktur des GFP wird durch das Anlegen von Kraft nicht signifikant deformiert.

2.5 Mechanische Triangulation

In der obigen Analyse sind alle drei intramolekularen Abstände zwischen den drei Aminosäuren 3, 132 und 212 des GFP bestimmt worden. Über die geometrische Beziehung $d_{i,j} = \sqrt{(x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2 + (z_i - z_j)^2}$ können den drei Aminosäuren daher auch Koordinaten in der von ihnen aufgespannten Ebene innerhalb der Raumstruktur des Proteins zugewiesen werden. Das sich so ergebende Dreieck mit den Aminosäuren 3, 132 und 212 als Eckpunkte ist in Abb. 2.5 abgebildet. Zum Vergleich ist Abb. 2.5 mit der Kristallstruktur des GFP hinterlegt worden. Die Kristallstruktur wurde dabei so orientiert, dass die C_α -Atome der Aminosäuren 3, 132 und 212 in die Bildfläche fallen. Dadurch ist ein direkter Vergleich der Positionen in der Kristallstruktur mit den hier bestimmten Positionen möglich. Der absolute Messfehler der mechanischen Positionsbestimmung ist in Abb. 2.5 in Form von schwarzen Kreisen eingetragen. Dieser Fehler ist hauptsächlich statistischer Natur und kann u.a. durch genauere Bestimmung des Kalibrationsfaktors d_{aa} weiter reduziert werden. Der Vergleich mit den aus Röntgenkristallographie-Experimenten bestimmten Strukturdaten von GFP zeigt nahezu perfekte Übereinstimmung im Rahmen des 0.4 nm betragenden Messfehlers. Die Positionen der drei Aminosäuren sind damit mechanisch trianguliert worden.

2.6 Bestimmung von teilentfalteten Strukturen

Eine wesentliche Voraussetzung für eine mechanische Abstandsmessung und Gleichung 2.1 ist, dass der Längenzuwachs ΔL_{ij} , der mit einem Entfaltungsereignis verbunden ist, auf die Entfaltung aller Aminosäuren zwischen den aufgegriffenen Aminosäuren i, j zurückgeht. Es kann der Fall eintreten, dass es zu einer Teilentfaltung des Proteins vor dem dominanten Entfaltungsereignis kommt. In diesem Fall ist Gleichung 2.1 nicht mehr anwendbar,

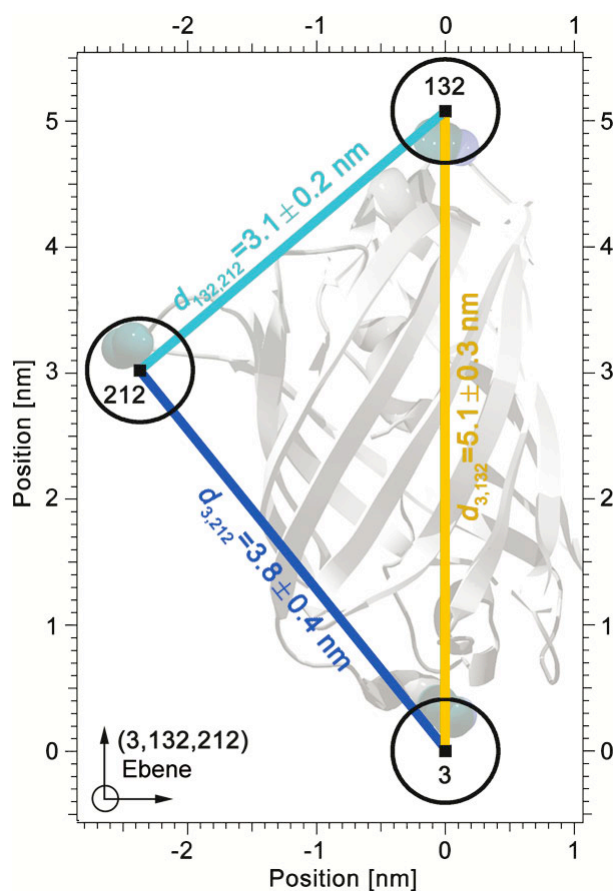


Abbildung 2.5: Intramolekulare Abstände (farbige Linien) $d_{132,212}$, $d_{3,132}$ und $d_{3,212}$ sowie die daraus resultierenden Positionen der Aminosäuren 3, 132 und 212 in der gefalteten GFP Struktur, ermittelt in Einzelmolekülexperimenten. Schwarze Kreise zeigen den absoluten Messfehler an. Die Graphik wurde mit der GFP Kristallstruktur 1EMB [15][8] ebenenparallel hinterlegt.

da die Indizes der Aminosäuren, über die Kraft an die noch verbleibende, feste Struktur angelegt wird, nicht mit den Indizes der vermeintlich aufgegriffenen Aminosäuren i, j übereinstimmen. Dieser Fall kann ebenfalls am GFP beobachtet werden. In Vorarbeiten [29][32][74] wurden Fusionspolyproteine analysiert, in denen jeweils ein einzelnes GFP Molekül über den N- und C-Terminus (Aminosäuren 1, 229) kovalent eingebunden war. Abb. 2.6 zeigt die Verteilung des Längenzuwachses der durch das dominante Entfaltungsereignis N-C terminal belasteter GFP-Moleküle erzeugt wird². Pro Einzelmolekülkraftkurve konnte aufgrund der Konstruktion der Fusionsproteine jeweils nur ein GFP Entfaltungsereignis beobachtet werden. Eine Vormittelung des Längenzuwachses pro Entfaltungsereignis wie oben vorgestellt ist daher nicht möglich. Das Histogramm in Abb. 2.6 a) ist daher entsprechend breiter als die vorgemittelten Histogramme in Abb. 2.4 a). Vergleicht man wieder die Differenz aus maximal möglicher Länge $L_{1,229}$ eines vollständig entfaltenden GFP

²Siehe Abb.1.5 für typische Kraftkurven.

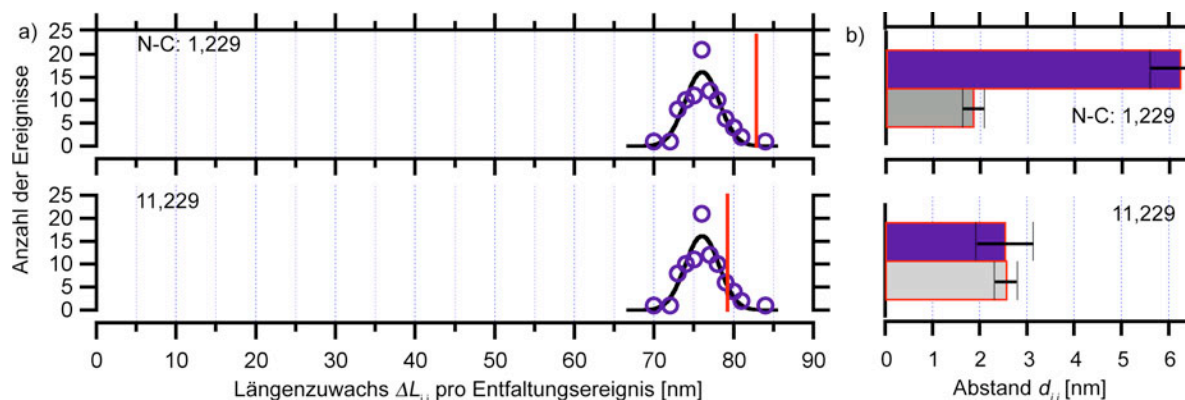


Abbildung 2.6: a) Kreise: Histogramm des mittleren Längenzuwachses ΔL_{ij} pro Entfaltungsereignis bei N-C terminaler Belastung des GFP. Schwarze Linien: gefittete Normalverteilungen. Rote Balken: Länge einer $(j - i)$ langen, ausgestreckten Aminosäurenkette. b) Farbige Balken: Experimentell bestimmte Differenz zwischen gemessenem Längenzuwachs pro Entfaltung und der Länge eines $(j - i)$ langen Aminosäurestranges. Graue Balken: Intramolekularer Abstand zwischen den C_α Atomen der jeweiligen Aminosäuren i, j laut GFP Kristallstruktur 1EMB [15][8]. Fehlerbreiten sind als schwarze Linien eingetragen.

Moleküls und gemessenem Längenzuwachs mit dem Kristallstrukturabstand zwischen N- und C-Terminus des GFP, so ergeben sich die oberen Graphen in Abb. 2.6. Der mechanisch bestimmte Abstand für die N-C terminale Richtung (1,229) ist mehr als dreimal so gross wie der Kristallstrukturabstand. Diese starke Diskrepanz deutet darauf hin, dass die Raumstruktur des GFP beim dominanten Entfaltungsereignis nicht mehr vollständig intakt ist. Bei N-C terminaler Kraftbelastung des GFP kommt es zunächst zum Ablösen einer N-terminalen α -Helix, die die Aminosäuren 1 bis 10 umfasst. Dieser Übergang kann in Einzelmolekül-Kraftkurven direkt beobachtet werden [29][32]. Das bedeutet, das dominant erscheinende Entfaltungsereignis entspricht nicht der Entfaltung einer $i = 1$ bis $j = 229$ Aminosäuren umfassenden Struktur, sondern hier wird Kraft an eine gefaltete Struktur angelegt, die bereits zehn Aminosäuren kleiner ist. Gleichung 2.1 ist zwar gültig, aber die Indizes sind nicht mehr bekannt.

Wählt man jedoch die Aminosäuren $i = 11$ und $j = 229$ und vergleicht wieder die Differenz aus der ausgestreckten Länge $L_{11,229}$ und dem experimentell ermittelten Längenzuwachs ΔL in N-C terminaler Richtung mit dem Kristallstrukturabstand zwischen Aminosäuren 11 und 229, so ergeben sich die unteren Graphen in Abbildung 2.6. Der mechanisch bestimmte Abstand reproduziert nun nahezu perfekt den Kristallstrukturabstand. Zusammen mit der direkt beobachteten Teilentfaltung von zehn Aminosäuren und der Annahme, dass die verbleibende Struktur immer noch mit der Kristallstruktur übereinstimmt³, kann daher geschlossen werden, dass das dominante Bruchereignis durch die Entfaltung der Aminosäuren 11 bis 229 verursacht wird.

³Im Falle der N-C terminalen Teilentfaltung des GFP konnten genügend Hinweise gesammelt werden, die diese Annahme überzeugend stützen (vgl. Anhang B und [32][74][75]).

Das bedeutet, die Analyse des Längenzuwachses und Gleichung 2.1 kann ebenfalls dazu verwendet werden, die gefaltete Reststruktur von teilentfalteten Proteinen zu identifizieren. Dies ist allerdings nur unter folgenden Voraussetzungen möglich:

- Die Raumstruktur des Protein ist vollständig bekannt.
- Eine Teilentfaltung lässt die verbleibende Raumstruktur intakt.

2.7 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die Bestimmung von acht intramolekularen Abständen zwischen einzelnen Aminosäuren und die mechanische Triangulation der Position von drei ausgewählten Aminosäuren in der gefalteten GFP Struktur beschrieben. Die gemessenen Abstände und Positionen zeigten keinerlei signifikante Abweichungen von der GFP Kristallstruktur. Es konnte daher geschlossen werden, dass die Raumstruktur der untersuchten GFP Moleküle in allen Cystein-verknüpften Richtungen bis zum kraftinduzierten Zusammenbruch vollständig intakt und nicht signifikant deformiert ist. Mit diesen Messungen wurden damit erstmals intramolekulare Abstände in der Raumstruktur eines Proteins direkt an einzelnen Proteinmolekülen in ihrer nativen Umgebung bestimmt [33].

Kapitel 3

Dissoziation von Bindungen unter Kraft

An dieser Stelle werden kurz die theoretischen Grundlagen für das Verständnis der kraftinduzierten Dissoziation von Bindungen dargelegt. Es werden eine Einzelbindung sowie Bindungsnetzwerke unter Kraft betrachtet. Bindungsnetzwerke werden für die Interpretation der Mechanik der GFP Raumstruktur im späteren Verlauf der Arbeit wichtig. Die Kinetik des ersten Bindungsbruchs und kooperative Dissoziation in einem Bindungsnetzwerk unter Kraft wird anhand einer Reihenschaltung und einer Parallelschaltung illustriert. Die Untersuchung von Polyproteinen in einem Kraftspektrometer realisiert den Fall einer Reihenschaltung, deren Eigenschaften in diesem Kapitel daher kurz diskutiert werden.

3.1 Bindungspotentiale unter Kraft

Eine Bindung lässt sich als ein gebundenes Teilchen in einem Potentialtopf als Funktion des Abstands x zwischen den Bindungspartnern verstehen (vgl. Abb. 3.1) [52]. Eine Kombination aus repulsiven und attraktiven Wechselwirkungen erzeugt ein energetisches Minimum im Abstand x_N und eine den gebundenen Zustand eingrenzende energetische Barriere im Abstand x_T . Die Höhe einer energetischen Barriere ΔG^* bestimmt nach Arrhenius den Übergangsratenkoeffizienten k_0 für ein spontanes, thermisch aktiviertes Entweichen des Teilchens aus dem Potentialtopf.

$$k_0 = k_T \cdot \exp\left(-\frac{\Delta G^*}{k_B T}\right) \quad (3.1)$$

Der Vorfaktor k_T beschreibt dabei eine charakteristische Rate, mit der das gebundene Teilchen im Potentialtopf fluktuiert [36][59][49]. Wird die Bindung über eine Feder, z.B die Kombination aus einem sich mit der Geschwindigkeit v bewegenden Cantilever und entfalten Peptidsträngen mit Kraft belastet, so wird diese Bindung einem näherungsweise harmonischen, externen Potential ausgesetzt.

$$V_{ext} = \frac{1}{2}\kappa(x - vt)^2 \quad (3.2)$$

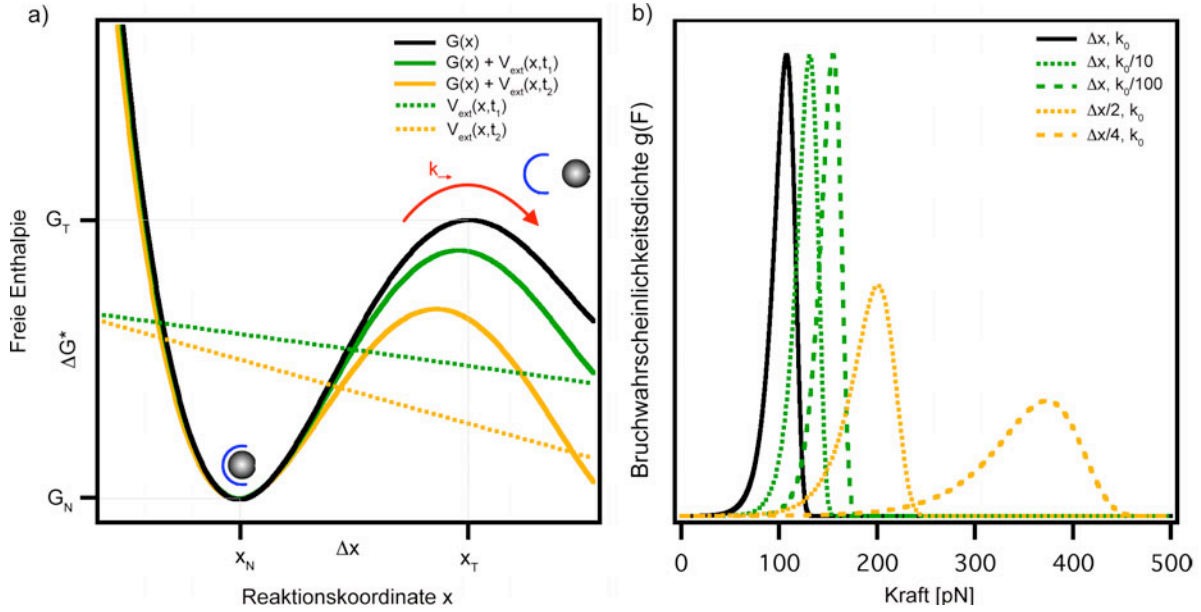


Abbildung 3.1: a) Schema eines Potentialtopfes, mit einem Minimum am Ort x_N und einer energetischen Barriere am Ort x_T . b) Wahrscheinlichkeitsdichten für den Bruch einer Bindung unter Kraft in Abhängigkeit verschiedener Potentialbreiten und Barrierenhöhen.

Das Minimum des externen Potentials wird mit der konstanten Geschwindigkeit v zu größeren Ausdehnungen hinbewegt. Hierbei beschreibt κ die effektive Federhärte des Systems, das die Bindung mit Kraft belastet. Für alle in dieser Arbeit relevanten Fälle gilt, dass die effektive Federhärte des externen Potentials sehr viel kleiner¹ als die Krümmung des Potentialtopfes des gebundenen Systems ist. Damit erscheint das externe Potential in Abb. 3.1 a) als eine mit der Zeit immer steiler abfallende Gerade. Die Bindung unterliegt damit einem effektiven, zeitabhängigen Potential $G(x) + V_{ext}(x, t)$. Damit ist auch die Höhe der Übergangsbarriere und der Übergangsratenkoeffizient zeitabhängig. Darüber hinaus verschiebt sich die Position x_T der Übergangsbarriere auf der Reaktionskoordinate. Ist der Abstand zwischen Übergangsbarriere und Minimum des Potentialtopfes Δx jedoch klein², so kann diese Verschiebung und die tatsächliche Form des Potentialtopfes vernachlässigt werden. In einem linearen Modell nach Bell [7] wird nur noch die Abnahme der Barrierenhöhe als Funktion des externen Potentials $V_{ext} = -\kappa vt x - F_0 x$ bzw. der extern anliegenden Kraft $F = \kappa vt + F_0$ betrachtet:

$$\Delta G^*(t) = \Delta G^* - \kappa vt \cdot (x_T - x_N) - F_0(x_T - x_N) = \Delta G^* - F \Delta x \quad (3.3)$$

F_0 beschreibt eine zum Zeitpunkt $t = 0$ bereits anliegende Kraft. Wie stark die energetische Barriere reduziert wird, hängt vom Abstand $\Delta x = x_T - x_N$ zwischen Minimum des Potentialtopfes und der Übergangsbarriere ab. Dieser Abstand Δx , im folgenden als Potentialbreite bezeichnet, stellt den Hebelarm des gebundenen Systems dar: je breiter das

¹Es gilt: $\kappa \approx 10^{-3}$ N/m während $\frac{d^2 G(x_N)}{dx^2} \approx 1$ N/m

²Siehe z.B die Diskussion in [87].

Potential, umso empfindlicher wird die Bindung auf anliegende Kräfte reagieren. Der nun zeitabhängige Übergangsratenkoeffizient k_{\rightarrow} für das thermische aktivierte Entweichen des gebundenen Teilchens aus dem Potentialtopf ist damit durch

$$k_{\rightarrow}(t) = k_0(t) = k_T e^{-\frac{\Delta G^* - \kappa v \Delta x t - F_0 \Delta x}{k_B T}} = k_0 e^{\frac{F(t) \Delta x}{k_B T}} \quad (3.4)$$

gegeben. Eine anliegende Kraft beschleunigt exponentiell den Übergangsratenkoeffizienten für den spontanen, thermisch aktivierten Bruch einer Bindung. Die Abnahme der Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Teilchens im Potentialtopf mit der Zeit wird durch folgende Differentialgleichung beschrieben:

$$\frac{dP(t)}{dt} = -P(t) \cdot k_0 \cdot e^{\frac{\kappa v \Delta x t + F_0 \Delta x}{k_B T}} \quad (3.5)$$

Die Differentialgleichung 3.5 kann mit den Anfangsbedingungen $P(0) = 1$ und $F(0) = F_0$ sowie der Variablensubstitution $F = \kappa v t + F_0$ gelöst werden.

$$P(F) = e^{\frac{k_0 k_B T}{\kappa v \Delta x} \left(e^{\frac{F_0 \Delta x}{k_B T}} - e^{\frac{F \Delta x}{k_B T}} \right)} \quad (3.6)$$

Daraus ergibt sich eine Bruchwahrscheinlichkeitsdichte $g(F)$, im folgenden auch als Bruchkraftverteilung bezeichnet, bei einer bestimmten Kraftbelastung den thermisch aktivierten Zusammenbruch der Bindung zu beobachten:

$$g(F) \equiv -\frac{dP(F)}{dF} = \frac{k_0}{\kappa v} e^{\frac{k_0 k_B T}{\kappa v \Delta x} \left(e^{\frac{F_0 \Delta x}{k_B T}} - e^{\frac{F \Delta x}{k_B T}} \right)} + \frac{F \Delta x}{k_B T} \quad (3.7)$$

Diese Gleichung wurde bereits durch M. Rief [87] und E. Evans et al. [34] hergeleitet. Abbildung 3.3 a) illustriert den Verlauf der Bruchwahrscheinlichkeitsdichte $g(F)$ für verschiedene Werte des Übergangsratenkoeffizienten k_0 und der Potentialbreite Δx . Eine Bindung mit einer schmalen Potentialform widersteht hohen Kraftbelastungen und es wird Bruchereignisse in einem breiten Kraftbereich geben, während Bindungen mit breiten Potentialen bei deutlich niedrigeren Kräften in einem engen Kraftbereich zusammenbrechen. In der Bruchwahrscheinlichkeitsdichte $g(F)$ erscheint die anliegende Kraft F immer im Produkt mit der Potentialbreite Δx . Die Potentialbreite wirkt somit skalierend auf die anliegenden Kräfte. Es ist daher ersichtlich, dass die Breite bzw. die Standardabweichung σ der mittleren Bruchkraft einer Bruchkraftverteilung indirekt proportional zur Potentialbreite ist:

$$\sigma \sim \frac{k_B T}{\Delta x} \quad (3.8)$$

Der natürliche Übergangsratenkoeffizient k_0 und damit die Höhe ΔG^* der Energiebarriere der Bindung hat hingegen einen vergleichsweise schwachen Einfluss auf die Position des Zentrums der Bruchkraftverteilung. Die Form der Bruchkraftverteilung ist zudem unabhängig von diesem Parameter.

3.2 Bindungsnetzwerke unter Kraft

Es werden nun Netzwerke aus Einzelbindungen unter Kraft betrachtet. Der Einfachheit halber werden Bindungen mit identischen Bindungspotentialen betrachtet. Die Geometrie des Bindungsnetzwerks bestimmt, wie sich eine an dem Netzwerk anliegende Kraft $F = \kappa vt + F_0$ auf die N Einzelbindungen verteilt. Die an der i -ten Bindung anliegende Kraft sei dabei proportional zur extern anliegenden Kraft F :

$$F_i(t) = \alpha_i F(t) \quad (3.9)$$

wobei α_i den an der i -ten Bindung wirkenden Anteil der extern anliegenden Kraft angibt. Die Kinetik der i -ten Bruchstelle unter der an ihr anliegenden Kraft F_i kann dann mit dem eben vorgestellten linearen Modell beschrieben werden. Für die Einzelbindungen folgt damit:

$$P_i(F) = e^{\frac{k_0 k_B T}{\kappa v \alpha_i \Delta x} \left(e^{\frac{\alpha_i F_0 \Delta x}{k_B T}} - e^{\frac{\alpha_i F \Delta x}{k_B T}} \right)} \quad (3.10)$$

$$g_i(F) = P_i(F) \cdot \frac{k_0}{\kappa v} \cdot e^{\frac{\alpha_i F \Delta x}{k_B T}} \quad (3.11)$$

An dieser Stelle soll zunächst die Frage interessieren, bei welcher Kraft es zum ersten aus N möglichen Bindungsbrüchen kommt. Die Wahrscheinlichkeit P_N , bis zu einer bestimmten Kraftbelastung alle N Bindungen noch intakt vorzufinden, ist bei unabhängigen Ereignissen das Produkt der Einzelwahrscheinlichkeiten:

$$P_N(F) = \prod_i P_i(F) = e^{\frac{k_0 k_B T}{\kappa v} \sum_i \frac{1}{\alpha_i \Delta x} \left(e^{\frac{\alpha_i F_0 \Delta x}{k_B T}} - e^{\frac{\alpha_i F \Delta x}{k_B T}} \right)} \quad (3.12)$$

Die Wahrscheinlichkeitsdichte $g_N(F)$, den Bruch irgendeiner Bindung bei der externen Kraft F zu beobachten, unter der Bedingung, dass alle anderen noch intakt sind, ergibt sich über:

$$g_N(F) = \sum_i g_i(F) \cdot \prod_{j \neq i} P_j = \frac{k_0}{\kappa v} P_N(F) \cdot \left(\sum_i e^{\frac{\alpha_i F \Delta x}{k_B T}} \right) \quad (3.13)$$

Zur Illustration zeigt Abbildung 3.2 a) schematisch ein Netzwerk aus drei identischen nummerierten Einzelbindungen mit verschiedenen α_i und Abb. 3.2 b) die Wahrscheinlichkeiten, unter einer wirkenden Kraft die jeweilige Bindung noch intakt vorzufinden. Die Produktwahrscheinlichkeit $P_N(F)$ aus Gl. 3.12, alle Bindungen intakt vorzufinden, ist durch die Bindung mit dem größten Anteil α_i der wirkenden Kraft dominiert. Abb. 3.2 c) zeigt die Wahrscheinlichkeitsdichten für den Bruch der jeweiligen Bindung unter der Bedingung, dass die anderen noch intakt sind, und ebenfalls die Bruchwahrscheinlichkeitsdichte $g_N(F)$ aus Gl. 3.13 für ersten Bindungsbruch im System. Wie zu erwarten, wird die Bindung mit der größten wirkenden Kraft im Mittel zuerst brechen. Wichtig ist, dass die Kräfte, bei denen es zum ersten Bindungsbruch kommt, deutlich höher liegen (im gezeigten Fall um $1/\alpha_1$), als wenn eine der Bindungen einzeln mit Kraft belastet würde.

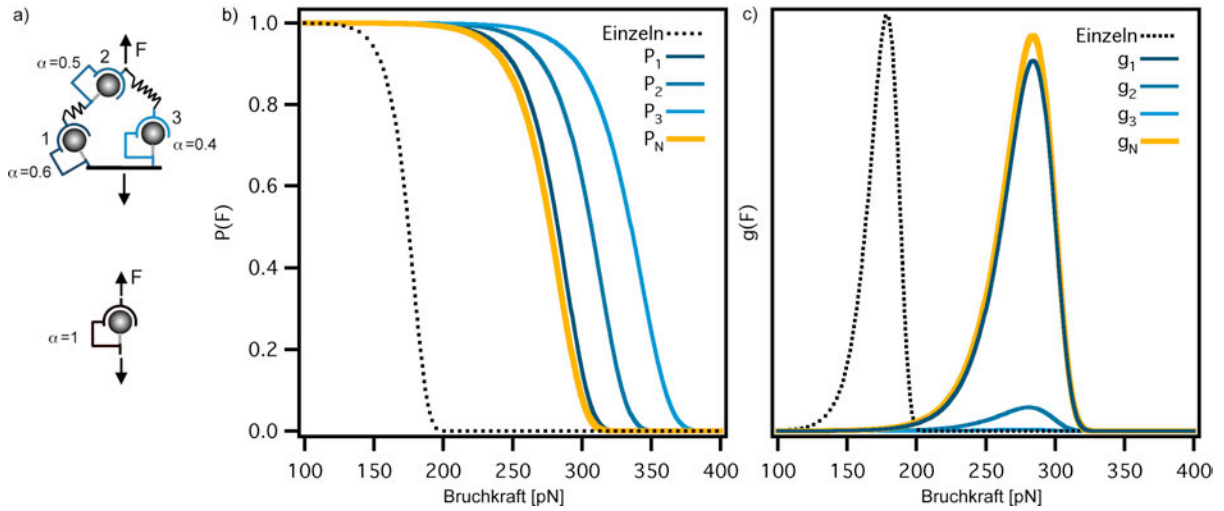


Abbildung 3.2: a) Schema eines kraftbelasteten Netzwerks aus drei identischen Bindungen bzw. einer einzeln belasteten Bindung. b) Durchgezogene Linien: Wahrscheinlichkeit, die jeweiligen Bindungen unter einer wirkenden Kraft noch intakt vorzufinden. Orange Linie: Wahrscheinlichkeit, alle Bindungen intakt vorzufinden. Gepunktete Linie: Wahrscheinlichkeit, eine einzeln vorliegende Bindung intakt vorzufinden. c) Durchgezogene Linien: Bruchkraftverteilung für den Bruch der jeweiligen Bindung unter der Bedingung, dass die anderen noch intakt sind. Orange Linie: Bruchkraftverteilung für den Bruch irgendeiner Bindung. Gepunktete Linie: Bruchkraftverteilung für den Bruch der einzeln belasteten Bindung.

Es ist illustrativ, zwei Grenzfälle in der geometrischen Anordnung von multiplen Bindungen zu betrachten: die ideale Serienschaltung und die ideale Parallelschaltung von N Bindungen (vgl. Abb. 3.3). In der seriellen Konfiguration sind die Kräfte in der Kette überall gleich, es gilt $\alpha_i = 1$ für alle i Bindungen. Das ist ein entscheidender Unterschied zur parallelen Konfiguration. Dort teilt sich die wirkende Kraft auf die Zahl der vorhandenen Bindungen N auf, d.h. $\alpha_i = 1/N$. Es ist ersichtlich, dass damit die Empfindlichkeit auf anliegende Kräfte im parallelen System mit steigender Zahl der Bindungen deutlich reduziert wird. Aus Gl. 3.13 ergibt sich die Bruchwahrscheinlichkeitsdichte für den ersten Bindungsbruch im seriellen System:

$$g_S(F) = \frac{Nk_0}{\kappa v} \cdot e^{\frac{Nk_0 k_B T}{\kappa v \Delta x} \cdot \left(e^{\frac{F_0 \Delta x}{k_B T}} - e^{\frac{F \Delta x}{k_B T}} \right) + \frac{F \Delta x}{k_B T}} \quad (3.14)$$

Für eine Parallelschaltung ergibt sich hingegen:

$$g_P(F) = \frac{Nk_0}{\kappa v} \cdot e^{\frac{N^2 k_0 k_B T}{\kappa v \Delta x} \cdot \left(e^{\frac{F_0 \Delta x / N}{k_B T}} - e^{\frac{F \Delta x / N}{k_B T}} \right) + \frac{F \Delta x / N}{k_B T}} \quad (3.15)$$

Abb. 3.3 b) illustriert den Verlauf der Wahrscheinlichkeitsdichten g_S und g_P für unterschiedlich viele seriell bzw. parallel belastete identische Bindungen. In der seriellen Konfiguration bewegt sich das Zentrum der Bruchkraftverteilungen langsam zu niedrigeren Kräften

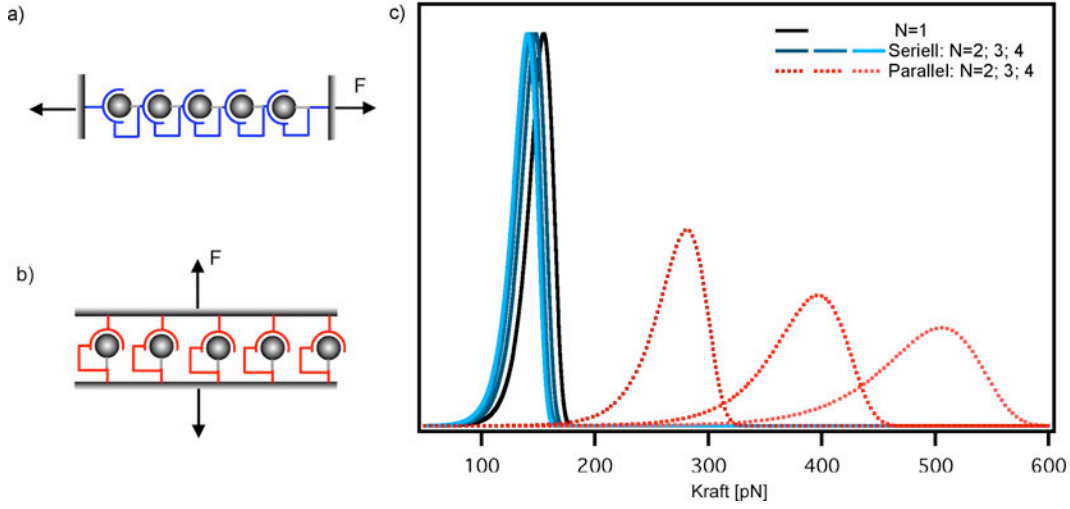


Abbildung 3.3: a) bzw. b) Schema einer Reihen- bzw. Parallelschaltung aus identischen Bindungen. c) Bruchkraftverteilungen für den Bruch der ersten aus N parallel bzw. seriell belasteten Bindungen.

mit steigender Zahl belasteter Bindungen, während sich im parallelen Fall das Zentrum zu deutlich höheren Kräften bewegt. Die Zahl der Bindungen hat nur im parallelen System einen Einfluss auf die Form der Bruchkraftverteilungen. Vergleicht man Gleichungen 3.14 und 3.15 mit der Bruchwahrscheinlichkeitsdichte für den Bruch einer einzelnen Bindung Gl. 3.7, so wirkt für die Kinetik des ersten Bindungsbruchs im seriellen System eine erhöhte, apparente Übergangsrate $k_s = k_0 \cdot N$, während im parallelen System sowohl eine erhöhte apparente Übergangsrate $k_p = k_s = k_0 \cdot N$ als auch eine verkleinerte, apparente Potentialbreite $\Delta x_p = \Delta x/N$ wirkt. Die wahrscheinlichste Kraft \tilde{F} , bei N vorhandenen Bindungen das erste Bruchereignis zu beobachten, ist durch die Position des Maximums der Wahrscheinlichkeitsdichten in Abb.3.3 gegeben und ist über $dg(F, N)/dF = 0$ erhältlich. Im seriellen Fall ergibt sich:

$$\tilde{F}_S = \frac{k_B T}{\Delta x} \ln \left(\frac{\kappa v \Delta x}{N k_0 k_B T} \right) \quad (3.16)$$

Im parallelen Fall gilt:

$$\tilde{F}_P = N \frac{k_B T}{\Delta x} \ln \left(\frac{\kappa v \Delta x}{N^2 k_0 k_B T} \right) \quad (3.17)$$

Dies gilt allerdings nur, solange die Bedingung $F_0 < \tilde{F}$ erfüllt ist. Falls nicht, ist das globale Maximum der Verteilung bereits bei der initial wirkenden Kraft F_0 zu finden. Ebenfalls von Interesse sind mittlere Bruchkräfte und deren Schwankungsquadratur. Aufgrund der Komplexität von $g_S(F)$ bzw. $g_P(F)$ ist die mittlere Bruchkraft $\langle F \rangle$ und die Breite σ der Bruchkraftverteilungen nicht in geschlossener Form angebar. Es ist jedoch ersichtlich, dass

$$\langle F_P \rangle \simeq N \cdot \langle F_S \rangle \quad (3.18)$$

und

$$\sigma_P \simeq N \cdot \sigma_S \quad (3.19)$$

gilt, d.h. die mittlere Bruchkraft und deren Streuung sind für den Bruch der ersten parallelen Bindung um die Zahl der Bindungen größer als im Vergleich zum seriellen System.

Das Verhalten des ersten Bindungsbruchs in einem Bindungsnetzwerk beliebiger Geometrie unter Kraft kann nun plausibel gemacht werden. Die Bruchkinetik einer beliebigen Verknüpfungsgeometrie wird durch die Bindungen bestimmt, auf denen der größte Anteil $\max(\alpha_i)$ der externen Kraft lastet. Die mittlere, beobachtete Bruchkraft ist durch die größte Projektion der externen Kraft auf eine der Bindungen bestimmt:

$$\langle F \rangle \simeq \frac{\langle F_1 \rangle}{\max(\alpha_i)} \quad (3.20)$$

Hierbei bezeichnet $\langle F_1 \rangle$ die mittlere Bruchkraft einer der Bindungen, wenn sie einzeln vorläge. Gleiches gilt für die wahrscheinlichste Bruchkraft. Die apparente Potentialbreite Δx_a der Bruchkinetik, die sich z.B. in der Breite einer Bruchkraftverteilung manifestiert, ist durch die größte Projektion der externen Kraft auf eine der Bindungen bestimmt:

$$\Delta x_a \simeq \max(\alpha_i) \Delta x \quad (3.21)$$

Bildet man das Produkt aus mittlerer Bruchkraft des ersten Bindungsbruchs und apparater Potentialbreite, so ergibt sich:

$$\langle F \rangle \Delta x_a = \langle F_1 \rangle \Delta x \quad (3.22)$$

Dieses Produkt kodiert die Eigenschaften der Einzelbindungen im Bindungssystem und ist unabhängig von der Geometrie des Systems.

Der Übergangsratenkoeffizient k_a für den ersten Bindungsbruch in einem System von Bindungen ist durch $k_a \simeq N' k_0$ gegeben, wobei N' die Zahl der Bindungen angibt, die den größten Anteil der externen Kraft tragen. Die apparente Höhe der wirkenden Barriere wirkt daher leicht reduziert:

$$\Delta G_a^* \simeq \Delta G^* - k_B T \cdot \ln N' \quad (3.23)$$

Die Projektionen α_i der extern anliegenden Kraft auf die Einzelbindungen kodieren dabei die effektive Deformationsantwort des gesamten Bindungsnetzwerks auf eine anliegende Kraft.

3.3 Kooperativität von Bindungssystemen

Es ist noch von Interesse, qualitative Aussagen über den weiteren Verlauf der Dissoziation der verbleibenden Bindungen nach dem ersten Bindungsbruch in einem Bindungsnetzwerk zu treffen. Es genügt, hierfür die Grenzfälle des parallelen und seriellen Systems zu betrachten. Nach der Dissoziation der ersten Bindung bei einer Kraft F in einem idealen parallelen System steigt sofort die Kraft auf die verbleibenden Bindungen, d.h. von F/N auf $F/(N-1)$. Damit erhöht sich der natürliche Übergangsratenkoeffizient instantan um

$$\frac{k_{P \rightarrow}(N-1)}{k_{P \rightarrow}(N)} = e^{\frac{F \Delta x}{k_B T} \cdot \left(\frac{1}{N^2 - N} \right)} \quad (3.24)$$

Der erste Bindungsbruch im parallelen System findet jedoch erst bei Kräften statt, die etwa N -fach über den Kräften liegen, bei denen eine einzeln vorhandene Bindung brechen würde. Der Verlust einer Bindung hat eine Überladung der verbleibenden Bindungen zur Folge, die immer drastischer wird, je mehr Bindungen verloren gehen. Dies führt zu einem kooperativen Bruch des gesamten parallelen Systems. Damit hat der erste Bruch einer von N parallelen Bindungen im wesentlichen den Bruch des Gesamtsystems zur Folge.

In einem seriellen System ist die Situation etwas komplizierter. Während Fluktuationen der Kraft des ersten Bindungsbruchs im parallelen System alle nachfolgenden Ereignisse stark beeinflussen, muss das im seriellen Fall nicht unbedingt der Fall sein. Nach der Dissoziation der ersten Bindung bei einer Kraft F_{N+1} in einem seriellen System aus $N + 1$ Bindungen könnte es zu einer Freisetzung von elastischen Abschnitten (z.B. das blau eingezeichnete Rückgrat in Abb. 3.1 b) kommen. Im leicht beschreibbaren Fall führt das dazu, dass die am System anliegende Kraft instantan auf einen bekannten Wert F_0 relaxiert, der deutlich unter ($F_0 \ll F_{N+1} - \sigma$) der vorher anliegenden Kraft F_{N+1} liegt. In diesem Fall kann die statistische Natur des Bruchereignisses bei F_{N+1} vernachlässigt werden und mit der Randbedingung F_0 kann eine Bruchkraftverteilung $g_S(F, N)$ für den nächsten Bindungsbruch einer der N noch vorhandenen Bindungen berechnet werden. Relaxiert das System dann wieder auf eine vorher bekannte Grenzkraft F_0 , so ist es ersichtlich, dass sich dieses Verfahren bis zur letzten vorhandenen Bindung fortsetzen läßt. Dieser Fall wird näherungsweise für Polyproteine realisiert und im folgenden Abschnitt besprochen. Kommt es jedoch nicht zu einer nennenswerten Kraftrelaxation, d.h. $F_0 \simeq F_{N+1} - \sigma$, so beeinflussen die Fluktuationen in der Bruchkraft der ersten Bindung über die Grenzkraft F_0 die Statistik des nächsten Bruchereignisses. Bleibt die anliegende Kraft nach einem Bindungsbruch vollständig erhalten, also $F_0 = F_{N+1}$, so wird, je nachdem ob F_{N+1} größer oder kleiner als die mittlere Bruchkraft für eine einzelne Bindung ist, die nächste Bindung entweder sofort oder bei leicht höheren Kräften brechen. Der übernächste Bindungsbruch kann wiederum entweder nur sofort oder bei höheren Kräften stattfinden. Diese Prozesse setzen sich fort, bis die letzte Bindung gebrochen ist. Im seriellen Fall ist damit eine stochastische Kooperativität zu finden ("kommunizierende Bruchereignisse" [29]).

Abbildung 3.4 illustriert den Verlauf der kraftinduzierten Dissoziation eines parallelen bzw. seriellen Systems an einem Beispiel aus fünf Bindungen, deren Kinetik mit Monte-Carlo Methoden (vgl. Anhang D.3) simuliert wurde. Dargestellt ist jeweils die Bruchkraftverteilung für den ersten Bruch einer der fünf Bindungen und für den Bruch der letzten noch vorhandenen Bindungen im seriellen (blaue Linien) und im parallelen Fall (rote Linien). Im parallelen Fall sind die Bruchkraftverteilungen nahezu identisch, d.h. die Dissoziation des gesamten Systems findet kooperativ und sofort nach dem Bruch der ersten Bindung statt. Im seriellen Fall reproduzieren sich die im vorigen Absatz dargestellten Effekte für den Fall instantan übertragener Kräfte. Eine vollständige Dissoziation des seriellen Systems tritt bei wenig höheren Bruchkräften als beim ersten Bindungsbruch ein. Reskaliert man die Kraftachse der parallelen Verteilung mit $F' = \alpha_i F = F/N$ (graue Linie), so ergibt sich wieder Übereinstimmung mit der Bruchkraftverteilung des seriellen Systems.

Die vollständige Dissoziation eines Bindungssystem beliebiger Geometrie wird somit in jedem Fall kooperativ stattfinden, wobei die Kinetik des ersten Bindungsbruchs bestim-

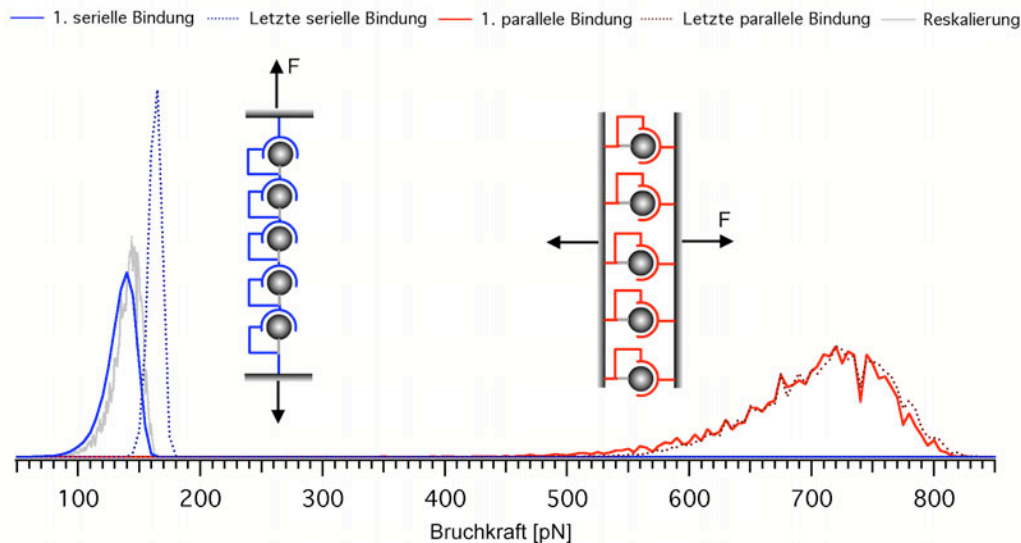


Abbildung 3.4: Monte-Carlo Simulation der kraftinduzierten Dissoziation eines seriellen bzw. parallelen Systems von identischen Bindungen.

ment für alle folgenden Bruchereignisse ist. Je näher die Geometrie eines Bindungssystem am parallelen Grenzfall ist, umso kooperativer und schneller wird es nach dem ersten Bindungsbruch zu einer vollständigen Dissoziation kommen.

3.4 Polyproteine als serielles Bindungssystem und der N-Effekt

Betrachtet man näherungsweise den kraftinduzierten Zusammenbruch einer gefalteten Proteinstruktur als einen Prozess, der dem Entweichen eines Teilchens aus einem Potentialtopf gleichwertig ist, so sind die eben getroffenen Aussagen über die Dissoziation einer Bindung unter Kraft ebenfalls für die Bruchkinetik einer Proteinstruktur unter Kraft gültig [21][42][88]. Abb. 3.1 a) ist dann als eine Projektion der hochdimensionalen Energielandschaft des Proteins auf eine eindimensionale Reaktionskoordinate anzusehen. Die Reaktionskoordinate kann beispielsweise durch den Abstand zwischen zwei Aminosäuren gegeben sein. Innerhalb des linearen Modells werden die Eigenschaften der Energielandschaft des Proteins wieder durch die Höhe einer energetischen Barriere ΔG^* und die Potentialbreite Δx beschrieben. Dehnt man ein Polyprotein mit einem Kraftspektrometer, so wird eine Reihenschaltung aus gefalteten Strukturen mit identischen Eigenschaften aufgebaut, die über eine Kombination aus Cantilever und entfaltenen Polypeptidabschnitten belastet wird. Der oben beschriebene Fall einer idealen Reihenschaltung von identischen Einzelbindungen wird mit einem Polyprotein realisiert. Die Wahrscheinlichkeitsdichte $g_S(F, N)$ in Gl. 3.14 beschreibt damit die Wahrscheinlichkeit für den ersten thermisch aktivierten Zusammenbruch einer von N intakten Proteinstrukturen im Polyprotein unter einer an-

liegenden Kraft. Wahrscheinlichkeitsdichten bilden die Schnittstelle zum Experiment: Sie geben die Verteilung der Häufigkeiten an, mit der Bruchereignisse bei bestimmten Kräften registriert werden. Der Vergleich von experimentell ermittelten Bruchkraftverteilungen mit berechneten Wahrscheinlichkeitsdichten erlaubt direkt Rückschlüsse auf die Form des Potentialtopfes, der den gefalteten Zustand einer Proteinstruktur entlang der Reaktionskoordinate eingrenzt. Im Falle von Polyproteinen erhöht ein kraftinduzierter Zusammenbruch der ersten von N gefalteten Strukturen die Länge entfalteter Polypeptidabschnitte im gestreckten Polyprotein. Der Bruch führt zu einer schlagartigen Relaxation der am Polyprotein anliegenden Kraft auf eine Kraft F_0 , die durch die momentane Ausdehnung des nun verlängerten Polyproteins vorgegeben ist. Ist diese Grenzkraft F_0 viel kleiner als die mittlere Bruchkraft der belasteten Strukturen, so kann mit Gl. 3.14 eine Bruchwahrscheinlichkeitsdichte $g_S(F, N - 1)$ für den kraftinduzierten Zusammenbruch der nächsten der nur noch $N - 1$ gefalteten Strukturen berechnet werden. Dieser Prozess läßt sich iterativ bis zum Zusammenbruch der letzten gefalteten Struktur fortsetzen. Aus Gl. 3.16 ergibt sich eine logarithmisch steigende wahrscheinlichste Bruchkraft mit abnehmender Zahl der in einem Polyprotein vorhandenen intakten Strukturen. Diese Tatsache wird im folgenden als N -Effekt bezeichnet. Bei statistisch unabhängiger Kinetik der einzelnen Strukturen wird man mit zunehmender Zahl an erfolgten Bruchereignissen in kraftbelasteten Polyproteinen im Mittel steigende Bruchkräfte beobachten.

3.5 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde dargelegt, dass die Kräfte, bei denen es zum Bruch einer Bindung kommt, Informationen über die Energielandschaft eines gebundenen Systems bzw. einer gefalteten Proteinstruktur kodieren. Die Analyse von experimentell ermittelten Bruchkraftverteilungen liefert

- die Potentialbreite Δx und
- die Höhe der Energiebarriere ΔG^*

des Potentialtopfes, der ein gebundenes System eingrenzt. Weiterhin wurden Netzwerke aus N identischen Bindungen unter Kraft betrachtet. Dabei hat sich gezeigt, dass die Bruchkräfte der ersten von N Bindungen in einem Netzwerk durch den größten wirkenden Anteil $\max(\alpha_i)$ einer externen Kraft auf Einzelbindungen bestimmt sind. Der erste Bindungsbruch liefert dabei Bruchkraftverteilungen, deren Form und Zentrum durch

- eine apparente Potentialbreite $\Delta x_a \simeq \max(\alpha_i) \cdot \Delta x$
- eine apparente Energiebarriere $\Delta G_a^* \simeq \Delta G^* - k_B T \ln N'$

bestimmt werden, wobei N' die Zahl der Bindungen angibt, die den größten Anteil $\max(\alpha_i)$ der anliegenden Kraft tragen. Vollständiger Bindungsbruch eines Bindungssystems findet kooperativ statt. Polyproteine realisieren eine ideale Serienschaltung von Bindungen. Es wurde der N -Effekt als Nachweis statistisch unabhängig und damit ungestört stattfindender Bruchereignisse in Polyproteinen eingeführt.

Kapitel 4

Lokale Minima in der GFP Energielandschaft

In diesem Kapitel wird beschrieben, dass durch die Wahl der Kraftangriffspunkte an ein Protein auch partiell gefaltete Proteinstrukturen erzeugt werden können. Das ermöglicht die selektive Besetzung und Charakterisierung von lokalen Minima in der Energielandschaft eines Proteins.

4.1 Population von partiell gefalteten Strukturen

Ein interessanter Aspekt der Belastung einer gefalteten Proteinstruktur über frei wählbare Kraftangriffspunkte wird bei genauer Betrachtung der Kraft-Ausdehnungsantwort von über das Aminosäurenpaar (3,212) verknüpften GFP Polyproteinen sichtbar. Eine Beispielkurve ist in Abb. 4.1 a) abgebildet.

In allen anderen untersuchten Belastungsrichtungen induziert eine anliegende Kraft den Zusammenbruch des GFP in einem Zwei-Zustandsprozess. Dabei zerfällt die komplette Proteinstruktur auf der experimentell zugänglichen Zeitskala in einem Stück. Bei Belastung über das Aminosäurenpaar (3,212) kommt es jedoch zu einem Zerfall, der über eine stabile Teilstruktur erfolgt. In den Kraftkurven an (3,212) verknüpften GFP Polyproteinen können drei Ereignisklassen beobachtet werden: vollständiger Zusammenbruch der GFP Raumstruktur ohne Besetzung eines Zwischenzustandes (blau markierte Ereignisse in Abb. 4.1 a) und partieller Bruch mit Population einer stabilen Zwischenstruktur (rote Ereignisse), gefolgt vom Bruch der verbleibenden Zwischenstruktur (grüne Ereignisse). Misst man die Längenzunahme der Polyproteine, die mit jeder Ereignisklasse verbunden ist¹ und bestimmt eine Verteilung der Längenzuwächse, so ergibt sich der Graph in Abb. 4.1 b). Es sind drei klar unterscheidbare Populationen ersichtlich: Der partielle Bruch des GFP Moleküls in den Zwischenzustand erzeugt eine mittlere Längenzunahme von $\langle L_1 \rangle = 32.8$ nm (rote Population). Der Zusammenbruch der Teilstruktur verursacht eine Längenzunahme

¹Dazu ist das WLC Modell an jeden einzelnen Kraftzacken in den Kraftkurven angepasst worden und der Parameter Konturlänge bestimmt worden.

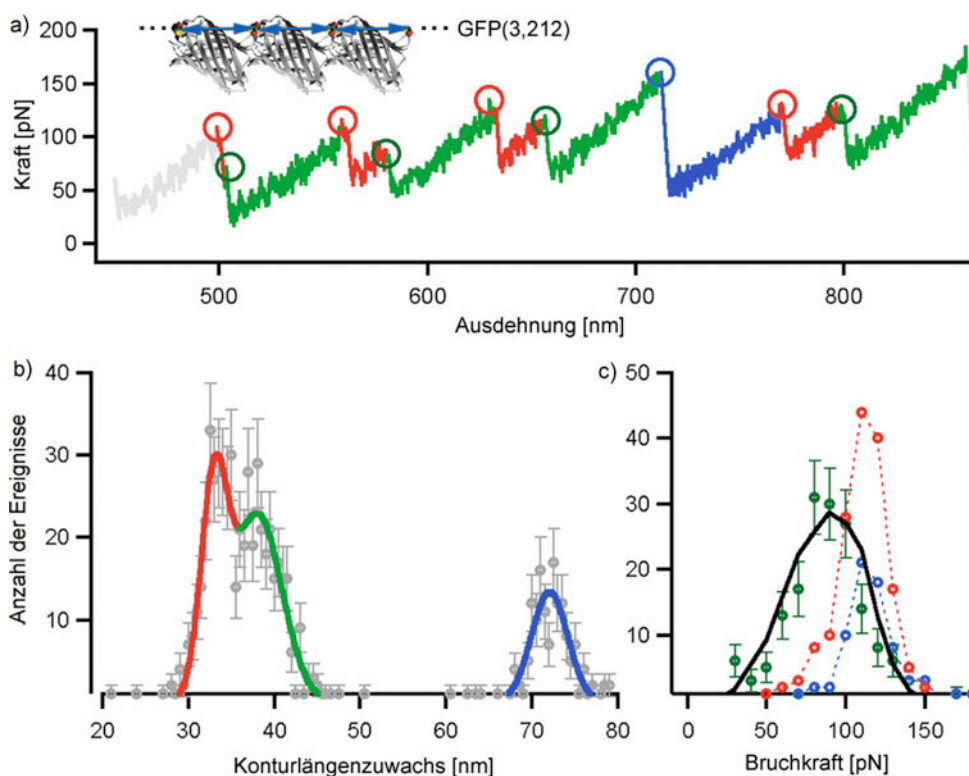


Abbildung 4.1: (a) Typisches Kraft-Ausdehnungsantwort von GFP(3,212) Polyproteinen. Blaue Kreise: Vollständiges Bruchereignis. Rote Kreise: Partielles Bruchereignis mit Population eines Zwischenzustandes. Grüne Kreise: Bruchereignis eines Zwischenzustandes. (b) Graue Kreise: Verteilung der Konturlängenzuwächse, die durch einzelne Bruchereignisse in (3,212) verknüpften GFP Polyproteinen auftreten. Die Farbkodierung entspricht der Klassifizierung in a. c) Bruchkraftverteilungen. Blaue Kreise: Vollständige GFP Entfaltung. Rote Kreise: partielle GFP Entfaltung. Grüne Kreise: Bruch des Zwischenzustandes. Schwarze Linie: Ergebnis einer Monte-Carlo Simulation mit einem Zweipfad Modell, das einen Zwischenzustand einschliesst (vgl. Tabelle 5.1).

von $\langle L_2 \rangle = 39.3$ nm (grüne Population). Die Population bei $\langle L_0 \rangle = 72.08$ nm wird durch den vollständigen Zusammenbruch der GFP Moleküle ohne Besetzung der Teilstruktur verursacht (blaue Population). Die Summe der zwei kürzeren Längen stimmt im Rahmen der Messgenauigkeit mit letzterer Länge überein, es gilt also $\langle L_0 \rangle = \langle L_1 \rangle + \langle L_2 \rangle$.

Aufgrund der großen Zahl der Ereignisse, in denen die Signatur eines Zwischenzustandes nach dem dominanten Bruchereignis bis hin zu einer minimalen Totzeit von $100 \mu s$ fehlt, kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei den als vollständigen Bruch klassifizierten Ereignissen in Wirklichkeit um partielle Bruchereignisse handelt, bei denen das Auftreten des Zwischenzustandes nicht detektiert werden konnte. Es läßt sich damit schliessen, dass der Reaktionspfad für den kraftinduzierten Bruch der GFP Raumstruktur entlang (3,212) eine Bifurkation aufweist. Ein Pfad mündet in der Besetzung einer strukturell definierten²

²Dies folgt aus der festen Längenzunahme.

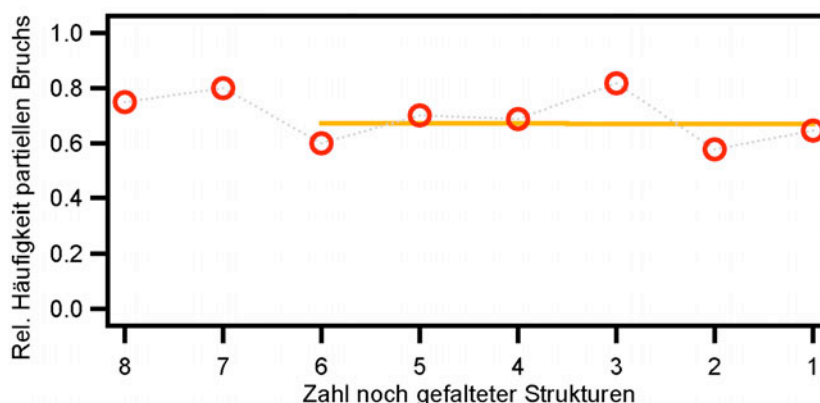


Abbildung 4.2: Relative Häufigkeit der Besetzung des Zwischenzustandes nach Bruchereignissen als Funktion der Zahl noch gefalteter Strukturen in den Polyproteinen.

Partialstruktur, während der andere Pfad direkt zum vollständigen Zusammenbruch der GFP Struktur führt.

Eine Analyse der Kräfte, bei denen die verschiedenen Bruchereignisse auftreten, liefert Bruchkraftverteilungen³, die in Abb. 4.1 c) abgebildet sind. Die Bruchkraftverteilungen für den Entfaltungspfad in den Zwischenzustand und für den Pfad mit vollständigem Zusammenbruch zeigen übereinstimmende Breiten und mittlere Bruchkräfte (blau und rot), der dominante Unterschied liegt in der Häufigkeit, mit der die zwei Ereignisklassen detektiert werden. Es gibt zwei mögliche Erklärungen für das apparente Zwei-Pfadverhalten, die im folgenden diskutiert werden.

4.2 These 1: Externe Einflüsse

Es ist denkbar, dass es nach dem Bruch der über (3,212) belasteten GFP Moleküle zu einer die Partialstruktur stabilisierenden Wechselwirkung zwischen benachbarten GFP Untereinheiten im Polyprotein kommen kann. Sind die Nachbarn noch intakt, so käme es zu einer Stabilisierung und somit zu einer Beobachtung des Zwischenzustandes. Sind die Nachbarn nicht mehr intakt, so würde die Struktur in einem Schritt zerfallen. Vorstellbar ist auch die inverse Situation, d.h. die Beobachtung des Zwischenzustandes erfordert die Abwesenheit von intakten Nachbarmolekülen. Bei stabilisierenden externen Wechselwirkungen sollte die relative Häufigkeit der partiellen Bruchereignisse im Mittel mit der Zahl bereits erfolgter Bruchereignisse in einzelnen Kraftkurven abnehmen, da die Zahl möglicher Protein-Wechselwirkungen abnimmt. Bei destabilisierenden Wechselwirkungen sollte die relative Häufigkeit der Partialbruchereignisse mit der Zahl bereits erfolgter Bruchereignisse zunehmen.

Abb. 4.2 zeigt die relative Häufigkeit der Partialbruchereignisse in Abhängigkeit der

³Verteilungen der Häufigkeit, mit denen Bruchereignisse innerhalb eines bestimmten Kraftintervalles (10 pN) detektiert worden sind.

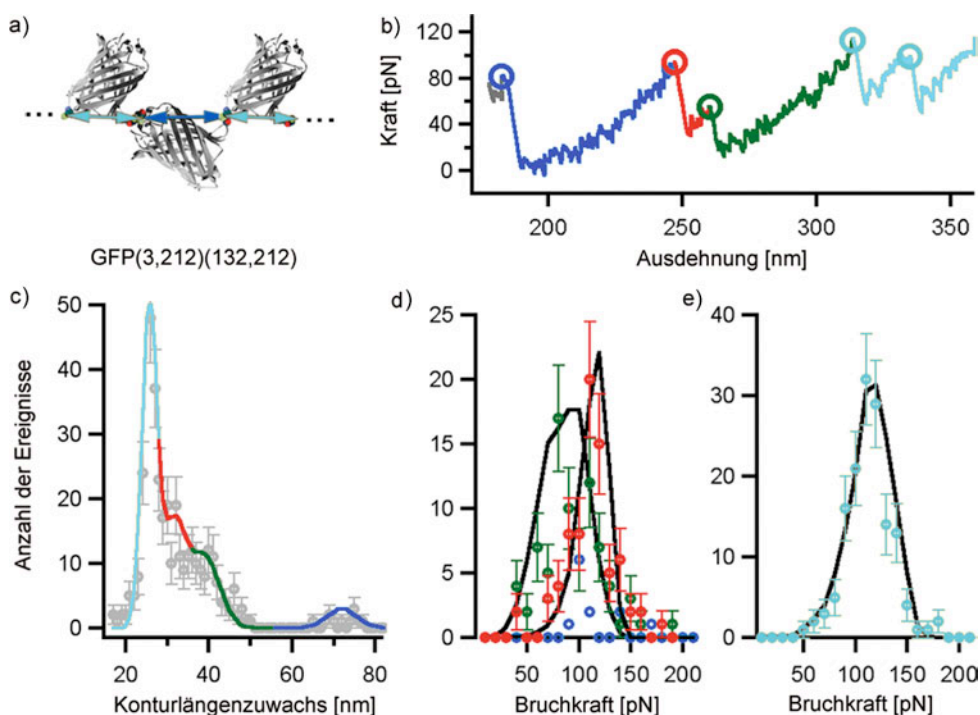


Abbildung 4.3: Schema eines GFP(3,212)(132,212) Copolyproteins mit alternierenden Kontaktflächen (b) Typische Kraftausdehnungsantwort von GFP(3,212)(132,212) copolymerisierten Proteinen. Die Farbklassifizierung ist wie in Abb. 4.1. Bruchereignisse von (132,212) verknüpften GFP Molekülen sind hellblau markiert. (c) Verteilung der Konturlängenzuwächse in GFP(3,212)(132,212) Copolyproteinen unter Kraft. Hellblau: Bruch einzelner GFP Moleküle entlang (132,212). Rot: Partielle Bruchereignisse entlang (3,212) in den Zwischenzustand. Grün: Bruch des Zwischenzustandes. Blau: Vollständige Bruchereignisse entlang GFP(3,212). (d) Kraftverteilung für vollständigen und partiellen Bruch von GFP und Entfaltung des Zwischenzustandes (blau, rot bzw. grün) entlang (3,212). Schwarze Linien: Ergebnis einer Monte-Carlo Simulation von Copolyproteinen. Siehe Tabelle 5.1 für erhaltene Parameter. (e) Experimentelle und simulierte Bruchkraftverteilungen für GFP(132,212) Bruchereignisse in den Copolyproteinen

Zahl gefalteter Strukturen in Polyproteinen. Im Bereich eins bis sechs gefaltete Strukturen wurden ausreichend Ereignisse detektiert, um statistisch signifikante Aussagen zu treffen. In diesem Bereich ist keinerlei Korrelation der Häufigkeit des Auftretens des Zwischenzustandes mit der Zahl der vorhandenen Strukturen beobachtbar, was sowohl gegen eine Stabilisierung als auch gegen eine Destabilisierung des Zwischenzustandes durch Nachbarwechselwirkungen spricht.

Um jedoch weitere mögliche Kontaktflächenwechselwirkungen auszuschließen, wurden zwei verschiedene GFP Verknüpfungsgeometrien, (3,212) und (132,212), gemischt copolymerisiert. In einem Copolyprotein werden statistisch alternierende Kontaktflächen zwischen benachbarten Strukturen erzeugt. Im Falle von Nachbarwechselwirkungen müsste ein Copolyprotein daher die relative Häufigkeit des Auftretens des Zwischenzustandes deutlich verändern. Ein Ausschnitt einer typischen Kraft-Ausdehnungskurve an einem

GFP(3,212)(132,212) Copolyprotein ist in Abb. 4.3 b) gezeigt. Die Verteilung der Konturlängenzuwächse für alle beobachteten Entfaltungseignisse ist in Abb. 4.3 c) abgebildet. Ein Vergleich mit Abb. 4.1 b) zeigt, dass die Copolymerisation keinen Einfluss auf das Auftreten des Zwischenzustandes beim Bruch der GFP Struktur entlang (3,212) hat. Abb. 4.3 d) und e) zeigen die Bruchkraftverteilungen für GFP entlang (3,212) und (132,212) im Copolyprotein. Die Bruchereignisse wurden anhand ihres Konturlängenzuwachses identifiziert. Die Verteilungen sind identisch mit den Verteilungen, die jeweils an GFP(3,212) und GFP(132,212) Homopolyproteinen gemessen wurden. Eine durch externe Einflüsse ausgelöste Bifurkation des Reaktionspfades für den Bruch (3,212) belasteter GFP Moleküle kann damit ausgeschlossen werden.

4.3 These 2: Intrinsische Ursachen

Es ist denkbar, dass der Bruch des Proteins über zwei separate energetische Barrieren erfolgen kann. Ein gebundenes System mit zwei energetischen Barrieren ΔG_1^* und ΔG_2^* hat die Wahl zwischen zwei Reaktionspfaden für eine thermisch aktivierte Dissoziation. Nach dem in dieser Arbeit verwendeten Modell zur Kinetik von Bindungen unter Kraft (vgl. Kapitel 3) hat jeder Dissoziationspfad einen eigenen Übergangsratenkoeffizienten:

$$k_1 = k_T \cdot e^{-\Delta G_1^* + F(t)\Delta x_1} \equiv k_{01} e^{F(t)\Delta x_1} \quad (4.1)$$

$$k_2 = k_T \cdot e^{-\Delta G_2^* + F(t)\Delta x_2} \equiv k_{02} e^{F(t)\Delta x_2} \quad (4.2)$$

Δx_1 und Δx_2 bezeichnen die Breite des Potentialtopfes entlang der zwei Reaktionsrichtungen. Die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Teilchens im Potentialtopf ist bei zwei Pfaden eine bedingte Wahrscheinlichkeit, bei der anliegenden Kraft weder Pfad 1 noch Pfad 2 bereits eingeschlagen zu haben:

$$P(F) = P_1(F) \cdot P_2(F) \quad (4.3)$$

Der Notation aus Kapitel 3 folgend, ergibt sich daraus eine Bruchwahrscheinlichkeitsdichte $g_1(F)$ bzw. $g_2(F)$ unter Kraft, einen Bruch der Struktur über die eine oder die andere Barriere zu beobachten:

$$g_1(F) = -\frac{dP_1}{dF} \cdot P_2 \quad (4.4)$$

$$g_2(F) = -\frac{dP_2}{dF} \cdot P_1 \quad (4.5)$$

Einsetzen von Gl. 3.7 ergibt:

$$g_1(F) = \frac{k_{01}}{\kappa v} e^{\frac{F\Delta x_1}{k_B T}} \cdot P_1 P_2 \quad (4.6)$$

$$g_2(F) = \frac{k_{02}}{\kappa v} e^{\frac{F\Delta x_2}{k_B T}} \cdot P_1 P_2 \quad (4.7)$$

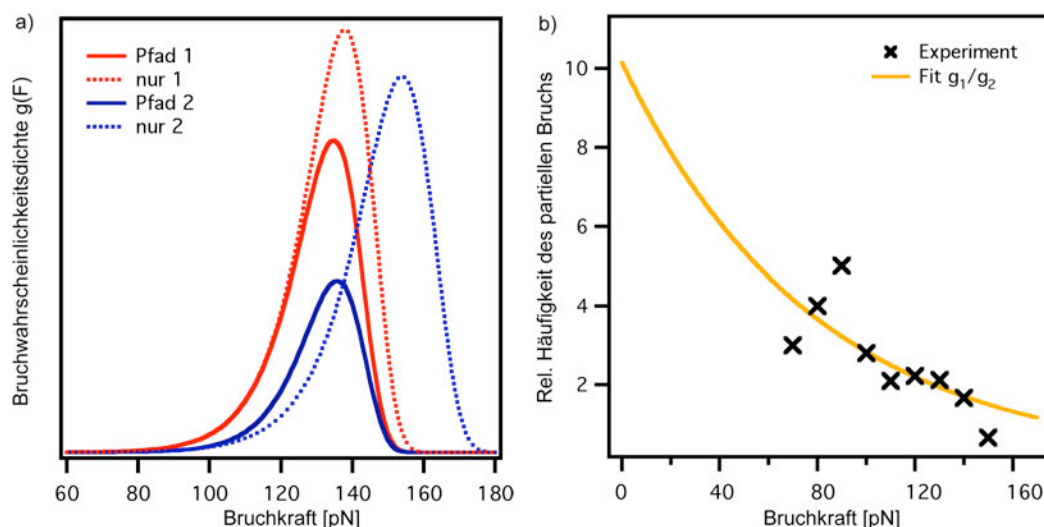


Abbildung 4.4: a) Illustration der Bruchwahrscheinlichkeitsdichte bei zwei möglichen Reaktionspfaden. Durchgezogene Linien: Dissoziation in Anwesenheit eines weiteren möglichen Reaktionspfades. Gepunktete Linien: Dichten für den Fall, dass ausschliesslich der jeweilige Pfad möglich wäre. b) Kreuze: Quotient aus gemessener Bruchkraftverteilung für den Bruch mit und ohne Population des Zwischenzustandes (Mit/Ohne). Linie: Fit mit Gleichung 4.8. Es ergibt sich: $k_1/k_2 = 10$ und $\Delta x_1 - \Delta x_2 = -0.05$ nm.

Abb. 4.4 a) illustriert an einem Beispiel die Form dieser Bruchkraftverteilungen für den Fall von zwei möglichen und ähnlich stabilen Reaktionspfaden. Die Form beider Bruchkraftverteilungen ist im wesentlichen durch den schwächeren Pfad vorgegeben und noch etwas zu niedrigeren Kräften verschoben. Insbesondere nimmt die Bruchkraftverteilung der Ereignisse, die aus dem stabileren Pfad (blau) stammen, die Form der Bruchkraftverteilung des schwächeren Pfades an. Im wesentlichen dürfen sich die Eigenschaften der zwei Pfade jedoch nur sehr wenig unterscheiden, um überhaupt die Dissoziation über zwei Pfade beobachten zu können. Dies wird deutlich, wenn man den Quotienten aus beiden Bruchwahrscheinlichkeitsdichten betrachtet. Der Quotient gibt die relative Häufigkeit an, mit der unter einer bestimmten Kraft die Dissoziation über Barriere 1 im Vergleich zur Dissoziation über Barriere 2 erfolgt:

$$\frac{g_1(F)}{g_2(F)} = \frac{k_{01}}{k_{02}} \cdot e^{\frac{F}{k_B T}(\Delta x_1 - \Delta x_2)} \quad (4.8)$$

Dieser Quotient kann mit den experimentell beobachteten Bruchkraftverteilungen direkt verglichen werden, und zwar ohne Kenntnis der absoluten Werte für die Form des Potentials entlang Pfad 1 und Pfad 2. Ist das Potential für Pfad 1 enger als das Potential für Pfad 2, so erwartet man einen exponentiell abklingenden Quotienten, im umgekehrten Fall müsste der Quotient exponentiell steigen. Der Achsenabschnitt am Kraftnullpunkt gibt in jedem Fall direkt das Verhältnis aus dem natürlichen Übergangskoeffizienten wieder. Der Unterschied

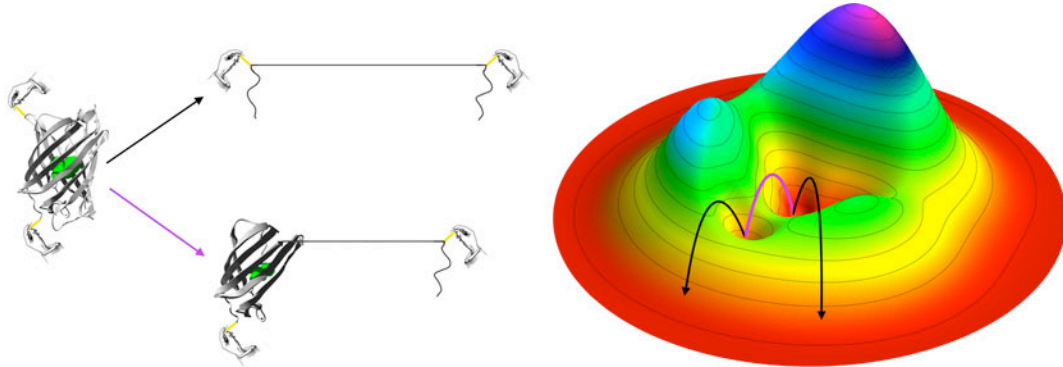


Abbildung 4.5: Bruch der über (3,212) belasteten GFP Raumstruktur über zwei verschiedene Reaktionspfade. Ein Reaktionspfad verläuft über eine partiell gefaltete Struktur. Dabei wird ein lokales Minimum der GFP Energielandschaft besetzt.

in der Höhe der wirkenden energetischen Barrieren lässt sich daher über

$$\frac{k_{01}}{k_{02}} = e^{(\Delta G_1^* - \Delta G_2^*)/k_B T} \quad (4.9)$$

sofort angeben. Das Verhältnis aus den experimentell beobachteten Bruchkraftverteilungen aus Abb. 4.1 c) für den Bruch des GFP mit und ohne Zwischenzustand ist in Abb. 4.4 b) dargestellt. Bei einer Dissoziation über dieselbe Barriere und nachgeordnete Bifurkation des Reaktionspfades z.B über einen energetischen Sattelpunkt müsste man einen konstanten Quotienten beobachten. Dies ist nicht der Fall. Daraus kann sofort geschlossen werden, dass der Bruch über (3,212) belasteter GFP Moleküle über zwei verschiedene energetische Barrieren erfolgt. Es ist eine abfallende Tendenz mit steigender Kraft zu beobachten, das Potential des Reaktionspfades über den Zwischenzustand muss somit etwas enger als das Potential für den vollständigen Bruch sein. Der Achsenabschnitt bei Extrapolation zum Kraftnullpunkt ist größer als Eins. Damit muss die energetische Barriere für den Bruch ohne den Zwischenzustand höher als die Energiebarriere für den Bruch mit Zwischenzustand sein. Gl. 4.8 ist an die Messpunkte angefüttet worden und in Abb. 4.4 als Linie eingezeichnet worden. Es ergibt sich ein kleiner Unterschied in der Potentialbreite von nur 0.05 nm und ein Unterschied in der Höhe der Energiebarriere für die zwei Reaktionspfade von $2.3 k_B T$. Die Bestimmung der absoluten Eigenschaften des Bindungspotentiales erfolgt im nächsten Kapitel. Die Eigenschaften des Bindungspotentiales der Zwischenstruktur sind mit einer Monte-Carlo Simulation (vgl. Anhang D.3) bestimmt worden. Es ergibt sich eine Breite von $\Delta x_{int} = 0.22$ nm und eine Höhe der energetischen Barriere von $\Delta G_{int}^* = 21 k_B T$ für das lokale Minimum in der Energielandschaft des GFP, das die Partialstruktur stabilisiert.

Demnach können durch die Wahl der Kraftangriffspunkte, wie eingangs motiviert, tatsächlich selektiv partiell gefaltete Strukturen eines Proteins erzeugt werden (vgl. Abb. 4.5). Dies ist gleichbedeutend mit der Besetzung von lokalen Minima in der Energielandschaft eines Proteins. Die Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften der Partialstruktur erlaubt dabei Rückschlüsse auf die Form des zugehörigen lokalen Minimums.

4.4 Zusammenfassung

Durch die Wahl der Kraftangriffspunkte an die Raumstruktur eines Proteinmoleküls können selektiv partiell gefaltete Strukturen eines Proteins erzeugt werden. Im Falle des GFP wurde eine Bifurkation des Reaktionspfades für den kraftinduzierten Bruch bei Belastung über (3,212) beobachtet. Einer der möglichen Pfade verläuft dabei über eine mechanische stabile Zwischenstruktur. Externe Einflüsse konnten ausgeschlossen werden. Es wurden die Unterschiede in der Form der energetischen Barriere der zwei Reaktionspfade sowie die Eigenschaften des Bindungspotentials der Zwischenstruktur analysiert.

Kapitel 5

Direktionale Mechanik einer Proteinstruktur

In diesem Kapitel werden die Kräfte analysiert, bei denen es zum Bruch der Raumstruktur des GFP kommt, wenn Kraft über verschiedene Punkte an das Protein angelegt wird. Aus den Bruchkraftverteilungen werden Eigenschaften des Bindungspotentials der GFP Raumstruktur bestimmt.

5.1 Direktionale Bruchkräfte der GFP Struktur

In die Analyse wurden nur Bruchereignisse aus Polyprotein-Kraftkurven einbezogen, in deren Verlauf mit großer Sicherheit alle im jeweils gestreckten Polyprotein initial vorhandenen GFP Strukturen zusammengebrochen waren. Als Kriterium wurde dafür ein signifikant höhere Abrisskraft in den Kraftkurven herangezogen (vgl. Abb. 1.4). Aus dem Datensatz ist eine kollektive Statistik der Bruchkräfte aller beobachteten Ereignisse für jede Belastungsrichtung angefertigt worden. Abb. 5.1 zeigt die so erhaltenen Bruchkraftverteilungen für die acht untersuchten Belastungsrichtungen. Zusätzlich ist die Bruchkraftverteilung für das dominante Bruchereignis bei N-C terminaler Kraftbelastung des GFP angegeben (vgl. Anhang B). Die Bruchkraftverteilung für die Richtung (3,212) wurde bereits im vorigen Kapitel vorgestellt und enthält sowohl die partiellen als auch die vollständigen Bruchereignisse.

Ein überraschendes Resultat in Abb. 5.1 ist eine enorme Bandbreite an Bruchkräften. In der mechanisch stabilsten Richtung (6,221) treten Bruchkräfte bis zu 750 pN auf, während in der labilsten Richtung (3,212) die meisten Bruchereignisse bei 100 pN stattfinden. 750 pN ist die höchste bisher beobachtete Bruchkraft für eine durch schwache, nicht-kovalente Wechselwirkungen stabilisierte molekulare Struktur. Dieser Wert ist nur noch halb so groß wie die 1.5 nN, die für den Bruch einer kovalenten Bindung in etwa aufgewendet werden müssen [40]. Die Bruchkraftverteilungen zeigen zudem eine große Variation in der Schwankungsbreite um ihr Maximum. Der Zusammenbruch der (3,212) belasteten GFP Struktur wird für einen engen Kraftbereich von etwa 30 pN um die mittlere Bruchkraft beobachtet,

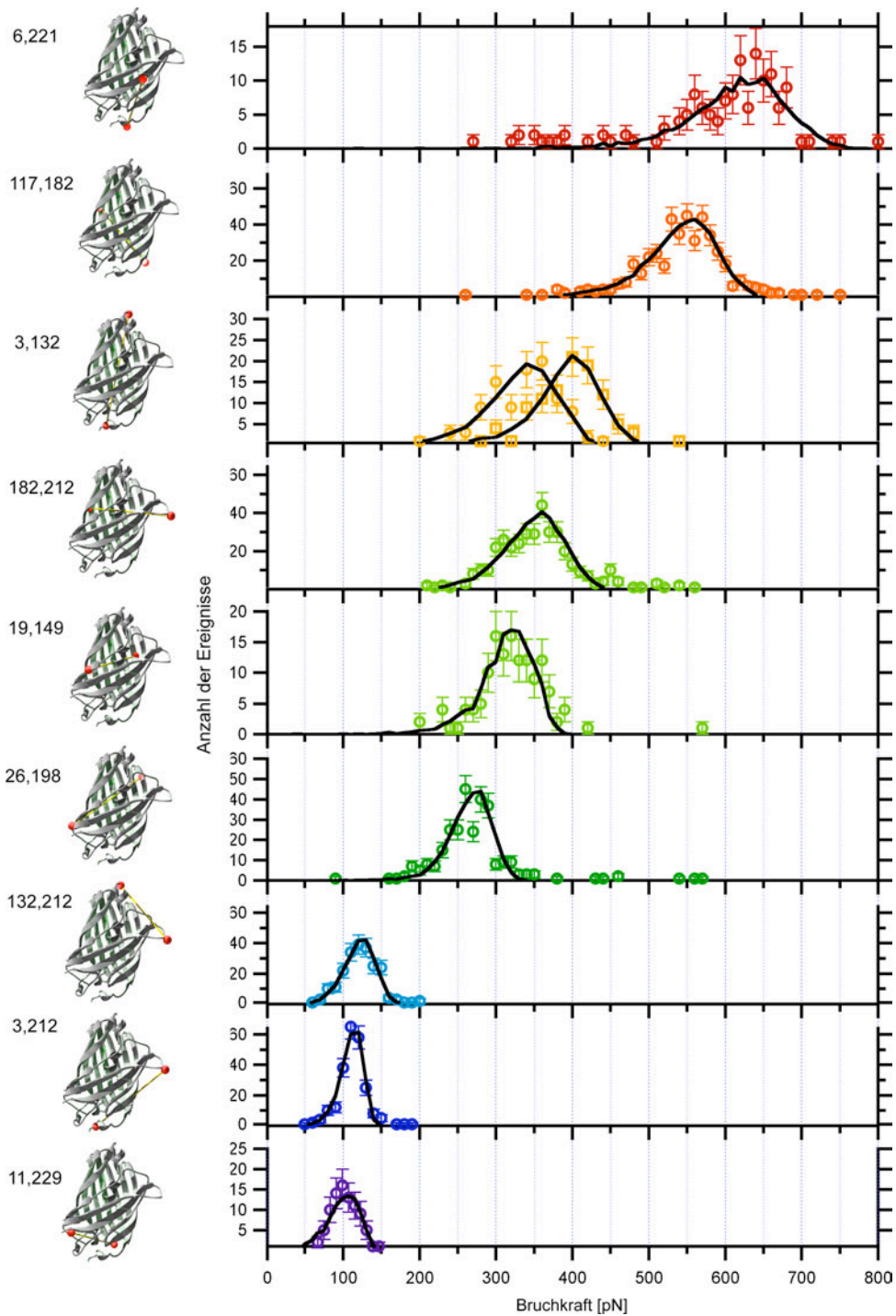


Abbildung 5.1: Links: Punkte, über die einzelne GFP Moleküle mit Kraft belastet werden. Rechts: Experimentell (Kreise) und über Monte-Carlo Simulationen (durchgezogene Linien) bestimmte Bruchkraftverteilungen. An GFP(3,132) wurden Experimente bei zwei verschiedenen Geschwindigkeiten durchgeführt (Kreise, $2 \mu\text{m/s}$; Quadrate, $12 \mu\text{m/s}$).

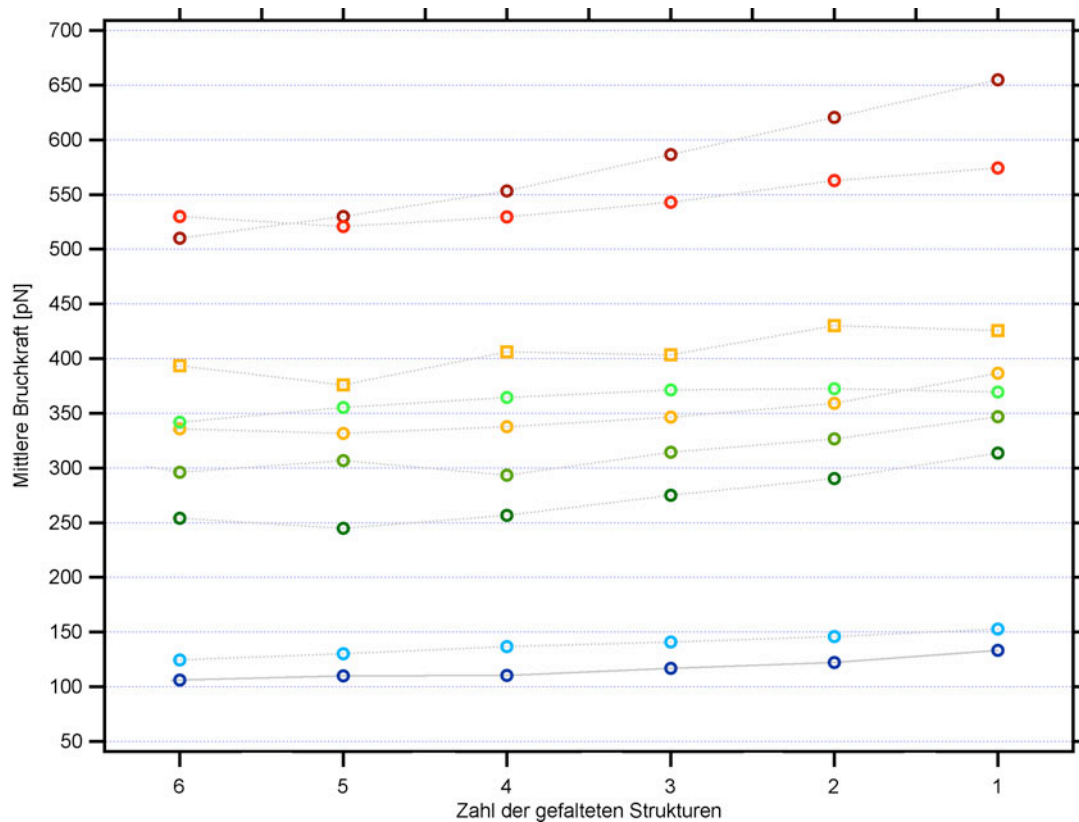


Abbildung 5.2: Mittlere Bruchkräfte in Abhängigkeit der Zahl gefalteter Strukturen in den verschiedenen verknüpften GFP Polyproteinen. Die Farbgebung ist wie in Abb. 5.1. An GFP(3,132) wurden Experimente bei zwei verschiedenen Geschwindigkeiten durchgeführt (Kreise, $2 \mu\text{m/s}$; Quadrate, $12 \mu\text{m/s}$)

während der Bruch der (6,221) belasteten GFP Strukturen in einem etwa 200 pN umfassenden Bereich um die mittlere Bruchkraft stattfindet. Dies ist insbesondere bemerkenswert, da die Belastungsrichtungen (3,212) und (6,221) nur um insgesamt sechs Aminosäuren verschoben sind und trotzdem die Extrempunkte der mechanischen Stabilität aller hier untersuchten Richtungen darstellen.

Es muss sichergestellt werden, dass einzelne Bruchereignisse in den Kraftkurven die ungestörten Eigenschaften einzelner GFP Moleküle wiedergeben. Externe Beiträge, wie z.B. stabilisierende Wechselwirkungen zwischen Kontaktflächen benachbarter Moleküle im Polyprotein könnten zu Verfälschungen führen [92]. In Kapitel 3 ist der *N*-Effekt, d.h. im Mittel steigende Bruchkräfte mit abnehmender Zahl gefalteter Strukturen in einem Polyprotein, als Signatur statistisch unabhängiger Ereignisse eingeführt worden. In Abb. 5.2 sind die mittleren Bruchkräfte in Abhängigkeit der Zahl gefalteter Strukturen in GFP Polyproteinen dargestellt.

Es wird deutlich, dass die mittleren Bruchkräfte mit abnehmender Zahl gefalteter Strukturen in allen Belastungsrichtungen steigen. Die steigenden Kräfte weisen damit statistisch

unabhängig stattfindende Bruchereignisse in GFP Polyproteinen nach. Gäbe es Nachbarwechselwirkungen, so würde man gekoppelte Bruchwahrscheinlichkeiten annehmen müssen. Diese würden sich mit steigender Ausdehnung in abnehmenden Kräften manifestieren, was nicht beobachtet wird.

5.2 Direktionale Eigenschaften der Energielandschaft der GFP Struktur

In Kapitel 3 wurde dargelegt, dass Bruchkraftverteilungen Eigenschaften des Bindungspotentials eines gebundenen Systems widerspiegeln. Die variierenden Kraftverteilungen in Abb. 5.1 legen daher nahe, die Ursache hierfür in anisotropen Eigenschaften des Bindungspotentials bzw. der Energielandschaft des GFP entlang der verschiedenen Richtungen zu suchen. Die Bruchkraftverteilungen in Abb. 5.1 erlauben es, die absolute Form des Energielandschaft der gefalteten GFP Struktur entlang der verschiedenen Reaktionspfade zu untersuchen und im Rahmen des in Kapitel 3 dargestellten linearen Modells die apparente Potentialbreite Δx_{ij} sowie die Höhe der energetischen Barriere ΔG_{ij}^* in jeder der acht Belastungsrichtungen zu bestimmen. Aufgrund der Konstruktion der Polyproteine über Cysteine Engineering gibt es keinerlei Unsicherheit in Bezug auf Angriffspunkte und Richtung der an einem gefalteten GFP Molekül anliegenden Kraft. Zudem konnte in Kapitel 2 sichergestellt werden, dass Bruchereignisse aus der nativen, nicht-deformierten GFP Struktur heraus stattfinden. Es gibt damit auch keinerlei Unsicherheit über den molekularen Zustand des GFP vor einem Bruchereignis. Die Kraft-Ausdehnungsantwort von elastischen Polypeptidabschnitten ist nichtlinear. Damit ist die effektive Federhärte $\kappa^{-1} = p_c^{-1} + p_p^{-1}(F)$ des Systems aus Cantilever der Federhärte p_c und entfaltenen Polypeptidabschnitten $p_p(F)$, über das gefaltete GFP Strukturen belastet werden, abhängig von der aktuell wirkenden Kraft. Die Auswirkungen zeitlich nichtlinearer Belastung auf die Kinetik von Bindungen wurden durch Evans et al. [35] und durch Friedsam et al. [37] untersucht. Es zeigte sich, dass die Nichtlinearität einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf Bruchkraftverteilungen hat.

Nach einem Bruchereignis sinkt zudem die anliegende Kraft in Polyproteinen nicht wieder auf Null ab, sondern auf einen Wert, der durch die Kraft, bei der das Bruchereignis erfolgte, vorgegeben wird (vgl. Abb. 1.5). Dadurch entsteht eine stochastische Kooperativität, die Form und Position von Bruchkraftverteilungen beeinflusst. Der Effekt ist dabei umso stärker, je kleiner der Längenzuwachs pro Bruchereignis ist (vgl. [29], "kommunizierende Entfaltungsergebnisse"). Die Zahl der gefalteten Strukturen in Polyproteinen hat zudem einen statistischen Einfluss auf die Bruchkräfte (vgl. Kapitel 3 und Abb. 5.2).

Monte-Carlo Simulationen erlauben es, alle genannten Eigenheiten vollständig und präzise in eine Analyse einzubeziehen [88][32]. Basis der Simulationen bildet das Modell zur Konformationskinetik aus Kapitel 3. Die Methodik der Simulationen ist in Anhang D.3 dargestellt. Die durchgeführten Monte-Carlo Simulationen lieferten Bruchkraftverteilungen,

die als Funktion der Potentialbreite Δx_{ij} und des natürlichen Übergangsratenkoeffizienten¹ $k_{ij}(F = 0)$ an die experimentell aufgefundenen Bruchkraftverteilungen in jeder Belastungsrichtung angepasst worden sind. Die so erhaltenen simulierten Bruchkraftverteilungen sind in Abb. 5.1 bereits eingezeichnet worden (schwarze Linien). Die Monte-Carlo Analyse ergibt dabei Potentialbreiten, die stark zwischen $\Delta x_{6,221} = 0.09$ nm und $\Delta x_{3,212} = 0.45$ nm variieren. Aus den Übergangsratenkoeffizienten $k_{ij}(F = 0)$ kann mit der Arrhenius Gleichung

$$\Delta G_{i,j}^* = k_B T \cdot \ln \frac{k_T}{k_{ij}} \quad (5.1)$$

die Höhe der energetischen Barriere ΔG_{ij}^* , die den gefalteten Zustand des Proteins entlang der Reaktionspfade eingrenzt, abgeschätzt werden. Der Arrhenius-Vorfaktor k_T hat im Bereich der Proteindynamik Werte aus dem Bereich von 10^6 bis 10^9 s⁻¹ [11][61][117][116]. Es wurde die obere Grenze $k_T = 10^9$ s⁻¹ zur Berechnung der Barrierenhöhen in Tabelle 5.1 verwendet. Wählt man k_T eine Größenordnung kleiner, so sind alle Barrieren um $2.3 k_B T$ zu reduzieren. Es ergeben sich für alle Richtungen vergleichbar hohe Übergangsbarrieren um etwa $27 k_B T$. Tabelle 5.1 fasst charakteristische Parameter der Bruchkraftverteilungen und die durch die Monte-Carlo Analyse bestimmten energetischen Informationen und ihre Fehlerbreiten für alle Belastungsrichtungen zusammen.

5.3 Diskussion

Die beobachtete mechanische Stabilität der Raumstruktur des GFP bei verschiedener Kraftbelastung kann nicht durch die Mechanik eines isotropen, homogenen Materials erklärt werden. In diesem Fall müssten die direktionalen Bruchkräfte korreliert zum Querschnitt des Moleküls orthogonal zur Zugrichtung sein. Dies ist eindeutig nicht der Fall. Die beobachtete Anisotropie des Proteins kann auch nicht nur durch lokale Eigenschaften der Aminosäuren an den Punkten der Kraftbelastung erklärt werden. Ein Beispiel ist Aminosäure 212. Diese Aminosäure ist in die labilsten Verknüpfungsgeometrien (132,212) und (3,212) mit den niedrigsten Bruchkräften involviert und mag daher als eine schwache Stelle des Proteins erscheinen. Die Position von Aminosäure 212 in einem augenscheinlich exponierten, nicht sonderlich strukturierten Bereich des Molekül unterstützt diesen Eindruck. Ändert man jedoch den Polarwinkel² der an Aminosäure 212 anliegenden Kraft um nur etwa 35° und belastet das Molekül entlang (182,212), so widersteht das Protein plötzlich dreimal höheren Bruchkräften. Ein noch drastischeres Beispiel ist Aminosäure 3, die sich in einer α -Helix am N-Terminus des Proteins befindet. Diese α -Helix wurde in Vorarbeiten als mechanisch äußerst labil klassifiziert [29][32]. Es genügen bereits 35 pN, um diese α -Helix von der Raumstruktur des GFP abzulösen, wenn Kraft über den N-C Terminus in etwa parallel zur Helixachse angelegt wird. Wenn Kraft jedoch orthogonal dazu, entlang der Richtung (3,132) angelegt wird, beobachtet man stattdessen Bruchkräfte bis hin zu

¹Identisch zu k_0 in Kapitel 3.

²Bezogen auf die Hochachse (3,132) des Moleküls.

400 pN und entlang der Richtung (6,221) treten sogar Bruchkräfte bis zu 750 pN auf. Die Ursache der großen Unterschiede in den Bruchkräften wird im folgenden Kapitel diskutiert.

5.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die Messung und Analyse der mechanischen Stabilität der GFP Raumstruktur bei Belastung mit Kraft über verschiedene Angriffspunkte beschrieben. Dabei wurde eine ausgeprägte mechanische Anisotropie der GFP Raumstruktur beobachtet [30]. Es wurden Eigenschaften der Energielandschaft des Proteins entlang der verschiedenen Reaktionskoordinaten bestimmt.

Richtung (i, j)	Bruchkraft $\langle F_{ij} \rangle [pN]$	Geschw. $v [\mu m/s]$	Potential $\Delta x_{ij} [nm]$	Barriere $\Delta G_{ij}^* [k_B T]$	Übergangsrate $k_{ij}^0 [s^{-1}]$	Federhärte $p_{ij} [nN/nm]$
(6, 221)	599 ± 95	3.6	0.09 ± 0.003	29	$3 \cdot 10^{-4}$ $\pm 4 \cdot 10^{-5}$	27.6
(117, 182)	548 ± 57	3.6	0.12 ± 0.003	31	$5 \cdot 10^{-5}$ $\pm 4 \cdot 10^{-5}$	16.5
(3, 132)	407 ± 45	12	0.125 ± 0.005	26	$4 \cdot 10^{-3}$ $\pm 4 \cdot 10^{-3}$	13
(3, 132)	346 ± 46	2	0.125 ± 0.004	26	$4 \cdot 10^{-3}$ $\pm 4 \cdot 10^{-3}$	13
(182, 212)	356 ± 61	3.6	0.14 ± 0.002	27	$2.2 \cdot 10^{-3}$ $\pm 8 \cdot 10^{-4}$	10.6
(19, 149)	325 ± 44	3.6	0.17 ± 0.003	28	$9 \cdot 10^{-4}$ $\pm 4 \cdot 10^{-5}$	7.4
(26, 198)	275 ± 51	3.6	0.22 ± 0.003	30	$14 \cdot 10^{-5}$ $\pm 4 \cdot 10^{-5}$	4.7
(132, 212)	127 ± 23	3.6	0.32 ± 0.005	26	$5 \cdot 10^{-3}$ $\pm 3 \cdot 10^{-3}$	2
(3,212) \nrightarrow Int	121 ± 18	3.6	0.50 ± 0.006	30	$4 \cdot 10^{-5}$ $\pm 3 \cdot 10^{-3}$	1
(3,212) \rightarrow Int	115 ± 18	3.6	0.45 ± 0.006	28	$4 \cdot 10^{-4}$ $\pm 3 \cdot 10^{-3}$	1.1
(132,212)*	117 ± 22	3.6	0.32 ± 0.015	25	$14 \cdot 10^{-3}$ $\pm 7 \cdot 10^{-3}$	2
(3,212)*	115 ± 22	3.6	0.45 ± 0.01	28	$8 \cdot 10^{-4}$ $\pm 1.4 \cdot 10^{-3}$	1.1
Int(3,212)	89 ± 24	3.6	0.22 ± 0.01	21	$6.5 \cdot 10^{-1}$ ± 1	3.4
Int(3,212)*	98 ± 30	3.6	0.22 ± 0.01	22	$2 \cdot 10^{-1}$ ± 1	3.6
(11,229)	104 ± 40	0.3	0.28 ± 0.01	23	$7 \cdot 10^{-2}$ $\pm 1 \cdot 10^{-1}$	2.3

Tabelle 5.1: Die Mechanik der GFP Raumstruktur in Zahlen. (*) Ergebnisse der Analyse von (132,212) und (3,212) Bruchereignissen in Copolyproteinen. (Int) Ergebnisse der Analyse des beim Bruch von GFP(3,212) auftretenden Zwischenzustandes (vgl. Kapitel 4). Mittlere Bruchkräfte und deren Standardabweichung wurden bei der Belastungsgeschwindigkeit v bestimmt. Potentialbreite und Übergangsrate für die verschiedenen Richtungen wurden mit Monte-Carlo Analysen der Bruchkraftverteilungen bestimmt. Energetische Barrierenhöhen wurden über die Arrhenius-Gleichung 5.1 abgeschätzt. Direktionale Federhärten wurden über $p_{ij} = 2\Delta G_{ij}^*/\Delta x_{ij}^2$ berechnet (vgl. Kapitel 7).

Kapitel 6

Minimalmodell der Mechanik einer Proteinstruktur

In diesem Kapitel werden die Ursachen der beobachteten mechanischen Anisotropie der GFP Raumstruktur identifiziert. Es wird ein Minimalmodell vorgeschlagen, das sowohl die Unterschiede der mechanischen Stabilität, als auch die beobachteten Eigenschaften des GFP Bindungspotentials in den verschiedenen Belastungsrichtungen qualitativ beschreibt.

6.1 Sequentieller Bruch der GFP Raumstruktur

Der kraftinduzierte Zusammenbruch der gefalteten Raumstruktur des GFP tritt experimentell als Zwei-Zustandsprozess¹ auf. Der vollständige Zusammenbruch der gefalteten GFP Struktur erfordert jedoch den kollektiven Zusammenbruch vieler Einzelbindungen und Wechselwirkungen zwischen einzelnen Atomen. Abb. 6.1 a) zeigt zur Illustration das komplizierte Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen im GFP. Es ist unwahrscheinlich, dass ein System aus Vielfachwechselwirkungen unter Kraft nur den Zustand vollständig gebunden oder vollständig entbunden kennt.

Das apparente Zwei-Zustandsverhalten kann u.a. auf eine limitierte Zeitauflösung des Experiments zurückgeführt werden. Abb. 6.1 b) zeigt einen 300 μs langen Ausschnitt aus einer hochauflösenden Kraftkurve, die an einem (117,182) verknüpften GFP Polyprotein gemessen wurde. Aufgetragen ist die am Cantilever anliegende Kraft im Zeitraum des Zusammenbruchs einer einzelnen GFP Struktur. Jeder Datenpunkt (rot) zeigt im Abstand von 4 μs die momentane Auslenkung des Cantilevers an. In Phase (1) in Abb. 6.1 b) ist das Molekül noch vollständig intakt. Beim Übergang zu Phase (2) (grau) kann das Molekül der anliegenden Kraft nicht länger standhalten und bricht auseinander. In Phase (2) relaxiert der Cantilever ungestört mit seiner charakteristischen Relaxationszeit entsprechend einem überdämpften Oszillator. Er benötigt dazu etwa 100 μs , dann erreicht er in Phase

¹Entlang (3,212) tritt ein Zwischenzustand auf. Der partielle Bruch der nativen Struktur in den Zwischenzustand und der Bruch des Zwischenzustandes treten jedoch ihrerseits als Zwei-Zustandsprozesse auf (vgl. Kapitel 4).

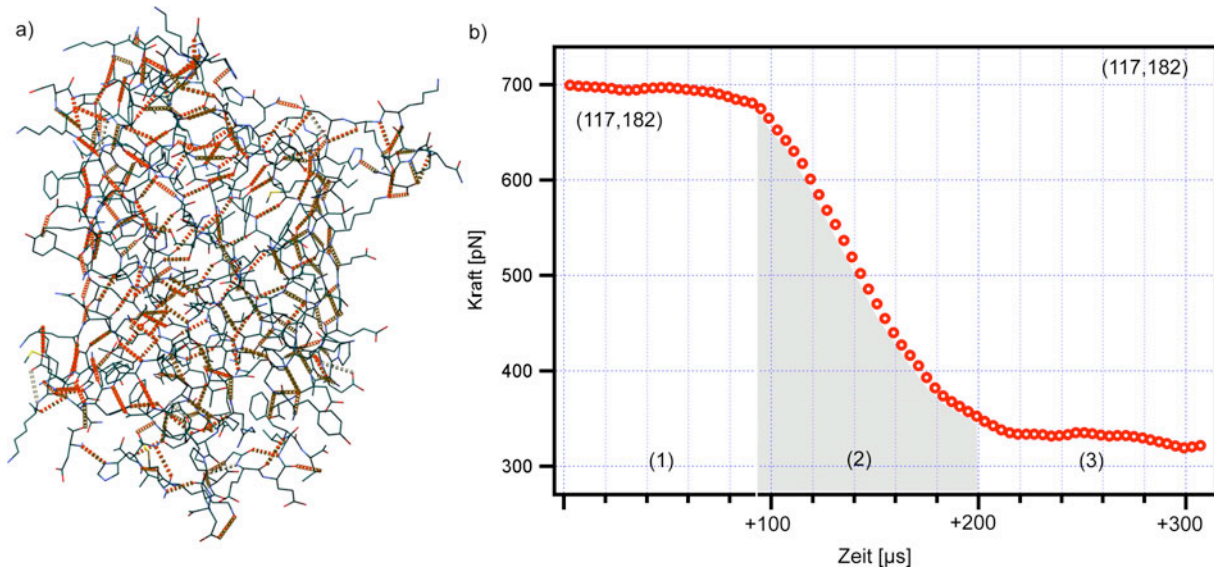


Abbildung 6.1: a) Raumstruktur des GFP als Stäbchen Darstellung mit internen Wasserstoffbrückenbindungen (rote Federn). b) Kraft-Zeitkurve kurz vor und kurz nach dem Bruch eines (117,182) belasteten GFP Moleküls.

(3) das Kraftniveau, das durch das verlängerte Polyprotein vorgegeben wird. Phase (2) ist somit als Totzeit des Experimentes anzusehen. Diese ist nicht durch die Abtastrate des experimentellen Aufbaus beschränkt, sondern durch die Resonanzfrequenz des Cantilevers im viskosen Medium Wasser. Alle Prozesse, in denen eine Struktur stückweise schneller zusammenbricht, d.h. weniger Kraft standhält (graues Gebiet) als der Cantilever während seiner Relaxation anzeigt (rote Punkte), sind während der Totzeit (2) von jeder Beobachtung ausgeschlossen. Im Falle der N-C terminalen Kraftbelastung konnte experimentell der sequentielle Zusammenbruch der GFP Struktur direkt beobachtet werden (vgl. Anhang B und [32][29][74]).

Es liegt daher auf der Hand, dass der apparente Zwei-Zustandsprozess in Wirklichkeit als sequentieller Zusammenbruch der intakten Raumstruktur des Proteins anzusehen ist, bei dem es zunächst zum Bruch einiger weniger Bindungen bzw. Wechselwirkungen kommt, deren Verlust zu einer Überbelastung oder Destabilisierung der verbleibenden Struktur führt und es in der Folge zum schnellen, kooperativen Zusammenbruch der gesamten Struktur kommt.

Die Hypothese des sequentiellen Zusammenbruchs wird weiter von der Beobachtung unterstützt, dass die natürlichen Übergangsraten $k_{ij}(F = 0)$ der GFP Struktur in allen hier untersuchten Belastungsrichtung etwa vier Größenordnungen zu hoch sind im Vergleich zur natürlichen Entfaltungsrate ($k_0 \approx 10^{-9} \text{ s}^{-1}$) des GFP, wie sie in Ensemble-Experimenten durch verschiedene Arbeitsgruppen bestimmt wurde [38][53]. Ensemble-Experimente miteln über alle möglichen Entfaltungspfade. Würden die hier bestimmten Übergangsraten für den Bruch entlang der Richtungen (i, j) tatsächlich eine Rate für eine vollständige Entfaltung des gesamten Moleküls beschreiben, so müsste das GFP auch in Ensemble Experimen-

ten immer diese schnellen Entfaltungspfade nutzen und diese Rate aufweisen. Dies ist nicht der Fall. Wie bereits in Kapitel 3 eingeführt, ist die Kinetik des ersten Bindungsbruchs in einem Bindungsnetzwerk durch Übergangsratenkoeffizienten bestimmt, die sich nur wenig von den Übergangsraten der Einzelbindungen im Netzwerk unterscheiden und zudem unabhängig von der Belastungsgeometrie sind. Die beobachteten Übergangsratenkoeffizienten haben in allen acht Belastungsrichtungen vergleichbare Zahlenwerte um $k_0 \approx 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Diese Beobachtung suggeriert, dass die beobachteten Übergangsraten charakteristisch für die Dissoziation einer kleinen Teilstruktur des GFP bzw. für die Dissoziation einiger weniger Bindungen sind. Für die folgende Diskussion wird daher folgendes angenommen:

- Der kraftinduzierte Zusammenbruch der Raumstruktur des GFP erfolgt sequentiell, ausgehend von der kraftinduzierten Dissoziation eines Bruchpunktes oder einer Bruchfläche der Struktur.

6.2 Bindungsbruch in einem Bindungsnetzwerk

In Kapitel 2 wurden intramolekulare Abstände zwischen den Kraftangriffspunkten in der GFP Struktur bestimmt. Die aufgefundenen Werte deuten darauf hin, dass Bruchereignisse in allen untersuchten Belastungsrichtungen aus der nativen Raumstruktur des GFP heraus erfolgen. In Kapitel 3 wurde die Konformationskinetik des ersten Bindungsbruchs in Bindungssystemen unter Kraft untersucht. Es zeigte sich, dass das Produkt aus mittlerer Bruchkraft $\langle F \rangle$ des ersten Bindungsbruchs im System mit der apparenten Potentialbreite Δx_a unabhängig von der internen Aufteilung der Kräfte im Bindungssystem ist. Entsprechend ist das Produkt unabhängig von der Geometrie der Kraftbelastung desselben Bindungssystems:

$$\langle F \rangle \cdot \Delta x_a \simeq \langle F_1 \rangle \cdot \Delta x = \text{const.} \quad (6.1)$$

Hierbei bezeichnet $\langle F_1 \rangle$ die mittlere Bruchkraft einer Einzelbindung und Δx die Potentialbreite einer Einzelbindung. Tabelle 6.1 listet den experimentell aufgefundenen Wert dieses Produktes für die untersuchten Belastungsrichtungen auf. Das Produkt ist näherungsweise konstant und beträgt $54 \pm 7 \text{ pN}\cdot\text{nm}$. Diese Beobachtung legt damit folgende Hypothese nahe:

- Die beobachtete Bruchkinetik des GFP unter Kraft ist identisch mit der Kinetik des ersten Bindungsbruchs in einem kraftbelasteten Bindungsnetzwerk.

Nach Kapitel 3 reflektiert damit die beobachtete Bruchkinetik die interne Aufteilung einer extern anliegenden Kraft auf das Bindungsnetzwerk und damit die elastischen Eigenschaften des Netzwerks.

Richtung	3,212	132,212	26,198	19,149	182,212	3,132	117,182	6,221
$\langle F \rangle \cdot \Delta x_a$ [pN·nm]	52	41	61	55	50	51	65	55

Tabelle 6.1: Produkt aus mittlerer Bruchkraft und apparenter Potentialbreite der GFP Struktur bei verschiedener Kraftbelastung.

6.3 Ein minimales Modell

An dieser Stelle soll nun versucht werden, mit einem minimalen physikalischen Modell die wesentlichen Eigenschaften herauszuarbeiten, mit denen die experimentell beobachtete Bruchkinetik des GFP beschrieben werden kann. Dafür ist die Definition eines Bindungsnetzwerks nötig und es müssen die elastischen Eigenschaften des Bindungsnetzwerks, d.h. die interne Aufteilung einer extern anliegenden Kraft auf jede Einzelbindung, bestimmt werden. Darüber hinaus müssen die kinetischen Eigenschaften jeder Einzelbindung definiert werden.

In einem minimalen Modell wird dazu jede der in der Raumstruktur aufgelösten 230 Aminosäuren des GFP als klassischer Massenpunkt mit der mittleren Masse einer Aminosäure ($m = 1.66 \cdot 10^{-27}$ kg) angenommen. Die Massenpunkte werden an den Orten der C_α Atome der einzelnen Aminosäuren entsprechend der GFP Kristallstruktur positioniert. Interne Wechselwirkungen des l -ten Massenpunktes am Ort \vec{r}_l mit dem m -ten Massenpunkt am Ort \vec{r}_m werden in Anlehnung an das Einstein-Modell aus der Festkörperphysik als harmonische Zentralkräfte entlang des Verbindungsvektors \vec{r}_{lm} approximiert. Interne Kräfte sollen erst dann auftreten, wenn Massenpunkte aus ihrer Ruhelage $\vec{r}_l(t = 0)$ ausgelenkt werden:

$$\vec{F}_l(t) = \sum_{m=1; m \neq l}^N -p_{lm} \cdot \left(1 - \frac{r_{lm}(0)}{r_{lm}(t)}\right) \cdot \vec{r}_{lm}(t) \quad (6.2)$$

wobei für die koppelnden Federkonstanten p_{lm} als zusätzliche Vereinfachung folgendes gelten soll:

$$p_{lm} = \begin{cases} p & : r_{lm}(0) \leq R_C \\ 0 & : r_{lm}(0) > R_C \end{cases} \quad (6.3)$$

Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren, deren Abstand kleiner als ein vorgegebener Interaktionsradius R_C ist, werden damit als Hooke'sche Federn mit identischer Federhärte modelliert. Diese drastische Reduktion der Geometrie einer Proteinstruktur ist in der Literatur als elastisches Netzwerkmodell bekannt und wird u.a. zur Berechnung von Temperaturfaktoren in Protein-Kristallstrukturen verwendet [4][105].

Abb. 6.2 zeigt das GFP als elastisches Netzwerk für verschiedene Interaktionsradien R_C . Kreuzungspunkte in diesen Netzwerken sind durch die Position einzelner Aminosäuren gegeben, während die Stäbe Federn zwischen Aminosäuren repräsentieren. Die Komplexität der Netzwerke nimmt mit steigendem Interaktionsradius stark zu. Während es für $R_C = 0.6$ nm etwa 500 Federn in diesem Netzwerk gibt, so sind es für $R_C = 1.0$ nm etwa 2000 und für $R_C = 2.0$ nm sind es schon 10000 Paarwechselwirkungen. Die relativen mechanischen Eigenschaften eines solchen Netzwerkes hängen ausschliesslich vom Interaktionsradius R_C ab, während die Federhärte der Netzwerkverbindungen rein skalierend wirkt.

Die Netzwerkverbindungen werden nun noch jeweils mit einer Bruchstelle versehen. Im Rahmen des minimalen Modells werden irreversible Bindungen angenommen, d.h. nach erfolgtem Bruch einer Bindung kann es nicht zu einer erneuten Ausbildung der Bindung kommen. Dazu wird jeder Bindung zwischen den Netzwerkpunkten l und m eine Potentialbreite Δx_{lm} und ein Übergangsratenkoeffizient k_{0lm} zugeordnet. Es werden Bindungen mit

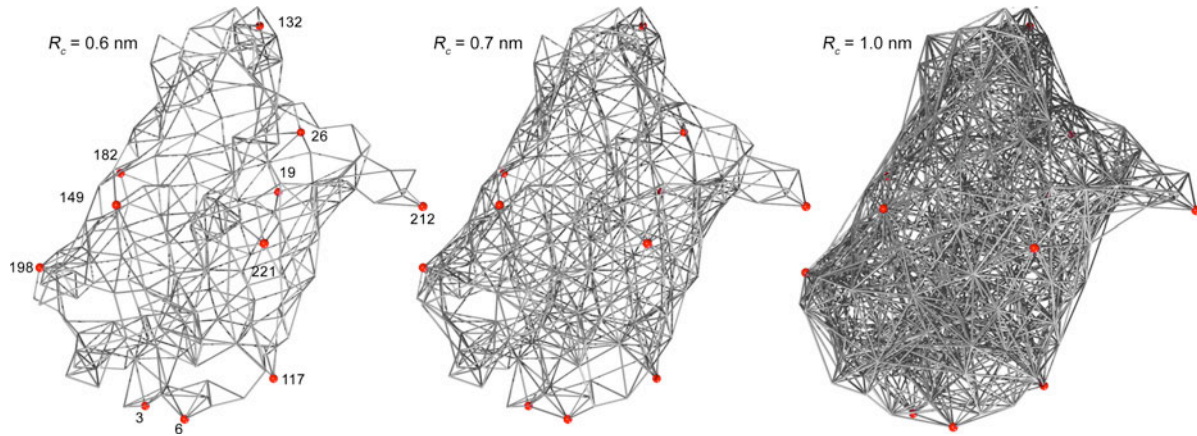


Abbildung 6.2: Das GFP als elastisches Netzwerk für verschiedene Interaktionsradien R_C . Zur Orientierung sind die Aminosäuren, die experimentell bereits als Kraftangriffspunkte dienen, in Form von roten Kugeln eingezeichnet.

identischer Kinetik betrachtet, d. h. es werden identische Potentialbreiten $\Delta x_{lm} \equiv \Delta x$ und identischen Übergangsratenkoeffizienten $k_{0lm} \equiv k_0$ für alle Netzwerkverbindungen zwischen Netzwerkpunkten l, m angenommen.

Die bedingte Wahrscheinlichkeit, bei einer über die Massenpunkte i, j angelegten Kraft F_{ij} alle N Bindungen des Systems intakt aufzufinden, ist durch den folgenden Ausdruck (vgl. Kapitel 3, Gl. 3.12 mit $F_0 = 0$) gegeben:

$$P_N(F_{ij}) = \prod_{l < N} \prod_{m < l} e^{\frac{k_0 k_B T}{\kappa v \alpha_{lm} \Delta x} \left(1 - e^{-\frac{\alpha_{lm} F_{ij} \Delta x}{k_B T}} \right)} \quad (6.4)$$

Die Wahrscheinlichkeitsdichte $g_N(F_{ij})$, den Bruch irgendeiner Netzwerkbindung bei der externen Kraft F_{ij} zu beobachten, unter der Bedingung, dass alle anderen noch intakt sind, ergibt sich über:

$$g_N(F) = P_N(F_{ij}) \cdot \left(\sum_{l < N} \sum_{m < l} \frac{k_0}{\kappa v} e^{-\frac{\alpha_{lm} F_{ij} \Delta x}{k_B T}} \right) \quad (6.5)$$

Bei Kenntnis des intern auf die Netzwerkbindung l, m wirkenden Anteils α_{lm} einer über i, j anliegenden Kraft kann mit Gl. 6.5 eine Bruchkraftverteilung für den ersten Bindungsbruch in dem Bindungsnetzwerk berechnet werden. Das minimale Modell verwendet damit drei Eigenschaften:

- Drastisch vereinfachte Geometrie einer Proteinstruktur.
- Interne Bindungsstruktur wird durch einen Interaktionsradius R_C definiert.
- Interne Wechselwirkungen werden als identische Federn mit identischer Bruchstelle approximiert.

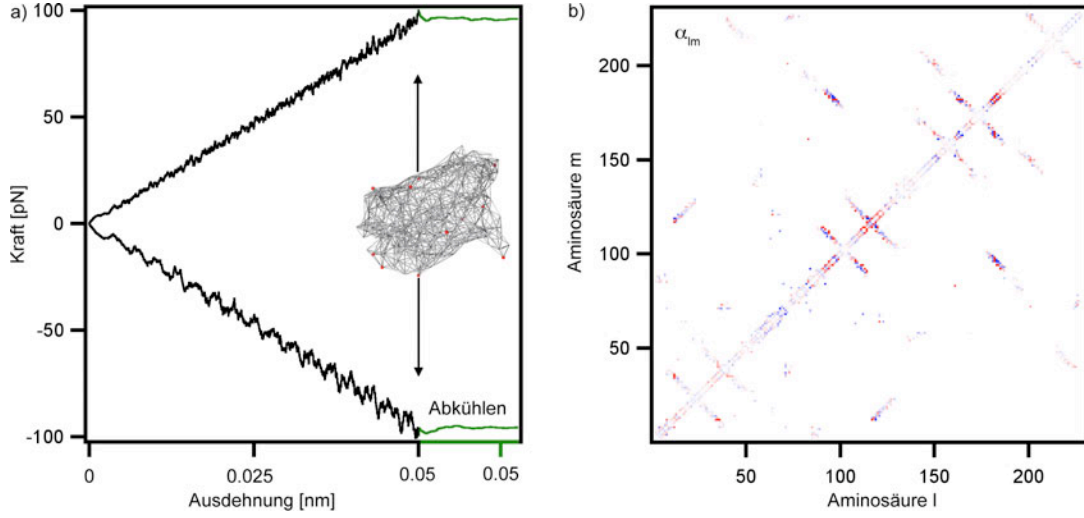


Abbildung 6.3: a) Rückstellkräfte, die bei Ausdehnung der Aminosäuren 117 und 182 in einem GFP Netzwerk mit $R_C = 0.8$ nm und $p = 10$ N/m entstehen. b) Kraftwirkungsmatrix α_{lm} . Rot: Ausdehnende Kräfte. Blau: Komprimierende Kräfte

Zur Bestimmung der Bruchkinetik der als ein Federnetzwerk abstrahierten GFP Struktur muss noch eine Kraftwirkungsmatrix α_{lm} bei Belastung des Federnetzwerks über i, j berechnet werden.

6.4 Kraftwirkungsmatrix α_{lm}

Die Dynamik der als Massenpunkte abstrahierten Aminosäuren des GFP wird durch einen Satz von N Bewegungsgleichungen beschrieben:

$$\frac{d^2 \vec{r}_l}{dt^2} = \frac{1}{m} \cdot \vec{F}_l(t) \quad (6.6)$$

Die Bewegungsgleichungen bilden einen Satz von $3N$ gekoppelten, nichtlinearen Differentialgleichungen zweiter Ordnung. Das System wird daher mit aus der Molekulardynamik bekannten Techniken numerisch integriert [104][42][41]. Dazu werden die Bewegungsgleichungen mit einem Algorithmus nach Loup Verlet diskretisiert [107]. Die Bewegungsgleichungen nehmen dann folgende Form an:

$$\vec{r}_l(n+1) = \frac{\Delta t^2}{m} \cdot \vec{F}_l(n) - \vec{r}_l(n-1) + 2 \cdot \vec{r}_l(n) \quad (6.7)$$

Die Integration erfordert Anfangswerte bei $n = 0$ und bei $n = 1$. Die initialen Koordinaten $\vec{r}_l(0)$ wurden aus der Kristallstruktur des GFP (1EMB, [15]) eingelesen. Es wurde $\vec{r}_l(1) = \vec{r}_l(0)$ gewählt. Damit sind alle initialen Geschwindigkeiten gleich Null, das System wird somit beim absoluten Temperaturnullpunkt betrachtet. Es wurden die in der Molekulardynamik üblichen Zeitschritte von $\Delta t = 1$ fs verwendet und eine Integration über 25

ns durchgeführt. Die koppelnden Federkonstanten wurden zu 10 N/m gewählt. Zwei ausgewählte Aminosäuren i, j wurden während der Simulation mit konstanter Geschwindigkeit (ca. 2 mm/s) bis zu einer maximalen Auslenkung von 0.5 Å entlang des Verbindungsvektors \vec{r}_{ij} auseinanderbewegt, während die Dynamik der restlichen Aminosäuren mit obigem Algorithmus als Antwort auf die Deformation berechnet wurde (vgl. Abb. 6.3 a). Während der Deformation der zwei Aminosäuren i, j wurden die Rückstellkräfte aufgezeichnet, die durch das Netzwerk auf die zwei gewählten Aminosäuren ausgeübt werden. Durch die diskreten Zeitschritte und durch Abwesenheit jeglicher Reibung entstehen Oszillationen und damit eine Temperatur größer Null in dem Netzwerk. Nach Erreichen der gewünschten maximalen Deformation des Netzwerks entlang der gewählten Aminosäuren wurde daher eine Stokes'sche Reibung $-\gamma \cdot \vec{v}$ mit $\gamma = 10^{-14}$ kg/s² über einen leicht modifizierten Verlet-Algorithmus [104] eingeführt und das Netzwerk wieder auf T=0 K abgekühlt (vgl. Abb. 6.3 a). Diese Methode ermöglicht eine einfache Bestimmung der finalen Gleichgewichtskoordinaten $\vec{r}_i(E)$ des ausgelenkten Netzwerks. Aus dem finalen und dem initialen Koordinatensatz wurde über

$$\alpha_{lm} = \frac{p_{lm}}{F_{ij}(E)} \cdot (r_{lm}(E) - r_{lm}(0)) \quad (6.8)$$

eine symmetrische Kraftwirkungsmatrix berechnet, die den in jeder Netzwerkverbindung l, m wirkenden Anteil der extern anliegenden Kraft F_{ij} angibt (vgl. Abb. 6.3 b). Ist $\alpha_{lm} > 0$, so handelt es sich um ausdehnende Kräfte in der Netzwerkverbindung, für $\alpha_{lm} < 0$ handelt es sich um komprimierende Kräfte.

Auf diese Weise konnte für jede der experimentell untersuchten Belastungsrichtungen die Kraftwirkungsmatrix für verschiedene Interaktionsradien R_C berechnet werden. Der Interaktionsradius R_C bestimmt die Zahl der Bindungen im Netzwerk und damit auch die Zahl der Einträge mit $\alpha_{lm} \neq 0$ in der Kraftwirkungsmatrix. Je größer R_C , desto kleiner wird im Mittel der Anteil der extern wirkenden Kraft pro Einzelbindung.

Abb. 6.4 illustriert die sich ergebende Kraftwirkungsmatrix ($R_C=0.725$ nm) für die acht experimentell untersuchten Belastungsrichtungen als Projektion auf die GFP Raumstruktur. Der Durchmesser der Netzwerkverbindungen zeigt den Anteil der extern wirkenden Kraft an. Es ist ersichtlich, dass bei Deformation des GFP über (3,212) die gesamte Raumstruktur Kräfte trägt und einzelne Bindungen sehr stark belastet werden. Im Falle von GFP(6,221) hingegen sind es nur wenige Bindungen, auf die sich eine anliegende Kraft parallel aufteilt, während die restliche Raumstruktur von der anliegenden Kraft abgeschirmt ist. Nach Kapitel 3 wird die mittlere Bruchkraft des ersten Bindungsbruchs im Netzwerk durch die größten Anteile α_{lm} der extern wirkenden Kraft dominiert, d.h. $\langle F \rangle = \langle F_1 \rangle / \max(\alpha_{lm})$. Die Kraftwirkungsmatrix sagt damit bereits voraus, dass bei Belastung des GFP-Netzwerks über (6,221) die Bruchkräfte höher liegen werden als bei Belastung über (3,212). Dieser Effekt wurde experimentell beobachtet (vgl. Kapitel 5) und findet seine Erklärung offenbar in einem diskreten Bindungsnetzwerk.

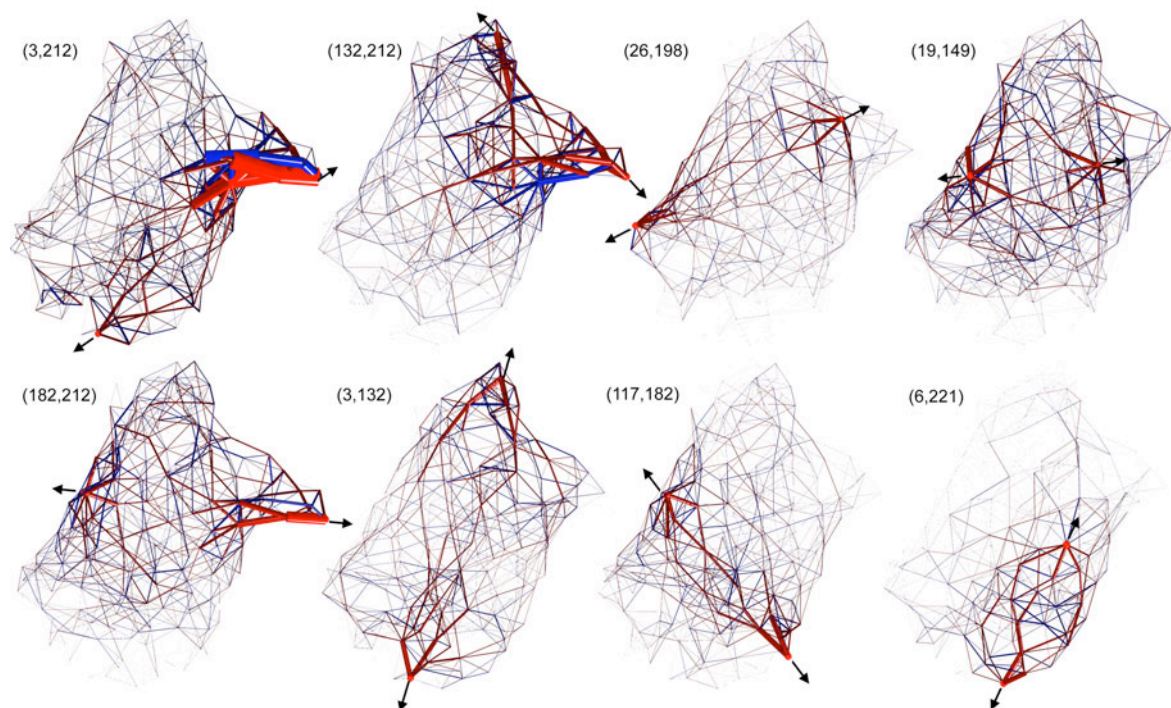


Abbildung 6.4: Kraftwirkungsmatrix, d.h. der Anteil einer extern anliegenden Kraft auf Einzelbindungen bei Belastung der Struktur über zwei Aminosäuren. Rot: Ausdehnende Kräfte. Blau: Komprimierende Kräfte. Der Durchmesser der Verbindungen gibt den Anteil der extern wirkenden Kraft in der entsprechenden Netzwerkverbindung an.

6.5 Bruchkinetik des Minimalmodells

Das Minimalmodell benötigt drei unabhängige Parameter, um die Kinetik des ersten Bindungsbruchs in dem Bindungsnetzwerk unter Kraft zu berechnen: den Interaktionsradius R_C , die Potentialbreite Δx der Einzelbindungen und den Übergangsratenkoeffizienten k_0 der Einzelbindungen. Das experimentell beobachtete Produkt aus mittlerer Bruchkraft und apparer Potentialbreite in Gl. 6.1 gibt die Eigenschaften der Einzelbindungen wieder, aus denen das Bindungsnetzwerk besteht. Für die experimentellen Bruchkraftverteilungen in Abb. 5.1 gilt näherungsweise $\langle F \rangle \approx \tilde{F}$, d.h. die mittlere Bruchkraft stimmt in etwa mit der wahrscheinlichsten Bruchkraft überein. Entsprechend gibt das Produkt aus mittlerer Bruchkraft und apparer Potentialbreite näherungsweise auch das Produkt aus wahrscheinlichster Bruchkraft eine Einzelbindung \tilde{F}_1 und deren Potentialbreite Δx an. Mit dem beobachteten Zahlenwert von $\gamma := \tilde{F}_1 \cdot \Delta x = 54.3 \text{ pN}\cdot\text{nm}$ sind damit die Eigenschaften des Bindungspotentiales der Einzelbindungen teilweise festgelegt. Für einen erfolgreichen Vergleich mit dem Experiment ist der Übergangsratenkoeffizient k_0 der Einzelbindungen damit kein freier Parameter mehr, sondern hängt über Gl. 3.16 mit $N = 1$ direkt mit der

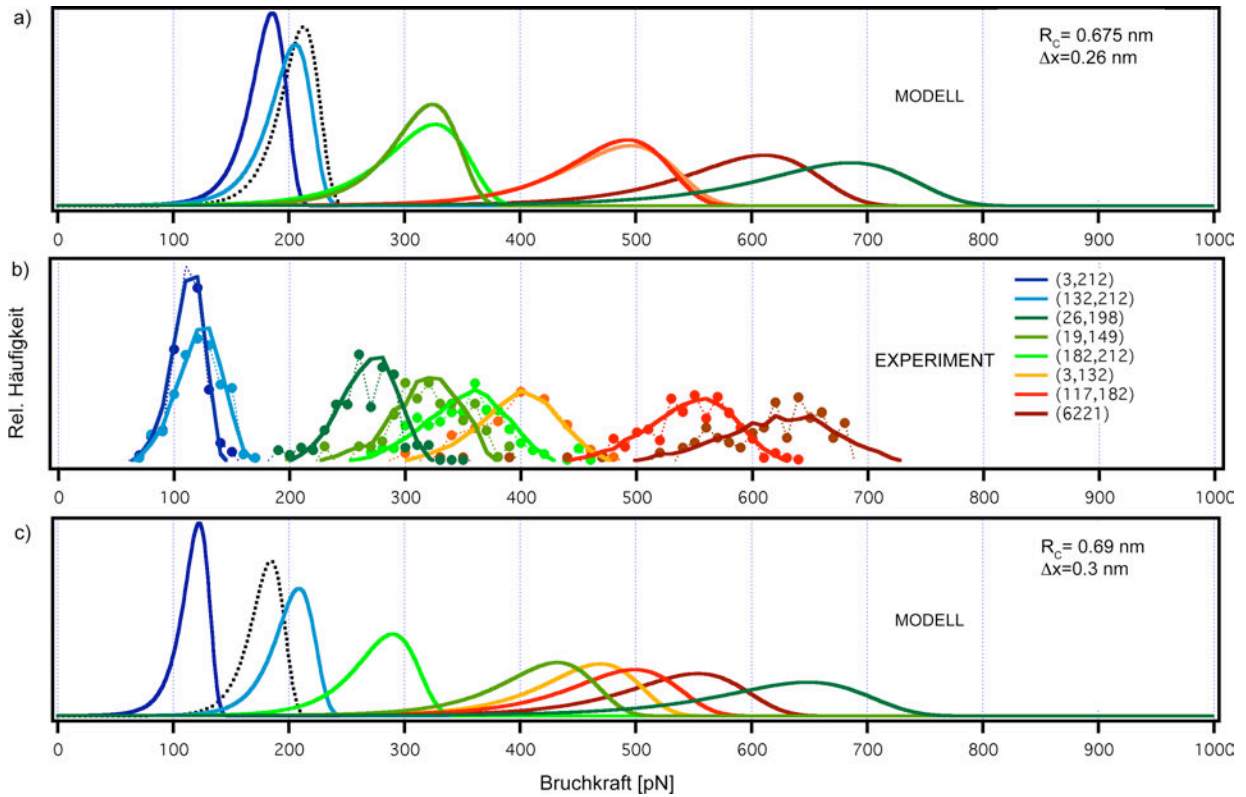


Abbildung 6.5: a) und c) Berechnete Bruchkraftverteilungen eines elastischen Netzwerks. Gestrichelte Linien geben die Bruchkraftverteilung einer Einzelbindung an. b) Experimentell beobachtete Bruchkraftverteilungen (Kreise) mit Monte-Carlo Fits (Linien) aus Kapitel 5.

Potentialbreite der Einzelbindungen zusammen:

$$k_0 = \Delta x \cdot \frac{\kappa v}{k_B T} \cdot e^{-\gamma/k_B T} \quad (6.9)$$

Es sind Kraftwirkungsmatrizen für alle experimentell untersuchten Belastungsrichtungen für Interaktionsradien R_C im Bereich von 0.6 nm bis 2 nm berechnet worden und mit Gl. 6.5 sind Bruchkraftverteilungen für den ersten Bindungsbruch im Netzwerk berechnet worden. Es wurde das Parameterpaar $(R_C, \Delta x)$ mit optimaler Übereinstimmung mit den experimentellen Bruchkraftverteilungen gesucht. Abb. 6.5 zeigt das Ergebnis dieser Analyse. Für einen Interaktionsradius R_C im Bereich zwischen 0.65 nm bis 0.75 nm und eine Potentialbreite $\Delta x \simeq 0.28 \text{ nm}$ (mit einem Übergangsratenkoeffizienten $k_0 \simeq 1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ bzw. einer Barrienhöhe $\Delta G_1^* = 27 k_B T$) der Einzelbindungen ergibt sich optimale Übereinstimmung mit den experimentell beobachteten Bruchkraftverteilungen.

Wie im Experiment auch, markieren die Belastungsrichtungen (3,212) und (6,221) die Extrempunkte der mechanischen Stabilität des Bindungsnetzwerks. Bis auf die Belastungsrichtung (26,198) stimmt auch die Ordnung der mechanischen Stabilität für alle Belastungsrichtungen mit dem Experiment überein. Die Richtungen (3,132), (117,182) und (6,221) zeigen wie im Experiment die höchsten Bruchkräfte um 600 pN, während (182,212)

und (19,149) Bruchkräfte im Bereich von 350 pN aufweisen. Die Richtungen (3,212) und (132,212) brechen wie im Experiment auch bereits bei niedrigen Kräften zwischen 100 pN und 200 pN. Ebenfalls wird die Breite der experimentell beobachteten Bruchkraftverteilungen durch die berechneten Bruchkraftverteilungen reproduziert.

Für unterstabilisierte, kaum zusammenhängende Bindungsnetzwerke bei Interaktionsradien $R_C < 0.65$ nm stimmt die Ordnung der mechanischen Stabilität nicht mehr mit dem Experiment überein. Zudem ist die Berechnung der Kraftwirkungsmatrix α_{lm} in diesem Parameterbereich instabil, da die Netzwerke keine nennenswerte Rückstellkraft aufbauen. Im Bereich $0.65 \text{ nm} < R_C < 0.75$ nm kann die experimentell aufgefundene mechanische Anisotropie reproduziert werden. Für $R_C > 0.75$ nm beobachtet man ein Zusammenrücken der Bruchkraftverteilungen, die mechanische Stabilität der verschiedenen Belastungsrichtungen wird immer ähnlicher. Die Anisotropie des Netzwerks geht verloren.

6.6 Diskussion

Die experimentell beobachtete mechanische Anisotropie der GFP Raumstruktur kann demnach mit dem vorgestellten Minimalmodell erklärt werden. Das Modell basiert auf einem über einen Interaktionsradius R_C kontrollierten elastischen Netzwerk, dessen Netzwerkpunkte sich an den Positionen der Aminosäuren entsprechend der GFP Raumstruktur befinden. Die Präsenz des Polypeptidrückgrates wird vollständig vernachlässigt. Die chemische Natur der Aminosäuren wird ebenfalls vollständig vernachlässigt. Die Netzwerkverbindungen werden als irreversibel bruchfähige, identische Einzelbindungen mit einem durch eine Potentialbreite Δx und einen Übergangsratenkoeffizienten k_0 beschriebenen Bindungspotential modelliert.

Die große Bandbreite der experimentell beobachteten Bruchkräfte als auch ihre unterschiedlichen Schwankungsbreiten in den verschiedenen Richtungen kann durch die Kinetik des ersten Bindungsbruch des Minimalmodells qualitativ erklärt werden. Demnach ist die experimentell beobachtete große Schwankung der apparenten Potentialbreite auf die unterschiedliche Projektion einer extern anliegenden Kraft auf das Bindungspotential der Einzelbindungen zurückzuführen. Die experimentell beobachteten apparenten Potentialbreiten sind projizierte Eigenschaften des Bindungspotentials einer Einzelbindung. Die Potentialbreite der Einzelbindungen, mit der die experimentellen Daten qualitativ reproduziert werden können, hat einen Wert von $\Delta x \simeq 0.28$ nm. Die schwächsten Bindungen in Proteinstrukturen werden durch van-der-Waals Wechselwirkungen verursacht, deren Reichweite etwa dieselbe Größenordnung hat [46][52].

Die experimentell beobachteten energetischen Barrierenhöhen geben näherungsweise die Höhe der energetischen Barriere einer Einzelbindung an. Der für den Bruch der Proteinstruktur relevante Übergangszustand ist demnach identisch mit dem Übergangszustand der Einzelbindung, die im Netzwerk die meiste Kraft trägt.

Die natürlichen Übergangsratenkoeffizienten der Einzelbindungen innerhalb des Modells müssen zu etwa $k_0 \approx 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ gewählt werden, was einer Barrierenhöhe ΔG^* von etwa $27 k_B T$ entspricht, um gute Übereinstimmung mit dem Experiment zu erzielen. Das

Modell nimmt irreversible Einzelbindungen an, die nach erfolgtem Bruch keine Möglichkeit zur erneuten Ausbildung der Bindung haben. Ein Schritt hin zu einem realistischeren Modell muss daher die Berücksichtigung von reversiblen Bindungen sein. Dazu könnte statt der Wahrscheinlichkeit, intakte Bindungen anzutreffen in Gl. 6.5, ähnlich wie in [100] die Besetzungswahrscheinlichkeit einer Bindung im Gleichgewicht unter Kraft betrachtet werden. Es bleibt offen, welche Wechselwirkungen in Proteinen durch die Bindungen modelliert werden. Es könnte sich um kleine Einheiten aus mehreren Wechselwirkungen handeln, z.B. die Summe der Wechselwirkungen die zwischen benachbarten Aminosäuren wirken.

Die Einzelbindung, die die meiste Kraft trägt, ist ausschlaggebend für die Bruchkinetik. In den meisten Belastungsgeometrien handelt es sich um mehrere Bindungen, die vergleichbare Anteile der extern anliegenden Kraft tragen (vgl. Abb. 6.4). Entsprechend gibt es mehrere Möglichkeiten für den ersten Bruch im Netzwerk. Angewandt auf eine reale Proteinstruktur bedeutet dies, dass es mehrere mögliche Reaktionspfade gibt, über die der vollständige Bruch einer Proteinstruktur erfolgen kann. Im Falle der Belastung der GFP Struktur über (3,212) konnten experimentell zwei unterschiedliche Reaktionspfade identifiziert werden (vgl. Kapitel 4). Die Kraftwirkungsmatrix in Abb. 6.4 zeigt, dass in der Richtung (3,212) nur wenige Bindungen fast vollständig die anliegende Kraft tragen. Es ist denkbar, dass ein realistischeres Modell der Bindungsstruktur des GFP daher eine strukturelle Identifikation der Reaktionspfade ermöglichen würde.

In allen Belastungsrichtungen wird die meiste Kraft von Bindungen getragen, die sich unmittelbar in der Nähe der Kraftangriffspunkte befinden. Der erste Bruch der Struktur wird somit mit großer Wahrscheinlichkeit immer in der Nähe der Kraftangriffspunkte erfolgen. Damit ist klar, dass die kraftinduzierte Entfaltung einer Proteinstruktur über vollkommen andere Reaktionspfade erfolgt, als thermisch oder chemisch induzierte Protein entfaltung.

Die Grenzen der drastischen Reduktion der komplexen GFP Raumstruktur auf Massenpunkte, die in gewisser Weise willkürlich mit Federn verbunden sind, werden durch die Überschätzung der Stabilität des GFP in der Richtung (26,198) deutlich. Die Aminosäure 198 befindet sich in einer leicht ins Lösungsmittel gebogenen Schleife (vgl. Abb. 7.2) zwischen zwei β -Strängen. In dem modellierten Netzwerk werden der Aminosäure 198 (und nicht nur ihr) jedoch Wechselwirkungen mit vielen Nachbarn zugewiesen, die es in der Realität nicht geben dürfte.

Bei allen Belastungsgeometrien außer der Belastung über (3,212) kommt es innerhalb des Modells erst bei deutlich über der Stabilität der Einzelbindungen liegenden Kräften zu einem ersten Bruchereignis. Nach Kapitel 3 wäre demnach schneller, kooperativer Bruch des Gesamtsystems zu erwarten, wie es experimentell auch beobachtet wird. Eine Analyse des Fortgang des Bruchs des elastischen Netzwerks als Modell für den vollständigen Bruch einer Proteinstruktur ist jedoch an dieser Stelle nicht sinnvoll, da z.B. ein Polypeptidrückgrat zur weiteren Kraftbelastung nach dem ersten internen Bindungsbruch in dem Modell vollkommen fehlt.

Das verwendete Modell impliziert, dass die chemischen Unterschiede der einzelnen Aminosäuren in der Sequenz eines Proteins völlig unerheblich für die mechanischen Eigenschaften der gefalteten Raumstruktur sind. Während die Sequenz eines Proteins dessen native

Struktur eindeutig festlegt, würde demzufolge die gefaltete Raumstruktur die mechanischen Eigenschaften eines Proteins festlegen. Das ist eine starke Aussage, auf die jedoch bereits in anderen Arbeiten hingewiesen wurde [58][81]. Daraus folgt unter anderem, dass Mutationen, die die Rückgrat-Struktur eines Proteins erhalten, keinen Einfluss auf die Mechanik einer Proteinstruktur haben dürften. Brockwell et al. [16] haben den Einfluss von strukturerhaltenden Punktmutationen auf die mechanische Stabilität einer Proteinstruktur untersucht. Dabei zeigten sich nur marginale Unterschiede im Vergleich zur nicht-mutierten Struktur. Im Gegensatz dazu zeigten Li et al. [63], dass Prolin-Punktmutationen die mechanische Stabilität einer Proteinstruktur deutlich verändern können. Prolin-Mutationen sind jedoch nicht strukturerhaltend und sind in der Studie von Li et al. explizit verwendet worden, um gezielt β -Stränge zu brechen und einzelne Wasserstoffbrückenbindungen in der Struktur des untersuchten Proteins zu entfernen oder neue einzufügen. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Auswirkung von Mutationen auf die mechanische Stabilität eines Proteins zu prüfen und obige Aussage damit zu testen.

Aufschluss über den tatsächlichen Verlauf des mechanischen Entfaltungspfades eines Proteins als Vielteilchensystem können jedoch nur Molekular-Dynamik Simulationen geben, die sämtliche physikalischen Wechselwirkungen zwischen allen Atomen eines Proteins und des umgebenden Lösungsmittels berücksichtigen [39][43][42][103]. Diese Simulationen sind jedoch extrem rechenintensiv [41]. Es ist daher wünschenswert, Näherungen zu identifizieren [95], mit denen die Dynamik gefalteter Proteinstrukturen korrekt beschrieben werden kann. Das vorgeschlagene Modell leistet dazu einen Beitrag.

6.7 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die experimentell beobachtete Bruchkinetik des GFP als erster Bindungsbruch in einem Bindungsnetzwerk interpretiert. Das GFP wurde als elastisches Netzwerk approximiert und die Kinetik des ersten Bindungsbruches in diesem Netzwerk berechnet. Die experimentell beobachtete mechanische Anisotropie der GFP Raumstruktur konnte mit diesem Minimalmodell reproduziert werden.

Kapitel 7

Mechanische Anisotropie der GFP Struktur

Die Ergebnisse aus den durchgeführten Messungen können nun zu einem Bild der mechanischen Eigenschaften der gefalteten GFP Raumstruktur zusammengefasst werden.

7.1 Direktionale molekulare Federkonstanten

Die Potentialbreite und die Höhe einer energetischen Barriere sind in erster Näherung charakteristisch für die elastischen Eigenschaften einer Einzelbindung. Dazu wird das Bindungspotential in der Nähe des Potentialminimums bei x_N als Parabel angenähert:

$$G_1(x) = \frac{1}{2}p_1(x - x_N)^2 \quad (7.1)$$

Die Bindung wird damit für kleine Ausdehnungen als Hooke'sche Feder mit der Federhärte p_1 angenähert. Unter der Voraussetzung, dass sich die energetische Barriere ΔG_1^* am Ort $x_N + \Delta x_1$ auf der Reaktionskoordinate befindet, ergibt sich für die kinetische Federhärte einer Einzelbindung:

$$p_1 = 2 \cdot \frac{\Delta G_1^*}{\Delta x_1^2} \quad (7.2)$$

Es wurde gezeigt, dass sich die experimentell bestimmten, apparenten Potentialbreiten Δx_{ij} der GFP Raumstruktur auf die größte Projektion einer extern anliegenden Kraft auf das Bindungspotential von Einzelbindungen zurückführen lassen, d.h. $\Delta x_{ij} \simeq \max(\alpha_{lm}) \cdot \Delta x_1$. Die experimentell bestimmten Barrierenhöhen ΔG_{ij}^* stimmen jedoch im wesentlichen mit der Barrierenhöhe einer Einzelbindung überein, d.h. $\Delta G_{ij}^* \approx \Delta G_1^*$. Damit kann nun eine direktionale Federkonstante p_{ij} einer Proteinstruktur bei Belastung über die Aminosäuren i, j angegeben werden:

$$p_{ij} = \frac{2\Delta G_{ij}^*}{\Delta x_{ij}^2} \simeq \frac{1}{\max(\alpha_{lm})^2} \cdot p_1 \quad (7.3)$$

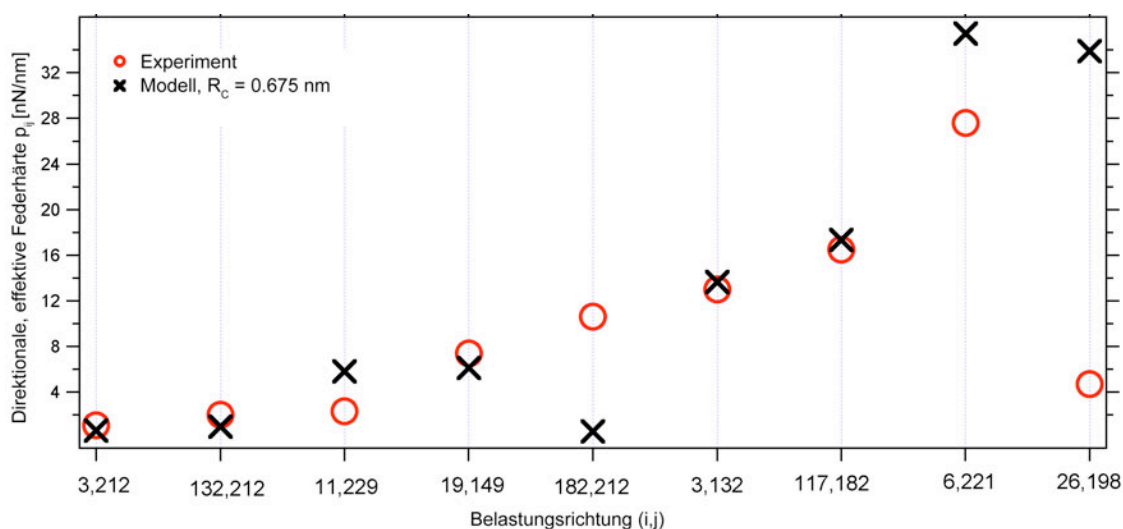


Abbildung 7.1: Vergleich der beobachteten, directionalen Federhärten p_{ij} mit berechneten, effektiven Federhärten des GFP Minimalmodells aus Kapitel 3.

Unter Verwendung der experimentell ermittelten apparenten Potentialbreiten und Barrierenhöhen aus Tabelle 5.1 sind die directionalen Federhärten der GFP Struktur berechnet worden und in Abb. 7.1 sowie in Tabelle 5.1 angegeben worden. Die effektive Federhärte der GFP Struktur variiert von 1 nN/nm für die Richtung (3,212) bis hin zu 27 nN/nm für die Richtung (6, 221)¹. Mit der directionalen Federkonstante p_{ij} kann die zu erwartende Deformation der GFP Struktur entlang einer Belastungsrichtung bei den experimentell beobachteten mittleren Bruchkräften berechnet werden. Mit den Werten aus Tabelle 5.1 ergibt sich, dass in keiner der acht Belastungsrichtungen eine mittlere Deformation der Struktur größer als 1 Ångström zu erwarten wäre. In Kapitel 2 wurde die Messung von intramolekularen Abständen in der GFP Raumstruktur beschrieben. Es wurde dabei festgestellt, dass die GFP Struktur vor dem Bruch keinerlei signifikante Deformationen innerhalb des wenige Ångström betragenden Messfehlers aufweist. Es lässt sich daher schliessen, dass die directionalen Federkonstanten der GFP Struktur die richtige Größenordnung haben und ihre relativen Unterschiede korrekt sind.

Im letzten Kapitel ist ein Minimalmodell der GFP Mechanik vorgeschlagen worden. Zur Vorhersage der Kräfte, bei denen es zum ersten Bruch in einem diskreten Bindungsnetzwerk mit der Geometrie des GFP kommt, wurde berechnet, wie sich eine extern anliegende Kraft in dem elastischen Netzwerk verteilt. Dazu wurden die Rückstellkräfte bestimmt, die bei der Deformation des Modells entlang der experimentell untersuchten Belastungsrich-

¹Eine Unsicherheit im absoluten Wert der directionalen Federkonstanten ist durch die Wahl des Arrhenius-Vorfaktors k_T in Gleichung 5.1 für die Berechnung der Barrierenhöhe gegeben. Die Federkonstanten p_{ij} in Tabelle 5.1 wurden mit der oberen Grenze $k_T = 10^9 \text{ s}^{-1}$ berechnet. Für jede Größenordnung, die man k_T kleiner wählt, reduzieren sich die directionalen Federkonstanten um etwa 10 Prozent. Die relativen Unterschiede zwischen den Federkonstanten bleiben jedoch innerhalb von 5 Prozent Abweichung jeweils erhalten.

tungen an den zwei ausgelenkten Aminosäuren (i, j) auftreten. Damit lässt sich direkt die effektive Federhärte des elastischen Netzwerks in den jeweiligen Richtungen bestimmen. Abb. 7.1 vergleicht die aus dem Experiment bestimmten direktionalen Federkonstanten p_{ij} mit der effektiven Federhärte des Minimalmodells für einen Interaktionsradius $R_C = 6.75$ Å und einer Federhärte von ca. 85 nN/nm der einzelnen Netzwerkverbindungen. Bis auf die Richtungen (26,198) und (182,212) stimmen die effektiven Federhärten des elastischen Netzwerks mit den Federhärten aus dem Experiment sehr gut überein. Dies bestätigt damit erneut, dass das Minimalmodell geeignet zur Beschreibung der Mechanik des GFP ist.

Die direktionalen Federkonstanten ergeben sich aus dem Produkt der kinetischen Federkonstante der Einzelbindungen mit dem elastisch labilsten Teil der Proteinstruktur. Abb. 7.1 zeigt damit auch, dass die direktionalen Federkonstanten p_{ij} ein wirkliches Maß für die effektiven elastischen Eigenschaften der gesamten Proteinstruktur in einer bestimmten Belastungsrichtung sind. Die experimentelle Bestimmung von apparenten Potentialbreiten und Barrierenhöhen aus der Bruchkinetik eines Proteins bei punktueller Kraftbelastung ermöglicht somit den Rückschluss auf tatsächliche, elastische Eigenschaften der gefalteten Raumstruktur einer Proteinstruktur im nativen, funktionalen Zustand *vor* dem Bruch.

7.2 Anisotrope Energielandschaft des GFP

Die beobachtete Bruchkinetik des GFP entlang verschiedener Belastungsrichtungen konnte durch apparente Potentialbreiten Δx_{ij} und energetische Barrierenhöhen ΔG_{ij}^* bei Betrachtung des GFP als ein Teilchen in einem hochdimensionalen und offenbar anisotropen Potentialtopf beschrieben werden, wie eingangs in Abb. 1 schematisch motiviert. Die Barrierenhöhen variierten dabei nur wenig, während eine starke Variation in den Potentialbreiten beobachtet wurde. Auf der anderen Seite konnte nun durch Vergleich der experimentellen Daten mit dem Minimalmodell herausgearbeitet werden, dass die Bruchkinetik des GFP im wesentlichen effektive molekulare Federkonstanten entlang verschiedener Reaktionskoordinaten kodiert. Diese molekularen Federkonstanten sind demnach der Hesse-Matrix, d.h. der partiellen zweiten Ableitung der hochdimensionalen Energielandschaft des Proteins nach den Koordinaten der Kraftangriffspunkte äquivalent. Durch Belastung eines Proteins über verschiedene Kraftangriffspunkte kann demnach die Krümmung der Energielandschaft eines Proteins in der Umgebung des nativen Zustands untersucht werden.

7.3 Stabilitätskarte der GFP Raumstruktur

Die direktionalen mechanischen Eigenschaften der gefalteten GFP Raumstruktur sind in Abb. 7.2 zusammengefasst. Bänder verbinden die untersuchten Kraftangriffspunkte. Die Breite der Bänder kodiert die experimentell aufgefundenen molekularen Federkonstanten, während die mittlere Bruchkraft des Moleküls in der jeweiligen Belastungsrichtung durch eine Farbskala dargestellt ist. Für die genauen Zahlenwerte sei auf Tabelle 5.1 verwiesen. Die großen Unterschiede in der direktionalen Elastizität reflektieren die diskrete, interne

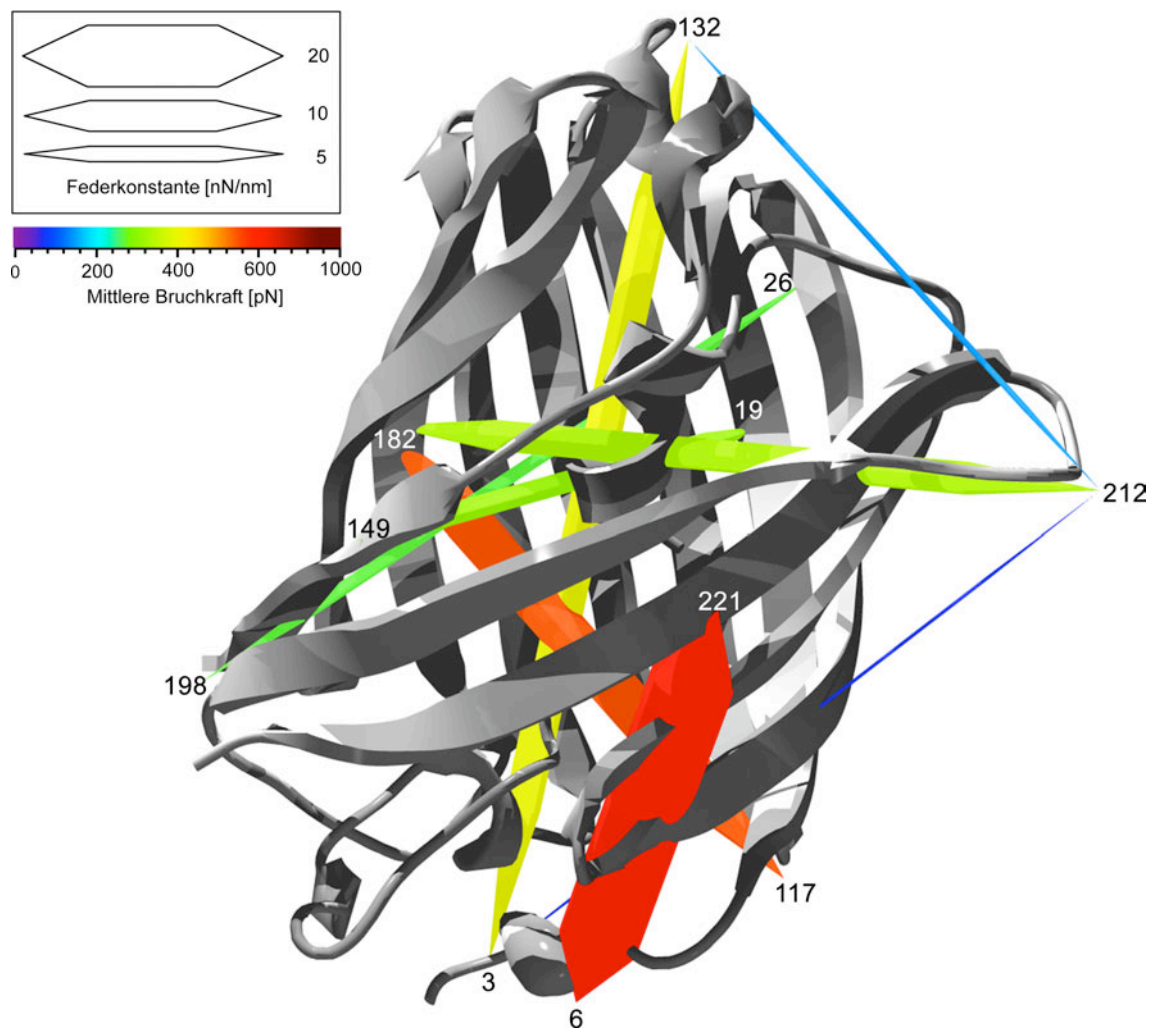


Abbildung 7.2: Die Bänderbreite repräsentiert die directionale Federkonstante des Moleküls in der entsprechenden Richtung. Farben kodieren die jeweilige mittlere Bruchkraft.

Bindungsstruktur des Moleküls. Das im vorigen Kapitel vorgestellte Minimalmodell der GFP Mechanik legt dabei nahe, dass die chemischen Eigenschaften der einzelnen Aminosäuren nur für die Ausbildung der nativen Struktur des Moleküls relevant sind, während die mechanischen Eigenschaften durch die Geometrie der Struktur dominiert werden.

Kapitel 8

Ausblick

In dieser Arbeit wurde mit der Kombination aus AFM-Kraftspektroskopie mit Cysteine Engineering erstmals eine Technik zur Untersuchung der mechanischen Eigenschaften von Proteinen in verschiedenen Bereichen ihrer funktionalen Raumstruktur vorgestellt. Das topologisch komplexe Grün Fluoreszierende Protein ist mit dieser Technik eingehend untersucht worden. Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente und Techniken eröffnen nun neue, vielversprechende Möglichkeiten für die Proteinphysik. Einige dieser Möglichkeiten werden an dieser Stelle daher näher diskutiert.

8.1 Wie stabil sind Sekundärstrukturelemente?

Für das Verständnis eines komplexen Systems wie der funktionalen Raumstruktur eines Proteins ist es notwendig, die Eigenschaften der elementaren Bausteine des Systems zu kennen. Elementare Bausteine von Proteinstrukturen sind Sekundärstrukturelemente wie α -Helizes, Loops und β -Stränge [3]. Mit der in dieser Arbeit eingeführten Kombination aus Cysteine Engineering und Einzelmolekül-Kraftspektroskopie wird es in der Zukunft möglich sein, eine Ebene tiefer zu gehen und direkt die mechanischen Eigenschaften von einzelnen Sekundärstrukturelementen zu untersuchen. Von Interesse wäre beispielsweise, wie unterschiedlich fest verschiedene Sekundärstrukturelemente in einer Proteinstruktur verankert sind und damit deren Eigenschaften bestimmen. Die Beantwortung von kinetischen Fragestellungen, wie schnell z.B ein gezielt abgelöster β -Strang wieder in die Reststruktur zurückfaltet oder ob die Reststruktur eines Proteins nach einer solchen Störung autark stabil bleibt, würde zu einem tieferen Verständnis des Faltungsprozesses von Proteinen beitragen. Die Kombination aus AFM-Kraftspektroskopie mit Cysteine Engineering ermöglicht nun den Zugang zu solchen Fragestellungen.

Eine Untersuchung von Sekundärstrukturelementen ist nur im Kontext einer ganzen Proteinstruktur möglich und stellt eine große technische Herausforderung dar. Sekundärstrukturelemente bestehen aus nur wenigen Aminosäuren. Konformationsübergänge haben damit nur minimale, kaum detektierbare Längenänderungen im Bereich weniger Ångström zur Folge. Die Amplifikation der mechanischen Signatur einzelner Sekundärstrukturelemente

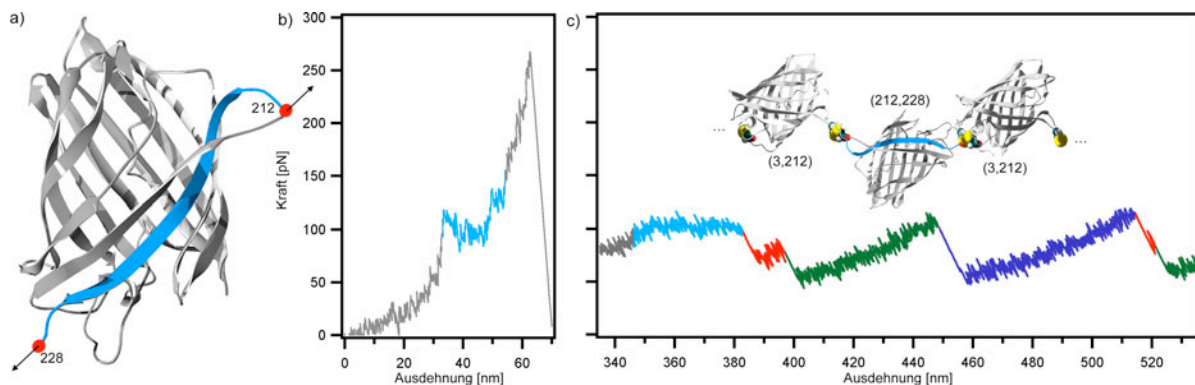


Abbildung 8.1: a) Schema der GFP Raumstruktur. Der durch die Aminosäuren 212 bis 228 eingegrenzte einzelne β -Strang ist farblich gekennzeichnet. b) Kraft-Ausdehnungsantwort von (212,228) verknüpften GFP Polyproteinen. Hellblau: Ausstrecken der β -Stränge c) Kraft-Ausdehnungsantwort von (3,212)(212,228) gemischt verknüpften Copolyproteinen. Hellblau: Ausstrecken der β -Stränge. Rot: Partieller Bruch des GFP entlang (3,212). Grün: Bruch der verbleibenden Teilstruktur. Blau: Kompletter Bruch des GFP entlang (3,212). Vgl. Kapitel 4.

über Polyproteine kann diese Ereignisse detektierbar machen.

Von Interesse ist beispielsweise, wieviel Kraft aufgewendet werden muss, um einen einzelnen β -Strang aus einer Proteinstruktur herauszuziehen. Ein einzelner β -Strang wird z.B. in der GFP Raumstruktur durch die Aminosäuren (212,228) eingegrenzt (vgl. Abb. 8.1 a). Über Cysteine Engineering sind (212,228) verknüpfte GFP Polyproteine erzeugt worden, die mit dem Kraftspektrometer untersucht worden sind. Abb. 8.1 a) zeigt die typische Kraft-Ausdehnungsantwort dieser Polyproteine. Der β -Strang kann sich beim Herausziehen nur um etwa 1.3 nm verlängern, was einer Verlängerung um ein Drittel im Vergleich zu seiner gefalteten Länge entspricht. Die Kraftkurve in Abb. 8.1 b) zeigt ein etwa 20 nm langes Kraftplateau bei 100 pN, bei dem die initiale Länge des gespannten Polyproteins um etwa ein Drittel verlängert wird. Demzufolge wurden in der gezeigten Kraftkurve etwa 15 hintereinander geschaltete β -Stränge aus einzelnen GFP Strukturen herausgezogen. Zum Nachweis, dass es sich bei dieser Signatur tatsächlich um das Herausziehen einzelner β -Stränge handelt, kann die in Kapitel 4 eingeführte Konstruktion von Copolyproteinen herangezogen werden. Abb. 8.1 c) zeigt die Kraft-Ausdehnungsantwort von (3,212)(212,228) gemischt verknüpften GFP Polyproteinen. Abgesehen von der typischen Signatur des Bruchs der GFP Struktur bei Belastung über (3,212), beobachtet man wieder ein Kraftplateau bei 100 pN, das mit (3,212) GFP Homopolyproteinen nicht beobachtet wird. Damit ist gezeigt, dass dieses Plateau durch das Herausziehen einzelner β -Stränge verursacht wird. Für diese Störung der GFP Raumstruktur sind 100 pN notwendig. Die Machbarkeit der Untersuchung der mechanischen Eigenschaften einzelner Sekundärstrukturelemente ist damit demonstriert. Es wird sich zeigen, welchen Beitrag Messungen dieser Art zum Verständnis der Mechanik von Proteinen liefern können.

8.2 Beitrag für die Strukturbiologie

Ein Schlüsselschritt zum Verständnis der Funktionsweise eines Proteins ist die Aufklärung der gefalteten Raumstruktur eines Proteins. Hochauflösende Strukturaufklärung an Proteinen ist derzeit hauptsächlich durch zwei Ensemble-Techniken geprägt. Röntgenstreuung an kristallisierten Proteinen liefert hochauflösende, atomare Strukturinformationen [5]. Diese Informationen sind statisch und entstammen kristallisierten Proteinen fern ihrer nativen Umgebung, in der sie normalerweise ihre Funktion ausüben. Kernmagnetische Resonanz (NMR) erlaubt die hochauflösende Strukturbestimmung von Proteinen in Lösung, ist derzeit aber u.a. aufgrund des immensen Rechenaufwandes in der Interpretation der NMR-Daten noch auf Proteine begrenzt, die aus weniger als ca. 150 Aminosäuren bestehen [111][51]. Die räumliche Struktur einer Vielzahl von Proteinen ist aufgrund unterschiedlicher Probleme wie z.B. Unlöslichkeit, Aggregation bzw. Kristallisationsproblemen derzeit weder für Röntgenkristallographie noch NMR zugänglich [69]. Eine erfolgreiche Einzelmolekül-Technik, die dynamisch Konformationsänderungen von einzelnen Proteinen beobachten kann, ist z.B. durch Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)-basierte Messungen gegeben [44]. FRET-Techniken sind jedoch derzeit nur relative Strukturänderungen und keine absoluten Strukturinformationen zugänglich. Es gibt einen großen Bedarf an neuen Techniken, die präzise und absolute Strukturinformationen möglichst von einzelnen Proteinen in ihrer nativen Umgebung bei der Arbeit erlangen können.

In Kapitel 2 wurde beschrieben, wie durch mechanische Messungen an einzelnen Molekülen intramolekulare Abstände in der gefalteten Raumstruktur eines Proteins bis auf wenige Ångström genau bestimmt werden können. Eine mechanische Triangulation lieferte absolute Positionen einzelner Aminosäuren in der Raumstruktur eines Proteins. Die mechanischen Abstandsmessungen erfordern im Prinzip keinerlei Kenntnis der tatsächlichen Raumstruktur eines Proteins und könnten daher auch für die Bestimmung von intramolekularen Abständen in Proteinen unbekannter Raumstruktur verwendet werden. Für die Positionsbestimmung einer Aminosäure sind nur drei Abstandsmessungen nötig. Es ist daher im Prinzip denkbar, komplette dreidimensionale Proteinstrukturen über die Bestimmung von ausreichend vielen Paarabständen zu rekonstruieren. Dazu wären maximal $3N$ Abstandsmessungen¹ nötig, der Aufwand wächst also nur linear mit der Proteingröße. Vielversprechend könnte eine Kombination der mechanischen Einzelmolekül-Messungen mit rechnerischen Methoden zur Strukturvorhersage [94] in einem iterativen Prozess sein:

1. Experimentelle Bestimmung von einigen intramolekularen Abständen als Randbedingungen.
2. Rechnerische Strukturvorhersage unter Einbeziehung der Randbedingungen
3. Erneute Messung von weiteren intramolekularen Abständen mit Hilfe der errechneten Struktur

¹ N = Anzahl der Aminosäuren eines Proteins

4. Verbesserung der rechnerischen Strukturvorhersage mit den experimentellen Randbedingungen
5. Erneute Messung von weiteren intramolekularen Abständen
6. Test: Strukturvorhersage in 4. korrekt? Falls ja: Ende; Falls nein: Wiederhole 4-6.

Dieses Verfahren ist vielversprechend, da es Vorteile beider Techniken kombiniert und den nötigen Aufwand für beide verwendeten Methoden deutlich reduziert. Auf der experimentellen Seite wird die aufwändige Messung vieler intramolekularer Abstände unnötig und durch die rechnerische Strukturvorhersage wird eine atomare Auflösung erreicht [76]. Methoden der Strukturvorhersage berechnen die Energie für eine Vielzahl verschiedener Konfigurationen einer Aminosäurenkette bestimmter Sequenz und versuchen die Konfiguration minimaler Energie aufzufinden. Ein großes Problem der Strukturvorhersage liegt jedoch in der Vielzahl der möglichen Konfigurationen eines N Aminosäuren großen Proteins verborgen: nur ein kleiner Teil der möglichen Konfigurationen können mit dem Computer überhaupt abgetastet werden. Das Auffinden der Konfiguration globaler, minimaler Energie ist daher ein großes Problem in der Strukturvorhersage. Bisher konnten nur für kleine Proteine ($N < 50$) unter großem Rechenaufwand vertrauenswürdige Proteinstrukturen vorhergesagt werden [14][94].

Die experimentelle Bestimmung von intramolekularen Abständen als Randbedingungen für die Strukturvorhersage könnte jedoch zur Reduktion des nötigen Rechenaufwandes beitragen. Die folgende heuristische Argumentation macht dies plausibel: Streckt man einen entfalteten Aminosäurenstrang auf einen bestimmten End-zu-End Abstand, so benötigt man dafür eine Kraft. Diese Kraft ist weitgehend entropisch bedingt, weil die Festlegung auf eine bestimmte Ausdehnung die Zahl der der entfalteten Aminosäurenkette zur Verfügung stehenden Konfigurationen deutlich reduziert. Experimentell beobachtet man bei kleinen Ausdehnungen eine Rückstellkraft, die proportional zur Ausdehnung ist (vgl. Anhang D, Gl. 2.2 für $d \rightarrow 0$):

$$F(d) \simeq \frac{3 k_B T}{2} \frac{d}{p L} \quad (8.1)$$

Die Arbeit, die zur Ausdehnung auf den Abstand d geleistet werden muss, wird zur Reduktion der Entropie der Aminosäurenkette verwendet:

$$\Delta S(d) = -\frac{1}{T} \int_0^d F(x) dx \quad (8.2)$$

Die Entropie der Kette hängt direkt mit der Zahl der möglichen Konfigurationen g zusammen, die eine bestimmte Ausdehnung d realisieren:

$$\Delta S(d) = k_B \ln g(d) - k_B \ln g(0) \quad (8.3)$$

Die Zahl der möglichen Konfigurationen $g(0)$ für ein N Aminosäuren großes Protein beträgt in etwa α^N , wobei α die Zahl der Einstellmöglichkeiten für ein Kettenglied relativ zum

nächsten bezeichnet. Kennt man den End-zu-End Abstand d einer Aminosäurenkette, so ist dies gleichbedeutend mit einer Fixierung des End-zu-End Abstandes auf den aufgefundenen Wert. Mit den Gleichungen 8.1 bis 8.3 sowie den Substitutionen $L = Nd_{aa}$ und $d = \gamma d_{aa}$ mit $\gamma \in [0, N]$ folgt für die Zahl der Konfigurationen einer Kette aus N Aminosäuren, deren End-zu-End Abstand auf den Wert γ (ausgedrückt in Aminosäureinheiten) bestimmt wurde:

$$g(\gamma) \simeq \alpha^N \cdot \exp(-\gamma^2/N) \quad (8.4)$$

Für ein Protein aus 200 Aminosäuren, dessen End-zu-End Abstand z.B der Länge von etwa 10 Aminosäuren entspricht, reduziert sich die Zahl möglicher Konfigurationen um einen Faktor 0.6 - was zunächst bei α^{200} möglichen Konfigurationen keine dramatische Reduktion bedeutet. Teilt man das Protein jedoch in gedachte Teilketten aus jeweils n_i Aminosäuren mit $\sum_i n_i = N$ auf, so ist die Gesamtzahl möglicher Konfigurationen gegeben durch:

$$g = \prod_i \alpha^{n_i} = \alpha^N \quad (8.5)$$

Bestimmt man nun jeweils den End-zu-Endabstand γ_i der Teilketten, so ergibt sich:

$$g = \alpha^N \cdot \prod_i \exp(-\gamma_i^2/n_i) \quad (8.6)$$

Das bedeutet, die Reduktion in der Zahl möglicher Konfigurationen potenziert sich mit der Zahl der bekannten Teilkettenabstände. Zerlegt man z.B ein Protein aus 200 Aminosäuren in acht Teilketten aus jeweils 25 Aminosäuren und bestimmt experimentell die intramolekularen Abstände zwischen den Endpunkten (also $d_{0,25}, d_{25,50}$ etc.) und findet z.B jeweils relative Ausdehnungen von $\gamma_i \approx 10$, so reduziert sich die Zahl möglicher Konfigurationen bereits um 14 Größenordnungen. Die Einführung von experimentellen Randbedingungen könnte damit helfen, den nötigen Rechenaufwand in der Strukturvorhersage zu reduzieren. In dieser Arbeit sind im GFP acht intramolekulare Abstände experimentell bestimmt worden. Die Machbarkeit solcher Messungen ist damit demonstriert worden.

Es kann jedoch eine spezielle Eigenschaft des GFP sein, dass die mechanisch bestimmten intramolekularen Abstände keinerlei signifikante Abweichungen von der Kristallstruktur aufweisen. Es ist denkbar, dass für andere Proteine ähnliche Situationen auftreten wie im Falle der N-C terminalen Kraftbelastung des GFP (vgl. Anhang B): das Auftreten von Teilentfaltung und/oder gravierende Deformationen durch die Belastung mit Kraft. In diesem Fall liefert die mechanische Abstandsmessung jedoch wertvolle Informationen über das elastische Verhalten eines Proteins. Es wird sich zeigen, ob die vorgestellte mechanische Abstandsbestimmung tatsächlich zur *de novo* Bestimmung von Proteinstrukturen beitragen kann.

8.3 Dynamik gefalteter Proteinstrukturen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente brachten eine überraschende Vielfalt der mechanischen Eigenschaften einer Proteinstruktur zu Tage. Experimentelle Daten allein

genügen jedoch nicht, um ein tieferes Verständnis der Prinzipien, die hinter den beobachteten Eigenschaften stehen, zu erlangen. Aufgrund der Komplexität von Proteinen ist die theoretische Beschreibung der Dynamik einer gefalteten Proteinstruktur eine enorme Herausforderung, die ohne Hilfe des Computers nicht zu bewältigen wäre. Molekulardynamik-Simulationen sind etablierte Techniken, die die atomaren Wechselwirkungen zwischen allen Atomen eines Proteins und des umgebenden Lösungsmittels mit grundlegenden physikalischen Prinzipien beschreiben und die Dynamik dieses komplexen Systems aus vielen tausend Atomen zu berechnen suchen. Aufgrund des enormen Rechenaufwandes ist es derzeit jedoch noch nicht möglich, die Konformationsdynamik von Proteinstrukturen auf Zeitskalen länger als einige Mikrosekunden vertrauenswürdig zu berechnen [103][42]. Es ist daher von Interesse, die minimale Menge an Information zu identifizieren, die zur korrekten Beschreibung der Dynamik gefalteter Proteinstrukturen ausreicht. West et al. [110] und Hyeon et al. [48] konnten mit relativ einfachen Modellen bereits erfolgreich Eigenschaften der mechanischen Entfaltung von terminal belasteten Proteinen beschreiben. In dieser Arbeit ist ein Minimalmodell entwickelt worden, mit dem die Bruchkinetik einer Proteinstruktur unter Kraft semi-analytisch beschrieben werden kann. Es sind zugleich Limitierungen des Modells identifiziert worden, die aus einer drastischen Reduktion der Geometrie einer Proteinstruktur reduzieren. Das Modell kann nun schrittweise realistischer gemacht werden, bis sämtliche experimentell überprüfbareren Eigenschaften korrekt beschrieben werden. Es ist ebenfalls ein Ausbau des Modells in Richtung komplizierterer Konformationsübergänge über den ersten Bindungsbruch hinaus möglich. Damit wäre ein experimentell überprüftes theoretisches Modell zur Hand, mit dem die Dynamik gefalteter Proteinstrukturen beschrieben werden kann. Es ist vorstellbar, dass auf diese Weise beschrieben und vorhergesagt werden kann, wie z.B die Bindung eines ATP Moleküls an die Bindungstasche eines molekularen Motors und die daraus resultierende minimale Deformation der Motorstruktur in eine große Konformationsänderung an anderer Stelle der Motorstruktur umgesetzt wird.

8.4 Enzyme bei der Arbeit

Es gibt in der Natur eine Vielzahl von Proteinen wie z.B Enzyme oder molekulare Motoren, deren biologische Funktion die Ausübung von mechanischen Kräften und Konformationsumwandlungen als Antwort auf chemische oder mechanische Signale einschliesst. Die in dieser Arbeit vorgestellte Technik ermöglicht es nun, Kraftangriffspunkte an ein Enzym derart zu wählen, dass dessen Konformationszustand in Abhängigkeit äusserer Bedingungen wie z.B Temperatur, pH -Wert oder der Anwesenheit bestimmter chemischer Substanzen überprüft bzw. durch Kraftwirkung kontrolliert werden kann. Auf diese Weise könnten neue Erkenntnisse über die Funktionsweise von Enzymen gewonnen werden.

8.5 Protein-Nanotechnologie

Biologische Systeme zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, komplexe Strukturen mittels Selbstorganisation zu erzeugen. In lebenden Zellen werden chemische Reaktionen präzise gesteuert, Signale verarbeitet und Stoffe transportiert. Viele der dabei beteiligten Proteine wirken dabei wie Maschinen auf der Nanoskala. Ein Ziel der Nanotechnologie ist es daher, künstlich solche molekularen Maschinen für die Erledigung technologisch motivierter Aufgaben herstellen zu können. Der Natur ist es in einem langen Evolutionsprozess gelungen, hochspezialisierte Maschinen für eine enorme Bandbreite von Aufgaben zu erzeugen. Es liegt daher nahe, diese zur Verfügung stehende Bibliothek an Maschinen verschiedener Funktionalität auszunutzen, um gezielt Kombinationen verschiedener Aufgabenbereiche zu erzeugen. Denkbar wäre z.B. eine bewegte Nano-Fabrik, d.h. eine Kombination aus Enzymen, die bestimmte chemische Reaktionen katalysieren, mit molekularen Motoren, die diese Enzyme an bestimmte Orte transportieren. Für die Konstruktion solcher Proteinkomplexe ist eine spezifische, selbstorganisierte bzw. programmierbare Verknüpfung der einzelnen Bausteine notwendig. Cysteine Engineering ermöglicht zwar eine geometrisch spezifische Verknüpfung zwischen verschiedenen Bausteinen (vgl. Kapitel 4, Copolyproteine), eine selbstorganisierte spezifische Verknüpfung verschiedener Bausteine ist jedoch noch nicht kontrollierbar. In Anhang C wird Cysteine Engineering durch die programmierbaren Multimerisierungseigenschaften von Superhelices ergänzt. Mit elementaren Bausteinen werden erste Schritte hin zu einer selbstorganisierten Konstruktion von Proteinkomplexen demonstriert. Es ist denkbar, diese Ansätze in der Zukunft zu einer Protein-Nanotechnologie auszubauen.

Anhang A

Fluoreszenzeigenschaften von GFP Polyproteinen

A.1 Spektrale Eigenschaften von GFP Polyproteinen

Die Eigenschaften des Grün Fluoreszierenden Proteins sind seit vielen Jahren Thema aktiver Forschung [102][106][120][53]. Ein wichtiges Ergebnis ist, dass die Fluoreszenzeigenschaften des GFP empfindlich von der Präsenz der intakten Raumstruktur des Proteins abhängen. Die Fluoreszenz des GFP ist ein Indikator für die korrekte Faltung des Moleküls.

Abbildungen A.1 a)-c) zeigen Anregungs- und Emissionsspektren von nativem GFP und Zweifach-Cystein mutierten GFP-Polyproteinlösungen am Beispiel von GFP(3,212). Es ist klar ersichtlich, dass die Mutation der zwei Cysteine und anschließende Polymerisation keinerlei Einfluss auf die spektralen Eigenschaften des GFP hat. Sowohl das relative Verhältnis der Anregungsbanden der neutralen Form (bei 396 nm) und auch der anionischen Form (bei 473 nm) als auch die Emissionsspektren bei Anregung der neutralen Form des Chromophores und bei Anregung der anionischen Form erscheinen vollkommen ungestört. Dies zeigt direkt die korrekte Faltung auch der Zweifach-Cystein mutierten GFP Moleküle in die funktionale Raumstruktur des GFP. Einzig im Falle von (6,221) mutierten GFP Polyproteinen konnte eine spektrale Veränderung festgestellt werden. Dabei ist (6,221) mutiertes GFP in etwa vergleichbar stark bei 396 nm und bei 473 nm anregbar. Eine mögliche Ursache ist die Mutation 221 in der Nähe von Glutaminsäure 222, die über den Ladungszustand des Chromophores entscheidet (siehe weiter unten). Das Emissionsspektrum von (6,221) mutierten GFP stimmt aber mit nativem GFP vollständig überein, so dass die korrekte Faltung der (6, 221) mutierten Moleküle ebenfalls gesichert ist. Ormö et al. [79] berichteten 1996 über eine Punktmutation (Serin 65 zu Threonin), die in nativem GFP zu einer Stabilisierung der anionischen Form des Chromophores führt und damit zu einer viel stärkeren Anregungsbande bei 473 nm. Das native Serin 65 bildet im Inneren des GFP eine Wasserstoffbrücke mit der Seitenkette der Aminosäure Glutamin 222, was zu einer negativen Ladung an Glu222 führt. Das Chromophor des GFP befindet sich im gefalteten Zustand nur 3.7 Å von Glu222 entfernt. Elektrostatische Abstossung verhindert

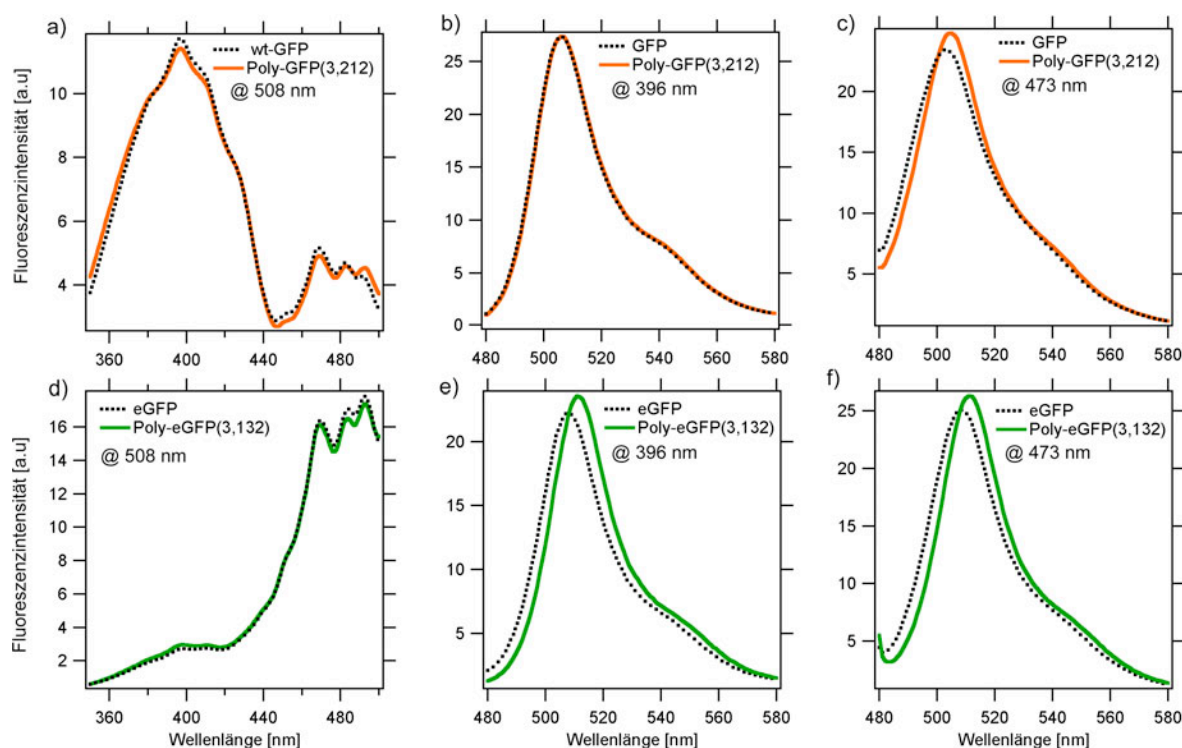


Abbildung A.1: a) Anregungsspektren von nicht-mutierten (wt-) GFP und (3,212) GFP Polyproteinenlösungen. Beobachtet wird die Emission bei 508 nm. b)-c) Emissionsspektren bei Anregung mit 396 nm bzw. 473 nm Wellenlänge. d) Anregungsspektren von eGFP und (3,132) eGFP Polyproteinenlösungen. Beobachtet wird die Emission bei 508 nm. e)-f) Emissionsspektren bei Anregung mit 396 nm bzw. 473 nm Wellenlänge.

daher einen permanenten anionischen Zustand des Chromophores. Ersetzt man Serin durch Threonin, so bleibt die Restgruppe von Glu 222 neutral und das Chromophor besetzt permanent den anionischen Zustand [79]. Diese GFP Variante ist unter dem Namen Enhanced GFP (eGFP) in der Literatur bekannt.

Zum weiteren Test ist daher das vorhandene native GFP und zwei der Zweifach-Cystein mutierten GFP Varianten, (3,132) und (132,212), durch Durchführung der Punktmutation S65T zu eGFP umgearbeitet worden. Abb. A.1 d)-f) zeigen Anregungs- und Emissionsspektren von eGFP und (3,132) verknüpften eGFP Polyproteinen. (132, 212) GFP Polyproteine zeigen identisches Verhalten. Auch hier ist wieder vollständige Übereinstimmung mit den spektralen Eigenschaften des nicht mutiertem eGFP zu beobachten. Die leichte Verschiebung der Emissionsspektren zu größeren Wellenlängen ist auf die 2 nm große Unsicherheit in der mechanischen Einstellung der Beugungsgitter des verwendeten Spektrometers zurückzuführen. Die Spektren zeigen direkt, dass die verschiedenen Ladungszustände des Chromophores, die sensibel von der korrekten Position bestimmter Restgruppen in der Raumstruktur des GFP abhängen, auch in Zweifach-Cystein mutierten GFP Polyproteinen kontrolliert werden können.

Es ist damit gesichert, dass alle vorgenommenen Zweifach-Cystein Mutationen zu kor-

rekt gefalteten und funktionalen GFP Molekülen führen, deren Raumstruktur vollständig mit der des nativen GFP übereinstimmt. Der Polymerisationszustand einer GFP Polyproteinelösung hat dabei keinen Einfluss auf die spektralen Eigenschaften der Proteinlösung.

A.2 Fluoreszenz einzelner GFP Polyproteine verschiedener Länge

Das GFP bietet aufgrund seiner Fluoreszenz die Möglichkeit, eine Untersuchung der Funktionalität von GFP Polyproteinen ebenfalls auf der Einzelmolekülebene durchzuführen. Es ist denkbar, dass ein Teil der Moleküle in einem Polyprotein ihre Funktionalität verliert und damit nicht über spektrale Eigenschaften in einer Ensemblemessung erfassbar ist. Es ist daher von Interesse, ausgehend von GFP Monomeren, die Fluoreszenzeigenschaften von GFP Polyproteinen zu analysieren. Für die folgenden Analysen ist daher ein invertiertes objective-type Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskop konstruiert worden (vgl. Anhang D.1). Für die Anregung stand Laserlicht der Wellenlänge 473 nm zur Verfügung. Aufgrund der verbesserten Anregbarkeit von eGFP im Vergleich zu GFP bei 473 nm (vgl. Abb. A.1) sind die folgenden Messungen mit eGFP Polyproteinen durchgeführt worden. Mit Größenausschluss-Chromatographie sind Lösungen mit eGFP-Polyproteinen verschiedener Länge präpariert worden. Es sind sechs verschiedene Längenbereiche aufgereinigt worden (grüne senkrechte Balken in Abb. A.8). Laut Säulenkalibration handelt es sich dabei um Monomer-, Dimer-, Tetramer-, Nonamer-, und 16-mer Fraktionen und eine Fraktion, die Moleküle unbekannter Länge aus dem Bereich der Ausschlussgröße der Säule enthält. Die Längenangaben der beiden letztgenannten Fraktionen sind fragwürdig, da die Auftrennungseigenschaften der verwendeten Chromatographiesäule in diesem Größenbereich unsicher ist. Die Fraktionen wurden auf etwa $1 \cdot 10^{-10}$ M Proteinkonzentration verdünnt und nacheinander unter exakt den gleichen Anregungsbedingungen nach Adsorption auf die Oberfläche eines Deckgläschens unter Anregung durch Laserlicht bei 473 nm in totaler interner Reflektion im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Abb. A.2 zeigt typische Fluoreszenzbilder der verschiedenen Größenfraktionen, a) zeigt die Monomere, b) die Dimere, c) die Tetramere, d) die Nonamere, e) die 16-meren und f) Moleküle unbekannter Länge.

Die Kamera des Mikroskops nimmt Einzelbilder auf, die digitalisiert als zweidimensionaler Intensitätsdatensatz vorliegen. Da Helligkeiten in Bildern vom Betrachter nur schwer evaluiert werden können, sind die Bilder der verschiedenen Fraktionen als dreidimensionale Landschaft dargestellt. Die Höhen sind dabei direkt proportional zur Fluoreszenzintensität pro 25 ms Belichtungszeit, wobei die Intensitätsskala für alle Bilder in Abb. A.2 identisch ist. Die ausgeprägten Peaks in diesen Bildern werden durch einzelne, stationäre Leuchtpunkte verursacht. Aufgrund der hochrein präparierten Probenoberfläche und Lösungen sind die Leuchtpunkte auf oberflächen-immobilisierte eGFP Moleküle zurückzuführen. Die sehr schmalen und flachen Peaks werden durch transiente Moleküle, Streulicht und elektronisches Rauschen verursacht. Es ist klar zu erkennen, dass die absolute Fluoreszenzintensität der Leuchtpunkte von Bild zu Bild zunimmt. Die Peaks in Bild b) haben in etwa

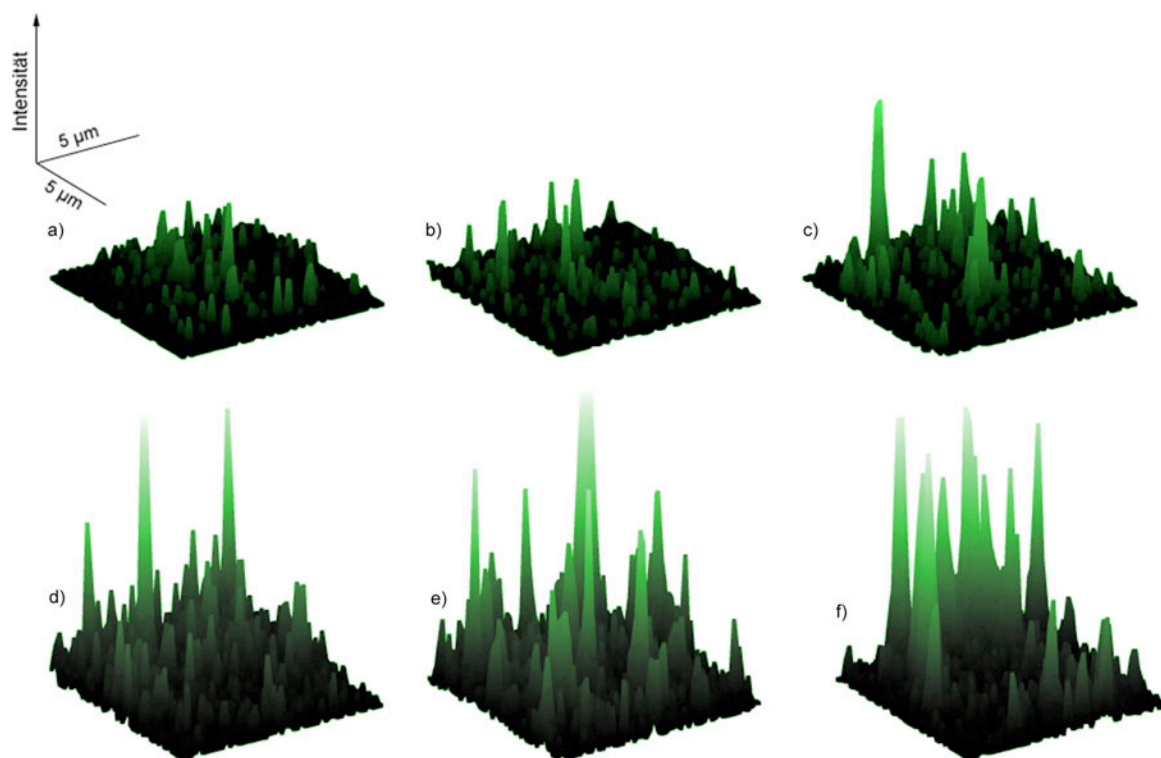


Abbildung A.2: Typische Fluoreszenzbilder von längensortierten eGFP Polyproteinen. a) Monomere b) Dimere c) Tetramere d) Nonamere e) 16-mere f) Unbekannte Länge

die doppelte Höhe wie Peaks in Bild a), während Peaks in Bild c) wiederum in etwa die doppelte Höhe wie Peaks in Bild b) haben. Aufbauend auf der Monomerfraktion kann nun Schritt für Schritt anhand des Fluoreszenzsignales auf die Länge der eGFP Polyproteine zurückgeschlossen werden. Dazu muss sichergestellt werden, dass mit dem aufgebauten Instrument die Fluoreszenz einzelner eGFP Moleküle detektiert werden kann¹. Dies kann durch eine Untersuchung des Fluoreszenz-Zeitverhaltens einzelner Leuchtpunkte in einer monomeren eGFP Lösung erfolgen.

Abb. A.3 zeigt das Fluoreszenz-Zeitverhalten einzelner, Zweifach-Cystein mutierter eGFP Moleküle. Das Fluoreszenz-Zeitverhalten wurde durch die Aufnahme von Bildserien (bis zu mehreren tausend Einzelbildern) im Abstand von 28.5 ms und bei einer Belichtungszeit von 25 ms gewonnen. Die Fluoreszenz eines einzelnen Moleküls führt zu einem beugungsbegrenzten Leuchtpunkt, der eine etwa 6x6 Pixel grossen Fläche auf dem Chip der verwendeten EM-CCD Kamera ausleuchtet. Die Intensitäten der ausgeleuchteten Pixel wurden für jedes aufgenommene Fluoreszenzbild gemittelt. Abb. A.3 a) zeigt typische Fluoreszenz-Zeitkurven für einzelne eGFP Moleküle, bei denen die Aminosäuren 3 und 132 durch Cysteine ersetzt wurden, während Abb. A.3 b) Fluoreszenzsignale von einzelnen (132, 212)-Cystein mutierten eGFP Molekülen zeigt.

¹Bei den Peaks in Abb. A.2 könnte es sich in jedem Fall um Aggregate einzelner Moleküle verschiedener Größe handeln.

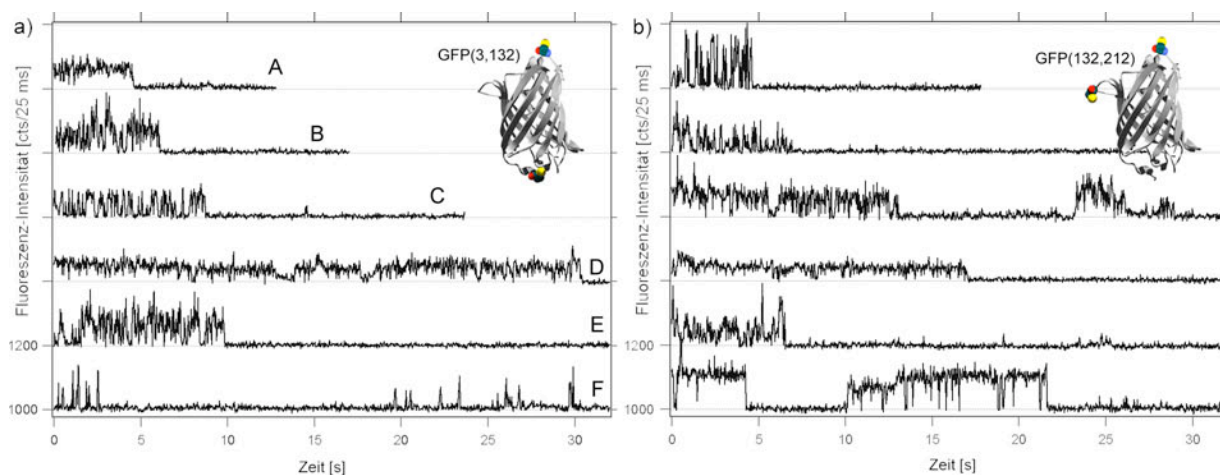


Abbildung A.3: Fluoreszenzintensität-Zeitverhalten einzelner doppelt-cystein mutierter eGFP Moleküle. a) (3,132) mutierte eGFP Moleküle. b) (132,212) mutierte eGFP Moleküle

Die Fluoreszenzeigenschaften einzelner eGFP Moleküle sind 1997 erstmals unabhängig voneinander durch Pierce et al. [84] und Dickson et al. [28] beschrieben worden. Ihre Arbeiten zeigten überraschend komplexes zeitabhängiges Fluoreszenzverhalten. Es tritt Blinken durch die kurzzeitige Besetzung von nicht-strahlenden Dunkelzuständen, reversibles Photobleichen (Dunkelzustände auf längeren Zeitskalen) und irreversibles Photobleichen auf. Kurve A in Abb.A.3 a) zeigt die typische Signatur eines einzelnen GFP-Moleküls, wie es in den ersten Arbeiten bereits beschrieben wurde. Man beobachtet ein um ein bestimmtes Intensitätsniveau relativ stark schwankendes Leuchtsignal, das sehr plötzlich zum Erliegen kommt. Dieses diskrete An/Aus -Verhalten ist die wesentliche Charakteristik eines einzelnen vorliegenden Farbstoffmoleküls. Dieses Verhalten weisen alle zwölf Fluoreszenzkurven in Abb.A.3 a) und b) auf. Die Kurven B bis F in Abb. A.3 a) zeigen zudem Blinken als ein weiteres typisches Element der Fluoreszenz einzelner GFP Moleküle. Dabei erlischt für Zeiträume im Bereich von 0.1 bis mehreren Sekunden die Fluoreszenz der Moleküle, die dann jedoch plötzlich wieder erscheint. Kurve F zeigt ein extremes Beispiel dieses Blinkverhaltens, das betreffende eGFP Molekül befand sich die überwiegende Zeit in einem nicht-emittierendem Dunkelzustand und wechselte selten in emittierende Zustände. Kurve C und E zeigen ein dazu gegensätzliches Verhalten. Die Moleküle wechselten dabei etwa 50-Mal schnell zwischen emittierenden Zuständen und Dunkelzuständen. Ebenfalls beobachtet werden Schwankungen in der absoluten Fluoreszenzintensität der einzelnen Moleküle. Die Ursachen dieses Effektes sind nicht vollständig geklärt, eine naheliegende Möglichkeit sind jedoch verschiedene Orientierungen des Chromophores von oberflächenimmobilisierten Molekülen im anregenden Feld. Zur Kontrolle sind die beschriebenen Experimente ebenfalls mit einzelnen, nicht-mutierten nativen eGFP Molekülen durchgeführt worden. Die erhaltenen Fluoreszenzsignale sind vollständig konsistent.

Die Ergebnisse zeigen, dass Fluoreszenzsignale einzelner eGFP Moleküle mit dem verwendeten Aufbau detektiert werden können. Die Fluoreszenzsignatur Zweifach-Cystein mu-

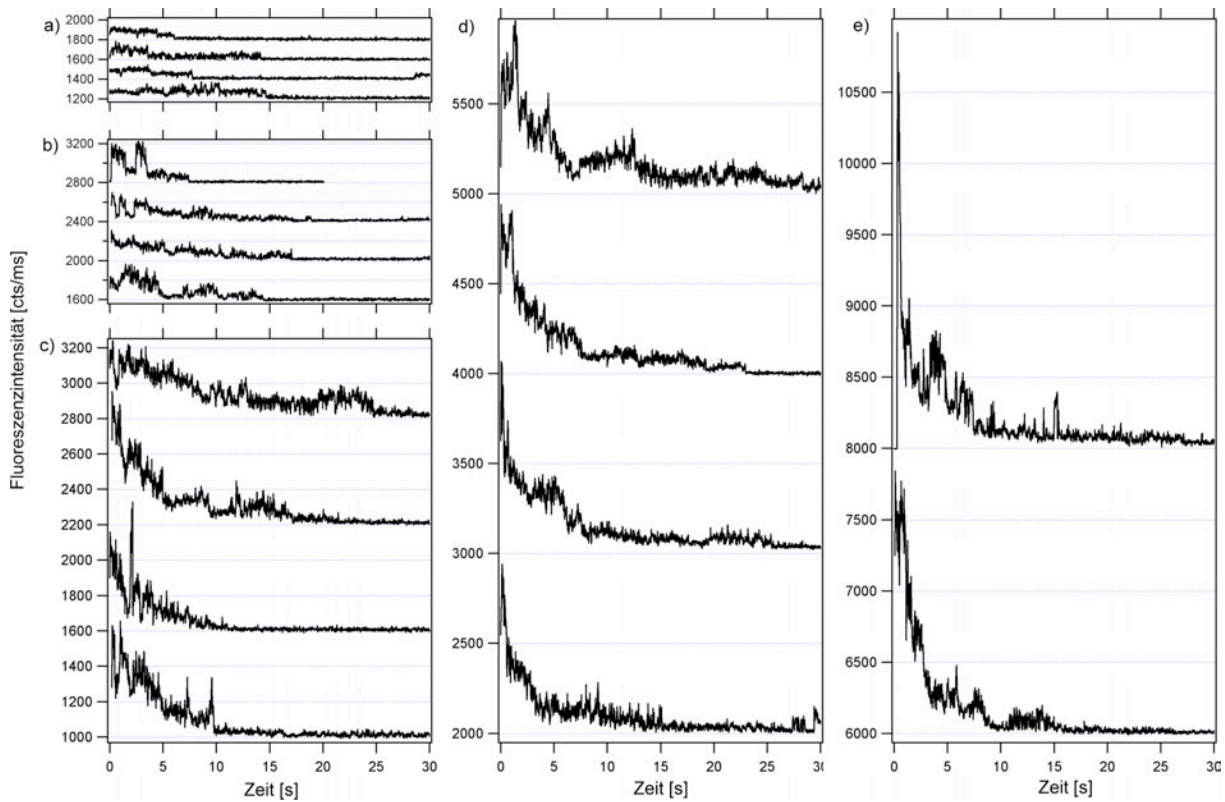


Abbildung A.4: Fluoreszenz-Zeitverhalten einzelner (132, 212) mutierter eGFP Polyproteine. a) Dimere b) Tetramere c) Nonamere d) 16-mere e) Unbekannte Länge. Die Daten sind vertikal verschoben worden.

tierter eGFP Moleküle zeigt dabei die gleichen Eigenschaften wie die des nativen eGFP. Auf gleiche Weise sind nun einzelne Leuchtpunkte in den aufgereinigten eGFP-Polyprotein Lösungen verschiedener Länge analysiert worden. Die Experimente wurden dabei unter exakt den gleichen Bedingungen wie für die Monomere durchgeführt. Abb. A.4 zeigt das typische Fluoreszenz-Zeitverhalten einzelner Polyproteine verschiedener Länge.

Abb. A.4 a) zeigt typische Signale von Dimeren, in denen deutlich zwei diskrete Intensitätsniveaus identifiziert werden können. Abb. A.4 b) bis e) zeigen immer komplexer werdende und stark rauschende Intensitätssignale, die jedoch auf derselben Zeitskala wie die Monomere und Dimere abklingen. Die absolute Intensität der Leuchtsignale nimmt von Abb. A.4 a) bis e) dabei etwa um einen Faktor 20 zu. In der Tetramer-Fraktion (b) ist es noch möglich, diskrete Intensitätsniveaus zu identifizieren, für Polyproteine größerer Länge ist dies nicht mehr möglich. Das starke Rauschen von offenbar unabhängig voneinander statistisch zwischen Leucht- und Dunkelzuständen wechselnden einzelnen eGFP Moleküle macht dies unmöglich.

Für Abb. A.5 a) sind die Fluoreszenz-Zeitkurven mehrerer Leuchtpunkte aus den Polyproteinfraktionen verschiedener Länge gemittelt worden. Es ist klar ersichtlich, dass die absolute Fluoreszenzintensität der einzelnen Leuchtpunkte mit zunehmender Länge

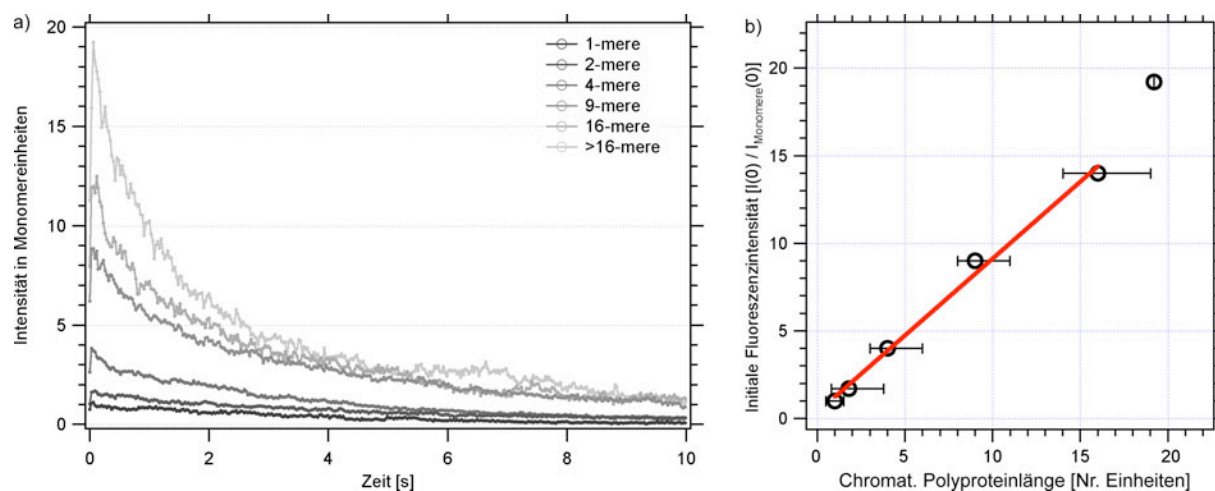


Abbildung A.5: a) Mittleres Fluoreszenz-Zeitverhalten einzelner eGFP Polyproteine verschiedener Länge. b) Initiale Fluoreszenzintensität relativ zur Monomerintensität als Funktion der chromatographischen bestimmten Polyproteinlänge.

ebenfalls zunimmt. Darüberhinaus ist ein exponentieller Abfall der mittleren Fluoreszenz-Intensität zu beobachten, der in allen Fraktionen vergleichbar schnell erfolgt. Die Abklingzeit ist dabei durch die mittlere Zeit bis zum irreversiblen Bleichen einzelner eGFP Moleküle bestimmt und konsistent mit der Literatur [83]. Für Abb. A.5 b) ist die mittlere initiale Fluoreszenz-Intensität einzelner Polyproteine im Verhältnis zur Intensität von eGFP Monomeren aus den verschiedenen Längenfraktionen über die chromatographisch bestimmte Polyproteinlänge aufgetragen. Es ergibt sich eine Winkelhalbierende. Demnach stimmt die anhand der Fluoreszenz einzelner Moleküle bestimmte Länge mit der über Größenausschluss-Chromatographie bestimmten Länge überein. Das bedeutet, *alle* GFP Untereinheiten in GFP Polyproteinen sind vollständig funktional und korrekt gefaltet.

A.3 Reduktion einzelner GFP Polyproteine zu Monomeren

Die Fluoreszenzerscheinung des GFP ermöglicht es zudem, die spezifische Verknüpfung der GFP Polyproteine über kovalente Schwefelbrücken zwischen den eingeführten Cysteinen direkt auf der Einzelmolekülebene nachzuweisen. Abb. A.6 a) zeigt ein typisches Fluoreszenzbild von einzelnen Oberflächen-immobilisierten eGFP Polyproteinen aus einer 3000 Einzelbilder umfassenden Bildserie. Die Einzelbilder sind im Abstand von 28.5 ms bei einer Belichtungszeit von 25 ms aufgenommen worden. Rotiert man diesen Bilderstapel um 90° um die Hochachse, so ergibt sich die Darstellung in Abb. A.6b). Eine vertikale Linie der Darstellung in Abb. A.6 b) ergibt sich durch Kollaps sämtlicher Intensitätsinformationen eines Einzelbildes aus der xy-Ebene auf die x-Achse. Die Aneinanderreihung der auf Linien kollabierten Einzelbilder ermöglicht, die Dynamik der Fluoreszenzsignale in Form von

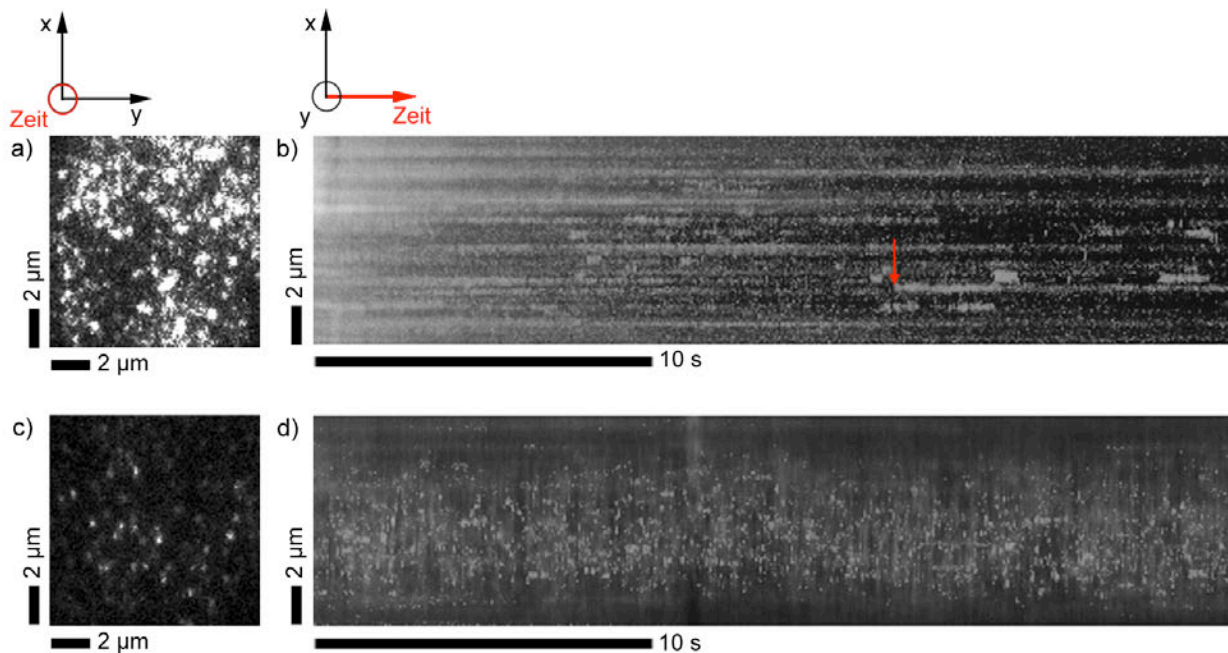


Abbildung A.6: a) Fluoreszenzbild einzelner GFP Polyproteine. b) Darstellung einer Fluoreszenz-Bildserie mit GFP Polyproteinen als Nebelspur. c) und d): GFP Polyproteinlösung unter 20mM DTT.

Nebelspuren auf einer Zeitachse abzubilden. Die horizontalen hellen Linien in Abb. A.6 b) werden durch einzelne, stationäre und langsam bleichende eGFP-Polyproteine verursacht. Das Probenvolumen ist extensiv gespült worden, um nicht-oberflächengebundene Moleküle aus der Probe zu entfernen. Gelegentlich kommt es jedoch trotzdem zu einer Landung eines neuen eGFP-Polyprotein Moleküls (z.B. roter Pfeil in Abb. A.6 b), das fest an die Oberfläche bindet und wieder als stationärer, horizontaler Streifen langsam photobleicht. Die wesentlichen Merkmale der Bildserie sind somit:

- Feste Bindung der Moleküle an die Oberfläche. Entbindung wird sehr selten innerhalb der Zeit bis zum Photobleichen beobachtet.
- Geringe Zahl neuer Bindungsereignisse.

Gibt man nun das Reduktionsmittel DTT (Dithiothreitol) zum Probenvolumen dazu, so ändert sich das Bild radikal. DTT reduziert Cystin wieder zu Cystein. Die Schwefelbrücken, die die GFP Polyproteine verknüpfen, werden damit durch DTT vernichtet. Unmittelbar nach Erzeugung von 20mM DTT Konzentration in der Probe nimmt die Fluoreszenzintensität einzelner Leuchtpunkte auf der Oberfläche stark ab (Abb. A.6 c). Die Wirkung des Reduktionsmittel manifestiert sich jedoch am stärksten in einer schlagartigen Zunahme der Dynamik in der Probe. Abb. A.6 d) zeigt die aufgenommene Bildserie wieder als Nebelspur. Im Gegensatz zu Abb. A.6 b) sind keinerlei horizontale Streifen, d.h stationäre Moleküle, mehr zu beobachten, sondern nur noch Punkte mit schwacher Leuchtintensität. Die Punkte sind auf kurzzeitig bindende und schnell wieder entbindende Moleküle zurückzuführen.

Es gibt eine große Zahl dieser Landungs- und Startereignisse. Darüber hinaus beobachtet man verwischte, unscharfe Intensitätsspuren in der Darstellung. Diese sind auf eine Vielzahl transienter, schnell in der Nähe und auf der Oberfläche diffundierender Moleküle zurückzuführen. Die Auswirkung des Reduktionsmittels DTT sind somit:

- Rückgang der Fluoreszenzintensität pro Molekül.
- Starke Zunahme von neuen Bindungsereignissen als auch Entbindungsereignissen
- Auftreten von schnell diffundierenden Molekülen

Offensichtlich zerlegt DTT die eGFP Polyproteine in ihre monomeren Einzelteile, was sich durch einen sofortigen Rückgang der Fluoreszenzintensität einzelner Leuchtpunkte manifestiert. Die Zerlegung führt zu einer Vielzahl von eGFP Molekülen im Probenvolumen, die frei diffundieren können. Ein interessanter Aspekt wird durch die Vielzahl von auftretenden neuen Bindungs- und Entbindungsereignissen an die Oberfläche deutlich. Aus Abb. A.6 b) geht hervor, dass lange eGFP Polyproteine eine stabile Bindung an die Oberfläche eingehen, während die Bindung von eGFP Monomeren offenbar nur sehr kurzzeitig hält. Die Wahrscheinlichkeit, die Dissoziation eines Polyproteins von der Oberfläche zu beobachten, ist eine bedingte Wahrscheinlichkeit, die die Dissoziation sämtlicher oberflächengebundener Untereinheiten erfordert. Die Stationarität der einzelnen Leuchtpunkte in Abb. A.6 b) im Vergleich zur Dynamik in Abb. A.6 d) zeigt damit unabhängig von der Fluoreszenzintensität, dass es sich zunächst um Cystin-verknüpfte eGFP Polyproteine handelt, die durch die Wirkung von DTT zu monomeren eGFP Molekülen reduziert werden.

A.4 Cysteine Engineering Protokoll

Für ein detailliertes Schritt-für-Schritt Cysteine Engineering Protokoll sei auf [31] verwiesen. Die für das entsprechende Protein (hier: GFP und Ig27) kodierende DNA Sequenz wurde in zytosolische *E. coli* Expressionsvektoren (pRSET5d und pET3c) über Restriktion und Ligation in die Cloning Site der Expressionsvektoren eingebaut (Abb. A.7 Start). Die Expressionsvektoren kodieren ebenfalls für sechs Histidin-Aminosäuren, die bei der Expression an die Proteine direkt angehängt werden (GFP: C-terminal; Ig27: N-terminal) und die Aufreinigung der Zielproteine über Ni-NTA Affinitätschromatographie ermöglichen. DNA-Codons, die für die zwei für als Kraftangriffspunkte gewählten nativen Aminosäuren kodieren, wurden mit dem QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit zu TGC oder TGT (Cysteine-Codons) mutiert (Abb. A.7 1). Erfolgreiche Mutation wurde durch Sequenzierung (MWG Biotech, Ebersberg) überprüft. Die mutierten Expressionsvektoren wurden in einen *E. coli* Expressionsstamm (BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, Stratagene) transformiert und die Proteinexpression induziert (Abb. A.7 2). Die Expression der Proteine wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dabei lieferten 500 ml Zellkultur etwa 50 mg der mutierten Proteine. Die Proteinlösung wurde mittels HisTrap HP Affinitätschromatographie-Säulen durch Elution mit aufsteigenden

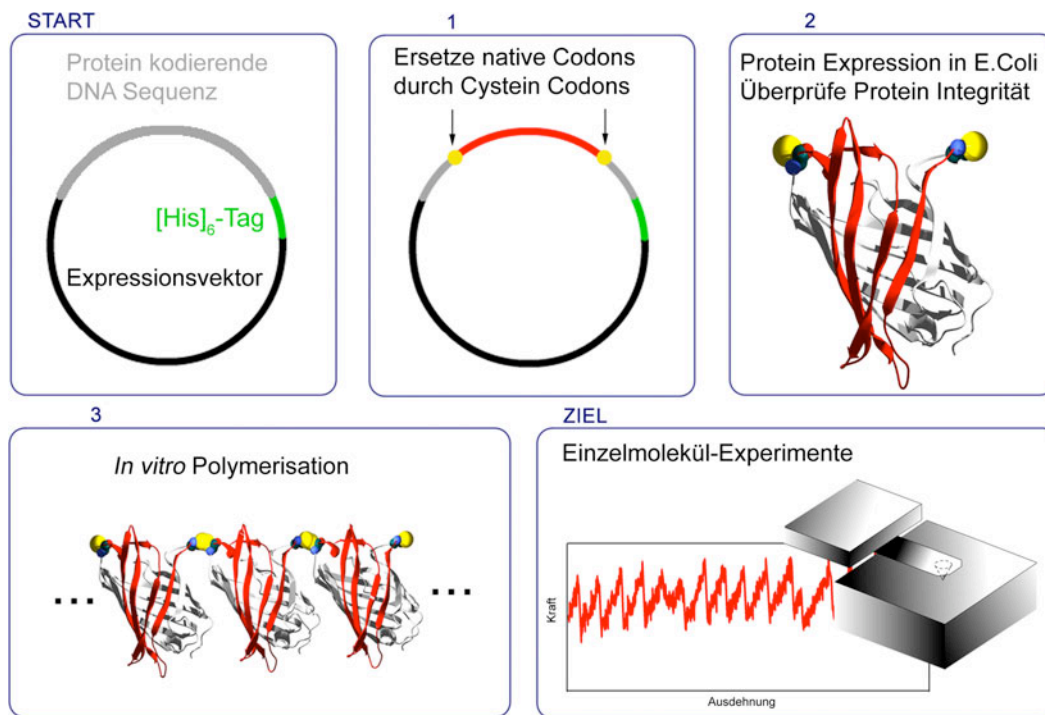


Abbildung A.7: Cysteine Engineering Protokoll

Imidazol-Konzentrationen aufgereinigt. Zur Polymerisation (Abb. A.7 3) wurden die Proteinlösungen im Elutionspuffer (meist Lysis-Puffer mit 200mM Imidazol) mit Centricon Filtern (Millipore) auf mindestens $200 \mu\text{M}$ Proteingehalt aufkonzentriert und in einem Thermo-Schüttler bei 37°C für etwa 80 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit war bei allen hier untersuchten Proteinlösungen ein Polymerisationsgrad erreicht, der der in Abb.A.9 vorgestellten Längendispersion entsprach. Nach diesem Schritt konnten ohne weitere Behandlung Kraftspektroskopie-Experimente an einzelnen Polyproteinen durchgeführt werden (Abb. A.7 Ziel). Weitere Polymerisation konnte durch Lagerung bei 4°C oder, effektiver, durch Verdünnung deutlich unter $200 \mu\text{M}$ Proteingehalt verlangsamt oder zum Stillstand gebracht werden. Für eine Copolymerisation verschiedener Verknüpfungsgeometrien wurden bereits polymerisierte Proben mit 20 mM DTT (Dithiothreitol) zu Monomeren reduziert und im 1:1 Proteinkonzentrationsverhältnis gemischt. Im Anschluss wurde durch zweimalige Anwendung von HiTrap Entsalzungssäulen der Puffer getauscht und das DTT wieder entfernt. Nachfolgende Inkubation für etwa 80 Stunden führte bei ausreichend hohen Proteinkonzentrationen ($> 200 \mu\text{M}$) zu Copolyproteinen. Für die Durchführung des Protokolls werden folgende Materialien benötigt:

- *Escherichia coli* zytosolischer Expressionsvektor
- QuikChange Multi Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene)
- XL10 Gold Ultracompetent *E.coli* Zellen (Stratagene)

- BL21-CodonPlus(DE3)-RIL *E. coli* Zellen (Stratagene)
- Lysis-Puffer: 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 300 mM NaCl. Der *pH*-Wert sollte mit NaOH auf *pH* = 8 eingestellt werden
- 5 verschiedene Elutions-Puffer, bestehend aus Lysis-Puffer mit jeweils 20 mM, 70 mM, 100 mM, 200 mM und 500 mM Imidazol
- Sterile Pipettenspitzen und Reagenzgefäße
- French Press oder Sonicator für das Aufschliessen von Zellen
- HisTrap HP oder FF Ni-NTA Affinitätschromatographie-Säulen (GE Healthcare)
- Centricon Zentrifugationsfilter (Millipore)
- HiTrap Entsalzungssäulen (GE Healthcare)
- Größenausschlusschromatographie-Säule, z.B Superose 6 10/30 oder Superdex 200 PC 3.2/30 (GE Healthcare)

A.5 Längendispersion von GFP Polyproteinen

Größenausschluss-Chromatographie basiert auf Chromatographie-Säulen, die mit mikroporösem Material gefüllt sind. Die effektive Laufzeit eines Moleküls durch solch eine Säule hängt sehr stark von der Form und Größe der Moleküle ab. Diese Faktoren beeinflussen, wie oft und wie lange ein Molekül in einer der Mikroporen der Säule gefangen bleibt. In Verbindung mit einer Hochleistungs-Pumpe und spektroskopischen Detektoren nach der Chromatographiesäule können mit der Größenausschlusschromatographie sowohl analytische als auch präparative Experimente zur Molekulargewichtszusammensetzung von Lösungen biologischer Makromoleküle mit Molekulargewichten von 1 kDa bis zu 1MDa durchgeführt werden. Damit ist diese Technik gut geeignet, um die Längendispersion der hier konstruierten Polyproteine zu untersuchen. Für die Experimente wurde eine FPLC Anlage Modell ÄKTA Prime der Firma GE Healthcare verwendet. Für die Analysen wurden zwei verschiedene Größenausschlussssäulen, Superdex 200 PC 3.2/30 und Superose 6 10/30 (GE Healthcare), verwendet. Das Auftrennungsverhalten als Funktion des Molekulargewichtes der Größenausschlussssäulen muss kalibriert werden. Die Kalibration wurde anhand einer Lösung mit bekannter Zusammensetzung aus Proteinen verschiedenen Molekulargewichtes durchgeführt. Abb. A.8 zeigt exemplarisch das Auftrennungsverhalten der Superdex 200 PC 3.2/30 Säule als Funktion des Elutionsvolumens. Die Molekulargewichtachse ist dabei in GFP Einheiten angegeben ($M_{GFP} = 26.9 \text{ kD}$). Der Bereich von 10-600 kDa wird durch den Hersteller der Säule als Bereich optimaler Auftrennung spezifiziert. In diesem Bereich findet man ein exponentielles Auftrennungsverhalten. Im Bereich 600 kDa bis zu 1.2 MDa ist das Auftrennungsverhalten unklar. Für Abb. A.8 wurde das exponentielle Auftrennungsverhalten als Anhalt auch für diesen Bereich extrapoliert. Bei einem Molekulargewicht von

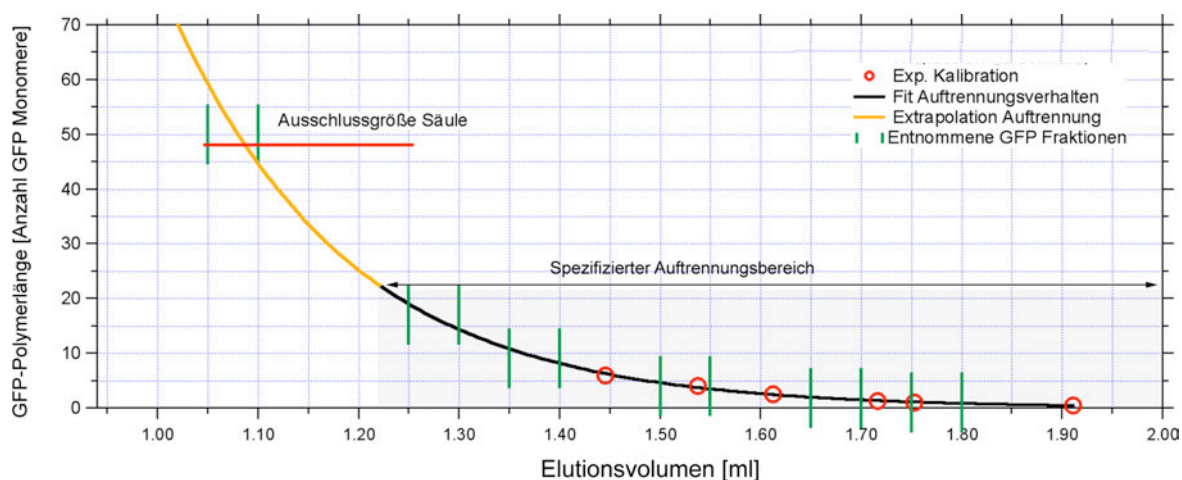


Abbildung A.8: Kalibration einer Größenausschluss-Chromatographiesäule: Molekulargewicht in Einheiten des GFP Molekulargewichts (26.4 kDa) als Funktion des Elutionsvolumens. Die grünen Balken zeigen Fraktionen an, deren Fluoreszenz in Einzelmolekül-Experimenten analysiert worden ist (vgl. Anhang A).

1.2 MDa ist die Ausschlussgröße der Säule erreicht, d.h. Moleküle dieser Größe treten entweder gar nicht erst in die Säule ein oder werden ohne Verzögerung durchgeleitet. Mit der Kalibrierung kann das Absorptionssignal einer Proteinlösung als Funktion des Elutionsvolumens durch eine Chromatographiesäule direkt in ein Absorptionssignal als Funktion des Molekulargewichtes umgerechnet werden. Handelt es sich um Polyproteine, ist die Molekulargewichtsangabe proportional zur Länge der Polyproteine. Wird das Absorptionssignal bei einem bestimmten Elutionsvolumen durch die entsprechende Polyproteinelänge geteilt, erhält man somit eine zur molekularen Konzentration eines Polyproteins bestimmter Länge proportionale Angabe.

Abb. A.9 a) und b) zeigen die typische Längendispersion der konstruierten GFP Polyproteine am Beispiel einer (3,212) vknüpften GFP Polyproteinlösung. Die Graphen wurden anhand der Absorption der Proteinlösung als Funktion des Elutionsvolumens bei drei verschiedenen Wellenlängen: 280 nm, 396 nm und 473 nm bestimmt. Abb. A.9 a) zeigt den Bereich kleiner und Abb. A.9 b) den Bereich sehr großer Längen. Die Kurven sind zum besseren Vergleich auf eine Konzentration von 1 für GFP Monomere normiert worden. Alle drei Signale zeigen die Präsenz von GFP Polyproteinen bis zu Molekülen, die etwa hundert Untereinheiten umfassen. Die Absorption von Licht der Wellenlänge 280 nm einer Proteinlösung wird verursacht durch den Gehalt an den Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan und ist direkt proportional zum absoluten Proteingehalt und weitgehend unempfindlich gegenüber dem Faltungszustand von Proteinen. GFP Moleküle mit fertig ausgebildetem Chromophor weisen zusätzlich zwei Absorptionsbanden auf, eine bei 396 nm und eine bei 473 nm. Dabei absorbiert GFP etwa 3 mal stärker bei 396 nm als bei 473 nm. Aggregation bzw. Denaturierung des GFP kann zu einer Veränderung des Absorptionsverhältnisses führen [108][109]. Für Abb. A.9 c) sind die Quotienten aus den Absorptionskurven gebildet

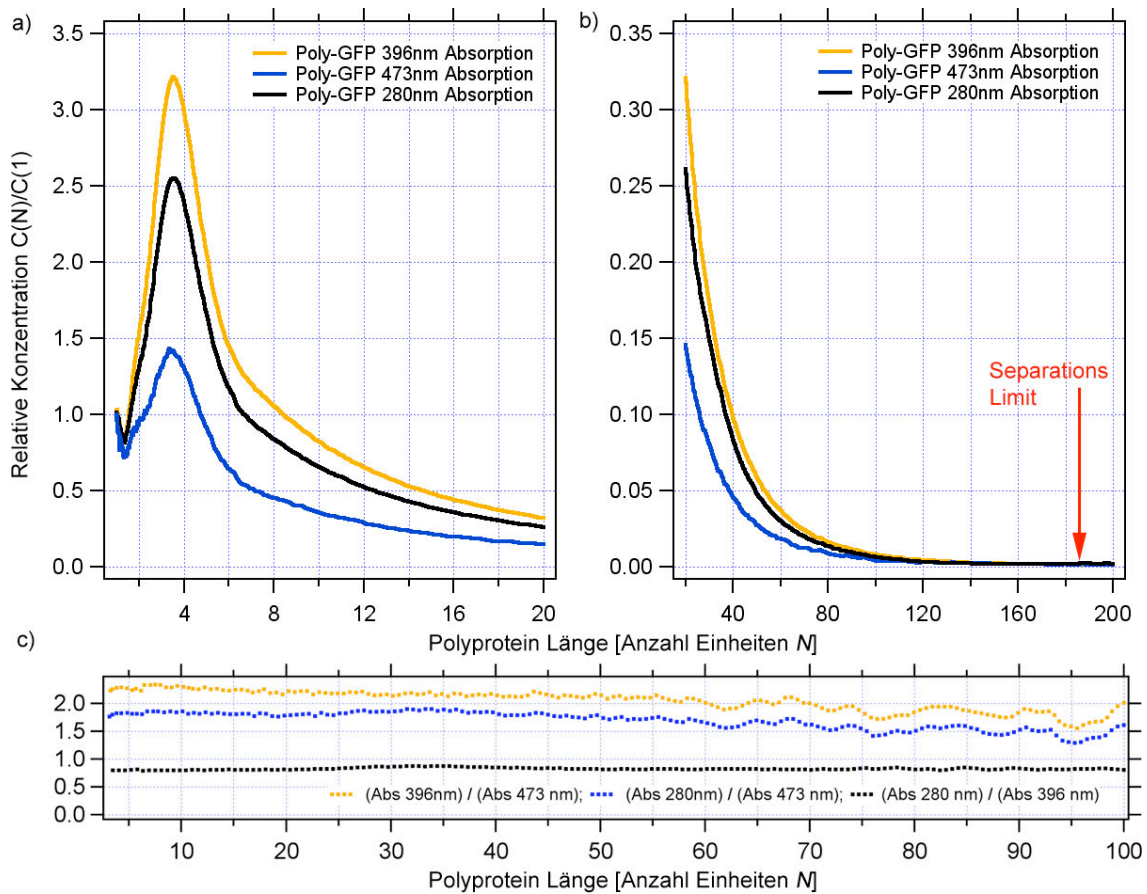


Abbildung A.9: a) und b) Längendispersion von GFP Polyproteinen, bestimmt durch Absorption bei drei Wellenlängen. Absorption ist proportional zum Proteingehalt. Aufgetragen ist die relative Konzentration im Vergleich zum Gehalt von Monomeren. c) Verhältnis der Absorptionssignale als Funktion der Polyproteinlänge. Die Analyse wurde mit einer Superose 6 10/30 (GE Healthcare) Chromatographiesäule durchgeführt.

worden. Man erkennt deutlich, dass das Verhältnis der Absorption der GFP Polyproteine bei 396 nm und bei 473 nm über einen grossen Bereich konstant bleibt. Die leichten Schwankungen in den Kurven, die bei grossen Polyproteinlängen auftreten, sind vollständig korreliert und damit nicht auf Schwankungen in den Eigenschaften der Proteine zurückzuführen, sondern auf das Erreichen des Detektionslimits der Chromatographieapparatur aufgrund der geringen Proteinkonzentrationen. Die Länge der Polyproteine hat somit keinen Einfluss auf das Verhältnis der Absorption der Moleküle mit anionischem bzw. neutralem Chromophor.

Anhang B

Kontrolle des Reaktionspfades bei kraftinduziertem Bruch

Ein Kernziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der mechanischen Eigenschaften der Raumstruktur eines Proteins bei punktueller Kraftbelastung. Eine interessante Fragestellung ist jedoch auch, wie sich der Reaktionspfad des kraftinduzierten Bruchs eines Proteins bei gegebener Belastungsgeometrie verhält, wenn punktuell stabile Verknüpfungen im Inneren des Proteins erzeugt werden. Die folgende Diskussion geht auf Messungen zurück, die hauptsächlich von Moritz Mickler in seiner Diplomarbeit in Zusammenarbeit mit dem Autor durchgeführt worden sind.

B.1 Reaktionspfad bei N-C terminaler Belastung des GFP

In Vorarbeiten wurde der mechanische Entfaltungspfad des GFP bei Belastung über den N-C Terminus charakterisiert [32][29][74]. Dazu wurden Fusionsproteine konstruiert, bei denen jeweils ein einzelnes GFP Molekül über den N-C Terminus in ein modulares Protein (*Dictyostelium discoideum* Filamin) eingefügt wurde. Abb. 1.5 zeigt die typische Kraft-Ausdehnungsantwort dieser GFP-Fusionsproteine, während Abb. B.1 a) das typische Bruchereignis der N-C terminal belasteten GFP Struktur vergrößert darstellt.

Ein Ergebnis dieser Untersuchungen ist, dass der N-C terminale Zusammenbruch des GFP über mehrere metastabile Zwischenzustände erfolgt. In einem ersten Schritt kommt es bei Kräften um 35 pN zum Ablösen einer zehn Aminosäuren umfassenden N-terminalen α -Helix (in Abb. B.1 nicht gezeigt). Die verbleibende, die Aminosäuren 11 bis 229 umfassende GFP Fass-Struktur (im folgenden als GFP $\Delta\alpha$ bezeichnet) widersteht Kräften bis zu 100 pN. Der Zusammenbruch von GFP $\Delta\alpha$ erfolgt sequentiell über die Besetzung eines kurzlebigen Zwischenzustandes. Die Präsenz dieses Zwischenzustandes manifestiert sich bei Raumtemperatur in kurzen Zwischeniveaus in der Relaxationsphase des Cantilevers (gelber Übergang in Abb. B.1 a). Eine Analyse des Längenzuwachses bei diesem Übergang führt zu der in Abb. B.1 b) dargestellten Verteilung, die sich durch ein scharfes Maximum bei

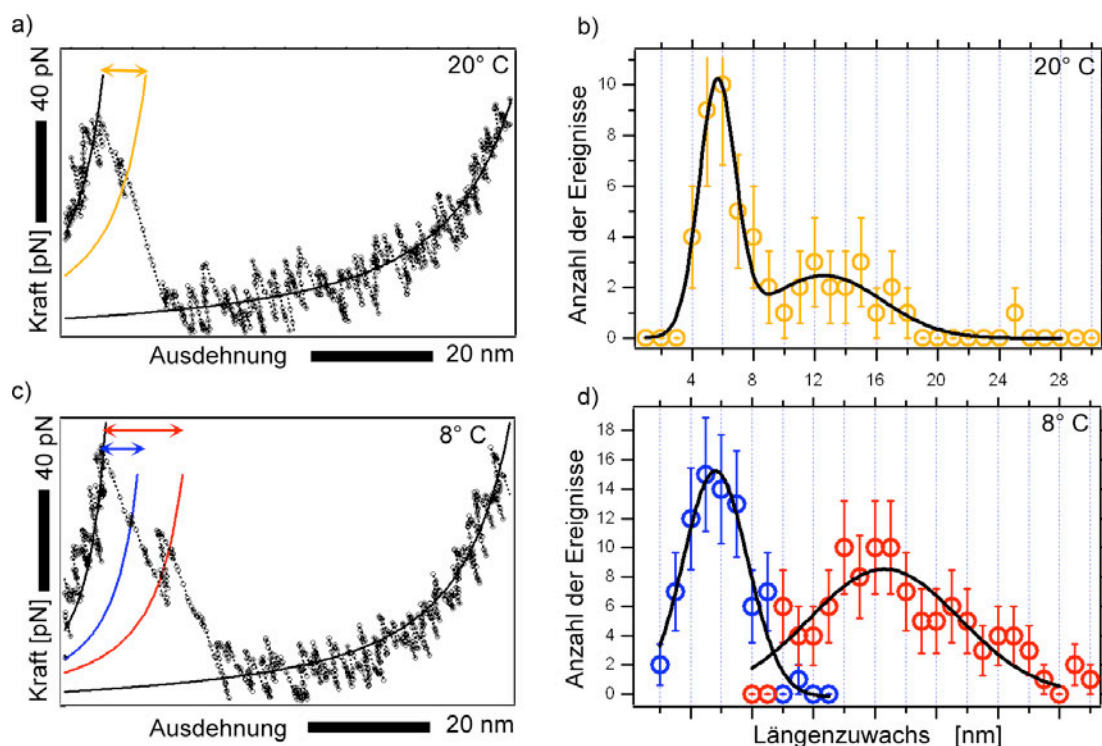


Abbildung B.1: a) Bruchereignis von $\text{GFP}\Delta\alpha$ (entspricht einer Belastung über 11,229) bei 20°C. b) Längenzuwachs Verteilung, die durch Besetzung von Zwischeniveaus in der Relaxationsphase des Cantilevers nach Bruch vom $\text{GFP}\Delta\alpha$ verursacht wird. c) und d) Daten bei 8°C.

6.8 nm und eine verbreiterte Population bei 14 nm auszeichnet, was auf die Präsenz von zwei strukturell verschiedenen Zwischenzuständen hindeutet. Führt man die Messungen bei niedrigeren Temperaturen (8°C) durch, so beobachtet man eine längere Lebensdauer der Zwischenzustände (Abb. B.1 c), deren Besetzung zudem nacheinander beobachtet werden kann. Der zugehörige Längenzuwachs kann in zwei Verteilungen aufgetrennt werden, deren Mittelwerte bei $\langle L \rangle = 6.8$ nm und $\langle L \rangle = 16$ nm liegen (Abb. B.1 d).

Unter der Annahme, dass es sich bei den Übergängen um ein Ablösen weiterer, kleiner Teile des GFP handelt, deren Verlust die verbleibende Raumstruktur zumindest kurzzeitig intakt läßt, kann aus dem mittleren Längenzuwachs von 6.8 nm für den ersten Übergang mit Gl. 2.1 ein Strukturvorschlag angegeben werden. Es ergeben sich zwei Möglichkeiten. In beiden Fällen handelt es sich um das Ablösen eines kompletten β -Stranges von der GFP Struktur, beginnend entweder vom N - oder vom C - Terminus des Moleküls. Die sich ergebende Struktur wird daher als $\text{GFP}\Delta\alpha\Delta\beta$ bezeichnet. Für die Struktur des nach $\text{GFP}\Delta\alpha\Delta\beta$ auftretenden Zwischenzustandes ergeben sich nun schon vier Möglichkeiten. Von einem Strukturvorschlag wird daher abgesehen und dieser Zustand als S_3 bezeichnet. Der Zusammenbruch der GFP-Raumstruktur bei N-C terminaler Belastung erfolgt damit sequentiell über drei klar detektierbare Zwischenzustände: $\text{GFP} \rightarrow \text{GFP}\Delta\alpha \rightarrow \text{GFP}\Delta\alpha\Delta\beta \rightarrow S_3$. Es bleiben an dieser Stelle zwei Fragen offen:

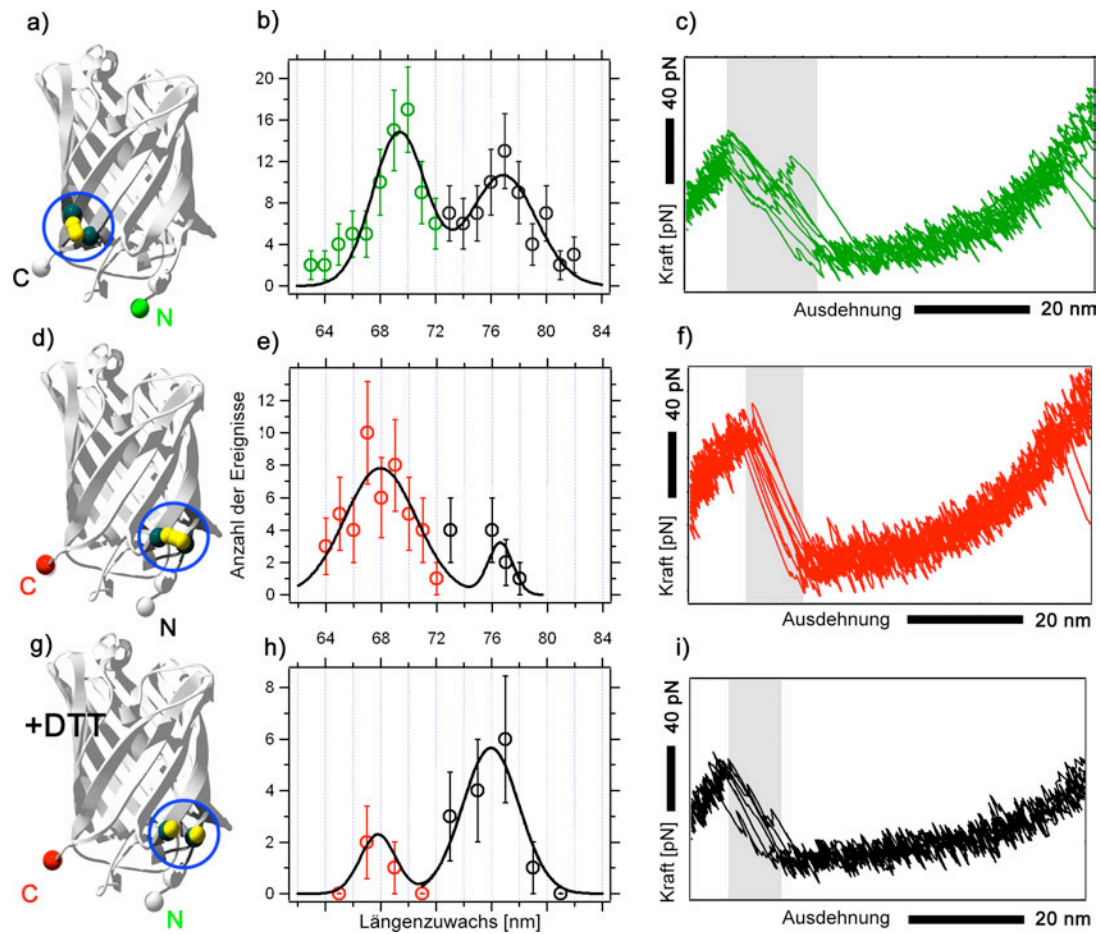


Abbildung B.2: a) $\text{GFP}\beta_{C\text{-lock}}$. b) Längenzuwachs-Verteilung durch Bruch von $\text{GFP}\beta_{C\text{-lock}}$ Molekülen. c) Überlagerung der Kraft-Ausdehnungssignatur bei Bruch von $\text{GFP}\beta_{C\text{-lock}}$. d) $\text{GFP}\beta_{N\text{-lock}}$. e) Längenzuwachs-Verteilung durch Bruch von $\text{GFP}\beta_{N\text{-lock}}$ Molekülen. f) Überlagerung der Kraft-Ausdehnungssignatur bei Bruch von $\text{GFP}\beta_{N\text{-lock}}$. g) - i) $\text{GFP}\beta_{N\text{-lock}}$ in Anwesenheit des Reduktionsmittels DTT.

- Erfolgt der Übergang $\text{GFP}\Delta\alpha \rightarrow \text{GFP}\Delta\alpha\Delta\beta$ über den N-Terminus oder den C-Terminus?
- Ist die Annahme intakter Raumstruktur gerechtfertigt?

B.2 Internes Cysteine Engineering

Cysteine Engineering basiert auf einer Doppelmodifikation der Sequenz eines Proteins, mit dem Ziel, zwei reaktive Schwefel-Restgruppen an bestimmten Stellen auf der Oberfläche der Proteinstruktur zu erzeugen, um über diese Punkte Kraft an die Raumstruktur anzulegen. Dasselbe Konzept kann jedoch auch verwendet werden, um zwei reaktive Gruppen im Inneren des Proteins so zu positionieren, dass sie bei korrekter Faltung des Proteins

an gewünschten Punkten eine interne kovalente Schwefelbrücke ausbilden. Um die eben gestellten Fragen zu beantworten, sind daher zwei weitere Zweifach-Cystein modifizierte GFP Varianten erzeugt worden, bei denen das Aminosäurenpaar (202,225) bzw. (11,36) durch Cysteine ersetzt worden ist. Cysteine an diesen Positionen sollten zur Ausbildung von kovalenten Schwefelbrücken führen, die den ersten C-terminalen (a) bzw. N-terminalen (d) β -Strang fest an die Raumstruktur des GFP binden. Die Varianten werden im folgenden als GFP β_{C-lock} bzw. GFP β_{N-lock} bezeichnet. Die Moleküle sind schematisch in Abb. B.2 a) und d) dargestellt. Abb. B.2 b) und e) zeigen Verteilungen des Längenzuwachses der durch den vollständigen Zusammenbruch der beiden GFP Varianten verursacht wird.

Beide Verteilungen zeigen eine Population bei 77 nm, die auf den vollständigen Zusammenbruch aller Aminosäuren der GFP $\Delta\alpha$ Struktur zurückgeht [32]. Zusätzlich dazu ist im Fall von GFP β_{C-lock} eine Population (grün) bei 69 nm und im Fall von GFP β_{N-lock} eine Population (rot) bei 68 nm ersichtlich. Diese verkürzten Längenzuwächse werden durch die Entfaltung von GFP Molekülen verursacht, bei denen die kovalente Schwefelbrücke erfolgreich ausgebildet worden ist. Ihre Ausbildung schirmt im Falle von GFP β_{C-lock} 23 Aminosäuren und im Falle von GFP β_{N-lock} 24 Aminosäuren von einer Entfaltung ab, entsprechend kürzer (vgl. Kapitel 2: $23 \cdot d_{aa} = 8.4$ nm) ist der beobachtbare Längenzuwachs. Abbildungen B.2 c) und f) zeigen Überlagerungen der Kraft-Ausdehnungssignatur die durch Bruchereignisse von intern verknüpften GFP β_{C-lock} bzw. GFP β_{N-lock} Molekülen verursacht werden. Im Falle von GFP β_{C-lock} beobachtet man wieder die in Abb. B.1 vorgestellten Zwischenniveaus in der Relaxationsphase des Cantilevers, während diese Signaturen im Falle von GFP β_{N-lock} vollständig fehlen. Um auszuschliessen, dass die Doppelmodifikation des GFP mit Cysteinen zu einer Perturbation der Struktur führt, die die Besetzung von Zwischenniveaus im Falle von GFP β_{N-lock} verhindert, wurden die Messungen zusätzlich in Anwesenheit des Reduktionsmittels DTT durchgeführt. DTT reduziert Schwefelbrücken. Die Verteilung des Längenzuwachses, der durch die Entfaltung von GFP β_{N-lock} in Anwesenheit von DTT verursacht wird, zeigt nun eine dominante Population bei 77 nm, die auf die vollständige Entfaltung zwar Zweifach-Cystein modifizierter, aber nicht intern verknüpfter GFP Moleküle zurückgeht. Abb. B.2 i) zeigt eine Überlagerung der Kraft-Ausdehnungssignatur, die durch den Bruch nicht-verknüpfter GFP β_{N-lock} Moleküle zurückgeht. Die Besetzung von Zwischenniveaus in der Cantilever Relaxationsphase wird nun wieder konsistent beobachtet.

Damit kann nun geschlossen werden, dass der Übergang GFP $\Delta\alpha \rightarrow$ GFP $\Delta\alpha\Delta\beta$ durch das Ablösen des ersten N-terminalen β -Stranges verursacht wird. Die Variante GFP β_{N-lock} verhindert diesen Übergang, der Zustand GFP $\Delta\alpha\Delta\beta$ kann nicht besetzt werden und das Molekül muss einen anderen Reaktionspfad wählen. Ebenfalls kann nun geschlossen werden, dass die restliche Raumstruktur des GFP bei diesen Übergängen erhalten wird.

Anhang C

Superhelix-vermittelte Protein Polymerisation

C.1 Prinzip

In diesem Kapitel wird ein weiterer Weg beschrieben, um einzelne Proteinmoleküle spezifisch zu Polyproteinen zu assemblieren. Die Methode basiert auf der Konstruktion von reaktiven Fusionsgenen, bei denen die DNA-Sequenz des Zielproteins zwischen zwei Bindungspartnern zwischengeschaltet wird. Ein in der Natur häufig vorkommendes strukturelles Motiv zur Dimerisierung von Proteinen basiert auf der Bildung von Superhelizes (englisch: coiled coils). Superhelizes sind Thema der aktuellen Forschung [118][113][71][54]. Dabei multimerisieren zwei oder mehr für sich genommen unstrukturierte Aminosäuresequenzen mit einer sogenannten Heptaden-Signatur. Die Bindungspartner bilden dabei jeder für sich eine helikale Struktur, die sich dann zu einer gewundenen Superhelix zusammenlagern. Ein Eigenschaft von Superhelizes ist, dass sowohl die relative Orientierung der Helizes als auch die Bildung von Homo- wie auch Heterosuperhelizes allein über die Aminosäuresequenz programmiert werden kann. Superhelizes weisen somit ein großes Potential für die spezifische Konstruktion von supramolekularen Objekten auf. Auch für die gezielte Erzeugung von Polyproteinen, also einfachen linearen supramolekularen Konstrukten, können Superhelizes von Bedeutung sein. Abb. C.1 illustriert die zugrundeliegende Idee.

Ausgangspunkt ist ein Expressionsvektor. Eine Klasse der Superhelix-bildenden Sequenzen wird auch als „Leuzin-Zipper“ bezeichnet, da sie zum einen gehäuft die Aminosäure Leuzin beeinhaltend und zum anderen einem Reißverschluss ähnelnde Strukturen bilden. Der Expressionsvektor wird nun so präpariert, dass die Cloning Site durch die DNA Sequenzen zweier Leuzin-Zipper flankiert wird. Jede Zipper-Sequenz besitzt dabei jeweils am C-Terminus noch ein Cystein (gelber Punkt in Abb.C.1). In einem ersten Schritt wird die DNA Sequenz des zu polymerisierenden Proteins zwischen die Sequenzen der beiden Leuzin-Zipper fusioniert. Expression des modifizierten Vektors in Schritt 2 z.B in Bakterien führt zur Erzeugung von Fusionsproteinen, bei denen jeweils eine Zipper-Struktur am N- und am C-Terminus des Zielproteins montiert ist. Nach der Expression sollten damit die

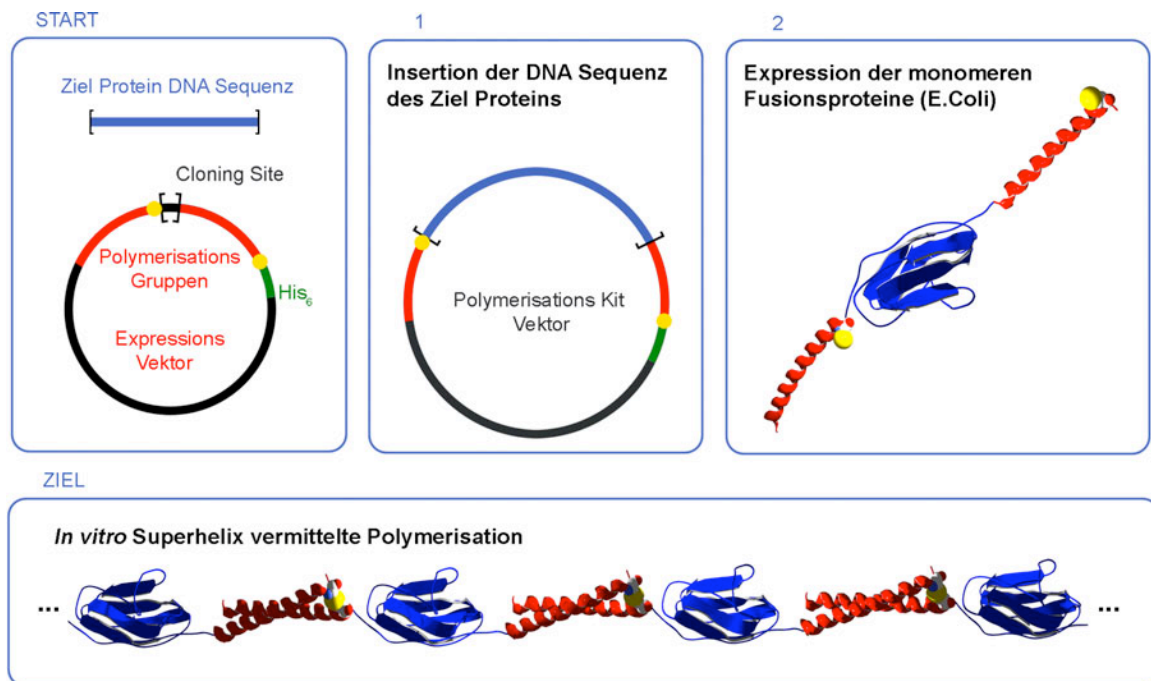


Abbildung C.1: Prinzip einer Superhelix-vermittelten Proteinpolymerisation

programmierten Zipper-Strukturen von selbst zu Superhelices zusammenfinden und damit lineare Polyproteine, wie in Abb. C.1 „Ziel“ bilden. Die terminalen Cysteine in den Zippern sorgen dabei über die Ausbildung einer Schwefelbrücke für eine dauerhafte, kovalente Verknüpfung der Polyproteine.

Es ist denkbar, diese Methode ebenfalls zur spezifischen selbst-assemblierten Konstruktion von dreidimensionalen, funktionalen Objekten zu verwenden. Wählt man unterschiedliche flankierende Superhelix-Motive, so könnten Proteine verschiedener Funktionen spezifisch und vorherbestimmt verbunden werden, und so beispielsweise ein Enzym mit einem anderen gezielt verbunden werden. Verwendet man flankierende Motive, die Dreifach- oder Mehrfach-Superhelices bilden, so könnte man Gabelungspunkte oder sogar Knotenpunkte für die Bildung dreidimensionaler Objekte einführen. In Anlehnung an die als DNA-Nanotechnologie bekannten Projekte [99][66][101][27], sind so selbstassemblierte nanometergroße Objekte vorstellbar, die bestimmte, gewünschte Funktionalitäten aufweisen.

Ein notwendiger Schritt ist daher eine Untersuchung, inwiefern Superhelices mit einfachen geometrischen Kriterien in Form eines Baukastens verwendet werden können. Abb. C.2 a) zeigt einen elementaren Baustein, bei dem N- und C-Terminus des zu polymerisierenden Proteins sich räumlich auf verschiedenen Seiten der Raumstruktur des Proteins befinden, während Abb. C.2 b) einen Baustein zeigt, bei dem N- und C-Terminus sich auf gleichen Seiten des zu polymerisierenden Proteins befinden. Verwendet man Zippersequenzen, die nur in paralleler Orientierung zu Superhelices dimerisieren, so kann jeder Zipper als Pfeil dargestellt werden und eine ausgebildete Superhelix als zwei parallel angelegte Pfeile. Im Fall a) und b) können sich daher drei unterschiedliche Verknüpfungsgeometrien

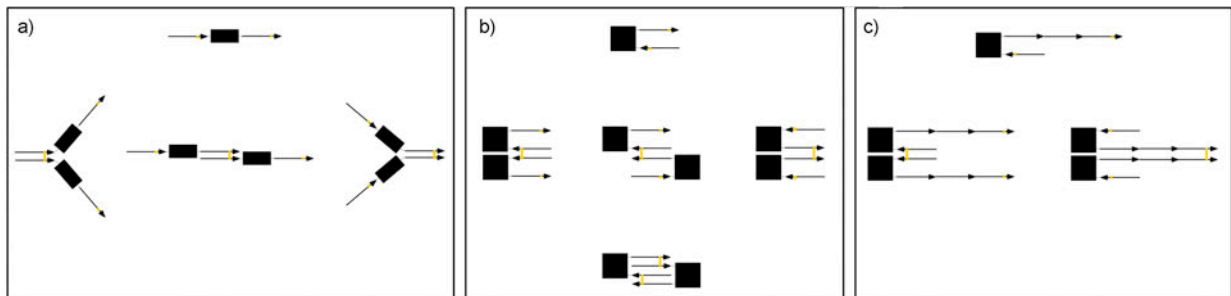


Abbildung C.2: Elementare Bausteine für eine Polymerisation mit verschiedenen Verknüpfungsgeometrien.

zwischen zwei Bausteinen ausbilden. Die dimerisierten Bausteine haben dabei jeweils wieder zwei freie partnerlose Zipper. In a) sind die freien Zipper in jedem Fall geometrisch voneinander getrennt und können sich nicht gegenseitig absättigen, ohne sterische Konflikte zu verursachen. Im Fall b) müsste jedoch in jedem Fall eine einfache Rotation der Untereinheiten um die Bindung der Zipper an das Zielprotein genügen, um die freien Zipper abzusättigen. Das bedeutet, ein Baustein der Form a) sollte ungehindert zur Ausbildung von langen Polyproteinen führen, die über drei verschiedene Verknüpfungsgeometrien polymerisieren. Im Fall b) sollte es hingegen durch eine sterische Randbedingung zu einer Akkumulation von Dimeren kommen. Im Fall c) ist schematisch ein weiterer Baustein dargestellt, der nur noch zwei mögliche Verknüpfungsgeometrien zulässt. Der elementare Baustein besteht dabei aus einer Zippersequenz am N-Terminus des Zielproteins und einer Dreifach-Zippersequenz am C-Terminus des Zielproteins. Die Orientierung der Untereinheiten in einem Polyprotein sollte daher determiniert sein, und zwar immer C-Terminus an C-Terminus und N-Terminus an N-Terminus.

Als Modellsystem für Baustein a) in Abb. C.2 ist die Domäne Ig27 aus menschlichem Herzmuskeltitin gewählt worden, während GFP als Modellsystem für Baustein b) und c) verwendet worden ist. Die Fusionsproteine werden im folgenden als (a) $Z \cdot Ig27 \cdot Z$ bzw. als (b) $Z \cdot GFP \cdot Z$ und (c) $Z \cdot GFP \cdot Z_3$ bezeichnet. Die Assemblierung der verschiedenen Bausteine zu Polyproteinen wird im Folgenden mit Größenausschluss-Chromatographie gezeigt und die Geometrie ihrer Verknüpfung direkt am einzelnen Molekül mit dem Kraftspektrometer untersucht.

C.2 Superhelix Polyproteine

Abb. C.3 zeigt die typische Längenverteilung in $Z \cdot Ig27 \cdot Z$, $Z \cdot GFP \cdot Z$ und $Z \cdot GFP \cdot Z_3$ Polyproteinlösungen. Die Kurven sind zum besseren Vergleich jeweils auf eine Konzentration von 1 für den Gehalt an Monomeren normiert worden. Im Falle von $Z \cdot Ig27 \cdot Z$ und $Z \cdot GFP \cdot Z_3$ beobachtet man eine breite Längenverteilung. Der Gehalt an 30-meren beträgt in beiden Fällen immer noch etwa 30 Prozent im Vergleich zum Gehalt an den jeweiligen Monomeren. Die Polymerisation über Superhelizes ist für diese beiden Bausteine unge-

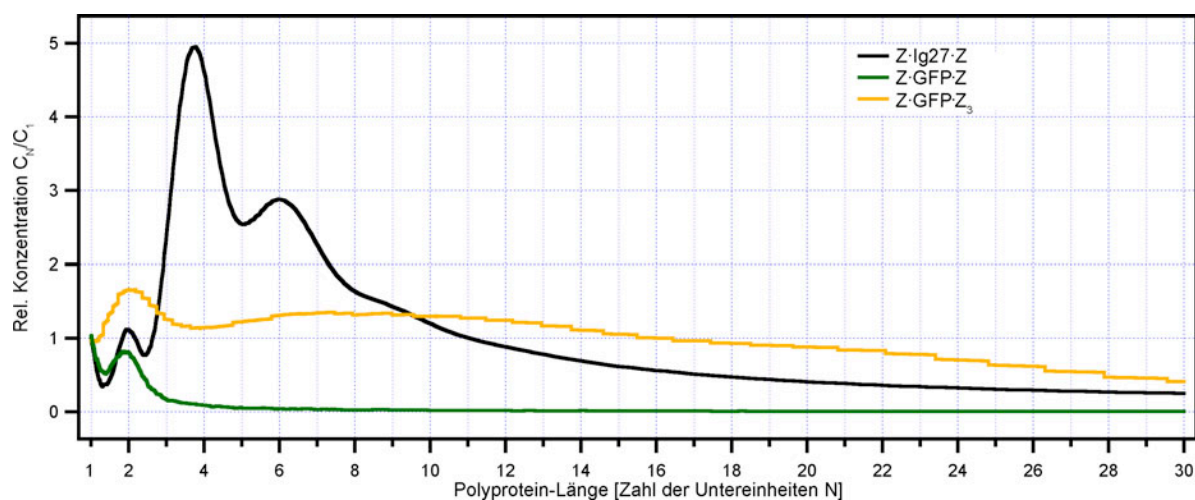


Abbildung C.3: Längendispersion von Superhelix Polyproteinen. Die Konzentrationen wurden im Falle von $Z \cdot Ig27 \cdot Z$ über die Absorption bei 280 nm und im Falle von $Z \cdot GFP \cdot Z$ bzw. $Z \cdot GFP \cdot Z_3$ über die GFP Absorption bei 473 nm bestimmt. Aufgetragen ist die relative Konzentration im Vergleich zum Gehalt von Monomeren.

hindert möglich. Im Gegensatz dazu zeigt das Chromatogramm im Fall von $Z \cdot GFP \cdot Z$ nur einen deutlichen Peak bei Dimeren. Die Polymerisation kommt auf dieser Stufe zum Erliegen. Diese Beobachtungen zeigen, dass der Polymerisationsprozess mit Superhelizes tatsächlich mit einfachen geometrischen Kriterien (vgl. Abb. C.2), gesteuert werden kann und, abgesehen von sterischen Randbedingungen, nicht von den chemischen Eigenschaften des zu polymerisierenden Proteins abhängt.

In der Längendispersion von $Z \cdot Ig27 \cdot Z$ zeigt sich eine Akkumulation von Polyproteinen geradzahligter Länge. Dies deutet auf einen Polymerisationsprozess hin, der so schnell abläuft, dass die Menge verfügbarer Monomere schnell in Dimere umgewandelt wird und dabei aufgebraucht wird. Im weiteren Verlauf der Polymerisation entstehen dadurch gehäuft Polymere geradzahligter Länge. Es wurde versucht, die Kinetik des Polymerisationsprozesses näher zu untersuchen. Es stellte sich jedoch für alle untersuchten elementaren Bausteine heraus, dass direkt nach der Aufreinigung der Proteine aus den Expressionszellen bereits eine mit Abb. C.3 vergleichbare Längendispersion erreicht worden ist. Die Polymerisation findet offenbar bereits sehr schnell zum Teil *in vivo* und während der Zeit, die zum Zellaufschluss und Aufreinigung benötigt wird, statt.

Mit der Kraftspektroskopie ist es nun möglich, einerseits die erfolgreiche Polymerisation auf der Einzelmolekül-Ebene nachzuweisen und andererseits die verschiedenen Verknüpfungsgeometrien der Bausteine direkt am einzelnen Molekül zu untersuchen. Schwaiger et al und Bornschlögl et al haben die mechanischen Eigenschaften von ausgewählten Superhelizes in Einzelmolekül-Experimenten bei Überstreckung entlang der Helixachse und bei Belastung orthogonal zur Helixachse („unzipping“) untersucht [98][13]. Bei einer Überstreckung kommt es zur Trennung der Bindungspartner bei Kräften um 25 pN, während es in der Unzipping Geometrie bereits bei Kräften um 15 pN zur Dissoziati-

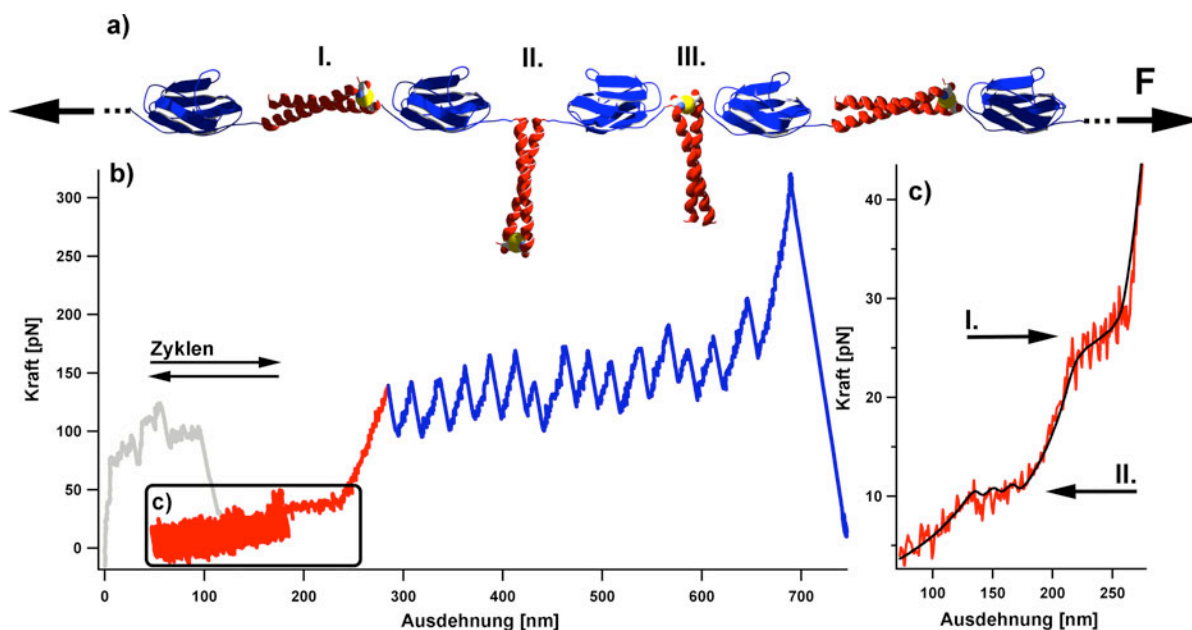


Abbildung C.4: a) Schematische Darstellung eines $Z \cdot Ig27 \cdot Z$ Polyproteins. b) Typische Kraftausdehnungsantwort von $Z \cdot Ig27 \cdot Z$ Polyproteinen. c) Mechanische Signatur des Überstreckens (I) und Unzippens (II) der verbindenden Superhelizes.

on kommt. Die kraftinduzierte Dissoziation der Superhelizes findet bei den experimentell üblichen Bedingungen im thermischen Gleichgewicht statt und führt zu einer hochreproduzierbaren und markanten Signatur in Kraft-Ausdehnungskurven. In einem Polyprotein, das aus einem Baustein wie in Abb. C.2 a) konstruiert worden ist, sollten statistisch gemischt drei verschiedene Verknüpfungsgeometrien vorhanden sein. Abb. C.4 a) zeigt schematisch die Struktur eines $Z \cdot Ig27 \cdot Z$ Polyproteins mit den drei verschiedenen Verknüpfungsgeometrien. Die Verknüpfungsgeometrien I. und II. sollten sich durch Auftreten der charakteristischen Signaturen des Überstreckens bzw. Unzipping in Einzelmolekül-Kraftkurven bemerkbar machen, während eine Kraftwirkung auf die Superhelix im Fall III. durch eine kovalente Schwefelbrücke abgeschirmt wird. Abb. C.4 zeigt eine typische Einzelmolekül-Kraftkurve an einem $Z \cdot Ig27 \cdot Z$ Polyprotein. Für die Messung der Kraftkurve wurde zunächst die Probenfläche etwa 200 Nanometer von der Cantileverspitze entfernt, um Vielfachwechselwirkungen mit dem Cantilever zu beseitigen (Abb. C.4 b), grauer Abschnitt). Im Anschluss wurde in zehn Zyklen die Probenfläche bis auf 50 nm an den Cantilever angenähert und wieder auf 200 nm entfernt. Die Zyklen sind nötig, um die Auflösung im Bereich der Superhelix Signaturen zu steigern. Im Anschluss wurde wie in konventionellen Kraftkurven die Probenfläche mit konstanter Geschwindigkeit weiter entfernt. In der Kraftkurve sind bis zum Abriss des Moleküls 15 äquidistante Kraftzacken (blauer Teil) ersichtlich, die auf den sequentiellen Zusammenbruch aller im Molekül enthaltenen Ig27 Strukturen zurückzuführen sind. Zusätzlich dazu ist bei Ausdehnungen bis 250 nm ein Kraftplateau ersichtlich. Mittelung der Zyklen in diesem Ausdehnungsbereich

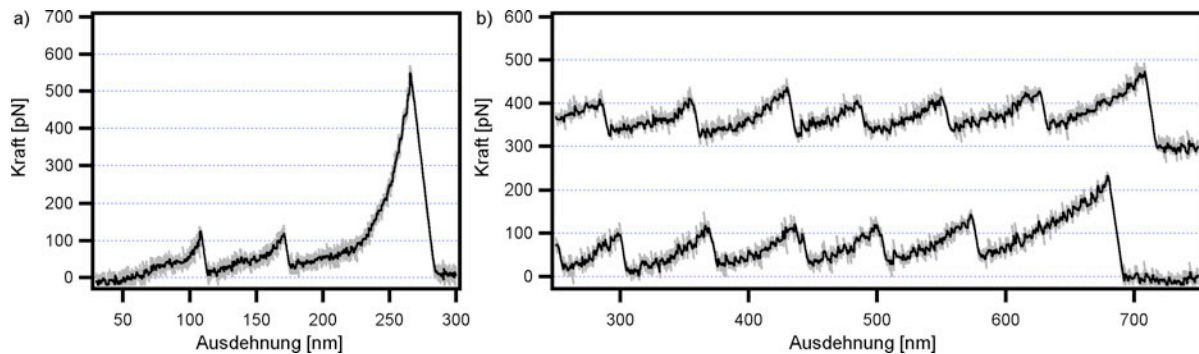


Abbildung C.5: a) Kraftkurve an einem $Z \cdot GFP \cdot Z$ -Dimer. b) Typische Kraftkurven an $Z \cdot GFP \cdot Z_3$ Polyproteinen. Graue Linien: Ungefilterte Kraftkurven. Schwarze Linien: gefilterte Kraftkurven

liefert Abb. C.4c). Es sind zwei diskrete Plateaus bei 13 pN und bei 27 pN ersichtlich. Kombiniert man die theoretischen Modelle zur Beschreibung der Elastizität von Superhelizes bei Überstreckung [98] und bei Unzipping [13], und passt sie an die Kraftkurve an, so ergibt sich die schwarze Linie in Abb. C.4 c). Aus dieser Analyse ergeben sich drei Unzipping-Ereignisse und sieben Überstreck-Ereignisse. Das Polyprotein beinhaltete 15 Untereinheiten, demzufolge waren die verbleibenden fünf Untereinheiten über die abgeschirmte Geometrie III. verknüpft. Die Häufigkeit, Geometrie I. anzutreffen, sollte bei statistisch unabhängiger Verknüpfung der Untereinheiten 50 Prozent betragen, während Geometrie II. und III jeweils mit 25 Prozent Häufigkeit aufgefunden werden sollten. Diese Verteilung wird in diesem Polyprotein reproduziert. Der Vollständigkeit halber zeigt Abb. C.5 a) noch die Kraft-Ausdehnungsantwort von einem kurzen $Z \cdot GFP \cdot Z$ Polyprotein mit zwei GFP Bruchereignissen. Die Überstreck-Signatur der Superhelix manifestiert sich in einem Kraftplateau bei etwa 30 pN. Abb. C.5 b) zeigt typische Kraftkurven von einzelnen $Z \cdot GFP \cdot Z_3$ Polyproteinen. In dieser Konfiguration sind nur Unzipping-Signaturen (vgl. Abb. C.2c) der Dreifach-Zipper möglich, die in den gezeigten Kraftkurven jedoch nicht aufgelöst sind.

C.3 Ausblick

Damit ist die Machbarkeit einer Superhelix-vermittelten Proteinpolymerisation demonstriert worden. Es sind vielversprechende Hinweise gesammelt worden, dass diese Technik zu einem Baukasten ausgebaut werden kann, mit dem Proteine spezifisch in einem self-assembly Prozess verknüpft werden können. Die Verwendung von Mehrfach-Helizes sollte damit auch die Konstruktion von dreidimensionalen Strukturen ermöglichen. Eine Anwendung findet die Superhelix-vermittelte Proteinpolymerisation unmittelbar in der Einzelmolekül-Kraftspektroskopie, da mit ihr unabhängig von den Eigenschaften der zu verknüpfenden Proteine auf einfache Weise Polyproteine erzeugt werden können. Insbesondere können die markanten, elastischen Signaturen der Superhelix-Strukturen als ein

Kraftstandard zur Kalibration der Kraftachse ausgenutzt werden.

C.4 Protokoll

Die für das entsprechende Protein (hier: GFP und Ig27) kodierende DNA Sequenz wurde in die Cloning site des *PolyKit*-Expressionsvektors über Restriktion und Ligation eingebaut. Der *PolyKit* Vektor wurde durch doppelte Insertion der Sequenz von zwei GCN4-Leuzinzippern [13] in einen pRSET5d Expressionsvektor (Novagene) konstruiert. Die zwei Zippersequenzen kodieren ebenfalls jeweils für ein Cystein, das C-terminal am Ende jedes Zippers im exprimierten Protein erscheint. Der modifizierte Vektor wurde in BL21-CodonPlus(DE3)-RIL *E.coli* Zellen (Stratagene) transformiert. Protein Expression wurde analog der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Zielproteine wurden über Ni-NTA basierte Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Polymerisation findet bei Proteinkonzentrationen $> 20 \mu\text{M}$ bereits in den Expressionszellen und während der Aufreinigung statt. Weitere Inkubation ist daher nicht nötig. Für die Durchführung des Protokolls sind folgende Materialien notwendig:

- *PolyKit*-Expressionsvektor
- XL10 Gold Ultracompetent *E.coli* Zellen (Stratagene)
- BL21-CodonPlus(DE3)-RIL *E.coli* Zellen (Stratagene)
- Lysis-Puffer: 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 300 mM NaCl. Der *pH*-Wert sollte mit NaOH auf *pH* = 8 eingestellt werden
- 5 verschiedene Elutions-Puffer, bestehend aus Lysis-Puffer mit jeweils 20 mM, 70 mM, 100 mM, 200 mM und 500 mM Imidazol
- Sterile Pipettenspitzen und Reagenzgefäße
- *French Press* oder Sonicator für das Aufschliessen von Zellen
- HisTrap HP oder FF Ni-NTA Affinitätschromatographie-Säulen (GE Healthcare)
- Centricon Zentrifugationsfilter (Millipore)
- HiTrap Entsalzungssäulen (GE Healthcare)
- Superose 10/300 GL Säule (GE Healthcare)

Anhang D

Methoden

D.1 Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie

Für die Einzelmolekül-Fluoreszenzexperimente in dieser Arbeit wurde ein invertiertes, objective-type TIR¹ Fluoreszenz-Mikroskop zur Abbildung von fluoreszenten Einzelmolekülen konstruiert. Abb. D.1 zeigt schematisch die Konfiguration des Instrumentes.

Kern des Mikroskops ist eine empfindliche EM-CCD Kamera (Andor iXON DU-897), die in der Lage ist, mit jedem ihrer 512x512 Pixel einzelne Photonen zu detektieren. Mit dieser Kamera konnten bei Belichtungszeiten von nur 25 ms die schwachen Lichtsignale von einzelnen GFP Molekülen ausreichend vom durch elektronisches Rauschen und Streulicht verursachten Hintergrund aufgelöst werden. Diese Zeitauflösung wurde für alle aufgenommenen Fluoreszenzfilme verwendet. Ein weiteres wesentliches Element ist ein 100x Ölimmersionsobjektiv (Zeiss alpha Plan-Fluar) mit einer numerischen Apertur von NA=1.45.

Für die Anregung der GFP Moleküle wurde ein continuous-wave Festkörperlaser mit einer Wellenlänge von 473 nm (Roithner Lasertechnik) und einer maximalen Leistung von 50 mW in den Anregungsstrahlengang des Mikroskops eingebaut. Der Laser wurde bei einer optischen Leistung von 35 mW betrieben. Durch verschiedene nachgeordnete Filter wurde die Energiedichte des Anregungslichts in der Probe auf etwa 5 kW/cm² eingestellt. Das Mikroskop enthält nur die wesentlichen optischen Komponenten, um Streulicht und Fluoreszenzlichtverluste so klein wie möglich zu halten. Das gesamte Mikroskop ist lichtundurchlässig ummantelt worden. Der Strahlengang des Anregungslichts wurde in Anlehnung an eine von Dr. Felix Linke für ein ellipsometrisches Mikroskop entworfene Konfiguration [68] aufgebaut. Linse 1 fokussiert das aufgeweitete Laserlicht auf den Spiegel 1, welcher wiederum im Fokus der Linse 2 positioniert ist. Linse 2 erzeugt dadurch wieder parallele Strahlenbündel, die durch Linse 3 über einen dichromatischen Spiegel (AHF Analysetechnik) in die hintere fokale Ebene des Objektivs fokussiert werden. Linse 1 und Spiegel 1 können gemeinsam über präzise Mikrometerschrauben in zwei Richtungen verschoben werden (durch rote Pfeile in Abb. D.1 gekennzeichnet). Diese Konfiguration ermöglicht

¹TIR = Total Internal Reflection

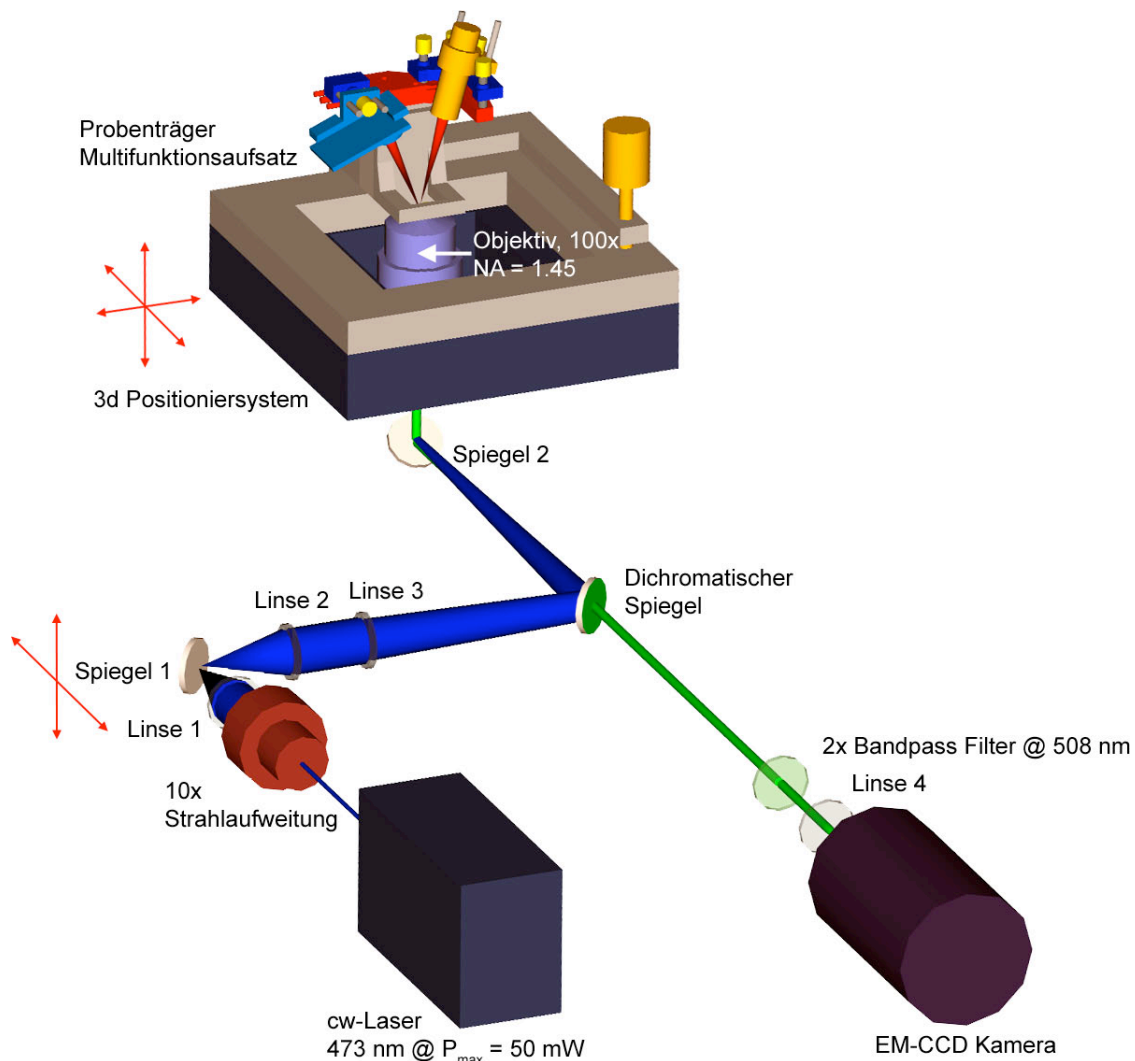


Abbildung D.1: Einzelmolekül-TIR Fluoreszenzmikroskop (Schema) mit Kraftspektrometernaufsatz

es, das Anregungslicht in zwei Richtungen in nahezu perfekter Parallelität zur optischen Achse zu verschieben. Die verschobenen Strahlenbündel werden auf der Probenseite vom Objektiv zur optischen Achse hin gebrochen. Durch die Parallelverschiebung kann der kritische Winkel (und darüberhinaus) für eine totale interne Reflexion² des Anregungslichts am Probenträger sehr genau eingestellt werden. Das Mikroskop ist so konfiguriert worden, dass die Eindringtiefe des evaneszenten Anregungslichts in das Probenvolumen im Mittel zwischen 180 und 220 nm betrug. Dies konnte mit dem Kraftspektrometernaufsatz durch

²In totaler interner Reflexion klingt das Anregungslicht als evaneszente Welle im Probenvolumen gemäß $I(z) = I_0 \cdot e^{-z/d_p}$ ab. Die Eindringtiefe d_p hängt dabei sowohl von der verwendeten Wellenlänge, dem Einfallswinkel³ θ_1 , als auch von den Brechungsindizes n_1 (Glas: 1.52) und n_2 (wässrige Lösung: 1.38) ab:

$$d_p = \frac{\lambda}{4\pi \cdot \sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta_1 - n_2^2}}$$

Messung der Fluoreszenzintensität der Spitze eines AFM Cantilevers in Abhängigkeit von der Entfernung von der Oberfläche direkt bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Das vom Objektiv gesammelte Fluoreszenzlicht der Probe wird durch den bei 508 nm transparenten dichromatischen Spiegel durchgeleitet und nach zusätzlicher Filterung durch zwei Bandpassfilter bei 508 ± 10 nm Wellenlänge mit einer Okularlinse (Linse 4) auf den CCD Chip der Kamera fokussiert.

Von Linse 1 und Spiegel 1 abgesehen, ist der gesamte optische Strahlengang inklusive Objektiv auf einer optischen Bank fest fixiert. Für die Translation der abzubildenden Probe und Fokussierung ist daher ein Probenhalter konstruiert worden, der einerseits mit feinen Mikrometerschrauben in drei Dimensionen relativ zum Objektiv mit einer Reichweite von einigen Millimetern positioniert werden kann. Zusätzlich dazu ist in diesen Probenhalter ein dreiachsiger Piezoscanner mit $100 \mu\text{m}$ horizontaler und $20 \mu\text{m}$ vertikaler Reichweite eingelassen. Der Piezoscanner (Physik Instrumente P-517) kann elektronisch angesteuert werden und ermöglicht eine nanometergenaue Positionierung der Probe.

Der Aufbau ist als invertiertes objective-type Mikroskop konzipiert worden, um den probenseitigen Halbraum für verschiedene Funktionsaufsätze verfügbar zu halten. Es sind zwei Aufsätze konstruiert worden: eine Mikrofluidikhalterung und ein Kraftspektrometer. Die Mikrofluidikhalterung ist kompatibel für Standard-Objektträger der Größe $75 \times 25 \times 1$ mm und kann damit insbesondere für kommerziell erhältliche Flusskammern zur Zellkultivierung (z.B von der Firma IBIDI) sofort eingesetzt werden. Für die in Anhang A beschriebenen Einzelmolekül-Fluoreszenzexperimente wurden jedoch selbstgebaute Kammern verwendet. Diese Kammern wurden aus Standard-Deckgläschen (Firma Carl-Roth) der Größe $18 \times 18 \times 0.17$ mm gefertigt. Die Deckgläschen wurden dazu zunächst vier Stunden in einer Ätzlösung (1 Teil Ammoniak, 1 Teil Wasserstoffperoxid, 1 Teil doppelt-destilliertes Wasser) gereinigt, um jegliche Oberflächenverschmutzung zu entfernen, mehrfach mit zweifach-destillierten Wasser unter Ultraschall gespült und schliesslich aufeinandergelegt⁴ bei 70°C getrocknet. Für eine Messung wurden quer zur langen Achse abgeschnittene Pipettenspitzen als wenige Millimeter hohe Zylinder mit wasserunlöslichem Vakuumfett auf ein gereinigtes Deckgläschen geklebt. Die Kammern erhielten damit die Form eines umgedrehten Doktorhutes. Auf diese Weise konnten kleine Flüssigkeitsvolumina ($< 10 \mu\text{l}$) auf den Probenträger einfach aufgetragen und auch wieder getauscht werden.

D.2 Einzelmolekül-Kraftspektroskopie

Alle kraftspektroskopischen Messungen wurden auf einem durch Ingo Schwaiger konstruierten Atomkraftmikroskop [96] bei Raumtemperatur durchgeführt. Für die hochauflösende Kraft-Zeitkurve in Abb. 6.1 b) wurde der vom Autor konstruierte Kraftspektrometernaufsatz des Fluoreszenzmikroskops verwendet. Es wurden mit Gold bedampfte Cantilever des Typs BioLever Typ A (Olympus, Tokyo, Japan) mit Federkonstanten um 30 pN/nm und Resonanzfrequenzen in Wasser um 8 kHz verwendet. Für die Messungen wurden zunächst

⁴Dies verhindert erneute Verschmutzung durch Luftkontakt.

evtl. aufgetretene Aggregate durch 10 minütige Zentrifugation bei 10000xg aus den Proteinlösungen entfernt. Etwa 10 μl Proteinlösung wurden auf unbehandelte Glaträger aufgetragen (GFP(117,182) und GFP(182,212) wurden auf goldbeschichtete Glaträger aufgetragen) und für etwa 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Alle Kraftkurven wurden bei konstanter Ziehgeschwindigkeit von 3.6 $\mu\text{m/s}$ aufgenommen. GFP(3,132) Polyproteine wurden bei zwei unterschiedlichen Geschwindigkeiten untersucht: (2 $\mu\text{m/s}$ und 12 $\mu\text{m/s}$).

D.3 Monte-Carlo Simulationen

Ziel ist es, aus experimentellen Bruchkraftverteilungen die Potentialbreite Δx und die Höhe der energetischen Barriere ΔG^* einer gefalteten Proteinstruktur zu ermitteln. Dazu wurden Monte-Carlo Simulationen, basierend auf [88], durchgeführt. In einer solchen Simulation wird ein virtuelles Polypeptid der initialen Konturlänge L_0 mit der Geschwindigkeit v_p beginnend mit der Ausdehnung $x = 0$ gestreckt. Dies führt zu einer zusätzlichen Ausdehnung $\Delta x = v_p \cdot \Delta t$ in jedem Zeitschritt Δt . Nach jedem Zeitschritt wird die aktuell wirkende Kraft $F(t)$ bei der aktuellen Ausdehnung $x(t)$ über die WLC - Interpolationsformel 2.2 berechnet. Es wurden n gefaltete Proteinstrukturen in dem virtuellen Polypeptid simuliert, die Konformationsübergänge vollführen können. Die Eigenschaften der i -ten Struktur sind dabei über eine natürliche Übergangsrate k_{0i} , eine Potentialbreite Δx_i und einen Konturlängenzuwachs ΔL_i der mit einem Zusammenbruch der Struktur verbunden ist, beschrieben worden. Zur Simulation der Bruchkinetik der Proteinstrukturen unter Kraft wird in jedem Zeitschritt eine Übergangsrate $k_i(F)$ ($i = [0, \dots, n]$) unter der aktuell wirkenden Kraft F für jede der Strukturen berechnet.

$$k_i(F) = k_{0i} \cdot \exp \frac{F \cdot \Delta x_i}{k_B T} \quad (\text{D.1})$$

Übergangsraten für den Prozess der Faltung können bei den in dieser Arbeit relevanten Kräften vernachlässigt werden. Die Wahrscheinlichkeit für einen Konformationsübergang der i -ten Struktur in einem Zeitschritt Δt ist dann durch

$$P_i = k_i(F) \cdot \Delta t \quad (\text{D.2})$$

gegeben. Es wurden in jedem Zeitschritt die Übergangswahrscheinlichkeiten P_i für alle n Domänen berechnet und ein Wahrscheinlichkeitsstrahl wie in Abb. D.2 erzeugt. Die Zeitschritte sind so klein gewählt worden, dass $\sum_{i=1}^n P_i \ll 1$ galt. Mit einem Zufallsgenerator wurde in jedem Zeitschritt eine Zufallszahl erzeugt. Der verwendete Zufallsgenerator (*enose*, IGOR PRO, Wavemetrics) erzeugt gleichwahrscheinliche Zahlen im Bereich $[0, 1]$, die 2^{32} verschiedene Werte annehmen können. Die Periodizität ist größer als 10^{18} , wobei die Startwerte über die aktuelle Systemzeit festgelegt werden. Fällt die Zufallszahl in einen der Wahrscheinlichkeits-Kästen P_i (siehe Abb. D.2), so wurde für einen Bruch der entsprechenden Proteinstruktur entschieden. Die Konturlänge des simulierten Polypeptids wird um den jeweiligen Konturlängenzuwachs ΔL_i verlängert und die entsprechende Struktur

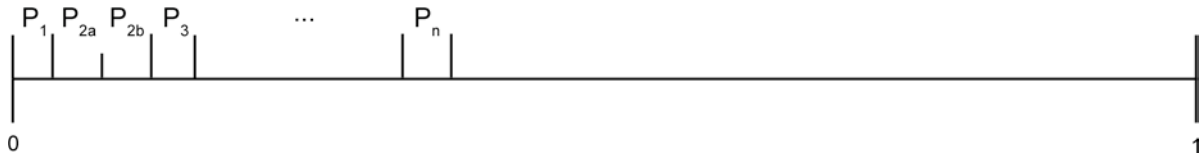


Abbildung D.2: Wahrscheinlichkeitsstrahl für Monte-Carlo Simulationen. Fällt eine Zufallszahl in einen der P_i Abschnitte, so wird auf Dissoziation der entsprechenden Struktur entschieden.

aus dem Wahrscheinlichkeitsstrahl gelöscht. Diese Verfahrensweise erlaubt es auch, parallele Übergangsmöglichkeiten derselben Proteinstruktur (vgl. Kapitel 4) zu simulieren. Dazu wurden Übergangswahrscheinlichkeiten P_{ia} und P_{ib} (siehe Abb. D.2) für die alternativen Pfade berechnet und entsprechend ein Abschnitt auf dem Wahrscheinlichkeitsstrahl erzeugt. Sollten Strukturen simuliert werden, die über stabile Zwischenzustände entfalten, so wurde bei einem Übergang der entsprechenden Struktur eine neue Struktur mit den Eigenschaften des Zwischenzustandes und ein neuer, zugehöriger Kasten auf dem Wahrscheinlichkeitsstrahl erzeugt.

Die Eigenschaften realer Cantilever mit begrenzter Reaktionszeit sind durch Einführung einer Relaxationsphase nach einem Übergang mit dem Kraft-Abstandsverhalten

$$F_{relax} = -k_c \cdot x \quad (\text{D.3})$$

simuliert worden. Die Relaxationsphase wurde als abgeschlossen angesehen, wenn die Ausdehnung mit $F_{relax}(x) = F_{WLC}(x, L + \Delta L_i)$ erreicht wurde. Danach wurde wieder auf WLC-artiges Kraft-Ausdehnungsverhalten 2.2 umgeschaltet.

Die Simulationen zur Auswertung der experimentellen Bruchkraftverteilungen sind folgendermaßen durchgeführt worden: In jeder gemessenen und in die Bruchkraftverteilungen eingegangenen Einzelmolekül-Kraftkurve ν an Polyproteinen wurde die initiale Konturlänge $L_{0\nu}$ über einen WLC-Fit bestimmt und tabelliert. Ebenfalls wurde die Anzahl der Bruchereignisse n_ν in jeder Kraftkurve ν tabelliert. Es wurden nur Kraftkurven ausgewertet, die aufgrund der Höhe des letzten Peaks drauf schliessen liessen, dass alle belasteten Strukturen auch entfaltet worden sind. Dies ergab eine Liste mit N Einträgen $(L_{0\nu}, n_\nu)$. Anhand dieser Liste wurden N Kraftkurven an virtuellen Polyproteinen mit der initialen Konturlänge $L_{0\nu}$ und n_ν übergangsfähigen Proteinstrukturen simuliert. Als Konturlängenzuwachs ΔL_i , der mit dem Bruch einer einzelnen Struktur verbunden ist, wurde konstant der experimentell ermittelte mittlere Konturlängenzuwachs der entsprechenden Proteinstruktur verwendet. Die Bruchkräfte, bei denen es zu Übergängen in den simulierten Kraftkurven gekommen ist, wurden tabelliert und eine Bruchkraftverteilung mit insgesamt $\sum_{\nu=1}^N n_\nu$ Einträgen erzeugt. Es wurden 30 Bruchkraftverteilungen für einen Parametersatz $(\Delta x_i, k_{0i})$ simuliert und gemittelt, um den Simulationen inhärente Fluktuationen zu beseitigen. Die simulierten, mittleren Bruchkraftverteilungen wurde dann mit den experimentell erhaltenen verglichen. Die Fit-Parameter Δx_i und k_{0i} wurden variiert, bis es zu einer augenscheinlichen Übereinstimmung zwischen experimenteller und simulierter Bruchkraftver-

teilung kam. Im Anschluss wurden Simulationen für jedes Parameterpaar $(\Delta x_i, k_{0i})$ auf der Parameterfläche um die durch den Augen-Fit gefundenen Parameter durchgeführt. Dabei wurde die Übergangsrate k_{0i} in einem exponentiellen Gitter über drei Größenordnungen variiert, während die Potentialbreite Δx_i in einem linearen Gitter über 0.3 nm variiert wurde. Für jedes Parameterpaar in diesem Gitter wurde die quadratische Abweichung $\chi^2(\Delta x_i, k_{0i})$ zwischen Experiment und Simulation berechnet und das Parameterpaar bestimmt, bei dem χ^2 minimal war. Die Fehlerbreiten der Fitparameter wurden aus der Krümmung von χ^2 entlang der Parameterachse $1/\sqrt{d^2\chi^2/da^2}|_{b=const}$ (a, b = Fitparameter) berechnet.

Literaturverzeichnis

- [1] N. Abu-Lail, T. Ohashi, R. Clark, H. Erickson und S. Zauscher, *Matrix Biology* **25** (2006), 175.
- [2] S. Ainarapu, L. Li, C. Badilla und J. Fernandez, *Biophysical Journal* **5** (2005), 3337.
- [3] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und J. Watson: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York, 2002.
- [4] I. Bahar, A. Etilgan und B. Erman, *Current Biology* **2** (1997), 173.
- [5] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. Moore und T. Steitz, *Science* **289** (2000), 905.
- [6] M. Bayas, A. Leung, E. Evans und D. Leckband, *Biophysical Journal* **90** (2006), 1385.
- [7] G. Bell, *Science* **200** (1978), 618.
- [8] H. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. Bhat, H. Weissig, I. Shindyalov und P. Bourne, *Nucleic Acids Research* **28** (2000), 235.
- [9] P. Bertoncini, R. Schoenauer, I. Agarkova, M. Hegner, J. Perriard und H. Guntherodt, *Journal of Molecular Biology* **348** (2005), 1127.
- [10] N. Bhasin, R. Law, G. Liao, D. Safer, J. Ellmer, B. Discher, H. Sweeney und D. Discher, *Journal of Molecular Biology* **352** (2005), 795.
- [11] O. Bieri, J. Wirz, B. Hellrung, M. Schutkowski und M. Drewello, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* **96** (1999), 9597.
- [12] G. Binnig, C. Quate und C. Gerber, *Physical Review Letters* **56(9)** (1986), 930.
- [13] T. Bornschögl und M. Rief, *Physical Review Letters* **96** (2006), 118102.
- [14] P. Bradley, K. Misura und D. Baker, *Science* **309** (2005), 1868.
- [15] K. Brejc, T. Sixma, P. Kitts, S. Kain, R. Tsien, M. Ormö und S. Remington, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* **94** (1997), 2306.

- [16] D. Brockwell, G. Beddard, J. Clarkson, R. Zinober, A. Blake, J. Trinick, P. Olmsted, D. Smith und S. Radford, *Biophysical Journal* **83** (2002), 458.
- [17] D. Brockwell, G. Beddard, E. Paci, D. West, P. Olmsted, A. Smith und S. Radford, *Biophysical Journal* **89** (2005), 506.
- [18] D. Brockwell, E. Paci, R. Zinober, G. Beddard, P. Olmsted, D. Smith, R. Perham und S. Radford, *Nature Structural Biology* **10** (2003), 731.
- [19] A. Brown, I. Rustem, D. Discher und J. Weisel, *Biophysical Journal*, e-published (2006).
- [20] B. Bullard, T. Garcia, V. Benes, M. Leake, W. Linke und A. Oberhauser, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **103** (2006), 4451.
- [21] C. Bustamante, Y. Chemla, N. Forde und D. Izhaky, *Annual Review of Biochemistry* **73** (2004), 705.
- [22] C. Bustamante, J. Marko, E. Siggia und S. Smith, *Science* **265** (1994), 1599.
- [23] Y. Cao und H. Li, *Journal of Molecular Biology* **361** (2006), 372.
- [24] M. Carrion-Vazquez, H. Li, H. Lu, P. Marszalek, A. Oberhauser und J. Fernandez, *Nature Structural Biology* **10** (2003), 738.
- [25] M. Carrion-Vazquez, P. Marszalek, A. Oberhauser und J. Fernandez, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* **96** (1999), 11288.
- [26] M. Carrion-Vazquez, A. Oberhauser, T. Fisher, P. Marszalek, H. Li und J. Fernandez, *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **74** (2000), 63.
- [27] A. Condon, *Nature Reviews Genetics* **7** (2006), 565.
- [28] R. Dickson, A. Cubitt, R. Tsien und W. Moerner, *Nature* **388** (1997), 355.
- [29] H. Dietz: *Mechanik des Grün Fluoreszierenden Proteins*. Diplomarbeit, Fakultät für Physik der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2004.
- [30] H. Dietz, F. Berkemeier, M. Bertz und M. Rief, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* **103** (2006), 12724.
- [31] H. Dietz, M. Bertz, M. Schlierf, F. Berkemeier, T. Bornschlögl, J. Junker und M. Rief, *Nature Protocols* **1** (2006), 80.
- [32] H. Dietz und M. Rief, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* **101** (2004), 16192.
- [33] H. Dietz und M. Rief, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* **103** (2006), 1244.

- [34] E. Evans und K. Ritchie, *Biophysical Journal* **72** (1997), 1541.
- [35] E. Evans und K. Ritchie, *Biophysical Journal* **76** (1999), 2439.
- [36] H. Eyring, *Journal of Chemical Physics* **3** (1935), 107.
- [37] C. Friedsam, A. Wehle, F. Kuhner und H. Gaub, *Journal of Physics-Condensed Matter* **15** (2003), 1709.
- [38] H. Fukuda, M. Arai und K. Kuwaijima, *Biochemistry* **39** (2000), 12025.
- [39] M. Gao, H. Lu und K. Schulten, *Journal of Muscle Research and Cell Motility* **23** (2002), 513.
- [40] M. Grandbois, M. Beyer, M. Rief, H. Clausen-Schaumann und H. Gaub, *Science* **283** (1999), 1727.
- [41] H. Grubmüller: *Molekulardynamik auf langen Zeitskalen*. Dissertation am Physik Department der Technischen Universität München, 1994.
- [42] H. Grubmüller, *Methods in Molecular Biology* **305** (2005), 493.
- [43] F. Gräter, J. Shen, H. Jiang, M. Gautel und H. Grubmüller, *Biophysical Journal* **88** (2004), 790.
- [44] T. Ha, *Methods* **25** (2001), 78.
- [45] R. Hertadi, F. Gruswitz, L. Silver, A. Koide, S. Koide, H. Arakawa und A. Ikai, *Journal of Molecular Biology* **333** (2003), 993.
- [46] J. Howard: *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Massachusetts, 2001.
- [47] T. Hugel, M. Rief, H. Gaub und R. Netz, *Physical Review Letters* **94** (2005), 048301.
- [48] C. Hyeon, R. Dima und D. Thirumalai, *Structure* **14** (2006), 1633.
- [49] P. Hänggi, P. Talkner und M. Borkovec, *Reviews of Modern Physics* **62** (1990), 251.
- [50] S. Imbrota, A. Politou und A. Pastore, *Structure* **4** (1996), 323.
- [51] R. Ishima und D. Torchia, *Nature Structural Biology* **7** (2000), 740.
- [52] J. Israelachvili: *Intermolecular and Surface Forces*. Academic Press, London, 1992.
- [53] S. Jackson, T. Craggs und J. Huang, *Expert Review of Proteomics* **3** (2007), 545.
- [54] R. Jahn und R. Scheller, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7** (2006), 631.

- [55] J. Junker, K. Hell, M. Schlierf, W. Neupert und M. Rief, *Biophysical Journal* **89** (2005), L46.
- [56] A. Kedrov, H. Janovjak, C. Ziegler, W. Kuhlbrandt und D. Muller, *Journal of Molecular Biology* **355** (2006), 2.
- [57] M. Kessler und H. Gaub, *Structure* **14** (2006), 521.
- [58] D. Klimov und D. Thirumalai, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **14** (2006), 1633.
- [59] H. Kramers, *Physica (Utrecht)* **7** (1940), 284.
- [60] O. Kratky und G. Porod, *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas* **68** (1949), 1106.
- [61] L. Lapidus, W. Eaton und J. Hofrichter, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* **97** (2000), 7220.
- [62] G. Lee, K. Abdi, Y. Jiang, P. Michaely, V. Bennett und P. Marszalek, *Nature* **440** (2006), 246.
- [63] H. Li, M. Carrion-Vazquez, A. Oberhauser, P. Marszalek und J. Fernandez, *Nature Structural Biology* **7** (2000), 1117.
- [64] H. Li, A. Oberhauser, S. Fowler, J. Clarke und J. Fernandez, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* **97** (2000), 6527.
- [65] L. Li, S. Wetzel, A. Plückthun und J. Fernandez, *Biophysical Journal* **90** (2006), L30.
- [66] S. Liao und N. Seeman, *Science* **306** (2004), 2072.
- [67] M. Lill und V. Helms, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* **99** (2002), 2778.
- [68] F. Linke: *Development of Ellipsometric Microscopy as a Quantitative High-Resolution Technique for the Investigation of Thin Films at Glass-Water and Silicon-Air Interfaces*. Dissertation am Physik Department der Technischen Universität München, 2004.
- [69] H. Liu und J. Hsu, *Proteomics* **5** (2005), 2056.
- [70] W. Liu, V. Montana, J. Bai, E. Chapman, U. Mohideen und V. Parapura, *Biophysical Journal* **91** (2006), 744.
- [71] A. Lupas und M. Gruber, *Advances in Protein Chemistry* **70** (2005), 37.

- [72] J. Marko und E. Siggia, *Macromolecules* **28** (1995), 209.
- [73] P. Marszalek, A. Oberhauser, H. Li und J. Fernandez, *Biophysical Journal* **85** (2003), 2696.
- [74] M. Mickler: *Kontrolle und Analyse des mechanischen Entfaltungspfades des Grün Fluoreszierenden Proteins*. Diplomarbeit, Physik Department der Technischen Universität München, 2005.
- [75] M. Mickler, *in preparation* (2007).
- [76] K. Misura, D. Chivian, C. Rohl, D. Kim und D. Baker, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* **103** (2006), 5361.
- [77] W. Moerner, *Journal of Chemical Physics* **117** (2002), 10925.
- [78] F. Oesterhelt, D. Oesterhelt, M. Pfeiffer, A. Engel, H. Gaub und D. Müller, *Science* **288** (2000), 143.
- [79] M. Ormö, A. Cubitt, K. Kallio, L. Gross, R. Tsien und S. Remington, *Science* **273** (1996), 1392.
- [80] E. Oroudjev, J. Soares, S. Arcidiacono, J. Thompson, S. Fossey und H. Hansma, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* **99** (2002), 6460.
- [81] E. Paci und M. Karplus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **97** (2000), 6521.
- [82] R. Perez-Jimenez, S. Garcia-Manyes, R. Ainavarapu und J. Fernandez, *Journal of Biological Chemistry* (2006).
- [83] E. Peterman, S. Brasselet und W. Moerner, *Journal of Physical Chemistry A* **103** (1999), 10553.
- [84] D. Pierce, N. Hom-Booher und R. Vale, *Nature* **388** (1997), 338.
- [85] G. Popowicz, R. Muller, A. Noegel, M. Schleicher, R. Huber und T. Holak, *Journal of Molecular Biology* **5** (2004), 1637.
- [86] F. Qian, F. Wei, G. Germino und A. Oberhauser, *Journal of Biological Chemistry* **49** (2005), 40723.
- [87] M. Rief: *Kräfte in der molekularen Erkennung*. Diplomarbeit, Physik Department der Technischen Universität München, 1995.
- [88] M. Rief, J. Fernandez und H. Gaub, *Physical Review Letters* **81** (1998), 4764.
- [89] M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J. Fernandez und H. Gaub, *Science* **276** (1997), 1109.

- [90] M. Rief, M. Gautel, A. Schemmel und H. Gaub, *Biophysical Journal* **75** (1998), 3008.
- [91] M. Rief, J. Pascual, M. Saraste und H. Gaub, *Journal of Molecular Biology* **286** (1999), 553.
- [92] R. Rounsevell, A. Steward und J. Clarke, *Biophysical Journal* **88** (2005), 2022.
- [93] M. Schlierf, H. Li und J. Fernandez, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* **101** (2004), 7299.
- [94] O. Schueler-Furman, C. Wang, P. Bradley, K. Misura und D. Baker, *Science* **310** (2005), 638.
- [95] K. Schulten: *Molecular mechanisms of cellular mechanics*. Vortrag im Soft-Matter Seminar, Physik Department der Technischen Universität München, 2006.
- [96] I. Schwaiger: *Kraftspektroskopische Untersuchung einzelner Zytoskelett-Proteine*. Dissertation an der Fakultät für Physik, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2006.
- [97] I. Schwaiger, A. Kardinal, M. Schleicher, A. Noegel und M. Rief, *Nature Structural and Molecular Biology* **11** (2004), 81.
- [98] I. Schwaiger, C. Sattler, D. Hostetter und M. Rief, *Nature Materials* **1** (2002), 232.
- [99] N. Seeman, *Quarterly Reviews of Biophysics* **38** (2006), 363.
- [100] U. Seifert, *Physical Review Letters* **84** (2000), 2750.
- [101] W. Shih, J. Quispe und G. Joyce, *Nature* **427** (2004), 618.
- [102] O. Shimomura, F. Johnson und Y. Saiga, *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **59** (1962), 223.
- [103] E. Tajkhorshid, A. Aksimentiev, I. Balabin, M. Gao, B. Isralewitz, J. Phillipps, F. Zhu und K. Schulten, *Advances in Protein Chemistry* **66** (2003), 195.
- [104] J. Thijssen: *Computational Physics*. Cambridge University Press, 1999.
- [105] M. Tirion, *Physical Review Letters* **77** (1996), 1905.
- [106] R. Tsien, *Annual Review of Biochemistry* **67** (1998), 509.
- [107] L. Verlet, *Physical Review* **159** (1967), 98.
- [108] W. Ward, C. Cody, R. Hart und J. Cormer, *Photochemistry and Photobiology* **31** (1980), 611.

- [109] W. Ward, H. Prentice, A. Roth, C. Cody und S. Reeves, *Photochemistry and Photobiology* **35** (1982), 803.
- [110] D. West, D. Brockwell, P. Olmsted, S. Radford und E. Paci, *Biophysical Journal* **90** (2006), 287.
- [111] G. Wider und K. Wuthrich, *Current Opinion in Structural Biology* **9** (1999), 594.
- [112] G. Winter, A. Fersht, A. Wilkinson, M. Zoller und M. Smith, *Nature* **299** (1982), 756.
- [113] D. Woolfson, *Advances in Protein Chemistry* **70** (2005), 79.
- [114] F. Yang, L. Moss und G. Phillips, *Nature Biotechnology* **14** (1996), 1246.
- [115] G. Yang, C. Cecconi, W. Baase, I. Vetter, W. Breyer, J. Haack, B. Matthews, F. Dahlquist und C. Bustamante, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* **97** (2000), 139.
- [116] W. Yang und M. Gruebele, *Nature* **423** (2003), 193.
- [117] I. Yeh und G. Hummer, *Journal of the American Chemical Society* **124** (2002), 6563.
- [118] Y. Yu, *Advanced Drug Delivery Reviews* **54** (2002), 1113.
- [119] J. Zhao, H. Lee, R. Nome, S. Majid, N. Scherer und W. Hoff, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* **103** (2006), 11561.
- [120] M. Zimmer, *Chemical Reviews* **102** (2002), 759.

Danke!

Viele Menschen haben wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Ihnen soll an dieser Stelle herzlich gedankt werden. Zu allererst sei allen Mitgliedern des E22 am Physik Department der TU München für ihre Unterstützung und die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre gedankt.

Größter Dank gebührt Matthias Rief, unter dessen Leitung diese Arbeit entstand. Er stand mir jederzeit mit Engagement zur Seite. Die Diskussionen mit ihm, seine Impulse und das kritische Hinterfragen meiner Ergebnisse waren stets produktiv und motivierend. Der große Freiraum im Denken und Handeln zusammen mit den vielen technischen Möglichkeiten am E22 hat die vorliegende Arbeit wesentlich geprägt.

Ebenfalls danken möchte ich Moritz Mickler, Angeliki Tsokou, Roland Heym und Frauke König, die mich tatkräftig und motiviert während ihrer Diplomarbeiten bzw. ihrer Praktikumsaufenthalte am E22 unterstützten. Danken möchte ich auch Thomas Bornschlögl, der nicht nur wesentlich zu einer ausgezeichneten Arbeitsatmosphäre beigetragen hat, sondern auch immer für eine gute Diskussion zu haben war. Morten Bertz sei besonders für Hilfe mit der verflixten Chromatographie-Anlage gedankt. Diskussionen mit Emanuel Schneck und Thomas Schubert haben mir besonders in der Phase der Entwicklung des Minimalmodells weitergeholfen. Rainer Tharmann, Johann Jaud und Michael Schlierf sei nicht nur für die Unterstützung bei Computerproblemen gedankt. Rudolf Lehrhuber möchte ich für die immer ausgezeichnete Anfertigung vieler Bauteile für das in dieser Arbeit konstruierte Fluoreszenzmikroskop danken. Ebenfalls von existenzieller Bedeutung war Jochen *Mr. Coffee* Oehlke.

Dank gebührt auch Claudia Antrecht, Andreas Bausch, Felix Berkemeier, CeNS, Gabi Chmel, Hermann Gaub, Elke Fehsenfeld, Kevin Hermanson, Thorsten Hugel, Daniel König, Tim Liedl, Felix Linke, Emanuele Paci, Monika Rusp, Friedrich Simmel, Martin Stumpe und Claudine Voelcker.

Zu guter Letzt möchte ich Karen Wieland für die schönen Dinge und Zeiten des Lebens danken, die ursächliche Zweifel am nüchternen Zusammenwirken der Moleküle wecken.

Lebenslauf

Hendrik Dietz

- | | |
|----------------|---|
| 18. Dez. 1977 | Geburt in Dresden |
| Nationalität | Deutsch |
| 1988 - 1994 | Besuch des Alexander-von-Humboldt-Gymnasiums
Eichwalde bei Berlin |
| 1994-1997 | Besuch des Reismann-Gymnasiums
Paderborn |
| Juli 1997 | Abitur |
| 1997-1998 | Wehrdienst |
| 1998-2000 | Grundstudium der Physik
Fakultät für Physik, Universität Paderborn |
| 2000-2001 | Auslandsstudium (ERASMUS-Programm)
Facultad de Ciencias, Universität Zaragoza, Spanien |
| 2001-2004 | Hauptstudium der Physik
Fakultät für Physik, Ludwig-Maximilians-Universität München |
| 20. März 2004 | Abschluss des Studiums als Diplom-Physiker (univ.) |
| Seit Juli 2004 | Promotion
Leitung: Prof. Dr. Matthias Rief
Lehrstuhl für Biophysik E22
Physik Department, Technische Universität München |