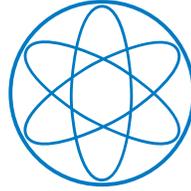


Physik-Department



**Energielandschaften einzelner
Proteine gemessen mit der
optischen Pinzette**

Dissertation

von

Christof Gebhardt



Technische Universität München

Technische Universität München
Lehrstuhl für Biophysik E22, Physik-Department

Energielandschaften einzelner Proteine gemessen mit der optischen Pinzette

Johann Christof Manuel Gebhardt

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. Martin Zacharias

Prüfer der Dissertation : 1. Univ.-Prof. Dr. Matthias Rief
2. Univ.-Prof. Dr. Friedrich Simmel

Die Dissertation wurde am 12.11.2009 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 08.12.2009 angenommen.

Energielandschaften einzelner Proteine gemessen mit der optischen Pinzette

Dissertation am Physik-Department
der Technischen Universität München

vorgelegt von
Johann Christof Manuel Gebhardt
aus Tübingen

München, den 12.11.2009

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	xiii
1 Einleitung	1
2 Kraftspektroskopie mit der optischen Pinzette	3
2.1 Die Physik der optischen Pinzette	4
2.1.1 Das Prinzip der Falle	4
2.1.2 Kugeldynamik in der Falle und Kalibration der Federhärte	5
2.2 Das Design der optischen Pinzette	7
2.2.1 Experimenteller Aufbau	7
2.2.2 Eigenschaften des Instruments	12
2.3 Kraftspektroskopie an einzelnen Proteinen	13
2.3.1 Kugel-DNA-Protein-Hanteln	14
2.3.2 Ablauf eines Experiments	16
2.3.3 Auswertung der Daten	18
3 Biomoleküle unter Kraft	21
3.1 Polymerelastizität	21
3.2 Energetik der Proteinfaltung in der optischen Pinzette	23
3.2.1 Kraftabhängige Aufenthaltswahrscheinlichkeiten	24
3.2.2 Das Fluktuationstheorem von Crooks	24
3.3 Kinetik von Konformationsübergängen	25
3.3.1 Ratenkonstanten unter Kraft	25
3.3.2 Die Rekonfigurationszeit von Proteinen	27
3.4 Direkte Messung von Energielandschaften	28
3.4.1 Dekonvolution von System- und Proteinfluktuationen	29
4 Die vollständige orts aufgelöste Faltungslandschaft eines Proteins	33
4.1 Der Transkriptionsfaktor GCN4	33
4.2 Kraftspektroskopie an der GCN4 Leucin Zipper Domäne	35
4.2.1 Die Energielandschaft aus kinetischen Parametern	39
4.2.2 Die vollständige orts aufgelöste Energielandschaft	44
4.2.3 Diskussion der orts aufgelösten Energielandschaft	45
4.3 Zusammenfassung	49

5	Experimente zur Faltung von Calmodulin	51
5.1	Das Signalprotein Calmodulin	51
5.2	Calmodulin ist ein weiches und flexibles Protein	52
5.2.1	Faltungsmuster von Calmodulin	53
5.2.2	Kinetische und energetische Eigenschaften von Calmodulin	57
5.3	Zusammenfassung und Ausblick	61
6	Die Asymmetrie des molekularen Motors Myosin-V	65
6.1	Der native, doppelköpfige Motor	65
6.1.1	Der chemo-mechanische Zyklus bei niedrigen Kräften	66
6.1.2	Das Ratschen-Verhalten unter hohen Kräften	68
6.2	Experimente an einzelköpfigem Myosin-V	70
6.2.1	Design der Experimente	70
6.2.2	Asymmetrie der Abrießereignisse zwischen Myosinkopf und Aktin	72
6.2.3	Ein Modell zur Erklärung der Asymmetrie	76
6.3	Zusammenfassung und Ausblick	79
7	Ausblick	81
A	Details zum Aufbau der optischen Pinzette	83
A.1	Komponenten der optischen Pinzette	83
B	Abschätzungen und Protokolle zu den Proteinfaltungsexperimenten	85
B.1	Herstellung der Kugel-DNA-Protein-Hanteln	85
B.2	Limitierungen der Faltungsexperimente mit der optischen Pinzette	89
B.3	Langevin-Dynamik-Simulation der Kugel-DNA-Protein-Hanteln	91
B.4	Der Einfluss der Kugeldynamik auf Energielandschaften	92
B.5	Minimierung thermischer Fluktuationen des Kugel-DNA-Systems	93
C	Protokolle zu den Experimenten mit Myosin-V	99
C.1	Einzelköpfige Konstrukte von Myosin-V	99
C.2	Doppelt markiertes Aktin	100
C.3	Der Fallen-Assay	101
C.4	Eine globale Fit-Funktion für Abrisskraftverteilungen	102
	Danksagung	115

Abbildungsverzeichnis

2.1	Prinzip der optischen Pinzette	4
2.2	Kalibration der optischen Pinzette	6
2.3	Skizze der optischen Pinzette	8
2.4	Skizze des xy-Verschiebetischs	11
2.5	Stabilität der optischen Pinzette	13
2.6	Auflösungsvermögen der optischen Pinzette	13
2.7	Zusammenbau der Kugel-DNA-Protein-Hanteln	14
2.8	Aufreinigung von funktionalisiertem Protein	16
2.9	Ablauf der Faltungsexperimente	17
2.10	Crosstalk-Effekte der optischen Pinzette	18
2.11	Bestimmung von Verweildauern in Kraft-Zeit-Aufnahmen	20
3.1	Kraft-Ausdehnungs-Kurve von DNA	22
3.2	Das Kugel-DNA-Protein-System	23
3.3	Skizze einer Energielandschaft	25
3.4	Energielandschaft eines Proteins unter Kraft	26
3.5	Die kontinuierliche Punktbildfunktion	30
3.6	Vergleich zwischen konstanter und kontinuierlicher PSF	30
4.1	Struktur des DNA-Bindungsmotivs des GCN4	34
4.2	Skizze der Kugel-DNA-Protein-Hanteln mit LZ26	35
4.3	Kraft-Abstands-Kurven des LZ26	36
4.4	Histogramm der Konturlängenzuwächse des LZ26	36
4.5	Kraft-Zeit-Aufnahme des LZ26	38
4.6	Kraft-Zeit Aufnahmen des LZ26 bei verschiedenen Vorspannungen	38
4.7	Energetische Charakterisierung des LZ26	39
4.8	Gesamtenergie des LZ26 mit Hilfe von Crooks	40
4.9	Int. Wahrscheinlichkeiten der Lebensdauern des LZ26	41
4.10	Ratenkonstanten des LZ26 als Funktion der Kraft	42
4.11	Wechsel der Rückfaltungsbarriere	43
4.12	Energielandschaft des LZ26 aus der Kinetik	43
4.13	Energielandschaft des LZ26 über Dekonvolution	45
4.14	Vollständige Energielandschaft des LZ26	46
4.15	Bestimmung des Reibungskoeffizienten der Faltung	47
5.1	Struktur des Ca ²⁺ -assoziierten Calmodulin	52
5.2	Kraft-Abstands-Kurven von Calmodulin	53

5.3	Konturlängenzuwächse von Calmodulin	54
5.4	Kraft-Zeit-Aufnahmen von Calmodulin	57
5.5	Ratenkonstanten von Calmodulin als Funktion der Kraft	58
5.6	Die freie Energie von Calmodulin nach Crooks	59
5.7	Die Energielandschaft von Calmodulin	60
5.8	Die Energielandschaft von Calmodulin 38/118	61
5.9	Bindung von Calmodulin an skMLCK	63
5.10	Bindung von Calmodulin an CKK	63
6.1	Die Struktur des molekularen Motors Myosin-V	65
6.2	Der chemomechanische Zyklus von Myosin-V	67
6.3	Das Ratschenverhalten von Myosin-V	68
6.4	Energielandschaft des nativen Myosin-V gebunden an Aktin	69
6.5	Modell der Rückwärtsschritte von Myosin-V	70
6.6	Skizze des Experiments an einzelköpfigem Myosin-V	71
6.7	Richtungsmarkiertes Aktin	72
6.8	Kraft-Zeit Graphen von MV-6IQ und MV-4IQ	73
6.9	Abrisskraftverteilungen von MV-6IQ und MV-4IQ	74
6.10	Bindungslängen und Abrisskräfte als Funktionen der Anzahl IQ-Motive	75
6.11	Energielandschaft der Abrissereignisse zwischen Myosin und Aktin	76
6.12	Modelle für die Asymmetrie des einköpfigen Myosin-V	77
B.1	Reaktion zwischen Oligo-Protein und DNA-Linkern	87
B.2	Faltung und Entfaltung serieller Calmoduline	88
B.3	Stabilität der Proteine in der optischen Pinzette	89
B.4	Reproduzierbarkeit der Raten als Funktion der Kraft	90
B.5	Einfluss der Kugeln auf die Barrierenhöhe	92
B.6	Effekt des Linkers auf die Kugelbewegung	94
B.7	Simulation des Rauschens der Kugel-Linker-Hanteln	94
B.8	Der DNA-Nanolinker	95
B.9	Kraft-Abstands-Kurve des DNA-Nanolinkers	96
C.1	Eine globale Fit-Funktion für Abrisskraftverteilungen	102

Tabellenverzeichnis

4.1	Energetische und kinetische Eigenschaften des LZ26	41
5.1	Konturlängenwüchse von Calmodulin	55
5.2	Kinetische und energetische Eigenschaften von Calmodulin	58
6.1	Die einköpfigen Myosin-V Mutanten	71
6.2	Charakteristische Parameter der Myosin-V - Aktin Bindung	74
A.1	Komponenten der optischen Pinzette	84

Zusammenfassung

Die Faltung eines Proteins von der ungeordneten Polypeptidkette zur dreidimensionalen Struktur ist ein komplexer Prozess, dessen Ablauf durch eine Energielandschaft eindeutig festgelegt ist. Ebenso können Übergänge zwischen verschiedenen nativen Konformationen eines Proteins und Bindungsvorgänge zwischen Proteinen durch Energielandschaften beschrieben werden. Experimentell kann diese Energielandschaft untersucht werden, indem die Reaktion des Systems auf gezielte Störungen, wie die Zugabe von Denaturanzien oder das Anlegen einer äußeren Kraft, beobachtet wird. In dieser Arbeit wurden die Faltung und Entfaltung des GCN4 Leucin Zippers und von Calmodulin, sowie die Bindung des molekularen Motors Myosin-V an Aktin kraftspektroskopisch mit einer optischen Pinzette untersucht.

Für die Faltungsexperimente wurde eine Methode entwickelt, mit der einzelne Proteine zwischen zwei in einer hochauflösenden optischen Pinzette gefangene Kugeln eingespannt und manipuliert werden können. Damit wurde die direkte Beobachtung von Faltungs- und Entfaltungsübergängen im Gleichgewicht zwischen verschiedenen Faltungszuständen des Proteins möglich. Über die Analyse der Wahrscheinlichkeitsverteilung dieser Zustände konnte erstmalig die vollständige, orts aufgelöste Energielandschaft eines Proteins gemessen werden. Die Experimente am GCN4 Leucin Zipper zeigten, dass dieser in zwei unterschiedlich stabile Bereiche geteilt ist. Die verwendete Technik erlaubt auch das präzise Ausmessen des Faltungsmusters sowie der kraftabhängigen Faltungskinetik mechanisch weniger stabiler Proteine wie Calmodulin. Aus den Messungen ergab sich, dass Calmodulin ein weiches und flexibles Protein ist, das unterschiedliche Entfaltungspfade einschlagen kann.

Bei den Experimenten mit Myosin-V wurden einzelne an Aktin gebundene Köpfe des molekularen Motors in unterschiedliche Richtungen belastet. Es zeigte sich, dass der Leverarm von Myosin-V eine mechanische Asymmetrie der Myosin-V/Aktin Bindung bewirkt. Die Energielandschaft einer Protein-Protein Bindung kann also in verschiedenen Richtungen eine unterschiedliche Form haben. Die asymmetrische Energielandschaft der einzelnen Myosin-Köpfe hilft, das Vorkommen von Schritten entgegen der natürlichen Laufrichtung des nativen doppelköpfigen Motors unter Kraft zu verstehen.

Die Experimente in dieser Arbeit zeigen, dass ein einzelnes Proteinmolekül ausreicht, um seine vollständige Energielandschaft zu messen. Diese Energielandschaft, die den genauen Verlauf der Landschaft zwischen Übergangsbarrieren und Minima wiedergibt, enthält wesentlich mehr Informationen als die mit herkömmlichen chemischen und mechanischen Methoden zugänglichen Stützpunkte. Die leicht auf eine Vielzahl an Proteinen übertragbare Methode legt somit die Grundlage zu einem neuen, detaillierteren Blick auf den Vorgang der Proteinfaltung.

Kapitel 1

Einleitung

Proteine gehören, neben den Trägern der Erbinformation, DNA und RNA, und den membranbildenden Lipiden, zu den wichtigsten Bausteinen in Zellen. Sie übernehmen die unterschiedlichsten Aufgaben. So setzen sie sich unter anderem zu langen, strukturbildenden Filamenten zusammen, bewirken als molekulare Motoren Bewegung und aktiven Transport, arbeiten als Signalüberträger und Sensoren und sind verantwortlich für den Stoffwechsel. Proteine lesen sogar die zu ihrer Herstellung nötige Information aus der DNA aus und helfen, diese in die spezifische, lineare Aminosäuresequenz umzusetzen, aus der ein Protein besteht. Eine wichtige Frage ist, wie sich die eindimensionale Aminosäuresequenz zu der eindeutigen, für jedes Protein spezifischen, dreidimensionalen Struktur faltet, die die funktionelle Form darstellt. Die Oberflächenbeschaffenheit eines Proteins bestimmt seine Wechselwirkungen mit anderen Proteinen und Zellbausteinen, aber auch zum Beispiel mit Medikamenten. Eine Kenntnis der Struktur ist daher nicht nur wichtig, um auf die Funktion eines Proteins schließen zu können, sondern auch um spezifische Wirkstoffe zu entwickeln. Zwar kann man die Struktur von Proteinen oft experimentell bestimmen, aber für eine große Anzahl, unter anderem die meisten membranassoziierten Proteine, ist dies nicht möglich. Die Faltung eines Proteins in seine dreidimensionale Struktur wird vollständig durch seine Energielandschaft bestimmt [1]. Prinzipiell kann man daher die Faltung eines Proteins und seine Struktur berechnen, wenn alle Wechselwirkungen, die in die Energielandschaft eingehen, bekannt sind. Aufgrund der großen Anzahl beteiligter Atome sind theoretische Beschreibungen des Faltungsvorgangs aber oft noch nicht ausreichend, und ein experimenteller Zugang zur Proteinfaltung ist notwendig.

Mit Hilfe herkömmlicher Ensemble-Messungen zur Proteinfaltung [2] lassen sich die Faltungsenergie und kinetische Ratenkonstanten messen. Durch Mutationsexperimente ist auch bedingt eine strukturelle Interpretation möglich. Es können jedoch nur mittlere Moleküleigenschaften gemessen werden, da die stochastische Natur des Faltungsvorgangs eine Synchronisation einzelner Moleküle verhindert. Die Ende der neun-

ziger Jahre entwickelte Einzelmolekül-Kraftspektroskopie zur Entfaltung von Proteinen [3] ermöglicht einen direkteren Zugang zum Faltungsproblem. Hier ist neben der direkten Messung der wirkenden Kräfte auch eine einfache Detektion von Faltungszwischenzuständen möglich. Insgesamt zeichnen bisherige Faltungsmessungen jedoch nur ein lückenhaftes Bild der Energielandschaft, da sie nur die dominanten ratenlimitierenden Energiebarrieren charakterisieren. Kürzlich konnte für DNA durch die Analyse von Gleichgewichtsfluktuationen bei Anlegen einer mechanischen Kraft die Energielandschaft mit sequenzabhängiger Auflösung gemessen werden [4]. Ist eine vergleichbar gute Auflösung mit Informationen zur Form der Energielandschaft zwischen den Maxima und dem nativen Zustand auch für Proteine realisierbar?

Neben der Faltung eines Proteins können auch Übergänge zwischen nativen Proteinkonformationen und Protein-Protein Bindungen durch Energielandschaften beschrieben werden. Diese bestimmen die Kinetik und den Arbeitsmechanismus eines Proteins. Bei dem molekularen Motor Myosin-V ist zum Beispiel das Wechselspiel zwischen der Bindungsstärke an das Aktinfilament, an dem der Motor entlangläuft, und dem kraftproduzierenden Konformationsübergang wichtig für den Schrittmechanismus. Kann man die durch die Umsetzung des Treibstoffmoleküls ATP hervorgerufene Konformationsänderung mechanisch beeinflussen? Inwieweit spielt hier die Energielandschaft der Anbindung an das Filament eine Rolle? Macht es einen Unterschied, ob man die Kraft mit oder entgegen der Bewegungsrichtung des Motors anlegt?

In dieser Arbeit werden kraftspektroskopische Experimente mit der optischen Pinzette vorgestellt, die über kraftabhängige Gleichgewichtsfluktuationen zwischen verschiedenen Proteinkonformationen einen direkten Zugang zur Faltungskinetik eines Proteins erlauben. Die Analyse der Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Proteinzustände ermöglicht die Charakterisierung der Energielandschaft eines Proteins weit über die bisherigen Grenzen hinaus. In weiteren Experimenten wird der richtungsspezifische Einfluss von Kraft auf die Energielandschaft der Bindung zwischen Myosin-V und Aktin untersucht.

Kapitel 2

Kraftspektroskopie mit der optischen Pinzette

In einer optischen Pinzette wird der Impulsübertrag eines sich brechenden Laserstrahls auf das brechende Medium verwendet, um kleine dielektrische Proben im Fokus des Strahls einzufangen. Der manipulative Charakter des Strahlungsdrucks wurde in den 1970er Jahren von A. Ashkin untersucht [5] und führte zur Entwicklung einer der ersten optischen Pinzetten [6]. Eine lineare Kraft-Auslenkungs-Beziehung bei kleinen Auslenkungen und Federkonstanten zwischen 10 und 1000 fN/nm ermöglichen bei subnanometergenauer Positionsauflösung das Messen von Kräften im Femto- und Pikonewton-Bereich. Dieser Kraftbereich und die Möglichkeit in physiologischer Umgebung arbeiten zu können, machen die optische Pinzette zu einem geeigneten Instrument für die Kraftspektroskopie an biologischen Proben.

Über gefangene Polystyrolkugeln kann eine Kraft direkt an daran befestigte einzelne Biomoleküle angelegt werden. Auf diese Weise wurden erste Experimente zur aktiven Bewegung einzelner molekularer Motoren wie Kinesin, Myosin-II oder der RNA-Polymerase [7, 8, 9], sowie zur mechanischen Charakterisierung und Entfaltung von Biopolymeren durchgeführt [10, 11, 12].

In diesem Kapitel wird eine Methode vorgestellt, bei der einzelne Proteine für Kraftspektroskopie-Experimente mit der optischen Pinzette zwischen zwei Polystyrolkugeln eingespannt werden. Zu Beginn werden die physikalischen Grundlagen und der Aufbau einer optischen Pinzette beschrieben, die aufgrund ihrer mechanischen Stabilität und der Aufspaltung des Fallenlasers in zwei getrennte Strahlen für Hochpräzisionsmessungen zur Faltung einzelner Proteine und der Untersuchung einzelner molekularer Motoren geeignet ist. Anschließend wird das Verfahren vorgestellt, mit dem einzelne Proteine kraftspektroskopisch mit der optischen Pinzette untersucht werden können.

2.1 Die Physik der optischen Pinzette

2.1.1 Das Prinzip der Falle

In einem einfachen Bild läßt sich die Wechselwirkung von Photonen mit dem zu fangenden Teilchen durch Strahlenoptik veranschaulichen (siehe Abbildung 2.1A)[13]. Nach dem Impulserhaltungssatz bewirkt die Impulsänderung gebrochener und reflektierter Strahlen eine entgegengesetzte Änderung des Kugelimpulses. Eine stabile Falle wird möglich, wenn sich Impulsanteile in Richtung des Laserstrahls und Anteile in entgegengesetzter Richtung ausgleichen. Dies ist bei einem stark fokussierten Laserstrahl mit gaussförmigem Strahlprofil kurz hinter dem Laserfokus der Fall.

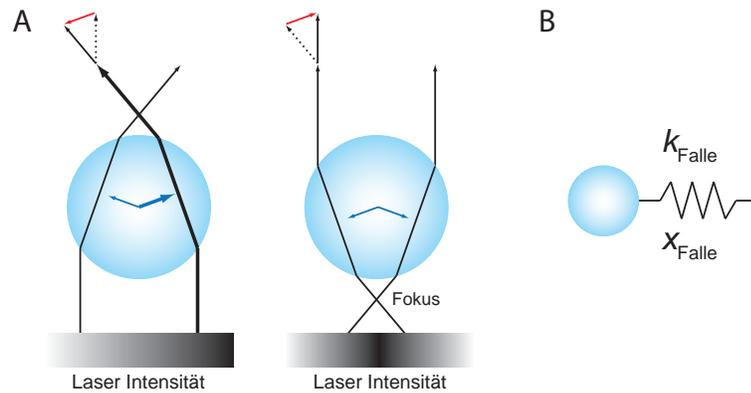


Abbildung 2.1: *Prinzip der optischen Pinzette. (A) Veranschaulichung des Fallenprinzips durch geometrische Optik. Die Impulsänderungen der Photonen (rote Pfeile) bewirken eine entgegengesetzte Änderung des Kugelimpulses (blaue Pfeile). Der Gesamtimpuls der Kugel zeigt in Richtung der größeren Laserintensität (rechter Graph) bzw. in Richtung des Fokus (linker Graph). (B) Für kleine Auslenkungen der Kugel ist die Kraft proportional zur Auslenkung und kann durch eine Federkonstante charakterisiert werden.*

Bei Berechnung der Fallenkraft auf das Teilchen in der Dipolnäherung findet man eine Streu-Komponente \vec{F}_s in Richtung der einfallenden Laserwelle, die abhängig vom Streuquerschnitt des Teilchens und proportional zur Laserintensität ist, also zum Quadrat des elektrischen Feldes \vec{E} [6]. Eine weitere Kraftkomponente, die Gradientenkraft \vec{F}_g , zeigt in Richtung des Intensitätsgradienten und ist proportional zum Gradienten des Quadrats von \vec{E} :

$$\vec{F}_g = -\frac{\alpha}{2} \vec{\nabla} E^2. \quad (2.1)$$

Die Gradientenkraft ist proportional zur Polarisierbarkeit α des Teilchens. Für eine stabile Falle müssen sich Streukraft \vec{F}_s und Gradientenkraft \vec{F}_g kompensieren [14]. Für eine genauere theoretische Beschreibung, insbesondere wenn der Radius der Kugeln im

Wellenlängenbereich des Fallenlasers ist, müssen u.a. auch Beugungseffekte berücksichtigt werden [15].

Für kleine Auslenkungen des Teilchens aus dem Fallenzentrum ist die rücktreibende Kraft proportional zur Auslenkung und die Falle kann durch eine Feder mit konstanter Federhärte angenähert werden (siehe Abbildung 2.1B)[6].

2.1.2 Kugeldynamik in der Falle und Kalibration der Federhärte

Die Brown'sche Bewegung einer Kugel in einem harmonischen Fallenpotential wird durch die Langevin-Gleichung

$$m\ddot{x}(t) + \gamma_0\dot{x}(t) + kx(t) = \sqrt{2k_B T \gamma_0} \xi(t) \quad (2.2)$$

beschrieben [16]. Hier ist $x(t)$ die Position des Brown'schen Teilchens, m die Masse, $\gamma_0 = 6\pi\eta R$ der Reibungskoeffizient nach Stokes (η : Viskosität des Mediums, R : Kugelradius), k die Federhärte und $\sqrt{2k_B T \gamma_0} \xi(t)$ eine zufällige thermische Kraft mit den Eigenschaften $\langle \xi(t) \rangle = 0$ und $\langle \xi(t)\xi(t') \rangle = \delta(t - t')$. In Wasser sind die verwendeten Kugeln überdämpft, und der Masse-Term kann vernachlässigt werden [16]. Man erhält:

$$\dot{x}(t) + 2\pi f_c x(t) = \sqrt{2D} \xi(t), \quad (2.3)$$

mit der Abfallfrequenz

$$f_c \equiv \frac{k}{2\pi\gamma_0} \quad (2.4)$$

und der Einstein-Relation zwischen Diffusionskonstante, Boltzmann-Energie und Reibungskoeffizient

$$D = \frac{k_B T}{\gamma_0}. \quad (2.5)$$

Diese Gleichung berücksichtigt nicht die Inkompressibilität von Wasser sowie den endlichen Abstand zur Oberfläche. Beide Effekte führen zu Korrekturtermen der Stokes'schen Reibung [16, 13]. Fouriertransformation von $x(t)$ führt auf das Leistungsspektrum $P(f)$:

$$P(f) = \frac{D}{2\pi(f_c^2 + f^2)}. \quad (2.6)$$

Gleichung 2.6 ist eine Lorentz-Kurve. Abbildung 2.2A zeigt ein typisches Leistungsspektrum einer optischen Pinzette.

Kalibration der Federhärte

Prinzipiell kann über einen Fit der Gleichung 2.6 an das gemessene Leistungsspektrum der Kugel aus Abbildung 2.2A und die Definition der Abfallfrequenz aus Gleichung 2.4

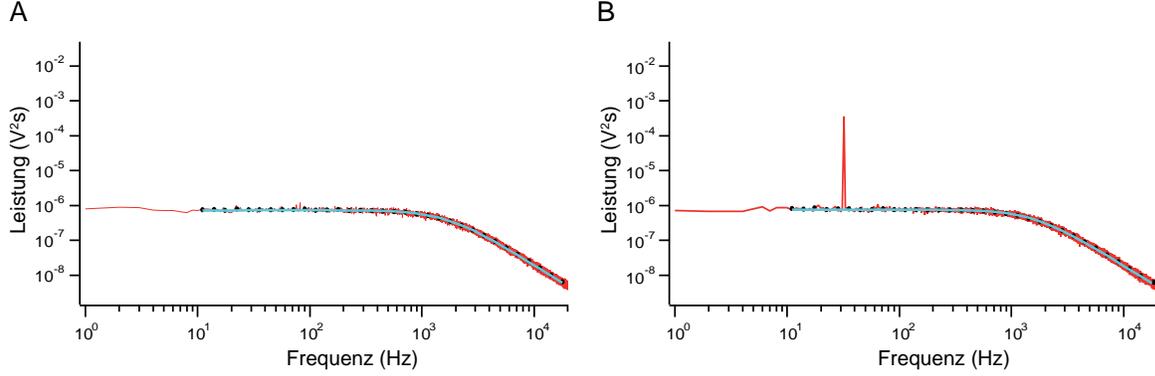


Abbildung 2.2: *Kalibration der optischen Pinzette. (A) Typisches Leistungsspektrum einer Kugel in der optischen Pinzette mit einer Frequenzauflösung von 1 Hz. (B) Zur gleichzeitigen Kalibration des Detektors und der Federkonstante der optischen Pinzette wurde an den Piezo-Tisch eine 32 Hz-Schwingung angelegt [17]. Das an das Leistungsspektrum angepasste Modell (blaue Linie) berücksichtigt alle relevanten physikalischen Korrekturterme [16].*

die Federhärte k der Falle ermittelt werden. Dazu muss der Reibungskoeffizient γ_0 bekannt sein. Dies ist aufgrund des unbekanntes Abstands der Kugel von der Oberfläche oft nicht der Fall.

Von Tolić-Nørrelykke et al. wurde ein Kalibrationsprotokoll für optische Pinzetten vorgeschlagen, das ohne die Kenntnis des genauen Reibungskoeffizienten auskommt [17]. Wird die Flüssigkeit mit einer definierten Amplitude A und Frequenz f_{drive} bewegt, ändert sich Gleichung 2.6 für das Leistungsspektrum der Kugel zu

$$P(f) = \frac{D}{2\pi(f_c^2 + f^2)} + \frac{\frac{1}{4}A^2}{1 + f_c^2/f_{\text{drive}}^2} \delta(f - f_{\text{drive}}). \quad (2.7)$$

Im Leistungsspektrum erscheint bei f_{drive} eine Spitze (siehe Abbildung 2.2B).

Ein Vergleich der gemessenen Leistung W_{ex} unter der Spitze mit dem theoretischen Wert W_{th} (linker Term in Gleichung 2.7) ergibt den Kalibrationsfaktor β

$$\beta = \sqrt{W_{\text{th}}/W_{\text{ex}}}, \quad [\beta] = \text{m/V}. \quad (2.8)$$

Die Federkonstante k kann damit über

$$k = 2\pi f_c \frac{k_B T}{\beta^2 D^{\text{Volt}}} \quad (2.9)$$

bestimmt werden. f_c und $D^{\text{Volt}} = D/\beta^2$ werden über einen Fit des Lorentz-Terms aus Gleichung 2.7 an das Leistungsspektrum ermittelt.

In dieser Arbeit wurde an die experimentell gemessenen Leistungsspektren eine modifizierte Lorentzkurve angepasst, die neben der Inkompressibilität von Wasser auch Filtereffekte des Detektors und Aliasingeffekte der Datenerfassungskarte berücksichtigt [16].

2.2 Das Design der optischen Pinzette

Die im Rahmen dieser Arbeit aufgebaute optische Pinzette mit zwei Fallen besteht aus einem Laser, dessen Strahl in zwei Pfade mit zueinander senkrechter Polarisation aufgeteilt ist. Abbildung 2.3 gibt eine Übersicht über den Aufbau. Ein Strahl kann über einen akusto-optischen Deflektor (AOD) kontrolliert bewegt werden. Beide Strahlen werden mit Hilfe eines Objektivs fokussiert, um die Fallenpotentiale zu erhalten. Nach einem kollimierenden Kondensator werden beide Strahlen wieder über ihre Polarisation getrennt. Die Detektion der in den Fallen gefangenen Kugeln erfolgt in der hinteren Fokalebene des Kondensators mit Hilfe zweier positionssensitiver Dioden.

Im Aufbau ist ein Fluoreszenzmikroskop integriert, mit dem Proben sowohl in Epi-Fluoreszenz als auch mit Totalreflektions-Fluoreszenz-Mikroskopie (TIRF) beobachtet werden können. Dazu stehen drei Anregungslaser zur Verfügung. Detektiert wird das Fluoreszenzlicht mit einer EMCCD-Kamera, die sensitiv auf einzelne Fluorophore ist.

In diesem Abschnitt wird der Aufbau der optischen Pinzette beschrieben. Zunächst werden die einzelnen optischen Komponenten und ihre Funktion vorgestellt. Anschließend wird auf einige Besonderheiten im optischen Pfad sowie der mechanischen Stabilität eingegangen. Eine detaillierte Auflistung aller verwendeten Komponenten ist in Anhang A in Tabelle A.1 aufgeführt.

2.2.1 Experimenteller Aufbau

Der Strahlengang des Fallenlasers

Abbildung 2.3 zeigt eine Skizze der optischen Pinzette. Der Strahlengang des Fallenlasers ist grün unterlegt. Als Fallenlaser wird ein diodengepumpter Nd:YVO₄ Festkörperlaser mit 1064 nm Wellenlänge und 5W maximaler Ausgangsleistung in der TEM₀₀ Mode mit vertikaler Polarisation verwendet. Dieser Laser zeichnet sich durch sehr gute Strahlqualität, Stabilität des Strahlaustrittswinkels und Leistungsstabilität aus. Der Laser wird mit 4W Ausgangsleistung betrieben, da er bei dieser Leistung besonders stabil läuft.

Die erste optische Komponente ist ein Faraday-Isolator, der verhindert, dass Rückreflexionen an optischen Elementen den Laser stören. Der Laserstrahl wird anschließend über ein 5×-Teleskop aufgeweitet. Der resultierende Strahldurchmesser von ca. 2 mm ist so gewählt, dass der AOD (s.u.) optimal arbeiten kann.

Die Gesamtleistung des Fallenlasers kann über eine Kombination aus $\lambda/2$ -Plättchen und Polarisationstrahlteilerwürfel eingestellt werden. Ein zweiter Polarisationstrahlteilerwürfel teilt den Strahl in zwei Pfade mit zueinander senkrechter Polarisation. Ein weiteres $\lambda/2$ -Plättchen steuert die relative Intensität der beiden Strahlpfade. Beide $\lambda/2$ -Plättchen sind computergesteuert.

Ein Strahl kann mit Hilfe eines akusto-optischen Deflektors (AOD) in einem Winkelbereich von $49 \times 49 \text{ mrad}^2$ in zwei Richtungen ausgelenkt werden. Das entspricht in

diesem Aufbau einer Fläche von $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ in der Probenebene (vgl. Gleichung 2.10). Aufgrund von Wechselwirkungen zwischen Photonen des Laserstrahls und Phononen im AOD-Kristall wird die Frequenz des Lasers verschoben. Dies verhindert eine Interferenz zwischen den Laserstrahlen der optischen Pinzette [18]. Die Ansteuerung des AOD erfolgt über eine DSP-Karte (*digital signal processor*-Karte) mit dem Computer. Der Kalibrationsfaktor ‘nm/steps’ des AOD wurde über den Piezotisch wie in [19] besprochen bestimmt. Der andere Strahl kann manuell mit einem Gimbal-Mount-Spiegel positioniert werden. Um Einflüsse von Drift und Schwankungen im Brechungsindex der Luft gering zu halten, ist die Länge der getrennten Strahlführung so klein wie möglich gewählt. Beide Strahlengänge werden über einen Polarisationsstrahlteilerwürfel wieder vereint.

Ein $5\times$ -Teleskop aus zwei Linsen (T_1 in Abbildung 2.3) weiten die beiden Strahlen soweit auf, dass sie die hintere Apertur des Objektivs um ca. 10% überfüllen. Direkt im Anschluß ermöglicht ein zweites Teleskop (1:1, T_2 in Abbildung 2.3) die gleichzeitige manuelle Bewegung beider Strahlen. Über T_1 und T_2 wird die Drehebene des AOD auf die hintere Fokalebene des Objektivs abgebildet¹[20]. Die Teleskope sind darüber hinaus so positioniert, dass eine erhebliche Verkürzung des Strahlengangs erreicht wurde.

Beide Strahlpfade werden über einen dichroitischen Spiegel (D_1), der Wellenlängen $> 800 \text{ nm}$ reflektiert, in den Mikroskop-Strahlengang eingekoppelt. Ein weiterer Spiegel lenkt die Strahlen in das Objektiv. Dieses hat eine numerische Apertur $NA = 1.45$ um die Strahlen sehr stark fokussieren zu können. Zudem ermöglicht dieses Objektiv eine Fluoreszenzanregung in Totalreflektion (TIRF).

Die Probenkammer wird auf einem computergesteuerten Piezotisch montiert. Dieser ist in vertikaler Richtung beweglich aufgehängt. Eine manuelle Bewegung der Probenkammer wird durch einen speziell konstruierten xy-Verschiebetisch (siehe Abbildung 2.4) ermöglicht. Die Aufhängung des Piezotischs und das Design des Verschiebetischs sind auf mechanische Stabilität optimiert (siehe Abschnitt 2.2.2).

Ein Kondensor kollimiert die Fallenlaserstrahlen nach der Probenkammer. Sie werden über einen dichroitischen Spiegel (D_2), der das Licht der Hellfeldbeleuchtung transmittiert, in die Detektionsebene gelenkt. Dort werden die beiden Strahlpfade wieder über ihre Polarisation getrennt und mit einem System konkaver und konvexer Linsen auf zwei positionssensitive Detektoren fokussiert. Die Detektoren wurden aufgrund ihrer hohen Bandbreite von ca. 100 kHz bei 1064 nm Laserlicht ausgewählt [21, 22, 23]. Sie stehen in der hinteren Fokalebene des Detektors (konjugiert zur Drehebene des AOD) und ermöglichen die Positionsbestimmung von in den Fallen gefangenen Kugeln [24, 17]. Die Kalibration der Kugeln wurde in Abschnitt 2.1.2 besprochen.

Als Hellfeldbeleuchtung wurde eine LED mit 780 nm Wellenlänge gewählt, um Fluoreszenz im gesamten sichtbaren Wellenlängenbereich zu ermöglichen. Das Licht der LED wird auf die hintere Fokalebene des Kondensors fokussiert. Nach dem Objektiv

¹Im AOD sind die beiden Drehebene nicht konjugiert. Daher wurde eine mittlere Ebene für die Abbildung verwendet.

wird das Hellfeldbild über zwei Linsen auf eine CCD-Kamera abgebildet.

Bedingungen an den Strahlengang

Beim Design des Strahlengangs für den Fallenlaser ist zu beachten, dass die Drehebene des AOD, die hintere Fokalebene des Objektivs, die hintere Fokalebene des Kondensors und die Ebene der Detektion miteinander konjugiert sein müssen (vgl. gestrichelte Linien in Abbildung 2.3) [20]. Dies stellt sicher, dass der Laserstrahl bei einer Auslenkung durch den AOD nicht am Objektivrand abgeschnitten oder bei der Detektion seitlich bewegt wird. Um die Ebenen konjugiert aufeinander abzubilden, kommt den Teleskopen T_1 und T_2 eine zentrale Bedeutung zu. Das Verhältnis der Brennweiten f_2/f_1 , das die Vergrößerung von T_1 angibt, geht in mehrere wichtige Gleichungen ein (vgl. [25]).

Zwischen Ablenkwinkel α des AOD, der entsprechenden Strecke d in der Proben-ebene und Brennweite des Objektivs² f_{Obj} gilt der Zusammenhang

$$d = f_{\text{Obj}} \frac{f_1}{f_2} \tan \alpha. \quad (2.10)$$

Eine Abweichung x_1 zwischen vorderer Brennebene von T_1 und der Drehebene des AOD führt zu einer Verschiebung x_2 zwischen hinterer Brennebene von T_1 und dem Abbild der Drehebene:

$$x_2 = x_1 \left(\frac{f_2}{f_1} \right)^2. \quad (2.11)$$

Außerdem wird f_2/f_1 durch die Bedingung eingeschränkt, dass die hintere Apertur des Objektivs ca. 10% überfüllt werden soll, um eine stabile Falle zu erhalten. Gleichzeitig darf der Strahldurchmesser vor dem AOD nicht zu groß sein (≤ 2 mm), damit die Reaktionszeit des AOD klein bleibt.

In diesem Aufbau wurden T_1 und T_2 so gewählt, dass nicht nur die richtigen Abbildungseigenschaften erfüllt, sondern auch der Strahlweg möglichst kurz wurde.

Mechanische Stabilität

Für die mechanische Stabilität des Aufbaus sind neben der kurzen Strahlwege u.a. die Aufhängung des Piezotischs und das Design des manuellen Verschiebetischs von Bedeutung.

Der in vertikaler Richtung manuell verfahrbare Piezotisch wurde an drei Punkten mit stabilen Führungen versehen. Die Verankerung erfolgte über Federn unterschiedlicher Steifigkeit, um keine Schwingungsfrequenz zu bevorzugen.

Für die manuelle Positionierung der Probenkammer wurde ein leichter und stabiler xy-Verschiebetisch entworfen, der wesentlich zur Verbesserung der mechanischen Stabilität beitrug (siehe Abschnitt 2.2.2). Er ist in Abbildung 2.4 skizziert. Pro Richtung

²Für die Brennweite des Objektivs gilt: $f_{\text{Obj}} = t_0/V$ (V : Vergrößerung ($63\times$) und t_0 : Tubuslänge (160 mm)).

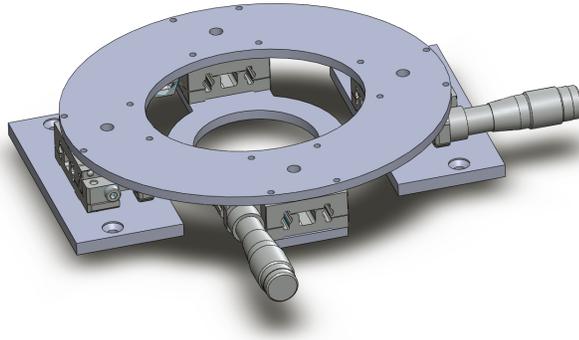


Abbildung 2.4: *Skizze des manuellen xy-Verschiebetischs.*

wurden je zwei Führungen verwendet um ein Schwingen der Probe zu verhindern. Die Führungen wurden parallel zur Verschieberichtung angeordnet. Dies verhinderte gegenüber einer senkrechten Anordnung ein seitliches Verdrehen der Probe.

Das Fluoreszenzmikroskop

In den Aufbau der optischen Pinzette ist ein Fluoreszenzmikroskop integriert (in Abbildung 2.3 rot unterlegt). Drei Anregungslaser, 405 nm, 473 nm und 532 nm Festkörperlaser³, werden zunächst über Teleskope (T_3 bis T_5) stark aufgeweitet, über dichroitische Spiegel (D_3 und D_4) zusammengeführt und anschließend über eine Linse auf die hintere Fokalebene des Objektivs fokussiert. Der dichroitische Spiegel (D_5), der die Anregungslaser in den Mikroskopstrahlengang einkoppelt, läßt sich linear verfahren. Auf diese Weise kann die Probe mit Epi-Fluoreszenz oder Totalreflektionsfluoreszenz [26] beleuchtet werden. Die starke Aufweitung bewirkt die gleichmäßige Ausleuchtung einer großen Fläche in der Probenkammer (ca. $80 \times 80 \mu\text{m}^2$).

Das Fluoreszenzlicht der Probe wird über einen dichroitischen Spiegel (D_6) vom Hellfeldlicht getrennt und über eine Linse auf eine EMCCD-Kamera abgebildet. Die Kamera ist wassergekühlt, um störende Vibrationen auf dem optischen Tisch zu vermeiden. Sie ist sensitiv genug, um einzelne Fluorophore detektieren zu können.

Die optimale optische Pinzette für Proteinfaltungsexperimente

Die in dieser Arbeit aufgebaute optische Pinzette wurde so konstruiert, dass sie sowohl für Messungen an molekularen Motoren, für Anwendungen mit mehr als zwei Fallen durch zeitliches Teilen der Fallenpotentiale mit dem AOD sowie für Proteinfaltungsexperimente geeignet war. Im Folgenden sind einige Punkte aufgeführt, mit der eine optische Pinzette für Faltungsexperimente optimiert werden kann:

Die Verwendung eines piezogesteuerten Spiegels anstelle des AOD bringt den Vor-

³ Fluoreszenz kann gleichzeitig mit 473 nm und 532 nm angeregt und detektiert werden. Für Anregung mit 405 nm kann der dichroitische Spiegel D_5 leicht ausgetauscht werden.

teil, dass beide Drehrichtungen in einer konjugierten Ebene liegen. Zudem ist die Intensität des abgelenkten Strahls nicht vom Winkel abhängig. Darüber hinaus entfallen die Winkelungenauigkeiten aufgrund von Kristalldefekten [27]. Um Interferenz zwischen beiden Strahlen zu vermeiden, kann ein AOM mit festem Ablenkwinkel eingesetzt werden [18].

Die Stabilität des Aufbaus kann verbessert werden, indem der Strahlengang konsequent parallel zur Ebene des optischen Tisches geführt wird. Dies erleichtert außerdem die Justage, die bei vertikaler Strahlführung erschwert ist. Für die gegenseitige Ausrichtung von Objektiv und Kondensator sowie zur Kontrolle der Laserposition ist es sinnvoll, am Ende des Strahlengangs eine feste Positionsreferenz zu installieren.

Die Verwendung eines Wasserimmersions-Objektivs ermöglicht das Fangen von Kugeln tief in der Probenkammer. Damit entfallen der Einfluss der Oberfläche auf den Reibungskoeffizient der Kugel [13] sowie Verschiebungen des Laserfokus aufgrund von Änderungen des Brechungsindex [28, 29]. Anstelle eines Kondensators empfiehlt sich der Einbau eines zweiten baugleichen Objektivs.

2.2.2 Eigenschaften des Instruments

Im folgenden Abschnitt wird auf einige wichtige Eigenschaften der vorgestellten optischen Pinzette eingegangen, wie Linearität des Detektorsignals sowie zeitliches und räumliches Auflösungsvermögen.

Linearität

Der Bereich, in dem sich das Signal des Detektors proportional zur Kugelauslenkung verhält, wurde bestimmt, indem eine auf der Oberfläche der Probenkammer fixierte Kugel linear durch den Laserfokus gefahren wurde (vgl. auch [19]). Dies ergab für beide Detektoren einen linearen Bereich von ± 150 nm. Für die Experimente wurde die Federhärte der Falle durchgehend so gewählt, dass die Kugel im relevanten Kraftbereich nicht mehr als 100 nm aus dem Fallenzentrum ausgelenkt war.

Zeitliches und räumliches Auflösungsvermögen

Das zeitliche Auflösungsvermögen der optischen Pinzette wird im Wesentlichen durch die Abfallfrequenz der thermisch bewegten Kugel bestimmt (siehe Abschnitt 2.1.2, Gleichung 2.4). Bei den verwendeten Federhärten und Kugelgrößen betrug die Abfallfrequenz $3 - 5 \cdot 10^3$ Hz (0,2 – 0,3 ms Zeitauflösung)⁴.

Das Design der optischen Pinzette wurde auf hohe mechanische Stabilität optimiert. Dazu trugen hauptsächlich die Verwendung der Zweistrahl-Geometrie, eine kurze Weglänge getrennter Strahlführung, kurze Strahlwege und die mechanisch stabile

⁴Aufgrund des nichtlinearen Kraft-Ausdehnungsverhaltens der DNA-Linker (vgl. Abschnitt 3.1) erhöhte sich die effektive Federhärte auf die Kugeln bei angelegter Kraft F und damit auch die minimale Zeitauflösung. Sie betrug bei $F > 10$ pN ca. 0,1 ms.

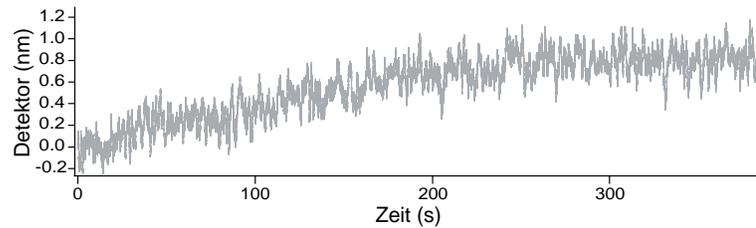


Abbildung 2.5: *Typisches Driftverhalten einer gefangenen Kugel. Die gemessene Position der Kugel ändert sich über einen Zeitraum von > 6 min weniger als 1 nm. Bei einer typischen Federhärte von 0,3 pN/nm entspricht das < 2 fN/s.*

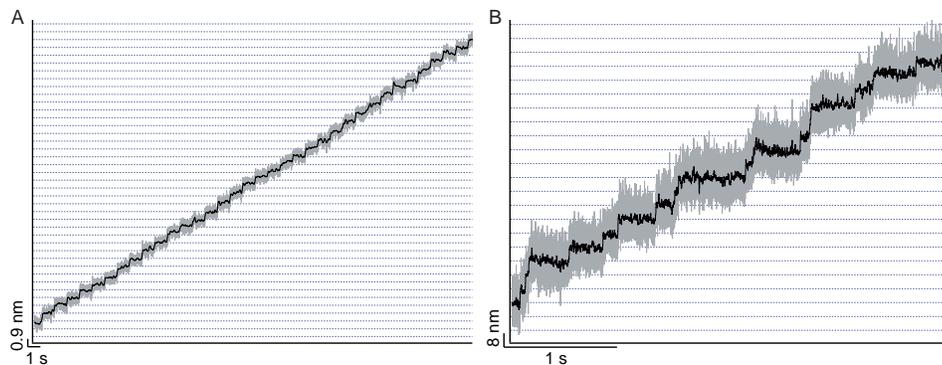


Abbildung 2.6: *Auflösungsvermögen der optischen Pinzette. (A) Zeitliche Verlauf einer auf einem Deckgläschen fixierten Kugel, aufgenommen mit 5 kHz (grau) und mit einem 100 ms Fenster gefiltert (schwarz). Das Deckgläschen wurde mit dem Piezotisch in 0,9 nm/s Schritten verfahren. (B) 8 nm Schritte eines einzelnen Kinesin-2 Motors (abgebildet mit freundlicher Genehmigung von Melanie Reisinger).*

Konstruktion des xy-Verschiebetisches bei. Abbildung 2.5 zeigt eine typische Aufnahme einer gefangenen Kugel. Die Drift beträgt weniger als 5 pm/s.

Die mechanische Stabilität des Aufbaus wurde mit einer auf der Oberfläche fixierten Kugel getestet, die mit 0,9 nm-Schritten bei 1 Hz durch den Laserfokus bewegt wurde. Das Signal der Kugel ist in Abbildung 2.6A gezeigt. Die Schritte werden über den gesamten Zeitraum von > 30 s gut aufgelöst. Wie in Abbildung 2.6B gezeigt, können die 8 nm-Schritte eines Kinesin-Motors sehr gut aufgelöst werden.

2.3 Kraftspektroskopie an einzelnen Proteinen

In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt mit der die Faltung einzelner Proteine mit der optischen Pinzette untersucht werden kann. Sie soll im folgenden Abschnitt vorgestellt werden. Zunächst wird der Zusammenbau von Kugel-DNA-Protein Handteln als Proben für die Kraftspektroskopie besprochen. Anschließend wird auf einige

Besonderheiten des Messprotokolls sowie der Datenanalyse eingegangen.

2.3.1 Kugel-DNA-Protein-Hanteln

Für die Kraftspektroskopie-Experimente sollten einzelne Proteine zwischen zwei Kugeln eingespannt werden. Die Verwendung von zwei Kugeln hat den Vorteil, dass die Auflösung im Vergleich zu einer Kugel und einer festen Oberfläche weiter verbessert werden kann (vgl. [30] und Abschnitt 2.3.3). Wichtig ist, dass das Protein nicht direkt an der Kugeloberfläche befestigt werden darf, um Wechselwirkungen zwischen Protein und Oberfläche zu vermeiden. Außerdem ist ein Abstand zwischen den beiden Kugeln wünschenswert, um Crosstalk-Effekte (siehe Abschnitt 2.3.3) zu minimieren.

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode zur Herstellung der Kraftspektroskopie-Proben stellt eine Weiterentwicklung eines von Cecconi et al. vorgestellten Protokolls dar, das doppelsträngige DNA-Linker als Abstandshalter zwischen Protein und Kugeln verwendet [31, 32]. Die wichtigste Veränderung ist das Verwenden von langen einzelsträngigen DNA-Überhängen am Ende der DNA-Linker, die mit komplementären Oligonukleotiden am Protein hybridisieren. Vorteile des neuen Protokolls sind eine kürzere Reaktionsdauer, eine größere Reaktionseffizienz und eine vereinfachte Aufreinigung des richtigen Konstrukts.

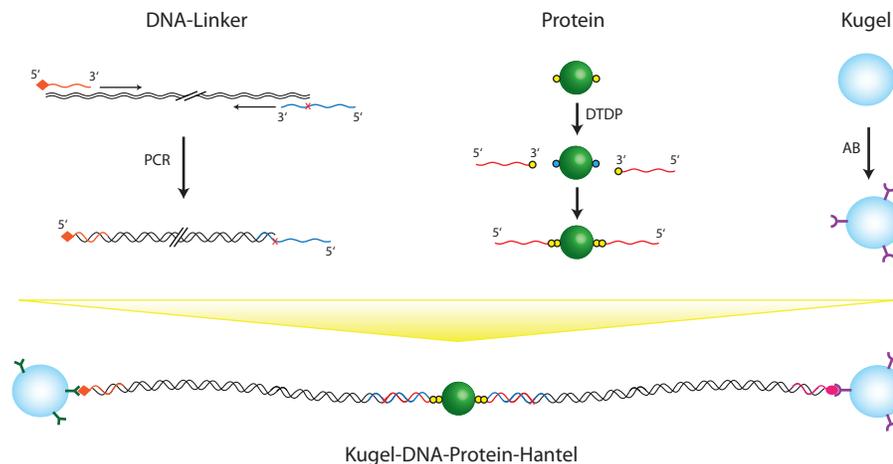


Abbildung 2.7: Skizze zum Zusammenbau der Kugel-DNA-Protein Hanteln. Links: Mittels PCR werden DNA-Linker mit Biotin/Digoxigenin und einem Überhang von 34 Basen hergestellt. Mitte: Das Proteins wird zunächst mit DTDP und anschließend mit thiol-modifizierten Oligonukleotiden funktionalisiert. Rechts: Die Kugeln werden kovalent mit Streptavidin/Anti-Digoxigenin beschichtet. Unten: DNA-Linker und Anti-Digoxigenin Kugeln werden vor dem Experiment mit dem Protein inkubiert. Während des Experiments werden Streptavidin und Anti-Digoxigenin Kugeln in Kontakt gebracht, um die Hantel auszubilden.

Abbildung 2.7 zeigt eine Übersicht des Protokolls. Es gliedert sich in drei Teilab-

schnitte: Die Herstellung der DNA-Linker, die Funktionalisierung des Proteins und die Beschichtung der Kugeln. Im Folgenden werden die wichtigsten Schritte der drei Teile besprochen. Ausführliche Protokolle sind in Anhang B.1 aufgelistet.

PCR der DNA-Linker

Die DNA-Linker wurden mit einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) hergestellt, bei der 544 bp (\cong 185 nm) der Lambda-Phagen-DNA vervielfältigt wurden. Die *sense*-Primer waren entweder mit drei Biotin-Molekülen oder drei Digoxigenin-Molekülen funktionalisiert, um die DNA-Linker an mit Streptavidin bzw. Anti-Digoxigenin beschichtete Kugeln binden zu können. Für die Hanteln wurden zwei verschiedene Anbindungen verwendet, da homogen funktionalisierte Konstrukte mit beiden Enden an eine Kugel binden können. Um den 5'-Überhang am anderen Ende der DNA-Linker zu erhalten, wurde ein *antisense*-Primer verwendet, der eine nicht-natürliche Base (tetrahydrofuran (1',2'-Dideoxyribose)) enthielt [33]. Diese Base führt zu einem vorzeitigen Abfallen der DNA-Polymerase, so dass nicht der gesamte Primer vervollständigt wird.

Funktionalisierung des Proteins

Die Anbindung der Oligonukleotide an das Protein erfolgte spezifisch über Disulfidbrücken zwischen Cysteinen des Proteins und Thiol-Gruppen am 3'-Ende der einzelsträngigen DNA [31]. Neben der Spezifität der Bindung ist vorteilhaft, dass viele Proteine Mutationen von lösungsmittelzugänglichen Aminosäuren zu Cysteinen tolerieren. So kann durch die Wahl der Cysteinpositionen im Protein auf einfache Weise die Richtung des Kraftvektors festgelegt werden. Eine analoge Strategie zum gezielten Festlegen der Krafrichtung wurde bereits für die Proteinfaltung mit dem AFM gewählt [34]. Um eine Polymerisation des Proteins über die Cysteine zu verhindern, wurden die Cysteine mit 2',2'-Dithiodipyridin (DTDP) geschützt. Ein weiterer Vorteil des DTDP besteht darin, dass die nachfolgende Reaktion mit den Thiol-Gruppen der Oligonukleotide erleichtert wird [31]. Verzichtet man auf das DTDP, kann die Polymerisation über Cysteine [35] dazu verwendet werden lange Proteinketten zu erhalten, die auch mit der optischen Pinzette untersucht werden können (vgl. Abbildung B.2).

Ein großer Vorteil der Verwendung kurzer Oligonukleotide als Verbindungsstücke zwischen Protein und DNA-Linker ist eine relativ kurze Reaktionszeit für die Anbindung (< 3 d). Außerdem lassen sich die funktionalisierten Proteine leicht über Größenausschluss-Chromatographie von unfunktionalisiertem Protein und nicht reagierten Oligonukleotiden abtrennen (siehe Abbildung 2.8).

Beschichtung der Kugeln

Um die Dicke der Kugelbeschichtung und damit die Elastizität der Anbindung möglichst gering zu halten, wurden Streptavidin oder F_{ab} -Fragmente des Anti-Digoxigenin-Antikörpers direkt kovalent an amino-funktionalisierte Polystyrolkugeln gebunden. Glu-

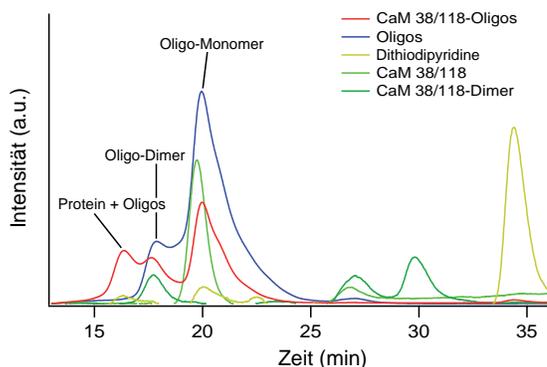


Abbildung 2.8: *Aufreinigung von Oligonukleotid-funktionalisiertem Calmodulin (CaM 38/118) über Größenausschluss-Chromatographie. Vergleich der Intensitäten bei 280 nm sukzessiver Läufe der Oligonukleotide (blau), Calmodulin-Monomere (hellgrün) und -Dimere (dunkelgrün) sowie des Calmodulin-Oligonukleotid-Reaktionsansatzes (rot (280 nm) und gelb (343 nm)). Man erkennt deutlich den Protein-Oligo-Peak sowie den Peak des freigesetzten DTDP bei 343 nm, der bei erfolgreicher Reaktion auftritt.*

taraldehyd diente bei der Reaktion als Crosslinker zwischen Amino-Gruppen der Kugeln und der Proteine. Zu dem Streptavidin wurde eine kleine Menge fluoreszierendes Alexa-532 Streptavidin gemischt, um sie im Experiment über Fluoreszenz von den Anti-Digoxigenin-Kugeln unterscheiden zu können.

Zusammensetzen der Hanteln

Die DNA-Linker wurden durch eine einfache Hybridisierungsreaktion an die funktionalisierten Proteine geheftet. Die Kugeln wurden erst während des Experiments zur Vervollständigung der Kugel-DNA-Protein-Hanteln angehängt (siehe den folgenden Abschnitt 2.3.2).

2.3.2 Ablauf eines Experiments

Im Folgenden wird die Durchführung der Faltungsexperimente sowie die Art der Daten, die mit der optischen Pinzette gewonnen werden können, kurz besprochen.

Die Probenpräparation

Die DNA-Protein Konstrukte wurden vor dem Experiment mit den Anti-Digoxigenin Kugeln inkubiert. Anschließend wurde die Lösung zusammen mit den Streptavidin Kugeln in die Probenkammer gespült.

Für die Probenkammern wurden Deckgläschen mit zwei Streifen Nescofilm® bei 75° C auf einem Objektträger befestigt. Dies verbesserte die Stabilität im Vergleich zu Kammern mit Vakuumfett [19]. Durch die entstehende Kammer wurde zunächst

BSA-Lösung (Puffer und 10 mg/ml BSA) und anschließend die Pufferlösung mit den Hanteln gespült.

Das Messprotokoll

Der Verlauf eines typischen Experiments ist in Abbildung 2.9 skizziert, die die Position der Kugel im AOD-Strahlengang als Funktion der Zeit wiedergibt. Zu Beginn werden zwei unterschiedlich beschichtete Kugeln mit konstanter Geschwindigkeit (500 nm/s) in Kontakt gebracht. Das ermöglichte zum einen das Binden des DNA-Protein Konstrukts an die Streptavidin Kugeln. Zum anderen wurde die Annäherungskurve verwendet, um den Crosstalk aufgrund der Nähe der beiden Laserpotentiale zu korrigieren (siehe Abschnitt 2.3.3 und Abbildung 2.10). Anschließend wurde der Kugelabstand zyklisch mit unterschiedlichen konstanten Geschwindigkeiten vergrößert und verkleinert um Kraft-Abstands-Kurven aufzunehmen bzw. konstant gehalten und stufenförmig vergrößert um Kraft-Zeit-Aufnahmen zu erhalten. Die Umrechnung wird in Abschnitt 2.3.3 kurz besprochen.

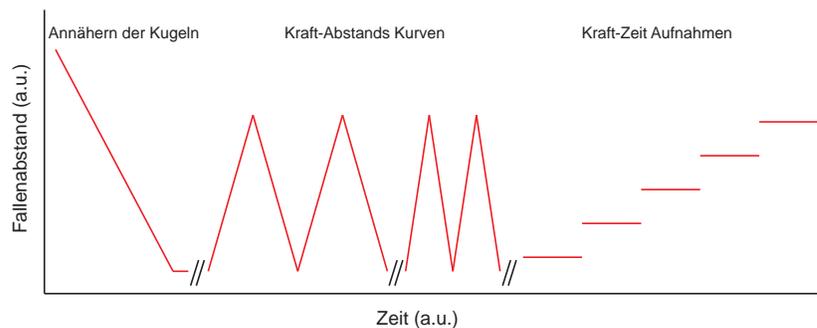


Abbildung 2.9: *Typischer Verlauf eines Faltungsexperiments. Gezeigt ist die Position des AOD-Strahlengangs als Funktion der Zeit. Das Experiment ist in drei Phasen unterteilt. Links: Annäherung der Kugeln zum Zusammenbau der Kugel-DNA-Protein Hanteln und zum Aufnehmen der Crosstalk-Effekte. Mitte: Verfahren der Kugel mit verschiedenen konstanten Geschwindigkeiten zur Aufnahme von Kraft-Abstands-Kurven. Rechts: sukzessive veränderter Fallenabstand für Kraft-Zeit-Aufnahmen.*

Im Anschluss an das Experiment wurden die Fallenfederhärten k_{fix} und k_{mobil} der beiden Kugeln mit dem in Abschnitt 2.1.2 beschriebenen Verfahren kalibriert. Die Kalibration erfolgte bei großem Kugelabstand ($12 \mu\text{m}$), um Störeffekte durch eine hydrodynamische Kopplung zwischen den Kugeln zu vermeiden. Die Federhärte der mobilen Falle wurde mit einem Faktor korrigiert, der die geringere Laserintensität des AOD-Strahlengangs bei großer Auslenkung berücksichtigte. Die Federhärte wurde in allen Experimenten für beide Fallen gleich eingestellt.

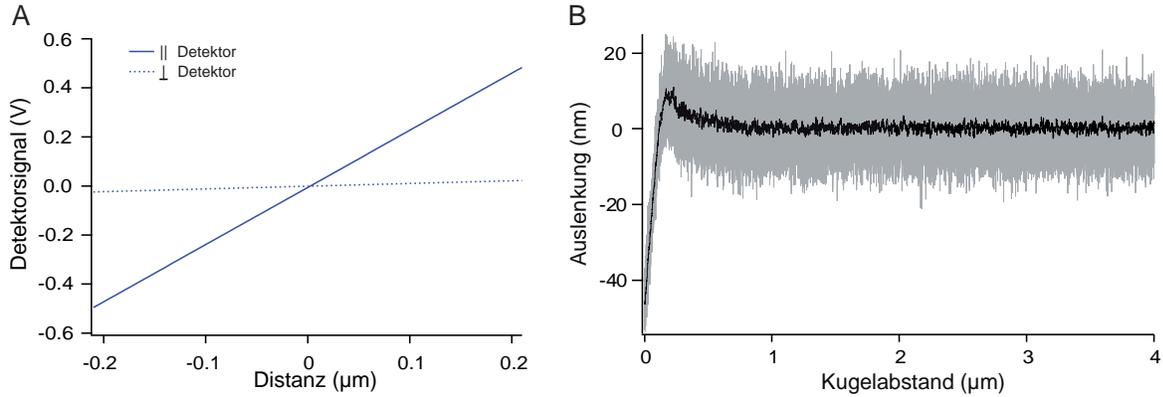


Abbildung 2.10: Crosstalk-Effekte der optischen Pinzette. (A) Crosstalk aufgrund von Depolarisation des Fallenlasers an optischen Elementen und der Kugeln. Fit an das Signal im \perp Detektor (gestrichelte Linie), wenn eine Kugel linear durch den \parallel Laserstrahl bewegt wird (kontinuierliche Linie, Fit). (B) Crosstalk aufgrund der Nähe des zweiten Fallenpotentials. Signal einer Kugel als Funktion des Kugelabstands.

2.3.3 Auswertung der Daten

In diesem Abschnitt wird kurz auf die Korrektur der Crosstalk-Effekte sowie die Auswertung der Kraftspektroskopie-Experimente eingegangen.

Korrektur von Crosstalk-Effekten

Durch die Verwendung von zwei Fallenpotentialen für die Kraftspektroskopie-Experimente traten zwei verschiedene Crosstalk-Effekte auf, die vor der Auswertung eines Experiments korrigiert wurden.

Crosstalk aufgrund von Depolarisation Ein Laserstrahl mit definierter Polarisationsrichtung kann durch Beugung oder Streuung an nicht ideal glatten optischen Elementen depolarisiert werden. Dies führt bei der Detektion der Kugelauslenkung zu einem Übersprechen des Kugelsignals auf den Detektor der dazu senkrechten Polarisationsrichtung. Dieser Effekt wurde quantifiziert, indem eine Kugel linear durch das Fallenpotential eines Lasers gefahren und das Signal auf beiden Detektoren gemessen wurde (siehe Abbildung 2.10A). Das Übersprechen verhielt sich im Bereich der in den Experimenten verwendeten Kugelauslenkungen von ± 200 nm linear und betrug ca. 2% des Ursprungssignals für beide Polarisationsrichtungen.

Aufgrund des linearen Verhaltens kann dieser Effekt leicht aus den Detektorsignalen herausgerechnet werden: Seien S_i die gemessenen Signale, A_i die tatsächlichen Signale und C_i die Crosstalk-Signale mit $i = 0, 1$ den beiden senkrechten Polarisationsrichtungen. $f_0 = C_0/A_1$ bzw. $f_1 = C_1/A_0$ bezeichnen den Prozentsatz des Crosstalk-Signals. Aus $S_0 = A_0 + C_0 = A_0 + f_0 A_1$ erhält man $A_0 = S_0 - f_0 A_1$ und eine analoge Gleichung

für $i = 1$. Damit ergibt sich $A_0 = S_0 - f_0 S_1 + f_0 f_1 A_0$ und schließlich

$$A_0 = \frac{S_0 - f_0 S_1}{1 - f_0 f_1} \quad \text{und} \quad A_1 = \frac{S_1 - f_1 S_0}{1 - f_0 f_1}. \quad (2.12)$$

Da S_0 und S_1 gemessen werden und f_0 und f_1 bekannt sind (0.02), kann mit Gleichung 2.12 das tatsächliche Signal der Kugelauslenkung berechnet werden.

Crosstalk aufgrund des zweiten Fallenpotentials Die endliche Ausdehnung der Fallenlaser im Fokus führt zu einem Crosstalk-Effekt, wenn der relative Abstand zwischen den Fallenpotentialen klein ist. Ein Beispiel für die Veränderung des Signals bei Annäherung einer zweiten Kugel ist in Abbildung 2.10B gezeigt. Bei einem relativen Abstand der Kugeln < 700 nm steigt das Detektorsignal auf ca. 10 nm an. Dieser Effekt wurde korrigiert, indem vor jedem Experiment das Annäherungssignal für beide Kugeln aufgenommen wurde (vgl Abschnitt 2.3.2). Nach dem Berechnen der tatsächlichen Signale $A_i(z)$ (siehe vorheriger Abschnitt) wurde ein Polynom 9ten Grades an die Annäherungssignale als Funktion des Fallenabstandes z angepasst. Diese Korrekturpolynome $P_{\text{kor}}(z)$ wurde anschließend von den Auslenkungssignalen beider Kugeln subtrahiert. Die Korrektur berücksichtigt nicht, dass sich auch die Federhärten der Fallen bei Annäherung des zweiten Fallenpotentials ändern. Bis zu ca. 150 nm ist die Änderung der Federhärte $< 10\%$ im Vergleich zu einer Bestimmung im Abstand von $4 \mu\text{m}$. Bei < 150 nm nimmt die Federhärte schnell ab. Da in den Experimenten dieser Arbeit der Abstand der Fallenpotentiale bei Entfaltung der Proteine ca. 600 nm betrug, war dieser Fehler klein.

Umrechnung der Auslenkungssignale

Für die Auswertung der Experimente wurde durchgehend das Differenzsignal der beiden Kugeln betrachtet. Dies hat den Vorteil, dass das Signal einer gegenphasigen Abstandsänderung (z.B. Falten des Proteins) verstärkt wird, wogegen eine gleichphasige Änderung des Signals (z.B. thermisches Rauschen oder Drift) vermindert wird. Auf diese Weise wird trotz der größeren Anzahl an Freiheitsgraden der zwei Kugeln eine Verbesserung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses erreicht [30].

Die Auslenkungssignale der Kugeln $A_{\text{fix}}(z, t)$ und $A_{\text{mobil}}(z, t)$ als Funktion des Kugelabstands $z(t)$ können wie folgt in Kraft-Zeit Signale $F(t)$ umgerechnet werden:

$$F(t) = (k_{\text{fix}} A_{\text{fix}}(z, t) - k_{\text{mobil}} A_{\text{mobil}}(z, t))/2. \quad (2.13)$$

k_{fix} und k_{mobil} bezeichnen die beiden Federhärten. Der Abstand $x(t)$ zwischen den Kugeloberflächen bei Kraft-Abstands-Kurven ist durch

$$x(t) = z(t) - (A_{\text{fix}}(z, t) - A_{\text{mobil}}(z, t)) - 2R \quad (2.14)$$

gegeben (R: Kugelradius).

Bestimmung von Verweildauern in Kraft-Zeit-Aufnahmen

Abbildung 2.11 zeigt einen Ausschnitt aus einer Kraft-Zeit Aufnahme eines Proteins.

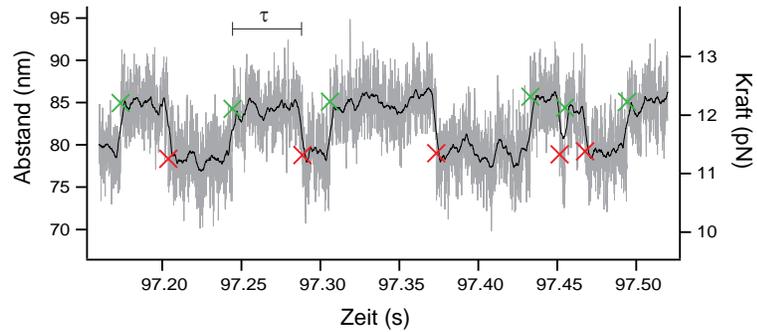


Abbildung 2.11: Kraft-Zeit-Aufnahme eines Proteins, das zwischen zwei Zuständen fluktuiert. Die grünen und roten Kreuze geben Beginn und Ende der Verweildauer τ im oberen Zustand an.

Das Protein fluktuiert zwischen zwei Zuständen. Die Verweildauer τ in einem Zustand wurde bestimmt, indem der Abstandsdurchschnitt eines 0,5 ms Zeitfensters mit einem Schwellenwert verglichen wurde (hier bei 82,5 nm; grüne Kreuze geben den Beginn, rote Kreuze das Ende des oberen Zustands an).

Kapitel 3

Biomoleküle unter Kraft

3.1 Polymerelastizität

Polymere sind lange, aus vielen gleichen Untereinheiten (Monomeren) aufgebaute kettenartige Moleküle. Streckt man Polymere mechanisch, weisen sie ein elastisches Verhalten auf. Die zum Strecken nötige Arbeit setzt sich prinzipiell aus zwei Energiebeiträgen zusammen: *enthalpische* Beiträge aufgrund der Änderung der inneren Energie zum Beispiel beim Dehnen von Bindungen und Strecken von Bindungswinkeln sowie *entropische* Beiträge aufgrund abnehmender Entropie, da die Anzahl an möglichen Konformationen, die das Polymer einnehmen kann, beim Strecken abnimmt.

Ein einfaches Modell, das nur entropische Beiträge berücksichtigt, ist das *Freely-Jointed-Chain-Modell* [36]. Das Polymer wird als Kette starrer Untereinheiten angenähert, die über frei bewegliche Gelenke miteinander verbunden sind. Das elastische Verhalten ergibt sich aus der statistischen Verteilung der Untereinheiten. Ein anderes Modell, das von Kratky und Porod eingeführte *Worm-Like-Chain-Modell* (WLC-Modell) [37], beschreibt das Polymer mit Konturlänge L als eine kontinuierliche Raumkurve und enthält auch enthalpische Beiträge. Die Korrelation der lokalen Krümmung des Polymers fällt exponentiell mit der Persistenzlänge P ab. Der Zusammenhang zwischen Kraft und End-zu-End-Abstand ergibt sich wiederum aus statistischen Überlegungen (eine Herleitung ist z.B. in [38] zu finden).

Das WLC-Modell eignet sich gut zur Beschreibung des Kraft-Ausdehnungsverhaltens von Proteinen. In dieser Arbeit wurde eine von Marko und Siggia entwickelte Interpolationsformel des WLC-Modells verwendet [39, 40]:

$$F_{WLC}(x) = \frac{k_B T}{P} \left(\frac{1}{4(1-x/L)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L} \right) \quad (3.1)$$

mit der Boltzmannkonstante k_B und Temperatur T . Diese nähert sich für kleine und große Kräfte dem exakten Modell an und weicht bei Ausdehnungen von $x/L \approx 0.5$ um maximal 10% ab.

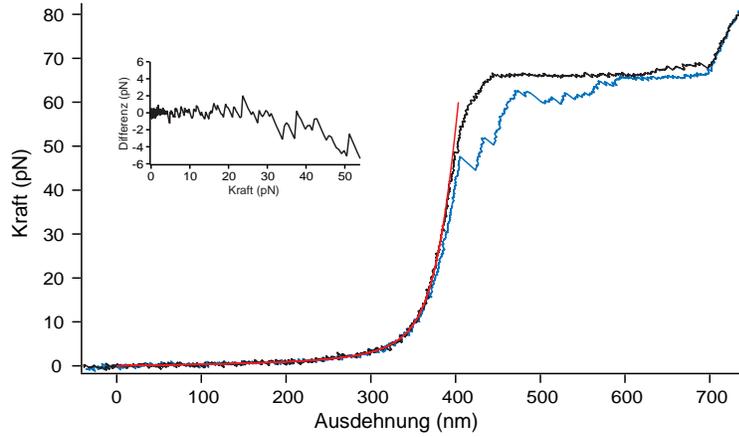


Abbildung 3.1: Kraft-Ausdehnungs-Kurve von DNA. Gezeigt ist ein Streckungs- (schwarz) und Relaxationszyklus (blau). Ab ca. 65 pN erfolgt der BS-Übergang. Die rote Linie ist eine eWLC-Kurve nach Gleichung 3.2, die an die schwarze Kurve angepasst wurde. Inset: Differenz zwischen gemessener und theoretischer Kurve.

Bei der Beschreibung von DNA kann eine Dehnung des Moleküls ab Kräften über 5 pN nicht mehr vernachlässigt werden. Um dies zu berücksichtigen erweiterten Wang et al. das WLC-Modell um den elastischen Term F/K mit dem Elastizitätsmodul K zum eWLC-Modell [10]:

$$F_{eWLC}(x) = \frac{k_B T}{P} \left(\frac{1}{4(1 - x/L + F/K)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L} - \frac{F}{K} \right). \quad (3.2)$$

Abbildung 3.1 zeigt die Kraft-Ausdehnungs-Kurve einer DNA mit 406 nm Konturlänge, an die das eWLC-Modell angepasst wurde. Die gemessene Kurve folgt der theoretischen Beschreibung sehr gut bis zu einer Kraft von ca. 40 pN [10]. Für die Persistenzlänge ergibt sich ein Wert von 5,5 nm. Die Persistenzlänge von μm -langer DNA liegt bei ca. 50 nm [40, 10]. Der kleinere Wert ist aber konsistent mit anderen Messungen an kurzer DNA [41, 42] und lässt sich teilweise auf den Einfluss der beiden Kugeln, zwischen die die DNA eingespannt ist, zurückführen [42].

Die Kraft-Ausdehnungs-Kurven der in dieser Arbeit untersuchten Kugel-DNA-Protein-Konstrukte lassen sich mit einer seriellen Kombination aus dem elastischen eWLC-Modell für DNA und dem einfachen WLC-Modell für das Protein beschreiben. Die Auslenkung in Abhängigkeit von der Kraft ist gegeben durch

$$x_{Dumbbell}(F) = x_{eWLC}(F) + x_{WLC}(F). \quad (3.3)$$

Bei einem Experiment wurde zunächst das einfache eWLC-Modell der DNA an den Bereich der Kraft-Ausdehnungs-Kurve vor einer Proteinfaltung angepasst, um die DNA-Parameter zu bestimmen. Anschließend wurde bei festgehaltenen DNA-Parametern mit dem seriellen Modell der Konturlängenzuwachs des Proteins bestimmt.

3.2 Energetik der Proteinfaltung in der optischen Pinzette

Abbildung 3.2 zeigt ein Schema der Kugel-DNA-Protein-DNA-Kugel-Hanteln. In den folgenden Berechnungen wurde das System durch das äquivalente System Kugel-DNA-Protein ersetzt. Für ähnliche Federhärten der beiden Falle ist die effektive Federhärte der Falle dann das Mittel der beiden einzelnen Federhärten, die effektive Kugelauslenkung ist die Differenz der beiden Kugelauslenkungen und die Konturlänge der DNA ist verdoppelt. Wenn die absolute Position der Falle nicht verändert wird, ist die Kraft bei einer Konformationsänderung des Proteins nicht konstant. Jede Längenänderung des Proteins bedeutet eine Änderung der Kraft. Dies wurde in den folgenden Berechnungen berücksichtigt. Die Energie $G_i(F_i)$, die bei Kraft F_i in einer Kugel-DNA-Protein-Hantel

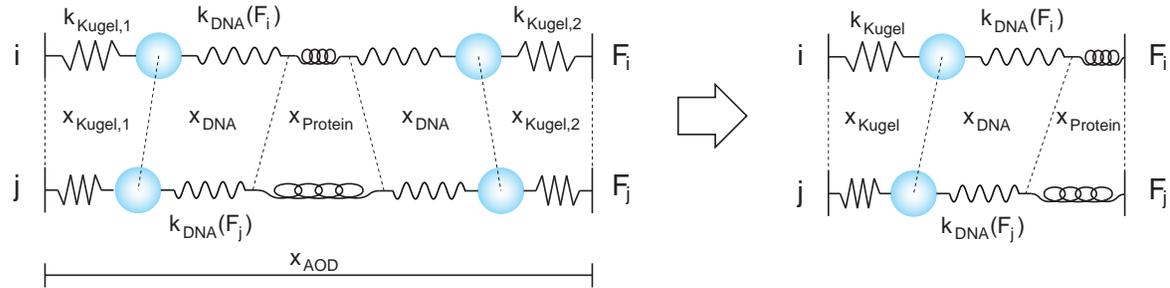


Abbildung 3.2: Schema der Kugel-DNA-Protein-DNA-Kugel-Hantel. Um die Berechnungen zu vereinfachen, wurde das System durch das äquivalente System Kugel-DNA-Protein ersetzt.

gespeichert ist, ist durch die Hooksche Energie der Kugelauslenkung, die entropischen und enthalpischen Beiträge der Ausdehnung von dsDNA-Linkern und entfaltetem Protein sowie durch die freie Energie $G_{P_i}^0$ des Proteins im Zustand i gegeben:

$$G_i(F_i) = G_{P_i}^0 + G_{Kugel}(F_i) + G_{DNA}(F_i) + G_{Protein}(F_i). \quad (3.4)$$

Hier wurden die freien Energien von DNA und Kugel im kraftfreien Fall auf null normiert. Die einzelnen Beiträge sind durch

$$G_{Kugel}(F_i) = \frac{1}{2} x_i(F_i) F_i, \quad (3.5)$$

$$G_{DNA}(F_i) = \int_0^{d_i(F_i)} F_{eWLC}(d) dd, \quad (3.6)$$

$$G_{Protein}(F_i) = \int_0^{p_i(F_i)} F_{WLC}(p) dp. \quad (3.7)$$

gegeben. Dabei bezeichnet $x_i(F_i)$ die effektive Kugelauslenkung, $d_i(F_i)$ die Ausdehnung der DNA und $p_i(F_i)$ die Ausdehnung des entfaltetes Proteins. Unterschiede der Energie

bei den Kräften F_i und F_j berechnen sich nach

$$\Delta G_{ij}(F_i, F_j) = G_j(F_j) - G_i(F_i). \quad (3.8)$$

3.2.1 Kraftabhängige Aufenthaltswahrscheinlichkeiten

Die Energie $\Delta G_{ij}(F_i, F_j)$ ist über eine Boltzmann-Verteilung mit der Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Systems, gemessen über die Position x der Kugeln, verbunden:

$$\frac{P_j(x_j, F_j)}{P_i(x_i, F_i)} = \exp(-\Delta G_{ij}(F_i, F_j)/k_B T) \quad (3.9)$$

Mit Hilfe dieser Gleichung können Unterschiede in der freien Energie zwischen verschiedenen Zuständen i und j des Proteins berechnet werden:

$$\Delta G_{ij}^0 = -k_B T \cdot \ln \left(\frac{P_j(x_j, F_j)}{P_i(x_i, F_i)} \right) - \Delta G_{Kugel}(F_i, F_j) - \Delta G_{DNA}(F_i, F_j) - \Delta G_{Protein}(F_i, F_j). \quad (3.10)$$

Um die Wahrscheinlichkeit $P_i(x_i, F_i)$ zu bestimmen, das System im Zustand i zu finden, wurde eine Summe aus n Gaussfunktionen an die Aufenthaltsverteilungen der Kugeln angepasst. n gibt die Anzahl der aufgelösten Zustände an. $P_i(x_i, F_i)$ ist dann die Fläche unter der einfachen Gausskurve, die zu Zustand i gehört.

Für ein Dreizustandssystem mit den Zuständen i , j und k führt das Auflösen von Gleichung 3.10 nach $P_i(F_i)$, zusammen mit den Gleichungen 3.8 und 3.4, auf die Formel

$$P_i(F_i) = \frac{1}{1 + \exp(-\Delta G_{ij}(F_i, F_j)/k_B T) + \exp(-\Delta G_{ik}(F_i, F_k)/k_B T)}, \quad (3.11)$$

die mit $F_i = F_i(x_{AOD})$ die Wahrscheinlichkeit des Zustands i in Abhängigkeit von der Distanz x_{AOD} zwischen den Fallenzentren angibt.

3.2.2 Das Fluktuationstheorem von Crooks

Die Gleichgewichtsenergie ΔG^0 der Faltung eines Proteins kann aus Kraft-Abstands-Kurven im Nichtgleichgewicht mit Hilfe des Fluktuationstheorems von Crooks berechnet werden [43]:

$$\frac{W_{\text{off}}}{W_{\text{on}}} = \exp((W - \Delta G^0)/k_B T) \quad (3.12)$$

Der Schnittpunkt der Verteilungen W_{off} der Entfaltungsarbeit und W_{on} der Faltungsarbeit des Moleküls bestimmt ΔG^0 . Die Arbeit der Faltung/Entfaltung eines Proteins ist durch die Fläche unter der Kraft-Kurve als Funktion des Abstands zwischen den Fallen abzüglich der Fläche unter der WLC-Kurve des entfalteten Zustands gegeben. Um Unsicherheiten der Federhärtenkalibrierung zu berücksichtigen, wurden die Verteilungen der Arbeit jedes Moleküls um die Differenz zwischen ihrem Mittelwert und dem Mittelwert aller Verteilungen korrigiert.

3.3 Kinetik von Konformationsübergängen

Im Folgenden werden Übergänge zwischen zwei Zuständen i und j betrachtet, die eine Differenz der freien Energie $\Delta G_{ij,0}$ aufweisen und über eine Aktivierungsbarriere mit Energie $\Delta G_{iT,0}$ bzw. $\Delta G_{jT,0}$ getrennt sind (siehe Abbildung 3.3) [44, 19]. Nach Arrhenius [45] befinden sich die Zustände i und j im thermischen Gleichgewicht mit dem Übergangszustand T . Der Übergangszustand zerfällt mit der gleichen Ratenkonstante k_A , dem prä-exponentiellen Faktor, in i und j . Für die Ratenkonstanten $k_{ij,0}$ und $k_{ji,0}$ gilt im kraftfreien Fall:

$$k_{ij,0} = k_A \exp\left(-\frac{\Delta G_{iT,0}}{k_B T}\right) \quad \text{bzw.} \quad k_{ji,0} = k_A \exp\left(-\frac{\Delta G_{jT,0}}{k_B T}\right). \quad (3.13)$$

Die Übergangsraten sind nach dieser Gleichung von der Höhe der Übergangsbarriere sowie dem prä-exponentiellen Faktor abhängig. Beide Variablen sind gekoppelt und lassen sich experimentell nur schwer getrennt voneinander bestimmen.

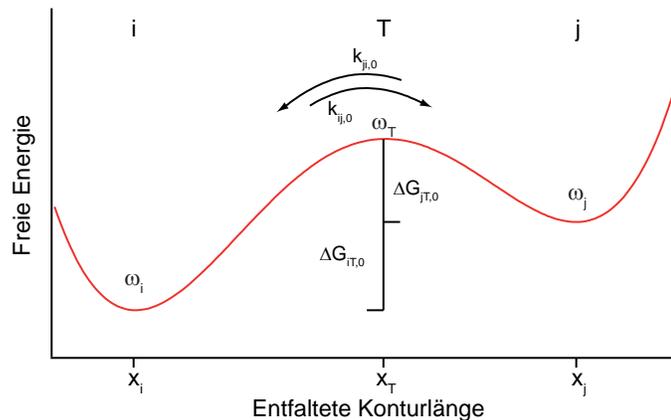


Abbildung 3.3: Skizze der Energielandschaft eines Systems mit zwei Zuständen i und j , die über einen Übergangszustand T getrennt sind. $\omega_{i/T/j}$ bezeichnen charakteristische Frequenzen im Bereich der Extrema (vgl. Abschnitt 3.3.2).

3.3.1 Ratenkonstanten unter Kraft

Das Modell von Bell

Das Anlegen einer konstanten äußeren Kraft verändert die kraftfreien Ratenkonstanten zwischen den Systemzuständen i und j , da entlang des Kraftvektors, der eine Reaktionskoordinate definiert, Arbeit am System verrichtet und damit die Potentialform verändert wird. Bell veröffentlichte 1978 für das Trennen von Rezeptor-Ligand-Systemen ein einfaches Modell, bei dem er annahm, dass sich die am System geleistete

Arbeit linear mit der Kraft und dem Abstand Δx_{iT} zwischen Zustand i und Übergangszustand T ändert [46]. Zusätzlich wird angenommen, dass sich Δx_{iT} unter dem Einfluss der äußeren Kraft nicht ändert. Die kraftfreie Ratenkonstante $k_{ij,0}$ aus Gleichung 3.13 berechnet sich in diesem Modell zu:

$$k_{ij,0} \xrightarrow{F} k_{ij}(F) = k_A \exp\left(-\frac{\Delta G_{iT,0} + F\Delta x_{iT}}{k_B T}\right) = k_{ij,0} \exp\left(-\frac{F\Delta x_{iT}}{k_B T}\right). \quad (3.14)$$

Bei realen Potentialformen, zum Beispiel der Energielandschaft eines globulären Proteins, ist die Annahme eines kraftunabhängigen Δx nur eingeschränkt gültig (vgl. Abbildung 3.4A). Dennoch eignet sich das Bell-Modell zur Beschreibung der kraftabhängigen Entfaltungsrates eines globulären Proteins. Bei Ratenkonstanten der Proteinfaltung ist die Bell-Näherung nicht mehr ausreichend. Ein realistischeres Modell wird im nächsten Abschnitt vorgestellt.

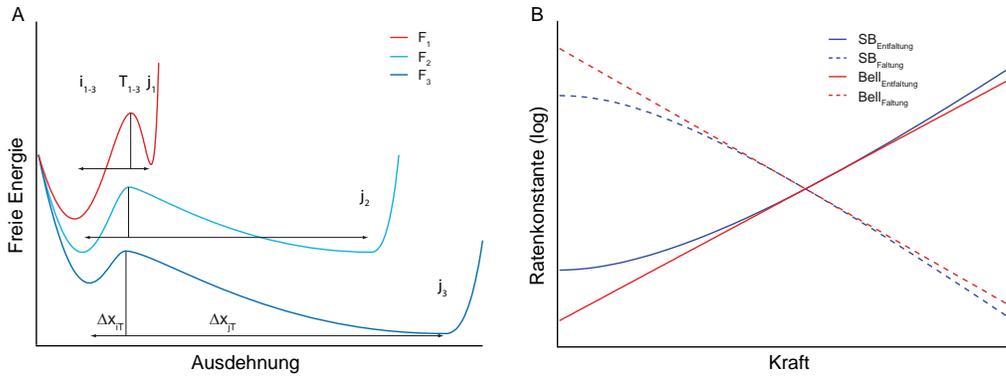


Abbildung 3.4: (A) Energielandschaft eines globulären Proteins unter Kraft mit $F_1 < F_2 < F_3$. Die Pfeile veranschaulichen die Änderungen von Δx_{iT} und Δx_{jT} mit der angelegten Kraft. (B) Qualitativer Vergleich zwischen den Verläufen der Ratenkonstanten der Faltung (gestrichelte Linien) und Entfaltung (durchgezogene Linien) nach dem Bell-Modell (rot) und dem SB-Modell (blau).

Ist die äußere Kraft F nicht konstant, sondern eine Funktion der Zeit, $F(t)$, werden auch die Übergangsraten zeitabhängig. Für die Wahrscheinlichkeit $P_{ij}(t)$, nach einer Zeit t einen Übergang vollzogen zu haben, gilt dann $dP_{ij}(t) = k_{ij}(t)dt \cdot P_i$. P_i ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich das System in Zustand i befindet. Nach Integration und Variablentransformation $t \rightarrow F$ findet man mit der Bell-Näherung:

$$P_{ij}(F) = 1 - \exp\left(-k_{ij,0} \int_0^F \exp\left(-\frac{F'\Delta x_{iT}}{k_B T}\right) \frac{1}{F'} dF'\right), \quad (3.15)$$

mit der Kraft-Ladungsrate \dot{F} [47, 48]. Wird ein System mit nichtlinearer Elastizität mit konstanter Geschwindigkeit gestreckt, ist die Kraft-Ladungsrate \dot{F} nicht konstant.

Ein Modell für die Proteinfaltung unter Kraft

Wird ein Protein mit dem AFM oder einer optischen Pinzette untersucht, muss berücksichtigt werden, dass die Proteinkontraktion zu einer Auslenkung von Blattfeder bzw. Kugeln und einer Dehnung von zusätzlichen Linkern im System führt. Für diese Änderungen am System muss Arbeit geleistet werden, die zu einer zusätzlichen Energiebarriere für das faltende Protein führt. Anstelle des Energietherms $F\Delta x_{iT}$ des Bell-Modells (Gleichung 3.14) tritt für Proteinfaltung der nichtlineare Therm $\Delta G_{jT}(F_j, F_T) = \Delta G_{Kugel}(F_j, F_T) - \Delta G_{DNA}(F_j, F_T) - \Delta G_{Protein}(F_j, F_T)$, der die Energiebeiträge 3.5 bis 3.7 enthält. Für die Faltungsrate gilt in diesem Modell (SB-Modell) [49]:

$$k_{ji,0} \xrightarrow{F} k_{ji}(F) = k_{ji,0} \exp\left(-\frac{\Delta G_{jT}(F_j, F_T)}{k_B T}\right). \quad (3.16)$$

F_j und F_T bezeichnen die Kräfte, die in den Zuständen j und T auf das Protein wirken. Die Längenänderung Δx_{jT} des entfalteten Proteins entlang der Reaktionskoordinate, die bei einer Konformationsänderung des Proteins vom Zustand j in den Übergangszustand T auftritt, definiert die Position der Übergangsbarrriere. In Abbildung 3.4B werden die Verläufe der Ratenkonstanten für Faltung und Entfaltung als Funktionen der Kraft nach dem Bell- und dem SB-Modell qualitativ verglichen. Während bei logarithmischer Darstellung die Ratenkonstanten im Bell-Modell einer Geraden folgen, verlaufen sie im SB-Modell gekrümmt.

Für die in dieser Arbeit untersuchten Coiled-Coils wird sowohl bei Faltung als auch bei Entfaltung eine Konformationsänderung direkt in eine Änderung der Länge des entfalteten Proteinanteils umgesetzt. Gleichung 3.16 eignet sich daher auch gut zur Beschreibung der Entfaltung von Coiled-Coils.

3.3.2 Die Rekonfigurationszeit von Proteinen

Kramers entwickelte 1940 ein Modell, mit dem die Übergangsraten eines Proteins direkt hergeleitet werden können [50]. Der Übergang erfolgt, sobald das Protein durch Diffusion den Übergangszustand T bei x_T erreicht hat (vgl. Abbildung 3.3). Die Zeit $t_{iT} = t_f$, die es für die Diffusion braucht (*first-passage-time*), ist abhängig von der Form des Potentials $G(x)$ sowie dem Reibungskoeffizienten γ_i [44]:

$$t_{iT} = t_f = \frac{\gamma_i}{k_B T} \int_{x_i}^{x_T} \exp\left(-\frac{G(x)}{k_B T}\right) \int_x^{x_T} \exp\left(\frac{G(x')}{k_B T}\right) dx' dx. \quad (3.17)$$

Die Ratenkonstante $k_{ij,0}$ ist das Inverse der *first-passage-time*

$$k_{ij,0} = \frac{1}{t_f}. \quad (3.18)$$

Nähert man die Energielandschaft des Proteins durch harmonische Potentiale $G_i(x) = 1/2 m \omega_i^2(x - x_i)^2$ und $G_T(x) = \Delta G_{iT} - 1/2 m \omega_T^2(x - x_T)^2$, wobei $\omega = \sqrt{\kappa/m}$ die Schwingungsfrequenz des harmonischen Oszillators ist (m : Masse des schwingenden Systems), und nimmt eine hohe Energiebarriere $\Delta G_{iT} \gg k_B T$ sowie starke Dämpfung an, vereinfacht sich Gleichung 3.17 zu [50, 51]

$$t_f = \frac{2\pi\gamma_i}{\omega_i\omega_T m} \exp\left(\frac{\Delta G_{iT}}{k_B T}\right) = \frac{2\pi\omega_i\tau_0}{\omega_T} \exp\left(\frac{\Delta G_{iT}}{k_B T}\right), \quad (3.19)$$

mit der Rekonfigurationszeit $\tau_0 = \gamma_i/\kappa_i$ des Proteins. Für Faltung und Entfaltung gelten analoge Gleichungen, wobei der Vorfaktor für beide Richtungen unterschiedlich sein kann, abhängig von ω_i und ω_j .

Im einfachsten Fall sind die Frequenzen in Zustand i und T gleich, $\omega_i \approx \omega_T$. Gleichung 3.19 wird dann zu

$$t_f = 2\pi\tau_0 \exp\left(\frac{\Delta G_{iT}}{k_B T}\right). \quad (3.20)$$

In diesem Fall geht Gleichung 3.18 für die Ratenkonstante $k_{ij,0}$ in die Arrhenius-Gleichung 3.13 über, mit dem prä-exponentiellen Faktor $k_A = 1/(2\pi\tau_0)$.

3.4 Direkte Messung von Energielandschaften

Wenn ein Protein unter Kraft thermische Übergänge zwischen verschiedenen Zuständen vollzieht, durchläuft es alle entlang der Reaktionskoordinate liegenden Konformationen, auch die hochenergetischen Konformationen der Übergangszustände. Die Wahrscheinlichkeit $P_{Protein}(x)$, dass das Protein eine Position x auf der Reaktionskoordinate einnimmt, ist über eine Boltzmannverteilung mit seiner Energielandschaft $G_{Protein}(x)$ verknüpft:

$$P_{Protein}(x) = A \cdot \exp\left(-\frac{G(x)}{k_B T}\right) + C \quad (3.21)$$

(A und C sind Normierungskonstanten). Prinzipiell ist daher in der Verteilung der Aufenthaltswahrscheinlichkeit $P_{Protein}(x)$ (Aufenthaltsverteilung) des Proteins die vollständige Information über die zugrundeliegende Energielandschaft enthalten.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Aufenthaltsverteilung $P_{Protein}(x)$ des zwischen zwei Kugeln eingespannten Proteins (vgl. Abschnitt 2.3.1) indirekt über die Aufenthaltsverteilung der Kugeln $P_{Kugel}(x)$ gemessen werden. Die thermischen Fluktuationen der Proteinübergänge werden in diesem Fall von den thermischen Fluktuationen der Kugeln und DNA-Linker überlagert. Im Folgenden wird eine Methode vorgestellt, mit der aus der experimentell zugänglichen Aufenthaltsverteilung $P_{Kugel}(x)$ die Verteilung $P_{Protein}(x)$ des Proteins und damit seine vollständige Energielandschaft rekonstruiert werden kann.

3.4.1 Dekonvolution von System- und Proteinfluktuationen

Allgemein kann die Überlagerung der Proteinfluktuationen mit den Fluktuationen der Kugeln und DNA-Linker als Konvolution der Aufenthaltsverteilung $P_{Protein}(x)$ mit einer Punktbildfunktion $PSF(x)$ beschrieben werden:

$$P_{Kugel}(x) = PSF(x) \otimes P_{Protein}(x), \quad (3.22)$$

wobei \otimes das Faltungsintegral

$$P_{Kugel}(x) = \int_{-\infty}^{\infty} PSF(x - x') P_{Protein}(x') dx' \quad (3.23)$$

bezeichnet. In die näherungsweise gaussförmige Punktbildfunktion $PSF(x)$ gehen thermische Fluktuationen der Kugeln, DNA-Linker und des entfalteten Polypeptids ein. Prinzipiell erhält man die Aufenthaltsverteilung $P_{Protein}(x)$ bei bekannter $PSF(x)$ aus der Verteilung $P_{Kugel}(x)$ mit Hilfe einer Dekonvolution [4].

Die Aufenthaltsverteilung $P_{Kugel}(x)$ wurde in dieser Arbeit bei konstanter Distanz zwischen den Fallenzentren aufgenommen. Dies hat zur Folge, dass sich die wirkende Kraft bei einer Längenänderung des Proteins ändert. Aufgrund der nichtlinearen Elastizität der DNA-Linker (vgl. Gleichung 3.2), führt ein Sinken der Kraft zu einer Verbreiterung der Aufenthaltsverteilung $P_{Kugel}(x)$. Darüber hinaus vergrößern sich bei Entfalten des Proteins die thermischen Fluktuationen der entfalteten Polypeptidkette. Um diese Effekte zu berücksichtigen, wurde anstelle der früher verwendeten konstanten $PSF(x)$ [4] eine kontinuierliche ortsabhängige Punktbildfunktion $PSF^a(x)$ eingeführt, deren Breite von der Kugelposition a abhing. An der Position $a = x_N$ des vollständig gefalteten Proteins wurde die Breite der Punktbildfunktion von der Aufenthaltsverteilung einer Kugel-DNA-Hantel ohne eingeschlossenes Protein abgeleitet (Abbildung 3.5). An der Position $a = x_U$ des vollständig entfalteten Proteins wurde die Breite direkt an die Breite der gemessenen Verteilung $P_{Kugel}(x)$ angepasst, um die zusätzlichen thermischen Fluktuationen der entfalteten Polypeptidkette zu berücksichtigen. Die Breite der PSF s an jedem Punkt zwischen diesen Grenzen wurde durch lineare Interpolation berechnet.

Für die Dekonvolution wurde ein iterativer Ansatz gewählt [52]. Ausgangsverteilung $P^0(x)$ war die gemessene Verteilung $P_{Kugel}(x)$. Die $(n+1)$ te Iteration ist gegeben durch

$$P^{(n+1)}(x) = P^{(n)}(x) + r (P^{(n)}(x)) \cdot [P^{(0)}(x) - PSF^a(x) \otimes P^{(n)}(x)] \quad (3.24)$$

mit der Relaxationsfunktion

$$r (P^{(n)}(x)) = r_0 \cdot (1 - 2 |P^{(n)}(x)| - 1/2), \quad (3.25)$$

die das Ergebnis auf physikalische Werte $0 < P^{(n)}(x) < 1$ begrenzt, und der Amplitude r_0 , die die Konvergenzgeschwindigkeit bestimmt. In dieser Arbeit wurde durchgehend die Amplitude $r_0 = 1$ verwendet.

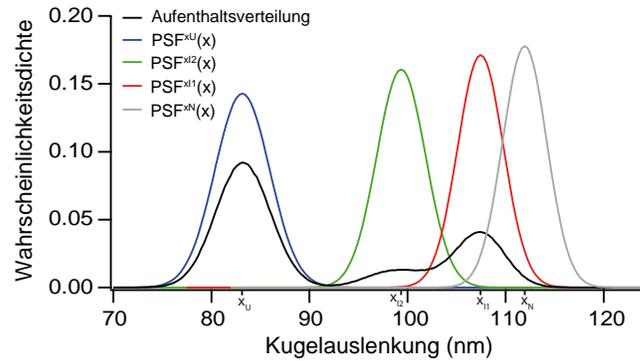


Abbildung 3.5: Veranschaulichung der ortsabhängigen Punktbildfunktion $PSF^a(x)$. Die glockenförmigen PSFs (rot und grün als Beispiele) wurden linear zwischen den beiden Grenzfällen des gefalteten Proteins an Position $a = x_N$ (grau, Breite einer Kugel-DNA-Hantel ohne Protein) und des entfalteten Proteins an Position $a = x_U$ (blau, Breite der gemessenen Verteilung) interpoliert. Die schwarze Verteilung ist die zu entfaltende gemessene Aufenthaltsverteilung der Kugeln (siehe Kapitel 4).

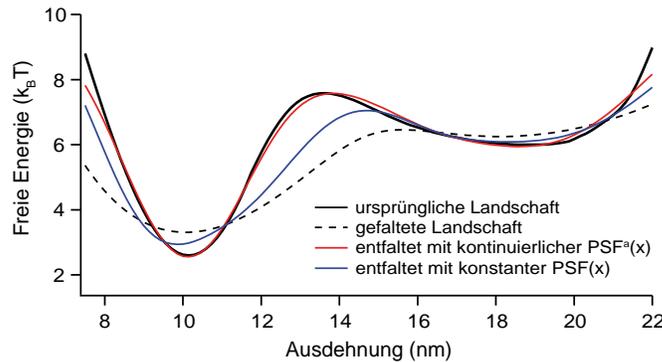


Abbildung 3.6: Ergebnis der Dekonvolution einer bekannten Verteilung (schwarz, kontinuierlich) mit konstanter $PSF(x)$ (blau) und mit kontinuierlicher $PSF^a(x)$ (rot) mit ortsabhängiger Breite. Die bekannte Verteilung wurde zuvor mit der kontinuierlichen Verteilung gefaltet (schwarz gestrichelt), um ein Experiment bei konstanten Fallenpositionen zu simulieren.

Bei der Dekonvolution erwies sich die neue ortsabhängige Punktbildfunktion $PSF^a(x)$ als notwendig, um Konvergenz zu erreichen. In Abbildung 3.6 ist das Ergebnis einer Simulation zum Vergleich der konstanten und der ortsabhängigen Punktbildfunktion gezeigt. Zunächst wurde eine bekannte Energielandschaft mit Gleichung 4.1 in eine Aufenthaltsverteilung umgerechnet und mit einer ortsabhängigen Punktbildfunktion $PSF^a(x)$ gefaltet, um ein Experiment bei konstanten Fallenpositionen zu simulieren. Anschließend wurde die Aufenthaltsverteilung sowohl mit einer konstanten $PSF(x)$ als auch mit der kontinuierlichen $PSF^a(x)$ entfaltet und die resultierenden Verteilungen

über Gleichung 4.1 zurückgerechnet. Die Dekonvolution mit der ortsabhängigen Punktbildfunktion reproduziert die ursprüngliche Energielandschaft. Dies ist bei Verwendung der konstanten Punktbildfunktion nicht der Fall.

Die Kugeln, zwischen denen das Protein eingespannt ist, folgen nicht instantan der Proteinbewegung, sondern diffundieren gemäß der Langevin-Dynamik (Gleichung 2.1.2). Sie halten sich daher eine gewisse Zeit zwischen den von den Proteinzuständen vorgegebenen Ruhelagen auf. Damit tragen sie zu einer Erhöhung der gemessenen Aufenthaltswahrscheinlichkeit zwischen den Ruhelagen bei. Dies wirkt sich in einer scheinbar niedrigeren Barrierenhöhe aus. Anders als die thermischen Fluktuationen der Kugeln um die Ruhelagen sind diese Beiträge nicht in der Punktbildfunktion enthalten und können daher nicht über die Dekonvolution aus der Aufenthaltsverteilung des Proteins herausgerechnet werden. In Anhang B.4 wird der Beitrag der Kugeln zur Energielandschaft durch Simulationen der Langevin-Dynamik der Kugel-DNA-Proteinhanteln abgeschätzt.

Für eine möglichst genaue Messung der Energielandschaft des Proteins ist es wünschenswert, die thermischen Fluktuationen der Kugeln und DNA-Linker zu minimieren. Dies kann erreicht werden, indem man das Differenzsignal der beiden Kugeln analysiert. Das Differenzsignal hat die Eigenschaft, dass gegenphasige Bewegungen der Kugeln, zum Beispiel bei Falten/Entfalten des Proteins, verstärkt werden, gleichphasige Bewegungen dagegen nicht [30]. Eine korrelierte Bewegung der Kugeln kann verstärkt werden, indem man die Verbindung zwischen ihnen versteift. Im Idealfall einer vollständig starren Verbindung ist das Differenzsignal der Kugeln rauschfrei. In Anhang B.5 wird der Effekt unterschiedlich steifer Linker zwischen den Kugeln auf die Rauschamplitude des Differenzsignals anhand von Langevin-Dynamik-Simulationen untersucht. Darüber hinaus werden erste Experimente zur Verminderung der Rauschamplitude mit kurzen dsDNA-Linkern und steifen DNA-Nanostrukturen vorgestellt.

Transformation von Energielandschaften

Eine Energielandschaft bei einer Vorspannung F_a kann in die Energielandschaft bei der Vorspannung F_b umgerechnet werden, indem an jeder Position x die Differenz der Energiebeiträge der Kugeln, DNA-Linker und des entfalteten Proteins gemäß Gleichung 3.8 addiert werden. Die Integrationsgrenzen der Gleichungen 3.5-3.7 hängen von der momentanen Länge an Position x des entfalteten Proteins ab.

Kapitel 4

Die vollständige orts aufgelöste Faltungslandschaft eines Proteins

In diesem Kapitel werden Experimente zur Bestimmung der vollständigen orts aufgelösten Energielandschaft eines einzelnen Proteins mit Hilfe einer zweistrahligen optischen Pinzette vorgestellt. Über Dekonvolutions-Kraftspektroskopie¹, kann dem Bewegungsverlauf eines einzelnen Moleküls des GCN4 Leucin Zippers mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung gefolgt werden. Die vorgestellte Methode lässt sich leicht auf andere Moleküle übertragen und ermöglicht einen modellfreien Zugang zur Energielandschaft von Proteinen.

4.1 Der Transkriptionsfaktor GCN4

Der Transkriptionsfaktor GCN4 wird aktiviert, wenn sich Hefe-Zellen (*Saccharomyces cerevisiae*) in einer Umgebung befinden, in der Aminosäuremangel herrscht. Er induziert die Transkription von mehr als dreißig Genen zur Biosynthese von Aminosäuren [53]. Die spezifische Erkennung der DNA-Bindungsstelle und die Bindung an DNA erfolgt über ein Motiv, das in über dreißig eukaryotischen Proteinen enthalten ist (Abbildung 4.1) [54]. Das DNA-Bindungsmotiv besteht aus 2 α -Helizes, die mit den Basen der DNA interagieren. Die α -Helizes gehen übergangslos in einen dimerisierenden Bereich über, die Leucin Zipper Domäne.

Die α -Helizes der GCN4 Leucin Zipper Domäne dimerisieren über eine sogenannte Superhelix- oder Coiled-Coil-Struktur. Bei diesem Faltungsmotiv winden sich im einfachsten Fall zwei α -Helizes entlang eines gemeinsamen Kerns aus hydrophoben Aminosäuren umeinander [55]. Entsprechend der Geometrie einer α -Helix muss dafür abwechselnd jede dritte oder vierte Aminosäure hydrophob sein. Die kleinste Unter-

¹Im Folgenden wird der Ausdruck Dekonvolution statt Entfaltung verwendet, um Verwechslungen mit der Entfaltung eines Proteins zu vermeiden.

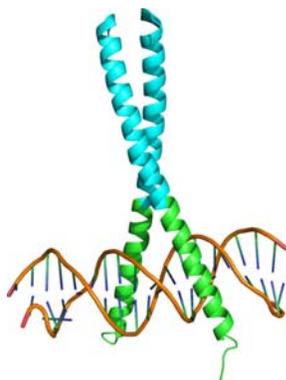


Abbildung 4.1: *Struktur des DNA-Bindungsmotivs des Transkriptionsfaktors GCN4. Die DNA-Bindungseinheit besteht aus zwei α -Helizes (grün), die mit Basen der großen Furche der DNA wechselwirken. Die α -Helizes werden über eine C-terminale Leucin Zipper Domäne (hellblau) dimerisiert.*

einheit aus sieben Aminosäuren wird Heptade genannt. Der Leucin Zipper von GCN4 besteht aus vier Heptaden, die eine zweisträngige Coiled-Coil bilden [56]. Die Aminosäuren des hydrophoben Kerns sind hauptsächlich Leucin und Valin.

Aufgrund ihres einfachen linearen Aufbaus und der definierten Wechselwirkung der Kern-Aminosäuren werden Coiled-Coils oft für Proteinfaltungsstudien verwendet. Auch die Faltung der Leucin Zipper Domäne von GCN4 wurde oft untersucht. Dabei wurde die Zipper Domäne als Zwei-Zustands-Falter klassifiziert [57]. Ensemble-Faltungsstudien haben gezeigt, dass die Faltung einer C-terminal verlinkten Coiled-Coil mit der Bildung eines Nukleationskeims an diesem Ende beginnt [58, 59]. Anschließend faltet sich die Coiled-Coil weiter in Richtung N-Terminus zusammen. Die Aktivierungsenergie und Faltungskinetik dieses Vorgangs wurde in Ensemble-Experimenten ausführlich untersucht [57, 60, 61]. Trotzdem ist über die Faltungslandschaft von GCN4 bis auf den Einfluss einzelner Aminosäuren, z.B. eines hydrophilen Asparagins im hydrophoben Kern [62], wenig bekannt. Frühere mechanische Einzelmolekülexperimente mit dem AFM (*Atomic Force Microscope*) lieferten Informationen zur mittleren Entfaltungskraft der Zipper Domäne [63, 64]. Die limitierte Kraftauflösung von AFM-Experimenten verhinderte jedoch die direkte Beobachtung von Faltungs- und Entfaltungsübergängen dieses Proteins.

Im Gegensatz zu vielen globulären Proteinen kann bei einer Coiled-Coil die mechanisch entfaltete Konturlänge direkt der Aminosäureposition der Entfaltungsgabel zugeordnet werden. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die Leucin Zipper Domäne des GCN4 daher ein ideales Modellprotein ist um mit der optischen Pinzette in Echtzeit Faltungs- und Entfaltungsfluktuationen zu untersuchen und die orts aufgelöste Energielandschaft des Proteins zu ermitteln.

4.2 Kraftspektroskopie an der GCN4 Leucin Zipper Domäne

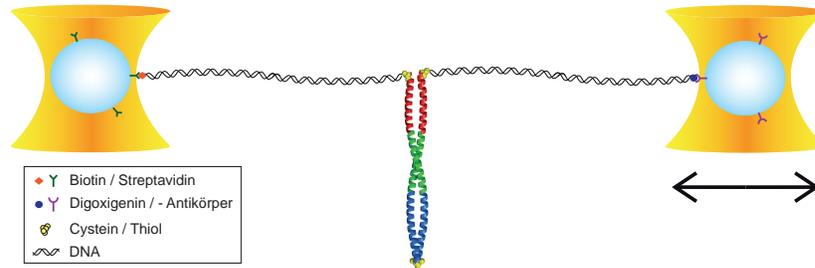


Abbildung 4.2: Skizze der Kugel-DNA-Protein-Hanteln für Kraftspektroskopie mit der optischen Pinzette. Das Protein ist über Disulfidbrücken an DNA-Linker gebunden. Die DNA-Linker werden über Biotin/Streptavidin bzw. Digoxigenin/Antikörper an Kugeln gebunden. Die Kugeln werden in optischen Fallen gefangen. Die Position einer Falle lässt sich verändern (schwarzer Doppelpfeil) und ermöglicht es, die Vorspannung auf das Molekül zu kontrollieren.

Die vollständige Energielandschaft eines GCN4 basierten Leucin Zippers wurde mit der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Methode der Einzelmolekül-Kraftspektroskopie mit der optischen Pinzette [31] untersucht. Abbildung 4.2 zeigt ein Schema des Experiments. An Stelle einer einzelnen Leucin Zipper Domäne (GCN4-p1) wurde ein Konstrukt aus drei hintereinander geschalteten GCN4-p1q Domänen verwendet (im Folgenden LZ26 bezeichnet [63])². Bei dieser Mutante des GCN4-p1 sind die f Positionen der Coiled-Coil zu Glutamin mutiert, um die Stabilität leicht zu erhöhen [59]. Die drei seriellen Zipper Domänen ermöglichten es, die Energielandschaft des GCN4-p1q gleichzeitig mit Keimbildung (blaue C-terminale Domäne in Abbildung 4.2) und ohne Keimbildung (grüne und rote N-terminale Domänen) zu untersuchen [64]. Das Protein wurde über DNA-Linker, die kovalent mit N-terminalen Cysteinen verbunden waren, zwischen zwei Polystyrol-Kugeln eingespannt (siehe Abschnitt 2.3.1 und Anhang B.1 für ein ausführliches Protokoll). Die beiden α -Helizes waren über eine Disulfidbrücke zwischen C-terminalen Cysteinen kovalent verknüpft, um ein vollständiges Auseinanderfallen der Helizes nach einer Entfaltung der Coiled-Coil zu verhindern. Über das Verfahren einer Kugel relativ zur Position der anderen Kugel konnte die Vorspannung auf das Protein kontrolliert werden.

²Die vollständige Aminosäuresequenz ist: MASR **MCQLEQK** **VEELLQK** **NYHLEQE** **VARLKQL** **VGELEQK** **VEELLQK** **NYHLEQE** **VARLKQL** **VGELEQK** **VEELLQK** **NYHLEQE** **VARLKQL** **VGECEGL** **EHHHHHH**; Kern-Aminosäuren sind fett hervorgehoben.

Ausschnitts). Unter Kraft werden bei der Entfaltung zwei Zwischenzustände (I_1 und I_2) bevölkert. Beginnend vom nativen Zustand N geht das Protein in einem Plateau-ähnlichen Übergang in I_1 über. Der Übergang zu I_2 erfolgt nahe am Gleichgewicht, es werden jedoch deutliche Fluktuationen des Moleküls zwischen den beiden Zwischenzuständen aufgelöst. Bei weiterer Belastung erfolgt ein letzter Übergang zur vollständig entfalteten Konformation U des Proteins. Bei Relaxation der äußeren Kraft faltet das Molekül wieder. Bei der Ziegeschwindigkeit von 500 nm/s entsteht eine Hysterese die zeigt, dass die Faltung des LZ26 bei dieser Geschwindigkeit nicht im Gleichgewicht erfolgt.

An die Kraft-Ausdehnungs-Kurven wurde ein serielles WLC-Modell, bestehend aus einem elastischen WLC für die DNA-Linker und einem einfachen WLC für das Protein (vgl. Abschnitt 3.1), angepasst (schwarze Linien in Abbildung 4.3). Auf diese Weise konnte der Konturlängenzuwachs eines Entfaltungsereignisses bestimmt werden. Abbildung 4.4 zeigt die entsprechenden Histogramme, die Werte sind in Tabelle 4.1 aufgeführt. Die gemessene Gesamtlänge des Proteins (62,4 nm) stimmt gut mit der erwarteten Länge von 61,5 nm überein (berechnet aus der Gesamtzahl der entfalteten Aminosäuren, dem Konturlängenzuwachs pro Aminosäure und einer Korrektur für den End-zu-End-Abstand [34]). Dies zeigt, dass das gesamte Molekül entfaltet wird. Die gemessenen Positionen der Zwischenzustände fallen mit den Positionen der Asparagine in der GCN4-p1q Sequenz zusammen. Aus früheren Messungen weiß man, dass diese Aminosäuren die GCN4-p1q-Coiled-Coil destabilisieren [63, 62].

Experimente bei konstanter Ziehgeschwindigkeit sind gut geeignet um das Faltungsmusters eines Proteins auszumessen. Eine quantitative Beschreibung von Konformationsfluktuationen (z.B. zwischen I_1 und I_2 in Abbildung 4.3) ist aufgrund der zeitlich veränderlichen Kraft aber umständlich und ungenau. Fluktuationen zwischen verschiedenen Zuständen eines Proteins lassen sich dagegen sehr gut mit Experimenten bei konstanter Vorspannung untersuchen³. In Abbildung 4.5 (oberer Graph) ist eine Aufnahme des LZ26 bei einer Vorspannung von 14,1 pN gezeigt. Eine Vergrößerung des mit einem roten Rechteck markierten Abschnitts (unterer Graph) zeigt, dass das Protein Übergänge zwischen den Zwischenzuständen I_1 und I_2 (rote und grüne gestrichelte Linie) sowie dem vollständig entfalteten Zustand U (blaue gestrichelte Linie) durchläuft⁴. Die geringe Drift der optischen Pinzette erlaubte die Beobachtung von Faltungs-/Entfaltungsfuktuationen des Proteins bei konstanter Vorspannung über mehrere Minuten. Dies entspricht bei der schnellen Kinetik zwischen I_1 und I_2 mehreren tausend Übergängen des Proteins.

³Im Folgenden bezeichnet die Vorspannung die mittlere Kraft, die an Zustand I_1 anliegt. Die Kraft ist in diesen Experimenten nicht konstant, sondern ändert sich bei einer Konformationsänderung des Proteins.

⁴Die Zustände können über eine Berechnung der Konturlängenzuwächse mit Hilfe des seriellen WLC-Modells, den gemessenen Kugelauslenkungen und dem bekannten absoluten Kugelabstand einer Proteinkonformation zugeordnet werden.

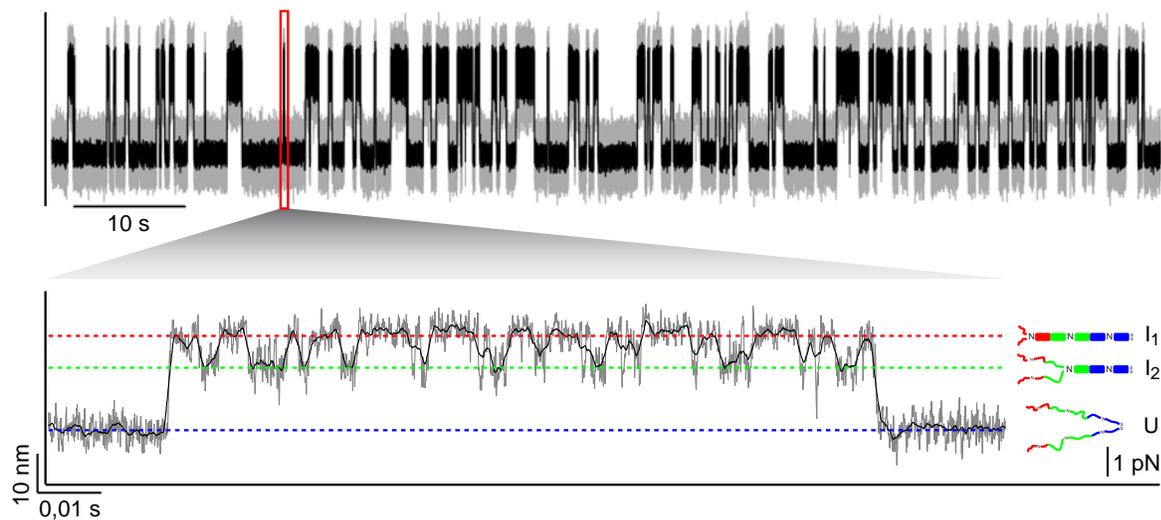


Abbildung 4.5: *Kraft-Zeit-Aufnahme der LZ26-Coiled-Coil bei einer Vorspannung von 14,1 pN (oberer Graph). In der Vergrößerung (unterer Graph) des mit einem roten Rechteck markierten Zeitabschnitts erkennt man Übergänge zwischen den Zuständen I_1 (rot gestrichelte Linie), I_2 (grün gestrichelte Linie) und U (blau gestrichelte Linie). Die Struktur dieser Zustände ist rechts skizziert.*

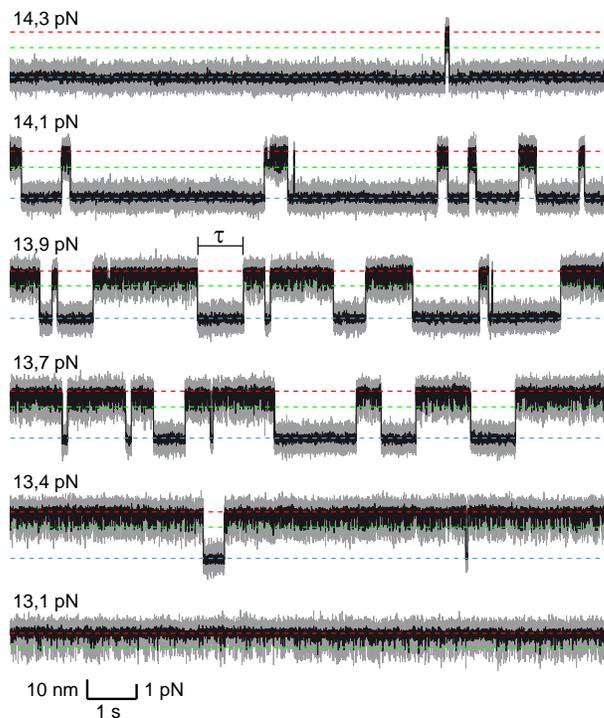


Abbildung 4.6: *Kraft-Zeit-Aufnahmen der LZ26-Coiled-Coil bei verschiedenen Vorspannungen. Die gestrichelten Linien kennzeichnen dieselben Zustände wie in Abbildung 4.5.*

In einer Fortführung des Experiments bei konstanter Vorspannung wurde der absolute Abstand zwischen den Kugeln, und damit die Vorspannung, im Abstand von wenigen Minuten um ca. 6 nm (0,2 bis 0,3 pN) erhöht (Abbildung 4.6). Dies bewirkt eine Verschiebung der Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Proteins vom gefalteten zum entfalteten Zustand. Die Kraft-Zeit-Aufnahmen aus Abbildung 4.6 enthalten sehr viele energetische und kinetische Informationen über den Faltungsprozess des Proteins. Dies wird in den folgenden Abschnitten besprochen.

4.2.1 Die Energielandschaft aus kinetischen Parametern

Abbildung 4.7A zeigt die Aufenthaltswahrscheinlichkeitsdichte der Kugeln als Funktion der Vorspannung. Man erkennt deutlich die Verschiebung der Aufenthaltswahrscheinlichkeit zu kleineren Kugel-Auslenkungen (stärker entfaltetem Protein) mit wachsender Vorspannung. An die Wahrscheinlichkeitsdichte wurde eine Gaussverteilung mit drei Peaks angepasst. Die einzelnen Komponenten spiegeln die drei Zustände des LZ26 wider. Sie sind in Abbildung 4.7A für die Vorspannung von 13,7 pN beispielhaft eingezeichnet (rote, grüne und blaue Linie). Die Fläche unter den einzelnen Komponenten entsprechen in guter Näherung der Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Proteins im zugehörigen Zustand. Mit der Boltzmann-Verteilung (Gleichung 3.10 in Abschnitt 3.2) kann aus dem Verhältnis der Besetzungswahrscheinlichkeiten die Energiedifferenz der Zustände in Abwesenheit äußerer Kraft berechnet werden. Die Differenz in freier Ener-

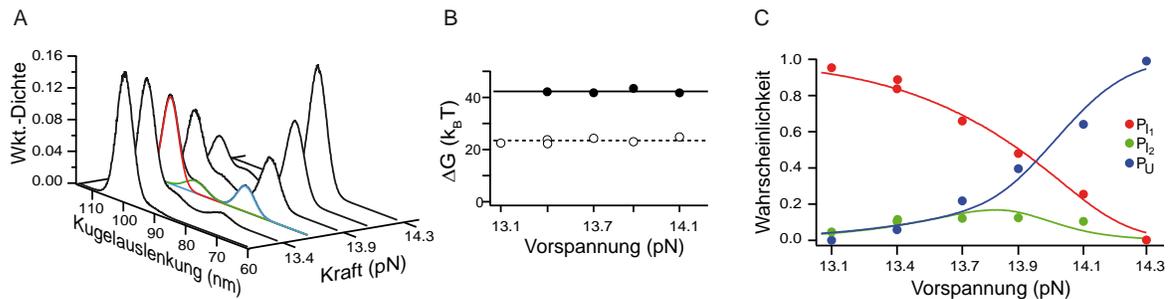


Abbildung 4.7: *Energetische Charakterisierung der LZ26-Coiled-Coil. (A) Wahrscheinlichkeitsdichten der Kugelposition der Aufnahmen in Abbildung 4.6. Farbige Linien sind Komponenten eines Gauss-Fits an die Verteilung bei 13,7 pN. (B) Unterschiede der freien Energie zwischen den Zuständen I_1 und I_2 (offene Symbole) und I_2 und U (geschlossene Symbole) als Funktion der Vorspannung. (C) Wahrscheinlichkeit, das Protein in einem der drei Zustände zu finden, als Funktion der Vorspannung.*

gie zwischen den Zuständen I_1 und I_2 sowie I_2 und U ist in Abbildung 4.7B bei verschiedenen Vorspannungen gezeigt. Die Energiedifferenzen in Abwesenheit von Kraft ändern sich nicht mit der angelegten Vorspannung. In Tabelle 4.1 sind die Mittelwerte der Energiedifferenz aufgeführt. Trägt man direkt die Aufenthaltswahrscheinlichkeit

eines Zustands gegen die Vorspannung auf, ergeben sich die in Abbildung 4.7C gezeigten Verläufe. Sie lassen sich mit Gleichung 3.11 und ähnlichen Werten wie den in Abbildung 4.7B ermittelten gut beschreiben.

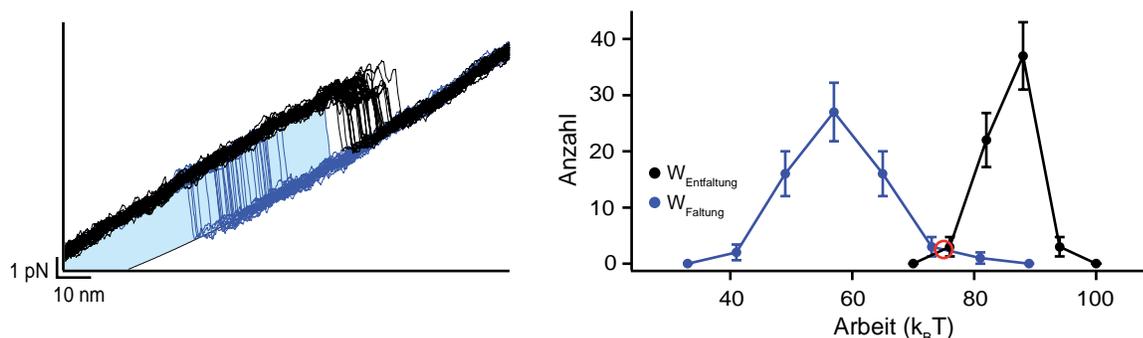


Abbildung 4.8: *Gesamtenergie der LZ26-Coiled-Coil mit Hilfe von Crooks' Fluktuationstheorem. (A) Die mit dem System assoziierte Arbeit bei Faltung oder Entfaltung ist durch die Fläche unter einer Kraft-Kurve als Funktion des Fallenabstands abzüglich des WLC des DNA-Linkers gegeben. (B) Histogramm der Faltungs- (blau, $n = 65$) und Entfaltungsarbeit (schwarz, $n = 65$) des LZ26 bei einer Ziehgeschwindigkeit von 500 nm/s (insgesamt 10 Moleküle). Nach Crooks ist die freie Energie des LZ26 durch den Schnittpunkt der beiden Verteilungen bestimmt (roter Kreis).*

Der native Zustand stellt bei den angelegten Vorspannungen über 13 pN kein Energieminimum mehr dar (vgl. Abbildung 4.14) und ist daher nicht stabil bevölkert. Daher können die Energiedifferenzen relativ zu N nicht aus den Aufenthaltsverteilungen aus Abbildung 4.7 bestimmt werden. Um dennoch die gesamte freie Faltungsenergie des LZ26 zu erhalten, wurde das Fluktuationstheorem von Crooks verwendet (siehe Abschnitt 3.2.2 und Gleichung 3.12)[43, 65]. Es besagt, dass die freie Gleichgewichtsenergie eines Proteins durch den Schnittpunkt zwischen den Verteilungen von Faltungs- und Entfaltungsarbeit aus Nichtgleichgewichtsexperimenten bestimmt ist. Abbildung 4.8A zeigt 37 Faltungs- (blau) und Entfaltungszyklen (schwarz) und verdeutlicht die Bestimmung der Arbeit als Fläche unter einer Kurve, korrigiert für die Elastizität der DNA-Linker. In Abbildung 4.8B sind die Verteilungen von Faltungs- (blau) und Entfaltungsarbeit (schwarz) bei einer Ziehgeschwindigkeit von 500 nm/s aufgetragen. Der Schnittpunkt (roter Kreis) ergibt die freie Energie des LZ26 von 75 $k_B T$.

Neben den freien Energien kann aus Kraft-Zeit-Aufnahmen wie in Abbildung 4.5 und 4.6 auch die Kinetik der Proteinübergänge ermittelt werden. Die Übergangsraten zwischen den Zuständen bei einer bestimmten Kraft erhält man aus den Verteilungen der Verweildauern τ des Proteins in einem Zustand (vgl. Abbildung 4.6 für eine Definition von τ). In Abbildung 4.9A und B sind beispielhaft einige Verweildauerverteilungen der Übergänge $I_1 \rightarrow I_2$ und $U \rightarrow I_2$ als integrierte Wahrscheinlichkeitsverteilungen dargestellt. Die Verweildauern sind einfach exponentiell verteilt.

Konstrukt	Verweildauer					Konturlänge	Aufenthaltsvert.
	$k_u^0 (s^{-1})^a$	$k_f^0 (s^{-1})^a$	$\Delta G^0 (k_B T)^{a,b}$	$\Delta x_u^\# (nm)^a$	$\Delta x_f^\# (nm)^a$	$\Delta x (nm)^c$	$\Delta G^0 (k_B T)^c$
N \rightarrow I ₁	-	-	-	-	-	9,3 \pm 1,1	9,6 \pm 1,1
I ₁ \rightarrow I ₂	(8,7 + 8,3 - 6,9) $\cdot 10^{-4}$	(6,9 \pm 4,1) $\cdot 10^7$	25,1 \pm 2,0	8,7 \pm 0,7	8,3 \pm 0,1	19,9 \pm 1,3	23,8 \pm 0,4
I ₂ \rightarrow U	(2,5 \pm 1,8) $\cdot 10^{-5}$	(1,7 + 4,3 - 1,2) $\cdot 10^{12}$ d	38,8 \pm 2,5	9,8 \pm 0,4	24,9 \pm 1,7 d	33,2 \pm 1,3	42,1 \pm 0,4
N \rightarrow U	-	(5,0 \pm 2,8) $\cdot 10^3$ e	-	-	7,9 \pm 0,6 e	62,4 \pm 1,0	75 \pm 3 f

^aFehler sind eine Kombination aus statistischen und systematischen Fehlern aufgrund der Unsicherheit der Federhärten-Kalibrierung.

^bAus dem Verhältnis der kraftfreien Ratenkonstanten.

^cFehler sind \pm s.d.

^dFit zu den Ratenkonstanten oberhalb 10,9 pN.

^eFit zu den Ratenkonstanten unterhalb 10,9 pN.

^fAus dem Fluktuationstheorem von Crooks.

Tabelle 4.1: *Energetische und kinetische Eigenschaften der LZ6-Coiled-Coil.*

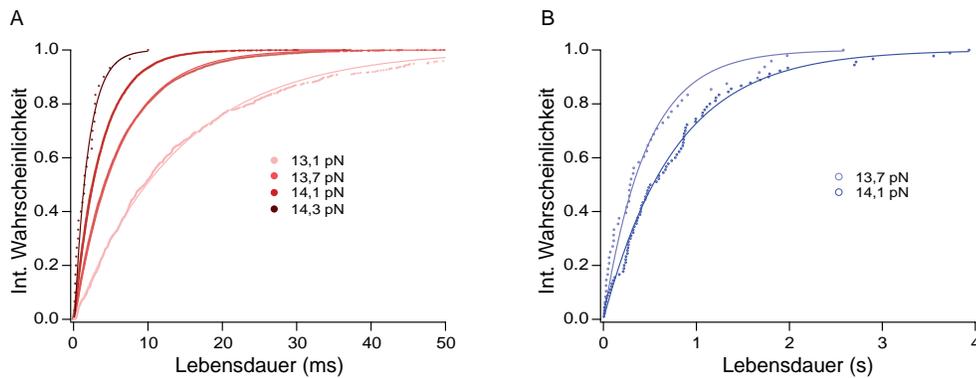


Abbildung 4.9: *Integrierte Wahrscheinlichkeiten der Lebensdauern der LZ26-Coiled-Coil bei verschiedenen Vorspannungen. (A) Lebensdauern des LZ26 im Zustand I₁. (B) Lebensdauern des LZ26 im Zustand U.*

Trägt man die Ratenkonstanten als Funktion der Startkraft eines Übergangs auf, erhält man den in Abbildung 4.10 gezeigten Graphen. Aus diesem Graphen lassen sich die Faltungs- und Entfaltungsratenkonstanten in Abwesenheit einer äußeren Kraft sowie die Positionen von Übergangsbarrieren ermitteln [66]. Dazu wurde an die Daten ein modifiziertes Arrhenius-Modell angepasst (Gleichung 3.16 in Abschnitt 3.3.1). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Eine Abschätzung zu den Fehlern der Ratenkonstanten ist in Anhang B.2 gegeben.

Die Differenz der freien Energie von $25 k_B T$ zwischen I₁ und I₂, die man aus dem Verhältnis der kraftfreien Ratenkonstanten erhält, stimmt gut mit den $24 k_B T$ überein, die aus den Aufenthaltswahrscheinlichkeitsverteilungen berechnet wurden. Die Summe der Positionen der Übergangsbarrieren von 17 nm zwischen diesen Zuständen passt ebenfalls zu dem Konturlängenzuwachs von 20 nm, der aus den Kraft-Abstands-Kurven ermittelt wurde (vgl. Tabelle 4.1). Der Wert für die kraftfreie Faltungsratenkonstante von $5 \cdot 10^3 s^{-1}$ liegt am unteren Rand der Raten, die in Ensemble-Studien gemessen wurden ($7,5 \cdot 10^3 - 2 \cdot 10^5 s^{-1}$) [58, 57]. Dies kann an der Einschränkung auf einen einzigen Faltungspfad bei Anlegen einer äußeren Kraft liegen.

Bemerkenswerterweise weist der Verlauf der Rückfaltungsrates (U \rightarrow I₂, offene blaue

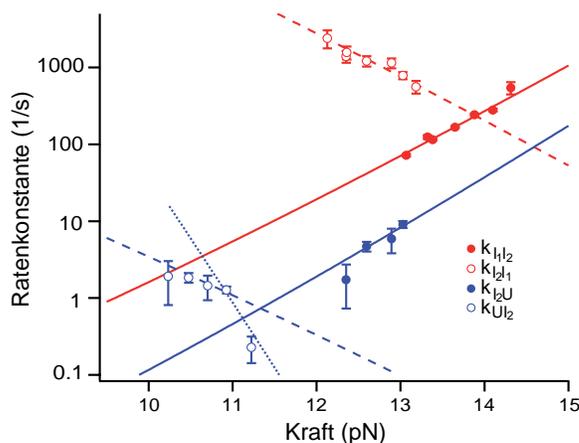


Abbildung 4.10: *Faltungs- und Entfaltungs-Ratenkonstanten der LZ26-Coiled-Coil als Funktion der Kraft. An die Ratenkonstanten wurde Gleichung 3.16 angepasst. Bei Faltung von Zustand U nach I_2 ändert sich der Verlauf der Ratenkonstanten ab einer Kraft von 10,9 pN.*

Symbole in Abbildung 4.10) bei ~ 11 pN einen Knick auf. Prinzipiell bewirkt die starke Kraftabhängigkeit der entfalteten Proteinkonformation eine Krümmung der Faltungs-ratenkonstante als Funktion der Kraft (vgl. Abschnitt 3.3.1) [67]. Dieser Effekt ist jedoch zu gering um den Knick in Abb. 4.10 zu erklären. Der abrupte Sprung der Steigung ist daher ein Hinweis auf einen Wechsel der Übergangsbarriere bei der Rückfaltung. Ein solcher Wechsel der Übergangsbarriere kann entweder von zwei sequentiellen Barrieren [48] oder einer breiten Barriere [68] verursacht werden. Der Verlauf der Rückfaltungs-rate wurde in zwei Bereiche aufgeteilt und getrennt ausgewertet. Bei Kräften unter 11 pN (gestrichelte blaue Linie) beträgt die gemessene Distanz zur Übergangsbarriere ca. 2 Heptaden. Dies entspricht dem bereits früher gemessenen Nukleationskeim der Coiled-Coil-Bildung [59, 64]. Bei Kräften oberhalb von 11 pN (gepunktete blaue Linie) beträgt die Distanz zur Faltungsbarriere 25 nm. Diese Position der zweiten Barriere addiert sich mit der Position des umgekehrten Übergangs von 10 nm (blaue Linie) zu der vollen Konturlänge zwischen den Zuständen I_2 und U (vgl. Tabelle 4.1). Der einzelne Datenpunkt des Übergangs $U \rightarrow I_2$ bei 11,2 pN ist nicht der einzige Anhaltspunkt für die Existenz einer Doppelbarriere. Wenn man diesen Datenpunkt aus der Analyse ausklammert, addieren sich die Positionen der Übergänge $U \rightarrow I_2$ (~ 8 nm, gestrichelte blaue Linie) und des umgekehrten Übergangs nicht zur vollen Länge zwischen beiden Zuständen, was wieder auf die Existenz einer verborgenen zweiten Barriere hindeutet.

In Abbildung 4.11 ist der Verlauf der Energiedifferenz zwischen entfaltetem Zustand und erster (blaue Linie) bzw. zweiter Barriere (gestrichelte blaue Linie) als Funktion der Kraft dargestellt. Zur Berechnung wurden die Energien aus Tabelle 4.1 und ein Vorfaktor von $1,2 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ angenommen (vgl. Abschnitt 4.2.2). Der Schnittpunkt beider

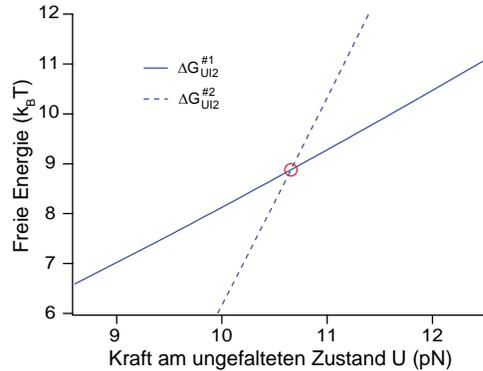


Abbildung 4.11: Verlauf der Energiedifferenz zwischen entfaltetem Zustand und Keimbildungsbarriere (blaue Linie) sowie zwischen entfaltetem Zustand und der zweiten Barriere als Funktion der Kraft, die auf den entfalteten Zustand wirkt. Der rote Kreis markiert die Kraft von 10,7 pN, ab der die zweite Barriere dominierend wird.

Linien (roter Kreis) gibt die Kraft an, ab der die zweite Barriere dominierend wird. Sie stimmt mit 10,7 pN gut mit der gemessenen Kraft von 10,9 pN überein.

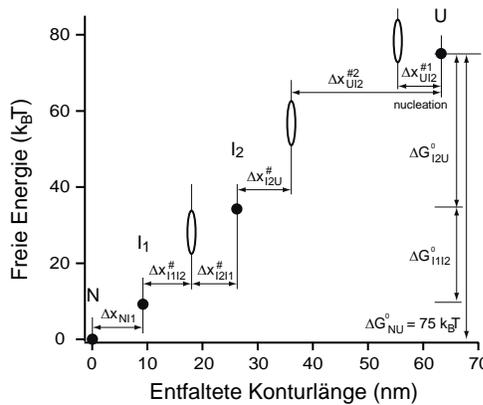


Abbildung 4.12: Energielandschaft der LZ26-Coiled-Coil aus kinetischen Parametern. Bei den geschlossenen Punkten sind Energie und Position bekannt. Bei den offenen Ellipsen ist nur die Position bekannt. Die genaue Energie hängt vom Vorfaktor der Faltung ab. Die Höhe der Ellipsen entspricht einem Intervall des Vorfaktors von $(10^{-3} - 10^{-7}) s^{-1}$.

Die im Verlauf der bisherigen Analyse erhaltenen Energien und Barrierenpositionen definieren die wichtigen Punkte entlang der Faltungslandschaft, die mit einer Kombination aus Gleichgewichts und Nichtgleichgewichts-Experimenten gewonnen werden können. Dies ist in Abbildung 4.12 dargestellt (gefüllte Kreise). Die Bestimmung von Barrierenhöhen aus kinetischen Daten ist jedoch nur möglich, wenn die Übergangszeit des Proteins, d.h. der prä-exponentielle Faktor der Arrhenius-Gleichung (vgl. Gleichung

3.13), bekannt ist. Der prä-exponentielle Faktor konnte früher nur indirekt bestimmt werden und wurde auf ein Intervall 10^3 bis 10^7 s^{-1} eingeschränkt [69]. Die Höhen der Barrieren in Abbildung 4.12 sind daher mit großem Fehler eingezeichnet (offene Ellipsen).

Im folgenden Abschnitt wird eine Möglichkeit vorgestellt, wie der Verlauf der Energielandschaft über die Sützpunkte aus Abbildung 4.12 hinaus ermittelt werden kann. Die Methode erlaubt des weiteren eine modellfreie Bestimmung des Vorfaktors der Proteinfaltung.

4.2.2 Die vollständige orts aufgelöste Energielandschaft

Wenn ein Protein zwischen entfaltetem und gefaltetem Zustand fluktuiert, tastet es alle möglichen Konformationen, auch hochenergetische Zustände wie Übergangszustände, ab. Daher ist die Beschreibung der Positionsverteilungen aus Abbildung 4.7A mit reinen Gaussverteilungen nicht vollständig. Besonders die seltenen Ereignisse in denen das Protein einen hochenergetischen Zustand entlang des Faltungspfades bevölkert, sollten zusätzliche detailreichere Informationen über die Energielandschaft liefern. Prinzipiell kann die vollständige zugrunde liegende Energielandschaft mit der Boltzmannverteilung

$$G(X) = -k_B T \ln(P(X)) + c \quad (4.1)$$

aus der Aufenthaltswahrscheinlichkeitsverteilung berechnet werden [4, 70, 71]. Für DNA wurde von Woodside et al. gezeigt, dass Kraft-Zeit-Aufnahmen analog zu den Aufnahmen in Abbildung 4.5 dafür verwendet werden können [4].

Die in der optischen Pinzette messbaren Aufenthaltswahrscheinlichkeitsverteilungen der Kugeln (schwarze Linien in Abbildung 4.13A und C) enthalten neben den Fluktuationen des Proteins auch thermische Fluktuationen der DNA-Linker und der Kugeln selbst. Diese Beiträge sind mathematisch über eine Konvolution miteinander verknüpft (siehe Abschnitt 3.4). In dieser Arbeit wurde die von Woodside et al. vorgestellte vereinfachte Methode zur Dekonvolution der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten [4] erweitert, um die Bedingungen nichtkonstanter Kraft im Experiment und thermische Fluktuationen des bereits entfalteten Proteins zu berücksichtigen. Dazu wurde in der iterativen Dekonvolution eine Punktbildfunktion (PSF) verwendet, deren Breite von der Position abhängt (siehe Abschnitt 3.4). Die mit dieser Methode erhaltenen wahren Aufenthaltswahrscheinlichkeitsverteilungen des Proteins sind in Abbildung 4.13A und C rot eingezeichnet. Die mit Gleichung 4.1 aus den Verteilungen bei 13,7 und 14,1 pN berechneten Energielandschaften sind in Abbildung 4.13B und D gezeigt.

Um die Aussagekraft der wahren Faltungslandschaft des Proteins weiter zu erhöhen, wurde aus den Energielandschaften bei 13,7 und 14,1 pN eine mittlere Energielandschaft berechnet (Abbildung 4.14). Dafür wurde die Landschaft bei 13,7 pN auf eine Vorspannung von 14,1 pN umgerechnet (siehe Abschnitt 3.4). Die in Abbildung

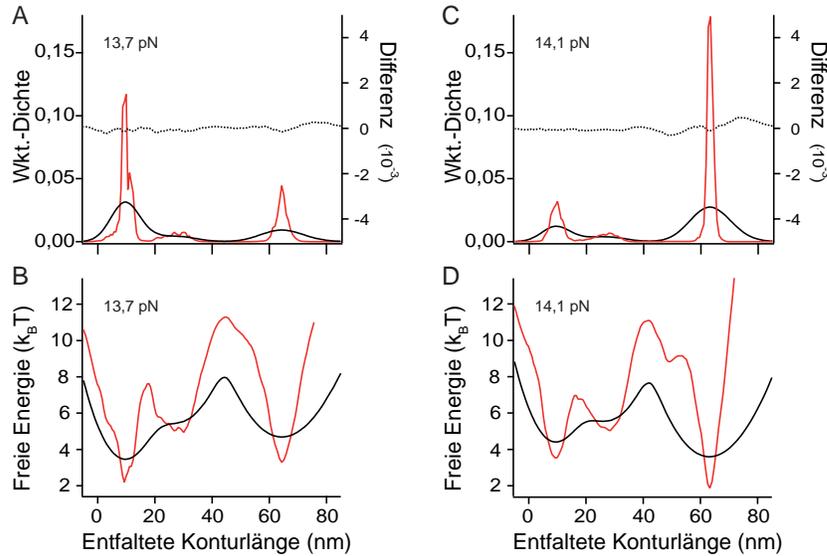


Abbildung 4.13: *Energielandschaft der LZ26-Coiled-Coil über Dekonvolution der Aufenthaltsverteilung der Kugeln. Die Aufenthaltsverteilung des Proteins (rot) geht durch Dekonvolution aus der Aufenthaltsverteilung der Kugeln (schwarz) hervor. Die gestrichelte Linie ist die Differenz zwischen Kugelverteilung und rückgefalteter Proteinverteilung. (A) Aufenthaltsverteilungen bei 13,7 pN Vorspannung. (B) Energielandschaft bei 13,7 pN Vorspannung. (C) Aufenthaltsverteilungen bei 14,1 pN Vorspannung. (D) Energielandschaft bei 14,1 pN Vorspannung.*

4.14 gezeigte Landschaft ist die vollständige orts aufgelöste Energielandschaft der LZ26-Coiled-Coil, gehalten in einer optischen Pinzette bei 14,1 pN Vorspannung. Aus der gemessenen Energielandschaft können direkt die Höhen der Übergangsbarrieren $\Delta G^*(F)$ abgelesen werden. Zusammen mit den gemessenen Übergangsraten $k(F)$ kann der prä-exponentielle Faktor k_A der Faltung des LZ26 in der optischen Pinzette aus $k_A = k(F) \exp(\Delta G^*(F)/k_B T)$ berechnet werden. Da die Barriere des Übergangs $I_1 \rightarrow I_2$ aufgrund der schnellen Kinetik ca. zehntausend Mal überwunden wird, wurde dieser Übergang für die Bestimmung des prä-exponentiellen Faktors herangezogen. Damit wurde der Wert $k_A = 1,2(+1,6 - 0,6) \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ berechnet.

Im folgenden Abschnitt werden die Qualität der gemessenen Energielandschaft sowie einige Schlussfolgerungen, die man aus ihrer Form ziehen kann, diskutiert.

4.2.3 Diskussion der orts aufgelösten Energielandschaft

In Abbildung 4.14A sind neben der gemessenen Energielandschaft des LZ26 auch die Stützpunkte der Landschaft aus den kinetischen Parametern eingezeichnet (offene und geschlossene Symbole). Für die Energien der Übergangszustände wurde der gemessene prä-exponentielle Faktor $k_A = 1,2 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ verwendet. Die direkt gemessene Landschaft

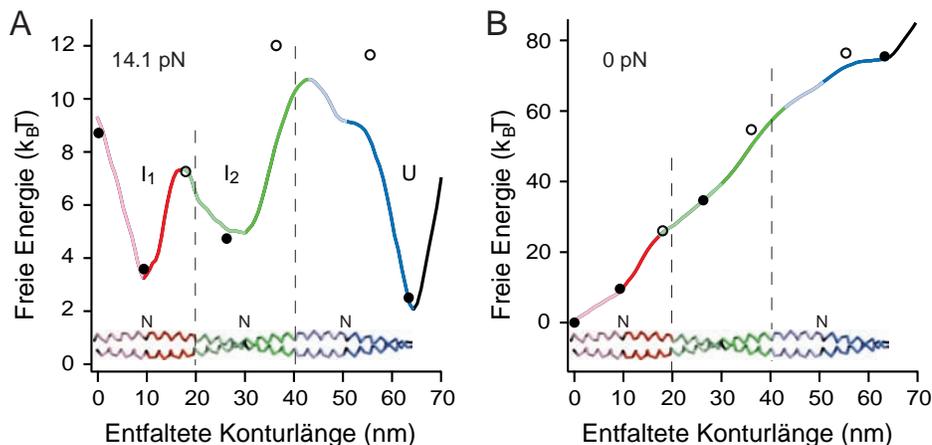


Abbildung 4.14: *Vollständige Energielandschaft der LZ26-Coiled-Coil. (A) Die Energielandschaft (farbige Linie) bei 14,1 pN ist ein Mittel der Landschaften bei 13,7 pN und 14,1 pN aus Abbildung 4.13, korrigiert auf die Kraftdifferenz. Die Punkte und Kreise sind die Stützpunkte der klassischen Energielandschaft aus Abbildung 4.12. Der Vorfaktor wurde direkt aus der Höhe der Barriere zwischen I_1 und I_2 der gemessenen Energielandschaft ermittelt und beträgt $1,2 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$. (B) Vollständige Energielandschaft und Stützpunkte der klassischen Landschaft ohne Kraft. Rot, grün und blau kennzeichnen die drei GCN4-p1q-Domänen. Helle Farben markieren die zwei N-terminalen, dunkle Farben die beiden C-terminalen Heptaden.*

und die Stützpunkte stimmen sehr gut überein. Insbesondere werden die Positionen der Übergangsbarrieren in der entfalteten Energielandschaft erstaunlich gut reproduziert.

Die Verlässlichkeit der gemessenen Energielandschaft lässt sich durch einen Vergleich der Dekonvolutionsergebnisse bei den Kräften 13,7 pN und 14,1 pN abschätzen. Nach einer Korrektur für den Kraftunterschied beträgt die Standardabweichung der Differenz zwischen beiden Landschaften $\pm 0,8 k_B T$. Insbesondere im Bereich des Übergangs $I_2 \rightarrow U$ ist aufgrund der geringen Anzahl an Übergängen (ca. 100) ein großer Fehler möglich. Die Form der gemessenen Energielandschaft kann darüber hinaus mit dem Näherungsmodell zur Berechnung der *first-passage-time* von Kramers, das die Krümmungen der Energielandschaft berücksichtigt (Gleichung 3.19), abgeschätzt werden. In Abbildung 4.15A wurde die Energielandschaft über Parabeln angenähert. Aus den Krümmungen der Parabeln, den Energiedifferenzen zwischen den Extrema und den gemessenen Raten kann mit Hilfe von Gleichung 3.19 der Reibungskoeffizient der Faltung berechnet werden (Abb. 4.15B). Innerhalb der Fehlergrenzen ist der Reibungskoeffizient entlang der Energielandschaft konstant und beträgt $3,2 \cdot 10^{-8} \text{ kg/s}$. Dies ist um den Faktor 1,7 größer als der Reibungskoeffizient einer Kugel-DNA-Hantel ($1,9 \cdot 10^{-8} \text{ kg/s}$). Dieser Reibungskoeffizient wird erwartet, da der aus der Barrierenhöhe bestimmte prä-exponentielle Faktor etwa der Kinetik des Systems entspricht. Umgelegt auf die einzelnen Krümmungen der Landschaft ergibt sich der Faktor 1,3, um den die

Landschaft steiler gemessen wird als erwartet.

Die Position des Minimas bei ca. 30 nm weicht bei der kinetischen Energielandschaft ca. 3 nm von der direkt gemessenen Intermediatsposition ab. Diese Verschiebung lässt sich mit der relativ flachen Landschaft in diesem Bereich erklären, die deutlich von einer Gaussfunktion abweicht. Die Verwendung einer Gaussfunktion zur Bestimmung der Intermediatsposition aus der Aufenthaltsverteilung der Kugeln führt daher bei der Landschaft aus den kinetischen Parametern zu einer Position näher am Übergangszustand.

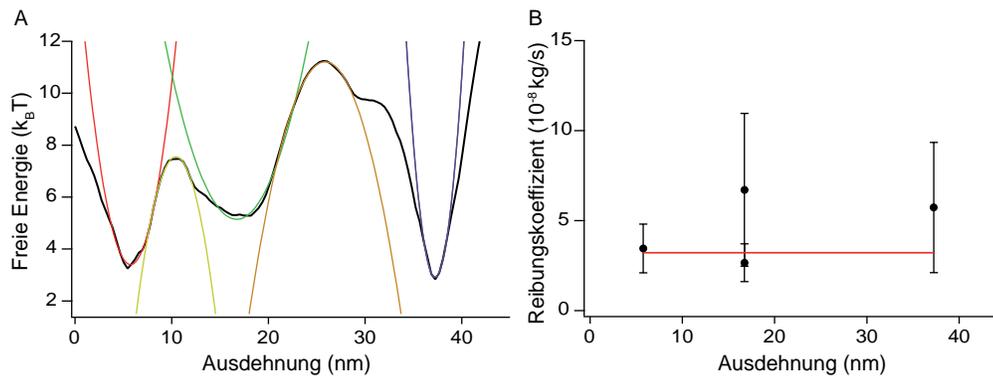


Abbildung 4.15: *Bestimmung des Reibungskoeffizienten der Faltung mit der Näherungsformel von Kramers. (A) Die Extrema der gemessenen Energielandschaft (schwarze Linie) wurden mit Parabeln (farbige Linien) genähert und mit Hilfe von Gleichung 3.19 und den bekannten Ratenkonstanten unter Kraft der Reibungskoeffizient berechnet. (B) Der Reibungskoeffizient an den verschiedenen Positionen der Energielandschaft (schwarze Kreise) und Fit unter der Annahme, dass der Koeffizient innerhalb der Fehlergrenzen konstant ist (rote Linie).*

Es ist oft nicht bekannt, ob breite Energiebarrieren, die in Proteinfaltungsexperimenten gemessen werden, auf mehrere energetisch gleiche Konformationen oder auf zwei serielle Barrieren, die nicht mehr getrennt aufgelöst werden können, zurückzuführen sind [72, 73]. Die breite Übergangsbarriere zwischen $I_2 \rightarrow U$ bei 40-60 nm weist zwei Maxima mit einer Einbuchtung bei ca. 55 nm auf. Dies deutet stark auf das Modell von zwei seriellen Barrieren hin. Damit wird die Interpretation des Knicks der Faltungsratenkonstante in Abbildung 4.10 durch die unabhängige Messung der Energielandschaft bestätigt. Interessanterweise liegt das zusätzliche Minimum dieser Doppelbarriere genau an der Position des Asparagins der C-terminalen GCN4-p1q Domäne. Dies ist konsistent mit den Positionen der Zwischenzustände I_1 und I_2 , die mit der Position eines Asparagins im hydrophoben Kern der Coiled-Coil zusammenfallen.

Eine Rücktransformation der freien Energielandschaft zu Bedingungen ohne äußere Kraft liefert die Energielandschaft in Abbildung 4.14B. Diese Landschaft enthält viele Details über die Stabilität und Faltung des LZ26 Leucin Zippers. Die freie Energie der Faltung der Coiled-Coil, die sich aus der kraftfreien Energielandschaft ablesen lässt,

stimmt mit ca. $75 k_B T$ sehr gut mit der Energie überein, die mit dem Fluktuationstheorem von Crooks bestimmt wurde. Man erkennt deutlich ein sich wiederholendes Muster, das die Zusammensetzung des LZ26 aus drei sequentiellen GCN4-p1q Domänen widerspiegelt.

Aus Wasserstoff-Austausch-Experimenten ist bekannt, dass die Faltung des C-terminal verbundenen GCN4-Peptids durch eine Barriere limitiert ist und deshalb ein Zwei-Zustands-System darstellt [57]. Die C-terminale Leucin Zipper Domäne des LZ26-Konstrukts (blau in Abbildung 4.14), die eine zu Ensemble-Messungen [57] vergleichbare freie Energie von $21 k_B T$ aufweist, faltet auch über eine Barriere. Diese Domäne enthält die Energiebeiträge der Keimbildung. Im Gegensatz dazu erfolgt die Faltung der zwei N-terminalen Domänen (grün und rot) *downhill* ohne Übergangsbarrrieren. Die beiden Zwischenzustände I_1 und I_2 werden nur unter Kraft bevölkert, wenn die Energielandschaft entsprechend verformt wird. Diese Eigenschaft von Kraftspektroskopie-Experimenten erlaubt es, den *downhill*-Bereich eines faltenden Proteins zu beobachten. Ein Vergleich der freien Energien der GCN4-p1q Domäne mit Nukleationskeim und den Domänen ohne Barriere ergibt einen Wert von $\sim 6 k_B T$ für die entropischen Beiträge der Keimbildung. Darüber hinaus zeigt die barrierefreie Faltung der fusionierten Domänen, dass sie ohne energetische Kosten zusammengesetzt werden können. Im Gegensatz dazu verhindert eine nicht-kanonische, hydrophobe Region am N-Terminus des Kinesin-Necks eine nahtlose Erweiterung der Coiled-Coil [74].

Bei den beiden N-terminalen Coiled-Coils erkennt man deutlich eine Zweiteilung des Energieprofils in zwei stabile C-terminale Heptaden (dunkle Farben in Abbildung 4.14) und zwei weniger stabile N-terminale Heptaden (helle Farben). Das destabilisierende Asparagin in der Mitte jeder GCN4-p1q Domäne besitzt kein lokalisiertes Energieminimum, sondern teilt den Zipper in zwei unterschiedlich stabile Bereiche auf. Es geht aus der gemessenen Energielandschaft jedoch nicht hervor, ob das Asparagin für die geringere Stabilität des N-terminalen Bereichs verantwortlich ist (also delokal wirkt) oder ob die Aminosäuren in diesem Bereich für sich weniger stabil sind. Ein Vergleich der Aminosäurepositionen zwischen einer nativen Domäne mit Asparagin und Domänen, bei denen das Asparagin durch Aminobuttersäure oder Lysin ersetzt wurde, lieferte keine Hinweise auf eine mögliche Verzerrung der Coiled-Coil-Struktur durch das Asparagin. Messungen mit dem AFM an LZ26, bei der das mittlere Asparagin durch Valin ersetzt wurde, zeigen, dass die angrenzenden N-terminalen Aminosäuren auch in diesem Fall eine geringere Stabilität haben [75]. Dies deutet auf eine lokale Wirkung des Asparagins hin. Die gemessene energetische Asymmetrie des Leucin Zippers hat möglicherweise eine physiologische Bedeutung, da das DNA-Bindungsmotiv des GCN4, das eine gewisse Flexibilität aufweisen muss, N-terminal an den dimerisierenden Leucin Zipper anschließt.

Die gemessene energetische Asymmetrie der GCN4 Leucin Zipper Domäne war bisher nicht bekannt, obwohl dieses System eines der am besten untersuchten Modelle für Proteinfaltung darstellt. Es gibt jedoch einige Experimente, die auf unterschiedliche

Stabilitäten der C- und N-terminalen Heptaden hinweisen. Hu et al. stellten fest, dass die beiden C-terminalen Heptaden weniger leicht Mutationen der Aminosäuren im hydrophoben Kern tolerieren als die N-terminalen Heptaden [76]. Innerhalb der α -Helizes der C-terminalen Heptaden gibt es mehr stabilisierende Salzbrücken [56]. Mutationen der Aminosäuren im hydrophoben Kern verhindern teilweise die Coiled-Coil-Bildung [77]. Die in dieser Arbeit gemessene Energielandschaft kann diese Experimente erklären. Sie liefert außerdem eine energetische Erklärung für das Vorhandensein von Triggersequenzen, die für die Faltung vieler natürlicher Coiled-Coils relevant sind [78, 79].

Der in dieser Arbeit direkt gemessene prä-exponentielle Faktor $k_A = 1,2 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ liegt am unteren Ende der erwarteten Werte von ca. $5 \cdot 10^6 - 5 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$, die für die Rate der Kontaktbildung innerhalb eines Moleküls gemessen wurde [80, 81]. Die Bindung des Proteins an die sehr viel größeren Kugeln könnte zu einer Verlangsamung der Proteindiffusion führen, da diese an die langsame Diffusion der Kugeln (ca. 10^4 s^{-1}) gekoppelt ist [82]. In diesem Fall würde die Barrierenhöhe der tatsächlichen Höhe entsprechen. Auf der anderen Seite könnte die Diffusion der Kugeln in der optischen Pinzette die Detektion schnellerer Proteinbewegungen verhindern und somit den prä-exponentiellen Faktor scheinbar verringern. Dieses Szenario wird durch Simulationen des Kugeleinflusses auf die Barrierenhöhe (Abschnitt B.4) unterstützt. Da die Kugeln dem Protein nicht instantan folgen, sondern mit der Langevin-Dynamik (Abschnitt 2.1.2) diffundieren, tragen sie scheinbar zur Barriere der Proteinenergielandschaft bei. Die Höhe der scheinbaren Barriere liegt nahe an der gemessenen Barrierenhöhe (Abschnitt B.4) und zeigt den dominierenden Einfluss der Kugeldiffusion. Darüber hinaus ist eine starke Kopplung zwischen Protein- und Kugeldynamik aufgrund der schnellen Relaxationszeit von ca. $3 \cdot 10^{-6} \text{ s}$ der gespannten Linker unwahrscheinlich [83]. Daher stellt der hier gemessene Wert eine untere Grenze für k_A dar. Diese untere Grenze liegt jedoch oberhalb früherer veröffentlichter Werte [84, 85].

Von Li und Mitarbeitern wurde ein Mechanismus der Proteinfaltung unter Kraft vorgeschlagen, bei der die Polypeptidkette über einen kooperativen Kollaps der gesamten Peptidkette faltet [86]. Bei AFM-Experimenten mit Kraftfeedback beobachteten die Autoren einen 0,01 bis 10 s langsamen kontinuierlichen Übergang vom entfalteten in den gefalteten Zustand. Dies steht in großem Kontrast zu den in dieser Arbeit gemessenen schnellen Übergangszeiten von ca. 10^{-4} s und dem ähnlich schnellen Wert aus Fluoreszenzmessungen der Faltung eines Proteins [85]. Zusätzlich spricht die gemessene hohe Energiebarriere bei großen Proteinausdehnungen gegen die Bildung eines kollabierten Zustands zu Beginn der Faltung der GCN4 Coiled-Coil.

4.3 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde anhand der GCN4 Leucin Zipper Domäne erstmalig für Proteine gezeigt, wie durch Dekonvolution von Gleichgewichtsfluktuationen eines Prote-

ins direkt die vollständige orts aufgelöste Faltungs-Energielandschaft des Proteins gemessen werden kann. Das Energieprofil kann mit dieser Methode auch auf der nativen Seite der Übergangsbarriere bestimmt werden. Die über den modellfreien Zugang der Dekonvolutions-Kraftspektroskopie gemessene Energielandschaft enthält wesentlich mehr Informationen als die über eine klassische kinetische Analyse bestimmbarer Stützpunkte. Darüber hinaus ist, im Gegensatz zu anderen Methoden, ein einzelnes Molekül ausreichend, um die gesamte Energielandschaft auszumessen.

Für die GCN4 Leucin Zipper Domäne konnte zum ersten Mal eine Aufteilung in zwei stabile C-terminale Heptaden und zwei weniger stabile N-terminale Heptaden gemessen werden. Es zeigt sich, dass der Leucin Zipper in Abwesenheit eines Nukleationskeims ein *downhill*-Falter ist. Außerdem zeigen die Messungen, dass mehrere Leucin Zipper nahtlos fusioniert werden können.

Über die vollständige Messung der Energielandschaft sind auch die Höhen von Energiebarrieren direkt zugänglich. Dies ermöglichte die direkte experimentelle Bestimmung des prä-exponentiellen Faktors der Arrhenius-Theorie für Übergangsraten.

Kapitel 5

Experimente zur Faltung von Calmodulin

In diesem Kapitel werden Kraftspektroskopie-Experimente mit der optischen Pinzette zur Faltung von Calmodulin vorgestellt. Zunächst werden die Faltungsmuster von Wildtyp-Calmodulin und von zwei Calmodulin-Mutanten miteinander verglichen. Anschließend wird die Kinetik einzelner Domänen dieser drei Konstrukte ausgemessen.

5.1 Das Signalprotein Calmodulin

Calmodulin spielt eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung extrazellulärer Reize auf intrazelluläre Signalwege. Dabei reagiert es auf einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels in Folge eines äußeren Signals [87]. Bindung von Ca^{2+} bewirkt eine Konformationsänderung von Calmodulin und versetzt es in die Lage, Proteine, die für Apoptose, Muskelkontraktion, Nervenwachstum und weitere Prozesse wichtig sind zu aktivieren. In vielen Fällen handelt es sich bei den Zielproteinen des Calmodulin um Kinasen, deren aktives Zentrum durch die Bindung von Calmodulin freigesetzt wird [88]. Die Sequenz von Calmodulin ist in praktisch allen Wirbeltieren konserviert [89].

Ohne gebundenes Ca^{2+} nimmt Calmodulin eine deaktivierte Struktur an, bei der sich zwei Domänen dicht zusammenlagern [90]. Durch die kooperative Bindung von Ca^{2+} wird das Protein gestreckt, und die beiden Domänen sind deutlich getrennt (Abbildung 5.1). Zwischen ihnen bildet sich eine freistehende α -Helix (Linker) aus. Die getrennten Domänen weisen exponierte hydrophobe Aminosäuren auf, die für die Bindung des Calmodulin an die meist α -helikalen Erkennungssequenzen des Zielproteins verantwortlich sind. Dabei falten sich beide Domänen um das Erkennungspeptid herum.

In früheren Experimenten zur Faltung unter Kraft von Calmodulin mit dem AFM konnten die unterschiedlichen Einflüsse von Ca^{2+} sowie dem Signalpeptid Mastoparan auf die Faltung des Proteins beobachtet werden [91]. In darauf folgenden Experimen-

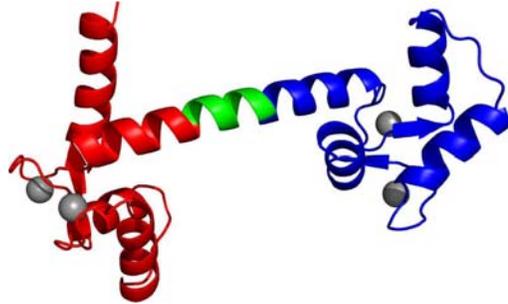


Abbildung 5.1: *Struktur des Ca^{2+} -assoziierten Calmodulin (PDB-ID 1CCL). Calmodulin weist in Anwesenheit von Calcium (graue Kugeln) zwei Domänen (rot und blau) auf, die über einen freistehenden α -helikalen Linker (grün) miteinander verbunden sind.*

ten wurden die Bindungseigenschaften weiterer Signalpeptide, wie skMLCK (*skeletal muscle myosin light chain kinase*) und CKK (*calmodulin dependent kinase kinase*) untersucht [92]. In beiden Studien wurden entweder Mutanten von Calmodulin zur leichteren Unterscheidung von N- und C-Domäne, isolierte Calmodulin-Domänen oder Fusionskonstrukte mit angehängtem Peptid verwendet. Über die Faltungseigenschaften des Wildtyp-Calmodulin unter Kraft ist dagegen nur wenig bekannt.

5.2 Calmodulin ist ein weiches und flexibles Protein

Da sich Calmodulin aufgrund seiner geringen mechanischen Stabilität und schnellen Faltungskinetik gut zur Untersuchung mit der hochauflösenden optischen Pinzette eignet, wurde in dieser Arbeit die Faltung von Wildtyp-Calmodulin mit der in den Kapiteln 2 und 4 vorgestellten Methode genauer untersucht. Interessant ist insbesondere, inwieweit sich N- und C-Domäne bei der Faltung unterscheiden und bei welchen Kräften der die beiden Domänen verbindende α -helikale Linker noch gefaltet vorliegt.

Die mechanischen Eigenschaften eines Proteins sind abhängig vom Angriffspunkt der angelegten Kraft [93]. Um ein umfangreicheres Bild der Calmodulinfaltung zu bekommen, wurde daher neben der NC-terminalen Zugrichtung (CaM NC) auch eine Zugrichtung untersucht, bei der die Kraft jeweils innerhalb der N- und C-Domäne anliegt (CaM 38/118). Zur Unterscheidung der beiden Domänen bei NC-terminaler Zugrichtung wurde zudem ein bereits in den AFM-Experimenten verwendetes Konstrukt untersucht, bei dem eine Disulfidbrücke innerhalb der C-Domäne ausgebildet wird (CaM 128/144) [91].

Um das Calmodulin mit der optischen Pinzette untersuchen zu können, wurde sowohl an CaM NC als auch an CaM 128/144 jeweils N- und C-terminal ein Ubiquitin fusioniert, das an seinem N- bzw. C-Terminus ein Cystein aufwies. An diese Cystei-

ne wurden die Thiol-modifizierten Oligonukleotide wie in Abschnitt 2.3 beschrieben angehängt. Die Reaktion zwischen den Oligonukleotiden und Cysteinen direkt am N- und C-Terminus des Calmodulin erwies sich als nicht effizient. Die Verwendung von Ubiquitin, das sehr hohe Entfaltungskräfte von ca. 100 pN aufweist, als Anknüpfungsproteine für die DNA-Linker lässt eine sehr einfache Erweiterung der Methode auf andere Proteine zu. Die Anbindung der Thiol-Oligonukleotide an das Konstrukt CaM 38/118 erfolgte hingegen direkt an Cysteine, die an den Positionen 38 und 118 in das Calmodulin mutiert wurden.

Die Experimente wurden in einem Puffer durchgeführt, der 10 mM Calcium enthielt (50 mM Tris, pH 8.0; 150 mM KCl; 10 mM Ca) um Calmodulin zu stabilisieren und die Rückfaltung zu beschleunigen [91]. Der Puffer enthielt außerdem 5-10 mM Ascorbinsäure, um leicht reduzierende Bedingungen zu erreichen, ohne die Disulfidbrücken zwischen Protein und DNA oder innerhalb des Proteins zu trennen. Die Zugabe von Ascorbinsäure erwies sich als notwendig, um homogene Faltung von Calmodulin zu beobachten.

5.2.1 Faltungsmuster von Calmodulin

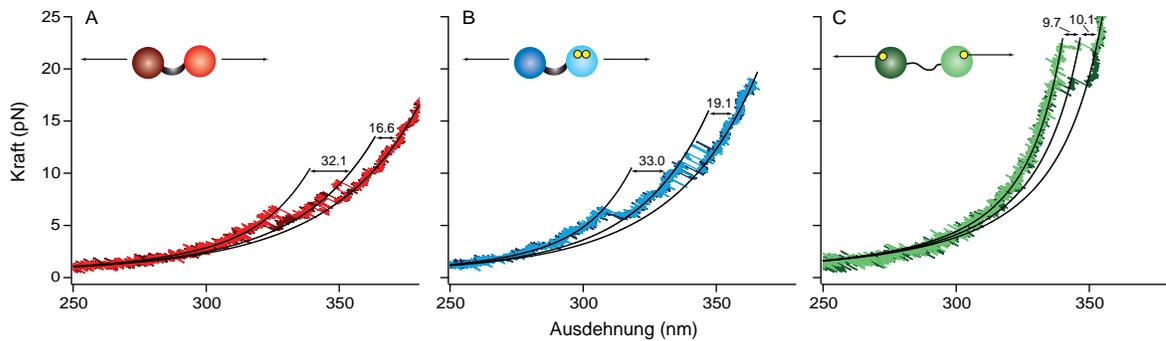


Abbildung 5.2: *Kraft-Abstands-Kurven von Calmodulin bei drei verschiedenen Untersuchungsgeometrien. (A) Calmodulin bei NC-terminaler Belastungsrichtung (CaM NC). (B) Calmodulin mit einer Disulfidbrücke zwischen den Aminosäuren 128 und 144 der C-terminalen Domäne (CaM 128/144). (C) Calmodulin bei Belastung zwischen den Aminosäuren 38 und 118 (CaM 38/118). Helle Farben kennzeichnen Entfaltungs-, dunkle Farben Faltungskurven. Schwarze Linien sind ein an die Daten angepasstes serielles WLC-Modell. Die Zahlen geben die Konturlängenzuwächse des entfaltenen Proteins an.*

Der relative Abstand der beiden Polystyrolkugeln, zwischen denen das Calmodulin eingespannt war, wurde zunächst mit einer konstanten Geschwindigkeit vergrößert bzw. verkleinert, um in Kraft-Abstandskurven das Faltungsmuster von Calmodulin zu erhalten. In Abbildung 5.2 sind charakteristische Faltungs- und Entfaltungskurven von CaM NC (A), CaM 128/144 (B) und CaM 38/118 (C) bei einer Ziehgeschwindigkeit

von 100 nm/s gezeigt. Alle drei Konstrukte weisen einen Zwischenzustand I auf, der sowohl bei Entfaltung des nativen Moleküls (N), als auch bei Faltung des entfalteten Polypeptids (U) bevölkert wird. Im Vergleich zu CaM NC, das zwischen 6 und 10 pN entfaltet, ist die Entfaltung des Zwischenzustands (I \rightarrow U) bei CaM 128/144 zu höheren Kräften hin verschoben. Der erste Entfaltungsübergang, N \rightarrow I, findet bei beiden Konstrukten bei einer Kraft von ~ 6 pN statt. Die Übergänge N \rightarrow I und I \rightarrow U erfolgen nahe des Gleichgewichts und schnelle Fluktuationen zwischen den drei Konformationen N, I und U sind erkennbar. Bei CaM 38/118 finden beiden Übergänge bei höheren Kräften zwischen 17 und 22 pN statt. Die Konturlängenzuwächse sind kleiner und es tritt eine Hysterese zwischen Entfaltung und Faltung auf.

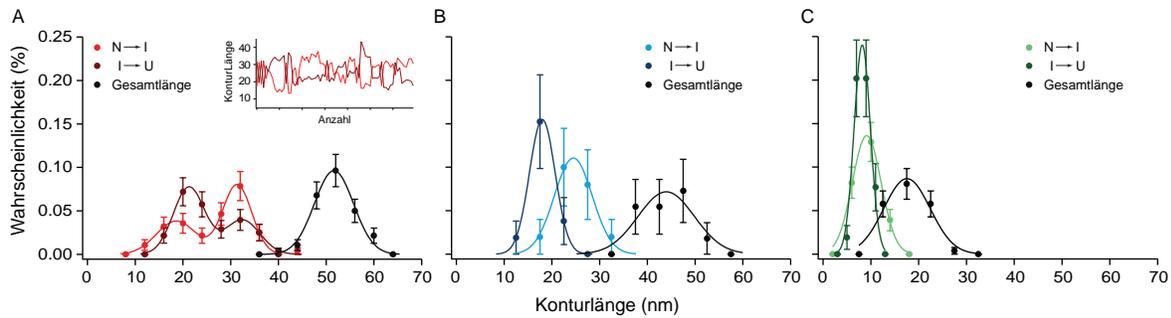


Abbildung 5.3: Verteilungen der Konturlängenzuwächse des ersten Entfaltungsereignisses (helle Farben), des zweiten Entfaltungsereignisses (dunkle Farben) und des Gesamtkonturlängenzuwachses (schwarz). (A) CaM NC (13 Moleküle, $n = 70$). Inset: Konturlängenzuwächse des ersten (hellrot) und zweiten (dunkelrot) Entfaltungsereignisses nach Experimenten geordnet. (B) CaM 128/144 (2 Moleküle, $n = 11$). (C) CaM 38/118 (7 Moleküle, $n = 64, 52, 52$).

An die in Abbildung 5.2 gezeigten Kraft-Abstandskurven wurde das in Abschnitt 3.1 besprochene serielle Modell für DNA- und Polypeptidelastizität angepasst um die Konturlängenzuwächse bei Entfaltung des Proteins zu quantifizieren. Abbildung 5.3 zeigt Histogramme der Konturlängenzuwächse der drei Konstrukte, getrennt nach dem ersten Übergang (N \rightarrow I, helle Farben), dem zweiten Übergang (I \rightarrow U, dunkle Farben), sowie dem Gesamtkonturlängenzuwachs. An die Verteilungen wurden Gaussfunktionen angepasst, um die Positionen der Maxima zu bestimmen. Das Ergebnis ist in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Der Konturlängenzuwachs ΔL eines entfaltenden Proteins ist über den Konturlängenzuwachs pro Aminosäure l_{aa} mit der Anzahl an entfaltenden Aminosäuren N_{aa} verknüpft

$$\Delta L = N_{aa} \cdot l_{aa} - d1_{ee} + d2_{ee}, \quad (5.1)$$

wobei $d1_{ee}$ und $d2_{ee}$ den End-zu-End-Abstand zwischen den Angriffspunkten der anliegenden Kraft vor bzw. nach der Entfaltung angeben. Über den Konturlängenzuwachs ΔL lassen sich Entfaltungsereignisse mit einer Genauigkeit von wenigen Ami-

nosäuren strukturell interpretieren. Der End-zu-End-Abstand kann aus der Kristallstruktur eines Proteins bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde der Wert $l_{aa} = 0,365 \text{ nm/Aminosäure}$ verwendet [34]. In die Fehlerangabe eines Konturlängenzuwachses geht neben dem statistischen Fehler ein Fehler von 5%, der die Ungenauigkeit des WLC-Modells im Bereich $x/L \approx 0,5$ (x : Ausdehnung, L : Konturlänge) widerspiegelt, ein.

Übergang	Konturlängenzuwachs (nm)		
	CAM NC	CaM 128/144	CaM 38/118
N → I	$31,4 \pm 1,6$ (60%)	$24,5 \pm 1,3$	$9,1 \pm 1,2$
	$18,6 \pm 1,2$ (40%)		
I → U	$21,3 \pm 1,1$ (64%)	$18,0 \pm 1,0$	$8,1 \pm 1,2$
	$32,4 \pm 1,6$ (36%)		
N → U	$51,6 \pm 2,6$ (49,2)	$43,9 \pm 2,6$ (43,3)	$17,7 \pm 1,6$ (23,8)

Tabelle 5.1: *Konturlängenzuwächse von Calmodulin. Die Prozentzahlen geben den relativen Anteil des Zuwachses bei dem entsprechenden Übergang an. Die Zahlen in Klammern bei Übergang $N \rightarrow U$ bezeichnen den zu erwartenden Gesamtlängenzuwachs des Proteins unter Berücksichtigung des End-zu-End-Abstands des gefalteten Peptids.*

Entfaltungspfade von CaM NC

Für CaM NC ergibt sich aus der Verteilung in Abbildung 5.3A der Wert $\Delta L_{NU} = 51,6 \text{ nm}$ für den Gesamtkonturlängenzuwachs. Nach Gleichung 5.1 ist der maximale Konturlängenzuwachs für CaM NC $\Delta L_{NU} = 144 \cdot 0,365 \text{ nm} - 3,4 \text{ nm} = 49,2 \text{ nm}^1$. Dies stimmt innerhalb der Fehlergrenzen gut überein. Die gemessene Gesamtlänge von CaM NC lässt daher den Schluss zu, dass Calmodulin bis ca. 6 pN vollständig gefaltet vorliegt.

Interessanterweise spalten sich die Konturlängenzuwächse des ersten und zweiten Übergangs in eine Verteilung mit jeweils zwei Maxima bei ca. 20 nm und 30 nm auf. Die Zuwächse beider Übergänge sind korreliert (lang/kurz bzw. kurz/lang, Inset in Abbildung 5.3A), so dass der Gesamtkonturlängenzuwachs nur ein Maximum aufweist. Im einfachsten Fall handelt es sich bei den Entfaltungen mit $\Delta L_{NI} \approx \Delta L_{IU} \approx 30 \text{ nm}$ um dieselbe entfaltende Untereinheit, die zu 60% vor und 40% nach der Untereinheit von ca. 20 nm entfaltet. Verglichen mit der Kristallstruktur von Calmodulin bedeuten 30 nm Konturlängenzuwachs eine gleichzeitige Entfaltung der N-terminalen Domäne, des Linkers und der ersten α -Helix der C-terminalen Domäne. Da die Domäne C etwas kleiner ist als Domäne N, würden eine C-terminal beginnende Entfaltung die Zerstörung der Domänenstruktur der Domäne N bedeuten. Dasselbe gilt für den Fall, dass die Untereinheit mit 20 nm Konturlängenzuwachs vom N-Terminus des Calmodulin beginnend entfaltet. Es ist unwahrscheinlich, dass in diesen Fällen die verbleibenden Teile der

¹Für die Bestimmung des End-zu-End-Abstands von holo-Calmodulin wurde die Kristallstruktur 1CLL der PDB verwendet.

Domäne N stabil sind.

In einem einfachen Modell entfaltet Calmodulin bei NC-terminaler Zugrichtung zu ca. 60% von Domäne N beginnend (zusammen mit dem Linker und der ersten α -Helix der Domäne C) und zu ca. 40% beginnt die Entfaltung C-terminal.

Entfaltungspfad von CaM 128/144

Wie bei CaM NC ergibt auch bei CaM 128/144 ein Vergleich der gemessenen Gesamtlänge des Proteins (43,9 nm) mit dem Ergebnis aus Gleichung 5.1 ($\Delta L_{\text{NU}} = 128 \cdot 0,365 \text{ nm} - 3,4 \text{ nm} = 43,3 \text{ nm}$), dass Calmodulin bis ca. 6 pN vollständig gefaltet vorliegt. Im Gegensatz zu CaM NC spalten bei CaM 128/144 die Verteilungen der Übergänge $\text{N} \rightarrow \text{I}$ und $\text{I} \rightarrow \text{U}$ nicht auf. Der gemessene Konturlängenzuwachs der ersten Entfaltung stimmt mit 24,5 nm sehr gut mit der für Domäne N zu erwartenden Konturlänge (25,0 nm) überein. Der zweite Übergang (gemessen 18 nm) entspricht der Entfaltung der verkürzten Domäne C (erwartet 16,9 nm). Aufgrund der experimentellen Ungenauigkeit kann die Entfaltung des Linkers nicht einer der beiden Domänen zugeordnet werden.

CaM 128/144 weist eine klare Trennung der Entfaltungen von Domäne N und Domäne C auf. Dies ist eine direkte Folge der Disulfidbrücke innerhalb der Domäne C (siehe den folgenden Abschnitt 5.2.2 für eine Untersuchung der Faltungskinetik der Domäne C mit und ohne Disulfidbrücke). Erstaunlich ist, dass bei ausgebildeter Disulfidbrücke die erste α -Helix, die nicht in der durch die Disulfidbrücke gebildeten Schleife enthalten ist, nicht mehr zusammen mit Domäne N entfaltet wie bei CaM NC. Vermutlich wirkt sich die Disulfidbrücke stabilisierend auf die gesamte Domäne C aus, obwohl sie nur einen kleinen Teil (16 von 66 Aminosäuren) der Domäne C verbindet. Der Vergleich zwischen Domäne C mit und ohne Disulfidbrücke zeigt, dass intermolekulare Crosslinks zwar die strukturelle Interpretation eines Entfaltungsereignisses vereinfachen, gleichzeitig aber auch die Faltung des Proteins merklich beeinflussen können.

Entfaltung von CaM 38/118

Bei CaM 38/118 ist die gemessene Gesamtlänge mit 17,7 nm deutlich kürzer als die theoretische maximale Entfaltungslänge des vollständig gefalteten Proteins ($\Delta L = 80 \cdot 0,365 \text{ nm} - 5,4 \text{ nm} = 23,8 \text{ nm}$). Folgt man der Kristallstruktur, müssen bei dieser Belastungsrichtung ab ca. 17 pN der Linker sowie weitere Anteile der die Domänen N und C verbindenden α -Helix schon entfaltet sein (ca. 17 Aminosäuren). Ein Ausrichten der Domänen entlang des Kraftvektors hat nur einen kleinen Effekt von ca. 1 nm auf den End-zu-End-Abstand und reicht zur Erklärung der gemessenen kurzen Distanz nicht aus. Die Entfaltung großer Teile der α -Helix zwischen den Domänen ist prinzipiell konsistent mit den geringeren Entfaltungskräften von CaM NC und CaM 128/144. Da die Entfaltung der α -Helix nicht als zusätzliches Entfaltungsereignis aufgelöst werden kann, liegt die Vermutung nahe, dass sie nicht als Ganzes sondern in mehreren seriellen Schritten entfaltet, die jeweils nahe am Gleichgewicht stattfinden. Die verbleibenden

Teile der Domänen werden vermutlich durch die bei dieser Zugrichtung nicht belasteten N- und C-terminalen Bereiche stabilisiert.

Innerhalb der Fehlergrenzen haben die Übergänge $N \rightarrow I$ und $I \rightarrow U$ gleiche Kontrurlängenzuwächse. Sie können daher nicht einer der beiden Domänen zugeordnet werden. Im folgenden Abschnitt zeigt sich, dass die Domänen bei CaM 38/118 vermutlich abwechselnd falten und entfalten können.

5.2.2 Kinetische und energetische Eigenschaften von Calmodulin

Nachdem im vorhergehenden Abschnitt das Faltungsmuster der Konstrukte CaM NC, CaM 128/144 und CaM 38/118 gemessen wurde, werden hier ihre Kinetik und ihre energetischen Eigenschaften untersucht. Das Vorgehen ist analog zu den Experimenten mit der GCN4 Coiled-Coil (siehe Kapitel 4). Aus Kraft-Zeit-Aufnahmen bei verschiedenen Vorspannungen wurden Verteilungen der Verweildauern eines Konstrukts in einer bestimmten Konformation extrahiert. Durch Anpassen einer Exponentialfunktion an die Verweildauerverteilungen wurden Übergangsraten bei der entsprechenden Kraft ermittelt.

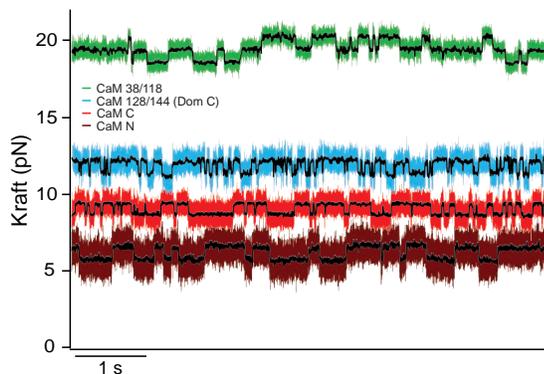


Abbildung 5.4: Vergleich der Kraft-Zeit-Aufnahmen bei $F_{1/2}$ der N-terminalen (dunkelrot) und C-terminalen (hellrot) Domäne von CaM NC, der C-terminalen Domäne mit Disulfidbrücke (CaM 128/144, blau) und der Mutante CaM 38/118 (grün).

In Abbildung 5.4 ist ein Vergleich der Kraft-Zeit-Aufnahmen nahe bei $F_{1/2}$ ² der Domänen N und C von CaM NC, der Domäne C des CaM 128/144 und der beiden Domänen von CaM 38/118 gegeben. Die Konstrukte weisen deutlich unterschiedliche $F_{1/2}$ -Werte auf. Außerdem ist ersichtlich, dass die Konstrukte bei $F_{1/2}$ unterschiedliche Faltungs- und Entfaltungsraten haben. Abbildung 5.5 zeigt für die jeweiligen Domänen der drei Calmodulin-Konstrukte die Ratenkonstanten der Faltung (offene Kreise) und

² $F_{1/2}$ bezeichnet die Kraft, bei der der gefaltete und der entfaltete Zustand gleich wahrscheinlich sind.

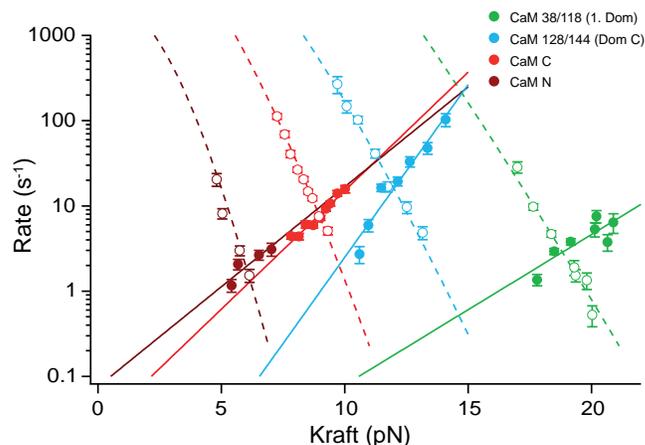


Abbildung 5.5: Ratenkonstanten der Faltung (offene Kreise) und Entfaltung (gefüllte Kreise) der N-terminalen (dunkelrot) und C-terminalen (hellrot) Domäne von CaM NC, der C-terminalen Domäne mit Disulfidbrücke (CaM 128/144, blau) und einer Domäne der Mutante CaM 38/118 (grün) als Funktion der Kraft.

Entfaltung (gefüllte Kreise) als Funktion der Kraft. Wie in Abbildung 5.4 wird die Auftrennung der Konstrukte entlang der Kraftachse deutlich.

An die Ratenkonstanten der Entfaltung als Funktion der Kraft wurde das Modell von Bell (Gleichung 3.14 in Kapitel 3) angepasst, um die kraftfreien Entfaltungsraten k_u^0 und die Distanzen zu den Entfaltungsbarrieren Δx_u zu erhalten. Für die kraftabhängigen Ratenkonstanten der Faltung wurde wie für den GCN4 Leucin Zipper (Abschnitt 4.2.1) ein Modell verwendet, das die Energieänderungen der Kugeln, der DNA-Linker und des entfalteten Polypeptids berücksichtigt (Gleichung 3.16 in Kapitel 3). Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst.

Konstrukt	k_u^0 (s ⁻¹)	k_f^0 (s ⁻¹)	Δx_u (nm)	ΔG^0 (k _B T) ^a	ΔG^0 (k _B T) ^b
CaM N	$7.6 \cdot 10^{-2}$	$2.3 \cdot 10^3$	2.2	10.3	} 28.2
CaM C	$2.5 \cdot 10^{-2}$	$1.5 \cdot 10^4$	2.6	13.3	
CaM 128/144 (Dom C)	$2.2 \cdot 10^{-4}$	$1.5 \cdot 10^4$	3.8	18.0	28.6
CaM 38/118 (1. Dom)	$1.3 \cdot 10^{-3}$	$3.9 \cdot 10^6$	1.7	21.8	28.0

^aAus dem Verhältnis der kraftfreien Ratenkonstanten für jeweils eine Domäne.

^bFreie Energie des gesamten Proteins aus dem Fluktuationstheorem von Crooks.

Tabelle 5.2: *Kinetische und energetische Eigenschaften von Calmodulin.*

Die Strecke, um die das Protein gedehnt werden muss, bis die Entfaltung stattfindet, variiert zwischen 1.7 nm bei CaM 38/118 und 3.8 nm bei CaM 128/144. Die Distanz zur Entfaltungsbarriere bei Domäne C von CaM NC (2,6 nm) ist vergleichbar mit dem früher gemessenen Wert (2 nm) [91]. Die kürzeste Distanz zur Übergangsbarriere tritt bei der Mutante auf, bei der die Kraft in der Mitte einer Domäne angreift. Dagegen muss die Domäne, die durch eine Disulfidbrücke zusammengehalten wird, um

mehr als das Doppelte gedehnt werden, bis es zur Entfaltung kommt. Die stabilisierende Wirkung der Disulfidbrücke zeigt sich auch in der im Vergleich zu den anderen Domänen langsamsten Entfaltungsrate. Der langreichweitige Zusammenhalt innerhalb der Domäne C von CaM 128/144 ist konsistent mit der Beobachtung, dass bei dieser Mutante, im Gegensatz zu Domäne C ohne Disulfidbrücke, die erste α -Helix nicht schon zusammen mit Domäne N entfaltet.

Die im Vergleich zu anderen globulären Proteinen relativ großen Distanzen zur Übergangsbarriere sowie die beobachteten variablen Entfaltungspfade des Calmodulin rechtfertigen die Bezeichnung als weiches und flexibles Protein. Diese Eigenschaften sind wahrscheinlich von Bedeutung für die Funktion als Signalprotein. Die Flexibilität ermöglicht es Calmodulin, unterschiedliche Erkennungspeptide zu binden, selbst wenn diese Teil eines größeren Enzyms sind.

Die Faltungs- und Entfaltungsraten der Domäne C von CaM NC liegen nahe an bisher veröffentlichten Werten ($5 \cdot 10^3 - 2 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$) [94, 91]. Die schnellste Faltungsrate wird bei der Domäne von CaM 38/118 mit der kleinsten zu faltenden Aminosäurekette beobachtet, die langsamste bei Domäne N von Calmodulin, die den größten Konturlängenzuwachs aufweist. Dies ist Konsistent mit Messungen an unterschiedlich langen Ubiquitin-Konstrukten und Coiled-Coil-Peptiden und spiegelt den Einfluss der in der Messanordnung auftretenden Elastizitäten auf die Faltung des Proteins wider [95, 96].

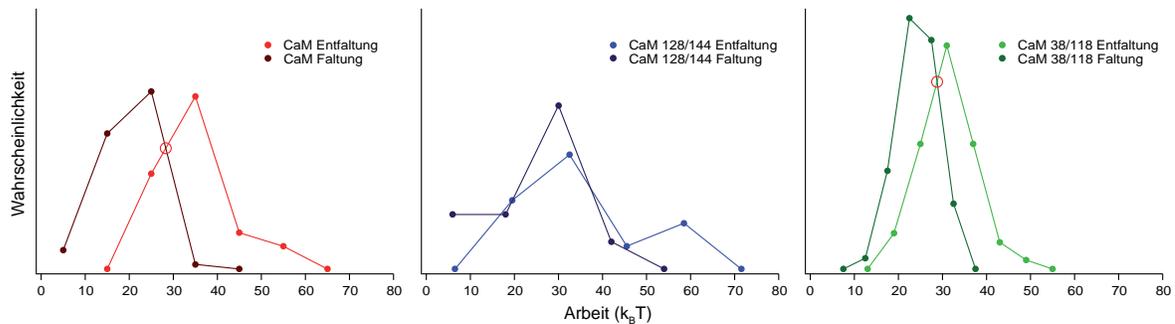


Abbildung 5.6: Bestimmung der freien Energie von Calmodulin bei verschiedenen Untersuchungsgeometrien nach dem Fluktuationstheorem von Crooks. Verteilungen der bei Entfaltung von Calmodulin aufgenommenen Arbeit (helle Farben) und bei Faltung frei werdenden Arbeit (dunkle Farben) bei (A) CaM NC (14 Moleküle, $n = 72$), (B) CaM 128/144 (2 Moleküle, $n = 11$) und (C) CaM 38/118 (7 Moleküle, $n = 60$). Der Schnittpunkt beider Verteilungen entspricht der freien Energie des Proteins (rote Kreise). Faltung von CaM 128/144 erfolgt bei der Ziehgeschwindigkeit von 100 nm/s ohne nennenswerte Hystere. Die freie Energie wurde daher aus den Mittelwerten der Verteilungen berechnet.

Die aus dem Verhältnis der kraftfreien Ratenkonstanten berechneten freien Energien der Domänen N und C von CaM NC (siehe Tabelle 5.2) stimmen gut mit Ensemble-Messungen überein (7,2 bzw. 11,4 $k_B T$) [97]. Zudem bestätigt sich, dass die N-terminale

Domäne eine geringere freie Energie aufweist als Domäne C. Die Domäne C mit Disulfidbrücke weist eine etwas größere Energie auf als die disulfidfreie Domäne. Dies ist konsistent mit der aus den kinetischen Parametern geschlossenen Stabilisierung der verlinkten Domäne. Trotz der Übereinstimmung der freien Energien mit den Ensemble-Messungen sind die absoluten Werte der Faltungsraten möglicherweise mit einem relativ großen Fehler behaftet. Dies ergibt sich aus einem Vergleich der freien Energien der untersuchten Domänen, berechnet aus dem Verhältnis der kraftfreien Ratenkonstanten, mit der gesamten freien Energie der Konstrukte, die mit Hilfe des Fluktuationstheorems von Crooks (Abbildung 5.6 und Abschnitt 3.2.2) bestimmt wurde (siehe Tabelle 5.2). So ist die Summe der Einzelenergien der Domänen von CaM NC kleiner als die gemessene Gesamtenergie. Die freie Energie, die sich bei CaM 38/118 aus den extrapolierten Raten ergibt ist dagegen verhältnismäßig groß. Ein Grund dafür liegt unter anderem in der Ungenauigkeit der Federhärtenkalibration der Kugeln (vgl. auch die Abschätzungen in Anhang B.2). Zudem ist nicht vollständig sicher, ob die unterschiedlichen Modelle, die zur Beschreibung der Faltungs- und Entfaltungsraten verwendet wurden, zum richtigen Verhältnis der kraftfreien Raten extrapolieren. Auf der anderen Seite ist der Fehler der über das Fluktuationstheorem von Crooks bestimmten Gesamtenergie aufgrund des großen Überlapps zwischen den Arbeitsverteilungen bei 100 nm/s relativ groß (ca. $3 k_B T$) [98]. Die Gesamtenergien von CaM NC, CaM 128/144 und CaM 38/118 stimmen gut überein. Dies ist zu erwarten, wenn man davon ausgeht, dass auch bei Domäne C von CaM 128/144 die durch die Disulfidbrücke zusammengehaltene Schleife und bei CaM 38/118 die unbelasteten Bereiche der Domänen vollständig entfalten.

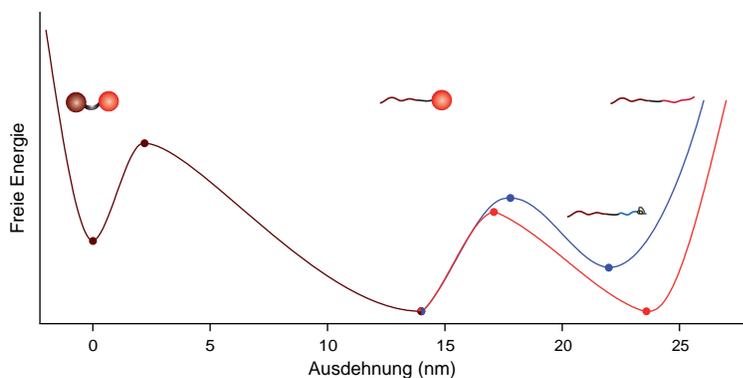


Abbildung 5.7: Die Stützpunkte der Energielandschaft von Calmodulin bei einer Belastung mit 9 pN. Gezeigt sind die Energielandschaften von CaM NC (dunkel- und hellrot) und der Domäne C von CaM 128/144 (blau). Die Skizzen veranschaulichen die Konformation des Proteins an den Minima der Energielandschaft.

Energielandschaften von Calmodulin

Mit den Informationen über die Positionen der Übergangsbarrrieren und über die Ratenkonstanten können die Stützpunkte der Faltungs-Energielandschaft des Calmodulin konstruiert werden. Da die Ratenkonstanten und relativen Energien der Proteinkonformationen in der Nähe von $F_{1/2}$ im Vergleich zu den kraftfreien Ratenkonstanten und der gesamten freien Energie sehr genau bekannt sind, wurden in Abbildung 5.7 die Energielandschaften von Calmodulin bei der Kraft $F_{1/2} = 9$ pN der Domäne C dargestellt. Es ist der wahrscheinlichere Entfaltungspfad aufgezeichnet, bei dem Domäne N zuerst entfaltet. Zum Vergleich mit der nativen Domäne C ist zusätzlich die Energielandschaft der Domäne C des CaM 128/144 eingetragen. Abbildung 5.8 zeigt die Energielandschaft des CaM 38/118 bei $F_{1/2} = 18.8$ pN.

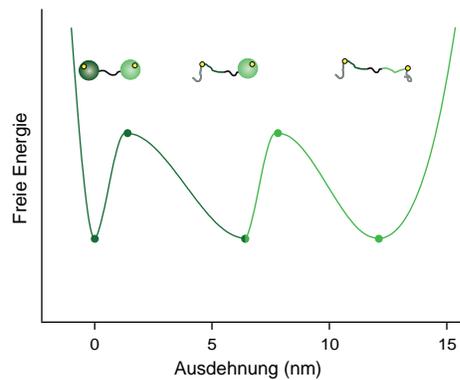


Abbildung 5.8: Die Stützpunkte der Energielandschaft von Calmodulin 38/118 bei einer Belastung mit 18.8 pN. Die Skizzen veranschaulichen die Konformation des Proteins an den Minima der Energielandschaft.

5.3 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel wurde mit Hilfe der optischen Pinzette die Faltung und Entfaltung von Calmodulin bei mechanischer Belastung untersucht. Es zeigt sich, dass die beiden Domänen bei der Entfaltung vertauschen können, wobei die Entfaltung zu 60% mit der N-terminalen Domäne beginnt. Der α -helikale Linker, der die beide Domänen miteinander verbindet, ist bis zu einer Kraft von ca. 6 pN noch gefaltet. Das Einführen einer Disulfidbrücke in Domäne C führt zu einer Stabilisierung der Domäne und das Durchtauschen der Domänen wird verhindert. Zudem zeigen die Experimente, dass sich Bereiche des Proteins, die nicht unmittelbar der angelegten Kraft ausgesetzt sind, stabilisierend auf die belasteten Teile auswirken können. Die unterschiedlichen Entfaltungspfade der verschiedenen Konstrukte und die relativ großen Distanzen zur Entfaltungsbarrriere zeigen, dass Calmodulin ein weiches und flexibles Protein ist.

Die hier vorgestellte Methode, mit der optischen Pinzette Faltung von Calmodulin zu beobachten erlaubt es, die Calciumkonzentration über Calcium-Chelatoren wie EDTA zu regulieren. Damit kann in weiterführenden Experimenten der Einfluss von Calcium auf die Faltung und Stabilität des Proteins bei geringen Konzentrationen von Calcium, die mit dem AFM bisher nicht zugänglich sind, gemessen werden.

In weiteren Experimenten bei konstantem Abstand der Fallenpotentiale sollte es möglich sein, analog zu den in Kapitel 4 gezeigten Messungen, die Energielandschaft des Calmodulin direkt auszumessen. Wie die Stützpunkte der Energielandschaften in Abschnitt 5.2.2 andeuten, erwartet man für Domäne C des Calmodulin und CaM 38/118 eine leicht asymmetrische Energielandschaft. Dagegen befindet sich bei CaM 128/144 bei der Kraft $F_{1/2}$ die Barriere etwa in der Mitte der Reaktionskoordinate.

Im nächsten Abschnitt wird anhand von zwei Beispielen gezeigt, dass mit der optischen Pinzette auch die Peptidbindung an Calmodulin sehr gut untersucht werden kann.

Bindung von Signalpeptiden an Calmodulin

In Ensemble-Messungen kann die Bindungsenergie von Signalpeptiden an Calmodulin gut ermittelt werden. Oft ist es jedoch schwierig, die genaue Stöchiometrie der Bindung, die Assoziation zu einer bestimmten Domäne und den Einfluss der Peptide auf die Faltung von Calmodulin (zum Beispiel das Auftreten von kooperativen Effekten) zu bestimmen. Für diese Fragestellungen sind mechanische Messungen gut geeignet [91, 92]. Hier wird am Beispiel des Calmodulin und der Target-Peptide skMLCK und CaM CKK die Möglichkeit veranschaulicht, die Kinetik der Peptidbindung an Calmodulin direkt zu untersuchen.

In Abbildung 5.9A ist eine Kraft-Abstands-Kurve der Entfaltung und der Faltung eines Konstruktes gezeigt, bei dem an den C-Terminus des CaM 38/118 (vgl. Abschnitt 5.2) das Signalpeptid skMLCK (*skeletal muscle myosin light chain kinase*) fusioniert wurde (CaM 38/118 skMLCK). Man erkennt deutlich drei serielle Entfaltungsereignisse. Diese weisen mittlere Konturlängenzuwächse von 5,2 nm, 11,2 nm und 9,3 nm auf. Die mittlere Gesamtlänge des Konstrukts beträgt 25,7 nm, was gut mit dem zu erwartenden maximalen Konturlängenzuwachs von 27,3 nm für CaM 38/118 mit gebundenem skMLCK übereinstimmt³. Ein Vergleich der Konturlängenzuwächse mit den Werten bei CaM 38/118 ohne Peptid (siehe Tabelle 5.1) lässt den Schluss zu, dass bei CaM 38/118 skMLCK bei kleinen Kräften beide Domänen mit skMLCK assoziiert sind. Steigt die Kraft an, wird zunächst mindestens eine Domäne von skMLCK abgelöst und der Linker entfaltet. bei einem weiteren Kraftanstieg entfalten nacheinander die beiden Domänen.

³Für die Bestimmung des End-zu-End-Abstands des CaM 38/118 skMLCK wurde die Kristallstruktur 2BBN mit gebundenem Peptid verwendet

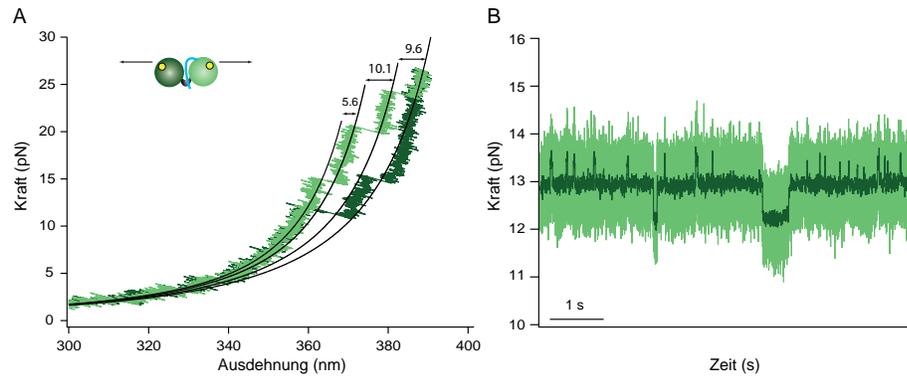


Abbildung 5.9: *Bindung von Calmodulin an skMLCK. (A) Kraft-Abstands-Kurve der Entfaltung (hellgrün) und Faltung (dunkelgrün) eines CaM 38/118 skMLCK-Proteins. Die Skizze veranschaulicht die Struktur des Konstrukts. (B) Kraft-Zeit-Aufnahme des CaM 38/118 skMLCK. Man erkennt Übergänge zwischen dem vollständig gefalteten Konstrukt, dem Calmodulin ohne gebundenes Peptid und einem Zustand mit einer entfalteten Calmodulin-Domäne.*

Bei konstanten Fallenpositionen und einer Kraft um ca. 13 pN kann das Binden und Ablösen des skMLCK-Peptids beobachtet werden (Abbildung 5.9B). Auf diese Weise ist die Kinetik der Peptidbindung an Calmodulin direkt zugänglich. Bei der in Abbildung 5.9B gezeigten Aufnahme bindet skMLCK mit $k_{\text{on}} = 3,2 \text{ s}^{-1}$ und löst sich mit $k_{\text{off}} = 41,9 \text{ s}^{-1}$ von einer Domäne des Calmodulin.

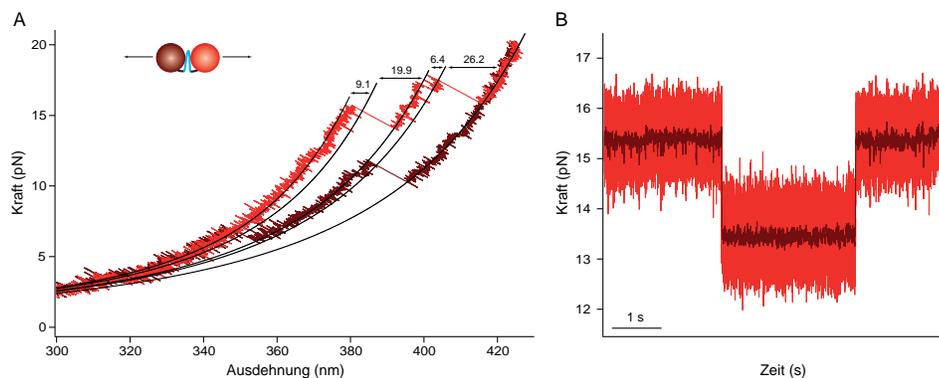


Abbildung 5.10: *Bindung von Calmodulin an CKK. (A) Kraft-Abstands-Kurve der Entfaltung (hellrot) und Faltung (dunkelrot) eines CaM CKK-Proteins. Die Skizze veranschaulicht die Struktur des Konstrukts. (B) Kraft-Zeit-Aufnahme des CaM CKK mit Übergängen zwischen dem vollständig gefalteten Konstrukt, dem CaM CKK mit teilweise entfaltetem Peptid und Linker und dem CaM CKK mit einer entfalteten Calmodulin-Domäne.*

Abbildung 5.10 zeigt ein weiteres Beispiel der Bindung eines Peptids, CKK (*Calmodulin-dependent kinase kinase*) an CaM. In diesem Fall wurde CKK in die Linker-Sequenz des CaM integriert (Konstrukt CaM CKK). Im Vergleich zu nativem CaM NC ist CaM CKK deutlich stabilisiert und entfaltet bei Kräften um ca. 15 pN. Vor der Entfaltung jeder Domäne sind schnelle Übergänge beobachtbar, die dem Ablösen einer Calmodulin-Domäne von CKK zugeordnet werden können [92].

In einer Fortsetzung dieser Experimente kann anhand der Konturlängenzuwächse der Kraft-Abstands-Kurven der Bindungsmodus eines Peptids genau bestimmt werden. Über Kraft-Zeit-Aufnahmen bei verschiedenen Vorspannungen lässt sich die Bindungskinetik der Peptide als Funktion der Kraft und damit die Energielandschaft der Peptidbindung ausgemessen. Die gezeigten Experimente lassen sich sehr einfach auf andere Peptide, wie die schweren Ketten von Myosin oder die *Death-associated protein kinase* (DAP-Kinase), verallgemeinern.

Kapitel 6

Die Asymmetrie des molekularen Motors Myosin-V

In diesem Kapitel wird zunächst kurz auf den Hintergrund des molekularen Motors Myosin-V und das Verhalten des nativen, doppelköpfigen Moleküls eingegangen. Anschließend werden Experimente zur richtungsabhängigen Stabilität der Myosin-V/Aktin-Bindung vorgestellt, die an einzelköpfigen Mutanten des Motors vorgenommen wurden.

6.1 Der native, doppelköpfige Motor

Myosin-V gehört zur Myosin-Familie molekularer Motoren, die über fünfzehn Mitglieder mit teilweise stark konservierter Motordomäne enthält [99]. Abbildung 6.1 zeigt

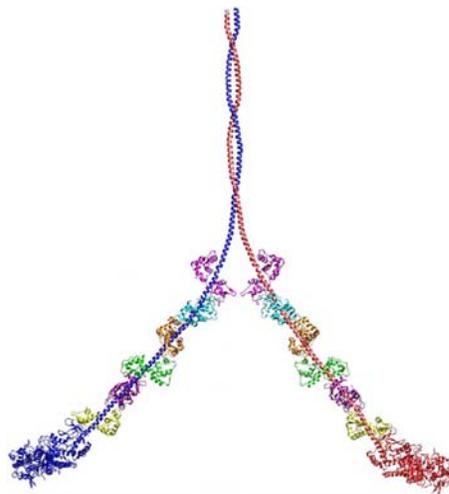


Abbildung 6.1: *Die Struktur des molekularen Motors Myosin-V. Das Bild ist eine Montage und frei aus [100] übernommen.*

eine schematische Abbildung der Struktur des Motors. Zwei identische Polypeptidketten bilden an ihrem N-Terminus jeweils eine Motordomäne (Kopf) aus, deren Struktur durch Röntgenkristallographie atomar aufgelöst werden konnte [101, 102]. Die Motordomäne besteht aus mehreren Untereinheiten, die die Aktin- und ATP-Bindungsstellen enthalten und sich während des chemomechanischen Zyklus (siehe Abschnitt 6.1.1) relativ zueinander verschieben. An die Motordomäne schließt sich über eine als Converter bezeichnete Struktur eine α -helikale Region an, die den Hals oder Leverarm des Myosin-V bildet. Die α -Helix wird durch sechs leichte Ketten (Calmoduline) stabilisiert, die an sogenannte IQ-Motive binden. Über diese Bindungen kann die Funktion von Myosin-V reguliert werden [103]. Motordomäne und Leverarm sind zusammen etwa 30 nm lang. Die beiden Polypeptidketten dimerisieren nach der Hals-Region über eine Coiled-Coil-Struktur. An ihrem C-Terminus bilden sie eine globuläre Domäne aus (nicht gezeigt), über die der Motor Vesikel und Membranen binden kann.

Myosin-V kommt in vielen eukaryotischen Zellen vor, wo es verschiedene Aufgaben übernimmt: es transportiert Organellen, Vesikel und Pigment-Partikel, verteilt mRNA und hilft bei der Zellteilung [104, 105]. Dabei folgt Myosin-V der Verteilung des Aktin-Netzwerks, operiert also hauptsächlich an der Peripherie der Zelle. Das gemeinsame Auftreten von Kinesin und Myosin-V auf den selben Vesikeln sorgt für den nahtlosen Übergang zwischen mikrotubuli- und aktinbasiertem Transport [106, 107].

Die Aufgaben von Myosin-V im Vesikel-Transport ließen vermuten, dass es sich, im Gegensatz zum Muskelprotein Myosin-II, um einen prozessiven Motor handelt, der viele aufeinanderfolgende Schritte machen kann ohne von Aktin abzulösen. Kinetische Untersuchungen bestätigten, dass Myosin-V die meiste Zeit eines chemischen Zyklus fest an Aktin gebunden ist, also einen hohen „duty-ratio“ besitzt [108]. Mit der optischen Falle und durch Fluoreszenzmessungen konnte die Prozessivität direkt bestätigt werden [109, 110].

6.1.1 Der chemo-mechanische Zyklus bei niedrigen Kräften

Auf der Grundlage erster biochemischer [108] und mechanischer [109] Untersuchungen wurde von Rief et al. ein Modell zum chemo-mechanischen Zyklus des Motors vorgeschlagen [111]. Es wurde in nachfolgenden Experimenten bestätigt und weiter verfeinert. Abbildung 6.2 veranschaulicht den Zyklus.

Im Ausgangszustand (Zustand I in Abbildung 6.2) ist der Motor mit beiden Armen an Aktin gebunden, und beide Nukleotidbindungsstellen sind mit ADP besetzt. Unter sättigenden ATP Bedingungen ist das Loslösen von ADP vom hinteren Kopf (Übergang in Zustand II) ratenlimitierend [108, 111]. Fluoreszenzexperimente [112] und Experimente an einzelköpfigen Konstrukten [113, 114] weisen darauf hin, dass Spannung zwischen beiden Armen das Loslösen von ADP im hinteren Arm beschleunigt und damit den chemischen Zyklus beider Köpfe koordiniert (dargestellt durch die leichte Krümmung der Leverarme). Das Binden von ATP an den hinteren Kopf lässt diesen

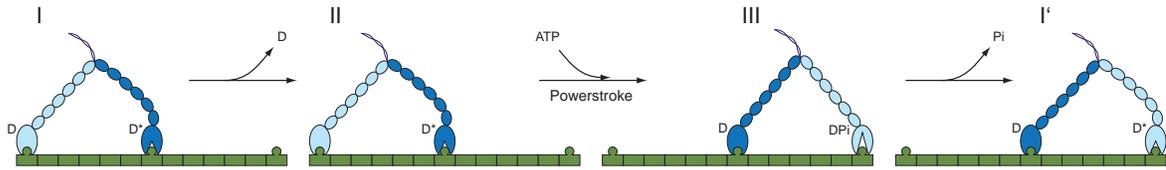


Abbildung 6.2: *Schema des chemomechanischen Zyklus von Myosin-V. (I) Unter nativen Bedingungen verweilt der Motor die meiste Zeit in einem Zustand, in dem beide Köpfe ADP gebunden haben. (II) Intramolekulare Spannung koordiniert das Ablösen des ADP vom hinteren Kopf. (III) ATP binden löst den hinteren Kopf von Aktin und ermöglicht den Powerstroke des vorderen Arms. Die Hydrolyse von ATP erfolgt schnell, der ehemals hintere Kopf bindet schwach an Aktin. (I') Ablösen von Pi ermöglicht eine festere Bindung des vorderen Kopfs an Aktin und führt zum Aufbau intramolekularer Spannung. Der Zyklus beginnt von vorn.*
 D: ADP, D*: Lever Arm vor Powerstroke; Pi: anorg. Phosphat

von Aktin abdissoziieren. Dies ermöglicht einen Kraftschlag (*Powerstroke*) des vorderen Arms, der den hinteren Arm in (+)-Richtung des Aktins bringt (Zustand III). Der nun vordere Kopf bindet nach einer diffusiven Suche an eine Bindungsstelle 36 nm weiter ans Aktinfilament [115, 116]. Die Hydrolyse von ATP erfolgt schnell [108], und man vermutet, dass das Binden des Kopfs mit dem Loslassen von Phosphat zusammenfällt [112] (Übergang in Zustand I'). Der Motor befindet sich nun wieder in seiner Ausgangskonformation. Man misst eine starke Kopplung zwischen chemischem und mechanischem Zyklus [117], d.h. für jeden Schritt wird ein Molekül ATP hydrolysiert.

Wenn Myosin-V an Pyrene-Aktin bindet, wird der Farbstoff gequenscht [118], wobei die Bindung umso stärker ist, je weniger der Farbstoff fluoresziert. Auf diese Weise lassen sich mehrere unterschiedlich stark gebundene Zustände der Myosin-Aktin Bindung identifizieren [108, 112], die in Abbildung 6.2 durch die Öffnung eines Spalts im Myosinkopf dargestellt sind. Demnach ist die Affinität zu Aktin eines Kopfs in *pre-stroke* Konformation und gebundenem ADP (Zustand I und II) größer als die, wenn ADP und Phosphat gebunden sind (Zustand III). Die Stärke der Bindung nimmt vermutlich mit dem *Powerstroke*-Übergang des Kopfes weiter zu [112] (hinterer Kopf des Myosin in Zustand I, III und I').

Unter sättigenden ATP-Bedingungen wartet der Motor die meiste Zeit in Zustand I. Aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen lässt sich ersehen, dass sich in diesem Zustand der hintere Kopf in einer *post-stroke* Konformation und der vordere Kopf in einer *pre-stroke* Konformation befindet [119, 120]. Es ist bisher allerdings noch nicht genau geklärt, ob es eine weitere Konformation von Myosin-V gibt, bei dem der vordere Kopf bereits den *Powerstroke* durchgeführt hat.

Das Modell sagt eine Hand-über-Hand-Bewegung des Motors voraus. Dieser Bewegungsmodus konnte in verschiedenen Fluoreszenzexperimenten, bei denen ein oder beide Köpfe mit einem Farbstoff markiert waren, direkt nachgewiesen werden [121, 122, 117].

Die Dynamik des *Powerstroke* konnte in einem Experiment abgeschätzt werden, bei

dem die Lichtstreuung von einer an den Motor gebundenen Polystyrolkugeln gemessen wurde [123]. Diese Technik ermöglicht eine sehr gute Zeitauflösung. Der Hauptschritt von ~ 23 nm erfolgt demnach innerhalb weniger μs ($< 160 \mu\text{s}$). Daran schließt sich die diffusive Suche des vorderen Arms an, dessen Bindung den Motorschwerpunkt weitere ~ 8 nm verschiebt und mit einer Zeitkonstante im Millisekundenbereich erfolgt. Eine ähnliche Messung, bei der ein Gold-Nanopartikel an einen Arm gebunden war, bestätigt die zeitliche Abfolge des Schrittes [124].

6.1.2 Das Ratschen-Verhalten unter hohen Kräften

Werden an Myosin-V Kräfte angelegt, die die Anhaltekraft von ~ 2 pN übersteigen, zeigt der Motor ein interessantes Verhalten. Bei Belastung in Rückwärtsrichtung ist der Motor in der Lage prozessiv rückwärts zu laufen [116, 125]. Die Geschwindigkeit der Schritte ist unabhängig von ATP. Es sind sogar Rückwärtsschritte möglich, wenn kein ATP in der Lösung ist. Im Gegensatz dazu sind ATP-freie Vorwärtsschritte sehr selten. Die Möglichkeit, Schritte des Motors auf mechanischem Wege in eine Richtung zu induzieren, während er in der anderen Richtung blockiert (siehe Abbildung 6.3), erinnert an das Verhalten einer mechanischen Ratsche [125].

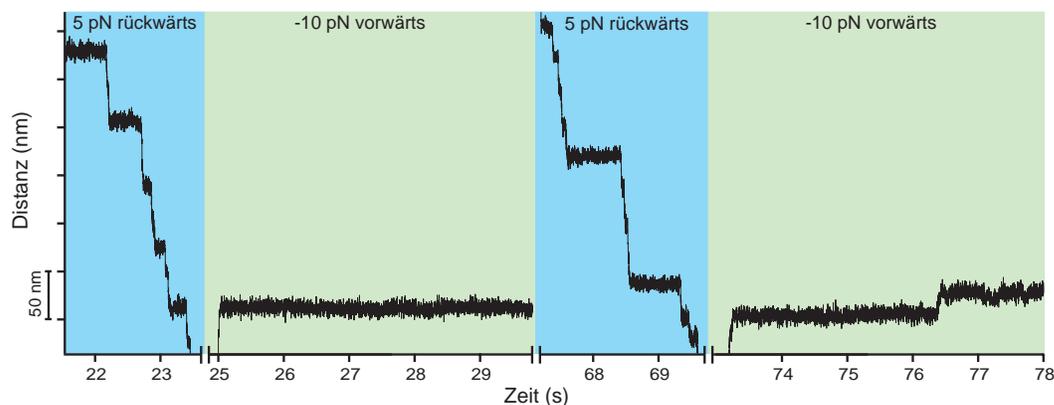


Abbildung 6.3: *Das Ratschenverhalten von Myosin-V. In Abwesenheit von ATP können Rückwärtsschritte (blau unterlegt) mechanisch induziert werden, während der Motor bei Belastung in Vorwärtsrichtung (grün unterlegt) blockiert. Die Abbildung wurde aus [125] entnommen.*

Eine Untersuchung der Vorwärtsschritte unter hohen Kräften zeigt, dass sie der gleichen ATP-Abhängigkeit folgen wie unter niedrigen Kräften. Eine hohe äußere Kraft führt allerdings zu einer geringen Beschleunigung. Im Gegensatz dazu zeigt sich der andere, kraftinduzierte Mechanismus der Rückwärtsschritte auch in einer großen Kraftabhängigkeit. Insgesamt kann man für das Verhalten des mit zwei Köpfen an Aktin

gebundenen Motors in Abwesenheit von ATP die in Abbildung 6.4 gezeigte asymmetrische Energielandschaft ableiten.

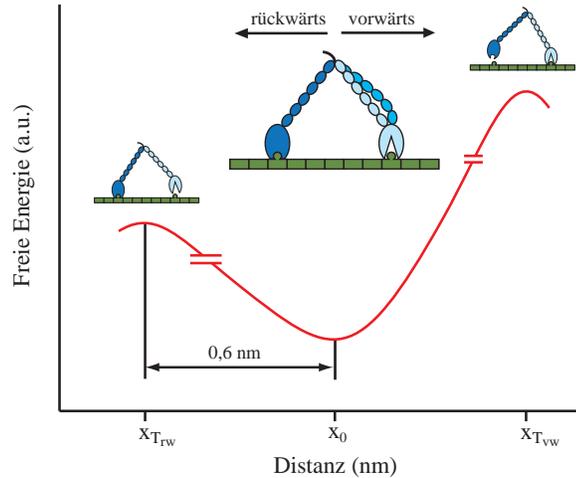


Abbildung 6.4: *Asymmetrische Energielandschaft des doppelköpfigen Myosin-V gebunden an Aktin. Die Abbildung wurde aus [125] entnommen.*

Für die Rückwärtsschritte von Myosin-V unter hoher Kraft und in Abwesenheit von ATP wurde das in Abbildung 6.5 dargestellte Modell vorgeschlagen [125]. Im Ausgangszustand (Zustand I in Abbildung 6.5) ist der Motor mit beiden Armen an Aktin gebunden. Der hintere Arm nimmt eine stark an Aktin gebundene *post-stroke*, der vordere Arm eine schwächer gebundene *pre-stroke* Konformation ein¹, konsistent mit der häufigsten in elektronenmikroskopischen Aufnahmen beobachteten Konformation [119]. Anlegen einer hohen Kraft führt zum Ablösen des vorderen Arms und einer anschließenden Umkehr der mit dem *Powerstroke* verbundenen Konformationsübergänge im hinteren Arm (Zustand II). Bei dieser Konformationsänderung werden vermutlich zum nativen *Powerstroke* in Vorwärtsrichtung analoge Konformationen umgekehrt durchlaufen, auch wenn keine Nukleotide gebunden haben. Mit der Änderung der Leverarmkonformation ist eine Konformationsänderung der Aktin-Bindungsstelle verbunden. Der nun vordere Arm befindet sich nach einem Rückwärtsschritt in einer *pre-stroke* Stellung, mit geringer Affinität zu Aktin (Zustand I'). Der nun hintere Arm nimmt die natürliche ATP-freie *post-stroke* Konformation ein und bindet 36 nm weiter hinten mit hoher Affinität ans Aktinfilament.

Die Experimente an doppelköpfigem Myosin-V legen die Umkehr des *Powerstroke* im Zuge eines Rückwärtsschritts nahe. Dies konnte aber nicht direkt gezeigt werden. Im Folgenden werden Experimente vorgestellt, die die Wirkung einer äußeren, direkt am Leverarm eines einzelnen Myosinkopfs anliegenden Kraft genauer untersuchen.

¹ Vergleiche die Diskussion zur Aktinaffinität in Abschnitt 6.1.1.

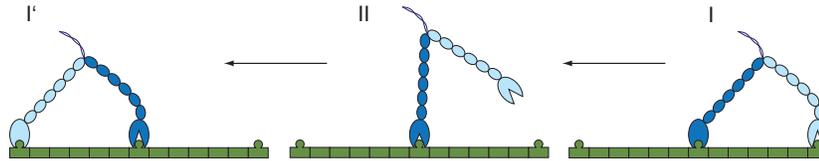


Abbildung 6.5: *Modell der Rückwärtsschritte von Myosin-V unter hoher Kraft. (I) Zu Beginn eines Rückwärtsschritts nimmt der hintere Kopf eine stark an Aktin gebundene post-stroke Konformation ein, der vordere Kopf befindet sich in einer pre-stroke Konformation, die unter Rückwärtsbelastung leicht ablöst. (II) Nach Ablösen des vorderen Kopfs führt eine Rückwärtskraft zur Umkehr der mit dem Powerstroke verbundenen Konformationsübergänge im an Aktin gebundenen Kopf. Insbesondere ändert sich die Affinität dieser Motordomäne zu Aktin. (I') Der nun hintere Kopf nimmt die natürliche ATP-freie post-stroke Konformation ein und bindet stark an Aktin. Der nach dem Rückwärtsschritt vordere Kopf ist in pre-stroke Stellung, die weitere kraftinduzierte Rückwärtsschritte ermöglicht.*

6.2 Experimente an einzelköpfigem Myosin-V

Im Folgenden werden Experimente an einzelköpfigem Myosin-V vorgestellt. Der Einfluss einer äußeren Kraft auf den chemomechanischen Zyklus einzelköpfiger Konstrukte wurde bereits untersucht [114, 126, 127]. Ausgangspunkt für die Experimente in dieser Arbeit war die Frage, wie das Molekül mechanisch in Abwesenheit von ATP reagiert, wenn eine äußere Kraft direkt an einem der Leverarme angreift. Es wurden zwei Mutanten des Myosin-V Kopfs untersucht, die sich in der Länge des Leverarms unterschieden, um festzustellen, ob eine Rotation des Leverarms auftritt [128].

6.2.1 Design der Experimente

Um eine veränderliche äußere Kraft an den Leverarm eines Myosin-V Kopfes anzulegen, wurde die optische Pinzette (vgl. Kapitel 2) verwendet. Ein Schema der experimentellen Anordnung ist in Abbildung 6.6 abgebildet. Das Molekül wurde spezifisch mit dem Ende des Leverarms an eine Polystyrol-Kugel angebunden. Die Kugel wurde in der optischen Pinzette gefangen und über einem an der Oberfläche einer Probenkammer fixierten fluoreszenzmarkierten Aktinfilament positioniert. Anschließend wurde die Kugel mit konstanter Geschwindigkeit in beide Richtungen entlang des Aktinfilaments verfahren (siehe Abschnitt 6.2.2). Sobald ein Motor gebunden hatte, stieg die Kraft bis zum Ablösen des Motors an. Um die Richtung der Kraft zu bestimmen, wurde das (+)-Ende des Aktinfilaments mit einem zweiten Farbstoff markiert. Im Folgenden werden die verwendeten Konstrukte des Myosin-V, die spezifische Anbindung und die richtungsmarkierten Aktinfilamente genauer vorgestellt. Ausführliche Protokolle zur Beschichtung der Kugeln und Polymerisation bzw. Anbindung der Aktinfilamente sind in Anhang C gegeben.

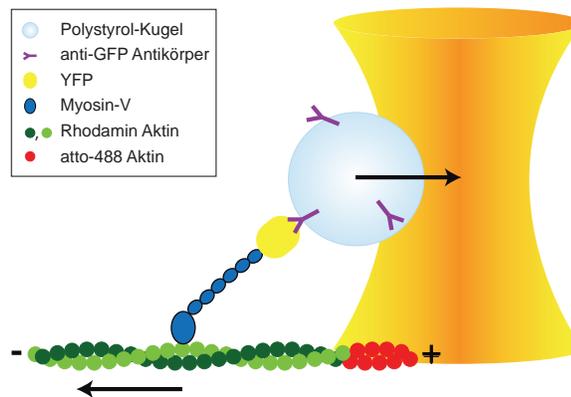


Abbildung 6.6: Skizze der Experimente an einzelköpfigem Myosin-V. Die Pfeile geben die Richtung der Kraft an, die über die optische Pinzette zwischen dem Kopf des Myosins und dem Aktinfilament anliegen.

Myosin-V Konstrukte mit unterschiedlicher Länge des Leverarms

Für die Experimente wurden zwei Mutanten mit jeweils unterschiedlicher Länge des Leverarms verwendet. Tabelle 6.1 enthält eine Übersicht über die strukturellen Eigenschaften beider Konstrukte. Das Konstrukt MV-6IQ besteht aus der Motordomäne und der natürlichen Anzahl von sechs Bindungsstellen von Calmodulin (IQ-Motive). Das Konstrukt MV-4IQ enthält neben der Motordomäne vier IQ-Motive. Bei beiden Mutanten wurde ein gelb fluoreszierendes Protein (YFP) im Anschluss an die IQ-Motive an das C-terminale Ende der Aminosäurekette fusioniert. Das YFP dient zur spezifischen Anbindung der Moleküle an Polystyrol-Kugeln über anti-GFP Antikörper. Der zur spezifischen Anbindung an Kugeln verwendete monoklonale Antikörper bindet an die Aminosäuren 132-144 des grün fluoreszierenden Proteins (GFP). Diese befinden sich auf der dem N-terminus gegenüberliegenden Stirnseite der Fass-Struktur. Die Position dieser Aminosäuren ist im YFP konserviert.

Konstrukt	Anzahl IQ-Motive	Länge des Leverarms ^a (nm)
MV-6IQ	6	26
MV-4IQ	4	17

Tabelle 6.1: Strukturelle Eigenschaften der einköpfigen Myosin-V Mutanten.

^aDie Längen sind abgeschätzt aus [119]

Aktinfilamente mit farblich markiertem (+)-Ende

Da die Experimente an einzelköpfigem Myosin-V ohne ATP durchgeführt wurden, konnte die Richtung der Aktinfilamente nicht aus der Richtung des Myosinkraftschlags abgeleitet werden. Um die Richtung der Aktinfilamente dennoch bestimmen zu können,

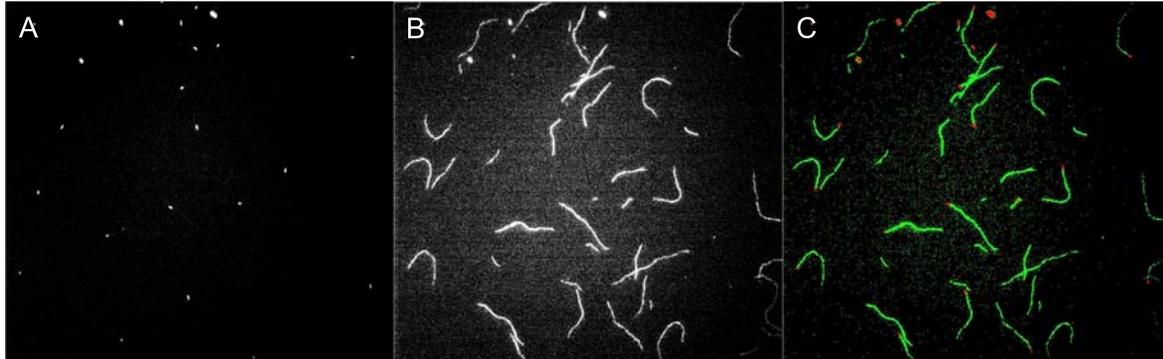


Abbildung 6.7: *Richtungsmarkiertes Aktin.* (A) FITC-Filter; man erkennt die Polymerisationskeime mit atto-488 Aktin und Gelsolin. (B) Rhodamin-Filter; man erkennt die Rhodamin-markierten Aktinfilamente. (C) Überlagerung der FITC- und Rhodamin-Intensität; fast jedes Aktinfilament hat ein markiertes (+)-Ende. Atto-488 wurde rot statt blau dargestellt, um den Kontrast zu erhöhen.

wurde ihr (+)-Ende mit einem kovalent gebundenen Farbstoff markiert. Das Protokoll lehnt sich an ein bereits veröffentlichtes Protokoll an [129]. Kurze Aktinfilamente wurden in Anwesenheit von Gelsolin polymerisiert. Gelsolin bindet an das (+)-Ende des Filaments, so dass dieses nur in Richtung des (–)-Endes wachsen kann. Ein Teil des verwendeten G-Aktins war dabei kovalent mit dem Farbstoff atto-488 markiert. Diese kleinen, ca. 30-100 nm langen Endstücke wurden anschließend als Polymerisationskeime verwendet. Die am (–)-Ende wachsenden Filamente wurden mit Rhodamin-Phalloidin stabilisiert und fluoreszent markiert. Das Verhältnis der Keime zu Aktin-Monomeren wurde so gewählt, dass die fertigen Filamente mehrere Mikrometer lang wurden und fast alle ein farblich markiertes (+)-Ende aufwiesen. Abbildung 6.7 zeigt die Fluoreszenz-Aufnahme einer typischen Probe mit einer Anregung bei 473 nm sowie 532 nm und die Überlagerung beider Farben.

6.2.2 Asymmetrie der Abrißereignisse zwischen Myosinkopf und Aktin

Die einköpfigen Myosin-V Mutanten wurden sowohl in Vorwärtsrichtung (in Richtung des Kraftschlags, Richtung (+)-Ende des Aktinfilaments) als auch in Rückwärtsrichtung belastet. Dafür wurde das auf der Oberfläche fixierte Aktinfilament mit Hilfe des Piezotischs mit konstanter Geschwindigkeit verfahren. Abbildung 6.8 zeigt typische Verläufe der gemessenen Kraft als Funktion der Zeit bei einer Geschwindigkeit von ± 87 nm/s für MV-6IQ und MV-4IQ. Die Kraft steigt an, sobald ein Motorkopf bindet. Nach Ablösen des Kopfs von Aktin fällt die Kugel wieder ins Fallenzentrum zurück und fluktuiert um den Nullpunkt, bis wieder ein Kopf bindet.

Vergleicht man die Abrisskräfte in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung, erkennt man

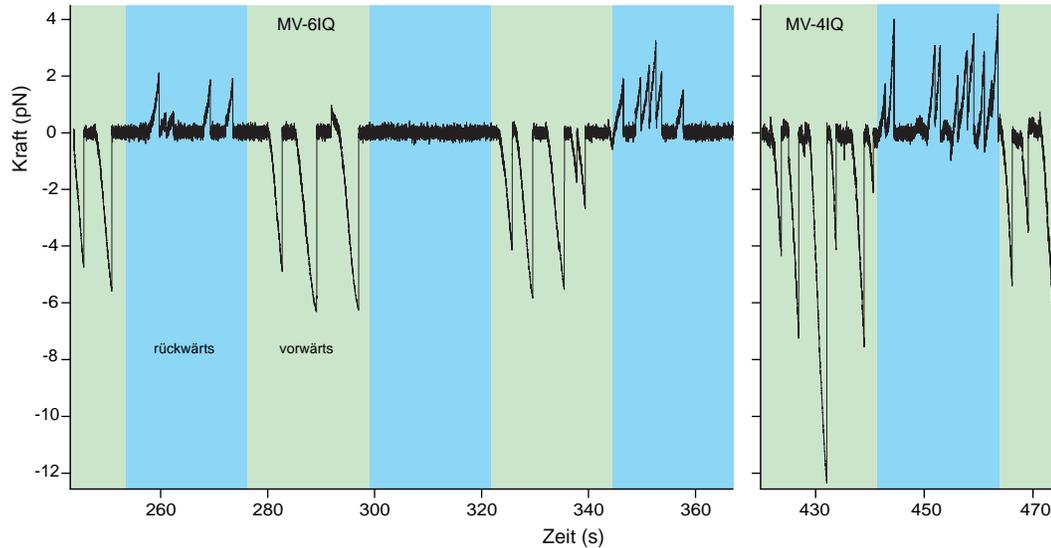


Abbildung 6.8: *Kraft-Zeit Graphen von MV-6IQ (links) und MV-4IQ (rechts) bei Belastung des Motors in Vorwärtsrichtung (grün hinterlegt) und Rückwärtsrichtung (blau hinterlegt). Die Experimente wurden in Abwesenheit von ATP durchgeführt.*

deutlich ein asymmetrisches Verhalten. Bei beiden Myosin-V Konstrukten wird der Kopf bei Belastung in Rückwärtsrichtung bei kleineren Kräften abgelöst als in Vorwärtsrichtung.

Für eine quantitative Untersuchung der Abrisskräfte wurde aus der Kraft-Zeit-Kurve die Auslenkung der Kugel aus dem Fallenzentrum herausgerechnet, um eine Kraft-Ausdehnungs-Kurve zu erhalten. Anschließend wurde an den ansteigenden Teil der Kraftkurve ein *Worm-like-Chain-Modell* (WLC, siehe 3.1 in Kapitel 3) angepasst, um den nichtlinearen Kraftanstieg zu berücksichtigen. An den abfallenden Teil der Kraft wurde eine Gerade angepasst. Der Schnittpunkt aus WLC und Gerade ergab die Abrisskraft des Bindungsereignisses.

In Abbildung 6.9 sind Histogramme der Abrisskräfte von MV-6IQ und MV-4IQ jeweils bei Belastung in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung abgebildet. Wie in den direkten Daten sieht man deutlich die Asymmetrie der Abrisskraftverteilungen. In Vorwärtsrichtung sind die Verteilungen breit um -4 pN gestreut und unterscheiden sich kaum zwischen beiden Konstrukten. In Rückwärtsrichtung dagegen sind die Verteilungen schmal und deutlich unterschiedlich für die beiden Konstrukte. Bei MV-4IQ ist die Verteilung der Abrisskräfte breiter und zu höheren Kräften verschoben als bei MV-6IQ.

Um die Abrisskraftverteilungen theoretisch zu beschreiben, wurde ein Zwei-Zustands-Modell für das Ablösen von Aktin angenommen (siehe Kapitel 3.3.1) [48, 130]. In diesem Modell wird das Ablösen durch zwei Parameter beschrieben, die Ratenkonstante des Ablösens im kraftfreien Fall k_0 und die Distanz zur Barriere in der Energielandschaft des Ablösens Δx^* (Bindungslänge). Bei wachsenden Kräften ist die Wahrscheinlichkeit

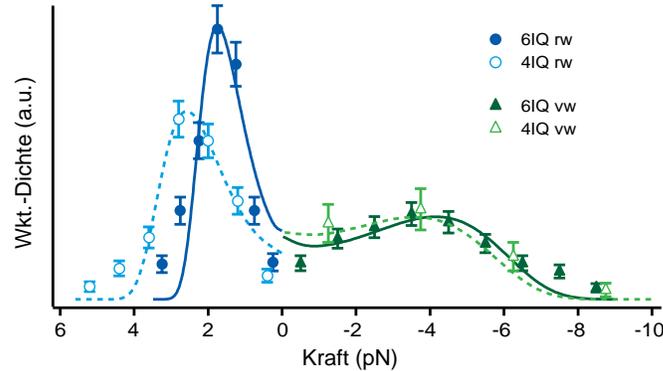


Abbildung 6.9: Verteilungen der Abrisskräfte von MV-6IQ (gefüllte Symbole) und MV-4IQ (offene Symbole) bei Belastung in Rückwärtsrichtung (Kreise) und Vorwärtsrichtung (Dreiecke). Die Verteilungen wurden mit Hilfe eines Zweizustands-Modells beschrieben (durchgezogene Linien, siehe Tabelle 6.2).

$P(F)$ eine Abrisskraft F zu messen gegeben durch

$$P(F) = 1 - \exp\left(-\int_0^F k_0 \exp(F' \Delta x^* / k_B T) / \dot{F}'(F) dF'\right) \quad (6.1)$$

(k_B : Boltzmannkonstante; T : absolute Temperatur) [48]. Die Ladungsrate $\dot{F}(F)$, die die Änderung der belastenden Kraft beschreibt, ist bei den Experimenten mit konstanter Geschwindigkeit aufgrund der nichtlinearen Elastizität des Aktin-Myosin-Kugel-Systems abhängig von der momentanen Kraft. Sie entspricht in den Kraft-Zeit-Kurven der Steigung unmittelbar vor einem Abriss. Bei der Berechnung der theoretischen Abrisskraftverteilung $dP(F)/dF$, die an die gemessenen Verteilungen angepasst werden kann, muss die kraftabhängige Ladungsrate $\dot{F}(F)$ berücksichtigt werden. Dafür wurde eine Fit-Funktion geschrieben, die aus allen gemessenen Ladungsraten eine mittlere Wahrscheinlichkeit $P(F)$ berechnete, bevor diese nach der Kraft abgeleitet wurde um die Abrisskraftverteilung zu erhalten (siehe Anhang C.4). Als Fehler in den Abrisskraftverteilungen wurde ein statistischer Fehler der Größe \sqrt{n} (n : Anzahl der Datenpunkte eines Bins) verwendet. Die Fehler der Fitvariablen setzen sich aus statistischen Fehlern und aus Abweichungen der Werte bei unterschiedlichen Binsgrößen zusammen. Das Ergebnis der Analyse ist in Tabelle 6.2 und Abbildung 6.10 zusammengefasst.

Konstrukt	Rückwärtskraft				Vorwärtskraft			
	F_{abr} (pN)	Δx^* (nm)	$k_{rw,0}$ (s^{-1})	N	F_{abr} (pN)	Δx^* (nm)	$k_{vw,0}$ (s^{-1})	N
MV-6IQ	$1,7 \pm 0,1$	$8,1 \pm 0,2$	$0,09 \pm 0,01$	457	$4,2 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,2$	$0,12 \pm 0,01$	288
MV-4IQ	$2,6 \pm 0,1$	$5,5 \pm 0,2$	$0,07 \pm 0,01$	326	$3,6 \pm 0,3$	$2,2 \pm 0,3$	$0,13 \pm 0,01$	46

Tabelle 6.2: Charakteristische Parameter der Myosin-V - Aktin Bindung.

Es zeigt sich, dass die Bindungslängen in Rückwärtsrichtung wesentlich größer sind (Faktor 4 für MV-6IQ) als in Vorwärtsrichtung. Zudem ist die Bindungslänge

in Rückwärtsrichtung für beide Konstrukte verschieden, während dies in Vorwärtsrichtung nicht der Fall ist.

Die Bindungslänge in Rückwärtsrichtung ist mit ~ 8 nm für MV-6IQ und ~ 5.5 nm für MV-4IQ ungewöhnlich groß. Diese Distanzen entsprechen ca. einem Drittel der Länge, die den Kraftschlag des entsprechenden Konstrukts ausmacht [115, 131, 132]. Im Vergleich dazu sind typische Längen für Protein-Protein-Bindungen fast eine Größenordnung kleiner [133]. Die Bindungslänge kann daher nicht ausschließlich auf das Aufbrechen intermolekularer Bindungen zurückgeführt werden. Stattdessen muss eine große strukturelle Änderung mit dem Ablösen des Myosinkopfs von Aktin verbunden sein. Betrachtet man die Bindungslängen in Rückwärtsrichtung für beide Konstrukte genauer, stellt man fest, dass sie proportional zur Anzahl an IQ-Motiven des Konstrukts ist (siehe linker Graph in Abbildung 6.10). Außerdem sinkt die wahrscheinlichste Abrisskraft mit wachsender IQ-Anzahl. Dieses Verhalten erinnert an das Hebelgesetz und lässt vermuten, dass der Leverarm bei der strukturellen Veränderung bei Belastung in Rückwärtsrichtung eine Rolle spielt.

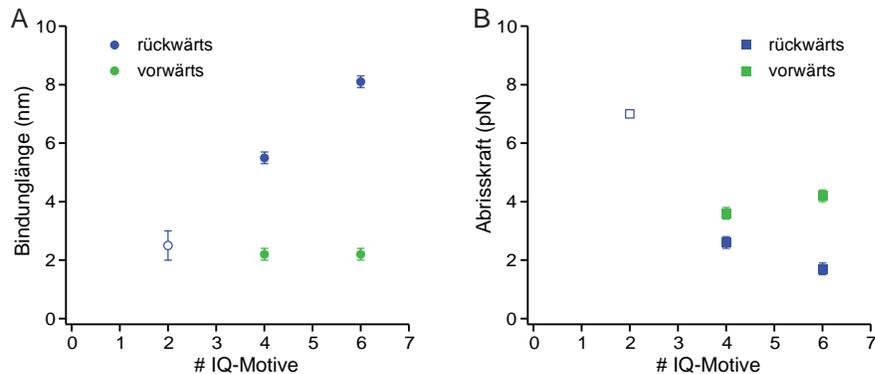


Abbildung 6.10: (A) Distanz zur Ablösebarriere (Bindungslänge) von MV-6IQ und MV-4IQ (gefüllte Symbole) als Funktion der Anzahl IQ-Motive für Belastung in Vorwärts- (grün) und Rückwärtsrichtung (blau). (B) Wahrscheinlichste Abrisskraft der Myosin-Konstrukte. Die offenen Symbole geben die Bindungslänge und wahrscheinlichste Abrisskraft von Myosin-II unter rückwärtiger Belastung an (aus Ref. [134]).

In früheren Experimenten wurde von Nishizaka et al. das Ablösen von einzelnen ATP-freien Myosin-II Molekülen von Aktin gemessen [134, 135]. Bei diesem doppelköpfigen Motor mit zwei IQ-Motiven bindet meistens jeweils nur ein Kopf. Die Messungen fanden unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen statt: der Motor wurde in Rückwärtsrichtung und bei einer konstanten Geschwindigkeit von 100 nm/s belastet. Wie Abbildung 6.10 zeigt, setzt der kleinere Myosin-II Motorkopf die hier beobachteten Abhängigkeiten von Bindungslänge und Abrisskraft von der Anzahl an IQ-Motiven fort. Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine wichtige Rolle des Leverarms auf das Ablösen zwischen Myosinkopf und Aktin in Rückwärtsrichtung.

Im Gegensatz zur Rückwärtsrichtung ist die Bindungslänge bei Belastung in Vorwärtsrichtung bei beiden Konstrukten MV-6IQ und MV-4IQ gleich (siehe Abbildung 6.10A) und mit ~ 2 nm im oberen Grenzbereich gemessener Protein-Barrierenlängen [136]. Auch die Abrisskraft beider Konstrukte ist annähernd konstant. In dieser Belastungsrichtung scheint die Länge des Leverarms keine große Bedeutung zu haben.

Aus den unterschiedlichen Bindungslängen in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung lässt sich eine Energielandschaft ableiten. Diese ist in Abbildung 6.11 schematisch dargestellt und verdeutlicht die Asymmetrie des Ablöseverhaltens unter Kraft. Aufgrund der sehr ähnlichen Ratenkonstanten für das Ablösen ohne Belastung (siehe Tabelle 6.2) sind die nötigen Aktivierungsenergien in beiden Richtungen ähnlich groß. Das asymmetrische Verhalten kommt fast ausschließlich durch die unterschiedlichen Bindungslängen zustande. Die Schemazeichnungen des Motors in Abbildung 6.11 geben eine mögliche strukturelle Erklärung der Asymmetrie wieder. Diese werden im folgenden Abschnitt näher besprochen.

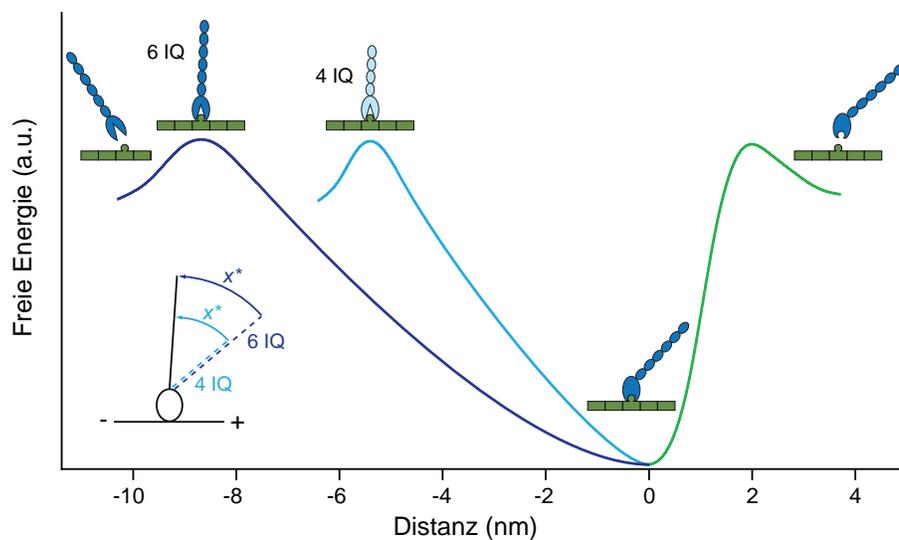


Abbildung 6.11: Schematische Darstellung der Energielandschaft für die Abrissereignisse zwischen Myosinkopf und Aktinfilament. Das asymmetrische Abrissverhalten wird hauptsächlich durch unterschiedliche Distanzen zur Übergangsbarriere bestimmt. Die Skizzen der Motorkonformation geben eine mögliche strukturelle Erklärung der Asymmetrie wieder (siehe Abschnitt 6.2.3). Inset: Skizze zur Geometrie der Myosin-Konstrukte.

6.2.3 Ein Modell zur Erklärung der Asymmetrie

Eine natürliche Ursache des asymmetrischen Verhaltens der Abrissereignisse liegt in der asymmetrischen Geometrie des ATP-freien, an Aktin gebundenen Myosin-V Kopfs. Wie

mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen festgestellt wurde, schließt der Leverarm in diesem Fall einen Winkel von $\sim 40^\circ$ mit der (+)-Richtung des Aktinfilaments ein [119]. Vorwärtskräfte wirken daher näherungsweise in Richtung des Leverarms, während Rückwärtskräfte unter einem großen Winkel am Leverarm angreifen.

Zwei unterschiedliche Modelle können die Abhängigkeit der Abrisskraft von der Leveramlänge erklären. Sie sind schematisch in Abbildung 6.12 dargestellt. Im ersten Modell (Modell A) wird das Myosin-V Konstrukt durch die Rückwärtskraft von einer *post-stroke* Konformation in eine *pre-stroke* Konformation überführt, der Kraftschlag also zurückgedreht (vgl. Abschnitt 6.1.1). Das Modell geht davon aus, dass mit der Position des Leverarms auch die zum natürlichen Kraftschlag gehörenden Konformationsänderungen der Motordomäne entsprechend rückwärts durchlaufen werden². Fluoreszenzmessungen haben ergeben, dass die Affinität von Myosin-V zu Aktin von der Konformation der Motordomäne abhängt und im *pre-stroke* Zustand schwächer ist als im *post-stroke* Zustand [108, 112] (vgl. die Diskussion in Abschnitt 6.1.1). Ein durch die äußere Kraft bewirktes Umdrehen des Kraftschlags und der damit verbundenen Konformationen der Motordomäne führt damit zu einem schnellen Ablösen des Motorkopfs von Aktin.

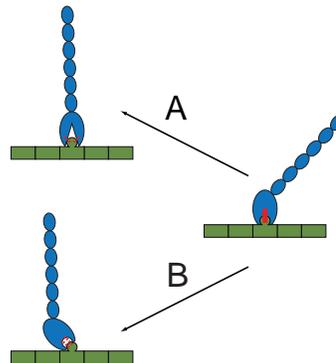


Abbildung 6.12: Modelle für die Asymmetrie des einköpfigen Myosin-V. (A) Modell der Kraftschlag-Umkehr. Die am Ende des Leverarms anliegende Kraft bewirkt über eine Konformationsänderung in der Motordomäne eine kleinere Affinität zu Aktin. (B) Modell des Abdrehens von Aktin. Leverarm und Motordomäne werden gleichzeitig gedreht und verstärken Abrisskräfte und Bindungslängen an der Myosin-Aktin Oberfläche. Rote Stäbe symbolisieren starke (durchgezogen) oder schwache Bindungen (gestrichelt).

Im zweiten Modell (Modell B) wird nicht nur der Leverarm gedreht, sondern zusammen mit ihm auch die Motordomäne. Beide Elemente bleiben starr miteinander verbunden. Das führt zu einem Abdrehen des Myosinkopfs vom Aktinfilament. Bin-

² Da in den Experimenten keine Nukleotide verwendet wurden, weichen die Konformationen der Motordomäne möglicherweise von den Kristallstrukturen in Anwesenheit von Nukleotiden ab.

dungslängen der Bindungen an der Myosin-Aktin Grenzfläche werden durch die Hebelwirkung des Leverarms vergrößert und die zum Reißen der Bindungen nötigen Kräfte herabgesetzt. Wichtig ist, dass eine Verbiegung des Leverarms allein die großen Bindungslängen in Rückwärtsrichtung nicht erklären kann. Eine Verbiegung würde nur zu einer größeren Elastizität des Myosin-Aktin-Kugel-Systems beitragen und nicht in die Bindungslänge eingehen. Die Experimente in dieser Arbeit können Modell B nicht ausschließen. Die beobachtete Kraftabhängigkeit des Nukleotidumsatzes in einzelköpfigen Myosin-V Konstrukten [114, 126, 127] ist jedoch nicht konsistent mit der in Modell B gemachten Annahme einer steifen Verbindung zwischen Leverarm und Motordomäne. Daher ist Modell A wahrscheinlich eher gültig.

In beiden Modellen beschreibt die in Tabelle 6.2 angegebene unbelastete Ratenkonstante für das Ablösen der Motordomäne von Aktin unterschiedliche Prozesse in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung. In Vorwärtsrichtung gibt $k_{vw,0}$ die kraftfreie Rate für das direkte Ablösen der Motordomäne an. In Modell A ist $k_{rw,0}$ die unbelastete Rate der Kraftschlags-Umkehr, in Modell B die Rate für das Ablösen durch Drehung der Domäne. Aus diesem Grund müssen die Raten ohne Kraft für beide Richtungen nicht gleich sein.

Ein Vergleich der Energielandschaft des einköpfigen Myosins (Abbildung 6.11) mit der Energielandschaft des nativen zweiköpfigen Motors (Abbildung 6.4) läßt vermuten, dass die Asymmetrie des nativen Moleküls unter hoher Kraft vom asymmetrischen Verhalten des einzelnen Kopfs mitbestimmt wird. Die Beobachtung, dass bei einem einzelnen Kopf ein Drehen des Leverarms unter Rückwärtsbelastung zu einem leichteren Ablösen führt, unterstützt das in Abschnitt 6.1.2 vorgestellte Modell für die kraftinduzierten Rückwärtsschritte des zweiköpfigen Motors. Während eines Rückwärtsschritts wird die Konformation des Leverarms des an Aktin gebundenen Kopfs wie bei den Experimenten an einzelköpfigem Myosin umgedreht, und die Affinität zu Aktin erniedrigt. Dies ermöglicht nachfolgende Rückwärtsschritte. Eine Vorwärtskraft wirkt im nativen Molekül dagegen hauptsächlich auf den Kopf in *post-stroke* Konformation, der stark an Aktin gebunden ist. Daher sind mechanisch induzierte Rückwärtsschritte wahrscheinlicher als analoge Vorwärtsschritte.

In den Experimenten zum Einfluss von Kraft auf den chemomechanischen Zyklus eines Myosinkopfs von Oguchi et al. wurde auch das Ablösen des Motors unter Kraft in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung ohne ATP gemessen [127]. In ihren Experimenten konnten die Autoren keine ausgeprägte Asymmetrie zwischen beiden Richtungen feststellen. In Rückwärtsrichtung war allerdings eine leicht höhere Kraft zum Ablösen nötig als in Vorwärtsrichtung (5.1 pN zu 6.4 pN). Der Grund für die Unstimmigkeit zu den hier vorgestellten Versuchen ist nicht bekannt. In der hier vorgestellten Arbeit führten unspezifische Wechselwirkungen zwischen Kugel und Oberfläche (die bei fehlerhafter Funktionalisierung der Kugeln auftraten) zu einer Aufhebung der Asymmetrie der Ablösekraft. Teilweise unspezifische Wechselwirkungen bei Oguchi et al. stellen daher eine mögliche Erklärung der unterschiedlichen Beobachtungen dar.

Vor kurzem wurde von Lewalle et al. für Myosin-II des Skelettmuskels eine zu den Verteilungen in Abbildung 6.9 analoge asymmetrische Abrisskraftverteilung gemessen [137]. Auch für Myosin-II wird weniger Kraft benötigt, um den Kopf in Rückwärtsrichtung von Aktin abzulösen als in Vorwärtsrichtung. Die Experimente von Lewalle et al. wurden bei geringer ATP-Konzentration durchgeführt ($2\ \mu\text{M}$), und die Autoren schrieben die Asymmetrie teilweise einer richtungsabhängigen ATP-Bindungsrate zu. Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist, dass auch bei Myosin-II der Leverarm eine richtungsabhängige Stabilität der Myosin-Aktin-Bindung bewirkt. In diesem Fall könnte der Mechanismus eine allgemeine Eigenschaft von Myosin sein.

Richtungsabhängige mechanische Stabilität kommt auch in anderen biologischen Systemen vor. So entfaltet zum Beispiel GFP in Abhängigkeit von der Zugrichtung bei unterschiedlichen Kräften [138]. Auch der Titin-Telethonin-Komplex ist eine gerichtete molekulare Bindung [139]. Die über Hebelwirkung induzierte Asymmetrie wie im Fall des Myosin-V stellt ein allgemeines Prinzip dar, mit dem die Stabilität einer Bindung richtungsabhängig moduliert werden kann. Ein ähnlicher Hebelmechanismus könnte auch in anderen Protein-Bindungen oder in kraftsensitiven Konformationsänderungen von Molekülen vorkommen [140, 141].

6.3 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass der Leverarm von Myosin-V eine Asymmetrie der Myosin-V - Aktin Bindung bewirkt. Unter rückwärtsgerichteter Kraft (entgegen des Kraftschlags) löst Myosin-V leichter von Aktin ab als unter Vorwärtsbelastung. Die gemessene Asymmetrie kann durch die kraftinduzierte Umkehr des Kraftschlags und eine damit verbundene Änderung der Affinität der Motordomäne zu Aktin erklärt werden. Auf diese Weise bildet die asymmetrische Energielandschaft der Myosin-V - Aktin Bindung die Grundlage für das asymmetrische Verhalten des nativen doppelköpfigen Motors unter Kraft.

Mit den vorgestellten Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine mechanische Verdrehung des Leverarms von Myosin-V möglich ist. Ein reversibler Übergang zwischen *post-* und *pre-stroke* Konformationen konnte aufgrund der geringen Affinität der Motordomäne zu Aktin nicht beobachtet werden. Eine Erhöhung der Aktin-Affinität der Motordomäne läßt sich durch Mutationen an der *Loop 2* genannten Aminosäureschleife erreichen [142]. Eine künstlich erhöhte Aktin-Affinität könnte verhindern, dass der Motor ablöst nachdem der Kraftschlag umgekehrt wurde. In diesem Fall wäre möglicherweise ein Flippen des Leverarms zwischen den *post-* und *pre-stroke* Konformationen beobachtbar. Auf diese Weise könnte die Kinetik des Kraftschlags direkt ausgemessen werden. Eine weitere Möglichkeit, den Myosinkopf stärker an Aktin zu binden ist, ihn über ein Cystein kovalent an das Cystein 374 des Aktins zu fixieren³.

Interessant wäre eine Erweiterung der gezeigten Experimente auf den molekularen Motor Myosin-VI. Dieser Motor läuft, im Gegensatz zu Myosin-V, zum Minusende des Aktinfilaments. Die Änderung der Laufrichtung ist aber nicht auf eine umgekehrte Motordomäne zurückzuführen, sondern auf einen Einschub weniger Aminosäuren am Ansatz des Leverarms. Eine mechanische Belastung des Kopfs von Myosin-VI in unterschiedliche Richtungen könnte klären, ob auch hier eine asymmetrische Anbindungs-Energielandschaft vorliegt, und ob sie gleich oder entgegen der von Myosin-V orientiert ist.

³Cystein 374 ist auch in polymerisiertem Aktin lösungsmittelzugänglich.

Kapitel 7

Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode der Kraftspektroskopie mit der optischen Pinzette stößt die Tür auf zu vielen weiteren spannenden Experimenten. Sie ist durch die Verwendung von Cysteinen zum Anbinden des Proteins sehr leicht auf andere Proteine übertragbar. Auf diese Weise wird es möglich, Faltungsmuster sowie die Energielandschaft einer Vielzahl von Proteinen sehr genau auszumessen. Darüber hinaus ermöglicht die Anbindungsschemie leicht das Verändern der Zugrichtung, so dass verschiedene Faltungspfade einfach verglichen werden können. Die unabhängigen Zugänge zur Faltungsenergie über das Verhältnis der extrapolierten Ratenkonstanten, das Fluktuationstheorem von Crooks und die Berechnung der Energie aus den Aufenthaltverteilungen ermöglichen es, sehr präzise die freie Energie des Proteins sowie den Einfluss von Liganden oder Bindungspartnern auf die Proteinstabilität zu messen. Es kann auch die Anbindungskinetik von Bindungspartnern direkt gemessen werden (vgl. Abschnitt 5.3). Aufgrund der Stabilität der optischen Pinzette wird es möglich, auch sehr langsam faltende Proteine zu untersuchen. Zudem erlaubt die sehr gute Kraft- und Zeitauflösung das Messen der Kinetik und aktiven Bewegung von Enzymen mit kleinen Konformationsänderungen. Kleine Konformationsänderungen können auch verstärkt werden, indem das Protein oder Enzym über die Cysteine polymerisiert wird, bevor die Linker angehängt werden.

Ein großer Vorteil der gezeigten Experimente ist, dass ein einziges Protein ausreicht, um seine gesamte kraftabhängige Kinetik auszumessen. Damit kann nicht nur untersucht werden, ob es möglicherweise Unterschiede in der Kinetik zwischen einzelnen Proteinen gibt. Das Abweichen der Verweildauerverteilungen von einer einfach exponentiellen Verteilung würde auch sehr schnell das Auftreten unterschiedlicher Faltungspfade innerhalb eines Proteins anzeigen. In Kraft-Zeit-Aufnahmen sind viele Faltungs/Entfaltungsübergänge hintereinander direkt beobachtbar. Daher kann auch leicht direkt erkannt werden, ob ein Protein unterschiedliche Faltungspfade aufweist.

Da die Experimente mit der optischen Pinzette relativ unempfindlich auf die Zugabe anderer, auch großer, Proteine und vieler Wirkstoffe sind, lässt sich mit den vorgestellten Kraftspektroskopie-Experimenten zum Beispiel auch der Einfluss von Enzymen, die frei in Lösung schwimmen, auf die Faltung und Entfaltung eines Proteins untersuchen. So könnte möglicherweise die Wirkung von Chaperonen auf langsam faltende Proteine beobachtet werden. Denkbar ist auch die Zugabe von Enzymen, die das eingespannte Protein umsetzen. So ließe sich beispielsweise der Einfluss einer von einem Enzym angebrachten Phosphatgruppe auf die Faltung des Proteins messen, indem seine Kinetik vor und nach Kontakt mit dem Enzym verglichen wird. Da mit dem Instrument auch Fluoreszenzmessungen möglich sind, lassen sich relativ einfach mechanische Messungen zum Beispiel mit FRET-Messungen kombinieren. In diesem Fall würde sich eine Geometrie anbieten, bei der die Kraft über einen langen DNA-Linker übertragen und das mit Farbstoffen markierte Protein an der Oberfläche fixiert wird.

Eine weitere Verbesserung der Auflösung lässt sich erreichen, indem die thermischen Fluktuationen der Kugeln und der Linker zwischen Kugeln und Protein minimiert werden. Dies ist möglich, indem eine korrelierte Bewegung der beiden Kugeln, die nicht in das Differenzsignal der Kugeln eingeht, verstärkt wird. Möglich wird dies über eine steifere Verbindung zwischen den Kugeln. Eine Möglichkeit dafür sind DNA-Nanostrukturen, bei denen parallele DNA-Stränge quervernetzt werden. Die Anbindung des Proteins über eine Modifikation mit Oligonukleotiden ist dabei direkt übertragbar. In einer Erweiterung dieser Nanolinker, bei der zwei unterschiedlich funktionalisierte Linker über eine flexible Brücke miteinander verbunden sind, kann zum Beispiel die Kinetik von Antikörper-Antigen-Bindungen oder Protein-Ligand-Systemen gemessen werden. Diese Messgeometrie ermöglicht auch die Abschätzung von *on*-Raten.

In weiteren nachfolgenden Experimenten kann der modellfreie Zugang zur Energielandschaft dazu beitragen, fundamentale Eigenschaften der Proteinfaltung aufzuklären. So kann zum Beispiel der prä-exponentielle Faktor k_A der Proteinfaltung genauer bestimmt werden. Durch die Verwendung unterschiedlich großer Kugeln kann direkt die Diffusionszeit der Kugel verändert und damit der Einfluss der Kugeldiffusion auf die Höhe der Energiebarriere untersucht und möglicherweise korrigiert werden. Außerdem ist man über die direkte Messung der Barrierenpositionen bei unterschiedlichen Vorspannungen in der Lage, die Anwendbarkeit der verwendeten kinetischen Modelle zur Bestimmung von Barrierenpositionen und kraftfreien Faltungsraten zu testen. Damit kann eine bessere theoretische Beschreibung der Faltung und Entfaltung unter Kraft erreicht werden.

Anhang A

Details zum Aufbau der optischen Pinzette

A.1 Komponenten der optischen Pinzette

Tabelle A.1 enthält eine Liste der in der optischen Pinzette verwendeten Komponenten. Die Bezeichnungen beziehen sich auf Abbildung 2.3 in Abschnitt 2.2.

Die Datenaufnahme erfolgte mit einer Datenerfassungskarte (PCI-6259, NI, München) bei 100 kHz. Die Daten wurden nach Mittelung auf 20 kHz abgespeichert. Die Ansteuerung des Piezotischs und des AOD erfolgte über eine DSP-Karte (*digital signal processing*) (Toro-16 DSP, GBM, Mönchengladbach).

Bez.	Name	Eigenschaften	Hersteller
Strahlengang Fallenlaser			
	Fallenlaser	1064 nm Nd:YVO ₄ Festkörperlaser, 5W, TEM ₀₀ Mode, vertikal polarisiert	Spectra Physics, Kalifornien, USA
	Faraday Isolator		EOT, Massachusetts, USA
	Teleskop	1064 nm, 5 × Vergrößerung	BFI OPTILAS, Puchheim, Deutschland
	λ/2-Plättchen	1064 nm, Quarzkristall, low order, Ø 9,5 mm	B.Halle, Berlin, Deutschland
	Polarisationsstrahlteilerwürfel	800-1100 nm, Flintglas	B.Halle, Berlin, Deutschland
	Quarz-Spiegel	1064 nm, R > 99,8%	Edmund Optik, Karlsruhe, Deutschland
	Akusto-optischer Deflektor	1064 nm, xy, (49 × 49) mrad ²	Akoptoelectronic, Orsay Cedex, Frankreich
	5 × Teleskop	Plankonvex-Linsen, 633-1064 nm, f ₁ = 82,4 mm, f ₂ = 412 mm	Laser Components, Olching, Deutschland
	1:1 Teleskop	Plankonvex-Linsen, 633-1064 nm, f ₁ = f ₂ = 103 mm	Laser Components, Olching, Deutschland
	Strahlteiler	Reflexion 830 und 1064 nm > 90%, Transmission 532 - 780 nm > 90%	AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland
	D ₁ optional	Reflexion 1064nm > 90%, Transmission 400 - 800nm > 90%	Precision Photonics, Colorado, USA
	Objektiv	63 × Öffnungszahl, NA = 1,45	Olympus Deutschland, Hamburg, Deutschland
	Kondensor	Ölflimmersion, NA = 1,4	Olympus Deutschland, Hamburg, Deutschland
	Strahlteiler	Transmission 532 - 780 nm > 90%, Reflexion 830 und 1064 nm > 90%	AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland
	L ₁	633-1064 nm, f = 103 mm	Laser Components, Olching, Deutschland
	L ₂	633-1064 nm, f = -39,2 mm	Laser Components, Olching, Deutschland
	L ₃	633-1064 nm, f = 25,8 mm	Laser Components, Olching, Deutschland
	F ₁	Block OD 6 bei 532, 633-635 und 750-790 nm, OD 4 von 300 - 749 nm	AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland
	F ₂	Block OD 0,6 - 1,6 2D, (10 × 10) mm ²	Thorlabs, München, Deutschland
	Positionssensitive Dioden		Silicon Sensors, Berlin, Deutschland
Helffeldbeleuchtung			
	LED	780 nm	Reithner Lasertechnik, Wien, Österreich
	Anregungsfilter	Transmission (770 ± 15) nm, Block OD 6 300-1200 nm	AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland
	F ₃	633-1064 nm, f = 51,6 mm	Laser Components, Olching, Deutschland
	L ₄	Transmission (770 ± 15) nm, Block OD 6 bei 532, 633-635, 830 und 1064 nm, ≥ OD 4 bei 300-1200 nm	AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland
	F ₄	633-1064 nm, f = 51,6 mm	Laser Components, Olching, Deutschland
	L ₆	633-1064 nm, f = 51,6 mm	EIV Elektronik, Leer, Deutschland
Strahlengang Fluoreszenz			
	Anregungslaser	Cube 405 nm, 50 mW	Coherent, Dieburg, Deutschland
	Anregungslaser	473 nm, 30 mW	Reithner Lasertechnik, Wien, Österreich
	Anregungslaser	532 nm, 30 mW	Reithner Lasertechnik, Wien, Österreich
	Teleskop	Plankonvex-Linsen, 430-700 nm, f ₁ = 25 mm, f ₂ = 200 mm	BFI OPTILAS, Puchheim, Newport, Darmstadt, Deutschland
	T ₄ , T ₅	Plankonvex-Linsen, 400-700 nm, f ₁ = 25,4 mm, f ₂ = 350 mm	Newport, Darmstadt, Deutschland
	T ₆	450-1200 nm, R > 98%	Edmund Optik, Karlsruhe, Deutschland
	S ₃	Reflexion 380-440 nm > 90%, Transmission 465-800 nm ≥ 90%	AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland
	D ₃	Reflexion 530-532 nm > 90% Transmission 400-490 nm ≥ 90%	AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland
	D ₄	Reflexion 372-410 nm > 94%, Transmission 420 - 900 nm > 93%	AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland
	L ₇	430-700 nm, f = 300 mm	Newport, Darmstadt, Deutschland
	D ₅	Reflexion 473 und 532 ≥ 90%, Transmission 490-510 nm und 555-780 nm ≈ 85%	AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland
	D ₅ optional	Strahlteiler	AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland
	L ₅	430-700 nm, f = 300 mm	Newport, Darmstadt, Deutschland
	F ₅	Dual Line Laser Reflektionband, Block OD 6 bei 473 und 532 nm; Multiphoton-Emitter, Transmission 720-380 nm > 90%, Block λ/OD 6 750-1100 nm	AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland
	F ₅ optional	Langpass, Transmission 419-730 nm > 95%, Block OD 6 300-410 nm; Multiphoton-Emitter, Transmission 720-380 nm > 90%, Block > OD 6 750-1100 nm	AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland

Tabelle A.1: Liste der in der optischen Pinzette verwendeten optischen Komponenten.

Anhang B

Abschätzungen und Protokolle zu den Proteinfaltungsexperimenten

B.1 Herstellung der Kugel-DNA-Protein-Hanteln

PCR der DNA-Linker

Die folgenden Tabelle listet die für die PCR der DNA-Linker verwendeten Oligonukleotide auf. Alle Oligonukleotide wurden von IBA, Göttingen bezogen.

Objekt	Sequenz	Funktionalisierung
Lange dsDNA-Linker		
Templat	Lambda-Phage, Basen 10557 - 11100 (544 bp)	–
sense, Bio	5'-Bio-GGCGA B CTGG B CGTTGATTTG-3'	B: dT-Biotin
sense, Dig	5'-Dig-GGCGA D CTGG D CGTTGATTTG-3'	D: dT-Digoxigenin
antisense	5'-CGACTCGCTGGTCTGGTTGAACGTCAGCCCTGCC X CCTGCCCGGCTCTGGACAGG-3'	X: abasic site
Protein Oligo	5'-GGCAGGGCTGACGTTCAACCAGACCAGCGAGTCG-Thio 3'	Thiol
kurze dsDNA-Linker		
Templat	Lambda-Phage, Basen 10951 - 11100 (150 bp)	–
sense, Bio	5'-Bio-ATGCC B GGTA B CAGGGCAACTC-3'	B: dT-Biotin
sense, Dig	5'-Dig-ATGCC D GGTA D CAGGGCAACTC-3'	D: dT-Digoxigenin
antisense	5'-CGACTCGCTGGTCTGGTTGAACGTCAGCCCTGCC X CCTGCCCGGCTCTGGACAGG-3'	X: abasic site
Protein Oligo	5'-GGCAGGGCTGACGTTCAACCAGACCAGCGAGTCG-Thio 3'	Thiol
kurze ssDNA-Linker		
Templat	Lambda-Phage, Basen 10964 - 11100 (137 bp)	–
sense, Bio	5'-Bio-ATGCC B GGTA B C X GGGCAACTCAACCCTGTCCG-3'	B: dT-Biotin, X: abasic site
sense, Dig	5'-Dig-ATGCC D GGTA D C X GGGCAACTCAACCCTGTCCG-3'	D: dT-Digoxigenin, X: abasic site
antisense	5'-CGACTCGCTGGTCTGGTTGAACGTCAGCCCTGCC X CCTGCCCGGCTCTGGACAGG-3'	X: abasic site
Protein Oligo	5'-GGCAGGGCTGACGTTCAACCAGACCAGCGAGTCG-Thio 3'	Thiol

Für die PCR wurde folgendes Protokoll verwendet:

Komponenten	PCR
H ₂ O	41,3 μ l
Puffer (Thermopol)	5 μ l
dNTP	0,5 μ l
Templat	1 μ l
Primer 1	0,5 μ l
Primer 2	0,5 μ l
Primer 3	1 μ l
Polymerase (Taq)	0,2 μ l
	95° C 5 min
	95° C 15 s
	55° C 15 s
	72° C 40 s
	4° C hold

Die Aufreinigung erfolgte über das Millipore Montage PCR Kit (Nr. UFC7PCR50) und eine anschließende Ethanol-fällung in *lowbind* DNA Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) nach folgendem Protokoll:

- 1/10 Volumen Na-Acatat (3M Stock, pH 5,2)
- 2 Volumen EtOH (unvergällt)
- 45-60 min bei -20° C
- Zentrifugation 15 min bei 13000 rpm (max. für Oligos)
- Überstand weg
- 1000 μ l 70% EtOH, 5 min bei 12000 rpm (max. für Oligos)
- Überstand weg, Eppi trocknen lassen
- Aufnahme in Puffer

Funktionalisierung des Proteins

Protein

Um eine Polymerisation über Cysteine zu verhindern, wurde das Protein direkt nach der Aufreinigung über einen His-Tag mit 2'2'-Dithiodipyridin (DTDP) funktionalisiert:

- Inkubation für 1 h bei 25° C mit 5-10 \times Überschuss (max. 5 mM DTDP einer 100 mM Stocklösung in DMSO)
- Zentrifugation 10 min bei 10000 \times g
- Aufreinigung über Größenausschluss-Chromatographie (Superdex 200, GE Healthcare)
- Einstellen der Konzentration auf ca. 200 μ M

Das Protein wurde entweder direkt weiter funktionalisiert oder mit 15% Glycerin bei -80° C eingefroren.

Oligonukleotide

Die Thiolgruppen der Oligonukleotide wurden direkt vor der Reaktion mit dem Protein reduziert:

- 40 μl Thiol-Primer (100 mM Stocklösung)
- 10 mM TCEP (100 mM Stocklösung)
- Inkubation 30 min bei 25° C
- Fällung mit EtOH (s.o.)
- direkt nach Resuspension Inkubation mit Protein in molarem Verhältnis 2:1 (Oligo:Protein)

Funktionalisiertes Protein

Die Funktionalisierung des Proteins mit den Oligonukleotiden erfolgte 2-3 d bei 25° C mit einem molaren Verhältnis von 2:1 (Oligos:Protein) bei einer Oligo-Konzentration von ca. 200 μM .

Zum Abtrennen des vollständig funktionalisierten Proteins von Protein mit einem Oligo bzw. Oligo-Dimeren ohne Protein wurde Größenausschluss-Chromatographie (Superdex 200) verwendet (vgl. Abbildung 2.8 in Kapitel 2). Anschließend wurde das Konstrukt auf ca. 50 ng/ μl (Absorption gemessen bei 260 nm mit DNA-Parametern) aufkonzentriert.

DNA-Protein Konstrukte

Die DNA-Linker (Konzentration ca. 1 μM) und funktionalisiertes Protein (Konzentration ca. 5-20 ng/ μl) wurden 30 min bei 4° C inkubiert, um DNA-Protein Konstrukte zu erhalten. Sie konnten ca. 0,5-4 Wochen für Experimente verwendet werden. Abbildung B.1 zeigt ein Kontrollgel der Reaktion zwischen Oligo-Protein und DNA-Linkern. Durch Zugabe von Proteinase K kann das Vorhandensein von Protein nachgewiesen werden.

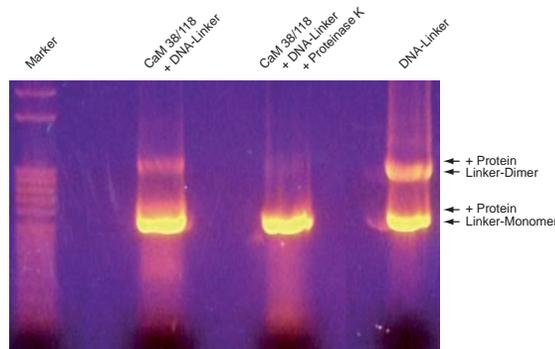


Abbildung B.1: *Polyacrylamidgel der Reaktion zwischen Oligonukleotid-funktionalisiertem Protein und dsDNA-Linkern. Ein Vergleich der Banden zwischen dem Reaktionsansatz, dem Reaktionsansatz mit Proteinase K und einer Kontrolle aus DNA-Linker-Monomeren und -Dimeren bestätigt eine erfolgreiche Reaktion.*

Beschichtung der Kugeln

Die Kugeln wurden entweder mit Streptavidin (Invitrogen, Karlsruhe) oder F_{ab} -Fragmenten eines Anti-Digoxigenin-Antikörpers (Roche, Mannheim) funktionalisiert. Die Beschichtung folgte weitgehend dem Protokoll des Glutaraldehyd-Kits von Polysciences (Polysciences, Eppelheim), mit Amino-funktionalisierten Kugeln. Um einem Verklumpen der Kugeln entgegenzuwirken, stellte sich als wichtig heraus, Reaktionsgefäße mit rundem Boden zu verwenden, Zentrifugationsschritte so langsam wie möglich zu wählen (< 3500 rpm für $1 \mu\text{m}$ Kugeln) und bei Waschschritten Tween-20 in den Puffer zu geben (0.05%).

Protein-Polymere

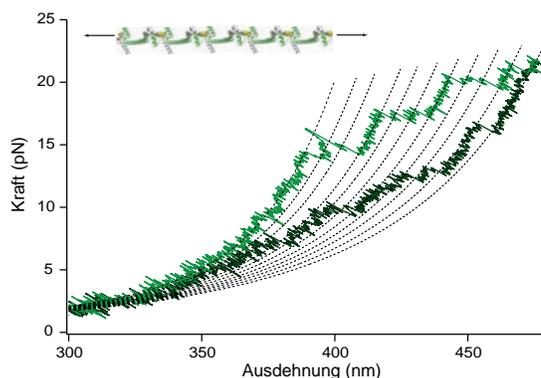


Abbildung B.2: *Kraft-Abstands-Kurve der Entfaltung (hellgrün) und Faltung (dunkelgrün) eines CaM 38/118-Polymers. Die einzelnen Proteine sind über Disulfidbrücken kovalent verbunden. Die Skizze veranschaulicht die Struktur des Polymers.*

Neben der Konstruktion von Kugel-DNA-Protein-Hanteln mit einzelnen eingeschlossenen Proteinen erlaubt eine Variation der vorgestellten Methode auch das Anhängen von DNA-Linkern an Protein-Polymere. Um dies zu erreichen, werden die Cysteine des Proteins nicht mit DTDP funktionalisiert. Bei geeigneter Konzentration polymerisiert das Protein über intermolekulare Disulfidbrücken [35]. Die Thiol-modifizierten Oligonukleotide binden an freie Cysteine an den Polymer-Enden. In Abbildung B.2 ist die Kraft-Abstands-Kurve eines CaM 38/118-Polymers (vgl. Abschnitt 5.2) mit fünf seriellen Proteinen gezeigt. Das Entfalten und Rückfalten der einzelnen Domänen sind deutlich aufgelöst. Wie bei einzelnen CaM 38/118 Proteinen (Abschnitt 5.2) beträgt der mittlere Konturlängenzuwachs ca. 10 nm.

Die Untersuchung von Protein-Polymeren erlaubt es, sehr schnell Informationen über den Konturlängenzuwachs eines Proteins zu gewinnen. Darüber hinaus können durch eine Serienschaltung eines Proteins sehr kleine Konformationsübergänge, zum Beispiel Bewegungen von Enzymen, verstärkt werden.

B.2 Limitierungen der Faltungsexperimente mit der optischen Pinzette

Eine häufige Beobachtung bei der Durchführung der Kraftspektroskopie-Experimente an einzelnen Proteinen war ein zeitlich veränderliches Entfaltungsmuster. Dieses Phänomen wird im folgenden Abschnitt vorgestellt. Anschließend wird auf die Genauigkeit der Ratenkonstantenbestimmung eingegangen.

Stabilität der Proteine in der optischen Pinzette

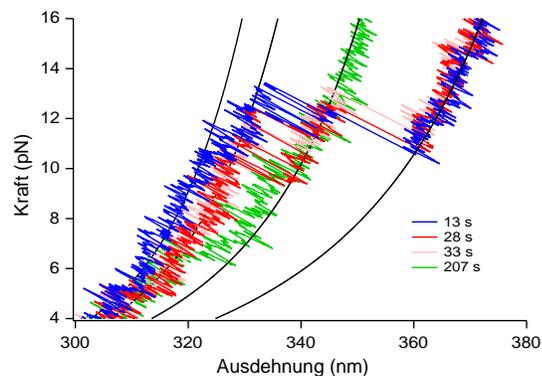


Abbildung B.3: Vier Kraft-Abstandskurven des selben LZ26 Moleküls. Zu Beginn des Experiments zeigt das Molekül das vollständige Entfaltungsmuster (blau). In nachfolgenden Kurven (rot und hellrot und grün) faltet das Molekül nicht mehr vollständig zurück. Gegen Ende eines Experiments wird das Protein nicht mehr vollständig entfaltet (grün).

In den kraftspektroskopischen Experimenten mit der optischen Pinzette wurde oft ein zeitlich veränderliches Faltungsverhalten der untersuchten Proteine beobachtet. Als Beispiel werden in Abbildung B.3 vier Kraft-Abstandskurven der Entfaltung des selben LZ26-Proteins (vgl. Abschnitt 4.2) gezeigt. Während das Molekül zu Beginn des Experiments das vollständige Entfaltungsmuster aufweist, faltet es in späteren Zyklen nicht mehr vollständig zurück. Gegen Ende des Experiments kann das Protein nicht mehr vollständig entfaltet werden. Ein ‘Sterben’ des Moleküls wie in Abbildung B.3 erschwert die Bestimmung des natürlichen Entfaltungsmusters. Außerdem limitiert es die Zeitspanne, über die Kraft-Zeit-Aufnahmen gemessen werden können. Die relativ hohe Intensität der Fallenlaser legt photochemische Prozesse als Ursache für die zeitlichen Veränderungen nahe. Konsistent mit dieser Vermutung wurde bei Verwendung von Ascorbinsäure als Reduktionsmittel eine Verbesserung der Protein-Lebensdauern beobachtet (vgl. Abschnitt 5.2). Ein ähnliches Verhalten, bei dem sich das Faltungs-/Entfaltungsmuster des Moleküls zeitlich änderte, wurde bei DNA-Hairpins beobach-

tet [143]. In den Experimenten von Landry et al. wurden mögliche Gründe für dieses Phänomen systematisch untersucht. So konnte der schädigende Einfluss von Sauerstoffradikalen, die durch Photoprozesse nahe des Fallenlasers entstehen, als Ursache für das ‘Sterben’ der Moleküle nachgewiesen werden. Eine Verlängerung der Lebensdauer des Moleküls konnte auch bei Landry et al. durch die Verwendung von Reduktionsmitteln wie Ascorbinsäure erreicht werden. Darüber hinaus schlagen die Autoren vor, Glaskugeln an Stelle der Polystyrolkugeln für die Experimente zu verwenden.

Genauigkeit der Ratenkonstantenbestimmung

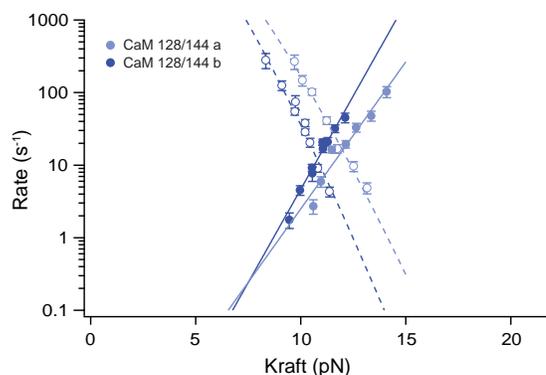


Abbildung B.4: Ratenkonstanten der Faltung (offene Kreise) und Entfaltung (gefüllte Kreise) von CaM 128/144 als Funktion der Kraft. Gezeigt ist der Verlauf der Ratenkonstanten zweier unter gleichen Bedingungen gemessener Moleküle.

In Abbildung B.4 sind die Ratenkonstanten der Faltung (offene Kreise) und der Entfaltung (gefüllte Kreise) zweier CaM 128/144-Moleküle (hellblau und dunkelblau) (vgl. Abschnitt 5.2) als Funktion der Kraft aufgetragen. Die statistischen Fehler innerhalb eines Moleküls sind relativ klein. Dennoch sind die Ratenkonstanten beider Proteine entlang der Kraftachse relativ zueinander deutlich verschoben. Eine mögliche Ursache für die Unsicherheit entlang der Kraftachse ist der Fehler der Federhärtenbestimmung von $\sim 10\%$. Die Genauigkeit der Kalibration lässt sich verbessern, indem über einen längeren Zeitraum oder über mehrere Kalibrationsmessungen gemittelt wird. Bei Verwendung eines Wasserimmersions-Objektivs für die optische Pinzette, mit dem in größeren Abständen zu Oberflächen gearbeitet werden kann, lassen sich störende Oberflächeneinflüsse leichter vermeiden.

Die kraftfreien Ratenkonstanten beider Moleküle wurden über eine Anpassung der Gleichungen 3.14 und 3.16 an die Daten bestimmt. Sie unterscheiden sich bei Entfaltung um einen Faktor 6.7 und bei Faltung um einen Faktor 0.3. Die Differenz der Barriereposition beträgt 1 nm. Zusätzlich zum Fehler der absoluten Kraft trägt der relativ kleine Kraftbereich, innerhalb dessen die Ratenkonstanten gemessen werden können,

zur Unsicherheit der Ratenkonstanten bei. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass Unterschiede zwischen beiden Molekülen, hervorgerufen durch photochemische Prozesse [143], die Faltung und Entfaltung beeinflussen (vgl. vorherigen Abschnitt). Das Beispiel dieser beiden Moleküle zeigt, dass die kraftfreien Ratenkonstanten der Faltung und Entfaltung nur auf ca. 1 Größenordnung genau bestimmt werden können. Solange nicht tatsächliche Unterschiede in der Kinetik der Moleküle vorliegen, ist eine Verbesserung der Genauigkeit möglich, indem über viele einzelne Moleküle gemittelt wird.

B.3 Langevin-Dynamik-Simulation der Kugel-DNA-Protein-Hanteln

Die thermische Bewegung jeder der beiden Kugeln der Kugel-DNA-Protein-Hantel folgt der überdämpften Langevin-Dynamik (vgl. die Gleichungen 2.2 und 2.3 in Abschnitt 2.1.2)[144]

$$\gamma_i \frac{dx_i(t)}{dt} + k_i x_i(t) - F_L(x_L) = \sqrt{2k_B T \gamma_0} \xi_i(t) \quad (\text{B.1})$$

(x_i : Kugelposition ($i = 1, 2$), γ_i : Reibungskoeffizient nach Stokes, k_i : Federhärte, $\sqrt{2k_B T \gamma_0} \xi_i(t)$: zufällige thermische Kraft). Die Kraft $F_L(x_L)$ wird von dem DNA-Linker mit Konturlänge L auf beide Kugeln ausgeübt. Sie ist vom Abstand der beiden Kugeloberflächen $x_L = z - 2r - x_1 - x_2$ (z : Abstand der beiden Fallenzentren, r : Kugelradius) abhängig und kann durch Invertierung der Gleichung 3.2 in Abschnitt 3.1 berechnet werden.

Bei der Simulation des Kugel-Verhaltens nach Gleichung B.1 wurde angenommen, dass sich der DNA-Linker während eines Iterationsschritts der Simulation von $dt = 10^{-8}$ s im Gleichgewicht befindet, die Kugel jedoch nicht [144]. Die Anfangsposition (Ruhelage) der Kugeln ist bei festgelegter Anfangskraft $F_{L,\text{start}}$ durch $x_i(0) = F_{L,\text{start}}/k_i$ gegeben, der anfängliche Abstand der Fallenzentren beträgt $z = x_1(0) + x_2(0) + x_L(F_{L,\text{start}})$. Nach jedem Zeitschritt dt wurden die Positionen der Kugeln über $x_{i,\text{neu}} = x_{i,\text{alt}} + dx_i$ mit $dx_i = dt/\gamma_i \cdot (-k_i x_i(t) + F_L(t, x_L) + \sqrt{2k_B T \gamma_0} \xi_i(t))$ neu berechnet. Anschließend wurden der Abstand der beiden Kugeloberflächen x_L und die Kraft $F_L(x_L)$, die der DNA-Linker ausübt, neu bestimmt. Das Differenzsignal x_{diff} beider Kugeln berechnet sich über $x_{\text{diff}} = x_1 + x_2$. Verschiedene Sampleraten k_{sample} wurden realisiert, indem alle $1/k_{\text{sample}}$ Sekunden ein simulierter Datenpunkt gespeichert wurde.

In manchen Simulationen wurden Übergänge des Proteins mit den Ratenkonstanten k_{on} und k_{off} berücksichtigt. In diesem Fall erfolgten die Übergänge nach jedem Zeitschritt dt mit den Wahrscheinlichkeiten $k_{\text{on}} dt$ und $k_{\text{off}} dt$. Bei erfolgreichem Übergang änderte sich die Konturlänge des Konstrukts L , die in die Berechnung der Kraft $F_L(x_L)$ einfließt, abrupt um die Konturlängenänderung $\Delta L_{\text{Protein}}$ des Proteins. Wenn

das Protein im entfalteten Zustand vorlag, wurde die Kraft $F_L(x_L)$ durch Invertierung des seriellen WLC-Modells berechnet (Gleichung 3.3).

B.4 Der Einfluss der Kugeldynamik auf Energielandschaften

Wenn das Protein faltet oder entfaltet, erfolgt der Übergang der Kugeln in ihre neue Gleichgewichtslage nicht instantan sondern diffusiv, getrieben durch die neue auf sie wirkende Kraft. Ihre Bewegung wird durch Gleichung 2.3 der Langevin-Dynamik bestimmt. Dies hat zur Folge, dass sie eine zusätzliche Aufenthaltswahrscheinlichkeit zwischen den durch die Proteinausdehnung bestimmten Ruhepositionen aufweist. Dieser Beitrag der Kugeln ist nicht wie die thermischen Fluktuationen um die Ruhepositionen in der Punktbildfunktion enthalten, und kann nicht durch die in Abschnitt 3.4.1 beschriebene Dekonvolution aus der Aufenthaltsverteilung des Proteins herausgerechnet werden. Dementsprechend ist dieser Beitrag der Kugeln auch noch in der über Gleichung 4.1 berechneten Energielandschaft des Proteins enthalten.

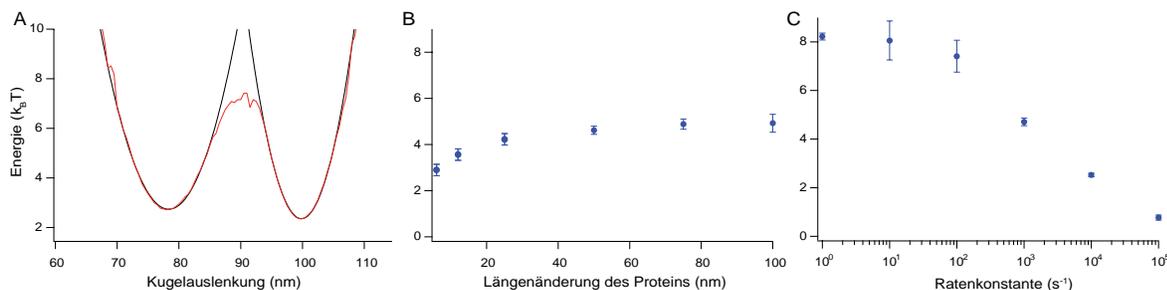


Abbildung B.5: *Einfluss der Kugelbewegung auf die Barrierenhöhe. (A) Simulierte Energielandschaft bei Ratenkonstanten von 1000 s^{-1} und 50 nm Proteidlängenzuwachs. (B) Barriere der Kugelbewegung als Funktion des Proteidlängenzuwachses. (C) Barriere der Kugelbewegung als Funktion der Ratenkonstanten des Proteins.*

Um den Beitrag zur Energiebarriere der Kugeln, den sie durch Diffusion zwischen den Ruhepositionen liefern, abschätzen zu können, wurden Simulationen der Langevin-Dynamik der Kugeln durchgeführt (siehe vorherigen Abschnitt). Zunächst wurde die Abhängigkeit dieses Kugelbeitrags als Funktion der Längenänderung des Proteins simuliert (Abbildung B.5A und B). Für die Simulation wurden typische Parameter für die DNA-Linker (Persistenzlänge 10 nm , Konturlänge 370 nm , Elastizitätsmodul 1200 pN) und die Federhärten ($k = 0.3\text{ pN/nm}$) verwendet. Die Vorspannung auf das System betrug 15 pN . Für die Faltungs- und Entfaltungsraten des Proteins wurden 1000 s^{-1} angenommen. Die scheinbare Barriere wird kleiner bei kleinerer Längenänderung des Proteins. In Abbildung B.5C ist das Ergebnis einer Simulation abgebildet, bei der

die Raten des Proteins variiert wurden (die übrigen Parameter waren dieselben, die Längenänderung des Proteins betrug 50 nm). Man sieht, dass die Barriere umso kleiner wird, je schneller die Raten des Übergangs sind. Da die simulierten Verteilungen aufgrund nicht berücksichtigter Elastizitäten in der Simulation grundsätzlich schmaler ausfielen als die gemessenen, müssen die simulierten Barrierenhöhen ca. $0,5 k_B T$ nach unten korrigiert werden.

Bei den Bedingungen, unter denen die Energielandschaft in Kapitel 4 gemessen wurde, ergibt sich für den Übergang $I_1 \rightarrow I_2$ eine simulierte Barriere von ca. $5 k_B T$, und für $I_2 \rightarrow I_1$ eine Barriere von ca. $3 k_B T$. Dies stimmt gut mit den gemessenen Werten von $4,5 k_B T$ und $1,9 k_B T$ überein und passt zu der Interpretation, dass die Kugelkinetik die Barrierenhöhen dominiert.

B.5 Minimierung thermischer Fluktuationen des Kugel-DNA-Systems

Simulationen zum Rauschverhalten der Kugel-Linker-Hanteln

Ein wichtiges Ziel von kraftspektroskopischen Experimenten zur Faltung von Proteinen ist die Gewinnung von Kenntnissen über die der Faltung zugrundeliegende Energielandschaft. Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode der Dekonvolutions-Kraftspektroskopie (vgl. Kapitel 4) ermöglicht das direkte Ausmessen der Energielandschaft eines Proteins entlang einer definierten Reaktionskoordinate. Die auf diese Weise gewonnene Energielandschaft enthält wesentlich mehr Informationen über die Faltung eines Proteins als die herkömmliche Landschaft aus kinetischen Messungen. Ein Problem der Dekonvolutions-Spektroskopie ist, dass die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Proteins nur indirekt über die in der Falle gefangenen Kugeln detektiert werden kann. Die thermischen Fluktuationen der Kugeln und der DNA-Linker verschleiern die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Proteins und führen zu einer geringeren Auflösung. Es ist deshalb wünschenswert, die Fluktuationen des Messsystems aus Kugeln und Linkern möglichst zu minimieren.

Eine gute Möglichkeit, die Fluktuationen des Systems zu verringern, bietet die Analyse des Differenzsignals der beiden Kugeln. Dieses Signal hat die Eigenschaft, dass korrelierte Bewegungen der Kugeln nicht zum Rauschen beitragen. Die Korrelation zwischen den Kugeln lässt sich prinzipiell erhöhen, indem die Steifigkeit der die Kugeln verbindenden Linker vergrößert wird [30, 82]. Dies ist in Abbildung B.6 veranschaulicht. Um den Einfluss von Konturlänge und Persistenzlänge der Linker auf das thermische Rauschen der Kugel-Linker-Hanteln besser zu verstehen, wurden Simulationen der Langevin-Dynamik der Messanordnung durchgeführt (vgl. Abschnitt B.1). Für die Simulation wurden die Linker mit Hilfe des elastischen WLC mit variabler Kontur- und Persistenzlänge modelliert (Gleichung 3.2). Das Ergebnis der Simulationen ist in

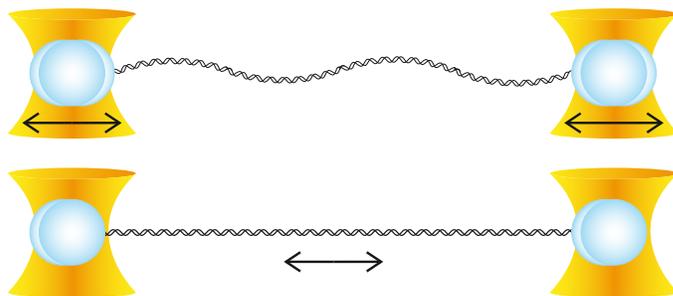


Abbildung B.6: *Effekt des Linkers auf die Kugelbewegung. Oben: Werden die zwei Kugeln durch einen elastischen Linker wie dsDNA verbunden, bewegen sich die Kugeln bei kleinen Kräften unkorreliert. Unten: Im Idealfall eines vollkommen starren Linkers bewegen sich die Kugeln vollständig korreliert. Das Differenzsignal ist im Idealfall rauschfrei.*

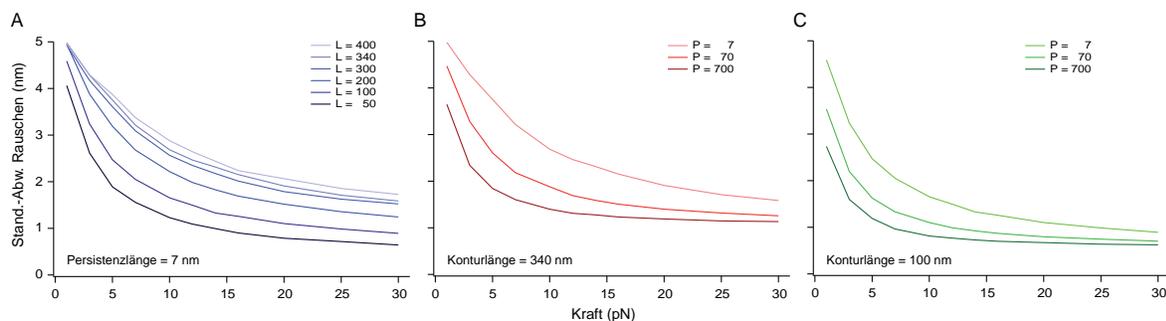


Abbildung B.7: *Einfluss der Linkereigenschaften auf das Rauschen der Kugel-Linker-Hanteln. Die Standardabweichung des Rauschens ist als Funktion der anliegenden Kraft aufgetragen. (A) Einfluss der Linkerlänge bei einer konstanten Persistenzlänge von 7 nm. (B) Einfluss der Persistenzlänge bei einer konstanten Konturlänge von 340 nm. (C) Einfluss der Persistenzlänge bei einer konstanten Konturlänge von 100 nm.*

Abbildung B.7 zeigt. Aufgetragen ist die Standardabweichung des Rauschens der Messanordnung als Funktion der Kraft. Man erkennt, dass sich das Rauschen mit zunehmender Kraft verringert. Dies ist auf die nichtlineare Steifigkeit der mit dem eWLC beschriebenen Linker zurückzuführen. Zusätzlich sorgt eine Verkürzung sowie wie erwartet die Vergößerung der Steifigkeit der Linker für eine Verkleinerung des Rauschens. Ein optimales Ergebnis erreicht man bei kurzen, steifen Linkern. Größere Federhärten führen auch zu einer Reduktion des Rauschens [30]. Dieser Effekt ist jedoch im Vergleich zur Reduktion aufgrund größerer Linker-Steifigkeit gering.

DNA-Nanostrukturen als Linker für die Dekonvolutions-Kraftspektroskopie

Die Persistenzlänge von DNA beträgt ca. 50 nm und sinkt bei kürzeren Konturlängen auf einen Wert < 10 nm (vgl. Abschnitt 3.1). Bei der Verwendung von dsDNA-Linkern ist die Konturlänge also festgelegt und das Rauschen kann nur durch eine Verkürzung der Linker beeinflusst werden. Für einen weitergehenden Effekt muss man auf ein anderes Material für die Linker zurückgreifen. Eine Möglichkeit besteht darin, eine Parallelschaltung mehrerer dsDNA-Stränge zu konstruieren [145]. In Abbildung B.8 ist ein solcher von Hendrik Dietz konzipierter DNA-Nanolinker abgebildet. Der Nanolinker

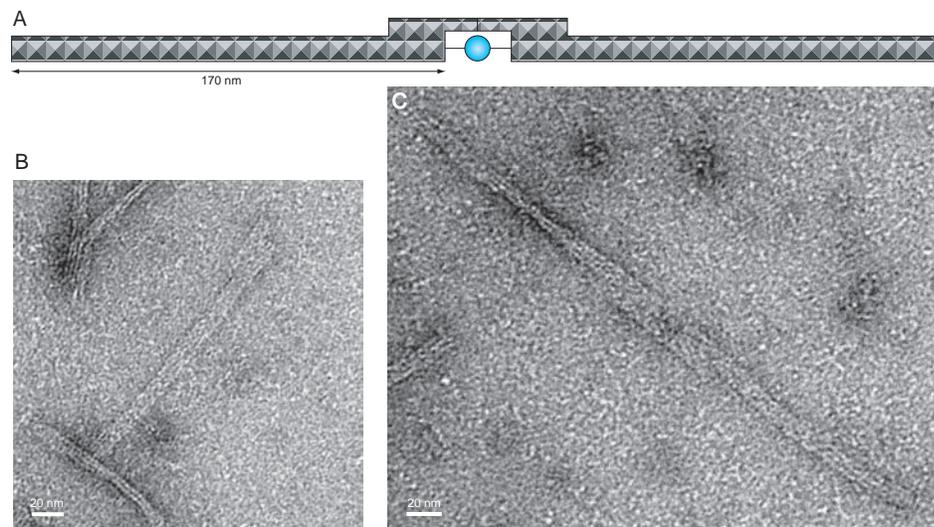


Abbildung B.8: *Der DNA-Nanolinker. (A) der DNA-Nanolinker besteht aus zwei 140 nm langen DNA-Griffen mit insgesamt neun parallel geschalteten dsDNA-Strängen. Sie sind über eine Brücke verbunden, die das Einbauen des Proteins über thiol-modifizierte Oligos erleichtert und vor dem Experiment aufgetrennt werden kann. (B) Elektronenmikroskopie-Aufnahme einer einzelnen DNA-Struktur. (C) Elektronenmikroskopie-Aufnahme von zwei über die Brücke verbundenen DNA-Strukturen. Die EM-Bilder wurden freundlicherweise von Hendrik Dietz zur Verfügung gestellt.*

besteht aus zwei 140 nm langen DNA-Griffen, die über eine Brücke miteinander verbunden sind. Das Protein kann mit dem in dieser Arbeit entwickelten Protokoll über thiol-modifizierte Oligonukleotide leicht an die DNA-Griffe des Nanolinkers geheftet werden (vgl. Abschnitt 2.3). Die Brücke wird durch Zugabe kurzer DNA-Stücke vor dem Experiment aufgetrennt. An den Stirnseiten sind die Griffe mit Biotin bzw. Digoxigenin funktionalisiert, um sie an entsprechend funktionalisierte Kugeln binden zu können.

Um das Verhalten der DNA-Nanolinker im Experiment zu testen, wurden zunächst

an Stelle des Proteins zwei über Disulfidbrücken dimerisierte Oligonukleotide in die Struktur eingebaut. Anschließend wurden Kraft-Abstands-Kurven der Nanolinker aufgenommen sowie das Rauschen von Kugel-Linker-Hanteln bei konstanter Kraft quantifiziert. In Abbildung B.9A ist ein Vergleich der Kraftabstandskurven von dsDNA-Linkern mit Konturlänge $L = 370$ nm, dsDNA-Linkern mit $L = 100$ nm, dsDNA-Linkern ($L = 100$ nm) mit ssDNA-Anbindung an die Kugeln sowie des DNA-Nanolinkers gezeigt. Qualitativ weist der Nanolinker eine größere Persistenzlänge als dsDNA auf. Die Standardabweichung des Rauschens derselben Linker ist in Abbildung B.9B als Funktion der Kraft aufgetragen. Das von den Simulationen vorhergesagte Verhalten der Linker wird

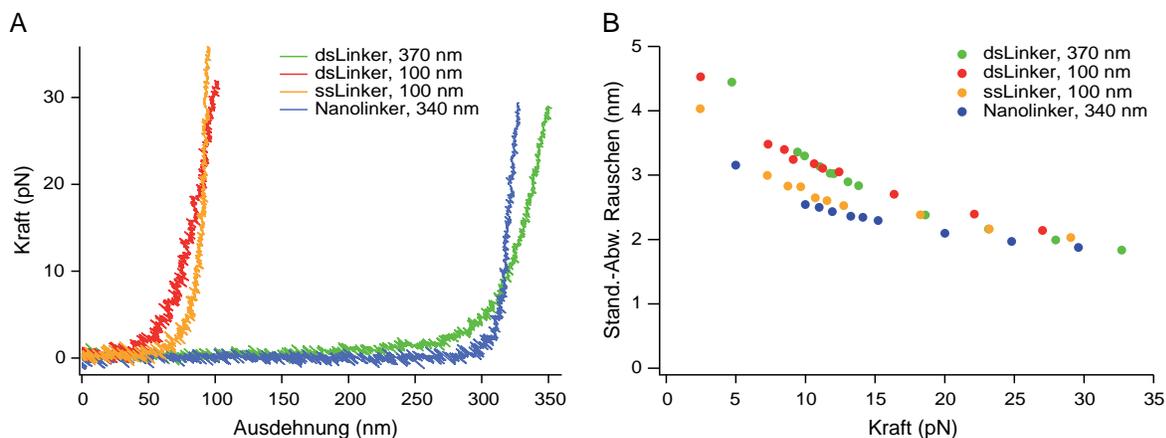


Abbildung B.9: *Verhalten verschiedener Linker in der optischen Pinzette. (A) Kraft-Abstands-Kurven von dsDNA-Linkern ($L = 370$ nm, grün und $L = 100$ nm, rot), eines dsDNA-Linkers ($L = 100$ nm) mit ssDNA-Anbindung an die Kugeln (gelb) und eines DNA-Nanolinkers ($L = 340$ nm). (B) Standardabweichung des Kugel-Rauschens derselben Linker als Funktion der Kraft.*

in den Messungen nur eingeschränkt reproduziert. Die Standardabweichung verringert sich mit zunehmender Kraft. Allerdings ist zwischen dem Linker mit $L = 370$ nm und $L = 100$ nm kein Unterschied zu erkennen. Dagegen ist das Rauschen eines Linkers mit einzelsträngiger Anbindung an die Kugeln geringfügig kleiner. Auch das Rauschen des Nanolinkers ist, entsprechend seiner größeren Persistenzlänge, geringfügig kleiner als bei dsDNA. Dennoch bleibt der Einfluss von Steifigkeit und Konturlänge der gemessenen Linker deutlich hinter den Erwartungen der Simulation zurück. Dies liegt zum einen an der vereinfachten Beschreibung der Linker durch das eWLC-Modell, das eigenständige Fluktuationen der Linker vernachlässigt. Diese sollten mit zunehmender Dicke der Linker größer werden. Darüber hinaus können im Experiment weitere in der Simulation nicht berücksichtigte Elastizitäten auftreten. So zeigt der Unterschied zwischen dsDNA- und ssDNA-Anbindung an die Kugeln, dass bei dsDNA-Linkern möglicherweise eine zusätzliche Biegesteifigkeit berücksichtigt werden muss. Ein weiterer elastischer Beitrag könnte von Inhomogenitäten der Kugeln kommen, die zu einer bevorzugten Ausrich-

tung der Kugeln entlang einer bestimmten Achse im Fallenpotential führt. Möglicherweise trägt auch das an der Peripherie des Laserfokus abstoßende Potential zu einem vermehrten Rauschen bei, wenn die Fallenpotentiale bei kurzen Linkern nahe zusammen sind. Eine genauere Analyse des Crosstalk zwischen beiden Kugeln wird daher weiter Aufschluss über mögliche Ursachen der Abweichung zwischen den gemessenen Rauschwerten und der Simulation bringen.

Um ein genaueres Bild des Einflusses der Linkereigenschaften auf die Rauschamplitude zu erhalten, sind weitere systematische Untersuchungen notwendig. Es lässt sich aber schon jetzt absehen, dass die Verwendung der DNA-Nanolinker, möglicherweise in einer weiterentwickelten Form, bei der sich die Brücke besser trennen lässt, einen Vorteil gegenüber dsDNA-Linkern haben wird.

Anhang C

Protokolle zu den Experimenten mit Myosin-V

C.1 Einzelköpfige Konstrukte von Myosin-V

Design der Konstrukte MV-6IQ und MV-4IQ

Die DNA von Huhn (*Gallus gallus*) Myosin-V wurde nach Aminosäure Arginin R904 für MV-6IQ und nach Arginin R863 für MV-4IQ abgeschnitten. N-terminal wurde ein Flag-Tag (Sequenz: GDYKDDDDK) für die Protein-Aufreinigung angehängt. An den C-Terminus wurde ein YFP (*yellow fluorescent protein*) für eine spezifische Anbindung an Polystyrol-Kugeln mit anti-GFP-Antikörper fusioniert. Zwischen Myosin und YFP befand sich ein Linker mit den Aminosäuren GAP. C-terminal des YFP nach einem Glycin-Linker (GG) wurde ein Strap-Tag für eine alternative Aufreinigung angehängt.

Expression der Konstrukte

Für die Expression in Sf9 Insektenzellen (*Spodoptera frugiperda*) wurden die Myosin-V DNA (Schnittstellen NheI und KpnI) und Calmodulin DNA (*D. melanogaster*) (Schnittstellen NotI und SalI) in einen pFastBac Dual Expressionsvektor (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) kloniert.

Aufreinigungsprotokoll für 200 ml Suspensionskultur mit 2×10^6 Zellen/ml:

- Zentrifugation für 15 min bei 3500 rpm der Zellen nach 48 h Inkubation bei 28°C
- Lysis der Zellen mit Glas-Homogenisierer in Lysis-Puffer (20 mM Imidazol (pH 7,5), 200 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 7% Sucrose, 5 mM DTT, 2 mM ATP, 0,5% Igepal, Protease-Inhibitor (Roche, Mannheim, Deutschland))
- Zentrifugation 10 min bei 30000 rpm
- Inkubation des Überstands mit 500 µl Anti-Flag M2 Affinity Agarose gel (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) für 2 h
- Waschen mit 3 ml Wasch-Puffer (20 mM Imidazol (pH 7,5), 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM DTT, 3 mM ATP)
- Elution des Proteins mit 200 µl Elutions-Puffer (20 mM Imidazol (pH 7,5), 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM DTT, 3 mM ATP, 0,2 mg/ml 1 × Flag Peptide (Sigma-Aldrich))

C.2 Doppelt markiertes Aktin

Fluoreszenzmarkieren des G-Aktins

Das Protokoll zum Fluoreszenzmarkieren von Aktin wurde freundlicherweise von Simone Köhler zur Verfügung gestellt.

- 20 mg lyophilisiertes Aktin in 4 mL destillierten Wassers lösen
- Dialyse gegen Borat-Puffer (50 mM Borsäure (pH 8,0), 0,2 mM CaCl₂, 0,2 mM Na₂ATP)
- Polymerisation für 30 min durch Zugabe von 20 mM MgCl₂ und 1 M KCl (1/10 des Volumens)
- Inkubation mit 1 - 2-fach molarem Überschuss an NHS-Ester Farbstoff für 1 h bei 25°C
- Zentrifugation für 2 h bei 38000 rpm und 4°C
- Homogenisation des Pellet in 3 ml G-Puffer
- Dialyse gegen G-Puffer
- Zentrifugation für 2 h bei 38000 rpm und 4°C

Polymerisation des Aktins

Doppelt markiertes Aktin wurde im Wesentlichen nach einem in [129] veröffentlichten Protokoll hergestellt. Dafür wurde Gelsolin zusammen mit fluoreszenzmarkiertem G-Aktin in molarem Verhältnis 1:50 polymerisiert und mit Phalloidin stabilisiert.

Protokoll für eine 50 µl-Reaktion:

- 5 µl 10 × F-Puffer
- 0,1 µM Gelsolin
- 5 µM atto 488-Aktin
- 2,5 µM Phalloidin
- auf 50 µl H₂O

Die resultierenden kleinen (30-100 nm) Gelsolin-Filamente wurden anschließend als Polymerisationskeime für die Polymerisation von ungelabeltem G-Aktin am (–)-Ende verwendet und mit Rhodamin-Phalloidin stabilisiert.

Protokoll für eine 50 μ l-Reaktion:

- 5 μ l 10 \times F-Puffer
- x μ l Gelsolin 488-Aktin (x ca. 1-5 μ l)
- 5 μ M G-Aktin
- 2,5 μ M Rhodamin-Phalloidin
- auf 50 μ l H₂O
- Inkubation mind. 1 h bei RT

C.3 Der Fallen-Assay

Spezifische Anbindung der Proteine

Die Myosin-V Konstrukte wurden mit dem C-terminalen YFP spezifisch an Kugeln gebunden. Amino-Kugeln (500 nm Durchmesser, Polysciences, Eppelheim, Deutschland) wurden kovalent mit Hilfe des Glutaraldehyd-Kits (Polysciences) mit Protein-G (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) funktionalisiert und anschließend mit anti-GFP-Antikörper (G1546, Sigma-Aldrich, Deutschland) spezifisch gegen aa 132-144 (konserviert in GFP und YFP) markiert. Die Konzentration des Motors wurde so eingestellt, dass \ll 1 Molekül pro Kugel gebunden hatte. Kontrollexperimente ohne Motor zeigten keine Wechselwirkung zwischen Kugel und Oberfläche.

Doppelt markiertes Aktin wurde über NEM-modifiziertes Myosin-II an die Oberfläche gebunden ([125, 19]). Durch langsames Spülen in die Fluidzelle wurden die Filamente longitudinal ausgerichtet.

Experimentelle Bedingungen

Für die Experimente wurde ein Puffer mit 25 mM Imidazol (pH 7,4), 25 mM KCl, 1 mM EGTA, 10 mM DTT und 4 mM MgCl₂ sowie einem Sauerstoff-Abfang-System (6 mg/ml Glucoseoxidase, 1 mg/ml Katalase und 1% Glucose) verwendet.

Die Stocklösung des Motor wurde für die Einzelmolekülexperimente um einen Faktor (5 – 20) \cdot 10⁵ verdünnt. Dies ergab eine maximale Konzentration von 0.006 μ M ATP im Experimentierpuffer. Bei dieser ATP-Konzentration banden während eines Experiments durchschnittlich maximal 2 Moleküle ATP an den an Aktin gebundenen Motor (bei einer ATP-Bindungsrate von 1,6 μ M⁻¹s⁻¹ [108]). Daher wurden < 2,5% der Ablöseereignisse durch ATP-Binden ausgelöst oder erfolgten mit gebundenem ADP. Aufgrund der ADP-Ablöserate in Abwesenheit von Aktin von 1,2 s⁻¹ [108] hatte der Motor bei Beginn der Experimente ca. 5 min nach der Verdünnung kein ADP mehr gebunden.

C.4 Eine globale Fit-Funktion für Abrisskraftverteilungen

Die Kraft, bei der ein Myosin-V Kopf von Aktin ablöste, wurde über den Schnittpunkt einer WLC-Kurve, die den nichtlinearen Kraftanstieg beschrieb, und einer Geraden, die den Kraftverlauf nach einem Abriss beschrieb, bestimmt. Prinzipiell ist die Abrisskraft von der Ladungsrate abhängig (Gleichung 3.15), die wiederum von der Ziehgeschwindigkeit und der Elastizität der Anbindung abhängt. Die Anbindung des Aktin-Filaments an die Oberfläche über NEM-modifizierte Motoren sowie des Myosin an die Kugeln über Antikörper bewirkte, dass bei verschiedenen Abrissereignissen der Kraftanstieg teilweise deutlich unterschiedlich war und damit unterschiedliche Ladungsraten auftraten. Um bei der theoretischen Beschreibung der Abrisskraft-Verteilungen mit Gleichung 3.15 die unterschiedlichen Ladungsraten richtig zu berücksichtigen, wurde eine globale Fit-Funktion entwickelt. Für den Fit werden die Kraftladungsrate jedes Abrissereignisses, das in eine Verteilung eingeht, aus den tabellierten WLC-Parametern berechnet, und daraus eine globale Funktion erstellt. Diese globale Funktion wird mit der gemessenen Verteilung verglichen und durch Variation der kraftfreien Ratenkonstante und der Distanz zur Übergangsbarriere angepasst.

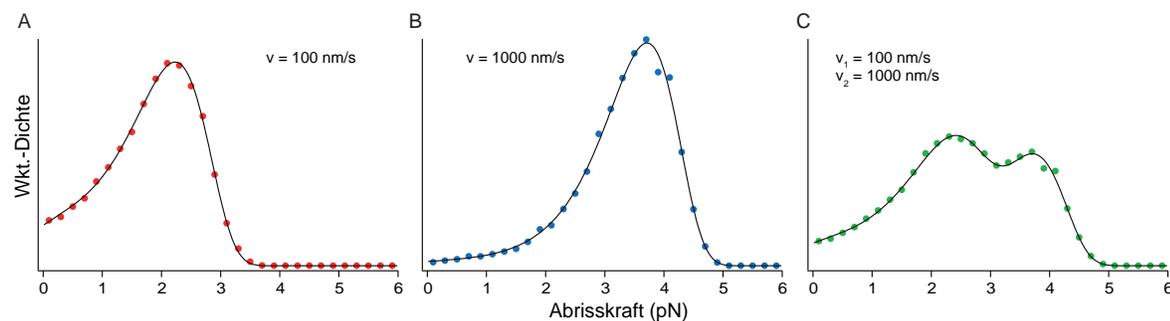


Abbildung C.1: Die globale Fit-Funktion für Abrisskraftverteilungen. (A) Simulierte Abrisskraftverteilung bei 100 nm/s (rote Kreise) und Fit (schwarze Linie). (B) Simulierte Abrisskraftverteilung bei 1000 nm/s (blaue Kreise) und Fit (schwarze Linie). (C) Summe der Abrisskraftverteilungen aus A und B (grüne Kreise) und globaler Fit an die Daten (schwarze Linie).

Abbildung C.1 verdeutlicht die Arbeitsweise des Algorithmus. Zunächst wurden zwei Abrisskraftverteilungen nach Gleichung 3.15 mit unterschiedlicher Ziehgeschwindigkeit simuliert¹ und gefittet (Abb. C.1A und B). Anschließend wurden beide Verteilungen zusammengelegt und global gefittet (Abb. C.1C). Die resultierende Funktion nimmt die Doppel-Peak-Form der Gesamtverteilung an.

¹Um eine deutliche Trennung der Verteilungen zu erhalten, wurde eine unterschiedliche Ziehgeschwindigkeit gewählt. Tatsächlich berücksichtigt der Algorithmus Unterschiede in allen WLC-Parametern.

Literaturverzeichnis

- [1] J. N. Onuchic, Z. Luthey-Schulten, and P. G. Wolynes. Theory of protein folding: the energy landscape perspective. *Annu Rev Phys Chem*, 48:545–600, 1997.
- [2] A. I. Bartlett and S. E. Radford. An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 16:582–588, 2009.
- [3] M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J. M. Fernandez, and H. E. Gaub. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science*, 276:1109–1112, 1997.
- [4] M. T. Woodside, P. C. Anthony, W. M. Behnke-Parks, K. Larizadeh, D. Herschlag, and S. M. Block. Direct measurement of the full, sequence-dependent folding landscape of a nucleic acid. *Science*, 314:1001–1004, 2006.
- [5] A. Ashkin. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Phys. Rev. Lett.*, 24:156–159, (1970).
- [6] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and S. Chu. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Opt. Lett.*, 11:288–290, (1986).
- [7] K. Svoboda, C. F. Schmidt, B. J. Schnapp, and S. M. Block. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature*, 365:721–727, (1993).
- [8] J. T. Finer, R. M. Simmons, and J. A. Spudich. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature*, 368:113–119, (1994).
- [9] H. Yin, M. D. Wang, K. Svoboda, R. Landick, S. M. Block, and J. Gelles. Transcription against an applied force. *Science*, 270:1653–1657, 1995.
- [10] M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S. M. Block. Stretching DNA with optical tweezers. *Biophys. J.*, 72:1335–1346, 1997.
- [11] L. Tskhovrebova, J. Trinick and J. A. Sleep, and R. M. Simmons. Elasticity and unfolding of single molecules of the giant muscle protein titin. *Nature*, 387:308, (1997).
- [12] M. S. Z. Kellermayer, S. B. Smith, H. L. Granzier, and C. Bustamante. Folding-Unfolding Transitions in Single Titin Molecules Characterized with Laser Tweezers. *Science*, 276:1112–1116, (1997).

- [13] K. Svoboda and S. M. Block. Biological applications of optical forces. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 23:247–285, (1994).
- [14] A. Ashkin. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Biophys. J.*, 61:569–582, (1992).
- [15] J. P. Barton, D. R. Alexander, and S. A. Schaub. Theoretical determination of net radiation force and torque for a spherical particle illuminated by a focused laser beam. *J. Appl. Phys.*, 66:4594–4602, (1989).
- [16] K. Berg-Sørensen and H. Flyvbjerg. Calibration of optical tweezers with positional detection in the back focal plane. *Rev. Sci. Instr.*, 75:594–612, (2004).
- [17] S. F. Tolić-Nørrelykke, E. Schäffer, J Howard, F. S. Pavone, F. Jülicher, and H. Flyvbjerg. Calibration of optical tweezers with positional detection in the back focal plane. *Rev. Sci. Instr.*, 77:103101–103111, (2006).
- [18] P. Mangeol and U. Bockelmann. Interference and crosstalk in double optical tweezers using a single laser source. *Rev Sci Instrum*, 79:083103, 2008.
- [19] J.C.M. Gebhardt. *Einzelmolekül-Kinetik von Myosin V unter hohen Kräften*. Diploma thesis, Ludwigs-Maximilians-Universität, 2005.
- [20] E. Fällman and O. Axner. Design for fully steerable dual-trap optical tweezers. *Appl Opt*, 36:2107–2113, 1997.
- [21] K. Berg-Sørensen, L. Oddershede, E.-L. Florin, and H. Flyvbjerg. Unintended filtering in a typical photodiode detection system for optical tweezers. *J. Appl. Phys.*, 93:3167–3176, (2003).
- [22] E.J.G. Peterman, M.A. van Dijk, L.C. Kapitein, and C.F. Schmidt. Extending the bandwidth of optical-tweezers interferometry. *Rev. Sci. Instr.*, 74:3246–3249, (2003).
- [23] K. C. Neuman and S. M. Block. Optical trapping. *Rev Sci Instrum*, 75:2787–2809, 2004.
- [24] F. Gittes and C. F. Schmidt. Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers. *Opt Lett*, 23:7–9, 1998.
- [25] M. Reisinger. *Einzelmolekülmechanik von Aktin-quervernetzenden Proteinen*. Diploma thesis, Technische Universität München, 2005.
- [26] D. Axelrod. Total Internal Reflection Fluorescence. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 13:247–268, (1984).

- [27] M. T. Valentine, N. R. Guydosh, B. Gutiérrez-Medina, A. N. Fehr, J. O. Andreasson, and S. M. Block. Precision steering of an optical trap by electro-optic deflection. *Opt Lett*, 33:599–601, 2008.
- [28] K. C. Neuman, E. A. Abbondanzieri, and S. M. Block. Measurement of the effective focal shift in an optical trap. *Opt Lett*, 30:1318–1320, 2005.
- [29] S. N. Reihani and L. B. Oddershede. Optimizing immersion media refractive index improves optical trapping by compensating spherical aberrations. *Opt Lett*, 32:1998–2000, 2007.
- [30] J. R. Moffitt, Y. R. Chemla, D. Izhaky, and C. Bustamante. Differential detection of dual traps improves the spatial resolution of optical tweezers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103:9006–9011, 2006.
- [31] C. Cecconi, E. A. Shank, C. Bustamante, and S. Marqusee. Direct observation of the three-state folding of a single protein molecule. *Science*, 309:2057–2060, 2005.
- [32] C. Cecconi, E. A. Shank, F. W. Dahlquist, S. Marqusee, and C. Bustamante. Protein-DNA chimeras for single molecule mechanical folding studies with the optical tweezers. *Eur. Biophys. J.*, 37:729–738, 2008.
- [33] J. Gál, R. Schnell, S. Szekeres, and M. Kálmán. Directional cloning of native PCR products with preformed sticky ends (autosticky PCR). *Mol. Gen. Genet.*, 260:569–573, 1999.
- [34] H. Dietz and M. Rief. Protein structure by mechanical triangulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103:1244–1247, 2006.
- [35] H. Dietz, M. Bertz, M. Schlierf, F. Berkemeier, T. Bornschlögl, J. P. Junker, and M. Rief. Cysteine engineering of polyproteins for single-molecule force spectroscopy. *Nat Protoc*, 1:80–84, 2006.
- [36] Paul J. Flory. *Statistical Mechanics of Chain Molecules*. Hanser, München, 1988.
- [37] O. Kratky and G. Porod. Röntgenuntersuchung gelöster Fadenmoleküle. *Journal of the Royal Netherlands Chemical Society*, 68(12):1106–1122, 1949.
- [38] C. Bouchiat, M. D. Wang, J. Allemand, T. Strick, S. M. Block, and V. Croquette. Estimating the persistence length of a worm-like chain molecule from force-extension measurements. *Biophys. J.*, 76:409–413, 1999.
- [39] J. F. Marko and E. D. Siggia. Stretching DNA. *Macromolecules*, 28(26):8759–8770, 1995.

- [40] C. Bustamante, J. F. Marko, E. D. Siggia, and S. Smith. Entropic elasticity of lambda-phage DNA. *Science*, 265:1599–1600, 1994.
- [41] J. D. Wen, M. Manosas, P. T. Li, S. B. Smith, C. Bustamante, F. Ritort, and I. Tinoco. Force unfolding kinetics of RNA using optical tweezers. I. Effects of experimental variables on measured results. *Biophys. J.*, 92:2996–3009, 2007.
- [42] Y. Seol, J. Li, P. C. Nelson, T. T. Perkins, and M. D. Betterton. Elasticity of short DNA molecules: theory and experiment for contour lengths of 0.6-7 microm. *Biophys. J.*, 93:4360–4373, 2007.
- [43] G. E. Crooks. Entropy production fluctuation theorem and the nonequilibrium work relation for free energy differences. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics*, 60:2721–2726, 1999.
- [44] J. Howard. *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, 2001.
- [45] S. Arrhenius. Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 4:226–248, 1889.
- [46] G. I. Bell. Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science*, 200:618–627, (1978).
- [47] E. Evans and K. Ritchie. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys. J.*, 72:1541–1555, 1997.
- [48] R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, and E. Evans. Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature*, 397:50–53, 1999.
- [49] M. Schlierf, F. Berkemeier, and M. Rief. Direct observation of active protein folding using lock-in force spectroscopy. *Biophys. J.*, 93:3989–3998, 2007.
- [50] H. A. Kramers. Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions. *Physica.*, 7:284–304, (1940).
- [51] P. Hänggi, P. Talkner, and M. Borkovec. Reaction-rate theory: fifty years after Kramers. *Rev. Mod. Phys.*, 62:251–342, 1990.
- [52] Peter A. Jansson. *Deconvolution with Applications in Spectroscopy*. Academic Press, New York, 1st. edition, 1984.
- [53] A. G. Hinnebusch. Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu. Rev. Microbiol.*, 59:407–450, 2005.

- [54] T. E. Ellenberger, C. J. Brandl, K. Struhl, and S. C. Harrison. The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell*, 71:1223–1237, 1992.
- [55] A. N. Lupas and M. Gruber. The structure of alpha-helical coiled coils. *Adv. Protein Chem.*, 70:37–78, 2005.
- [56] E. K. O’Shea, J. D. Klemm, P. S. Kim, and T. Alber. X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science*, 254:539–544, 1991.
- [57] W. K. Meisner and T. R. Sosnick. Barrier-limited, microsecond folding of a stable protein measured with hydrogen exchange: Implications for downhill folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101:15639–15644, 2004.
- [58] L. B. Moran, J. P. Schneider, A. Kentsis, G. A. Reddy, and T. R. Sosnick. Transition state heterogeneity in GCN4 coiled coil folding studied by using multisite mutations and crosslinking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96:10699–10704, 1999.
- [59] J. A. Zitzewitz, B. Ibarra-Molero, D. R. Fishel, K. L. Terry, and C. R. Matthews. Prefolded secondary structure drives the association reaction of GCN4-p1, a model coiled-coil system. *J. Mol. Biol.*, 296:1105–1116, 2000.
- [60] B. Ibarra-Molero, G. I. Makhatadze, and C. R. Matthews. Mapping the energy surface for the folding reaction of the coiled-coil peptide GCN4-p1. *Biochemistry*, 40:719–731, 2001.
- [61] M. E. Holtzer, G. L. Bretthorst, D. A. d’Avignon, R. H. Angeletti, L. Mints, and A. Holtzer. Temperature dependence of the folding and unfolding kinetics of the GCN4 leucine zipper via $^{13}\text{C}(\alpha)$ -NMR. *Biophys. J.*, 80:939–951, 2001.
- [62] J. A. Knappenberger, J. E. Smith, S. H. Thorpe, J. A. Zitzewitz, and C. R. Matthews. A buried polar residue in the hydrophobic interface of the coiled-coil peptide, GCN4-p1, plays a thermodynamic, not a kinetic role in folding. *J. Mol. Biol.*, 321:1–6, 2002.
- [63] T. Bornschlöggl and M. Rief. Single molecule unzipping of coiled coils: sequence resolved stability profiles. *Phys. Rev. Lett.*, 96:118102, 2006.
- [64] T. Bornschlöggl and M. Rief. Single-molecule dynamics of mechanical coiled-coil unzipping. *Langmuir*, 24:1338–1342, 2008.
- [65] D. Collin, F. Ritort, C. Jarzynski, S. B. Smith, I. Tinoco, and C. Bustamante. Verification of the Crooks fluctuation theorem and recovery of RNA folding free energies. *Nature*, 437:231–234, 2005.

- [66] E. Evans and P. Williams. *Physics of Bio-Molecules and Cells*, volume 75. Les Houches Summer School, 2002.
- [67] R. B. Best and G. Hummer. Protein folding kinetics under force from molecular simulation. *J. Am. Chem. Soc.*, 130:3706–3707, 2008.
- [68] M. Schlierf and M. Rief. Single-molecule unfolding force distributions reveal a funnel-shaped energy landscape. *Biophys. J.*, 90:L33–35, 2006.
- [69] B. Schuler, E. A. Lipman, and W. A. Eaton. Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy. *Nature*, 419:743–747, 2002.
- [70] J. P. Cleveland, T. E. Schäffer, and P. K. Hansma. Probing oscillatory hydration potentials using thermal-mechanical noise in an atomic-force microscope. *Phys. Rev., B Condens. Matter*, 52:R8692–R8695, 1995.
- [71] J. Rädler and E. Sackmann. On the Measurement of Weak Repulsive and Frictional Colloidal Forces by Reflection Interference Contrast Microscopy. *Langmuir*, 8:848–853, 1992.
- [72] I. E. Sánchez and T. Kiefhaber. Evidence for sequential barriers and obligatory intermediates in apparent two-state protein folding. *J. Mol. Biol.*, 325:367–376, 2003.
- [73] K. A. Scott and J. Clarke. Spectrin R16: broad energy barrier or sequential transition states? *Protein Sci.*, 14:1617–1629, 2005.
- [74] T. Bornschlögl, G. Woehlke, and M. Rief. Single molecule mechanics of the kinesin neck. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106:6992–6997, 2009.
- [75] T. Bornschlögl. *Gleichgewichtsmechanik und Fluktuationen von Superhelizes*. PhD thesis, Techn. Univ. München, 2008.
- [76] J. C. Hu, E. K. O’Shea, P. S. Kim, and R. T. Sauer. Sequence requirements for coiled-coils: analysis with lambda repressor-GCN4 leucine zipper fusions. *Science*, 250:1400–1403, 1990.
- [77] B. Ibarra-Molero, J. A. Zitzewitz, and C. R. Matthews. Salt-bridges can stabilize but do not accelerate the folding of the homodimeric coiled-coil peptide GCN4-p1. *J. Mol. Biol.*, 336:989–996, 2004.
- [78] R. A. Kammerer, T. Schulthess, R. Landwehr, A. Lustig, J. Engel, U. Aebi, and M. O. Steinmetz. An autonomous folding unit mediates the assembly of two-stranded coiled coils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95:13419–13424, 1998.

- [79] D. L. Lee, P. Lavigne, and R. S. Hodges. Are trigger sequences essential in the folding of two-stranded alpha-helical coiled-coils? *J. Mol. Biol.*, 306:539–553, 2001.
- [80] O. Bieri, J. Wirz, B. Hellrung, M. Schutkowski, M. Drewello, and T. Kiefhaber. The speed limit for protein folding measured by triplet-triplet energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96:9597–9601, 1999.
- [81] L. J. Lapidus, W. A. Eaton, and J. Hofrichter. Measuring the rate of intramolecular contact formation in polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97:7220–7225, 2000.
- [82] C. Hyeon, G. Morrison, and D. Thirumalai. Force-dependent hopping rates of RNA hairpins can be estimated from accurate measurement of the folding landscapes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105:9604–9609, 2008.
- [83] B. Obermayer, O. Hallatschek, E. Frey, and K. Kroy. Stretching dynamics of semiflexible polymers. *Eur Phys J E Soft Matter*, 23:375–388, 2007.
- [84] E. Rhoades, M. Cohen, B. Schuler, and G. Haran. Two-state folding observed in individual protein molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, 126:14686–14687, 2004.
- [85] H. S. Chung, J. M. Louis, and W. A. Eaton. Experimental determination of upper bound for transition path times in protein folding from single-molecule photon-by-photon trajectories. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106:11837–11844, 2009.
- [86] J. M. Fernandez and H. Li. Force-clamp spectroscopy monitors the folding trajectory of a single protein. *Science*, 303:1674–1678, 2004.
- [87] D. Chin and A. R. Means. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.*, 10:322–328, 2000.
- [88] J. K. Krueger, G. A. Olah, S. E. Rokop, G. Zhi, J. T. Stull, and J. Trewheella. Structures of calmodulin and a functional myosin light chain kinase in the activated complex: a neutron scattering study. *Biochemistry*, 36:6017–6023, 1997.
- [89] D. E. Clapham. Calcium signaling. *Cell*, 131:1047–1058, 2007.
- [90] M. Zhang, T. Tanaka, and M. Ikura. Calcium-induced conformational transition revealed by the solution structure of apo calmodulin. *Nat. Struct. Biol.*, 2:758–767, 1995.
- [91] J. P. Junker, F. Ziegler, and M. Rief. Ligand-dependent equilibrium fluctuations of single calmodulin molecules. *Science*, 323:633–637, 2009.

- [92] J. P. Junker and M. Rief. Single-molecule force spectroscopy distinguishes target binding modes of calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106:14361–14366, 2009.
- [93] H. Dietz, F. Berkemeier, M. Bertz, and M. Rief. Anisotropic deformation response of single protein molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103:12724–12728, 2006.
- [94] C. R. Rabl, S. R. Martin, E. Neumann, and P. M. Bayley. Temperature jump kinetic study of the stability of apo-calmodulin. *Biophys. Chem.*, 101:553–564, 2002.
- [95] M. Schlierf and M. Rief. Surprising simplicity in the single-molecule folding mechanics of proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 48:820–822, 2009.
- [96] T. Bornschlöggl, J.C.M. Gebhardt, and M. Rief. Designing the Folding Mechanics of Coiled Coils. *Chemphyschem*, 10:2800–2804, 2009.
- [97] L. Masino, S. R. Martin, and P. M. Bayley. Ligand binding and thermodynamic stability of a multidomain protein, calmodulin. *Protein Sci.*, 9:1519–1529, 2000.
- [98] P. Maragakis, F. Ritort, C. Bustamante, M. Karplus, and G. E. Crooks. Bayesian estimates of free energies from nonequilibrium work data in the presence of instrument noise. *J Chem Phys*, 129:024102, 2008.
- [99] J. R. Sellers. Myosins: a diverse superfamily. *Bioch. Biophys. Acta*, 1496:3–22, (2000).
- [100] W. Hwang and M. J. Lang. Mechanical design of translocating motor proteins. *Cell Biochem. Biophys.*, 54:11–22, 2009.
- [101] P.-D. Coureux, A. L. Wells, J. Ménétrey, C. M. Yengo, C. A. Morris, H. L. Sweeney, and A. Houdusse. A structural state of the myosin v motor without bound nucleotide. *Nature*, 425:419–423, (2003).
- [102] P.-D. Coureux, H. L. Sweeney, and A. Houdusse. A Model of Myosin V Processivity. *EMBO*, 23:4527–4537, (2004).
- [103] H. Nguyen and H. Higuchi. Motility of myosin V regulated by the dissociation of single calmodulin. *Nature Struct. Mol. Biol.*, 12:127–131, (2005).
- [104] S. L. Reck-Peterson, D. W. Provance, M. S. Mooseker, and J. A. Mercer. Class V myosins. *Bioch. Biophys. Acta*, 1496:36–51, (2000).
- [105] X. Wu, G. Jung, and J. A. Hammer. Functions of unconventional myosins. *Curr. Op. Cell Biol.*, 12:42–51, (2000).

- [106] G. M. Langford. Myosin v, a Versatile Motor for Short-Range Vesicle Transport. *Traffic*, 3:859–865, (2002).
- [107] C. Kural, A. S. Serpinskaya, Y. H. Chou, R. D. Goldman, V. I. Gelfand, and P. R. Selvin. Tracking melanosomes inside a cell to study molecular motors and their interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104:5378–5382, 2007.
- [108] E. M. De La Cruz, A. L. Wells, S. S. Rosenfeld, E. M. Ostap, and H. L. Sweeney. The kinetic mechanism of Myosin V. *PNAS*, 96:13726–13731, (1999).
- [109] A. D. Mehta, R. S. Rock, M. Rief, J. A. Spudich, M. S. Mooseker, and R. E. Cheney. Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature*, 400:590–593, (1999).
- [110] T. Sakamoto, I. Amitani, E. Yokota, and T. Ando. Direct Observation of Processive Movement by Individual Myosin V Molecules. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, 272:586–590, (2000).
- [111] M. Rief, R. S. Rock, A. D. Mehta, M. S. Mooseker, R. E. Cheney, and J. A. Spudich. Myosin V stepping kinetics: A molecular model for processivity. *PNAS*, 97(17):9482–9486, (2000).
- [112] S. S. Rosenfeld and H. L. Sweeney. A Model of Myosin V Processivity. *J. Biol. Chem.*, 279:40100–40111, (2004).
- [113] T. J. Purcell, H. L. Sweeney, and J. A. Spudich. A force dependent state controls the coordination of processive myosin v. unpublished.
- [114] C. Veigel, S. Schmitz, F. Wang, and J. R. Sellers. Load-dependent kinetics of myosin-V can explain its high processivity. *Nat. Cell Biol.*, 7:861–869, 2005.
- [115] C. Veigel, F. Wang, M. L. Bartoo, J. R. Sellers, and J. E. Molloy. The gated gait of the processive molecular motor, myosin V. *Nature Cell Biol.*, 4:59–65, (2002).
- [116] A. E.-M. Clemen, M. Vilfan, J. Jaud, J. Zhang, M. Bärmann, and M. Rief. Force Dependent Stepping Kinetics of Myosin-V. *Biophys. J.*, accepted, (2005).
- [117] T. Sakamoto, M. R. Webb, E. Forgacs, H. D. White, and J. R. Sellers. Direct observation of the mechanochemical coupling in myosin Va during processive movement. *Nature*, 455:128–132, 2008.
- [118] M. A. Geeves, T. E. Jeffries, and N. C. Millar. ATP-induced dissociation of rabbit skeletal actomyosin subfragment 1. Characterization of an isomerization of the ternary acto-S1-ATP complex. *Biochemistry*, 25:8454–8458, 1986.

- [119] M. L. Walker, S. A. Burgess, J. R. Sellers, F. Wang, J. A. Hammer, J. Trinick, and P. J. Knight. Two-headed binding of a processive myosin to F-actin. *Nature*, 405:804–807, 2000.
- [120] S. Burgess, M. Walker, F. Wang, J. R. Sellers, H. D. White, P. J. Knight, and J. Trinick. The prepower stroke conformation of myosin V. *J. Cell Biol.*, 159:983–991, 2002.
- [121] A. Yildiz, J. N. Forkey, S. A. McKinney, T. Ha, Y. E. Goldman, and P. R. Selvin. Myosin V Walks Hand-Over-Hand: Single Fluorophore Imaging with 1.5-nm Localization. *Science*, 300:2061–2065, (2003).
- [122] L. S. Churchman, Z. Ökten, R. S. Rock, J. F. Dawson, and J. A. Spudich. Single molecule high-resolution colocalization of Cy3 and Cy5 attached to macromolecules measures intramolecular distances through time. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102:1419–1423, 2005.
- [123] G. Cappello, P. Pierobon, C. Symonds, L. Busoni, J.C.M. Gebhardt, M. Rief, and J. Prost. Myosin V stepping mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104:15328–15333, 2007.
- [124] A. R. Dunn and J. A. Spudich. Dynamics of the unbound head during myosin V processive translocation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 14:246–248, 2007.
- [125] J.C.M. Gebhardt, A. E. Clemen, J. Jaud, and M. Rief. Myosin-V is a mechanical ratchet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103:8680–8685, 2006.
- [126] T. J. Purcell, H. L. Sweeney, and J. A. Spudich. A force-dependent state controls the coordination of processive myosin V. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102:13873–13878, 2005.
- [127] Y. Oguchi, S. V. Mikhailenko, T. Ohki, A. O. Olivares, E. M. De La Cruz, and S. Ishiwata. Load-dependent ADP binding to myosins V and VI: implications for subunit coordination and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105:7714–7719, 2008.
- [128] J.C.M. Gebhardt, Z. Ökten, and M. Rief. The lever arm effects a mechanical asymmetry of the myosin-V - actin bond. (accepted). *Biophys. J.*, (2009).
- [129] A. Herm-Götz, S. Weiss, R. Stratmann, S. Fujita-Becker, C. Ruff, E. Meyhöfer, T. Soldati, D. J. Manstein, M. A. Geeves, and D. Soldati. Toxoplasma gondii myosin A and its light chain: a fast, single-headed, plus-end-directed motor. *EMBO J.*, 21:2149–2158, 2002.

- [130] C. Friedsam, A. K. Wehle, F. Kühner, and H. E. Gaub. Dynamic single-molecule force spectroscopy: bond rupture analysis with variable spacer length. *J. Phys. C. M.*, 15:S1709–S1723, 2003.
- [131] J. R. Moore, E. B. Krementsova, K. M. Trybus, and D. M. Warshaw. Myosin V exhibits a high duty cycle and large unitary displacement. *J. Cell Biol.*, 155:625–635, 2001.
- [132] T. J. Purcell, C. Morris, J. A. Spudich, and H. L. Sweeney. Role of the lever arm in the processive stepping of myosin V. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99:14159–14164, 2002.
- [133] E. L. Florin, V. T. Moy, and H. E. Gaub. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science*, 264:415–417, 1994.
- [134] T. Nishizaka, H. Miyata, H. Yoshikawa, S. Ishiwata, and K. Kinosita. Unbinding force of a single motor molecule of muscle measured using optical tweezers. *Nature*, 377:251–254, (1995).
- [135] T. Nishizaka, R. Seo, H. Tadakuma, K. Kinosita, and S. Ishiwata. Characterization of Single Actomyosin Rigor Bonds: Load Dependence of Lifetime and Mechanical Properties. *Biophys. J.*, 79:962–974, (2000).
- [136] J. P. Junker, F. Ziegler, and M. Rief. Ligand-dependent equilibrium fluctuations of single calmodulin molecules. *Science*, 323:633–637, 2009.
- [137] A. Lewalle, W. Steffen, O. Stevenson, Z. Ouyang, and J. Sleep. Single-molecule measurement of the stiffness of the rigor myosin head. *Biophys. J.*, 94:2160–2169, 2008.
- [138] H. Dietz, F. Berkemeier, M. Bertz, and M. Rief. Anisotropic deformation response of single protein molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103:12724–12728, 2006.
- [139] M. Bertz, M. Wilmanns, and M. Rief. The titin-telethonin complex is a directed, superstable molecular bond in the muscle Z-disk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106:13307–13310, 2009.
- [140] E. M. Puchner, A. Alexandrovich, A. L. Kho, U. Hensen, L. V. Schäfer, B. Brandmeier, F. Gräter, H. Grubmüller, H. E. Gaub, and M. Gautel. Mechanoenzymatics of titin kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105:13385–13390, 2008.
- [141] X. Zhang, K. Halvorsen, C. Z. Zhang, W. P. Wong, and T. A. Springer. Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Science*, 324:1330–1334, 2009.

- [142] C. M. Yengo and H. L. Sweeney. Functional role of loop 2 in myosin V. *Biochemistry*, 43:2605–2612, 2004.
- [143] M. P. Landry, P. M. McCall, Z. Qi, and Y. R. Chemla. Characterization of photoactivated singlet oxygen damage in single-molecule optical trap experiments. *Biophys. J.*, 97:2128–2136, 2009.
- [144] M. Manosas, J. D. Wen, P. T. Li, S. B. Smith, C. Bustamante, I. Tinoco, and F. Ritort. Force unfolding kinetics of RNA using optical tweezers. II. Modeling experiments. *Biophys. J.*, 92:3010–3021, 2007.
- [145] H. Dietz, S. M. Douglas, and W. M. Shih. Folding DNA into twisted and curved nanoscale shapes. *Science*, 325:725–730, 2009.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Erfolg dieser Dissertation beigetragen haben.

Als erstes möchte ich mich bei Matthias Rief bedanken, unter dessen Anleitung die Arbeit entstand. Seine exzellente Betreuung und die vielen hinterfragenden, motivierenden und inspirierenden Diskussionen haben es mir ermöglicht, Neues auszuprobieren und die Arbeit in großer Freiheit durchzuführen. Auch die hervorragenden Bedingungen am Lehrstuhl waren für das Gelingen der Arbeit von großer Bedeutung.

Ganz besonderer Dank geht an Melanie Reisinger, Felix Berkemeier und Morten Bertz für die vielfältige Unterstützung, die kritischen Diskussionen und guten Ratschläge. Mein Dank gilt auch Philipp Junker, Simone Köhler und Hendrik Dietz für die hilfreiche und gute Zusammenarbeit und Thomas Bornschlögl, Christoph Ratzke, Moritz Mickler, Michael Schlierf und Christine Semmrich für viele gute Diskussionen.

Für die gute Laune und freundschaftliche Atmosphäre bedanke ich mich bei den vielen neuen Mitgliedern der ‘Trapper-group’ sowie allen anderen aus E22, E27 und E40. Bedanken möchte ich mich auch bei Zeynep Ökten, Giovanni Cappello und Andreas Bausch für die sehr gute Zusammenarbeit und Unterstützung.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich Claudia Antrecht, Monika Rusp, Daniela Mayr, Karin Vogt und Gabi Chmel für die tatkräftige Unterstützung bei Proteinexpression und -aufreinigung und Rudi Lehrhuber für die Ausführung der vielen Baupläne aussprechen.

Großer Dank geht an meine Freunde. Vielen Dank auch an meine Geschwister und insbesondere an meine Eltern, die mich immer unterstützen.