
Kraftspektroskopische Untersuchungen an coiled-coil Strukturen

Thomas Bornschlögl



München 2004

Kraftspektroskopische Untersuchungen an coiled-coil Strukturen

Thomas Bornschlögl

Diplomarbeit
an der Fakultät für Physik
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Thomas Bornschlögl
aus München

München, den 26. August 2004

Erstgutachter: Prof. Dr. Matthias Rief

Zweitgutachter: Prof. Dr. Roland R. Netz

Ich möchte schlafen,
aber du mußt tanzen.

T. Storm

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	ix
1 Einleitung	1
2 Coiled-coil Strukturen	3
2.1 Einleitung	3
2.2 Aufbau und Struktur	3
2.3 Coiled-coil Strukturen in Myosin und Kinesin	6
2.4 Theoretische Vorhersage	7
3 Theoretische Grundlagen	9
3.1 Das Wormlike-Chain-Modell	9
3.2 Konformationskinetik mit dem Zwei-Zustands Modell	11
3.3 Monte-Carlo Simulation	13
3.4 Kooperative Faltung	14
3.5 Numerische Berechnung der Kraft-Abstands-Kurven	16
4 Experimentelle Methoden	19
4.1 Prinzipieller Aufbau des Kraftspektrometers	19
4.2 Eichen des Kraftspektrometers	20
4.3 Kraft-Abstands-Kurven	21
4.4 Kraft-Abstands-Kurven von Titin und Myosin	22
5 Kraftmikroskop für hochauflösende Messungen	25
5.1 Signal zu Rauschverhältnis von Blattfedern	25
5.2 Konstruktion des Kraftmikroskops	27
5.2.1 Berechnung der Spotgröße	27
5.2.2 Beschreibung des Aufbaus	30
5.3 Test des Kraftmikroskops	31
5.3.1 Bestimmung des Spotdurchmessers	31
5.3.2 Rauschspektren des konstruierten Kraftmikroskops	33
5.4 Zusammenfassung	35

6 Ig8-Nkin-Konstrukt	37
6.1 Einleitung	37
6.2 Beschreibung des Ig8-Nkin-Proteins	37
6.3 Messungen am Ig8-Nkin-Konstrukt	38
6.4 Diskussion	40
7 ddFLN(1-5)-p1Q-Konstrukt	43
7.1 Einleitung	43
7.2 Beschreibung des ddFLN(1-5)-p1Q-Konstruktes	43
7.3 Dimerisierung des ddFLN(1-5)-p1Q-Konstruktes	44
7.4 Zusammenfassung	46
8 Faltungen und Entfaltungsexperimente am Leucinezipper	47
8.1 Messungen mit kleinen Geschwindigkeiten	48
8.2 Konturlängenzuwachs des Leucinezippers	50
8.3 Entfaltungskraft des Leucinezippers	52
8.4 Messungen mit hohen Geschwindigkeiten	53
8.5 Konturlängenzuwachs bei bestimmter Kraft	55
8.6 Zusammenfassung	56
9 Kooperatives Falten des Leucinezippers	59
9.1 Einleitung	59
9.2 Parameter der berechneten Kraft-Abstands-Kurven	60
9.3 Mögliche Energielandschaften	61
9.4 Diskussion	63
10 Ausblick	67
A Molekularbiologische Methoden	69
A.1 Gentechnische Methoden	69
A.2 Protein Aufreinigung	70
A.3 Sequenzen	70
Danksagung	80

Zusammenfassung

In dieser Diplomarbeit wurden kraftspektroskopische Experimente an coiled-coil Strukturen durchgeführt. Das coiled-coil Faltungsmotiv besteht aus einer α -helikalen Sekundärstruktur, die eine superhelikale Tertiärstruktur ausbildet. Diese, im Vergleich zu anderen Proteinen relativ einfache Struktur, macht die coiled-coil zu einem beliebten System um Fragen der Proteinfaltung zu klären.

Mit gentechnischen Methoden wurde ein Protein konstruiert, welches die zu untersuchende coiled-coil Struktur enthält. Mit kraftspektroskopischen Experimenten an diesem Protein ist man in der Lage, eine Kraft gezielt an den N-Terminus der coiled-coil anzulegen. Dadurch konnte das reißverschlussartige Auftrennen („unzippen“) der beiden α -Helizes untersucht werden.

Die beobachteten Kräfte zum Trennen der coiled-coil sind sehr klein. Daher wurde eine Meßmethode angewandt, mit der die Auflösung des benutzten Kraftspektrometers, durch Mittelung über mehrere Kraft-Abstands-Kurven des selben Proteins, erhöht werden konnte.

Parallel dazu wurde ein neues Kraftmikroskop konstruiert, mit dem ein besseres Signal zu Rauschverhältnis erreicht werden kann. Mit diesem Instrument werden zukünftig kraftspektroskopische Messungen bis hin zu Kräften im pN-Bereich möglich sein.

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit stellte sich heraus, daß die Entfaltung der coiled-coil im thermischen Gleichgewicht stattfindet. Die zum völligen Trennen der beiden α -Helizes notwendige Arbeit beträgt ca. $20 k_B T$ und die dazu nötige Kraft beträgt 13 pN. Die Faltung der coiled-coil kann durch ein theoretisches Modell beschrieben werden, das von Keimbildung ausgeht. Dabei liefert eine Keimgröße von ca. 20 Aminosäuren eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten.

Das für diese kraftspektroskopischen Experimente konstruierte Protein zeigt auch, daß es möglich ist, Proteine mithilfe einer eingefügten coiled-coil Struktur zu dimerisieren und kovalent durch eine Disulfidbrücke zu verbinden. Dadurch hat man die Möglichkeit neue Proteine zu konstruieren, die die Effizienz zukünftiger kraftspektroskopischer Untersuchungen erhöhen, oder sich für spezielle Fragen der Proteinfaltung eignen.

Kapitel 1

Einleitung

Die coiled-coil Struktur kommt in einer Vielzahl von Proteinen vor. Meist üben diese Proteine Tätigkeiten in der Zelle aus, die eine hohe Stabilität oder Dimerbildung erfordern. Mittlerweile sind mehr als 200 Proteine identifiziert, die coiled-coil Strukturen enthalten könnten [1]. Eine Zusammenfassung von mehr als 20 Proteinen, bei denen man durch hochauflösende Struktorexperimente coiled-coil Elemente fand, wurde von Lupas gegeben [2]. Ein Beispiel für ein Intermediär-Filament (IF) Protein das coiled-coil Strukturen enthält ist α -Keratin. Bei Zellen die in Haaren, Federn, Nägeln oder Hörnern auftreten, besteht fast die gesamte Trockenmasse aus α -Keratin. In diesen Bereichen ist Stabilität von großer Bedeutung. Sie wird durch coiled-coil Strukturen erreicht, die unter anderem in der Lage sind Disulfidbrücken auszubilden. Ein weiteres IF-Protein, das coiled-coil Strukturen enthält, ist Laminin. Es ist Teil der Basalmembran, die u.a. zur Stabilisation von Muskelzellen dient. Coiled-coils sind in onkogenen Produkten enthalten, also in Proteinen die für die Zellteilung verantwortlich sind, aber durch Mutation Krebs verursachen, genauso wie in antionkogenen Produkten, sogenannten Tumor Suppressoren.

Auch bei Proteinen die an DNA anbinden, kommen coiled-coil Strukturen vor. Beispiele hierfür sind die in E. Coli auftretende DNA Polymerase I, oder der Transkriptase Aktivator der Hefe GCN4.

Coiled-coil Strukturen wurden auch in Motor-Proteinen, wie Dynein, Kinesin und Moysin identifiziert. In vielen dieser Proteine spielt mechanische Stabilität eine große Rolle. So ist z.B. die Untersuchung des Einflusses der coiled-coil des Kinesins auf den Bewegungsablauf des Motors Teil aktueller Forschung. Experimente mit verkürzten oder mutierten coiled-coil Bereichen, die sich in der Nähe der Motordomäne des Kinesins befinden, zeigen, daß diese die Bewegung des Motors beeinflussen [3][4][5].

Es gibt Vermutungen, daß sich während eines Motorschrittes Teile dieser coiled-coil öffnen [6].

Ein ähnliches Problem stellt sich beispielsweise auch für das Motorprotein Myosin VI, dessen Schrittweite unter anderem durch ein unzippen von Teilen der coiled-coil zu erklären versucht wird [7].

Aus diesen Gründen stellt sich die Frage nach der mechanischen Stabilität von coiled-coil Strukturen. In dieser Diplomarbeit wird gezeigt, daß es möglich ist, einzelne coiled-coil

Strukturen mit dem Kraftmikroskop aufzutrennen und so deren Stabilität zu untersuchen. Dabei ist es möglich die Kraft zum unzippen der coiled-coil gezielt am N-Terminus anzulegen, an den sich beispielsweise im Kinesin die Motordomänen anschließen.

Coiled-coil Strukturen besitzen eine vergleichbar einfache Tertiärstruktur. Darum bilden sie ein hervorragendes Modell, um Fragen der Proteinfaltung, wie z.B die nach dem Einfluß der Aminosäuresequenz auf die Proteinstruktur, zu untersuchen. Mit zukünftigen Kraftmikroskopen mit verbessertem Signal zu Rauschverhältnis kann die kraftspektroskopische Untersuchung von coiled-coil Strukturen weitere, neue Einblicke in Vorgänge der Proteinfaltung geben.

Kapitel 2

Coiled-coil Strukturen

2.1 Einleitung

Eine coiled-coil Struktur besteht typischerweise aus zwei oder mehreren α -Helizes, die sich aneinanderlagern. Diese relativ einfache Tertiärstruktur erlaubt es, synthetische coiled-coils zu modellieren und ihre physikalischen Eigenschaften zu studieren. In diesem Kapitel wird der Aufbau von coiled-coil Strukturen auf atomarer Ebene erklärt. Anhand zweier Motorproteine, Kinesin und Myosin VI, wird kurz auf die Frage nach der physiologischen Relevanz der coiled-coil Struktur eingegangen. Außerdem wird eine theoretische Methode vorgestellt, die Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten von coiled-coil Strukturen anhand der Aminosäuresequenz bestimmen kann.

2.2 Aufbau und Struktur

Die α -Helix ist ein häufig auftretendes Motiv der Sekundärstruktur von Proteinen. In Abbildung 2.1 sind drei Windungen einer α -Helix schematisch dargestellt. Die Windungen werden durch Wasserstoffbrückenbindungen der CO-Gruppen (Rot) mit darüberliegenden NH-Gruppen (Blau) der drittnächsten Aminosäure stabilisiert [8] (Durch gestrichelte Linien gekennzeichnet). Die schwarzen Pfeile deuten auf einen Aminosäurerest (Lila Kugeln) und einen darüberliegenden Aminosäurerest der drei Aminosäuren entfernt ist. Die Aminosäurereste sind immer nach außen hin orientiert. In einer Windung der Helix befinden sich 3,64 Aminosäuren, d.h. die durch Wasserstoffbrücken verbundenen Aminosäuren befinden sich nicht senkrecht übereinander, sondern sind gegeneinander verschoben.

1953 wurde von F. Crick [9] vorhergesagt, daß zwei α -Helizes mit gleichem Drehsinn in der Lage sein sollten, sich parallel, also mit den N-Terminalen Enden der Helizes in die selbe Richtung weisend, aneinander zu lagern und eine coiled-coil zu formen. Wenn dies geschehen soll, dann dürfen sich gegenüberliegende Aminosäurereste der beiden α -Helizes nicht sterisch behindern. Crick hatte sich, um dies zu modellieren zwei α -Helix Modelle aus Papier gebaut. Dazu hatte er ein Papier zu einem Zylinder gefaltet und für jeden Aminosäurerest ein Kreuz eingezeichnet. In Abbildung 2.2 a) ist ein Bild des dadurch ent-

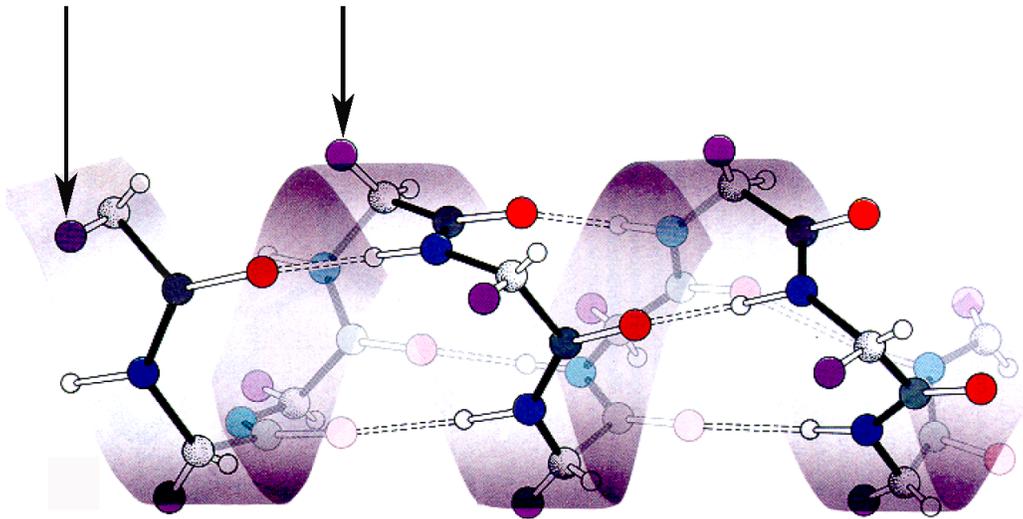


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung einer α -Helix

standenen Papiers, wenn man es wieder entfaltet, gezeigt. Da pro Umrundung der Helix 3,6 Aminosäurereste Platz finden müssen, liegt der siebte Aminosäurerest nicht vertikal über dem ersten, sondern leicht nach rechts verschoben. Dies ist durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet.

Man kann eine zweite α -Helix mit dem selben Verfahren modellieren und für jeden Aminosäurerest einen Kreis zeichnen. Versucht man die Papierzylinder so aneinander zu halten, daß die Aminosäurereste der einen zwischen den Aminosäureresten der anderen Helix Platz finden und entfaltet dann beide Blätter wieder, so erhält man das in Abbildung 2.2 b) gezeigte Muster. Dabei kommen die Kreuze des ersten Blattes zwischen den Kreisen des zweiten zu liegen („knob into holes packing“). Ein Aminosäurerest der ersten α -Helix ist also von vier Aminosäureresten der gegenüberliegenden Helix umgeben. Dazu müssen die Blätter aber gegeneinander um ca. 20° verdreht werden. Stellt man sich die Blätter wieder als sehr lange Zylinder vor, so werden sie sich gegenseitig mit diesem Kreuzungswinkel umwinden.

Eine weitere Veranschaulichung dieser Struktur ist in Abbildung 2.3 gezeigt. Dabei sind die Aminosäurereste, die sich an den Berührungspunkten beider Helizes nahe kommen, als Kugeln eingezeichnet. Man erkennt, daß sich die Kugeln um die jeweilige Achse ihrer α -Helix drehen, gleichzeitig aber eine vertikale, superhelikale Achse bilden, die von den α -Helizes umwunden wird. Die α -Helizes umwinden sich also gegenseitig.

Die effektive Anziehungskraft der beiden Stränge entsteht aus der hydrophoben Wechselwirkung zwischen den Aminosäureresten, die sich in der superhelikalen Achse nahe kommen. Sollen an diesen Stellen nur nichtpolare Aminosäurereste auftreten, muss jeweils der erste und der vierte Aminosäurerest von sieben Aminosäuren zweier Windungen unpolar sein. Diese Sequenz nennt man Heptade oder „heptad repeat“ $(abcdefg)_n$ [10], sie wiederholt sich alle sieben Aminosäuren. Abbildung 2.4 zeigt eine schematische Darstellung der

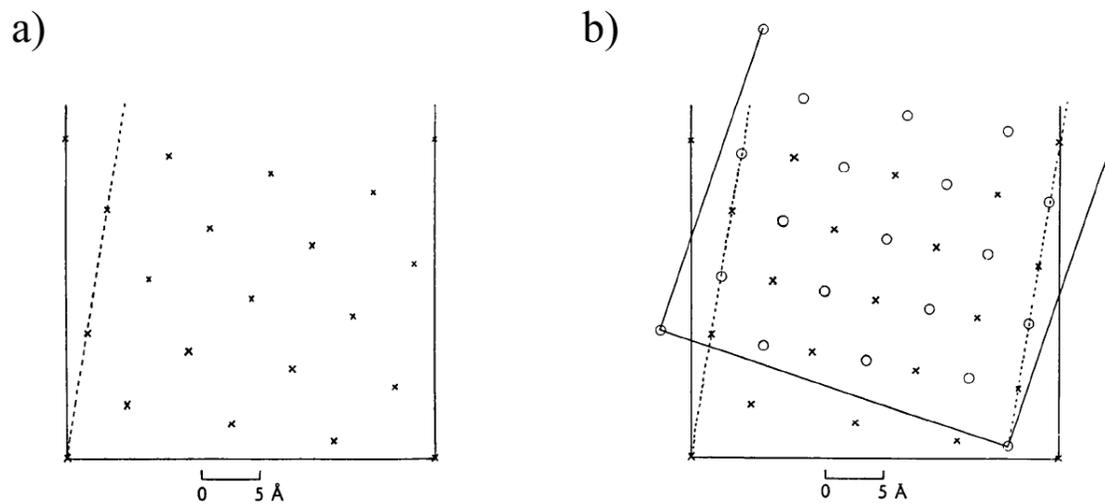


Abbildung 2.2: Veranschaulichung der „knob into holes“ Anordnung. Übernommen aus [9]

Heptade. Man erkennt einen Querschnitt durch zwei α -Helizes. Es wurden zwei ganze Umdrehungen eingezeichnet, eine Heptade wird also vollständig durchlaufen. Man sieht zum einen, daß sich die Aminosäurereste an a und d Positionen der beiden Helizes nahe kommen und daher um eine hydrophobe Wechselwirkung zu erzeugen, unpolar sein müssen. Zum anderen erkennt man, daß die Stabilität der coiled-coil durch Ionenpaare verstärkt werden kann. Um ein Ionenpaar bilden zu können, müssen an den Positionen e und g unterschiedlich geladene Aminosäurereste sein.

Mittlerweile ist es möglich von kurzen coiled-coil Strängen hoch auflösende Röntgenstruktur-

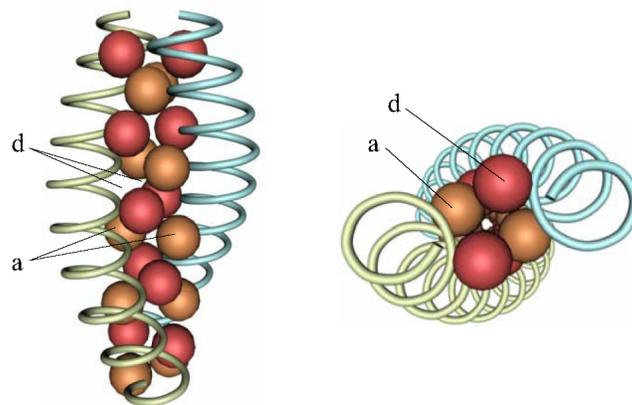


Abbildung 2.3: Veranschaulichung einer coiled-coil Struktur. Adaptiert aus [11].

Experimente zu machen, für längere Stränge wird die Kristallisation zunehmend schwieri-

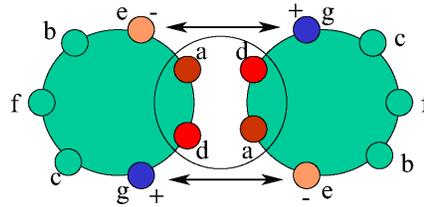


Abbildung 2.4: Heptad Repeat einer coiled-coil, gezeigt sind zwei Windungen. Adaptiert aus [12]

ger. So wurde 1991 die Struktur des Leucinezippers des Transkriptions Aktivators der Hefe (GCN4) mit $1,8 \text{ \AA}$ Auflösung bestimmt [11]. Dadurch wurde Cricks „knob into holes“-Idee, mit einem Kreuzungswinkel der beiden α -Helizes von 18° , bestätigt. Die Höhe für eine vollständige Umwindung der beiden Helizes ist 11 nm, d.h. bei dem GCN4 Leucine Zipper, der aus 33 Aminosäuren besteht, wird man nur etwa eine halbe Umwindung sehen wie in Abbildung 2.3 gezeigt. Dieser Leucinezipper ist ein beliebtes Objekt für experimentelle Untersuchungen, weil er ein fast perfektes Beispiel für den Heptad-Repeat liefert. So sieht man an fast allen a und d Positionen (außer N^{16}) hydrophobe Aminosäuren und man erkennt die ionischen Wechselwirkungen zwischen $K^{15} \longleftrightarrow E^{20}$ und $E^{22} \longleftrightarrow K^{27}$ (Vgl. Tabelle A.3).

2.3 Coiled-coil Strukturen in Myosin und Kinesin

In Abbildung 2.5 ist schematisch der Aufbau von Kinesin und Myosin gezeigt. Beide Typen von Motoren werden durch eine coiled-coil Struktur (in blau markiert) dimerisiert. Die Motordomänen (in orange markiert) sind die katalytischen Domänen, die auch die Bindungsstellen für ATP enthalten. Die Motordomänen des Kinesins binden an Mikrotubuli und die des Myosins an Aktin Filamente an. Ein Vergleich möglicher Modelle für die Bewegungsabläufe beider Motoren wurde von R. Vale und R. Milligan gegeben [15]. Um die Bindungsstellen der Mikrotubuli, die in Abständen von 8 nm auftreten, erreichen zu können, muss sich der „Necklinker“-Teil des Kinesins (in Abb. 2.5 in braun angedeutet) annähernd auf seine gesamte Länge ausdehnen. Direkt an den „Necklinker“ schließt sich eine coiled-coil Struktur an. Mutationen, Ersetzungen oder Verkürzungen in dieser Region haben einen Einfluss auf die Effizienz der Fortbewegung des Kinesins [3][4][5]. Daher stellt sich die Frage nach der mechanischen Stabilität der coiled-coil Struktur in diesem Bereich. Auch bei Myosin VI wird spekuliert, ob sich die dimerisierende coiled-coil während eines Motorschrittes öffnet. In Abbildung 2.5 b) sind schematisch die Motoren Myosin V und Myosin VI, an ein Aktinfilament gebunden, gezeigt. Ein hauptsächlicher Unterschied der beiden Motoren liegt in der Länge ihrer „Neck“-Regionen (Halsregionen). Bei Myosin V kann eine Schrittweite von 36 nm [16][17] durch ein nach vorne neigen der Halsregion erklärt werden [18][19][20][21]. Myosin VI zeigt mit seinen sehr viel kürzeren Halsregionen

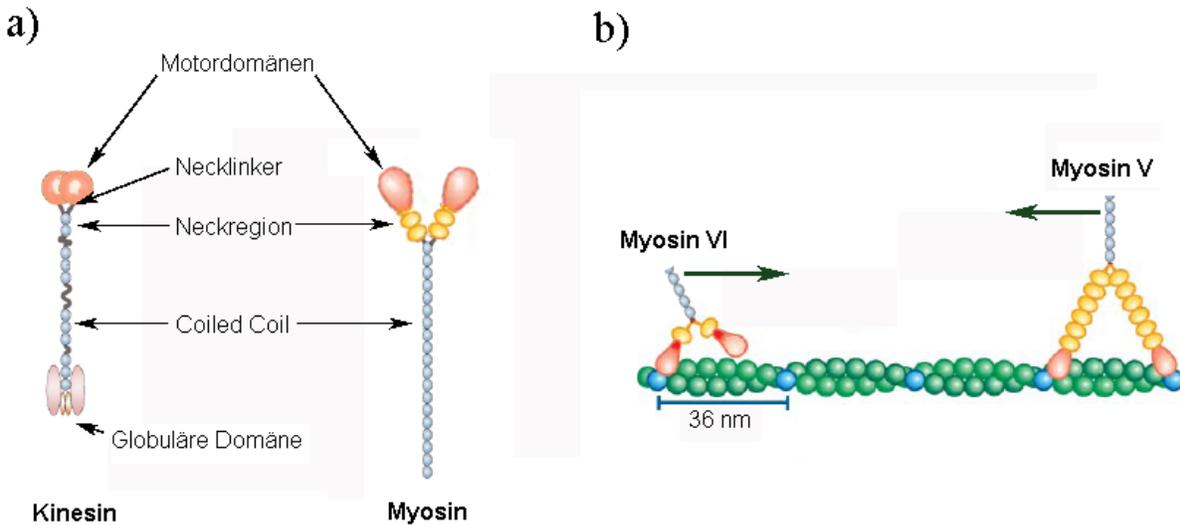


Abbildung 2.5: a) Schematische Darstellung von Kinesin und Myosin. Adaptiert aus [13]. b) Schematische Darstellung von Myosin V und Myosin VI an Aktinfilament gebunden. Adaptiert aus [14].

vergleichbar große Schrittweiten auf [22][7]. Auch Myosin V Mutanten, deren Halsregionen verkürzt wurden, zeigen noch Schrittweiten von 36 nm [23]. Es wurde ein Modell vorgeschlagen, das eine Dehnung der Halsregion des Myosin VI durch teilweises unzzippen der coiled-coil Region beinhaltet [7].

2.4 Theoretische Vorhersage

Für sehr lange coiled-coil Strukturen oder für solche, bei denen aus anderen Gründen noch keine experimentellen Strukturinformationen vorliegen, wurde oft aus dem Vorfinden des heptad repeats in der Aminosäuresequenz geschlossen, daß sich eine coiled-coil bilden würde [24]. Das Auftreten des heptad repeats allein reicht aber nicht aus, um eine coiled-coil vorhersagen zu können. 1991 lieferte Lupas zum ersten Mal einen verlässlich funktionierenden Algorithmus, der aus der Aminosäureabfolge eines Proteins Wahrscheinlichkeiten für das Entstehen einer coiled-coil angeben konnte[1][25]. Dieser Algorithmus vergleicht die eingegebene Sequenz mit bereits vorhandenen coiled-coil Sequenzen, basierend auf Untersuchungen von D.A.D. Parry [26]. Dazu benutzt der Algorithmus eine Tabelle, in der die Wahrscheinlichkeit für ein Auftreten einer bestimmten Aminosäure, an einer bestimmten Stelle der Heptade angegeben ist.

In dieser Diplomarbeit wurden die Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten des coiled-coil Faltungsmotives in dem Halsstück des Neurospora Crassa Kinesins (Nkin) und für die Leucinezipper Sequenz des Transkriptase Aktivators der Hefe (GCN4-p1 und GCN4-p1Q) mit dem Programm MacStripe [27] berechnet. In Abbildung 2.6 ist die von Macstripe

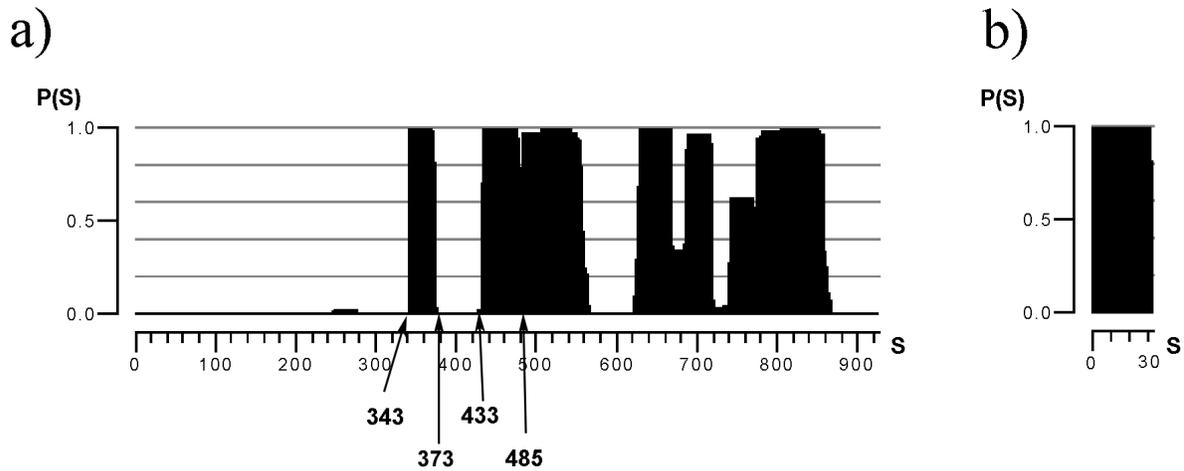


Abbildung 2.6: Lupas Plot für a) Nkinesinsequenz und b) Leucinezippersequenz des GCN4-p1Q

berechnete Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen des coiled-coil Motivs ($P(S)$) gegen die Nummer der Aminosäure S aufgetragen. In Abbildung 2.6 a) wurde die Aminosäuresequenz des Nkinesins als Eingabe benutzt. Die genaue Sequenz findet sich in Anhang A.3. Man sieht das bereits durch Röntgenstrukturanalyse als coiled-coil bekannte Halsstück („neck“) zwischen den Aminosäuren 343 und 370 [28]. Nach Aminosäure 370 sind keine experimentellen Strukturinformationen bekannt. Der Lupasplot gibt aber einen starken Hinweis darauf, daß zwischen den Aminosäuren 373 und 433 keine coiled-coil Struktur vorliegt. Im weiteren wird dieser Abschnitt als „Scharnier“ bezeichnet. Zwischen den Aminosäuren 439 und 485 ist $P(S)$ wieder fast durchgehend bei 1,0 mit einem kleinen Einbruch um Aminosäure 480, wo $P(S)_{480} = 0,5$ ist. Für das Teilstück zwischen den Aminosäuren 343 und 485, das in dieser Diplomarbeit untersucht werden wird (vgl. Kapitel 6), sagt der Lupasplot also eine vollständige coiled-coil voraus, die durch einen strukturlosen Teil zwischen den Aminosäuren 373 und 433 unterbrochen ist.

Eine Berechnung von $P(S)$ für den Leucinezipper GCN4-p1 ergibt $P(S) = 1$ für alle 33 Aminosäuren. Es handelt sich also bei dem 33 Aminosäuren langen Zipper um eine fast perfekte coiled-coil (vgl. auch [11]). Auch bei dem in dieser Diplomarbeit verwendeten Leucinezipper GCN4-p1Q, dessen Aminosäuren an f-Positionen der Heptade jeweils durch ein Glutamin (Q) ersetzt wurden (Sequenz in Anhang A.3) und der zwei weitere Aminosäuren am N-Terminale Ende besitzt, ergibt der Lupas Plot die gleiche Vorhersage. Dies ist in Abbildung 2.6 b) gezeigt. $P(S)$ ist dort über die gesamte Länge des Zippers von 35 Aminosäuren, wie bei dem ursprünglichen GCN4-p1 Leucinezipper, durchgehend 1.

Kapitel 3

Theoretische Grundlagen

Mit dem Kraftmikroskop ist man in der Lage, die Kraftantwort eines langkettigen Moleküls auf ein Vergrößern seines Abstands zwischen C-Terminals Ende und N-Terminals Ende zu erhalten. Mit größerem Ende-zu-Ende Abstand schränkt man zunehmend die Bewegungsfreiheit des Moleküls ein. Durch diese Verringerung der Entropie entsteht eine Kraft. Im Folgenden wird ein Modell besprochen, das diese Kraftantwort beschreibt.

3.1 Das Wormlike-Chain-Modell

Proteine bestehen aus einer Aneinanderreihung von Aminosäuren, die eine lange Kette bilden. Zehn Dictyostelium discoideum Filamin (ddFLN) Domänen bestehen beispielsweise aus 1000 Aminosäuren, wobei jeweils drei Atome der Aminosäure das Rückgrat der Kette bilden. Man erhält also eine Rückgradkette aus 3000 Atomen. Ein solches System kann nur mit Methoden der statistischen Physik beschrieben werden. Um die kanonische Zustandssumme berechnen zu können, muß über alle Zustände n , die das System einnehmen kann, summiert werden. Bei kraftmikroskopischen Untersuchungen kann man durch den experimentellen Aufbau den Abstand z zwischen Anfangs- und Endpunkt der Kette bestimmen. Die Zustandssumme für eine solche Kette lautet:

$$Z_k = \sum_n e^{-\beta E_n} = \sum_n e^{-\beta(E_n + Fz)} \quad (3.1)$$

wobei $\beta = 1/k_B T$ ist und über alle möglichen Zustände n der Kette addiert wird. Außerdem ändert sich die Energie E_n der Kette, wenn an den Enden eine Kraft F angelegt wird. Dies kann durch einen linearen Beitrag in der Zustandssumme berücksichtigt werden [29]. Kennt man die Zustandssumme, kann man alle thermodynamischen Größen aus ihr berechnen, da sie mit der Helmholtzschen freien Energie $F = U - TS$ über $F(T, V, N) = -k_B T \ln Z_k$ zusammenhängt. Außerdem gilt für die mittlere Kraft $\langle F \rangle$ die am System wirkt:

$$-k_B T \frac{\delta \ln(Z_k)}{\delta z} = \sum_n F_n \frac{1}{Z_k} e^{-\beta E_n} = \sum_n F_n p_n = \langle F \rangle \quad (3.2)$$

Dabei ist F_n die Kraft, die das Systems in einem bestimmten Zustand n ausübt. Würden wir also die Zustandssumme kennen, könnten wir auf alle wichtigen Größen des Systems schließen.

Es gibt mehrere Ansätze zur Berechnung der Zustandssumme für ein langkettiges Molekül. Das Modell der sich frei bewegenden Kette (Freely Jointed Chain) [30] vernachlässigt enthalpische Beiträge, indem die Kette als Aneinanderreihung von Stäben angesehen wird. Die Stäbe dürfen sich um Ihre Angelpunkte frei bewegen. Diese Annahme kann nur eine erste Näherung darstellen, da in einem realen Molekül Bindungswinkel zwischen den Atomen gegeben sind.

Ein Modell, das zumindest die enthalpischen Beiträge dieser Bindungswinkel berücksichtigt, ist das der frei rotierenden Kette (Freely Rotating Chain). Dabei werden zwischen den einzelnen Kettengliedern feste Winkel angenommen. Um diese kann die Kette aber frei rotieren. Hierbei werden immer noch sterische Behinderungen weiter entfernter Kettenglieder und andere Wechselwirkungen vernachlässigt[30]. Das Modell, das in dieser Diplomarbeit verwendet wird, ist das Wormlike-Chain-Modell (WLC-Modell), es kann aus dem Modell der frei rotierenden Kette hergeleitet werden, wenn man die Anzahl der Segmente gegen unendlich und die Länge der Segmente gegen null gehen läßt [31][32]. Marko und Siggia haben die Kraftabhängigkeit von der Ausdehnung der Kette mit Hilfe des WLC-Modells auf die Lösung eines Variationsproblems zurückgeführt [33]. Dazu haben sie für die Energie der WLC-Kette eine Biegeenergie von

$$E = \frac{k_B T}{2} \int_0^L A \kappa^2 ds - Fz \quad (3.3)$$

angesetzt, wobei sie die Kette als Raumkurve $\mathbf{r}(s)$ ansahen. In Formel 3.3 ist $\kappa = |\delta \mathbf{r} / \delta s|$ das Reziproke des Biegeradiuses, und A die Länge, über die mit einem Energieaufwand von $k_B T$ eine Biegung erreicht werden kann. Da gleichzeitig A die Länge ist, nach der keine Korrelation mehr zwischen den Tangentenvektoren $\mathbf{t} = \delta \mathbf{r} / \delta s$ existiert, nennt man sie auch Persistenzlänge [34]. Die Integration über die Streckensegmente ds wird zwischen den Grenzen 0 und der Konturlänge L der Raumkurve ausgeführt. Allerdings kann das Variationsproblem nur für kleine oder große Kräfte analytisch gelöst werden. Man erhält für

$FA \ll 1$:

$$\frac{z}{L} = \frac{2}{3} \frac{FA}{k_B T} \quad (3.4)$$

und für $FA \gg 1$:

$$\frac{z}{L} = 1 - \sqrt{\frac{k_B T}{4FA}} \quad (3.5)$$

Man erkennt für die zweite Formel, daß die Kraft gegen unendlich geht ($F \rightarrow \infty$), wenn man z an die Konturlänge annähert ($z \rightarrow L$). Für den Bereich zwischen diesen Näherungen wurde eine analytische Interpolationsformel angegeben, die von der exakten numerischen

Lösung des Variationsproblems bei $FA \approx 1$ in z um 7% abweicht:

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{z}{L} + \frac{1}{4(1 - z/L)^2} - \frac{1}{4} \right] \quad (3.6)$$

1999 wurde von C. Bouchiat [35] eine genauere Interpolationsformel für diesen Bereich angegeben. Dazu wurde Formel 3.6 von der exakten numerischen Lösung des Variationsproblems subtrahiert und an die Differenz ein Polynom siebten Grades angenähert. Für die Kraft-Abstands-Funktion ergibt sich:

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{z}{L} + \frac{1}{4(1 - z/L)^2} - \frac{1}{4} + \sum_{i=1}^{i \leq 7} \alpha_i \left(\frac{z}{L} \right) \right] \quad (3.7)$$

Die Konstanten α_i sind gegeben durch: $\alpha_2 = -0.5164228$, $\alpha_3 = -2.737418$, $\alpha_4 = 16.07497$, $\alpha_5 = -38.87607$, $\alpha_6 = 39.49944$ und $\alpha_7 = -14.17718$. Die Abweichung dieses Polynomes von der exakten numerischen Lösung des WLC-Modells im Bereich $FA \approx 1$ beträgt 0,01%. Da das WLC-Modell Wechselwirkungen verschiedener Aminosäurereste vernachlässigt, findet man verschiedene Werte für die Persistenzlänge A , wenn man das WLC-Modell an experimentell gemessene Kurven in verschiedenen Kraftbereichen anpassen will. Kürzlich wurde ein theoretisches Modell vorgeschlagen, das in einem hohen Kraftbereich (> 500 pN) Kraft-Abstands-Kurven liefert, die von der Persistenzlänge A unabhängig sind [36].

3.2 Konformationskinetik mit dem Zwei-Zustands Modell

Proteine bestehen aus einer Aneinanderreihung von Aminosäuren. Bei Verhältnissen wie sie z.B. in der Zelle herrschen, nimmt die Aminosäurekette eine bestimmte, von der Sequenz der Aminosäuren abhängige, 3-dimensionale Struktur ein. Diese native (oder auch gefaltete) Struktur ist grundlegend für die richtige Funktionsweise der Proteine. Durch Ändern der Umgebungsbedingungen kann der native Zustand eines Proteins zerstört werden, die Aminosäurekette liegt dann nicht mehr geordnet vor und es existiert keine feste 3-dimensionale Struktur mehr. Dieser Zustand wird als denaturierter oder entfalteter Zustand bezeichnet.

Mit Formel 3.6 ist man in der Lage die Kraft anzugeben, die benötigt wird um ein Polymer der Konturlänge L auf einen Ende-zu-Ende-Abstand von z auszudehnen. Ist dieses Polymer aber eine Kette aus gefalteten Proteinen, so kann mit dem WLC-Modell allein die Kraftantwort einer Proteinkette nicht beschrieben werden, wenn die Proteine Konformationsänderungen durchführen können. Legt man eine Kraft an ein gefaltetes Protein so erhöht man die Wahrscheinlichkeit, daß es entfaltet. Durch die geordnete räumliche Struktur des nativen Zustands ist der Abstand der N-Terminalen Aminosäure zur C-Terminalen kleiner als im denaturierten Zustand. Entfaltet ein Protein in der Kette, so wird sich die Konturlänge der gesamten Kette erhöhen. Diesen Umstand kann man mit dem Zwei-Zustands

Modell beschreiben.

In diesem Modell geht man davon aus, daß ein Protein nur zwei Zustände einnehmen kann: den völlig gefalteten Z_f und den völlig entfalteten Z_u . Abbildung 3.1 zeigt schematisch die freie Enthalpie $G(T, P, N) = U - TS + PV$ für ein solches Protein, dabei ist hier der Zustand tieferer Energie der gefaltete und der höherer Energie der entfaltete. Dies ist schematisch

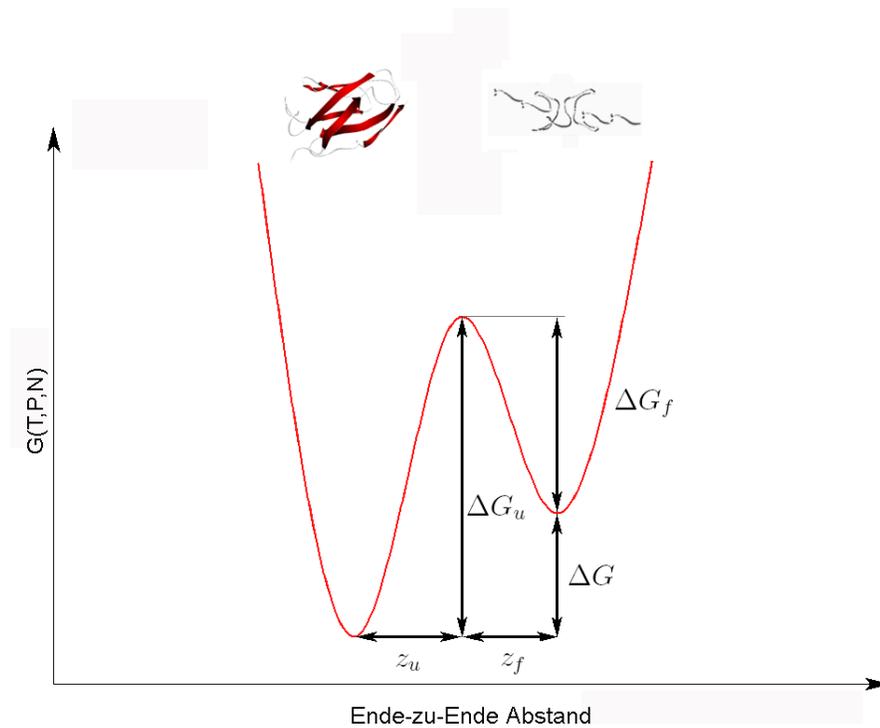


Abbildung 3.1: Schema für freie Enthalpie in Abhängigkeit vom Ende-zu-Ende Abstand. Zeichnung adaptiert aus [37]

durch die darüber gezeigten Strukturbilder dargestellt. Die Änderung des Ende-zu-Ende Abstandes, um von Z_f zu Z_u zu gelangen, beträgt $z_u + z_f$. Es lassen sich Übergangsraten α_0 und β_0 zwischen den beiden Zuständen angeben. Eine Faltung des Proteins wird durch die Rate α_0 beschrieben, eine Entfaltung durch die Rate β_0 :



Die Übergangsraten sind durch die Arrhenius-Gleichung bestimmt:

$$\alpha_0 = \omega e^{-\Delta G_f/k_B T} \quad (3.9)$$

Dabei ist ΔG_f die Energiebarriere, die vom entfalteten Zustand aus überwunden werden muß. Der Vorfaktor ω kann durch die Kramerstheorie erklärt werden und hängt nur schwach

von der angelegten Kraft ab [38]. Dies gilt auch für die Übergangsraten der Entfaltung, nur mit einer Energiebarriere ΔG_u .

$$\beta_0 = \omega e^{-\Delta G_u/k_B T} \quad (3.10)$$

Durch Anlegen einer externen Kraft wird diese Energielandschaft verschoben. So wird bei einer bestimmten Kraft die Energie für den gefalteten Zustand Z_f größer sein als für den entfalteten Zustand Z_u . Dadurch ändern sich auch die Übergangsraten. Ein linearer Ansatz addiert zu der im Boltzmannfaktor gegebenen freien Aktivierungsenthalpie der Rate, die Energieänderung durch die angelegte Kraft hinzu [29]. Man erhält die kraftabhängigen Übergangsraten:

$$\alpha(F) = \omega e^{-(\Delta G_f - Fz_f)/k_B T} \quad (3.11)$$

und

$$\beta(F) = \omega e^{-(\Delta G_u - Fz_u)/k_B T} \quad (3.12)$$

Besteht die Proteinkette aus N vielen gleichen Untereinheiten, die alle im Gleichgewicht falten und entfalten, kann man eine analytische Form für die Kraft-Abstands-Kurven angeben. Für große N und im thermischen Gleichgewicht gilt:

$$K = [Z_f]/[Z_u] = \alpha_0/\beta_0 \quad (3.13)$$

Damit läßt sich mit den Gleichungen 3.11 und 3.12 die Gleichgewichtskonstante K schreiben als:

$$K = e^{-\Delta G(F)/k_B T} \quad (3.14)$$

wobei $\Delta G(F)$ durch $\Delta G_f - \Delta G_u - F(z_f - z_u)$ gegeben ist. Nimmt man zwei Konturlängen für die Untereinheiten an, eine für den gefalteten Zustand l_f und eine für den entfalteten l_u , so ist die Konturlänge der gesamten Proteinkette durch $L_{ges} = \alpha(F)l_f + \beta(F)l_u$ gegeben. Mit der Umkehrfunktion der WLC-Formel 3.6 kann man bei gegebener Kraft den Ende-zu-Ende-Abstand aller gefalteten Proteine $x_f(F, A_f, \alpha(F)l_f)$ und aller entfalteten Proteine $x_u(F, A_u, \beta(F)l_u)$ angeben. Dabei ist A_f die Persistenzlänge der gefalteten Untereinheiten und A_u die der entfalteten. Der Ende-zu-Ende-Abstand der gesamten Kette ist dann:

$$z(F) = x_f(A_f, F, \alpha_0 l_f) + x_u(A_u, F, \beta_0 l_u) \quad (3.15)$$

Mit der Gesamtzahl N aller Untereinheiten kann man die Raten wegen Formel 3.14 analytisch angeben. Die Umkehrformel $z(F)$ kann auch analytisch angegeben werden. Damit wird Formel 3.15 auch analytisch angebar. In dieser Betrachtung haben alle Untereinheiten die gleiche Gleichgewichtskonstante K . Es ergibt sich für Gleichung 3.15 $\delta z/\delta F \geq 0$, womit $F(z)$ monoton wachsend ist. Diese theoretische Kraft-Abstands-Funktion beschreibt beispielsweise das Überstrecken von Myosin sehr gut [39].

3.3 Monte-Carlo Simulation

Mit den kraftabhängigen Übergangsraten (Formel 3.11 und 3.12) ist man in der Lage, Entfaltungen einzelner Domänen zu simulieren. Mit Hilfe des Kraft-Abstands-Verhaltens

des WLC-Modells (Formel 3.6) kann ein Computer die Kraft des Moleküls mit bestimmter Konturlänge L berechnen, wenn es einen Ende-zu-Ende-Abstand z aufweist. Dazu unterteilt der Computer die Zeit in Intervalle endlicher Größe und berechnet den jeweiligen Abstand der Blattfeder von der Oberfläche, indem er eine konstante Geschwindigkeit der Blattfeder voraussetzt $z(t) = v_p t$. Wurde die an der Proteinkette anliegende Kraft für ein Zeitintervall berechnet, lassen sich zusätzlich mit

$$dP_u = N_f \beta(F) \Delta t \quad (3.16)$$

und

$$dP_f = N_u \alpha(F) \Delta t \quad (3.17)$$

die Wahrscheinlichkeiten für eine Konformationsänderung einer Domäne angeben. Der Computer gibt für jeden Zeitschritt eine Zufallszahl an, nach welcher entschieden wird, ob ein Konformationsübergang stattgefunden hat. Ist dies der Fall, kann man mit einer neuen Konturlänge $L_{neu} = L_{alt} + \Delta L$ wieder die Kraft der Feder mit Hilfe von 3.6 berechnen. Diese Simulation wird solange weitergeführt, bis alle Domänen entfaltet haben.

Auf diese Art lassen sich Gleichgewichts und Nichtgleichgewichtsübergänge von Proteinen simulieren [37][39]. Der Übergang vom Gleichgewicht zum Nichtgleichgewicht kann durch die Ziehgeschwindigkeit der Blattfeder und die Raten $\alpha(F)$ und $\beta(F)$ beschrieben werden. So kann bei Titin die Rückfaltung für mit dem AFM erreichbare Ziehgeschwindigkeiten vernachlässigt werden ($\alpha_0 \approx 2s^{-1}$), hingegen kann bei Dextran oder Überstrecken von Myosin die Rückfaltungsrate nicht vernachlässigt werden, man erhält eine Konformationsänderung im Gleichgewicht.

3.4 Kooperative Faltung

Wie in Kapitel 9 gezeigt werden wird, kann man die Faltung einer coiled-coil mit Hilfe der Kooperativität beschreiben. Das bedeutet, daß die Faltung einer Untereinheit der coiled-coil beeinflusst wird vom Zustand anderer Untereinheiten. Dabei bevorzugen die jeweiligen Untereinheiten den Zustand ihrer Nachbarn. Ein von B. H. Zimm und J. K. Bragg [40][41] entwickeltes Modell berücksichtigt die Kooperativität durch Einführung eines Keimbildungsschrittes. Dazu geben sie jeder Untereinheit j eine eigene Gleichgewichtskonstante K_j . Die erste Untereinheit die faltet erhält eine Gleichgewichtskonstante, die um den Nukleationsparameter $\sigma < 1$ erschwert ist. Dieser erschwerte erste Schritt wird Keimbildung genannt. Zimm und Bragg nahmen vereinfachend an, daß für die Faltung von α -Helizes die Keimbildung auch an den Enden der Aminosäurekette durch σ erschwert ist. Für die Keimbildung gilt also:

$$K_1 = \sigma K \quad (3.18)$$

Liegt aber die erste Domäne im gefalteten Zustand vor, soll für die jeweils benachbarten Domänen die alte Gleichgewichtskonstante gelten.

$$K_2 = K_3 = \dots = K_N = K \quad (3.19)$$

σ ist für realistische Systeme (z.B. für Übergänge zwischen entfaltetem Zustand \leftrightarrow α -Helix) in der Größenordnung von 10^{-4} . Wegen Gleichung 3.14 ist dies gleichbedeutend mit:

$$K_1 = e^{-\Delta G/k_B T + \ln \sigma} = e^{-\Delta G_{koop}/k_B T} \quad (3.20)$$

Mit Einführung der Kooperativität erhalten wir Domänen, die nicht mehr unabhängig voneinander falten und verschiedene freie Faltungsenthalpien aufweisen. Deswegen können wir die Monte-Carlo Simulation, die in Kaptiel 3.3 erklärt wurde nicht zum Beschreiben kooperativer Faltung anwenden. Um die kooperative Faltung beschreiben zu können, müssen wir wieder zu Gleichung 3.1 zurückkehren. Durch numerische Berechnung der Zustandssumme wurde bereits von Bockelmann et al. [42] das unzzippen komplementärer DNA theoretisch beschrieben. Diese Berechnung läßt sich auch auf das Falten und Entfalten von coiled-coils im thermischen Gleichgewicht übertragen. Die Energie E_n des Boltzmannfaktors in Zustandssumme 3.1 können wir, für den Fall kraftspektroskopischer Experimente, in drei verschiedene Energieteile aufspalten.

$$E_n = E_{unz} + E_{ext} + E_{lev} \quad (3.21)$$

Dabei bedeutet E_{unz} die Arbeit, die durch das Entfalten des Zippers bis zu einem bestimmten Aminosäurepaar m aufgebracht werden muss. Sie enthält alle energetischen Beiträge, die mit dem Entfalten verbunden sind, wie Öffnen der Wasserstoffbrückenbindungen der α -Helix und Wechselwirkungen der wässrigen Umgebung mit den Aminosäureresten des Leucinezipper. In dieser Beschreibung ordnen wir jeder einzelnen Aminosäure einen solchen energetischen Beitrag E_j zu. E_{unz} läßt sich daher als

$$E_{unz} = \sum_{j=0}^{m \leq N} \Delta E_j \quad (3.22)$$

schreiben. Der zweite Energieterm in Formel 3.21, E_{ext} , kommt durch die entropische Kraft eines ausgedehnten Biopolymers zu Stande. Die bereits entfalteten Teile der Struktur haben eine Konturlänge L , die jeweils von der Anzahl der Entfaltungen j abhängt. Die für diese Konturlänge jeweilige Kraft läßt sich mit der WLC-Formel 3.6 bestimmen. Allerdings hängt sie auch von der Anzahl der bereits entfalteten Aminosäurepaare j ab, da die Konturlänge L mit größerem j wächst. Für die entropische Energie erhält man:

$$E_{ext} = \int_0^z F(L(j), z') dz' \quad (3.23)$$

Da die Eigenschaften der beiden Stränge gleich sind, müssen wir sie nicht getrennt betrachten, d.h. z steht für den Ende-zu-Ende-Abstand des Proteins. Die letzte Energie E_{lev} ist durch die Energie der Blattfeder bestimmt. Mit dem Hookeschen Gesetz ergibt sie sich zu

$$E_{lev} = \frac{k_c}{2} x^2 = \frac{k_c}{2} (x_0 - z)^2 \quad (3.24)$$

Dabei ist x_0 der Abstand der Blattfeder von der Unterlage ohne Auslenkung. Mit diesen Energien sind die Zustände des Systems durch die jeweilige Anzahl der Entfaltungen j und den jeweiligen Ende-zu-Ende Abstand z gegeben. Deswegen wird 3.1 zu

$$Z_k = \sum_{j,z} e^{-E_n(j,z)/k_B T} \quad (3.25)$$

Aus Formel 3.25 und 3.2 ergibt sich für eine bestimmte Auslenkung des Piezotisches x_0 der Erwartungswert der Kraft zu [42]:

$$\langle F(x_0) \rangle = \frac{\sum_{j,z} F(j, z, x_0) e^{E_n(j,z,x_0)/k_B T}}{\sum_{j,z} e^{E_n(j,z,x_0)/k_B T}} \quad (3.26)$$

3.5 Numerische Berechnung der Kraft-Abstands-Kurven

Die Berechnung von Formel 3.26 kann numerisch durchgeführt werden. Die Summe muß dabei über alle Aminosäurenpaare j und alle möglichen Ende-zu-Ende-Abstände z der Aminosäurekette ausgeführt werden. In Abbildung 3.2 ist schematisch der Versuchsauf-

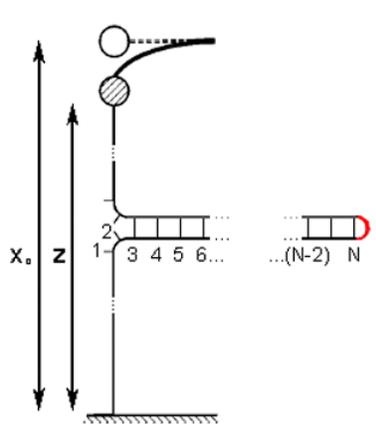


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Adaptiert aus [42].

bau eines kraftspektroskopischen Experimentes an einer coiled-coil Struktur aufgezeichnet, dabei ist die Piezooberfläche um den Abstand x_0 ausgelenkt. Zwischen Oberfläche und Feder ist ein Molekül eingespannt, das die Leucinezippersequenz enthält. Die Feder ist um $x = x_0 - z$ ausgelenkt. Die Leucinezippersequenz wird durch zwei Stränge beschrieben, die am Ende durch eine Disulfidbrücke (in rot gezeichnet) verbunden sind. In diesem Bild hat jede Aminosäure eine gegenüberliegende Aminosäure, mit der sie in Wechselwirkung steht. Für diese theoretische Beschreibung gehen wir davon aus, daß mit einem Entfalten einer

Aminosäure das Entfalten der gegenüberliegenden Aminosäure einhergeht. Die einzelnen Aminosäurepaare sind mit Zahlen von 1 bis N gekennzeichnet. In Abbildung 3.2 wurde der Zipper bereits um zwei Aminosäurepaare aufgetrennt.

In der für diese Diplomarbeit benutzten, numerischen Berechnung wurde in Formel 3.26 über die Aminosäurepaare $1 \leq j \leq N$ summiert, z wurde in 0.5 nm Schritte unterteilt und Formel 3.26 zwischen 0 und der jeweiligen von j abhängigen Konturlänge $L(j)$ der gesamten Aminosäurekette summiert. Wenn der Zipper noch völlig geschlossen ist, wird eine Konturlänge des Aminosäurerückgrads zwischen Blattfeder und Oberfläche von $L(j = 0) = L_{zu}$ angenommen. Für jedes entfaltende Aminosäurepaar j wurde ein Konturlängenzuwachs von 0,72 nm benutzt, dies entspricht dem doppelten Eichfaktor von 0,36 nm/AS [43].

Die Kraft des jeweiligen Zustandes kann durch die Auslenkung der Feder bestimmt werden:

$$F(j, z, x_0) = k_c(x_0 - z) \quad (3.27)$$

Die in $E_n(j, z, x_0)$ eingehenden Terme wurden, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, berechnet. Dabei wurde für die entropische Kettenenergie E_{ext} aus Formel 3.23 die Kraft des WLC-Modells aus Formel 3.6 eingesetzt. Sie ergibt sich zu:

$$E_{ext} = \frac{k_B T}{4A} \left[\frac{2z^2}{L(j)} - L(j) \left(1 + \frac{L(j)}{L(j) - x} \right) - z \right] \quad (3.28)$$

Die Energie der ausgelenkten Feder E_{lev} kann mit Formel 3.24 berechnet werden.

Durch Einsetzen bestimmter Werte für die Persistenzlänge A , die Federkonstante k_c , die Konturlänge des Aminosäurerückgrades bei völlig geschlossenem Zipper L_{zu} und die Energien E_j kann man die Summe 3.26 numerisch für verschiedene Auslenkungen des Piezotisches x_0 berechnen. Hat man für ein x_0 die Kraft berechnet, so erhält man mit

$$z = x_0 - \frac{\langle F(x_0) \rangle}{k_c} \quad (3.29)$$

den zugehörigen Ende-zu-Ende-Abstand des Proteins.

Kapitel 4

Experimentelle Methoden

Die in dieser Diplomarbeit vorgenommenen Messungen an einzelnen Molekülen wurden mit einem Kraftspektrometer durchgeführt. In diesem Kapitel wird die prinzipielle Funktionsweise eines Kraftspektrometers erklärt, außerdem werden typische Kraft- Abstands-Kurven am Beispiel des Titins und des Myosins vorgestellt.

4.1 Prinzipieller Aufbau des Kraftspektrometers

Seit seiner Erfindung 1986 durch G. Binnig et. al. [44] hat sich das Kraftmikroskop zu einer sehr erfolgreichen, flexiblen Technik zur Abbildung von Oberflächen von Polymeren, Mineralien und Biomaterialien entwickelt [44][45]. Schließlich wurde es möglich mit dem Kraftspektrometer die Ausdehnungsantwort eines einzelnen Moleküls auf die angelegte Kraft zu messen [46].

Der prinzipielle Aufbau eines Kraftspektrometers ist in Abbildung 4.1 wiedergegeben. Über einem in x,y und z-Richtung durch Anlegen einer Spannung im Nanometerbereich verschiebbaren Piezotisch ist eine Blattfeder mit sehr scharfer Spitze angebracht (Radius der Spitze ca. 30 nm). Sie befindet sich in einem Tropfen Pufferlösung, der auch die zu untersuchende Probe enthält. Außerdem wird ein Lichtstrahl auf das vordere Ende der Blattfeder fokussiert. Der dort reflektierte Strahl trifft zur Detektion in eine segmentierte Photodiode. Nähert man nun den Piezo in z-Richtung der Spitze an, wird bei Berührung mit der Oberfläche die Blattfeder ausgelenkt, und der Winkel des reflektierten Lichtzeigers ändert sich gleich der Winkeländerung der Blattfeder an der Stelle des Fokuses. Dadurch verschiebt sich der Intensitätsmittelpunkt des auftreffenden Strahls auf der Photodiode. Einen dazu proportionalen Wert kann man messen, indem man die Diode in mindestens zwei Segmente A und B aufteilt und das Verhältnis $D = \frac{A-B}{A+B}$ (Deflektion) bildet. Auf diese Weise können Auslenkungen der Spitze im Nanometerbereich beobachtet werden. Entfernt man den Piezo wieder von der Spitze, bleibt häufig ein Molekül unspezifisch zwischen beiden angebunden. Da man die Federkonstante k_c und den Piezoweg $x_0(t)$ kennt, kann man auf den Abstand der Spitze vom Piezo und auf die Kraft, die auf das Molekül

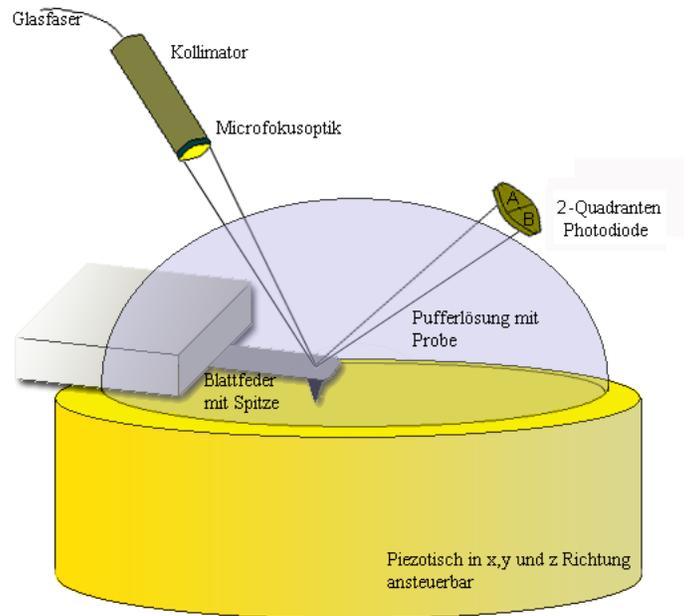


Abbildung 4.1: Schematischer Aufbau eines Kraftspektrometers

wirkt, schließen.

4.2 Eichen des Kraftspektrometers

Um über die Deflektion auf die Kraft an der Feder schließen zu können, benötigt man die Federkonstante k_c der Blutfeder. Die Federkonstante kann auf verschiedene Arten bestimmt werden, z.B. indem man die Blutfeder gegen eine andere makroskopische Blutfeder mit etwa gleich großer Federkonstante drückt[47], oder indem man die Verschiebung der Resonanzfrequenz unter zusätzlichem Gewicht an der Feder betrachtet[48]. Eine Zusammenfassung dieser Methoden findet man in [49]. Diese Methoden sind aber experimentell nur mit größerem Aufwand durchzuführen.

Eine weitere Möglichkeit k_c zu bestimmen, ist die des thermischen Rauschens der freien Blutfeder [50]. Diese Methode basiert auf dem Gleichverteilungssatz. Besitzt ein Freiheitsgrad x eines Systems eine sich quadratisch ändernde Energie, $U = ax^2$ mit $a = \text{const}$, so ist seine mittlere Energie durch $\langle U \rangle = \frac{1}{2}k_B T$ gegeben. Berücksichtigt man zusätzlich, daß das Deflektionssignal die Verbiegung der Blutfeder an der Stelle des Fokuses darstellt und betrachtet man nur die erste Eigenschwingung der Blutfeder [51], kommt man zu:

$$k_c = 0.82 \frac{k_B T}{\langle x^2 \rangle} \quad (4.1)$$

Für die Berechnung von $\langle x^2(t) \rangle$ aus den experimentellen Daten, würde man über sämtliches Rauschen integrieren, eingeschlossen Rauschen vom Detektionssystem oder von Oberschwingungen der Blattfeder. Um dies zu vermeiden, kann man die Fouriertransformierte $x(\omega)$ betrachten und das Parsevalsche Theorem benutzen: $\langle x^2(t) \rangle = \langle x^2(\omega) \rangle$. In Abbildung 4.2 ist ein solches Rauschspektrum $x(\omega)$ für einen Bio-Lever gezeigt. Man sieht die Resonanzfrequenz der Eigenschwingung bei ca. 1.8 kHz und zwei Oberschwingungen bei ca. 18 und 60 kHz. Nun kann man einen Großteil des ungewünschten Rauschens wegfiltern, indem man $x(\omega)$ nur zwischen 0 und 9 kHz integriert. Die für die Experimente in vorliegen-

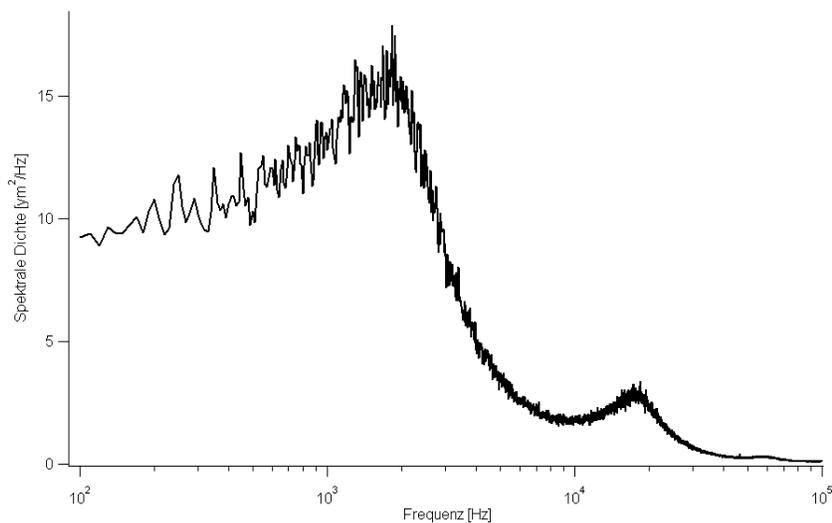


Abbildung 4.2: Spektrale Dichte des benutzten Bio-Levers

der Arbeit benutzen Blattfedern (Bio-Lever, Fa. Olympus, Bezug über Fa. Atomic Force, München, D) haben vergleichbare Kraftkonstanten von ca. 6 pN/nm.

4.3 Kraft-Abstands-Kurven

Bei einem kraftspektroskopischen Experiment werden in bestimmten zeitlichen Abständen (Samplingrate) das Deflektionssignal $D(t)$ und der Piezoweg $x_0(t)$ aufgezeichnet. Aus diesen Informationen kann man auf die Kraft an der Feder und den Abstand der Federspitze von der Oberfläche schließen. Dazu benötigt man die Kraftkonstante k_c , die man mit der Methode des thermischen Rauschens (Kapitel 4.2) bestimmen kann.

Außerdem liefert das Deflektionssignal, das an der Quadrantenphotodiode aufgezeichnet wird, nur einen zur Auslenkung der Blattfeder proportionalen Wert. Um diese Proportionalitätskonstante bestimmen zu können, drückt man mit der Blattfeder direkt auf die harte Substratunterlage. Die Auslenkung der Blattfeder ist dann durch die Auslenkung des Piezotisches gegeben. Der Proportionalitätsfaktor s wird durch die Steigung dieser Kraftkurve bestimmt: $s = dD/dx_0$.

Mit k_c und s ist man nun in der Lage den tatsächlichen Abstand der Spitze von der Oberfläche zu berechnen. Dazu muß man von dem, vom Piezo gefahrenen, Abstand $x_0(t)$ die Auslenkung der Blattfeder subtrahieren.

$$z(t) = x_0(t) - \frac{1}{s}D(t) \quad (4.2)$$

Da beide Informationen gleichzeitig aufgezeichnet werden, kann man den Parameter t eliminieren und die Kraft, die an der Feder wirkt

$$F(t) = \frac{k_c}{s}D(t) \quad (4.3)$$

in Abhängigkeit von $z(t)$ auftragen. Man erhält die sogenannten Kraft-Abstands-Kurven $F(z)$.

4.4 Kraft-Abstands-Kurven von Titin und Myosin

In kraftspektroskopischen Experimenten an Proteinen kann die unspezifische Bindung von Proteinen an Goldoberflächen ausgenutzt werden. Dazu drückt man die goldbedampfte Spitze auf eine Proteinschicht, die sich auf einer Goldunterlage befindet. Das Protein bindet dann an unbekanntes Stellen an das Gold der Unterlage und das Gold der Spitze an. Dies ist schematisch in Abbildung 4.3 a) am Beispiel des Titins gezeigt. Um Entfaltungseignisse von einzelnen Domänen reproduzierbar aufnehmen zu können, benötigt man eine modular aus gleichen Domänen aufgebaute Proteinkette. Durch die unspezifische Anbindung der Kette wird eine von Kraftkurve zu Kraftkurve verschiedene Anzahl von Proteindomänen zwischen Spitze und Oberfläche eingespannt sein. Das Ereignis, das durch das Entfalten einer einzelnen Domäne in den Kraftkurven hervorgerufen wird, tritt aber in allen Kraftkurven reproduzierbar auf. Die Gesamtanzahl der Entfaltungseignisse wird natürlich variieren. In Abbildung 4.3 a) ist eine Kraftkurve gezeigt, die an Titin aufgenommen wurde [46]. Die blaue Kraftkurve ist durch das Entfernen der Unterlage von der Blattfeder entstanden. Der erste Kraftanstieg (bis zum Punkt 1) entsteht durch die Kettenentropie der eingespannten Proteinkette. Am Punkt 1 entfaltet eine der zwischen Oberfläche und Spitze eingespannten Proteindomänen, wodurch sich der Abstand des N-Terminals Endes dieses Proteins zum C-Terminals Ende vergrößert. Die gesamte Kette erhält also eine größere Konturlänge, die Kraft an der Feder sinkt ab. Deshalb sieht man die gerade, abfallende Linie der Federrelaxation mit Steigung $-k_c$. Die Blattfeder relaxiert, bis sie die Kraft der längeren Kette erreicht. Der Kraftanstieg bis zum Punkt 2 ist also durch die Kettenentropie einer Kette gegeben, deren Konturlänge L im Vergleich zum ersten Kraftanstieg um einen für Titin spezifischen Wert ΔL vergrößert ist. Diese Ereignisse wiederholen sich solange, bis sich das Protein von der Oberfläche oder von der Spitze löst. Dadurch entsteht das für Titin spezifische, sägezahnartige Kraft-Abstands-Muster. In Abbildung 4.3 a) wurde die Blattfeder am Punkt 10 nicht weiter von der Oberfläche

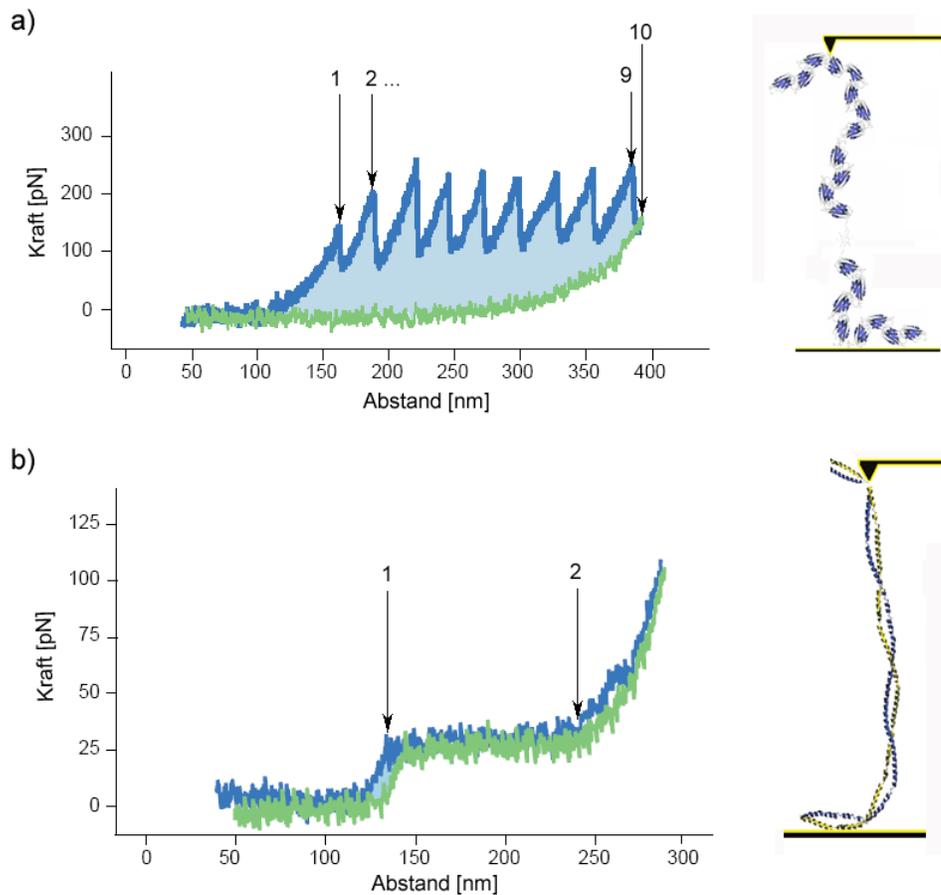


Abbildung 4.3: Kraft-Abstands-Kurven von Titin und Myosin. Übernommen aus [52]

entfernt, sondern wieder an die Oberfläche angenähert. Die in grün gezeigte Kurve folgt dem entropischen Kraft-Abstands-Verhalten einer Kette mit Konturlänge L , die sie nach Entfalten einer Domäne am Punkt 9 aufwies.

Die grüne Kurve weist eine große Hysterese zur blauen Kurve auf (in hellblau hervorgehoben), d.h. die Energie, die durch das Entfalten der einzelnen Domänen dissipiert ist, wird nicht instantan durch erneutes Annähern der Blattfeder an die Unterlage zurückgewonnen. Bei kraftspektroskopischen Experimenten entfaltet Titin also im Nichtgleichgewicht.

Diese Kraft-Abstands-Kurven können mit der in Kapitel 3.3 beschriebenen Monte-Carlo Simulation, die auf dem Zwei-Zustands Modell und dem WLC-Modell beruht, simuliert werden [37].

Ein von den Kraft-Abstands-Kurven des Titins grundsätzlich verschiedenes Muster erhält man bei kraftspektroskopischen Messungen an der Myosin coiled-coil [39]. Auch hier wurde die unspezifische Anbindung des Proteins an Gold ausgenutzt. In Abbildung 4.3 b) ist schematisch die coiled-coil des Myosins gezeigt, die unspezifisch an die Unterlage und die Spitze angebunden hat. Außerdem ist eine für diesen Versuchsaufbau typische Kraft-Abstands-Kurve in blau gezeigt. Der Kraftanstieg bis zum Punkt 1 entsteht wieder durch das entropische Verhalten der coiled-coil Kette, die zwischen Feder und Oberfläche eingespannt ist. Am Punkt 1 beginnen einzelne Untereinheiten der coiled-coil sich zu entfalten. Es entsteht ein Kraftplateau bis zum Punkt 2, an dem alle Untereinheiten der coiled-coil entfaltet sind und die Kraft dem entropischen Verhalten einer einzelnen Aminosäurekette folgt. Diese Konformationsänderungen finden im Gegensatz zu Titin im Gleichgewicht statt, d.h. nähert man die Blattfeder wieder an die Oberfläche an, so folgt die in grün gezeigte Kurve annähernd der blauen Kurve. Die in diesem Fall kleine, in hellblau gezeichnete Hysterese kann durch Untereinheiten erklärt werden, die nicht mehr zurückfallen. Auch dieses Kraft-Abstands-Verhalten kann durch die in Kapitel 3.3 erklärte Monte-Carlo Simulation beschrieben werden.

Kapitel 5

Kraftmikroskop für hochauflösende Messungen

Es ist möglich, mit einem Kraftspektrometer das Entfalten von coiled-coil Strukturen oder Trennen von DNA im thermischen Gleichgewicht zu beobachten. Solche Phänomene zeigen sich in einem sehr kleinen Kraftbereich (z.B. unzzippen von DNA bei 9 und 20 pN [53] oder Überstecken von Myosin bei 23 pN [39]). Das Unzippen von coiled-coil Strukturen, das in dieser Diplomarbeit untersucht wird, zeigt sich bei Kräften von 13 pN. Um Effekte in diesem Kraftbereich untersuchen zu können, braucht man ein Kraftspektrometer, das im Vergleich zu heute kommerziell erhältlichen Kraftspektrometern ein verbessertes Signal zu Rauschverhältnis (SNR) aufweist. Dies kann durch Benutzung von Blattfedern mit kleineren Abmessungen erreicht werden [54][55]. In diesem Kapitel wird die Konstruktion eines Kraftspektrometers, das Blattfedern mit besserem Signal zu Rauschverhältnis benutzen kann, vorgestellt.

5.1 Signal zu Rauschverhältnis von Blattfedern

Die Blattfeder des Kraftmikroskops kann man als eindimensionalen, harmonischen Oszillator betrachten. Da seine Energie

$$W(z) = \frac{1}{2}m \left(\frac{\delta z}{\delta t} \right)^2 + \frac{1}{2}m\omega_0^2 z^2 \quad (5.1)$$

von beiden Freiheitsgraden quadratisch abhängt, hat die Feder wegen des Gleichverteilungssatzes eine Energie von $k_B T$. Mit dem Gleichverteilungssatz und durch Lösen der mechanischen Bewegungsgleichung für eine Blattfeder mit Dämpfungsfaktor γ , beträgt die spektrale Dichte [56]

$$W_p(\omega) = \frac{2mk_b T \omega_0 / Q}{m^2(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + (m\omega_0 / Q)^2 \omega^2} \quad (5.2)$$

Dabei ist $\omega_0^2 = k_c/m$ und $Q = m\omega_0/\gamma$ wird als Qualitätsfaktor bezeichnet. Die spektrale

Dichte ist über $W_p = \frac{1}{2B} \langle \delta z^2 \rangle$ definiert, wobei B die Bandbreite des gefilterten Signals darstellt. Deshalb kann das Rauschen der Feder als

$$\langle \delta z^2 \rangle^{1/2} = \sqrt{\frac{4k_bTB}{k_c\omega_0} \frac{Q}{Q^2(1 - \omega^2/\omega_0^2)^2 + \omega^2/\omega_0^2}} \quad (5.3)$$

geschrieben werden. Man kann nun zwei Näherungen für das Rauschen der Feder anschreiben, für $\omega < \omega_0$ und für $\omega = \omega_0$:

$$\langle \delta z^2(\omega = \omega_0) \rangle^{1/2} = \sqrt{\frac{4k_B T Q B}{k_c \omega_0}} \quad (5.4)$$

und

$$\langle \delta z^2(\omega < \omega_0) \rangle^{1/2} = \sqrt{\frac{4k_B T B}{k_c Q \omega_0}} \quad (5.5)$$

Das Signal zu Rauschverhältnis ist über

$$\text{SNR} = \frac{\delta A}{\langle \delta z^2 \rangle^{1/2}} \quad (5.6)$$

definiert. Bei unseren Versuchen tritt die AFM Spitze mit der Oberfläche in Kontakt und wird dadurch ausgelenkt. Das Signal, das an der Photodiode gemessen wird, ist proportional zur Auslenkung der Feder und kann deshalb als $\delta A = a \frac{F}{k_c}$ geschrieben werden. Da aber das Rauschen den gleichen Proportionalitätsfaktor bei der Detektion besitzt, können wir für SNR schreiben:

$$\text{SNR}(\omega < \omega_0) = \frac{F}{k_c} \sqrt{\frac{Q\omega_0 k_c}{4k_B T B}} \quad (5.7)$$

Für $\text{SNR} = 1$ und mit Hilfe der Relation $\gamma = k_c/\omega_0 Q$ ergibt sich für die minimal auflösende Kraft

$$F_{\min} = \sqrt{4k_B T \gamma B} \quad (5.8)$$

Will man die Bandbreite der Messung und die Temperatur, die meist bei physiologisch relevanten Werten liegen soll, konstant lassen, kann man die Auflösung nur durch Verringern des Dämpfungsfaktors γ erreichen. Dies geht Hand in Hand mit den Dimensionen der Blattfeder, d.h. durch Verkleinern der Blattfeder erreicht man eine geringere Dämpfung und damit ein geringeres Rauschen [54]. Für den Aufbau eines neuen Kraftspektrometers wurden uns Blattfederprototypen mit 6 μm Breite und Längen zwischen 6 und 40 μm der Firma AsylumResearch (AsylumResearch, Santa Barbara, USA) zur Verfügung gestellt.

Es gibt noch andere Ursachen für Rauschen, wie Schrotrauschen durch statistisch verteilte Photonen, die auf die Photodiode treffen, Laserintensitätsrauschen und Laserphasenrauschen. Dennoch wird die spektrale Dichte (wie in Abbildung 4.2) durch das thermische Rauschen der Blattfeder dominiert. Daher wird ein Verringern des thermischen Rauschens durch kleinere Blattfedern den größten Effekt zum Verringern des Signal zu Rauschverhältnisses des gesamten Kraftmikroskops erbringen.

5.2 Konstruktion des Kraftmikroskops

In naher Zukunft werden Blattfedern mit einer Breite von $6 \mu\text{m}$ kommerziell erhältlich sein. Daher war es ein Hauptziel in der vorliegenden Arbeit ein Kraftmikroskop zu konstruieren, das einen Durchmesser des fokussierten Spots von ca. $6 \mu\text{m}$ aufweist. Dabei stand im Vordergrund, daß das Kraftmikroskop leicht zu justieren und zu bedienen sein sollte. Generell gilt, daß ein kleiner Fokus eine große numerische Apertur benötigt, will man aber mit der Optik nicht zu nahe an die Blattfeder heran, sind dem Auflösungsvermögen des Systems Grenzen gesetzt. In dieser Diplomarbeit wurde ein leicht zu justierendes Kraftmikroskop gebaut, das einen Spotdurchmesser von ca. $5 \mu\text{m}$ hat.

5.2.1 Berechnung der Spotgröße

Die Herleitungen in diesem Kapitel zur theoretischen Berechnung der Spotgröße, sind im wesentlichen aus [57] und [58] übernommen.

Da wir eine Superlumineszenzdiode (Fa. SuperLumDiodes Ltd. Moskau, Ru.) als Lichtquelle verwenden, müssen zur Berechnung des Strahlenganges die Gaußsche Intensitätsverteilung des Laserlichtes und Beugungseffekte berücksichtigt werden. Der prinzipielle Aufbau der Optik ist in Abbildung 5.1 veranschaulicht. Dabei wird das Ende der Glasfaser in den

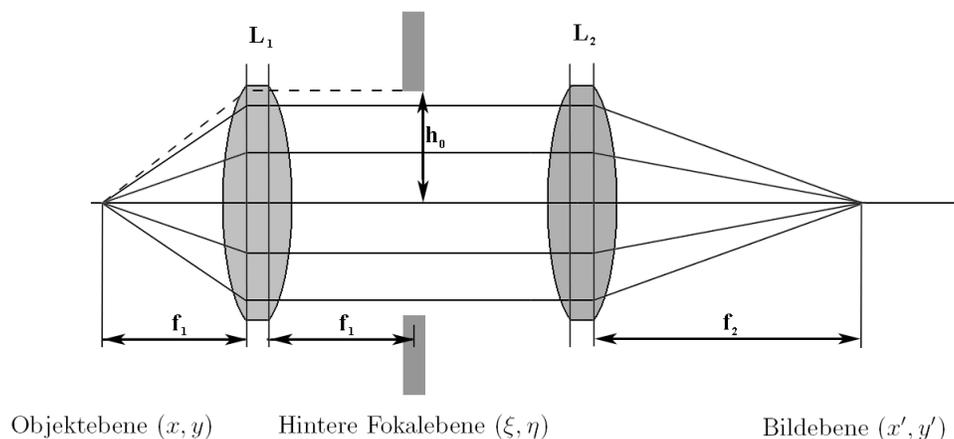


Abbildung 5.1: Prinzipieller Aufbau der Optik

Fokus f_1 der ersten Linse L_1 gebracht. Somit wird das Licht kollimiert und trifft auf die Mikrofokuslinse L_2 , die das Licht zu einem Fokus in der Brennebene f_2 fokussiert. Dieses optische System stellt ein lineares System dar, d.h. wenn ein Eingangssignal $F(x, y)$ mit einer Konstanten a multipliziert wird, wird ein Ausgangssignal $aU(x', y')$ erzeugt und aus einem Eingangssignal $aF_1(x', y') + bF_2(x', y')$ entsteht ein Ausgangssignal der Form $aU_1(x', y') + bU_2(x', y')$ wobei $F_{1,2}(x, y)$ als alleiniges Eingangssignal $U_{1,2}(x', y')$ als Ausgangssignal ergeben würde. Für solche Systeme existiert eine elegante Methode zur Bildberechnung: die Fouriersche Methode.

Dabei wird ausgenutzt, daß Licht, das durch eine Linse tritt, in der hinteren fokalen Ebene die Fouriertransformierte des Eingangssignals ergibt. Damit kann durch zweimaliges Fouriertransformieren das Bild in der $(x'y')$ -Ebene geschrieben werden als:

$$U(x', y') = C_1 C_2 \int_A dx dy F(x, y) J(x, y, x', y') \quad (5.9)$$

A ist der Bereich, den das Objekt ausfüllt, $F(x, y)$ ist für unseren Fall von kohärentem Licht die elektrische Feldstärke in der x - y Ebene und J ist die „point-spread-function“. Hat man also J berechnet, kann man durch obige Integration sofort von dem Objekt auf das Bild schließen. J ist durch folgende Gleichung gegeben:

$$J(x, y, x' y') = \int_B d\xi d\eta G(\xi, \eta) e^{i\frac{2\pi}{\lambda} \left[\frac{x}{f_1} + \frac{x'}{f_2} \right] \xi} e^{i\frac{2\pi}{\lambda} \left[\frac{y}{f_1} + \frac{y'}{f_2} \right] \eta} \quad (5.10)$$

Dabei ist $G(\xi, \eta)$ die Pupillenfunktion, die die Einschränkungen des optischen Systems z.B. durch Apertur darstellt. Für ein ideales System mit unendlich großen Linsen würde überall $G(\xi, \eta) = 1$ gelten, man hätte überhaupt keine Beugungserscheinungen und perfektes Auflösungsvermögen. Da in unserem Beispiel durchaus der eintretende Lichtstrahl durch die Pupillenfunktion abgeschnitten wird, müssen wir sie berücksichtigen. Wir können sie als ein Loch mit Radius h_0 darstellen. Dazu wählen wir Zylinderkoordinaten:

$$\xi = r \cos \phi \quad \eta = r \sin \phi \quad (5.11)$$

$$\frac{x}{f_1} + \frac{x'}{f_2} = \rho \cos \Phi \quad \frac{y}{f_1} + \frac{y'}{f_2} = \rho \sin \Phi \quad (5.12)$$

Da das Problem rotationsinvariant ist, können wir es für $\Phi = 0$ lösen. Damit ergibt sich die „point-spread-function“ zu:

$$J(\rho, \Phi = 0) = \int_0^{h_0} r dr \int_0^{2\pi} e^{i\frac{2\pi}{\lambda} r \rho \cos \phi} d\phi \quad (5.13)$$

Der Teil des Doppelintegrals, der die Variable ϕ betrifft, ist eine Besselfunktion 0-ter Ordnung $J_0(u)$, wobei u durch $\frac{2\pi}{\lambda} r \rho$ ausgedrückt wird. Die Besselfunktionen besitzen rekursive Eigenschaften d.h. speziell für die Besselfunktion 0-ter Ordnung gilt: $\int_0^u u' J_0(u') du' = u J_1(u)$, womit die „point-spread-function“ zu

$$J(\rho) = \frac{J_1\left(\frac{2\pi}{\lambda} h_0 \rho\right)}{\frac{2\pi}{\lambda} h_0 \rho} \quad (5.14)$$

wird.

Betrachtet man jetzt einen unendlich kleinen Punkt an der Stelle (x_0, y_0) als Objekt, können wir für unser System das Bild berechnen:

$$\begin{aligned} U(x', y') &= C_1 C_2 \int_A dx dy \delta(x - x_0) \delta(y - y_0) J(x, y, x', y') \\ &= C_1 C_2 \frac{J_1\left(\frac{2\pi}{\lambda} h_0 \rho'\right)}{\frac{2\pi}{\lambda} h_0 \rho'} \end{aligned} \quad (5.15)$$

wobei ρ' durch $\sqrt{(x_0/f_1 + x'_0/f_2)^2 + (y_0/f_1 + y'_0/f_2)^2}$ gegeben ist. Dies ist der Grund für den Namen „point-spread-function“. Durch Falten der δ -Funktion mit J erhält man das Bild, das ein einziger Punkt im Objekt erzeugen würde. Formel 5.15 ist ein analoger Ausdruck zu der bekannten Airy Formel, die das Auflösungsvermögen eines durch Beugung begrenzten Systems beschreibt. Nimmt man die Minima des Quadrats der durch 5.15 gegebenen Funktion und bestimmt das Auflösungsvermögen Δx durch den Radius des Airyscheibchens, kommt man zu:

$$\Delta x = \frac{1.22\lambda}{2NA} \quad (5.16)$$

Dabei ist NA die numerische Apertur von L_2 .

Für unseren Fall ist das Objekt aber durch eine Gaußverteilung $F(x, y) = C_3 e^{-a\sqrt{x^2+y^2}}$ gegeben. Dies führt zu folgendem Integral für das Bild:

$$U(x', y') = C_1 C_2 C_3 \int_A dx dy \frac{J_1\left(\frac{2\pi}{\lambda} h_0(\rho)\right)}{\frac{2\pi}{\lambda} h_0(\rho)} e^{-a\sqrt{x^2+y^2}} \quad (5.17)$$

Dieses Integral kann numerisch mit den Parametern unseres optischen Aufbaus gelöst werden: $NA_{\text{faser}} = 0.11$, $r_{\text{Modenfeld}} = 5.7\mu\text{m}$, $NA_{L_1} = 0.13$, $NA_{L_2} = 0.16$, $f_1 = 20\text{mm}$, $f_2 = 15\text{mm}$, wobei $h_0 = f_1 NA_{\text{Faser}}$ benutzt wurde und die Glasfaser als Bild angenommen wird. Dies stellt natürlich auch nur eine Näherung dar, da die Glasfaser an ihrem Ende keine so starke Beugung aufweist, wie z.B. ein mit kohärentem Licht beleuchtetes Loch. In Abbildung 5.2 ist die relative Intensität $I(x')/I(0)$ mit $I(x') = U(x')U^*(x')$ in der Ebene (x', y') entlang der x' -Achse aufgetragen. Für den Durchmesser des erhaltenen Bildes bei

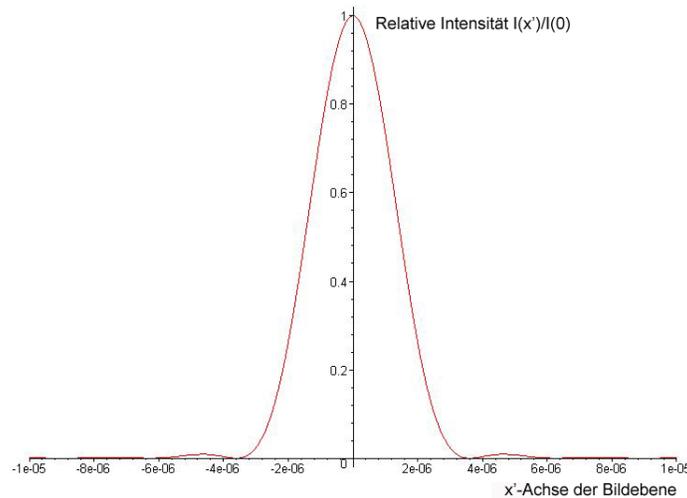


Abbildung 5.2: Relative Intensität des Fokussierten Spots

$I(x')/I(0) = 1/e^2$ ergeben sich $4,8\mu\text{m}$. Man erkennt auch, daß bei diesem Aufbau Beugung eine untergeordnete Rolle spielt, würde man sie völlig vernachlässigen (z.B. indem

man $G(\xi, \eta) = 1$ setzt), käme man zu der einfachen Abbildungsformel aus der Geometrischen Optik, für den Durchmesser des dann rein gaußförmigen Spots:

$$D_{\text{Spot}} = \frac{f_2}{f_1} D_{\text{Faser}} \quad (5.18)$$

Diese Formel würde für unser optisches System einen Spotdurchmesser von $4.3 \mu\text{m}$ liefern.

5.2.2 Beschreibung des Aufbaus

Abbildung 5.3 zeigt ein Bild des konstruierten AFM-Aufbaus. Die kleine Brennweite der fokussierenden Linse ($f_2 = 15 \text{ mm}$) erfordert es, den optischen Aufbau (in Abbildung 5.3 3)) nahe an die Blattfeder zu bringen. Deshalb ist die optische Einkopplung nicht über einen justierbaren Spiegel, sondern direkt. Durch große numerische Apertur weist der Strahl auch eine größere Divergenz auf, d.h er muss entweder nahe an der Fluidzelle oder mit einer größeren Photodiode detektiert werden. Es wurde daher auch für den reflektierten Strahl auf einen Spiegel verzichtet und die Photodiode direkt auf einem in x, y -Richtung verschiebbaren Tisch montiert. Die für den prinzipiellen Aufbau wie in Abb.4.1 gezeigten,

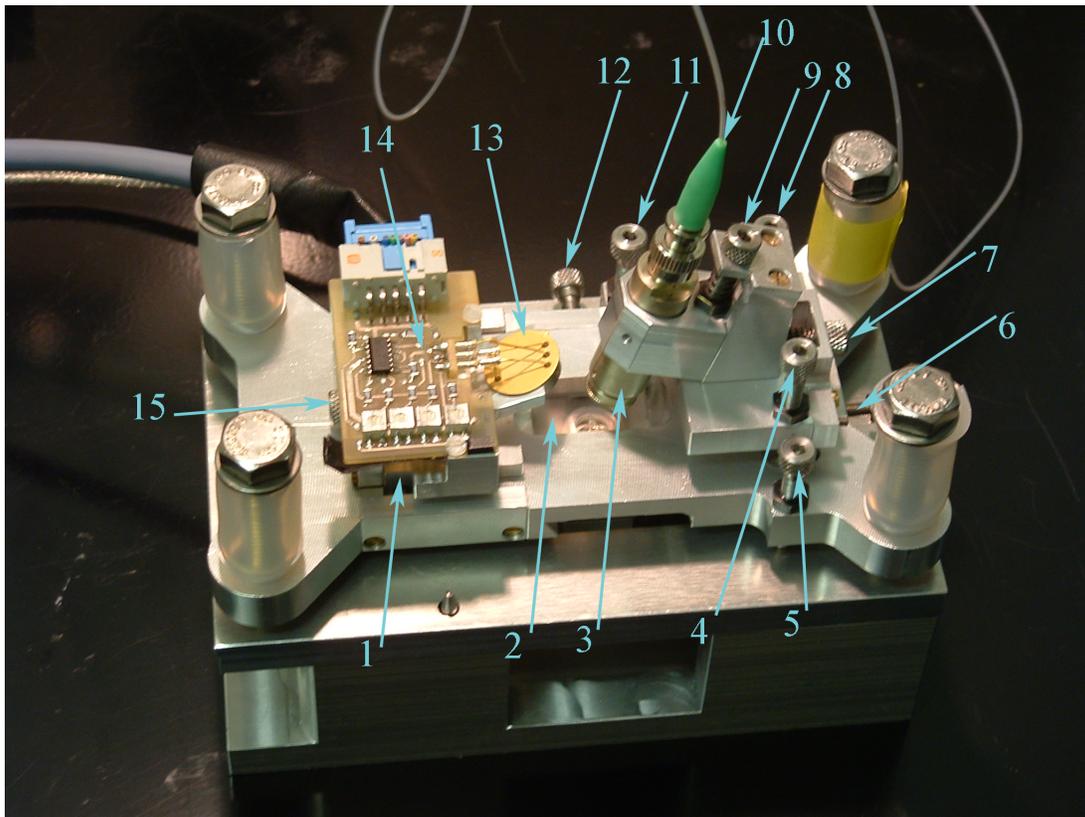


Abbildung 5.3: Aufbau des AFM-Kopfes für kleine Blattfedern. Erklärung zu den Zahlen im Text.

notwendigen Teile sind der Faserkollimator mit Mikrofokusoptik (**3**) (Fa. Schäfter + Kirchhoff, Hamburg, D), in die das Laserlicht über eine Glasfaser eingekoppelt wird (**10**). (**2**) steht für die Fluidzelle an der die Blattfeder befestigt ist. Die Oberfläche der Fluidzelle wurde so geschliffen, daß der einfallende Strahl senkrecht zu ihr auftrifft. In der Photodiode (**13**) (Fa. Laser2000, Wessling, D) wird der reflektierte Strahl detektiert. Um den Einfallswinkel des Strahls auf der Fluidzelle verstellen zu können, wurde der Kollimator (**3**) auf einem Dreibein mit den Schrauben (**4,8,11**) befestigt. Der Laserstrahl kann in x-Richtung mit Schraube (**7**) verschoben werden, die Fluidzelle in y-Richtung mit Schraube (**12**). Dies ermöglicht ein präzises Ausrichten des Fokuses auf die Blattfeder. Unabhängig von der Position des Spots kann er mit einer Schraube (**9**) fokussiert werden. Der Detektionsteil (Photodiode (**13**) mit anschliessendem Vorverstärker (**14**)) ist auf einem in x und y-Richtung verschiebbaren Tisch (**1**) gelagert. Dabei dient (**15**) zur Verstellung in x-Richtung, die Schraube für die Verstellung in y-Richtung ist durch den Vorverstärker verdeckt. Um den gesamten AFM-Kopf an die auf den Piezo befestigte Oberfläche anzunähern, ist er auf drei Schrauben gelagert (Sichtbar ist (**5**)). Schraube (**6**) dient zum Feststellen der Fluidzelle, wenn der Spot auf der Blattfeder fokussiert worden ist. Alle Schrauben sind leicht auswechselbare Feingewindeschrauben, der Aufbau des Verschiebetisches (**1**) ist an den handelsüblicher Verschiebetische angelehnt.

5.3 Test des Kraftmikroskops

5.3.1 Bestimmung des Spotdurchmessers

Mit dem konstruierten AFM steht ein Aufbau zur Verfügung, mit dem man die Größe des Spotfokuses messen kann. Der verwendete Piezotisch ist auch in x-Richtung verschiebbar. Legt man eine Blattfeder, deren Ausmaße bekannt sind, direkt auf den Piezo und schiebt sie in x-Richtung durch den fokussierten Strahl, so wird die Intensität an der Photodiode ansteigen, sobald der Fokus auf die reflektierende Blattfeder tritt. Dies ist schematisch in Abbildung 5.4 oben dargestellt. Die Auslenkung des Piezotisches relativ zum Spotfokus ist in fünf Abstände (a,b,c,d,e) unterteilt. Bei dem Abstand (b) befindet sich der Spot gerade zur Hälfte auf der Blattfeder. Ist der Fokusdurchmesser kleiner als die Breite der Blattfeder, so sollte eine, relativ zu kleinen Verschiebungen, konstante Intensität vorliegen, wenn der Fokus völlig auf der Blattfeder ist (c). Symmetrisch zum Anstieg wird die Intensität wieder abfallen, wenn der Spot die Blattfeder verläßt (d). Bei den Abständen (a) und (e) befindet sich der Spot nicht auf der Blattfeder, es wird kein Licht reflektiert. In Abbildung 5.4 unten ist die relative Intensität des reflektierten Strahls in Abhängigkeit von der Piezoposition für verschieden gut fokussierte Laserspots aufgetragen.

Bei der schwarzen Kurve befindet sich der Fokus in der Höhe der Blattfeder. Man erkennt das scharfe Ansteigen der Intensität bei der Piezoposition (b), wenn der Strahl auf die Blattfeder trifft. Die Intensität zwischen den Abständen $24\ \mu\text{m}$ und $48\ \mu\text{m}$ bleibt nahezu konstant. Beim Verlassen des Spots von der Blattfeder fällt die Intensität wieder ab (Abstand (d)). Die anders gefärbten Kurven entstanden durch verschiedenen stark

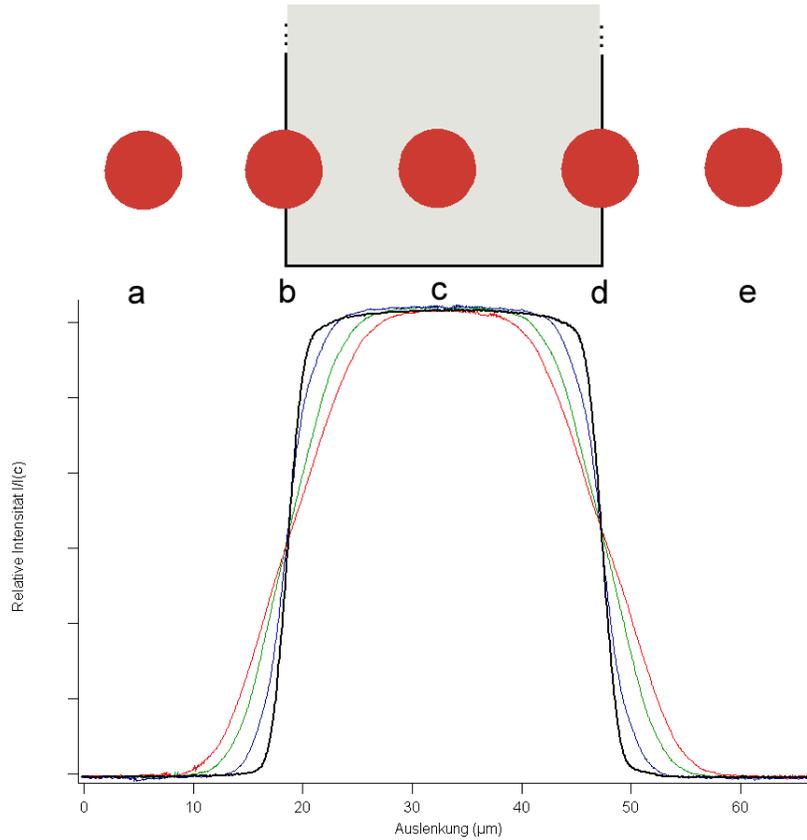


Abbildung 5.4: Intensität in Abhängigkeit der Leverposition

defokussierte Spots. Dabei ist der Spot der roten Kurve am stärksten defokussiert. Der Intensitätsanstieg beim Abstand (b) erscheint dadurch flacher. Beim kontinuierlichen fokussieren ist erkennbar, daß der Anstieg beim Abstand (b) wieder an Schärfe zunimmt. (Grüne und blaue Kurve). Beim ideal fokussierten Spot erhält man die schwarze Kurve. Bei der Intensität $I/I(0) = 0.5$ schneiden sich die Kurven in zwei Punkten (Im Abstand (b) und im Abstand (d)). Diese Punkte beschreiben gerade die Piezopositionen, bei der der Spot zur Hälfte auf der Blattfeder liegt. Der Abstand dieser Punkte beträgt $29 \mu\text{m}$, was der vom Hersteller angegebenen Breite der Blattfeder von $30 \mu\text{m}$ entspricht. Da die Feder zwischen den Grenzen b und d reflektiert, ist die an der Photodiode ankommende Intensität gegeben durch:

$$\frac{I(x')}{I(0)} = \int_b^d f(x + x') dx = F(d - x') - F(b - x') \quad (5.19)$$

x' ist dabei die relative Auslenkung des Fokusses von der Blattfeder und $f(x)$ ist die Intensitätsverteilung des fokussierten Spots in Höhe der Blattfeder. $F(x)$ ist die Stammfunktion von $f(x)$. Wenn die reflektierende Oberfläche der Blattfeder sehr groß im Vergleich zum Absinken der Intensitätsverteilung $f(x)$ ist und man nur den Bereich des Intensitätsan-

stieges, also Auslenkungen x' zwischen den Abständen (a) und (c) betrachtet, kann man $F(d-x') = \text{const}$ annehmen. Deswegen erhält man durch Differenzieren der gemessenen Intensität nach x' wieder die ursprüngliche Intensitätsverteilung des Fokuses. Abbildung 5.5 zeigt $dI(x')/dx'$ für die schwarze Kurve zwischen den Abständen (c) und (e) aus Abbildung 5.4. Der daraus bestimmte $1/e^2$ Durchmesser ergibt sich zu $4,7 \mu\text{m}$. Allerdings wurden die-

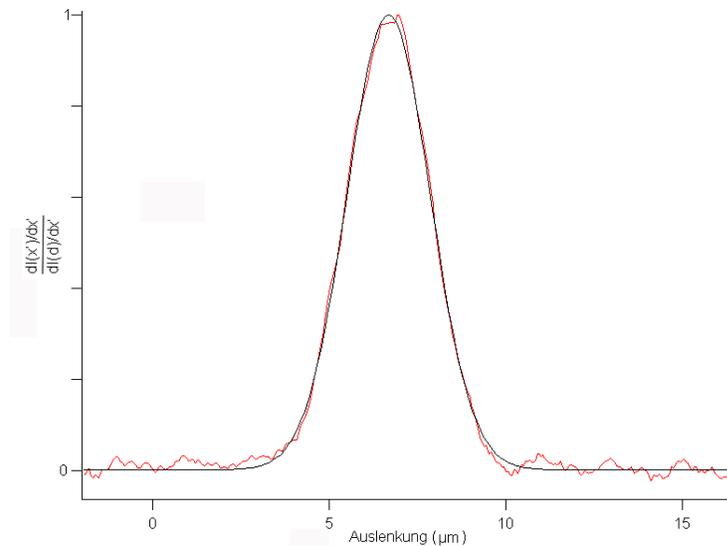


Abbildung 5.5: Differenzierte Intensität in Abhängigkeit der Leverposition

se Messungen nicht in wässriger Lösung und ohne Fluidzelle durchgeführt. Die Fluidzelle wurde so konstruiert, daß der Strahl senkrecht zur Plexiglasoberfläche ein- und austritt, bevor er auf die Blattfeder trifft, deswegen sollte der Fokus theoretisch keine Veränderung erfahren. Dennoch wird der tatsächliche Spotdurchmesser noch etwas größer als der hier gemessene sein.

Mit den theoretischen und experimentellen Ergebnissen kann man zusammenfassend sagen, daß für kleine Lever mit einer Breite von $5 \mu\text{m}$ der Großteil der Strahlung von der Blattfeder reflektiert werden wird. Mit dem in Kapitel 5.2.2 beschriebenen Kraftmikroskop steht also ein einfach zu bedienendes Instrument, das für Messungen mit kleinen Blattfedern geeignet ist, zur Verfügung. Ausserdem ist dieses Kraftmikroskop sehr flexibel, da man durch defokussieren des Spots auch noch mit herkömmlichen, breiteren Blattfedern messen kann.

5.3.2 Rauschspektren des konstruierten Kraftmikroskops

Mit dem in Abschnitt 5.2.2 beschriebenen Kraftmikroskop wurden Rauschspektren von verschiedenen Blattfedern aufgenommen. In die Rauschspektren geht neben dem thermischen Rauschen der Blattfeder auch sämtliches anderwertiges Rauschen ein, wie beispielsweise Rauschen, das durch die Elektronik des Kraftmikroskops erzeugt wird.

In Abbildung 5.6 a) ist schematisch der Aufbau der Prototypen-Blattfedern der Firma

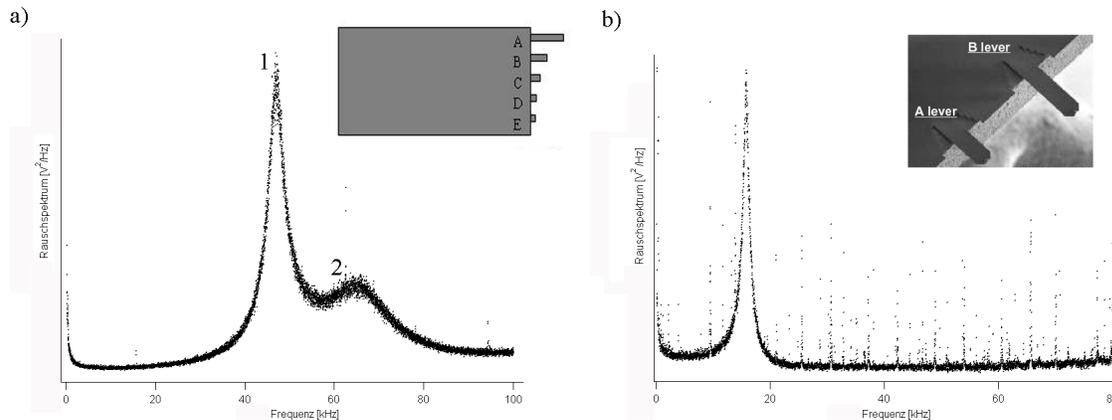


Abbildung 5.6: Rauschspektrum und Aufbau a) der Prototypblatfeder A b) des Olympus Biolevers Typ B. Die Grafik b) wurde von [59] übernommen

AsylumResearch (AsylumResearch, Santa Barbara, USA) gezeigt. Tabelle 5.1 listet die von AsylumResearch ermittelten Daten für die Resonanzfrequenz f_0 in Wasser und Luft und für die Federkonstanten k_c der jeweiligen Blatfeder auf. Die Ausmaße der Blatfedern sind in Breite * Länge angegeben.

Mit der, für kraftspektroskopische Messungen interessanten Blatfeder A, wurde ein Rauschspektrum an Luft aufgenommen. Dabei wurde das Kraftmikroskop noch nicht geeicht, weswegen das Rauschspektrum nur einen zur spektralen Dichte proportionalen Wert, mit den Einheiten V^2/Hz darstellt. Sie ist in Abbildung 5.6 a) gezeigt. Man erkennt deutlich die Resonanzfrequenz der Blatfeder A bei einer Frequenz von 47 kHz (Mit 1 gekennzeichnet). Dies liegt in dem von AsylumResearch angegebenen Bereich. Das thermische Rauschen der Blatfeder dominiert das Rauschspektrum, es ist aber ein weiterer Effekt im Rauschspektrum zu sehen (mit 2 gekennzeichnet). Dieser Effekt rührt von Eigenschwingungen des Vorverstärkers (in Abbildung 5.3 Nr. 14) her. Nimmt man ein Rauschspektrum mit ausgeschalteter Lichtquelle auf, so verschwindet das thermische Rauschen der Blatfeder, wohingegen das Rauschen der Elektronik bestehen bleibt. Dieser unerwünschte Effekt konnte durch einen neuen Vorverstärker der Firma Laser2000 (Fa. Laser2000, Wessling, D) eliminiert werden. Abbildung 5.6 b) zeigt ein Rauschspektrum, das mit diesem Vorverstärker aufgenommen wurde. Der unerwünschte Effekt elektronischen Rauschens ist nicht mehr zu sehen. Dieses Rauschspektrum wurde mit Olympus Blatfedern des Typs B die bei Asylum Research erhältlich sind, aufgenommen. (In Abbildung 5.6 b) gezeigt)

Man erkennt die Resonanzfrequenz der Blatfeder an Luft bei 15,6 kHz. Vom Hersteller wird eine Resonanzfrequenz von 13 kHz angegeben.

Dennoch sind in diesem Rauschspektrum weitere, scharfe Peaks zu sehen, die wiederum von der Elektronik herrühren, und eine Messung negativ beeinflussen würden.

Typ	Ausmaße [μm]	f_0 in Luft [kHz]	f_0 in Wasser [kHz]	k_c [pN/nm]
A	6*40	40-50	12,4	5-10
B	6*20	150 -180	49,5	30-60
C	6*15	330-400	132,4	220
D	6*10	600-680	290,4	970
E	5*6	950-1050	474,0	4600

Tabelle 5.1: Datenblatt für verschiedene Prototypen-Blattfedern

5.4 Zusammenfassung

Das in diesem Kapitel beschriebene, neu konstruierte Kraftmikroskop, für hochauflösende kraftspektroskopische Messungen, steht kurz vor der Fertigstellung. Es konnte gezeigt werden, daß das Kraftmikroskop einen Durchmesser des fokussierten Spots von ca. $5 \mu\text{m}$ produziert, womit es für Messungen mit Blattfedern, die ein verbessertes Signal zu Rauschverhalten liefern, geeignet ist.

Die Kraftkurven die in dieser Diplomarbeit gezeigt werden, konnten noch nicht mit diesem Kraftmikroskop aufgenommen werden. Es mussten daher andere Wege gefunden werden, die die Auflösung des am Lehrstuhl vorhandenen Kraftmikroskopes durch Mittelungsmethoden erhöhen. Diese Methoden werden in den Kapiteln 8.1 und 8.4 vorgestellt.

Kapitel 6

Ig8-Nkin-Konstrukt

6.1 Einleitung

Die zwei Motordomänen des *Neurospora Crassa* Kinesins (Nkinesin) werden durch eine coiled-coil Struktur dimerisiert. Da in Motoren mechanische Kräfte auftreten, ist die Frage nach den mechanischen Eigenschaften dieser coiled-coil Struktur von Bedeutung. In diesem Kapitel werden kraftspektroskopische Messungen beschrieben, die ein gezieltes Auftrennen dieser coiled-coil Struktur ermöglichen sollen. Dabei soll die Kraft zum Trennen der coiled-coil an ihrem N-Terminus angreifen, woran sich normalerweise im Nkinesin die Motordomänen anschließen. Für diese Experimente wurde ein spezielles Protein konstruiert.

6.2 Beschreibung des Ig8-Nkin-Proteins

In Abbildung 6.2 b) ist schematisch der strukturelle Aufbau konventionellen Kinesins dargestellt. Der in orange hervorgehobene Bereich wird als Kopfreion bezeichnet, dessen Struktur bereits durch Röntgenstrukturexperimente aufgeklärt wurde [28]. In Anschluss an Aminosäure 373 ist die durch den Lupasplot (vgl. Kapitel 2.4) vorhergesagte Scharnierstelle und der Rest des coiled-coil Schwanzes eingezeichnet. Die Kopfreion ist verantwortlich für das Binden an Mikrotubuli und für die Fortbewegung des Motors. Daher sind die mechanischen Eigenschaften der coiled-coil beginnend ab Aminosäure 342 von großem Interesse. Um diesen Teil der coiled-coil von Aminosäure 342 bis Aminosäure 485 kraftspektroskopisch untersuchen zu können, wurde er aus dem Kinesin entfernt und an ein bereits kraftspektroskopisch untersuchtes Protein angefügt.

Dieses konstruierte Protein ist in Abbildung 6.2 a) schematisch in seiner dimerisierten Form gezeigt. Die coiled-coil ist grün eingezeichnet, wobei der aus Abschnitt 2.4 vorhergesagte Scharnierbereich, zwischen den Aminosäuren 373 und 433, in grau angedeutet ist. Die Anbindung des Proteins an die Oberfläche und die Spitze der AFM-Feder geschieht unspezifisch. Daher ist es unwahrscheinlich, daß das N-terminale Ende einer α -Helix an die Unterlage bindet, während das N-Terminale Ende der gegenüberliegenden Helix an die Spitze bindet. Deshalb wurden an Aminosäure 342 der coiled-coil vier immunoglobulinar-

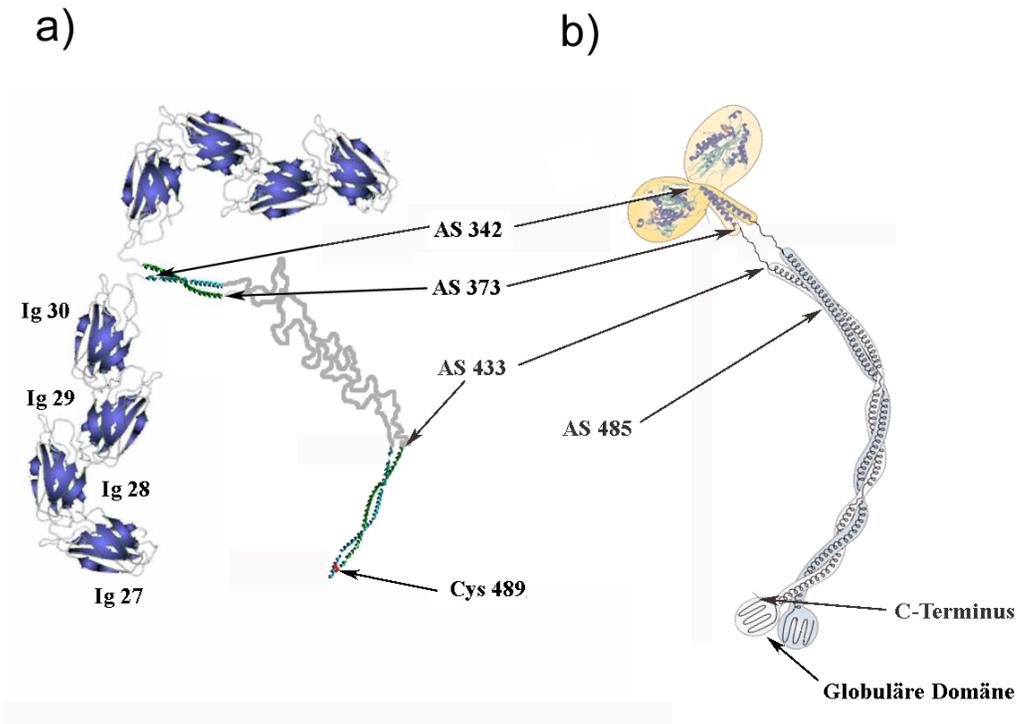


Abbildung 6.1: a) Schematische Darstellung des Ig8-Nkin-Konstruktes b) Schematische Darstellung des Nkinesins übernommen aus [13]

tige Proteindomänen (Titin Ig 27 - Ig 30) fusioniert. Sie dienen als Trägerproteine, um die Wahrscheinlichkeit für ein gezieltes Auftrennen der coiled-coil zu erhöhen.

Mit molekularbiologischen Methoden wurde ein Strang der coiled-coil mit vier angehängten Titinen exprimiert. Dies wurde von Günther Woehlke (Adolf Butenandt Institut D) durchgeführt. Die Aminosäuresequenzen der coiled-coil finden sich in Anhang A.3. An Aminosäure 485 des Stranges wurde die Sequenz LEACEG angefügt. Damit befindet sich das Cystein (C) an einer d-Position der Heptade. Dimerisieren zwei verschiedene coiled-coil Stränge miteinander, kann sich durch das eingefügte Cystein an Position 489 eine intermolekulare Disulfidbrücke zwischen den beiden Strängen bilden (rot markiert). Dadurch würden nach einem kraftspektroskopischen Öffnen der coiled-coil Struktur beide Stränge verbunden bleiben.

6.3 Messungen am Ig8-Nkin-Konstrukt

Mit dem in Abschnitt 6.2 beschriebenen Protein wurden insgesamt 20 verschiedene Experimente durchgeführt, wobei pro Experiment ca. 1500 Kraft-Abstands-Kurven gewonnen wurden. In Abbildung 6.2 ist eine typische Kraft-Abstands-Kurve aus diesen Experimenten dargestellt. Sie wurde mit einer Ziehgeschwindigkeit von $v_p = 230\text{nm/s}$ und 4000 Punkten/s aufgenommen. Man erkennt die in Abschnitt 4.4 erklärten, sägezahnartigen Muster

einzelner Domänenentfaltungen. Die blauen Kurven sind mit dem WLC-Modell berechnete Kraft-Abstands-Kurven (Formel 3.6). Es wurde dabei eine Persistenzlänge $A = 0.4$ nm gewählt, die jeweilige Konturlänge L wurde durch einen Fit bestimmt. Vor jeder blauen Kurve ist die jeweilige Konturlänge L , die sich aus dem Fit ergab, in nm angegeben. Die Konturlänge des ersten entropischen Kraftanstiegs wird mit L_1 bezeichnet. Die Konturlängenzuwächse ΔL liegen in dieser Kraftkurve zwischen 29 und 30 nm. Die Kraftkurve zeigt also das für Titin typische Sägezahnmuster auf. Die Titindomänen des Ig8-Nkin Konstruktes liegen somit in der korrekt gefalteten Form vor [46].

In der in Abbildung 6.2 gezeigten Kraft-Abstands-Kurve erkennt man vier Titindomänenent-

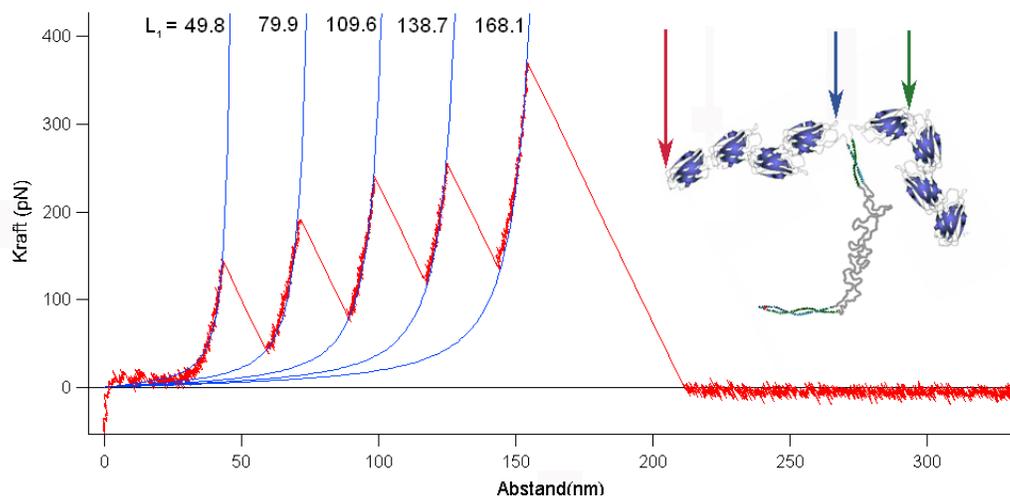


Abbildung 6.2: Typische Kraft-Abstands-Kurve des Ig8-Nkin-Konstruktes

faltungen. Zwischen Oberfläche und Blattfederspitze waren also mindestens vier Titine eingespannt. Dadurch läßt sich aber nicht sicher sagen, daß sich auch die coiled-coil Struktur zwischen Unterlage und Spitze befand. Beispielsweise könnte auch die coiled-coil Struktur an der Oberfläche binden (in Abbildung 6.2 durch den blauen Pfeil gekennzeichnet) und die Spitze an der äußeren Titin Domäne (roter Pfeil). Auch dann wären vier Titinentfaltungen in den Kraftkurven zu sehen. Erst wenn in den Kraftkurven mehr als vier Titinentfaltungen auftreten, kann man sicher sein, an den Trägerproteinen eines dimerisierten Konstruktes angebonden zu haben. Ein Beispiel für eine Anbindung der Oberfläche und der Spitze, bei dem fünf Titindomänenentfaltungen in den Kraftkurven auftreten könnten, ist in Abbildung 6.2 durch den roten und den grünen Pfeil dargestellt. Liegt das Konstrukt in der korrekt gefalteten Form vor, würde durch ein Entfernen der Spitze von der Oberfläche bei dieser Anbindung also die coiled-coil Struktur sicher entfaltet werden.

In allen Experimenten, die mit diesem Konstrukt gemacht wurden, wurden nur drei Einzelmolekülkraftkurven gefunden, die mehr als vier Titinentfaltungen aufweisen. Diese Kurven sind in Abbildung 6.3 a) gezeigt. Hat man in diesen Kraftkurven die coiled-coil Struktur entfaltet, so würde man einen reproduzierbar auftretenden Effekt, der durch das Auftren-

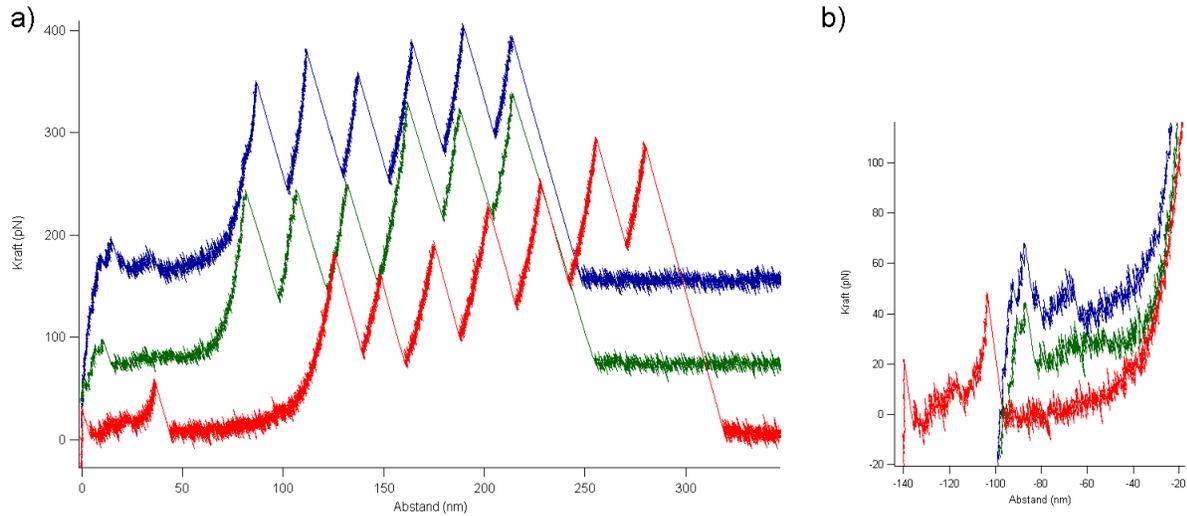


Abbildung 6.3: Kraft-Abstands-Kurven des Ig8-Nkin-Konstruktes mit mehr als vier Titinentfaltungseignissen

nen der coiled-coil verursacht wird, erwarten. Der eingefügte coiled-coil Teil umfasst 148 Aminosäuren. Bei einem Konturlängenzuwachs von 3.6 \AA pro Aminosäure und einer Persistenzlänge von 0.5 nm [43] würde man also ein Konturlängenzuwachseignis von ca. 107 nm erwarten. In keiner von allen gemessenen Kraftkurven war ein solches Entfaltungseignis bei hohen Kräften (im Bereich der Entfaltungskräfte des Titins) zu sehen. Aber auch im niedrigen Kraftbereich zwischen 0 und 20 pN am Anfang der Kraft-Abstands-Kurven konnte kein reproduzierbares Muster gefunden werden, das auf die coiled-coil schließen läßt.

In Abbildung 6.3 b) sind die vorderen Bereiche der Kraftkurven aus Abbildung 6.3 a) geglättet gezeigt. Sie wurden so angeordnet, daß die Konturlänge des ersten Kraftanstieges L_1 bei einem Abstand von 0 nm liegt. Dadurch sollten in dieser Darstellung Effekte, die relativ zur Konturlänge L_1 im gleichen Abstand auftreten sollten, bei allen drei Kurven senkrecht übereinander erscheinen. Man erkennt aber, daß die Kraftkurven kein reproduzierbares Muster zeigen. Auch in allen anderen Kurven, die zwar weniger als fünf Titinentfaltungen aber eine vergleichbar lange Konturlänge L_1 aufwiesen, wurde kein wiederkehrendes Muster gefunden.

6.4 Diskussion

Durch Anfitzen des WLC-Modells (Formel 3.6) mit einer Persistenzlänge $A = 0,5 \text{ nm}$ an den Kraftanstieg der ersten Titinentfaltung wurden die Konturlängen L_1 der Kraftkurven in Abbildung 6.3 bestimmt. Sie betragen:

96,2 nm für die blaue Kurve

91,4 nm für die grüne Kurve und

139.6 nm für die rote Kurve.

Die im Gegensatz zu der blauen und grünen Kurve höhere Konturlänge L_1 der roten Kurve, könnte durch ein bereits denaturiert vorliegendes Titin erklärt werden. Die Konturlängen L_1 der blauen und der grünen Kurve sind aber zu klein, um ein Konturlängenzuwachsergebnis von ca. 107 nm zu beinhalten. Ohne ein reproduzierbares Entfaltungsereignis der coiled-coil Struktur fehlt auch der Beweis, daß das Protein in seiner gewünschten Form dimerisiert hat.

Dieses konstruierte Protein ist also nicht geeignet, kraftspektroskopisch das Auftrennen einer coiled-coil Struktur zu beobachten.

Dies kann mehrere Gründe haben:

- Das Konstrukt lag nicht in der wie in Abbildung 6.1 a) gezeigten, korrekt dimerisierten Form vor. So wäre es möglich, daß die eingefügten Cysteine zwar in manchen wenigen Fällen die Trägerproteine dimerisiert haben, aber sich die coiled-coil Struktur trotzdem nicht in ihrem nativen Zustand befindet.
- Das Konstrukt lag in der korrekt dimerisierten Form vor, aber die coiled-coil Struktur ist zu lang. Dadurch könnten Wechselwirkungen mit der Oberfläche oder anderen Proteinen entstehen, die das Messen des Entfaltungsereignisses der coiled-coil beeinträchtigen.
- Das Konstrukt lag in der korrekt dimerisierten Form vor, aber die coiled-coil entfaltet im Gleichgewicht bei sehr kleinen Kräften, wobei die Anzahl an Kraftkurven mit mehr als vier Titinentfaltungen sehr gering ist. Für hochauflösende Messungen, also Messungen mit langsamen Ziehgeschwindigkeiten v_p verringert man nochmals die Anzahl der brauchbaren Kraftkurven.

Mit einem dem Ig8-NKin ähnlichen Konstrukt wurden bereits Experimente durchgeführt. [60]. In diesem Konstrukt wurde allerdings fast der gesamte Kinesinschwanz an vier Titine gebunden. Dabei wurde die gesamte Kinesin coiled-coil ab Aminosäure 342 und ohne globuläre Domäne (vgl. 6.1 b)) verwendet. Dies verringert die Wahrscheinlichkeit mit Oberfläche und Spitze an den Trägerproteinen anzubinden. Auch in diesen Experimenten wurden keine reproduzierbaren coiled-coil Entfaltungsmuster gefunden.

Um dennoch das gezielte Unzippen von coiled-coiled Strukturen kraftspektroskopisch untersuchen zu können, legen es die Ergebnisse dieses Kapitels nahe, ein verbessertes Protein zu konstruieren. Dabei sollte die coiled-coil Struktur möglichst kurz sein, um Wechselwirkungen mit der Oberfläche und anderen Proteinen zu vermeiden. Dennoch sollte die coiled-coil eine große freie Enthalpie ΔG zum denaturieren benötigen, d.h. die coiled-coil sollte große Stabilität aufweisen. Außerdem sollten die Titine die als Trägerproteine dienen durch andere Proteine ersetzt werden, die besser geeignet sind, Dimerisierung nachzuweisen. Im nächsten Kapitel wird ein Protein, das unter diesen Aspekten konstruiert wurde, vorgestellt und kraftspektroskopisch untersucht.

Kapitel 7

ddFLN(1-5)-p1Q-Konstrukt

7.1 Einleitung

An die coiled-coil Struktur eines Leucinezipfers wurden Trägerproteine angefügt. Mit diesem Konstrukt wurden kraftspektroskopische Untersuchungen durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, daß der eingefügte Leucinezipper Dimere ausbildet, die kovalent durch ein Cystein verbunden werden können. Mit Mittelungsmethoden wurde eine hochauflösende Charakterisierung des Faltungs- und Entfaltungsprozesses des Leucinezipfers gewonnen.

7.2 Beschreibung des ddFLN(1-5)-p1Q-Konstruktes

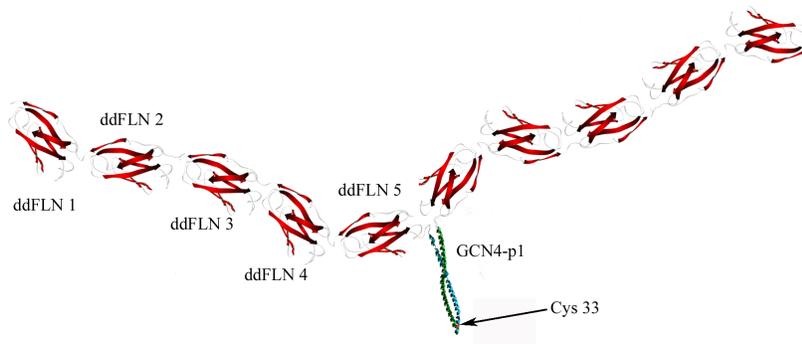


Abbildung 7.1: Schematische Darstellung des dimerisierten ddFLN(1-5)-p1Q Konstruktes

Abbildung 7.1 zeigt schematisch das konstruierte, als Dimer vorliegende Protein. In diesem Konstrukt wählte man anstelle des Titins aus Abschnitt 6 ein anderes modulares Protein, bestehend aus fünf immunoglobulinartigen Domänen des Dictyostelium discoideum Filamins (ddFLN(1-5)) als Trägerprotein. Dieses wurde bereits von Schwaiger et al. [43] kraftspektroskopisch untersucht. Anschließend an Domäne 5 des ddFLN(1-5) wurde der N-Terminale Anfang eines Leucinezipfers fusioniert. Es gibt bereits Circular Dichroismus

Experimente mit diesem p1Q-Leucinezipper [61]. Die aus 33 Aminosäuren bestehende Sequenz des Leucinezipper ist in Anhang A.3 wiedergegeben. Ursprünglich findet sich diese Leucinezippersequenz im Transkriptase-Aktivator der Hefe (GCN4), wobei an der Sequenz verschiedene Mutationen vorgenommen wurden. So wurden jeweils die Aminosäuren an f-Positionen des heptad repeats durch Glutamin (Q) ersetzt, wodurch die Stabilität der coiled-coil relativ zum Wildtyp erhöht wurde [61]. Die Aminosäure Arginin (R) an Stelle 33 des Leucinezipper wurde durch ein Cystein (C) ersetzt. Dadurch befindet sich das Cystein an einer d-Position der Heptade, was wiederum die kovalente Disulfidbindung zwischen zwei dimerisierten Strängen sicherstellt. Nach Aminosäure 33 befinden sich die Aminosäuren Glutaminsäure (E) und Glycin (G), um nicht den Zipper direkt mit dem Cystein abzuschließen, Leucin (L) und Glutaminsäure (E) von den Restriktionsschnittstellen der DNA und sechs Histidine, die für die Proteinreinigung benötigt werden. Dieses Protein wurde wie in Anhang A.1 beschrieben hergestellt.

7.3 Dimerisierung des ddFLN(1-5)-p1Q-Konstruktes

Das hier verwendete Trägerprotein ddFLN(1-5) ist schon kraftspektroskopisch von Schwai-ger et al. [43] untersucht worden. In Abbildung 7.2 a) ist eine Kraft-Abstands-Kurve, wie sie an ddFLN(1-5) gemessen wurde, gezeigt. Bis auf Domäne 4 entfalten alle Domänen in einem typischen Zwei-Zustands-Prozess. Der Konturlängenzuwachs durch eine entfaltende Domäne beträgt $31,5 \text{ nm} \pm 0,1 \text{ nm}$. Darüber hinaus zeigt ddFLN(1-5) eine deutliche Abweichung von einer Zwei-Zustandsentfaltung bei Domäne 4, sie ist in Abbildung 7.2 a) schwarz gekennzeichnet. Beim Entfalten dieser Domäne tritt ein stabiler Zwischenzustand auf, der in Kraftkurven erkennbar ist (auch schwarz hervorgehoben). Der Konturlängenzuwachs für diesen Zwischenzustand liegt zwischen 14 und 15 nm und die Entfaltungskraft auf den total entfalteten Zustand bei $52,5 \text{ pN} \pm 3 \text{ pN}$. Domäne 4 entfaltet vom gefalteten Zustand zum Zwischenzustand bei Kräften um 63 pN, was kleiner als die benötigten Entfaltungskräfte für die restlichen Domänen ist. Dieses sehr spezielle Entfaltungsmuster erlaubt es, Domäne 4 des ddFLN(1-5) eindeutig, anhand der Kraft-Abstands-Kurven zu identifizieren.

In Abbildung 7.2 b) ist eine typische Einzelmolekülkraftkurve des ddFLN(1-5)-p1Q Konstruktes dargestellt.

Man erkennt das Sägezahnartige Muster, das durch einzelne Domänenentfaltungen des ddFLN(1-5) entsteht. Die mit 1 und 2 gekennzeichneten Kraftanstiege kommen durch unspezifische Wechselwirkung der Spitze mit der Oberfläche oder durch weitere Proteine, die zusätzlich an die Feder gebunden haben, zustande. Sie lösen sich im Verlauf der Kurve (bei 40 nm) von der Spitze. Die blauen Kurven sind gefittete WLC-Kurven (Formel 3.6). Als Fitparameter wurde die Konturlänge bestimmt, die Persistenzlänge A wurde mit 0,5 nm konstant gelassen. Zwischen den Kurvenanstiegen ist der jeweilige Konturlängenzuwachs angeschrieben, der sich aus dem Fit ergab. Die Konturlängenzuwächse liegen bei den für ddFLN typischen 31,5 nm.

Dieses Konstrukt ist wegen des speziellen Entfaltungsmusters der Domäne 4 ein geeig-

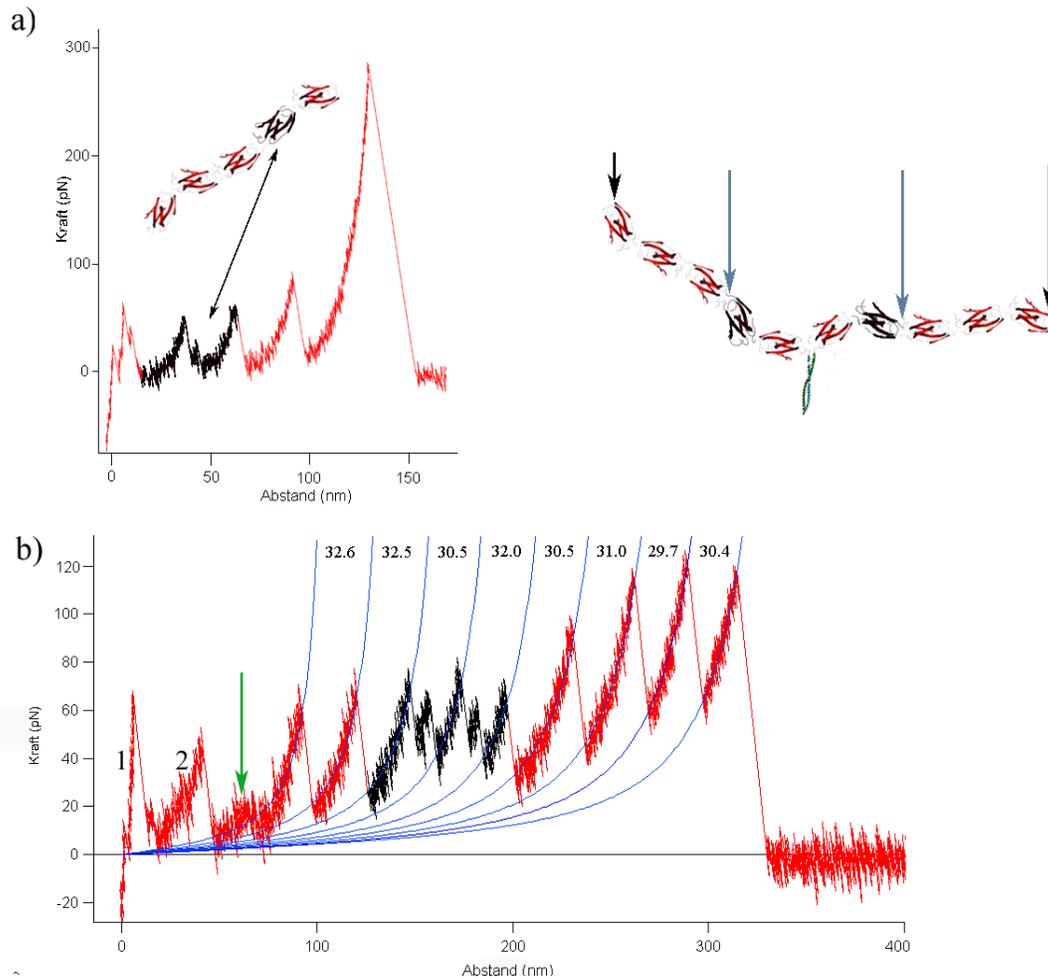


Abbildung 7.2: Kraft-Abstands-Kurven von: a) ddFLN(1-5) und b) ddFLN(1-5)-p1Q mit schwarz markiertem Kraft-Abstands-Verhalten der Domäne 4. Schematisch sind die jeweiligen Proteine gezeigt, Domäne 4 ist schwarz hervorgehoben.

neteres Protein, um Dimerisierung nachzuweisen, als das aus Abschnitt 6. Das Ig8-Nkin Konstrukt besteht aus vier Titindomänen, die in den Kraftkurven das selbe, ununterscheidbare Konturlängenzuwachereignis liefert. Anhand der Kraftkurven läßt sich also nicht entscheiden, welche der Domänen welches Entfaltungsereignis lieferte. Deshalb war man gezwungen, die Anzahl der Entfaltungen zu zählen, um auf Dimerisierung des Konstruktes schließen zu können (vgl. Kapitel 6.3).

Bei dem ddFLN(1-5)-p1Q Konstrukt kann die Entfaltung von Domäne 4 eindeutig festgestellt werden. Domäne 4, die nur eine Domäne von der eingefügten Leucinezippersequenz entfernt ist, kommt bei einem dimerisierten Protein auf beiden Seiten vor. Binden Oberfläche und Spitze beispielsweise an die in Abbildung 7.2 b) durch blaue Pfeile gekennzeichneten Stellen, so erhält man höchstens vier ddFLN(1-5) Entfaltungsereignisse in den

Kraftkurven. Allein anhand der Zahl der Entfaltungen läßt sich Dimerisierung nicht feststellen. Bei diesem Konstrukt kann aber, bei solcher Anbindung, das Entfaltungsereignis der Domäne 4 zwei Mal in den Kraftkurven auftreten. Deshalb kann man die Dimerisierung dennoch nachweisen.

Selbst wenn das Konstrukt an den äußersten ddFLN(1-5) Domänen angebunden war (in Abbildung 7.2 b) durch schwarze Pfeile gekennzeichnet), kann sich das Protein von der Spitze oder der Oberfläche lösen, bevor mehr als fünf ddFLN(1-5) Entfaltungen stattgefunden haben. Da aber Domäne 4 kleinere Entfaltungskräfte aufweist, als die restlichen ddFLN(1-5) Domänen, erscheint sie häufig am Anfang der Kraft-Abstands-Kurven. Auch aus diesen Gründen wird die Anzahl an nachweisbaren Dimeren im Gegensatz zum Ig8-Nkin-Konstrukt stark erhöht werden.

In allen von Schwaiger et al. [43] durchgeführten Einzelmolekülmessungen an ddFLN(1-5) wurde nie eine Kraftkurve gemessen, die zwei Domäne 4 Entfaltungen zeigte oder mehr als 5 ddFLN(1-5) Entfaltungsereignisse. Im Gegensatz dazu zeigt die Einzelmolekülkraftkurve in Abbildung 7.2 b) zwei Mal den Zwischenzustand der Domäne 4 (schwarz hervorgehoben). Insgesamt wurden in 26 Experimenten 52 Einzelmolekülkraftkurven aufgenommen, in denen zwei Domänen 4 identifiziert werden konnten. Dies stellt sicher, daß das Konstrukt in der dimerisierten Form vorliegt.

Ein ähnliches Verhalten wie die Kraftkurven am ddFLN-p1Q-Konstrukt zeigt ddFLN(1-6). DdFLN(1-6) ist fähig, über Domäne 6 Dimere auszubilden [62][63]. Diese Dimerverbindung zwischen zwei Domänen 6 ist bis mindestens 200 pN stabil. Bei kraftspektroskopischen Experimenten [43] tritt Domäne 4 zwei Mal in den Kraftkurven auf.

Wie in Kapitel 8 gezeigt werden wird, ist in diesen Kraftkurven auch das Entfalten der eingefügten Zippersequenz zu sehen (Grüner Pfeil in Abbildung 7.2 b)). Die Entfaltung tritt im niedrigen Kraftbereich auf, der Leucinezipper ist also bei den Entfaltungsereignissen des ddFLN(1-5) bereits im denaturierten Zustand. Deshalb ist sichergestellt, daß das an Stelle 33 des Leucinezippers eingefügte Cystein eine kovalente Bindung mit dem Cystein der zweiten α -Helix eingegangen hat. Da sich die Cysteine am C-Terminus des Zippers befinden, muß der Zipper also im nativen Zustand wie in Abbildung 7.2 a) schematisch gezeigt, in seiner parallelen, dimerisierten Form vorliegen.

7.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde gezeigt, daß sich, durch Anfügen einer Leucinezippersequenz an Proteine, diese dimerisieren lassen. Es ist zu erwarten, daß dies mit beliebigen Trägerproteinen möglich ist. Außerdem wurde gezeigt, daß sich die beiden α -Helizes des Leucinezippers kovalent, durch Einfügen eines Cysteins an einer d-Position der Heptade, verbinden lassen. Auch hier kann man erwarten, daß dies an beliebigen d- oder a- Positionen der α -Helix möglich ist. Dadurch ist ein sehr flexibles Werkzeug für die zukünftige Konstruktion von Proteinen gegeben.

Kapitel 8

Faltungen und Entfaltungsexperimente am Leucinezipper

Es konnte gezeigt werden, daß man mit kraftspektroskopischen Experimenten mit unspezifischer Anbindung dennoch in der Lage ist, Entfaltungen von einzelnen Domänen zu beobachten, indem man diese in ein bekanntes modulares Protein einfügt[43][64]. Dies ist auch hier geschehen. In Kapitel 7.3 wurde herausgearbeitet, daß das konstruierte Protein ddFLN(1-5)-p1Q in einer dimerisierten Form vorliegt. Um nachweisen zu können, daß der Leucinezipper auch in seiner korrekt gefalteten Form vorliegt, muß in den Kraft-Abstands-Kurven ein für ihn signifikantes Ereignis auftreten. In Abbildung 7.2 b) wurde auf dieses Ereignis bereits durch den grünen Pfeil aufmerksam gemacht. Dieses Ereignis wird im Folgenden genauer untersucht werden.

Abbildung 8.1 zeigt eine Überlagerung von drei Messkurven aus unterschiedlichen Experimenten, die mit Geschwindigkeiten zwischen $v_p = 200\text{nm/s}$ und $v_p = 400\text{nm/s}$ aufgenommen wurden. Zur besseren Übersicht wurden die Kurven geglättet. Zwischen den Abständen von 40 und 80 nm wurden alle drei Kurven schwarz gefärbt (2). Man erkennt die Abweichung vom berechneten WLC-Modell (in dunkelrot eingezeichnet mit $A = 0,6$ nm und $L_1 = 110$ nm), die von allen drei Kurven reproduziert wird. Im Abstand (3) erkennt man bei den einzelnen Kraftkurven jeweils ein Entfaltungsereignis einer ddFLN(1-5) Domäne, das in allen Kurven einen reproduzierbaren Konturlängenzuwachs liefert. Die Kraftanstiege der blauen Kurve (1) und der grünen Kurve (1) sind unspezifische Wechselwirkungen, die im weiteren Verlauf der Kurve von der Spitze oder der Oberfläche abfallen. Diese mit (1) gekennzeichneten, unspezifischen Wechselwirkungen fallen häufig erst bei größeren Abständen ab, wenn der Leucinezipper schon im entfalteten Zustand ist. Dadurch ist das Entfaltungsereignis nicht mehr zu beobachten. Außerdem ist die Kraftabweichung des Ereignisses vom rein entropischen Verhalten von Polypeptiden sehr klein. Aus diesen Gründen wurde in den folgenden Kapiteln eine Meßmethode angewandt, die unspezifische Wechselwirkungen verringert und durch Mittelungsmethoden in der Lage ist, die Auflösung zu erhöhen. Mit dieser Meßmethode wurde das Faltungs- und Entfaltungsverhalten des Leucinezippers studiert. Sie wird im Folgenden beschrieben.

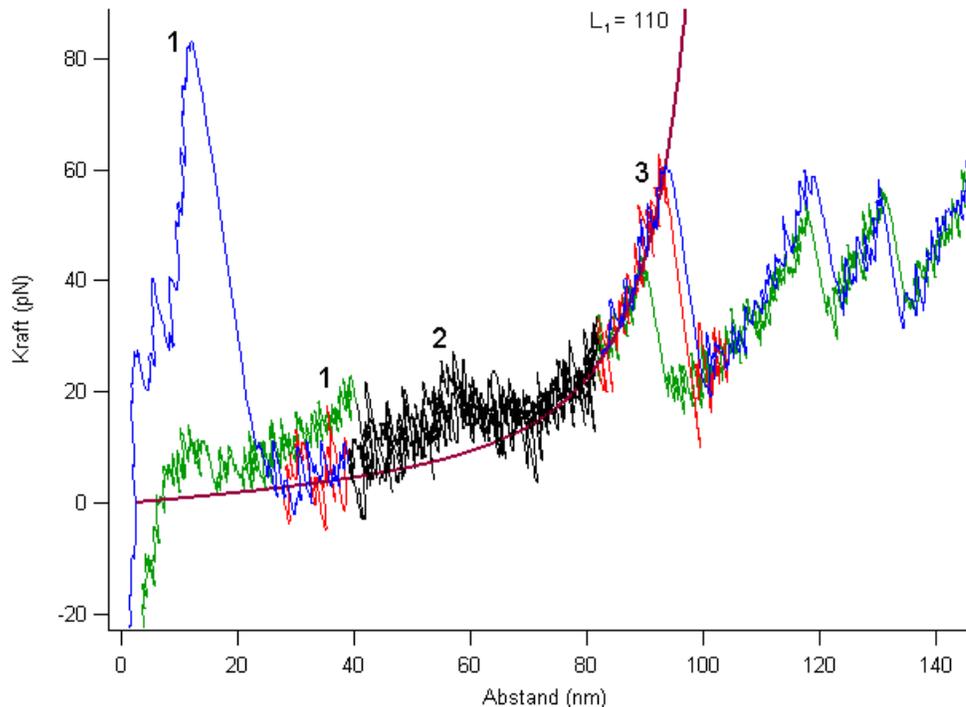


Abbildung 8.1: Überlagerung verschiedener ddFLN(1-5)-p1Q Kraft-Abstands-Kurven

8.1 Messungen mit kleinen Geschwindigkeiten

Aus Formel 5.8 ist ersichtlich, daß ein Erhöhen der Bandbreite der Messung, die minimal auflösbare Kraft erhöht. Die Datenerfassungselektronik des benutzten Kraftmikroskops kann eine maximale Samplingrate von 20000 Punkten pro Sekunde durchführen. Durch das Nyquist Theorem [65] ist dann die maximale Bandbreite der Messung mit 10000 Hz gegeben. Alle folgenden Kraftkurven wurden mit einer Bandbreite von 10000 Hz aufgezeichnet. Entfernt man zusätzlich die Blattfeder nur langsam von der Oberfläche ($v_p \approx 150\text{nm/s}$), so erhält man ca. 130 Punkte pro nm. Man kann also von jeweils ca. 30 Punkten den Mittelwert bilden und erhöht dadurch die Auflösung.

Um neben dem verbesserten Signal zu Rauschverhältnis dieser Meßmethode auch die unerwünschten, unspezifischen Wechselwirkungen zu verringern, nutzt man aus, daß man mit dem Piezotisch in der Lage ist den Abstand der Oberfläche von der Blattfeder gezielt zu steuern. In Abbildung 8.2 c) ist die Auslenkung des Piezotisches mit der Zeit aufgetragen. Zuvor wurde die Oberfläche an die Blattfeder angenähert. Der Ort, an dem die Blattfeder mit der Oberfläche in Kontakt tritt und ausgelenkt wird, legt den Nullpunkt des Abstandes der Feder von der Substratunterlage fest. Zur Zeit $t = 5\text{ s}$ befindet sich die Spitze auf der Oberfläche, wobei der Piezotisch um weitere -100 nm verfahren wurde. Die Oberfläche wird bis zum Punkt 1 mit einer konstanten Geschwindigkeit verfahren. Am Punkt 1 ist die

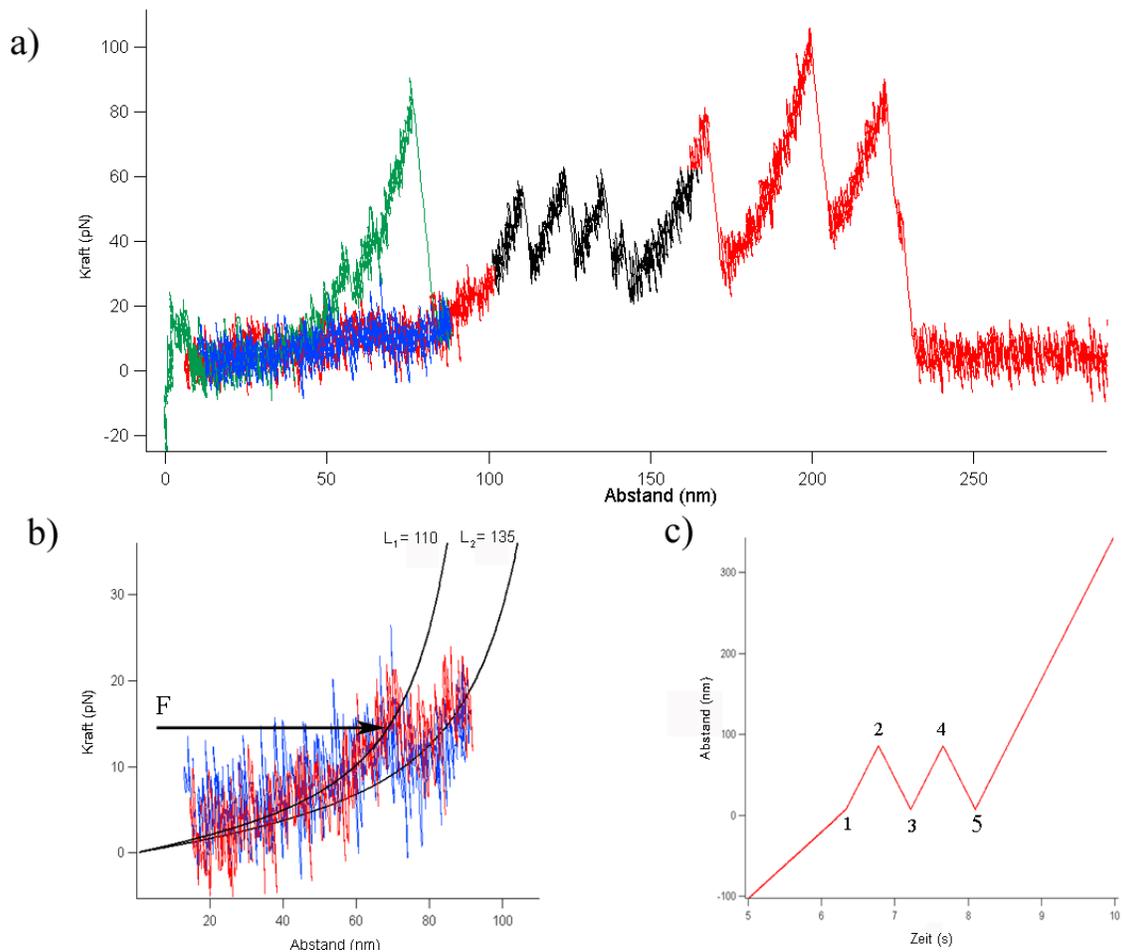


Abbildung 8.2: Hin und Rückfahrkurven bei niedriger Geschwindigkeit

Blattfeder nicht mehr ausgelenkt, sie ist 15 nm von der Oberfläche entfernt. Der Piezotisch bewegt sich nun bis zum Punkt 2 in positiver Richtung (d.h. von der Blattfeder weg). Die Geschwindigkeit v_p hierfür ist durch die Steigung der Geraden zwischen den Punkten 1 und 2 gegeben. Hier beträgt sie 178 nm/s. In Abbildung 8.2 a) ist in grün die Kraftabstandskurve gezeigt, die sich aus dieser Piezoverschiebung ergab. Ein Molekül hat zwischen Spitze und Oberfläche angebunden, der grüne Kraftanstieg rührt aber von einem zusätzlich angebundenen, unspezifischen Protein her und würde, wenn man den Piezo weiter in positiver Richtung über den Punkt 2 hinaus bewegen würde, das Entfalten des Leucinezippers „überdecken“. Die unspezifische Wechselwirkung löst sich bei einem Abstand von ca. 70 nm. Am Punkt 2 bei einem Abstand von 90 nm wird die Bewegungsrichtung des Piezotisches geändert, er wird mit $v_r = -v_p$ wieder an die Blattfeder angenähert. Dabei entsteht in Abbildung 8.2 a) die blaue Kraftabstandskurve. Da die Bewegungsrichtung des Piezotisches negativ ist, werden diese Kurven im folgenden als Rückwärtskurven bezeichnet. Wiederrum bei einem Abstand der Blattfeder von 15 nm von der harten Substratunterlage

(Punkt 3), wird der selbe Vorgang wiederholt (Punkte 4 und 5) In Abbildung 8.2 b) ist die dabei entstandene Vorwärtskurve in rot und die Rückwärtskurve in blau eingezeichnet. Nach dem Punkt 5 wird der Piezotisch bis zu einem Abstand von 500 nm in positiver Richtung bewegt. Dadurch erhält man in Abbildung 8.2 a) das bekannte Sägezahnartige Kraftmuster (in rot eingezeichnet). Man erkennt dabei die Entfaltungsmuster beider Domänen 4 des ddFLN-p1Q-Dimers (in schwarz hervorgehoben) und weitere drei ddFLN Entfaltungen.

8.2 Konturlängenzuwachs des Leucinezippers

Mit der in Kapitel 8.1 beschriebenen Methode wurden 39 Vorwärts- und Rückwärtskurven aufgenommen. In Abbildung 8.2 b) folgt die blaue Rückwärtskurve im Rahmen der Auflösung dem Kraftverlauf der roten Vorwärtskurve. Es ist keine Hysterese zu erkennen. Um den Konturlängenzuwachs zu bestimmen, wurde an 31 Vorwärts- und Rückwärtskurven das WLC-Modell (Formel 3.6) wie in Abbildung 8.2 b) angefitet. Die Persistenzlänge wurde mit $A = 0,6$ nm konstant gelassen, die jeweilige Konturlänge L als Fitparameter gewählt. In Abbildung 8.3 ist die Anzahl der erhaltenen Konturlängenzuwächse ΔL_{cc} eingetragen. Der berechnete Mittelwert aus allen Kurven $1/N \sum_{n=0}^N F_n$ liegt bei 26,7 nm, das

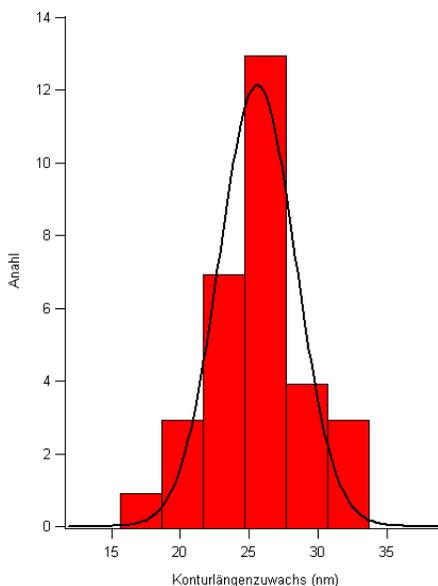


Abbildung 8.3: Histogramm der gefitteten Konturlängenzuwächse

Maximum einer angefiteten Gaußverteilung bei 25,4 nm. Mit derselben Fitmethode und einer Persistenzlänge von $A = 0,6$ nm wurden auch die Konturlängenzuwächse ΔL_{ddFLN} von 51 ddFLN(1-5) Entfaltungen ermittelt. Es ergab sich ein Mittelwert des Konturlängenzuwachses von 31,5 nm. Da ddFLN(1-5) Domänen aus 100 Aminosäuren bestehen, erhält man auch bei einer Persistenzlänge von $A = 0,6$ nm, einen Umrechnungsfaktor von 0,36 nm/AS

[43]. Somit entspricht das neue Konturlängenzuwachereignis ΔL_{cc} einer Anzahl von ca. 70 Aminosäuren. Aus dem Lupasplot aus Abschnitt 2.4 ergeben sich 35 Aminosäuren pro α -Helix des verwendeten p1Q-Leucinezipers, die in einer coiled-coil Struktur vorliegen. Dies steht in sehr guter Übereinstimmung mit dem erhaltenen Konturlängenzuwachs ΔL_{cc} . Das durch das Anfügen des Leucinezipers an ddFLN(1-5) Domänen neu entstandene Ereignis in den Kraftkurven entsteht also durch das Entfalten von ca. 70 Aminosäuren. Daher muß der Leucinezipper im nativen Zustand in seiner korrekt gefalteten Struktur (wie in Abbildung 7.1 schematisch gezeigt) vorliegen.

Das in Abbildung 8.3 gezeigte Histogramm beinhaltet einen Fehler, der bei der Bestim-

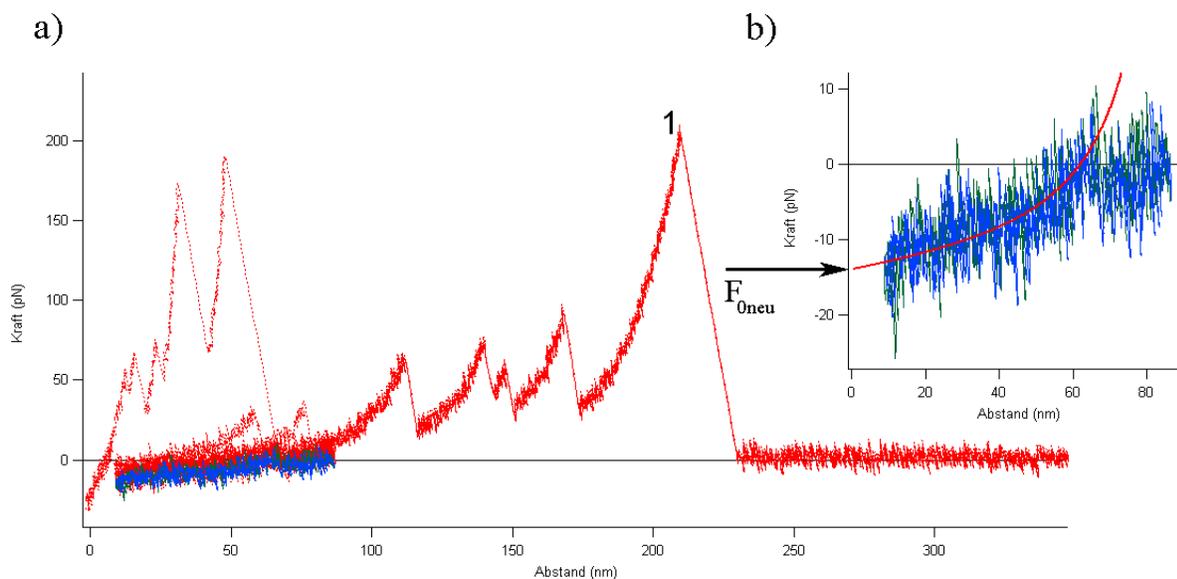


Abbildung 8.4: Kraft-Abstands-Kurve mit Leverdrift

mung der Konturlängen durch den Fit entsteht. Der erste Anstieg in Abbildung 8.2 b) (mit $L_1 = 110$ nm) geht nur bis Kräfte um 13 pN, weswegen bei einem Fit vor allem der lineare Kraftbereich von Bedeutung ist. Daher hängt die aus dem Fit gewonnene Konturlänge stark von der Wahl des Kraftnullpunktes ab. Auch die Konturlängenzuwächse hängen von der Wahl des Kraftnullpunktes ab. Verschiebt man den Kraftnullpunkt zum negativen, so werden die Konturlängen beider Kraftanstiege kleiner. Da aber der lineare Bereich nur in den Fit des ersten Anstiegs eingeht, wird der Konturlängenzuwachs ΔL_{cc} größer. Dieser Effekt hängt auch von der jeweiligen Kraftkurve ab: wenn der unzipping Vorgang durch Leverdrift schlechter aufgelöst erscheint, kann der Konturlängenzuwachs im Nanometerbereich variieren, wenn man den Kraftnullpunkt im pN Bereich verändert. Im bestmöglichen Fall bei einer gut aufgelösten Kurve bleibt der Konturlängenzuwachs konstant über einen Bereich von 6 pN Nullpunktverschiebung.

Eine objektive Bestimmung des Kraftnullpunktes erfolgt normalerweise durch Festlegen des Kraftnullpunktes am Ende der Kraft-Abstands-Kurven, wenn kein Molekül mehr zwischen Feder und Unterlage eingespannt ist. Dies ist in Abbildung 8.4 a) gezeigt. Am Punkt 1 löst

sich das Molekül von der Spitze oder der Unterlage, die Blattfeder ist frei in der Lösung. Die Kraftnullpunktlinie wird durch die unabhängig von der Piezoposition konstante Kraft der Feder festgelegt.

Mit der in Kapitel 8.1 beschriebenen Meßmethode ist diese Art der Kraftnullpunktsbestimmung aber zu ungenau. Die Vorwärts- und Rückwärtskurven des ersten Zyklus sind in Abbildung 8.4 a) in grün und blau eingezeichnet. Es ist deutlich zu erkennen, daß die bestimmte Nullpunktskraft relativ zu den ersten Zyklen, zu höheren Kräften verschoben erscheint (In Abbildung 8.4 b) vergrößert dargestellt). Der beschränkende Faktor der Nullpunktbestimmung ist durch Lever- und Unterlagendrift gegeben. Da die Geschwindigkeit v_p , mit der die Blattfeder von der Oberfläche entfernt wird, sehr langsam ist, vergrößert sich der Fehler der Kraftnullpunktsbestimmung im Gegensatz zu Messungen mit höheren Geschwindigkeiten.

Diese Kraftnullpunktsbestimmung liefert für manche Kurven Kraftnullpunkte, mit denen die Fitroutine nicht mehr angewandt werden kann. Deshalb wurde der Kraftnullpunkt am Anfang der Kraft- Abstands-Kurven bestimmt (in Abbildung 8.4 b) durch F_{0neu} gekennzeichnet). Der Abstand der Umkehrpunkte (in Abbildung 8.2 c) 1, 3 und 5) von der Oberfläche ist bekannt. Damit kann man durch Anpassen der Kraftkurve an eine berechnete WLC-Funktion mit $A = 0,6$ nm, auf den Kraftnullpunkt schließen.

In Kapitel 8.5 wird eine weitere, vom Kraftnullpunkt weniger stark abhängende Methode zum Messen des Konturlängenzuwachses vorgestellt, die zu den hier gewonnenen Konturlängenzuwachsen konsistente Werte liefert.

8.3 Entfaltungskraft des Leucinezippers

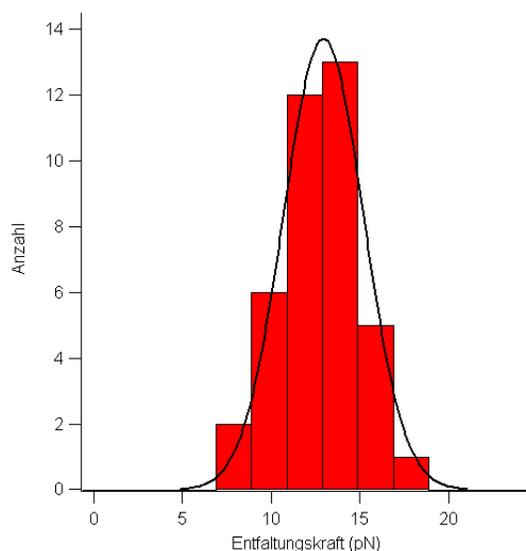


Abbildung 8.5: Kraftverteilung der Entfaltungskräfte des p1Q-Leucinezippers.

Aus 39, mit der in Kapitel 8.1 erklärten Meßmethode aufgenommenen Vorwärts- und Rückwärtskurven, wurde die in Abbildung 8.2 b) durch F gekennzeichnete Entfaltungskraft des Leucinezipers gemessen, bei der die Kraftkurve beginnt, vom WLC-Anstieg der Konturlänge L_1 abzuweichen. Der Kraftnullpunkt F_{0neu} der jeweiligen Kraft-Abstands-Kurve wurde wie in Kapitel 8.2 erklärt, in der Nähe der Oberfläche bestimmt.

In Abbildung 8.5 ist die sich aus dieser Art der Nullpunktsbestimmung ergebende Verteilung der Entfaltungskräfte gezeigt. Eine angefittete Gaußkurve hat ihr Maximum bei 12,9 pN, der Mittelwert der Kräfte liegt bei 13,3 pN. Die Verteilung der Kräfte folgt dem Gaußprofil. Der Leucinezipper beginnt sich also bei Kräften von ca. 13 pN zu öffnen.

8.4 Messungen mit hohen Geschwindigkeiten

Mit der in Abschnitt 8.1 vorgestellten Meßmethode war man in der Lage, durch Glätten einzelner Kraftkurven eine erhöhte Auflösung zu erzielen. Dazu mußte aber die Ziehgeschwindigkeit v_p klein gewählt werden. In diesem Kapitel wird eine Meßmethode beschrieben, mit der man das Entfaltungsereignis des Leucinezipers bei hohen Ziehgeschwindigkeiten v_p beobachten kann. Dafür wird das selbe Messverfahren, das bereits in Kapitel 8.1 vorgestellt wurde, verwendet.

In Abbildung 8.6 c) ist die Piezoposition in Abhängigkeit der Zeit aufgezeichnet. Der Nullpunkt des Abstandes ist wieder durch den ersten Kontakt der Blattfeder mit der Oberfläche definiert. Im Gegensatz zu der Meßmethode aus Kapitel 8.1 sind die Geschwindigkeiten v_p und $v_r = -v_p$, mit denen der Piezo bewegt wird, höher. In der in Abbildung 8.6 gezeigten Kurve beträgt $v_p = 700$ nm/s, in weiteren Experimenten wurden Kraftkurven mit Geschwindigkeiten v_p bis zu 1000 nm/s aufgezeichnet. Da der Piezo mit höherem v_p bewegt wird, ist man in der Lage mehrere Zyklen aufzunehmen, bevor sich das Molekül von der Spitze oder der Unterlage löst. In dem in Abbildung 8.6 gezeigten Experiment wurden 17 Zyklen zwischen den Abständen $a_1 = 15$ nm und $a_2 = 85$ nm aufgenommen.

Bei einer Samplingrate von 20000 Punkten/s erhält man pro Nanometer ca. 20 Punkte. In den einzelnen Vorwärts- oder Rückwärtskurven ist deshalb meist das Entfaltungsereignis des Leucinezipers nicht mehr aufzulösen. Man kann aber aus allen an dem selben Molekül aufgenommenen Vorwärts- und Rückwärtskurven, gemittelte Vorwärts- und Rückwärtskurven bilden. Dazu wurde die Abstandsachse zwischen den Umkehrpunkten (in Abbildung 8.6 c) durch a_1 und a_2 gekennzeichnet) in Bereiche von 0.1 nm Breite unterteilt. Die Punkte der verschiedenen Vorwärtskurven, die in den selben Abstandsbereich fielen, wurden addiert und durch Ihre Anzahl geteilt. Genauso wurde mit den verschiedenen Rückwärtskurven verfahren. Für jeden Abstandsbereich erhält man also einen Mittelwert, aus allen aufgenommenen Vorwärts- bzw. Rückwärtskurven. Über den gesamten Zyklusabstand erhält man zwei Kurven, die in Abb. 8.6 b) vergrößert dargestellt sind. Die gemittelte Vorwärtskurve ist dabei rot, die gemittelte Rückwärtskurve blau eingezeichnet. Zusätzlich sind mit dem WLC-Modell berechnete Kraft-Abstands-Kurven mit einer Konturlängendifferenz von 25 nm eingezeichnet.

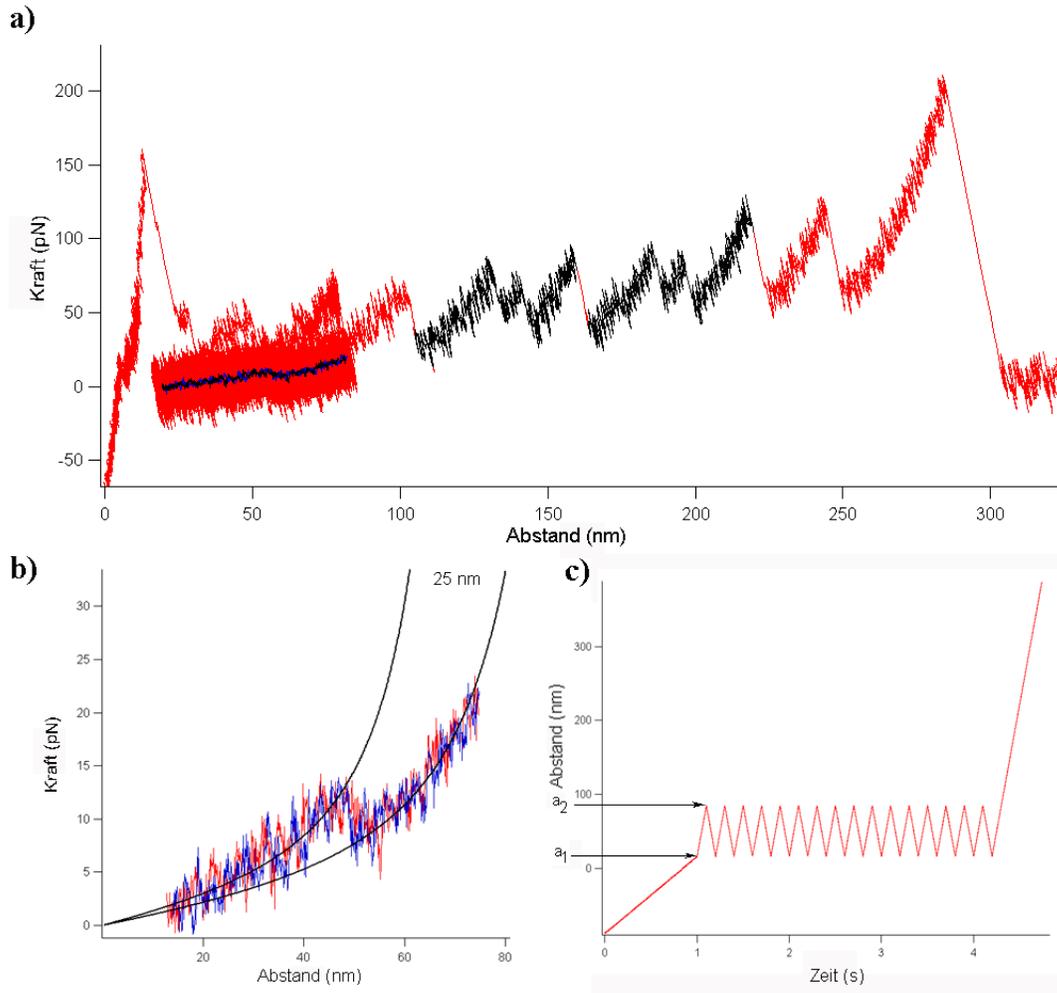


Abbildung 8.6: a) Beispielhafte Kraft-Abstands-Kurve mit vielen Zyklen. b) Aus den Zyklen gemittelte Vorwärtskurve (rot) und Rückwärtskurve (blau). c) Auslenkung des Piezotisches in Abhängigkeit der Zeit

Auch bei Geschwindigkeiten bis zu $v_p = 1000$ nm/s konnte keine Hysterese zwischen den Kurven aufgelöst werden. Die gemittelte Rückwärtskurve folgt dem Kraftverlauf der gemittelten Vorwärtskurve. Das Falten bzw. Entfalten des Leucinezippers ist auch bei hohen Geschwindigkeiten im thermodynamischen Gleichgewicht. Die Energie, die zum Entfalten aufgebracht werden muß, wird beim Falten des Zippers vollständig zurückgewonnen.

In Abbildung 8.6 a) ist die gesamte Kraft-Abstands-Kurve aufgezeichnet, bei der die Piezoposition wie in 8.6 c) variiert wurde. Durch das vollständige Entfernen der Oberfläche von der Blattfeder nach dem letzten Zyklus erhält man die typischen ddFLN(1-5)-Entfaltungsmuster. Die beiden Entfaltungen der Domäne 4 sind wieder schwarz gekennzeichnet.

8.5 Konturlängenzuwachs bei bestimmter Kraft

Versucht man das WLC-Modell an die mit der Meßmethode aus Kapitel 8.4 gemittelten Vorwärts- und Rückwärtskurven anzufitten, so führt eine geringe Verschiebung des Kraftnullpunktes (ca. 1 pN) zu großen Änderungen in den Konturlängen und Konturlängenzuwächsen (ca. 8 nm). Dies wird durch die kleinere Rauschamplitude der Kurven bedingt. Dadurch würde mit dem in Kapitel 8.1 benutzten Fitverfahren die Breite der Verteilung der Konturlängenzuwächse sehr groß werden.

Es gibt aber eine andere Länge in den Kraft-Abstands-Kurven, die ohne Fit bestimmt werden kann.

In Abb. 8.7 ist eine gemittelte Vorwärtskurve wie die in Abb. 8.6 b) rot eingezeichnete, ge-

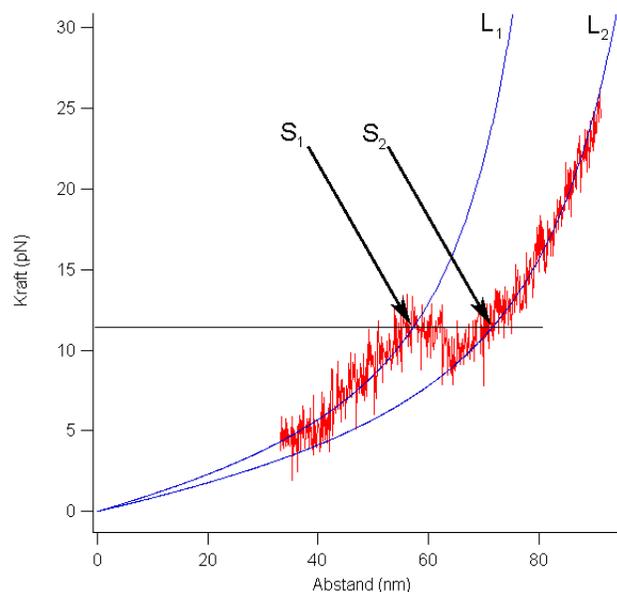


Abbildung 8.7: Aus 19 Zyklen gemittelte Kraft-Abstands-Kurve

zeigt. Der Punkt S_1 , bei dem der erste Kraftanstieg vom WLC-Verhalten mit Konturlänge L_1 abzuweichen beginnt, ist auch ohne gefittete Kurven gut zu bestimmen. Der Schnittpunkt der Geraden bei konstanter Kraft durch diesen Punkt mit dem zweiten Kraftanstieg mit Konturlänge L_2 ist wiederum leicht zu messen. Dadurch erhält man einen verlässlichen Wert des Konturlängenzuwachses bei einer bestimmten Kraft. In Abb. 8.8 ist ein Histogramm mit 69 gemessenen Abständen $S_2 - S_1$ aufgezeichnet. Dazu wurden auch 47 Kurven verwendet, die mit der Meßmethode aus Kapitel 8.1 aufgenommen wurden. Die restlichen 22 $S_2 - S_1$ -Abstände wurden aus Kraftkurven mit schnellen Ziehgeschwindigkeiten v_p gewonnen. Der Mittelwert aller Konturlängendifferenzen $S_2 - S_1$ beträgt 16,1

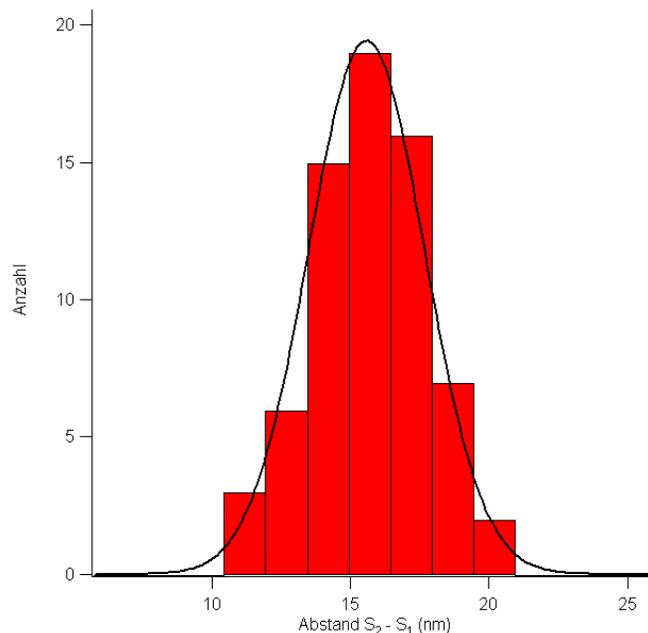


Abbildung 8.8: Histogramm der Kontrulängendifferenzen $S_2 - S_1$

nm, eine angefittete Gaußverteilung hat ihr Maximum bei 15,5 nm. Bei berechneten WLC-Kraftkurven mit einer Persistenzlänge von $A = 0,6$ nm muß man einen Kontrulängenzuwachs von $\Delta L = 26$ nm wählen, um bei einer Kraft von 13 pN einen Abstand $S_2 - S_1$ von 15,5 nm zu erhalten. Auch diese Methode der Kontrulängenzuwachsbestimmung hängt von der Wahl des Kraftnullpunktes ab, da der Abstand $S_2 - S_1$ von der Höhe der Kraft bei der die Schnittgerade gewählt wird, abhängt. Der Kontrulängenzuwachs von 26 nm ist konsistent mit dem in Abschnitt 8.2 bestimmten Kontrulängenzuwachs von ca. 26 nm.

8.6 Zusammenfassung

In Abbildung 8.9 a) und b) sind vier charakteristische Vorwärts- und Rückwärtskurven, aus Experimenten mit verschiedenen Geschwindigkeiten, eingezeichnet. In Abbildung 8.9 a) ist in blauer Farbe eine Vorwärtskurve markiert, die mit der in Abschnitt 8.1 erklärten Meßmethode, mit einer Geschwindigkeit von $v_p = 180$ nm/s, aufgenommen wurde. Die gesamte Meßkurve ist verkleinert darüber dargestellt. Die grüne Kraftkurve wurde mit der in Abschnitt 8.4 erklärten Methode bei einer Geschwindigkeit von $v_p = 890$ nm/s gemessen. Die gesamte Meßkurve ist verkleinert in Abbildung 8.9 b) eingezeichnet. Die schwarzen Kurven sind berechnete WLC-Kraftkurven mit Kontrulängen $L_1 = 100$ nm und $L_2 = 125$ nm. Beide Kurven weisen denselben charakteristischen Kraftverlauf auf. In Abbildung 8.9 b) wurde dasselbe für die Rückfahrkurven der beiden Messungen gemacht. Auch hier zeigen beide Rückwärtskurven das selbe Kraft-Abstands-Verhalten. Im Rahmen der

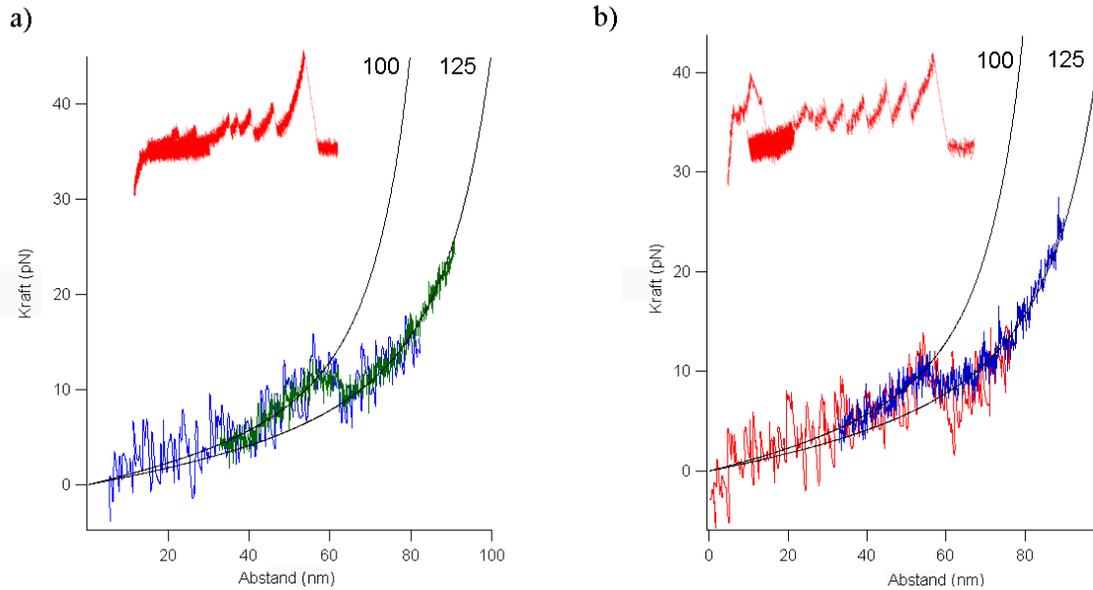


Abbildung 8.9: Überlagerung von Vorwärts- und Rückwärtskurven mit verschiedenen Geschwindigkeiten.

Auflösung beider Messungen ist keine Hysterese zwischen den Vorwärts- und Rückwärtskurven verschiedener Geschwindigkeiten zu erkennen, d.h. die Faltung und Entfaltung des Leucinezipers findet im thermischen Gleichgewicht statt. Die Entfaltung des Leucinezipers ist also ein reversibler Prozess, die Arbeit, die zum Entfalten aufgewendet werden muß, wird beim Falten des Leucinezipers geleistet.

Die Geschwindigkeit mit denen die Oberfläche bewegt wurde, konnte in verschiedenen Experimenten zwischen $100 \text{ nm/s} \leq v_p \leq 1000 \text{ nm/s}$ variiert werden, wobei keine Änderung im Kraftkurvenverlauf auftrat. Der Leucinezipper beginnt sich bei einer Kraft von 13 pN zu entfalten, der durch ihn erzeugte Konturlängenzuwachs ΔL beträgt, bei einer Persistenzlänge von $A = 0,6 \text{ nm}$, 26 nm.

Kapitel 9

Kooperatives Falten des Leucinezippers

Das Falten des Leucinezippers erfolgt kooperativ, d.h. die coiled-coil Struktur muß erst eine Energiebarriere, gegeben durch den Keimbildungsschritt, überwinden, bevor sie in ihre native Struktur falten kann. In diesem Kapitel wird das theoretische Modell aus Kapitel 3.4 mit den bereits vorgestellten Kraft-Abstands-Kurven verglichen, die daraus erhaltenen Parameter werden diskutiert.

9.1 Einleitung

Die Kraft-Abstands-Kurven am ddFLN-p1Q Konstrukt zeigen eine grundsätzliche Abweichung von Kraft-Abstands-Kurven, die durch ein Überstrecken der Myosin coiled-coil gewonnen werden (vgl. Kapitel 4.4). Dort wird zur theoretischen Beschreibung das Zwei-Zustands Modell angewandt, wobei die Übergänge aller Teilelemente der Kette dieselben Gleichgewichtskonstanten tragen. Dadurch erhält man eine monoton steigende Kraft-Abstands-Kurve. Beim Unzippen des Leucinezippers ist die Kraft-Abstands-Kurve nicht monoton steigend. Es gibt einen Bereich, in dem die Kraft trotz größer werdenden Abstandes abnimmt. Dieser Bereich kann nicht mehr durch die in Kapitel 3.3 erklärte Monte-Carlo Simulation beschrieben werden. Bockelmann et al. [42] haben ein theoretisches Modell vorgestellt, das mit einer numerischen Berechnung der Zustandssumme (Formel 3.26) Kraft-Abstands-Kurven liefert. Dadurch konnten experimentelle Kraft-Abstands-Kurven, die durch Unzippen komplementärer DNA-Stränge mit dem Kraftmikroskop entstanden, erklärt werden [66]. Diese theoretische Beschreibung kann auch auf das Falten und Entfalten von coiled-coil Strukturen angewandt werden (siehe Kapitel 3.4).

In den nächsten Kapiteln werden theoretische Kraft-Abstands-Kurven aus diesem Modell mit experimentell gemessenen Kraft-Abstands-Kurven verglichen und die dazu benutzten Parameter diskutiert.

9.2 Parameter der berechneten Kraft-Abstands-Kurven

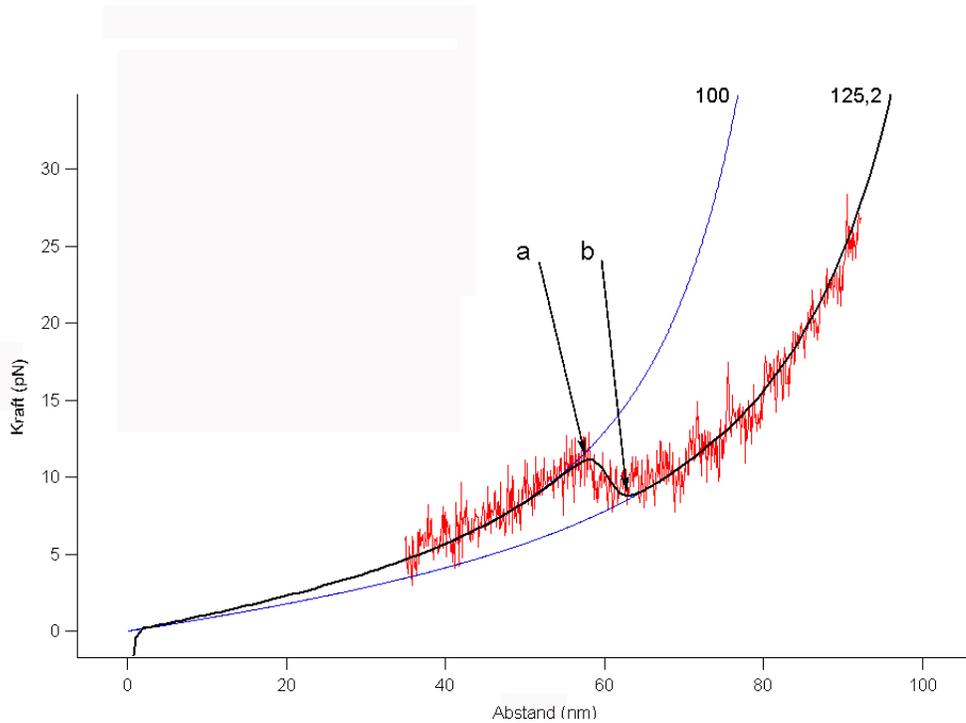


Abbildung 9.1: Gemittelte Rückwärtskurve und theoretisch berechnete Kraft-Abstands-Kurve

Abbildung 9.1 zeigt in schwarz eine Kraft-Abstands-Kurve, die wie in Kapitel 3.5 beschrieben, numerisch berechnet wurde. Dazu wurde die mittlere Kraft $\langle F(x_0) \rangle$ für verschiedene Piezopositionen x_0 , in 1 nm Schritten, berechnet. Für die Parameter zur numerischen Berechnung wurden folgende Werte benutzt:

$$L_{zu} = 100 \text{ nm}, A = 0,6 \text{ nm}, k_c = 8,0 \text{ pN/nm}, N = 35$$

Der Parameter L_{zu} erklärt sich aus den, in den Abschnitten 8.1 und 8.4 benutzten, Meßmethoden. Dort liegt meist eine ddFLN(1-5) Domäne im denaturierten Zustand vor, weswegen man für die Konturlänge des ersten Kraftanstieges L_1 Werte um 100 nm erhält.

Die Persistenzlänge $A = 0,6 \text{ nm}$ wurde auch in Kapitel 8.2 für die Fitroutine zur Konturlängenbestimmung verwendet, und ergab mit dem WLC-Modell berechnete Kraft-Abstands-Kurven, die die experimentellen Kurven gut reproduzierten.

Die gesamte Anzahl der Aminosäurepaare N des gefalteten p1Q-Leucinezippers ist ca. 35. (vgl. Kapitel 8.2)

Für unterschiedliche Federkonstanten erhält man zwar unterschiedliche Kraft-Piezopositions-Kurven $F(x_0)$, aber gleiche Kraft-Abstands-Kurven $F(z)$. Sie ist daher ein Parameter, der keinen Einfluss auf die Form der Kraft-Abstands-Kurven nimmt.

Zur Berechnung der schwarzen Kraft-Abstands-Kurve in Abbildung 9.1 wurden für die Energien E_j folgende Werte benutzt:

$$\Delta E_j = 1,42k_B T \quad \text{für } 1 \leq j \leq 34 \quad \text{und} \quad \Delta E_{35} = -28,43k_B T \quad (9.1)$$

Die Energien E_j zur numerischen Berechnung der Kraft-Abstands-Kurven sind nicht eindeutig festgelegt. Man kann beispielsweise die Aminosäurepaare zu größeren Untergruppen zusammenfassen, und diesen bestimmte Entfaltungsenergien E_{jg} zuordnen. Damit erhält man mit verschiedenen Energielandschaften die gleiche Kraft-Abstands-Kurve. Dies wird in Kapitel 9.3 genauer diskutiert.

Die blauen Kurven in Abbildung 9.1 sind mit dem WLC-Modell berechnete Kraft-Abstands-Kurven mit einer Persistenzlänge von 0,6 nm und Konturlängen von 100 nm und 125,2 nm. Für kleine Kräfte ($F < 10$ pN) und große Kräfte ($F > 15$ pN) reproduziert die schwarze Kraftkurve in Abbildung 9.1 das Kraftverhalten des WLC-Modelles. Bei kleinen Kräften am Molekül sind Zustände mit geöffneten Aminosäurepaaren sehr unwahrscheinlich. Deswegen geht hauptsächlich die Energie der Feder und die entropische Energie des Aminosäurerückgrads mit Konturlänge $L(j = 0)$ in die Berechnung der mittleren Kraft (Formel 3.26) ein. Dasselbe gilt für große Kräfte. Dort werden Zustände mit geschlossenen Aminosäurepaaren unwahrscheinlich besetzt sein, $\langle F(x_0) \rangle$ folgt dem WLC-Verhalten mit Konturlänge $L(j = 35)$.

Die in Abbildung 9.1 rot gezeichnete Kurve ist eine aus 19 Zyklen gemittelte Rückwärtskurve, die mit einer Geschwindigkeit von $v_p = 890$ nm/s aufgenommen wurde. Sie folgt dem theoretischen Verlauf der Kraft-Abstands-Kurve sehr gut.

9.3 Mögliche Energielandschaften

In Abbildung 9.2 a) ist die für die Berechnung der Formel 3.26 verwendete Energielandschaft mit den benützten Energien 9.1 gezeigt. In x-Richtung ist die Anzahl der geöffneten Aminosäurepaare gezeichnet. Mit dem Umrechnungsfaktor 0,72 nm/AS ist dies äquivalent zu dem jeweiligen Konturlängenzuwachs durch den Leucinezipper. Bei $j = 0$ liegt der Zipper in seiner gefalteten Form vor, der Konturlängenzuwachs durch den Zipper ist dadurch auch 0. Bei $j = 35$ ist der Zipper völlig entfaltet, der Konturlängenzuwachs durch den Zipper beträgt $\Delta L = 25,2$ nm. Für die in 9.1 gewählten Werte gilt $\Delta E_{35} = -M\Delta E_j$ mit $M = 20$. Erst wenn 20 Aminosäurepaare im nativen Zustand vorliegen, ergibt sich für den Leucinezipper ein Energiegewinn durch Falten weiterer Aminosäuren. Mit dieser Energielandschaft muß sich also erst ein Keim aus 20 Aminosäuren bilden, bevor die Struktur völlig falten kann.

Um die Struktur völlig zu entfalten muss eine Arbeit von

$$\Delta E = \sum_{j=0}^{N=35} E_j \quad (9.2)$$

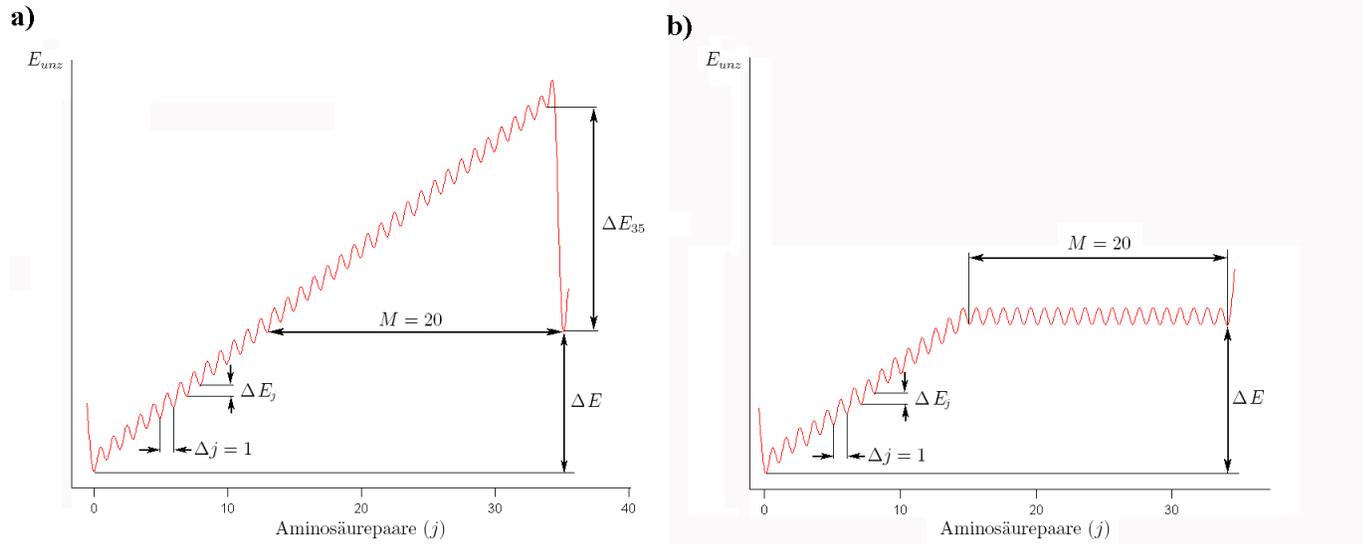


Abbildung 9.2: Schematische Darstellung der Energielandschaft in Abhängigkeit aufgetrennter Aminosäurepaare j

aufgebracht werden.

Mit dieser Energielandschaft erklärt sich der Anstieg der Kraft in Abbildung 9.1 zwischen den Punkten a und b. Da der Zipper zum Falten erst die Energie ΔE_{35} überwinden muß, liegt er solange im denaturierten Zustand vor, bis sich ein Keim aus 20 Aminosäuren bilden kann. Dies wird umso wahrscheinlicher, je näher die Blattfeder der Oberfläche kommt. Der Zipper faltet sich, weswegen eine höhere Kraft bei kleinerer Konturlänge entsteht. Daraus resultiert der Kraftanstieg zwischen den Punkten a und b.

Um aus Formel 3.26 das in Abbildung 9.1 gezeigte Kraft-Abstandsverhalten zu erhalten, kann man auch andere Energielandschaften, als die in Abbildung 9.2 a) gezeigte, benutzen. So könnte man z.B. für die ersten 15 Aminosäuren $\Delta E_{j=1..15} = \Delta E/15$ wählen und für die letzten 20 Aminosäuren $\Delta E_{j=16..35} = 0$. Diese Energielandschaft ist in Abbildung 9.2 b) gezeigt. Auf diese Weise könnte man beliebig viele Energielandschaften konstruieren, indem man die Aminosäurepaare zu Gruppen beliebiger Größe zusammenschließt, deren Entfaltung man eine bestimmte Energie ΔE_{jg} zuordnet. Dennoch ergeben aber alle diese Energielandschaften, wenn sie die in Abbildung 9.1 gezeigte Kraft-Abstands-Kurve liefern, die gleiche Schlussfolgerung. Immer muß ein Keimbildungsschritt von 20 Aminosäuren überwunden werden, bis der Leucinezipper durch weiteres Falten Energie gewinnen kann und immer ist die, zum völligen Entfalten benötigte, Arbeit durch ΔE gegeben.

9.4 Diskussion

- Die Keimbildung, die in die theoretische Berechnung der Kraft-Abstands-Kurven einging, kann auf molekularer Ebene veranschaulicht werden:
 Von Zimm und Bragg [41] wurde vermutet, daß die Keimbildungsschwierigkeit zum

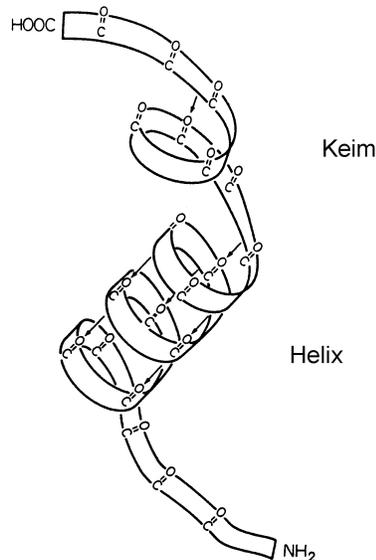


Abbildung 9.3: Schematische Darstellung einer α -Helix mit Keim. Übernommen aus [67]

Bilden einer α -Helix hauptsächlich durch das Einfrieren der frei drehbaren Bindungswinkel dreier Aminosäuren erklärt werden kann. In Abbildung 9.3 unten, ist schematisch eine α -Helix mit drei Windungen gezeigt. Dabei bildet jede Peptid NH-Gruppe einer Aminosäure eine Wasserstoffbrückenbindung mit den Peptid-CO-Gruppen des drittnächsten Restes (mit Pfeilen zu den C=O Gruppen gekennzeichnet). Liegt bereits eine α -Helix vor, so wird beim Hinzufalten einer neuen Aminosäure (Wachstumsschritt) an die Helix die Bindungsenthalpie einer Wasserstoffbrückenbindung gewonnen, wohingegen zwei frei drehbare Bindungen einer Aminosäure eingefroren werden müssen, also die Energie $T\Delta S$ aufgebracht werden muß. Bei der Keimbildung, also wenn das gesamte Protein noch im denaturierten Zustand vorliegt, gewinnt das System nur die Bindungsenthalpie einer Wasserstoffbrückenbindung, muß aber die Freiheitsgrade von drei Aminosäuren einschränken (In Abbildung 9.3 oben gezeigt). Für die Keimbildung muß also die dreifache Energie $3T\Delta S$ im Gegensatz zum Wachstumsschritt aufgebracht werden. Diese Veranschaulichung vernachlässigt sämtliche weiteren Wechselwirkungen, beispielsweise der Aminosäurereste. Bei einem coiled-coil Keimbildungsschritt könnte man in diesem Bild annehmen, daß beide Stränge einen Keim ausbilden müssen, damit die coiled-coil in ihre native Struktur falten kann. Dieses Bild wird durch computergestützte Berechnungen von Vieth et al [68]

gestützt.

- Die, aus den in Abbildung 9.2 gezeigten Energielandschaften, gewonnene Keimgröße M besteht aus 20 Aminosäuren. Damit wäre in diesem Bild für einen Leucinezipper, der nur aus 20 Aminosäuren bestünde, $\Delta G = 0$ und der entfaltete Zustand würde energetisch mit dem gefalteten auf gleicher Höhe liegen. Dies ist in guter Übereinstimmung mit synthetischen coiled-coil Mutantenmessungen verschiedener Länge [69]. In diesen Experimenten ist ein sprunghafter Anstieg des Helix Gehaltes bei coiled-coils ab einer Länge zwischen 19 und 23 Aminosäuren zu erkennen. Die Änderung der berechneten Kraft-Abstands-Kurven (Abbildung 9.1) die durch eine Änderung der Keimgröße hervorgerufen wird, ist allerdings gering. Die aus den kraftspektroskopischen Experimenten dieser Arbeit, gewonnenen Keimgröße M ist daher nur mit ca. 20 Aminosäuren angegeben.
- Bei der numerischen Berechnung von Formel 3.26 geht man davon aus, daß sich der Keim am C-Terminus des Leucinezippers bilden wird. Dies ist wegen der dort ausgebildeten Disulfidbrücke sehr wahrscheinlich. Außerdem wird auch ohne kovalente Verbindung der beiden α -Helizes vermutet, daß die Keimbildung des GCN4-p1 Leucinezippers am C-Terminus stattfindet [61][70][71][72].
- Die zum Erhalten der in Abbildung 9.1 gezeigten Kraft-Abstands-Kurve möglichen Energien, ergeben alle eine zum Trennen des Leucinezippers nötige Gesamtenergie, die mit anderen Experimenten konsistent ist:

Die Gesamtenergie

$$\Delta E = \sum_1^{35} \Delta E_j \quad (9.3)$$

die sich mit den Energien 9.1 ergibt, beträgt $20k_B T$. Aus Circular-Dichroismus-experimenten mit dem gleichen Leucinezipper weiß man, daß die freie Enthalpie, die zum Trennen der Stränge notwendig ist, ca. $\Delta G = 11.6\text{kcal/mol}$ beträgt [61]. Für einen einzelnen Dimer erhält man mit der Avogadrokonstanten also $80.6 \cdot 10^{-21}\text{J}$ oder bei einer Temperatur von 294 K $20 k_B T$.

Auch bei der theoretischen Beschreibung des unzippen von DNA-Strängen mit Formel 3.26 sind die Energien E_j in Übereinstimmung mit experimentell ermittelten freien Enthalpien G_j [42]. Dies kann dadurch erklärt werden, daß beim Aufbrechen eines Aminosäurepaares oder einer Aminosäuregruppe entropisch bedingte Effekte direkt in die Auslenkung der Feder eingehen. Die gemessene Kraft kann als Mittelwert über die Fluktuationen angesehen werden, die an der Stelle des gerade noch geschlossenen Aminosäurepaares m „ausprobiert“ werden.

Damit läßt sich eine realistische „Landschaft“ für die freie Enthalpie des p1Q-Leucinezipers abschätzen. Dies wird im nächsten Punkt gezeigt.

- Wie in Abschnitt 9.3 erklärt wurde, sind zum Berechnen der selben Kraft-Abstands-Kurve mehrere Energielandschaften denkbar. Diese Freiheit in der Wahl der Energielandschaft kommt dadurch zustande, daß die in dieser Diplomarbeit durchgeführten kraftspektroskopischen Experimente im thermischen Gleichgewicht stattfinden. Könnte man die Ziehgeschwindigkeit v_p so stark erhöhen, bis die Übergänge im Nichtgleichgewicht stattfänden, so sollte man die einzelnen freien Aktivierungsenthalpien bestimmen können. Trotzdem läßt sich aus den möglichen Energielandschaften eine schematische Energielandschaft der freien Enthalpie abschätzen. Sie ist in Abbildung 9.4 gezeigt. Aus Circular Dichroismus Experimenten am selben Leucinezipper

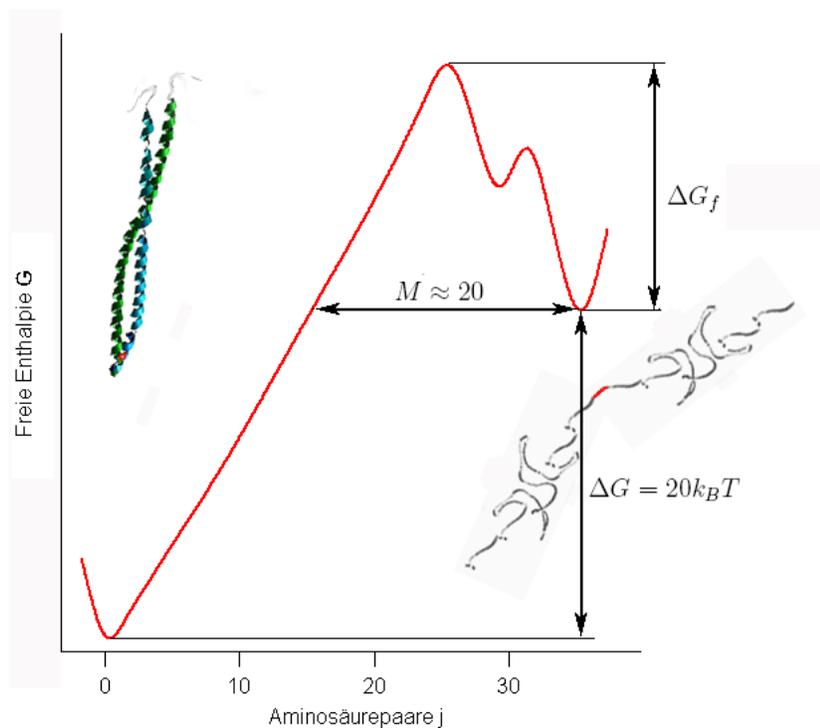


Abbildung 9.4: Schematische Darstellung der freien Enthalpie des p1Q-Leucinezipers in Abhängigkeit der geöffneten Aminosäurepaare j . Bei $j=0$ ist schematisch die gefaltete, bei $j=35$ die entfaltete Leucinezippersequenz gezeichnet.

[61] wurde eine Energielandschaft vorhergesagt, die der in Abbildung 9.4 gezeigten entspricht. Daher unterstützen diese kraftspektroskopischen Experimente das dort vorgeschlagene Faltungsmodell des Leucinezipers, das von einer Keimbildung mit zumindest partiell gebildeter coiled-coil Struktur zum Überwinden der freien Aktivierungsenthalpie ausgeht.

Kapitel 10

Ausblick

In dieser Diplomarbeit wurde gezeigt, daß man in der Lage ist, mit einem Kraftmikroskop das mechanisch induzierte Entfalten von einzelnen coiled-coil Strukturen zu beobachten. Aufgrund der weiten Verbreitung des coiled-coil Motivs in vielen verschiedenen Proteinen, hat man eine Reihe von coiled-coil Sequenzen zur Verfügung die noch nicht untersucht sind.

Um die Vermutung der Sequenzunabhängigkeit des Keimbildungsschrittes beim Falten der coiled-coil Struktur zu erhärten, sollte ein coiled-coil Motiv, das aus zwei direkt aneinandergfügten p1Q-Leucinezippern besteht, untersucht werden.

Auch wäre es interessant synthetische coiled-coils mit sich wiederholendem gleichen Aminosäuremuster zu untersuchen. Auch dies könnte Aufschluss über die Vermutung der Sequenzunabhängigkeit des Keimbildungsschrittes bringen.

Eine weitere interessante Frage, ist die nach dem Faltungsverhalten von Leucinezippern mit verschiedener Länge. Allerdings könnten hier wie am Beispiel des Ig8-Nkin-Konstruktes zu sehen ist, experimentelle Schwierigkeiten für längere coiled-coil Strukturen auftreten. Dies wird es wahrscheinlich schwierig machen, coiled-coil Strukturen mit einer Länge, die größer als die kooperative Länge N_0 ist, zu untersuchen.

Außerdem ist, mit dem in dieser Arbeit benutzten p1Q-Zipper eine Proteinstruktur gegeben, mit der man beliebige Trägerproteine kovalent verbinden kann. Fügt man das Cystein an einer d-Position im N-Terminalen Bereich des Zippers ein, so könnte man zwei beliebige Proteine kovalent verbinden, wobei der Leucinezipper bei kraftspektroskopischen Experimenten nicht mehr entfalten könnte.

Auf diese Weise könnte man durch ein Anfügen eines Leucinezippers am N-Terminus und am C-Terminus eines Proteins, sehr lange, kovalent verbundene Ketten aus gleichen Proteinen konstruieren.

Anhang A

Molekularbiologische Methoden

An das N-Terminale Ende des p1Q-Leucinezippers (Sequenz in Abbildung A.2 wurde ein bereits kraftspektroskopisch untersuchtes modulares Protein, ddFLN(1-5), fusioniert. Dazu wurde in den bereits vorhandenen DNA-Vector mit der ddFLN(1-5)-Sequenz die DNA-Sequenz des p1Q-Zippers eingefügt.

A.1 Gentechnische Methoden

Die Sequenz für das DdFLN(1-5) wurde bereits von Angelika Kardinal am Lehrstuhl Gaub zwischen den NCO1 und XHO1 Schnittstellen der Multiple Kloning Site des pET-28a(+) Standardvectors von Novagen eingefügt. Um die Leucinezippersequenz nach der DdFLN(1-5) Sequenz einfügen zu können, musste zwischen dem DdFLN(1-5) und XHO1 eine NHE1 Schnittstelle eingefügt werden. Dies geschah mit speziell entworfenen Primern (Fa. Metabion, Martinsried, D) und dem QuickChange Mutagenesis Kit (Fa. Stratagene, Amsterdam, NL). Als Klonierungszellen wurden die Zelllinien DH5 α und XL1-Blue verwendet. Zum Reinigen der Plasmidringe aus diesen Zellkulturen wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Fa. Qiagen, Konstanz, D) benutzt. Um den Einbau der NHE1 Schnittstelle zu überprüfen, wurde das entsprechende Restriktionsenzym dem gelösten Plasmidring zugegeben und das verdautete Produkt mit Gelelektrophorese auf linearisierte DNA überprüft. Anschließend wurden der pET-28a(+)Vector mit dem eingefügten DdFLN(1-5) und der neuen NHE1 Schnittstelle mit den NHE1 und XHO1 Restriktionsenzymen gleichzeitig verdaut. Das verdautete Produkt wurde mit Gelelektrophorese analysiert und die verbleibende linearisierte DNA mit dem Gel Extraction Kit (Fa. Qiagen, Konstanz, D) extrahiert. Genau so wurde mit der Leucinezippersequenz, die in einem pPCR-Script Amp Vector (Fa. Geneart, Regensburg, D) geliefert wurde, verfahren. Dabei mußte beachtet werden, daß der Leucinezipper Insert nur 130 bp lang war und somit an der Aufreinigungsgrenze der verwendeten Protokolle lag. Die beiden DNA Stränge mit den jeweils offenen Restriktionsschnittstellen wurden von einer T4 Ligase (Fa. Roche, Basel, CH) verbunden. Zur Kontrolle wurde zum verdauten pET-28a(+) ohne einzufügenden Leucinezipper-insert, die T4 Ligase gegeben, um den Einfluss der Selbstligation abschätzen zu können. Durch hinzufügen beider Re-

striktionenzyme und anschließender Gelelektrophorese konnte das korrekte Einfügen der Leucinezipper Sequenz an Domäne 5 des DdFLN(1-5) bestätigt werden.

A.2 Protein Aufreinigung

Der so aus den gentechnischen Methoden erhaltene Vector wurde in BL21 Bakterien transformiert. Diese wurden bei 37 °C kultiviert, bis sie eine bestimmte Populationsstärke erreichen (optische Dichte der Lösung 0.8). Danach wurde die Expression des Proteins durch Zugabe von Isopropylthiogalactosid (IPTG) gestartet. Nach 2 Stunden wurden die Zellmembrane in einer French Press geöffnet. Um das gewünschte Protein von den restlichen Proteinen der BL21 Bakterien und anderen Zellrückständen zu trennen, wurde Affinitätschromatografie benutzt. Dabei nutzt man aus, daß Histidine eine hohe Affinität zu Ni-NTA haben. An dem C-Terminale Ende unseres Proteins befindet sich eine solche Folge von sechs Histidinen. Durch Hinzufügen von Imidazol mit langsam steigender Konzentration kann das Protein wieder von der Ni-NTA-Säule gelöst werden. Das erhaltene Protein wurde mit SDS Gelelektrophorese auf das korrekte Molekulargewicht überprüft.

A.3 Sequenzen

PAEL <u>K</u> Q <u>M</u> LAK	<u>A</u> KT <u>Q</u> IT <u>S</u> FEN	Y <u>I</u> V <u>N</u> LE <u>S</u> EVQ	VWRGGETVPK
EKWVPPLELA	ITPSKSASTT	ARPSTPSRLL	PESRAETPAI
SDRAGTPSLP	LDKDEREEFL	RRENEL <u>Q</u> D <u>Q</u> I	AEKESIAAAA
ER <u>Q</u> L <u>R</u> ET <u>K</u> EE	<u>L</u> I <u>A</u> L <u>K</u> D <u>H</u> D <u>S</u>	<u>K</u> L <u>G</u> KE	

Tabelle A.1: Aminosäuresequenz des NKinesin Halsstückes (342-485) die a und d Positionen der Heptad Wiederholung sind unterstrichen.

GCTAGCCGTA	TGAAGCAACT	TGAACAAAAG	GTCGAAGAAC
TTCTTCAAAA	GAATTATCAT	CTTGAACAAG	AAGTTGCACG
TCTTAAGCAA	CTTGTTGGAG	AATGCGAAGG	TCTCGAG

Tabelle A.2: DNA Sequenz des Leucinezippers zwischen Nhe1 und Xho1 Schnittstellen.

RMKQLED KVEELLS KNYHLEN EVARLKK LVGER

Tabelle A.3: Aminosäuresequenz des originalen Leucinezippers aus GCN4. Die a und d Positionen der Heptad Wiederholung sind unterstrichen.

ASRMKQLEQK VELLQKNYH LEQEVARLKQ LVGECEGLEH HHHHH

Tabelle A.4: Aminosäuresequenz des p1Q- Leucinezipers mit jeweils zwei Aminosäuren von den Restriktionsschnittstellen am Anfang und Ende und angehängtem Histag. Die a und d Positionen der Heptad Wiederholung sind unterstrichen.

```

CCATGGAGCA  AGGGCTTGAA  GTTTATGGTC  CAGGTGTTGA
AGGTGGTTTC  GTTAATAAAT  CCGCCGATTT  CCACATTAAT
GCCGTCAACT  ACTATGGTGA  ACCATTAGCC  AACGGTGGTG
AAGGTTTCAC  TGTTAGCGTC  GTTGGTGCCG  ATGGTGTGTA
AGTCCCATGC  AAATTGGTTG  ACAACAAAAA  TGGTATCTAT
GATGCTTCAT  ACACTGCTAC  CGTTCCACAA  GACTACACTG
TCGTCGTTCA  ATTAGATGAT  GTCCACTGCA  AAGACTCACC
ATACAACGTT  AAGATTGACG  GTTCAGATGC  TCAACACTCA
AATGCCTACG  GTCCAGGTTT  AGAAGGTGGT  AAAGTTGGTG
TTCCAGCTGC  TTCAAATC   CAAGGTCGTA  ACAAGGATGG
CGAGACCGTC  ACTCAAGGTG  GTGATGATTT  CACCGTCAAA
GTTCAATCAC  CAGAAGGTCC  AGTCGATGCT  CAAATCAAAG
ACAATGGTGA  TGGTTCATAC  GATGTTGAAT  ACAAACCAAC
CAAAGGTGGT  GATCACACTG  TCGAAGTTTT  CCTCCGTGGT
GAACCATTAG  CCCAAGGTCC  AACCGAAGTT  AAGATCCTCA
ACTCTGACTC  TCAAAACAGT  TATTGTGATG  GTCCAGGTTT
CGAAAAAGCC  CAAGCTAAAC  GTCCAAGTGA  ATTCACTATT
CACTCTGTTG  GTGCTGATAA  TAAACCATGT  GCTGCTGGTG
GTGATCCATT  CCAAGTATCC  ATCAGTGGTC  CACACCCAGT
CAACGTTGGT  ATCACCGATA  ATGACGATGG  TACTTACACT
GTTGCCTACA  CTCCAGAACA  ACCAGGTGAC  TACGAAATTC
AAGTCACCCT  CAATGATGAA  GCCATCAAGG  ATATTCCAAA
ATCAATTCAT  ATTAACCAG  CTGCTGATCC  AGAGAAATCA
TACGCTGAAG  GTCCAGGTTT  AGATGGTGGT  GAATGTTTCC
AACCAAGCAA  ATCAAGATT  CATGCAGTTG  ATCCAGATGG
TGTACACCGT  ACTGACGGTG  GTGACGGTTT  TGTCGTTACC
ATTGAAGGTC  CAGCTCCAGT  CGATCCAGTT  ATGGTCGATA
ATGGTGATGG  TACATATGAT  GTTGAATTTG  AACCAAAAGA
AGCCGGTGAC  TATGTTATCA  ATCTCACTTT  AGATGGTGAC
AACGTCAATG  GTTTCCCAA  TATGCTGAAG  GTGAAGGTTT
AGTCAAAGTA  TTTGATAATG  CCCCAGCTGA  ATTCACTATT
TTCGCCGTTG  AACTAAAGG  TGTTGCTCGT  ACCGATGGTG
GTGATCCATT  TGAAGTCGCT  ATCAATGGTC  CAGATGGTTT
AGTCGTTGAT  GCCAAAGTTA  CCGATAACAA  GGTAACACTA
ATGTTAATGT  CACCCTCCGT  GGTAATCCAA  TCAAAAATAT
GCCAATCGCT  AGCATACTCG  AG

```

Tabelle A.5: DNA Sequenz von Ddfilamin(1-5) zwischen Nco1 und Xho1 Schnittstellen. Die Nhe1 Schnittstelle ist bereits eingefügt. Der Startcodon zur Expression ist ATG in der Nco1 Schnittstelle (Leserahmen 3).

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Darstellung einer α -Helix	4
2.2	Veranschaulichung der „knob into holes“ Anordnung	5
2.3	Veranschaulichung einer coiled-coil Struktur	5
2.4	Heptad Repeat einer coiled-coil	6
2.5	Schematische Darstellung von Kinesin und Myosin	7
2.6	Lupas Plot	8
3.1	Schema für freie Enthalpie in Abhängigkeit vom Ende-zu-Ende Abstand .	12
3.2	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus	16
4.1	Schematischer Aufbau eines Kraftspektrometers	20
4.2	Spektrale Dichte des Bio-Levers	21
4.3	Kraft-Abstands-Kurven von Titin und Myosin	23
5.1	Schematischer Aufbau der Optik	27
5.2	Relative Intensität des Fokussierten Spots	29
5.3	Aufbau des AFM-Kopfes für kleine Blattfedern	30
5.4	Intensität in Abhängigkeit der Leverposition	32
5.5	Differenzierte Intensität in Abhängigkeit der Leverposition	33
5.6	Spektrale Dichten verschiedener Blattfedern	34
6.1	Ig8-Nkin-Konstrukt	38
6.2	Typische Kraft-Abstands-Kurve des Ig8-Nkin-Konstruktes	39
6.3	Vergleich mehrerer Kraft-Abstands-Kurven des Ig8-Nkin-Konstruktes . . .	40
7.1	Schematische Darstellung des dimerisierten ddFLN(1-5)-p1Q Konstruktes .	43
7.2	Kraft-Abstands-Kurven von ddFLN(1-5) und ddFLN(1-5)-p1Q	45
8.1	Überlagerung verschiedener ddFLN(1-5)-p1Q Kraft-Abstands-Kurven . . .	48
8.2	Hin und Rückfahrkurven bei niedriger Geschwindigkeit	49
8.3	Histogramm der gefitteten Konturlängenzuwächse	50
8.4	Kraft-Abstands-Kurve mit Leverdrift	51
8.5	Verteilung der Entfaltungskräfte des Leucinezipers	52
8.6	Kraft-Abstands-Kurve mit vielen Zyklen	54

8.7	Aus 19 Zyklen gemittelte Kraft-Abstands-Kurve	55
8.8	Histogramm der Kontrulängendifferenzen $S_2 - S_1$	56
8.9	Überlagerung von Vorwärts- und Rückwärtskurven mit verschiedenen Geschwindigkeiten	57
9.1	Gemittelte Rückwärtskurve und theoretisch berechnete Kraft-Abstands-Kurve	60
9.2	Schematische Darstellung der Energielandschaft in Abhängigkeit aufgetrennter Aminosäurepaare j	62
9.3	Schematische Darstellung einer α -Helix mit Keim	63
9.4	Schematische Darstellung der freien Enthalpie des p1Q-Leucinezipers . .	65

Literaturverzeichnis

- [1] A. Lupas, M. Van Dyke, and J. Stock. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*, **252**:p.1162, 1991.
- [2] A. Lupas. Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem. Sci.*, **21(10)**:p.375, 1996.
- [3] M. Grummt, G. Woehlke, U. Henningsen, S. Fuchs, M. Schleicher, and M. Schliwa. Importance of a flexible hinge near the motor domain in kinesin-driven motility. *European Molecular Biology Organization Journal*, **17**:p.5536, 1998.
- [4] L. Romberg, D.W. Pierce, and R.D. Vale. Role of the kinesin neck region in processive microtubule-based motility. *J. Cell. Biol.*, **140**:p.1407, 1998.
- [5] R.B. Case, S. Rice, C.L. Hart, B. Ly, and R.D. Vale. Role of the kinesin neck linker and catalytic core in microtubule-based motility. *Curr. Biol.*, **10**:p.157, 2000.
- [6] M. Thormählen, A. Marx, S. Sack, and E. Mandelkow. The coiled-coil helix in the neck of kinesin. *J. Struct. Biol.*, **122**:p.30, 1998.
- [7] S. Nishikawa, K. Homma, Y. Komori, M. Iwaki, T. Wazawa, A. Iwane Hikkikoshi, J. Saito, R. Ikebe, E. Katayama, T. Yanagida, and M. Ikebe. Class VI myosin moves processively along actin filaments backward with large steps. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **290(1)**:p.311, 2002.
- [8] L. Pauling, R. B. Corey, and H. R. Branson. The structure of proteins: Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **37**:p.205, 1951.
- [9] F. Crick. The packing of α -helices: simple coiled-coils. *Acta Crystallogr.*, **6**:p.689, 1953.
- [10] C. Cohen and D.A.D. Parry. α -helical coiled coils - a widespread motif in proteins. *Trends Biochem. Sci.*, **11**:p.245, 1986.
- [11] E.K. OShea, 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**:p.539, 1991.

- [12] C. Cohen and D.A.D. Parry. α -helical coiled coils and bundles: How to design an α -helical protein. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, **7**:p.1, 1990.
- [13] G. Woehlke and M. Schliewa. Walking on two heads: The many talents of kinesin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **1**:p.50, 2000.
- [14] M.Y. Ali, K. Homma, A.H. Iwane, K. Adache, H. Itoh, K.Jr. Kinosita, T. Yanagida, and M. Ikebe. Unconstrained steps of myosin VI appear longest among known molecular motors. *Biophys J.*, **86(6)**:p.3804, 2004.
- [15] R.D. Vale and R.A. Milligan. The way things move: Looking under the hood of molecular motor proteins. *Science*, **288(5463)**:p.88, 2000.
- [16] 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(6744)**:p.590, 1999.
- [17] 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **97**:p.9482, 2000.
- [18] H.E. Huxley. The mechanism of muscular contraction. *Science*, **164**:p.1356, 1969.
- [19] 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**:p.804, 2000.
- [20] 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**:p.983, 2002.
- [21] J.N. Forkey, M.E. Quinlan, M.A. Show, J.E.T. Corrie, and Y.E. Goldman. Three-dimensional structural dynamics of myosin v by single-molecule fluorescence polarisation. *Nature*, **422**:p.399, 2003.
- [22] R.S. Rock, S.E. Rice, A.L. Wells, T.J. Purcell, J.A. Spudich, and H.L. Sweeney. Myosin VI is a processive motor with a large step size. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**:p.13665, 2001.
- [23] H. Tanaka, K. Homma, A.H. Iwane, E. Katayama, R. Ikebe, J. Saito, T. Yanagida, and M. Ikebe. The motor domain determines the large step of myosin-V. *Nature*, **415**:p.192, 2002.
- [24] W.H. Landschulz, P.F. Johnson, and S.L. McKnight. The leucine zipper: A hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, **245**:p.1759, 1988.
- [25] A. Lupas. Prediction and analysis of coiled-coil structures. *Meth. Enzymology*, **266**:p.513, 1996.

- [26] D.A.D. Parry. Coiled-coils in alpha-helix-containing proteins: analysis of the residue types within the heptad repeat and the use of these data in the prediction of coiled coils in other proteins. *Biosci. Rep.*, **2**:p.1017, 1982.
- [27] A. Knight. Macstripe2.0b1. <http://www.york.ac.uk/depts/biol/units/coils/mstr2.html>, 1998.
- [28] F. Kozielski, S. Sack, A. Marx, M. Thormählen, E. Schönbrunn, V. Biou, A. Thompson, E.M. Mandelkow, and E. Mandelkow. The crystal structure of dimeric kinesin and implications for microtubule-dependent motility. *Cell*, **91**:p.985, 1997.
- [29] G.I. Bell. Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science*, **200**:p.618, 1978.
- [30] P. J. Flory. *Statistical Mechanics of Chain Molecules*. Hansa, 1988.
- [31] M. Fixman and J. Kovac. Polymer conformational statistics III. modified gaussian models of stiff chains. *J. Chem. Phys.*, **58**:p.1553, 1973.
- [32] O. Kratky and G. Porod. Röntgenuntersuchung gelöster fadenmoleküle. *Rec. Trav. Chim.*, **68**:p.1106, 1949.
- [33] J. F. Marko and E. D. Siggia. Stretching dna. *Macromol.*, **28**:p.8759, 1995.
- [34] M. Doi and S. F. Edwards. *The Theorie of Polymer Dynamics*. Cambridge University Press, 1986.
- [35] C. Bouchiat, M. D. Wang, J.F. Allemand, T. Strick, S. M. Block, and V. Croquette. Estimating the persistence length of a worm-like chain molecule from force-extension measurements. *Biophysical Journal*, **76**:p.409, 1999.
- [36] T. Hugel, M. Rief, M. Seitz, H.E. Gaub, and R.R. Netz. Highly stretched single polymers: Afm experiments versus ab-initio theory. *submitted*, 2004.
- [37] M. Rief, J.M. Fernandez, and H. E. Gaub. Elastically coupled two-level systems as a model for biopolymer extensibility. *Phys. Rev. Lett.*, **81**:p.4764, 1998.
- [38] S. Izrailev, S. Stepaniants, M. Balsera, Y. Oono, and K. Schulten. Molecular dynamics study of unbinding of the avidin-biotin complex. *Biophys. J.*, **72**:p.1568, 1997.
- [39] I. Schwaiger, C. Sattler, D.R. Hostetter, and M. Rief. The myosin coiled-coil is a truly elastic protein structure. *Nat. Mater.*, **1(4)**:p.232, 2002.
- [40] B.H. Zimm and J.K. Bragg. Theory of the one-dimensional phase transition in polypeptide chains. *J. Chem. Phys.*, **28(6)**:p.1246, 1958.
- [41] B.H. Zimm and J.K. Bragg. Theory of the phase transition between helix and random coil in polypeptide chains. *J. Chem. Phys.*, **31(2)**:p.526, 1959.

- [42] U. Bockelmann, B. Essevaz-Roulet, and F. Heslot. Dna strand separation studied by single molecule force measurements. *Phys. Rev. E*, **58**:p.2386, 1998.
- [43] I. Schwaiger, A. Kardinal, M. Schleicher, A.A. Noegel, and M. Rief. A mechanical unfolding intermediate in an actin-crosslinking protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**(1):p.81–5, 2004.
- [44] G. Binnig, C.F. Quate, and C. Gerber. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.*, **56**:p.930, 1986.
- [45] D. Rugar and P. Hansma. Atomic force microscopy. *Phys. Today*, **43**:p.23, 1990.
- [46] M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J.M. Fernandez, and H.E. Gaub. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by afm. *Science*, **276**:p.1109, 1997.
- [47] E.-L. Florin et al. Sensing specific molecular interactions with the atomic force microscope. *Biosensors and Bioelectronics*, **10**:p.895, 1995.
- [48] J.P. Cleveland et al. A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy. *Rev. Sci. Instrum.*, **64**(2):p.403, 1993.
- [49] J. Sader. *Calibration of Atomic Force Microscope Cantilevers*, page 846. Encyclopedia of Surface and Colloid Science, 2002.
- [50] J.L. Hutter and J. Bechhoefer. Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev. Sci. Instrum.*, **64**(7):p.1868, 1994.
- [51] H.-J. Butt and M. Jaschke. Calculation of thermal noise in atomic force microscopy. *Nanotechnology*, **6**(1):p.1, 1995.
- [52] X. Zhuang and M. Rief. Single-molecule folding. *Current Opinion in Structural Biology*, **13**:p.88, 2003.
- [53] M. Rief, H. Clausen-Schaumann, and HE Gaub. Sequence-dependent mechanics of single dna molecules. *Nat. Struct. Biol.*, **6**(4):p.346, 1999.
- [54] M.B. Viani, T.E. Schäffer, A. Chand, M. Rief, H.E. Gaub, and P.K. Hansma. Small cantilevers for force spectroscopy of single molecules. *Jour. of Appl. Phys.*, **86**:p.2258, 1999.
- [55] D. Sarid. *Scanning Force Microscopy With Applications to Electric, Magnetic and Atomic Forces*. Oxford Univerity Press, 1991.
- [56] C. V. Heer. *Statistical Mechanics , Kinetic Theory and Stochastic Processes*. Academic Press New York, 1972.
- [57] E. Hecht. *Optik*. Addison-Wesley, 1989.

-
- [58] F. Linke. *Development of Ellipsometric Microscopy as a Quantitative High-Resolution Technique for the Investigation of Thin Films at Glass-Water and Silicon-Air Interfaces*. Dissertation an der Fakultät für Physik, Technische Universität München, 2004.
- [59] AsylumResearch. <http://www.asylumresearch.com/Products/Levers/BioLever.shtml>.
- [60] C. Sattler. *Einzelmoleküluntersuchungen von super-helikalen Proteinfilamenten*. Diplomarbeit an der Fakultät für Physik, Ludwig Maximilians Universität München, 2003.
- [61] J. Zitzewitz, B. Ibarra-Molero, D. Fishel, K. Terry, and C. Matthews. Preformed secondary structure drives the association reaction of gcn4-p1, a model coiled-coil system. *J. Mol. Biol.*, **296**(4):p.1105, 2000.
- [62] P. Fucini, B. Köppel, M. Schleicher, A. Lustig, T. A. Holak, R. Müller, M. Stewart, and A. A. Noegel. Molecular architecture of the rod domain of the dictyostelium gelation factor (abp120). *J. Mol. Biol.*, **291**:p.1017, 1999.
- [63] A. J. McCoy, P. Fucini, A.A. Noegel, and M. Stewart. Structural basis for dimerisation of the dictyostelium gelation factor (abp120). *Nat. Struct. Biol.*, **6**:p.836, 1999.
- [64] H. Dietz. *Mechanik des Grün Fluoreszierenden Proteins*. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Physik, Ludwigs Maximilians Universität München, 2004.
- [65] H. Nyquist. Certain factors affecting telegraph speed. *Bell System Technical Journal*, **3**:p.324, 1924.
- [66] R. Krautbauer, M. Rief, and H. E. Gaub. Unzipping dna oligomers. *Nano Letters*, **3**(4):p.493, 2003.
- [67] W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl, and H. Ziegler. *Biophysik*. Springer Verlag.
- [68] M. Vieth, A. Kolinski, C.L. BrooksIII, and J. Skolnick. Prediction of the folding pathways and structure of the GCN4 leucine zipper. *J.Mol.Biol*, **237**:p.361, 1994.
- [69] Y. Su. Jeffrey, R. S. Hodges, and C. M. Kay. Effect of chain length on the formation and stability of synthetic α -helical coiled coils. *Biochem.*, **33**:p.15501, 1994.
- [70] O. Bilsel and C.R. Matthews. Barriers in protein folding reactions. *Advan. Protein Chem.*, **53**:p.154, 2000.
- [71] 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. USA*, **95**:p.13419, 1998.
- [72] K.J. Lumb, C.M. Carr, and P.S. Kim. Subdomain folding of the coiled coil leucine zipper from the bZIP transcriptional activator GCN4. *Biochemistry*, **33**:p.7361, 1994.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Prof. Matthias Rief danken, meinem Chef, für die immer offene Tür zu seinem Büro und dafür, daß man ihn auch mit unglaublichen Fragen nie aus der Fassung bringen konnte. Außerdem danke für die gute Stimmung am E22 und für das Weiterleben der Winterschule (das alles sind ja auch Chefsachen).

Ein Dankeschön auch an Prof. Hermann E. Gaub, an dessen Lehrstuhl die Diplomarbeit begonnen wurde, und wo man auch nach dem Umzug immer wieder gerne auftaucht.

Danke auch an alle Kollegen und Mitbestreiter: Hendrik, Ingo (ohne den man kein AFM bauen kann), Jonny, Anabel, Michael, Uwe, Thomas S. und den restlichen E22, Max, Christian, Martin und die restliche Gambicrew.

Danke an Angelika für die Hilfe bei den Klonierarbeiten und an Günther Woelke für die Konstruktion des Ig8-Nkin-Proteins. Danke an Rudi ohne den man auch kein AFM bauen kann.

Außerdem ein Dank an alle Korrekturleser und Leute die unser Wohnzimmer kennen (und dabei wissen was ich meine) Kristina, Manuel, Danie, Alex, Karina, Franz, Stefan, Bene.

Danke Brigitte.

Und zum Schluß ein Dank an meine Oma (für das gute Essen) und meine Eltern, dafür, daß ich immer studieren konnte, was ich wollte (und wie lang ich wollte).

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Verfasser angefertigt zu haben.

München, den 26.August 2004