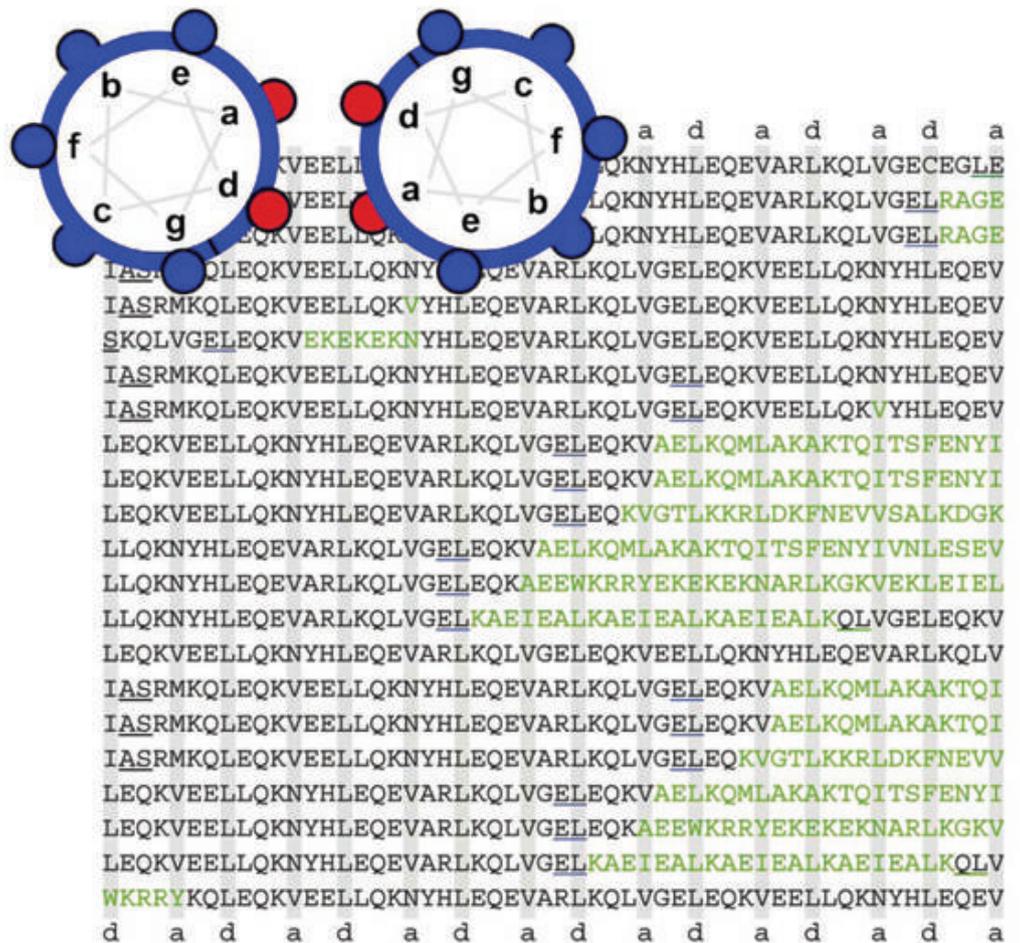


Gleichgewichtsmechanik und Fluktuationen von Superhelices

Thomas Bornschlögl



Technische Universität München
Lehrstuhl für Biophysik E22, Physik Department

Gleichgewichtsmechanik und Fluktuationen
von Superhelices

Thomas Bornschlögl

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

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. Roland Netz

Prüfer der Dissertation:

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

Die Dissertation wurde am 17.09.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 04.11.2008 angenommen.

Gleichgewichtsmechanik und Fluktuationen von Superhelices

Dissertation am Physik-Department
der Technischen Universität München

vorgelegt von
Thomas Bornschlögl
aus München

München, den 17. September 2008

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2008

Zugl.: (TU) München, Univ., Diss., 2008

978-3-86727-814-0

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2008

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2008

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86727-814-0

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Einleitung	3
1 Thermodynamik der mechanischen Entfaltung von Superhelices	5
1.1 Der Aufbau dimerer Superhelices	5
1.2 Beschreibung im thermodynamischen Gleichgewicht	7
1.2.1 Grundlagen	7
1.2.2 Kraftantwort der entropischen Kette	9
1.2.3 Laterales Auftrennen einzelner Superhelices	10
1.2.4 Das Überstrecken von Superhelices	14
1.3 Beschreibung im thermodynamischen Nichtgleichgewicht	17
1.3.1 Konformationsübergänge unter Kraft	17
1.3.2 Monte-Carlo Simulation	20
1.3.3 Die Näherung unendlich steifer Blattfedern	23
1.4 Fluktuationstheoreme	25
1.4.1 Theoretische Grundlagen	25
1.4.2 Bisherige experimentelle Überprüfungen	28
1.5 Zusammenfassung	29
2 Mechanisches Entfalten der LZ-Superhelices	31
2.1 Aufbau und Eigenschaften der LZ-Superhelices	31
2.2 Experimentelle Methode	33
2.2.1 Experimenteller Aufbau	33
2.2.2 Mittelungsmethode zur Detektion von 1 pN Kraftunterschieden	34
2.2.3 Bestimmung von Kraft- und Energieverteilungen	36
2.3 Entfaltung der LZ-Superhelices im Gleichgewicht	38
2.3.1 Gleichgewichtsbeschreibung der LZ26 Entfaltung	38
2.3.2 Gleichgewichtsbeschreibung der LZ10 und LZ18 Entfaltungen	43
2.3.3 Serielle Entfaltung mit unterschiedlichen Krafrichtungen	46
2.4 Entfaltung der LZ-Superhelices im Nichtgleichgewicht	50
2.4.1 Nichtgleichgewichtsbeschreibung der LZ26 Entfaltung	50
2.4.2 Die Breite der Faltungsbarriere als kontrollierbarer Parameter	55

2.4.3	Experimentelle Überprüfung des Fluktuationstheorems von Crooks	58
2.5	Zusammenfassung und Ausblick	60
3	Mechanisches Entfalten der Superhelices molekularer Motoren	65
3.1	Einleitung	65
3.1.1	Molekulare Motoren	65
3.1.2	Die Kinesin-1 Untergruppe	66
3.1.3	Superhelices als Motive zur Motordimerisation	67
3.1.4	Die <i>Drosophila melanogaster</i> Halssuperhelix	69
3.2	Mechanisches Entwinden der <i>Drosophila melanogaster</i> Halssuperhelix	71
3.2.1	Direkte Messungen an der DmKHC-Halssequenz	71
3.2.2	Messungen an der DmKHC-LZ10-Chimäre	73
3.2.3	Lokale Stabilitäten einzelner Heptaden	77
3.2.4	Die helixbrechenden Eigenschaften der N-terminalen Heptade	82
3.2.5	Diskussion und Zusammenfassung	88
3.3	Mechanisches Entwinden der <i>Neurospora crassa</i> Halssuperhelix	91
3.3.1	Einleitung	91
3.3.2	Messungen an der <i>Neurospora crassa</i> Halssuperhelix	91
3.3.3	Diskussion und Zusammenfassung	93
3.4	Ausblick	95
	Ausblick	97
	A CD-Spektroskopie an Superhelices	99
	B Methoden und Materialien	103
B.1	Molekularbiologische Methoden	103
B.1.1	Gentechnische Methoden	103
B.1.2	Expression und Aufreinigung	106
B.1.3	Sequenzen	106
B.2	Experimentelle Methoden	108
B.2.1	Kraftspektroskopie	108
B.2.2	CD-Spektroskopie	109
	C Kraftspektroskopie an Phytochrom	113
	Nachwort	121
	Literaturverzeichnis	122

Zusammenfassung

Superhelices¹ kommen in einer Vielzahl von Proteinen vor, die mechanischen Kräften ausgesetzt sind. Die strukturell einfachsten Superhelices bestehen aus zwei α -Helices, die sich gegenseitig umwinden und stellen ein ideales Modellsystem der Proteinfaltung dar. In dieser Arbeit werden ihre mechanischen Eigenschaften kraftspektroskopisch untersucht.

Durch eine lateral wirkende Kraft, die an einem Ende einer einzelnen Superhelix angreift, lassen sich die α -Helices schrittweise voneinander trennen. Dies wird anhand artifizierlicher Superhelices (LZ) verschiedener Länge gezeigt, welche auf einer Teilsequenz des Transkriptase Aktivators GCN4 der Hefe beruhen. Sie öffnen sich bei Kräften zwischen 10 und 16 pN, wobei sequenzspezifische Kraftfluktuationen zu beobachten sind. So zeigen sich Krafteinbrüche an Orten, die ein hydrophiles Asparagin innerhalb des hydrophoben Superhelixkerns aufweisen. Substituiert man ein einzelnes Asparagin durch ein hydrophobes Valin kann eine damit verbundene Energiedifferenz von $6 k_B T$ lokal aufgelöst werden. Die Faltung der LZ-Superhelices startet immer mit einer kooperativen Keimbildung am C-terminalen Ende, durch eine Disulfidbrücke kovalent verbundenen Ende. Sie findet bei Ziehgeschwindigkeiten von 150 nm/s gegen eine anliegende Kraft von 8 pN nahe am thermodynamischen Gleichgewicht statt und kann durch Erhöhen der Ziehgeschwindigkeit weiter zum Nichtgleichgewicht verschoben werden. Der Faltungskeim lässt sich gezielt durch Einfügen unstrukturierter Aminosäuren vergrößern, wodurch die mittlere Rückfaltungskraft der Superhelix abnimmt, während die Entfaltungskraft unverändert bleibt. Mit Hilfe eines Nichtgleichgewichtsmodells lässt sich die Größe und Kinetik des Faltungskeims bestimmen. Ein Gleichgewichtsmodell ermöglicht anhand der Superhelixsequenz die Bestimmung des gesamten Stabilitätsprofils. Da experimentell sowohl das Gleichgewichts- als auch das Nichtgleichgewichtsregime zugänglich ist, konnte erstmals die Anwendbarkeit des Fluktuationstheorems von Crooks auf Messungen mit dem Kraftmikroskop (AFM) nachgewiesen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit werden die Superhelices molekularer Motoren des *Drosophila melanogaster* und des *Neurospora crassa* Kinesins untersucht, die in ihrer biologischen Funktion lateralen Kräften ausgesetzt sind. Auf physiologisch relevanten Zeitskalen entfaltet erstere im thermodynamischen Nichtgleichgewicht bei mittleren Kräften von 12 pN; die Entfaltung der *N. crassa* Superhelix findet hingegen bei Kräften kleiner als 7 pN statt. Die *D. melanogaster* Sequenz enthält für Superhelices untypische und helixbrechende Motive, deren jeweilige lokale Stabilitäten und Faltungseigenschaften durch Einfügen in die LZ-Superhelices bestimmt werden.

¹Im Englischen: coiled coils

Einleitung

Proteine gehören zu den Grundbausteinen der Zelle, sie verleihen ihr Stabilität und agieren als Nanomaschinen, die an allen zellulären Prozessen beteiligt sind. Sie bestehen aus einer linearen Aneinanderreihung von Aminosäuren, wobei 20 verschiedene Aminosäuren mit jeweils spezifischen, physikalischen Eigenschaften Verwendung finden. Ihre Funktion können Proteine nur in ihrer korrekt gefalteten, dreidimensionalen Tertiär- bzw. Quartärstruktur ausüben. Bei einer Vielzahl von Proteinen findet diese Faltung spontan und ohne weitere Hilfsproteine in physiologischer Umgebung statt. Die sich ergebende Struktur des Proteins hängt dann nur von der sequentiellen Anordnung der Aminosäuren innerhalb der Kette ab. Der Faltungsprozess ist äußerst komplex und eine Vorhersage der gefalteten Struktur allein aus der Sequenz der Aminosäurekette ist nur in Spezialfällen oder durch vergleichende Methoden möglich.

Eine häufig in Proteinen vorkommende Struktur ist die Superhelix, die sich durch ihren sehr einfachen Aufbau auszeichnet. Superhelices bestehen aus mindestens zwei α -Helices, die sich gegenseitig umwinden. Trotz dieser einfachen Struktur sind die intra- und intermolekularen Wechselwirkungen der einzelnen α -Helices sehr vielschichtig. Dies macht die Superhelix zu einem viel erforschten Modellsystem, von welchem ausgehend versucht wird, allgemeine Fragen zur Proteinfaltung zu klären. Tatsächlich ist die Superhelix bisher die einzige bekannte Struktur, die allein aus der Aminosäuresequenz mit Hilfe eines Satzes parametrischer Gleichungen vorher gesagt werden kann. Diese frei verfügbaren Vorhersageprogramme ermöglichten die Abschätzung, dass etwa 2% der in Proteinen vorkommenden Aminosäuren in einer dimeren oder trimeren Superhelixstruktur auftreten.

Dabei sind Superhelices nicht allein aufgrund ihrer Häufigkeit, sondern auch wegen ihrer speziellen mechanischen Eigenschaften an Orten zu finden, die der Wirkung von Kräften ausgesetzt sind. Beispiele hierfür sind die Gruppe der Intermediärfilamente, die unter anderem Bestandteil des Zytoskeletts sind oder als Keratin in Haar, Horn und Federn vorkommen sowie das Fibrinogen, das bei der Blutgerinnung eine Rolle spielt. Auch können Superhelices bei ihrer Faltung aktiv Kraft ausüben. Physiologisch relevant ist dies beispielsweise bei der Membranfusion wie sie bei Viren (HIV-gp41 Komplex) oder Transport Vesikeln (SNARE-Komplex) vorkommt. Als weiteres Beispiel sind noch molekulare Motoren zu nennen, die bei allen zellulären Prozessen, die Bewegung erfordern eine wichtige Rolle spielen. Molekulare Motoren treten häufig als Oligomere auf, wobei die Oligomerisation meist durch Superhelices erreicht wird. Diese sind lateralen Kräften ausgesetzt, wenn sich der Motor fortbewegt.

In allen, oben genannten Beispielen sind die mechanischen Eigenschaften der Superhelices von Bedeutung, die nur mit Einzelmolekültechniken experimentell zugänglich sind. So machten es experimentelle Aufbauten, wie die optische Pinzette oder das Kraftmikroskop möglich, einzelne Proteine einer definierten Kraft auszusetzen und sowohl die mechanischen Eigenschaften gefalteter Proteine zu testen, als auch die Vorgänge bei mechanisch induzierten Entfaltungen.

In dieser Arbeit wird die mechanische Methode der Kraftmikroskopie angewandt, um dimere Superhelices schrittweise aufzutrennen. Es wird gezeigt, dass das Auflösungsvermögen der Methode ausreichend ist, um die Effekte einzelner Aminosäuresubstitutionen zu detektieren. Außerdem werden die Kräfte bestimmt die zum Entfalten verschiedener Superhelices benötigt werden, die in molekularen Motoren vorkommen. Ferner ist die Kraftspektroskopie in der Lage, Antworten zu liefern, die mit klassischen Ensemble-Methoden nicht direkt zugänglich sind. So ist es mit der hier vorgestellten Methode möglich, das Faltungsverhalten und die Stabilität einzelner α -helikaler Windungen innerhalb einer Superhelix lokal aufzulösen. Mit dieser Methode können also wichtige Fragen zur Proteinfaltung, wie die der Größe, Kinetik und der Lokalisation von Faltungskeimen direkt beantwortet werden.

Kapitel 1

Thermodynamik der mechanischen Entfaltung von Superhelices

Dieses Kapitel gibt einen Überblick über die theoretische Beschreibung der mechanischen Entfaltung von Superhelices. Dazu wird zuerst der strukturelle Aufbau dimerer Superhelices umrissen, anschließend werden die thermodynamischen Grundlagen der Proteinentfaltung eingeführt. Es wird gezeigt, dass die Entfaltung von Superhelices sowohl im thermodynamischen Gleichgewicht als auch im Nichtgleichgewicht beobachtet werden kann, was in den Abschnitten 1.2 und 1.3 behandelt wird. In Abschnitt 1.4 werden die kürzlich aufgestellten Fluktuationstheoreme vorgestellt, die eine Brücke zwischen Nichtgleichgewichts- und Gleichgewichtsbeschreibung schlagen.

1.1 Der Aufbau dimerer Superhelices

Superhelices sind drei-dimensionale Strukturen, die sich aus der korrekten Anordnung mehrerer α -Helices zusammensetzen. Die einfachsten Superhelices bestehen aus nur zwei α -Helices, die sich gegenseitig umwinden. Da in dieser Arbeit nur dimere Superhelices untersucht werden, wird sich dieser Abschnitt auf solche beschränken. Ein umfassender Überblick über komplexere Superhelices ist in [1][2] zu finden.

Die Strukturen der α -Helix und der Superhelix wurden bereits in den 50er Jahren von Pauling [3] und Crick [4] beschrieben. Abbildung 1.1 a) zeigt drei Windungen einer einzelnen α -Helix. Nur die Atome des Rückgrats sind eingezeichnet; die nicht gezeigten Restgruppen der Aminosäuren würden immer von der Helixachse weg zeigen. Stabilisiert wird die α -Helix durch Wasserstoffbrücken zwischen der C=O Gruppe der n -ten Aminosäure und der N-H Gruppe der $n + 4$ ten Aminosäure (grün gestrichelt in Abbildung 1.1 a)), wobei die Nummerierung vom N-terminalen Ende her erfolgt. Eine α -helikale Windung fasst im Mittel 3.6 Aminosäuren. Bezeichnet man also die Aminosäuren mit Buchstaben von a bis g (abcdefg) _{n} , so kommt die Aminosäure a_1 fast senkrecht über der Aminosäure a_0 zu liegen. Die Nummerierung durch die „Heptadenwiederholung“ ist in Abbildung 1.1 b) gezeigt. Dort sind schematisch zwei Windungen von zwei sich nebeneinander befindenden

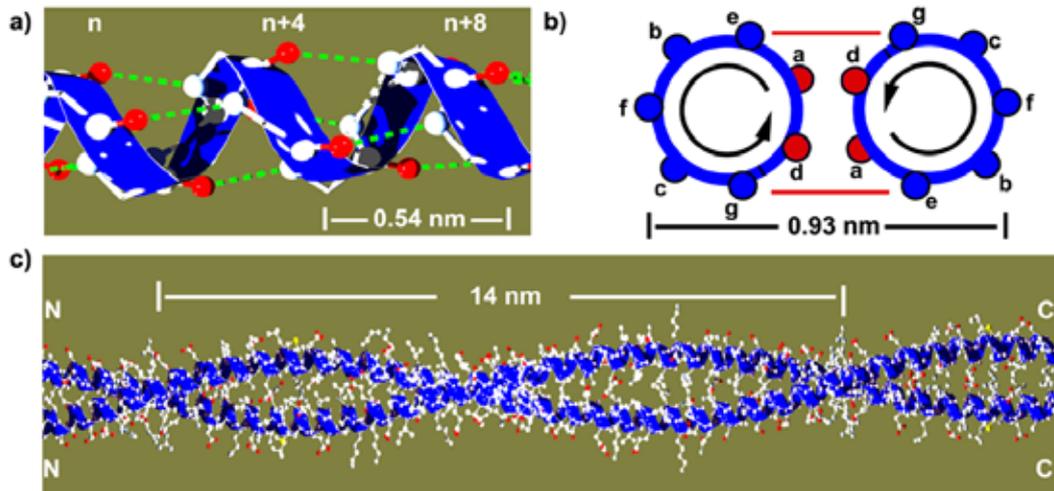


Abbildung 1.1: a) Schematischer Aufbau einer α -Helix. Die Restgruppen der Aminosäuren sind nicht gezeigt. b) Schematischer Querschnitt durch eine Superhelix. Gezeigt sind zwei α -helikale Windungen. Die Blickrichtung ist vom C-terminalen Ende zum N-terminalen Ende hin. Die Aminosäuren a und d bilden den hydrophoben Streifen der α -Helix, die Aminosäuren e und g zeigen häufig elektrostatische Wechselwirkungen („Salzbrücken“). c) Schematische Struktur einer Superhelix mit eingezeichneten Aminosäureresten. Die α -Helices umwinden einander mit einer Ganghöhe von etwa 14 nm . Alle in der Abbildung angegebenen Maße können zwischen verschiedenen Superhelices variieren, angegeben sind Mittelwerte [5].

α -Helices aufgetragen. Man blickt dabei vom C-terminalen Ende entlang der Superhelixachse. Sollen sich zwei α -Helices zu einer Superhelix verbinden, so müssen sie sich an ihrer Kontaktfläche nahe kommen. Da die Aminosäurereste von der jeweiligen α -Helix Achse weg zeigen, wird dies wie in Abbildung 1.1 b) geschehen. Um sterische Behinderungen zu vermeiden wird die Restgruppe der Aminosäure d' des einen Stranges zwischen den Restgruppen der Aminosäuren a_0 und a_1 des anderen Stranges zu liegen kommen (rot in Abbildung 1.1 b)). Eine schöne Veranschaulichung dieser „knob-into-holes“-Anordnung wurde bereits 1953 von Crick gegeben [4]. Damit diese Anordnung der beiden α -Helices thermodynamisch stabil bleibt, müssen die Aminosäuren an a - und d -Positionen der Heptade hydrophobe Restgruppen aufweisen. Dieses sich streng wiederholende Muster in der Aminosäuresequenz, das einen hydrophoben Streifen an der jeweiligen α -Helix bildet, ist essentiell für die exakte Vorhersage superhelikaler Strukturen (siehe Seite 45ff in [1]). Die Aminosäuren an den e - und g -Positionen sind meist hydrophil und sie können über intermolekulare, elektrostatische Wechselwirkungen der Superhelix Spezifität verleihen (rote Striche in Abbildung 1.1 b)). Da pro α -helikaler Windung 3.6 Aminosäuren Platz finden, wird sich mit zunehmender Höhe (n) die a_n -Position zunehmend zur a_0 Position verschieben, der jeweilige hydrophobe Streifen wird sich also um die Achse seiner α -Helix winden. Dies führt dazu, dass sich die aneinander liegenden α -Helices gegenseitig umwinden (Abbildung 1.1 c)); aus der strukturellen Geometrie ergibt sich eine Ganghöhe von etwa 14 nm [5].

1.2 Beschreibung im thermodynamischen Gleichgewicht

1.2.1 Grundlagen

In jüngster Zeit wurde es durch neue, experimentelle Techniken möglich, einzelne Makromoleküle gezielt zu strecken und damit einer definierten Kraft auszusetzen¹ [9]. Makromoleküle bestehen aus einer sehr großen Anzahl von Atomen, weshalb mit Hilfe der Ergodenhypothese eine thermodynamische Beschreibung eines einzelnen Moleküls erlaubt ist. Die Ergodenhypothese besagt, dass die thermodynamischen Eigenschaften eines einzelnen Moleküls auch durch eine zeitliche Mittelung gewonnen werden können. Daher kann das Konzept der thermodynamischen Potentiale auch auf Experimente mit einzelnen Molekülen angewandt werden. Berücksichtigt man als neue Variablen die intensive Größe der am Molekül anliegenden Kraft F und die extensive Größe des End-zu-End Abstands z des Moleküls, so lassen sich die bekannten Potentiale erweitern.

$$dE = TdS - pdV + Fdz \quad (1.1)$$

$$dA = -SdT - pdV + Fdz \quad (1.2)$$

$$dG = -SdT + Vdp + Fdz \quad (1.3)$$

$$dG' = -SdT + Vdp - zdF \quad (1.4)$$

Dabei ergeben sich die Potentiale der freien Energie von Helmholtz ($A = E - TS$), der freien Energie von Gibbs ($G = E - TS + PV$) und das Potential $G' = E - TS + PV - FZ$ jeweils durch Legendre-Transformationen aus Gleichung 1.1. Bezeichnet F die Kraft, die parallel zur Richtung der Ausdehnung z wirkt, so darf Fdz als Skalar geschrieben werden. Kraftspektroskopische Experimente mit unendlich steifer Blattfeder, bei denen der Abstand z kontrolliert und die Kräfte F detektiert werden, sind mit der freien Energie G (Gleichung 1.3) verbunden, während bei einer Messung mit unendlich weicher Blattfeder die Kraft F kontrolliert werden kann und somit G' das zugehörige Potential ist [10]. Speziell bei der Beschreibung von Proteinen kann man die Unterschiede zwischen der freien Energie $A(T, V, z)$ von Helmholtz und der freien Energie $G(T, p, z)$ von Gibbs vernachlässigen, da Volumenänderungen der Proteine in Abhängigkeit des Druckes äußerst klein sind. Darüber hinaus kann in kraftspektroskopischen Experimenten der Druck p und die Temperatur T konstant gehalten werden, womit sich aus Gleichung 1.3

$$dG = Fdz \quad \text{oder} \quad G(z_2) = G(z_1) + \int_{z_1}^{z_2} Fdz \quad (1.5)$$

ergibt. Seit Boltzmann lassen sich die Potentiale der klassischen Thermodynamik (Gleichungen 1.1 - 1.4) mit der statistischen Physik in Verbindung bringen. So gilt beispielsweise für ein kanonisches Ensemble der Zusammenhang

$$A(T, V, z) = -k_B T \ln Z_k(T, V, z) \quad (1.6)$$

¹Dieser Abschnitt ist an [6][7][8] angelehnt

zwischen der Helmholtz'schen freien Energie und der kanonischen Zustandssumme Z_k . Diese ist durch

$$Z_k = \sum_n \exp\left(-\frac{E_n}{k_B T}\right) \quad (1.7)$$

gegeben, wobei E_n die Energie aller einnehmbarer Zustände n des Systems bei gegebener Temperatur darstellt. Kennt man also die kanonische Zustandssumme Z_k , so kann mit Gleichung 1.6 auf alle Parameter des Systems geschlossen werden. Ein anderer Weg besteht in der direkten Berechnung der Erwartungswerte der gewünschten Parameter. Mit Kenntnis der Zustandssumme Z_k lässt sich mit dem Gesetz von Boltzmann die Wahrscheinlichkeit, einen bestimmten Zustand n des Systems mit Energie E_n vorzufinden, mit

$$p_n = \frac{1}{Z_k} \exp\left(-\frac{E_n}{k_B T}\right) \quad (1.8)$$

angeben. Somit kann der Erwartungswert einer beliebigen Observablen O mit

$$\langle O \rangle = \sum_n O_n p_n = \frac{\sum_n O_n \exp(-E_n/k_B T)}{\sum_n \exp(-E_n/k_B T)} \quad (1.9)$$

berechnet werden, wobei über alle einnehmbaren Zustände n summiert werden muss. Unter anderem lässt sich auf diese Art die mittlere Energie $\langle E \rangle$ (Gleichung 1.1) des thermodynamischen Systems berechnen. Möchte man in der Praxis die kanonische Zustandssumme beispielsweise eines einzelnen Moleküls angeben, welches sich in wässriger Lösung zwischen Blattfeder und Oberfläche eines Kraftmikroskops befindet, so müssten alle möglichen Zustände n mit berücksichtigt werden. Dazu würden auch sämtliche Beiträge aus den Interaktionen der einzelnen Wasseratome untereinander und mit dem Molekül zählen; eine solche Berechnung würde sehr viel Zeit beanspruchen. Auch ist es in dieser detaillierten Sichtweise schwierig, experimentell zugängliche Zustände, wie den entfalteten oder den gefalteten Zustand eines Proteins zu definieren, da diese sich aus einem Ensemble verschiedener Konformationen zusammensetzen. Um die Rechnungen zu vereinfachen, kann man mehrere Zustände des Systems zusammenfassen. Beispielsweise lässt sich das Ensemble der Zustände T_i , die den entfalteten Zustand i bilden, betrachten. Besteht der Zustand i aus vielen verschiedenen Unterzuständen $n = [1\dots m]$, so ergibt sich als Wahrscheinlichkeit das System im Zustand i zu finden²,

$$p_i = \frac{1}{Z_k} \exp\left(-\frac{G_i}{k_B T}\right) \quad \text{mit} \quad Z_k = \sum_i \exp\left(-\frac{G_i}{k_B T}\right) \quad (1.10)$$

wobei G_i die freie Energie des jeweiligen Ensembles an Unterzuständen beschreibt. Bei einer Vereinfachung der theoretischen Beschreibung durch Zusammenführen von mehreren Zuständen in Unterensembles T_i , hängt die Zustandssumme also eher von der freien als von der potentiellen Energie ab. Dies ist sinnvoll, da für die Energie eines solchen Ensembles neben den enthalpischen Energiebeiträgen auch die entropischen Beiträge berücksichtigt werden müssen.

² $p_i = \sum_n p_n = 1/Z_{k(i)} \sum_n \exp(E_n/k_B T)$ mit Gleichung 1.6 wird dies zu $1/Z_{k(i)} \exp(-A_i/k_B T)$ und bei $p, V = \text{const}$ ergibt sich Gleichung 1.10

1.2.2 Kraftantwort der entropischen Kette

Ein Beispiel, wie mit den Methoden der statistischen Physik die Kraftantwort eines einzelnen Moleküls auf eine Streckung berechnet werden kann, ist die Dehnung einer entropischen Kette. Experimentell kann eine solche Kette beispielsweise ein DNA-Strang oder ein Polypeptid sein, da diese aus einer Abfolge von vielen, zueinander beweglichen Unter-einheiten bestehen. Es lassen sich verschiedene Modelle wie das FJC (freely jointed chain) oder das FRC (freely rotating chain) Modell angeben [11], deren Kraft-Abstandsverhalten ausschließlich durch entropische Beiträge erklärt wird. In dieser Arbeit wird zur Beschreibung des Kraft-Abstandsverhaltens eine Interpolationsformel des WLC (worm like chain) Modells von Porod-Kratky benutzt [12][13]:

$$F = \frac{k_B T}{p} \left(\frac{z}{L} + \frac{1}{4(1 - z/L)^2} - \frac{1}{4} \right) \quad (1.11)$$

Dabei ist die Persistenzlänge p ein Maß für die Steifigkeit des Polymers, die Konturlänge L beschreibt die Länge des vollständig gestreckten Polymers im asymptotischen Fall einer unendlich hohen Kraft. Die Interpolationsformel gibt das Kraft-Abstandsverhalten des WLC-Modells asymptotisch für kleine und große Kräfte sehr gut wieder. Es ist bei kleinen Kräften hauptsächlich durch die entropischen Beiträge der Konformationen der Polymerkette bestimmt, während bei hohen Kräften von $F > 500$ pN die enthalpischen Beiträge der Dehnung von Bindungen oder der Vergrößerung von Bindungswinkeln in den Vordergrund treten [14].

Für die in dieser Arbeit gezeigten Experimente an Superhelices ist nur der entropisch dominierte, niedrige Kraftbereich zwischen 0 und 25 pN von Interesse. Abbildung 1.2 zeigt eine, mit der in Abschnitt 2.2.2 beschriebenen Methode aufgenommene Kraft-Abstandskurve in diesem Kraftbereich. Als Inset ist die gesamte Kraft-Abstandskurve gezeigt, mit der die

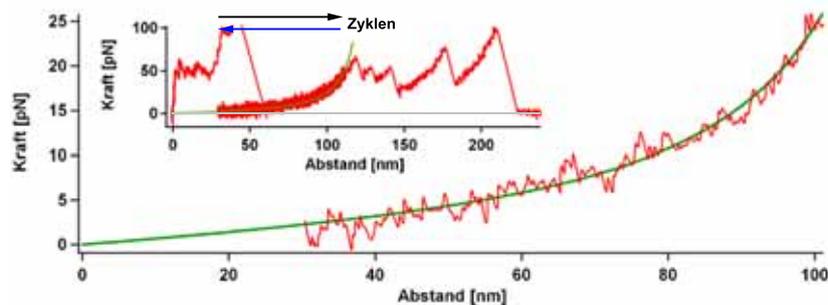


Abbildung 1.2: Gemessener (rot) und theoretischer (grün) Kraft-Abstandsverlauf eines Polypeptids. Die Mittelung zur Erhöhung der Auflösung wurde zwischen den Abständen 35 und 110 nm durchgeführt, die Nullpunkte $F = 0$ und $z = 0$ ergeben sich aus dem Inset. Der theoretische Verlauf der Kraft-Abstandskurve wurde mit Formel 1.11 berechnet, als Konturlänge wurde $L = 135$ nm, als Persistenzlänge $p = 0.7$ nm verwendet.

Nullpunkte des Abstandes z und der Kraft F bestimmt werden können. Es zeigt sich, dass die Kraftantwort dieses Polypeptids mit einer Persistenzlänge von $p = 0.7$ nm sehr gut beschrieben werden kann.

1.2.3 Laterales Auftrennen einzelner Superhelices

Das mechanische Auftrennen von Superhelices durch eine lateral zur Superhelixachse anliegende Kraft („unzipping“) zeigt viele Ähnlichkeiten zum mechanischen unzipping einzelner DNA-Stränge [15]. Dies wurde bereits von Bockelmann *et al.* experimentell untersucht und durch ein theoretisches Modell, welches auf der Annahme thermodynamischen Gleichgewichts basiert, beschrieben [16][17]. Im Folgenden soll das Modell von Bockelmann *et al.* auf das Unzippen von Superhelices angewandt werden. Abbildung 1.3 zeigt schematisch den dafür verwendeten, experimentellen Aufbau. Die Superhelix (in Abbildung 1.3

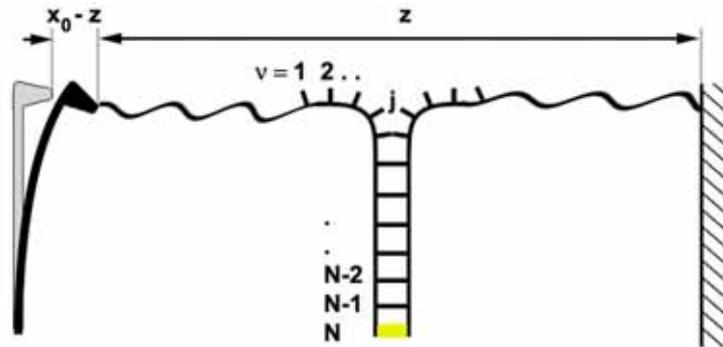


Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau des Experiments zum mechanischen Entwinden einer Superhelix mit N Windungen (Angelehnt an [17]). Der Abstand der nicht ausgelenkten Feder Spitze von der Unterlage ist x_0 , der End-zu-End Abstand der Superhelix zusammen mit dem Trägerprotein ist z . In gelb ist das die beiden α -Helices kovalent verbindende Cystein eingezeichnet.

als Leiter dargestellt) ist über ein Trägerprotein, welches in der Beschreibung als entropische Kette angesehen werden soll, an die Spitze einer Blattfeder und eine Unterlage gebunden. Der End-zu-End Abstand des gesamten Moleküls (Trägerprotein und Superhelix) ist mit z bezeichnet, der Abstand der nicht ausgelenkten Blattfeder zur Unterlage mit x_0 . Diese Abstände können im Experiment gemessen werden (siehe Anhang B.2.1). Zur Vereinfachung ist die Superhelix aus zwei linearen Stängen gezeichnet, die miteinander in diskreten Abständen „Bindungen“ eingehen können. Da die Kraft des Systems lateral zur Superhelixachse anliegt, werden diese Bindungen sequentiell belastet und können so aufbrechen (in Abbildung 1.3 durch $j = 4$ geöffnete Bindungen verdeutlicht). Die letzte Bindung der Superhelix N (in Abbildung 1.3 gelb gekennzeichnet) kann dabei nicht aufgebrochen werden. Für die Beschreibung kann man als Vereinfachung annehmen, dass sich alle 3.5 Aminosäuren eine Bindung zwischen den sich gegenüberliegenden α -Helices ausbildet. Dies lässt sich durch die intermolekular wechselwirkenden Aminosäuren an den a- und d-Positionen einer Heptade rechtfertigen. Diese Darstellung der Superhelix beinhaltet mehrere Vereinfachungen: In einer realen Superhelix besteht eine α -helikale Windung aus 3.6 Aminosäuren, wodurch sich beide α -Helices umeinander winden. Die reale, noch gefaltete Superhelix wird also durch den unzipping Vorgang in der Lösung rotieren. Dadurch auftretende Reibungseffekte werden somit in unserer Beschreibung vernachlässigt. Außerdem

bezeichnet das „Brechen einer Bindung“ den komplexen Vorgang der gesamten Entfaltung einer Windung. Der Konturlängenzuwachs, der durch solch einen Bindungsbruch entsteht, lässt sich durch die Konturlänge von 3.5 entfalteten Aminosäuren auf beiden Seiten zu $2 \cdot 3.5 \cdot 0.365$ nm berechnen [18]. Dabei wurde angenommen, dass die Entfaltung symmetrisch ist, d.h., dass immer eine α -helikale Windung des einen Stranges gleichzeitig mit der α -helikalen Windung des anderen Stranges entfaltet.

Für eine feste Piezoposition x_0 lässt sich ein bestimmter Zustand des gesamten Systems durch Angabe des End-zu-End Abstandes z und der Zahl geöffneter Windungen j eindeutig festlegen. Der Erwartungswert einer Observablen O des Systems, wie beispielsweise der Kraft F lässt sich dann mit Gleichung 1.9 bestimmen, wobei über alle Zustände $n = j, z$ des Systems summiert werden muss. Es ergibt sich als Erwartungswert der Kraft:

$$\langle F(x_0) \rangle = \frac{\sum_{j,z} F(j, z, x_0) e^{-E_{\text{ges}}(j,z,x_0)/k_B T}}{\sum_{j,z} e^{-E_{\text{ges}}(j,z,x_0)/k_B T}} \quad (1.12)$$

Um die Summation numerisch ausführen zu können, müssen noch die Werte $F(j, z, x_0)$ und $E_{\text{ges}}(j, z, x_0)$ jedes einnehmbaren Zustandes berechnet werden. Mit den Längen x_0 und z lässt sich die Verbiegung der Blattfeder und somit auch die Kraft zu $F(z, x_0) = k_c(x_0 - z)$ für die einzelnen Zustände bestimmen. Die Bestimmung der Werte $E_{\text{ges}}(j, z, x_0)$ wird im folgenden Abschnitt erklärt.

Energiebeiträge im kraftspektroskopischen Experiment

Die in dem in Abbildung 1.3 beschriebenen System auftretenden Energien lassen sich durch drei Teilenergien zusammenfassen: Die Energie zum Biegen der Blattfeder E_{fed} , die Energie zum Strecken der entropischen Kette E_{WLC} und die Energie zum Auftrennen von j Windungen E_{unz} . Für jeden durch j und z spezifizierten Zustand des Gesamtsystems lassen sich diese Energien berechnen. Kennt man die Federkonstante k_c der Blattfeder, so lässt sich E_{fed} mit

$$E_{\text{fed}}(z, x_0) = \frac{k_c}{2} (x_0 - z)^2 \quad (1.13)$$

bestimmen. Die Energie, die benötigt wird, um die entropische Kette auf die Länge z zu strecken, lässt sich durch

$$E_{\text{WLC}}(j, z) = \int_0^z F(L(j), z') dz' \quad (1.14)$$

ausdrücken. Dabei bezeichnet F die an den Enden einer entropischen Kette der Konturlänge $L(j)$ auftretende Kraft. Für Polypeptide hat sich als Kraft-Abstandsbeschreibung die Interpolationsformel des WLC-Modells bewährt, die hier mit einer Persistenzlänge von $p = 0.7$ nm verwendet wird (Gleichung 1.11 in Abschnitt 1.2.2). Zu beachten ist, dass diese Energie nicht nur vom End-zu-End Abstand z abhängt, sondern auch von der Anzahl

bereits geöffneter Windungen j der Superhelix, da sich die Konturlänge $L(j)$ der gesamten entropischen Kette aus der Konturlänge des Trägerproteins und der Konturlänge aller entfalteten Superhelix-Windungen zusammensetzt. Die Energien E_{fed} und E_{WLC} beinhalten also nur bekannte Größen, die sich ohne weitere Fitparameter angeben lassen.

Der letzte Energiebeitrag E_{unz} , der das Unzippen von j Windungen beschreibt, lässt sich durch Summation über die Energien E_{SH} , die zum Auftrennen einer einzelnen Windung ν nötig sind, bestimmen.

$$E_{\text{unz}}(j) = \sum_{\nu=1}^j E_{\text{SH}}^{\nu} \quad (1.15)$$

Die Energie E_{SH}^{ν} setzt sich dabei aus allen, beim Aufbrechen einer α -Helix Windung auftretenden Energien zusammen und hängt daher auf komplexe Weise von der Sequenz der Aminosäuren innerhalb der Windung, aber auch von den, die Windung umgebenden Aminosäuren ab. Dieses Modell erlaubt es prinzipiell für jede Windung der Superhelix einen freien Fitparameter E_{SH}^{ν} einzuführen, wodurch die eindeutige Bestimmung dieser Parameter aus einer begrenzten Anzahl von Experimenten unmöglich wird. Durch speziell gewählte Randbedingungen lässt sich aber die Anzahl der unterschiedlichen Parameter E_{SH}^{ν} einschränken, so dass diese bestimmbar werden. Dies wird in Abschnitt 2.3.1 anhand der LZ26-Superhelix gezeigt.

Die Energie $E_{\text{ges}}(j, z, x_0)$ in Gleichung 1.12 ergibt sich dann durch Addition der einzelnen Teilenergien:

$$E_{\text{ges}}(j, z, x_0) = E_{\text{unz}}(j) + E_{\text{WLC}}(j, z) + E_{\text{fed}}(z, x_0) \quad (1.16)$$

Abbildung 1.4 zeigt, wie sich die Energie E_{ges} durch das Entfernen der Blattfeder von der Oberfläche verändert. Zur Veranschaulichung wurde eine Superhelix mit zehn Windungen gewählt, wovon die ersten sechs Windungen stabilisierende Energien $E_{\text{SH}}^{\nu=1..6} = 5 k_B T$ aufweisen und die letzten vier Windungen destabilisierende Energien $E_{\text{SH}}^{\nu=7..10} = -2 k_B T$. Die Superhelix ist über eine entropische Kette der Länge $L_0 = 120$ nm zwischen Blattfederspitze und Oberfläche verankert. Für die Energie $E_{\text{unz}}(j)$, die nur von der Anzahl offener Windungen j und nicht von den Abständen x_0 und z abhängt, ergibt sich das in Abbildung 1.4 a) gezeigte Bild. Die vom System einnehmbaren Zustände sind hier, um die Beschreibung einfach zu halten, durch ganzzahlig geöffnete Windungen gegeben. Wenn die Abstände x_0 und z Null sind, also keine Kraft auf die Superhelix wirkt, dann verschwinden die Energiebeiträge E_{fed} und E_{WLC} . Abbildung 1.4 a) zeigt also die der Superhelix zugehörige Energielandschaft ohne anliegende Kraft. Unter Krafeeinfluss werden die Energiebeiträge E_{fed} und E_{WLC} von Bedeutung und sind in Abbildung 1.4 b) und c) für die realistischen Auslenkungen $x_0 = 86$ nm und $z = 84$ nm gezeigt. Bei einer Federkonstante k_c von 8 pN/nm entspricht dies etwa einer anliegenden Kraft von 16 pN. Die Energie E_{fed} hängt nur von der Auslenkung $(x_0 - z)$ ab und ist daher unabhängig von der Zahl geöffneter Windungen ca. $4 k_B T$. Um die angegebenen Abstände x_0 und z zu erreichen, ist auch eine Energie zum Strecken der entropischen Kette E_{WLC} aufgewandt worden. Diese Energie ist in Abbildung 1.4 c) gezeigt. Mit mehr geöffneten Windungen j , die die Konturlänge der entropischen Kette verlängern, wird dieser Energiebeitrag

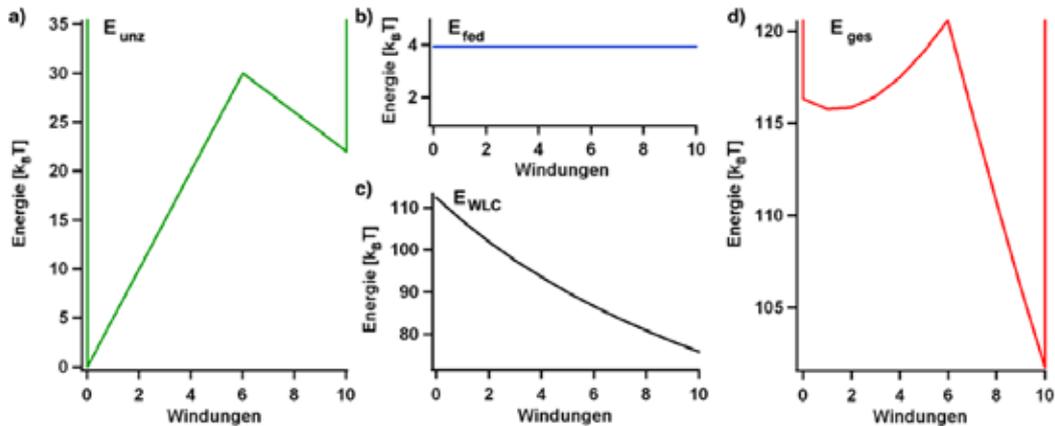


Abbildung 1.4: Energiebeiträge zur Berechnung der Gesamtenergie des Systems E_{ges} mit anliegender Kraft. Gezeigt sind für die konstanten Abstände z und x_0 die Energien a) E_{unz} , b) E_{fed} und c) E_{WLC} . Addiert ergeben sie die in d) gezeigte, „verkippte“ Energielandschaft E_{ges} . Ist das System nicht ausgelenkt, also ohne anliegende Kraft, so ergibt sich mit $E_{\text{fed}} = E_{\text{WLC}} = 0$ als Gesamtenergie die in a) gezeigte Energielandschaft.

kleiner, da es weniger Arbeit erfordert, eine längere Kette auf den gleichen Abstand z zu dehnen. Addiert ergeben diese drei Energien die in Abbildung 1.4 d) gezeigte, „verkippte“ Energielandschaft. Dabei ist insgesamt mehr Energie im System gespeichert und die gesamte Energie des Systems mit 10 offenen Windungen ist jetzt kleiner als die mit Null geöffneten Windungen. Mit Gleichung 1.8 bedeutet dies, dass es für die gezeigten Werte x_0 und z wahrscheinlicher ist, die Superhelix völlig entfaltet vorzufinden, als völlig gefaltet. Durch Anlegen einer Kraft wird also die Superhelix entfaltet. Bei der hier gezeigten Energielandschaft zeigt sich zusätzlich, dass der Zustand mit sechs entfaltenen Windungen immer die höchste Energie besitzt. Dieser Zustand wird also nur mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit besetzt werden. Als weiteres Detail ist zu nennen, dass es in der in Abbildung 1.4 d) gezeigten Energielandschaft unter Krafteinfluss wahrscheinlicher ist, eine Superhelix mit einer oder zwei entfaltenen Windungen zu finden, als eine völlig gefaltete.

Kennt man die Energielandschaft E_{ges} , so lässt sich mit Formel 1.12 der Erwartungswert der Kraft für konstante Abstände x_0 berechnen. In Abbildung 1.5 a) ist dies für die in Abbildung 1.4 erklärte Energielandschaft gezeigt. Mit steigendem Abstand x_0 steigt die Kraft auf das System durch das Dehnen der entropischen Kette und der Blattfeder. Bei etwa 76 nm Auslenkung findet der Übergang zwischen gefalteter und entfalteter Superhelix statt. Da durch das Entfalten der letzten vier Windungen Energie frei wird und die entfaltete Superhelix zu einer verlängerten entropischen Kette führt, sinkt die mittlere Kraft in diesem Bereich. Mit Formel 1.12 können außer der Kraft auch die Erwartungswerte weiterer Observablen berechnet werden. Abbildung 1.5 b) zeigt für die in Abbildung 1.4 erklärte Energielandschaft den Erwartungswert der offenen Windungen $\langle j \rangle$, in Abbildung 1.5 c) ist deren Varianz $\text{var}(j) = \langle j^2 \rangle - \langle j \rangle^2$ zu sehen. Wie schon in Abbildung 1.5 a) zu sehen ist, findet in diesem Beispiel bei einer Piezoposition von $x_0 = 76$ nm die Entfaltung der Super-

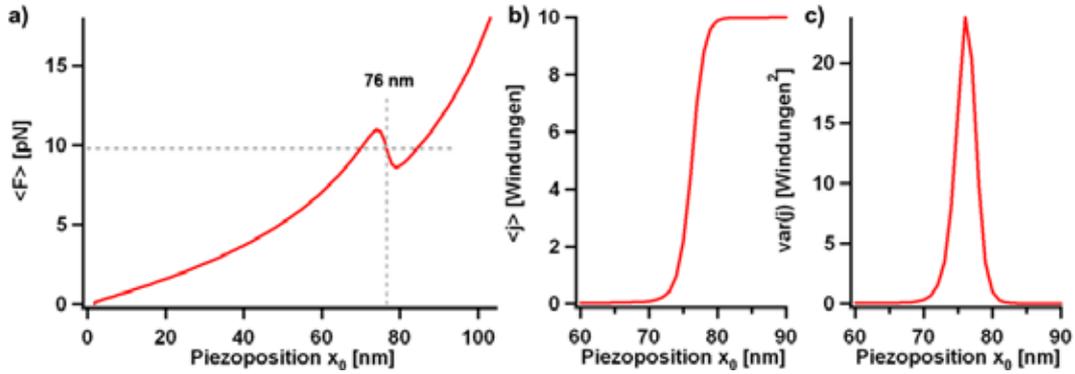


Abbildung 1.5: a) Mittlere Kraft $\langle F \rangle$ in Abhängigkeit der Piezoposition x_0 für die in Abbildung 1.4 gezeigte Energielandschaft. Bei $x_0 = 76$ nm und einer anliegenden Kraft von ca. 10 pN wechselt die Superhelix vom gefalteten zum entfalteten Zustand. Dies ist in b) durch die mittleren geöffneten Superhelixwindungen $\langle j \rangle$ in Abhängigkeit von x_0 dargestellt. c) Varianz $\langle j^2 \rangle - \langle j \rangle^2$ der geöffneten Superhelixwindungen.

helix statt, wobei nur an dieser Position eine hohe Varianz der geöffneten Windungen zu beobachten ist³. Eine genaue Analyse der Varianz und der damit verbundenen Auflösung des Messsystems wird in Abschnitt 2.3.1 am Beispiel der LZ26-Superhelix erläutert. Mit der mittleren Kraft für eine Piezoposition x_0 lassen sich über $z = x_0 - \langle F \rangle / k_c$ die im Folgenden in dieser Arbeit gezeigten, theoretischen Kraft-Abstandskurven $\langle F(z) \rangle$ berechnen.

1.2.4 Das Überstrecken von Superhelices

Auch das Überstrecken einzelner Superhelices weist große Ähnlichkeiten mit dem Überstrecken doppelsträngiger DNA auf [6][19]. Für eine theoretische Beschreibung kann man das jeweilige Molekül in N Untereinheiten unterteilen, die in zwei Konformationen (1) und (2) vorliegen können. Die Konformation (1) entspricht dabei der gefalteten und die Konformation (2) die der entfalteten, bzw. überstreckten Form. Schematisch ist dies in Abbildung 1.6 für eine Superhelix mit $N = 11$ Untereinheiten gezeigt. Dabei hat die gefaltete Form die Konturlänge L_1 während die überstreckte Form eine größere Länge L_2 aufweist. Die gefaltete Form der Konturlänge L_1 kann also als kleinste, kooperativ entfaltende Untereinheit gesehen werden. Unter der Annahme, dass die Übergänge (1) \rightleftharpoons (2) innerhalb der experimentellen Bedingungen im thermodynamischen Gleichgewicht ablaufen, lässt sich für eine genügend große Anzahl an Untereinheiten N das Verhältnis von

³Beim Übergang der gefalteten zur entfalteten Superhelix haben die Fluktuationen des Systems ($\sigma = \sqrt{\text{var}(j)} \approx 5$ Windungen) die selbe Größenordnung, wie das untersuchte System selbst. Da in unseren Experimenten der End-zu-End Abstand z kontrolliert wird und die Kraft F eine Messgröße ist, ist das zugeordnete Potential das der Gibbs'schen freien Energie G . Dieses kann mit der Näherung einer unendlich weichen Blattfeder, die anschaulich einer Maxwellkonstruktion entspricht, oder durch Legendretransformation in G' überführt werden [10]. Für eine serielle Belastung mehrerer Superhelices (Abschnitt 2.3.3) werden die relativen Fluktuationen kleiner und die Gleichungen 1.3 und 1.4 wieder auf natürliche Weise ineinander überführbar.

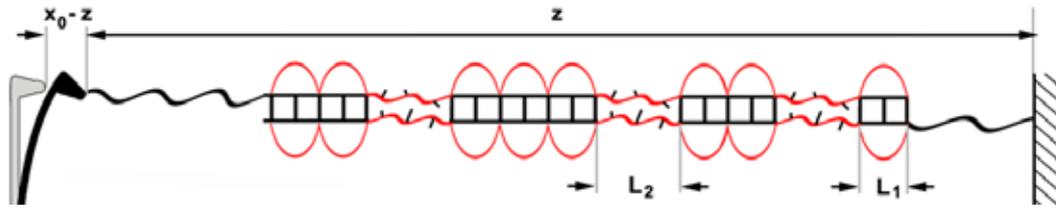


Abbildung 1.6: Schematischer Aufbau zum Überstrecken von Superhelices. Die Superhelix lässt sich in kooperative Einheiten unterteilen, die in der gefalteten Form (durch Leitern gekennzeichnet) der Länge L_1 oder der entfalteten Form mit Länge L_2 vorliegen können.

überstreckten Segmenten zu gefalteten Segmenten durch eine Boltzmannverteilung angeben:

$$\frac{n_2}{n_1} = \exp\left(-\frac{\Delta G'(F)}{k_B T}\right) \quad (1.17)$$

Um die theoretische Beschreibung zu vereinfachen ist es von Vorteil, das Potential G' (Gleichung 1.4) zu verwenden und die aktuelle Ausdehnung z der gesamten Superhelix in Abhängigkeit der Variablen F zu berechnen. Die aktuelle Ausdehnung lässt sich durch

$$z_{\text{ges}}(F) = x_{\text{rel}}(F) [n_2 L_2 + n_1 L_1] \quad (1.18)$$

beschreiben, wenn die Persistenzlängen der gefalteten und der entfalteten Struktur die selben sind [19]. Dabei ist x_{rel} die zur Konturlänge L relative Länge eines Polypeptides unter Kraft und kann beispielsweise durch die Umkehrformel der Gleichung 1.11 mit $L = 1$ beschrieben werden. Da $n_1 = N - n_2$ gilt, können n_2 und n_1 in Gleichung 1.18 mit Gleichung 1.17 ersetzt werden. Es ergibt sich

$$z_{\text{ges}}(F) = x_{\text{rel}}(F) N \left[\frac{L_2}{1 + e^{\Delta G'(F)/k_B T}} + \frac{L_1}{1 + e^{-\Delta G'(F)/k_B T}} \right] \quad (1.19)$$

Der Energieunterschied $\Delta G'(F)$ zwischen einer entfalteten oder gefalteten Untereinheit hängt von der aktuell anliegenden Kraft ab. Bei der Beschreibung durch das Potential G' findet eine Entfaltung bei konstanter Kraft statt, die dadurch freiwerdende Energie lässt sich als $x_{\text{rel}}(F)(L_2 - L_1)F$ angeben. Allerdings muss nach der Entfaltung ein Polypeptid der Konturlänge L_2 auf die Kraft F gestreckt werden, was mehr Energie kostet als die Dehnung des Polypeptides der Konturlänge L_1 zur selben Kraft. Diese Beiträge zusammen verändern die Gleichgewichtsenergie der kooperativen Untereinheit ohne anliegende Kraft ΔG_0 wie folgt

$$\Delta G'(F) = \Delta G_0 - x_{\text{rel}}(L_2 - L_1)F + \int_0^F z(F, L_2) dF - \int_0^F z(F, L_1) dF \quad (1.20)$$

Es ist bemerkenswert, dass mit einer analytisch integrierbaren Funktion von $z(F, L)$, die Überstreckung eines Moleküls analytisch durch Formel 1.19 beschrieben werden kann. Abbildung 1.7 zeigt in rot eine sich aus Gleichung 1.19 ergebende, beispielhafte Kraft-Abstandskurve. Für die Berechnung wurde eine zusätzliche entropische Kette angenom-

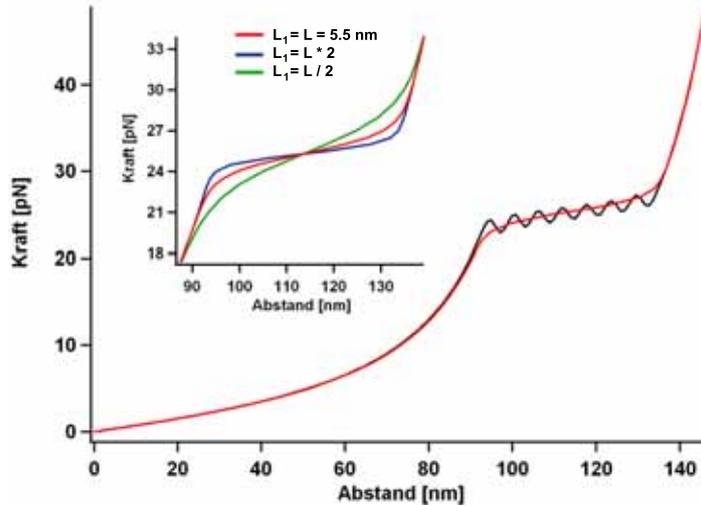


Abbildung 1.7: Kraft-Abstandskurve einer überdehnten Superhelix. Für die Abbildung wurde das Ergebnis aus Gleichung 1.19 invertiert. Es wurde eine Superhelix von 38.5 nm Länge überdehnt. Unterteilt man sie in 7 Untereinheiten von je 5.5 nm Länge, die sich mit einem Energieaufwand von $\Delta G_0 = 25k_B T$ um das 2.3-fache dehnen können, ergibt sich mit Gleichung 1.19 die in rot gezeigte Kurve. Eine Berechnung des selben Aufbaus mit Formel 1.22 ergibt die in schwarz gezeigte Kurve. Der Inset zeigt die Abhängigkeit der Steigung im Schmelzbereich von der Größe der kleinsten kooperativen Einheit L_1 .

men, über die die Superhelices mit der Blattfeder und der Unterlage verbunden sind; $z(F, L_i)$ wurde durch die Umkehrformel von Gleichung 1.11 bestimmt. Mit den für Superhelices typischen Parametern (siehe auch Kapitel 2.3.3), schmelzen bei einer Kraft von ca. 25 pN die einzelnen kooperativen Untereinheiten der Länge L_1 auf. Dabei hängt die Steigung dieses Kraftplateaus von der Größe der kooperativen Untereinheiten ab. Diese lässt sich über Formel 1.17 zu

$$L_1 \approx \frac{4k_B T}{1.3x_{\text{rel}}(F)\Delta F} \quad (1.21)$$

abschätzen⁴. Dabei bezeichnet ΔF die Differenz der Kräfte zu Beginn und zum Ende des Kraftplateaus. Eine größere Untereinheit führt also zu einem flacheren Kraftplateau, was im Inset in Abbildung 1.7 gezeigt ist. Für die Berechnung der blauen Kurve wurde beispielsweise die Länge der kooperativen Untereinheit L_1 und die für die Entfaltung nötige Gleichgewichtsenergie ΔG_0 verdoppelt, dafür muss die Gesamtzahl der Untereinheiten halbiert werden.

Das oben gezeigte Kraft-Abstandsverhalten kann auch innerhalb des Potentials der freien Energie G (Gleichung 1.3) mit Hilfe der Zustandssumme 1.12 hergeleitet werden, wenn

⁴Die Herleitung ist in [6] Gleichung (32)-(34) zu finden, dabei werden die energetischen Terme der WLC-Dehnung vernachlässigt. Für eine Beschreibung der Superhelices wurde angenommen, dass sie bei einer Überdehnung um den Faktor 2.3 gestreckt werden, außerdem muss die relative Ausdehnung $x_{\text{rel}}(F)$ bei einer Kraft berücksichtigt werden, da die Persistenzlänge entfalteter Polypeptide kleiner ist als die doppelsträngiger DNA.

die Näherung $k_{\text{fed}} \rightarrow \infty$ gemacht wird. In der Überstreckungsgeometrie ist die exakte Energielandschaft in Abhängigkeit von der Ausdehnung der Untereinheiten nicht bekannt. Es erscheint jedoch nahe liegend, ein Zwei-Zustandsmodell für die einzelnen Untereinheiten anzunehmen. Die Energielandschaft E_{SH} aus Abschnitt 1.2.3 reduziert sich in dieser Krafrichtung also auf zwei Werte: Bei einer Ausdehnung L_1 von beispielsweise 5.5 nm ist die Untereinheit völlig gefaltet und $E_{\text{SH}}^1 = 0 k_B T$. Ist die Untereinheit völlig entfaltet, hat sie eine Ausdehnung L_2 von 12.7 nm und es musste eine Energie von $E_{\text{SH}}^2 = \Delta G_0$ aufgewandt werden. Für sieben sich seriell in der Überstreckungsgeometrie befindender Untereinheiten schreibt sich die Zustandssumme wie in Gleichung 1.9, allerdings muss über sieben Untereinheiten i, j, \dots, o summiert werden.

$$\langle F(x_0) \rangle = \frac{\sum_{i, \dots, o, z} F(i, \dots, o, z, x_0) e^{-E_{\text{ges}}(j, \dots, o, z, x_0)/k_B T}}{\sum_{i, \dots, o, z} e^{-E_{\text{ges}}(i, \dots, o, z, x_0)/k_B T}} \quad (1.22)$$

Berechnung der Gleichung 1.22 liefert den in Abbildung 1.7 in schwarz gezeigten Kraftverlauf. Er ist bis auf die Fluktuationen im Kraftplateau identisch mit dem im Potential G' berechneten Verhalten. Dieses Beispiel zeigt sehr schön die Äquivalenz der Beschreibungen durch die Potentiale G und G' . Dies liegt unter anderem daran, dass die Varianz der insgesamt geöffneten Untereinheiten ($\text{var}(n_2) < 0.25$) sehr klein im Vergleich zur Anzahl der Untereinheiten ist. Durch die begrenzte Auflösung der experimentellen Daten in Abschnitt 2.3.3 wird sich zeigen, dass die Beschreibung durch das Potential G' mit der Näherung $N \rightarrow \infty$ schon für sehr kleine N von ca. 5 Untereinheiten verwendet werden kann.

1.3 Beschreibung im thermodynamischen Nichtgleichgewicht

1.3.1 Konformationsübergänge unter Kraft

Legt man eine mechanische Kraft an einzelne, globuläre Proteine, so erscheint deren Entfaltung und Faltung in einem kraftspektroskopischen Experiment als sehr kooperativer Prozess, bei dem mehrere Sekundärstrukturelemente gleichzeitig zwischen gefaltetem und entfaltetem Zustand wechseln. So können häufig nur zwei Zustände, der völlig gefaltete Zustand (1) und der völlig entfaltete Zustand (2), zwischen denen das Protein wechseln kann, detektiert werden [20].



Der gefaltete Zustand des Proteins lässt sich als Minimum einer Energielandschaft beschreiben. Für den Übergang zum entfaltetem Zustand muss das Protein zu einem

Übergangszustand (TS) der Energie $\Delta G_{\text{off}}^{(1)}$ diffundieren. Die Höhe dieser Energiebarriere bestimmt über eine Arrhenius-ähnliche Gleichung die Raten, mit der die Übergänge stattfinden können [7][21].

$$k_{\text{off}}^{(1)} = k_T \exp\left(-\frac{\Delta G_{\text{off}}^{(1)}}{k_B T}\right) \quad k_{\text{on}}^{(2)} = k_T \exp\left(-\frac{\Delta G_{\text{on}}^{(2)}}{k_B T}\right) \quad (1.24)$$

Dabei beschreibt der Vorfaktor k_T die natürliche Rate, mit der die Übergänge ohne die, sie trennende Energiebarriere stattfinden würden. Der Vorfaktor hängt vom untersuchten System ab, für die Proteinfaltung kann er mit der Kramers-Raten-Theorie berechnet werden [7]. In dieser Arbeit wird als Vereinfachung angenommen, dass die Vorfaktoren der Hin- bzw Rückrate gleich sind, was in der Kramers-Raten-Theorie nicht zutreffen muss. Experimentell kann der Vorfaktor beispielsweise als die Rate gesehen werden, mit der sich statistisch unkorrelierte Polypeptidschlaufen bilden können [22]. In dieser Arbeit wird $k_T = 10^7 \text{ s}^{-1}$ angenommen.

Sind die on- und off-Raten des Übergangs viel schneller als die Zeitauflösung des detektierenden Messsystems, so wird der Übergang für den Betrachter im Gleichgewicht stattfinden, die Beschreibung der Konformationsübergänge kann innerhalb des Ratenmodells also sowohl im Gleichgewicht als auch im Nichtgleichgewicht erfolgen. Kennt man sowohl die Entfaltungs- als auch die Faltungsraten, so lässt sich die Gleichgewichtskonstante K_0 angeben.

$$K_0 = \frac{k_{\text{off}}^{(1)}}{k_{\text{on}}^{(2)}} = \exp\left(-\frac{\Delta G_{\text{off}}^{(1)} - \Delta G_{\text{on}}^{(2)}}{k_B T}\right) = \exp\left(-\frac{\Delta G_0}{k_B T}\right) \quad (1.25)$$

Befindet sich das Protein kraftfrei in Lösung, so ist die Energielandschaft durch die Energien der intramolekularen Wechselwirkungen des Proteins gegeben. In der Nomenklatur des Abschnitts 1.2.3 wurde dies durch die Energie E_{unz} beschrieben. Allerdings sind für die Beschreibung innerhalb des Ratenmodells nur die Energien der Zustände (1) und (2) (grüne Punkte in Abbildung 1.8 a)) und der Energiebarriere (grünes Quadrat in 1.8 a)) von Bedeutung. Da beim unzippen von Superhelices die Ausdehnung des Proteins eng mit der Entfaltung einzelner Windungen verbunden ist, bekommt die Position des Übergangszustandes (TS) eine anschauliche Bedeutung. Durch thermische Fluktuationen müssen $\Delta x_{\text{off}}^{(1)}$ Windungen entfalten, damit die Superhelix in den völlig entfalteten Zustand (2) übergehen kann. Die Höhe der diesen Schritt limitierenden Energiebarriere $\Delta G_{\text{off}}^{(1)}$ kann in einem kraftspektroskopischen Experiment durch das Entfernen der Blattfeder von der Oberfläche verändert werden. Um das „Verkippen“ der Energielandschaft unter Kraft des Ratenmodells vergleichbar mit dem des Gleichgewichtsmodells zu halten, ist es nahe liegend, die Änderung der Energiebarriere mit den energetischen Beiträgen aus Abschnitt 1.2.3 zu berechnen. Der Boltzmannfaktor in den jeweiligen Raten der Gleichungen 1.24 ergibt sich dann zu

$$\Delta G_{\text{off}}^{(1)} = E_{\text{ges}}^{\text{TS}} - E_{\text{ges}}^{(1)} \quad \text{und} \quad \Delta G_{\text{on}}^{(2)} = E_{\text{ges}}^{\text{TS}} - E_{\text{ges}}^{(2)} \quad (1.26)$$

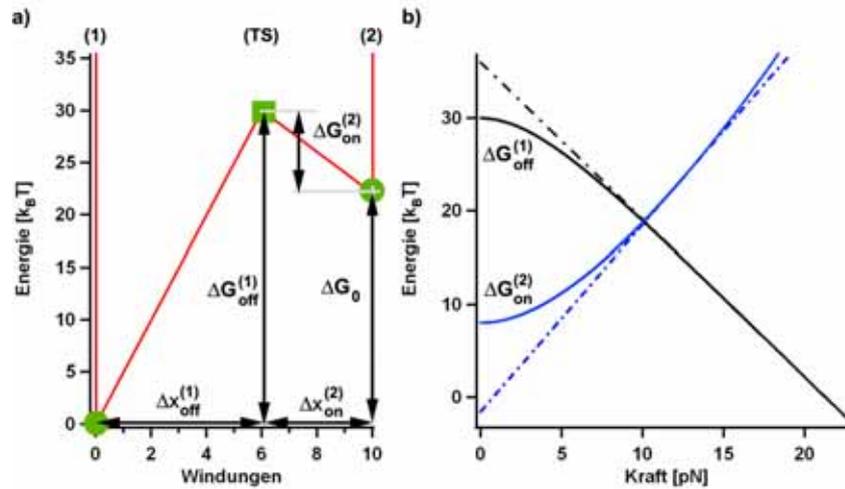


Abbildung 1.8: a) Beispielhafte Energielandschaft für das Ratenmodell. Die Übergangsraten zwischen den Zuständen (1) und (2) werden nur durch die Höhe der Energiebarriere an der Position (TS) bestimmt. Die Breiten der Barrieren $\Delta x_{\text{on/off}}$ beziehen sich immer auf die Konturlängen der entfaltenden oder faltenden Windungen b) Energiebarrieren bei angelegter Kraft. Für deren Berechnung mit Gleichung 1.16 wurde die Blattfeder vernachlässigt. Gestrichelt ist die Näherung des Zusammenhangs zwischen Barrierenhöhe und Kraft im Modell von Bell [23] gezeigt. Für die Untersuchung von Superhelices ist diese Näherung nicht mehr gültig.

wobei sich E_{ges} mit Gleichung 1.16 in Abhängigkeit einer anliegenden Kraft F berechnen lässt⁵.

Durch das Entfernen der Blattfeder von der Oberfläche, also durch Erhöhen der am Protein anliegenden Kraft F , sinkt die Entfaltungsbarriere $\Delta G_{\text{off}}^{(1)}$ und es vergrößert sich die Faltungsbarriere $\Delta G_{\text{on}}^{(2)}$. Abbildung 1.8 b) zeigt dies für die in Abbildung 1.8 a) beispielhaft gezeigte Energielandschaft. Zur Berechnung wurde eine zusätzliche, das Protein mit Unterlage und Spitze des Kraftmikroskops verbindende, entropische Kette mit einer Konturlänge von $L_0 = 120$ nm verwendet. Die Form der Graphen in Abbildung 1.8 hängt nur von den elastischen Eigenschaften der entropischen Kette und der Form der Energielandschaft E_{unz} ab. Die Barrieren $\Delta G_{\text{off}}^{(1)}$ und $\Delta G_{\text{on}}^{(2)}$ schneiden sich in diesem Beispiel bei ca. 10 pN, d.h. im thermodynamischen Gleichgewicht sind dort die Zustände (1) und (2) gleich wahrscheinlich (vgl. Abbildung 1.5 a)).

In mechanischen Entfaltungsexperimenten wird oft die Näherung von Bell [23] und Evans [21] verwendet, um die Abhängigkeit der Energiebarriere von der äußeren Kraft zu

⁵Die Werte E_{ges} sind für alle einnehmbaren Zustände des gesamten Systems (j, x_0, z) definiert. Für eine bestimmte, konstante Kraft F , die durch eine Auslenkung $(x_0 - z)$ am Protein anliegt, lassen sich die Zustände auf einen reduzieren. Dazu definiert man die Piezoposition x_0 und den Abstand z so, dass die entropische Kette mit $j = 0$ offenen Windungen gerade die Kraft aufbringt, die an der Blattfeder anliegt. Die Superhelix testet dann alle Konformationen j , während die Blattfeder unbewegt bleibt. Die Eigenschaften der Blattfeder auf die Energiebarrieren werden also vernachlässigt. In Abschnitt 1.3.3 wird der damit verbundene Fehler berechnet. Für Messsysteme mit weicherer Kraftsonde, wie beispielsweise der optischen Pinzette, kann eine andere Reduktion der Zustände (j, x_0, z) nötig werden.

beschreiben. Diese Näherung geht von einem linearen Zusammenhang zwischen anliegender Kraft und Energiebarriere aus:

$$\Delta G_{\text{off}}^{(1)} = \Delta G_{\text{off}}^{(1)}(F = 0) - F \Delta x_{\text{Bell}}^{\text{off}} \quad \text{bzw.} \quad \Delta G_{\text{on}}^{(2)} = \Delta G_{\text{on}}^{(2)}(F = 0) + F \Delta x_{\text{Bell}}^{\text{on}} \quad (1.27)$$

wobei $\Delta x_{\text{Bell}}^{\text{on/off}}$ die Breite der Barrieren als kraftunabhängigen Abstand beschreibt. In Abbildung 1.8 wurde diese Abhängigkeit an den Verlauf der Energien bei 10 pN angepasst (gestrichelte Linien). Es wird deutlich, dass die Näherung von Bell für die Beschreibung der Superhelixentfaltung nicht mehr angewandt werden kann, da die Barrierenbreiten von der anliegenden Kraft abhängen. Das Versagen der Näherung für die Entfaltung von Superhelices ist dadurch zu begründen, dass sich für sehr kleine Δx , wie sie etwa bei der Entfaltung globulärer Proteine auftreten, die elastischen Beiträge der Blattfeder und der entropischen Kette in Abhängigkeit von der Kraft F linearisieren lassen, für Δx -Werte von mehreren nm, wie sie bei der Superhelixentfaltung auftreten, ist dies nicht mehr möglich. Allerdings lassen sich durch diese Näherung die zu erwartenden Faltungs- und Entfaltungskraftverteilungen analytisch herleiten.

Nimmt man zusätzlich zur Bell-Näherung eine lineare Erhöhung der anliegenden Kraft mit der Zeit $F(t) = \eta t$ an, so lässt sich die Wahrscheinlichkeitsdichte für eine Entfaltung und somit auch die wahrscheinlichste Entfaltungskraft mit

$$\tilde{F} = \frac{k_B T}{\Delta x_{\text{Bell}}^{\text{off}}} \ln \left(\frac{\eta \Delta x_{\text{Bell}}^{\text{off}}}{k_{\text{off}}^{(1)} k_B T} \right) \quad (1.28)$$

angeben. Eine analytische Herleitung ist in [24][21] zu finden. Die wahrscheinlichste Entfaltungskraft steigt in Abhängigkeit von der Kraftladungsrate η nur logarithmisch an. Im Gegensatz dazu hat die Barrierenbreite $\Delta x_{\text{Bell}}^{\text{off}}$ einen großen Einfluss auf \tilde{F} und kann daher experimentell meist sehr genau bestimmt werden. Dies kann unter anderem durch Messen der mittleren Entfaltungskräfte bei zwei verschiedenen Ziehgeschwindigkeiten und anschließendes Bilden von $\tilde{F}(\eta_1) - \tilde{F}(\eta_2)$ erreicht werden. Wenn auch die Ermittlung der absoluten Werte von $\Delta G_{\text{on/off}}(F = 0)$ mit dieser Näherung nicht mehr exakt möglich sein wird, kann sie dennoch zur Abschätzung der Größenordnungen der Barrierenbreiten Δx herangezogen werden.

Eine weitere analytische Bestimmung der Wahrscheinlichkeitsverteilung für einen Übergang bei bestimmter Kraft ohne die Näherung von Bell lässt sich mit Hilfe der Kramers Theorie angeben [25]. In dieser Arbeit wird zur Bestimmung der Parameter ΔG und Δx aus den Daten eine Simulation des experimentellen Aufbaus vorgenommen. Diese wird im nächsten Abschnitt erklärt.

1.3.2 Monte-Carlo Simulation

Um die exakten experimentellen Bedingungen nachzustellen, die sich in einem kraftspektroskopischen Experiment mit sich konstant von der Oberfläche entfernender Blattfeder ergeben, kann eine Monte-Carlo Simulation herangezogen werden. Bei Proteinentfaltungen, die sehr weit vom thermodynamischen Gleichgewicht entfernt sind und daher bei

hohen Kräften stattfinden, lässt sich die Verteilung der Entfaltungskräfte experimentell direkt bestimmen und durch eine Simulation nachbilden [26]. Für die in dieser Arbeit gezeigten Untersuchungen an Superhelices sind die Ent- und Rückfaltungskräfte mit dem Kraftmikroskop nur noch durch Mittelungsmethoden detektierbar (siehe Abschnitt 2.2.2). Die Bestimmung der Wahrscheinlichkeitsverteilung der Entfaltungskräfte aus den experimentellen Daten ist zwar möglich (Abschnitt 2.2.3), aber nicht sehr direkt. Daher ist es nahe liegend, mit Hilfe der Monte-Carlo Simulation das gesamte experimentelle Verfahren, inklusive der Mittelung verschiedener Kraftkurven, nachzustellen. Dies soll im Folgenden für den einfachsten Fall eines Zweizustandssystems wie es in den Abschnitten 1.2.3 und 1.3.1 vorgestellt wurde, geschehen.

Um die Entfaltungskurven zu berechnen, wird ein virtuelles Polypeptid der Konturlänge $L_{(1)}$, beginnend bei $z = 0$ nm Ausdehnung in diskreten Zeitschritten dt mit einer Geschwindigkeit von $v = dx_0/dt$ gestreckt. Für jeden Zeitschritt wird dabei der Anstieg der Kraft durch die zusätzliche Ausdehnung mit Hilfe der Formel 1.11 berechnet. Abbildung 1.9 a) zeigt für Abstände unter 80 nm den sich ergebenden Kraftverlauf durch die schwarze Kurve. Mit zunehmender Dehnung wächst nach Formel 1.11 die Kraft auf die Superhelix,

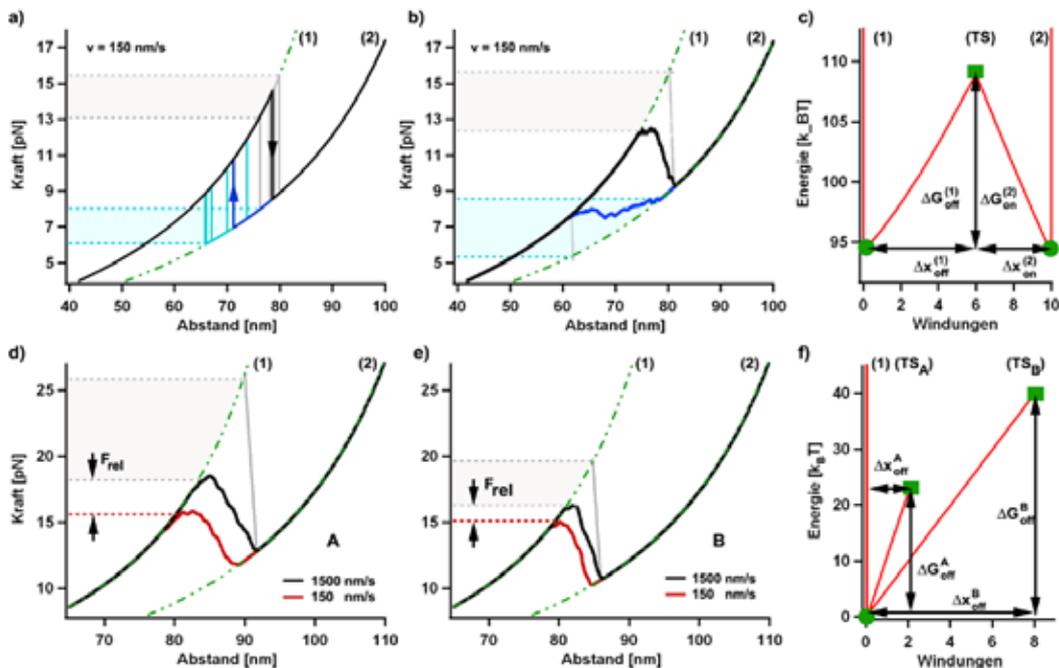


Abbildung 1.9: a) Einzelne simulierte Vorwärts- (schwarz) und Rückwärtskurven (blau). Die Kraftintervalle, in welchen die Entfaltungs- bzw. Rückfaltungsereignisse auftreten, sind grau bzw. hellblau markiert. b) Aus 30 simulierten Kraft-Abstandskurven gewonnene, mittlere Kraft-Abstandskurve. c) Für die Simulation verwendete Energielandschaft bei 10 pN anliegender Kraft. Für $F=0$ ist die Energielandschaft in Abbildung 1.8 a) zu finden. d) und e) zeigen gemittelte Vorwärtskurven bei 150 und 1500 nm/s Ziehgeschwindigkeit. Die der Simulation zu Grunde liegenden Entfaltungsbarrieren sind in f) gezeigt, die Rückfaltungsrate wurde vernachlässigt.

was zu einer Veränderung der Energiebarrieren führt. Für jeden Zeitschritt wird mit der in Abschnitt 1.3.1 erklärten Methode unter der Näherung $k_{\text{fed}} \rightarrow \infty$ die aktuelle Energielandschaft berechnet. Abbildung 1.9 c) zeigt als Beispiel die in Abbildung 1.8 a) ohne anliegende Kraft gezeigte Energielandschaft bei einer Ausdehnung von $z = 75$ nm, was einer Kraft $F = 10$ pN entspricht. Für die Monte-Carlo Simulation werden aus der errechneten Energielandschaft nur die Höhen der möglichen Übergangsbarrrieren bestimmt. Für den Fall der völlig gefalteten Superhelix im Zustand (1) ist dies nur $\Delta G_{\text{off}}^{(1)}$, da eine weitere Faltung nicht möglich ist ($\Delta G_{\text{on}}^{(1)} = \infty$). Über die Arrheniusgleichung 1.24 werden aus den kraftabhängigen Energiebarrieren $\Delta G_{\text{off}}^{(1)}$ und $\Delta G_{\text{on}}^{(1)}$ die aktuellen Übergangsraten $k_{\text{off}}^{(1)}$ und $k_{\text{on}}^{(1)}$ bestimmt. Für alle in dieser Arbeit gezeigten Berechnungen wurde der Vorfaktor zu $k_T = 10^{-7} \text{s}^{-1}$ gewählt [22]. Daraus lässt sich als Übergangswahrscheinlichkeit zum Zustand (2)

$$dP_{\text{off}}^{(1)} = k_{\text{off}}^{(1)}(F)dt \quad (1.29)$$

angeben. Eine vom Computer generierte Zufallszahl entscheidet, ob der Übergang stattfindet. Wenn ein Übergang stattfindet (wie in Abbildung 1.9 a) bei 79 nm), wechselt das System in den Zustand (2), d.h. im nächsten Zeitschritt wird eine entropische Kette der Länge $L_{(2)}$ gestreckt, wobei die Übergangsbarrrieren $\Delta G_{\text{off}}^{(2)}$ und $\Delta G_{\text{on}}^{(2)}$ des Zustandes (2) berechnet werden. Die Rückwärtskurve (blau in Abbildung 1.9 a)) wird nach dem selben Prinzip ermittelt, wobei als Startpunkt der völlig entfaltete Zustand bei Abständen z mit hohen Kräften > 200 pN gewählt wird und z sukzessive verringert wird. In der in Abbildung 1.9 a) blau gezeigten Kurve tritt eine Rückfaltung bei 72 nm auf.

Um die experimentelle Messmethode exakt nachzustellen, werden 30 solcher Vorwärts- und Rückwärtskurven simuliert. In Abbildung 1.9 a) sind einige in grau und hellblau gezeigt. Die Ent- und Rückfaltungsereignisse schwanken dabei um die Wahrscheinlichste Kraft \tilde{F} (hellblau und grau gestrichelte Intervalle in Abbildung 1.9 a)). Die simulierten Kurven werden mit der in Abschnitt 2.2.2 erklärten Methode gemittelt, das Ergebnis ist in Abbildung 1.9 b) gezeigt. Auch aus den gemittelten Kurven lässt sich die Breite der Verteilungen erkennen (grau und hellblau gestrichelte Intervalle, vgl. auch Abschnitt 2.2.3). Es ist zu beachten, dass beispielsweise die Verteilung der Rückfaltungskräfte (hellblau gestricheltes Intervall in Abbildung 1.9 a) und b)) nicht über 10 pN wachsen kann, da dort die Entfaltungsraten des Zustandes (1) bereits sehr groß sind und daher eine eventuelle Rückfaltung in den gemittelten Kurven nicht mehr detektiert werden kann. Ähnliches gilt für die untere Grenze der Entfaltungskräfte.

Im Prinzip ist es möglich, durch Anpassen der simulierten Kurven an experimentelle Daten, die bei einer Geschwindigkeit ermittelt wurden, die Parameter ΔG und Δx zu bestimmen. Allerdings sind ΔG und Δx nicht völlig voneinander unabhängig, ihre Bestimmung wäre mit einem großen Fehler behaftet. Um diesen Fehler zu verringern, kann man mittlere Ent- und Rückfaltungskurven bei verschiedenen Geschwindigkeiten aufnehmen. Abbildung 1.9 d) und e) zeigen gemittelte Vorwärtskurven bei 150 nm/s (rot) und 1500 nm/s Ziehgeschwindigkeit (schwarz). In Abbildung 1.9 d) wurde dabei als Entfaltungsbarrriere $\Delta G_{\text{off}}^A = 23 k_B T$ mit $\Delta x_{\text{off}}^A = 2$ Windungen gewählt, in Abbildung 1.9 e) $\Delta G_{\text{off}}^B = 40 k_B T$ mit $\Delta x_{\text{off}}^A = 8$ Windungen. Die Energiebarrieren sind in Abbildung 1.9 f) gezeigt.

Bei 150 nm/s zeigen beide gemittelte Vorwärtskurven, trotz unterschiedlicher ΔG und Δx Werte, ein ähnliches Verhalten. Durch die relativen Änderungen der mittleren Entfaltungskraft für unterschiedliche Ziehgeschwindigkeiten (als F_{rel} gekennzeichnet), die auch im Experiment sehr genau bestimmt werden können, lassen sich die Parameter ΔG und Δx entkoppeln und dadurch sehr genau bestimmen. Diese Beispiele zeigen auch, dass ein kleineres Δx zu einer breiteren Verteilung der Entfaltungskräfte führt (vgl. grau gestricheltes Intervall in Abbildung 1.9 d) vs. e)) und dass ein kleineres Δx eine stärkere Abhängigkeit der mittleren Entfaltungskraft von der Ziehgeschwindigkeit zeigt (vgl. F_{rel} der Abbildungen 1.9 d) und e)) [24][21]. Die Simulation des gezeigten Zweizustandssystems kann sehr leicht auf Systeme mit mehreren Zwischenzuständen erweitert werden. Befindet sich das System in einem solchen Zwischenzustand i , muss für jeden Zeitschritt die Wahrscheinlichkeit für eine Entfaltung $dP_{\text{off}}^{(i)}$ und für eine Rückfaltung $dP_{\text{on}}^{(i)}$ berechnet werden. Nötig wird dies beispielsweise für die in Abschnitt 2.4.1 simulierte LZ26-Superhelix. Es ist noch anzumerken, dass durch die Simulation der Vorwärts- und Rückwärtskurven mit der selben Energielandschaft eine weitere Randbedingung eingeführt wurde: Die Addition aller Barrieren muss die gesamte Gleichgewichtsenergie des Systems ergeben $\sum_i \Delta G_{\text{on/off}}^{(i)} = \Delta G_0$. Dies schränkt die freie Wahl der Parameter $\Delta G_{\text{on/off}}^{(i)}$ weiter ein.

1.3.3 Die Näherung unendlich steifer Blattfedern

Durch die Annahme einer unendlich steifen Blattfeder ($k_{\text{fed}} \rightarrow \infty$) lässt sich die Berechnung der Energielandschaft unter mechanischer Kraft des Gleichgewichtsmodells (Abschnitt 1.2.3) auf die Berechnung der Energiebarrieren im Ratenmodell (Abschnitt 1.3.1) übertragen. Nur mit dieser Näherung lassen sich kraftspektroskopische Experimente durch die Erweiterung der thermodynamischen Potentiale (Gleichungen 1.1 - 1.4) mit Fdz beschreiben. In realen kraftspektroskopischen Experimenten hat man aber endliche Federhärten und daher keine direkte Kontrolle über den End-zu-End Abstand z des Proteins, sondern nur über den Abstand x_0 der nicht ausgelenkten Blattfeder von der Oberfläche. Für unendlich steife Blattfedern gilt $x_0 = z$, in realistischen Experimenten ist diese Vereinfachung allerdings mit einem Fehler behaftet, der in diesem Abschnitt angegeben werden soll. Möchte man den Einfluss der Blattfeder auf die relativen Energiebarrieren nicht vernachlässigen, so ergäbe sich in einem kraftspektroskopischen Experiment mit einer Blattfeder von $k_c = 0.8$ pN/nm der in Abbildung 1.10 gezeigte Vorgang: Für die Faltung eines Proteins das als entropische Kette der Konturlänge L_2 vorliegt, muss dieses in den Übergangszustand (TS) kontrahieren, wofür sich die Blattfeder vom Punkt A zum Punkt B bewegen muss. Für Abbildung 1.10 wurden für mechanische Experimente an Superhelices beispielhafte Werte verwendet: Die Superhelix ist über eine entropische Kette mit $L_0 = 100$ nm Konturlänge zwischen Blattfeder und Unterlage eingespannt und um zur Faltungsbarriere (TS) zu gelangen, müssen sich zehn Windungen kontrahieren. Um dies zu ermöglichen müssen zusätzlich zu der dem Protein zugehörigen Barriere $\Delta G_{\text{on}}^{(2)}(F = 0) = E_{\text{unz}}(\text{TS}) - E_{\text{unz}}(2)$ weitere mechanische Energiebeiträge überwunden

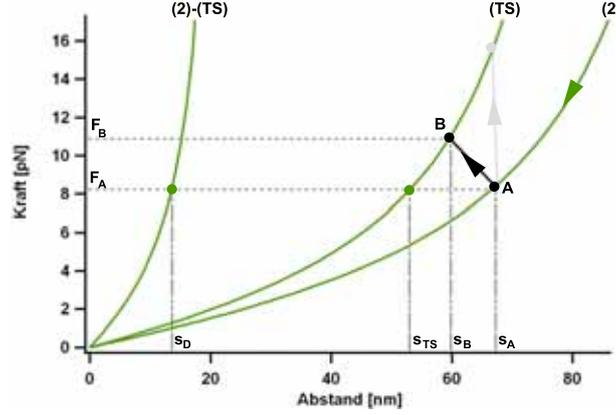


Abbildung 1.10: Kraft-Abstandskurven zur Berechnung der mechanischen Energiebarriere, die sich durch Anlegen einer Kraft an ein Protein ergibt. Zum Erreichen des Übergangszustandes (TS) muss sich das Protein vom Punkt A nach B kontrahieren. Für die in dieser Arbeit verwendeten Blattfedern würde man das von A ausgehende, grau gezeigte Verhalten der Blattfeder erwarten, was durch die relativ große Steigung die Näherung $k_{\text{fed}} \rightarrow \infty$ erlaubt.

werden [6][27]: Die Blattfeder muss sich von A nach B bewegen, was mit der Energie

$$\Delta E_{\text{fed}} = \frac{1}{2}(F_A + F_B)(s_A - s_B) \quad (1.30)$$

verbunden ist. Außerdem muss die entropische Kette der Konturlänge L_{TS} , die vor der Faltung nur bis zur Ausdehnung s_{TS} gestreckt war, nach der Faltung auf die Länge s_B gestreckt werden. Damit ist ein Energieaufwand von

$$E_S = \int_{s_{\text{TS}}}^{s_B} F_{\text{WLC}}(L_{\text{TS}}) ds \quad (1.31)$$

verbunden. F_{WLC} lässt sich dabei durch Formel 1.11 beschreiben. Nach der Faltung muss die entropische Kette der gefalteten Windungen nicht mehr gestreckt gehalten werden, wodurch Energie gewonnen wird:

$$E_D = \int_0^{s_D} F_{\text{WLC}}(L_{2-\text{TS}}) ds \quad (1.32)$$

Durch eine anliegende Kraft F_A addieren sich also zu der natürlichen Barriere ohne Kraft die Energien $E_k = E_S + E_D + E_{\text{fed}}$. Der Unterschied zwischen dieser Berechnung der Energiebarriere und der in Abschnitt 1.2.3 erklärten, lässt sich also durch $\Delta E_{\text{on}}^{(2)} - E_k$ angeben. Es ergibt sich als Unterschied⁶

⁶Aus $\Delta E_{\text{on}}^{(2)} - E_k = \int_0^{s_A} F_{\text{WLC}}(L_{\text{TS}}) dz - \int_0^{s_A} F_{\text{WLC}}(L_2) dz - \int_{s_{\text{TS}}}^{s_A} F_{\text{WLC}}(L_{\text{TS}}) dz + \int_0^{s_D} F_{\text{WLC}}(L_{2-\text{TS}}) dz - \Delta E_{\text{fed}}$ ergibt sich Formel 1.33 durch die Skalierbarkeit der WLC-Kurven $\int_0^{s_A} F_{\text{WLC}}(L_2) dz = \int_0^{s_{\text{TS}}} F_{\text{WLC}}(L_{\text{TS}}) dz + \int_0^{s_D} F_{\text{WLC}}(L_{2-\text{TS}}) dz$

$$\Delta E_{\text{on}}^{(2)} - E_k = \int_{s_B}^{s_A} F_{\text{WLC}}(L_{\text{TS}}) ds - \Delta E_{\text{fed}} \quad (1.33)$$

Je größer die Federkonstante k_{fed} der Blattfeder wird, um so steiler wird die Gerade \overline{AB} und umso näher kommen sich die Integrationsgrenzen s_B und s_A . Der Fehler verschwindet also im Grenzfall $\lim k_{\text{fed}} \rightarrow \infty$. Bei den für reale Experimente verwendeten Blattfedern mit $k_{\text{fed}} = 8 \text{ pN/nm}$ (in Abbildung 1.10 als graue Linie gezeigt) ist der Fehler bereits sehr klein, mit den hier verwendeten Parametern würde sich $\Delta E_{\text{on}}^{(2)} - E_k = 2 k_B T$ ergeben.

1.4 Fluktuationstheoreme

Ob ein thermodynamischer Prozess für den Betrachter im Gleichgewicht oder davon entfernt stattfindet, hängt von den Zeitskalen des jeweiligen Experiments ab. Die natürlichen Faltungsraten globulärer Proteine, wie beispielsweise des grün fluoreszierenden Proteins (GFP), liegen im Bereich von Minuten, während die natürlichen Entfaltungsraten bei $k_{\text{off}}^{(1)} \approx 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ liegen [28]. Soll der Übergang zwischen gefaltetem und entfaltetem Zustand $(1) \rightleftharpoons (2)$ für den Betrachter im Gleichgewicht erscheinen, müssen während der Dauer des Experiments mehrere Übergänge beobachtbar sein. Für ein einzelnes GFP läge dies im Bereich mehrerer Jahrzehnte und ist daher experimentell nicht zugänglich. Ein Ausweg sind Ensemblemessungen, bei denen durch die Mittelung über die große Zahl der Moleküle ein thermodynamisches Gleichgewicht erreicht werden kann. In den letzten 15 Jahren wurden Theorien vorgestellt, die aus Prozessen, die im Nichtgleichgewicht stattfinden, Rückschlüsse auf Gleichgewichtseigenschaften zulassen. Diese Fluktuationstheoreme sollen in diesem Abschnitt näher erklärt werden⁷.

1.4.1 Theoretische Grundlagen

Fluktuationstheoreme beziehen sich auf die Eigenschaften kleiner Bereiche eines thermodynamischen Systems, in welchem lokal und in endlichen Zeiten Verletzungen des zweiten Hauptsatzes der Thermodynamik auftreten können. Als Beispiele für solche Systeme können ein einzelnes Makromolekül in einem Wasserbad oder eine $1 \mu\text{m}$ große Kugel, die mit $1 \mu\text{m/s}$ durch Wasser gezogen wird, angesehen werden. In den Jahren 1993 und 1995 wurden erste Fluktuationstheoreme (FT) veröffentlicht. Sie beschrieben Spezialfälle thermodynamischer Systeme im Fließgleichgewicht (“steady state“-Systeme) [30][31]. Fließgleichgewicht bezeichnet dabei ein thermodynamisches System, dem kontinuierlich Wärme zugeführt wird. Es befindet sich zwar in einem stabilen Zustand, ist aber nicht abgeschlossen. 1999 wurde von Crooks eine sehr allgemeine Form eines Fluktuationstheorems gegeben [32], die eine Art generalisierte Form früherer FTs darstellt. Außerdem ist dieses

⁷Ein aktueller Überblick über Fluktuationstheoreme auf dem dieser Abschnitt aufbaut, ist in [29] zu finden.

FT sehr nah mit dem 1997 von Jarzynski bewiesenen verbunden [33]. Das FT von Crooks soll daher hier als Ausgangspunkt für eine Übersicht über die verschiedenen FTe dienen.

Betrachtet man zwei Gleichgewichtszustände (1) und (2), wie sie beispielsweise durch den gefalteten oder entfalteten Zustand eines Proteins gegeben sein können, so kann durch einen äußeren Einfluss (wie beispielsweise den der gerichteten Bewegung einer AFM-Blattfeder) der Zustand (1) in den Zustand (2) innerhalb einer endlichen Zeit t überführt werden. Dieser Übergang soll vom thermischen Gleichgewicht entfernt stattfinden, d.h. beispielsweise für die Entfaltung eines Proteins, dass der Zustand (1) im Nichtgleichgewicht in einen Übergangszustand (TS) überführt wird und von diesem in den Gleichgewichtszustand (2) relaxieren darf. Für diesen Weg wurde mechanische Arbeit E benötigt, die teilweise als Wärme an die Umgebung dissipiert. Dann wird der Prozess umgekehrt, das System wird von Zustand (2) in den Zustand (1) gebracht, wobei der äußere Einfluss die exakte Umkehrung des Vorwärtsprozesses sein muss, also auch nur die gleiche Zeit t beanspruchen darf. Auch hier wird das System erst im Nichtgleichgewicht einen Übergangszustand (TS) überwinden müssen, bevor es in den Gleichgewichtszustand (1) relaxieren darf. Dabei wird Energie frei. Wenn $P_{\text{off}}(E)$ die Wahrscheinlichkeit dafür angibt, beim Übergang (1) \rightarrow (2) die Energie E aufwenden zu müssen und $P_{\text{on}}(-E)$ die Wahrscheinlichkeit dafür, die Energie E beim umgekehrten Vorgang zu gewinnen, so schreibt sich das Fluktuationstheorem von Crooks als

$$\frac{P_{\text{off}}(E)}{P_{\text{on}}(-E)} = \exp\left(\frac{E - \Delta G}{k_B T}\right) \quad (1.34)$$

Dabei steht ΔG für den Energieunterschied der Zustände (1) und (2) im thermodynamischen Gleichgewicht. Dieses FT verbindet also die Wahrscheinlichkeit, im Nichtgleichgewicht für die Vorwärtsrichtung Energie an das System abzugeben mit der Wahrscheinlichkeit, in Rückwärtsrichtung Energie vom System zu gewinnen. Insbesondere lässt sich aus diesen Verteilungen die Gleichgewichtsenergie bestimmen. Am Schnittpunkt der Verteilungen gilt $P_{\text{off}}(E) = P_{\text{on}}(-E)$ und damit $E = \Delta G$. Diese Gleichung gilt theoretisch für Verteilungen aus Prozessen, die beliebig weit vom Gleichgewicht entfernt stattfinden. Experimentell wird aber dann die gleichzeitige Bestimmung der beiden Wahrscheinlichkeiten $P_{\text{off}}(E)$ und $P_{\text{on}}(-E)$ und damit die Bestimmung der Gleichgewichtsenergie ΔG immer schwieriger.

Läuft der Hin- und Rückprozess im Gleichgewicht ab, so darf Netto keine Energie an die Umgebung abgegeben werden, für alle E muss daher $P_{\text{off}}(E) = P_{\text{on}}(-E)$ gelten und Gleichung 1.34 entartet, sie ist also nur für Systeme im thermodynamischen Nichtgleichgewicht anwendbar.

Gleichung 1.34 ist sehr allgemein und sie ähnelt früheren FTen wie dem von Searles *et al.* oder Gallavotti *et al.* [30][31]. Diese beschäftigen sich mit turbulenten Strömungen von Systemen im Nichtgleichgewicht und stellten eine „chaotische Hypothese“ auf, die für den Grenzfall des Gleichgewichts die Ergodenhypothese beinhaltet. Eine experimentell überprüfbare Hauptaussage ihrer Arbeit bezieht sich auf die Wahrscheinlichkeitsverteilungen von lokalen Flussdichten, wie beispielsweise des Wärme- oder Entropieflusses.

Bezeichnet $J(t)$ diesen Fluss, so ist dessen Mittelwert innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls durch $J_\tau = \frac{1}{\tau} \int_t^{t+\tau} J(t) dt$ gegeben. Die chaotische Hypothese stellt dann die Wahrscheinlichkeit $P(y)$, den aus dem lokalen System austretenden Fluss $y = J_\tau/J_+$ mit der Wahrscheinlichkeit, die umgekehrte Flussrichtung $P(-y)$ zu beobachten in Beziehung:

$$\ln \frac{P_\tau(y)}{P_\tau(-y)} = \tau J_+ y \quad (1.35)$$

Dabei gibt J_+ den stationären Mittelwert des Flusses $J_+ = \lim_{\tau \rightarrow \infty} J_\tau$ an. Diese Hypothese gilt allerdings nur für den Grenzfall $\tau \rightarrow \infty$, experimentell ist sie aber dennoch überprüfbar, wenn τ sehr viel größer als eine für das System charakteristische Zeit τ_0 ist. Dabei ist τ_0 in etwa die Zeit, die das System nach einer Störung braucht, um in das Fließgleichgewicht zurückzufinden. Betrachtet man in Gleichung 1.35 den Entropiefluss $J(t) = \sigma = Q/Tt$ und setzt diesen in Gleichung 1.34 mit der dissipierten Energie gleich ($\sigma t = W_{\text{diss}}/T = (W - \Delta G)/T$), so erkennt man die Ähnlichkeit der beiden Fluktuationstheoreme [32]. Als Unterschied ist anzumerken, dass Gleichung 1.34 für beliebige Zeitintervalle gilt und sich auf die „Entropieproduktion“ bezieht, während Gleichung 1.35 nur im Grenzfall sehr großer Zeiten gültig ist und auf die Rate der „Entropieproduktion“ bezogen ist.

Das FT von Crooks ist direkt mit einem zwei Jahre zuvor von Jarzynski bewiesenem FT verbunden [33], das sich direkt aus Gleichung 1.34 durch Integration bestimmen lässt⁸.

$$\exp\left(-\frac{\Delta G}{k_B T}\right) = \left\langle \exp\left(-\frac{E}{k_B T}\right) \right\rangle \quad (1.36)$$

Dabei stehen die Klammern $\langle \dots \rangle$ für den Erwartungswert bei einem Nichtgleichgewichtsübergang (1) \rightarrow (2), wie er bereits für das FT von Crooks beschrieben wurde, den mit der dafür aufgebrauchten Arbeit verbundenen Wert $\exp(-E/k_B T)$ zu messen. Um experimentell aus Nichtgleichgewichtsmessungen ΔG bestimmen zu können, müsste also über eine unendliche Anzahl von Trajektorien (1) \rightarrow (2) gemittelt werden. Gleichung 1.36 ist bemerkenswert, weil sie die Möglichkeit aufweist, aus Nichtgleichgewichtsübergängen einer Richtung auf die Gleichgewichtsenergie des Systems zu schließen. Da die Funktion e^x konvex ist, folgt mit Hilfe der Jensenschen Ungleichung⁹ direkt aus Gleichung 1.36 für einen Übergang in Vorwärtsrichtung $\langle E \rangle \geq \Delta G$, was für makroskopische Systeme dem zweiten Hauptsatz der Thermodynamik entspricht. Dies gilt allerdings nur für den Erwartungswert der verrichteten Arbeit E , d.h. es können einzelne Ereignisse auftreten, bei denen $E \leq \Delta G$ ist, also bei welchen die Umgebung Arbeit am System verrichtet. Diese Vorgänge sind lokale Verletzungen des zweiten Hauptsatzes der Thermodynamik, aber sie sind nötig, um die mikroskopische Reversibilität zu gewährleisten [34].

⁸Betrachtet man beispielsweise nur den Pfad der Vorwärtsrichtung (1) \rightarrow (2) lässt sich der Erwartungswert $\langle e^{-(E-\Delta G)/k_B T} \rangle$ aus Gleichung 1.34 durch $\langle e^{-(E-\Delta G)/k_B T} \rangle = \int_{-\infty}^{+\infty} P_{\text{off}}(+E) e^{-(E-\Delta G)/k_B T} dE = \int_{-\infty}^{+\infty} P_{\text{on}}(-E) dE = 1$ bestimmen. Da $e^{\Delta G/k_B T}$ nicht von E abhängt ergibt sich sofort Gleichung 1.36. Natürlich gilt das FT von Jarzynski auch für den umgekehrten Vorgang (2) \rightarrow (1).

⁹Ist $f(x)$ eine konvexe Funktion und $\sum_{i=1}^N p_i = 1$ dann gilt $f(\sum_{i=1}^N p_i x_i) \leq \sum_{i=1}^N p_i f(x_i)$.

Die Gleichung 1.36 (und damit auch Gleichung 1.34) beinhaltet als Grenzfall zusätzlich eine Version des Fluktuations-Dissipations Theorems, das 1951 von Callen *et al.* gezeigt wurde [35]. Um dies zu sehen, kann man den Logarithmus des Erwartungswerts in Gleichung 1.36 als Summe von Kumulanten darstellen:

$$\Delta G = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(-k_B T)^{n-1}} \frac{\omega_n}{n!} \quad (1.37)$$

wobei ω_n die n-te Kumulante der Wahrscheinlichkeitsfunktion $P(E)$ bezeichnet [33]. Betrachtet man nur den ersten Term der Reihe $n = 1$, so erhält man $\Delta G = \langle E \rangle$, da die erste Kumulante den Erwartungswert von $P(E)$ darstellt. Dies ist für den Grenzfall zutreffend, in welchem sich das System im Gleichgewicht befindet. Da die 2te Kumulante die Varianz von $P(E)$ darstellt, ergibt sich durch Summation bis $n = 2$ aus Gleichung 1.37 $\Delta G = \langle E \rangle - \sigma^2/2k_B T$. Für eine Wahrscheinlichkeitsverteilung $P(E)$ die gaußverteilt ist, sind alle Kumulanten $\omega_n > 2 = 0$, womit die Summation abgebrochen werden kann. Ist das untersuchte System noch nahe am Gleichgewicht, so ist die Annahme einer Gaußverteilung für $P(E)$ gerechtfertigt, für diesen Grenzfall ergibt sich also eine Version des Fluktuations-Dissipationstheorems [35][36].

Die Gleichungen 1.35 und 1.36 gelten streng genommen entweder nur im Limit für unendliche Zeiten, oder für eine Mittelung über unendlich viele Ereignisse. Da diese Limits experimentell nicht erreichbar sind, bestimmten Gore *et al.* die bei einer Berechnung der Gleichgewichtsenergien aus Nichtgleichgewichtsdaten zu erwartenden Fehler bei experimentell realistischen Bedingungen [37]. Sie konnten zeigen, dass für $N < \infty$ die ΔG -Berechnung mit Gleichung 1.36 einen systematischen Fehler enthält, der mit größer werdender dissipierter Energie anwächst. Ähnliches gilt für die Varianz und den mittleren quadratischen Fehler von ΔG . Wird zuviel Energie dissipiert, so ist es selbst bei einer sehr hohen Zahl von Experimenten schwierig, ΔG mit Gleichung 1.36 exakt zu bestimmen.

1.4.2 Bisherige experimentelle Überprüfungen

Die im letzten Abschnitt beschriebenen Fluktuationstheoreme lassen sich nur lokal in sehr kleinen Bereichen beobachten; je größer der beobachtete Bereich wird, umso unwahrscheinlicher werden Verletzungen des zweiten Hauptsatzes. Aus diesem Grund wurde es erst in den letzten 20 Jahren durch neue experimentelle Methoden möglich, die Eigenschaften kleiner Systeme und die Art, wie sie Energie und Wärme mit ihrer Umgebung austauschen, zu beobachten. Ein erster experimenteller Test des FTs von Gallavotti (Gleichung 1.35) wurde 1998 von Ciliberto *et al.* gegeben [38]. Sie benutzten turbulente Rayleigh-Bénard-Konvektion, die sich in einer Flüssigkeit ausbildet, deren obere Schicht gekühlt und deren untere Schicht erhitzt wird. Dazu darf die Flüssigkeit nicht zu hohe Viskosität aufweisen, da ansonsten der Wärmestrom durch homogene Wärmeleitung stattfindet. In einem solchen Experiment findet der Großteil der Wärmeübertragung durch Konvektion statt, d.h. der lokale Wärmefluss sollte der lokalen Temperatur proportional sein ($J(t) \sim \Theta(t)$), wodurch sich Gleichung 1.35 direkt durch Messen der lokalen Temperatur testen lässt. Mit

diesem Aufbau waren die Autoren in der Lage, Gleichung 1.35 für verschiedene Zeiten τ zu bestätigen.

Vier Jahre später konnte von Wang *et al.* [39] eine integrierte Form der Gleichung 1.35 durch direktes Messen der Entropieproduktion einer Kugel, die mit Hilfe einer optischen Pinzette durch Wasser gezogen wird, bestätigt werden. Bei diesem Aufbau kann die aktuell auf die Kugel wirkende Kraft F direkt bestimmt werden, die Entropieproduktion lässt sich also mit $\sigma = \int_0^t F_{\text{opt}}(\tau)v_{\text{opt}}d\tau$ direkt berechnen. Für kurze Integrationszeiten $t = 10^{-2}s$ konnten die Autoren Entropie verringernde Prozesse auflösen und somit zeigen, dass das Verhältnis zwischen den Wahrscheinlichkeiten Entropie verringernde Prozesse und Entropie erzeugende Prozesse zu beobachten, exponentiell mit t abnimmt.

Gleichung 1.36 konnte noch im selben Jahr von Liphart *et al.* [40] experimentell bestätigt werden. Sie benutzten eine optische Pinzette, um einen einzelnen RNA-Hairpin mechanisch zu entfalten und rückfalten zu lassen. In diesem Experiment kann durch Wahl der Ziehgeschwindigkeit sowohl das Gleichgewichts- als auch das Nichtgleichgewichtsregime getestet werden. Durch Berechnen der rechten Seite von Gleichung 1.36 für die im Nichtgleichgewichtsregime gewonnenen Daten, erhielten sie bis auf $\pm 0.5 k_B T$ die im Gleichgewicht bestimmten Energien ΔG .

2005 konnte durch einen ähnlichen Aufbau auch das FT von Crooks experimentell bestätigt werden [41]. Die Autoren bestimmten die Wahrscheinlichkeiten, Arbeit aufzuwenden und Arbeit zu gewinnen, wenn ein RNA-Hairpin mechanisch entfaltet wird, oder gegen Kraft rückfaltet. Die Schnittpunkte der Wahrscheinlichkeitsverteilungen führten für verschiedene Kraftladungsraten zu den selben Gleichgewichtsenergien ΔG . Außerdem konnten sie für verschiedene Energien E die nahe der Gleichgewichtsenergie liegen zeigen, dass eine logarithmierte Form der Gleichung 1.34 gilt. Weitere experimentelle Überprüfungen der FTs sind in [29] zusammengefasst.

Die Federhärten optischer Pinzetten sind typischerweise 100-fach kleiner als die der Blattfedern von Kraftmikroskopen (AFM) und zusätzlich ist die Kraftauflösung optischer Pinzetten höher. Daher wurde bezweifelt, dass sich Gleichung 1.34 auf AFM-Messungen anwenden lässt [41]. In Abschnitt 2.4.3 wird gezeigt, dass dies dennoch mit Hilfe spezieller Mittelungsmethoden möglich ist.

1.5 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden die thermodynamischen Grundlagen der mechanischen Proteinentfaltung vorgestellt und auf die Entfaltung von Superhelices angewandt. Die Entfaltung von Superhelices findet bei den experimentell zugänglichen Zeitskalen sehr nahe am Gleichgewicht statt und kann durch Erhöhen der Ziehgeschwindigkeit vom Gleichgewicht entfernt werden. Daher wurde zuerst ein theoretisches Modell der Superhelixentfaltung im Gleichgewicht gegeben. Dabei wurden auch verschiedene Wirkungsrichtungen der anliegenden Kraft modelliert. Ein Ratenmodell zusammen mit einer Monte-Carlo Simulation erlaubt die Beschreibung der Superhelixentfaltung auch im thermodynamischen Nichtgleichgewicht. Die Beschreibung beider Modelle wird mit der Näherung unendlich steifer Blattfedern einheit-

lich. Mit dieser Näherung ist ein Fehler verbunden, dessen Größe bestimmt wurde. Zuletzt wurden die theoretischen Grundlagen kürzlich gefundener Fluktuationstheoreme, wie das von Crooks vorgestellt, die eine Brücke zwischen den Nichtgleichgewichts- und Gleichgewichtsbeschreibungen schlagen.

Kapitel 2

Mechanisches Entfalten der LZ-Superhelices

Im folgenden Kapitel soll die experimentelle Methode des mechanischen Auftrennens von Superhelices und die theoretische Beschreibung der daraus resultierenden Daten vorgestellt werden. Dazu ist die LZ26-Superhelix [42][43] mit verschiedenen Kürzungsvarianten besonders geeignet, da sie fast ideale Superhelixeigenschaften zeigt und bereits ausführlich durch Ensemblestudien charakterisiert wurde.

2.1 Aufbau und Eigenschaften der LZ-Superhelices

Die in diesem Kapitel untersuchten LZ-Superhelices basieren auf einer Teilsequenz der in Hefe vorkommenden Superhelix des Transkriptase Aktivators GCN4 [44]. Röntgenstrukturdaten zeigen, dass die aus 33 Aminosäuren bestehende Teilsequenz GCN4-p1, die zuständig für die Dimerbildung des GCN4-Moleküls ist, als Superhelix vorliegt, während die in N-terminaler Richtung folgenden Aminosäuren die spezifische Bindung an die DNA ermöglichen [45][46]. In diesem Kapitel werden drei, auf der GCN4-p1-Sequenz basierende Superhelices verschiedener Länge untersucht. Für diese wurden die f-Positionen aller Heptaden durch hydrophile Glutamine (Q) ersetzt, wodurch die Stabilität der Superhelices leicht erhöht wird [47]. Die Sequenzen der drei Superhelices LZ10, LZ18 und LZ26 sind in Abbildung 2.1 a) zu sehen. Die LZ10-Superhelix hat etwa die gleiche Länge wie die originale GCN4-p1-Sequenz, die Superhelix LZ18 entsteht durch einmaliges, C-terminales Anfügen des Teils LZ8, die Superhelix LZ26 durch zweimaliges Anfügen dieses Teils. Beim Aneinanderfügen der LZ8-Windungen wurde darauf geachtet, dass das Heptadenschema an den Schnittstellen nicht unterbrochen wurde.

Anhand der Struktur der GCN4-p1-Sequenz konnte gezeigt werden, dass diese, für Superhelices ideale intra- und intermolekulare Interaktionen aufweist. So alternieren positiv und negativ geladene Aminosäuren entlang einer α -Helix und führen zu einer insgesamt ungeladenen Struktur. Dadurch können zwischen verschiedenen geladenen Restgruppen, die in nahem Kontakt zueinander stehen, stabilisierende elektrostatische Wechselwirkungen

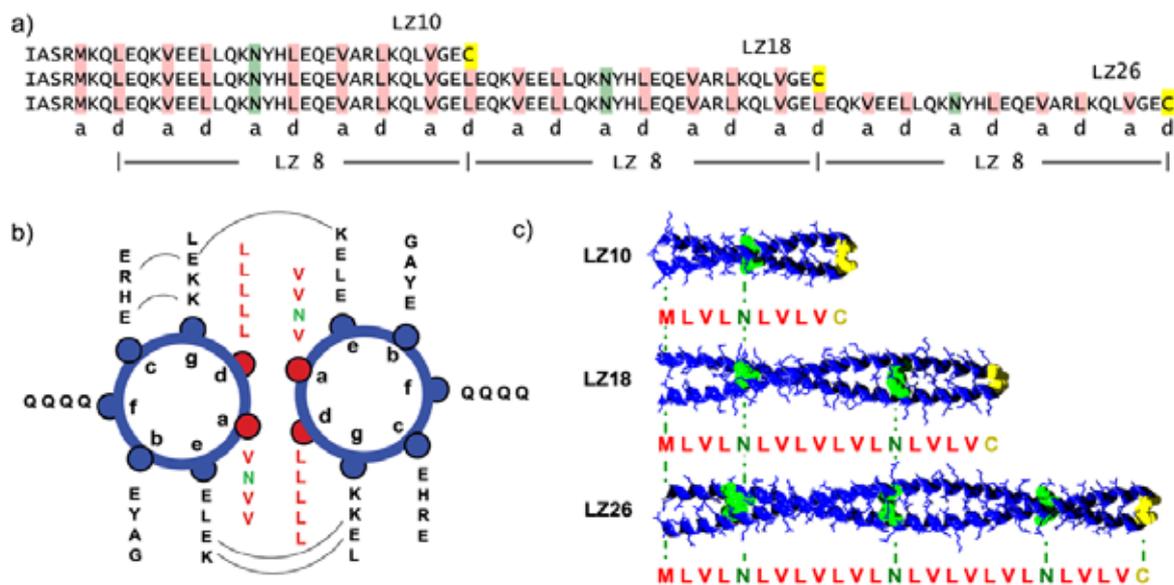


Abbildung 2.1: a) Aminosäuresequenz der LZ10-, LZ18- und LZ26-Superhelices. Der als LZ 8 markierte Abschnitt ist an die GCN4-p1-Sequenz angelehnt. b) Schematische Darstellung des LZ 8 Abschnittes aus N-terminaler Blickrichtung. Die Auflistung der Aminosäuren erfolgt von innen nach außen, wobei mit dem Leucin (L) der d-Position begonnen wird (angelehnt an [45]). Verschieden geladene Aminosäuren mit nahem Abstand innerhalb der Röntgenstruktur sind durch schwarze Bögen verbunden [45]. c) Schematische Struktur der LZ10-, LZ18- und LZ26-Superhelices. Darunter sind jeweils die Aminosäuren, welche sich an den a- und d-Positionen der Heptade befinden, angegeben.

aufzutreten. In Abbildung 2.1 b) sind diese durch schwarze Bögen gekennzeichnet. Die Röntgenstruktur konnte zudem zeigen, dass die überwiegend hydrophoben Aminosäuren, welche sich an den a- und d-Positionen beider Helices befinden, sich in der von Crick vorhergesagten „Knobs-into-holes“-Struktur ineinander fügen [4] und so den hydrophoben Kern der Superhelix bilden (rot in Abbildung 2.1 b)). Die hydrophile Aminosäure Asparagin (N) ist von dieser Regel auszunehmen (grün gezeigt in Abbildung 2.1 b)). Durch das Aneinanderreihen der LZ8-Abschnitte entstehen die schematisch in Abbildung 2.1 c) gezeigten Superhelices. Die längste LZ26-Superhelix zeigt bis auf die drei, in regelmäßigen Abständen vorkommenden Asparagine (N) einen idealen, hydrophoben Kern. Diese Superhelices stellen aufgrund ihrer intra- und intermolekularen Wechselwirkungen eine ideale Modellsequenz dar, um die mechanischen Eigenschaften von Superhelices zu studieren. Um bei einem mechanischen Auftrennen die vollständige Dissoziation des Dimers zu verhindern, wurde am jeweiligen C-terminalen Ende der Superhelices ein Cystein eingefügt, das über eine Disulfidbrücke eine kovalente Bindung zwischen den α -Helices bildet. Diese Bindung hält sehr hohen Kräften im nN-Bereich stand [48].

2.2 Experimentelle Methode

Das Kraftmikroskop erlaubt es, einzelne Moleküle zwischen einer Oberfläche und der Spitze einer Blattfeder anzubinden und auf das Molekül mechanische Kräfte im pN-Bereich auszuüben [49][50][51]. Eine Art der Anbindung kann über unspezifische Wechselwirkungen zwischen dem Molekül und der Spitze erfolgen. Diese Anbindung hält Kräften bis in den nN-Bereich stand und ist für eine Vielzahl von Proteinen möglich. Allerdings kann bei dieser Methode der genaue Ort der Anbindung nicht ermittelt werden. Verwendet man hingegen modulare, aus gleichen Domänen aufgebaute Proteine wie beispielsweise Herzmuskeltitin [52], ist der genaue Ort der Anbindung ohne Belang. Während eine Domäne an die Spitze bindet, bleibt eine andere an die Unterlage gebunden. Die sich zwischen diesen Domänen befindenden Untereinheiten werden alle seriell, am Ort ihrer natürlichen Verbindung belastet und zeigen bei der Entfaltung ein hoch-repetitives Muster. Mit Hilfe dieser Methode konnte auch das mechanische Entfalten des Aktin-bindenden *Dictyostelium discoideum* Filamins (ddFLN1-6) untersucht werden [53]. Um die mechanischen Eigenschaften einer einzelnen Domäne studieren zu können, gibt es zwei Möglichkeiten: Durch Einfügen zweier Cysteine in die Domäne, die intermolekulare, kovalente Bindungen eingehen können, lassen sich Polymere aus identischen Domänen erzeugen [54]. Diese Methode hat den Vorteil, dass die Kraftangriffspunkte sehr frei gewählt werden können. Die zweite Möglichkeit besteht darin, die zu untersuchende Domäne zwischen ihren N- und C-Termini in ein bereits kraftspektroskopisch untersuchtes, modular aufgebautes Molekül mit Hilfe molekularbiologischer Methoden einzufügen [53]. Das neue Ereignis, welches im gesamten Entfaltungsmuster auftritt, kann dann mit der eingefügten Domäne assoziiert werden.

2.2.1 Experimenteller Aufbau

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Frage nach der Kraftantwort einer Superhelix, wenn diese mit lateral wirkenden Kräften an ihrem N-Terminus belastet wird. Dazu wurde ein α -helikaler Strang der Superhelix C-terminal an das bereits untersuchte, modular aufgebaute „Trägerprotein“ ddFLN(1-5) angefügt. Homodimerisation der Superhelix in Lösung führt zu der in Abbildung 2.2 gezeigten Struktur. Das gezeigte Konstrukt bringt einige Vorteile mit sich, so kann beispielsweise durch das bereits bekannte Entfaltungsmuster der ddFLN-Domänen bei einem kraftspektroskopischen Experiment schnell entschieden werden, ob ein einzelnes Molekül in der gewünschten Geometrie an Oberfläche und Spitze gebunden hat. Zudem können mit Hilfe molekularbiologischer Methoden beliebige Superhelices in dieses Konstrukt eingefügt werden (siehe Anhang B.1). Nachteilig an dieser Methode ist das benötigte, C-terminale Cystein zu bewerten, wodurch die zu untersuchende Struktur geringfügig verändert wird. Außerdem können mit dem hier vorgestellten Trägerprotein nicht beliebig lange Superhelices untersucht werden, da die Wahrscheinlichkeit für eine unerwünschte Anbindung der Superhelix an Oberfläche oder Spitze mit deren Länge zunimmt.

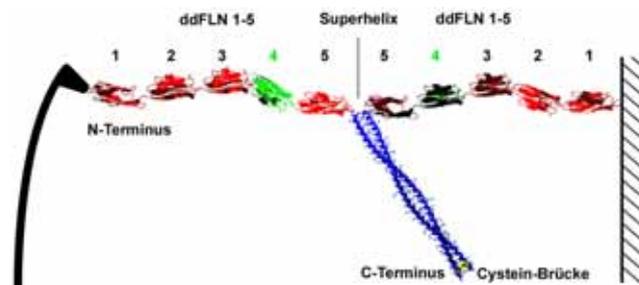


Abbildung 2.2: Homodimerisierung der C-terminal an die ddFLN5 Domäne angefügten Superhelix führt zu dem gezeigten, schematischen Konstrukt. Die Struktur der ddFLN-Domänen wurde aus [55] übernommen (rot), die Superhelixstruktur (blau) ist mit einer Länge von 26 Windungen gezeigt. Beide ddFLN4 Domänen sind grün eingefärbt. Die Anbindung an Spitze und Oberfläche erfolgt unspezifisch und nicht zwingend an den N-Termini des Trägerproteins.

2.2.2 Mittelungsmethode zur Detektion von 1 pN Kraftunterschieden

In vorangegangenen Experimenten [56] stellte sich heraus, dass Superhelices, wenn sie in lateraler Richtung mechanisch belastet werden, bei Kräften unter 20 pN entfalten. Für eine Verbesserung des Signal-Rauschverhältnisses wurde eine Mittelungsmethode entwickelt, die hier vorgestellt werden soll. Abbildung 2.3 b) zeigt den Abstand der Blattfeder von der Unterlage in Abhängigkeit von der Zeit während eines kraftspektroskopischen Experiments. Zum Zeitpunkt 0 ist die Spitze fest auf die Unterlage gedrückt, um Proteine adsorbieren

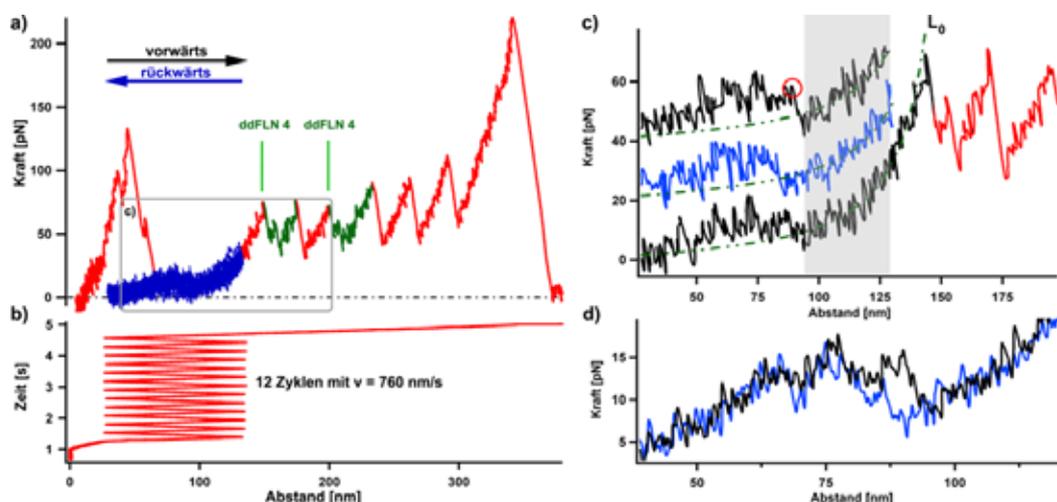


Abbildung 2.3: a) Repräsentative Kraft-Abstandskurve für das gesamte, über eine Superhelix dimerisierte, Trägerprotein. b) Bewegung der Federspitze mit der Zeit. Für Zeiten kleiner 4.5 s wird die Spitze zwischen 25 und 125 nm zur Oberfläche hin und herbewegt. c) Drei repräsentative Kraft-Abstandskurven aus den Zyklen im Bereich von 25 und 125 nm. d) Aus jeweils 12 Vorwärts- und Rückwärtskurven gemittelte Kraft-Abstandskurven.

zu lassen. Nach etwa einer Sekunde wird die Spitze in Vorwärtsrichtung bis zu einem Abstand von ca. 125 nm mit gleichmäßiger Geschwindigkeit v bewegt. Dort wird die Bewegungsrichtung instantan geändert und die Spitze in Rückwärtsrichtung mit der gleichen Geschwindigkeit v bis auf einen Abstand von ca. 25 nm an die Oberfläche angenähert. Für die hier gewählte Geschwindigkeit von 760 nm/s stellte sich heraus, dass die unspezifische Anbindung des Moleküls ca. 12 Zyklen überdauern kann, ohne aufzubrechen. Nach der letzten Annäherung wird die Spitze, mit der Geschwindigkeit v vollständig von der Oberfläche entfernt. Zu allen Zeitpunkten wird das Kraftsignal der Blattfeder gemessen. Dieses wurde gegen den End-zu-End Abstand z des Moleküls in Abbildung 2.3 a) aufgetragen (siehe Anhang B.2.1). Durch das vollständige Entfernen der Feder im letzten Zyklus ist ab ca. 125 nm das, für die Entfaltung der ddFLN(1-5) Domänen typische Sägezahnmuster zu erkennen [53]. Im gezeigten Fall waren sechs ddFLN Domänen zwischen Spitze und Unterlage verankert, deren jeweilige Entfaltung einen abrupten Längenzuwachs in den Kraft-Abstandskurven lieferte. Zwei dieser Entfaltungsereignisse zeichnen sich durch einen Zwischenzustand aus, den bereits Schwaiger *et al.* mit der ddFLN4 Domäne assoziieren konnte [53] (grün eingefärbt). Somit konnte gezeigt werden, dass das gesamte Konstrukt in der gewünschten Form zwischen Oberfläche und Spitze angebunden war. Es konnten jeweils 12 Vorwärts- und Rückwärtskurven aufgenommen werden, welche die Ent- und Rückfaltung der LZ26-Superhelix zeigen. In Abbildung 2.3 c) sind die Kraft-Abstandskurven der beiden letzten Zyklen gezeigt. Der Anschaulichkeit wegen sind sie jeweils um 20 pN nach oben verschoben dargestellt. Man erkennt, dass das Kraftsignal in der Größenordnung des thermischen Rauschens der Blattfeder liegt.

Um die Auflösung zu erhöhen, wurden die aus den Zyklen gewonnenen Vorwärts- und Rückwärtskurven jeweils getrennt gemittelt. Um zu gewährleisten, dass die einzelnen Kurven den gleichen absoluten Abstand zur Oberfläche haben, wurden sie an den Kraftverlauf der WLC-Kurve mit Konturlänge L_0 angepasst, welcher sich für eine vollständig entfaltete Superhelix ergibt (grauer Bereich in Abbildung 2.3 c)). Für Abstände von 0.1 nm wurde die mittlere Kraft für identische Piezoauslenkungen der einzelnen Zyklen bestimmt. Das Ergebnis der Mittelung ist in Abbildung 2.3 d) für die Vorwärtskurven in schwarz sowie für die Rückwärtskurven in blau gezeigt. Auf diese Weise lässt sich das Signal-Rauschverhältnis um den Faktor $\sqrt{12}$ verbessern.

Eine weitere Verbesserung des Signal-Rauschverhältnisses lässt sich erreichen, wenn mehrere dieser Kraft-Abstandskurven aus verschiedenen Messungen gemittelt werden. Dazu wurden Messungen des gleichen Proteins ausgewählt, die den selben Abstand L_0 von der Oberfläche zeigen. Diese bereits gemittelten Daten wurden nochmals auf die oben beschriebene Weise gemittelt. Abbildung 2.4 zeigt das Ergebnis dieser Mittelung von fünf ausgewählten, vergleichbaren Kraft-Abstandskurven. Durch die Verbesserung des Signal-Rauschverhältnisses um den Faktor acht, werden jetzt Kraftschwankungen im 1 pN-Bereich in der Kraft-Abstandskurve auflösbar.

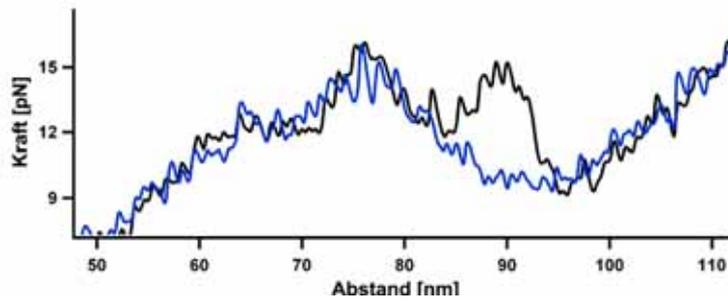


Abbildung 2.4: Kraft-Abstandskurve, die aus der Mittelung von fünf verschiedenen Kraftkurven hervorgeht, die jeweils mit oben beschriebenen Verfahren gewonnen wurden.

2.2.3 Bestimmung von Kraft- und Energieverteilungen

Finden die Ent- und Rückfaltungen eines Proteins nicht im thermodynamischen Gleichgewicht statt, lassen sich aus den Kraftverteilungen der Ent- und Rückfaltungsereignisse Rückschlüsse auf die, dem Protein zugehörige Energielandschaft ziehen. Eine direkte Methode die Verteilung der Entfaltungskräfte zu gewinnen bestünde darin, sie in den Kraft-Abstandskurven der einzelnen Zyklen direkt zu bestimmen (für die Entfaltung des C-terminalen Endes der LZ26-Sequenz wäre diese durch den roten Kreis in Abbildung 2.3 c) gegeben). Für die einzelnen Zyklen ist aber die Bestimmung des Kraftnullpunktes durch das Anpassen des WLC-Verlaufs der Konturlänge L_0 mit einem Fehler von ± 3 pN behaftet, der mit zunehmender Ziehgeschwindigkeit und damit verbundener kleinerer Datenmenge pro Zyklus anwächst. Dieser Fehler würde die Kraftverteilungen unnatürlich verbreitern. Besonders drastisch wäre dieser Effekt, wenn man die, mit einer Entfaltung verbundene Energie, die sich aus der Integration der Kraft-Abstandskurve ergibt, direkt ermitteln wollte. Für die Entfaltung von 10 Windungen bei ca. 10 pN ergäben ± 3 pN Schwankung des Kraftnullpunktes in etwa $\pm 15 k_B T$ Schwankung in der Energie.

Mit der im Folgenden erklärten Methode ist es möglich, die Verteilungen ohne diesen Fehler zu ermitteln. Hierfür kann von der bereits gemittelten Kraft-Abstandskurve ausgegangen werden. Die Methode der Mittelung wurde in Abschnitt 2.2.2 erklärt. Die Bestimmung der Kraftnulllinie einer gemittelten Kurve durch Anpassen an einen theoretischen WLC-Verlauf ist aufgrund der erhöhten Auflösung mit größerer Genauigkeit bis zu ± 0.5 pN möglich. Es liegt also nahe, von der gemittelten Kraft-Abstandskurve auf die Verteilungen zurück zu schließen. Abbildung 2.5 a) zeigt eine beispielhafte, aus 30 Monte-Carlo Simulationen (Abschnitt 1.3.2) erhaltene, gemittelte Entfaltungskurve. Ihr zu Grunde liegt die in Abbildung 1.8 a) gezeigte Energielandschaft mit dem gefalteten Zustand (1) und dem entfalteten Zustand (2). Um bei einem festen x_0 zu ermitteln, welche relative Anzahl dort schon entfalteter Kraft-Abstandskurven in die gemittelte Kurve eingingen, ist der Quotient

$$P_{\text{vor}}^{\text{ent}}(x_0) = \frac{\Delta F_{\text{vor}}(x_0)}{\Delta F_{\text{max}}(x_0)} \quad (2.1)$$

zu bilden. Dabei gibt $\Delta F_{\text{max}}(x_0)$ die Kraftdifferenz einer Entfaltung an dieser Stelle an,

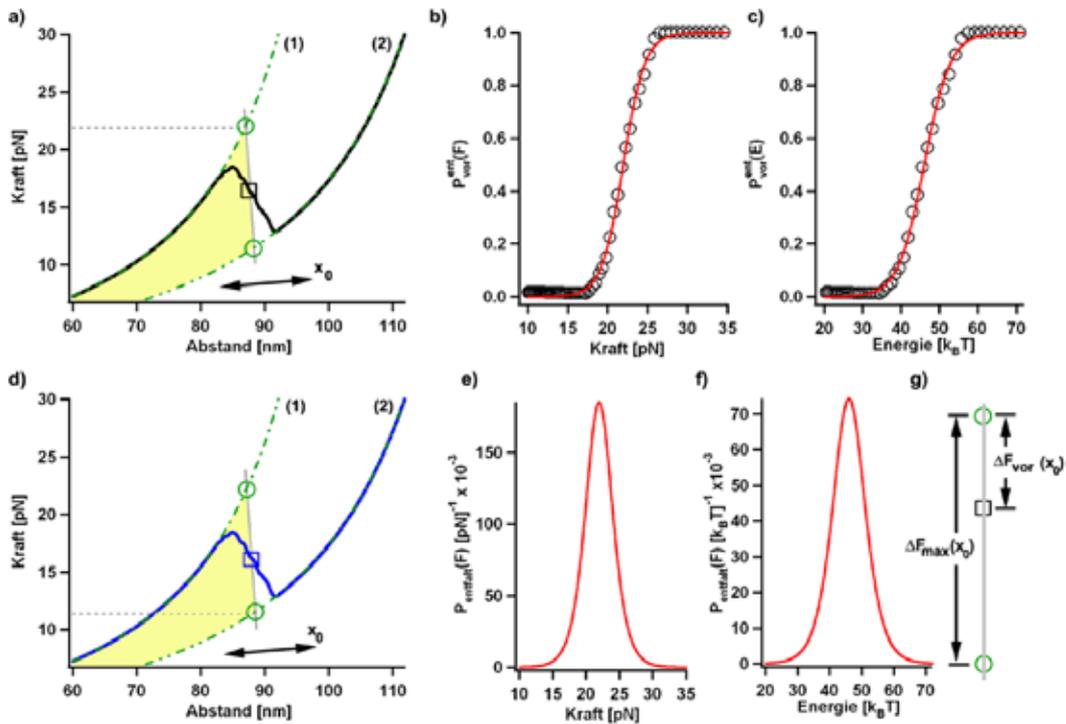


Abbildung 2.5: a) Gemittelte Entfaltungskurve, die mit Hilfe der Monte-Carlo Simulation für ein beispielhaftes Zweizustandssystem ermittelt wurde. Die Entfaltung findet zwischen 85 und 95 nm statt, die Linienkonstruktion bestimmt die wahrscheinlichste Entfaltungskraft. In Abhängigkeit der Kraft findet der Übergang zwischen 18 und 26 pN statt b), wobei Energien zwischen 35 und 58 $k_B T$ frei werden c). d) Bei einer Rückfaltungskurve lässt sich die wahrscheinlichste Rückfaltungskraft mit der gezeigten Linienkonstruktion bestimmen. Durch Ableiten der Wahrscheinlichkeiten $P_{\text{vor}}^{\text{ent}}$ erhält man die Wahrscheinlichkeitsdichte für eine Entfaltung in Abhängigkeit der Kraft e) oder der Energie f). g) zeigt vergrößert die Konstruktion zur Bestimmung von $P_{\text{vor}}^{\text{ent}}$.

$\Delta F_{\text{vor}}(x_0)$ die Differenz zwischen der für eine völlig gefaltete Superhelix zu erwartende Kraft und der gemessenen mittleren Kraft. Die Größen $\Delta F_{\text{max}}(x_0)$ und $\Delta F_{\text{vor}}(x_0)$ sind in Abbildung 2.5 g) dargestellt, in Abbildung 2.5 a) sind sie an die mittlere Kraft-Abstandskurve bei einem Abstand x_0 angepasst, bei welchem 50% der Entfaltungen stattfanden. Möchte man die experimentelle Federhärte der Blattfeder berücksichtigen, muss die Konstruktion gekippt werden (vgl. Abschnitt 1.3.3). Für Abstände $z < 85$ nm in Abbildung 2.5 a) kommt das schwarze Quadrat auf dem WLC-Verlauf (1) zu liegen und es ergibt sich $P_{\text{vor}}^{\text{ent}} = 0$. Analog ergibt sich für Abstände > 95 nm $P_{\text{vor}}^{\text{ent}} = 1$. Zwischen diesen Abständen müssen alle Entfaltungen stattgefunden haben. Die Abstände x_0 bzw. z können eindeutig mit anderen Größen des Systems verbunden werden. So entspricht beispielsweise der Abstand $z = 88$ nm, bei dem 50% der Entfaltungen stattgefunden haben, einer Entfaltungskraft von 22 pN (gestrichelte Linie in Abbildung 2.5 a)). Für eine mittlere Rückfaltungskurve entspräche dieser Abstand einer Rückfaltungskraft von 11 pN (gestrichelte Linie in Abbildung 2.5

d)). Daher kann durch einfache Variablensubstitution $x_0 \rightarrow F$ auch die Wahrscheinlichkeit $P_{\text{vor}}^{\text{ent}}(F)$, eine entfaltete Superhelix bei einer bestimmten Kraft vorzufinden, angegeben werden. Dies ist für die Entfaltung in Abbildung 2.5 b) gezeigt. Neben der Kraft kann beispielsweise auch die während der Entfaltung einer Superhelix frei werdende Energie E_{unz} bei einer bestimmten Position x_0 angegeben werden. Sie entspricht der in Abbildung 2.5 a) gelb gezeigten Fläche. Eine Variablensubstitution $x_0 \rightarrow E$ ergibt die in Abbildung 2.5 c) gezeigte Wahrscheinlichkeit, eine entfaltete Superhelix in Abhängigkeit der frei werdenden Energie zu finden.

Um die gewünschte Wahrscheinlichkeitsverteilung $P_{\text{entfalt}}(x_0)$ zu erhalten, muss die Ableitung der integrierten Wahrscheinlichkeit $P_{\text{vor}}^{\text{ent}}$ gebildet werden. Da die Zahl der Datenpunkte durch die Auflösung der Methode begrenzt ist, ist eine direkte Ableitung der Daten nur schwer zu ermitteln. Die vorgestellte Methode kann also nicht die, für Entfaltungskräfte typische Form der Verteilung auflösen [24][21]. Um dennoch die Ableitung bestimmen zu können, wurde eine Sigmoidalfunktion¹ an die integrierte Wahrscheinlichkeit $P_{\text{vor}}^{\text{ent}}$ angefitzt (Abbildung 2.5 b) und c) rote Kurve) und diese dann differenziert. Die sich ergebenden Verteilungen sind in Abbildung 2.5 e) in Abhängigkeit der Kraft und in Abbildung 2.5 f) in Abhängigkeit der Energie angegeben.

2.3 Entfaltung der LZ-Superhelices im Gleichgewicht

2.3.1 Gleichgewichtsbeschreibung der LZ26 Entfaltung

Die in Abschnitt 2.1 vorgestellte LZ26-Superhelix wurde kraftspektroskopisch mit Ziehgeschwindigkeiten von 150 nm/s untersucht. Hierfür wurden mit Hilfe der, in Abschnitt 2.2 beschriebenen Methode verschiedene Vorwärts- und Rückwärtskurven aufgenommen und gemittelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 2.6 a) zu sehen. Bis zu einem Abstand von ca. 75 nm folgt die gemittelte Kurve dem Verlauf der WLC-Kurve (1) und ab einem Abstand von 110 nm dem Verlauf der WLC-Kurve (4). Der Konturlängenzuwachs $L_{(4)} - L_{(1)}$ entspricht dem zu erwartenden Längenzuwachs bei einer Entfaltung von 26 Windungen. Dies, zusammen mit den für Superhelices typischen CD-Spektren (siehe Anhang A) zeigt, dass die Superhelix in der korrekt gefalteten Form vorliegt. Die gemittelten Entfaltungskurven der LZ26-Superhelix zeigen, dass eine Entfaltung bei lateralen Kräften zwischen 10 und 16 pN stattfindet. Zudem sind die Vorwärts- (schwarz) und Rückwärtskurven (blau) in Abbildung 2.6, bis auf die in gelb gezeigte Hysterese von $7 k_B T$ deckungsgleich. Daraus ergibt sich, dass das System bei der verwendeten Ziehgeschwindigkeit fast vollständig reversibel ist, sich also nahe am thermodynamischen Gleichgewicht befindet. Bei diesen Ziehgeschwindigkeiten sollte also die in Abschnitt 1.2 vorgestellte Gleichgewichtsbeschreibung anwendbar sein.

Während der Entfaltung vom WLC-Verlauf (1) zum WLC-Verlauf (4) sind zwei weitere Kraftanstiege mit konstanter Konturlänge zu erkennen (dargestellt als WLC-Kurven (2) und (3) in Abbildung 2.6 a)), die sich auf stabile Zwischenzustände zurückführen lassen.

¹In diesem Fall wurde die Funktion $[1 + \exp(-mF + \tilde{F})]^{-1}$ verwendet.

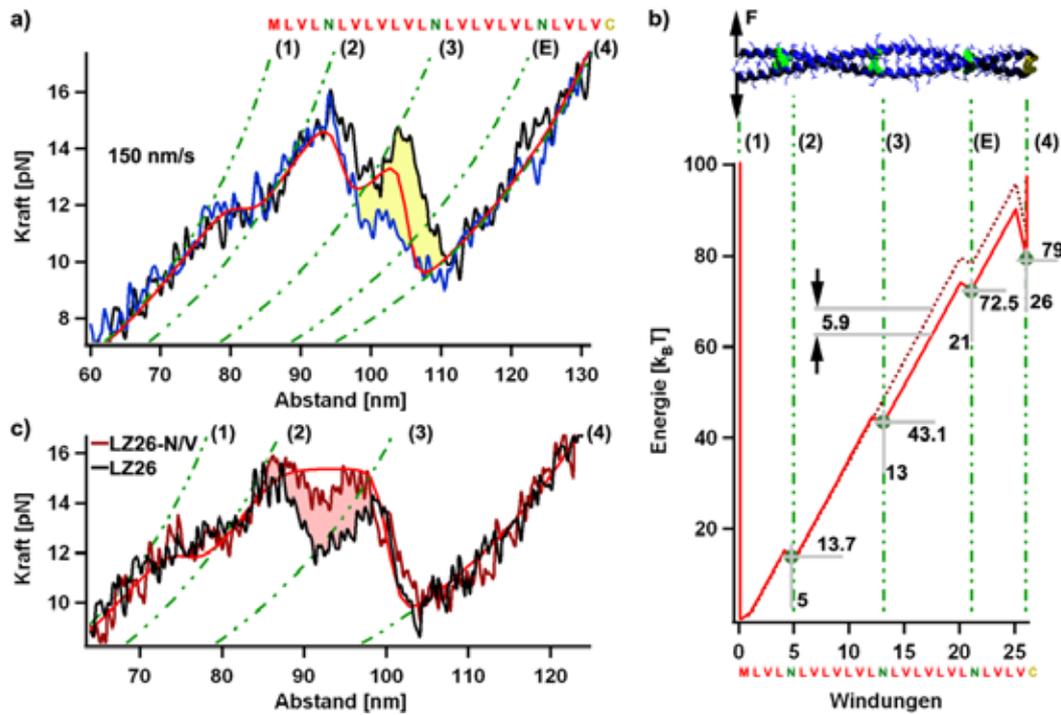


Abbildung 2.6: a) Entfaltungs- (schwarz) und Rückfaltungskurven (blau) der LZ26-Superhelix mit Ziehgeschwindigkeiten von 150 nm/s. b) Gleichgewichtsenergielandschaft der LZ26- (rot) und LZ26-N/V-Superhelix (rot gepunktet). Oberhalb ist die schematische Struktur der LZ26 Superhelix gezeigt, unterhalb die Bezeichnungen der einzelnen Windungen. Die Energielandschaft ergibt sich aus der Zuordnung der Energiewerte aus Tabelle 2.1 zu den Windungen. c) Kraft-Abstandskurve der LZ26-Superhelix in Vorwärtsrichtung (schwarz). In dunkelrot ist die Vorwärtskurve der LZ26N-V Superhelix gezeigt, bei der das Asparagin (N) an Position (3) durch ein Valin (V) ersetzt wurde.

Die Konturlängenzuwächse liefern $L_{(2)} - L_{(1)} = 5 \pm 1$ und $L_{(3)} - L_{(1)} = 13 \pm 1$ Windungen, also exakt die Positionen der Superhelix, bei welchen hydrophile Asparagine (N) im hydrophoben Kern zu finden sind. Es ist daher anzunehmen, dass diese Windungen destabilisierend auf die Superhelix wirken. Um zu zeigen, dass tatsächlich das Asparagin verantwortlich für das Auftreten der Zwischenzustände (2) und (3) ist, wurde das sich an Position (3) befindende Asparagin durch ein Valin (V) ersetzt. Die sich ergebende LZ26-N/V Sequenz ist in Abbildung B.2 aufgeführt. Abbildung 2.6 c) zeigt eine Überlagerung zweier Vorwärtskurven, wobei in schwarz die aus Messungen an der unveränderten LZ26-Sequenz und in rot die aus der LZ26-N/V Mutante hervorgegangenen Kraftkurven aufgetragen wurden. Aus der Grafik ist ersichtlich, dass beide Kraft-Abstandskurven zwischen den Übergängen (1) \rightleftharpoons (2) und (3) \rightleftharpoons (4) kaum voneinander abweichen. Am Übergang (2) \rightleftharpoons (3) ergibt sich für die LZ26-N/V Mutante eine höhere mittlere Kraft. Der Unterschied in den, für die Entfaltung benötigten Energien, kann direkt durch Bestimmung der Fläche zwischen beiden Kurven (rot in Abbildung 2.6 c)) zu $6 \pm 1 k_B T$ bestimmt

werden. Diese Messung zeigt, dass der Zwischenzustand an Position (3) verschwindet, wenn das energetisch ungünstige Asparagin an dieser Stelle durch ein hydrophobes Valin ersetzt wird. Das Asparagin ist demzufolge die Ursache für das Auftreten der stabilen Zwischenzustände bei der Superhelixentfaltung.

Innerhalb der in Abschnitt 1.2 vorgestellten Gleichgewichtsbeschreibung müssen also diese Windungen energetisch ungünstige Beiträge E_{SH} zur Superhelixstabilität aufweisen, während die restlichen Windungen positive Energiebeiträge liefern müssen. Im Gegensatz zur DNA, kann die Beschreibung mit Hilfe des in Abschnitt 1.2.3 vorgestellten Gleichgewichtsmodells nicht mehr auf nur zwei energetische Beiträge $E_{DNA}(AT)$ und $E_{DNA}(GC)$ für die Bildung der unterschiedlichen Basenpaare zurückgeführt werden [57]. Bei Superhelices besteht eine Windung aus 3.5 Positionen, die im Prinzip von jeweils 20 verschiedenen Aminosäuren besetzt werden können. Der energetische Beitrag einer Windung hängt jedoch nicht allein von deren Aminosäuren ab, sondern auch von den Aminosäuren der direkten Umgebung. Es gibt Bemühungen, die relativen Energien festzulegen, die durch Permutation der Aminosäuren an bestimmten Heptadenpositionen entstehen. Zwei Studien permutierten sämtliche Aminosäuren an a- und d-Positionen homodimerer Superhelices [58][59], eine weitere Studie untersuchte sämtliche Permutationen, die 10 Aminosäuren an der a-Position eines Stranges mit der a' Position des Nachbarstrangs von Heterosuperhelices eingehen können [60]. Das Vermessen aller, möglicher Permutationen ist aber wegen ihrer großen Anzahl schwierig. Da also im Prinzip für jede Windung ein eigener Fitparameter E_{SH} eingeführt werden kann ist es notwendig, bei der hier gezeigten theoretischen Beschreibung sinnvolle Randbedingungen festzulegen.

Da Mutationen von Aminosäuren an a- und d-Positionen von Superhelices einen größeren energetischen Effekt zeigen als beispielsweise Mutationen geladener Aminosäuren an e- und g-Positionen [61] oder f-Positionen [47], besteht eine nahe liegende Vereinfachung darin, die Windungen energetisch nach ihren Aminosäuren an a- oder d-Positionen zu ordnen. Demzufolge ergeben sich für die LZ26-Superhelix fünf verschiedene Klassen von Windungen: Windungen mit Methionin (M), Valin (V), Leucin (L), Asparagin (N) und Cystein (C) an den entsprechenden Positionen, wobei als weitere Randbedingung die Windungen mit Valin (V) oder Leucin (L) als energetisch gleichwertig zusammengefasst werden können [58][59]. Durch diese Randbedingung zusammen mit der bereits gemessenen Ener-

Windungen	Leu (L) Val (V)	Met (M)	Asn (N)	Keimbildung (C)
$E_{SH} [k_B T]$	4.42 ± 0.2	1.9 ± 1.1	-1.5 ± 0.9	-11 ± 3.5
$\Delta G [k_B T]$	4.4	3.2	-1.1	

Tabelle 2.1: Gleichgewichtsenergien E_{SH} für einzelne Windungen. Die Windungen sind nach den Aminosäuren an a- oder d-Positionen innerhalb der Heptade benannt. ΔG gibt zum Vergleich die äquivalenten Energiewerte aus Ensemblestudien an [58][59]. Durch Ensemblestudien an der GCN4 Superhelix konnte ein zusätzlicher Wert für $\Delta G(N) = -1.6 k_B T$ ermittelt werden [62]

giedifferenz von $E_{SH}(V) - E_{SH}(N) = 6 k_B T$, die sich ergibt wenn ein Asparagin (N) durch

ein Valin (V) ersetzt wird, lassen sich die Werte E_{SH} aus den experimentellen Daten eindeutig festlegen². Sie sind in Tabelle 2.1 aufgeführt, die damit erhaltene Energielandschaft ist in Abbildung 2.6 b) gezeigt.

Die mit dieser Energielandschaft berechneten, mittleren Gleichgewichtskurven sind in Abbildung 2.6 a) und c) rot eingezeichnet und beschreiben die experimentellen Daten sehr gut. Beachtenswert ist, dass zwischen den Zuständen (3) und (4) der LZ26-Superhelix ein im Vergleich zu den Übergängen (1) \rightleftharpoons (3) deutlicherer Krafteinbruch zu beobachten ist. Die Erklärung dafür ist in der Keimbildung zu sehen, die am C-terminalen Ende stattfindet. Ist die Superhelix entfaltet, muss, um die erste C-terminale Windung zu falten, die Entropie dreier Aminosäuren eingeschränkt werden. Andererseits wird aber noch keine Energie durch sich ausbildende Wasserstoffbrücken innerhalb des α -helikalen Rückgrats frei [63]. Der damit verbundene Energieaufwand ist in Tabelle 2.1 der letzten Windung, die ein Cystein (C) an der d-Position aufweist, zugeschrieben. In den experimentellen Kraft-Abstandskurven ist für den Übergang zwischen den Zuständen (3) \rightleftharpoons (4) eine Hysterese zu erkennen, deren Fläche $7 k_B T$ beträgt (gelbe Fläche in Abbildung 2.6 a)). Diese kann durch die Gleichgewichtsbeschreibung nicht erklärt werden; allerdings müssen sich die Entfaltungs- und Rückfaltungskurven im Gleichgewicht, also bei langsameren Geschwindigkeiten, völlig decken. Folglich muss die theoretische Kraft-Abstandskurve innerhalb der Hysterese zum liegen kommen. Der in Tabelle 2.1 angegebene Wert von $E_{\text{SH}}(\text{C}) = -11 \pm 3.5 k_B T$ erfüllt diese Anforderung.

Auf den ersten Blick wäre aus der Energielandschaft ein stabiler Zwischenzustand zu erwarten, der durch das Asparagin der 21ten Windung hervorgerufen werden müsste. In den Daten ist dieser jedoch nicht auflösbar. Der WLC-Verlauf, bei dem dieser Zustand auftreten müsste, ist in Abbildung 2.6 a) mit (E) gekennzeichnet. Es stellt sich daher die Frage nach dem Auflösungsvermögen der vorgestellten Methode, die im folgenden Abschnitt erklärt werden soll.

Sensitivität der Kraft-Abstandskurve auf die Superhelixsequenz. Aus der durch Tabelle 2.1 gegebenen Energielandschaft lässt sich, neben der mittleren Kraft auf die Superhelix, auch der Erwartungswert der offenen Windungen und dessen Varianz angeben. Die Varianz gibt ein Maß für die Streuung der Zufallsvariable j an und ist daher geeignet die Sensitivität der Kraft-Abstandskurven auf die Energielandschaft anzugeben. Abbildung 2.7 a) zeigt den Erwartungswert der offenen Windungen $\langle j \rangle$ in Abhängigkeit von der Piezoposition, die mit Formel 1.9 berechnet wurde, Abbildung 2.7 b) zeigt deren Varianz.

²Die Gleichgewichtsenergie von $29.4 k_B T$ zwischen den Energieminima der Zustände (2) und (3) beeinflusst das Verhalten der Kraft-Abstandskurve zwischen den WLC-Verläufen (2) und (3) in Abbildung 2.6 a) und kann sehr genau bestimmt werden. Zwischen diesen Zuständen finden sich sieben Windungen mit (L) bzw. (V) und eine Windung mit (N) an den a- oder d-Positionen. Da also $7 * E_{\text{SH}}(\text{L},\text{V}) + E_{\text{SH}}(\text{N}) = 29.4 k_B T$ und der Energieunterschied der Mutation eines Asparagins (N) zu einem Valin (V) $E_{\text{SH}}(\text{L},\text{V}) - E_{\text{SH}}(\text{N}) = 6 k_B T$ beträgt, lassen sich die absoluten Werte für $E_{\text{SH}}(\text{L},\text{V})$ und $E_{\text{SH}}(\text{N})$ festlegen. Der Parameter $E_{\text{SH}}(\text{M})$ lässt sich dann durch Angleichen der theoretischen Kraftkurve auf den Übergang (1) \rightleftharpoons (2) und der Parameter $E_{\text{SH}}(\text{C})$ durch Angleichen auf den Übergang (3) \rightleftharpoons (4) festlegen.

Die Varianz ist für Piezopositionen, die in dem gezeigten Beispiel kleiner als 70 nm oder

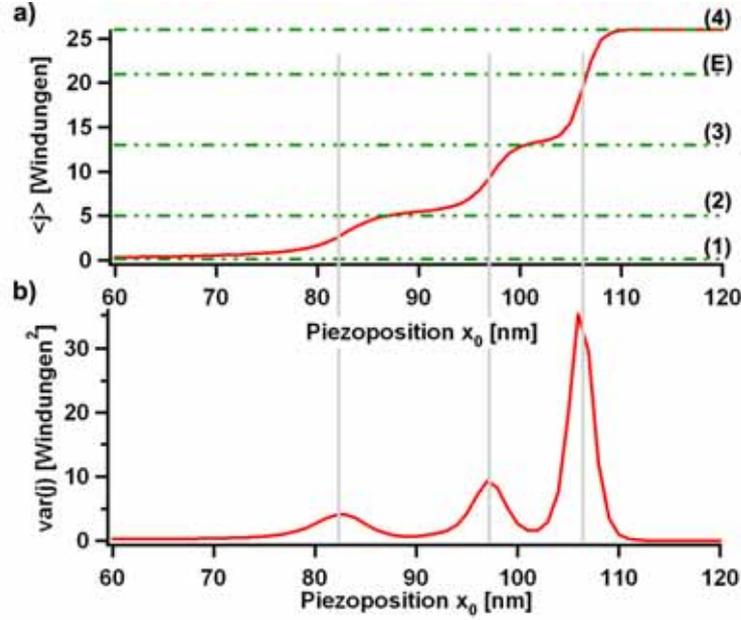


Abbildung 2.7: a) Mit den Energiewerten aus Tabelle 2.1 berechnete Erwartungswerte offener Windungen j in Abhängigkeit der Piezoposition x_0 . Die Windungen mit Asparagin (N) an einer a-Position sind durch grün gestrichelte Linien gekennzeichnet. b) Varianz $\text{var}(j) = \langle j^2 \rangle - \langle j \rangle^2$ der geöffneten Windungen.

größer als 115 nm sind, annähernd Null. Nur bei Piezopositionen, bei denen Teile der Superhelix entfalten, steigt die Varianz. So ergeben sich für die Standardabweichungen $\sigma = \sqrt{\text{var}(j)}$ an Piezopositionen, bei denen die Superhelix zwischen den Zuständen (1) und (2) oder (2) und (3) wechselt, Werte kleiner als drei Windungen. Haben die Asparagine also einen größeren Abstand als drei Windungen, so können die Kraftfluktuationen, die sie verursachen aufgelöst werden. Für die Superhelixentfaltung zwischen den Zuständen (3) und (4) ergibt sich durch die relativ hohe negative Energie $E_{\text{SH}}(C)$ eine Standardabweichung von sechs Windungen, wodurch der Zwischenzustand an Position (E) nicht mehr aufgelöst werden kann.

Allgemein lässt sich zeigen, dass die Varianz $\text{var}(j)$ proportional zu $k_{\text{tot}}^{-1/2}$ ist [64][65], d.h. je größer die Federhärte des Gesamtsystems k_{tot} ist, um so stärker wirkt sich ein Energieeinbruch auf den Kraftverlauf aus. Der hier gezeigte experimentelle Aufbau besteht aus einer seriellen Hintereinanderschaltung zweier Federn, der Blattfeder des Messgeräts mit Federhärte $k_{\text{fed}} = 8$ pN/nm und der, durch die entropische Kette des Trägerproteins und der entfaltenen Windungen der Superhelix entstehenden Feder, die bei einer anliegenden Kraft von 13 pN eine Federhärte von $k_{\text{Kette}} \approx 0.5$ pN/nm besitzt. Bei einer Serienschaltung errechnet sich die gesamte Federhärte durch

$$\frac{1}{k_{\text{tot}}} = \frac{1}{k_{\text{fed}}} + \frac{1}{k_{\text{Kette}}} \quad (2.2)$$

woraus sich ergibt, dass die weichste Feder des Systems die Auflösung limitiert. Hier ist aber die weichste Feder durch die entropische Kette des Trägerproteins und der entfalteten Superhelix-Windungen gegeben. Während das Trägerprotein durch eine steifere Konstruktion wie beispielsweise doppelsträngiger DNA ersetzt werden könnte, um die Auflösung zu erhöhen, ist die entropische Kette, die durch die entfalteten Superhelixwindungen entsteht, dem System inhärent. Die Auflösung wird folglich immer durch entfaltetes Polypeptid der gemessenen Superhelix limitiert werden.

Als ein weiterer Wert, der die Auflösung des gezeigten Systems beschreibt, kann die Sensitivität auf Punktmutationen gesehen werden. In Abbildung 2.6 c) wurden zwei Vorwärtskurven der LZ26-Superhelix verglichen, die sich nur durch die Mutation einer Aminosäure unterscheiden. Der sich ergebende Unterschied wird im Kraft-Abstandsverhalten deutlich, woraus ersichtlich wird, dass es möglich ist, energetische Unterschiede von mindestens $6 k_B T$ aufzulösen.

Wenn also die Randbedingung zutrifft, dass die Energien einer Windung nur durch die Aminosäure an der a- oder d-Position der betreffenden Windung bestimmt sind, dann müssen die Energien E_{SH} vergleichbar zu Ensemble-Studien sein, in denen die Energiedifferenzen, die durch Mutation dieser Aminosäuren entstehen, gemessen wurden [58][59]. In diesen Studien wurden systematisch 20 Aminosäuren an a- und d-Positionen einer Superhelix eingefügt und die Energiedifferenz relativ zu Alanin (A) an der jeweiligen Position angegeben. Tabelle 2.1 zeigt unter ΔG diese, auf den Absolutwert der (L) und (V) Windungen von $4.4 k_B T$ normierten Werte. Innerhalb der Fehlergrenzen decken sich die Ergebnisse der Ensemblestudien also sehr gut mit den kraftspektroskopischen Messungen. Für das LZ26-Konstrukt, deren Windungen sich im Aufbau sehr gleichen (vgl. Abbildung 2.1 b)), ist diese Randbedingung also zulässig. Allerdings darf die Verallgemeinerung, dass sich die Energielandschaft jeder beliebigen Superhelix aus den normierten Werten der Substitutionsstudie berechnen lässt, nicht gemacht werden. Beispiele für Superhelices bei denen diese Randbedingung nicht mehr erfüllt ist, sind die Halssuperhelices der *D. melanogaster* und der *N. crassa* Kinesine (Kapitel 3), die äußerst auffällige, untypische Wechselwirkungen zeigen.

2.3.2 Gleichgewichtsbeschreibung der LZ10 und LZ18 Entfaltungen

Die LZ26-Superhelix wurde artifiziell durch aneinanderfügen dreier LZ8- Untereinheiten gewonnen (siehe Abschnitt 2.1), wobei die Gleichgewichtsbeschreibung den zur gleichen Klasse gehörenden Windungen, unabhängig von deren Position, immer die gleiche Energie $E_{SH}(L,V,N,M,C)$ zuschreibt. Dies impliziert, dass sich Windungen an den Schnittstellen der Untereinheiten energetisch nicht von Windungen gleicher Art an anderen Positionen unterscheiden. Lassen sich gekürzte LZ-Untereinheiten mit den gleichen Werten E_{SH} beschreiben, so zeigt dies, dass sich die LZ8-Untereinheiten homogen zur LZ26-Superhelix zusammenfügen lassen. Aus diesem Grund werden auch Messungen an den kürzeren Superhelixvarianten LZ10 und LZ18 durchgeführt, die in etwa aus einer einzel-

nen und einer doppelten LZ8- Untereinheit bestehen (siehe Abschnitt 2.1). Abbildung 2.8 b) zeigt schematisch die Struktur der LZ18-Superhelix; in Abbildung 2.8 a) ist die Sequenz der einzelnen Windungen mit der in Tabelle 2.1 eingeführten Bezeichnung angegeben. Unterhalb sind gemittelte Kraft-Abstandskurven des LZ18-Konstruktes gezeigt,

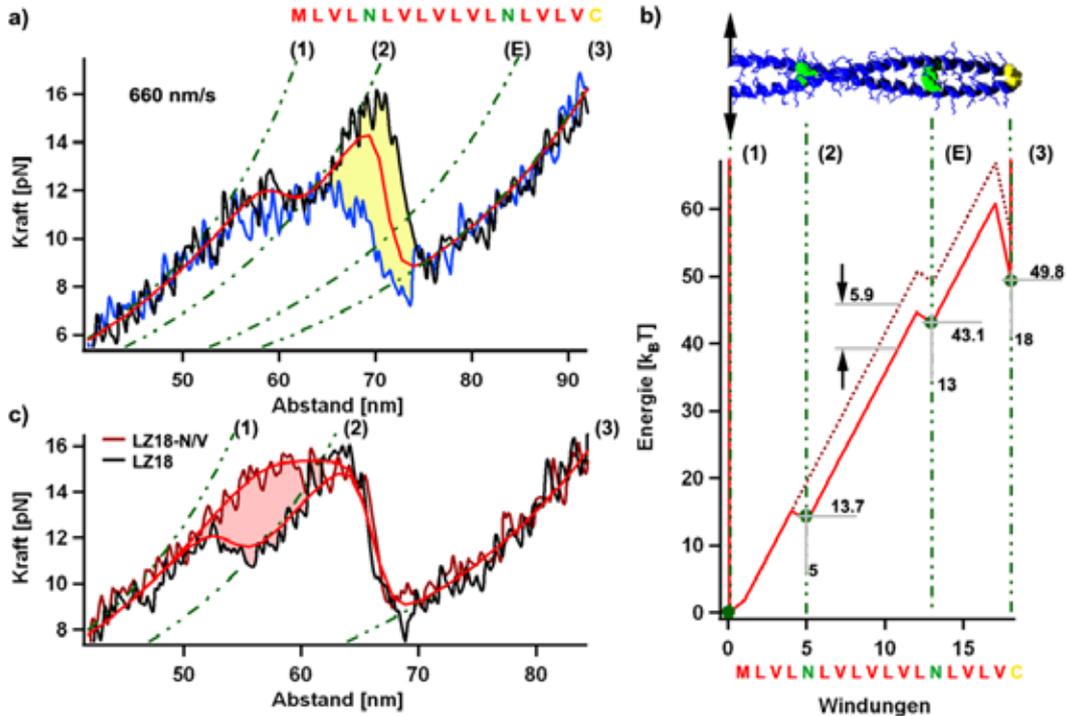


Abbildung 2.8: a) Entfaltungs- (schwarz) und Rückfaltungs-Kraft-Abstandskurven (blau) der LZ18-Superhelix mit Ziehgeschwindigkeiten von 660 nm/s. b) Gleichgewichtsenergielandschaft der LZ18-Superhelix. Darüber ist die schematische Struktur gezeigt, darunter sind die Bezeichnungen der einzelnen Windungen angegeben. Die Energielandschaft ergibt sich aus der Zuordnung der Energiewerte aus Tabelle 2.1 zu den Windungen. c) Vorwärtskurve der LZ18-Superhelix (schwarz), in dunkelrot überlagert ist die Vorwärtskurve der LZ18N-V Superhelix gezeigt, bei der das Asparagin (N) an Position (2) durch ein Valin (V) ersetzt wurde.

die bei einer Ziehgeschwindigkeit von 660 nm/s aufgenommen wurden. Die Vorwärts- (schwarz) und Rückwärtskurven (blau) sind erneut, bis auf die in gelb markierte Hysterese von $8k_B T$, deckungsgleich. Der Längenzuwachs $L_{(3)} - L_{(1)}$ entspricht dem für die Entfaltung von 18 Windungen erwarteten Wert. Außerdem ist auf dem Entfaltungspfad ein stabiler Zwischenzustand (2) zu erkennen, der an der Position des Asparagins der fünften Windung auftritt. Abbildung 2.8 b) zeigt die Energielandschaft, die sich ergibt, wenn man den Windungen der LZ18-Superhelix die Werte aus Tabelle 2.1 zuordnet. Die sich daraus mit Gleichung 1.12 ergebende Kraft-Abstandskurve ist in Abbildung 2.8 a) rot gezeigt und beschreibt die experimentellen Daten sehr gut. Beachtenswert dabei ist, dass die Energiewerte der Tabelle 2.1 mit Hilfe der LZ26-Superhelix bestimmt wurden, das heißt, dass die experimentellen Daten der LZ18-Sequenz ohne freie Parameter vorher berechnet

werden konnten. Insbesondere bestätigt dies, dass sich die Windungen der LZ Untereinheiten an den Schnittstellen homogen zusammenfügen lassen. Die vorgestellte Beschreibung liefert somit eine Methode, die Gleichgewichts-Energielandschaft aus der Anordnung der verwendeten Windungen in der Superhelix vorherzusagen. Insbesondere zeigt sie, wie die gesamten Gleichgewichtsenergien zu addieren sind, wenn einzelne Superhelices homogen aneinander gefügt werden. Dabei ist zu beachten, dass bei einer homogen zusammengeführten Superhelix jeweils nur ein Keimbildungsschritt nötig ist. Addiert man also zwei Superhelices mit Gleichgewichtsenergien ΔG_{ges}^1 und ΔG_{ges}^2 , so ist die Gleichgewichtsenergie der sich ergebenden Superhelix $\Delta G_{\text{ges}}^{1+2}$ stets größer als $\Delta G_{\text{ges}}^1 + \Delta G_{\text{ges}}^2$.

Auch bei der LZ18-Sequenz tritt ein stabiler Zwischenzustand (2) aufgrund des Asparagins (N) an einer a-Position der fünften Windung auf. Dieser Zwischenzustand kann wieder durch die Substitution dieses Asparagins durch ein Valin (V) eliminiert werden. Gezeigt ist dies in Abbildung 2.8 c), wo eine Vorwärtskurve der LZ18-Sequenz (schwarz) mit der Vorwärtskurve der LZ18-N/V Superhelix überlagert ist. Die gesamte Sequenz der LZ18-N/V Superhelix ist in Abbildung B.2 zu finden. Der energetische Unterschied beider Kurven ist durch die rote Fläche gekennzeichnet und bestimmt sich aus den Daten zu $6 \pm 1 k_B T$. Anhand des Parameters $E_{\text{SH}}(C)$ lassen sich die theoretischen Kraft-Abstandskurven auch an die Vorwärtskurven anpassen. Dies gibt eine untere Grenze für die Keimbildungsenergie an und ist in Abbildung 2.8 c) zur besseren Vergleichbarkeit der Daten mit der Theorie (rote Kurven) geschehen. Ersetzen des Asparagin-Wertes an der fünften Windung durch einen Valin-Wert (gepunktete rote Energielandschaft in Abbildung 2.8 b)) beschreibt das LZ18-N/V Kraft-Verhalten sehr gut und bestätigt so die schon in Abschnitt 2.3.1 getroffenen Aussagen.

Als kürzestes LZ-Konstrukt wurde schon in vorhergehenden Studien [56] die LZ10-Sequenz kraftspektroskopisch untersucht. Ihre Länge entspricht in etwa der Länge der GCN4-p1-Sequenz und auch in der Natur auftretende, motordimerisierende Halssuperhelices haben vergleichbare Längen (siehe Kapitel 3). Abbildung 2.9 b) zeigt schematisch die Struktur der LZ10-Superhelix, ihr Aufbau wird genauer in Abschnitt 2.1 erläutert. Die Kraft-Abstandskurven der LZ10-Superhelix (Abbildung 2.9 a)) zeigen eine Entfaltung vom geschlossenen Zustand (WLC-Verlauf (1)) zum völlig entfalteten Zustand (WLC-Verlauf (2)), deren Konturlängenzuwachs der erwarteten Entfaltung von 10 Windungen entspricht. Auch hier lässt sich der Verlauf der Kraft-Abstandskurve mit Hilfe der Gleichgewichtstheorie erklären. Abbildung 2.9 b) zeigt die Energielandschaft, die sich ergibt, wenn für die einzelnen Windungen der LZ10-Sequenz die Parameter aus Tabelle 2.1 eingesetzt werden. Die daraus berechnete Kraft-Abstandskurve ist in Abbildung 2.9 a) rot eingezeichnet und liegt zwischen den schwarzen Entfaltungs- und den blauen Rückfaltungsdaten, die eine nur sehr kleine Hysterese von $4 k_B T$ zeigen (gelbe Fläche). Die Messungen liefern also für die gesamte, zum Auftrennen der LZ10-Superhelix benötigte Energie $\Delta G_{\text{ges}} = 20.3 \pm 4 k_B T$. Dies steht in sehr guter Übereinstimmung mit Ensemblestudien an einer vergleichbaren Sequenz [47]. Die komplexe Energielandschaft in Abbildung 2.9 im Kontrast zum sehr einfachen Verhalten der Kraft-Abstandskurve zeigt deutlich, dass die Energielandschaft für die Beschreibung der LZ10-Superhelix überbestimmt ist. Durch die begrenzte örtliche Auflösung kann der zu erwartende Zwischenzustand (E) nicht aufgelöst werden. Allein aus

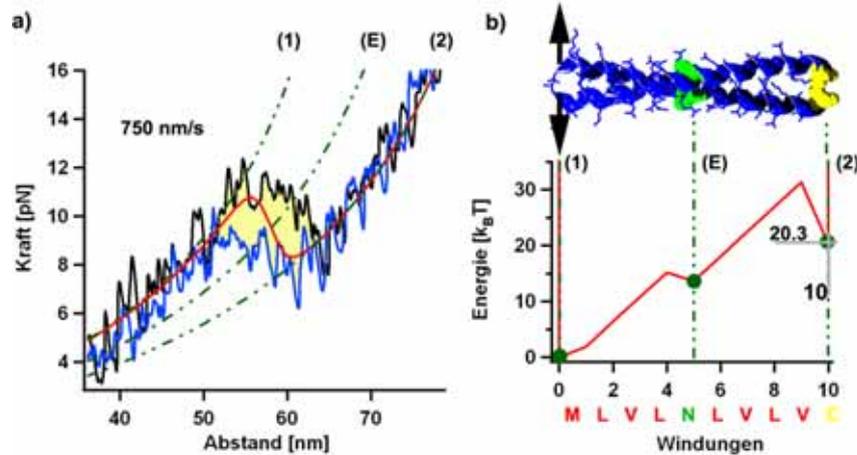


Abbildung 2.9: a) Entfaltungs- (schwarz) und Rückfaltungs-Kraft-Abstandskurven (blau) der LZ10-Superhelix mit Ziehgeschwindigkeiten von 750 nm/s. b) Gleichgewichtsenergielandschaft der LZ10-Superhelix. Darüber ist die schematische Struktur gezeigt, darunter sind die Bezeichnungen der einzelnen Windungen angegeben. Die Energielandschaft ergibt sich aus der Zuordnung der Energiewerte aus Tabelle 2.1 zu den Windungen.

Messungen an der LZ10-Sequenz hätte daher nicht auf die durch das Asparagin verursachte negativen Energiebeiträge geschlossen werden können. Dennoch liegt die Annahme nahe, dass dieser Zwischenzustand, auch wenn er hier durch die das Auflösungsvermögen limitierende, entropische Kette nicht direkt gemessen werden kann, in der natürlichen GCN4 Superhelix auftritt.

2.3.3 Serielle Entfaltung mit unterschiedlichen Krafrichtungen

Die Richtung, in der Kraft auf ein Molekül ausgeübt wird, bestimmt die Höhe dessen mittlerer Entfaltungskraft. Im thermodynamischen Nichtgleichgewicht ist dieser Zusammenhang stark von der Struktur des Moleküls abhängig und sehr komplex [54][66][67], während der Zusammenhang im thermodynamischen Gleichgewicht nur noch auf einfache Weise vom Konturlängenzuwachs der Entfaltung abhängen sollte. Um diesen Zusammenhang kontrolliert an der LZ10-Superhelix zu testen, wurden Polyproteine erstellt, durch welche mehrere Superhelices gleichzeitig und seriell, in verschiedenen Zugrichtungen belastet werden können [68]. Die kleinste Untereinheit des Proteins ist in Abbildung 2.10 a) zu sehen. An das C-terminale sowie das N-terminale Ende von Herzmuskeltitin (Ig27) wurde jeweils ein Strang der LZ10-Superhelix angefügt. Die beiden LZ10-Sequenzen sind identisch, in diesem Konstrukt werden sie aber unterscheidbar, da die LZ10-Sequenz A über ihren C-Terminus mit der I27 Domäne verbunden ist, die Sequenz B über ihren N-Terminus. Dimerisieren die LZ10-Sequenzen verschiedener Untereinheiten, so ergeben sich drei verschiedene Bindungsmöglichkeiten, die in Abbildung 2.10 b) gezeigt sind. Die Bindung I entsteht durch Dimerisation der Stränge A und B, die Bindung II durch Dimerisation zweier B-Stränge und die Bindung III durch Dimerisation zweier A-Stränge. In

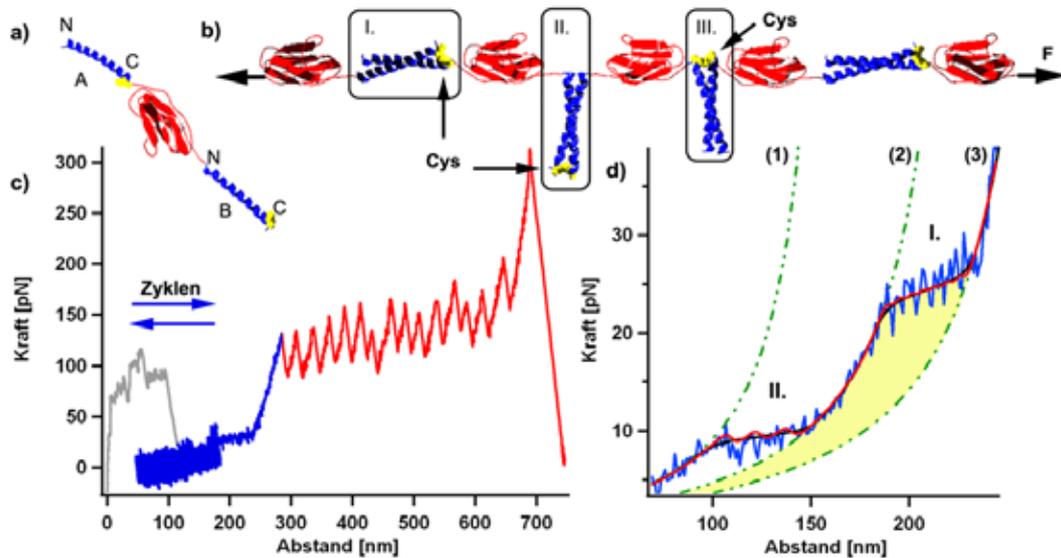


Abbildung 2.10: a) Schematischer Aufbau einer monomeren Proteinuntereinheit. An die Enden einer Titindomäne wurde jeweils ein LZ10-Strang angefügt. b) Dimerisation der einzelnen LZ10-Stränge führt zu dem schematisch gezeigten Polymer, mit drei möglichen Verbindungsgeometrien. c) Kraft-Abstandsdiagramm eines solchen Polymers. Zur Verbesserung der Auflösung wurden mehrere Ent- und Rückfaltungs-Zyklen bei Abständen kleiner als 200 nm aufgenommen. d) Aus Vorwärts- und Rückwärtskurven gemitteltes Kraft-Abstandsverhalten bei kleinen Kräften.

einem kraftspektroskopischen Experiment können jetzt Spitze und Unterlage unspezifisch an das Polyprotein binden, die ausgeübte Kraft wird immer entlang der Polyproteinachse ausgerichtet sein. Dadurch ergeben sich für die einzelnen Bindungsarten I, II und III unterschiedliche Kraftrichtungen auf die Superhelices. Die Bindung I wird durch die anliegende Kraft parallel zur Superhelixachse belastet („Überstreckungsgeometrie“), während die Bindungen II und III lateral zur Superhelixachse belastet werden („unzipping-Geometrie“). Die Superhelices mit Bindung III werden sich dabei nicht auftrennen, da sich direkt am Kraftangriffspunkt die kovalent verbundenen Cysteine befinden.

Abbildung 2.10 c) zeigt eine Kraft-Abstandsdiagramm an einem typischen Polymer. In rot sind 15, für Titin typische Einzelentfaltungen zu sehen [52], während im vorderen Teil der Kraftkurve (blau) die in Abschnitt 2.2.2 beschriebene Methode zur Erhöhung des Signal-Rauschverhältnisses angewandt wurde. Zwischen den gemittelten Vorwärts- und Rückwärtskurven der in Abbildung 2.10 c) gezeigten Kurve, war innerhalb der Auflösung keine Hysterese zu erkennen. Abbildung 2.10 d) zeigt daher das mittlere Kraft-Abstandsverhalten im niedrigen Kraftbereich, in welches die Vorwärts- sowie die Rückwärts- Kraftkurven der Zyklen eingingen. Man erkennt drei Kraftanstiege mit konstanter Konturlänge (durch die WLC-Verläufe (1), (2) und (3) gekennzeichnet), wobei der Übergang (1) \rightleftharpoons (2) bei Kräften um 10 pN und der Übergang (2) \rightleftharpoons (3) bei Kräften von 25 pN stattfindet. Die Entfaltung einzelner LZ10-Superhelices innerhalb der Geometrie II, bei der die Kräfte lateral zur Superhelixachse angreifen, wurde bereits in Abschnitt 2.3.2

untersucht. Dort wurde gezeigt, dass diese Entfaltung bei 10 pN auftritt und mit einem Konturlängenzuwachs von 25.6 nm verbunden ist. Der gemessene Konturlängenzuwachs $L_{(2)} - L_{(1)}$ von 77 nm entspricht exakt dem dreifachen Wert dieses Konturlängenzuwachses. Der Übergang (1) \rightleftharpoons (2) resultiert also im hier gemessenen Polymer aus der Entfaltung von drei Superhelices, die in Geometrie II dimerisiert haben.

Der Übergang (2) \rightleftharpoons (3) muss daher von der Überstreckung der Superhelices in Geometrie I herrühren. In dieser Geometrie erwartet man einen Konturlängenzuwachs von 7.3 nm je entfaltender Superhelix³[19]. Die Energie, die zum Überstrecken der Superhelices benötigt wird, lässt sich durch die gelbe Fläche in Abbildung 2.10 d) abschätzen. Der Konturlängenzuwachs bei der Überstreckung einer einzelnen Superhelix ist aber kleiner, als ihr Konturlängenzuwachs in der unzipping-Geometrie. Da die Gleichgewichtsenergie ΔG_{ges} pro entfaltender Superhelix nicht von der Richtung der entfaltenden Kraft abhängen darf, muss die mittlere Kraft in der Überstreckungsgeometrie größer sein, als für die unzipping-Geometrie. Durch den in Abbildung 2.10 gemessenen Konturlängenzuwachs $L_{(3)} - L_{(2)}$ lässt sich außerdem feststellen, dass sieben LZ10-Superhelices in der Überstreckungsgeometrie I entfaltet wurden. Aus der Anzahl der Titin-Entfaltungen können wir schließen, dass insgesamt 15 Superhelices zwischen Oberfläche und Spitze angebunden waren, die verbleibenden 5 Superhelices fanden sich also in der Geometrie III, die zu keiner beobachtbaren Entfaltung führt. Dieses Verhältnis der Bindungsgeometrien I:II:III spiegelt sehr gut das zu Erwartende 50:25:25 Verhältnis wieder.

In diesem Konstrukt sind die Kraftangriffspunkte an die Superhelices in den jeweiligen Geometrien genau definiert und die Gleichgewichtsenergien der einzelnen LZ10-Superhelices sind bekannt (siehe Abschnitt 2.3.2). Die durch laterale Krafteinwirkung entfaltenden Superhelices konnten bereits mit einem Gleichgewichtsmodell beschrieben werden (Kapitel 1.2.3). Um die serielle Belastung mehrerer solcher Superhelices zu beschreiben, muss der Raum der möglichen Zustände erweitert werden. Gibt es zwei serielle Superhelices, so muss in Gleichung 1.12 nicht mehr nur über die Abstände z und die Anzahl der offenen Windungen j einer Superhelix, sondern auch zusätzlich über die Anzahl der offenen Windungen k der anderen Superhelix summiert werden. Für den oben gezeigten Fall von drei seriellen Superhelices wird Gleichung 1.12 zu:

$$\langle F(x_0) \rangle = \frac{\sum_j \sum_k \sum_{l,z} F(j, k, l, z, x_0) e^{-E_{\text{ges}}(j,k,l,z,x_0)/k_B T}}{\sum_j \sum_k \sum_{l,z} e^{-E_{\text{ges}}(j,k,l,z,x_0)/k_B T}} \quad (2.3)$$

wobei j, k und l die Anzahl der offenen Windungen der einzelnen Superhelices angeben.

³Dies ist die Differenz aus der Konturlänge l_2 von 35 völlig entfalteten Aminosäuren der LZ10-Sequenz ($35 \cdot 0.365$ nm [18]) und der Ausdehnung der LZ10-Superhelix vor der Entfaltung, die sich Anhand der Röntgenstruktur zu $l_1 = 5.5$ nm bestimmen lässt [62]. Der Wert $l_2/l_1 = 2.3$ entspricht dem bei der mechanischen Überstreckung von Myosin Superhelices gemessenen Wert [19].

Damit müssen zu der schon bekannten Energie E_{ges} noch die Energien

$$E_{\text{unz}}^{(K)}(k) = \sum_{\nu=1}^k E_{\text{SH}}^{K,\nu} \quad E_{\text{unz}}^{(L)}(l) = \sum_{\nu=1}^l E_{\text{SH}}^{L,\nu} \quad (2.4)$$

addiert werden, die zum Öffnen von k und l Windungen der Superhelices (K) und (L) benötigt werden. Außerdem hängt die Konturlänge des gesamten Systems von der gesamten Anzahl offener Windungen j, k und l ab, womit sich die Energie zum Dehnen des Polypeptides als

$$E_{\text{WLC}} = \int_0^z F_{\text{WLC}}(L(j, k, l), z') dz' \quad (2.5)$$

ergibt. In unserem Fall sind die Energien E_{SH} der einzelnen Windungen bekannt (siehe Tabelle 2.1 in Abschnitt 2.3.1). Mit diesen Energien ergibt Formel 2.3 die in Abbildung 2.10 d) zwischen den WLC-Verläufen (1) und (2) in rot gezeigte Kraft-Abstandskurve. Sie reproduziert die Daten sehr gut und zeigt drei Kraftschwankungen mit einer Amplitude von ca. 0.7 pN, die durch die seriellen Entfaltungen der einzelnen LZ10-Sequenzen verursacht werden. Da das Polymer natürlicherweise schon im gefalteten Zustand eine vergleichbar große Konturlänge $L_{(1)}$ aufweist, können diese Kraftfluktuationen experimentell nicht mehr aufgelöst werden (siehe Abschnitt 2.3.1).

Mit Hilfe der Zustandssumme 1.22 lässt sich auch das Aufschmelzen der Superhelices in der Überstreckungsgeometrie berechnen. Die sich ergebende Kraft-Abstandskurve ist in Abbildung 2.10 zwischen den WLC-Verläufen (2) und (3) in rot eingezeichnet. Mit dem Parameter $\Delta G_0 = 24k_B T$ lässt sich der experimentelle Verlauf der Kraft-Abstandskurve sehr gut reproduzieren. Dieser Wert entspricht innerhalb der Fehlergrenzen der zum unzippen einer LZ10-Superhelix benötigten Energie. Das in Abschnitt 1.2.3 vorgestellte Gleichgewichtsmodell liefert also eine konsistente Beschreibung mehrerer serieller Superhelixentfaltungen für verschiedene Zugrichtungen.

Die von den einzelnen LZ10-Untereinheiten stammenden Kraftfluktuationen sind mit der hier gezeigten experimentellen Methode nicht mehr aufzulösen und die Rechendauer für eine Kraft-Abstandskurve mit Formel 2.3 ist proportional zu k^N , wenn k die Anzahl der Windungen einer Superhelix und N die Anzahl der seriellen Superhelices angibt. Obwohl sich in Abbildung 2.10 c) nur eine sehr geringe Anzahl von LZ10-Untereinheiten in serieller Schaltung befanden ($N = 10$), erscheint dennoch eine Beschreibung des Kraft-Abstandsverhaltens mit einer Näherung für große N als sinnvoll. Mit einem solchen Modell wurde bereits die mechanische Überstreckung einzelner Myosin-Superhelices beschrieben und sie wird in Kapitel 1.2.4 näher erklärt [19]. Für die Polyproteinkette lässt sich die Ausdehnung des gesamten Peptides $z_{\text{ges}}(F) = z_{\text{I}}(F) + z_{\text{II}}(F)$, durch die Summe der Ausdehnungen der Superhelices in der Verbindungsgeometrie I (übersteckung) und der Verbindungsgeometrie II („unzippen“) ausdrücken. Mit Formel 1.19 ergibt sich

$$z_{\text{I}}(F) = N_{\text{I}} x_{\text{frac}}(F) \left(\frac{L_{\text{I,offen}}}{1 + e^{\Delta G_{\text{I}}(F)}} + \frac{L_{\text{I,zu}}}{1 + e^{-\Delta G_{\text{I}}(F)}} \right) \quad (2.6)$$

und

$$z_{\text{II}}(F) = N_{\text{II}} x_{\text{frac}}(F) \left(\frac{L_{\text{II,offen}}}{1 + e^{\Delta G_{\text{II}}(F)}} + \frac{L_{\text{II,zu}}}{1 + e^{-\Delta G_{\text{II}}(F)}} \right) \quad (2.7)$$

Abbildung 2.10 d) zeigt in schwarz den sich ergebenden Verlauf der Umkehrkurve $F(z_{\text{ges}})$ für die Werte $L_{\text{I,zu}} = 5.5\text{nm}$, $L_{\text{I,offen}} = 12.8\text{ nm}$, $L_{\text{II,zu}} = 0.1\text{nm}$, $L_{\text{II,offen}} = 25.6\text{nm}$, $\Delta G_{\text{I}} = 24k_{\text{B}}T$ und $\Delta G_{\text{II}} = 20k_{\text{B}}T$. Beide Beschreibungen liefern fast identische Ergebnisse, was zeigt, dass sich bereits bei einer sehr kleinen Anzahl von seriell geschalteten Superhelices der hier gezeigten Länge die Näherung $\lim N \rightarrow \infty$ verwenden lässt.

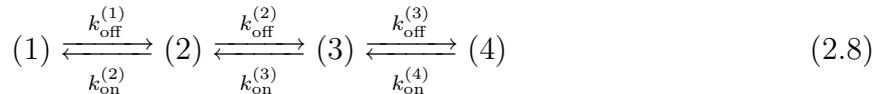
Die Kraft-Abstandskurven beider theoretischer Beschreibungen, sowie die Daten zeigen eine endliche Steigung bei den Entfaltungen in Geometrie I und II (Abbildung 2.10 d)). Diese Steigung wird von der Größe der kooperativen Untereinheiten $L_{\text{I,zu}}$ und $L_{\text{II,zu}}$ bestimmt und geht gegen 0, wenn die kooperativen Untereinheiten sehr groß werden (Abschnitt 1.2.4). In dem hier gezeigten Polyprotein lassen sich die Steigungen zwischen den Übergängen (1) \rightleftharpoons (2) und (2) \rightleftharpoons (3) gut mit der Annahme reproduzieren, dass eine LZ10-Superhelix die kleinste kooperative Einheit darstellt. Messungen an einer einzelnen Superhelix des Myosins ergaben kooperative Einheiten mit 3 nm Länge, was durch energetisch ungünstige Sequenzen in kurzen Abständen innerhalb der Superhelix erklärt werden kann [19]. Mit dem hier vorgestellten Konstrukt hat man aber die Möglichkeit, die kooperativen Untereinheiten selbst zu definieren. So wäre die Frage von Interesse, auf welche maximale Größe sich die kooperativen Untereinheiten idealer Superhelices verschiedener Längen, wie beispielsweise der „EIEALKA“-Sequenz [69], bringen lassen.

2.4 Entfaltung der LZ-Superhelices im Nichtgleichgewicht

2.4.1 Nichtgleichgewichtsbeschreibung der LZ26 Entfaltung

Das im Abschnitt 1.2.3 beschriebene Gleichgewichtsmodell ist in der Lage fast alle bei der Entfaltung der LZ-Superhelices auftretenden Effekte zu beschreiben. Allerdings findet sich schon bei relativ langsamen Ziehgeschwindigkeiten von 150 nm/s eine Hysterese zwischen Vorwärts- und Rückwärtskurven der LZ26-Superhelix (gelbe Fläche in Abbildung 2.6 a)). Diese Hysterese zeigt, dass beim Keimbildungsschritt die Superhelixfaltung nicht völlig reversibel ist, dort konnte das angewandte Gleichgewichtsmodell nur näherungsweise die Gleichgewichtsenergien des Keimbildungsschritts $E_{\text{SH}}(C)$ angeben. Um die Dynamik der Keimbildung modellieren zu können, soll hier die in Abschnitt 1.3.2 vorgestellte Monte-Carlo Simulation auf die LZ26 Entfaltung angewandt werden. Die Monte-Carlo Simulation beruht auf der Beschreibung von Übergängen zwischen diskreten Zuständen durch kraftabhängige Übergangsraten. Die in Abbildung 2.6 a) gezeigte Entfaltungskurve der LZ26-Superhelix folgt zwischen dem völlig gefalteten Zustand (1) und dem völlig entfaltetem Zustand (4) den WLC-Verläufen (2) und (3), die man daher als stabile Zwischenzustände sehen kann. In diesem Bild kann die Superhelix kooperativ zwischen den vier

Zuständen mit folgendem kinetischen Schema hin und her wechseln:



Obwohl in der Gleichgewichtsbeschreibung partiell geöffnete Zustände der Superhelix beliebiger Länge besetzbar sind, kann sie dieses kooperative Bild bestätigen. Das Gleichgewichtsmodell erlaubt es, die Wahrscheinlichkeit $p(j, x_0)$ anzugeben, mit der man bei einer festen Piezoposition x_0 die Superhelix mit j offenen Windungen vorfindet⁴. In Abbildung 2.11 werden diese Wahrscheinlichkeiten für die in Abschnitt 2.3.1 diskutierte LZ26-Sequenz gezeigt. Sie wurden für verschiedene Piezopositionen x_0 berechnet, die linear von 70 auf 115 nm erhöht und farblich von rot über grün zu blau gekennzeichnet sind. Für Piezopo-

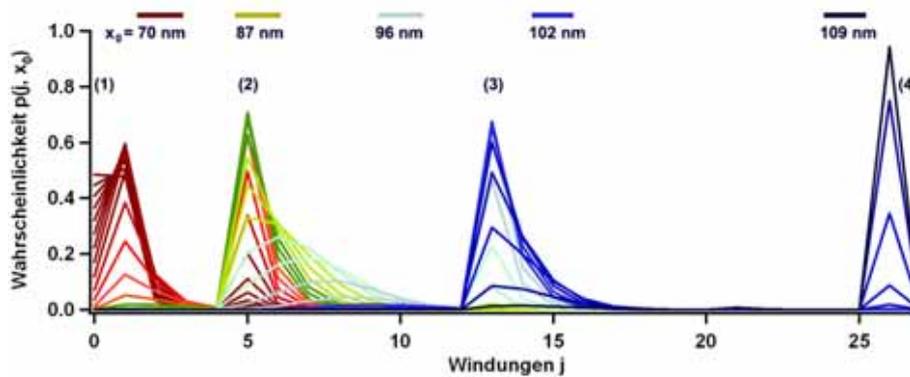


Abbildung 2.11: Wahrscheinlichkeit bei konstantem x_0 die Superhelix mit j geöffneten Windungen vorzufinden. Es sind mehrere Graphen mit verschiedenen Abständen x_0 zwischen 70 und 115 nm berechnet worden, wobei der Farbcode für wachsende x_0 von rot über hellrot, grün, hellgrün, hellblau zu dunkelblau gewählt ist.

sitionen bis 70 nm erkennt man eine hohe Wahrscheinlichkeit, keine oder eine Windung in offenem Zustand anzutreffen (gekennzeichnet durch den Zustand (1)), für höhere Piezopositionen wachsen die Wahrscheinlichkeiten für die Zustände (2) und (3) und für Piezopositionen größer als 110 nm finden sich nur noch völlig geöffnete Superhelices (4). Auffällig ist dabei, dass die Wahrscheinlichkeit eine andere Zahl geöffneter Windungen j außer die der Zustände (1), (2), (3) oder (4) zu finden, für keinen der Abstände x_0 signifikant von Null abweicht. Das Gleichgewichtsmodell rechtfertigt also die Näherung von vier diskreten Zuständen, zwischen denen die Übergänge kooperativ stattfinden.

Abbildung 2.12 a) zeigt eine mit dem kinetischen Schema 2.8 bei 760 nm/s simulierte Kraft-Abstandskurve in Vorwärts- (schwarz) und Rückwärtsrichtung (blau). Die einzelnen Übergangsraten $k_{\text{on/off}}^{(i)}$ in Gleichung 2.8 hängen dabei über Gleichung 1.24 von der zu Grunde liegenden Energielandschaft (Abbildung 2.12 b)) ab. In Abbildung 2.12 a) erkennt man,

⁴Die Wahrscheinlichkeit errechnet sich durch $p(j, x_0) = \frac{\sum_z e^{-(E_{\text{ges}}(j, z, x_0)/k_B T)}}{\sum_{j, z} e^{-(E_{\text{ges}}(j, z, x_0)/k_B T)}}$, wobei über alle möglichen Ausdehnungen z summiert werden muss. Für die Abbildung 2.11 wurden die in Tabelle 2.1 angegebenen Werte verwendet. Als Konturlänge des Trägerproteins wurde $L_0 = 125$ nm gewählt

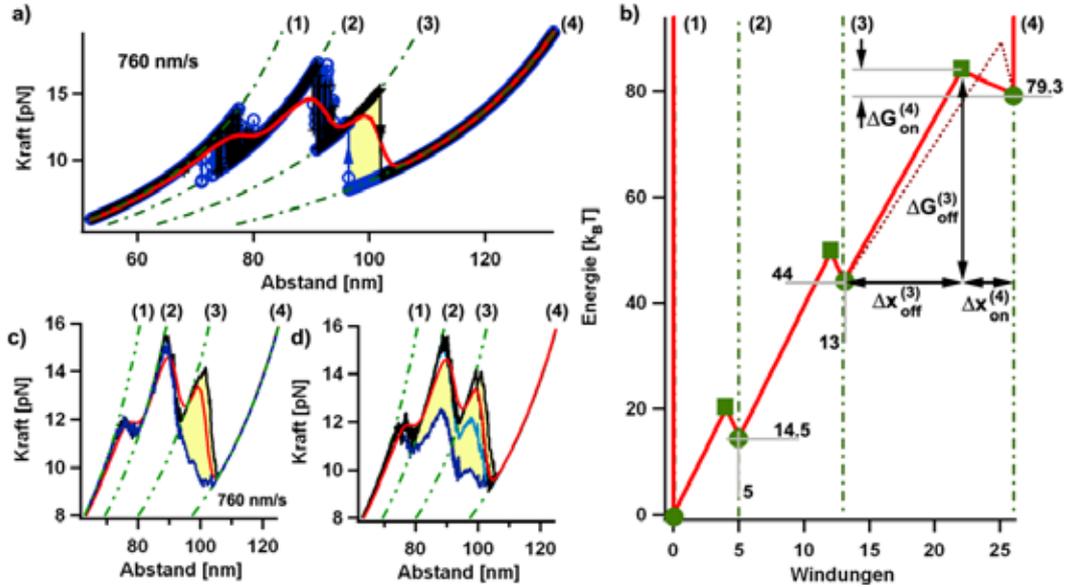


Abbildung 2.12: a) Durch die Monte-Carlo Simulation berechnete, beispielhafte Kraft-Abstandskurve bei 760 nm/s. In schwarz ist die Entfaltungskurve, in blau die Rückfaltungskurve gezeigt. Die der Berechnung zu Grunde liegende Energielandschaft ist in b) gezeigt. Durch Mittelung von 30 simulierten Kraft-Abstandskurven erhält man das in c) gezeigte Ergebnis. d) Entfaltungs- (schwarz) und Rückfaltungskurven bei 150 nm/s (hellblau) und 1500 nm/s (dunkelblau), die mit der in b) gepunkteten Energielandschaft berechnet wurden.

dass die Kraft für steigende Abstände z , den WLC-Verläufen (1), (2), (3) und (4) sukzessive folgt. Bei den Übergängen (1) \rightleftharpoons (2) und (2) \rightleftharpoons (3) sind sehr schnelle Kraftsprünge zu sehen. Für die Vergleichbarkeit mit den experimentellen Daten, deren Zeitauflösung unter anderem durch die Resonanzfrequenz der Blattfeder limitiert ist, wurden die in Abbildung 2.12 a) gezeigten Kraftkurven mit einem Tiefpassfilter bei 2 kHz gefiltert. Die Übergänge (1) \rightleftharpoons (2) und (2) \rightleftharpoons (3) erscheinen also schon bei einer einzelnen simulierten Kraft-Abstandskurve, für die in Abbildung 2.12 b) verwendete Energielandschaft im thermodynamischen Gleichgewicht. Dies bedeutet, dass auch innerhalb der Monte-Carlo Simulation die on- und off-Raten zwischen den Zuständen (1), (2) und (3) nicht ermittelt werden können. Da die Raten $k_{\text{on}}^{(2),(3)}$ aber nicht langsamer als die experimentell zugänglichen 2 kHz sein können, lässt sich als Obergrenze für $\Delta G_{\text{on}}^{(3),(2)} = 8.5 k_B T$ angeben. Unabhängig von den absoluten Werten der Raten kann ihr Verhältnis $k_{\text{off}}^0/k_{\text{on}}^0$ aber nicht verändert werden, ohne die mittleren Kräfte bei den Übergängen (1) \rightleftharpoons (3) zu beeinflussen. Daher lassen sich, in Analogie zur Gleichgewichtsbeschreibung, die energetischen Minima der Zustände (2) und (3) sehr genau angeben. Sie stimmen mit den aus der Gleichgewichtsbeschreibung gewonnenen Werten überein (vgl. Abbildung 2.6 b)). Die Monte-Carlo Simulation beinhaltet also auch die Beschreibung der Gleichgewichtsübergänge.

Um die experimentell gemessene Hysterese des Übergangs (3) \rightleftharpoons (4) zu reproduzieren, müssen mehrere, wie die in Abbildung 2.12 a) gezeigte, simulierte Kraft-Abstandskurven

gemittelt werden. Die Mittelungsmethode ist in Abschnitt 2.2.2 erklärt. Durch eine Mittelung von 30 verschiedenen Kraft-Abstandskurven, die mit der Energielandschaft aus Abbildung 2.12 simuliert wurden, ergeben sich die in Abbildung 2.12 c) gezeigten Vorwärts- und Rückwärtskurven. Um die experimentellen Daten mit der Monte-Carlo Simulation reproduzieren zu können, wurden die Parameter $\Delta G_{\text{on}}^{(4)}$, $\Delta x_{\text{on}}^{(4)}$, $\Delta G_{\text{off}}^{(3)}$ und $\Delta x_{\text{off}}^{(3)}$ variiert und die beste Übereinstimmung der gemittelten, simulierten Kurven mit den experimentellen Daten gesucht. Die Parameter sind nicht unabhängig voneinander, was ihre Bestimmung aus den mittleren Kraft-Abstandskurven bei nur einer Geschwindigkeit erschwert. Daher wurde die LZ26-Superhelix bei vier verschiedenen Geschwindigkeiten von 150 nm/s bis 1500 nm/s untersucht. Die experimentellen Daten sind in Abbildung 2.13 a) zu sehen. Man erkennt deutlich, dass die Hysterese (gelbe Fläche) mit wachsender Ziehgeschwindigkeit

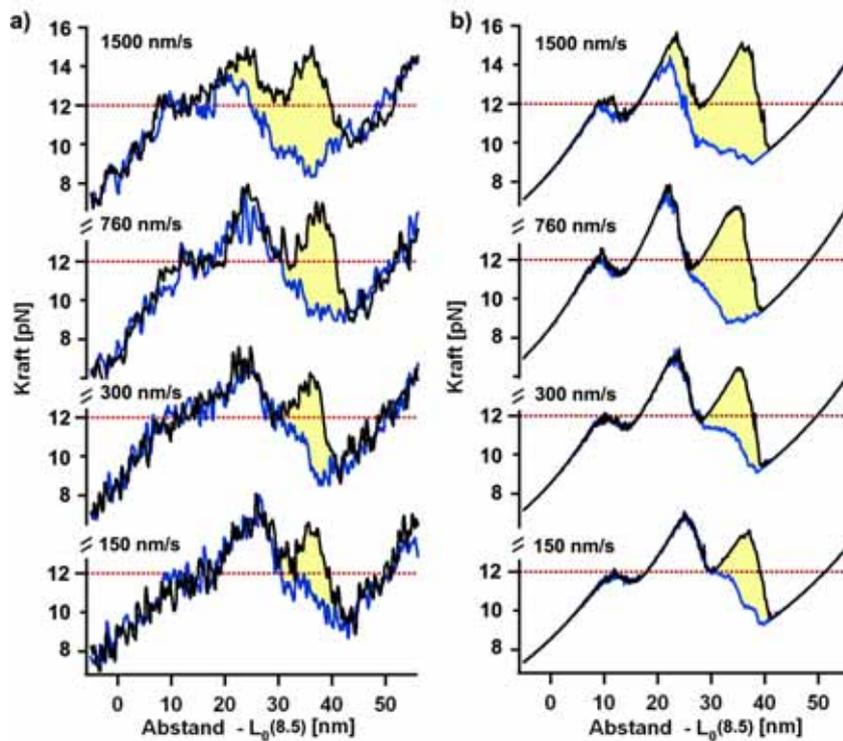


Abbildung 2.13: a) Experimentelle Kraft-Abstandskurven der LZ26 Entfaltung mit Ziehgeschwindigkeiten von 150, 300, 760 und 1500 nm/s. Mit steigender Ziehgeschwindigkeit wächst die Hysterese zwischen Ent- und Rückfaltungskurven (gelb). Von den Abständen z wurde für eine bessere Vergleichbarkeit der Kurven der Abstand der entropischen Kette bei 8.5 pN $L_0(8.5)$ abgezogen. b) Mit der Monte-Carlo Simulation berechnete Kraft-Abstandskurven, die die beste Übereinstimmung mit den Daten zeigen. Für die Simulation wurden folgende Parameter der Energielandschaft gewählt: $\Delta G_{\text{on}}^{(4)} = 4.5 \pm 0.8 k_B T$, $\Delta x_{\text{on}}^{(4)} = 4 \pm 1$ Windungen, $\Delta G_{\text{off}}^{(3)} = 39.8 \pm 1.5 k_B T$ und $\Delta x_{\text{off}}^{(3)} = 9 \pm 1$ Windungen.

keit zunimmt. In Abbildung 2.13 b) sind simulierte Kraft-Abstandskurven gezeigt, welche die Daten sehr gut wiedergeben. Für ihre Simulation wurde die in Abbildung 2.12 ge-

zeigte Energielandschaft mit den Parametern $\Delta G_{\text{on}}^{(4)} = 4.5 k_B T$, $\Delta x_{\text{on}}^{(4)} = 4$ Windungen, $\Delta G_{\text{off}}^{(3)} = 39.8 k_B T$ und $\Delta x_{\text{off}}^{(3)} = 9$ Windungen verwendet. Für die Faltung müssen also 4 Windungen kontrahieren und in superhelikaler Form vorliegen, um den Übergangszustand zu erreichen. Erst dann kann die weitere Faltung rapide stattfinden. Um die Sensibilität der gemittelten Kraft-Abstandskurven auf die veränderlichen Parameter zu zeigen, sind in Abbildung 2.12 d) simulierte Kraft-Abstandskurven gezeigt, bei welchen mit gleicher Gesamtenergie der Superhelix $\Delta x_{\text{on}}^{(4)} = 1$ Windung gewählt wurde und $\Delta G_{\text{on}}^{(4)}$ zu $10 k_B T$ (gepunktete Linie in Abbildung 2.12 b)). Die Kurven wurden für Geschwindigkeiten von 150 nm/s und 1500 nm/s berechnet. Während die simulierten Entfaltungskurven (schwarz) sich noch mit den experimentellen Daten in Deckung bringen ließen, ist dies für die Rückfaltungskurven (hellblau bei 150 nm/s, dunkelblau 1500 nm/s) nicht mehr möglich. Vor allem bei der schnelleren Rückfaltungskurve ist durch das kleinere Δx die Verteilung der Rückfaltungskräfte verbreitert, was zu einem „Ausschmieren“ der gemittelten Kurve führt. Die veränderlichen Parameter lassen sich also sehr genau, mit den in Abbildung 2.13 angegebenen Fehlern bestimmen.

Auch mit Hilfe der Näherung von Bell kann aus der wahrscheinlichsten Entfaltungskraft bei bestimmter Kraftladungsrate η auf die Barrierenbreite geschlossen werden (Formel 1.28). Mit der in Abschnitt 2.2.3 vorgestellten Methode ist es möglich, aus den gemittelten Kraft-Abstandskurven die Wahrscheinlichkeitsdichte P_{entfalt} für die Entfaltung (3) \rightarrow (4) und P_{falt} für die Faltung (4) \rightarrow (3) in Abhängigkeit der anliegenden Kraft anzugeben⁵. Das Ergebnis der Methode ist in Abbildung 2.14 b) für vier verschiedene Ziehgeschwindigkeiten von 150 nm/s (grün) bis 1500 nm/s (schwarz) gezeigt. Aus den Daten kann die typische Form dieser Verteilung nicht aufgelöst werden [24][21], daher wurde zur Bestimmung der Wahrscheinlichkeitsdichte eine Fermi-Funktion an die integrierte Wahrscheinlichkeitsdichte gefittet (Abbildung 2.14 c) und d)). Die Form dieser Verteilungen sollte nicht von der Ziehgeschwindigkeit abhängen, was die limitierte Auflösung mit diesem Verfahren widerspiegelt⁶. Dennoch lässt sich eine erste Schätzung der Barrierenbreite $\Delta x_{\text{Bell}}^{\text{on/off}}$ für die Faltung und die Entfaltung angeben. Die Kräfte, bei denen 50 % der Entfaltungen oder Rückfaltungen stattgefunden haben, lassen sich relativ genau bestimmen (in Abbildung 2.2.3 a) und b) durch schwarz bzw. blau gestrichelte Linie gekennzeichnet). Mit Formel 1.28 lässt sich $\Delta x_{\text{Bell}}^{\text{off}}$ über

$$\Delta x_{\text{Bell}}^{\text{off}} = \frac{k_B T \ln(\eta_{1500}/\eta_{150})}{\tilde{F}_{1500} - \tilde{F}_{150}} \quad (2.9)$$

abschätzen. Da $\tilde{F}_{1500} - \tilde{F}_{150}$ für die Faltungs- und Entfaltungskraftverteilung in etwa die gleichen Werte von 1.1 ± 0.6 pN liefert, müssen $\Delta x_{\text{Bell}}^{\text{on}}$ und $\Delta x_{\text{Bell}}^{\text{off}}$ mit Formel 2.9 zwischen 5 und 16 nm liegen. Da bei den hier betrachteten Kräften von ≈ 10 pN die entropische

⁵Da die Übergänge (1)...(3) alle im Gleichgewicht ablaufen bestimmt sich für die LZ26 Entfaltung $\Delta F_{\text{max}}(x_0)$ aus der Differenz zwischen dem in Abbildung 2.14 a) roten, mit (1)-(3) gekennzeichneten und dem mit (4) gekennzeichneten Kraftverlauf.

⁶Zu höheren Kräften hat die gleiche Schwankung in Δx_0 eine höhere Schwankung in ΔF und ΔE zur Folge, was ein Grund für die etwas breiteren Entfaltungskraftverteilungen trotz ähnlicher Barrierenbreite sein könnte.

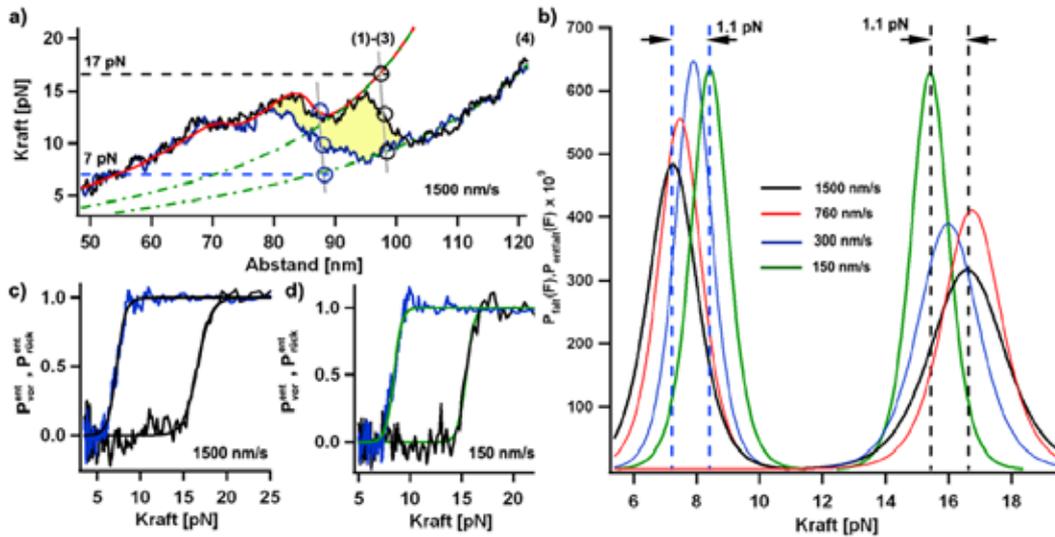


Abbildung 2.14: a) Methode zur Bestimmung der Entfaltung- und Faltungskraftverteilungen. Die Kraft, bei der 50 % der Superhelices entfaltet vorliegen, ist für die Entfaltungen als schwarze, für die Rückfaltungen als blau gestrichelte Linie gezeigt. b) Gewonnene Wahrscheinlichkeitsdichte der Entfaltung P_{entfalt} und Rückfaltung P_{falt} . Sie wird durch Ableiten der Wahrscheinlichkeit für das Auffinden entfalteter Superhelices in Abhängigkeit der Kraft $P_{\text{vor}}^{\text{ent}}$ und $P_{\text{rück}}^{\text{ent}}$ gewonnen. Diese sind in c) für 1500 nm/s und in d) für 150 nm/s Ziehgeschwindigkeiten gezeigt.

Kette nur zu etwa $x_{\text{rel}} = 60\%$ gestreckt ist, müssen die Breiten $\Delta x_{\text{off}}^{(3)}$ und $\Delta x_{\text{on}}^{(4)}$ zwischen 3 und 10 Windungen liegen. Diese Abschätzung beruht auf den Vereinfachungen, dass die Kraftladungsrate $\dot{F} = \eta$ konstant ist und sich die Energiebarrieren mit der Näherung von Bell ändern. Dennoch liegen die mit Hilfe der Monte-Carlo Simulation bestimmten Barrierenbreiten innerhalb dieser Schätzung. Allerdings ist eine exakte Bestimmung der Barrierenhöhen der zu Grunde liegenden Energielandschaft mit dieser Näherung nicht mehr möglich (vgl. Abbildung 1.8).

2.4.2 Die Breite der Faltungsbarriere als kontrollierbarer Parameter

In kraftspektroskopischen Messungen kann die Ziehgeschwindigkeit, mit welcher man Proteine entfaltet oder falten lässt, gezielt eingestellt und damit ihr Einfluss auf die mittleren Ent- und Rückfaltungskräfte problemlos studiert werden. Als weiterer Parameter, der die mittleren Kräfte der Ent- und Rückfaltung bestimmt, ist die Barrierenbreite Δx zu nennen. Dieser Parameter kann bei globulären Proteinen nicht leicht variiert werden, da dort die Faltung ein sehr komplexer Vorgang ist, der bis auf Ausnahmen durch ein Einfügen oder Löschen von Polypeptidsträngen in der Aminosäuresequenz die Struktur zerstören würde. [70][71]. Superhelices stellen in dieser Hinsicht durch ihre einfache Struktur eine Ausnahme dar. Durch die kraftspektroskopischen Messungen an den LZ18- und LZ26-Konstrukten konnte die mit der Keimbildung verbundene Struktur sehr gut aufgeklärt werden (Ab-

schnitt 2.4.1). Es ergab sich, dass für das Überwinden der Faltungsenergiebarriere die entfaltenen, C-terminalen vier Windungen kontrahieren und zu einer Superhelix formen müssen. Der Parameter $\Delta x = 4 \pm 1$ Windungen, ist also sehr genau bestimmt und kann durch C-terminales Anfügen unstrukturierter Aminosäuresequenzen experimentell beliebig manipuliert werden. Dies wird in diesem Abschnitt vorgestellt.

Abbildung 2.15 a) zeigt die bereits untersuchte LZ10-Superhelix. In den Abbildungen 2.15 b) und c) wurden 10 beziehungsweise 20 unstrukturierte Aminosäuren an den C-Terminus der LZ10-Sequenz angefügt, die sich ergebenden Konstrukte werden mit LZ10-H3T und LZ10-H6T bezeichnet, ihre Sequenzen sind in Abbildung B.2 zu finden. Die eingefügten Aminosäuren sind aus der Hingeregion des *D. melanogaster* Kinesins entnommen, da diese sicher nicht als Superhelix vorliegen (vgl. Abschnitt 3.1.2). Dabei ist das, die α -helikalen Stränge verbindende Cystein, immer am C-terminalen Ende des gesamten Konstruktes zu finden. In den sich ergebenden Konstrukten muss also die LZ10-Superhelix ein längeres entfaltetes Polypeptid kontrahieren, um die Faltungsbarriere zu überwinden. In Längeneinheiten von Windungen muss das LZ10-H3T Konstrukt ein entfaltetes Polypeptid mit einer Länge von sieben Windungen kontrahieren, das LZ10-H6T Konstrukt eine Länge von 10 Windungen. Die Abbildungen 2.15 a), b) und c) zeigen gemittelte Kraft-Abstandskurven an diesen Konstrukten bei vergleichbaren Ziehgeschwindigkeiten. Man erkennt direkt, dass die mittlere Entfaltungskraft nicht stark von der Anzahl eingefügter Aminosäuren abhängt, während die mittlere Rückfaltungskraft mit zunehmendem Δx abnimmt. Für die Monte-Carlo Simulation bedeutet dies, dass sich die Höhe der Entfaltungsbarriere durch das Anfügen unstrukturierter Aminosäuren an die Superhelix, wenig ändert, während die Position der Faltungsbarriere stark beeinflusst wird. Abbildung 2.15 g) zeigt in rot die bereits bekannte Energielandschaft für die LZ10-Superhelix, die blau und schwarz gezeigten Energielandschaften ergeben sich durch die Annahme, dass die Höhe der Faltungsbarriere nicht stark von der Anzahl eingefügter Aminosäuren abhängt. Dies ist gerechtfertigt, da die gesamte Gleichgewichtsenergie der Faltung ΔG_0 nicht stark durch unstrukturierte Aminosäuren beeinflusst sein wird. Die Monte-Carlo Simulation zusammen mit dieser Energielandschaft beschreibt die experimentellen Daten sehr gut (rote Kurven in Abbildung 2.15 a), b) und c)).

Um zu zeigen, dass sich die Breite der Faltungsbarriere Δx_{falt} tatsächlich wie angenommen mit der Anzahl eingefügter Aminosäuren verhält, wurden zusätzliche Messungen an den LZ10-H3T und LZ10-H6T Konstrukten mit Ziehgeschwindigkeiten von 150 nm/s und 1500 nm/s durchgeführt. Die Abbildungen 2.15 f) und h) zeigen diese Messungen für das LZ10-H6T Konstrukt, in rot überlagert sind die mit der Energielandschaft aus Abbildung 2.15 g) berechneten Kraft-Abstandskurven. Im Rahmen der Auflösung passen auch hier die Daten gut zu den errechneten Kurven, allerdings beträgt der erwartete Unterschied der mittleren Entfaltungskräfte, wenn die Ziehgeschwindigkeit von 150 nm/s auf 1500 nm/s steigt lediglich 1.6 pN, der Unterschied der mittleren Rückfaltungskräfte sogar nur 1 pN, was für die hier gezeigten Konstrukte an der Auflösungsgrenze der Messmethode liegt. Da für immer größere Δx_{falt} die mittleren Faltungskräfte immer weniger stark von der Ziehgeschwindigkeit abhängen, kann aus den Daten nur eine Untergrenze für Δx_{falt} gewonnen werden. Die Annahme, dass sich der Einfluss der angefügten Aminosäuren auf die Ener-

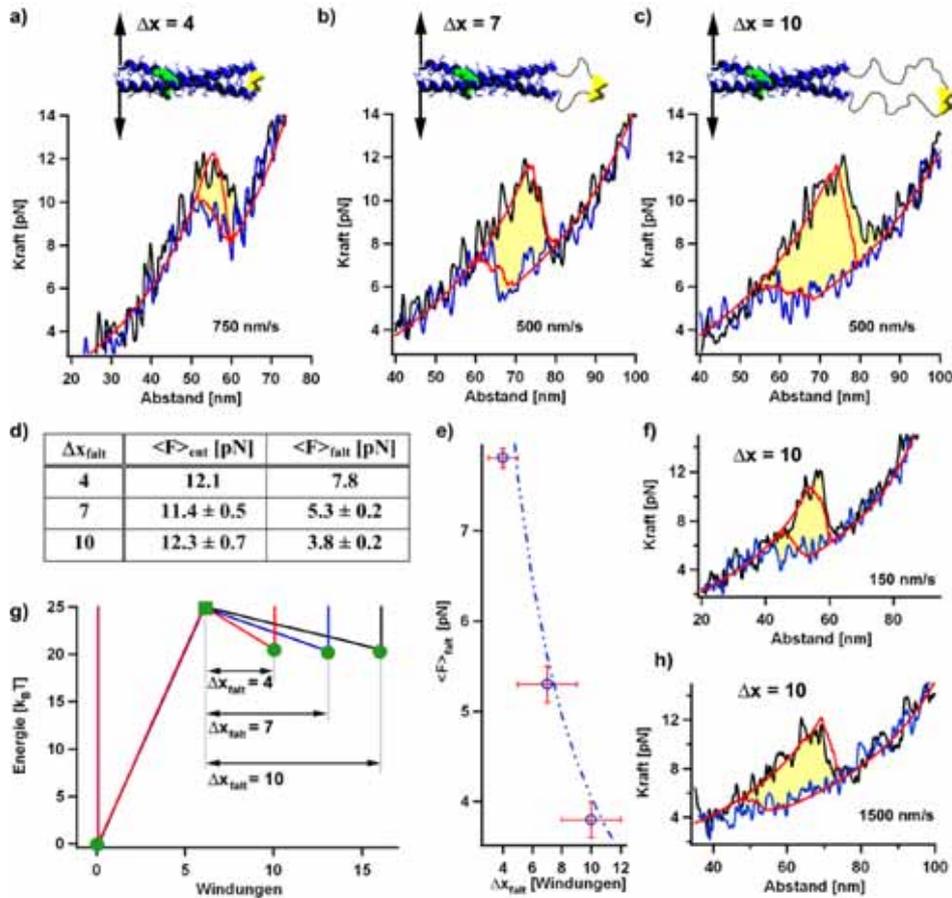


Abbildung 2.15: Gemittelte Entfaltungs- (schwarz) und Rückfaltungskurven (blau) der LZ10-Superhelix mit a) 0, b) 10 und c) 20 zusätzlich eingefügten, unstrukturierten Aminosäuren. d) Tabelle mit den mittleren Faltungs- und Entfaltungskräften der drei Superhelices. Dabei wurde über alle Kraftkurven mit Geschwindigkeiten zwischen 150 und 1500 nm/s gemittelt. e) Abhängigkeit der mittleren Rückfaltungskraft von der Barrierenbreite Δx_{falt} . g) Energielandschaften der gezeigten Superhelices. f) Entfaltungs- und Faltungskurven des LZ10-H6T Konstruktes bei Ziehgeschwindigkeiten von 150 nm/s und h) 1500 nm/s.

gielandschaft also hauptsächlich durch eine Verbreiterung der Energiebarriere bemerkbar macht, ist somit innerhalb der hier vorhandenen Auflösung zulässig.

Um die mittleren Ent- und Rückfaltungskräfte der LZ10-H3T und LZ10-H6T mit größerer Genauigkeit bestimmen zu können, wurden diese mit der in Abschnitt 2.2.3 vorgestellten Methode, für alle Ziehgeschwindigkeiten bestimmt. Da die Unterschiede in den mittleren Kräften in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit nicht auflösbar waren, wurde über alle Ziehgeschwindigkeiten gemittelt. Als mittlere Geschwindigkeit ergibt sich so 716 nm/s, die sich ergebenden mittleren Ent- und Rückfaltungskräfte sind in Abbildung 2.15 d) aufgeführt. Dabei ergeben sich die Werte für $\Delta x_{\text{falt}} = 4$ aus den Messungen an den LZ10-, LZ18- und LZ26-Konstrukten. Abbildung 2.15 e) zeigt die Abhängigkeit

der Rückfaltungskräfte von der Barrierenbreite Δx_{falt} . Eine Abschätzung der mittleren Rückfaltungskräfte kann wieder unter der Näherung von Bell mit Gleichung 1.28 gegeben werden. Einsetzen typischer Werte für die hier gezeigten Messdaten in Gleichung 1.28 ergibt die blau gestrichelte Linie in Abbildung 2.15 e). Allerdings muss bei der Abschätzung berücksichtigt werden, dass $\Delta x_{\text{Bell}}^{\text{on}} \approx 0.45 \cdot \Delta x_{\text{falt}}$ gilt, da im Bellmodell die Barrierenbreite stark von der aktuell anliegenden Kraft F abhängt und die entropische Kette im vorliegenden Kraftbereich nur zu etwa 45% gedehnt ist. Es ist bemerkenswert, dass die Näherung die Abhängigkeit der mittleren Rückfaltungskräfte von der Barrierenbreite sehr gut widerspiegelt [72][27].

2.4.3 Experimentelle Überprüfung des Fluktuationstheorems von Crooks

Die mechanische Entfaltung biologischer Makromoleküle findet oft weit entfernt vom thermodynamischen Gleichgewicht statt [73]. Diese Nichtgleichgewichtsmessungen sind theoretisch über die Fluktuationstheoreme (Abschnitt 1.4) mit der Gleichgewichtsenergie der Moleküle verbunden. Für die mechanische Entfaltung von RNA in einer optischen Pinzette konnte bereits die erfolgreiche Anwendung dieser FTe zur Bestimmung der Gleichgewichtsenergie ΔG gezeigt werden. Allerdings gab es bis jetzt keinen Beweis, dass diese FTe auch auf AFM-Experimente, deren Kraftsensoren eine sehr viel größere Federhärte besitzen, anwendbar sind [41]. Dieser Abschnitt wird die prinzipielle Anwendbarkeit der FTe auf AFM-Messungen zeigen.

Die mechanische Entfaltung der LZ26-Superhelix konnte bei langsamen Ziehgeschwindigkeiten von 150 nm/s mit einer Gleichgewichtstheorie erklärt werden (Abschnitt 2.3.1). Dazu mussten auf dem Weg vom gefalteten Zustand (1) zum entfalteten Zustand (4) zwei Zwischenzustände (2) und (3) angenommen werden. Die Entfaltung des in Richtung C-Terminus letzten Zwischenzustands (3) \rightleftharpoons (4) zeigte auch bei 150 nm/s Ziehgeschwindigkeit eine Hysterese von $7 k_B T$. Da die mittleren Kräfte im Gleichgewicht innerhalb der Hysterese zum liegen kommen müssen, konnte eine erste Abschätzung der Gleichgewichtsenergie des Übergangs (3) \rightleftharpoons (4) gewonnen werden. Es ergab sich damit eine Gleichgewichtsenergie für die gesamte LZ26 Entfaltung von $\Delta G_{\text{ges}} = 79 \pm 6 k_B T$. Durch die in Abschnitt 2.4.1 beschriebene Monte-Carlo Simulation der Nichtgleichgewichtskurven bei verschiedenen Geschwindigkeiten konnten die Barrierenhöhen der Entfaltung und Rückfaltung $\Delta G_{\text{off}}^{(4)}$ und $\Delta G_{\text{on}}^{(3)}$ des Übergangs (3) \rightleftharpoons (4) sehr genau bestimmt werden. Kennt man die Hin- und Rückfaltungsbarriere kann wegen Gleichung 1.25 auch die Gleichgewichtsenergie bestimmt werden. Es ergab sich für die gesamte, zum Entfalten der LZ26-Sequenz nötige Energie $\Delta G_{\text{ges}} = 79.2 \pm 3 k_B T$. Durch diese Experimente ist also die Gleichgewichtsenergie ΔG_{ges} bereits sehr genau bestimmt. Um zu zeigen, dass das FT von Crooks (Gleichung 1.34) gültig ist, muss aus den Wahrscheinlichkeitsverteilungen $P(E)$, die für Messungen mit hohen Geschwindigkeiten, also weit vom Gleichgewicht entfernt bestimmt wurden, die Gleichgewichtsenergie errechnet werden.

Eine direkte Bestimmung der Wahrscheinlichkeitsverteilungen $P_{\text{off}}(E)$ und $P_{\text{on}}(-E)$

aus einzelnen Entfaltungs- und Rückfaltungsereignissen ist wegen der limitierten Kraftauflösung des AFM vor allem bei höheren Ziehgeschwindigkeiten mit einem großen Fehler behaftet (siehe Abschnitt 2.2.3). Daher wurden die Verteilungen $P_{\text{off}}^{(3)}(E)$ und $P_{\text{on}}^{(4)}(E)$ mit der in Abschnitt 2.2.3 erklärten Methode für den Übergang $(3) \rightleftharpoons (4)$ ermittelt. Abbildung 2.16 d) zeigt die sich ergebenden Wahrscheinlichkeitsverteilungen die für vier verschiedene Ziehgeschwindigkeiten ermittelt wurden. Bei niedrigen Ziehgeschwin-

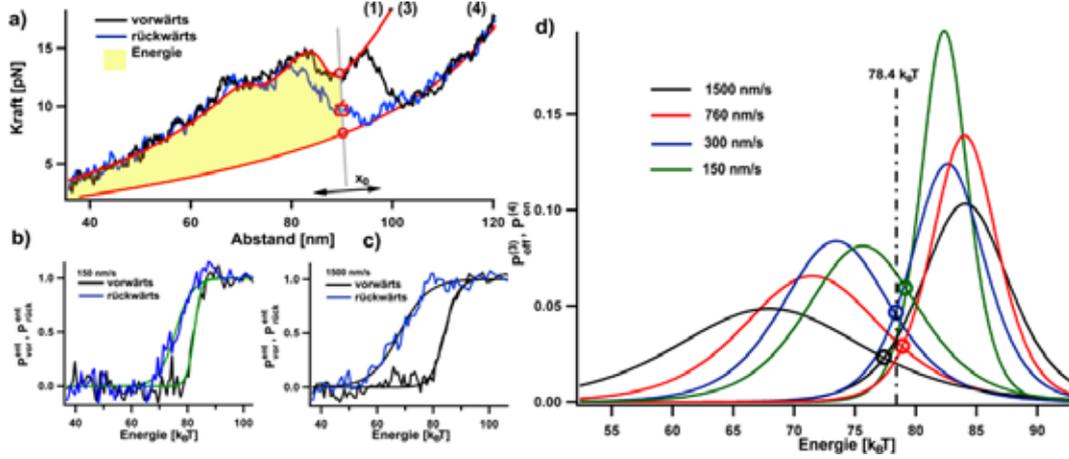


Abbildung 2.16: a) Methode zur Bestimmung der Energieverteilungen. Für jedes x_0 lässt sich die relative Anzahl dort entfaltet vorliegender Superhelices in Vorwärtsrichtung $P_{\text{vor}}^{\text{ent}}$ und in Rückwärtsrichtung $P_{\text{rück}}^{\text{ent}}$ bestimmen. Diese Wahrscheinlichkeiten sind in b) und c) gezeigt. d) Durch Ableiten einer an die Wahrscheinlichkeiten $P_{\text{vor}}^{\text{ent}}$ und $P_{\text{rück}}^{\text{ent}}$ gefitteten sigmoidalen Funktion erhält man die Wahrscheinlichkeitsverteilungen des FTs von Crooks

digkeiten (grün) liegen die Maxima der Verteilungen nahe zusammen, die mittlere dissipierte Energie beträgt etwa $7 k_B T$, was der mittleren Hysterese zwischen Vorwärts- und Rückwärtskurven bei dieser Geschwindigkeit entspricht (gelbe Fläche in Abbildung 2.6 a)). Mit höheren Ziehgeschwindigkeiten entfernen sich die Maxima der Verteilungen voneinander, die dissipierte Energie nimmt zu. Da am Schnittpunkt $P_{\text{off}}^{(3)}(E) = P_{\text{on}}^{(4)}(-E)$ und somit $\Delta G = E$ gilt, gibt dieser Ort die Gleichgewichtsenergie der LZ26 Entfaltung an. Für alle Ziehgeschwindigkeiten sind die Schnittpunkte der Verteilungen bei der selben Energie von $78.4 \pm 4 k_B T$. Dieser Wert stimmt exakt mit der durch die vorherigen Methoden gewonnenen Gleichgewichtsenergie von $79 k_B T$ überein. Obwohl also für Geschwindigkeiten von 1500 nm/s bereits im Mittel $16 k_B T$ Energie dissipiert, liefert das FT von Crooks noch die richtige Gleichgewichtsenergie.

Der Fehler in der Bestimmung der Wahrscheinlichkeitsverteilungen konnte mit der verwendeten Methode klein gehalten werden, da sich die Ungenauigkeiten der Kraftnullpunktsbestimmung im Mittel aufheben. Da schon die Verteilungen $P(F)$ in etwa die zu erwartende Form aufweisen (siehe Abbildung 2.14), sollten die Verteilungen $P(E)$ keine großen Fehler beinhalten, was indirekt durch das richtige Ergebnis für ΔG_{ges} bestätigt wird. Für die Überprüfung des Fluktuationstheorems von Jarzynski (Gleichung 1.36) darf allerdings die vorgestellte Methode der Mittelung nicht mehr angewandt werden. Dort müsste der

Erwartungswert $\langle \exp(-E/k_B T) \rangle$ gebildet werden, wofür man die Energien E jeweils einzelner Ereignisse sehr genau bestimmen müsste. Dennoch wurde das FT von Jarzynski bereits auf AFM basierte Daten angewandt.

Bei diesen Versuchen [74][75] ist die dissipierte Energie im Mittel größer als $50 k_B T$, weswegen auch die mit dem Jarzynskioperator verbundenen systematischen Fehler von Bedeutung sind [37], ein Experiment das die Genauigkeit des Jarzynskioperators für AFM-Versuche ermittelt, steht noch aus.

Harris *et al.*[76] bestimmten mit Hilfe von Gleichung 1.36 direkt die Entfaltungsbarriere ΔG_{off} der Domäne I27 von Herzmuskeltitin. Da nach der Entfaltung im Kraftmikroskop durch die Relaxation der Blattfeder die aktuell am Molekül anliegende Kraft nicht detektiert werden kann, beschränken sich die Autoren auf die Ermittlung der Energiebarriere des Übergangszustandes ΔG_{off} . Dazu nehmen sie an, dass Gleichung 1.36 auch für Übergänge $(1) \rightarrow (TS)$ gilt, wenn nur der Zustand (1) im Gleichgewicht und der Zustand (TS) arbiträr ist. Obwohl der größte Teil der Energie in die Verbiegung der Blattfeder und die Dehnung der entropischen Kette fließt, also die freie Energie $G(z)$ stark von z abhängt, bestimmen die Autoren die Energiebarriere indirekt, da sie nur die, mit der Potentialbreite $\Delta x_u = 0.6$ nm verbundene Längenänderung beim mittleren Entfaltungsübergang betrachten. Die Gleichgewichtsenergie ΔG_{ges} bestimmen die Autoren dann mit Hilfe der Faltungsbarriere aus Denaturierungsstudien. Diese Methode hätte gegenüber bisherigen Studien, die aus den gemessenen Entfaltungsraten nur über Gleichung 1.24 auf die Energiebarriere schließen können, den Vorteil, unabhängig von dem unbekanntem Vorfaktor k_T zu sein. Mit der Entfaltung von GFP in verschiedenen Zugrichtungen [54] könnte die Genauigkeit der vorgestellten Methode überprüft werden, da sie unabhängig von der Zugrichtung die selbe Gleichgewichtsenergie liefern müsste⁷.

2.5 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel wurde eine Mittelungsmethode vorgestellt, die es erlaubt die Widerstandskraft einzelner Superhelices gegen ein mechanisch induziertes, schrittweises Trennen ihrer α -helikalen Stränge, mit Hilfe eines Kraftmikroskops zu messen. Dies wurde an drei Superhelices verschiedener Länge gezeigt, die alle auf der GCN4-p1-Sequenz basieren. Die GCN4-p1-Superhelix wurde bereits in früheren Ensemble-Experimenten detailliert untersucht, wodurch Teile der hier gefundenen Ergebnisse überprüft werden können. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen, dass alle LZ-Superhelices bei Kräften zwischen 10 und 16 pN entfalten, wobei die beiden längeren Superhelices sequenzspezifische Kraftfluktuationen bei ihrer Entfaltung aufwiesen. Die Kraftfluktuationen rühren von hydrophilen Aminosäureresten des Asparagins her, die sich innerhalb des hydrophoben Kerns der Superhelix befinden. Durch Ersetzen eines einzelnen Asparagins durch ein hydrophobes Valin, konnte die damit assoziierte Kraftfluktuation gelöscht werden. Die damit verbundene Energiedifferenz konnte zu $6 k_B T$ bestimmt werden, was in

⁷In dieser Hinsicht ist bemerkenswert, dass für die verschiedenen Zugrichtungen des GFP in etwa $\langle F \rangle \Delta x_u = \text{const}$ gilt, mit $\langle F \rangle$ als mittlerer Entfaltungskraft und Δx_u als Potentialbreite.

sehr guter Übereinstimmung zu Ensemblestudien steht [58][59][62]. Insgesamt zeigt sich, dass bei langsamen Ziehgeschwindigkeiten von 150 nm/s die Entfaltung aller drei Superhelices mit einer mittleren dissipierten Energie pro Entfaltungs- und Rückfaltungszyklus von $7 k_B T$ sehr nahe am Gleichgewicht stattfindet. Ein theoretisches Modell, das auf dem Vorliegen thermodynamischen Gleichgewichts beruht, konnte die Kraftfluktuationen mit Hilfe sequenzspezifischer Energiewerte wiedergeben. Dieses Modell erlaubt es, die Kraftfluktuationen einer beliebig aus den gemessenen Windungen zusammengesetzten Superhelix im Gleichgewicht vorherzusagen. Darüber hinaus ist das Gleichgewichtsmodell in der Lage, ohne weitere freie Parameter das Entfaltungsverhalten der Superhelix bei einer mechanischen Überstreckung zu berechnen.

Alle Superhelices zeigen bei der Entfaltung des C-terminalen Endes einen Krafteinbruch, der im Gegensatz zu dem mit Asparagin assoziierten deutlicher ausgeprägt ist. Dieser Krafteinbruch ist mit der Bildung des Faltungskeims und mit einem Energieaufwand von $-11 k_B T$ verbunden. Die Bildung des Faltungskeims ist innerhalb der gemessenen Zeitskalen die einzige Ursache dafür, dass die gesamte Superhelix Energie an die Umgebung dissipiert, d.h. sie findet lediglich nahe des thermodynamischen Gleichgewichts statt. Dies ermöglichte es mit einem kinetischen Ratenmodell die Höhe und Position des, für eine Faltung zu überwindenden Übergangszustandes zu bestimmen. Es ergab sich, dass der Faltungskeim aus vier C-terminalen Windungen besteht, die in superhelikaler Form vorliegen müssen. Erst dann kann die weitere Faltung der Superhelix erfolgen. Auch dieses Ergebnis steht in sehr guter Übereinstimmung mit vorangegangenen „ Φ -Value analysis“-Studien[77][78][47].

Zusammen zeigt dies, dass die vorgestellte Methode in der Lage ist, die Ergebnisse aus Ensemblestudien durch Einzelmolekülexperimente zu reproduzieren. Zusätzlich dazu ermöglicht sie aber die, mit der Entfaltung verbundenen Energien und Kräfte lokal und an einzelnen Molekülen aufzulösen. So ergeben die in diesem Kapitel vorgestellten Experimente, dass sich die Windungen der LZ-Superhelices homogen zusammenfügen lassen; an den Schnittstellen entstehen somit keine energetisch ungünstigen Beiträge. Der Faltungskeim muss nur einmal am C-terminalen Ende gebildet werden, die Gleichgewichtsenergie einer zusammengefügten Superhelix ΔG_{1+2} ist also in diesem Fall größer als die Gleichgewichtsenergie der einzelnen Superhelices $\Delta G_1 + \Delta G_2$.

Da der Faltungskeim der untersuchten Superhelices sehr gut verstanden ist, lassen sich allgemeine Fragen zur Proteinfaltung beantworten, wie etwa die Abhängigkeit der Faltungskraft von der Größe des Faltungskeims. Dies kann experimentell durch C-terminales Anfügen unstrukturierter Aminosäuresequenzen an die Superhelix erreicht werden. Es zeigt sich, dass mit der Größe des Faltungskeims die mittlere Faltungskraft abnimmt. Ein Modell, bei dem die Höhe der Faltungsbarriere unverändert bleibt, die Potentialbreite der Faltung aber durch die Anzahl eingefügter Aminosäuren bestimmt ist, konnte die gemessenen Daten reproduzieren. Besteht der Faltungskeim aus 70 Aminosäuren, so ergibt sich eine mittlere Rückfaltungskraft von 3.8 pN, was innerhalb der Größenordnung von Rückfaltungskräften globulärer Proteine ähnlicher Größe ist [27]. Dies zeigt, dass bei den komplexen Vorgängen der Proteinfaltung gegen eine anliegende Kraft, die Länge des zu kontrahierenden Polypeptides eine dominierende Rolle spielt.

Durch Erhöhen der Ziehgeschwindigkeit erhöht sich die von der Superhelix an die Umgebung dissipierte mittlere Energie $\langle W_{\text{diss}} \rangle$. Die Superhelixentfaltung lässt sich also nahe am Gleichgewicht ($v = 150 \text{ nm/s} \equiv \langle W_{\text{diss}} \rangle = 7k_B T$) und entfernt vom Gleichgewicht ($v = 1500 \text{ nm/s} \equiv \langle W_{\text{diss}} \rangle = 16k_B T$) studieren, wodurch sich die Vorhersagen von Fluktuationstheoremen experimentell überprüfen lassen. So konnte die Gültigkeit des Fluktuationstheorems von Crooks auch für kraftspektroskopische Messungen mit den relativ steifen Blattfedern eines AFM gezeigt werden.

Die hier vorgestellte, kraftspektroskopische Methode ergänzt die klassischen Methoden der chemischen oder thermischen Denaturierung hervorragend, da diese zum einen für sehr stabile Superhelices nur noch näherungsweise angewandt werden können (Anhang A) und zum anderen die lokale Auflösung der Faltungsvorgänge aufwendig ist. Auch bildet die hier entwickelte Methode die Grundlage für weitere systematische Untersuchungen an Superhelices. So wäre es denkbar mit Hilfe einer homogen, aus gleichen Windungen aufgebauten Superhelix, die lokalen Kraftantworten schwächerer Interaktionen, wie beispielsweise die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren der e- und g-Positionen, direkt zu testen. Einen Hinweis, dass auch solche Interaktionen auflösbar sind, liefert Abbildung 2.17, die eine gemittelte Entfaltungskurve der LZ26-N/V-Superhelix zeigt, bei welcher das mittlere Asparagin durch ein Valin ersetzt wurde (vgl. Abbildung 2.6 c)). Wären alle Windungen gleichwertig, wie für die theoretische Beschreibung angenommen,

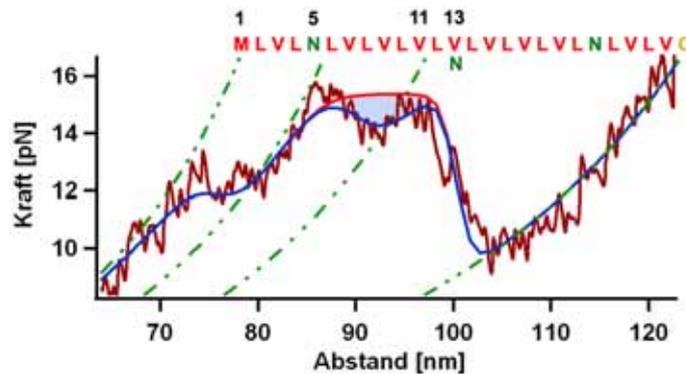


Abbildung 2.17: Vorwärtskurve der LZ26-N/V-Superhelix die schon in Abbildung 2.6 c) gezeigt wurde. In rot ist die mit den Energiewerten der Tabelle 2.1 berechnete Gleichgewichtskurve zu sehen. Die geringe Abweichung der Daten kann durch eine um $2 k_B T$ verringerte Stabilität der elften Windung beschrieben werden. Dies ist durch die blaue Kurve gezeigt.

so müsste sich ein Kraftplateau zwischen den Windungen 5 und 13 ergeben (rote Kurve in Abbildung 2.17). Die geringe Abweichung von $2 k_B T$ (blaue Fläche in Abbildung 2.17) der Daten von der theoretischen Vorhersage impliziert, dass die Energieterme E_{SH} der Tabelle 2.1 weiter differenziert werden müssen. So lassen sich die experimentellen Daten durch die Gleichgewichtsbeschreibung mit den Werten aus Tabelle 2.1 reproduzieren, wenn für die elfte Windung ein Wert von $E_{\text{SH}}^{11}(V) = 2.5 k_B T$ angenommen wird (blaue Kurve in Abbildung 2.17). Da sich an dieser Position eine hydrophobe Aminosäure im Superhelixkern befindet, muss die geringere Energie von anderen Wechselwirkungen herrühren. Beispiels-

weise könnten die inhomogen verteilten elektrostatischen Wechselwirkungen der Superhelix an den e- und g-Positionen dafür verantwortlich sein (siehe Abbildung 2.1). Dies könnte durch weitere Messungen an verlängerten LZ34 oder LZ42 Superhelices, bei denen alle Asparagine durch Valine ersetzt wurden, überprüft werden. Die vorgestellten Messungen zeigen auch, dass es möglich ist mittlere Energieschwankungen von $2 k_B T$ aufzulösen.

In dieser Arbeit wurden die Superhelices immer vom N-terminalen Ende her belastet. Dadurch lässt sich die kooperative Länge, die eine energetische Störung der Sequenz hat, in N-terminaler Richtung vermessen. Durch mechanisches Belasten der Superhelix aus C-terminaler Richtung ließe sich die Symmetrie dieser Störungen klären.

Für die Messung solcher Effekte oder für die genauere Bestimmung der mittleren Rückfaltungskräfte in Abhängigkeit der Keimgröße und Ziehgeschwindigkeit wäre eine höhere laterale Auflösung und eine höhere Kraftauflösung wünschenswert. Da die laterale Auflösung vorwiegend durch die entropische Kette des Trägerproteins limitiert ist, könnte diese durch das Verwenden sehr steifer Trägermoleküle (wie beispielsweise konstruierter 3D Strukturen aus DNA [79]), erhöht werden. Eine Erhöhung der Kraftauflösung wäre mit der Methode der Lock-in Messung denkbar [70][80], oder durch die Verwendung optischer Pinzetten.

Kapitel 3

Mechanisches Entfalten der Superhelices molekularer Motoren

3.1 Einleitung

3.1.1 Molekulare Motoren

Molekulare Motoren sind Enzyme, die chemische Energie in mechanische Arbeit umwandeln können. Sie sind essentiell für eine Vielzahl biologischer Abläufe die mit Bewegung assoziiert sind, wie z.B. die Mitose, der Transport von Vesikeln, die Muskelkontraktion oder die Fortbewegung von Bakterien. Grob lassen sich Linearmotoren und Rotationsmotoren unterscheiden. Als ein Beispiel für letztere ist der bakterielle Flagellarmotor erwähnenswert, der durch Ausnützung eines Protonengradienten über der Bakterienmembran eine Drehbewegung der an ihm hängenden Geißeln erzeugt, die dem Bakterium die Fortbewegung ermöglicht [81][82][83]. Im Gegensatz dazu bewegen sich Linearmotoren geradlinig, entlang spezieller Filamente. Eine wichtige Untergruppe molekularer Linearmotoren stellen die Myosine dar, die durch Hydrolyse von ATP unter anderem für die Kontraktion von Muskelzellen sorgen. Diese beruht auf einem gerichteten Gleiten von dicken, myosinhaltigen Filamenten an dünneren, aktinhaltigen Filamenten. Der diesem Gleiten zu Grunde liegende molekulare Mechanismus konnte seit Mitte der 50er Jahre durch die Entdeckung feiner Querbrücken zwischen den Filamenten [84][85] mehr und mehr aufgeklärt werden.

Myosin ist ein Vertreter der am besten untersuchten Gruppe von Linearmotoren, den Zytoskelett assoziierten Motoren. Die beiden anderen bekannten Mitglieder dieser Gruppe sind Dynein und Kinesin. Während sich Myosin an Aktin entlang bewegt, benutzen Dynein und Kinesin Mikrotubuli als „Gleise“ [86][87][88]. Seit dem ersten Nachweis von Dynein im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* [89] im Jahre 1987 und Kinesin in Tintenfischaxonen zwei Jahre zuvor [90][91], wurde eine Vielzahl von weiteren Motoren gefunden, die sich den drei Gruppen zuordnen lassen. So sind heute 18 verschiedene Klassen von Myosinen, 10 Klassen der Kinesine und zwei Gruppen von Dyneinen bekannt, die jeweils wieder aus bis zu mehreren Dutzend Mitgliedern bestehen. Die genaue Einteilung der Kinesin-,

Myosin- und Dynein-Familie ist in [92][93][94] zu finden. Trotz der hohen Diversität der Myosin- und Kinesinmotoren zeigen jedoch Kristallstrukturen eine große Ähnlichkeit im Bereich der ATP Bindungsstelle der verschiedenen Motoren: Das grundlegende Prinzip der Krafterzeugung beruht bei allen Motoren der Kinesin und Myosin Familie auf einer stufenweisen Verstärkung kleiner Strukturänderungen, die durch die Hydrolyse von ATP hervorgerufen werden [95].

Bei der Umsetzung von chemisch gespeicherter Energie in gerichtete Bewegung kann man wieder zwei Arten von Motortypen unterscheiden: Prozessive und nichtprozessive Motoren. Nichtprozessive Motoren wie das dimere Myosin II interagieren nur sehr kurz (etwa ein Zehntel der Zeit eines ATPase Zykluses) mit Aktin und verlieren dann wieder den Kontakt. Arbeiten allerdings mehrere Myosine, wie zum Beispiel im Muskel zusammen, so führt das zu einer sehr schnellen Bewegung des Gesamtsystems. Im Gegensatz dazu können sich einzelne, prozessive Motoren wie beispielsweise konventionelles Kinesin, über sehr lange Strecken im Bereich von mehreren μm bewegen, ohne den Kontakt zum Filament zu verlieren. Lange dachte man, dass nur dimere Motoren prozessiv sein könnten, allerdings wurden 1999 auch erstmals prozessive, monomere Motoren gefunden [96][97], deren Funktion sich aber deutlich von vorher genannten Motoren unterscheidet.

3.1.2 Die Kinesin-1 Untergruppe

Ein besonders gut untersuchtes Beispiel eines prozessiven, dimeren Motors ist das konventionelle Kinesin, oder, nach neuer Nomenklatur [98], Kinesin-1. Es ist unter anderem verantwortlich für den Transport verschiedener Organellen oder Vesikel, für den Transport von mRNA und verschiedener Signal-Moleküle [99]. Es bewegt sich schrittweise, indem es den hinteren Motorkopf vor den vorderen setzt [100] in Richtung des Plus-Endes entlang von Mikrotubuli und kann dabei etwa 150 Schritte von 8 nm Länge machen, ohne vom Mikrotubulus zu dissoziieren [101]. Einzelne Kinesinmotoren können dabei maximal entgegen einer Kraft von 5 pN arbeiten [102]. Die Struktur der Motordomänen, sowie die über die Necklinker anhängende „Halssuperhelix“¹ konnte 1997 aufgeklärt werden [103] und ist in Abbildung 3.1 a) gezeigt. Dies bestätigte für die N-terminale Halssequenz, dass sie als Superhelix vorliegt und für die Dimerisation des Kinesins verantwortlich ist [106]. Bereits 1989 erkannte man, dass der auf die Halssequenz folgende Teil der Struktur, der als „Stalk“ bezeichnet wird, als Superhelix vorliegt [105], was später durch Elektronenmikroskopie und Circular Dichroismus Messungen bestätigt werden konnte [107]. Vorhersageprogramme, die die Häufigkeit bestimmter Aminosäuren an den einzelnen Heptadenpositionen analysieren, zeigten mehrere, wahrscheinlich nicht als Superhelix vorliegende Unterabschnitte im Kinesin-„Stalk“ [104][108] (Abbildung 3.1 c)). Dabei könnte der in der Mitte des Stalks liegende, nicht superhelikale Teil für den Knick des „Stalkes“, der in elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu beobachten ist, verantwortlich sein. Der nicht superhelikale Teil („Hinge“-Region), der direkt auf die Halsregion des Motors folgt, konnte in den Röntgenstrukturmessungen nicht aufgelöst werden, was für eine hohe Flexibilität

¹im Englischen: neck coiled coil

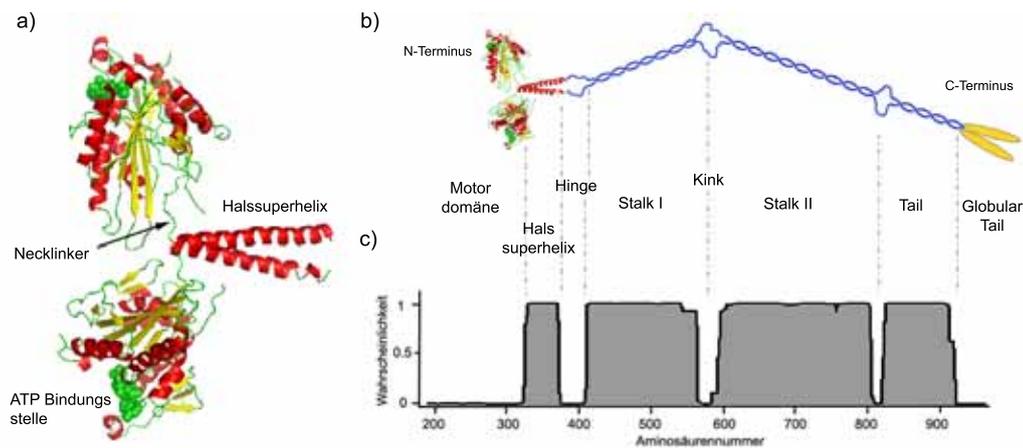


Abbildung 3.1: a) Röntgenstrukturmodell der dimeren, *Rattus norvegicus* Motordomäne des Kinesins-1. Der PDB Eintrag ist unter „3Kin“ zu finden [103]. b) Schematischer Aufbau des gesamten Motormoleküls c) Superhelixstrukturvorhersage mit dem Algorithmus von Lupas [104]

dieses Sequenzabschnittes spricht. Durch NMR-Studien an einem 30 Aminosäuren langen Abschnitt, der das Ende der Halssuperhelix und den Beginn der Hingeregion einschloss, wurde diese Flexibilität durch das Auffinden vieler möglicher Konformationen, die diese Region einnehmen kann, bestätigt. [109]

3.1.3 Superhelices als Motive zur Motordimerisation

Molekulare Motoren dimerisieren häufig mit Hilfe von Superhelices. Beispiele dafür sind Kinesin-1 und 14, sowie Myosin II, V-VIII, X und XI. Dabei ist die Hauptfunktion der Superhelices, dass sie prozessiven Motoren durch die Dimerbildung erlaubt, immer mindestens einen Motorkopf am Filament gebunden zu haben, wodurch der Motor über viele ATP-Zyklen im dauerhaften Kontakt zum Filament bleiben kann. Darüber hinaus können die Superhelices aber auch verschiedene Motoreigenschaften beeinflussen, bis hin zur Direktionalität des Motors. Der prozessive Kinesinmotor Ncd ist ein Dimer, wobei sich seine Kopfgruppen am C-Terminus der dimerisierenden Superhelix befinden. Er ist mitverantwortlich für die Chromosomentrennung und bewegt sich eigentlich auf dem Mikrotubulus in Richtung des Minusendes. Durch Mutation von 12 Aminosäuren der Superhelix, die mit der Motorkopfdomäne wechselwirken, ändert der Motor seine Bewegungsrichtung [110]. Weniger drastische Mutationen der selben Region der Ncd-Superhelix ändern zwar die Bewegungsrichtung nicht, verringern aber die Motorgeschwindigkeit [110]. Weitere Chimären aus konventionellem Kinesin und Ncd zeigten, dass die dimerisierende Superhelix, obwohl sie außerhalb der Motordomäne ist, die Bewegungsrichtung des jeweiligen Motorkopfes bestimmt [111]. Die Mutation nur einer Aminosäure in der Superhelix des Ncd-Motors führt zur völligen Einbuße der Motordirektionalität. Er bewegt sich mit Wildtypgeschwindigkeiten stochastisch mal zum Plus- mal zum Minusende des Mikrotubulus [112][113]. Auch auf die Prozessivität eines Motors kann die Superhelix Einfluss haben. So konnte durch

Einfügen von positiven Ladungen in der Halsregion des konventionellen Kinesins dessen prozessive Lauflängen um das Vierfache verlängert werden, wohingegen negative Ladungen die Lauflängen verkürzten [114].

Wenn der Motor läuft, wirkt auf die Enden der dimerisierenden Superhelix eine laterale, mechanische Kraft ein, die sofort folgende Frage aufwirft:

Ist das Entwinden der Superhelix notwendig für Motorenschritte? Durch die Strukturauflösung der dimeren Kinesinmotordomäne der Ratte im Jahre 1997 [103] erkannte man, dass ohne ein Dehnen des Dimers nicht beide Motorköpfe gleichzeitig an den Mikrotubulus binden konnten [115]. Es entwickelten sich zwei Vorschläge dafür, welche Strukturänderung das gleichzeitige Binden beider Köpfe an den Mikrotubulus erlauben würde: Der erste Vorschlag basierte auf einem partiellen Entwinden der Halssuperhelix [115][116][117], der zweite auf einem Abziehen des Necklinkers von der Motordomäne [118]. Messungen an humanem Kinesin, welches dem der Ratte sehr ähnlich ist, zeigten, dass der Necklinker verschiedene Konformationen einnimmt. Ist das Kinesin am Mikrotubulus gebunden und zusätzlich ATP in der Nukleotid-Tasche, so ist der Necklinker an die Motordomäne angedockt. Ist jedoch ADP oder kein Nukleotid in der Bindungstasche, so kann sich der Necklinker von der Motordomäne lösen [119][120]. In diesem Zustand wäre auch ein gleichzeitiges Binden beider Köpfe an den Mikrotubulus möglich. Um die Frage zu klären, ob ein Entwinden der Halssuperhelix, oder ein Abziehen des Necklinkers für die Prozessivität und Funktion des Motors wichtig ist, wurden verschiedene Disulfid-Mutanten des konventionellen Kinesins untersucht. Dabei wurde in einer Variante, durch eine kovalente Bindung das Abziehen des Necklinkers unterbunden, in einer anderen Variante das Entwinden der Superhelix. Die Mutante mit fest angedockten Necklinker zeigte keine gerichtete Bewegung mehr, wohingegen die Mutante mit N-terminal fest verbundenen Superhelices, bis auf eine um 40% verringerte Lauflänge, nur geringe Unterschiede zum Wildtyp aufwies [101]. Zusätzlich zeigte eine kryo-elektronenmikroskopische Untersuchung, dass die Halssuperhelix völlig gefaltet ist, wenn beide Motorenköpfe am Mikrotubulus gebunden sind [121]. Auch ein Ersetzen der Halssuperhelix durch eine synthetische, sehr stabile Superhelix führte zu keiner beobachtbaren Einbuße der Prozessivität [118]. Zusammen spielt also bei humanem, konventionellen Kinesin ein Entwinden der Halssuperhelix höchstens eine untergeordnete Rolle.

Da die Kinesin-1 Halssuperhelix des Pilzes *Neurospora crassa* (NKin) eine sehr geringe Stabilität zeigt, wurde vermutet, dass bei diesem Kinesin ein Entwinden der Halssuperhelix innerhalb des ATPase-Zyklus' für die hohe Geschwindigkeit des Motors verantwortlich sein könnte [122][123]. Tauscht man die Wildtyp Superhelix gegen eine sehr stabile, synthetische Superhelix gleicher Länge aus, so ergeben sich in Einzelmolekülmessungen unter Kraft geringere Lauflängen und Geschwindigkeiten [124]. Allerdings hat eine Disulfidbrücke am N-Terminus der Wildtyp Halssuperhelix wiederum keinen Einfluss auf Lauflänge oder Geschwindigkeit des Motors unter Last [125]. Ein Modell, bei dem die axiale Flexibilität der Superhelix verantwortlich für die Prozessivität und Geschwindigkeit des Motors unter Last ist, würde diese Effekte erklären.

Auch bei anderen Motoren wie dem Kinesin-14 Motor Ncd [126] oder Myosin VI [127] wird vermutet, dass ein Entfalten der dimerisierenden Superhelix auftreten könnte; eine direkte experimentelle Prüfung der Vermutungen steht jedoch noch aus.

3.1.4 Die *Drosophila melanogaster* Halssuperhelix

Motiviert durch die Strukturdaten der dimeren Motordomäne des Kinesins und die Vermutungen, dass sich die Halssuperhelix für die Motorschritte entwinden muss (vgl. Abschnitt 3.1.3), ergaben sich eine große Anzahl experimenteller Untersuchungen. Es stellte sich heraus, dass die nur 31 Aminosäuren lange Struktur eine Vielzahl von komplexen und teilweise für Superhelices untypischen Interaktionen aufweist. Dieser Abschnitt versucht eine Zusammenfassung der vorhandenen Erkenntnisse zu dieser Superhelix zu geben.

Abbildung 3.2 a) zeigt schematisch für die Halssuperhelix der Ratte die Anordnungen der einzelnen Aminosäuren im gegebenen Heptadenschema. Der allgemeine Aufbau von Superhelices ist in Abschnitt 1.1 zu finden. In Abbildung 3.2 b) ist die aufgelöste Röntgenstruktur gezeigt [103]. Dabei sind nur die Restgruppen der Aminosäuren, die sich innerhalb des Heptadenschemas an a- oder d-Positionen befinden eingezeichnet. Die Abbildungen sind an [128] angelehnt. Man erkennt, dass sich die Struktur grob in zwei Segmente unterteilen lässt. Segment II zeigt das für Superhelices typische Heptadenschema, an den a- und d-Positionen finden sich hydrophobe Aminosäuren (grün dargestellt), die die typische „knob-into-holes“ Anordnung aufzeigen (Abbildung 3.2 b)). Erstaunlich ist allerdings die Anordnung der Aminosäuren im Segment I. Dort finden sich an den a- und d-Positionen der Superhelix untypische, das heißt geladene, sehr große und polare Aminosäuren. So zeigen die unpolaren Restgruppen des Tryptophans W342 und des Thyrosins Y346 vom hydrophoben Zentrum der Superhelix weg. Dies führt zusammen mit den sie umgebenden Strukturen wie den langen und hydrophoben Seitenketten der Lysine (K) zu einem „hydrophoben Mantel“ anstelle des für Superhelices bekannten „hydrophoben Kerns“ [128]. Ensemblestudien unterstützen die Aussage, dass diese spezielle Anordnung eine thermodynamische Stabilität aufweist, da eine Ersetzung des Tryptophans durch Alanin zu einer Destabilisierung der Superhelix führt. Diese ist vergleichbar mit dem Stabilitätsverlust, der durch das völlige Löschen der ersten Heptade auftritt [129]. Das Segment I lässt sich also grob weiter in die, den „hydrophoben Mantel“ bildende erste Heptade und die folgende Heptade mit der sich wiederholenden „EKEK“-Sequenz (rot dargestellt in Abbildung 3.2 c)) unterteilen. Tripet *et al.* zeigten bereits, dass die Stabilität der „EKEK“-Sequenz erhöht werden konnte, indem die Aminosäuren an a- und d-Positionen durch ideale, hydrophobe Aminosäuren ersetzt wurden [116], was auf einen destabilisierenden Effekt dieser Sequenz auf die Superhelix hinweist. Dennoch wird spekuliert, ob die geladene Glutaminsäure E349 in ihrer für Superhelices untypisch geladenen Umgebung, stabilisierende Effekte haben könnte [106][128].

Zusätzlich zu den Studien, die sich auf die Superhelix bezogen, konnte gezeigt werden, dass die N-terminal folgenden, nicht mehr helikalen Aminosäuren des „Necklinkers“ eine weitere stabilisierende Wirkung auf das N-terminale Ende der Superhelix ausüben. Dies wird durch die Motive der „Capping-Box“ und eines hydrophoben Stapels erreicht, die

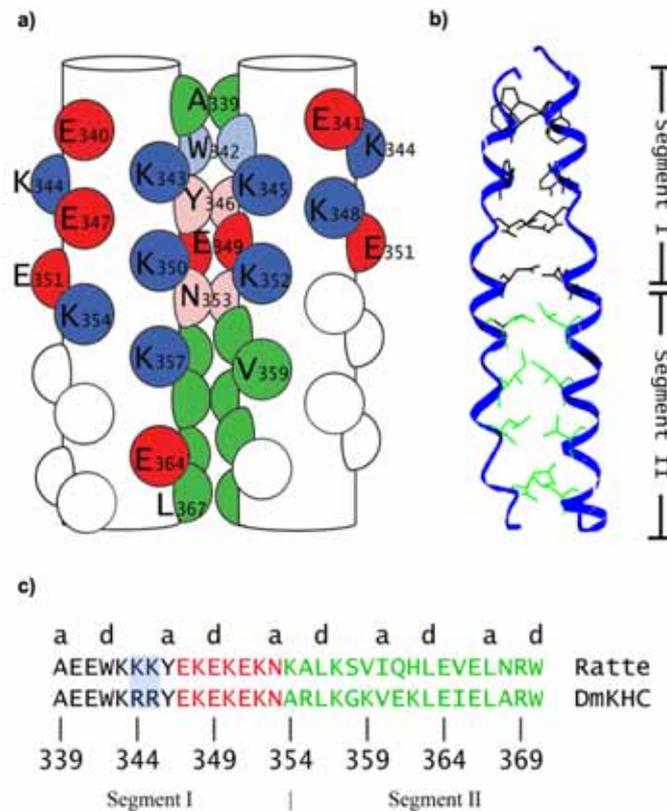


Abbildung 3.2: a) Schematische Struktur der Kinesin Halssuperhelix der Ratte. Angelehnt an [116][128]. Hydrophobe Aminosäuren sind in grün gezeigt, positiv geladene in blau, negativ geladene in rot. b) Röntgenstruktur der Halssuperhelix [103][128]. Gezeigt ist nur das Rückgrat beider α -Helices und die Restgruppen der Aminosäuren, die sich an den a- und d-Positionen innerhalb des Heptadenschemas befinden. c) Aminosäuresequenz der gezeigten Superhelix aus dem Kinesin der Ratte. Darunter ist die entsprechende Sequenz der *Drosophila melanogaster* Superhelix gegeben.

allerdings zu einer Terminierung der α -Helix führen [129]. Eine genauere Diskussion wird in Abschnitt 3.2.4 geführt.

Die genannten Eigenschaften der Halssuperhelix werfen sofort Fragen nach den lokalen Stabilitäten einzelner Abschnitte innerhalb der nativen Superhelix auf. So ist ein interessanter Aspekt die lokale Stabilität der ersten Heptade, die sich strukturell stark von normalen Superhelixheptaden unterscheidet. Auch lässt sich die Frage stellen, welchen lokalen Einfluss die „EKEK“-Sequenz hat. Außerdem ist von Interesse, wie stark die helixbrechende Sequenz am N-Terminus der Halssuperhelix eine weiter folgende Superhelix destabilisieren kann und wie weit sich diese Destabilisierung N-terminal fortsetzt. Während Ensemblestudien wie die CD-Spektroskopie nur Zugriff auf die Gesamtstabilität der Proteine haben, stellt die Kraftspektroskopie den idealen experimentellen Aufbau zur Verfügung, um diese Fragen zu beantworten. Ferner kann durch die Kraftspektroskopie

direkt die Frage nach den Kräften geklärt werden, die zu einer Entfaltung der Superhelix führen. Da mit großer Wahrscheinlichkeit ein solches Entfalten für die einzelnen Schritte des Motors nicht nötig ist (siehe Abschnitt 3.1.3), gibt diese Zahl eine Grenze für die im Motor möglichen, lokal wirkenden Kräfte an. Die nachstehenden Abschnitte werden sich daher mit der mechanischen Untersuchung der Halssuperhelix des Kinesins aus der *Drosophila melanogaster* Fruchtfliege beschäftigen. Die Sequenz ist unter DmKHC in Abbildung 3.2 c) zu finden und ist vor allem im Segment I äußerst homolog zur Kinesinsequenz der Ratte. Die einzigen Unterschiede finden sich in der sehr konservativen Ersetzung zweier Lysine (K) durch Arginin (R), die beide etwa die gleiche Größe haben und positiv geladen sind (blau eingerahmt). Die Aminosäuren im Segment II sind hingegen nicht so gut konserviert, nur die a- und d-Positionen zeigen große Übereinstimmung.

3.2 Mechanisches Entwinden der *Drosophila melanogaster* Halssuperhelix

In Kapitel 2 wurde gezeigt, dass es mit dem Kraftmikroskop möglich ist, die Kraft, die zum Entwinden einer Superhelix benötigt wird aufzulösen. Daher ist der vorgestellte experimentelle Aufbau ideal dazu geeignet, die mechanischen Stabilitäten Motor-dimerisierender Halssuperhelices zu bestimmen, die in ihrer natürlichen Funktion lateralen Kräften ausgesetzt sind. Im folgenden Abschnitt wird die mechanische Stabilität der Halssequenz des *Drosophila melanogaster* Kinesins (DmKHC) ermittelt. Außerdem werden die Stabilitäten einzelner Heptaden, die für Superhelices untypische Sequenzen aufweisen, durch verschiedene Chimärkonstrukte bestimmt.

3.2.1 Direkte Messungen an der DmKHC-Halssequenz

In einem ersten Set von Experimenten wurde mit dem bereits beschriebenen Aufbau (Abschnitt 2.2) die DmKHC-Halssequenz mechanisch aufgetrennt. Die untersuchte Aminosäuresequenz ist bis auf eine Mutation des sich an der d-Position der fünften Heptade befindenden Tryptophans (W370) zu einem Cystein (C) unverändert und in Abbildung 3.3 b) aufgeführt. Die aufgelöste Kristallstruktur der Halssuperhelix aus der Ratte ist in 3.3 a) gezeigt, die Pfeile geben die, durch den experimentellen Aufbau wirkende Kraft F auf die Struktur an. Die gemittelten Kraft-Abstandskurven, die sich bei der Entfaltung (schwarz) und bei der Rückfaltung (blau) an dem gezeigten Konstrukt ergeben, sind in Abbildung 3.3 c) für Ziehgeschwindigkeiten von 150 nm/s und in Abbildung 3.3 d) für 500 nm/s gezeigt. Beide Kurven zeigen einen Übergang vom Kraftverlauf des gefalteten Zustands (WLC-Kraft-Abstandskurve (1)) zum entfalteten Zustand (WLC-Kraft-Abstandskurve (2)). Dabei entspricht der gemessene Konturlängenzuwachs $L_{(2)} - L_{(1)} = 23.0$ nm, den durch die Entfaltung einer korrekt gefalteten Halssuperhelix zu erwartenden 9 Windungen.

Das gemessene, mittlere Kraftverhalten zeigt bei einer Ziehgeschwindigkeit von 150 nm/s eine mittlere Entfaltungskraft von 12.5 ± 1.5 pN (grau gestrichelte Linie in Abbildung 3.3 c)). Bei einer Ziehgeschwindigkeit von 500 nm/s steigt die mittlere Entfaltungskraft

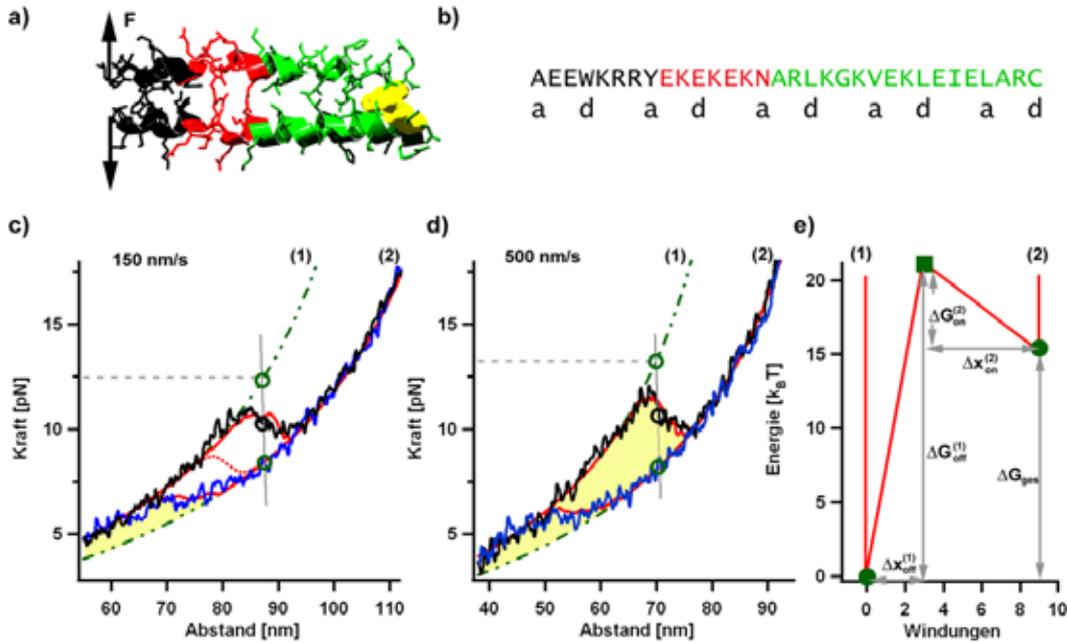


Abbildung 3.3: a) Röntgenstrukturmodell der Halssuperhelix des *Rattus norvegicus* Kinesins [103], das eine hohe Sequenzanalogie zur verwendeten *Drosophila melanogaster* Kinesin Halssuperhelix aufweist. b) Aminosäuresequenz der *D. melanogaster* Halssuperhelix. Darunter sind die a- und d-Positionen der Aminosäuren im Heptadenschema angegeben. An der letzten d-Position wurde ein Cystein eingefügt. c) Gemittelte Kraft-Abstandskurven mit 150 nm/s Ziehgeschwindigkeit. Schwarz gezeigt sind Entfaltungskurven, blau Rückfaltungskurven. Rot gepunktet ist die zu erwartende Kraftkurve im Gleichgewicht angegeben. d) Gemittelte Kraft-Abstandskurven mit 500 nm/s Ziehgeschwindigkeit. e) Für die Monte Carlo Simulation verwendete Energielandschaft. Die Parameter sind: $\Delta x_{\text{off}}^{(1)} = 3 \pm 2$ Windungen, $\Delta G_{\text{off}}^{(1)} = 21.5 \pm 4 k_B T$ und $\Delta G_{\text{ges}} = 15.5 \pm 4 k_B T$

auf 13.5 ± 1.5 pN (grau gestrichelte Linie in Abbildung 3.3 d)). Selbst bei langsamen Ziehgeschwindigkeiten von 150 nm/s, treten keine Entfaltungen der Superhelix für Kräfte < 11 pN auf.

Die Hysterese zwischen den Vorwärts- und Rückwärtskurven der DmKHC-Superhelix ist, im Vergleich mit dem gleich langen LZ10-Konstrukt (Abschnitt 2.3.2) bei vergleichbaren Ziehgeschwindigkeiten deutlicher ausgeprägt, die DmKHC-Superhelixentfaltung ist also weiter vom thermodynamischen Gleichgewicht entfernt, wodurch die Anwendung der Gleichgewichtstheorie aus Abschnitt 1.2 nicht mehr gerechtfertigt ist. Dennoch lässt sich die für ein mechanisches Aufschmelzen nötige Gleichgewichtsenergie ΔG_{ges} , eingrenzen. Die Fläche, die von der gemessenen, schwarzen Kraft-Abstandskurve und dem WLC-Verlauf (2) eingeschlossen wird (gelb in Abbildung 3.3 d)), entspricht grob der Energie, die im Mittel für eine Entfaltung der DmKHC-Superhelix aufgebracht werden muss. Diese ergibt sich für 150 nm/s zu $\approx 24 k_B T$ und für 500 nm/s zu $\approx 27 k_B T$. Auf die gleiche Weise lässt sich die bei der Rückfaltung wieder frei werdende Energie ermitteln (gelb markierte Fläche in Abbildung 3.3 c)). Sie ergibt sich bei beiden Geschwindigkeiten zu $\approx 10 k_B T$.

Da sich mit abnehmender Ziehgeschwindigkeit die mittlere, zur Entfaltung aufgebrauchte Energie senken und die mittlere, bei der Rückfaltung gewonnene Energie erhöhen wird, muss sich die Gleichgewichtsenergie ΔG_{ges} zwischen den angegebenen Grenzen befinden.

Um ΔG_{ges} genau zu bestimmen, wurden die Entfaltungs- und Rückfaltungsraten der DmKHC-Superhelix unter Kraft mit der in Abschnitt 1.3.2) vorgestellten Monte-Carlo Simulation ermittelt. Begrenzt durch das Auflösungsvermögen des experimentellen Aufbaus, ist analog zur gleich langen Superhelix LZ10-beim Übergang zwischen völlig gefalteten Zustand (1) zum völlig entfalteten Zustand (2) kein stabiler Zwischenzustand zu erkennen. Für die Monte-Carlo Simulation wurde daher die in Abbildung 3.3 e) gezeigte Energielandschaft mit nur zwei möglichen Zuständen verwendet, die durch das folgende kinetische Schema beschrieben werden kann:



Dabei ist der völlig gefaltete Zustand (1) vom völlig entfalteten Zustand (2) durch eine Barriere getrennt, wobei die Raten $k_{\text{off/on}}$ über Gleichung 1.24 mit den Energiebarrieren $\Delta G_{\text{on/off}}$ verbunden sind (Abschnitt 1.3.1). Da das System im Vergleich zur LZ10-Superhelix weiter vom thermodynamischen Gleichgewicht entfernt ist, ist bei einzelnen simulierten Kraftkurven kein häufiges hin und herspringen zwischen den Zuständen zu beobachten. Die Barrierenhöhe $\Delta G_{\text{off}}^{(1)}$ und die Breite $\Delta x_{\text{off}}^{(1)}$ sind daher hauptsächlich verantwortlich für die Form der gemittelten Entfaltungskurve, während die Barrierenhöhe $\Delta G_{\text{on}}^{(2)}$ und Breite $\Delta x_{\text{on}}^{(2)}$ verantwortlich für das Verhalten der gemittelten Rückfaltungskurve sind. Durch Testen dieser vier Parameter zeigt sich, dass sich die gemittelten Ent- und Rückfaltungskurven mit der in Abbildung 3.3 e) gezeigten Energielandschaft reproduzieren lassen. Die sich aus der Simulation ergebenden Kraft-Abstandskurven sind in den Abbildungen 3.3 c) und d) rot dargestellt.

Aus der Energielandschaft lässt sich als Gleichgewichtsenergie für eine völlige Entfaltung $\Delta G_{\text{ges}} = 15.5 k_B T$ bestimmen. Dies liegt zwischen den vorher bestimmten Grenzen und ist in sehr guter Übereinstimmung mit Ensemblestudien an der selben, jedoch nicht über Cysteinbrücken verbundenen, Superhelix [129]. Das sich mit dieser Energielandschaft ergebende Kraft-Abstandsverhalten im thermodynamischen Gleichgewicht ist in Abbildung 3.3 c) als rot gepunktete Linie gezeigt.

Das hier verwendete DmKHC-Konstrukt hat bei der Bestimmung der Parameter in der Energielandschaft den Nachteil, dass man auf die exakte Messung absoluter Kraftwerte angewiesen ist. Dies ist immer mit einem größeren Fehler behaftet als relative Messungen. Daher wurde an die DmKHC-Superhelix die bekannte LZ10-Superhelix fusioniert, deren Faltungsverhalten bekannt ist und somit als Bezugswert dienen kann. Die Messungen an diesem Konstrukt werden im nächsten Abschnitt vorgestellt.

3.2.2 Messungen an der DmKHC-LZ10-Chimäre

An den C-Terminus der oben diskutierten DmKHC-Superhelix wurden die letzten 10 Windungen der LZ26-Sequenz angefügt. Um das Heptadenschema nicht zu unterbrechen und

damit eine homogen zusammengesetzte Superhelix zu erhalten, wurde direkt nach der C-terminalen e-Position der DmKHC-Superhelix mit einer f-Position der LZ26-Sequenz fortgeföhren. Die sich ergebende Aminosäuresequenz ist in Abbildung 3.4 a), die sich ergebende, schematische Superhelix-Struktur in Abbildung 3.4 c) gezeigt. Dieses Konstrukt

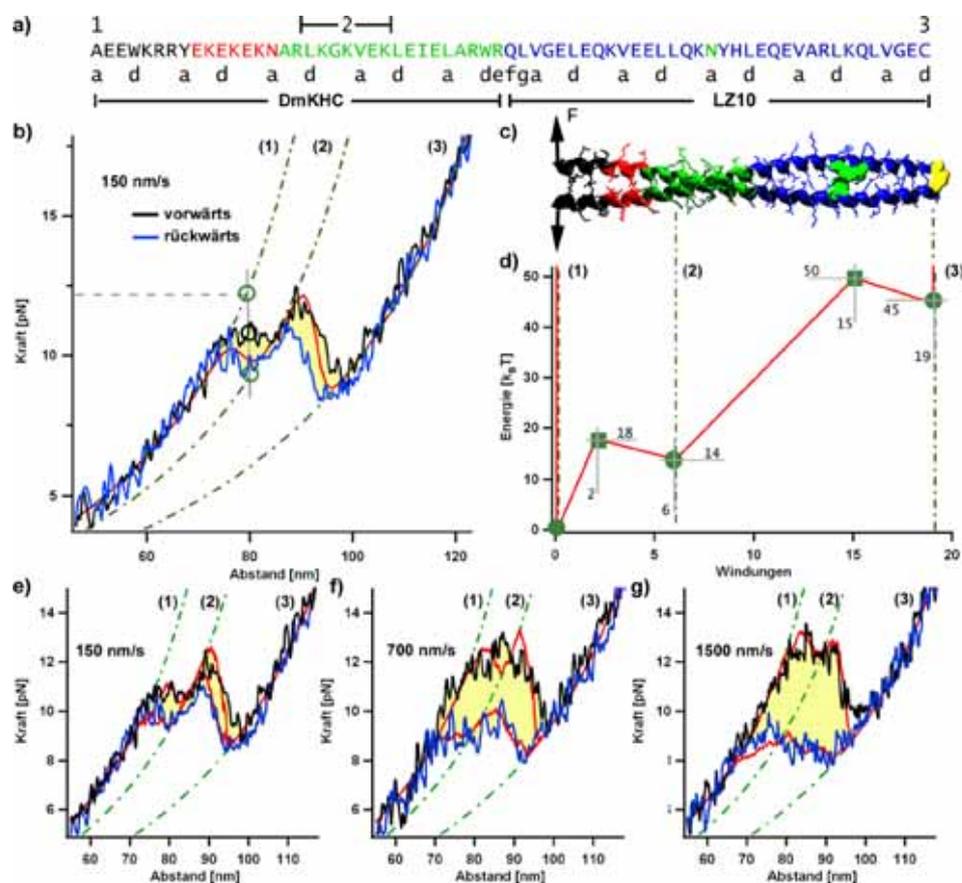


Abbildung 3.4: a) Aminosäuresequenz der DmKHC-LZ10-Superhelix, die Zahl 2 markiert die Position des Zwischenzustands. b) Gemittelte Kraft-Abstandskurven des DmKHC-LZ10-Konstruktes bei 150 nm/s Ziehgeschwindigkeit mit theoretischer Gleichgewichts-Kurve (rot). c) Schematische Darstellung der DmKHC-LZ10-Struktur. d) Energielandschaft des DmKHC-LZ10-Konstruktes. Gemittelte Kraft-Abstandskurven mit einer Geschwindigkeit von e) 150 nm/s f) 700 nm/s und g) 1500 nm/s, in rot sind jeweils die mit der in d) angegebenen Energielandschaft berechneten Nichtgleichgewichtskurven gezeigt.

bringt zwei Vorteile mit sich: Zum einen ist die Energielandschaft und damit das dynamische Verhalten der angefügten LZ10-Sequenz bekannt. Man weiß bei welchen Kräften die Rückfaltung am C-terminalen Ende der angefügten LZ10-Superhelix stattfindet und kann dies als Eichung in den Kraft-Abstandskurven verwenden. Zum anderen ist der Keimbildungsschritt der LZ10-Superhelix näher am Gleichgewicht als der der DmKHC-Superhelix. Dies verringert die Hysterese zwischen Vorwärts- und Rückwärtskurven und erleichtert so die Bestimmung der Gleichgewichtsenergie ΔG_{ges} . Abbildung 3.4 b) zeigt gemittelte

Ent- und Rückfaltungskurven am DmKHC-LZ10-Konstrukt bei einer Geschwindigkeit von 150 nm/s. Der gemessene, bei der gesamten Entfaltung der Superhelix auftretende Konturlängenzuwachs $L_{(3)} - L_{(1)} = 49$ nm entspricht dem für 19 Windungen zu erwartenden Wert. Dies zeigt, zusammen mit den für Superhelices typischen CD-Spektren (Anhang A), dass die konstruierte DmKHC-LZ10-Superhelix in ihrer korrekt gefalteten Form vorliegt.

Bei der Entfaltung der Superhelix vom völlig gefalteten Zustand (WLC-Kurve (1)) zum völlig entfalteten Zustand (WLC-Kurve (3)) zeigen die Kraft-Abstandskurven ein zusätzliches Entfaltungsereignis, das von einem stabilen Zwischenzustand herrührt (WLC-Kurve (2)). Durch Anpassen der Konturlänge $L_{(2)}$ an den Kraftanstieg des stabilen Zwischenzustands erhält man $L_{(2)} - L_{(1)} = 6 \pm 1$ Windungen, im stabilen Zwischenzustand sind also 6 Windungen der DmKHC-Superhelix bis zu der in Abbildung 3.4 a) mit 2 gekennzeichneten Stelle geöffnet. Dies liegt an der Grenze zwischen den in Abschnitt 3.1.4 beschriebenen Segmenten I und II und zeigt, dass sich das Segment II durch Anfügen der LZ10-Superhelix stabilisieren lässt.

Die Vorwärts- und Rückwärtskurven zeigen nur eine geringe Hysterese (gelb gekennzeichnet in Abbildung 3.4 b)), wodurch die in Abschnitt 1.2.3 vorgestellte Gleichgewichtsbeschreibung anwendbar wird. Die in 3.4 b) rot dargestellte Kraft-Abstandskurve ergibt sich aus der Gleichgewichtstheorie für die in Abbildung 3.4 d) gezeigte Energielandschaft und beschreibt den gemessenen Kraft-Abstandsverlauf sehr gut. Allerdings haben nur die Minima der Energielandschaft (grüne Punkte in Abbildung 3.4 d)) Einfluss auf die Form der theoretischen Kraft-Abstandskurve, während eine Änderung der Barrierenpositionen (grüne Quadrate in 3.4 d)) die theoretische Kraft-Abstandskurve annähernd unverändert lässt. Mit der Gleichgewichtsbeschreibung lässt sich somit die Energie, die zum Entfalten der ersten 6 Windungen benötigt wird, mit $14k_B T$ angeben (grüner Punkt an Position 6 in Abbildung 3.4 d)). Zum vollständigen Entfalten der DmKHC-LZ10-Superhelix benötigt man im Gleichgewicht $\Delta G_{\text{ges}} = 45k_B T$ (grüner Punkt bei Position 19 in Abbildung 3.4 d)).

Um auch die Höhe und Position der Barrieren zwischen den Zuständen (1), (2) und (3) bestimmen zu können, wurde die Nichtgleichgewichtssimulation (Abschnitt 1.3.2 mit folgenden kinetischem Schema verwendet.



Die Abbildungen 3.4 e), f) und g) zeigen gemittelte Kraft-Abstandskurven am DmKHC-LZ10-Konstrukt bei steigenden Ziehgeschwindigkeiten. Man erkennt direkt, dass mit steigender Ziehgeschwindigkeit die mittlere Entfaltungskraft bei immer höheren Werten vom WLC-Verlauf (1) der völlig gefalteten Struktur abweicht. So weicht die Kraft bei 150 nm/s bei 11 pN vom WLC-Verlauf (1) ab, bei 1500 nm/s allerdings erst bei Kräften von 13 pN. Zusätzlich wächst die in gelb markierte Hysterese zwischen Vorwärts- und Rückwärtskurven mit wachsender Geschwindigkeit. Dabei ist bei den Geschwindigkeiten 150 nm/s und 700 nm/s erkennbar, dass sich die gemittelten, blau gezeigten Rückfaltungskurven und damit die gesamte Hysterese aus zwei Ereignissen zusammen

setzt: Ein Teil der Hysterese entsteht bei der Faltung von Zustand (3) zum Zwischenzustand (2), der zweite Teil der Hysterese kommt bei der Faltung vom Zwischenzustand (2) zum gefalteten Zustand (1) zustande. Dies bedeutet, dass nicht nur der kinetische Übergang $(2) \rightleftharpoons (3)$ sondern auch der Übergang $(1) \rightleftharpoons (2)$ im thermodynamischen Nichtgleichgewicht stattfindet. Deshalb kann durch die Monte-Carlo Simulation die Position der Energiebarriere zwischen den Zuständen (1) und (2), sowie die der Energiebarriere zwischen (2) und (3) bestimmt werden. Die roten in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung berechneten Kraft-Abstandskurven in den Abbildung 3.4 e), f) und g) ergeben sich aus der Simulation mit der in d) gezeigten Energielandschaft und beschreiben das Verhalten der Hysterese für alle gezeigten Geschwindigkeiten sehr gut. Für die Faltungsrate des Keims ergeben sich die Parameter $k_{\text{on}}^{(3)}$ zu $5k_B T$ mit $\Delta x_{\text{on}}^{(3)} = 4$ Windungen, was in sehr guter Übereinstimmung mit der Keimgröße der LZ-Konstrukte steht (Kapitel 2). Damit ist aber die mittlere Rückfaltungskraft beim Übergang $(3) \rightarrow (2)$ festgelegt, alle anderen mittleren Kräfte können relativ zu dieser bestimmt werden.

Dadurch können auch die Raten für den Übergang $(1) \rightleftharpoons (2)$ genauer bestimmt werden. Die Faltungsbarriere für den Übergang vom Zwischenzustand (2) zum gefalteten Zustand (1) ergibt sich zu $4 \pm 1k_B T$ mit $\Delta x_{\text{on}}^{(2)} = 4 \pm 1$ Windungen, die Entfaltungsbarriere vom geschlossenen Zustand (1) zum Zwischenzustand (2) ergibt sich zu $k_{\text{off}}^{(1)} = 18 \pm 2k_B T$ mit $\Delta x_{\text{off}}^{(1)} = 2 \pm 1$ Windungen.

Zusammenfassend ergeben sich aus der Energielandschaft des DmKHC-LZ10-Konstruktes folgende Ergebnisse:

- An das C-terminale Ende der DmKHC-Sequenz lässt sich die LZ10-Sequenz homogen anfügen, d.h die entstehende gesamte Superhelix zeigt keine energetisch ungünstige Unterbrechung am Schnittpunkt der beiden Superhelices. Dies ergibt sich aus der energetischen Stabilisierung des Zwischenzustands (2), also aus der hohen Entfaltungsbarriere $\Delta G_{\text{off}}^{(2)}$. Die angefügte LZ10-Sequenz stabilisiert also das Segment II der DmKHC-Superhelix. Die Windungen des Segmentes II verhalten sich also so, wie es von ihrem für Superhelices typischen Heptadenschema zu erwarten ist.
- Die DmKHC-Sequenz selbst ist nicht homogen, sondern zeigt ein energetisches Minimum, das in diesem Konstrukt zu einem stabilen, kraftspektroskopisch auflösbaren Zwischenzustand (2) führt. Da sich das Segment II vorhersagbar verhält, muss diese Inhomogenität von der für Superhelices untypischen Sequenz innerhalb des I. Segmentes herrühren.
- Das DmKHC-LZ10-Konstrukt zeigt als mittlere Entfaltungskraft des N-terminalen Endes 12 ± 0.7 pN bei einer Ziehgeschwindigkeit von 150 nm/s, was die Messungen an der allein stehenden DmKHC-Superhelix bestätigt. Außerdem steigen die mittleren Entfaltungskräfte mit steigender Geschwindigkeit über 14 ± 0.7 pN bei 700 nm/s auf 14.6 ± 0.7 pN bei 1500 nm/s.
- Fast die gesamte Energie, die zum Auftrennen der DmKHC-Superhelix nötig ist,

muss zum Auftrennen der ersten beiden Windungen aufgebracht werden. Dies ergibt sich aus der Position der Energiebarriere zwischen den Zuständen (1) und (2), die nur zwei Windungen vom N-Terminus entfernt liegt.

Dadurch ergeben sich direkt zwei weitere Fragen zur Sequenz der DmKHC-Superhelix: Welcher Teil der Sequenz wirkt destabilisierend auf den N-terminalen Bereich der Superhelix und führt so zum beobachteten Zwischenzustand? Und welcher Teil der Struktur ist für die hohe, N-terminale Entfaltungsbarriere verantwortlich? Um diese Fragen zu beantworten, wurden einzelne Sequenzabschnitte der DmKHC-Sequenz in die bereits untersuchte LZ26-Sequenz eingefügt und kraftspektroskopisch untersucht. Dies wird im nächsten Abschnitt näher erläutert.

3.2.3 Lokale Stabilitäten einzelner Heptaden

Wie im letzten Abschnitt gezeigt wurde, lässt sich die DmKHC-Sequenz in die Segmente I und II aufteilen. Das C-terminale Segment II beinhaltet das für Superhelices typische Heptadenschema mit hydrophoben Aminosäuren an den a- und d-Positionen, während das N-terminale Segment I von diesem Schema stark abweicht. Dadurch tritt bei der mechanischen Entfaltung etwa am Schnittpunkt der Segmente I und II ein Zwischenzustand auf, der sich durch Anfügen weiterer superhelikaler Windungen kraftspektroskopisch auflösen lässt. Dieser Zwischenzustand muss durch energetisch ungünstige Sequenzabschnitte im Segment I hervorgerufen werden. Die aus den direkten Messungen an der DmKHC-Superhelix und den Messungen an der DmKHC-LZ10-Chimäre gewonnenen Energielandschaften zeigen eine Entfaltungsbarriere, die nur zwei Windungen vom N-Terminus der DmKHC-Superhelix entfernt liegt. Es ist daher nahe liegend anzunehmen, dass die N-terminale Heptade die Superhelix stabilisiert, während die darauf folgende Heptade (rot gekennzeichnete „EKEK“-Sequenz in Abbildung 3.4 a)) destabilisierend auf die Halssuperhelix wirkt. Dabei ist nicht nur die Änderung der Gleichgewichtsenergie, die durch die unkonventionellen Aminosäuren der „EKEK“-Sequenz hervorgerufen werden von Bedeutung [116], sondern auch über welche Ausdehnungen eine solche Sequenz lokal die Stabilität der Superhelix beeinflusst.

Lokale Stabilität der „EKEK“-Sequenz

Um die Stabilität und das Faltungsverhalten der „EKEK“-Sequenz zu überprüfen, wurde diese in die Mitte des bereits kraftspektroskopisch untersuchten LZ26-Konstruktes eingefügt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Heptadenpositionen der „EKEK“-Sequenz im LZ26-Konstrukt die gleichen sind, wie im ursprünglichen DmKHC-Konstrukt. Die sich ergebende EKEK-LZ26-Superhelix ist schematisch in Abbildung 3.5 b) gezeigt, die gesamte Aminosäuresequenz ist in Abbildung B.2 zu finden. Das kraftspektroskopische Verhalten der unveränderten LZ26-Sequenz wurde bereits in Kapitel 2 untersucht. Mit der Annahme von zwei stabilen Zwischenzuständen (2) und (3) auf dem Weg vom völlig geschlossenen Zustand (1) zum völlig entfalteten Zustand (4) konnte das mechanische Aufwinden der

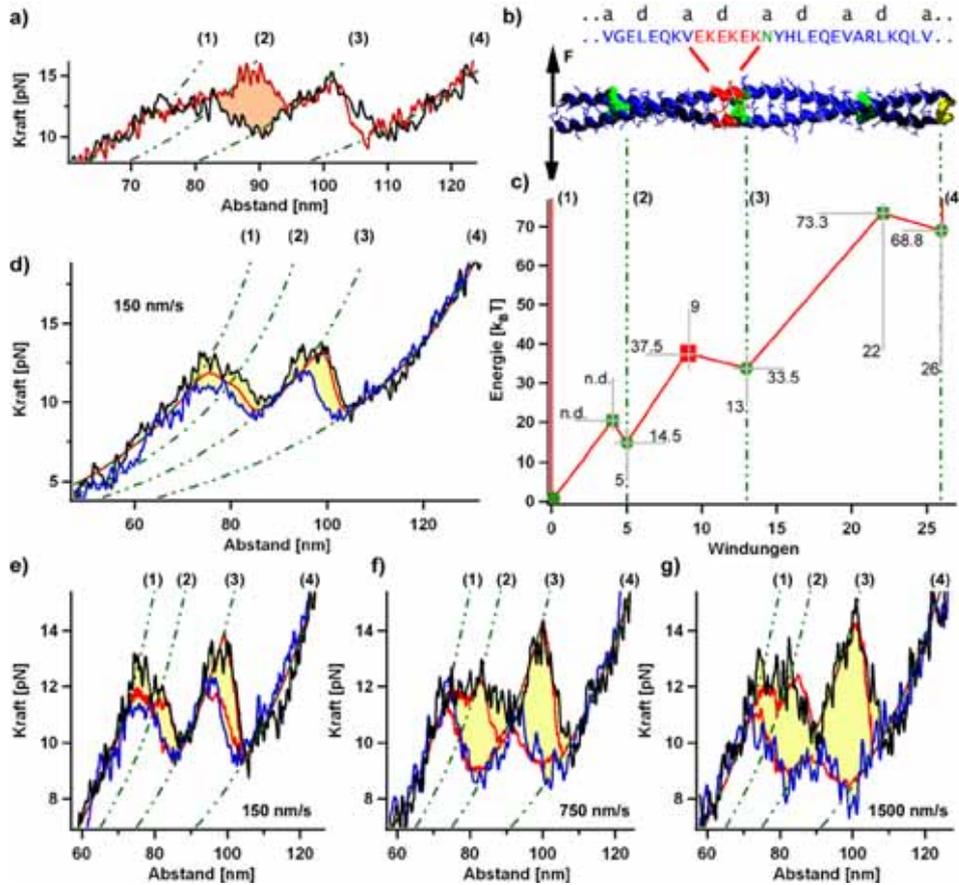


Abbildung 3.5: a) Vergleich von in Vorwärtsrichtung gemessener Kraft-Abstandskurven des LZ26-Konstruktes (rot) mit der EKEK-LZ26-Superhelix. b) Schematische Struktur des EKEK-LZ26-Konstruktes. Am Ort an dem die EKEK-Sequenz eingefügt wurde ist die Aminosäuresequenz angegeben. c) Energielandschaft der EKEK-LZ26-Superhelix. d) Mittlere Vorwärts- (schwarz) und Rückwärtskurven (blau). Die Hysterese zwischen den Zuständen (1) \rightleftharpoons (2) und (3) \rightleftharpoons (4) ist gelb markiert. e-f) Mittlere Kraft-Abstandskurven bei verschiedenen Ziehgeschwindigkeiten. In rot sind die sich aus der Monte-Carlo Simulation mit der in c) gezeigten Energielandschaft ergebenden Kurven gezeigt.

LZ26-Sequenz sehr gut mit den folgendem Ratenschema beschrieben werden.

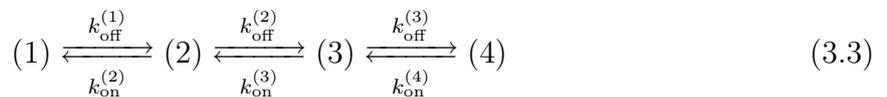


Abbildung 3.5 a) zeigt in rot eine typische, gemittelte Entfaltungskurve des LZ26-Konstruktes. Es konnte gezeigt werden, dass der stabile Zwischenzustand (2) mit dem Asparagin (N) an einer α -Position der 5ten Windung zusammenhängt, während der Zwischenzustand (3) durch ein solches Asparagin in der 13ten Windung hervorgerufen wird. Im EKEK-LZ26-Konstrukt wurde die „EKEK“-Sequenz direkt vor dem Asparagin des Zustandes (3) eingefügt. In schwarz überlagert ist in Abbildung 3.5 a) eine gemittelte Entfal-

tungskurve des EKEK-LZ26-Konstruktes zu sehen. Der Konturlängenzuwachs $L_{(4)} - L_{(1)}$ ist dabei genau so groß wie der des unveränderten LZ26-Konstruktes, was zeigt, dass die EKEK-LZ26-Superhelix völlig gefaltet ist. Bei den Übergängen $(1) \rightleftharpoons (2)$ und $(3) \rightleftharpoons (4)$ weicht der Kraftverlauf der EKEK-LZ26-Sequenz nicht von dem der unveränderten LZ26-Sequenz ab. Beim Übergang $(2) \rightleftharpoons (3)$ ist allerdings ein deutlicher Unterschied in beiden Kraftkurven zu sehen. Während dieser bei der LZ26-Sequenz bei etwa 15 pN stattfindet, ereignet er sich bei der EKEK-LZ26-Sequenz schon bei 12 pN. Der Zwischenzustand (2) ist also durch das Einfügen der „EKEK“-Sequenz deutlich destabilisiert, eine erste Abschätzung des Unterschiedes in der Gesamtenergie ΔG_{ges} , die zum Entfalten beider Superhelices aufgebracht werden muss, liefert $12 \pm 2k_B T$ (braune Fläche in Abbildung 3.5 a)). Dies zeigt direkt, dass in der neuen Umgebung der LZ26-Superhelix die „EKEK“-Sequenz destabilisierend wirkt.

Neben dem Entfaltungsverhalten ändert sich durch das Einfügen der „EKEK“-Sequenz auch das Faltungsverhalten der EKEK-LZ26-Superhelix. Abbildung 3.5 d) zeigt eine gemittelte Entfaltungs- und Rückfaltungskurve der EKEK-LZ26-Sequenz, die mit 150 nm/s Ziehgeschwindigkeit aufgenommen wurde. Man erkennt die bereits bekannte, zwischen den Zuständen $(3) \rightleftharpoons (4)$ auftretende Hysterese, die durch die Keimbildung der LZ26-Sequenz verursacht wird. (vgl. Abbildung 2.6). Zusätzlich erkennt man aber eine zweite Hysterese, die jetzt zwischen den Zuständen $(1) \rightleftharpoons (3)$ auftritt und durch das Einfügen der „EKEK“-Sequenz verursacht wurde. Die Superhelix ist also auch bei dem Übergang $(3) \rightarrow (2)$ nicht im thermodynamischen Gleichgewicht, weshalb mit Hilfe der Monte-Carlo Simulation die Position der diese Zustände trennenden Energiebarriere (rotes Quadrat in Abbildung 3.5 c)) bestimmt werden kann. Dazu wurden Ent- und Rückfaltungskurven des EKEK-LZ26-Konstruktes bei verschiedenen Geschwindigkeiten aufgenommen. Abbildung 3.5 e), f) und g) zeigen die gemittelten Kraft-Abstandskurven bei Geschwindigkeiten von 150, 750 und 1500 nm/s. Bemerkenswert ist dabei, wie die Hysterese zwischen den Zuständen $(1) \rightleftharpoons (3)$ mit steigender Geschwindigkeit zunimmt. In allen Abbildungen sind in rot die mit der Monte-Carlo Simulation errechneten, Ent- und Rückfaltungskurven gezeigt. Die beste Übereinstimmung zwischen experimentellen und simulierten Daten ergeben sich für die in Abbildung 3.5 c) gezeigte Energielandschaft. Wie schon an den in Abbildung 3.5 a) verglichenen Kraft-Abstandskurven deutlich wurde, ändern sich die Ent- und Rückfaltungsraten $k_{\text{on/off}}$ zwischen den Zuständen (1) und (2) sowie zwischen den Zuständen (3) und (4) durch ein Einfügen der „EKEK“-Sequenz in die LZ26-Superhelix nicht. So ergeben sich mit $\Delta G_{\text{off}}^{(3)} = 39.8k_B T$ und $\Delta G_{\text{on}}^{(4)} = -4.5k_B T$ die gleichen Werte und Positionen wie für das unveränderte LZ26-Konstrukt (vgl. Abbildung 2.12). Die Übergangsraten zwischen den Zuständen (2) und (3) weichen allerdings stark von denen der unveränderten LZ26-Superhelix ab. Während dort dieser Übergang im thermodynamischen Gleichgewicht stattfindet, ergeben sich jetzt als Höhe der Entfaltungsbarriere $\Delta G_{\text{off}}^{(2)} = 23k_B T$ mit $\Delta x_{\text{off}}^{(2)} = 4$ Windungen und als Höhe der Rückfaltungsbarriere $\Delta G_{\text{on}}^{(3)} = 4k_B T$ mit $\Delta x_{\text{on}}^{(3)} = 4$ Windungen. Erstaunlicherweise stimmt diese Rückfaltungsbarriere exakt mit der im DmKHC-LZ26-Konstrukt für den Übergang von Zustand $(2) \rightarrow (1)$ gefundenen überein. Zwischen diesen Übergängen befindet sich auch in der nativen DmKHC-Superhelix die „EKEK“-

Sequenz. Es ist daher nahe liegend anzunehmen, dass auch im DmKHC-LZ10-Konstrukt diese Hysterese von der „EKEK“-Sequenz herrührt.

Energetisch reduziert ein Einfügen der „EKEK“-Sequenz die Stabilität der LZ26-Superhelix um $10.6 \pm 1.5k_B T$. Dies lässt sich aus der reduzierten Gesamtstabilität ΔG_{ges} der EKEK-LZ26-Sequenz im Vergleich zur LZ26-Sequenz ablesen. (grüne Punkte an Position (4) in Abbildung 3.5 c) und Abbildung 2.12). Dieser Stabilitätseinbruch tritt lokal zwischen den Zuständen (2) und (3) auf, also genau dort wo die „EKEK“-Sequenz eingefügt wurde.

In der nativen DmKHC-Superhelix ist die destabilisierend wirkende „EKEK“-Sequenz nur eine Heptade vom N-terminalen Ende der Superhelix entfernt. Dies führt zu folgender Frage: Wie erreicht es die native N-terminale Heptade im gefalteten Zustand vorzuliegen? Die untersuchten LZ-Superhelices gehören zu den stabilsten bisher gefundenen, da fast alle Interaktionen der α -Helices untereinander ideal sind (Abschnitt 2.1). Dabei zeigt eine Heptade der LZ-Sequenz in etwa eine Gleichgewichtsenergie von $9k_B T$ (Tabelle 2.1). Fügt man diese vor die „EKEK“-Sequenz, so würde man im Gleichgewicht und ohne Krafteinwirkung eine bis zu dieser Sequenz in 50% der Fälle entfaltete Superhelix erwarten. Um dies zu testen, wurden alle N-terminalen Heptaden des EKEK-LZ26-Konstrukt, bis auf die letzte, die sich direkt vor der „EKEK“-Sequenz befindet, gelöscht. Die sich ergebende, schematische EKEK-LZ17 -Struktur ist in Abbildung 3.6 c) gezeigt, die sich ergebende Aminosäuresequenz ist in Abbildung B.2 zu finden. Messungen an diesem Konstrukt er-

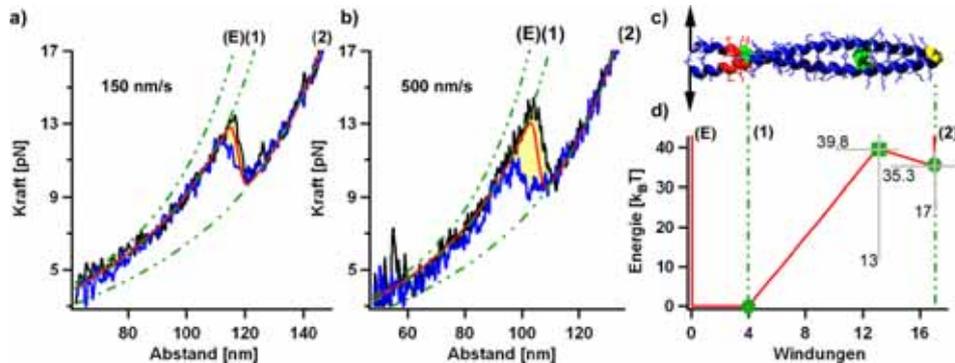


Abbildung 3.6: Gemittelte Entfaltungs- (schwarz) und Rückfaltungskurven (blau) des EKEK-LZ17 Konstruktes mit Ziehgeschwindigkeiten von a) 150 nm/s und b) 500 nm/s c) Schematische Darstellung der EKEK-LZ17 Struktur. d) Energielandschaft des EKEK-LZ17 Konstruktes.

geben bei Geschwindigkeiten von 150 nm/s die in Abbildung 3.6 a) gezeigten, gemittelten Vorwärts- (schwarz) und Rückwärtskurven (blau). Der Konturlängenzuwachs $L_{(2)} - L_{(1)}$ ergibt eine Länge von 33 nm, was einer Entfaltung von nur 13 Windungen entspricht. In diesen Messungen kann also keine Entfaltung der ganzen Struktur aufgelöst werden (der dafür erwartete Konturlängenzuwachs ist als WLC-Verlauf (E) in Abbildung 3.6 a) dargestellt), die erste Heptade und die „EKEK“-Sequenz sind also zumindest ab Kräften > 5 pN entfaltet. Auch energetisch verhält sich die Superhelix völlig äquivalent zur Entfaltung der letzten 13 Windungen der LZ26-Sequenz. Abbildung 3.6 d) zeigt ab Position (1) die für die

LZ26-Sequenz ab der äquivalenten Position (3) ermittelte Energielandschaft (vgl. Abbildung 2.12). Die daraus mit Hilfe der Gleichgewichtstheorie folgende Kraft-Abstandskurve ist in Abbildung 3.6 a) rot gezeigt und beschreibt die Daten sehr gut.

Die gemittelten Kraft-Abstandskurven bei 500 nm/s (Abbildung 3.6 b)) bestätigen dieses Bild und zeigen keine vollständig gefaltete Superhelix bei Kräften > 5 pN. Innerhalb des vorhandenen Auflösungsvermögens führt also die „EKEK“-Sequenz in Verbindung mit einer N-terminal folgenden GCN4 Heptade nicht zu einer beobachtbaren Entfaltung des N-terminalen Endes.

Lokale Stabilität der N-terminalen DmKHC-Heptade

An das N-terminale Ende der LZ26-Superhelix wurde unter Beibehaltung des Heptadenschemas die erste Heptade der DmKHC-Halssequenz angefügt. Ein schematisches Bild der sich ergebenden NT-LZ25 Superhelixstruktur ist in Abbildung 3.7 b) zu sehen, die Aminosäuresequenz der N-terminalen Region ist darüber angegeben. Die unveränderte LZ26-Sequenz ist zum besseren Vergleich darunter zu finden, die gesamte NT-LZ25 Sequenz findet sich in Abbildung B.2. Die mittleren Kraft-Abstandskurven des NT-LZ25

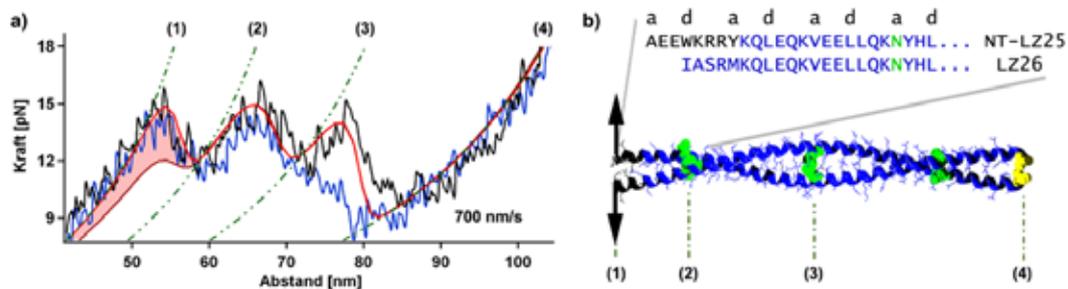


Abbildung 3.7: a) Kraft-Abstandskurven des NT-LZ25 Konstruktes in Vorwärts- (schwarz) und Rückwärtsrichtung (blau) bei einer Ziehgeschwindigkeit von 700 nm/s. In rot ist die theoretische Gleichgewichtskurve gezeigt, die mit den Werten aus Tabelle 2.1 und $E_{SH}(W, Y) = 5 k_B T$ berechnet wurde. Dunkelrot ist zum Vergleich die theoretische Kraft-Abstandskurve des LZ26-Konstruktes gezeigt. Der energetische Unterschied von $8 k_B T$ ist als rote Fläche markiert. b) Schematische Struktur des NT-LZ25 Konstruktes, die Aminosäuresequenz des N-terminalen Abschnittes ist darüber angegeben.

Konstruktes sind in Vorwärtsrichtung (schwarz) und Rückwärtsrichtung (blau) in Abbildung 3.7 a) gezeigt. Der Konturlängenzuwachs $L_{(4)} - L_{(1)}$ entspricht einer Entfaltung von 27 Windungen, beide N-terminale Windungen liegen also im NT-LZ25 Konstrukt gefaltet vor. Zwischen beiden Zugrichtungen ist nur die bereits in Kapitel 2 diskutierte Hysterese zwischen den Zuständen (3) \rightleftharpoons (4) zu sehen, für die Übergänge (2) \rightleftharpoons (4) verhält sich die Kraftkurve exakt so, wie es von der LZ26-Superhelix zu erwarten ist. (dunkelrote Kurve in Abbildung 3.7 a) vgl. auch Abbildung 2.6). Durch das Anfügen der beiden N-terminalen DmKHC-Windungen erhöht sich die Gleichgewichtsenergie der Superhelix um $8 k_B T$ (rote Fläche in Abbildung 3.7 a)). Es ist bemerkenswert, dass zwischen Vorwärts- und Rückwärtskurven des Übergangs (1) \rightleftharpoons (2) keine Hysterese auflösbar

ist. Trotz der untypischen Struktur des „hydrophoben Mantels“ der N-terminalen Heptade findet ihre Faltung im Gleichgewicht statt. Die Daten lassen sich daher mit dem Gleichgewichtsmodell (Abschnitt 1.2.3) beschreiben. Dazu können die C-terminalen 25 Windungen mit den bereits bekannten Werten aus Tabelle 2.1 modelliert werden, um die N-terminale Kraftantwort zu reproduzieren, müssen die ersten beiden Windungen je eine Energie von $E_{SH}(W) = E_{SH}(Y) = 5 \pm 0.5k_B T$ besitzen. Die Gleichgewichtsenergie einer N-terminalen Windung der DmKHC-Halssequenz ist nur unbedeutend größer als die einer (L,V)-Windung der LZ26-Superhelix. Allein die den zwei N-terminalen DmKHC-Windungen intrinsische Energie kann also nicht erklären, warum diese Windungen mit der darauf folgenden „EKEK“-Sequenz in der DmKHC-Superhelix gefaltet vorliegen. Eine Erklärung für die hohen Entfaltungskräfte des zusammengefügt Segmentes I sind die über das gesamte Segment verteilten Ladungen, dies würde auch die sehr ausgeprägte Sequenzhomologie verschiedener Kinesine innerhalb des Segments I erklären. Messungen in Abhängigkeit des pH-Wertes oder der Salzkonzentration könnten diese Hypothese stützen. Es ist noch anzumerken, dass die Energien $E_{SH}(W, Y)$ höher sind, als die durch Substitutionen gewonnenen Energien der gleichen Aminosäuren innerhalb einer Modellsuperhelix [58][59]. Dies zeigt, dass die Stabilität einer Superhelix nicht auf triviale Weise aus der Sequenz und den Energiewerten einzelner Aminosäuren vorhersagbar ist, da komplexe Interaktionen mit der Umgebung, wie die des „hydrophoben Mantels“ dabei vernachlässigt würden.

3.2.4 Die helixbrechenden Eigenschaften der N-terminalen Heptade

Das N-terminale Segment I lässt sich nicht in Mitten einer Superhelix einfügen, ohne die gesamte Struktur zu zerstören. Kraftspektroskopische Messungen eines solchen Versuches (Sequenz LZ12-NT-LZ13 in Abbildung B.2) zeigen nur in 5% der Entfaltungen Konturlängenzuwächse, die auf eine gefaltete Superhelix der gewünschten Länge schließen lassen. Dies liegt unter anderem an den helixbrechenden Motiven die am N-terminalen Ende der Sequenz I zu finden sind. Diese sollen im folgenden Abschnitt näher untersucht werden.

Um das N-terminale Fortschreiten einer α -Helix zu beenden, nutzt die Natur mehrere Möglichkeiten. Durch Häufigkeitsanalyse des Auftretens bestimmter Aminosäuren an Helixenden konnten einige dieser Möglichkeiten identifiziert werden, beispielsweise fand man, dass Prolin (P) sehr oft am Ende einer α -Helix zu finden ist [130]. Die gleiche Studie konnte zeigen, dass die erste N-terminale Helixwindung häufig negativ geladen vorliegt und dass die vierte Aminosäure innerhalb der Helix oft eine hydrophobe ist. Diese außerhalb der Helix liegende Aminosäure kann dann durch Ausbildung eines „hydrophoben Stapels“ eine um fünf Positionen weiter liegende, hydrophobe Aminosäure aus ihrer Helixorientierung lösen [131]. Eine weitere Möglichkeit der Helixterminierung ist durch das Motiv der „Capping-Box“ gegeben [132]. Es beruht auf Wasserstoffbrücken zwischen der Seitenkette der ersten, N-terminalen Aminosäure der Helix an Position i mit dem Rückgrat

der $i+3$ Positionen weiter in der Helix folgenden Aminosäure, sowie vice versa der Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen der Seitenkette der $i+3$ -ten Aminosäure mit dem Rückgrat an der ersten Position. Diese Wasserstoffbrücken zerstören die normale, für α -Helices bekannte Anordnung der Wasserstoffbrücken [3] und verhindern so eine Fortsetzung der Helixstruktur.

Die Kristallstruktur des konventionellen Kinesins der Ratte zeigte, dass das N-terminale Ende der Halssuperhelix die typischen Eigenschaften des „hydrophoben Stapels“ sowie der „Capping-Box“ aufweist [103][129] (siehe Abbildung 3.8 b)). Außerdem konnte mit En-

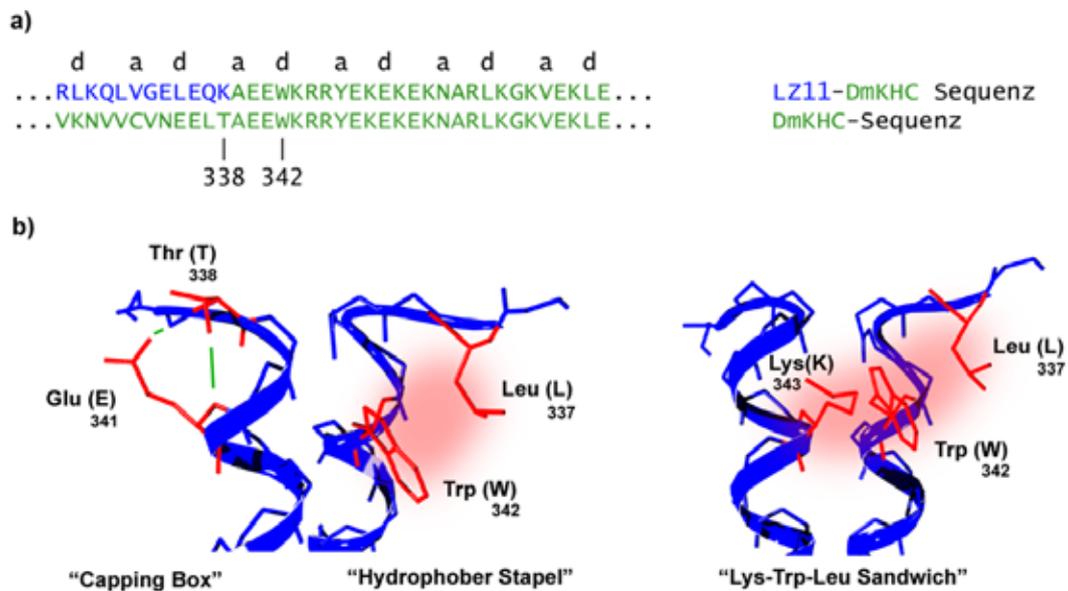


Abbildung 3.8: a) Sequenzausschnitt des Ortes an dem LZ10-Superhelix und DmKHC-Superhelix zusammengefügt wurden. Darunter ist die unveränderte DmKHC-Sequenz angegeben, die Nummerierung erfolgt nach [103]. b) Darstellung der atomistischen Interaktionen am N-terminalen Ende der unveränderten DmKHC-Halssuperhelix. Die Abbildung ist an [129] angelehnt, die Aminosäuren sind nach [103] (PDB: 3KIN) nummeriert.

semblestudien an der Halssuperhelix aus humanem Kinesin gezeigt werden, dass die weiter in N-terminaler Richtung folgenden, nicht mehr helikalen Aminosäuren des „Necklinkers“, den N-Terminus der Superhelix stabilisieren [129]. Zudem fand die Studie das Lys-Trp-Leu-Sandwich als eine weitere atomistische Erklärung für den stabilen N-Terminus der Superhelix (Abbildung 3.8 b)).

Messungen am LZ11-DmKHC-Konstrukt. Um die „helixbrechenden“ Eigenschaften der *Drosophila melanogaster* Superhelix zu studieren, wurde diese N-terminal durch 11 Windungen der bereits untersuchten LZ-Superhelix fortgesetzt. Will jetzt der N-Terminus der DmKHC-Superhelix ein weiteres Fortschreiten der helikalen Struktur verhindern, so muss er der Faltung der LZ11-Struktur entgegenwirken und daher diese destabilisieren. Die gesamte sich ergebende Sequenz ist in Abbildung B.2 unter dem Namen LZ11-DmKHC zu

finden, der Sequenzabschnitt an der Schnittstelle der beiden Helices ist in Abbildung 3.8 a) gezeigt. Durch das Anfügen an die LZ11-Sequenz ändern sich die nach dem DmKHC-Terminus folgenden Aminosäuren, was zur Folge hat, dass in der gewonnenen Superhelix manche helixbrechenden Motive nicht mehr auftreten. So ist das sich ursprünglich an Position 337 befindende, hydrophobe Leucin (L) durch ein polares Glutamin (Q) ersetzt, der hydrophobe Stapel sollte daher im LZ11-DmKHC-Konstrukt nicht auftreten. Außerdem besteht dadurch im LZ11-DmKHC-Konstrukt das Lys-Trp-Leu-Sandwich nur noch teilweise. In der „Capping-Box“ hingegen sollte die Wasserstoffbrücke der Glutaminsäure (Glu 341) nach wie vor möglich sein. Auch das Lysin das an der Position 338 das Threonin ersetzt, sollte noch in der Lage sein eine Wasserstoffbrücke auszubilden. Es ist daher nahe liegend anzunehmen, dass die „Capping-Box“ im LZ11-DmKHC-Konstrukt erhalten ist, während der hydrophobe Stapel nicht mehr gebildet werden kann.

Die Ergebnisse der kraftspektroskopischen Messungen am LZ11-DmKHC-Konstrukt sind in Abbildung 3.9 a) - d) gezeigt. Die N-terminale Superhelix LZ11, die in diesem

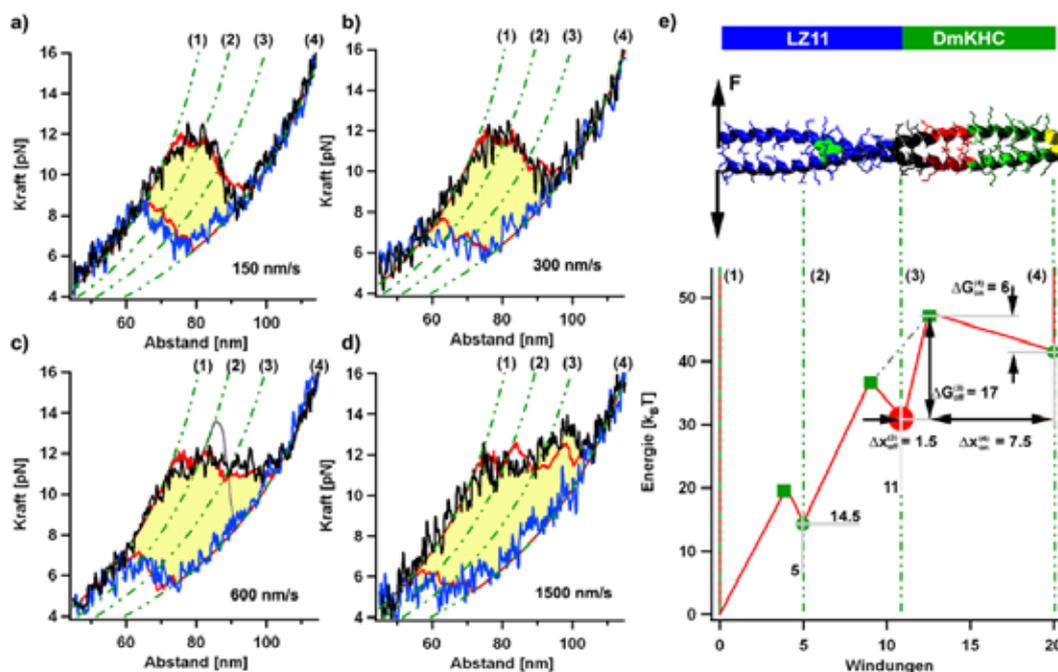


Abbildung 3.9: Mittlere Entfaltungs- (schwarz) und Rückfaltungskurven (blau) des LZ11-DmKHC-Konstruktes. Es wurde mit den Geschwindigkeiten a) 150 nm/s b) 300 nm/s c) 600 nm/s und d) 1500 nm/s gemessen. e) Energielandschaft zur Reproduktion der gemessenen Kraft-Abstandskurven. Darüber ist die schematische Struktur des gemessenen LZ11-DmKHC-Konstruktes gezeigt.

Konstrukt als erste der lateralen Kraft ausgesetzt wird, ist in Kapitel 2 bereits in mehreren Varianten kraftspektroskopisch untersucht worden. Daher ist bekannt, dass sie bei etwa 12 pN entfaltet. Außerdem zeigten die Messungen an den LZ18- und LZ26-Konstrukten (Abschnitt 2.3.1), dass sich durch eine homogen an das C-terminale Ende des LZ11-Konstruktes

angefügte Superhelix der Zwischenzustand (2), der durch das Asparagin in der fünften Windung hervorgerufen wird, stabilisieren lässt. In den LZ18- und LZ26-Konstrukten äußert sich dies durch eine Erhöhung der Entfaltungskraft des Zwischenzustands (2) auf etwa 16 pN. (vgl. Abbildung 2.6).

In den in Abbildung 3.9 a) - d) gezeigten Kraft-Abstandskurven, die mit Geschwindigkeiten zwischen 150 und 1500 nm/s aufgenommen wurden, zeigt sich immer ein Konturlängenzuwachs $L_{(4)} - L_{(1)}$ den man für 20 gefaltete Windungen erwartet. Auch weicht die gemittelte Kraft bei ca. 12 pN vom WLC-Verlauf (1) der völlig gefalteten LZ11-DmKHC-Struktur ab. Die angefügte LZ11-Superhelix ist also nicht drastisch durch den N-Terminus der DmKHC-Superhelix destabilisiert. Eingezeichnet ist auch der WLC-Verlauf des erwarteten Zwischenzustands (2). Allerdings erkennt man, dass bei keiner der gemessenen Geschwindigkeiten die gemittelte Kraft-Abstandskurve dem WLC-Verlauf (2) zu größeren Kräften als 12 pN folgt. Dies kann zwei Gründe haben: Entweder ist die angefügte DmKHC-Superhelix nicht thermodynamisch stabil, wodurch sie auch keine stabilisierende Wirkung auf die N-terminale LZ11-Superhelix haben könnte (vgl. Abschnitt 2.4.2), oder die Superhelices lassen sich nicht homogen zusammenfügen. Erstere Möglichkeit kann aber ausgeschlossen werden, da die direkten Messungen an den DmKHC-Konstrukten (Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2) eine thermodynamische Stabilität der DmKHC-Superhelix zeigten. Ein Zusammenfügen der beiden Helices ist also energetisch ungünstig, d.h., dass an der Schnittstelle der beiden Helices ein energetisches Minimum und damit ein weiterer Zwischenzustand (3) eingeführt werden muss.

Dadurch lässt sich ein zusätzlicher Schluss ziehen: Ein weiteres Entwinden der Superhelix, wenn sie sich im Zustand (3) befindet, also wenn die LZ11-Superhelix völlig geöffnet vorliegt, muss das gleiche Kraft-Abstands-Verhalten zeigen, das auch bei einem direkten Angreifen an den N-Terminus der DmKHC-Superhelix auftritt. Die Messungen an dem DmKHC-LZ10-Konstrukt (Abschnitt 3.2.2) und an der unveränderten DmKHC-Superhelix (Abschnitt 3.2.1) haben gezeigt, dass bei einer Ziehgeschwindigkeit von 150 nm/s die mittleren Entfaltungskräfte bei 11 pN vom WLC-Verlauf der völlig gefalteten Superhelix abweichen, bei einer Geschwindigkeit von 1500 nm/s erst bei 13 pN (siehe Abbildung 3.4 e) - f) und Abbildung 3.3 c) - d)). Dieses Verhalten ist auch in den Kraft-Abstandskurven 3.9 a) - d) zu erkennen. Bei hohen Ziehgeschwindigkeiten (Abbildung 3.9 d)) erkennt man, dass die mittlere Entfaltungskraft dem WLC-Verlauf (3) folgt und bei etwa 13 pN von ihr abweicht. Bei langsameren Ziehgeschwindigkeiten (Abbildung 3.9 a)) schneidet die mittlere Kraft den WLC-Verlauf (3) bei etwa 11 pN. Bei langsamen Ziehgeschwindigkeiten verdeckt also die hohe Entfaltungskraft der LZ11-Superhelix das Entfaltungsereignis der DmKHC-Superhelix. Mit der in Abbildung 3.9 d) gezeigten Energielandschaft lassen sich die in Abbildung 3.9 a) - d) gezeigten Kraft-Abstandskurven mit Hilfe der in Abschnitt 1.3.2 vorgestellten Monte-Carlo Simulation reproduzieren.

Allerdings ist die Bestimmung der Barrierenhöhen und Positionen schwierig. Die zu erwartenden energetischen Minima (Abbildung 3.9 d)) befinden sich in der ersten Hälfte der LZ11-DmKHC-Superhelix nur fünf bzw. sechs Windungen auseinander, was sehr nahe an der lateralen Auflösungsgrenze von vier Windungen liegt (Abschnitt 2.3.1). Dadurch überlagern sich die einzelnen Entfaltungsereignisse in der gemittelten Kurve. Besonders

drastisch erkennt man dies in Abbildung 3.9 c) bei Ziehgeschwindigkeiten von 600 nm/s, wo sich ein glattes Kraftplateau bei 12 pN für die gemittelte Vorwärtskurve ergibt. Eine direkte Zuordnung von Entfaltungskräften zu bestimmten Zuständen ist daher nur beschränkt möglich. Der Übergang (3) \rightarrow (4) ist beispielsweise nur bei 1500 nm/s Ziehgeschwindigkeit (Abbildung 3.9 d) eindeutig einer mittleren Entfaltungskraft zuzuordnen. Dennoch ist anzumerken, dass obwohl die Barrierenpositionen nicht eindeutig zu bestimmen sind, keine Energielandschaft ohne lokales Minima an Position (3) in der Lage ist, die Kraft-Abstandskurven zu reproduzieren. Als Beispiel hierfür ist in grau in Abbildung 3.9 c) eine simulierte Kraft-Abstandskurve bei 600 nm/s gezeigt, die an der Position (3) keinen Zwischenzustand aufweist (Abbildung 3.3 c) und e) graue Linie). Mit solch einer Energielandschaft kann das Kraftplateau ab dem WLC-Verlauf (2) nicht mehr reproduziert werden.

Dieses Konstrukt zeigt also, dass sich das N-terminale Ende der DmKHC-Superhelix nicht homogen mit einer weiteren Superhelix fortsetzen lässt, sondern am Ort des Schnittpunktes destabilisierend auf die N-terminal folgenden Windungen wirkt. Die exakte Bestimmung der destabilisierenden Energie kann allerdings mit Hilfe der Monte-Carlo Simulation nur eingegrenzt werden. Das liegt auch daran, dass sich die Kraft-Abstandskurven der Rückfaltung bereits durch die Barriere $\Delta G_{\text{on}}^{(4)}$ vollständig beschreiben lassen. Dadurch können die nachfolgenden Faltungsbarrieren $\Delta G_{\text{on}}^{(3)}$ und $\Delta G_{\text{on}}^{(2)}$ jeweils nur durch die Werte 0 und $8 k_B T$ eingegrenzt werden. Es lässt sich also auch die gesamte, zum Entfalten des LZ11-DmKHC-Konstruktes benötigte Gleichgewichtsenergie mit der Monte-Carlo Simulation nicht exakt angeben.

Messungen am LZ11-DmKHC-LZ10-Konstrukt. Mit dem im vorherigen Abschnitt vorgestellten Konstrukt war es möglich zu zeigen, dass das N-terminale Ende der *D. melanogaster* Kinesin Superhelix nicht homogen mit einer weiteren Superhelix fortgesetzt werden kann. Vielmehr wirkt der Ort des Schnittpunktes destabilisierend auf die angefügte Superhelix. Die interessante Frage, wie weit und wie stark diese Destabilisierung innerhalb der angefügten LZ11-Superhelix wirkt, konnte allerdings nicht beantwortet werden, unter anderem deshalb, weil die Entfaltung des LZ11-DmKHC-Konstruktes sehr weit vom Gleichgewicht entfernt stattfindet. Eine Möglichkeit, die Faltung der DmKHC-Superhelix näher an das thermodynamische Gleichgewicht zu führen, ist, sie C-terminal durch die LZ10-Sequenz fortzusetzen (Abschnitt 3.2.2). Abbildung 3.10 b) zeigt schematisch die bereits untersuchten LZ11-DmKHC und DmKHC-LZ10-Superhelices. In einem neuen Konstrukt wurden diese so zusammengefügt, dass sich die DmKHC-Sequenz zwischen den beiden LZ Sequenzen befindet. Die ersten 2/3 der neuen Struktur sind also identisch mit dem LZ11-DmKHC Konstrukt, während die letzten 2/3 identisch mit dem DmKHC-LZ10-Konstrukt sind. Die vollständige Sequenz ist in Abbildung B.2 unter dem Namen LZ11-DmKHC-LZ10 zu finden. Abbildung 3.10 a) zeigt gemessene Vorwärts- und Rückwärtskurven dieses Konstruktes. Man erkennt direkt, dass die Hysterese zwischen Vorwärts- und Rückwärtskurven von $\approx 10 k_B T$ kleiner ist als die des LZ11-DmKHC-Konstruktes mit $25 k_B T$ (vgl. gelbe Flächen in Abbildungen 3.10 a) und 3.9 a)). Daher kann die in Abschnitt 2.3.1 vorgestellte

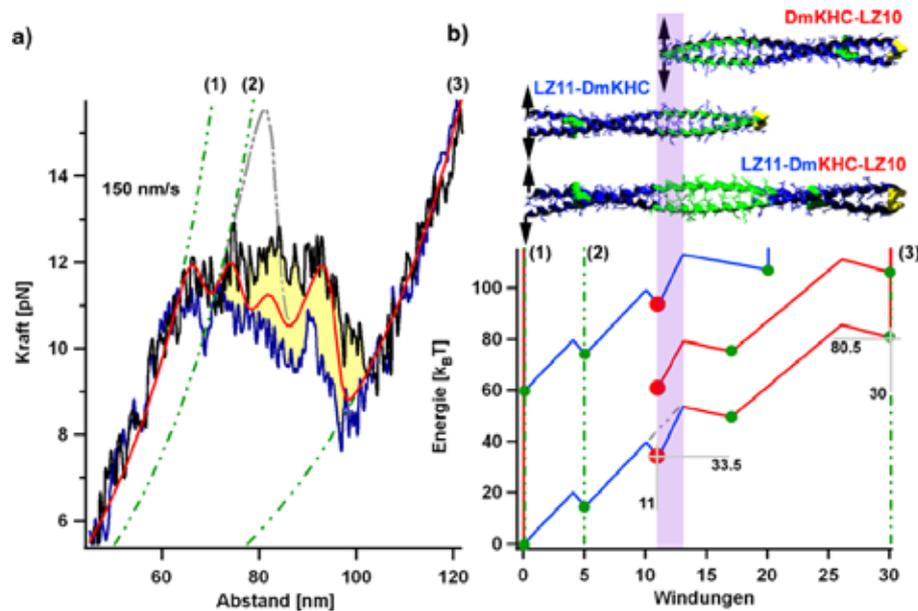


Abbildung 3.10: a) Mittlere Entfaltungs- (schwarz) und Rückfaltungskurven (blau) des LZ11-DmKHC-LZ10-Konstruktes bei einer Ziehgeschwindigkeit von 150 nm/s b) Schematische Strukturen der bereits untersuchten DmKHC-LZ10- und LZ11-DmKHC-Sequenzen. Darunter ist die schematische Struktur der aus beiden zusammengefügteten LZ11-DmKHC-LZ10-Superhelix zu sehen. Die Energielandschaft der LZ11-DmKHC-LZ10-Sequenz (blau und rot) lässt sich aus den schon bekannten Energielandschaften der LZ11-DmKHC-Sequenz (blau) und der DmKHC-LZ10-Sequenz (rot) reproduzieren, die aus anschaulichen Gründen um $60 k_B T$ nach oben verschoben gezeigt sind.

Gleichgewichtstheorie zur Beschreibung der Daten herangezogen werden.

Die Energielandschaft des DmKHC-LZ10-Konstruktes konnte bereits sehr exakt vermessen werden (Abschnitt 3.2.2 und ist nochmal in Abbildung 3.10 b) rot gezeigt). Die Energielandschaft des LZ11-DmKHC-Konstruktes konnte in Abschnitt 3.8 jedoch nur teilweise ermittelt werden. Sie ist in Abbildung 3.10 blau gezeigt. Es ergab sich ein Energieminimum an der Schnittstelle zwischen der LZ11- und der DmKHC-Sequenz (roter Punkt in Abbildung 3.10 b)), dessen absolute Höhe aber nicht exakt ermittelt werden konnte. Die nachfolgende Barriere konnte allerdings bestimmt werden und sie war identisch mit der im DmKHC-LZ10-Konstrukt an der selben relativen Position gefundenen Barriere (violett hervorgehoben). Fügt man nun die beiden kürzeren Konstrukte in der vorgestellten Art zusammen, ist es nahe liegend anzunehmen, dass sich die Energielandschaften an der violett hervorgehobenen Stelle homogen fortsetzen lassen. Innerhalb der Gleichgewichtstheorie haben die relativen Positionen der Energieminima (Punkte in Abbildung 3.10 b)) sehr großen Einfluss auf die sich ergebende Kraft-Abstandskurve, während die Barrierenhöhen nur geringen Einfluss haben. Alle durch grüne Punkte in Abbildung 3.10 b) markierten Energieminima konnten durch die vorherigen Messungen exakt bestimmt werden, nur das Minimum an der Position der helixbrechenden Sequenz (roter Punkt) konnte

nicht exakt bestimmt werden. In Abbildung 3.10 a) ist in rot die sich für die gezeigte Energielandschaft ergebende Kraft-Abstandskurve eingezeichnet. Als einziger freier Parameter wurde die Höhe des Minimums, das durch die helixbrechende Position gegeben ist (roter Punkt in Abbildung 3.10 b) gewählt. Mit dem Wert von $33.5 \pm 2k_B T$ kommt die rote theoretische Kurve zwischen den Vorwärts- und Rückwärtskurven zu liegen. Der zu erwartende Wert an dieser Position für die LZ11-Superhelix ist $40.2 k_B T$. (Tabelle 2.1). Es ergibt sich also eine energetische Destabilisierung durch das helixbrechende N-terminale Ende der DmKHC-Sequenz von $6.8k_B T$. Zum Vergleich ist in Abbildung 3.10 a) in grau noch die Kraft-Abstandskurve angegeben, die sich für eine Energielandschaft errechnet, die keinen Zwischenzustand an der helixbrechenden Position aufweist (grau gestrichelte Energielandschaft in Abbildung 3.10 b)). Eine solche Energielandschaft würde, wie bereits in Abschnitt 3.8 diskutiert, zu einer Stabilisierung des Zwischenzustands (2) bis auf ca. 16 pN führen, was deutlich über den gemessenen Vorwärtskurven liegt.

Für die Auswertung der dargestellten, gemittelten Kraft-Abstandskurven ist anzumerken, dass nur 45% der gemessenen Vorwärts- und Rückwärtskurven in die Auswertung eingingen. Die restlichen Kraft-Abstandskurven zeigten nicht reproduzierbare Muster, mit Konturlängenzuwächsen $L_{(3)} - L_{(1)}$ die auf nicht vollständig gefaltete Strukturen hinweisen. Bei langsamen Ziehgeschwindigkeiten von 150 nm/s lassen sich die einzelnen Kraft-Abstandskurven nach dem in Abbildung 3.10 gezeigten Muster auswählen, bei höheren Geschwindigkeiten wird dies zunehmend schwieriger. Daher ist das vorgestellte Konstrukt für eine weitere Untersuchung bei höheren Geschwindigkeiten nicht geeignet.

Die vorgestellten Messungen konnten zeigen, dass sich das N-terminale Ende der DmKHC-Superhelix nicht homogen durch eine weitere Superhelix fortsetzen lässt. Die Strukturdaten einer homologen Superhelix aus dem Kinesin der Ratte ergaben, dass sich an ihrem N-Terminus helixbrechende Motive befinden, die sehr wahrscheinlich in der hier untersuchten Superhelix zumindest teilweise erhalten sind. Es konnte gezeigt werden, dass dies eine lokale Destabilisierung der Superhelix um $6.8 \pm 2k_B T$ zur Folge hat. Allerdings zeigen die hier gewählten Superhelices mehrere Nachteile auf. So kann nur eine Obergrenze von fünf Windungen dafür ermittelt werden, wie weit sich die destabilisierende Wirkung der helixbrechenden Windung in N-terminaler Richtung fortsetzt. Außerdem ergaben sich bei der LZ11-DmKHC-LZ10-Superhelix in 55% der Fälle Fehlfaltungen, die eine Auswertung erschweren. Daher wäre eine systematische Untersuchung der helixbrechenden Motive, in einer geeigneteren „Trägersuperhelix“ wünschenswert. Diese Trägersuperhelix sollte nicht repetitiv sein, um Fehlfaltungen zu vermeiden. Außerdem sollte sie genügend lang sein und möglichst schnell falten, um eine Unterscheidung der Zwischenzustände und damit auch ein Auflösen der mit den helixbrechenden Motiven verbundenen Barrierenbreiten zu erleichtern.

3.2.5 Diskussion und Zusammenfassung

Die in diesem Kapitel vorgestellten Messungen ergeben, dass die mittleren Entfaltungskräfte der Halssuperhelix des *D. melanogaster* Kinesins bei 12 pN liegen, wenn diese an

ihrem N-terminalen Ende mit Ziehgeschwindigkeiten von 150 nm/s mechanisch belastet wird (Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2). Sind beide Motorköpfe des Kinesins gleichzeitig an den Mikrotubulus gebunden, berechneten Hyeon *et al.* aus Strukturdaten eine lateral auf die Halssuperhelix wirkende Kraft von 12-15 pN [133]. Dies ist auf den ersten Blick überraschend, da eine Vielzahl von Experimenten die Notwendigkeit für ein Aufwinden der Halssuperhelix bei den einzelnen Motorschritten ausschließt (siehe Abschnitt 3.1.3). Allerdings zeigen die Messungen dieses Kapitels, dass die Entfaltung der Halssuperhelix entfernt vom thermischen Gleichgewicht stattfindet. Für kurze Belastungszeiten, wie man sie für einen Motor erwartet, der sich ohne Last und unter sättigenden ATP Konzentrationen fortbewegt [134][135], kann die *D. melanogaster* Halssuperhelix höheren Kräften standhalten. Außerdem muss für eine Vergleichbarkeit der hier ermittelten Kräfte mit den im Motor auftretenden die Konturlänge der entropischen Kette berücksichtigt werden, die N-terminal auf die Halssuperhelix folgt. Im Motor ist sie hauptsächlich durch den Necklinker gegeben und wird von Hyeon *et al.* auf 5.7 nm geschätzt. Der bis auf eine Kraft von 12 pN gedehnte Necklinker besitzt daher nur eine Energie von etwa $4 k_B T$. Da für ein Auftrennen der Halssuperhelix aber eine Energie von $15 k_B T$ benötigt wird, erscheint dies unwahrscheinlich. Allerdings kann mit obigen Abschätzungen ein Entwinden der Halssuperhelix nicht mehr ausgeschlossen werden, wenn sich der Motor langsam bewegt und eine Last transportiert, die eine zusätzliche, parallel zur Superhelixachse wirkende Kraft ausübt. Dies könnte auch die geringere Prozessivität von Kinesinmutanten erklären, deren Halssuperhelix nicht aufschmelzen kann [101].

Die Messungen an der DmKHC-Superhelix (Abschnitt 3.2.1) ergaben als Gleichgewichtsenergie, die zum Auftrennen der Struktur aufgewendet werden muss, $15.5 \pm 4 k_B T$. Dies steht in sehr guter Übereinstimmung mit Ensemblestudien an vergleichbaren Sequenzen (beispielsweise der Sequenz K2 in [129]). Daher ist die mittlere Entfaltungskraft, die vergleichbar mit der der stabileren LZ10-Superhelix ist, überraschend. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Entfaltung der DmKHC-Superhelix bei den hier gemessenen, physiologisch relevanten Zeitskalen, nicht im Gleichgewicht stattfindet. Eine Abschätzung der Entfaltungskräfte nur mit Hilfe von Gleichgewichtsenergien ist für diese Struktur also problematisch.

Eine genaue Analyse der Superhelixstruktur zeigt, dass sich diese in zwei Hälften unterteilen lässt [128]. Dabei weist die N-terminale Hälfte (Segment I) für Superhelices untypische Faltungsmotive auf (Abschnitt 3.1.4), während die C-terminale Hälfte (Segment II) ein für Superhelices typisches Heptadenmuster zeigt. Die kraftspektroskopischen Messungen am DmKHC-LZ10-Konstrukt konnten diese Einteilung bestätigen (Abschnitt 3.2.2). Es zeigt sich, dass durch C-terminales Anfügen der konservativen LZ10-Superhelix das Segment II stabilisiert wurde und sich so ein beobachtbarer Zwischenzustand an der Grenze zwischen Segment I und II auflösen lässt. Dieser Zwischenzustand kann allerdings in der kürzeren, unveränderten DmKHC-Sequenz nicht direkt aufgelöst werden [116]. Zusätzlich zeigt das DmKHC-LZ10-Konstrukt, dass bei der Entfaltung des Segments I die zu überwindende Barriere nur etwa eine Heptade vom N-terminalen Ende entfernt liegt. Das bedeutet, dass durch ein Entfalten der untypischen, N-terminalen Heptade, die das Motiv eines hydrophoben Mantels aufzeigt, das gesamte Segment I kooperativ aufbricht.

Während also die erste Heptade die Struktur stabilisiert, hat die folgende „EKEK“-Sequenz der zweiten Heptade eine destabilisierende Wirkung auf die Superhelix.

In Abschnitt 3.2.3 konnten die Stabilitäten einzelner, aus der DmKHC-Sequenz entnommener Heptaden in der Umgebung der LZ26-Superhelix aufgelöst werden. Fügt man die „EKEK“-Sequenz in die LZ26-Superhelix ein, so ergibt sich eine lokale Destabilisierung um $-11 k_B T$, während ein N-terminales Anfügen des hydrophoben Mantels an die LZ25-Sequenz zu einer Stabilisierung von $10 k_B T$ führt. Durch eine einfache Summation der für die beiden Abschnitte ermittelten Gleichgewichtsenergien kann aber die Energie von $14 k_B T$, die zum Entfalten des nativen Segments I benötigt wird, nicht erklärt werden. Ein Grund ist in den komplexen Wechselwirkungen innerhalb des Segments I zu sehen, was auch erklärt warum dieses Segment in allen Kinesinen aus Tieren kaum Mutationen aufweist.

Auch zeigen die Messungen an den EKEK-LZ26- und dem DmKHC-LZ10-Konstrukt, dass im Faltungspfad der Superhelix an der Position der „EKEK“-Sequenz eine Barriere auftritt. Diese Barriere ist in beiden Konstrukten gleich, es ist daher nahe liegend anzunehmen, dass sich auch im unveränderten DmKHC-Konstrukt an dieser Position eine solche Barriere befindet. Diese Sequenz wirkt nicht nur destabilisierend auf die Superhelix, sie führt auch zu einer langsameren, zum Nichtgleichgewicht verschobenen Faltung an dieser Position.

Der N-Terminus der *D. melanogaster* Halssuperhelix weist zusätzlich helixbrechende Motive auf, die ein Fortschreiten der Superhelix verhindern. Messungen an dem LZ11-DmKHC-Konstrukt, bei welchem dieses helixbrechende Motiv N-terminal, durch die LZ11-Superhelix fortgesetzt wurde ergeben, dass dies nicht homogen möglich ist. Diese Messungen zeigen, dass die Kraftspektroskopie ein geeignetes Werkzeug darstellt, um die Eigenschaften helixbrechender Motive lokal zu untersuchen. Es ergibt sich eine lokale Destabilisierung der nachfolgenden LZ11-Superhelix um $6.8 k_B T$. Helixbrechende Motive werden auch am C-terminalen Ende der DmKHC-Halssequenz erwartet [128]. Allerdings zeigen die Messungen an der DmKHC-LZ10-Sequenz, dass sich die *D. melanogaster* Superhelix C-terminal durch eine LZ10-Superhelix homogen fortsetzen lässt. Das Tryptophan W370 allein zeigt also in dieser Umgebung keine auflösbaren, helixbrechenden Eigenschaften [128].

3.3 Mechanisches Entwinden der *Neurospora crassa* Halssuperhelix

3.3.1 Einleitung

Die konventionellen Kinesine verschiedener Organismen zeigen Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäuresequenz. So haben Kinesine aus Pilzen eine Sequenzhomologie zu Kinesinen aus Säugetieren von 30%, während die Sequenzhomologie innerhalb der einzelnen Gruppen höher liegt [136]. Es ist daher nicht erstaunlich, dass auch die gefalteten Proteinstrukturen ähnlich aufgebaut sind [137]. Dennoch gibt es deutliche Unterschiede zwischen diesen Kinesinen, so wurde bisher bei Kinesin aus Pilzen noch keine „leichten Ketten“ gefunden. Auch unterscheiden sie sich in ihrer *in vitro* gemessenen Geschwindigkeit. Dabei sind die Kinesine aus Pilzen mit Geschwindigkeiten von etwa $2 \mu\text{m/s}$ um das 3-fache schneller und zudem mit Lauflängen von ca. $2 \mu\text{m}$ etwa doppelt so prozessiv wie humanes Kinesin [138]. Diese Eigenschaften können dabei auch durch Mutationen im Hinge-Bereich beeinflusst werden [139]. Überraschenderweise fand man, dass im Gegensatz zu *D. melanogaster* Kinesin [106][103] die Halssuperhelix des *N. crassa* Kinesins allein nicht ausreicht, um den Motor zu dimerisieren [122]. Erst durch Anfügen von 16 weiteren Aminosäuren aus der Hingeregion, erhält man dimere Motoren. Kallipolitou *et al.* zeigten zusätzlich, dass die Halssuperhelix allein, nur bei pH-Werten unter 4.5 die für Superhelices typischen CD-Spektren aufweist. Durch das Einfügen einer Cystein-Brücke kann das für Superhelices typische CD-Spektrum auch bei pH 7 beobachtet werden [123]. Die mit der Entfaltung der Halssuperhelix verbundenen Gleichgewichtsenergien müssen daher sehr klein sein. Diese Erkenntnis führte zu mehreren Modellen, in denen die Halsregion eine steuernde Funktion übernimmt. So wurde für die Motorschritte ein Entwinden der Helix angenommen, was durch Cystein-Mutanten aber in Frage gestellt wird (siehe Abschnitt 3.1.3). Auch wurde ein Modell vorgeschlagen, das die Inaktivierung eines Motors, der keine Last trägt, durch ein Entfalten der Halssuperhelix erklärt [140]. Das Entfalten der Halssuperhelix wird in diesem Modell durch Interaktion mit dem lastenbindenden „Tail“ hervorgerufen.

Im folgenden Abschnitt werden Messungen vorgestellt, die die mechanische Stabilität der Halssuperhelix des *Neurospora crassa* Kinesins und die Stabilisierung der Superhelix durch die Hingeregion untersuchen.

3.3.2 Messungen an der *Neurospora crassa* Halssuperhelix

Die Sequenzen der Halssuperhelices aus *N. crassa* und *D. melanogaster* zeigen deutliche Unterschiede. Während bei der *D. melanogaster* Superhelix die a- und d-Positionen der ersten zwei Heptaden von untypischen Aminosäuren belegt sind, befinden sich an diesen Positionen in der *N. crassa* Sequenz nur hydrophobe Aminosäuren. Die Sequenz ist in Abbildung 3.11 a) in grün gezeigt. Um die mechanische Stabilität der *N. crassa* Superhelix ohne und mit angefügtem Hingebereich zu untersuchen, wurden diese an die bereits untersuchte LZ11-Superhelix, unter Berücksichtigung des Heptadenschemas, angefügt. Die C-terminalen Teile der sich ergebenden Sequenzen sind in Abbildung 3.11 a) gezeigt, die

(1) und völlig entfaltetem Zustand (3) beschreiben lassen².



Die zu diesem Schema passende Energielandschaft ist in Abbildung 3.11 d) gezeigt. Der Übergang $(1) \rightleftharpoons (2)$ führt in den Kraft-Abstandskurven beider Konstrukte zu einem Kraftplateau bei 12 pN, wie es auch bei den LZ18- und LZ26-Konstrukten auftritt. Daher ergeben sich für die ersten fünf Windungen der Energielandschaft dieselben Parameter mit denen auch die LZ-Konstrukte simuliert wurden (vgl. Abbildung 2.6). Bei der Simulation der Kraft-Abstandskurven zwischen den Zuständen (2) und (3) ergibt sich die beste Übereinstimmung mit den Daten für die in Abbildung 3.11 d) gezeigten Barrieren. Dabei beschreibt die Faltungsbarriere $\Delta G_{\text{on}}^{(4)} = 8k_B T$ die blauen Rückfaltungskurven in Abbildung 3.11 b) und c) vollständig. Die Simulation der Konstrukte mit und ohne angefügte Hingeregion, wurde mit derselben in Abbildung 3.11 d) gezeigten Energielandschaft durchgeführt. Das bedeutet, dass ein Anfügen der Hingeregion zu keiner messbaren Änderung der Entfaltungsbarriere $\Delta G_{\text{off}}^{(2)}$ oder der Rückfaltungsbarriere $\Delta G_{\text{on}}^{(3)}$ führt und daher auch keine Erhöhung der Gleichgewichtsenergie aufzulösen ist [122].

3.3.3 Diskussion und Zusammenfassung

Aus der gezeigten Energielandschaft lassen sich die Gleichgewichtsenergien der *N. crassa* Superhelix ohne angefügte LZ-Sequenzen abschätzen: Der energetische Beitrag der ersten 11 Windungen der LZ11-Superhelix ist bereits aus früheren Messungen bekannt und beträgt etwa $40 k_B T$ (siehe roter Kreis in Abbildung 3.11 d) und Tabelle 2.1). Denkt man sich nun die *N. crassa* Superhelix alleine, so sollte sie mit der Energielandschaft ab der 11ten Windung beschrieben werden können. Sie wäre also durch ein Zweizustandssystem mit einer ca. $12 k_B T$ hohen Entfaltungsbarriere zu beschreiben und würde eine nur sehr geringe Gleichgewichtsenergie von ca. $4 k_B T$ aufweisen. Diese ist gegeben durch die Energiedifferenz zwischen dem grünen Punkt des Zustands (3) in Abbildung 3.11 d) und dem in rot gezeigten Kreis. Diese Abschätzung deckt sich sehr gut mit der Beobachtung, dass bei physiologischen pH die *N. crassa* Sequenz alleine nicht als Superhelix vorliegt [122].

Die mit dieser Schätzung für die allein stehende *N. crassa* Superhelix im Gleichgewicht zu erwartenden, mittleren Entfaltungskräfte lägen bei sehr niedrigen 4 pN. Da aber die Entfaltung der LZ11-NKin-Konstrukte bei physiologisch relevanten Zeitskalen sehr weit vom Gleichgewicht entfernt ist, ist diese Abschätzung problematisch. So kann der Ort der Energiebarriere, der in Abbildung 3.11 d) an Position 13 zu finden ist, nur mit einem Fehler von ± 2 Windungen angegeben werden. Es ist also theoretisch möglich, dass in der *N. crassa* Superhelix die Entfaltungsbarriere sehr nahe am N-Terminus liegt und so im Nichtgleichgewicht zu hohen Entfaltungskräften führt. Um dies zu überprüfen, wurden direkte Messungen an der Halssuperhelix des *N. crassa* Kinesins mit einem Teil der

²Die Daten können auch mit komplexeren, weitere Zwischenzustände beinhaltenden kinetischen Modellen beschrieben werden [80].

Hingeregion durchgeführt. Die Aminosäuresequenz ist in Abbildung 3.12 a) zu sehen, die schematische Struktur in Abbildung 3.12 b). Abbildung 3.12 c) zeigt eine Messung an

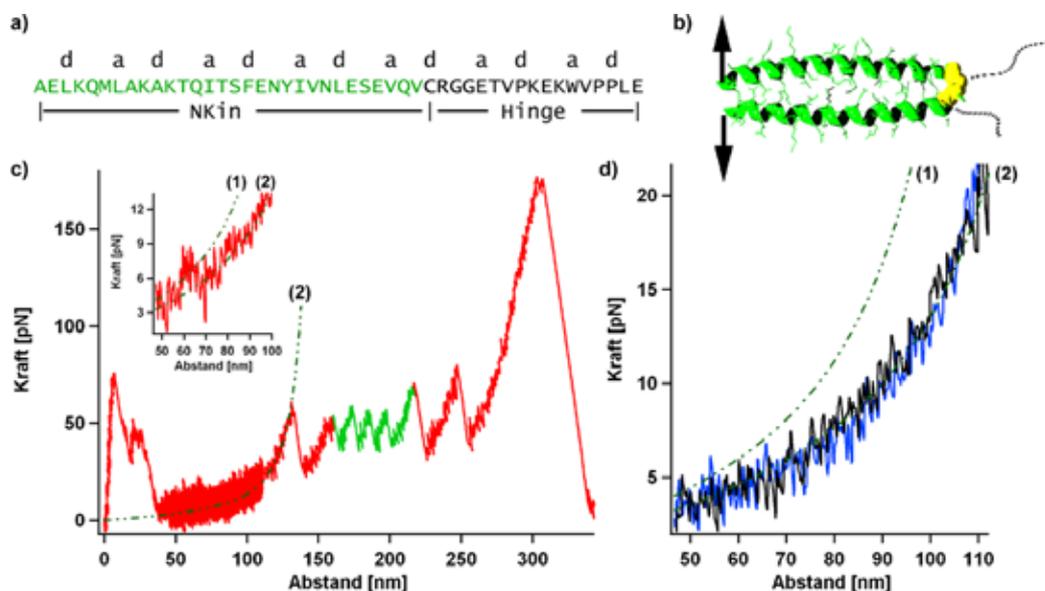


Abbildung 3.12: a) Sequenz der Halssuperhelix des *N. crassa* Kinesins. In der 9ten Windung wurde ein Cystein eingefügt. b) Schematische Struktur der NKin-H-Superhelix. c) Kraft-Abstandskurve eines einzelnen Moleküls, in grün sind zwei ddFLN4 Entfaltungen gezeigt. d) Gemittelte Vorwärts- (schwarz) und Rückwärtskurve (blau) des Moleküls.

einem Molekül. Die beiden in grün gezeigten Entfaltungsereignisse der ddFLN4 Domäne zeigen, dass im gemessenen Molekül eine laterale Kraft auf die Superhelix wirkt. Dennoch zeigen die gemittelten Vorwärts- und Rückwärtskurven (Abbildung 3.12 d) keine auflösbaren, mittleren Entfaltungskräfte, die größer als 4 pN sind. Eine Ursache könnte sein, dass die mittlere Entfaltung bei Kräften, die kleiner als 4 pN sind stattfindet und des Weiteren, dass die Rückfaltung der Superhelix nicht gegen Kräfte von 4 pN stattfinden kann. Durch Mittelung einzelner, ausgewählter Zyklen, die ein Entfaltungsereignis zeigen, kann eine Obergrenze für die mittlere Kraft der Superhelixentfaltung angegeben werden. Dies ist im Inset in Abbildung 3.12 c) gezeigt, maximal auftretende Kräfte der Entfaltung liegen danach bei ca. 7 pN. Diese Superhelix ist also thermodynamisch sehr instabil. Dies unterstützt Motormodelle, die eine flexible Halssuperhelix voraussetzen. Diese Modelle können die gemessene Verringerung der Kinesingeschwindigkeit unter Last erklären, die in Motoren auftritt, deren Halsregion durch eine sehr stabile Superhelix ersetzt wurde [124].

Die LZ11-NKin-Konstrukte zeigen darüber hinaus, dass sich die *N. crassa*-Sequenz homogen an die LZ11-Superhelix anfügen lässt, d.h am Ort des Schnittpunktes beider Sequenzen bildet sich kein energetisches Minimum. Bis auf das Prolin, das in dem zusammengefügteten Konstrukt weggelassen wurde, weist der N-Terminus der *N. crassa* Superhelix also keine weiteren Helix-terminierenden Eigenschaften auf.

3.4 Ausblick

Im Gegensatz zur Superhelix des *D. melanogaster* Kinesins kann die Schrittweite dimerer Myosin VI Motoren nur durch eine flexible Halsregion erklärt werden [127]. Dieser „proximal Tail“ zeigt in Vorhersageprogrammen nur geringe Wahrscheinlichkeiten für eine superhelikale Struktur. Mit der hier gezeigten Methode ist man in der Lage, dies zu überprüfen. Abbildung 3.13 b) zeigt die Sequenz des LZ11-MyosinVI Konstruktes, in dem an die bereits untersuchte LZ11-Sequenz der N-terminale „proximal Tail“ des Myosins VI aus *Sus scrofa* angefügt wurde. Darunter ist die Wahrscheinlichkeit angegeben, die

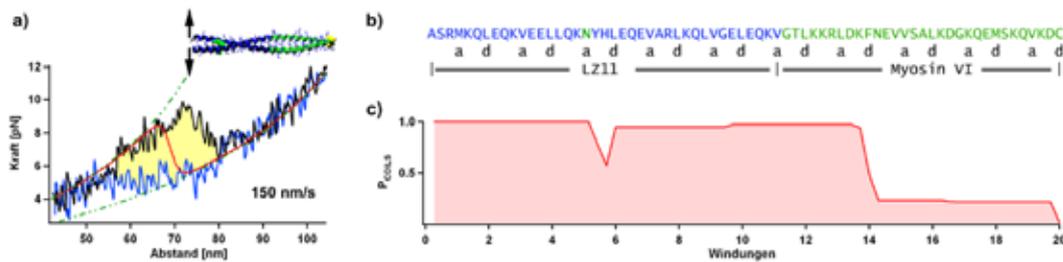


Abbildung 3.13: a) Mittlere Kraft-Abstandskurven des LZ11-MyosinVI Konstruktes, in rot ist die Gleichgewichtskurve gezeigt, die sich ergibt, wenn für alle MyosinVI Windungen $E_{SH} = 0$ $k_B T$ angenommen wird. b) Sequenz des LZ11-MyosinVI Konstruktes. Die Myosin VI Sequenz ist aus *Sus scrofa* ab Aminosäure 844 entnommen. c) Superhelixvorhersage mit dem Algorithmus von Lupas [104], die Myosin VI Sequenz liegt wahrscheinlich nicht als Superhelix vor.

Sequenz als Superhelix vorzufinden [104]. Kraftspektroskopische Messungen an diesem Konstrukt (Abbildung 3.13 a)) zeigen keine deutliche Stabilisierung der LZ11-Sequenz, die Kraftkurven verhalten sich analog zu Konstrukten, bei denen unstrukturierte Aminosäuren an die LZ11-Sequenz addiert wurden (vgl. LZ11-H6T Sequenz in Abbildung 2.15). Die Messungen unterstützen also die Aussage, dass der „proximal Tail“ nicht als Superhelix vorliegt. Eine direkte kraftspektroskopische Überprüfung mit der besseren Kraftauflösung der optischen Pinzette an nativen Konstrukten ohne die LZ Sequenzen wäre aber für solche Fragestellungen von Vorteil.

Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Auflösungsvermögen der Kraftmikroskopie ausreichend ist, um die lokalen, mechanischen Stabilitäten von Superhelices zu studieren. Dies legt die Grundlage für die Beantwortung weiterer Fragen der Proteinfaltung. So konnte die lokale Änderung der mechanischen Stabilität einer Superhelix gemessen werden, die sich durch Austausch einer hydrophilen durch eine hydrophobe Aminosäure ergibt. Durch gezielte Mutation der Restgruppe einer Aminosäure könnte diese Methode verfeinert werden. Auf diese Weise könnte die mechanische Stabilität einzelner Wasserstoff- oder Salzbrücken gemessen werden.

Die direkte Auflösbarkeit der lokalen Reichweite einzelner Defekte in einer Superhelix stellt einen Vorteil der Kraftspektroskopie gegenüber den klassischen Ensemblestudien dar. Somit ermöglicht es die Kraftspektroskopie, systematisch die Reichweite helixterminierender Wechselwirkungen in C- und N-terminaler Richtung zu studieren. Auch lässt sich die Größe von Faltungskeimen direkt vermessen, in diesem Zusammenhang wäre ihre minimal mögliche Größe, oder die mechanischen Eigenschaften so genannter „Triggersequenzen“ [141] von Interesse.

Von physikalischem Interesse ist die Temperaturabhängigkeit der, den einzelnen Windungen zugeordneten Gleichgewichtsenergien E_{SH} . Diese Energien setzen sich aus einer Vielzahl enthalpischer und entropischer Beiträge zusammen, die unterschiedlich von der Temperatur abhängen sollten. So könnten durch temperaturabhängige Messungen die Energien E_{SH} weiter differenziert werden.

Neben anderen zukünftigen Messungen, die in den einzelnen Abschnitten vorgeschlagen wurden, können durch die Kraftspektroskopie auch eine Vielzahl weiterer superhelikaler Strukturen untersucht werden. Interessant sind in diesem Zusammenhang Proteine, die bei der Fusion von Membranen beteiligt sind, wie die SNARE-Komplexe [142] oder der HIV-gp41 Komplex [143]. Auch Messungen an Intermediärfilamenten, die mechanischen Kräften ausgesetzt sind, können Aussagen über deren Stabilität liefern [144].

Für Superhelices, die sehr instabil sind, wie beispielsweise die Halssuperhelix des *N. crassa* Kinesins, ist aber die vorgestellte Messmethode bereits an ihrer Auflösungsgrenze. Hier wären Kraftmikroskope mit Blattfedern höherer Kraftauflösung wünschenswert. Auch wird die Verwendung optischer Pinzetten zum mechanischen Auftrennen von Superhelices hier tiefergehende Erkenntnisse liefern.

Anhang A

CD-Spektroskopie an Superhelices

In dieser Arbeit wurden verschiedene, artifizielle Superhelices erzeugt und kraftspektroskopisch untersucht. Da die Konturlängenzuwächse und die spezifischen Kraftfluktuationen, die mit dem mechanischen Auftrennen der Superhelices verbunden sind, sehr gut durch die jeweiligen Aminosäuresequenzen erklärt werden konnten, lässt sich allein durch die Kraftspektroskopie schon auf die korrekte Faltung der Superhelices schließen. Eine weitere komplementäre Methode, mit der eine Aussage über die Struktur von Proteinen getroffen werden kann ist die CD-Spektroskopie. Superhelices zeigen ein typisches Spektrum, das bereits sehr gut untersucht ist [129]. Abbildung A.1 zeigt die CD-Spektren der LZ26, LZ11-DmKHC und der DmKHC-LZ10-Superhelices, die in dieser Arbeit kraftspektroskopisch untersucht wurden. Die Spektren wurden an Lösungen mit verschiedenen Superhe-

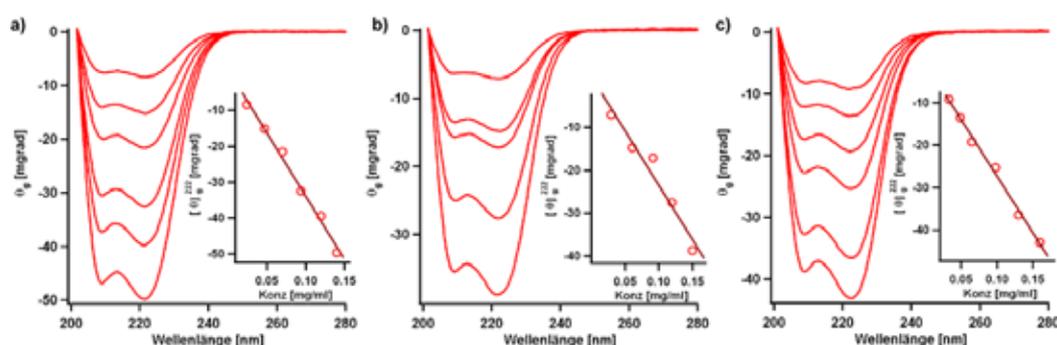


Abbildung A.1: CD-Spektren der a) LZ26, b) LZ11-DmKHC und c) DmKHC-LZ10-Konstrukte bei verschiedenen Konzentrationen. Die Elliptizität des Minima bei 222 nm ist für die jeweiligen Konstrukte im Inset in Abhängigkeit von der Konzentration gezeigt.

lixkonzentrationen gemessen, die absoluten Werte der Elliptizität Θ_g hängen dabei linear von der Konzentration ab (Anhang B.2.2). Erkennbar ist dies an den jeweiligen Insets, die die Elliptizität bei einer Wellenlänge von $\lambda = 222$ nm in Abhängigkeit der Superhelixkonzentration zeigen. Um die Spektren der verschiedenen Superhelices vergleichbar zu halten, können sie mit Formel B.6 auf die mittlere Molmasse der einzelnen Aminosäuren (MRW) und die Konzentration der Superhelices in der gemessenen Lösung geeicht werden.

Führt man dies für alle in Abbildung A.1 a) gezeigten Spektren durch und bildet bei jeder Wellenlänge den Mittelwert aus den sechs Spektren, so erhält man das in Abbildung A.2 schwarz gezeigte Spektrum der LZ26-Superhelix. Analog erhält man aus Abbildung A.1 b) und c) die in Abbildung A.2 grün und rot gezeigten Spektren. Alle Spektren zeigen zwei

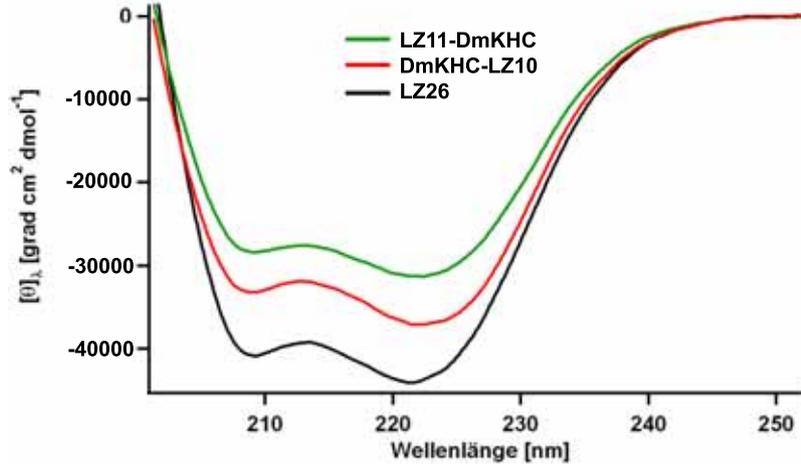


Abbildung A.2: Mittlere molare Elliptizität $[\theta_\lambda]$ pro Aminosäure von drei verschiedenen Superhelices. In grün ist das Spektrum der LZ11-DmKHC, in rot das der DmKHC-LZ10 und in schwarz das der LZ26-Superhelix gezeigt. Die Spektren zeigen die für Superhelices typische Form.

Minima bei $\lambda = 222$ und $\lambda = 208$ nm, die charakteristisch für dimere Superhelices sind. Das Verhältnis dieser Werte wird oft als Indikator der Superhelixbildung verwendet, wobei Werte von $[\theta_{222}]/[\theta_{208}] \approx 1.05$ für eine korrekt gefaltete Superhelix sprechen und Werte unter $[\theta_{222}]/[\theta_{208}] \approx 0.96$ für nicht superhelikal vorliegende α -Helices [129][122]. Bildet man für die hier gezeigten Superhelices die Verhältnisse der Minima, so ergeben sich die Werte 1.09 (LZ26), 1.1 (DmKHC-LZ11) und 1.06 (LZ10-DmKHC), die für korrekt gefaltete Superhelices zu erwarten sind.

Außerdem lassen sich die absoluten $[\theta_{222}]$ -Werte für α -Helices beliebiger Länge über

$$[\theta_{222}] = [\theta_{222}^\infty](1 - k/N_{AA}) \quad (\text{A.1})$$

theoretisch vorhersagen, wobei $[\theta_{222}^\infty] = 40000$ [grad cm²dmol⁻¹] die molare Elliptizität einer unendlich langen α -Helix angibt, $k = 4.6$ eine von der Wellenlänge abhängige Konstante ist und N_{AA} die Anzahl der Aminosäuren des Peptides darstellt [145][129]. Die dadurch zu erwartenden Werte für die drei verschiedenen Superhelices liegen bei $[\theta_{222}] \approx 38000$. Gemessen werden 44000 (LZ26), 37000 (DmKHC-LZ11) und 31000 (LZ10-DmKHC), nur die DmKHC-LZ11-Superhelix zeigt also den zu erwartenden Wert. Die Messwerte hängen dabei direkt von der Konzentration des gemessenen Peptides ab, die in dieser Arbeit über die Absorption von Licht der Wellenlänge $\lambda = 280$ nm ermittelt wurde. Die Abschätzung der dafür notwendigen Extinktionskoeffizienten ist insbesondere für die LZ26-Sequenz fehlerbehaftet, da diese kein Tryptophan (W) beinhaltet [146]. Für eine genaue Bestimmung

des α -helikalen Anteils, wäre eine exakte Messung der Konzentration nötig. Vor allem für das LZ11-DmKHC-Konstrukt könnten damit Aussagen über die Struktur der N-terminal nach den helixbrechenden Motiven folgenden LZ11-Superhelix gegeben werden [129].

Mit Zerstörung der Sekundärstruktur durch thermische oder chemische Denaturation verschwindet auch das CD-Signal. Somit kann durch Detektion der Elliptizität bei 222 nm in Abhängigkeit der Temperatur oder eines GdnHCL-Gradienten die Gleichgewichtsenergie des Proteins bestimmt werden. Abbildung A.3 a) zeigt das CD-Signal bei 222 nm in Abhängigkeit der Temperatur für das LZ26-Konstrukt. Ohne zusätzliches chemisches De-

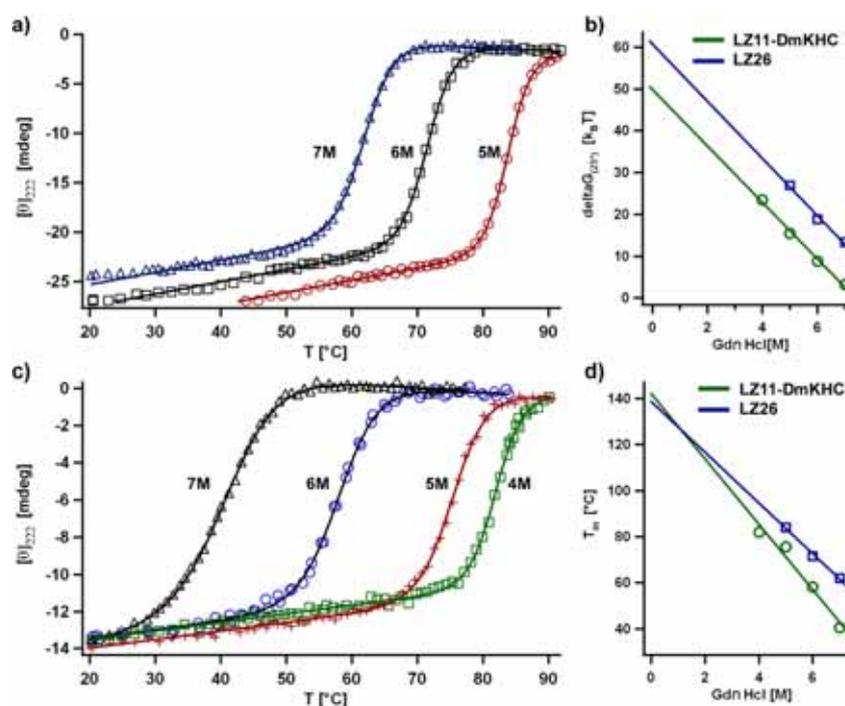


Abbildung A.3: Thermische Denaturierungskurven der a) LZ26 und c) LZ11-DmKHC-Superhelix. Die Messungen wurden in PBS-Lösung mit verschiedenen Konzentrationen von GdnHCL durchgeführt. Für Konzentrationen kleiner als 4M lassen sich die Superhelices nicht mehr mit Temperaturen unter 100° aufschmelzen. b) Durch Extrapolation der Gleichgewichtsenergien ΔG_{25° und d) der Schmelztemperaturen T_m lassen sich diese bei 0M Denaturant abschätzen.

naturant lässt sich die LZ26-Superhelix nicht mit Temperaturen, die kleiner als $100^\circ C$ sind aufschmelzen. Selbst bei Zugabe von 7M GdnHCL lässt sich die LZ26-Superhelix nur mit einer Temperatur von $T_m = 61^\circ C$ denaturieren, wodurch die Gleichgewichtsenergie und die mittlere Schmelztemperatur ohne Detergent nur noch durch Extrapolation bestimmt werden kann. Die LZ11-DmKHC-Superhelix zeigt ein ähnliches Verhalten (Abbildung A.3 c)). Durch Anpassen einer Schmelzkurve an die Daten [147][148] lassen sich die Werte für T_m und ΔG_{25° bestimmen. Dabei ist anzumerken, dass als weiterer Parameter die Differenz der Wärmekapazitäten zwischen gefaltetem und entfaltetem Protein Δc_p benötigt wird. Da die verwendeten Superhelices einen hohen Schmelzpunkt haben, ist die Bestimmung dieses

Wertes beispielsweise durch die „Differential Scanning Calorimetrie“ (DSC) schwierig. Eine empirische Abschätzung, wie sie hier verwendet wurde [149], ist mit einem großen Fehler behaftet, die exakte Bestimmung der Gleichgewichtsenergien ΔG_{25° ist also nicht möglich. Die sich bei verschiedenen Konzentrationen von GdnHCl ergebenden Schmelzpunkte T_m sind in Abbildung A.3 d), die abgeschätzten Gleichgewichtsenergien ΔG_{25° in Abbildung A.3 b) gezeigt. Durch Extrapolation der Schmelztemperaturen auf eine Konzentration von 0M GdnHCl erhält man für die LZ26 und die LZ11-DmKHC-Superhelix $T_m \approx 140^\circ$. Dies entspricht dem zu erwartenden Wert für stabile Superhelices mit einer Länge von mehr als 10 Windungen [69].

Durch Extrapolation lassen sich auch die Gleichgewichtsenergien ΔG_{25° bei 0M GdnHCl abschätzen. Die Werte von $60 k_B T$ (LZ26) und $50 k_B T$ (LZ11-DmKHC) liegen in der richtigen Größenordnung. Zusätzlich erkennt man, dass die LZ26-Sequenz eine höhere Gleichgewichtsenergie als die LZ11-DmKHC-Sequenz aufweist. Die CD-Messungen an diesen sehr stabilen Superhelices zeigen, dass sich die Methoden der Kraftspektroskopie und der CD-Spektroskopie für die Bestimmung von Gleichgewichtsenergien hervorragend ergänzen. Für stabile bzw. sehr lange Superhelices ist die Kraftspektroskopie das geeignetere Verfahren, während für instabile oder sehr kurze Superhelices die CD-Spektroskopie von Vorteil ist.

Anhang B

Methoden und Materialien

B.1 Molekularbiologische Methoden

Sämtliche Proteinkonstrukte für die Messungen zum Faltungsverhalten superhelikaler Strukturen wurden im lehrstuhleigenen S1 Labor hergestellt. Im Folgenden wird ein Überblick über die verwendeten gentechnischen Methoden zum Design des Expressionsvektors und das Vorgehen zur Expression und Aufreinigung der verschiedenen Proteinkonstrukte gegeben. Außerdem werden die Aminosäuresequenzen der verwendeten Superhelices zusammengefasst.

B.1.1 Gentechnische Methoden

Ziel war es, an die N-terminalen Enden einer Superhelix globuläre Domänen als „Trägerprotein“ zu fusionieren. Als besonders geeignetes Trägerprotein erwiesen sich die Domänen eins bis fünf des kraftspektroskopisch sehr gut untersuchten aktinbindenden Proteins *Dictyostelium discoideum* Filamin (ddFLN 1-5). Die DNA-Sequenz dieses Proteins wurde freundlicherweise von Prof. Michael Schleicher (Adolf-Butenandt-Institut) zur Verfügung gestellt. Sie lag im Expressionsvektor pET28a(+) (Fa. Novogene) zwischen den Schnittstellen NcoI und XhoI der „Multiple Cloning Site“ vor. Mit Hilfe des „Quickchange Mutagenesis Kits“ (Fa. Stratagene) und speziell entworfenen Primern (Fa. Metabion) wurde vor der XhoI Schnittstelle eine NheI Schnittstelle eingefügt. Alle in dieser Arbeit kraftspektroskopisch in der „Unzippinggeometrie“ untersuchten Superhelices (eine Zusammenfassung aller Sequenzen findet sich in Abbildung B.2) wurden zwischen diesen NheI und XhoI Schnittstellen eingebettet. Die Vektorkarte in Abbildung B.1 zeigt dies am Beispiel der LZ26-Sequenz. In einzelnen wurden zuerst die Sequenzen der Superhelices LZ10- und LZ18 unter Vermeidung von repetitiven und GC- oder AT-reichen Sequenzabschnitten und mit einer für den E.coli-Stamm optimierten Codon-Tabelle hergestellt (Fa. GeneArt) und zwischen NheI und XhoI Schnittstellen des pPCR-Script Amp Vektors geliefert. Der pET28a(+)ddFLN1-5 Vektor sowie die pPCR-Script Vektoren wurden parallel durch NheI und XhoI Restriktionsenzyme geschnitten (Fa. NewEngland BioLabs) und die Endprodukte durch Gelelektrophorese getrennt. Mit Hilfe des „Gel Extraction Kits“ (Fa. Qiagen)

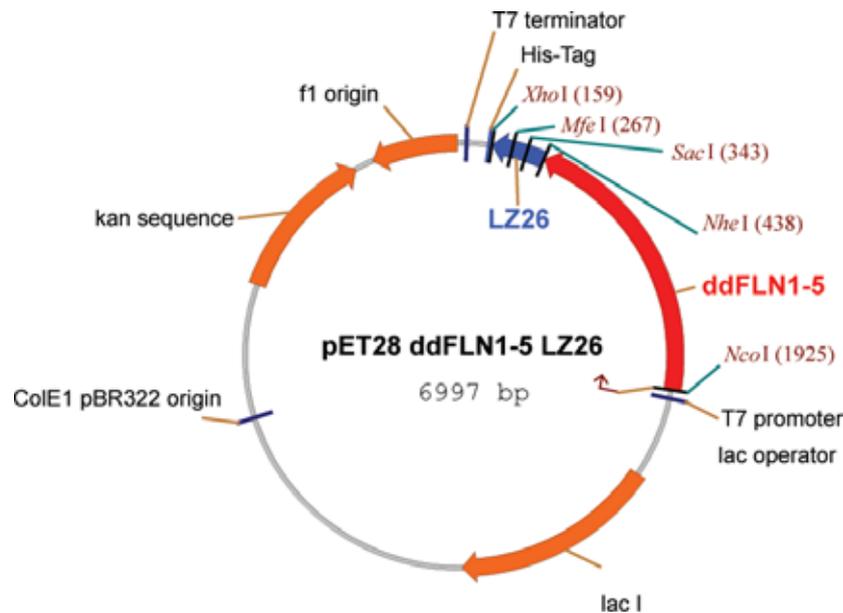


Abbildung B.1: Vektorkarte des zur Expression benutzten pet28a(+) Vektors mit eingefügtem ddFLN1-5 und LZ26-Sequenzen

konnten der geschnittene pET28a(+)-ddFLN1-5 Vektor und die geschnittenen LZ10- und LZ18-Sequenzen gewonnen werden. Unter Verwendung einer T4 Ligase (Fa. Roche) wurde die LZ10- bzw. die LZ18-Sequenz in den pet28a(+)-ddFLN Vektor eingefügt.

Zur Herstellung des LZ26-Konstruktes wurde mit dem „Quickchange Mutagenesis Kit“ jeweils eine SacI Schnittstelle am Ende der LZ10-Sequenz und zu Beginn der LZ18-Sequenz eingefügt. Es wurde speziell diese Schnittstelle gewählt, da sie innerhalb des verwendeten Leserahmens die Aminosäuren Glutaminsäure (E) und Leucin (L) codiert, die sich störungsfrei in die Superhelixheptade integrieren lassen. Die gewählte Position (343) gewährleistet außerdem, dass in der codierten Aminosäuresequenz das Heptadenschema nicht unterbrochen wird. Durch Ausschneiden der LZ18-Sequenz zwischen den SacI und XhoI Positionen und anschließendes Einfügen in den pet28a(+)-ddFLN1-5-LZ10 Vektor wurde das gewünschte LZ26-Konstrukt gewonnen.

Die Mutationen, die das an einer α -Position codierte Asparagin (N) in der dritten Heptade der LZ18-Sequenz und der siebten Heptade der LZ26-Sequenz in ein Valin (V) umcodieren (rot markiert in den Sequenzen LZ18-N/V und LZ26-N/V in Abbildung B.2), wurden mit dem „Quickchange Mutagenesis Kit“ (Fa. Stratagene) durchgeführt.

Um weitere superhelikale Sequenzen zwischen zwei LZ10-Sequenzen einfügen zu können, wurde im hinteren Drittel des LZ26-Abschnittes (an Position 267) mit dem „Quickchange Mutagenesis Kit“ eine MfeI Schnittstelle eingebracht. (siehe Abbildung B.1) Diese Mutation verändert die codierte Aminosäuresequenz nicht, da die Schnittstelle innerhalb des verwendeten Leserahmens die Aminosäuren Glutamin (Q) und Leucin (L) erzeugt, die so in der Templatsequenz bereits vorkommen. Die einzufügenden Sequenzen aus der Halsregion des *Drosophila melanogaster* Kinesins (DmKHC), des *Neurospora crassa* Kinesins

(NKin) und die synthetische, besonders stabile ..EIEALKA.. Sequenz (Stable) wurden zwischen SacI und MfeI Schnittstellen geliefert (Fa. GeneArt) und mit obigen Methoden in den vorhandenen pET28a-ddFLN1-5-LZ26 Vektor eingefügt. Die sich ergebenden Sequenzen (LZ-DmKHC-LZ, LZ-NKin-LZ und LZ-Stable-LZ) sind in Abbildung B.2 aufgeführt, wobei die eingefügten Sequenzen rot hervorgehoben sind.

Aus den LZ-DmKHC-LZ und LZ-NKin-LZ Konstrukten wurden durch das Einmutieren eines Cysteins (C) mit direkt anschließendem Stop-codon die Sequenzen LZ-DmKHC und LZ-NKin gewonnen. Da dadurch der C-terminale His-Tag nicht mehr exprimiert wird, wurde dieser am N-terminus vor der ddFLN1 Domäne angebracht. In Abbildung B.2 ist dies durch ein N in der Spalte „Tag“ gekennzeichnet. Ein C in dieser Spalte bedeutet, dass direkt am Ende der Sequenz nach der XhoI Schnittstelle (die die Aminosäuren Leucin (L) und Glutaminsäure (E) codiert) sechs Histidine (H) angefügt sind.

Der von GeneArt gelieferte Vektor enthielt außerdem Sequenzen, die die ersten 20 Aminosäuren der *Drosophila melanogaster Kinesin*-„Hinge“-region und der „proximal tail“-region des Myosins VI (*Sus scrofa*) codieren. Diese wurden mit Primern (Fa. Metabion), die als Überhang jeweils eine SacI Schnittstelle und eine XhoI Schnittstelle aufweisen, durch PCR (Taq DNA-Polymerase Fa. New England Biolabs) amplifiziert und mit diesen Schnittstellen in den pET28 ddFLN1-5 LZ26 Vektor eingebracht. Die sich ergebenden Sequenzen sind in Abbildung B.2 unter LZ10-H6T und LZ10-M6 aufgeführt. Um die „Hingeregion“ des LZ10-H6T Konstruktes zu verkürzen, wurde mit Hilfe des „Quick Change Mutagenesis Kits“ ein Cystein (C) mit direkt folgendem Stop-Codon in diese eingebracht (Sequenz LZ10-H3T in Abbildung B.2).

Mit Hilfe des „Phusion Site Directed Mutagenesis Kits“ (Fa. Finnzymes) kann eine Deletion beliebig langer Sequenzabschnitte durch PCR erreicht werden. Wählt man am 5' Ende phosphorylierte PCR-Primer, kann der Vektor sofort nach der PCR durch eine Ligase wieder cyclisiert und transformiert werden. Mit dieser Prozedur wurden die ersten fünf Heptaden des LZ-DmKHC-LZ Konstruktes gelöscht, was zu dem DmKHC-LZ10-Konstrukt führt. Die selbe Methode kann auch verwendet werden, um Insertionen kürzerer Sequenzen vorzunehmen. Dazu müssen die am 5'-Ende phosphorylierten Primer Überhänge mit der gewünschten Insertion aufweisen. Auf diese Weise wurde eine Heptade der DmKHC-Sequenz in die LZ26-Sequenz (EKEK-LZ26) eingefügt. Durch darauf folgendes Löschen der ersten 5 Heptaden der EKEK-LZ26-Sequenz konnte die EKEK-LZ18-Sequenz gewonnen werden. Anhand des „Phusion Site Directed Mutagenesis Kits“ wurde auch die erste Heptade der DmKHC-Sequenz in die LZ26-Sequenz eingefügt (NT-LZ26).

Für die Arbeiten auf DNA-Ebene wurden die E.coli Zelllinien DH5 α und XL10 (Fa. Stratagene) verwendet, transformiert wurde mit Hilfe des Hitzeschockverfahrens basierend auf der Methode von D. Hanahan [150], die Plasmidisolierung wurde mit dem „QiaPrep Spin Miniprep“ (Fa. Qiagen) durchgeführt. Alle Vektoren wurden nach Fertigstellung sequenziert (Fa. GATC-Biotech) und auf Korrektheit überprüft.

B.1.2 Expression und Aufreinigung

Die mit obigen gentechnischen Methoden gewonnenen Vektoren wurden in *E.coli* Bakterien des Stamms „BL21Codon+“ (Stratagene) transformiert und bei 37° bis zu einer gewissen Populationsstärke (OD=0.7) kultiviert. Durch Zugabe von IPTG wurde die Expression des gewünschten Proteins gestartet und nach zwei Stunden wurden die Zellmembranen durch Ultraschall aufgebrochen. In einem ersten Reinigungsschritt wurden die gewünschten Proteine durch Ni-NTA Affinitätschromatografie von den restlichen Zellrückständen getrennt (HisTrap GE Healthcare). In einem zweiten Reinigungsschritt wurde durch Größenausschlusschromatographie (Superdex 200 GE Healthcare) die restlichen Proteine fraktioniert und das gewünschte Protein ausgewählt. Mit SDS-Gelelektrophorese wurden diese auf ihr korrektes Molekulargewicht hin überprüft.

B.1.3 Sequenzen

In Abbildung B.2 sind alle, im Rahmen dieser Arbeit erstellten, Superhelixsequenzen zusammengefasst. Die Spalte Tag gibt an, ob der HisTag bestehend aus sechs Histidinen (H) vor den ddFLN1-5 Domänen (N-terminal) oder nach der jeweiligen Superhelixsequenz (C-terminal) angebracht wurde. Im hier verwendeten Leserahmen codiert die Schnittstelle NheI die Aminosäuren AS (schwarz unterstrichen), SacI codiert EL (blau unterstrichen), MfeI codiert QL (rot unterstrichen) und durch XhoI wird LE codiert (grün unterstrichen). Veränderte oder hinzugefügte Sequenzabschnitte sind rot hervorgehoben. Die LZ-Nkin-LZ-, LZ-Stable-LZ-, LZ-DmKHC-LZ- und die LZ12-NT-LZ13 zeigten bei der kraftspektroskopischen Untersuchung nicht bei allen Entfaltungen die zu erwartenden Konturlängenzuwächse. Von diesen Konstrukten wurde daher nur die LZ-DmKHC-LZ-Superhelix ausgewertet. Alle Sequenzen wurden in den pET28a ddFLN Vektor zwischen den NheI und XhoI Schnittstellen eingefügt.

B.2 Experimentelle Methoden

B.2.1 Kraftspektroskopie

Das Messprinzip eines Atom-Kraftmikroskopes (AFM) beruht auf einer sehr kleinen Blattfeder, die eine scharfe Spitze mit einem Spitzenradius von ca. 40 nm aufweist (siehe Abbildung B.3 a)). Auf das vordere Ende der Blattfeder wird ein Lichtstrahl fokussiert, der nach

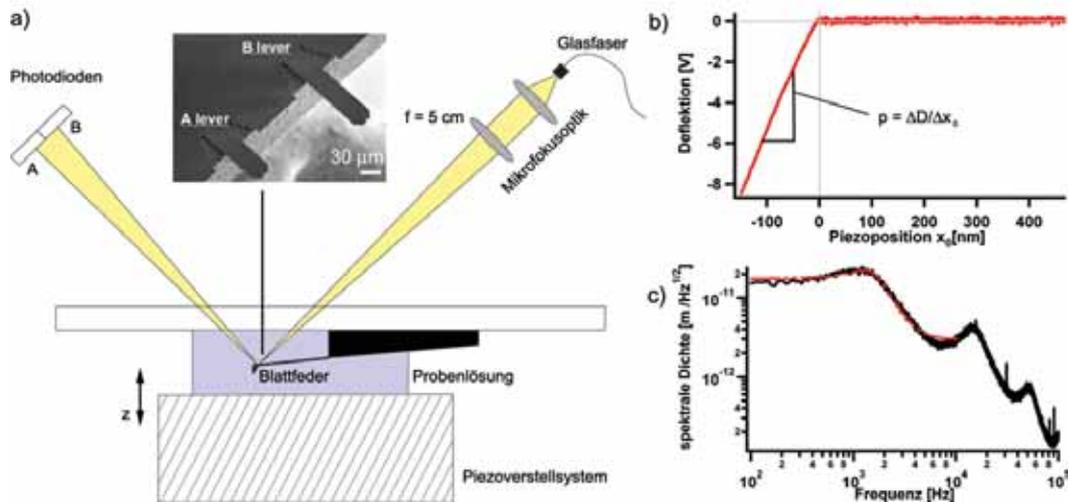


Abbildung B.3: a) Nicht maßstabsgetreuer Aufbau eines Atom-Kraftmikroskopes. Eingefügt ist eine Abbildung der verwendeten Blattfeder (Biolever Typ B Fa. Olympus). b) Beispielhafte Kurve in der die Deflektion gegen die Piezoposition aufgetragen ist. Bis 0 nm ist die AFM-Spitze in direktem Kontakt mit der Oberfläche für größere Entfernungen ist die Blattfeder frei in Lösung. c) Thermisches Rauschspektrum der verwendeten Blattfeder in Lösung.

der Reflexion von einer aus den Segmenten A und B bestehenden Photodiode detektiert wird. Für Messungen an biologischen Proben wird die Blattfeder in eine Probenlösung eingebracht. Unter der Blattfeder ist ein in z-Richtung höhenverstellbarer Piezotisch angebracht. Der Piezotisch verfügt über kapazitive Abstandssensoren mit Feedbacksystem, so dass der Abstand der nicht ausgelenkten Spitze von der Tischoberfläche (x_0) mit nanometer Genauigkeit eingestellt werden kann. Berührt die Oberfläche die AFM-Spitze, so führt das zu einer Verbiegung der Blattfeder und somit zu einer Positionsänderung des Lichtzeigers auf den Photodioden. Diese Positionänderung kann durch Messen der Intensitäten I_A und I_B bestimmt werden, indem man die Deflektion $D = (I_A - I_B) / (I_A + I_B)$ berechnet. Die Deflektion ist jedoch nur proportional zur tatsächlichen Auslenkung der Blattfederspitze, weshalb noch die Proportionalitätskonstante p bestimmt werden muss. Man erhält diese durch Bestimmung des Verhältnisses aus Änderung der Deflektion ΔD , relativ zur Änderung der Position der Oberfläche Δx_0 , wenn diese in direktem Kontakt mit der Blattfederspitze ist (Steigung in Abbildung B.3 b)). Kennt man die Kraftkonstante k_C der Blattfeder, kann man aus der absoluten Auslenkung der Blattfeder die Kraft die auf

die Federspitze zu jeder Zeit t wirkt berechnen:

$$F(t) = \frac{k_C}{p} D(t) \quad (\text{B.1})$$

Außerdem kann man den Abstand zwischen Blattfederspitze und Oberfläche $z(t)$ angeben:

$$z(t) = x_0(t) - \frac{1}{p} D(t) \quad (\text{B.2})$$

Trägt man das Kraftsignal gegen das Abstandssignal auf, so erhält man Kraft-Abstandskurven, wie sie in dieser Arbeit gezeigt werden.

Die für alle Messungen in dieser Arbeit verwendeten Blattfedern (Biolever Typ B Fa. Olympus) haben eine vom Hersteller angegebene Federkonstante von $k_C \approx 6\text{pN/nm}$. Für jede Messung wurde die Federkonstante mit der Methode des thermischen Rauschens bestimmt [151][152][153][154]. Dazu wurde die spektrale Dichte der Blattfeder aufgenommen und eine Lorentzkurve bei der ersten Resonanzfrequenz ($\omega_0 \approx 1.5\text{kHz}$) angefitet (Abbildung B.3 c)). Mit Hilfe des Gleichverteilungssatzes kann durch Integration der Fitkurve die Federkonstante durch

$$k_C = 0.82 \frac{k_B T}{\langle x^2 \rangle} \quad (\text{B.3})$$

bestimmt werden. Typischerweise liegt der Fehler der so bestimmten Federhärte bei 10%. Für die Messungen wurden etwa $10\mu\text{l}$ der Proteinlösung (ca. 1 mg/ml Protein in PBS-Lösung) auf einen unbehandelten Glasträger gegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Glasträger unter die, sich bereits in $30\mu\text{l}$ PBS-Lösung befindende, Blattfeder gebracht. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

B.2.2 CD-Spektroskopie

Linear polarisiertes Licht kann man sich als Überlagerung zweier gleicher Teile von links- und rechts-zirkular polarisiertem Licht denken. Tritt linear polarisiertes Licht durch eine optisch aktive Probe, so besitzen nach Fresnel die verschiedenen polarisierten Anteile verschiedene Brechungsindizes ($n_r \neq n_l$) und damit verbundene unterschiedlichen Propagationsgeschwindigkeiten, was nach Austreten aus der Probe zu linear polarisiertem Licht mit einer um den Winkel α gedrehten Polarisationssebene führt (optische Rotation).

Zusätzlich besitzen die verschiedenen zirkular polarisierten Anteile unterschiedliche Extinktionskoeffizienten ($\varepsilon_r \neq \varepsilon_l$), wodurch ihre Vektoren nach Austritt aus dem Medium verschiedene Längen aufweisen (siehe Abbildung B.4 a)). Das heißt, das austretende Licht ist zusätzlich zur gedrehten Polarisationssebene elliptisch polarisiert (Circular Dichroismus). Die Elliptizität Θ definiert sich als:

$$\Theta = \arctan \frac{b}{a} \quad (\text{B.4})$$

wobei a die Länge der großen und b die Länge der kleinen Halbachse der Ellipse bezeichnet. Ersetzt man a und b durch die Extinktionen E_R und E_L , die über das Lambert-Beer'sche

Gesetz mit den Feldstärkevektoren verbunden sind und beachtet man, dass in der Praxis Θ sehr klein ist (\approx mgrad), so erhält man für die gemessene Elliptizität, die dem Circular Dichroismus proportional ist:

$$\Theta_g = 32.98(E_L - E_R) \quad [\text{grad}] \quad (\text{B.5})$$

Um die Elliptizität verschiedener Proteine vergleichen zu können, bezieht man noch die durchleuchtete Schichtdicke d in [cm], die Konzentration c in [mg/ml] und die mittlere Molmasse MRW in [g/mol] der einzelnen Aminosäuren ein. Mit der gemessenen Elliptizität Θ_g in [mgrad] wird die resultierende Elliptizität in dieser Arbeit als

$$[\Theta]_\lambda = \frac{\text{MRW}\Theta_g}{10c \cdot d} \quad \left[\frac{\text{grad} \cdot \text{cm}^2}{\text{dezimol}} \right] \quad (\text{B.6})$$

angegeben.

Für die Circular Dichroismus Messungen wurde ein kommerzielles Gerät (J-815 CD-Spektrometer Fa. Jasco) verwendet, der prinzipielle Aufbau ist schematisch in Abbildung B.4 b) gezeigt. Das Licht einer Xenonlampe wird durch einen Doppelmonochromator, be-

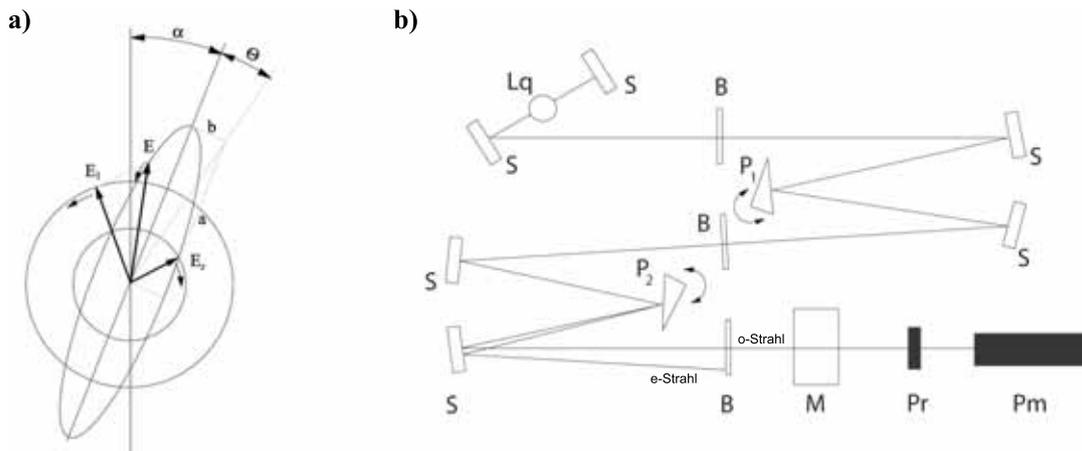


Abbildung B.4: a) Schematische Darstellung elliptisch polarisierten Lichtes (Übernommen aus [155]). b) Schematischer Aufbau des kommerziellen CD-Spektrometers (Fa. Jasco). Die Abkürzungen stehen für: S: Spiegel, B: Blende, P: Prisma, Lq: Lichtquelle, M: Modulator, Pr: Probe, PM: Photomultiplier

stehend aus den drehbaren Kristallprismen P_1 und P_2 und den drei Blenden (B) geschickt, durch welche monochromatisches Licht einer bestimmten Wellenlänge ausgewählt werden kann. Zusätzlich dazu sind die Prismen doppelbrechend, d.h an den Blenden können zusätzlich die extraordinären, vertikal polarisierten Strahlen (e-Strahl) ausgefiltert werden, die horizontal polarisierten ordinären Strahlen (o-Strahl) werden durchgelassen. Man erhält also monochromatisches, linear polarisiertes Licht mit stark reduziertem Streulichtanteil. Dieses Licht tritt durch einen Modulator (M), der es zeitabhängig (Frequenz f) in rechts- oder links-zirkular polarisiertes Licht umwandeln kann. Dies wird durch einen

Quartzkristall erreicht, der durch Piezoelemente mechanisch gedehnt oder gestaucht werden kann, wodurch er entweder als $+\lambda/4$ oder $-\lambda/4$ Plättchen wirkt. Wird nun beim Durchtreten des Lichtes durch eine optisch aktive Probe (Pr) eine der beiden zirkular polarisierten Komponenten stärker absorbiert als die andere, so kann man am Photomultiplier (PM) beobachten, dass die Intensität des ankommenden Lichtes um einen konstanten Wert I_A mit Amplitude $I_R - I_L$ und Frequenz f schwingt. Der Circular Dichroismus ($E_L - E_R$) lässt sich dann anhand von

$$E_L - E_R = \log \left(\frac{I_R}{I_L} \right) \quad (\text{B.7})$$

ermitteln.

Da die CD-Messung keine Absolutwerte für Θ_g liefert, wurde das Gerät zuvor mit d-10-Camphersulfonsäure geeicht. Alle CD-Spektren wurden bei 20° in $200 \mu\text{l}$ PBS Lösung (Fa. Sigma Aldrich pH 7.4) aufgenommen. Für die chemischen Denaturierungsmessungen wurden PBS Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen von GdnHCl durch Verdünnen einer 7.4 M GdnHCl PBS-Lösung gewonnen. Die jeweiligen GdnHCl Konzentrationen wurden refraktometrisch bestimmt. Das zu untersuchende Peptid wurde vor der Messung 12 h bei Raumtemperatur in der Lösung gelassen um vollständige Equilibration zu gewährleisten.

Anhang C

Kraftspektroskopie an Phytochrom

Seit den Anfängen einer mathematischen Behandlung verknoteter Kurven im späten 18ten Jahrhundert, an der unter anderen auch Carl Friedrich Gauß beteiligt war, waren Knoten immer wieder Gegenstand physikalischer Theorien. Erwähnenswert ist dabei die Atomtheorie William Thomsons', die die Vielfalt der chemischen Elemente durch verschiedenartig verknotete, geschlossene Wirbellinien zu erklären versuchte. Wenn sich auch die Wirbelatomtheorie nicht bestätigte, so ergaben sich doch durch Thomsons Untersuchungen tiefere Einsichten auf dem Gebiet der Hydrodynamik. Eine ausführliche Abhandlung über die Geschichte der Knotentheorie ist in [156] zu finden.

Durch die Einsicht, dass auch biologische Polymere Knoten in ihrer Topologie aufweisen können, erhielt die Knotentheorie neue physikalische und biologische Relevanz. Beispielsweise erkannte man, dass zirkulare, doppelsträngige DNA in verschieden stark verknoteten Topoisomeren vorliegen kann, die durch energieunabhängige Enzyme (Typ I Topoisomerasen) oder energieverbrauchende Enzyme (Typ II Topoisomerasen), topologisch verändert werden können [157].

Überraschenderweise fanden sich seit 1994 auch eine wachsende Anzahl an Proteinen, die in ihrer Topologie Knoten aufweisen [158][159]. Möglich wurde dies durch Algorithmen, die aus vorhandenen Strukturdaten die Knotentopologie vorhersagen können [159][160][161][162]. Verknotete Proteinstrukturen werfen viele Fragen auf, wie zum Beispiel nach der physiologischen Relevanz der Knoten [163][164] oder nach dem Faltungspfad. Ensemblestudien an dimerem *Haemophilus influenzae* YibK, einer Methyltransferase mit einem dreier Knoten in der gefalteten Topologie jedes Monomers, zeigen einen sehr komplexen Faltungspfad. Er besteht aus zwei parallelen Faltungspfaden zu strukturell unterschiedlichen Zwischenzuständen, die über einen dritten Zwischenzustand den nativen Dimer bilden können [165][166].

Mit Hilfe einer optischen Pinzette wurde es möglich, mikroskopische Knoten in einzelnen biologischen Systemen, wie einem Aktinfilament [167] oder DNA [168] zu produzieren und mechanischer Kraft auszusetzen. Mit dem AFM wurde versucht, die Bovine Carboanhydratase (CAB), die einen dreier Knoten in ihrer Struktur aufweist, mechanisch zu entfalten [169][170]. Dazu versuchten die Autoren mit Hilfe von Funktionalisierung, einzelne Domänen gezielt an AFM-Spitze und Unterlage zu binden. Die Autoren ver-

muten, dass CAB aufgrund seiner verknoteten Struktur mechanischen Kräften > 2 nN standhalten kann, ohne zu entfalten. Eine große Schwierigkeit bei der Interpretation von AFM-Daten mit der von den Autoren vorgestellten Anbindung ist die Identifikation von einzelnen Molekülen, die in der korrekten Form gebunden haben. Dies wird insbesondere erschwert, wenn das Protein keinen signifikanten „Kraftabdruck“ wie beispielsweise durch eine Entfaltung mit reproduzierbaren Konturlängenzuwächsen liefert. Zusätzlich ist bei einer solchen Herangehensweise die absolute Messung von Konturlängen, die dann für eine Interpretation der Knotengröße nötig wird, immer mit einem größeren Fehler behaftet, als die Bestimmung von Konturlängenzuwächsen in modular aufgebauten Polyproteinen, die sehr genau ermittelt werden können. Dieser Aufbau eignet sich also nicht für eine exakte Bestimmung der Größe festgezogener Knoten.

Ein Beispiel für ein Protein, das in seiner Topologie einen Achterknoten aufweist, ist das Phytochrom des Bakteriums *Deinococcus radiodurans* [171]. Phytochrome sind Photorezeptoren, die unter anderem in Pflanzen, Bakterien, Algen und Pilzen auftreten, wo sie an einer Vielzahl von Signaltransduktionen beteiligt sind. Beispielsweise sind sie verantwortlich für die „Ergrünung“ von Pflanzen oder das intensive Streckungswachstum von im dunkeln kultivierten Keimlingen [172][173][174]. Sie können in zwei konformerer Formen existieren, der P_r -Form und der P_{fr} -Form. Die P_r -Form absorbiert maximal im roten Spektralbereich ($\lambda = 600-700$ nm) und photokonvertiert dabei zur P_{fr} -Form, die bei höheren Wellenlängen (λ : far red = 700-800 nm) absorbiert und dadurch zurück zur P_r -Form wechselt. Die Ursache des Übergangs zwischen P_r und P_{fr} -Form durch Absorption eines Lichtquanten ist der sich in der Chromophor-Bindetasche befindende Farbstoff. Beim *D. radiodurans* Phytochrom, dessen Teilstruktur 2005 aufgeklärt werden konnte [171], ist als Chromophor Biliverdin kovalent, über ein Cystein an Position 24, an das Phytochrom gebunden (siehe Abbildung C.1 a)). Der aufgelöste Teil der Struktur besteht aus den N-terminalen 321

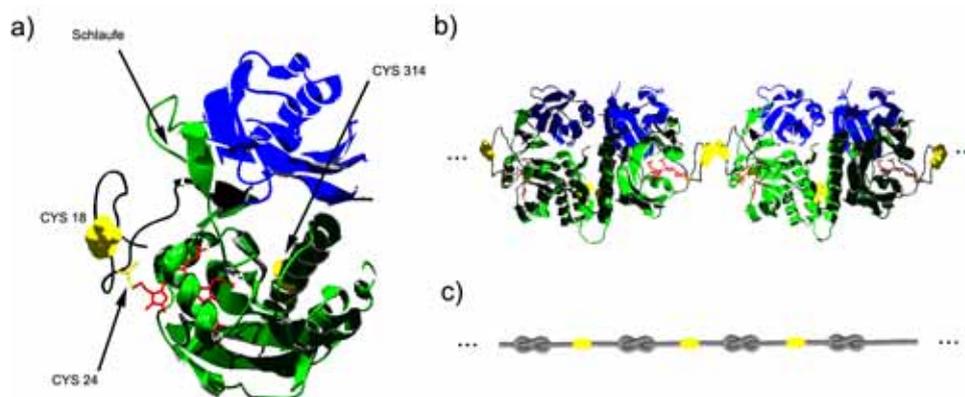


Abbildung C.1: a) Strukturmodell der ersten 321 Aminosäuren des monomeren *Deinococcus radiodurans* Phytochroms. Der PDB Eintrag ist unter „1ZTU“ zu finden. Die zur Polymerbildung eingefügten Cysteine 18 und 314 sind gelb markiert. An Cystein 24 ist der Farbstoff Biliverdin kovalent gebunden. b) Schematische Struktur des polymerisierten Phytochroms. c) Schematisches Polypeptid nach Entfaltung von vier *drCBD*-Domänen

Aminosäuren, die ein stabiles Fragment bilden (*drCBD*), das immer noch ein normales P_r -Absorptionsspektrum zeigt. Die normalerweise weiter C-terminal folgende PHY-Domäne, die zur Stabilisierung der P_{fr} -Form benötigt wird, wurde entfernt. Dies führt zu einem gebleichten P_{fr} -Spektrum [171]. Das N-terminale Ende des Phytochroms besteht aus ca. 30 unstrukturierten Aminosäuren (in Abbildung C.1 a schwarz gezeigt), an die an Position 24 über das Cystein kovalent der Farbstoff Biliverdin gebunden ist. Darauf folgt die blau gezeigte PAS-Domäne (Aminosäuren 38-128), die über 10 nicht aufgelöste Aminosäuren mit der grün eingefärbten GAF-Domäne (Aminosäuren 138-321) verbunden sind. Sequenzanalysen der Phytochromfamilie zeigen, dass diese Motive charakteristisch für Phytochrome sind und in verschiedenen Anordnungen innerhalb der Aminosäuresequenzen auftreten [175]. Die PAS (Per/Arndt/Sim) ähnliche Domäne ist vermutlich für die Signaltransduktion verantwortlich [176], während die GAF-Domäne (cGMP phosphodiesterase/adenylate cyclase/FhlA-Domäne) die Chromophor-Bindetasche bildet [177].

Um für die kraftspektroskopischen Untersuchungen Polymere des *DrCBD* herzustellen, wurden in jedes Monomer zwei Cysteine an den Positionen 18 und 314 eingefügt [178] (siehe Abbildung C.1 a). Die Kristallstruktur der *DrCBD* Proteine zeigte bereits, dass diese als Dimere vorlagen, wobei die C-terminalen Helices um das Cystein 314 die Dimerisationschnittstelle bilden [179]. Durch das Cystein 314 werden die Dimere kovalent verbunden. Über die beiden verbleibenden Cysteine an Position 18 können dann die Dimere in Lösung weiter polymerisieren. Abbildung C.1 b) zeigt beispielhaft ein Polymer aus vier monomeren *DrCBD* Proteinen.

Ein besonderes Merkmal der *DrCBD*-Struktur ist, dass es in seiner gefalteten Topologie einen Achterknoten aufweist. Geformt wird dieser dadurch, dass sich die ca. 30 unstrukturierten N-terminalen Aminosäuren durch eine Schlaufe (Aminosäuren 225-257) innerhalb der GAF-Domäne fädeln. Das an Position 18 eingefügte Cystein befindet sich also an einer Position, die bereits durch die Schlaufe gezogen wurde. Das zweite Cystein befindet sich an Position 314 sehr nahe am C-Terminus, so dass sich, bei einer Entfaltung der Struktur durch ein kraftinduziertes Angreifen an diesen Positionen, der Achterknoten nicht entwinden kann. In Abbildung C.1 c) ist schematisch das Polypeptid nach vier monomeren *DrCBD* Entfaltungen gezeigt. Ein entfaltetes Polypeptid, das noch mehrere Achterknoten beinhaltet, muss im Gegensatz zu Polypeptiden ohne Knoten eine kürzere Konturlänge aufweisen. Die Frage, ob dieser Längenunterschied mit dem Kraftmikroskop aufgelöst werden kann, wird im Folgenden beantwortet.

In Abbildung C.2 a) ist eine Kraft-Abstandskurve eines *DrCBD*-Polymers mit gebundenem Chromophor (Holo) gezeigt. Die vier Entfaltungsereignisse zeigen, dass in dem Polymer mindestens vier monomere *DrCBD*-Domänen enthalten waren. Die blauen Kurven sind theoretische WLC-Kraft-Abstandskurven, die an die Daten angepasst wurden. Als Fitparameter wurde die Konturlänge $L_{18,314}^{Holo}$ gewählt, die Persistenzlänge wurde mit 0.5 nm konstant gelassen. Die gemessenen Konturlängenzuwächse von insgesamt 47 einzelnen Domänenentfaltungen $\Delta L_{18,314}^{Holo}$ sind in Abbildung C.2 b) gezeigt. Der durchschnittliche Konturlängenzuwachs liegt bei 98.1 nm.

Auf die gleiche Weise wurden *DrCBD*-Polymere kraftspektroskopisch untersucht, die kein Chromophor gebunden hatten (Apo)(Abbildung C.2 c). Der mittlere Kon-

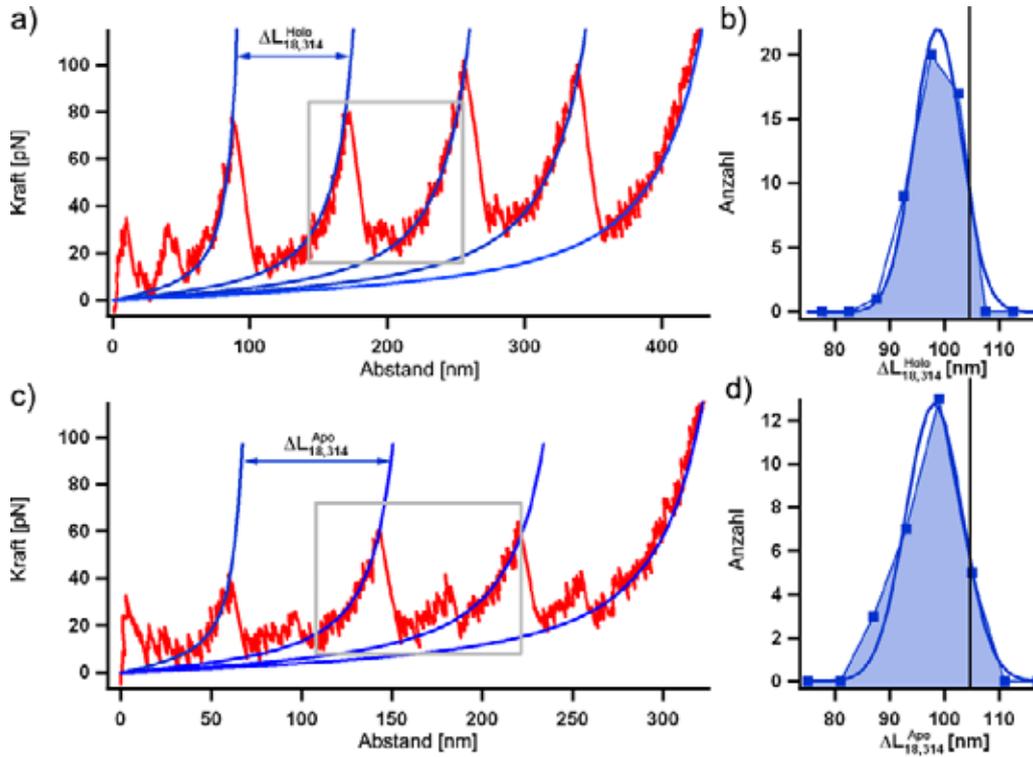


Abbildung C.2: a) Kraft-Abstandskurve eines *DrCBD*-Polymers mit gebundenem Chromophor. b) Histogramm der Längenzuwächse einer vollständigen *DrCBD*-Monomer Entfaltung $\Delta L_{18,314}^{Holo}$. Der mittlere Konturlängenzuwachs beträgt $L_{18,314}^{Holo} = 98.1 \pm 1.0$ nm c) Kraft-Abstandskurve eines *DrCBD*-Polymers ohne gebundenem Chromophor e) Histogramm der Längenzuwächse $\Delta L_{18,314}^{Apo}$. Der mittlere Konturlängenzuwachs beträgt $L_{18,314}^{Apo} = 97.5 \pm 1.8$ nm.

turlängenzuwachs $\Delta L_{18,314}^{Apo}$, der beim Entfalten von insgesamt 28 einzelnen Domänen auftritt, unterscheidet sich mit 97.5 nm nicht vom Konturlängenzuwachs der Domänen, die ein Chromophor gebunden haben.

Kennt man die Konturlänge einer einzelnen gestreckten Aminosäure d_{aa} und die Anzahl der Aminosäuren $j - i$, die zwischen den Angriffspunkten j und i eines nicht verknoteten Polypeptides liegen, so lässt sich die Konturlänge des gesamten gedehnten Polypeptides durch $(j - i)d_{aa}$ berechnen. Bei einer vollständigen Entfaltung wird aber der gemessene Konturlängenzuwachs $\Delta L_{i,j}$ um den Abstand $d_{i,j}$, den die Angriffspunkte in der gefalteten Struktur zueinander haben, kleiner sein [18].

$$\Delta L_{i,j} = (j - i)d_{aa} - d_{i,j} \quad (C.1)$$

Um den Parameter d_{aa} zu bestimmen, wurden mit dem auch für diese Messungen verwendeten Kraftmikroskop zwei Proteine mit bekannter Struktur entfaltet. Der mittlere Konturlängenzuwachs des aktinverlinkenden Proteins *Dictyostelium discoideum* Filamin (ddFLN1-5) zusammen mit der aufgelösten Struktur lieferte einen Wert von $d_{aa} =$

0.365 ± 0.002 nm. Dieser Wert wurde durch Messungen an Polypeptiden des menschlichen Herzmuskeltitins Ig27 bestätigt. Zusätzlich konnten mit diesem d_{aa} Wert durch Entfalten von GFP-Polymeren mit verschiedenen Kraftangriffspunkten die Positionen dreier ausgewählter Aminosäuren in der GFP Struktur mit Angstrom Genauigkeit reproduziert werden [18].

Aus der Struktur der *DrCBD*-Domäne ergibt sich als Abstand, den die gewählten Kraftangriffspunkte im gefalteten Zustand haben, $d_{18,314} = 3.9$ nm. Damit lässt sich als Konturlängenzuwachs für die *DrCBD*-Domäne $\Delta L_{18,314}^{Holo} = 104.1 \pm 0.6$ nm vorhersagen (in Abbildung C.2 b) und d) als schwarze Linie gezeigt).

Der tatsächlich gemessene Konturlängenzuwachs der Phytochrome, mit und ohne gebundenes Chromophor, ist also um 6.2 nm kleiner, als der theoretisch für die Entfaltung eines Proteins ohne Knoten in seiner Topologie vorhergesagte. Durch den festgezogenen Achterknoten erscheint also der Konturlängenzuwachs um die Länge von 17 ± 2 Aminosäuren verkürzt.

Die Kraft-Abstandskurven der gemessenen *DrCBD*-Polymere, mit und ohne gebundenes Chromophor zeigen zusätzlich nach dem ersten Entfaltungsereignis noch das Entfaltungsereignis eines Zwischenzustands (eingerahmt in Abbildung C.2 a) und c) und vergrößert dargestellt in Abbildung C.3 a) und e). Durch Anfitten der theoretischen WLC-Kraft-Abstandskurven (grün in Abbildung C.3 a) und e) lassen sich die Konturlängenzuwächse zu $\Delta L_{GAF}^{Holo} = 68.0$ nm und $\Delta L_{GAF}^{Apo} = 65.3$ nm bestimmen. Die Histogramme sind in Abbildung C.3 b) und f) zu sehen. Vernachlässigt man in Formel C.1 den Anfangsabstand der Kraftangriffspunkte $d_{18,314}$ und den Einfluss des noch nicht ganz zugezogenen Knotens, so ist der gemessene, mittlere Konturlängenzuwachs verbunden mit dem gleichzeitigen Entfalten von etwa 180 Aminosäuren. Die GAF-Domäne besteht aus 186 Aminosäuren, die kleinere PAS-Domäne dagegen nur aus 90. Da beide Domänen unabhängig voneinander in verschiedenen Phytochromen auftreten und die GAF-Domäne mit der PAS-Domäne nur wenige elektrostatische und hydrophobe Interaktionen zeigt [171], lässt sich vermuten, dass der zuerst entfaltende Teil die Chromophorbindende GAF-Domäne ist.

Die kraftspektroskopischen Messungen an Phytochrom mit gebundenem Chromophor und ohne gebundenen Chromophor können diese Vermutung bestätigen. Während die Konturlängenzuwächse der jeweiligen Kraftkurven (Abbildung C.2 b) und d) und Abbildung C.3 b) und f)) keine Unterschiede zeigen, hängt die mittlere Entfaltungskraft des ersten Entfaltungsereignisses (rote Kreise in Abbildung C.3 a) und e)) davon ab, ob ein Chromophor gebunden ist oder nicht. Das Histogramm der initialen Entfaltungskräfte für Phytochrome mit gebundenem Chromophor F_{GAF}^{Holo} ist in Abbildung C.3 c) gezeigt. Die Verteilung ist sehr breit und hat einen Mittelwert bei 73.3 ± 6.6 pN. Im Gegensatz dazu findet das erste Entfaltungsereignis bei Phytochrom ohne gebundenes Chromophor bei kleineren Kräften statt. Das Histogramm dieser Entfaltungskräfte (Abbildung C.3 g)) zeigt eine mittlere Entfaltungskraft F_{GAF}^{Apo} bei 47.1 ± 3.2 pN und ist zudem schmaler. Die Kraft, die zum Entfalten der ersten Teilstruktur benötigt wird, hängt also davon ab, ob der Farbstoff gebunden ist oder nicht. Die Verbreiterung des Krafthistogramms in Abbildung C.3 c) kann dabei dadurch erklärt werden, dass nicht alle *DrCBD* Monomere ein gebundenes Chromophor aufweisen. Das gebundene Biliverdin zeigt viele stabilisierende

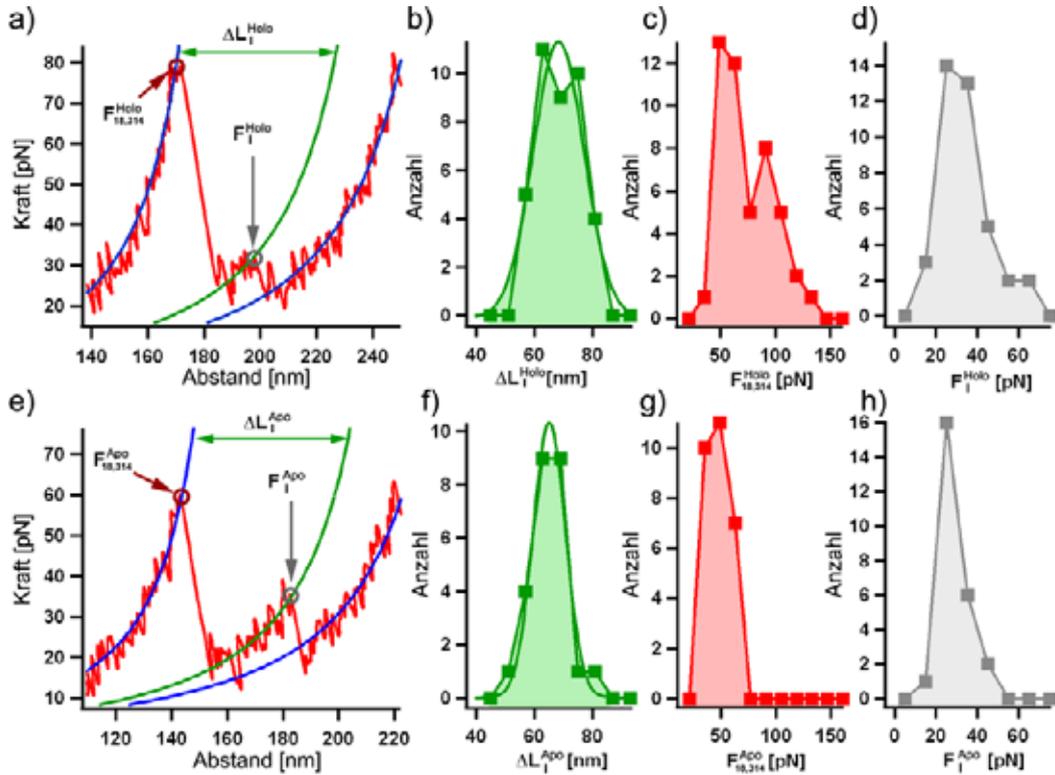


Abbildung C.3: a) Vergrößerung eines *DrCBD*-Entfaltungsereignisses mit gebundenem Chromophor. In Abbildung C.2 a) ist der hier gezeigte Bereich als grauer Kasten gekennzeichnet. b) Histogramm der Konturlängenzuwächse ΔL_{GAF}^{Holo} . Der mittlere Konturlängenzuwachs beträgt $\Delta L_{GAF}^{Holo} = 68.0 \pm 2.2$ nm. c) Histogramm der Entfaltungskräfte des ersten Entfaltungsereignisses F_{GAF}^{Holo} . Der Mittelwert liegt bei 73.3 ± 6.6 pN. d) Histogramm der Entfaltungskräfte des stabilen Zwischenzustands F_{PAS}^{Holo} . Der Mittelwert liegt bei 32.8 ± 4 pN. e) Vergrößerung der Kraft-Abstandskurve eines *DrCBD*-Polymers ohne gebundenen Chromophor in Abbildung C.2 c) ist der vergrößerte Bereich grau eingerahmt. f) Histogramm der Längenzuwächse ΔL_{GAF}^{Apo} . Der mittlere Konturlängenzuwachs beträgt $\Delta L_{GAF}^{Apo} = 65.3 \pm 2.6$ nm. g) Histogramm der Entfaltungskräfte, die zum Entfalten der ersten Teilstruktur des Apo-Phytochroms benötigt werden. Die mittlere Entfaltungskraft liegt bei 47.1 ± 3.2 pN. h) Histogramm der Entfaltungskräfte, die zum Aufbrechen des Zwischenzustands benötigt werden. Die mittlere Entfaltungskraft liegt bei $27.7.1 \pm 2.8$ pN.

Interaktionen mit der Chromophor-Bindetasche innerhalb der GAF-Domäne [171] und hat keinerlei Wechselwirkung mit der distalen PAS-Domäne. Dies zeigt, dass die zuerst entfaltende Teilstruktur die Chromophorbindetasche enthalten muss. Hinzu kommt, dass die Entfaltungskräfte der stabilen Zwischenzustände, mit oder ohne gebundenes Chromophor, keine Unterschiede zeigen (Abbildungen C.3 d) und h)). Die Entfaltungskraft für den stabilen Zwischenzustand hängt also nicht davon ab, ob ein Chromophor gebunden ist oder nicht, so wie man es für die PAS-Domäne erwartet, die wenig Wechselwirkung mit der GAF-Domäne und keine Wechselwirkung mit dem Chromophor zeigt.

Eine Vorhersage der exakten Struktur des stabilen Zwischenzustands wird dadurch erschwert, dass, wenn nur ein Teil des Proteins entfaltet ist, sich der Knoten noch nicht vollständig gebildet und festgezogen haben kann. Da die strukturlosen 33 Aminosäuren des N-Terminus nur stabilisierende Wechselwirkungen mit der GAF-Domäne zeigen, kann man vermuten, dass diese gleichzeitig mit der GAF-Domäne entfalten. Vernachlässigen wir das Konturlängenzuwachsdefizit, welches durch den noch nicht ganz festgezogenen Knoten entstehen könnte und nehmen an, dass die PAS-Domäne zwischen den Aminosäuren Gly33 und Glu130 den stabilen Zwischenzustand darstellt, erwarten wir mit Formel C.1 eine Obergrenze des Längenzuwachses von 71.6 nm. Unter Berücksichtigung des Konturlängenzuwachsdefizites von 6.2 nm für einen fertig ausgebildeten, festgezogenen Achterknoten ergibt sich als maximale untere Grenze des erwarteten Längenzuwachses 65.4 nm. Der beobachtete Längenzuwachs von 66.7 nm liegt innerhalb dieser Grenzen und spricht für ein gleichzeitiges Entfalten des N-terminalen Endes mit der GAF-Domäne. Als Beweis darf dies allerdings nicht gelten, da die genaue Struktur des Knotens im Zwischenzustand nicht bekannt ist. Die erwartete untere Grenze des Konturlängenzuwachses kann also mit der Annahme, dass der Knoten beliebige Größen im Zwischenzustand einnehmen kann, beliebig nach unten verschoben werden. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass der Zwischenzustand aus einer größeren stabilen Teilstruktur als nur der PAS-Domäne besteht.

Die hier durchgeführten Messungen zeigen, dass verknotete Proteinstrukturen, verglichen mit nicht verknoteten Proteinen, bei niedrigen Kräften entfaltet werden können. Dies widerspricht direkt den Vermutungen von Ikai *et al.* [169][170], die annahmen, dass eine verknotete Struktur allgemein zu hohen Entfaltungskräften führt.

Der Entfaltungspfad zeigt, dass die PAS-Domäne einen stabilen Zwischenzustand darstellt. Dies lässt umgekehrt die Vermutung zu, dass sich diese Domäne bei der Faltung zuerst ausbildet. Im Anschluss müsste sich die GAF-Domäne formen, wobei als letzter Schritt das unstrukturierte N-terminale Ende durch die Schlaufe der GAF-Domäne gefädelt werden müsste. Die Kraftspektroskopie ist in der Lage, damit verbundene Fragen zu beantworten. So wären beispielsweise Vergleiche der Faltungsraten verknoteter Proteine von Interesse, die in ihrem entfalteten Zustand bereits den Knoten aufweisen oder nicht.

Nachwort

In diesem letzten Abschnitt möchte ich mich noch bei den Menschen bedanken, die diese Arbeit unterstützt und viel dazu beigetragen haben.

In erster Linie gilt dies natürlich für meinen Doktorvater Prof. Dr. Matthias Rief, der die grundlegende Idee zu diesem Projekt hatte und auch im Verlauf der Arbeit mit seinem Wissen und seiner Weitsicht immer wieder richtungsweisende Ratschläge beisteuerte.

Prof. Dr. Manfred Schliwa, Dr. Günther Woelke, Prof. Dr. Erich Sackmann und Prof. Dr. Hermann E. Gaub möchte ich für die Zeit danken, die sie sich genommen haben, um über meine Arbeit zu diskutieren und für die wertvollen Ideen, die sie zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Dr. Michael Bärmann danke ich für die schönen Stunden, in denen wir die Übungen der Biophysikvorlesung vorbereitet haben. Ich habe sehr viel gelernt.

Dank gilt auch Prof. Dr. Katrina Forest, Dr. Joachim Dzubiella und Dr. David Anstrom, mit denen es eine Freude ist zusammenzuarbeiten.

Auch möchte ich mich bei Elisabeth Wasner für die Messungen am *N. crassa* Kinesin während ihrer Diplomarbeit bedanken und bei Elisabeth Mey, Dennis von Berlepsch und Johanna Panitz für ihre tatkräftige Unterstützung während ihrer Praktikantenzeit.

Vielen Dank für die technische Unterstützung von Monika Rusp, Claudia Antrecht, Gabi Chmel und Karin Vogt.

Und natürlich herzlichen Dank an alle Kollegen und Freunde, die Ideen und Spaß beigesteuert haben und mich immer wieder in den schlimmsten Durststrecken unterstützt haben: Dr. Hendrik Dietz, Christof Gebhard, Morten Bertz, Dr. Johann Jaud, Dr. Stefan Kufer, Franz Weinert, Melanie Reisinger, Moritz Mickler, Manuel Krinner, Felix Berkemeier Dr. Rainer Tharmann, Michael Schlierf, Sebastian Rammensee und alle anderen Kollegen am E22, die immer für einen Kaffee zu haben waren.

Für die Unterstützung bei der Arbeit und über die Arbeit hinaus vielen Dank an meine Eltern und Brigitte.

Literaturverzeichnis

- [1] A. N. Lupas and M. Gruber. The structure of alpha-helical coiled coils. *Adv Protein Chem*, 70:37, 2005.
- [2] J. M. Mason and K. M. Arndt. Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *ChembioChem*, 5(2):170, 2004.
- [3] 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 U S A*, 37(4):205, 1951.
- [4] F. Crick. The packing of α -helices: simple coiled-coils. *Acta Crystallogr*, 6:689, 1953.
- [5] G. N. Phillips Jr. What is the pitch of the alpha-helical coiled coil? *Proteins*, 14(4):425, 1992.
- [6] I. Tinoco Jr. and C. Bustamante. The effect of force on thermodynamics and kinetics of single molecule reactions. *Biophys Chem*, 101:513, 2002.
- [7] J. Howard. *Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton*, Sinauer Associates Inc, 2001.
- [8] T. Fließbach. *Statistische Physik, Lehrbuch zur theoretischen Physik IV*, Spektrum, 2006.
- [9] A. Borgia, P. M. Williams, and J. Clarke. Single-molecule studies of protein folding. *Annu Rev Biochem*, 77(1):101, 2008.
- [10] H. J. Kreuzer and S. H. Payne. Stretching a macromolecule in an atomic force microscope: Statistical mechanical analysis. *Phys Rev E*, 63(2):021906, 2001.
- [11] P. J. Flory. *Statistical Mechanics of Chain Molecules*, Hanser, 1988.
- [12] 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. *Biophys J*, 76(1):409, 1999.
- [13] C. Bustamante, J. F. Marko, E. D. Siggia, and S. Smith. Entropic elasticity of lambda-phage DNA. *Science*, 265(5178):1599, 1994.

- [14] T. Hugel, M. Rief, M. Seitz, H. E. Gaub, and R. R. Netz. Highly stretched single polymers: Atomic-force-microscope experiments versus ab-initio theory. *Phys Rev Lett*, 94(4):048301, 2005.
- [15] M. Rief, H. Clausen-Schaumann, and H. E. Gaub. Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules. *Nat Struct Biol*, 6(4):346, 1999.
- [16] B. Essevaz-Roulet, U. Bockelmann, and F. Heslot. Mechanical separation of the complementary strands of DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(22):11935, 1997.
- [17] U. Bockelmann, B. Essevaz-Roulet, and F. Heslot. Dna strand separation studied by single molecule force measurements. *Phys Rev E*, 58(2):2386, 1998.
- [18] H. Dietz and M. Rief. Protein structure by mechanical triangulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(5):1244, 2006.
- [19] I. Schwaiger, C. Sattler, D. R. Hostetter, and M. Rief. The myosin coiled-coil is a truly elastic protein structure. *Nat Mater*, 1(4):232, 2002.
- [20] Mai Suan Li. Secondary structure, mechanical stability, and location of transition state of proteins. *Biophys J*, 93(8):2644, 2007.
- [21] E Evans and K Ritchie. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys J*, 72(4):1541, 1997.
- [22] B. Fierz, H. Satzger, C. Root, P. Gilch, W. Zinth, and T. Kiefhaber. Loop formation in unfolded polypeptide chains on the picoseconds to microseconds time scale. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(7):2163, 2007.
- [23] G. I. Bell. Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science*, 200(4342):618, 1978.
- [24] M. Rief. *Kräfte in der molekularen Erkennung*, Diplomarbeit am Department für Physik der Technischen Universität München, 1995.
- [25] O. K. Dudko, G. Hummer, and A. Szabo. Intrinsic rates and activation free energies from single-molecule pulling experiments. *Phys Rev Lett*, 96(10):108101, 2006.
- [26] M. Rief. *Kraftspektroskopie an einzelnen Molekülen*, Dissertation an der Fakultät für Physik der Ludwig-Maximilians-Universität München, 1997.
- [27] Michael Schlierf, Felix Berkemeier, and Matthias Rief. Direct observation of active protein folding using lock-in force spectroscopy. *Biophys J*, 93(11):3989, 2007.
- [28] H. Dietz. *Mechanik des Grün Fluoreszierenden Proteins*, Diplomarbeit an der Ludwig Maximilians Universität, 2004.

- [29] C. Bustamante, J. Liphardt, and F. Ritort. The nonequilibrium thermodynamics of small systems. *Physics Today*, 58(7):43, 2005.
- [30] D. J. Evans and D. J. Searles. The fluctuation theorem. *Adv Phys*, 51(7):1529, 2002.
- [31] G. Gallavotti and E. G. D. Cohen. Dynamical ensembles in stationary states. *Journal of Statistical Physics*, 80(5-6):931, 1995.
- [32] Gavin E. Crooks. Entropy production fluctuation theorem and the nonequilibrium work relation for free energy differences. *Phys Rev E*, 60(3):2721, 1999.
- [33] C. Jarzynski. Nonequilibrium equality for free energy differences. *Phys Rev Lett*, 78(14):2690, 1997.
- [34] Denis J. Evans, E. G. D. Cohen, and G. P. Morriss. Probability of second law violations in shearing steady states. *Phys Rev Lett.*, 71(15):2401, 1993.
- [35] Herbert B. Callen and Theodore A. Welton. Irreversibility and generalized noise. *Phys Rev*, 83(1):34, 1951.
- [36] J. Hermans. Simple analysis of noise and hysteresis in (slow-growth) free energy simulations. *J Phys Chem*, 95:9029, 1991.
- [37] J. Gore, F. Ritort, and C. Bustamante. Bias and error in estimates of equilibrium free-energy differences from nonequilibrium measurements. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(22):12564, 2003.
- [38] Ciliberto, S. and Laroche, C. . An experimental test of the gallavotti-cohen fluctuation theorem. *Le Journal de Physique IV*, 8(PR6):215, 1998.
- [39] G. M. Wang, E. M. Sevick, Emil Mittag, Debra J. Searles, and Denis J. Evans. Experimental demonstration of violations of the second law of thermodynamics for small systems and short time scales. *Phys Rev Lett*, 89(5):050601, 2002.
- [40] J. Liphardt, S. Dumont, S. B. Smith, I. Jr. Tinoco, and C. Bustamante. Equilibrium information from nonequilibrium measurements in an experimental test of jarzynski's equality. *Science*, 296(5574):1832, 2002.
- [41] D. Collin, F. Ritort, C. Jarzynski, S. B. Smith, I. Tinoco Jr., and C. Bustamante. Verification of the Crooks fluctuation theorem and recovery of RNA folding free energies. *Nature*, 437(7056):231, 2005.
- [42] T. Bornschlöggl and M. Rief. Single molecule unzipping of coiled coils: Sequence resolved stability profiles. *Phys Rev Lett*, 96(11):118102, 2006.
- [43] T. Bornschlöggl and M. Rief. Single-molecule dynamics of mechanical coiled-coil unzipping. *Langmuir*, 24(4):1338, 2008.

- [44] A. G. Hinnebusch. Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol*, 59(1):407, 2005.
- [45] E. K. O'Shea, J. D. Klemm, P. S. Kim, and T. Alber. X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science*, 254(5031):539, 1991.
- [46] T. E. Ellenberger, C. J. Brandl, K. Struhl, and S. C. Harris. The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha-helices: Crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell*, 71(7):1223, 1992.
- [47] J. A. Zitzewitz, B. Ibarra-Molero, D. R. Fishel, K. L. Terry, and C. R. Matthews. Preformed secondary structure drives the association reaction of GCN4-p1, a model coiled-coil system. *J Mol Biol*, 296(4):1105, 2000.
- [48] M. Grandbois, M. Beyer, M. Rief, H. Clausen-Schaumann, and H. E. Gaub. How strong is a covalent bond? *Science*, 283(5408):1727, 1999.
- [49] G. Binnig, C. F. Quate, and Ch. Gerber. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*, 56(9):930, 1986.
- [50] E. L. Florin, V. T. Moy, and H. E. Gaub. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science*, 264(5157):415, 1994.
- [51] M. Rief, F. Oesterhelt, B. Heymann, and H. E. Gaub. Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by atomic force microscopy. *Science*, 275(5304):1295, 1997.
- [52] M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J. M. Fernandez, and H. E. Gaub. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science*, 276(5315):1109, 1997.
- [53] Schwaiger I., Kardinal A., Schleicher M., Noegel A. A., and Rief M. A mechanical unfolding intermediate in an actin-crosslinking protein. *Nat Struct Mol Biol*, 11(1):81, 2004.
- [54] H. Dietz, F. Berkemeier, M. Bertz, and M. Rief. Anisotropic deformation response of single protein molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(34):12724, 2006.
- [55] G. M. Popowicz, R. Müller, A. A. Noegel, M. Schleicher, R. Huber, and T. A. Holak. Molecular structure of the rod domain of dictyostelium filamin. *J Mol Biol*, 342(5):1637, 2004.
- [56] Thomas Bornschlögl. *Kraftspektroskopische Untersuchungen an coiled-coil Strukturen*, Diplomarbeit an der Ludwig Maximilians Universität, 2004.
- [57] U. Bockelmann, B. Essevaz-Roulet, and F. Heslot. Molecular stick-slip motion revealed by opening DNA with piconewton forces. *Phys Rev Lett*, 79(22):4489, 1997.

- [58] B. Tripet, K. Wagschal, P. Lavigne, C. T. Mant, and R. S. Hodges. Effects of side-chain characteristics on stability and oligomerization state of a de novo-designed model coiled-coil: 20 amino acid substitutions in position d. *J Mol Biol.*, 300(2):377, 2000.
- [59] K. Wagschal, B. Tripet, P. Lavigne, C. Mant, and R. S. Hodges. The role of position a in determining the stability and oligomerization state of alpha-helical coiled coils: 20 amino acid stability coefficients in the hydrophobic core of proteins. *Protein Sci*, 8(11):2312, 1999.
- [60] A. Acharya, V. Rishi, and C. Vinson. Stability of 100 homo and heterotypic coiled-coil a-a' pairs for ten amino acids (A, L, I, V, N, K, S, T, E, and R). *Biochemistry*, 45(38):11324, 2006.
- [61] B. Ibarra-Molero, J. A. Zitzewitz, and C. R. Matthews. Salt-bridges can stabilize but do not accelerate the folding of the homodimeric coiled-coil peptide GCN4-p1. *J Mol Biol*, 336(5):989, 2004.
- [62] T. Alber. Structure of the leucine zipper. *Curr Opin Genet Dev*, 2(2):205, 1992.
- [63] 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):526, 1959.
- [64] R. E. Thompson and E. D. Siggia. Physical limits on the mechanical measurement of the secondary structure of bio-molecules. *Europhys Lett*, 31(5-6):335, 1995.
- [65] U. Bockelmann, Ph. Thomen, B. Essevez-Roulet, V. Viasnoff, and F. Heslot. Unzipping DNA with optical tweezers: High sequence sensitivity and force flips. *Biophys J*, 82(3):1537, 2002.
- [66] H. Dietz and M. Rief. Elastic bond network model for protein unfolding mechanics. *Phys Rev Lett*, 100(9):098101, 2008.
- [67] R. B. Best, E. Paci, G. Hummer, and O. K. Dudko. Pulling direction as a reaction coordinate for the mechanical unfolding of single molecules. *J Phys Chem B*, 112(19):5968, 2008.
- [68] H. Dietz, T. Bornschlöggl, R. Heym, F. König, and M. Rief. Programming protein self assembly with coiled coils. *New J Phys*, 9:424, 2007.
- [69] J. Y. Su, R. S. Hodges, and C. M. Kay. Effect of chain length on the formation and stability of synthetic alpha-helical coiled coils. *Biochemistry*, 33(51):15501, 1994.
- [70] M. Schlierf. *Einzelmolekülmechanik der Faltung und Entfaltung von Proteinen*, Dissertation an der Technischen Universität München, 2008.

- [71] V. L. Morton, C. T. Friel, L. R. Allen, E. Paci, and S. E. Radford. The effect of increasing the stability of non-native interactions on the folding landscape of the bacterial immunity protein Im9. *J Mol Biol*, 371(2):554, 2007.
- [72] R.B. Best and G. Hummer. Protein folding kinetics under force from molecular simulation. *J Am Chem Soc*, 130(12):3706, 2008.
- [73] A. F. Oberhauser and M. Carrion-Vazquez. Mechanical biochemistry of proteins one molecule at a time. *J Biol Chem*, 283(11):6617, 2008.
- [74] W. Liu, Vedrana Montana, Vladimir Parpura, and U. Mohideen. Comparative energy measurements in single molecule interactions. *Biophys J*, 95(1):419, 2008.
- [75] Johannes Preiner, Harald Janovjak, Christian Rankl, Helene Knaus, David A. Cisneros, Alexej Kedrov, Ferry Kienberger, Daniel J. Muller, and Peter Hinterdorfer. Free energy of membrane protein unfolding derived from single-molecule force measurements. *Biophys J*, 93(3):930, 2007.
- [76] Nolan C. Harris, Yang Song, and Ching-Hwa Kiang. Experimental free energy surface reconstruction from single-molecule force spectroscopy using jarzynski's equality. *Phys Rev Lett*, 99(6):068101, 2007.
- [77] L. B. Moran, J. P. Schneider, A. Kentsis, G. A. Reddy, and T. R. Sosnick. Transition state heterogeneity in GCN4 coiled coil folding studied by using multisite mutations and crosslinking. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(19):10699, 1999.
- [78] J. K. Myers and T. G. Oas. Reinterpretation of GCN4-p1 folding kinetics: partial helix formation precedes dimerization in coiled coil folding. *J Mol Biol*, 289(2):205, 1999.
- [79] F. C. Simmel. Three-dimensional nanoconstruction with DNA. *Angew Chem Int Ed Engl*, 47(32):5884, 2008.
- [80] L. Wasner. *Kraftspektroskopische Untersuchungen an Coiled-Coil-Strukturen von Motorproteinen*, Diplomarbeit an der Technischen Universität München, 2008.
- [81] H. C. Berg and R. A. Anderson. Bacteria swim by rotating their flagellar filaments. *Nature*, 245(5425):380, 1973.
- [82] M. Silverman and M. Simon. Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility. *Nature*, 249(452):73, 1974.
- [83] H. C. Berg. The rotary motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem*, 72:19, 2003.
- [84] H. E. Huxley. The mechanism of muscular contraction. *Science*, 164(886):1356, 1969.
- [85] A. F. Huxley and R. M. Simmons. Proposed mechanisms of force generation in striated muscle. *Nature*, 233(5321):533, 1971.

- [86] M. Schliewa and G. Woehlke. Molecular motors. *Nature*, 422(6933):759, 2003.
- [87] J. A. Spudich. How molecular motors work. *Nature*, 372(6506):515, 1994.
- [88] R. A. Cross. Molecular motors: Walking talking heads. *Curr Biol*, 9(22):R854, 1999.
- [89] R.J. Lye, M.E. Porter, J.M. Scholey, and J.R. McIntosh. Identification of a microtubule-based cytoplasmic motor in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 51(2):309, 1987.
- [90] B. J. Schnapp, R. D. Vale, M. P. Sheetz, and T. S. Reese. Single microtubules from squid axoplasm support bidirectional movement of organelles. *Cell*, 40(2):455, 1985.
- [91] S. T. Brady. A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor. *Nature*, 317(6032):73, 1985.
- [92] E. M. Dagenbach and S. A. Endow. A new kinesin tree. *J Cell Sci*, 117(1):3, 2004.
- [93] T. Hodge and M. J. T. V. Cope. A myosin family tree. *J Cell Sci*, 113(19):3353, 1999.
- [94] B. Wickstead and K. Gull. Dyneins across eukaryotes: A comparative genomic analysis. *Traffic*, 8(12):1708, 2007.
- [95] R. D. Vale and R. A. Milligan. The way things move: Looking under the hood of molecular motor proteins. *Science*, 288(5463):88, 2000.
- [96] Y. Okada and N. Hirokawa. A processive single-headed motor: Kinesin superfamily protein KIF1A. *Science*, 283(5405):1152, 1999.
- [97] H. Sakakibara, H. Kojima, Y. Sakai, E. Katayama, and K. Oiwa. Inner-arm dynein c of chlamydomonas flagella is a single-headed processive motor. *Nature*, 400(6744):586, 1999.
- [98] C. J. Lawrence, R. K. Dawe, K. R. Christie, D. W. Cleveland, S. C. Dawson, S. A. Endow, L. S. B. Goldstein, H. V. Goodson, N. Hirokawa, J. Howard, R. L. Malmberg, J. R. McIntosh, H. Miki, T. J. Mitchison, Y. Okada, A. S. N. Reddy, W. M. Saxton, M. Schliwa, J. M. Scholey, R. D. Vale, C. E. Walczak, and L. Wordeman. A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol*, 167(1):19, 2004.
- [99] L. S. B. Goldstein and A. V. Philp. The road less traveled: Emerging principles of kinesin motor utilization. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15(1):141, 1999.
- [100] A. Yildiz, M. Tomishige, R. D. Vale, and P. R. Selvin. Kinesin walks hand-over-hand. *Science*, 303(5658):676, 2004.

- [101] M Tomishige and R. D. Vale. Controlling kinesin by reversible disulfide cross-linking. identifying the motility-producing conformational change. *J Cell Biol*, 151(5):1081, 2000.
- [102] C. M. Coppin, D. W. Pierce, L. Hsu, and R. D. Vale. The load dependence of kinesin's mechanical cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(16):8539, 1997.
- [103] S. Sack, J. Müller, A. Marx, M. Thormählen, E. M. Mandelkow, S.T. Brady, and E. Mandelkow. X-ray structure of motor and neck domains from rat brain kinesin. *Biochemistry*, 36(51):16155, 1997.
- [104] A. Lupas, M. Van Dyke, and J. Stock. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*, 252(5009):1162, 1991.
- [105] J. M. Scholey, J. Heuser, J. T. Yang, and L. S. B. Goldstein. Identification of globular mechanochemical heads of kinesin. *Nature*, 338(6213):355, 1989.
- [106] T. G. Huang, J. Suhan, and D. D. Hackney. Drosophila kinesin motor domain extending to amino acid position 392 is dimeric when expressed in Escherichia coli. *J Biol Chem*, 269(23):16502, 1994.
- [107] M. de Cuevas, T. Tao, and L. S. Goldstein. Evidence that the stalk of Drosophila kinesin heavy chain is an alpha-helical coiled coil. *J Cell Biol*, 116(4):957, 1992.
- [108] B. Berger, D. B. Wilson, E. Wolf, T. Tonchev, M. Milla, and P. S. Kim. Predicting coiled coils by use of pairwise residue correlations. *Proc Nat Acad Sci USA*, 92(18):8259, 1995.
- [109] C. Seeberger, E. Mandelkow, and B. Meyer. Conformational preferences of a synthetic 30mer peptide from the interface between the neck and stalk regions of kinesin. *Biochemistry*, 39(41):12558, 2000.
- [110] E. P. Sablin, R. B. Case, S. C. Dai, C. L. Hart, A. Ruby, R. D. Vale, and R. J. Fletterick. Direction determination in the minus-end-directed kinesin motor ncd. *Nature*, 395(6704):813, 1998.
- [111] S. A. Endow. Determinants of molecular motor directionality. *Nature Cell Biol*, 1(6):E163, 1999.
- [112] S. A. Endow and H. Higuchi. A mutant of the motor protein kinesin that moves in both directions on microtubules. *Nature*, 406(6798):913, 2000.
- [113] M. Badoual, F. Jülicher, and J. Prost. Bidirectional cooperative motion of molecular motors. *Proc Nat Acad Sci USA*, 99(10):6696, 2002.
- [114] K. S. Thorn, J. A. Ubersax, and R. D. Vale. Engineering the processive run length of the kinesin motor. *J Cell Biol*, 151(5):1093, 2000.

- [115] 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(7):985, 1997.
- [116] B. Tripet, R. D. Vale, and R. S. Hodges. Demonstration of coiled-coil interactions within the kinesin neck region using synthetic peptides: Implications for motor activity. *J Biol Chem*, 272(14):8946, 1997.
- [117] A. Hoenger, M. Thormählen, R. Diaz-Avalos, M. Doerhoefer, K. N. Goldie, J. Müller, and E. Mandelkow. A new look at the microtubule binding patterns of dimeric kinesins. *J Mol Biol*, 297(5):1087, 2000.
- [118] L. Romberg, D. W. Pierce, and R. D. Vale. Role of the kinesin neck region in processive microtubule-based motility. *J Cell Biol*, 140(6):1407, 1998.
- [119] S. Rice, A. W. Lin, D. Safer, C. L. Hart, N. Naber, B. O. Carragher, S. M. Cain, E. Pechatnikova, E. M. Wilson-Kubalek, M. Whittaker, E. Pate, R. Cooke, E. W. Taylor, R. A. Milligan, and R. D. Vale. A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. *Nature*, 402(6763):778, 1999.
- [120] M. Tomishige, N. Stuurman, and R. D. Vale. Single-molecule observations of neck linker conformational changes in the kinesin motor protein. *Nat Struct Mol Biol*, 13(10):887, 2006.
- [121] G. Skiniotis, T. Surrey, S. Altmann, H. Gross, Y.-H. Song, E. Mandelkow, and A. Hoenger. Nucleotide-induced conformations in the neck region of dimeric kinesin. *EMBO J*, 22(7):1518, 2003.
- [122] A. Kallipolitou, D. Deluca, U. Majdic, S. Lakämper, R. Cross, E. Meyhöfer, L. Moroder, M. Schliwa, and G. Woehlke. Unusual properties of the fungal conventional kinesin neck domain from *neurospora crassa*. *EMBO J*, 20(22):6226, 2001.
- [123] D. Deluca, G. Woehlke, and L. Moroder. Synthesis and conformational characterization of peptides related to the neck domain of a fungal kinesin. *J Peptide Sci*, 9(4):203, 2003.
- [124] J. Jaud, F. Bathe, M. Schliwa, M. Rief, and G. Woehlke. Flexibility of the neck domain enhances kinesin-1 motility under load. *Biophys J*, 91(4):1407, 2006.
- [125] Johann Jaud. *Mechanische Charakterisierung schneller Kinesinmotoren in Einzelmolekülexperimenten*, Dissertation an der Technischen Universität München, 2007.
- [126] T. Makino, H. Morii, T. Shimizu, F. Arisaka, Y. Kato, K. Nagata, and M. Tanokura. Reversible and irreversible coiled coils in the stalk domain of ncd motor protein. *Biochemistry*, 46(33):9523, 2007.

- [127] R. S. Rock, B. Ramamurthy, A. R. Dunn, S. Beccafico, B. R. Rami, C. Morris, B. J. Spink, C. Franzini-Armstrong, J. A. Spudich, and H. L. Sweeney. A flexible domain is essential for the large step size and processivity of myosin VI. *Mol Cell*, 17(4):603, 2005.
- [128] M. Thormahlen, A. Marx, S. Sack, and E. Mandelkow. The coiled-coil helix in the neck of kinesin. *J Struct Biol*, 122:30, 1998.
- [129] B. Tripet and R. S. Hodges. Helix capping interactions stabilize the n-terminus of the kinesin neck coiled-coil. *J Struct Biol*, 137(1-2):220, 2002.
- [130] J. S. Richardson and D. C. Richardson. Amino acid preferences for specific locations at the ends of alpha helices. *Science*, 240(4859):1648, 1988.
- [131] V. Muñoz, F. J. Blanco, and L. Serrano. The hydrophobic-staple motif and a role for loop-residues in α -helix stability and protein folding. *Nature Struct Biol*, 2(5):380, 1995.
- [132] J. W. Seale, R. Srinivasan, and G. D. Rose. Sequence determinants of the capping box, a stabilizing motif at the N-termini of alpha-helices. *Protein Sci*, 3(10):1741, 1994.
- [133] C. Hyeon and J. N. Onuchic. Internal strain regulates the nucleotide binding site of the kinesin leading head. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(7):2175, 2007.
- [134] D. L. Coy, M. Wagenbach, and J. Howard. Kinesin takes one 8-nm step for each ATP that it hydrolyzes. *J Biol Chem*, 274(6):3667, 1999.
- [135] K. Visscher, M. J. Schnitzer, and S. M. Block. Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp. *Nature*, 400(6740):184, 1999.
- [136] J. Kirchner, G. Woehlke, and M. Schliwa. Universal and unique features of kinesin motors: Insights from a comparison of fungal and animal conventional kinesins. *Biol Chem*, 380(7-8):915, 1999.
- [137] Y. H. Song, A. Marx, J. Müller, G. Woehlke, M. Schliwa, A. Krebs, A. Hoenger, and E. Mandelkow. Structure of a fast kinesin: implications for ATPase mechanism and interactions with microtubules. *EMBO J*, 20(22):6213, 2001.
- [138] S. Lakämper, A. Kallipolitou, G. Woehlke, M. Schliwa, and E. Meyhöfer. Single fungal kinesin motor molecules move processively along microtubules. *Biophys J*, 84(3):1833, 2003.
- [139] 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. *EMBO J*, 17(19):5536, 1998.

- [140] Friederike Bathe, Katrin Hahlen, Renate Dombi, Lucia Driller, Manfred Schliwa, and Guenther Woehlke. The complex interplay between the neck and hinge domains in kinesin-1 dimerization and motor activity. *Mol Biol Cell*, 16(8):3529, 2005.
- [141] M. O. Steinmetz, I. Jelesarov, W. M. Matousek, S. Honnappa, W. Jahnke, J. H. Missimer, S. Frank, A. T. Alexandrescu, and R. A. Kammerer. Molecular basis of coiled-coil formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(17):7062, 2007.
- [142] J. Rizo and C. Rosenmund. Synaptic vesicle fusion. *Nat Struct Mol Biol*, 15(7):665, 2008.
- [143] W. Weissenhorn, A. Dessen, L. J. Calder, S. C. Harrison, J. J. Skehel, and D. C. Wiley. Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses. *Mol Membr Biol*, 16(1):3, 1999.
- [144] H. Herrmann, H. Bär, L. Kreplak, S. V. Strelkov, and U. Aebi. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(7):562, 2007.
- [145] P. J. Gans, P. C. Lyu, M. C. Manning, R. W. Woody, and N. R. Kallenbach. The helix-coil transition in heterogeneous peptides with specific side-chain interactions: theory and comparison with CD spectral data. *Biopolymers*, 31(13):1605, 1991.
- [146] C. N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, and T. Gray. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci*, 4(11):2411, 1995.
- [147] S. C. Kwok and R. S. Hodges. Effect of chain length on coiled-coil stability: decreasing stability with increasing chain length. *Biopolymers*, 76(5):378, 2004.
- [148] M. Bertz. *Proteinfaltung: Vergleich von chemischen mit mechanischen Methoden*, Bachelorarbeit an der Technischen Universität München, 2004.
- [149] J. K. Myers, C. N. Pace, and J. M. Scholtz. Denaturant m values and heat capacity changes: Relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci*, 4(10):2138, 1995.
- [150] D. M. Glover and B. D. Hames. *DNA cloning 1: A practical approach*, Oxford University Press, 1995.
- [151] J. L. Hutter and J. Bechhoefer. Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev Sci Instrum*, 64(7):1868, 1993.
- [152] H. J. Butt and M. Jaschke. Calculation of thermal noise in atomic force microscopy. *Nanotechnology*, 6(1):1, 1995.
- [153] D. A. Walters, J. P. Cleveland, N. H. Thomson, P. K. Hansma, M. A. Wendman, G. Gurley, and V. Elings. Short cantilevers for atomic force microscopy. *Rev Sci Instrum*, 67(10):3583, 1996.

- [154] N. A. Burnham, X. Chen, C. S. Hodges, G. A. Matei, E. J. Thoreson, C. J. Roberts, M. C. Davies, and S. J. B. Tendler. Comparison of calibration methods for atomic-force microscopy cantilevers. *Nanotechnology*, 14(1):1, 2003.
- [155] W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl, and H. Ziegler. *Biophysik*, Springer Verlag, 1982.
- [156] M. Epple. *Die Entstehung der Knotentheorie: Kontexte und Konstruktionen einer modernen mathematischen Theorie*, Vieweg, 1999.
- [157] S. A. Wasserman and N. R. Cozzarelli. Biochemical topology: applications to DNA recombination and replication. *Science*, 232(4753):951, 1986.
- [158] M. L. Mansfield. Are there knots in proteins? *Nat Struct Biol*, 1(4):213, 1994.
- [159] P. Virnau, L. A. Mirny, and M. Kardar. Intricate knots in proteins: Function and evolution. *PLoS Comput Biol*, 2(9):e122, 2006.
- [160] F. Khatib, M. T. Weirauch, and C. A. Rohl. Rapid knot detection and application to protein structure prediction. *Bioinformatics*, 22(14):e252, 2006.
- [161] W. R. Taylor. A deeply knotted protein structure and how it might fold. *Nature*, 406(6798):916, 2000.
- [162] Y. L. Lai, S. C. Yen, S. H. Yu, and J. K. Hwang. pKNOT: the protein KNOT web server. *Nucleic Acids Res*, 35(suppl2):W420, 2007.
- [163] R. C. Lua and A. Y. Grosberg. Statistics of knots, geometry of conformations, and evolution of proteins. *PLoS Comput Biol*, 2(5):e45, 2006.
- [164] W. R. Taylor. Protein knots and fold complexity: Some new twists. *Comput Biol Chem*, 31(3):151, 2007.
- [165] A. L. Mallam and S. E. Jackson. Probing nature's knots: The folding pathway of a knotted homodimeric protein. *J Mol Biol*, 359(5):1420, 2006.
- [166] S. Wallin, K. B. Zeldovich, and E. I. Shakhnovich. The folding mechanics of a knotted protein. *J Mol Biol*, 368(3):884, 2007.
- [167] Y. Arai, R. Yasuda, K. Akashi, Y. Harada, H. Miyata, K. Kinoshita, and H. Itoh. Tying a molecular knot with optical tweezers. *Nature*, 399(6735):446, 1999.
- [168] X. R. Bao, H. J. Lee, and S. R. Quake. Behavior of complex knots in single DNA molecules. *Phys Rev Lett*, 91(26):265506, 2003.
- [169] T. Wang, H. Arakawa, and A. Ikai. Force measurement and inhibitor binding assay of monomer and engineered dimer of bovine carbonic anhydrase B. *Biochem Biophys Res Commun*, 285(1):9, 2001.

- [170] M. T. Alam, T. Yamada, U. Carlsson, and A. Ikai. The importance of being knotted: effects of the C-terminal knot structure on enzymatic and mechanical properties of bovine carbonic anhydrase II. *FEBS Lett*, 519(1-3):35, 2002.
- [171] J. R. Wagner, J. S. Brunzelle, K. T. Forest, and R. D. Vierstra. A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome. *Nature*, 438(7066):325, 2005.
- [172] H. Smith. Physiological and ecological function within the phytochrome family. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 46(1):289, 1995.
- [173] P. H. Quail. Phytochrome photosensory signalling networks. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(2):85, 2002.
- [174] C. Fankhauser. The phytochromes, a family of red/far-red absorbing photoreceptors. *J Biol Chem*, 276(15):11453, 2001.
- [175] B. Karniol, J. R. Wagner, J. M. Walker, and R. D. Vierstra. Phylogenetic analysis of the phytochrome superfamily reveals distinct microbial subfamilies of photoreceptors. *Biochem J*, 392(1):103, 2005.
- [176] O. Yildiz, M. Doi, I. Yujnovsky, L. Cardone, A. Berndt, S. Hennig, S. Schulze, C. Urbanke, P. Sassone-Corsi, and E. Wolf. Crystal structure and interactions of the PAS repeat region of the drosophila clock protein PERIOD. *Mol Cell*, 17(1):69, 2005.
- [177] S. H. Wu and J. C. Lagarias. Defining the bilin lyase domain: Lessons from the extended phytochrome superfamily. *Biochemistry*, 39(44):13487, 2000.
- [178] H. Dietz, M. Bertz, M. Schlierf, F. Berkemeier, T. Bornschlöggl, J. P. Junker, and M. Rief. Cysteine engineering of polyproteins for single-molecule force spectroscopy. *Nature Protocols*, 1(1):80, 2006.
- [179] J. R. Wagner, J. Zhang, J. S. Brunzelle, R. D. Vierstra, and K. T. Forest. High resolution structure of deinococcus bacteriophytochrome yields new insights into phytochrome architecture and evolution. *J Biol Chem*, 282(16):12298, 2007.

