

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Physik-Department, Lehrstuhl für Biophysik E22

Kraftspektroskopische Untersuchungen der Myomesin-Elastizität

Felix Gregor Berkemeier

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 16. Februar 2011 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 6. Mai 2011 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	vii
I. Einleitung	
1. Die M-Bande	3
2. Myomesin	7
II. Theorie & Methoden	
3. Polymerelastizität entfalteter und teilentfalteter Proteine	13
3.1. Das <i>Worm-like-Chain</i> -Modell	13
3.2. WLC-Formeln	15
4. Kinetik des Entfaltungs-/Rückfaltungsübergangs	19
4.1. Das Bell-Modell	20
4.2. Kinetisches Modell mit Berücksichtigung der elastischen Beiträge	21
5. Hidden-Markov-Modelle	25
5.1. Standard-HMM	26
5.1.1. Viterbi-Algorithmus	28
5.1.2. Baum-Welch-Algorithmus	30
5.2. HMM mit zeitabhängigen Übergangswahrscheinlichkeiten	32
6. Bestimmung kraftabhängiger Raten	35
6.1. Kraftabhängige Raten aus Entfaltungs-/Rückfaltungskraftverteilungen	35
6.2. Kraftabhängige Raten aus Messungen bei konstanter Kraft	37
6.2.1. Zerlegung von Messungen bei variabler Kraft zu Messungen bei quasi-konstanter Kraft	38
6.2.2. Fehlerbetrachtung bezüglich der Berechnung kraftabhängiger Raten	39
7. Auswertung schneller Entfaltungs-/Rückfaltungsübergänge	41

III. Ergebnisse

8. Mechanische Stabilität der C-terminalen Myomesin-Domänen My9-My13	47
8.1. Kraftspektroskopie an My9-My13	47
8.2. Diskussion der My9-My13-Messungen	51
9. Gesonderte Betrachtung der einzelnen Domäne-Helix-Paare My9α, My10α, My11α und My12α	53
9.1. Kraftspektroskopie an (My10 α) ₈ und (My12 α) ₈	53
9.2. Diskussion der My10 α - und My12 α -Messungen	57
9.3. Mechanische Stabilität von My9 α und My11 α	59
9.3.1. Kraftspektroskopie an (GB1) ₂ My9-My10 α (GB1) ₂	59
9.3.2. Kraftspektroskopie an (Ubi) ₃ My11-My13	61
9.4. Diskussion der My9 α - und My11 α -Messungen	63
10. Detailuntersuchungen an My12α	65
10.1. Molekulardynamik-Simulation der kraftinduzierten My12 α -Entfaltung	65
10.2. CD-Spektroskopie an My12 α und α^{12}	68
10.3. Stabilität der Ig-Domäne My12 bei Kontakt zur gefalteten α -Helix α^{12} .	75
10.4. Diskussion der Detailuntersuchungen an My12 α	77
11. Faltungskinetik der α-Helix α^{12}	79
11.1. Schnelle Reversibilität des Faltungsübergangs eines einzelnen Sekundär- strukturelements	79
11.2. Diskussion der α^{12} -Faltungskinetik	87
12. Gesamtbetrachtung der Ergebnisse	91

Anhang

A. Klonierung nach dem Baukastenprinzip	99
B. Kraftspektroskopie mit dem Rasterkraftmikroskop	101
C. Lösung kubischer WLC-Gleichungen	102
D. Pseudocode für HMM-Algorithmus	105
Literaturverzeichnis	107
Danksagung	117

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

- 2.1. Übersicht über die Zuordnung von Aminosäurebereichen zu Struktureinheiten des C-terminalen Endes humanen Myomesins der Isoform I. 9

Abbildungsverzeichnis

- 1.1. Schema und EM-Aufnahme eines Sarkomers. 4
1.2. Modell der Struktur der M-Bande und der Rolle Myomesins darin. 6
2.1. Schema der Abfolge der 13 Domänen Myomesins. 8
3.1. Beispiel einer Kraft-Ausdehnungs-Kurve nach dem WLC-Modell. 14
4.1. Vereinfachtes Potential eines Systems, das in nativer (N) und entfalteter Konformation (U) vorliegen kann. 20
4.2. Beispiel für die Berechnung der kraftabhängigen Veränderung der Übergangsbarrierenenergie nach dem Modell, das die elastischen Beiträge der einzelnen Elemente berücksichtigt. 23
7.1. Beispiele für Übergangsereignisse in Kraft-Ausdehnungs-Darstellung. 42
7.2. Simulierte und gemessene Beispieldaten für in Konturlängen umgerechnete Übergangsereignisse. 43
8.1. Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve einer Messung an My9-My13 sowie die entsprechenden Konturlängen- und Entfaltungskräftehistogramme. 48
8.2. Unterstruktur des Kraftplateaus aus einer Messung an My9-My13 bei langsamer Ziehgeschwindigkeit. 49
8.3. Ausdehnungs- und Relaxationszyklen einer Messung an My9-My13 zur Probe der Plateaureversibilität. 50
9.1. Abgleich der Strukturen von My10 α und My12 α 54
9.2. Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve einer Messung an (My10 α)₈ bzw. (My12 α)₈ sowie die entsprechenden Konturlängen- und Entfaltungskräftehistogramme. 55

9.3.	Ausdehnungs- und Relaxationszyklen einer Messung an $(\text{My}12\alpha)_8$ zur Probe der Plateaureversibilität bei zwei verschiedenen Ausdehnungen.	56
9.4.	Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve einer Messung an $(\text{GB}1)_2\text{My}9\text{-My}10\alpha(\text{GB}1)_2$ sowie die entsprechenden Konturlängen- und Entfaltungskräftehistogramme.	60
9.5.	Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve einer Messung an dimerem $(\text{Ubi})_3\text{My}11\text{-My}13$ sowie die entsprechenden Konturlängen- und Entfaltungskräftehistogramme.	62
10.1.	MD-simulierte Struktur von $\text{My}12\alpha$ bei Entfaltung zu drei Zeitpunkten sowie zugehörige Kraft-Abstands-Daten.	66
10.2.	Typische CD-Spektren α -helikaler Proteine.	69
10.3.	Temperaturabhängige CD-Spektren von α^{12}	70
10.4.	Basisspektren und Koeffizienten zur Rekonstruktion der an α^{12} gemessenen CD-Spektren.	71
10.5.	Temperaturabhängige CD-Spektren von $\text{My}12\alpha$	72
10.6.	Basisspektren und Koeffizienten zur Rekonstruktion der an $\text{My}12\alpha$ gemessenen CD-Spektren.	73
10.7.	Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve einer Messung an $(\text{GB}1)_2\text{My}12\text{Ca}$ sowie die entsprechenden Konturlängen- und Entfaltungskräftehistogramme.	76
11.1.	Schema der Konturlängenzuwächse der α^{12} -Entfaltung bei unterschiedlicher Zugrichtung.	80
11.2.	<i>Cartoon</i> -Darstellung eines $\text{My}12\text{Ca}$ -Dimers.	80
11.3.	Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve einer Messung an $\text{My}12\text{Ca}(\text{GB}1)_2$	81
11.4.	In Konturlängen umgerechnete und gegen die Zeit aufgetragene Kraft-Ausdehnungs-Daten einer Messung an $\text{My}12\text{Ca}(\text{GB}1)_2$	82
11.5.	Zusammenstellung der Bereiche schneller Übergänge verschiedener Einzelmessungen als Konturlänge gegen die Zeit aufgetragen.	83
11.6.	Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve einer Messung an $\text{My}12\text{Ca}'(\text{GB}1)_2$	84
11.7.	Histogramme der α -Helix-Entfaltungs-/Rückfaltungseignisse und Fehler der daraus berechneten Raten.	85
11.8.	α -Helix-Entfaltungs- und Rückfaltungsraten mit Fehlern.	85
11.9.	Kraftabhängige α -Helix-Entfaltungs- und Rückfaltungsraten sowie mögliche Extrapolationen.	86
A.1.	Schema des Einbaus einer Sequenz A vor eine Sequenz B nach dem Baukastenprinzip.	100
B.1.	Schematische Darstellung eines zur Kraftspektroskopie verwendeten AFM.	101

Zusammenfassung

Die Eigenschaft, Dimere auszubilden und Myosin zu binden, macht Myomesin zu einem essentiellen Baustein im Proteinnetzwerk der sarkomerischen M-Bande. Als Quervernetzer unterliegt es während und nach der Muskelkontraktion regelmäßig Zugkräften, deren Auswirkungen auf die streng geordnete Struktur der M-Bande zu kompensieren als die wichtigste physiologische Funktion Myomesins angesehen wird.

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit sind mit Hilfe kraftspektroskopischer Messungen die molekularen Mechanismen untersucht worden, die zu der an die Anforderungen in der M-Bande ideal angepassten Elastizität Myomesins führen. Dazu sind speziell die mechanischen Eigenschaften der fünf C-terminalen Ig-Domänen (My9-My13) und der sie verbindenden α -Helices – ein erst kürzlich für Myomesin entdecktes und bis dahin völlig unbekanntes Faltungsmotiv – einer detaillierten Betrachtung unterzogen worden; aufgrund ihrer Lage in der M-Bande wird angenommen, dass ihre mechanischen Eigenschaften die für die Elastizität Myomesins bestimmenden sind.

Die Messungen an My9-My13 sowie an einzelnen der darin enthaltenen Domäne-Helix-Paare zeigen, dass die α -Helices unabhängig von den Ig-Domänen und bei geringeren Kräften als diese mit einer sehr schmalen Verteilung um 30 pN mechanisch entfalten, was auch durch Molekulardynamik-Simulationen bestätigt werden konnte. Bemerkenswerterweise falten die α -Helices zudem gegen Kräfte bis zu dieser Entfaltungskraft zurück, sofern die zugehörige Ig-Domäne gefaltet vorliegt und die notwendige gemeinsame Wechselwirkungsgrenzfläche zur Verfügung stellt. Die Bedeutung dieser Grenzfläche für die wechselseitige Stabilisierung von Domäne und Helix ist mittels Zirkulardichroismus- und Kraftspektroskopie in gesonderten Experimenten untersucht und bestätigt worden.

Ein besonderer Fokus wurde auf die Kinetik der α -Helix-Entfaltung und -Rückfaltung gerichtet. Dazu ist es gelungen, die schnellen Entfaltungs- und Rückfaltungsübergänge dieses einzelnen Sekundärstrukturelements mit dem Rasterkraftmikroskop aufzulösen. Durch Analyse der Daten mit Hilfe eines speziell angepassten Hidden-Markov-Modells haben sich daraus direkt kraftabhängige Raten bestimmen lassen, die durch ein eigenes Modell der Faltungskinetik beschrieben werden können.

Die schnelle Reversibilität der α -Helix-Entfaltung ermöglicht es Myomesin einerseits, durch Elongation auf bis zu 150% seiner Ausgangslänge ein Ansteigen der Kraft über 30 pN und somit Domänenentfaltung und Dimerdissoziation zu verhindern, und andererseits, diese Rückstellkraft bis zur vollständigen Rückfaltung aufrechtzuerhalten und so zur Wiederherstellung der strukturellen Ordnung in der M-Bande beizutragen. Daran zeigt sich die entscheidende Bedeutung der speziellen Elastizität der α -Helices Myomesins für die Stabilität des gesamten Sarkomers.

Teil I.
Einleitung

1. Die M-Bande

Aktive Bewegung spielt für lebende Systeme in allen Bereichen, sei es auf molekularer Ebene oder als Bewegungen des gesamten Organismus, eine wichtige Rolle. Unwillkürliche Bewegungen wie z.B. die des Herzschlags ebenso wie willkürliche Bewegungen der Gliedmaßen eines Lebewesens sind in aller Regel durch die Kontraktion von Muskeln verursacht. Aufgabe der Muskeln ist es, aktiv Kraft zu erzeugen und Widerstand gegen externe Kräfte zu leisten. Diese Funktion erfüllt der Muskel als Einheit, sie ist aber das Ergebnis des Zusammenwirkens zahlreicher Untereinheiten, zunächst der Muskelzellen, aus denen der Muskel aufgebaut ist, dann der Myofibrillen, langer zylindrischer Stränge, die sich zu den Muskelzellen der quergestreiften Muskulatur (Skelett- und Herzmuskulatur) zusammenbündeln; die Myofibrillen ihrerseits lassen sich entsprechend der regelmäßigen Abfolge heller und dunkler Bereiche, die sie in elektronenmikroskopischen (EM) Aufnahmen aufweisen, in weitere Untereinheiten, die Sarkomere, unterteilen [24]. Diese in langer Folge aneinandergereihten Sarkomere schließlich stellen die kleinsten kontraktile Untereinheiten des Muskels dar. Ihre Fähigkeit zur Kontraktion und ihre Struktur bilden den Grundbaustein für die Krafterzeugung und die Widerstandsfähigkeit des Muskels.

Die Eigenschaften der Sarkomere sind im Wesentlichen die Folge ihrer molekularen Zusammensetzung, insbesondere des komplexen, aber hochgradig geordneten Netzwerks verschiedener Proteine [7]. Der Aufbau jedes einzelnen Sarkomers ist klar und regelmäßig strukturiert, wie Röntgenstreuung und elektronenmikroskopische Aufnahmen von Myofibrillen direkt zeigen [109]. Die aufgrund ihrer Isotropie unter polarisiertem Licht hell erscheinenden Bereiche der Myofibrillen werden als I-Banden, die aufgrund ihrer Anisotropie dunkel erscheinenden Bereiche als A-Banden bezeichnet (vgl. Abb. 1.1). Die schmalen dunklen Zentren der I-Banden, die Z-Scheiben genannt werden, stellen die Grenzen zwischen den aneinandergereihten, in relaxiertem Zustand etwa $2,5\ \mu\text{m}$ langen Sarkomeren dar. Die Struktur der Sarkomere ist insbesondere durch das „dicke Filament“ Myosin und das „dünne Filament“ Aktin sowie die „riesigen“ filamentösen Proteine Titin und Obskurin gekennzeichnet, die longitudinal zum Sarkomer angeordnet sind und das Sarkomer in EM-Aufnahmen längsgestreift erscheinen lassen. Während die Aktinfilamente und Titine mit ihrem einen Ende jeweils in der Z-Scheibe verankert sind und sich durch die gesamte I-Bande bis in die A-Bande zum Zentrum des Sarkomers hin erstrecken, befinden sich die Myosinfilamente ausschließlich in der A-Bande. In den Randbereichen der A-Bande überlappen die Aktin- und Myosinfilamente und treten miteinander in Wechselwirkung: Die Motordomänen der Myosine, die seitlich aus dem Myosinfilament ragen, binden an die Aktinfilamente und laufen als moleku-

1. Die M-Bande

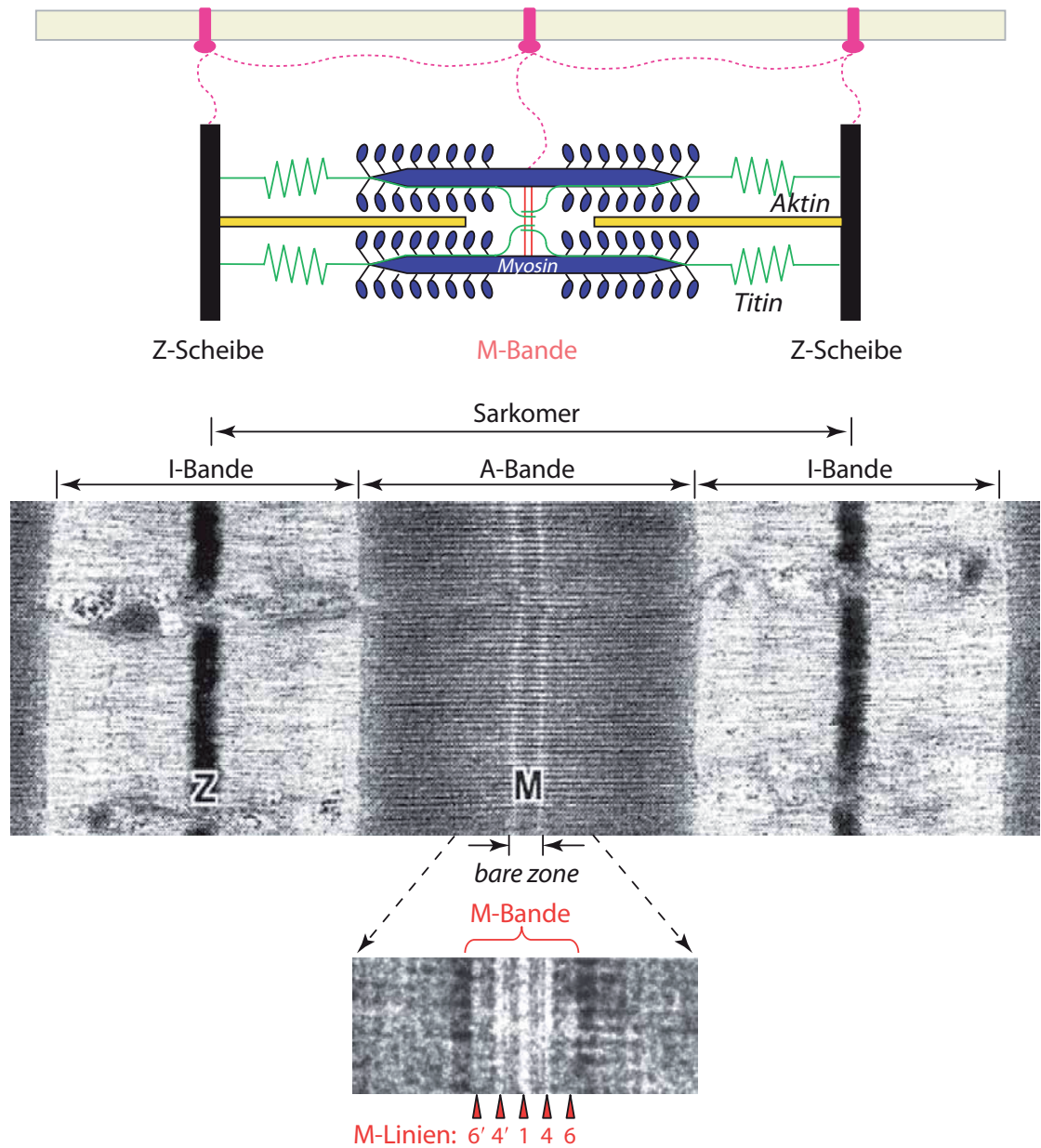


Abbildung 1.1. Oben: Schema des Aufbaus eines Sarkomers mit den drei wichtigsten Filamenten Aktin, Myosin und Titin. Mitte: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Sarkomers mit den klar zu erkennenden Banden. Unten: Invertierte Vergrößerung der *bare zone* im Zentrum der A-Bande. Deutlich sind die M-Bande und darin die fünf markantesten M-Linien M6', M4', 1, M4 und M6 zu erkennen. (Abbildung mit Anpassungen übernommen aus Agarkova und Perriard, 2005 [1].)

lare Motoren unter ATP-Hydrolyse an diesen entlang. Diese Bewegung ist die molekulare Ursache der Muskelkontraktion [46, 49, 51]; dafür zu sorgen, dass diese den komplexen Aufbau des Sarkomers nicht jeweils völlig durcheinander bringt, ist Aufgabe stabilisierender Strukturen [37].

Das Zentrum der A-Bande, wo nur Myosin-, aber kein Aktinfilament vorhanden ist und das auch keine Myosin-Motordomänen enthält (sogenannte *bare zone*), erscheint in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen etwas heller als die übrige A-Bande, enthält allerdings einen transversal zur Sarkomerachse verlaufenden dunkleren Streifen, die sogenannte M-Bande [1]. Querschnitte durch die M-Bande zeigen, dass die parallelen Myosinfilamente in einem streng hexagonalen Muster angeordnet sind, wozwischen weitere regelmäßige Strukturen zu erkennen sind [70, 75]. Da neben Myosin verschiedene weitere Proteine wie das M-Protein, Creatinkinase und vor allem Myomesin in der M-Bande lokalisiert worden sind, wird angenommen, dass sie zusammen mit Titin und Obscurin, dessen Enden bis in die M-Bande reichen, ein Netzwerk zur Stabilisierung der Myosinfilamente bilden und auf diese Weise zur Ausbildung und zur Aufrechterhaltung der Sarkomerstruktur beitragen [3, 8, 31, 47, 80]. Dass die M-Banden-Proteine ihrerseits klar definiert angeordnet sind, darauf deuten die in EM-Aufnahmen dunkel erscheinenden M-Linien hin, die die M-Bande symmetrisch zu deren Zentrum durchziehen (vgl. Abb. 1.1, unten). Die M-Linien werden von innen nach außen fortlaufend nummeriert und sind in verschiedenen Muskeln verschieden stark ausgeprägt; die in allen Muskeln markantesten sind M1 (zentral), M4 bzw. M4' und M6 bzw. M6', die jeweils 22 nm voneinander entfernt sind [106]. Entsprechend dem Modell von Luther und Squire sind an diesen Stellen höherer Elektronendichte die Myosinfilamente durch sogenannte M-Brücken quervernetzt, durch die sie in für das Gleiten der Aktin- und Myosinfilamente optimalem Abstand zueinander gehalten werden [75, 82]; weitere, parallel zu den Myosinfilamenten verlaufende Proteinstrukturen werden als M-Filamente bezeichnet [57, 70] (vgl. Abb. 1.2, oben).

Obwohl sowohl die Z-Scheibe als auch die M-Bande als transversale Strukturen die Anordnung der longitudinalen Filamente im Sarkomer gewährleisten, müssen sie ganz unterschiedliche mechanische Anforderungen erfüllen [31, 37]. Die Z-Scheiben an den Rändern eines Sarkomers sind robuste Proteinnetzwerke, in denen die Titine durch Bindung an Telethonin und die Aktinfilamente durch Bindung an das Z-Scheiben-Protein α -Aktinin mit ihrem einen Ende jeweils fest verankert sind [14, 24, 105, 121]; da bei Muskelkontraktion die Aktinfilamente an den Z-Scheiben zerren, müssen diese als Schnittstelle zwischen den Sarkomeren besonders widerstandsfähig gegen Krafteinwirkungen sein. In der M-Bande dagegen führen zufällige Ungleichgewichte in den bei Muskelkontraktion auf ein Myosinfilament von beiden Seiten wirkenden Kräften dazu, dass die Myosinfilamente aus ihrer zentralen Position (unterschiedlich weit in beide möglichen Richtungen) herausgleiten [50, 68, 111]. Eine Überzahl von vier bis acht Myosin-Motordomänen auf einer Filamentseite kann zu einem Kraftungleichgewicht von einigen zehn Piconewton und zu Versetzungen in der Größenordnung von 10 nm führen [91].

1. Die M-Bande

Um diese Scherkräfte zu kompensieren, müssen die quervernetzenden Proteine der M-Bande besonders elastisch sein [1]. Diese Annahme wird durch AFM-Studien der Steifigkeit transversaler Sarkomerstrukturen bestätigt [4].

Da Myomesin, eines der am stärksten exprimierten M-Banden-Proteine, Myosin bindet und Dimere ausbildet [64], fungiert es als direkter Quervernetzer der Myosinfilamente. Es ist daher anzunehmen, dass seine mechanischen Eigenschaften einen wesentlichen Beitrag zur Integrität und Elastizität der M-Bande leisten. Wie wichtig das Vorhandensein Myomesins für die Intaktheit des gesamten Sarkomers ist, zeigen Experimente, bei denen die Expression Myomesins genetisch verhindert oder gehemmt wurde, was zu fehlerhaftem bis hin zu vollständig ausbleibendem Sarkomeraufbau führt [88].

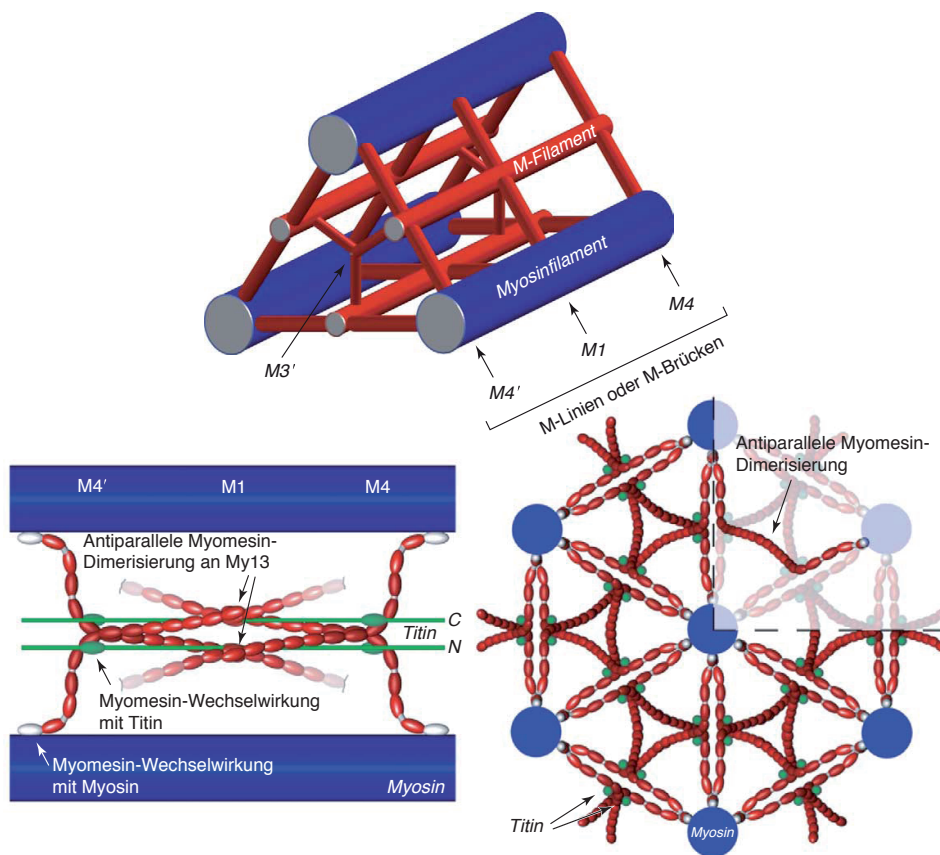


Abbildung 1.2. Modell der Struktur der M-Bande und der Rolle Myomesins darin. **Oben:** Von Luther und Squire vorgeschlagenes Modell des Netzwerks aus Myosinfilament, M-Filament und M-Brücken [70]. **Unten:** Myomesin als M4- und M4'-Brücke und als Bestandteil des M-Filaments. Myomesin dimerisiert und bindet Myosin, wobei der N-terminale Teil senkrecht, der C-terminale Teil parallel zum Myosinfilament verläuft (links). Die im Querschnitt hexagonal angeordneten Myosinfilamente werden durch Myomesin quervernetzt (rechts). (Abbildungen mit Anpassungen übernommen aus Agarkova und Perriard, 2005 [1].)

2. Myomesin

Myomesin ist ein in der quergestreiften Muskulatur aller Wirbeltiere aufzufindendes filamentöses Protein mit einer Masse von rund 185 kDa [44]. Es ist modular aufgebaut und setzt sich zusammen aus 13 Domänen, von denen bis auf die erste (My1) alle entweder den Faltungstyp Immunglobulin Typ II (Ig) oder den Faltungstyp Fibronectin Typ III (FnIII) aufweisen, wie es bei vielen Muskelproteinen der Fall ist; die Abfolge von My2 bis My13 lautet Ig-Ig-FnIII-FnIII-FnIII-FnIII-FnIII-Ig-Ig-Ig-Ig-Ig (vgl. Abb. 2.1) [114]. Die N-terminale Domäne My1, die keinem bekannten Faltungstyp entspricht, ist in der Lage, Myosin zu binden [78, 79]. Da Myomesin außerdem über die C-terminale Domäne My13 dimerisiert, ist Myomesin ein Quervernetzer der Myosinfilamente [64]. Als solcher ist Myomesin bei Muskelkontraktion und -dehnung potentiell Zugkräften ausgesetzt, so dass sich die Frage stellt, welche Auswirkungen diese Kräfte auf Myomesin und seine physiologische Funktion haben.

Unter den Muskelproteinen ist vor allem Titin ausführlich auf seine elastischen Eigenschaften hin untersucht worden. Für Titin ist eine Art mechanischer Hierarchie bekannt, die von entropischer Elastizität unstrukturierter Bereiche (PEVK-Region) über mechanische Kinase-Aktivierung bis hin zu Entfaltung einzelner Domänen reicht [66, 91, 93, 112]. Titin wird als wesentliche Komponente der passiven Elastizität des Sarkomers angesehen, die bei Überdehnung des Sarkomers durch externe Kräfte eine Rückstellkraft gewährleistet [38]. Wenn dagegen das Sarkomer durch die Interaktion von Aktin und Myosin aktiv kontrahiert, sind es die M-Banden-Proteine, darunter vor allem Myomesin, die durch das oben beschriebene ungleichmäßige Gleiten der Myosinfilamente mit Kraft belastet werden. Es ist daher naheliegend, auch Myomesin einer eingehenden Untersuchung seiner mechanischen Eigenschaften zu unterziehen.

Eine besondere Isoform Myomesins, die sogenannte EH-Variante, die überwiegend in embryonischen Herzen exprimiert wird, weist zwischen den Fibronectindomänen My6 und My7 einen der PEVK-Region Titins ähnlichen Bereich unstrukturierter Aminosäuren auf. Mechanische Untersuchungen haben gezeigt, dass durch deren entropische Elastizität die Nachgiebigkeit Myomesins erhöht wird [12, 100]. Da dieses besondere elastische Element aber in adulten Lebewesen, wo Myomesin der Isoform I vorherrscht, nicht vorhanden ist, kann die EH-Region nicht zur allgemeinen Erklärung der Elastizität Myomesins herangezogen werden. Es sind daher weitere strukturelle Aspekte des Aufbaus Myomesins auf ihren Einfluss auf die Elastizität hin zu untersuchen.

In neueren Röntgenstrukturanalysen an Myomesin sind zwischen den fünf C-terminalen Ig-Domänen My9 bis My13 α -helikale Verbindungen entdeckt worden, was ein bis dahin unbekanntes Tertiärstrukturmotiv darstellt [85, 86]. Diese α -Helices sind je-

2. Myomesin

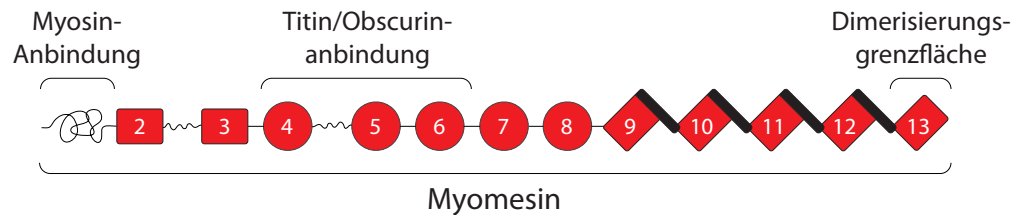


Abbildung 2.1. Schema der Abfolge der 13 Domänen Myomesins. Domänen des Fibronektintyps III sind als Kreise, solche des Immunglobulintyps II als Rechtecke dargestellt; die erste Domäne, My1, weist kein bekanntes strukturelles Muster auf. Die Domänen My9 bis My13 sind durch α -Helices (schwarze Balken) verbunden.

weils zu einem Teil vollständig lösungsmittlexponiert, weisen aber auch zur jeweils N-terminal angrenzenden Ig-Domäne eine gemeinsame hydrophobe Grenzfläche und polare Wechselwirkungen auf. Gefaltete Proteindomänen haben ein nur sehr geringes Ausdehnungsvermögen in der Größenordnung von einigen Ångström; wird Myomesin gestreckt, steigt die Kraft, die auf das gesamte Dimer wirkt, daher schnell an. Die im Vergleich zu kovalenten Bindungen in der Regel schwächeren Dimerisierungen stellen in einer Kette, als die das Myomesindimer aufgefasst werden kann, das schwächste Glied dar; zu ihrem Schutz ist es daher erforderlich, dass das Molekül Länge nachgeben kann, um Kraft abzubauen. Vor diesem Hintergrund ist spekuliert worden, dass die α -Helices zwischen den C-terminalen Ig-Domänen als elastische Federn wirken und die Elastizität Myomesins wesentlich prägen könnten [85].

Zudem ist die Elastizität gerade der C-terminalen Hälfte Myomesins von besonderem Interesse, weil diese entsprechend aktuellen Modellen parallel zur Sarkomerachse verläuft [1, 80] und zwischen der M4- und der M4'-Linie die schon früh entdeckte und als M-Filament bezeichnete Struktur darstellt [57, 70] (vgl. Abb. 1.2, unten). Die übrigen, N-terminalen Aminosäuren verlaufen senkrecht dazu und bilden als sogenannte M-Brücke vermutlich gerade die M4- und M4'-Linien [1, 64, 80]. In diesem N-terminalen Teil befinden sich außerdem Bindungsstellen für Titin und Obscurin [35, 78], so dass dieser transversale Bereich insgesamt eher der Anbindung und Wechselwirkung dient, während der longitudinale C-terminale Bereich für Elastizität sorgen muss.

Um die mechanischen Eigenschaften dieser C-terminalen Ig-Domänen und der sie verbindenden α -Helices im Hinblick auf die Funktion Myomesins in der M-Bande zu untersuchen, sind im Rahmen der hier dokumentierten Arbeit in erster Linie kraftspektroskopische Messungen durchgeführt worden. Mit Hilfe eines hochauflösenden Rasterkraftmikroskops (siehe dazu auch Anhang B) war es möglich, in mit den Vorgängen *in vivo* vergleichbarer Weise Kräfte auf einzelne Moleküle auszuüben und so Details der Myomesin-Elastizität aufzudecken.

Anmerkung zur Notation

Wenn im Rahmen der vorliegenden Arbeit von Myomesin die Rede ist, ist humanes Myomesin der Isoform I gemeint, das von dem Gen MYOM1 auf Chromosom 18 codiert wird [108, 114].

Die 13 Myomesin-Domänen werden vom N- zum C-Terminus nummeriert und erhalten die Bezeichnungen My1, My2, usw. Die zwischen den C-terminalen Ig-Domänen My9 bis My13 entdeckten α -Helices [85] verbinden je zwei benachbarte Domänen. Sie weisen dabei jeweils eine Grenzfläche und wesentliche Wechselwirkungen zur N-terminalen der beiden verbundenen Domänen auf. Es ist daher zweckmäßig, deren Index auf die α -Helices zu übertragen. So wird z.B. die α -Helix, welche die Domänen My12 und My13 verbindet, als α^{12} notiert.

Aufgrund der für die Stabilität von Myomesin wichtigen Wechselwirkungen und der großen gemeinsamen Grenzfläche zwischen α -Helix und der dazu jeweils N-terminalen Domäne (vgl. Kapitel 2 und [85, 86]) kann das Domäne-Helix-Paar auch als Einheit betrachtet werden. Mit My12 α wird dann der Komplex aus My12 und α^{12} bezeichnet. Entsprechendes gilt für My9 α , My10 α und My11 α .

Werden Bereiche angegeben, umfassen diese jeweils alle dazwischen befindlichen Domänen inklusive der verbindenden α -Helices. So entspricht z.B. My11-My13 der Sequenz My11- α^{11} -My12- α^{12} -My13; My9-My10 α entspricht der Sequenz My9- α^9 -My10- α^{10} .

Spezielle Punktmutationsvarianten erhalten zur kürzeren Schreibweise eine eigene Bezeichnung. So steht My10^{CC} für die zweifache Punktmutation My10^{L1250C,S1329C}, durch die die Domäne My10 zwischen ihrem ersten und ihrem letzten β -Strang über eine Disulfidbrücke kurzgeschlossen wird. In zwei weiteren Cysteinmutanten ist bei My10 und My12 die Aminosäure in der Biegung zwischen Domäne und α -Helix (jeweils ein Glycin) ausgetauscht worden. Diese Mutationen lauten My10Ca und My12Ca und entsprechen My10 α^{G1335C} bzw. My12 α^{G1548C} .

Sofern nicht anders angegeben erstrecken sich die Domänen und α -Helices über die in Tabelle 2.1 angegebenen Bereiche.



Struktur	My9	α^9	My10	α^{10}	My11	α^{11}	My12	α^{12}	My13
von	E1135	D1225	K1247	G1335	G1357	V1444	L1461	G1548	R1571
bis	I1224	V1246	V1334	Q1356	L1443	A1460	S1547	N1570	K1685

Tabelle 2.1. Übersicht über die Zuordnung von Aminosäurebereichen zu Struktureinheiten des C-terminalen Endes humanen Myomesins der Isoform I.

Teil II.

Theorie & Methoden

3. Polymerelastizität entfalteter und teilentfalteter Proteine

In ihrer nativen Konformation nehmen Proteine eine Struktur ein, die ihnen funktionale Eigenschaften verleiht wie z.B. mechanische oder thermische Stabilität, spezifische Bindungsfähigkeit oder enzymatische Aktivität. Welche Struktur das Protein einnimmt, hängt von der Abfolge der Aminosäuren in der Polypeptidkette ab. Die verschiedenen Seitenreste ermöglichen unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren (Van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrücken, Disulfidbrücken, elektrostatische Wechselwirkungen) oder mit der umgebenden Lösung (polare und hydrophobe Wechselwirkungen). Diese Wechselwirkungen dominieren daher die elastischen Eigenschaften von Proteindomänen.

Entfaltete Proteine oder entfaltete Unterabschnitte von Proteinen unterscheiden sich gerade darin von gefalteten, dass bis auf die Peptidbindung keine Wechselwirkung zwischen den Aminosäuren besteht. Die Seitenreste der Polypeptidkette können somit bei der Betrachtung vernachlässigt, und die Polypeptidkette als lineares Homopolymer angesehen werden. Für die Elastizität von Polymerketten sind verschiedene Modelle aufgestellt worden, welche die Rückstellkraft in Abhängigkeit von der End-zu-End-Ausdehnung aus den entropischen und enthalpischen Beiträgen zur Elastizität herleiten. Enthalpische Beiträge sind dabei alle diejenigen, die aus einer Änderung der inneren Energie resultieren, wie der Dehnung von Bindungsabständen und -winkeln; entropische Beiträge haben ihre Ursache in der Reduktion der dem Polymer zugänglichen Zustände.

Im *Freely-Jointed-Chain-Modell* sowie im *Freely-Rotating-Chain-Modell* wird das Polymer als aus starren Segmenten fester Länge aufgebaut modelliert; die Segmente sind dabei so verbunden, dass sie völlig frei bzw. bei festem Biegunswinkel frei rotierend beweglich sind [34]. Es werden also nur entropische Beiträge berücksichtigt, was dadurch gerechtfertigt ist, dass diese auf der Größenordnung von Proteinketten die Kräfte dominieren. Ein weniger reduktionistisches Modell, das auch enthalpische Beiträge berücksichtigt und die experimentellen Daten entfalteter Polypeptidketten gut beschreibt, ist das *Worm-like-Chain-Modell*, das im folgenden kurz vorgestellt werden soll.

3.1. Das *Worm-like-Chain-Modell*

In dem von Kratky und Porod aufgestellten *Worm-like-Chain-Modell* (WLC-Modell) wird die Polypeptidkette als kontinuierliche Raumkurve aufgefasst [60], zu deren Krümmung Arbeit aufgebracht werden muss. Über diese Änderungen der inneren Energie

3. Polymerelastizität entfalteter und teilentfalteter Proteine

finden zusätzlich zu den entropischen auch enthalpische Beiträge zur Elastizität Berücksichtigung. Wie leicht oder schwer sich die Kette krümmen lässt, hängt von ihrer Persistenzlänge ab, die als Materialeigenschaft aufgefasst werden kann. Sie ist ein Maß dafür, bis zu welchem Abstand zweier Punkte der als Raumkurve aufgefassten Kette deren Ausrichtung im Raum korreliert ist. Da alle Proteine bei Vernachlässigung der Seitenreste dasselbe Peptidrückgrat aufweisen, kann für alle Proteine dieselbe Persistenzlänge angenommen werden. Empirisch hat sich aus zahlreichen Messungen, die am Garchingener Lehrstuhl für Biophysik an unterschiedlichen Proteinen durchgeführt wurden, für den untersuchten Kraftbereich von bis zu 300 pN ein Wert von 0,5 nm für die Persistenzlänge als sinnvoll erwiesen.

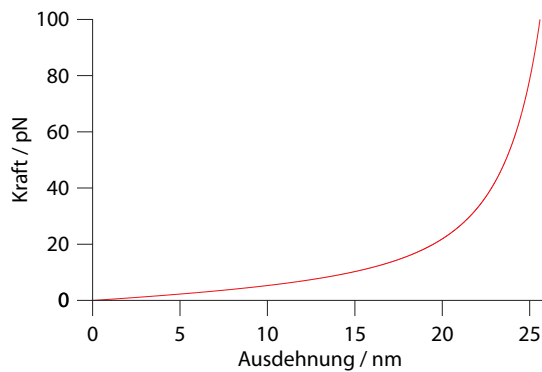


Abbildung 3.1. Kraft-Ausdehnungs-Kurve entsprechend dem *Worm-like-Chain*-Modell mit einer Konturlänge von 30 nm und einer Persistenzlänge von 0,5 nm.

muss. Alternativ dazu haben Marko und Siggia eine einfache Extrapolationsformel vorgestellt, die sich für die Grenzfälle kleiner und großer Kräfte asymptotisch der exakten Lösung nähert, aber im mittleren Kraftbereich (bei einem Verhältnis von Ausdehnung zu Konturlänge von etwa 0,5) einen Fehler von bis zu 10 % aufweist [20, 72]. Die WLC-Extrapolationsformel wird in der vorliegenden Arbeit insbesondere zur Messung von Konturlängenzuwächsen verwendet. Da sich die Abweichungen der Extrapolationsformel von der exakten Lösung in dieselbe Richtung auswirken und für verschiedene Konturlängen von ähnlicher Größe sind, heben sie sich bei Differenzbildung gegenseitig nahezu auf.

Im folgenden werden die WLC-Formel sowie weitere, aus ihr abgeleitete Formeln kurz vorgestellt, die sich aus der speziellen Geometrie des AFM ergeben und eine geschlossene Beschreibung der Zusammenhänge zwischen Kraft, Ausdehnung, Konturlänge und Piezoposition erlauben.

Zur Herleitung der *Worm-like-Chain*-Elastizität werden alle möglichen Konformationen der Kette im Raum mit den enthalpischen Beiträgen aus angelegter Kraft und lokaler Krümmung der Raumkurve gewichtet und daraus die Zustandssumme aufgestellt. Daraus lässt sich die mittlere End-zu-End-Ausdehnung als Funktion der angelegten Kraft berechnen (für ausführliche Herleitungen siehe [17, 59]). Die dazu notwendige Summation über alle Konformationen, die zu einer bestimmten Rückstellkraft führen, ist analytisch nicht möglich, so dass auf numerische Verfahren zurückgegriffen werden

3.2. WLC-Formeln

Die Extrapolationsformel von Marko und Siggia [20, 72] ermöglicht die Beschreibung des Zusammenhangs zwischen der Rückstellkraft und der End-zu-End-Ausdehnung einer *Worm-like-Chain* in Form einer analytischen Funktion. Sie lautet

$$F(d, L) = \frac{k_B T}{p} \left(\frac{d}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{d}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \right). \quad (3.1)$$

Hierbei ist F die Kraft, d die Ausdehnung, L die Konturlänge, p die Persistenzlänge und T die Temperatur. Diese einfache Formel ist so gewählt worden, dass sie asymptotisch mit der exakten numerischen Lösung des WLC-Modells übereinstimmt; dabei erfüllt sie folgende Eigenschaften:

- Die Kraft kann auch als abhängig von der *relativen* Ausdehnung $D = \frac{d}{L}$ aufgefasst werden: $F = F(D)$.
- Für eine Ausdehnung von $D = 0$ ist die Kraft $F(0) = 0$.
- Die Steigung ist für kleine Kräfte proportional zur Ausdehnung: $F(D) \propto D$, wobei der Proportionalitätsfaktor $\frac{3}{2}C = \frac{3k_B T}{2p}$ so etwas wie eine hooksche Federkonstante darstellt.
- Für $d \rightarrow L$ bzw. $D \rightarrow 1$ geht $F(D) \rightarrow \infty$. Als Funktion der relativen Ausdehnung lautet die WLC-Formel

$$F(D) = C \left(D + \frac{1}{4(1-D)^2} - \frac{1}{4} \right). \quad (3.2)$$

Man beachte, dass die WLC-Formeln nur für $d < L$ bzw. $D < 1$ physikalisch sinnvoll sind, weil eine Ausdehnung der Polymerkette über ihre Konturlänge hinaus im WLC-Modell nicht möglich ist.

Da die Kraft F von der *relativen* Ausdehnung $D = \frac{d}{L}$ abhängig ist, gilt außerdem

$$d(F, L_1) + d(F, L_2) = L_1 \cdot D(F) + L_2 \cdot D(F) = (L_1 + L_2) \cdot D(F) = d(F, L_1 + L_2). \quad (3.3)$$

Invertierung der WLC-Formel und Berechnung der Konturlänge

Mit Hilfe der Cardanischen Formeln kann die kubische Gleichung 3.2 nach D aufgelöst werden. Die Lösung dieser Gleichung in geschlossener Form ist so umfangreich, dass sie hier nicht angegeben werden soll. Stattdessen wird auf den Anhang C verwiesen, wo die analytische Lösung vollständig hergeleitet wird und ein Programmcode angegeben wird, der die entsprechende Berechnung von $D(F)$ durchführt.

3. Polymerelastizität entfalteter und teilentfalteter Proteine

$D(F)$ kann dann zur Berechnung der Konturlänge L für gegebene Werte für Kraft F und Ausdehnung d herangezogen werden. Es gilt $L(F, d) = \frac{d}{D(F)}$.

Abhängigkeiten zwischen Kraft, Ausdehnung, Konturlänge, Piezoposition und Zeit

In AFM-Experimenten kann die Ausdehnung d der untersuchten Polymerkette nicht direkt kontrolliert werden, da auf die Probe Kraft über eine Blattfeder ausgeübt wird, die sich ihrerseits unter Kraft verbiegt. Die Ausdehnung d entspricht dem Abstand zwischen dem Objektträger, auf dem die Probe fixiert ist, und dem biegbaren (spitzen) Ende der Blattfeder, über das an der Probe gezogen wird. Über ein Piezo-System kontrolliert werden kann aber nur die Position des fixierten anderen Endes der Blattfeder. Wenn z den Abstand zwischen Objektträger und dem fixierten Ende der Blattfeder bezeichnet, so gilt

$$d = z - \frac{F}{k_C}, \quad (3.4)$$

wobei k_C die Federkonstante der Blattfeder ist. Über diesen einfachen Zusammenhang kann aus den Messgrößen $z(t)$ und $F(t)$ für eine geeichte Blattfeder zu jedem Zeitpunkt t der Messung die Ausdehnung $d(t)$ bestimmt werden.

Dass nur $z(t)$, nicht aber $d(t)$ direkt kontrolliert werden kann, bereitet dann Probleme, wenn es darum geht, zeitliche Abhängigkeiten z.B. der Kraft oder der (kraftabhängigen) Rate zu messen (vgl. Kapitel 6). F und d stehen nicht nur über die WLC-Formel zueinander in Bezug, sondern sind auch über $z(t)$ miteinander gekoppelt. Durch Verknüpfung der Gleichungen 3.1 und 3.4 erhält man

$$F = (d - z) \cdot k_C = \frac{k_B T}{p} \left(\frac{d}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{d}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \right). \quad (3.5)$$

Für z ergibt sich daraus

$$z(d, L) = \frac{k_B T}{p \cdot k_C} \left(\left(1 + L \frac{p \cdot k_C}{k_B T}\right) \frac{d}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{d}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \right) \quad (3.6)$$

bzw.

$$z(D, L) = C \left(\left(1 + \frac{L}{C}\right) D + \frac{1}{4(1 - D)^2} - \frac{1}{4} \right), \quad (3.7)$$

wobei $D = \frac{d}{L}$ wiederum die relative Ausdehnung darstellt, hier aber $C = \frac{k_B T}{p \cdot k_C}$ ist. Diese Gleichung ist Gleichung 3.2 sehr ähnlich und kann auf dieselbe Weise wie diese für D gelöst werden (siehe Anhang C). Man beachte aber, dass im Gegensatz zur Kraft $F(D)$ die Position $z(D, L)$ noch explizit von L abhängig ist, so dass auch $D(z, L)$ dies ist.

Wie gezeigt wurde, können ausgehend von den Gleichungen für $F(d, L)$ und $z(d, L)$ mit Hilfe der Cardanischen Formeln $D(F)$ bzw. $D(z, L)$ analytisch gelöst werden; daraus folgend erhält man dann direkt zudem

$$\begin{aligned} d(F, L) &= L \cdot D(F), & F(z, L) &= F(D(z, L)), \\ d(z, L) &= L \cdot D(z, L), & z(F, L) &= z(D(F), L), \end{aligned} \quad (3.8)$$

sowie unter Berücksichtigung von $d = z - \frac{F}{k_C}$

$$L(F, d) = \frac{d}{D(F)}, \quad L(F, z) = \frac{z + \frac{F}{k_C}}{D(F)}, \quad L(d, z) = \frac{d}{D((d - z) \cdot k_C)}. \quad (3.9)$$

Ist die Zeitabhängigkeit der Piezoposition $z(t)$ bekannt und unabhängig von F , d und L – wie z.B. bei einer typischen AFM-Messung bei konstanter Geschwindigkeit $z(t) = v_p \cdot t$ –, ergeben sich durch Einsetzen von $z(t)$ auch die Zeitabhängigkeiten $F(t, L)$, $d(t, L)$, $L(F, t)$ sowie $L(d, t)$. Insbesondere kann dann durch einfache Differentiation die Kraftladungsrate \dot{F} analytisch berechnet werden.

4. Kinetik des Entfaltungs-/ Rückfaltungsübergangs

Die Energielandschaft eines thermodynamischen Systems definiert, welche Zustände das System unter welchen Bedingungen mit welcher Wahrscheinlichkeit einnehmen kann. Stabile Zustände sind dabei solche, bei denen die freie Energie ein Minimum einnimmt. Übergänge zwischen verschiedenen Minima können über verschiedene Pfade erfolgen, deren Scheitelpunkt ein meta-stabiler Zustand ist, der Übergangszustand genannt wird. Da die Energielandschaft von zahlreichen Parametern abhängig sein kann, ist sie viel-dimensional. Zur vereinfachten Betrachtung von Konformationsübergängen von Proteinen wird die freie Energie entlang einer Reaktionskoordinate betrachtet, welche die verschiedenen Konformationszustände miteinander verbindet; auf diese Weise reduziert sich die Energielandschaft auf eine Dimension.

Ein System, das thermisch angeregt wird, fluktuiert innerhalb des gegebenen Potentials. Zustände geringerer Energie werden dabei entsprechend dem Boltzmann-Faktor $\exp(-E/k_B T)$ wahrscheinlicher eingenommen als solche höherer. Die Wahrscheinlichkeit für einen Übergang aus einem stabilen Zustand in einen anderen ist daher durch die Form der Energielandschaft vorgegeben. Relevant für die Kinetik des Übergangs ist vor allem die vom System aufzubringende Energiedifferenz zwischen Ausgangszustand i und Übergangszustand \ddagger (Übergangsbarriere); der weitere Verlauf vom Übergangszustand zum Endzustand ist energetisch begünstigt und daher nicht limitierend. Die Rate des Übergangs nimmt exponentiell mit der relativen Höhe der Übergangsbarriere $\Delta G_{i\ddagger}^0$, auch Aktivierungsenergie genannt, ab. Dieser Zusammenhang wird mit der Arrhenius-Gleichung [6] beschrieben:

$$k_{i\ddagger}^0 = k_A \cdot \exp\left(-\frac{\Delta G_{i\ddagger}^0}{k_B T}\right), \quad (4.1)$$

wobei der präexponentielle Faktor k_A ein Maß für die Frequenz darstellt, mit der das System fluktuiert und die von der lokalen Rauheit der Energielandschaft abhängt [33, 52].

Äußere Einflüsse können die Form der Energielandschaft verändern und so die Kinetik beeinflussen. In AFM-Experimenten ist es die angelegte Kraft, durch die eine Entfaltung wahrscheinlicher und eine Rückfaltung unwahrscheinlicher gemacht wird. Zieht man an den Enden eines Proteins, wird Arbeit geleistet, welche die Energielandschaft verformt. Gleichzeitig wird das Protein durch die eingespannten Enden so eingeschränkt, dass nicht mehr alle Pfade der viel-dimensionalen Energielandschaft zugänglich sind. Es

4. Kinetik des Entfaltungs-/Rückfaltungsübergangs

ist daher zweckmäßig, als einzige zu betrachtende Dimension der Energielandschaft die Reaktionskoordinate eines kraftspektroskopischen Experimentes, d.i. die End-zu-End-Ausdehnung des Proteins zu wählen.

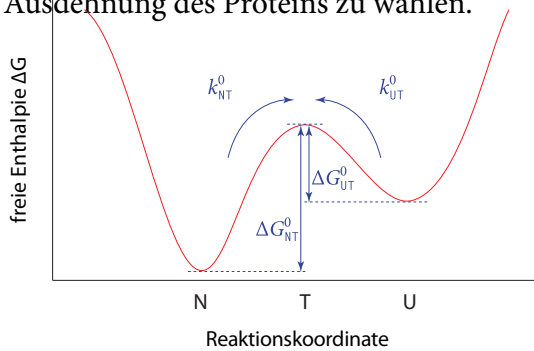


Abbildung 4.1. Vereinfachtes Potential eines Systems, das in nativer (N) und entfalteter Konformation (U) vorliegen kann. Dazwischen befindet sich der Übergangszustand (T).

Verschiedene Modelle versuchen, den Einfluss einer äußeren Kraft auf die Kinetik eines Konformationsübergangs zu beschreiben. Im folgenden sollen das weit verbreitete, aber stark vereinfachende Bell-Modell sowie ein eigenes Modell vorgestellt werden, das auch Energiebeiträge der experimentellen Umgebung (Blattfeder, übrige Polypeptidkette) berücksichtigt.

4.1. Das Bell-Modell

Das Bell-Modell für die Kraftabhängigkeit von Übergangsraten betrachtet die Arbeit, die zur Ausdehnung des Moleküls aus seinem Ausgangszustand bis zum Übergangszustand durch Anlegen von Kraft aufgebracht werden muss [10]. Dabei wird angenommen, dass die Arbeit linear mit der Kraft und der Ausdehnung zunimmt. Beträgt im kraftfreien Fall der Abstand zwischen Ausgangs- und Übergangszustand $\Delta x_{iT} = x_T - x_i$, wird folglich die Energie des Übergangszustandes relativ zur Energie des Ausgangszustandes um $E = F \cdot \Delta x_{iT}$ abgesenkt (bzw. angehoben; abhängig vom Vorzeichen von Δx_{iT}). Für die kraftabhängige Rate folgt

$$k_{iT}(F) = k_A \cdot \exp\left(-\frac{\Delta G_{iT}^0 - F \cdot \Delta x_{iT}}{k_B T}\right) = k_{iT}^0 \cdot \exp\left(\frac{F \cdot \Delta x_{iT}}{k_B T}\right). \quad (4.2)$$

Das Modell berücksichtigt dabei nicht, dass bei Verformung der Potentiallandschaft die Positionen der Minima und der Maxima nicht erhalten bleiben. Es ist daher auch Δx_{iT} nicht zwangsläufig kraftunabhängig. Wird die Reaktionskoordinate als die End-zu-End-Ausdehnung des untersuchten Proteins aufgefasst, kann die Kraftabhängigkeit von Δx_{iT} aus der Elastizität des Proteins abgeleitet werden: Ein gefaltetes Protein ist relativ steif und kann nur um einige Ångström gedehnt werden, bevor ein Konformationsübergang stattfindet, was aus der Stärke, aber geringen Reichweite der stabilisierenden Wechselwirkungen (vor allem hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrücken) folgt; der Übergangszustand ist also nah am gefalteten Zustand, und die Annahme eines konstanten Δx_{iT} als Näherung daher durchaus gerechtfertigt. Die Elastizität eines ungefalteten Proteins dagegen folgt aus dem WLC-Modell (siehe Kapitel 3); der Abstand zwischen ungefaltetem Zustand und Übergangszustand ist daher kraftabhängig und kann Werte in der Größenordnung bis zur Konturlänge annehmen, so dass das Bell-Modell im Prinzip eine zu starke Vereinfachung darstellt.

4.2. Kinetisches Modell mit Berücksichtigung der elastischen Beiträge

In diesem Modell wird die kraftabhängige Energie, durch die die Übergangsbarriere relativ zum Ausgangszustand vergrößert oder verringert wird, aus der Elastizität der einzelnen beteiligten Elemente berechnet. In einem kraftspektroskopischen AFM-Experiment an einem Proteinkonstrukt sind das neben dem entfaltenden oder zurückfaltenden Abschnitt der untersuchten Polypeptidkette, im folgenden der Einfachheit halber Protein genannt, die übrige entfaltet vorliegende Polypeptidkette, im folgenden *Spacer* genannt, sowie die Blattfeder, über die an der Probe gezogen wird.

Findet bei der Kraft F_N eine Entfaltung des Proteins statt, bricht die Kraft auf einen neuen Wert F_U ein; gleichzeitig finden drei experimentell voneinander nicht trennbare Vorgänge statt, deren Energiebeiträge die Übergangskinetik beeinflussen:

- Das bislang kompakt gefaltete Protein (P) verhält sich nach der Entfaltung wie eine *worm-like chain* der Konturlänge L_P und wird entsprechend diesem Modell auf eine Ausdehnung $d(F_U, L_P)$ gestreckt.
- Die Konturlänge L_S des *Spacers* (S) verändert sich nicht, aber durch den Krafeinbruch relaxiert er von der Ausdehnung $d(F_N, L_S)$ gemäß dem WLC-Modell auf eine geringere, der Kraft F_U entsprechende Ausdehnung $d(F_U, L_S)$.
- Die Blattfeder (C) mit der Federkonstanten k_C relaxiert durch den Krafeinbruch linear um $d_N - d_U = \frac{F_N - F_U}{k_C}$.

F_U und F_N sind nicht unabhängig voneinander, sondern über die Piezoposition z , die sich während der Entfaltung nicht ändert, durch die Funktionen $F(z, L)$ und $z(F, L)$ (siehe Gleichungen 3.8) miteinander gekoppelt:

$$F_U = F(z(F_N, L_S), L_S + L_P) \quad \text{bzw.} \quad (4.3)$$

$$F_N = F(z(F_U, L_S + L_P), L_S). \quad (4.4)$$

Die einzelnen Energiebeiträge lauten

$$\begin{aligned} E_P(F_N) &= \int_0^{d(F_U, L_P)} F(d, L_P) dd, \\ E_S(F_N) &= \int_{d(F_U, L_S)}^{d(F_N, L_S)} F(d, L_S) dd, \\ E_C(F_N) &= \frac{(F_N + F_U) \cdot (d_N - d_U)}{2} = \frac{F_N^2 - F_U^2}{2 \cdot k_C}. \end{aligned} \quad (4.5)$$

4. Kinetik des Entfaltungs-/Rückfaltungsübergangs

Die angegebenen Energien wurden für die Entfaltung definiert, gelten aber für die Rückfaltung ganz entsprechend. Die Gesamtenergie beträgt $E_{\text{total}}(F) = E_S(F) + E_C(F) - E_P(F)$ (siehe Abb. 4.2, links). Man beachte, dass die Energien von *Spacer* und Blattfeder positiv zur Summe beitragen, während die Energie des Proteins negativ in die Summe eingeht, da bei der Relaxation von *Spacer* und Blattfeder potentielle Energie frei wird, bei der Ausdehnung des Proteins aber potentielle Energie gespeichert wird.

Umformungen zur einfacheren Berechnung von $E_{\text{total}}(F)$

Aus der Additivität der Ausdehnung zweier WLC-Kurven unterschiedlicher Konturlänge bei gleicher Kraft (Gleichung 3.3) sowie aus der Monotonie der WLC-Kurven folgt für Integrale:

$$\begin{aligned}
 \int_0^{d(F,L_1)} F(d, L_1) dd + \int_0^{d(F,L_2)} F(d, L_2) dd &= \\
 &= F \cdot d(F, L_1) - \int_0^F d(F, L_1) dF + F \cdot d(F, L_2) - \int_0^F d(F, L_2) dF \\
 &= F \cdot (d(F, L_1) + d(F, L_2)) - \int_0^F (d(F, L_1) + d(F, L_2)) dF \\
 &= F \cdot d(F, L_1 + L_2) - \int_0^F d(F, L_1 + L_2) dF \\
 &= \int_0^{d(F,L_1+L_2)} F(d, L_1 + L_2) dd. \tag{4.6}
 \end{aligned}$$

Die Summe E_{total} kann damit umgeformt werden zu

$$\begin{aligned}
 E_{\text{total}}(F_N) &= \int_{d(F_N, L_S)}^{d(F_N, L_S)} F(d, L_S) dd + \frac{F_N^2 - F_U^2}{2 \cdot k_C} - \int_0^{d(F_U, L_P)} F(d, L_P) dd \\
 &= \int_0^{d(F_N, L_S)} F(d, L_S) dd - \int_0^{d(F_U, L_S)} F(d, L_S) dd \\
 &\quad + \frac{F_N^2 - F_U^2}{2 \cdot k_C} - \int_0^{d(F_U, L_P)} F(d, L_P) dd \\
 &= \int_0^{d(F_N, L_S)} F(d, L_S) dd + \frac{F_N^2 - F_U^2}{2 \cdot k_C} - \int_0^{d(F_U, L_P + L_S)} F(d, L_P + L_S) dd. \tag{4.7}
 \end{aligned}$$

Dieser Ausdruck entspricht gerade der Fläche, die durch eine Entfaltung oder Rückfaltung zwischen den zwei WLC-Kurven mit den Konturlängen L_S und $L_S + L_P$ einge-

4.2. Kinetisches Modell mit Berücksichtigung der elastischen Beiträge

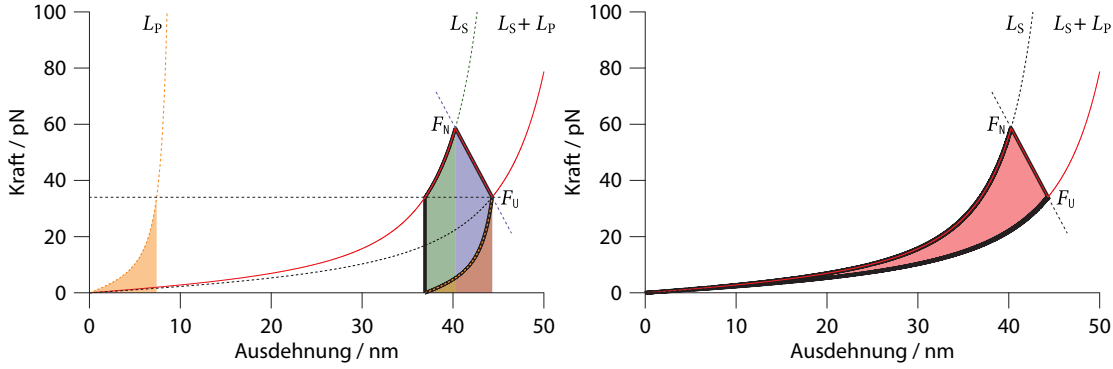


Abbildung 4.2. Beispiel für die Berechnung der kraftabhängigen Veränderung der Übergangsbarrierenenergie bei Entfaltung/Rückfaltung eines Elements mit einer Konturlänge von $L_P=10$ nm bei einer Spacer-Konturlänge von $L_S=50$ nm und einer AFM-Federkonstanten von $k_C=6$ pN/nm. **Links:** Die gefärbten Flächen kennzeichnen die unterschiedlichen Energiebeiträge $E_P(F)$ (orange), $E_S(F)$ (grün) und $E_C(F)$ (blau); $E_{\text{total}}(F)$ ist dann die schwarz umrandete Fläche. **Rechts:** $E_{\text{total}}(F)$ kann auch direkt aus der schwarz umrandeten Fläche zwischen den WLC-Kurven des gefalteten und des entfalteten Zustands bestimmt werden.

geschlossen wird (siehe Abb. 4.2, rechts). Dieselbe Fläche erhält man auch einfacher durch Integration über z , da $z(F_N, L_S) = z(F_U, L_S + L_P)$ ist.¹ Die Gesamtenergie ist dann

$$E_{\text{total}}(F_N) = \int_0^{z(F_N, L_S)} [F(z, L_S) - F(z, L_S + L_P)] dz = E_{\text{total}}(z). \quad (4.8)$$

Die so berechnete Gesamtenergie bezeichnet die von der externen Kraft verursachte Änderung in der Energiedifferenz zwischen gefaltetem (N) und entfaltetem (U) Zustand.

$$\Delta G_{\text{NU}}(F_N) = \Delta G_{\text{NU}}^0 + \Delta \Delta G_{\text{NU}}(F_N) = \Delta G_{\text{NU}}^0 + E_{\text{total}}(F_N) \quad (4.9)$$

Daraus kann bereits direkt die Kraftabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten K abgeleitet werden:

$$K(F) = \exp\left(\frac{\Delta G_{\text{NU}}(F)}{k_B T}\right) = K^0 \cdot \exp\left(\frac{E_{\text{total}}(F)}{k_B T}\right), \quad (4.10)$$

wobei $K^0 = \exp\left(\frac{\Delta G_{\text{NU}}^0}{k_B T}\right)$ die Gleichgewichtskonstante im kraftfreien Fall ist.

Für die Kinetik der Entfaltung und Rückfaltung spielt jeweils nur die Änderung der Energiedifferenz zwischen dem gefaltetem bzw. ungefaltetem Zustand und dem Übergangszustand (T) eine Rolle. Die Gesamtenergieänderung kann daher aufgeteilt werden

¹Graphisch ist dieser Zusammenhang direkt ersichtlich. Für eine ausführliche analytische Herleitung zeigt man den Zusammenhang $\int_{z(a,L)}^{z(b,L)} F(z, L) dz = \frac{1}{2k_C} [F^2(d, L)]_a^b + \int_a^b F(d, L) dd$ mit Hilfe der Substitution $z = d + F/k_C$ und anschließender partieller Integration.

4. Kinetik des Entfaltungs-/Rückfaltungsübergangs

gemäß $\Delta\Delta G_{\text{NU}} = \Delta\Delta G_{\text{NT}} + \Delta\Delta G_{\text{UT}} = a \cdot E_{\text{total}} + (1 - a) \cdot E_{\text{total}}$, wobei a die relative Position des Übergangszustands zwischen gefaltetem und ungefaltetem Zustand angibt. a kann seinerseits von der Kraft F abhängen. Abhängig von der Größe des betrachteten Kraftbereichs kann a aus Gründen der Kontinuität aber näherungsweise als konstant angenommen werden.

Die Entfaltungs- und die Rückfaltungsrate hängen exponentiell von der durch die angelegte Kraft verursachten Veränderung der Übergangsbarrierenhöhe ab. Für das Vorzeichen des Exponenten ist dabei zu berücksichtigen, dass eine angelegte Kraft eine Entfaltung begünstigt und eine Rückfaltung behindert. Es ergeben sich die folgenden Abhängigkeiten:

$$k_{\text{NT}}(F_{\text{N}}) = k_{\text{NT}}^0 \cdot \exp\left(a \cdot \frac{E_{\text{total}}(F_{\text{N}})}{k_{\text{B}}T}\right) \quad (4.11)$$

$$k_{\text{UT}}(F_{\text{N}}) = k_{\text{UT}}^0 \cdot \exp\left(-(1 - a) \cdot \frac{E_{\text{total}}(F_{\text{N}})}{k_{\text{B}}T}\right) \quad (4.12)$$

5. Hidden-Markov-Modelle

Hidden-Markov-Modelle (HMM) wurden vor allem als Verfahren zur automatischen Spracherkennung entwickelt [92], finden heute aber Anwendung bei einer Vielzahl von Fragestellungen, wenn es darum geht, aus einer Serie von Messdaten (wie z.B. der akustischen Folge von Lauten) nicht unmittelbar zugängliche, den Messdaten aber zugrundeliegende Information (die gesprochenen Worte) zu gewinnen. Ein Beispiel für eine weitverbreitete Anwendung in der Biologie ist der Sequenzabgleich (*sequence alignment*) zweier Abschnitte genetischen Codes [30]. HMM können wie im Fall der Sprach- oder auch der Schrifterkennung hohe oder wie im Falle des Sequenzabgleichs eher geringe Komplexität aufweisen; gemeinsam ist ihnen die im Prinzip einfache Grundstruktur, die im folgenden am Beispiel eines zeitlichen Messsignals bei schlechtem Signal/Rausch-Verhältnis vorgestellt werden soll.

Bei der Messung einer Abfolge von Zuständen eines Systems kann es sein, dass der messbare Unterschied zwischen den Zuständen in einer ähnlichen Größenordnung liegt wie die z.B. durch Rauschen verursachte Messungenauigkeit. In diesem Fall können die einzelnen Messwerte nicht eindeutig einem Zustand zugeordnet werden. Das Experiment liefert zwar eine Observationsfolge $\mathbf{O} = \{o_0, o_1, o_2, \dots, o_T\}$, die zugrundeliegende Zustandsfolge $\mathbf{S} = \{s_0, s_1, s_2, \dots, s_T\}$ aber ist nicht direkt zugänglich. Sind bestimmte Voraussetzungen erfüllt, lassen sich diese „versteckten“ Zustände jedoch mit Hilfe eines Hidden-Markov-Modells und eines geeigneten Satzes an Parametern näher bestimmen. Dies ist dann möglich, wenn

1. die Wahrscheinlichkeit, zu einem bestimmten Zeitpunkt t in einem bestimmten Zustand s_t zu sein, nur vom unmittelbar vorangehenden Zustand abhängt²

$$P(s_t | s_0, s_1, \dots, s_{t-1}) = P(s_t | s_{t-1}), \quad (5.1)$$

2. die Wahrscheinlichkeit einer Observation nur vom aktuellen Zustand, nicht aber von anderen Zuständen oder Observationsen abhängt

$$P(o_t | o_0, o_1, \dots, o_{t-1}, s_0, s_1, \dots, s_t) = P(o_t | s_t). \quad (5.2)$$

☒

²Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass es auch sogenannte HMM höherer Ordnung m gibt, bei denen die Abhängigkeit nicht auf den einen unmittelbar vorangehenden Zustand beschränkt, sondern auf eine finite Anzahl m vorangehender Zustände ausgedehnt ist. Diese lassen sich jedoch stets durch Zusammenfassung der m Zustände zu einem neudefinierten Zustand in ein HMM erster Ordnung überführen.

5. Hidden-Markov-Modelle

Die unter 1. genannte Wahrscheinlichkeit des Systems, bei gegebenem vorangegangenen Zustand in einem bestimmten Zustand zu sein, wird auch Übergangswahrscheinlichkeit genannt; die unter 2. genannte Wahrscheinlichkeit einer Observation bei gegebenem zugrundeliegenden Zustand wird auch Emissionswahrscheinlichkeit genannt (siehe Kapitel 5.1).

Üblicherweise wird für Hidden-Markov-Modelle außerdem gefordert, dass die Übergangswahrscheinlichkeiten unabhängig von der Zeit sind, man es also mit einem *stationären* stochastischen Prozess zu tun hat. Nur in diesem Fall lassen sich die üblichen Algorithmen zur Bestimmung der wahrscheinlichsten Zustandsfolge für eine gegebene Observationsfolge sowie zur Optimierung der verwendeten Parameter verwenden, die im folgenden dargestellt werden (Kapitel 5.1). Zur Analyse von Entfaltungs-/Rückfaltungsübergängen hingegen, deren Wahrscheinlichkeit von der Kraft abhängt, die auf das untersuchte Molekül ausgeübt wird und die sich in klassischen AFM-Experimenten (konstante Piezugeschwindigkeit) mit der Zeit verändert, kann nur der erste der beiden Algorithmen und dieser nur in einer modifizierten Form verwendet werden, die im Anschluss an das Standard-Verfahren vorgestellt wird (Kapitel 5.2).

In Kapitel 6 wird dargestellt, wie aus Daten, die in AFM-Experimenten bei konstanter Piezoeschwindigkeit gewonnenen wurden, kraftabhängige Übergangsraten bestimmt werden können.

5.1. Standard-HMM

Ein Hidden-Markov-Modell ist definiert durch

1. eine endliche Menge von N dem System zugänglichen Zuständen $\{0, 1, 2, \dots, N\}$;
2. einen Vektor von Startwahrscheinlichkeiten $\boldsymbol{\pi} = \{\pi_i\}$, wobei $\pi_i = P(s_0 = i)$ die Wahrscheinlichkeit ist, dass das System zum Startzeitpunkt $t = 0$ im Zustand i ist;
3. eine Matrix von Übergangswahrscheinlichkeiten $\mathbf{A} = \{a_{ij}\}$, wobei $a_{ij} = P(s_t = j | s_{t-1} = i)$ die Wahrscheinlichkeit des Systems ist, zum Zeitpunkt t im Zustand j zu sein, wenn das System zum Zeitpunkt $t - 1$ im Zustand i ist; definiert man einen fiktiven und allen Zustandsfolgen gemeinsamen Startzustand $s_{-1} = *$, so lassen sich die Startwahrscheinlichkeiten gemäß $a_{*i} = \pi_i$ in die Übergangswahrscheinlichkeiten integrieren;
4. einen Satz von Emissionswahrscheinlichkeiten $\mathbf{B} = \{b_i(o_t)\}$, wobei $b_i(o_t) = P(o_t | s_t = i)$ die Wahrscheinlichkeit dafür darstellt, dass zum Zeitpunkt t die Observation o_t generiert wird, wenn das System zu diesem Zeitpunkt im Zustand i ist.³

³Wenn o_t nicht auf diskrete Werte beschränkt ist, handelt es sich genau genommen bei $P(o_t | s_t = i)$ nicht

Während die Observationsfolge $\mathbf{O} = \{o_0, o_1, o_2, \dots, o_T\}$ gegeben ist, müssen die Parameter des Hidden-Markov-Modells durch begründete Abschätzung bestimmt werden. Es ist wichtig, dass für die Modellierung eines Systems die richtige Anzahl der versteckten, dem System zugänglichen Zustände verwendet wird. Die Anzahl an Zuständen gibt auch die Zahl der Start- und Übergangswahrscheinlichkeiten sowie der Emissionsverteilungen vor. Lässt sich die Anzahl nicht eindeutig bestimmen, können verschiedene Modelle ausprobiert und anhand ihrer Produktionswahrscheinlichkeit (siehe unten) miteinander verglichen werden. Für die Start- und die Übergangswahrscheinlichkeiten reicht in der Regel eine grobe Schätzung, da sie iterativ mit Hilfe des Baum-Welch-Algorithmus optimiert werden können. Auch für die Emissionsverteilungen gibt es iterative Optimierungsverfahren. Im einfachsten Fall (und oft zumindest in erster Näherung) handelt es sich um Gauß-Verteilungen, deren Mittelwerte und Standardabweichungen mit Hilfe eines Histogramms und der entsprechenden Anzahl gaußförmiger Fitkurven aus der Observationsfolge bestimmt werden können. Abhängig von der Eindeutigkeit der Fitkurven kann eine solche Abschätzung bereits so gut sein, dass auf Optimierungsschritte für die Emissionsverteilung verzichtet werden kann.

Für jede mögliche Abfolge von Zuständen $\mathbf{S} = \{s_0, s_1, s_2, \dots, s_T\}$ kann eine Wahrscheinlichkeit $P(\mathbf{O}, \mathbf{S})$ dafür angegeben werden, dass das System die Zustandsfolge \mathbf{S} durchläuft und dabei die Observationsfolge \mathbf{O} produziert. Die gesamte Produktionswahrscheinlichkeit $P(\mathbf{O}) = \sum_{\mathbf{S}} P(\mathbf{O}, \mathbf{S})$ kann als absolutes Maß dafür gesehen werden, wie wahrscheinlich das Auftreten der Observationsfolge \mathbf{O} ist. Verschiedene Hidden-Markov-Modelle liefern für dieselbe Observationsfolge unterschiedliche Wahrscheinlichkeiten. Folgend aus der Annahme, dass dasjenige Modell, für das die Wahrscheinlichkeit des Auftretens der Observationsfolge am größten ist, das zugrundeliegende System am besten beschreibt, kann daher die Produktionswahrscheinlichkeit als Qualitätskriterium für die Wahl eines Hidden-Markov-Modells dienen.

Um zu einer gegebenen Observationsfolge \mathbf{O} diejenige Zustandsfolge \mathbf{S} zu finden, die der Observationsfolge am wahrscheinlichsten zugrundeliegt, kann der Viterbi-Algorithmus verwendet werden [115]. Dessen Ergebnis hängt jedoch von der Wahl der Modell-Parameter ab. Durch den Baum-Welch-Algorithmus ist es möglich, diese Parameter iterativ zu optimieren und sich so der insgesamt optimalen Zustandsfolge anzunähern [9]. Beide Algorithmen sollen im folgenden vorgestellt werden.

um eine Wahrscheinlichkeit, sondern um eine Wahrscheinlichkeitsdichte $p(o_t|s_t = i)$. Daher kann die Wahrscheinlichkeit nicht für eine Einzelobservation o_t , sondern nur für das Vorliegen einer Observation innerhalb eines Intervalls $[o_t, o_t + \Delta o[$ angegeben werden; sie beträgt dann $\int_{o_t}^{o_t + \Delta o} p(o_t|s_t = i)$. Für kleine Δo ist dieses Integral (und damit die Wahrscheinlichkeit) $P(o_t|s_t = i) \approx \Delta o \cdot p(o_t|s_t = i)$. In der Praxis ist es daher zweckmäßig, ein kleines Δo zur Diskretisierung der Observations \mathbf{O} zu wählen.

5.1.1. Viterbi-Algorithmus

Der Viterbi-Algorithmus dient der Berechnung der optimalen Zustandsfolge \mathbf{S}^* , die für festgelegte Parameter eines Hidden-Markov-Modells die größte Produktionswahrscheinlichkeit für die Observationsfolge \mathbf{O} aufweist [115]. Die Wahrscheinlichkeit $P(\mathbf{O}, \mathbf{S})$ für das Durchlaufen der Zustandsfolge \mathbf{S} und die gleichzeitige Produktion der Observationsfolge \mathbf{O} berechnet sich aus dem Produkt der beiden einzelnen Wahrscheinlichkeiten:

$$P(\mathbf{O}, \mathbf{S}) = P(\mathbf{O}|\mathbf{S}) \cdot P(\mathbf{S}) \quad (5.3)$$

Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der Zustandsfolge ergibt sich aus dem Produkt aller Übergänge von einem Zustand in den nächsten angefangen mit der Startwahrscheinlichkeit:

$$P(\mathbf{S}) = \prod_{t=0}^T a_{s_{t-1}s_t} \quad (5.4)$$

Die Wahrscheinlichkeit für die Produktion der Observationsfolge bei gegebener Zustandsfolge ist einfach das Produkt der Emissionswahrscheinlichkeiten:

$$P(\mathbf{O}|\mathbf{S}) = \prod_{t=0}^T b_{s_t}(o_t) \quad (5.5)$$

Zusammen ergibt sich daraus

$$P(\mathbf{O}, \mathbf{S}) = \prod_{t=0}^T \{a_{s_{t-1}s_t} \cdot b_{s_t}(o_t)\}. \quad (5.6)$$

Die optimale Zustandsfolge \mathbf{S}^* ist diejenige, für welche die Produktionswahrscheinlichkeit $P(\mathbf{O}, \mathbf{S})$ maximal ist:

$$\mathbf{S}^* = \underset{\mathbf{S}}{\operatorname{argmax}} P(\mathbf{O}, \mathbf{S}) \quad (5.7)$$

Um zu vermeiden, zu einer gegebenen Observation der Länge T für alle N^T möglichen Zustandsfolgen die Wahrscheinlichkeit $P(\mathbf{O}, \mathbf{S})$ berechnen zu müssen, um die Zustandsfolge mit dem größten $P(\mathbf{O}, \mathbf{S})$ zu finden, wird die Hilfsgröße $\delta_t(i)$ als größtmögliche Wahrscheinlichkeit definiert, dass bis zum Zeitpunkt $0 \leq t \leq T$ eine beliebige Folge $\{s_0, s_1, \dots, s_t\}$ mit $s_t = i$ die Observationsfolge $\{o_0, o_1, \dots, o_t\}$ produziert:

$$\delta_t(i) = \max_{s_0, s_1, \dots, s_{t-1}} P(\{o_0, o_1, \dots, o_t\}, \{s_0, s_1, \dots, s_{t-1}, s_t = i\}) \quad (5.8)$$

Der Vorteil dieser Hilfsgröße ist, dass sie sich unter Berücksichtigung von Gleichung 5.6 folgendermaßen rekursiv definieren und berechnen lässt:

$$\begin{aligned} \delta_0(i) &= a_{*i} \cdot b_i(o_0) \\ \delta_{t+1}(j) &= \max_i \{ \delta_t(i) a_{ij} \} \cdot b_j(o_{t+1}) \end{aligned} \quad (5.9)$$

Werden auf diese Weise alle $\delta_t(i)$ für die gesamte Observation berechnet, so bezeichnet das größte der $\delta_T(i)$ die größtmögliche Wahrscheinlichkeit, dass eine beliebige Zustandsfolge \mathbf{S} die Observation \mathbf{O} produziert. Die Zustandsfolge, die diese größte Produktionswahrscheinlichkeit aufweist, ist gerade die gesuchte optimale Zustandsfolge \mathbf{S}^* . Es folgt also

$$P(\mathbf{O}, \mathbf{S}^*) = \max_i \delta_T(i). \quad (5.10)$$

Daraus kann direkt abgelesen werden, dass die optimale Zustandsfolge in demjenigen Zustand i endet, für den $P(\mathbf{O}, \mathbf{S}^*)$ maximal ist:

$$s_T^* = \operatorname{argmax}_i \delta_T(i) \quad (5.11)$$

Von diesem letzten Zustand der optimalen Zustandsfolge ausgehend kann auf ähnliche Weise der Vorgängerzustand s_{T-1}^* bestimmt werden. Er ist dadurch definiert, dass er das Produkt aus größtmöglicher Produktionswahrscheinlichkeit bis zum Zeitpunkt $T - 1$ und der Übergangswahrscheinlichkeit von s_{T-1} zum Endzustand s_T maximiert:

$$s_{T-1}^* = \operatorname{argmax}_i \{ \delta_{T-1}(i) \cdot a_{is_T^*} \} \quad (5.12)$$

Dies kann nun immer weiter fortgesetzt werden. Dazu ist die Einführung einer weiteren Hilfsgröße $\psi_t(i)$ nützlich, die wie folgt rekursiv definiert ist:

$$\begin{aligned} \psi_0(i) &= 0 \\ \psi_{t+1}(j) &= \operatorname{argmax}_i \{ \delta_t(i) \cdot a_{ij} \} \end{aligned} \quad (5.13)$$

Die optimale Zustandsfolge kann dann ebenso rekursiv ausgehend von Gleichung 5.11 vollständig rekonstruiert werden:

$$\begin{aligned} s_T^* &= \operatorname{argmax}_i \delta_T(i) \\ s_t^* &= \psi_{t+1}(s_{t+1}^*) \end{aligned} \quad (5.14)$$

5.1.2. Baum-Welch-Algorithmus

Die durch den Viterbi-Algorithmus bestimmte optimale Zustandsfolge S^* ist nur optimal in Bezug auf die gewählten Parameter. Geht man davon aus, dass die Zahl der dem System zugänglichen Zustände korrekt bestimmt wurde, bleiben die Übergangs- und die Emissionswahrscheinlichkeiten als ihrerseits zu optimierende Größen übrig. Das Ziel der Optimierung ist es, die Parameter so zu wählen, dass die gesamte Produktionswahrscheinlichkeit $P(\mathbf{O})$ maximal ist. Die wahrscheinlichste Zustandsfolge S^* zu diesem Parametersatz ist dann die insgesamt optimale.

Der Baum-Welch-Algorithmus optimiert den HMM-Parametersatz ausgehend von sinnvoll gewählten Anfangsparametern [9]. Zu diesen werden aus der Observationsfolge Hilfsgrößen sowie die Produktionswahrscheinlichkeit $P(\mathbf{O})$ berechnet. Aus den Hilfsgrößen können dann neue Parameter berechnet werden, die, wie gezeigt werden kann, zu einer höheren Produktionswahrscheinlichkeit führen [9]. Durch Wiederholung dieses Prozesses wird die Produktionswahrscheinlichkeit iterativ so lange maximiert, wie sich dadurch signifikante Verbesserungen ergeben.

Die zu verwendenden Hilfsgrößen sind die sogenannte Vorwärtsvariable $\alpha_t(i)$, die sogenannte Rückwärtsvariable $\beta_t(i)$ sowie die *a-posteriori*-Wahrscheinlichkeiten $\Gamma_t(i)$ und $\gamma_t(i, j)$, die im folgenden näher erläutert werden.

- Die Vorwärtsvariable gibt die Wahrscheinlichkeit dafür an, dass das System bis zum Zeitpunkt t die Observationsfolge $\{o_0, o_1, \dots, o_t\}$ generiert und sich zu diesem Zeitpunkt im Zustand i befindet:

$$\alpha_t(i) = P(\{o_0, o_1, \dots, o_t\}, s_t = i) \quad (5.15)$$

- Ganz analog dazu wird durch die Rückwärtsvariable die Wahrscheinlichkeit angegeben, dass zum Zeitpunkt t das System im Zustand i ist und daran anschließend die Observationsfolge $\{o_{t+1}, o_{t+2}, \dots, o_T\}$ generiert:

$$\beta_t(i) = P(\{o_{t+1}, o_{t+2}, \dots, o_T\}, s_t = i) \quad (5.16)$$

- Durch $\Gamma_t(i)$ wird die *a-posteriori*-Wahrscheinlichkeit \mathbf{O} bezeichnet, dass sich bei vollständig gegebener Observationsfolge das System zum Zeitpunkt t im Zustand i befindet:

$$\Gamma_t(i) = P(s_t = i | \mathbf{O}) \quad (5.17)$$

- Ähnlich dazu bezeichnet $\gamma_t(i, j)$ die *a-posteriori*-Wahrscheinlichkeit dafür, dass sich das System bei vollständig gegebener Observationsfolge \mathbf{O} zum Zeitpunkt t im Zustand i und zum Zeitpunkt $t + 1$ im Zustand j befindet:

$$\gamma_t(i, j) = P(s_t = i, s_{t+1} = j | \mathbf{O}) \quad (5.18)$$

Die Vorwärts- und die Rückwärtsvariable können auf rekursive Weise berechnet werden:

$$\begin{aligned} \alpha_0(i) &= a_{*i} \cdot b_i(o_0) \\ \alpha_{t+1}(i) &= \sum_j \{ \alpha_t(j) \cdot a_{ji} \} \cdot b_i(o_{t+1}) \end{aligned} \quad (5.19)$$

$$\begin{aligned} \beta_T(i) &= 1 \\ \beta_{t-1}(i) &= \sum_j \{ a_{ij} \cdot b_j(o_t) \cdot \beta_t(j) \} \end{aligned} \quad (5.20)$$

Aus Vorwärts- und Rückwärtsvariable können anschließend die beiden *a-posteriori*-Wahrscheinlichkeiten berechnet werden:

$$\Gamma_t(i) = \frac{\alpha_t(i) \cdot \beta_t(i)}{P(\mathbf{O})} \quad (5.21)$$

$$\gamma_t(i, j) = \frac{\alpha_t(i) \cdot a_{ij} \cdot b_j(o_{t+1}) \cdot \beta_{t+1}(j)}{P(\mathbf{O})} \quad (5.22)$$

Die Bestimmung neuer und besser an die Observationsfolge angepasster Übergangs- und Emissionswahrscheinlichkeiten basiert auf der Überlegung, dass dadurch, dass die Observationsfolge in die Berechnung eingeht, die *a-posteriori*-Wahrscheinlichkeiten trotz schlechter Parameter sinnvolle Aussagen über die Observationsfolge zulassen. Durch Summation über die Zeit kann aus der Wahrscheinlichkeit $\gamma_t(i, j)$ die zu erwartende Häufigkeit eines Übergangs von i nach j berechnet werden; normiert man diesen Wert durch die erwartete Häufigkeit, überhaupt im Zustand i zu sein, die sich aus der Summation über $\Gamma_t(i)$ ergibt, erhält man direkt die Wahrscheinlichkeit für einen Übergang von Zustand i nach Zustand j :

$$a_{ij} = \frac{\sum_{t=0}^{T-1} \gamma_t(i, j)}{\sum_{t=0}^{T-1} \Gamma_t(i)} \quad (5.23)$$

Die Startwahrscheinlichkeit ergibt sich trivialerweise direkt aus der Wahrscheinlichkeit dafür, dass sich das System zum Zeitpunkt 0 im Zustand i befindet: $a_{*i} = \Gamma_0(i)$.

Ganz ähnlich zur Argumentation für Gleichung 5.23 wird bei der Emissionswahrscheinlichkeit argumentiert. Die erwartete Häufigkeit, im Zustand i eine Observation k zu erhalten, ergibt sich aus Summation über all diejenigen Wahrscheinlichkeiten $\Gamma_t(i)$,

5. Hidden-Markov-Modelle

für die $o_t = k$ ist,⁴ und anschließende Normierung:

$$b_i(k) = \frac{\sum_{t: o_t=k} \Gamma_t(i)}{\sum_{t=0}^{T-1} \Gamma_t(i)} \quad (5.24)$$

Es kann gezeigt werden, dass die gesamte Produktionswahrscheinlichkeit $P(\mathbf{O})$, die mittels des Viterbi-Algorithmus aus den neuen Parametern bestimmt wird, größer oder gleich der aus den alten Parametern resultierenden Produktionswahrscheinlichkeit ist und das vorgestellte Vorgehen somit zu einer Optimierung führt [9].

Die Software-Umsetzung des Baum-Welch-Algorithmus' kombiniert mit dem davor in Kapitel 5.1.1 vorgestellten Viterbi-Algorithmus ist in Anhang D als Pseudocode dargestellt.

5.2. HMM mit zeitabhängigen Übergangswahrscheinlichkeiten

Die sogenannte Markov-Bedingung (Gleichung 5.1) fordert, dass die Wahrscheinlichkeit für einen Übergang nur vom unmittelbar vorangegangenen Zustand abhängt. In vielen Fällen wird zudem für die Zustandsfolge vorausgesetzt, dass es sich um eine stationäre Markov-Kette handelt, für die

$$P(s_{t+1}|s_t) = P(s_t|s_{t-1}) \quad (5.25)$$

für alle t gilt. Dies ist jedoch keine zwingende Voraussetzung für ein Hidden-Markov-Modell. Ein nicht stationäres HMM kann einfach dadurch gebildet werden, dass zeitabhängige Übergangswahrscheinlichkeiten $\mathbf{A}_t = \{a_{ij}(t)\}$ angenommen werden.⁵ Daran ergeben sich nur geringe Modifikationen bei der Berechnung von Produktionswahrscheinlichkeiten sowie der Hilfsgrößen für den Viterbi-Algorithmus:

$$P(\mathbf{O}, \mathbf{S}) = \prod_{t=0}^{T-1} \{a_{s_{t-1}s_t,t} \cdot b_{s_t}(o_t)\} \quad (5.26)$$

⁴Hierbei steht $k \in \mathbf{O}$ für eine beliebige aus allen möglichen diskreten (oder diskretisierten) Observationen.

⁵Man beachte bezüglich der Notation, dass im Gegensatz zu den t , die im Index einer Größe stehen und nur diskrete Werte $0, 1, 2, \dots, T$ annehmen können, in Klammern als Argument gekennzeichnete t kontinuierlich sind. Während das Inkrement für das Index- t 1 beträgt, ist er für das Argument- t Δt : $t_{s_{t+1}} = t_{s_t} + \Delta t$.

5.2. HMM mit zeitabhängigen Übergangswahrscheinlichkeiten

$$\begin{aligned} \delta_0(i) &= a_{*i,0} \cdot b_i(o_0) \\ \delta_{t+1}(j) &= \max_i \{ \delta_t(i) a_{ij,t} \} \cdot b_j(o_{t+1}) \end{aligned} \quad (5.27)$$

$$\begin{aligned} \psi_0(i) &= 0 \\ \psi_{t+1}(j) &= \operatorname{argmax}_i \{ \delta_t(i) \cdot a_{ij,t} \} \end{aligned} \quad (5.28)$$

Der Baum-Welch-Algorithmus dagegen kann für nicht stationäre HMM nicht verwendet werden. Im Optimierungsschritt zur Neubestimmung der Übergangswahrscheinlichkeiten (Gleichung 5.23) wird davon ausgegangen, dass sich die Übergangswahrscheinlichkeit aus dem Verhältnis von der erwarteten Zahl an Übergängen aus Zustand i nach Zustand j zur erwarteten Zahl von Zuständen i berechnen lässt. Diese beiden Werte werden durch Summation über die gesamte gemessene Zeit T gewonnen und stellen daher eine Art Mittelwert über diesen Zeitraum dar. Auf diese Art können folglich keine zeitabhängigen Wahrscheinlichkeiten bestimmt werden. Eine alternative Möglichkeit zur Optimierung der zeitabhängigen Übergangswahrscheinlichkeiten ist in Punkt 5. des Auswertungsprotokolls auf Seite 44 angegeben.

Die konkrete Bestimmung der zeitabhängigen Übergangswahrscheinlichkeiten $A(t) = \{a_{ij}(t)\}$ ist vom Modell abhängig, das für die Kinetik des Übergangs angenommen wird. Im vorliegenden Fall, in dem das HMM zur Auswertung von Faltungsübergängen aus AFM-Experimenten mit konstanter Piezugeschwindigkeit eingesetzt wird, hängen die Übergangswahrscheinlichkeiten von den kraft- und somit zeitabhängigen Entfaltungs- und Rückfaltungsraten ab. Die Abhängigkeit der Kraft F von der Zeit t ergibt sich aufgrund der experimentellen Geometrie aus der Piezugeschwindigkeit v_p sowie aus der mit dem Konformationszustand s_t der Probe korrelierten aktuellen Konturlänge L_{s_t} entsprechend Gleichung 3.8 in Kapitel 3.2:

$$F(t) = F(z = v_p \cdot t, L_{s_t}) \quad (5.29)$$

Die Abhängigkeit der Entfaltungs- und Rückfaltungsraten von der angelegten Kraft hängt ihrerseits von dem angenommenen Modell für die freie Energie des Faltungsübergangs ab (siehe Kapitel 4). Sowohl durch das stark vereinfachende Bell-Modell als auch durch das in Kapitel 4.2 vorgestellte Modell, das neben der Faltungsenergie des Proteins auch die Dehnung der übrigen Peptidkette und die Verbiegung der Blattfeder berücksichtigt, kann aus der Kraft F und je nach Modell weiteren Parametern die Energie $E(F(t), \dots)$ berechnet werden, die gemäß der Arrhenius-Gleichung (4.1) die Entfaltungs- und Rückfaltungsraten k_u bzw. k_f beeinflusst. Die Zeitabhängigkeit der Raten ist dann gegeben durch

$$k_{u/f}(t) = k_{u/f}(0) \cdot e^{\frac{E(F(t), \dots)}{k_B T}}. \quad (5.30)$$

Die Berechnung der Übergangswahrscheinlichkeiten aus den Raten erfolgt ausgehend von den Ratengleichungen. Am Beispiel eines einzelnen Proteinmoleküls, das gefaltet

5. Hidden-Markov-Modelle

und ungefaltet vorliegen kann, wird im folgenden der Fall eines Zweizustandssystems behandelt. Die Ratengleichungen lauten dann

$$\frac{dP_N(t)}{dt} = -k_u(t) \cdot P_N(t) + k_f(t) \cdot P_U(t) \quad (5.31)$$

$$\frac{dP_U(t)}{dt} = k_u(t) \cdot P_N(t) - k_f(t) \cdot P_U(t), \quad (5.32)$$

wobei $P_N(t)$ und $P_U(t)$ die Wahrscheinlichkeit bezeichnen, dass das Protein zum Zeitpunkt t gefaltet bzw. ungefaltet ist, und $P_N(t) + P_U(t) = 1$ gilt.

Für die Wahrscheinlichkeit $P_N(t, \tau)$, dass ein zum Zeitpunkt t gefaltetes Einzelmolekül auch zum Zeitpunkt $t + \tau$ ($\tau > 0$) noch gefaltet ist, spielt die Faltungsrate keine Rolle und kann also $k_f = 0$ gesetzt werden. Entsprechendes gilt für die Wahrscheinlichkeit $P_U(t, \tau)$, dass ein ungefaltetes Einzelmolekül weiterhin ungefaltet ist. Aus den Ratengleichungen ergibt sich somit

$$\frac{dP_N(t, \tau)}{d\tau} = -k_u(t + \tau) \cdot P_N(t, \tau) \quad (5.33)$$

$$\frac{dP_U(t, \tau)}{d\tau} = -k_f(t + \tau) \cdot P_U(t, \tau). \quad (5.34)$$

Diese Differentialgleichungen werden unter Berücksichtigung der Randbedingung $P_N(t) = 1$ bzw. $P_U(t) = 1$ durch einen Ansatz mit Exponentialfunktionen gelöst:

$$P_N(t, \tau) = \exp\left(-\int_0^\tau k_f(t + \tau') d\tau'\right) \quad (5.35)$$

$$P_U(t, \tau) = \exp\left(-\int_0^\tau k_u(t + \tau') d\tau'\right) \quad (5.36)$$

Die HMM-Übergangswahrscheinlichkeiten $a_{ij} = P(s_{t+1} = j | s_t = i)$ beziehen sich auf Übergänge innerhalb diskreter Zeitschritte (zur Notation siehe Fußnote 5 auf Seite 32), die durch die Abtastrate f_s festgelegt sind. Für kleine Zeitschritte $\Delta t = 1/f_s$ können die Raten als konstant zwischen zwei aufeinanderfolgenden Messzeiten angenommen werden: $k_{u/f}(t + \tau) \approx k_{u/f}(t)$ für $\tau \leq \Delta t$. Das Integral vereinfacht sich dann zu

$$\int_0^{\tau=\Delta t} k_{u/f}(t + \tau') d\tau' \approx k_{u/f}(t) \cdot \Delta t. \quad (5.37)$$

Die Wahrscheinlichkeiten der entsprechenden Gegenereignisse, also dass ein zum Zeitpunkt t gefaltetes oder ungefaltetes Protein bis zum Zeitpunkt $t + \Delta t$ entfaltet bzw. rückgefaltet hat, ergeben sich aus der Differenz zu 1. Insgesamt erhält man damit für die zeitabhängigen Übergangswahrscheinlichkeiten

$$\begin{aligned} a_{FF}(t) &= \exp(-k_u(t) \cdot \Delta t) & a_{FU}(t) &= 1 - a_{FF}(t) \\ a_{UF}(t) &= 1 - a_{UU}(t) & a_{UU}(t) &= \exp(-k_f(t) \cdot \Delta t). \end{aligned} \quad (5.38)$$

6. Bestimmung kraftabhängiger Raten

Die Bestimmung kraftabhängiger Raten aus Messdaten über Übergänge zwischen Faltungszuständen kann in den meisten Fällen durch Monte-Carlo-Simulation erfolgen. Dabei wird der Übergangsprozess möglichst präzise modelliert und die Erzeugung der Messdaten als Zufallsprozess sozusagen nachgespielt. Die freien Parameter des Modells, die den kraftabhängigen Raten zugrundeliegen, werden solange modifiziert, bis die experimentellen Werte gut reproduziert werden. Auf diese Weise werden optimale Parameter für die Rate bestimmt.

Problematisch an dieser Methode ist, dass der Simulation stets ein Modell zugrunde liegt. Der Zusammenhang zwischen Kraft und Raten muss bekannt sein oder sinnvoll angenommen werden; die Simulation liefert dazu nur die Parameter für die Rate (darunter in der Regel die Rate im kraftfreien Fall).

Im folgenden werden zwei andere Methoden vorgestellt, aus Messdaten Raten kraftabhängig zu bestimmen. Diese Methoden zeichnen sich dadurch aus, dass sie (zumindest in Bezug auf die Kraftabhängigkeit der Raten) modellfrei sind.

6.1. Kraftabhängige Raten aus Entfaltungs-/Rückfaltungskraftverteilungen

Die in den Gleichungen 5.35 und 5.36 als abhängig von der Zeit t angegebene Wahrscheinlichkeit für das Verbleiben eines Moleküls in einem bestimmten Zustand kann über die Zeitabhängigkeit der Kraft $F(t)$ in eine kraftabhängige Wahrscheinlichkeit umgerechnet werden. Hier soll das Gegenereignis, der Übergang von einem Zustand in einen anderen, betrachtet werden, dessen Wahrscheinlichkeit sich aus der Differenz zu 1 ergibt. Aus

$$P(t) = 1 - \exp\left(-\int_0^t k(t') dt'\right) \quad (6.1)$$

wird dann

$$P(F) = 1 - \exp\left(-\int_{F(0)}^F \frac{k(F')}{\dot{F}} dF'\right). \quad (6.2)$$

Die Wahrscheinlichkeitsverteilung erhält man durch Differentiation nach F :

$$p(F) = \frac{dP(F)}{dF} = \frac{k(F)}{\dot{F}} \cdot \exp\left(-\int_{F(0)}^F \frac{k(F')}{\dot{F}} dF'\right) \quad (6.3)$$

6. Bestimmung kraftabhängiger Raten

Aus dieser Gleichung wird ersichtlich, dass die Verteilung experimentell gemessener Entfaltungs- oder Rückfaltungskräfte abhängig ist von der Kraftabhängigkeit der Übergangsrate sowie vom zeitlichen Verlauf der Kraft, der sogenannten Kraftladungsrate \dot{F} .

In AFM-Experimenten bei konstanter Piezogeswindigkeit v_p kann die zeitliche Veränderung der auf die untersuchte Probe wirkenden Kraft F entsprechend der Ausführungen in Kapitel 3.2, insbesondere Gleichung 3.8, berechnet werden. Dazu wird $z(t) = v_p \cdot t$ in $F(z, L)$ eingesetzt, wodurch man $F(t, L)$ erhält. Die Kraftladungsrate \dot{F} ergibt sich dann auf analytische Weise direkt durch Ableitung dieser Funktion nach t .

Ist die Kraftladungsrate \dot{F} bekannt, kann die Übergangswahrscheinlichkeitsverteilung $p(F)$ (Gleichung 6.3) durch Integration, Logarithmierung und Differentiation nach $k(F)$ aufgelöst werden.

$$\int p(F) dF = 1 - \exp \left(- \int_{F(0)}^F \frac{k(F')}{\dot{F}'} dF' \right) \quad (6.4)$$

$$\ln \left(1 - \int p(F) dF \right) = - \int_{F(0)}^F \frac{k(F')}{\dot{F}'} dF' \quad (6.5)$$

$$-\frac{p(F)}{1 - \int p(F) dF} = - \frac{k(F)}{\dot{F}} \quad (6.6)$$

$$\frac{p(F) \cdot \dot{F}}{1 - \int p(F) dF} = k(F) \quad (6.7)$$

Mit Hilfe von Gleichung 6.7 ist es also möglich, aus einer gemessenen Verteilung von Entfaltungs- oder Rückfaltungskräften direkt die kraftabhängigen Raten zu extrahieren.

Diese Methode kann jedoch nur unter gewissen Voraussetzungen angewandt werden, die auch bereits direkt aus der Rechnung ersichtlich sind:

- Aufgrund der unteren Integrationsgrenze $F(0)$ in der Gleichung für die Übergangswahrscheinlichkeitsverteilung (6.3) dürfen nur Einzelmessungen in einer Kraftverteilung zusammengefasst werden, deren Anfangskraft $F(0)$ gleich ist. Daraus folgt insbesondere, dass in Messungen, die mehrere Entfaltungs-/Rückfaltungsübergänge aufweisen, nur das erste Ereignis berücksichtigt werden darf, weil für die übrigen eine vom vorangegangenen Ereignis abhängende Anfangskraft gilt.
- Die Berechnung der Kraftladungsrate \dot{F} hängt von der Polymerelastizität F_{WLC} ab und daher auch von deren Parametern (siehe Kapitel 3). Während für mehrere Einzelmessungen eines Experiments die Persistenzlänge p und die Temperatur T in der Regel als konstant angenommen werden können, kann die Konturlänge L zwischen Einzelmessungen variieren. Um Gleichung 6.7 anwenden zu können, dürfen

aber nur solche Einzelmessungen zu einer Kraftverteilung zusammengefasst werden, die im Messverlauf ausgehend von $F(0)$ bis zum Übergangsereignis dieselbe gemeinsame Konturlänge L aufweisen.

Für die experimentelle Untersuchung von langsamen Entfaltungs-/Rückfaltungsübergängen, deren Raten im Vergleich zur experimentellen Zeitskala so klein sind, dass die Übergänge fern vom Ratengleichgewicht stattfinden – das ist für die meisten Proteindomänen der Fall –, ist der erste Punkt automatisch erfüllt. Der zweite Punkt dagegen ist selten exakt erfüllt, da sich die Konturlänge L aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit der Anbindung der Probe an die Blattfeder für jede Einzelmessung verändert. In gut definierten Systemen (z.B. durch spezifische Anbindung der Probe) und durch entsprechende Selektion der Messkurven kann diese Schwankung so klein sein, dass die Konturlänge dennoch als konstant angenommen werden kann.

6.2. Kraftabhängige Raten aus Messungen bei konstanter Kraft

In AFM-Experimenten bei konstanter Kraft werden die Raten für Übergänge von einem Zustand in einen anderen in der Regel durch die Messung der Lebensdauer bestimmt, d.h. der Zeit, die das untersuchte Molekül bei angelegter Kraft im Ausgangszustand verweilt, bevor der Übergang stattfindet. Die Wahrscheinlichkeitsverteilung für die Lebensdauer τ , die durch Differentiation aus Gleichung 6.1 folgt, hängt exponentiell von der Übergangsrates k ab:

$$p(\tau) = k \cdot \exp(-k \cdot \tau), \quad (6.8)$$

so dass k durch Anpassen dieser Funktion an das aus einer Reihe von gemessenen Lebensdauern $\{\tau_n\}$, $n \in \{1, 2, \dots, N\}$ gebildete Histogramm bestimmt werden kann.

Ein direkterer Weg der Auswertung ergibt sich, wenn die Gleichung 6.8 auf den gesamten Datensatz $\{\tau_n\}$ gemessener Lebensdauern angewandt und so die Wahrscheinlichkeit berechnet wird, genau diesen Datensatz gemessen zu haben:

$$\begin{aligned} p(\{\tau_n\}) &= \prod_n p(\tau_n) = k^N \cdot \exp\left(-k \cdot \sum_{n=1}^N \tau_n\right) \\ &= \left(k \cdot \exp\left(-k \cdot \frac{1}{N} \cdot \sum_{n=1}^N \tau_n\right)\right)^N = (k \cdot \exp(-k \cdot \tau_\emptyset))^N = p(\tau_\emptyset)^N, \end{aligned} \quad (6.9)$$

wobei $\tau_\emptyset = \frac{1}{N} \cdot \sum_{n=1}^N \tau_n$ ist. Betrachtet man Gleichung 6.9 als Funktion von k , stellt diese Gleichung die Likelihood-Funktion für k bei gegebenem Datensatz $\{\tau_n\}$ dar. Diejenige

6. Bestimmung kraftabhängiger Raten

Rate k , die $p(\{\tau_n\})$ maximiert, hat am wahrscheinlichsten die Lebensdauern $\{\tau_n\}$ verursacht. Durch Ableiten erhält man das Maximum der Funktion $(k \cdot \exp(-k \cdot \tau_\emptyset))^N$; es befindet sich bei

$$k = \frac{1}{\tau_\emptyset} = \frac{N}{\sum_{n=1}^N \tau_n}. \quad (6.10)$$

Da am Ende einer jeden Lebensdauer τ_n ein Übergangsereignis steht, gibt die Zahl der gemessenen Lebensdauern N gleichzeitig die Zahl an gemessenen Übergangsereignissen an. Gleichung 6.10 zeigt demnach, dass die Übergangsrate dem Verhältnis der Zahl von gemessenen Übergangsereignissen zur gesamten gemessenen Verweildauer im Ausgangszustand des Überganges entspricht. Dabei ist es unerheblich, ob die gemessenen Lebensdauern aus einer oder mehreren Einzelmessungen eines oder mehrerer Experimente stammt, solange am gleichen Proteinkonstrukt bei derselben Kraft gemessen wurde. Es ist folglich möglich, Messwerte verschiedener Messungen kumuliert auszuwerten.

Aus jedem Datensatz, der bei einer bestimmten Kraft gemessen wurde, kann auf diese Weise eine Rate ermittelt werden. Um Informationen über die Kraftabhängigkeit der Rate zu messen, müssen Messungen bei verschiedenen Kräften erfolgen, die jeweils eine weitere kraftabhängige Rate liefern.

6.2.1. Zerlegung von Messungen bei variabler Kraft zu Messungen bei quasi-konstanter Kraft

Wie Oberbarnscheidt *et al.* gezeigt haben, können für die zuvor geschilderte Art der Auswertung von Experimenten bei konstanter Kraft auch AFM-Experimente herangezogen werden, die bei konstanter Piezugeschwindigkeit und somit bei sich verändernder Kraft gemessen wurden [77]. Dazu werden die Messungen in so kleine Abschnitte der Dauer Δt aufgeteilt, dass für einen einzelnen Abschnitt die angelegte Kraft als konstant angenommen werden kann. In der Praxis ist das kleinstmögliche Δt durch die Abtastrate f_s gegeben; durch Wahl von $\Delta t = 1/f_s$ besteht dann jeder Abschnitt aus genau einem Messwert. Jeder einzelne Abschnitt kann als unabhängiges Bernoulli-Experiment mit der Fragestellung betrachtet werden, ob in einer Zeit Δt ein Übergang stattfindet oder nicht. Die Wahrscheinlichkeit für die Häufigkeit eines Übergangs innerhalb der Zeit Δt ist dann poissonverteilt. Da sie stochastisch voneinander unabhängig sind, können alle diejenigen Abschnitte, die bei derselben Kraft gemessen wurden (auch wenn sie aus unterschiedlichen Einzelmessungen stammen), zu einem langen poissonverteilten Experiment zusammengefügt werden. Die Übergangsrate $k(F)$ bei einer bestimmten Kraft F lässt sich dann wie in Gleichung 6.10 aus dem Quotienten aus der Zahl $N(F)$ dieser Übergänge bei dieser Kraft und der Gesamtdauer des aus den $M(F)$ bei dieser Kraft ge-

messenen Abschnitten zusammengesetzten Experiments berechnen. Es gilt

$$k(F) = \frac{N(F)}{M(F) \cdot \Delta t}. \quad (6.11)$$

6.2.2. Fehlerbetrachtung bezüglich der Berechnung kraftabhängiger Raten

Über die Methode von Oberbarnscheidt *et al.* hinausgehend soll betrachtet werden, mit welcher Sicherheit die zugrundeliegende Rate k aus der gemessenen Anzahl N von Übergängen und der Anzahl M von Einzelmessungen der Dauer Δt bestimmt werden kann.

Als Ergebnis jeder der M Einzelmessungen werden nur zwei Zustände unterschieden: Entweder liegt ein Übergang vor oder nicht. Die Wahrscheinlichkeit, dass in einer Messung der Dauer Δt kein Übergang vorliegt, ist von der Rate k abhängig und beträgt $\exp(-k \cdot \Delta t)$. Die Wahrscheinlichkeit des Gegenereignisses, dass also mindestens ein Übergang vorliegt, beträgt dann $1 - \exp(-k \cdot \Delta t)$. Die Gesamtwahrscheinlichkeit für das Vorliegen von N Messungen mit Übergängen und $M - N$ Messungen ohne Übergänge ergibt sich aus dem Produkt der Einzelwahrscheinlichkeiten:

$$L(k) = (1 - \exp(-k \cdot \Delta t))^N \cdot \exp(-k \cdot \Delta t)^{M-N} \quad (6.12)$$

Diese Funktion stellt eine Likelihood-Funktion für k bei gegebenen N und M und festem Δt dar und wird daher von derjenigen Rate k maximiert, die am wahrscheinlichsten für die Beobachtung von N Übergängen in M Messungen ursächlich ist. Das Maximum wird durch Ableiten bestimmt und liegt bei

$$k_{\max} = -\frac{\ln\left(1 - \frac{N}{M}\right)}{\Delta t}. \quad (6.13)$$

Die Abweichung dieser Lösung von $k_{\max} = \frac{N}{M \cdot \Delta t}$ (vgl. Gleichung 6.11) erklärt sich daraus, dass die gesamte gemessene Dauer $T = M \cdot \Delta t$ in M diskrete Einzelmessungen mit endlicher Dauer Δt aufgeteilt ist. Für sehr kleine Δt wird M sehr groß und folglich $\frac{N}{M}$ sehr klein, so dass $\ln\left(1 - \frac{N}{M}\right) \approx -\frac{N}{M}$ gilt und die beiden Lösungen quasi identisch sind.

Um die Varianz der auf diese Weise abgeschätzten Rate k_{\max} zu bestimmen, kann man $L(k)$ als (nicht normierte!) Wahrscheinlichkeitsverteilung von k auffassen. Die Varianz ergibt sich dann gemäß

$$\text{Var}(k_{\max}) = \frac{\int (k - k_{\max})^2 L(k) dk}{\int L(k) dk}. \quad (6.14)$$

Die Lösung dieser Integrale ist rechnerisch aufwendig und nur numerisch möglich. Alternativ dazu kann die Likelihood-Funktion um ihr Maximum bei k_{\max} herum entwickelt

6. Bestimmung kraftabhängiger Raten

werden. Zur Vereinfachung der Differentiation wird zunächst der Logarithmus der Likelihood-Funktion betrachtet. Dessen Entwicklung lautet:

$$\ln L(k) = \ln L(k_{\max}) + (k - k_{\max}) \frac{d \ln L}{dk} \Big|_{k=k_{\max}} + \frac{1}{2} (k - k_{\max})^2 \frac{d^2 \ln L}{dk^2} \Big|_{k=k_{\max}} + \dots \quad (6.15)$$

Die erste Ableitung ist an der Stelle $k = k_{\max}$ Null, da k_{\max} ein Maximum von $L(k)$ und also auch von $\ln L(k)$ ist, und fällt daher weg. Die zweite Ableitung ist

$$\frac{d^2 \ln L}{dk^2} \Big|_{k=k_{\max}} = -N \cdot \Delta t^2 \frac{\exp(-\Delta t \cdot k_{\max})}{(1 - \exp(-\Delta t \cdot k_{\max}))^2}. \quad (6.16)$$

Nach dem quadratischen Term wird die Entwicklung abgebrochen.

Für die nicht-logarithmierte Likelihood-Funktion $L(k)$ folgt somit

$$L(k) \approx k_{\max} \cdot \exp \left(-\frac{1}{2} (k - k_{\max})^2 \left[N \cdot \Delta t^2 \frac{\exp(-\Delta t \cdot k_{\max})}{(1 - \exp(-\Delta t \cdot k_{\max}))^2} \right] \right). \quad (6.17)$$

Daraus wird ersichtlich, dass $L(k)$ als Gaussfunktion genähert werden kann mit dem Maximum bei k_{\max} und einer Varianz von

$$\sigma^2 = \frac{(1 - \exp(-\Delta t \cdot k_{\max}))^2}{N \cdot \Delta t^2 \cdot \exp(-\Delta t \cdot k_{\max})} = \frac{N}{\Delta t^2 \cdot M^2 \cdot \left(1 - \frac{N}{M}\right)}. \quad (6.18)$$

Die Standardabweichung σ stellt dann ein Maß für die Sicherheit dar, mit der aus N und M bei festem Δt die Rate k bestimmt werden kann.

7. Auswertung schneller Entfaltungs-/ Rückfaltungsübergänge

Bei der Untersuchung der mechanischen Funktion eines Proteins ist von besonderem Interesse, die Raten für Konformationsübergänge (in der Regel Entfaltungs- und Rückfaltungsübergänge) zu bestimmen, da sie Erkenntnisse darüber ermöglichen, wie (schnell) ein Protein auf gewisse äußere Einflüsse reagiert. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Raten davon abhängen, aus welchem Zustand ein Übergang startet und in welchem Zustand er endet, insbesondere welche Kraft bei diesen Zuständen anliegt. In klassischen kraftspektroskopischen Experimenten mit dem AFM wird über eine Blattfeder, die mit konstanter Geschwindigkeit bewegt wird, an dem zu untersuchenden Proteinkonstrukt gezogen. Die dabei auf das Protein wirkende Kraft verändert sich daher mit der Zeit, und somit verändern sich auch die Raten: Je größer die Kraft wird, desto schneller entfaltet das Protein; je geringer sie ist, desto schneller faltet es zurück. Bei der Bestimmung der Raten ist also darauf zu achten, dass sie in Abhängigkeit von den experimentellen Parametern, insbesondere von der Kraft angegeben werden. Idealerweise ist das Ziel der Auswertung, Erkenntnisse über die Kraftabhängigkeit der Raten zu gewinnen und als zwischen verschiedenen Proteinen vergleichbare Größe die Raten im kraftfreien Fall (wenn keine Kraft auf das Protein ausgeübt wird) angeben zu können.

Da eine Rate einen stochastischen Prozess beschreibt, muss zu ihrer Bestimmung eine Vielzahl von Übergangsereignissen gemessen werden, über die dann ein statistischer Mittelwert gebildet werden kann. Typischerweise befinden sich im kraftfreien Fall einzelne Proteindomänen in gefaltetem Zustand und weitab vom Entfaltungs-/Rückfaltungsratengleichgewicht [5]: Ihre Entfaltungsrate ist sehr klein im Vergleich zur Rückfaltungsrate, so dass sich auf der experimentellen Zeitskala keine Übergangsereignisse beobachten lassen. Werden im Experiment die Ausdehnung und damit auch die Kraft kontinuierlich erhöht, verschiebt sich das Ratenverhältnis (vgl. Kapitel 4), bis Entfaltungs- und Rückfaltungsrate einander entsprechen. Beide Raten sind dann zwar ähnlich, doch wenn sie klein im Vergleich zur Piezugeschwindigkeit des AFM sind, findet in der kurzen Zeit, für die Ratengleichheit herrscht, weiterhin kein Entfaltungsübergang statt. Erst nachdem die Kraft weiter gestiegen ist, entfaltet die Domäne. Typischerweise ist bei dieser hohen Kraft die Rückfaltungsrate so gering, dass keine Rückfaltung mehr beobachtet werden kann. Pro Messung kann dann nur eine Entfaltung beobachtet werden (vgl. Abb. 7.1, links). Analog kann in Experimenten, in denen eine entfaltete Proteindomäne kontinuierlich relaxiert wird, typischerweise nur ein Rückfaltungsereignis beobachtet werden. In letzterem Fall wird die Messung zudem dadurch erschwert, dass die

7. Auswertung schneller Entfaltungs-/Rückfaltungsübergänge

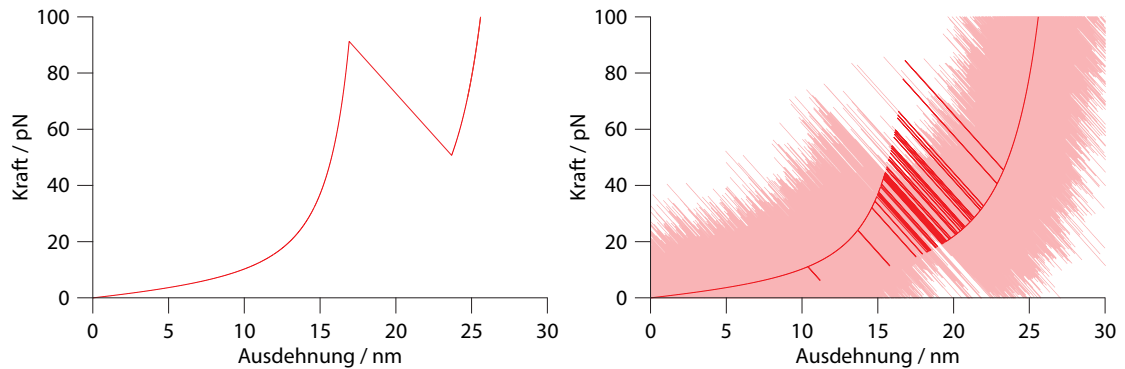


Abbildung 7.1. Simulierte Beispiele für Übergangereignisse in Kraft-Ausdehnungs-Daten. **Links:** Die Ziehgeschwindigkeit ist so hoch, dass eine Entfaltung erst weit jenseits des Raten-gleichgewichts stattfindet; eine Rückfaltung findet dann nicht statt. **Rechts:** Bei langsamen Ziehgeschwindigkeiten können im Bereich des Raten-gleichgewichts mehrere Entfaltungs- und Rückfaltungsübergänge stattfinden; hellrot sind dieselben Werte mit zusätzlichem Rauschen aufgetra-gen.

Rückfaltung dann erst bei sehr geringen Kräften stattfindet, die nahe oder jenseits der Auflösungsgrenze des AFM sein können.⁶

Zahlreiche in schnellem Wechsel aufeinanderfolgende Entfaltungs- und Rückfaltungsereignisse (Abb. 7.1, rechts, rote Werte) lassen sich nur dann beobachten, wenn die Piezo-geschwindigkeit des AFM so klein ist, dass der Bereich, in dem Entfaltungs- und Rückfal-tungsrate einander ähnlich sind, langsam genug durchlaufen wird, um ein Stattfinden der Übergänge zu ermöglichen. In der Praxis sind der Piezugeschwindigkeit jedoch Grenzen nach unten dadurch gesetzt, dass sowohl die Anfälligkeit der Messung für Driftphäno-mene als auch die Wahrscheinlichkeit einer Dissoziation des Proteins von der Blattfeder zunehmen. Mit dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten AFM sind Mes-sungen bis zu einer unteren Piezugeschwindigkeit von etwa 1 nm/s möglich.

Neben der Piezoeschwindigkeit entscheidet auch die Auflösung des AFM darüber, ob die Raten gemessen werden können. Während die relative Position der Blattfeder zur Oberfläche, an der die Probe haftet, über ein Piezo-System verhältnismäßig präzise bestimmt werden kann, ist das gemessene Kraftsignal zwangsläufig durch thermisches Rauschen beeinflusst, das abhängig von Resonanzfrequenzen des Systems (im Wesentli-chen der Blattfeder) das Kraftsignal überlagert (Abb. 7.1, rechts, hellrote Werte). Ist der gemessene Unterschied zwischen gefaltetem und ungefaltetem Zustand nicht groß ge-nug, dass die Übergänge eindeutig vom thermischen Rauschen zu unterscheiden sind, setzt die Auswertung der Daten dabei an, zunächst das Signal vom thermischen Rau-schen zu trennen. Ein übliches Verfahren, die Daten zu „glätten“ (vom Rauschen zu

⁶Ein Beispiel, wo es durch sehr langsame Piezoeschwindigkeiten und eine spezielle *Lock-in*-Filtertechnik gelungen ist, die Auflösung des AFM ausreichend zu verbessern, dass Rückfaltungen einer vollständigen Proteindomäne gegen eine angelegte Kraft gemessen werden konnten, findet sich in [96].

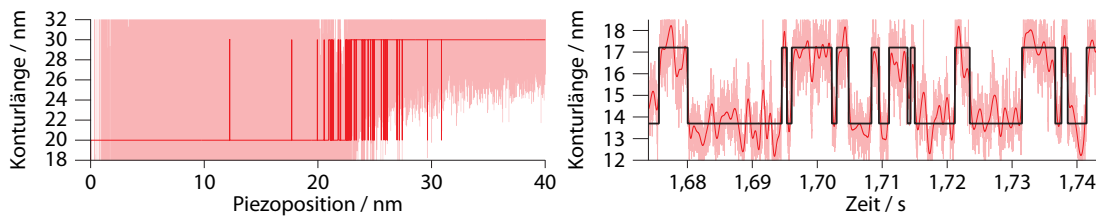


Abbildung 7.2. Links: Transformation der in Abb. 7.1, rechts, gezeigten Werte in Konturlängen. Rechts: An $\text{My12Ca}(\text{GB1})_2$ gemessene und in Konturlängen umgerechnete Daten (vgl. Kapitel 11.1; hellrot: Originaldaten, rot: gefilterte Daten); die schwarze Kurve ist eine mit Hilfe eines speziellen Hidden-Markov-Modells (siehe Kapitel 5.2) aus den Originaldaten rekonstruierte Zustandsabfolge.

befreien), besteht darin, einen Tiefpassfilter (bei guter Kenntnis des Signals eventuell auch einen Bandpassfilter) anzuwenden, der die Frequenzbereiche, in denen nicht mit einem Signal zu rechnen ist, ausblendet und so das Signal/Rausch-Verhältnis verbessert. Für schnelle Übergänge, die den gesamten durch die Resonanzfrequenz der Blattfeder definierten messbaren Frequenzbereich ausfüllen, kann auf diese Weise nicht gefiltert werden. Bei solchen Daten kann über ein Hidden-Markov-Modell (siehe Kapitel 5) versucht werden, die den verrauschten Messdaten zugrundeliegende „versteckte“ Abfolge von Faltungszuständen zu bestimmen. Die durch das Hidden-Markov-Modell rekonstruierte Sequenz entspricht dann einem perfekt gefilterten reinen Signal. Da es sich bei dem Hidden-Markov-Modell um ein probabilistisches Verfahren handelt, ist nicht garantiert, dass die rekonstruierte Sequenz der realen Zustandsfolge entspricht, es liefert aber auf objektivierte Weise diejenige Abfolge, die mit größter Wahrscheinlichkeit die gemessenen Daten generiert hat.

Bei der Auswertung der schnellen Entfaltungs-/Rückfaltungsübergänge der α -Helix α^{12} , deren Ergebnisse in Kapitel 11 vorgestellt werden, ist wie folgt vorgegangen worden:

1. Zunächst wurden die gemessenen Kraft-Positions-Daten entsprechend den in Kapitel 3.2 angegebenen Gleichungen in Konturlängen umgerechnet. Der Grund dafür ist, dass die Konturlänge die einzige Messgröße ist, die direkt mit verschiedenen Konformationszuständen korreliert ist: Durch eine Entfaltung nimmt die Konturlänge zu, durch eine Rückfaltung ab. Dem Hidden-Markov-Modell kann daher mit der Konturlänge eine Größe übergeben werden, die je Zustand konstant ist und daher die erforderlichen konstanten Emissionsverteilungen (siehe Punkt 4 der Aufzählung auf Seite 26) ermöglicht.⁷

⁷Genau genommen sind die Emissionsverteilungen auch für die Konturlänge nicht exakt konstant, da die Breite der Verteilung, die sich aus der Breite des thermischen Rauschens ergibt, kraftabhängig ist: Bei je höherer Kraft das System aus Blattfeder und Proteinprobe eingespannt ist, desto schmaler wird das Rauschen. Die Veränderung in der Breite des Rauschens ist in dem für die vorgestellten Messungen relevanten Kraftbereich aber derart gering, dass von konstanten Emissionsverteilungen ausgegangen werden kann.

7. Auswertung schneller Entfaltungs-/Rückfaltungsübergänge

2. Anschließend wurde mit Hilfe eines für zeitabhängige Übergangswahrscheinlichkeiten modifizierten Hidden-Markov-Modells und zunächst grob geschätzten Parametern die wahrscheinlichste Abfolge von Faltungszuständen der α -Helix bestimmt. Hidden-Markov-Modelle gehen in der Regel von konstanten Wahrscheinlichkeiten für Übergänge zwischen Zuständen aus; da im Fall eines AFM-Experimentes bei konstanter Piezogeswindigkeit die Kraft kontinuierlich verändert wird, ist auch die jeweilige Übergangswahrscheinlichkeit nicht konstant. Allgemeine Hidden-Markov-Modelle sowie die vorgenommene Modifikation sind in Kapitel 5 bzw. 5.2 dargestellt.
3. Da jedem Faltungszustand eindeutig eine Konturlänge entspricht, kann aus der Zustandsfolge frei von jedem Rauschen die Konturlänge in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt werden. Daraus kann entsprechend den Gleichungen aus Kapitel 3.2 auf nun perfekt geglättete Kraft-Positions-Daten zurückgerechnet werden.
4. Aus mehreren auf die beschriebene Weise geglätteten Datensätzen wurden schließlich mit Hilfe der in Kapitel 6 vorgestellten Methode durch Vergleich der Zahl von Übergängen bei einer bestimmten Kraft mit der kumulierten Aufenthaltsdauer bei dieser Kraft die kraftabhängigen Entfaltungs- und Rückfaltungsraten bestimmt.
5. Aus diesen Raten wurden angepasste Werte für die zeitabhängigen Übergangswahrscheinlichkeiten des modifizierten Hidden-Markov-Modells berechnet, was einen Ersatz für den Optimierungsschritt des Baum-Welch-Algorithmus für Standard-HMM darstellt (vgl. Kapitel 5.1.2, insbesondere Gleichung 5.23, und im Pseudocode auf Seite 106 die Zeilen 46ff., insbesondere Zeile 56). Die übrigen Parameter wurden entsprechend dem Baum-Welch-Algorithmus neu bestimmt, so dass die Auswertung ab Schritt 2. mit verbesserten Werten wiederholt werden kann. Das Verwenden der Werte aus dem ersten Durchlauf führte zu nur unwesentlich veränderten Ergebnissen im zweiten Durchlauf, so dass auf weitere Durchläufe verzichtet wurde.⁸

⁸Auch weitere unabhängige Durchläufe mit verschiedenen grob geschätzten Parametern (im Rahmen dessen, was noch als sinnvoll angenommen werden kann) zeigten kaum Veränderungen im Endresultat, so dass davon ausgegangen werden kann, dass das Verfahren auch ohne Optimierung relativ robuste Werte liefert.

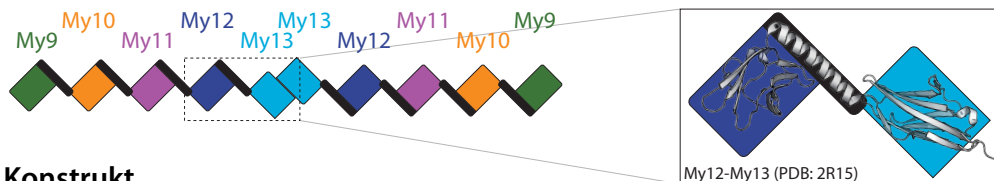
Teil III.

Ergebnisse

8. Mechanische Stabilität der C-terminalen Myomesin-Domänen My9-My13

Als Muskelprotein der sarkomerischen M-Bande unterliegt Myomesin regelmäßig infolge von Muskelkontraktion und -relaxation dem Einfluss externer Krafteinwirkung (vgl. auch Kapitel 1 und 2). Den fünf C-terminalen Domänen My9-My13 kommt dabei besondere elastische Funktion zu. Zum einen legen elektronenmikroskopische Untersuchungen nahe, dass nur der C-terminale Teil Myomesins parallel zur Kontraktionsrichtung des Sarkomers ausgerichtet ist und daher mehr Krafteinwirkung erfährt als der N-terminale Teil, der eher senkrecht dazu orientiert ist [1]. Zum anderen hat Röntgenstrukturanalyse ergeben, dass die Domänen My9-My13 durch an dieser Stelle ungewöhnliche α -Helices miteinander verbunden sind, von denen vermutet wird, dass sie einen speziellen Beitrag zur Myomesin-Elastizität liefern [85]. Im folgenden werden Ergebnisse von AFM-Messungen an My9-My13 vorgestellt, wie es im humanen Myomesin-Wildtyp vorliegt.

8.1. Kraftspektroskopie an My9-My13



Das Konstrukt

Bei den Myomesin-Domänen My9-My13 handelt es sich um Domänen des Immunglobulin-artigen Faltungstyps, durch den eine ganze Familie von Proteindomänen ähnlicher Struktur definiert wird. Immunglobulin-Domänen (Ig-Domänen) bestehen aus ca. 70-110 Aminosäuren und bilden zwei aus jeweils vier antiparallelen β -Strängen bestehende β -Faltblätter aus, die sich gegeneinander leicht verdreht „sandwichartig“ gegenüberliegen [16]. Der Ig-artige Faltungstyp ist sehr verbreitet, mit 765 identifizierten Genen sind Ig-Domänen die häufigsten im gesamten menschlichen Proteom [63]. Auch zahlreiche Proteine mit mechanischer Funktion bestehen (zum Teil) aus Ig-Domänen, wie z.B. das riesige Muskelprotein Titin, das 112 Ig-Domänen aufweist [62], oder das aktinbindende Protein Filamin mit 24 Ig-Domänen [76]. Von den 13 Domänen Myomesins sind sieben (neben den fünf C-terminalen Domänen My9-My13 auch My2 und My3) vom Ig-Faltungstyp [114]. Die β -Sandwich-Struktur der Ig-Domänen sorgt für eine vergleichsweise hohe mechanische Stabilität mit typischen Entfaltungskräften in der Größenord-

8. Mechanische Stabilität der C-terminalen Myomesin-Domänen My9-My13

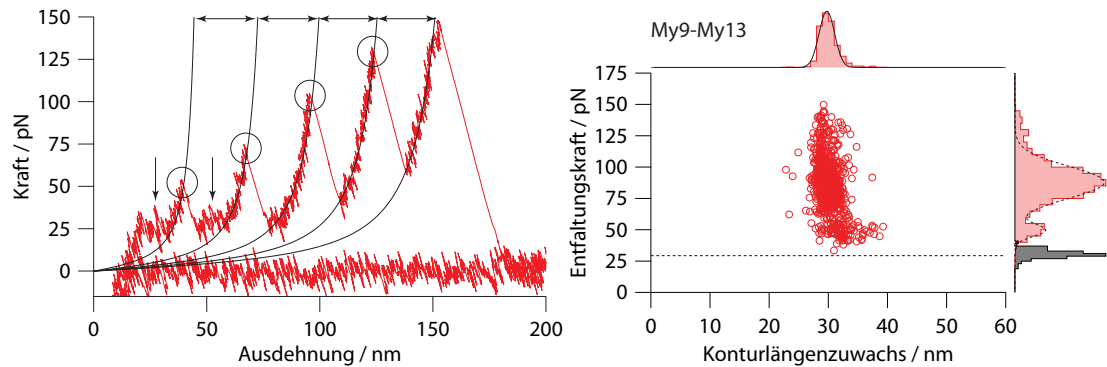


Abbildung 8.1. Links: Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve einer Messung an My9-My13. Die Kreise markieren Entfaltungsereignisse, die schwarzen Kurven sind *Worm-like-Chain*-Fitkurven, mit deren Hilfe die jeweiligen Konturlängenzuwächse (Doppelpfeile) gemessen werden. Die schwarzen Pfeile weisen auf das Kraftplateau; findet die erste Entfaltung bei geringer Kraft statt, erscheint das Plateau nach der Entfaltung erneut. Rechts: Die gemessenen Entfaltungskräfte gegen den jeweils zugehörigen Konturlängenzuwachs aufgetragen. Oben und rechts sind die entsprechenden Verteilungen dargestellt. An die Längenverteilung lässt sich eine Normalverteilung anpassen (durchgezogene schwarze Kurve); die Kraftverteilung ist zur Bestimmung der in den beiden Maxima enthaltenen Datenpunkte durch die Summe zweier Normalverteilungen angenähert worden (gestrichelte schwarze Kurve). Die gestrichelte horizontale Linie gibt die mittlere Plateaukraft an, deren Verteilung rechts (grau) dargestellt ist.

nung einiger weniger hundert Piconewton, wie auch im Allgemeinen Proteine mit hohem β -Faltblatt-Anteil mechanisch stabiler sind als solche mit größeren α -helikalen Anteilen [26].

Zwischen den Ig-Domänen My9-My13 befinden sich α -Helices, welche die Domänen miteinander verbinden. Dabei weisen die vier Helices Wechselwirkungsgrenzflächen zur jeweils N-terminal angrenzenden Domäne sowie unterschiedliche Längen von 4-6 Windungen auf; zumindest für die beiden längeren Helices α^{10} und α^{12} sind zwei der sechs Windungen vollständig lösungsmittel exponiert [86]. Ein solches Faltungsmotiv α -helikaler Verbindungen zwischen Ig-Domänen ist bisher bei keinem anderen Protein beobachtet worden [85].

Ebenso wie das vollständige My1-My13 dimerisiert das Konstrukt My9-My13 über eine Dimerisierungsgrenzfläche der Domäne My13. Die verbindenden Wechselwirkungen finden dabei zwischen den zwei N-terminalen β -Strängen der beiden My13-Domänen statt [85].

Die Ergebnisse

Kraftspektroskopische Messungen an My9-My13 wurden zunächst bei einer Ziehgeschwindigkeit von $1 \mu\text{m/s}$ durchgeführt. Die gemessenen Kraft-Ausdehnungs-Kurven weisen das typische Sägezahnmuster sequentieller Entfaltung einzelner Proteindomänen auf (vgl. Abb. 8.1, links). Die Entfaltungskräfte werden an den Scheitelpunkten der

Kraftanstiege bestimmt (Kreise in der Abbildung). Zu jedem Kraftanstieg wird zudem die Konturlänge des aktuell entfaltenen Anteils des untersuchten Einzelmoleküls durch Anpassen einer Fitkurve entsprechend dem WLC-Modell (vgl. Kapitel 3.1) ermittelt. Aus der Differenz zweier aufeinanderfolgender Konturlängen kann so der Konturlängenzuwachs bestimmt werden, der sich aus einer Entfaltung ergibt. Die Verteilung der so gemessenen Konturlängenzuwächse ist um einen Wert von $29,7 \pm 0,04$ nm ($n = 965$) in guter Näherung normalverteilt (vgl. Abb. 8.1, rechts). Die Entfaltungskräfte dagegen weisen keine Normalverteilung auf, sondern folgen einer Verteilung, wie sie sich entsprechend Gleichung 6.3 in Kapitel 6.1 ergibt. Der Maximalwert der Verteilung, d.h. die wahrscheinlichste Entfaltungskraft, liegt bei $87,9 \pm 0,3$ pN ($n \approx 723$). Deutlich ist in der Verteilung ein weiteres, lokales Maximum bei $49,6 \pm 0,2$ pN ($n \approx 241$) zu erkennen. Bestimmt man näherungsweise die Flächenanteile an der Verteilung, die auf das Hauptmaximum und auf das kleinere lokale Maximum zu beziehen sind, ergibt sich ein Verhältnis von 3 zu 1.

Insgesamt können in einzelnen Messkurven bis zu sechs Domänenentfaltungen identifiziert werden; dieser Fall tritt allerdings nur selten auf. Am häufigsten sind Kurven mit fünf, vier und drei Entfaltungen; Kurven mit weniger Entfaltungen wurden in der Regel nicht zur Analyse herangezogen. Ausnahmen sind einige Kurven mit zwei Entfaltungen, die ein sehr klares Kraftplateau (siehe dazu nächster Absatz) aufweisen.

In allen Messkurven ist innerhalb des ersten Kraftanstiegs bei einer Kraft von etwa 30 pN ein Bereich nahezu konstanter Kraft zu erkennen, der im folgenden als Kraftplateau bezeichnet werden soll. Durch Extraktion aller Kraftplateaus aus den Messkurven erhält man die um einen Mittelwert von $29,6 \pm 0,6$ pN recht scharf verteilte Plateaukraft (vgl. schwarze Verteilung in Abb. 8.1, rechts).

Um das Kraftplateau detaillierter zu untersuchen, wurden weitere Messungen bei auf 100 nm/s verringerter Ziehgeschwindigkeit durchgeführt, wobei im Bereich des Plateaus die Geschwindigkeit noch weiter auf 10 nm/s reduziert war (vgl.

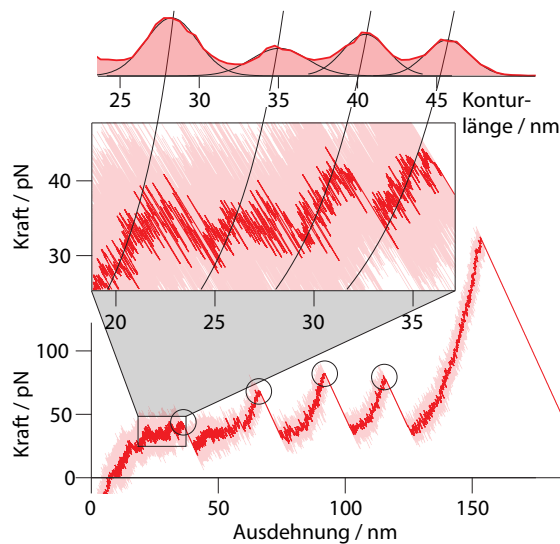


Abbildung 8.2. Unten: Kraft-Ausdehnungs-Daten einer Messung bei langsamer Ziehgeschwindigkeit. Mitte: Die Vergrößerung des Plateaukraftbereichs zeigt, dass nach Filterung der Originaldaten (rote bzw. hellrote Werte) eine Unterstruktur erkennbar ist. Die schwarzen Kurven sind WLC-Anpassungen. Oben: Zu allen Datenpunkten können die zugehörigen Konturlängen berechnet werden, deren Verteilung im Histogramm dargestellt ist. Die Verteilung lässt sich sehr gut durch Normalverteilungen reproduzieren (schwarze Kurven).

Abb. 8.2). Auf diese Weise steigt die Zahl der gemessenen Punkte in diesem Bereich; gleichzeitig erscheint dadurch das Rauschen breiter. Durch einen Mittelungsfilter mit einer Breite von 800 Punkten kann das Rauschen so weit reduziert werden, dass im Bereich des Plateaus Unterstrukturen erkennbar werden (Abb. 8.2, Mitte). Anstelle der konstant scheinenden Kraft weist das Plateau Übergänge zwischen distinkten Konturlängen auf. Die entsprechenden Konturlängen lassen sich klar mit Hilfe von an das Konturlängenhistogramm angepassten Normalverteilungen bestimmen (Abb. 8.2, oben). Zudem sind trotz der Filterung schnell aufeinanderfolgende Übergänge zwischen den verschiedenen durch die Konturlänge definierten Zuständen zu erkennen (Abb. 8.2, Mitte).

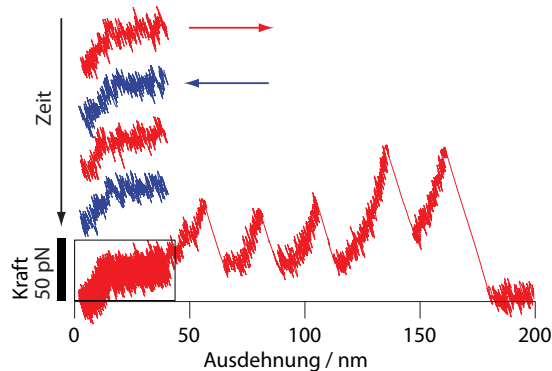


Abbildung 8.3. Kraft-Ausdehnungs-Daten einer Messung an My9-My13, in deren Bewegungsablauf im Bereich des Kraftplateaus (schwarz umrandet) Ausdehnungs- (rot) und Relaxationszyklen (blau) eingefügt sind. Einzelne Zyklen sind darüber in ihrer zeitlichen Abfolge dargestellt und lassen jeweils das Plateau erkennen.

In manchen Messkurven, deren erste Entfaltung bei vergleichsweise geringer Kraft erfolgt ist, erscheint das Kraftplateau nicht nur vor der ersten, sondern auch zwischen der ersten und zweiten Entfaltung (z.B. Abb. 8.1, links, schwarze Pfeile). Dies ist dann der Fall, wenn die sprunghafte Zunahme der Konturlänge nach der ersten Entfaltung gemäß der WLC-Elastizität eigentlich zu einem Kraftwert führen würde, der unterhalb der Plateaukraft liegt; die Plateaukraft wird jedoch nicht unterschritten, sondern auch bei weiterer Ausdehnung des Proteins in etwa konstant gehalten, bis entsprechend der WLC-Elastizität bei der neuen Konturlänge die Kraft wieder über die Plateaukraft ansteigt.

Veranlasst durch dieses ungewöhnliche Wiederauftreten des Plateaus wurden Messungen durchgeführt, um die Reversibilität des Plateaus genauer zu untersuchen. Hierzu wurde der Bewegungsablauf des Piezostellsystems derart verändert, dass in die ursprünglich kontinuierliche Ausdehnungsbewegung mehrere Zyklen direkt aufeinanderfolgender Ausdehnung und Relaxation in gerade demjenigen Ausdehnungsbereich eingefügt wurden, der das Plateau einschließt (vgl. Abb. 8.3). Ausdehnung und Relaxation, die beide bei einer Geschwindigkeit von 1 $\mu\text{m/s}$ gemessen wurden, zeigen im Kraft-Ausdehnungs-Verlauf keinen messbaren Unterschied: In beiden ist das Plateau deutlich zu erkennen; eine Hysterese zwischen den beiden Bewegungsrichtungen kann nicht festgestellt werden.

8.2. Diskussion der My9-My13-Messungen

Vorweg ist anzumerken, dass nicht damit zu rechnen ist, dass die gemessenen Daten Entfaltungen der Domäne My13 enthalten. Da über diese Domäne das Konstrukt My9-My13 so wie auch der Wildtyp dimerisiert und eine Entfaltung von My13 daher die Dissoziation der Monomere zur Folge hat, würde ein solches Ereignis zu einem völligen Krafteinbruch führen, der sich in den Daten nicht von dem üblicherweise die Messung abschließenden Loslösen der Probe von der AFM-Blattfeder bzw. dem Objektträger unterscheiden lässt (zur Möglichkeit, diese Einschränkung zu umgehen, siehe Kapitel 9.3.2).

Dass nur selten mehr als vier und nie mehr als sechs Entfaltungsspitzen in den Messdaten gemessen wurden, obwohl in einem My9-My13-Dimer ohne Berücksichtigung der My13-Domänen bis zu acht Domänen entfalten könnten, kann bei der großen Anzahl an Messungen nicht darauf zurückgeführt werden, dass die Zahl der zwischen Blattfeder und Objektträger eingespannten Domänen vom zufälligen Aufgreifen der Proben abhängig ist und daher nur selten das gesamte Konstrukt mit Kraft belastet wird. Vielmehr dürfte in Messungen, bei denen ein solcher Abschnitt mit Kraft belastet wird, der die Dimerisierung enthält, diese aufbrechen, bevor alle Domänen entfaltet worden sind. Diese Beobachtung ermöglicht es, die mittlere zu einer Dissoziation des Dimers führende Kraft abzuschätzen: Sie dürfte zwar größer als die Domänenentfaltungskräfte sein, sich aber in derselben Größenordnung wie diese befinden.

Betrachtet man die Ig-Domänen My9 bis My12 und die jeweils C-terminal daran anschließenden α -Helices α^9 bis α^{12} jeweils paarweise als Einheit, was zunächst aufgrund der gemeinsamen Wechselwirkungsgrenzflächen naheliegt, erhält man für die vollständige Entfaltung eines solchen Domäne-Helix-Paares aus der Zahl der Aminosäuren und der Ausdehnung im gefalteten Zustand jeweils einen zu erwartenden Konturlängenzuwachs von 34-36 nm. Dies weicht klar von den gemessenen Zuwächsen, die um etwa 30 nm verteilt sind, ab und ist ein erstes Anzeichen dafür, dass die Domäne-Helix-Paare My9 α bis My12 α nicht als Einheit entfalten. Die gemessenen Zuwächse entsprechen vielmehr den Werten, die man für die N/C-terminale Entfaltung der bloßen, 86-90 Aminosäuren umfassenden Ig-Domänen errechnen würde (siehe hierzu die einzelnen Unterkapitel des Kapitels 9).

Im Vergleich zu β -Faltblatt-domänen wie den Ig-Domänen sind α -helikale Strukturen oft nicht sehr stabil [26, 94], so dass bei den gemessenen Kräften bis 150 pN nicht damit zu rechnen ist, dass die α -Helices gefaltet bleiben; es muss folglich auch ihre Entfaltung zu den gemessenen Konturlängen beitragen. Da dies zwischen den der Entfaltung von Ig-Domänen zugeschriebenen Scheitelpunkten nicht der Fall ist, kann es nur vor der ersten Entfaltung stattfinden. Dort lassen sich Kraftplateaus beobachten, d.h. Bereiche, in denen bei konstanter Kraft die Ausdehnung zunimmt, was eine gleichzeitige Zunahme der Konturlänge bedeutet; diese kann nur durch Entfaltung verursacht sein und muss daher der Entfaltung der α -Helices zugeschrieben werden. Die Messungen, in denen das

8. Mechanische Stabilität der C-terminalen Myomesin-Domänen My9-My13

Kraftplateau besonders langsam durchlaufen wird, bestätigen diese Interpretation, da sie Unterstrukturen erkennen lassen, die eine Aufteilung des Plateaus in diskrete Abschnitte mit jeweils ähnlichem Konturlängenzuwachs von etwa 6 nm nahelegen (Abb. 8.2, oben). Dieser Konturlängenzuwachs steht in guter Übereinstimmung mit für die Entfaltung einer einzelnen Myomesin- α -Helix zu erwartenden Werten.

Die Verteilung der Domänenentfaltungskräfte mit ihrem Maximum bei etwa 90 pN ist wie zu erwarten breit und in einer typischen Größenordnung für Ig-Domänen, vergleichbar mit den Entfaltungskräften Filamins und etwa bei der Hälfte bis einem Viertel der an Ig-Domänen Titins gemessenen Kräfte [93, 103]. Die Entfaltungskraftverteilung weist aber ein zweites Maximum bei wesentlich geringeren Kräften auf. Aus dem Flächenverhältnis von 3 zu 1 der beiden Maxima kann geschlossen werden, dass eine der vier untersuchten Domänen eine signifikant geringere mechanische Stabilität als die anderen aufweist, wobei aus den Daten nicht zu unterscheiden ist, um welche Domäne es sich handelt. Diese Beobachtung ist auch direkt in der Auftragung der Konturlängenzuwächse gegen die jeweils zugehörige Entfaltungskraft zu erkennen (Abb. 8.1, rechts), wo sich eine Untergruppe bei niedrigeren Kräften und breiter gestreuten Längen von der Hauptgruppe unterscheiden lässt.

Im Vergleich zu den Domänenentfaltungskraftverteilungen ist die Plateaukraftverteilung sehr schmal. Die α -Helices entfalten folglich bei Überschreiten eines relativ scharf definierten Schwellenwertes. Die beobachtete Reversibilität des Plateaus bei Verringern der Ausdehnung oder bei einem eigentlich zu erwartenden Abfallen der Kräfte unter die Plateaukraft bedeutet eine Konturlängenabnahme und kann somit nur als Rückfaltung der α -Helices interpretiert werden, die bei Unterschreiten desselben Schwellenwertes erfolgt. Für die Elastizität des gesamten Moleküls bedeutet dies unterhalb von 30 pN eine hohe mechanische Stabilität gefalteter Strukturen verbunden mit der Eigenschaft, oberhalb dieses Wertes reversibel durch Längenzunahme Zugkräften nachgeben zu können.

Die bei langsamen Messungen in den gefilterten Daten des Kraftplateaus zu erkennenden schnell aufeinanderfolgenden Übergänge stellen die rasche Abfolge zahlreicher Entfaltungen und Rückfaltungen einzelner α -Helices dar. Hierbei kann allerdings nicht unterschieden werden, welche der Helices jeweils entfaltet bzw. zurückfaltet. Es muss davon ausgegangen werden, dass jeder der Unterabschnitte des Plateaus, in dem schnelle Übergänge mit Konturlängenunterschieden von etwa 6 nm stattfinden, eine Mischung aus Entfaltungen und Rückfaltungen verschiedener α -Helices darstellt, die sich voneinander nicht unterscheiden lassen. Während also aus den Konturlängen keine getrennte Betrachtung der α -Helices erfolgen kann, obwohl die vier Helices in Länge und Abfolge der Aminosäuren voneinander verschieden sind, lässt sich festhalten, dass alle vier bei nahezu identischer Kraft entfalten und auch zurückfalten.

9. Gesonderte Betrachtung der einzelnen Domäne-Helix-Paare My9 α , My10 α , My11 α und My12 α

Da es sich bei den Domänen My9 α bis My12 α um vier strukturell zueinander sehr ähnliche Ig-Domäne- α -Helix-Paare handelt, lassen sich in den Messdaten, die an My9-My13 erhoben wurden, die einzelnen Domänen und die einzelnen Helices nicht oder nur unzuverlässig voneinander unterscheiden. Zwar sind in der Entfaltungskraftverteilung zu My9-My13 durchaus mindestens zwei Fraktionen zu unterscheiden, und die Helices α^9 und α^{11} sind (mit jeweils 17 Aminosäuren⁹) kürzer als α^{10} und α^{12} (mit 22 bzw. 23 Aminosäuren); aber einzelne Domänenentfaltungen lassen sich aufgrund der stochastischen Verteilung der Entfaltungskraft nicht eindeutig einer Fraktion zuordnen, und die Entfaltungen und Rückfaltungen der verschiedenen α -Helices überlagern und mischen sich untrennbar innerhalb des Kraftplateaus. Daher wurden verschiedene Proteinkonstrukte entworfen, die es ermöglichen, Untersuchungen an einer spezifischen Ig-Domäne, einer spezifischen α -Helix oder einem spezifischen Domäne-Helix-Paar vorzunehmen. Als Prototyp, an dem die umfassendsten Untersuchungen unternommen worden sind, ist My12 α gewählt worden.

9.1. Kraftspektroskopie an (My10 α)₈ und (My12 α)₈



Das Konstrukt

Um im Gegensatz zu den Messungen an My9-My13 kraftspektroskopische Messungen an spezifischen Domänen und α -Helices durchführen zu können, sind Konstrukte entworfen worden, in denen ein Domäne-Helix-Paar achtfach in Serie hintereinander gefügt ist. Diese Homooktamere (My10 α)₈ und (My12 α)₈ sind entsprechend der in Anhang A angegebenen Methode kloniert und anschließend nach molekularbiologischen Standard-Methoden in *E.coli* exprimiert worden. Sie haben aufgrund des verwendeten pET-21-Vektors einen C-terminalen His₆-Tag, über den sie gereinigt wurden und im AFM an der Objektträgeroberfläche haften.

⁹Zur Zahl der Aminosäuren der Helix α^9 siehe Kapitel 9.3.1, insbesondere Fußnote 11 auf Seite 59.

9. Gesonderte Betrachtung der einzelnen Domäne-Helix-Paare My9 α , My10 α , My11 α und My12 α



Abbildung 9.1. Abgleich der Strukturen von My10 α (orange) und My12 α (blau), erstellt mit Hilfe von PyMol (<http://www.pymol.org>).

My12 α und My10 α sind einander sehr ähnlich, ihre Strukturen lassen sich fast perfekt übereinanderlegen (vgl. Abb. 9.1). Beide Domäne-Helix-Paare bestehen aus jeweils 110 Aminosäuren, wobei My10 mit 88 Aminosäuren um eine Aminosäure größer als My12 ist und α^{12} mit 23 Aminosäuren um eine Aminosäure größer als α^{10} ist. Aus der Struktur lassen sich die bei Entfaltung zu erwartenden Konturlängenzuwächse aus der Differenz der Länge der entfalteten Polypeptidkette zur Ausdehnung im gefalteten Zustand berechnen. Für My10 erhält man $88 \cdot 0,365 \text{ nm} -$

$2,73 \text{ nm} = 29,4 \text{ nm}$, für My12 $87 \cdot 0,365 \text{ nm} - 3,09 \text{ nm} = 28,7 \text{ nm}$.

Die Ergebnisse

Kraft-Ausdehnungs-Daten aus kraftspektroskopischen Messungen an $(\text{My10}\alpha)_8$ und $(\text{My12}\alpha)_8$ sind in ihren wesentlichen Merkmalen insofern den an My9-My13 gemessenen Daten ähnlich, als sie wie diese innerhalb des ersten Kraftanstiegs Kraftplateaus aufweisen, an die sich das typische Sägezahnmuster sequentieller Domänenentfaltung anschließt; sie enthalten aber bis zu acht solcher Entfaltungsspitzen. Wie für My9-My13 sind mit Hilfe von WLC-Fitkurven die Konturlängenzuwächse sowie die Entfaltungskräfte der einzelnen Domänenentfaltungen bestimmt worden (vgl. Abb 9.2). Die Mittelwerte der normalverteilten Konturlängenzuwächse betragen für $(\text{My10}\alpha)_8$ und $(\text{My12}\alpha)_8$ $29,6 \pm 0,04 \text{ nm}$ ($n = 523$) bzw. $29,2 \pm 0,06 \text{ nm}$ ($n = 583$); die wahrscheinlichsten Entfaltungskräfte sind $84,2 \pm 0,6 \text{ pN}$ ($n = 523$) bzw. $82,9 \pm 0,7 \text{ pN}$ ($n = 583$).

Außerdem wurden die Kraftplateaus ausgewertet. Die Mittelwerte der Plateaukräfte für $(\text{My10}\alpha)_8$ und $(\text{My12}\alpha)_8$ weichen leicht voneinander ab und betragen $30,8 \pm 0,4 \text{ pN}$ ($n = 59$) bzw. $24,0 \pm 0,5 \text{ pN}$ ($n = 72$). Zudem wurde versucht, die Länge der Plateaus zu bestimmen, was mit gewissen Schwierigkeiten verbunden ist. Nicht immer nämlich sind zwischen dem ersten Kraftanstieg und dem Plateau klare als Knicke erkennbare Übergänge zu sehen; es kann außerdem sein, dass eine Domänenentfaltung bei oder geringfügig über der Plateaukraft stattfindet. Beides erschwert die genaue Längenbestimmung des Plateaus. Hinzu kommt, dass die absolute Plateaulänge für sich keine relevante Messgröße ist, da sie von der zufälligen Zahl der zwischen Blattfeder und Objektträgeroberfläche aufgegriffenen Domänen abhängt. In Kurven, die eine Abrisskraft aufweisen, die wesentlich höher ist als die gemessenen Entfaltungskräfte, kann davon ausgegangen werden, dass sämtliche zwischen Blattfeder und Objektträgeroberfläche eingespannten Domänen entfaltet waren, bevor das Molekül abgefallen ist. Es lässt sich aus der Zahl der Entfaltungsereignisse also die Zahl der aufgegriffenen Domänen bestimmen. Nimmt

9.1. Kraftspektroskopie an $(My10\alpha)_8$ und $(My12\alpha)_8$

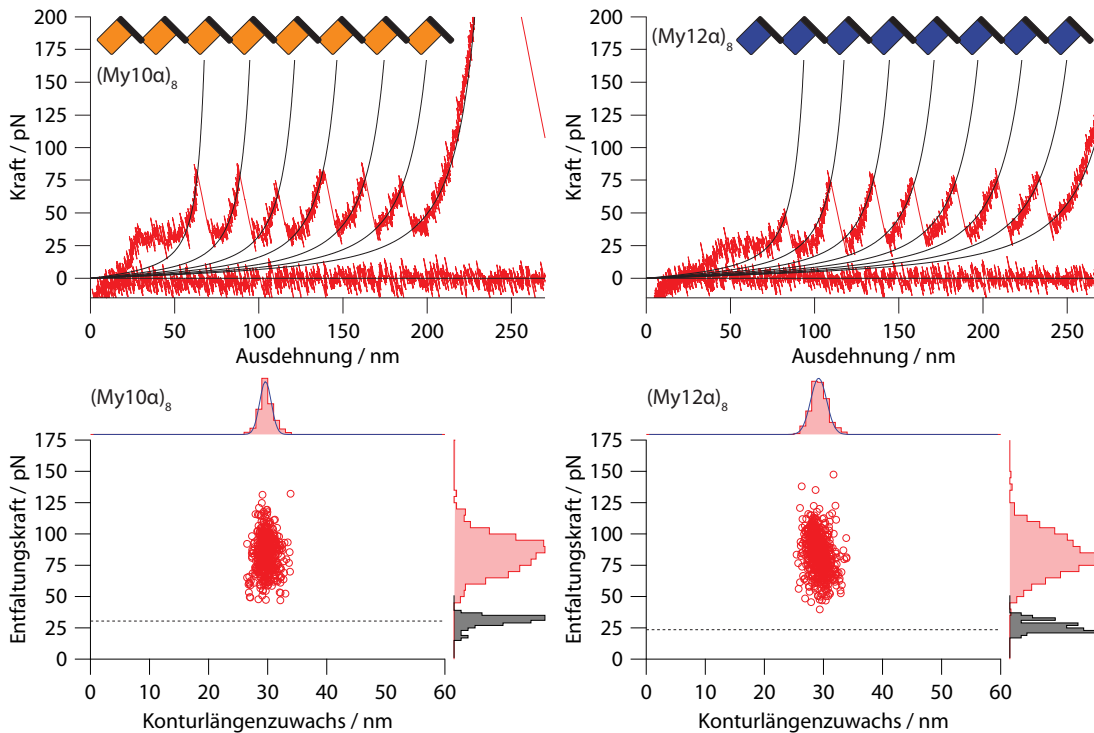


Abbildung 9.2. Oben: Typische an $(My10\alpha)_8$ (links) und $(My12\alpha)_8$ (rechts) gemessene Kraft-Ausdehnungs-Kurven. Die Domänenentfaltungen wurden durch das WLC-Modell angepasst (schwarze Kurven). Über den Daten befinden sich schematische Darstellungen der Homooktamer-Konstrukte. Unten: Verteilungen der Entfaltungskräfte und Konturlängenzuwächse von My10 (links) und My12 (rechts). Die schwarzen Histogramme geben die Kraftverteilung der Kraftplateaus an, die gestrichelte Linie stellt deren Mittelwert dar. Die blauen Kurven sind angepasste Normalverteilungen.

man an, dass mit jeder eingespannten Domäne auch die unmittelbar C-terminal angrenzende α -Helix mit Kraft belastet wird, so kann aus allen Kurven, die eine klare Längenbestimmung des Plateaus einerseits und die Bestimmung der Zahl der eingespannten Domänen andererseits zulassen, – von 523 ($My10\alpha$) bzw. 583 ($My12\alpha$) Messkurven erfüllen nur 16 bzw. 19 diese Bedingungen – die Plateaulänge pro α -Helix bestimmt werden. Sie beträgt für $My10\alpha$ wie auch für $My12\alpha$ $6,1 \pm 0,2$ nm.

Um die bei $My9$ - $My13$ beobachtete Reversibilität des Plateaus zu untersuchen, wurden auch an $(My12\alpha)_8$ Messungen durchgeführt, bei denen eine Reihe von Ausdehnungs- und Relaxationszyklen in den ansonsten kontinuierlichen Bewegungsablauf eingefügt wurden. Da $(My12\alpha)_8$ im Vergleich zu $My9$ - $My13$ besonders gut an der AFM-Blattfeder haftet und für $(My12\alpha)_8$ zudem im Gegensatz zum dimeren $My9$ - $My13$ nicht die Gefahr des Aufbrechens besteht, konnten Messungen durchgeführt werden, bei denen an zwei verschiedenen Stellen solche Zyklen eingefügt wurden (vgl. Abb. 9.3). Auf diese Weise

9. Gesonderte Betrachtung der einzelnen Domäne-Helix-Paare My9 α , My10 α , My11 α und My12 α

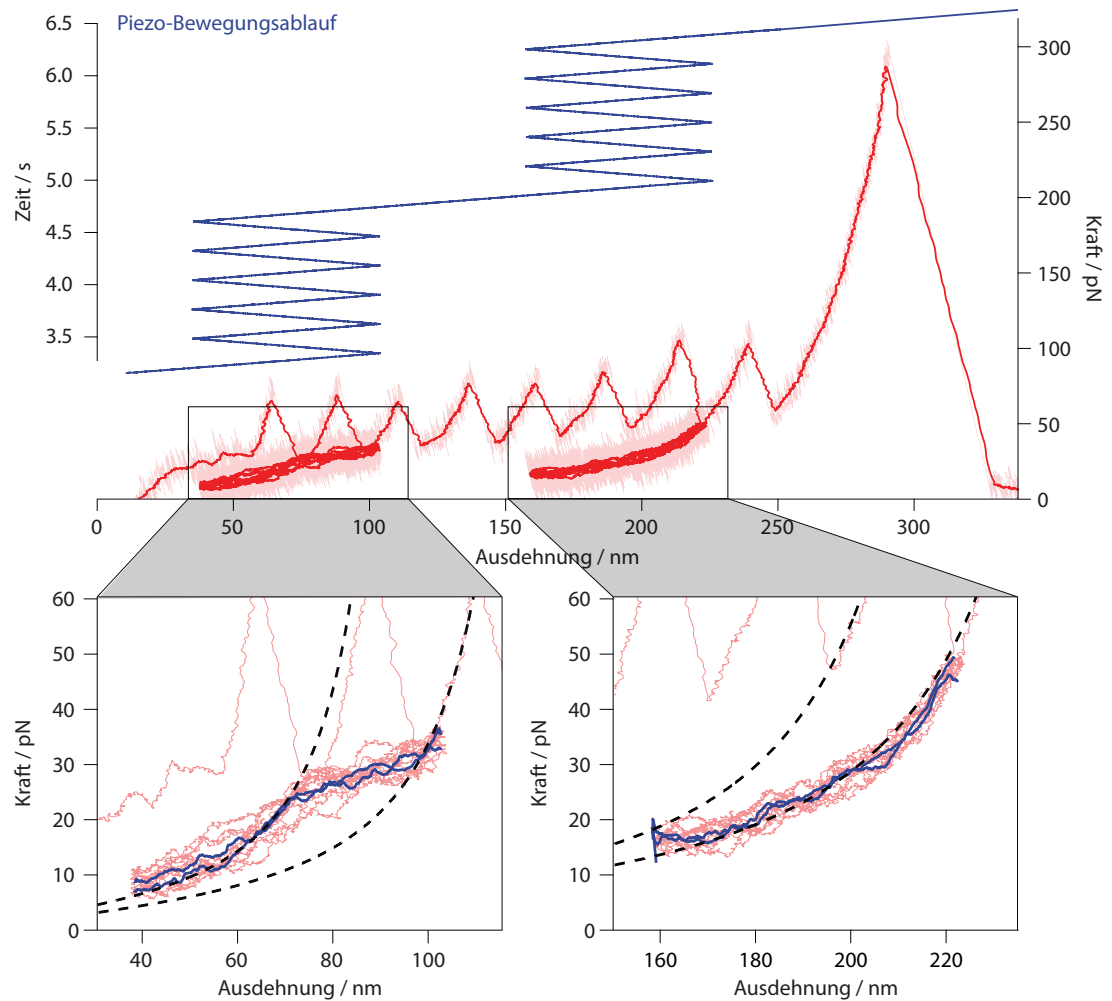


Abbildung 9.3. Oben: Kraft-Ausdehnungs-Kurve einer Einzelmessung an $(\text{My}12\alpha)_8$ mit speziellem Bewegungsablauf, bei dem die Streckung der Probe zweimal durch eine Reihe von aufeinanderfolgenden Ausdehnungs- und Relaxationszyklen unterbrochen ist (oben blau dargestellt). Unten: Vergrößerungen der beiden umrahmten Bereiche. Die Ausdehnungs- und Relaxationszyklen wurden getrennt gemittelt (blaue Kurven) und zeigen keine Hysterese. Im linken Fenster sind an die Daten zwei WLC-Kurven angepasst worden (gestrichelt), die das Kraftplateau eingrenzen und einen Konturlängenunterschied von etwa 30 nm aufweisen. Im rechten Fenster ist nur die rechte WLC-Kurve an die Daten angepasst, die linke ist von dieser durch Verringerung der Konturlänge um 30 nm abgeleitet; zwischen diesen beiden WLC-Kurven ist kein Kraftplateau zu erkennen.

war es möglich, das Auftreten des Plateaus sowie dessen Reversibilität abhängig davon zu untersuchen, wie viele Domänen entfaltet sind. Es zeigt sich, dass eine solche Abhängigkeit besteht: Während nach Entfaltung von zwei der acht im AFM eingespannten Domänen ein Plateau klar zu erkennen ist, das bei der Piezugeschwindigkeit von 500 nm/s perfekt reversibel erscheint und eine Länge von etwa 30 nm aufweist (Abb. 9.3, unten links), kann nach Entfaltung von sieben aus acht Domänen kein Plateau identifiziert werden (Abb. 9.3, unten rechts). Durch die große Konturlänge nach sieben Entfaltungen, die zu einem flacheren Kraftanstieg führt als bei kleinen Konturlängen, könnte ein kurzes Plateau schwieriger zu detektieren sein, so dass nicht prinzipiell ein Vorliegen ausgeschlossen werden kann. Betrachtet man indes, bis wohin ein Plateau reichen müsste, das 30 nm Länge aufweist, kann das Vorliegen eines solchen Plateaus mit Bestimmtheit ausgeschlossen werden.

9.2. Diskussion der My10 α - und My12 α -Messungen

Hinsichtlich des grundlegenden Entfaltungsmusters sequentieller Domänenentfaltung, der ein Bereich konstanter Kraft vorangeht, sind die an (My10 α)₈ und (My12 α)₈ den an My9-My13 gemessenen Kraft-Ausdehnungs-Kurven sehr ähnlich. Das Kraftplateau ist demnach offensichtlich keine Folge kooperativer Effekte über verschiedene Myomesindomänen hinweg, sondern in der Unterstruktur einzelner Domäne-Helix-Paare angelegt.

Wie aufgrund der hohen Ähnlichkeit der Domäne-Helix-Paare My10 α und My12 α zu erwarten ist, weisen die an deren Homooktamerkonstrukten gemessenen Entfaltungskräfte und Konturlängenzuwächse keine wesentlichen Unterschiede auf. Die Konturlängenzuwächse der Ig-Domänen stimmen sehr gut mit den aus den Strukturen berechneten zu erwartenden Zuwächsen überein, die Entfaltungskräfte decken sich im Wesentlichen mit dem an My9-My13 gemessenen Hauptmaximum. Es kann daher ausgeschlossen werden, dass es sich bei My10 oder My12 um die eine instabilere Ig-Domäne handelt.

Auch der Längenzuwachs pro α -Helix von 6,1 nm sowohl für (My10 α)₈ als auch für (My12 α)₈ steht in sehr guter Übereinstimmung mit den zu erwartenden Werten, die für das Ablösen und Entfalten einer α -Helix aus der bekannten Kristallstruktur berechnet werden können und 6,7 nm bzw. 6,3 nm betragen.¹⁰

My10 α und My12 α unterscheiden sich vor allem bezüglich der Plateaukraft. Dass dieser Unterschied nicht in der Plateaukraftverteilung der My9-My13-Messungen zu erkennen ist, kann darauf zurückgeführt werden, dass die Plateaus aus den Messungen an My9-My13 Mischungen aus den Faltungsübergängen der vier α -Helices darstellen, durch die die einzelnen Unterschiede einander angeglichen erscheinen. Es ist zudem auch mit

¹⁰Zur Berücksichtigung der Richtung der Krafteinwirkung für die Berechnung des zu erwartenden Konturlängenzuwachses und des zusätzlichen Beitrags, der durch das Ablösen der Helix von der Ig-Domäne bewirkt wird, siehe Abb. 11.1 auf Seite 80 und die Ausführungen dort.

9. Gesonderte Betrachtung der einzelnen Domäne-Helix-Paare My9 α , My10 α , My11 α und My12 α

Blick auf die Form der Plateaukraftverteilung für My12 α nicht auszuschließen, dass einer der Datensätze von Messungen an (My12 α)₈ einer leichten Abweichung der Federkonstanten zu geringeren Werten hin unterliegt und die mittlere Plateaukraft daher zu klein bestimmt wurde. Insgesamt erscheint die als Plateaukraft gemessene Kraft der Entfaltung einzelner α -helikaler Verbindung zwischen Ig-Domänen erstaunlich hoch. Selbst Strukturen, die aus der Verbindung mehrerer Helices aufgebaut sind, wie z.B. doppelhelikale *coiled coil*-Strukturen, die dreifachhelikalen Spektrin-Segmente, die in Proteinen des Zytoskellets wie Spektrin, α -Aktinin und Dystrophin vorkommen, oder das sich wiederholende Ankyrin-Motiv parallel gestapelter α -Helices, weisen Entfaltungskräfte auf, die nicht wesentlich höher sind [67, 94, 104].

Die an My9-My13 festgestellte Reversibilität der α -Helix-Entfaltung und -Rückfaltung, die in den Daten als Kraftplateau sowohl bei Ausdehnung als auch bei Relaxation erscheinen, ist, wie es aufgrund der an My9-My13 gemessenen Daten zu erwarten ist, auch für α^{10} und α^{12} zu beobachten. Es konnte ferner gezeigt werden, dass diese Reversibilität abhängig ist von der Zahl der gefaltet vorliegenden Ig-Domänen. Daran ist klar zu erkennen, dass die Wechselwirkungen zwischen α -Helix und N-terminal angrenzender Ig-Domäne an der gemeinsamen Grenzfläche essentiell für die Fähigkeit der α -Helix sind, gegen Zugkräfte in der Größenordnung von 24-30 pN zurückzufalten.

9.3. Mechanische Stabilität von My9 α und My11 α

Der Versuch, wie für My10 α und My12 α homooktamere Konstrukte für My9 α und My11 α zu erstellen, ist mehrfach ohne Erfolg geblieben. Schon die Klonierung erwies sich für beide Domänen als problematisch, da bei der beabsichtigten mehrfachen Verdopplung der Gensequenz nach der in Anhang A beschriebenen Methode wiederholt zu kurze Sequenzen herauskamen. Das spricht dafür, dass entweder spezielle Reparaturmechanismen gegen repetitive Sequenzen aus *E.coli* aktiv waren, obwohl ein *E.coli*-Stamm verwendet wurde, der diese Mechanismen nicht aufweisen sollte, oder dass die Sequenz Überstrukturen ausbildet, die bei der Reduplikation zum Überspringen gewisser Bereiche führen. Auf den letzten Schritt der Klonierung eines homooktameren Konstruktes aus einem homotetrameren ist daher verzichtet worden, da vier Domänen für AFM-Messungen knapp ausreichend sind. Die Expression sowohl von (My9 α)₄ als auch von (My11 α)₄ ist jedoch wiederholt gescheitert, so dass an Polymerkonstrukten von My9 α und My11 α keine Messungen durchgeführt werden konnten. Bezüglich der Ursache für die Schwierigkeiten liegt der Verdacht nahe, dass die korrekte Faltung und die Aggregationstendenz von My9 α und My11 α von dem Vorhandensein nativer Nachbardomänen abhängig sein könnten. Insbesondere für My11 α hat sich durch die spätere Aufklärung der vollständigen My9-My13-Struktur gezeigt, dass α^{11} nicht nur eine Wechselwirkungsgrenzfläche zu My11, sondern auch zu My12 aufweist [86]. Zur Bestimmung der mechanischen Stabilität von My9 α und My11 α wurden daher Konstrukte verwendet, die My9-My10 α bzw. My11-My12 α enthalten; durch Vergleich mit den Daten für My10 α und My12 α lässt sich dann auf Ergebnisse für My9 α und My11 α schließen.

9.3.1. Kraftspektroskopie an (GB1)₂My9-My10 α (GB1)₂



Das Konstrukt

Zur indirekten Messung der Stabilität von My9 α ist ein Konstrukt entworfen worden, das My9-My10 α enthält. Als Platzhalter und Aufgriffspunkte für die AFM-Blattfeder ist die für ihre geringe Größe mechanisch extrem stabile globuläre GB1-Domäne des Protein G aus *Streptococcus* verwendet worden [21, 43]. Mit Hilfe der in Anhang A dargestellten Methode wurden zunächst zwei GB1-Domänen, anschließend My9-My10 α und schließlich weitere zwei GB1-Domänen hintereinander in einen Vektor kloniert. Das fertige Konstrukt (GB1)₂My9-My10 α (GB1)₂ hat einen C-terminalen His₆-Tag.

My9 α besteht aus insgesamt 112 Aminosäuren, von denen 90 die Ig-Domäne bilden. Von den übrigen 22 sind die ersten 17 α -helikal, während die übrigen fünf Aminosäuren in Wechselwirkung zur Domäne My10 stehen und keine klassifizierte Sekundärstruktur aufweisen.¹¹ Der zu erwartende Konturlängenzuwachs bei Entfaltung von My9 kann

¹¹Dass diese fünf Aminosäuren dennoch My9 α zugerechnet wurden und nicht My10 α , rührt daher, dass Strukturvorhersagen, die vor der erfolgreichen Röntgenstrukturanalyse durch die Gruppe um Matthias

9. Gesonderte Betrachtung der einzelnen Domäne-Helix-Paare My9 α , My10 α , My11 α und My12 α

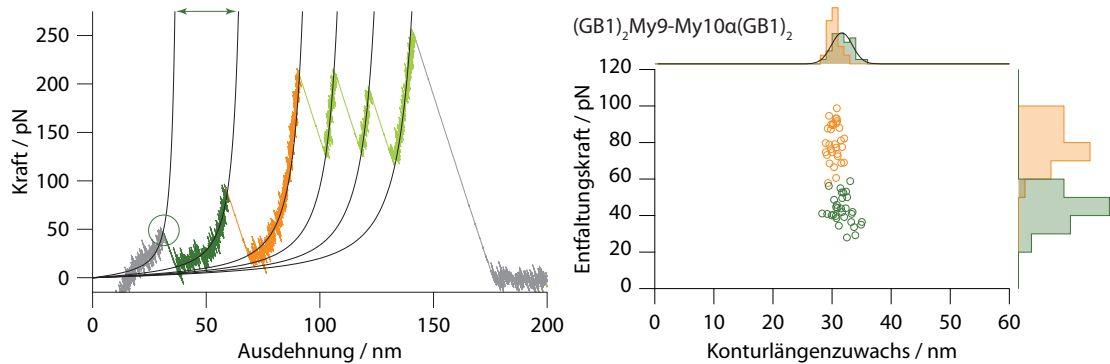


Abbildung 9.4. Links: Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve einer Messung an $(GB1)_2My9-My10\alpha(GB1)_2$. An ihrem Konturlängenzuwachs sind die Myomesin-Entfaltungen zu erkennen; die Entfaltung bei geringerer Kraft (Kreis) kann mit großer Wahrscheinlichkeit My9 (grün) zugeordnet werden, die andere My10 (orange). Die GB1-Entfaltungen (hellgrün) finden bei deutlich höheren Kräften statt und weisen einen geringeren Konturlängenzuwachs auf. Rechts: Entfaltungskräfte und Konturlängenzuwächse der Myomesin-Entfaltungen gegeneinander aufgetragen. Die in den Einzelmessungen jeweils zuerst auftretenden Entfaltungen (grün) bilden einen von den danach auftretenden Entfaltungen (orange) getrennten Cluster. Das Konturlängenhistogramm lässt sich durch eine Normalverteilung anpassen (schwarze Kurve).

nicht korrekt berechnet werden, da für die ersten sechs Aminosäuren (E1135-1140) keine Struktur bekannt ist. Aus der bekannten Struktur kann aber abgeschätzt werden, dass der Zuwachs mindestens 28,2 nm beträgt und wie bei den anderen C-terminalen Ig-Domänen Myomesins etwa 30 nm betragen dürfte.

Die Ergebnisse

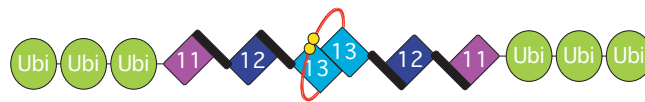
In den Kraft-Ausdehnungs-Kurven der Messungen an $(GB1)_2My9-My10\alpha(GB1)_2$ sind die GB1-Entfaltungen mit Konturlängenzuwächsen von etwa 18 nm und zugehörigen Entfaltungskräften, die breit zwischen 50 pN und 250 pN streuen, klar von den Myomesin-Entfaltungen zu unterscheiden (vgl. Abb. 9.4, links). Kurven mit mehr als zwei GB1-Entfaltungen (hellgrün) enthalten stets auch zwei Entfaltungen mit Konturlängenzuwächsen von etwa 30 nm (grün und orange). Deren Entfaltungskraftverteilung weist zwei Fraktionen auf, die sich sauber trennen lassen, wenn man die jeweils zuerst und die jeweils nachfolgend auftretenden dieser Entfaltungen getrennt voneinander auswertet (Abb. 9.4, rechts). Es zeigt sich, dass die Menge der zuerst auftretenden Entfaltungen (grün) bei geringfügig größeren Konturlängenzuwächsen von $31,7 \pm 0,3$ nm ($n = 31$) und einer deutlich geringeren wahrscheinlichsten Entfaltungskraft von $44,2 \pm 1,6$ pN ($n = 31$) auftritt als die Menge der später auftretenden Entfaltungen (orange), deren mittlerer Konturlängenzuwachs und deren wahrscheinlichste Entfaltungskraft in guter

Wilmanns an der EMBL-Außenstelle in Hamburg gemacht wurden, diese Zuordnung nahelegten (persönliche Kommunikation mit Nikos Pinotsis).

Übereinstimmung mit den Werten für My10 stehen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass es sich bei den jeweils zuerst auftretenden Entfaltungen um My9-Entfaltungen handelt. Die Annahme, dass tatsächlich in der Regel My9 vor My10 entfaltet, obwohl aufgrund der Verteilung der Entfaltungskräfte gelegentlich auch das Gegenteil der Fall sein könnte, wird zudem dadurch gestützt, dass bei Auftragung der Entfaltungskräfte gegen die Konturlängen schon optisch zwei Cluster unterschieden werden können (Abb. 9.4, rechts). Die im Vergleich zu den anderen C-terminalen Ig-Domänen geringere mechanische Stabilität der Domäne My9 erklärt das in der Entfaltungskraftverteilung von My9-My13 beobachtete zweite Maximum, dessen Mittelwert gut mit der mittleren Entfaltungskraft von My9 übereinstimmt (vgl. Kapitel 8.1 und Abb. 8.1, rechts).

Die Entfaltungen der nur zwei α -Helices α^9 und α^{10} führen in den Messdaten, die zudem oft gerade bei sehr kleinen Ausdehnungen Störungen enthalten, kaum zu beobachtbaren Plateaus. In den wenigen Kurven, in denen sie eher als Stufe im Kraftanstieg zu erkennen sind, ist es außerdem nicht möglich, zwischen α^9 und α^{10} zu unterscheiden, so dass für α^9 keine gesonderten Daten bezüglich der mechanischen Stabilität gewonnen werden konnten.

9.3.2. Kraftspektroskopie an (Ubi)₃My11-My13



Das Konstrukt

Für die Untersuchung von My11 α wurde kein eigenes Konstrukt entworfen, sondern es wurden Messdaten desjenigen Konstruktes herangezogen, das Morten Bertz für Untersuchungen der Dimerisierung der Domäne My13 im Rahmen seiner Doktorarbeit entworfen hat [13]. Dieses Konstrukt verwendet anstelle der hier ansonsten als Platzhalter und Aufgriffspunkte genutzten GB1-Domänen zu denselben Zwecken drei Ubiquitin-Domänen (Ubi), denen die Myomesin-Domänen My11-My13 folgen. Die My13-Domänen jeweils zweier solcher (Ubi)₃My11-My13-Konstrukte dimerisieren nicht nur über die native Dimerisierungsgrenzfläche, sondern auch über eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen (gelb), die jeweils als letzte von 11 Aminosäuren C-terminal an My13 angehängt wurden (rot). Auf diese Weise bleiben die beiden (Ubi)₃My11-My13 auch bei Dissoziation der nativen Dimerisierungsgrenzfläche miteinander verbunden.

Die Ergebnisse¹²

Die Ubiquitin-Entfaltungen sind aufgrund ihrer Konturlängenzuwächse von etwa 23,5 nm klar von den Myomesin-Entfaltungen zu unterscheiden [23]. Da sie bei deutlich höheren Kräften als die Myomesin-Entfaltungen stattfinden, treten sie in den Messkurven in der Regel nach diesen auf (vgl. Abb. 9.5, links). Vor den Ubiquitin-Entfaltungen

¹²Die hier vorgestellten Ergebnisse sind das Resultat eigener Analyse von Daten, die von Morten Bertz gemessen worden sind.

9. Gesonderte Betrachtung der einzelnen Domäne-Helix-Paare My9 α , My10 α , My11 α und My12 α

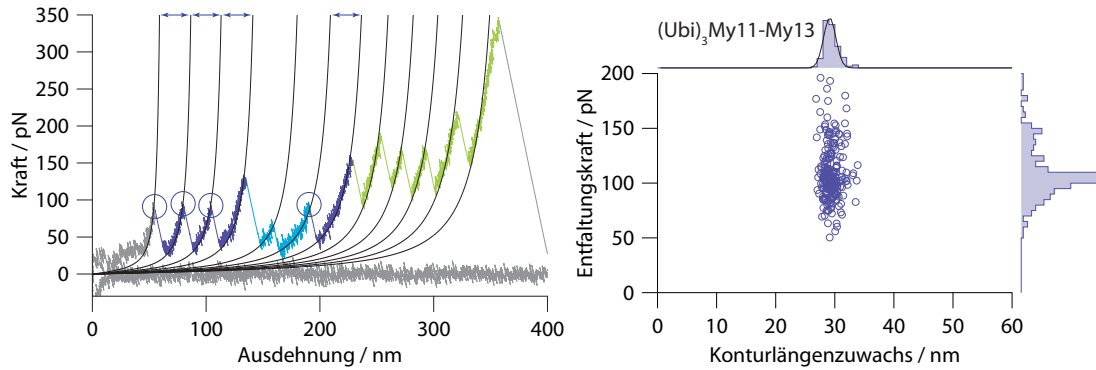


Abbildung 9.5. Links: Kraft-Ausdehnungs-Kurve einer Messung an dimerem (Ubi)₃My11-My13. Die Kreise kennzeichnen My11- und My12-Entfaltungen (dunkelblau, voneinander nicht unterscheidbar). Die Dissoziation der Dimerisierung und die direkt anschließenden Entfaltungen der My13-Domänen sind cyanfarben, die Entfaltungen der Ubiquitin-Domänen hellgrün dargestellt. Die schwarzen Kurven sind Anpassungen nach dem WLC-Modell. Rechts: Übersicht über die Entfaltungskräfte und Konturlängenzuwächse der Domänen My11 und My12. Es lassen sich keine getrennten Fraktionen unterscheiden. Die schwarze Kurve ist eine an das Histogramm angepasste Normalverteilung.

(hellgrün) sind einige Entfaltungen mit einem Konturlängenzuwachs von etwa 29 nm (dunkelblau) zu beobachten sowie ein längerer Konturlängenzuwachs von etwa 44 nm, dem stets ein 29 nm-Zuwachs folgt (beide cyanfarben), der im Vergleich zu den übrigen 29 nm-Entfaltungen bei deutlich geringerer Kraft erfolgt; manche dieser 44 nm-Zuwächse sind durch einen kurzlebigen Zwischenzustand nochmals unterteilt, wobei der zweite Schritt wiederum 29 nm Konturlängenzuwachs aufweist. Dieses wiederkehrende Muster einer Entfaltung mit 44 nm Konturlängenzuwachs, die eine 29 nm-Entfaltung enthält, und der eine weitere 29 nm-Entfaltung bei niedriger Kraft folgt, ist der Dissoziation der Dimerisierungsgrenzfläche sowie der unmittelbar darauffolgenden Entfaltung der beiden My13-Domänen zugeschrieben worden [13]. Die übrigen Entfaltungen, die etwa 29 nm Konturlängenzuwachs aufweisen, können daher als Entfaltungen von My11 und My12 identifiziert werden. Betrachtet man die Konturlängen- und Entfaltungskraftverteilungen nur dieser Domänen und trägt sie gegeneinander auf (Abb. 9.5, rechts), so sind im Gegensatz zu den aus (GB1)₂My9-My10 α (GB1)₂ gewonnenen Werten keine getrennten Cluster zu unterscheiden. Bei einem gemeinsamen mittleren Konturlängenzuwachs von $29,1 \pm 0,07$ nm ($n = 236$) kann davon ausgegangen werden, dass die Werte für My11 und My12 (vgl. Kapitel 9.1) nahezu identisch sind. Die gemeinsame wahrscheinlichste Entfaltungskraft ist mit $102,4 \pm 0,8$ pN ($n = 236$) etwas größer als die von My12 allein, was auf eine etwas größere mechanische Stabilität von My11 hindeutet.

Wie schon bei (GB1)₂My9-My10 α (GB1)₂ lassen sich auch aus den (Ubi)₃My11-My13-Daten keine klaren Entfaltungen auswerten, die eindeutig den α -Helices (hier: α^{11} und

α^{12}) zugeordnet werden könnten. Es kann somit keine Aussage über die mechanische Stabilität von α^{11} gemacht werden. Kurze Kraftplateaus oder Stufen im ersten Kraftanstieg sind allerdings durchaus auszumachen.

9.4. Diskussion der My9 α - und My11 α -Messungen

Da im Gegensatz zu My10 und My12 für My9 α und My11 α keine Konstrukte erstellt werden konnten, die eine direkte Bestimmung der mechanischen Stabilität dieser Domäne-Helix-Paare oder ihrer Komponenten ermöglichen würden, ist eine indirekte Bestimmung versucht worden. Dazu sind Konstrukte eingesetzt worden, in denen jeweils eine bereits untersuchte mit einer noch zu untersuchenden Domäne gepaart wurden. Die wesentliche Schwierigkeit in der Interpretation der daran gemessenen Daten besteht daher in der eindeutigen Zuordnung der Ereignisse zu der richtigen der jeweils in den Konstrukten vorhandenen und einander ähnlichen Ig-Domänen Myomesins. Wie aufgrund der Struktur zu erwarten, stellt der jeweilige Konturlängenzuwachs kein geeignetes Unterscheidungskriterium dar, da er für My9 und My11 fast identisch zu dem für My10 und My12 gemessenen ist. In den Entfaltungskräften sind dagegen Unterschiede festzustellen.

Aus den an My9-My13 gemessenen Entfaltungskräften war bereits zu erwarten, dass sich eine Domäne aufgrund ihrer geringeren mechanischen Stabilität von den übrigen unterscheiden lässt. Als diese schwächere Domäne hat sich My9 aufgrund der deutlich bimodalen Entfaltungskraftverteilung des My9-My10-Konstruktes identifizieren lassen (Abb. 9.4, rechts). Die an (Ubi)₃My11-My13 bei etwas höheren Werten als an (My12 α)₈ gemessenen Entfaltungskräfte scheinen zudem für eine höhere Stabilität von My11 gegenüber den übrigen Domänen zu sprechen. Da aber die (Ubi)₃My11-My13-Verteilung keine zwei Klassen aufweist, die My11 und My12 getrennt zugeordnet werden könnten, und sich auch in den My9-My13-Daten kein Hinweis auf eine stabilere Domäne findet, kann My11 nicht wesentlich mechanisch stabiler als die übrigen Ig-Domänen sein.

Noch schwieriger als die Domänen lassen sich die α -Helices anhand ihrer Spuren in den an den gemischten Konstrukten gemessenen Daten unterscheiden. Zwar weisen die (Ubi)₃My11-My13-Daten und in deutlich geringerem Maße auch die (GB1)₂My9-My10 α (GB1)₂-Daten kurze Kraftplateaus oder zumindest Stufen auf, die einen Konturlängenzuwachs bedeuten müssen; den Anteil von α^{11} bzw. α^9 daran zu bestimmen, ist jedoch nicht möglich. Die klaren an My9-My13 gemessenen Kraftplateaus lassen insbesondere im Hinblick auf deren Unterstruktur aber vermuten, dass sich α^9 und α^{11} den beiden anderen Helices α^{10} und α^{12} sehr ähnlich verhalten dürften, wenn auch aufgrund ihrer geringeren Helixlänge mit einem etwas geringeren Beitrag zum Konturlängenzuwachs als diese.

10. Detailuntersuchungen an My12 α

Exemplarisch für alle vier Ig-Domäne- α -Helix-Paare My9 α bis My12 α sind weitere Detailuntersuchungen an My12 α durchgeführt worden. Da in den Messungen an den Homooktamerkonstrukten Hinweise darauf gefunden worden waren, dass die Wechselwirkungen zwischen Ig-Domänen und α -Helix einen wichtigen Einfluss auf die Stabilität beider Strukturelemente hat (vgl. Kapitel 9.2), ist bei den hier vorgestellten Messungen ein besonderer Fokus auf diese wechselseitigen Einflüsse gerichtet worden.

Die verwendeten Techniken der Molekulardynamik-Simulation sowie der temperaturabhängigen Zirkulardichroismus-Spektroskopie ergänzen methodisch die bisherigen Messungen und eröffnen zusätzliche Einblicke in die mechanische und thermodynamische Stabilität von My12 α . Zusammen mit kraftspektroskopischen Messungen an einen Konstrukt, das es ermöglicht, ausschließlich die Ig-Domäne My12 mit Kraft zu belasten, während die α -Helix α^{12} gefaltet bleibt und mit My12 interagieren kann, zeigen diese Untersuchungen die Bedeutung der Wechselwirkungen zwischen Ig-Domäne und α -Helix für die spezielle Elastizität des C-terminalen Endes Myomesins.

10.1. Molekulardynamik-Simulation der kraftinduzierten My12 α -Entfaltung

Zur weiteren Stützung der bisherigen Interpretation der Messdaten, der zufolge das den Domänenentfaltungen vorangehende Kraftplateau von Entfaltungsübergängen der α -Helices herrührt, wurden Molekulardynamik-Simulationen an My12 α durchgeführt, die unter der Annahme, dass sie die Realität ausreichend präzise abbilden, einen Einblick mit atomarer Auflösung in die strukturellen Vorgänge des Proteins unter Kraftbelastung ermöglichen. Für die Simulationen wurde das Programm NAMD (Version 2.6) der Gruppe von Klaus Schulten an der University of Illinois eingesetzt [84].

Die Methode

Simuliert wurde das Auseinanderziehen eines einzelnen My12 α -Moleküls. Dazu wird am C-Terminus über eine virtuelle Feder mit konstanter Geschwindigkeit gezogen, während der N-Terminus im Raum fixiert ist. Dies entspricht einem AFM-Experiment, bei dem das eine Ende des untersuchten Moleküls auf dem Objektträger fixiert ist, während an dem anderen über die AFM-Blattfeder gezogen wird. Die Nutzung der Software sowie die Durchführung der Equilibrierung und der anschließenden Simulation folgten dem *NAMD Tutorial* der Software-Autoren [53].

10. Detailuntersuchungen an My12 α

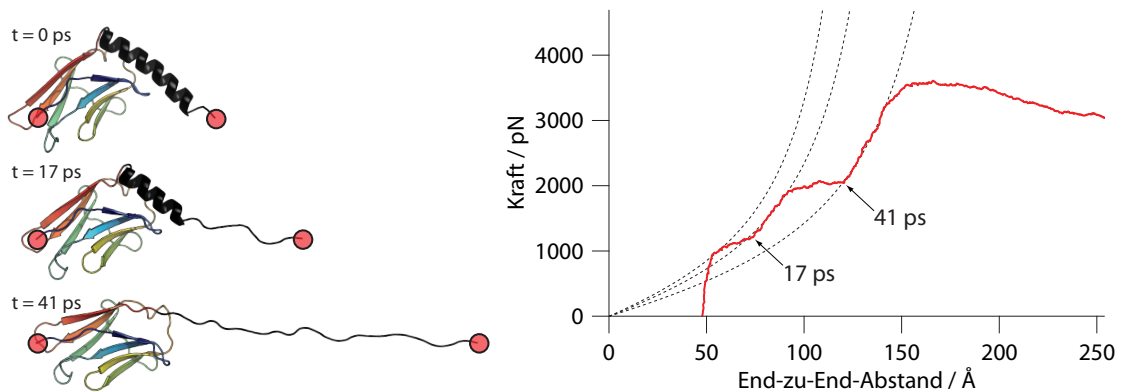


Abbildung 10.1. Links: *Cartoon*-Darstellung von My12 α zu drei Zeitpunkten der Molekulardynamik-Simulation. Die roten Kreise bezeichnen die Punkte, an denen die Kraft wirkt; der jeweils linke ist räumlich fixiert, während am jeweils rechten gezogen wird. Rechts: Kraft-Abstands-Daten der Molekulardynamik-Simulation an My12 α . Die Konturlängen zuwächse zwischen den einzelnen Kraftanstiegen wurden näherungsweise durch WLC-Kurven (gestrichelt) bestimmt. Die Pfeile markieren die beiden Zeitpunkte, für die links zusätzlich zum Ausgangszustand die simulierte Struktur abgebildet ist.

Die Struktur von My12 α ist dem Eintrag 2R15 der *Protein Data Bank* (PDB) entnommen worden. Die Röntgenstruktur wurde um die darin fehlenden Wasserstoffatome ergänzt, und das so vervollständigte Molekül mit Wasser umgeben. Diese Wasserbox hat Kantenlängen von 347 Å \times 82,5 Å \times 68,2 Å und enthält 9261 Wassermoleküle. Sie ist möglichst klein, aber so groß gewählt worden, dass sie Platz für das gestreckte entfaltete Peptid bietet und trotz Verwendung periodischer Randbedingungen möglichst keine Wechselwirkungen des Proteins mit seinen virtuellen benachbarten Kopien zulässt.

In einem ersten Simulationslauf wurde das so konstruierte System bezüglich seiner Energie minimiert sowie equilibriert, so dass es bei gegebener Temperatur von 310 K und gegebenem Druck von 1013,25 mbar einen stabilen Zustand einnimmt. Anschließend wurden der N-Terminus als fixiert und der C-Terminus als über eine virtuelle Feder mit der Federkonstanten 1 kcal/mol/Å² ziehbar definiert. Die Entfaltungssimulation schließlich erfolgte in 500000 Zeitschritten zu je 0,2 fs (entspricht 100 ps); in jedem dieser Zeitschritte ist berechnet worden, welche Auswirkungen das Ziehen an der virtuellen Feder mit einer Geschwindigkeit von 0,0005 Å pro Zeitschritt (entspricht 250 m/s) hat. Für alle NAMD-Simulationen wurde die Parameter-Datei `par_all27_prot_lipid.inp` für ein CHARMM-Kraftfeld (Version CHARMM22) verwendet [71]; für die Berechnung langreichweitiger elektrostatischer Effekte unter periodischen Randbedingungen ist die Verwendung der *Particle-Mesh*-Ewald-Methode eingeschaltet worden [84].

Die Ergebnisse

Die Entfaltungssimulation liefert die Position aller Atome zu jedem berechneten Zeitschritt. Unter der Annahme, dass trotz der extremen Ziehgeschwindigkeit in der Simu-

lation die Auswirkungen der Kraftbelastung auf das Protein ähnlich denen bei der geringeren Ziehgeschwindigkeit im Experiment sind, lässt sich qualitativ die Abfolge struktureller Veränderungen bei mechanischer Entfaltung des Proteins aus den Simulationsdaten bestimmen. Deutlich ist zu erkennen, dass als erstes die α -Helix entfaltet, während die Ig-Domäne weitgehend intakt bleibt (vgl. Abb 10.1, links). Dabei werden zunächst die beiden lösungsmittlexponierten Windungen der Helix gestreckt ($t = 17$ ps), anschließend auch die weiteren Windungen, die eine Grenzfläche zur Ig-Domäne aufweisen ($t = 41$ ps). Erst wenn die Helix vollständig entfaltet und weitgehend gestreckt ist, führt die weitere Ausdehnung dazu, dass auch die Ig-Domäne auseinanderbricht (nicht abgebildet).

Da während der Simulation auch die auf die Feder wirkende Kraft protokolliert wird, lässt sich eine Kraft-Ausdehnungs-Kurve des Simulationsverlaufs erstellen (siehe Abb. 10.1, rechts). Innerhalb des Kraftverlaufs wechseln sich Bereiche, wo die Struktur mit zunehmender Kraft belastet wird, aber kaum an Ausdehnung zunimmt, mit solchen Bereichen ab, wo die Ausdehnung zunimmt, ohne dass die Kraft weiter ansteigt. Letzgenannte Bereiche erklären sich durch den Konturlängenzuwachs aufgrund von Helix-Entfaltung; im ersten solchen Bereich entfalten die beiden C-terminalen Windungen, im zweiten die übrigen vier. Wo keine Entfaltung stattfindet, steigt die Kraft steil an: im ersten Kraftanstieg nahezu linear, da das gefaltete Molekül kaum elastisch ist; im zweiten und dritten Anstieg mit nicht-linearen Anteilen, die von der Polymerelastizität der bereits entfaltenen Anteile herrühren (vgl. Kapitel 3).

Um den Konturlängenzuwachs der beiden Teilentfaltungen der α -Helix abzuschätzen, können WLC-Kurven an die Kraft-Ausdehnungs-Kurve angepasst werden. Zwar weisen die drei Kraftanstiegsbereiche aufgrund des jeweils unterschiedlichen Anteils gefalteten und ungefalteten Proteins unterschiedliche Elastizität auf, für eine grobe Abschätzung kann jedoch von einer einheitlichen Persistenzlänge ausgegangen werden.¹³ Die Anpassungen ergeben für die Konturlängenzuwächse Werte von 2 nm und 4.6 nm und stimmen somit in der Summe gut mit dem experimentell bestimmten Konturlängenzuwachs für α ¹² überein (vgl. Kapitel 9.1).

Der Krafteinbruch bei weiterem Ziehen über eine Ausdehnung von 150 nm hinaus schließlich ist Folge der einsetzenden Entfaltung der Ig-Domäne, auf die an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden soll.¹⁴

¹³Es ist eine Persistenzlänge von 3 pm verwendet worden. Dieser geringe Wert ist eine direkte Folge der extremen Ziehgeschwindigkeit, die zu unrealistisch hohen Kraftwerten führt. Um diese mit der WLC-Formel anpassen zu können, müssen die Kraftwerte entsprechend skaliert werden. Diese Skalierung geht invers in die Persistenzlänge ein, führt also zu unrealistisch kleinen Werten.

¹⁴Ausführlichere Molekulardynamik-Simulationen, die in der Gruppe von Frauke Gräter am CAS-MPG Partner Institute for Computational Biology, Shanghai, China, an My12-My13-Dimeren durchgeführt wurden, bestätigen im Wesentlichen die Ergebnisse der vorgestellten eigenen Simulationen [11].

10.2. CD-Spektroskopie an My12 α und α^{12}

Ergänzend zur Untersuchung der mechanischen Stabilität von My12 α ist auch dessen thermodynamische Stabilität mit Hilfe der Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) gemessen worden. Dadurch, dass einerseits My12 α als ganzes und andererseits isoliertes α^{12} sowie dessen Beitrag zu My12 α untersucht worden sind, entsteht ein detailliertes Bild der Bedeutung des Zusammenspiels von Ig-Domäne und α -Helix für die Stabilität von My12 α .

Die Proben

My12 α umfasst die 110 Aminosäuren von Lys1461 bis Asn1570 Myomesins und ist zunächst auf Genebene durch biotechnologische Standardmethoden aus dem Wildtyp extrahiert und anschließend in *E.coli* exprimiert worden. Da die isolierte Helix α^{12} zu klein für eine Expression in *E.coli* ist, wurde diese als synthetisch produziertes Peptid von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) bezogen. Sowohl My12 α als auch α^{12} waren für die CD-Messungen in 100 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,4) gelöst, da der für die AFM-Messungen üblicherweise verwendete PBS-Puffer (pH 7,4) Chlorid enthält, das im untersuchten Wellenlängenbereich von 185 nm bis 260 nm Licht absorbiert, und er daher für CD-Messungen nicht geeignet ist. Die Konzentration von My12 α betrug 1,2 mg/ml (etwa 80 μ M), die von α^{12} 1,0 mg/ml (etwa 350 μ M) und ist aus den Absorptionen bei 205 nm und 280 nm bestimmt worden [56].

Die Methode

Bei der Zirkulardichroismus-Spektroskopie wird der Effekt genutzt, dass links- und rechts-zirkular polarisiertes Licht von gewissen Molekülen unterschiedlich stark absorbiert wird. Dieser Effekt ist abhängig von der Struktur des Moleküls und von der Wellenlänge des polarisierten Lichts. Die Sekundär-, Tertiär- und gegebenenfalls auch die Quartärstruktur eines Proteins führen dabei zu spezifischen Differenzspektren, die Rückschlüsse auf die Struktur des Proteins oder auf Veränderungen der Struktur aufgrund äußerer Einflüsse ermöglichen.

Oft ist das Ziel der Untersuchung, aus CD-Spektren Anteile gewisser Sekundärstrukturelemente wie α -Helices oder β -Faltblätter am Gesamtmolekül zu bestimmen, indem das Spektrum mit Referenzspektren verglichen wird. Dazu sind verschiedene Algorithmen vorgeschlagen worden, die zu zum Teil sehr unterschiedlichen Ergebnissen führen, wobei für verschiedene Proteine jeweils eine andere Methode die beste Wahl sein kann und keine Methode allgemein als gut anzusehen ist [42]. Ergebnisse von CD-spektroskopischen Messungen sind daher oft nur schwer quantitativ auszuwerten. Qualitative Analysen dagegen, insbesondere durch Vergleich verschiedener Spektren, die an ähnlichen Molekülen oder demselben Molekül bei verschiedenen Umgebungsbedingungen gemessen wurden, ermöglichen zuverlässig wichtige Einblicke in strukturelle Veränderungen [41, 56].

10.2. CD-Spektroskopie an My12 α und α^{12}

Für die CD-Messungen an My12 α , dessen Struktur bekannt ist, und an α^{12} , für das auch im Fall eines isolierten Peptids nur eine helikale oder ungeordnete Struktur anzunehmen ist, steht daher nicht die Strukturbestimmung im Vordergrund, sondern die Frage danach, welchen Einfluss die Temperatur auf die Stabilität und Faltung des Proteins hat [40, 41].

Zur möglichst umfassenden CD-spektroskopischen Untersuchung von My12 α und α^{12} sind an beiden Proben Messreihen bei verschiedenen Temperaturen beginnend bei 20 °C und in 2 °C-Schritten steigend bis 86 °C aufgezeichnet worden. Dabei sind bei jeder Temperatur jeweils drei Spektren über einen Wellenlängenbereich von 185 nm bis 260 nm mit einer Auflösung von 0,1 nm aufgezeichnet und zu einem Spektrum gemittelt worden. Für die Emissionsbandbreite der Spektrometerlampe ist ein Wert von 1 nm, für die Integrationszeit der Datenerfassung 1 s gewählt worden; die Weglänge der verwendeten Küvette betrug 0,2 mm. Von den gemessenen Spektren ist jeweils das Spektrum des reinen Puffers als Grundlinie abgezogen worden; die als absolute Elliptizität gemessenen Werte sind für alle Messungen in mittlere molare Elliptizitäten pro Residuum umgerechnet worden.

Im Anschluss an die Temperaturreihe sind die Proben von 86 °C auf 20 °C abgekühlt worden, woraufhin, so schnell es der Abkühlvorgang und die Steuerung des Spektrometers erlauben (etwa 3 Minuten nach Beginn des Abkühlens), ein weiteres Spektrum aufgezeichnet worden ist. Weitere Spektren sind 15 Minuten (für My12 α und α^{12}) sowie 30 Minuten später (für My12 α) wiederum bei 20 °C aufgezeichnet worden.

Die Ergebnisse — α^{12}

Das bei 20 °C an α^{12} gemessene CD-Spektrum zeigt einen Verlauf, der durch ein Maximum bei etwa 193 nm und ein doppeltes Minimum bei 208 nm und 222 nm gekennzeichnet ist (vgl. Abb. 10.3, links, hellblaue Kurve). Dieses Muster ist typisch für α -helikale Strukturen, wie ein Vergleich mit CD-Spektren α -helikaler Proteine gut zeigt, ohne dass auf Algorithmen zur Strukturbestimmung zurückgegriffen werden müsste:¹⁵ In Abb. 10.2 sind zum Vergleich die CD-Spektren derjenigen drei Einträge in der *Protein Circular Dichroism Data Bank* (PCCDB, [118]) wiedergegeben, die den größten α -helikalen Anteil an ihrer Kristallstruktur aufweisen [65]; es handelt sich dabei um c-Phy-

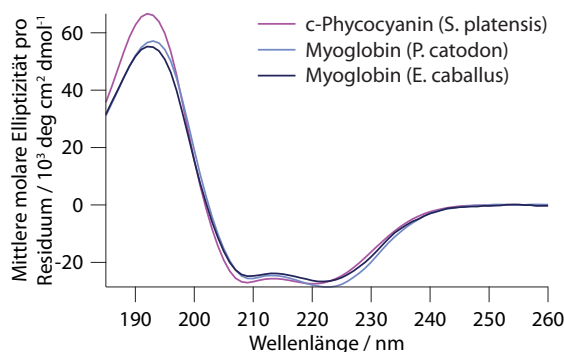


Abbildung 10.2. Typische CD-Spektren α -helikaler Proteine aus der PCCDB.

¹⁵Einige der üblichen Programme zur Strukturbestimmung (Contin, Selcon 3, CDSSTR, K2D; alle über DichroWeb, <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/>, verwendbar [117]) sind versuchsweise auf die Spektren angewandt worden. Die ausgegebenen Werte waren voneinander zu verschieden, als dass ein kohärentes Ergebnis hätte gewonnen werden können.

10. Detailuntersuchungen an My12 α

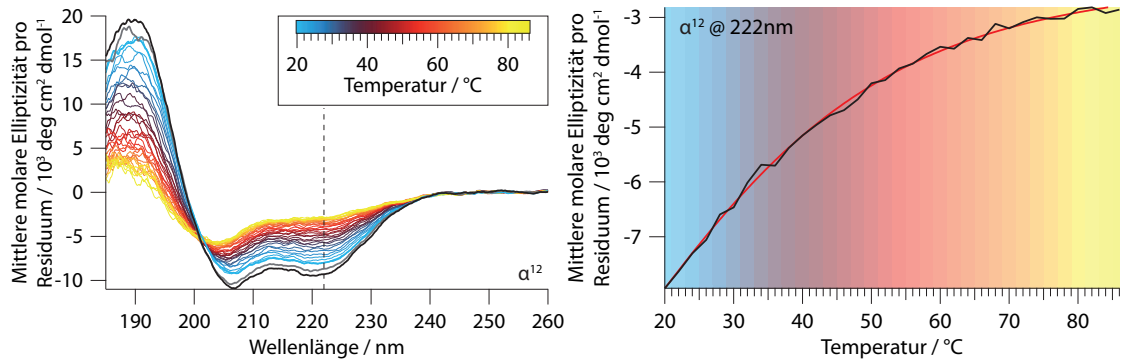


Abbildung 10.3. Links: Serie von an α^{12} bei Temperaturen von 20 °C bis 86 °C gemessenen CD-Spektren sowie zwei weitere Spektren, die nach Abkühlung auf 20 °C unmittelbar im Anschluss (grau) bzw. 15 Minuten später (schwarz) gemessen wurden. Die gestrichelte Linie befindet sich bei 222 nm und kennzeichnet einen Bereich starker Veränderungen. Rechts: Temperaturabhängiger Verlauf der Elliptizität bei 222 nm. Die rote Kurve ist eine Anpassung von Gleichung 10.1 an die Daten.

cocyanin aus *Spirulina platensis*, Myoglobin aus *Physeter catodon* und Myoglobin aus *Equus caballus*.

Mit steigender Temperatur verändert sich das Spektrum kontinuierlich, wobei insgesamt die Elliptizität abnimmt, was auf eine Abnahme regelmäßiger Struktur hindeutet (Abb. 10.3, links). Der temperaturabhängige Verlauf lässt sich besonders gut bei einer festen Wellenlänge wie z.B. 222 nm beobachten, bei der sich die Elliptizität besonders stark verändert (vgl. Abb. 10.3, rechts, schwarze Kurve). Über den gesamten gemessenen Temperaturbereich besteht eine klare Temperaturabhängigkeit; erst bei etwa 86 °C scheint eine Art Sättigung gerade erreicht zu werden.

Wird die Probe im Anschluss daran von 86 °C auf 20 °C abgekühlt, so ist bereits bei der ersten, schnellstmöglich durchgeführten Messung (graue Kurve in Abb. 10.3, links) das Spektrum der abgekühlten Probe dem ursprünglich bei 20 °C gemessenen Spektrum (hellblaue Kurve) sehr ähnlich, wobei die Elliptizitäten sogar etwas über den Anfangswert hinausgehen. Ein weiteres Spektrum, das 15 Minuten später aufgenommen worden ist (schwarze Kurve), unterscheidet sich von dem unmittelbar nach dem Abkühlen aufgenommenen praktisch nicht. Dass die beiden nach dem Abkühlen gemessenen Spektren dem ursprünglichen Spektrum nahezu entsprechen, ist ein klares Indiz dafür, dass die thermische Denaturierung der Helix α^{12} reversibel ist und die Rückfaltung (auf der zugänglichen Zeitskala) sehr schnell erfolgt.¹⁶

Mit Hilfe des CCA-Algorithmus' (*convex constraint analysis*) kann zu einem Daten-

¹⁶Warum die beiden nach dem Abkühlen gemessenen Spektren sogar über den ursprünglichen Zustand hinausgehen, es also so aussieht, als ob nach dem Abkühlen der Anteil gefalteten Peptids größer wäre, als er es ursprünglich bei 20 °C war, ist nicht eindeutig festzustellen; es ist aber zu vermuten, dass durch das Erhitzen etwas Puffer verdunstet und aus der Küvette entwichen ist und dass dadurch die Peptidkonzentration zugenommen hat, was zu einem intensiveren Signal wie dem beobachteten führen würde.

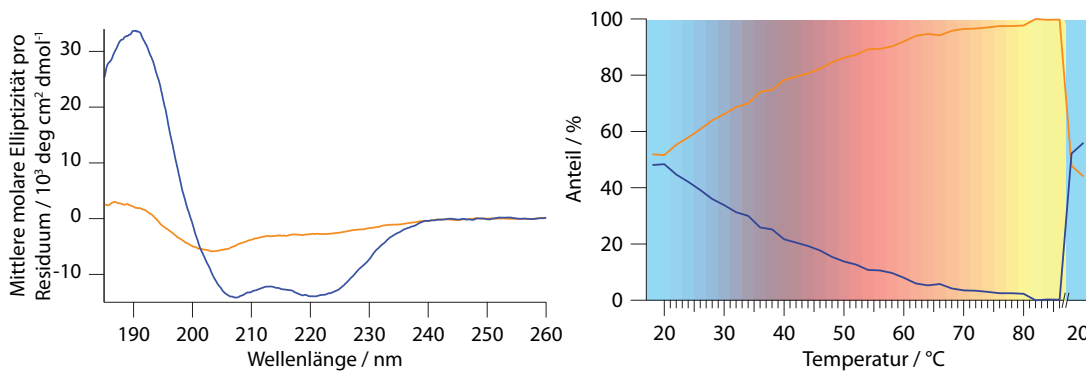


Abbildung 10.4. Links: Basisspektren zu den an α^{12} gemessenen CD-Spektren. Die blaue Kurve entspricht etwa der gefalteten, die orangefarbene der entfalteten α -Helix. Rechts: Temperaturabhängige Koeffizienten zur Rekonstruktion der Originaldaten aus den Basisspektren.

satz von Spektren, die denselben Wellenlängenbereich abdecken, eine vorgegebene Anzahl von Basisspektren gefunden werden, aus denen durch Linearkombination alle Spektren des Datensatzes näherungsweise konstruiert werden können, wobei gewährleistet ist, dass die Summe der Koeffizienten der Linearkombination jeweils Eins ist [83]. Der Datensatz zu α^{12} inklusive der nach dem Abkühlen gemessenen Spektren lässt sich schon durch nur zwei Basisspektren (Abb. 10.4, links) gut reproduzieren. Wird dem Algorithmus dagegen vorgegeben, drei Basisspektren zu finden, so sind das zweite und dritte Basisspektrum nahezu identisch, so dass zwar die mittlere quadratische Abweichung (RMSD) geringfügig abnimmt, jedoch keine neue Information gewonnen wird.

Da sich alle Spektren des Datensatzes in guter Näherung durch Addition der jeweils geeignet gewichteten zwei Basisspektren bilden lassen, ist anzunehmen, dass die Basisspektren direkt zwei Zuständen von α^{12} entsprechen, deren jeweilige Besetzung temperaturabhängig ist. Werden die zugehörigen Koeffizienten gegen die Temperatur aufgetragen, ist direkt zu erkennen, wie sich die Besetzung der beiden Zustände mit der Temperatur verändert. Aus dem Verlauf der Koeffizienten kann das eine Basisspektrum der gefalteten α -Helix zugeordnet werden (blau) und das andere der ungefalteten (orange). Wird die Probe nach der thermischen Denaturierung wieder abgekühlt, faltet α^{12} offenbar zumindest bis zu dem Grad, den es auch vor Erhitzen aufgewiesen hat, schnell zurück (vgl. Abb. 10.4, rechts). Der Verlauf der Koeffizienten steht dabei in guter Übereinstimmung mit der temperaturabhängigen Veränderung der Elliptizität bei 222 nm (vgl. Abb. 10.3, rechts).

Die Ergebnisse — My12 α

Das bei 20 °C an My12 α gemessene Spektrum zeigt im Gegensatz zu dem an α^{12} gemessenen kein einfach zu interpretierendes Muster, das auf die Struktur von My12 α hindeuten würde (Abb. 10.5, links, hellblaue Kurve). Auch die Temperaturabhängigkeit von My12 α unterscheidet sich grundlegend von der von α^{12} . Mit steigender Temperatur verändert

10. Detailuntersuchungen an My12 α

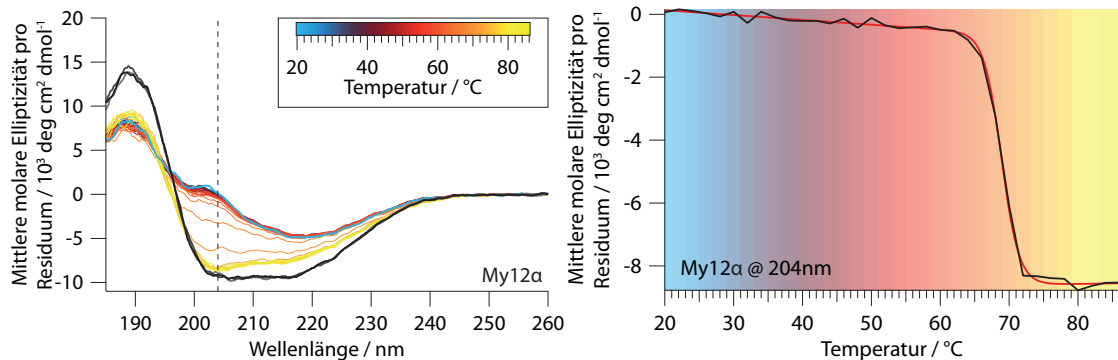


Abbildung 10.5. Links: Temperaturserie von an My12 α gemessenen CD-Spektren. Unmittelbar nach der Abkühlung von 86 °C auf 20 °C sind ein weiteres Spektrum (hellgrau) sowie jeweils 15 Minuten später zwei weitere Spektren (dunkelgrau und schwarz) aufgezeichnet worden. Bei 204 nm (gestrichelte Linie) verändert sich die Elliptizität besonders stark. Rechts: Temperaturabhängiger Verlauf der Elliptizität bei 204 nm. Die rote Kurve ist nach Gleichung 10.1 an die Daten angepasst.

sich das Spektrum lange Zeit nur sehr wenig und annähernd linear, bis es über einen Bereich von 6-8 °C bei etwa 69 °C zu einer starken Veränderung kommt, wonach bis zur Maximaltemperatur von 86 °C erneut Stagnation eintritt. Dies ist wiederum besonders deutlich zu erkennen, wenn die Veränderung der Elliptizität mit der Temperatur bei einer bestimmten Wellenlänge, in diesem Fall bei 204 nm, betrachtet wird (vgl. Abb. 10.5, rechts).

Nach der anschließenden Abkühlung wird offensichtlich nicht wieder der Anfangszustand eingenommen; vielmehr unterscheidet sich das unmittelbar nach dem Abkühlen aufgenommene Spektrum (Abb. 10.5, links, hellgraue Kurve) ganz klar von den bis dahin gemessenen Spektren, während zwei weitere, im Anschluss im Abstand von jeweils 15 Minuten aufgenommene Spektren (dunkelgraue und schwarze Kurve) keine weitere Veränderung zeigen. Durch das Abkühlen findet also offenbar eine strukturelle Veränderung statt, die das Molekül aber nicht in den nativen Anfangszustand überführt. Diese Veränderung erfolgt so schnell, dass sie zum Zeitpunkt der ersten Messung unmittelbar nach dem Abkühlen bereits abgeschlossen ist. Innerhalb der daran anschließenden 30 Minuten verändert sich die Probe nicht weiter, faltet also insbesondere nicht in den nativen Zustand zurück.

Zur Interpretation des temperaturabhängigen Verlaufs der an My12 α gemessenen Spektren ist wiederum der CCA-Algorithmus zur Anwendung gekommen, um die Spektren auf Basisspektren zurückzuführen. Da α^{12} ein Teil von My12 α ist und die My12 α -Spektren daher Anteile von α^{12} enthalten müssen, sind für die Auswertung die My12 α -Spektren um die beiden α^{12} -Basisspektren ergänzt worden. Der so erweiterte Datensatz ist in verschiedenen Durchläufen in zwei bis sieben Basisspektren zerlegt worden. Während die Verwendung von drei gegenüber zwei Basisspektren und von vier gegenüber

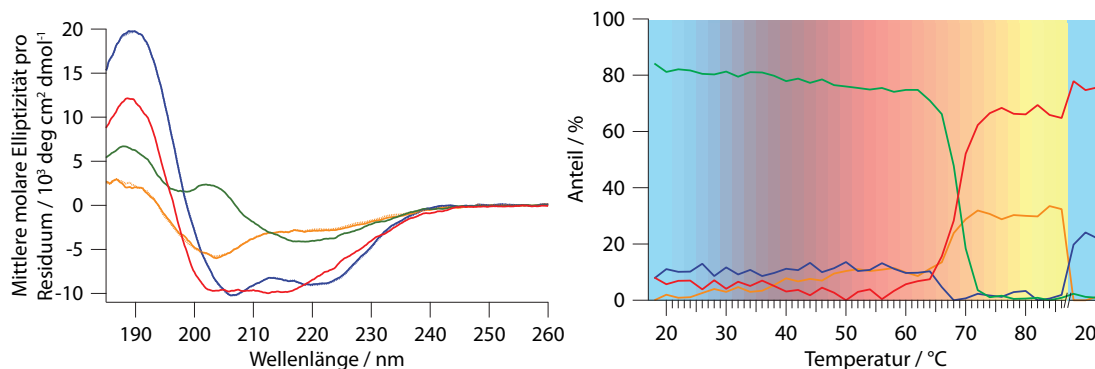


Abbildung 10.6. Links: Basisspektren, aus denen sich die an My12 α gemessenen CD-Spektren rekonstruieren lassen. Die Basisspektren lassen sich näherungsweise Strukturen zuordnen: gefaltete (grün) und entfaltete (rot) Ig-Domäne My12, gefaltete (blau) und entfaltete (orange) α -Helix α^{12} . Rechts: Von der Temperatur abhängiger Verlauf der zur Rekonstruktion zu verwendenden Koeffizienten. Die Farben entsprechen denen der Basisspektren.

drei Basisspektren wesentliche Verbesserungen in der mittleren quadratischen Abweichung (RMSD) zwischen den originalen und den rekonstruierten Spektren darstellen, stagniert der Grad der Verbesserung für größere Zahlen von Basisspektren. Es wird daher davon ausgegangen, dass die wesentlichen temperaturabhängigen strukturellen Veränderungen an My12 α im Rahmen dessen, was aus den CD-Daten sinnvoll herauszuholen ist, durch vier Basisspektren gut abgebildet werden (vgl. Abb. 10.6, links).

Zwei dieser vier Basisspektren sind dabei den Basisspektren für α^{12} sehr ähnlich und werden daher wie dort als für die gefaltete (blau) bzw. ungefaltete (orange) α -Helix stehend interpretiert. Die beiden anderen Spektren (grün und rot) sind den bei 20 °C bzw. 86 °C an My12 α gemessenen Spektren zumindest recht ähnlich und lassen sich durch Betrachtung des Verlaufs der Koeffizienten der My12 α -Basisspektren (vgl. Abb. 10.6, rechts) wiederum Strukturen zuordnen: Das eine (grün) dominiert den nativen Zustand, wird dabei vor allem durch das gefaltete α^{12} (blau) ergänzt und kann daher mit einer gewissen Unschärfe der gefalteten Ig-Domäne My12 zugeordnet werden; das andere (rot) bildet zusammen mit dem Spektrum der entfalteten α -Helix die Spektren bei hohen Temperaturen, bei denen My12 α entfaltet sein dürfte, und kann daher entfaltetem My12 zugeordnet werden.

Der temperaturabhängige Verlauf der Koeffizienten der vier My12 α -Basisspektren (vgl. Abb. 10.6, rechts) lässt sich dann wie folgt interpretieren: Bei Temperaturen unter 65 °C ist das Spektrum dominiert durch das Basisspektrum der gefalteten My12-Domäne (grün) sowie zu einem gewissen konstanten Anteil durch das Spektrum der gefalteten α^{12} -Helix (blau). In einem schmalen Temperaturbereich von etwa 6–8 °C um eine Schmelztemperatur von 69 °C entfalten die Domäne My12 (grün sinkt, rot steigt) sowie zugleich auch die Helix α^{12} (blau sinkt, orange steigt); dieser Übergang entspricht dem bei 69 °C zu beobachtenden Einbruch der Elliptizität bei 204 nm (Abb. 10.5, rechts). Bei wei-

10. Detailuntersuchungen an My12 α

terer Erhöhung der Temperatur verändert sich die Struktur nicht weiter, was eine Bestätigung für die vollständige Entfaltung von My12 α darstellt. Die miteinander nahezu identischen Spektren, die nach Abkühlung von 86 °C auf 20 °C im Abstand von 15 Minuten gemessen worden sind, setzen sich aus den Basisspektren für entfaltetes My12 und gefaltetes α^{12} zusammen. Während α^{12} demnach offenbar in der Lage ist, nach dem Abkühlen schnell zurückzufalten, verbleibt My12 innerhalb von 30 Minuten unverändert entfaltet.

Im nativen Zustand sind gemäß der Kristallstruktur 20% der Aminosäuren in My12 α α -helikal. Der Wert von etwa 80% für die gefaltete Ig-Domäne (grün) bei 20 °C entspricht dem sehr gut; die übrigen 20% teilen sich allerdings auf die Basisspektren für die gefaltete α -Helix (blau) und die entfaltete Ig-Domäne (rot) auf, was, wie aus der bekannten Struktur folgt, nicht der Realität entspricht. Vielmehr dürfte hier der Algorithmus, eventuell auch aufgrund der limitierten Auflösung der Daten, nicht die notwendige Trennschärfe besitzen, um diese beiden einander recht ähnlichen Basisspektren (blau und rot) eindeutig zuzuordnen. Vermutlich wird die Realität besser abgebildet, wenn bis zu etwa 65 °C der Anteil des Basisspektrums der entfalteten Ig-Domäne dem der gefalteten α -Helix zugerechnet wird.

Dass bei der Schmelztemperatur von 69 °C alle Strukturen einen gemeinsamen Übergang erfahren, spricht für eine hohe Kooperativität des Entfaltungsübergangs. Aus dem Vergleich mit dem temperaturabhängigen Verhalten von α^{12} wird deutlich, dass α^{12} durch My12 stabilisiert wird, solange die Domäne gefaltet ist, aber entfaltet, sobald diese entfaltet. Daran zeigt sich erneut die Bedeutung der gemeinsamen Wechselwirkungen für die Stabilität von α^{12} und My12.

Analyse der Thermodynamik

Aus den temperaturabhängigen Veränderungen der Elliptizität können im Prinzip thermodynamische Größen der Faltung/Entfaltung bestimmt werden [39, 41]. Dazu wird zunächst der jeweilige Anteil ungefalteten Proteins aus dem Verlauf der Elliptizität θ ermittelt. Dies erfolgt durch das Anpassen der Gleichung

$$\theta = \theta_{\text{gefaltet}}(T) + f_u \cdot (\theta_{\text{ungefaltet}}(T) - \theta_{\text{gefaltet}}(T)) \quad (10.1)$$

an die Messdaten (vgl. rote Kurven in Abb. 10.3 und 10.5, jeweils rechts), wobei f_u den Anteil ungefaltet vorliegenden Proteins darstellt und die Temperaturabhängigkeit der Elliptizitäten des gefalteten und ungefalteten Zustands in guter Näherung als linear angenommen wird: $\theta_{(\text{un})\text{gefaltet}}(T) = \theta_{(\text{un})\text{gefaltet}}(0) + m_{(\text{un})\text{gefaltet}} \cdot T$. Für einen Zweizustandsübergang sind die Ratenkonstante K und die freie Energie der Faltung ΔG direkt mit f_u über $K = f_u/(1 - f_u)$ bzw. $\Delta G = -RT \ln K = -RT \ln(f_u/(1 - f_u))$ verknüpft. $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ gilt nur für konstante ΔH und ΔS , also wenn sich die Wärmekapazität ΔC_p beim Übergang nicht ändert, was bei Proteinfaltung in der Regel nicht zutrifft [89, 95]. Die Berücksichtigung der Änderung der Wärmekapazität führt zu $\Delta G = \Delta H_0 - T\Delta S_0 + \Delta C_p(T - T_0 - T \ln(T/T_0))$, wobei ΔH_0 und ΔS_0 durch die Temperatur T_0 definiert sind. In der Regel wird für T_0 die Schmelztemperatur T_m gewählt,

10.3. Stabilität der Ig-Domäne My12 bei Kontakt zur gefalteten α -Helix α^{12}

für die $f_u = 0,5$ und somit $\Delta G = 0$ ist. Dann kann ΔS durch $\Delta S_m = \Delta H_m/T_m$ eliminiert werden und man erhält die Gibbs-Helmholtz-Gleichung

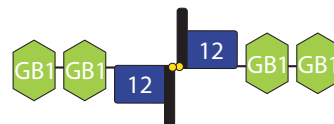
$$\Delta G = \Delta H_m(1 - T/T_m) + \Delta C_p(T - T_m - T \ln(T/T_m)). \quad (10.2)$$

ΔH_m folgt direkt aus dem Produkt der Steigung von ΔG bei T_m und T_m , ΔC_p muss in der Regel kalorimetrisch bestimmt werden.

Über den gemessenen Temperaturbereich ist ΔG in guter Näherung linear und ΔH somit konstant, so dass die Änderung der Wärmekapazität vernachlässigt werden kann. Ein Anpassen der genannten Gleichungen an den temperaturabhängigen Verlauf der Elliptizität bei Entfaltung von α^{12} ergibt eine Schmelztemperatur von 19 °C und eine Faltungsenthalpie bei dieser Temperatur von 40 kJ/mol. Da aufgrund der geringen Schmelztemperatur und der Breite des Übergangs nur für einen relativ kleinen Temperaturbereich Daten vorhanden sind, sind diese Werte nur als Abschätzungen zu verstehen. Sie stehen aber in guter Übereinstimmung mit Werten, die kalorimetrisch für den Übergang von helikaler zu ungeordneter Struktur gemessen wurden [101].

Die Entfaltung von My12 α findet in einem sehr viel schmaleren Temperaturbereich statt, der vollständig von den gemessenen Daten abgebildet wird, so dass im Grunde in ausreichendem Maße Daten für die Analyse der Thermodynamik vorhanden sind. Jedoch stellt die thermische Denaturierung von My12 α im Gegensatz zur α^{12} -Entfaltung keinen reversiblen Prozess dar, wie die CD-Spektren nach dem Abkühlen zeigen. Daher ist nicht gewährleistet, dass die gemessenen Elliptizitäten bei jeder Temperatur eine Gleichgewichtsverteilung zwischen den beiden möglichen Faltungszuständen widerspiegeln. Dass sich die jeweils drei einzeln nacheinander bei einer Temperatur gemessenen Spektren, die dann jeweils zu einem Spektrum gemittelt wurden, voneinander nahezu nicht unterscheiden, spricht dafür, dass dennoch annähernd Gleichgewichtsverteilungen gemessen worden sind und die thermodynamischen Größen durchaus als Abschätzungen herangezogen werden können. Für My12 α findet der Faltungsübergang bei der Schmelztemperatur $T_m = 69$ °C statt; die Faltungsenthalpie bei dieser Temperatur beträgt 760 kJ/mol und ist im Vergleich mit anderen globulären Proteindomänen eher hoch [19, 25, 113].

10.3. Stabilität der Ig-Domäne My12 bei Kontakt zur gefalteten α -Helix α^{12}



Das Konstrukt

Die an My9-My13 und an (My10 α)₈ und (My12 α)₈ gemessenen Daten zeigen, dass in der Regel alle α -Helices entfaltet sind, bevor die erste Ig-Domäne entfaltet (vgl. auch die Plaquekraftverteilungen und die Domänenentfaltungskraftverteilungen in Abb. 8.1, rechts,

10. Detailuntersuchungen an My12 α

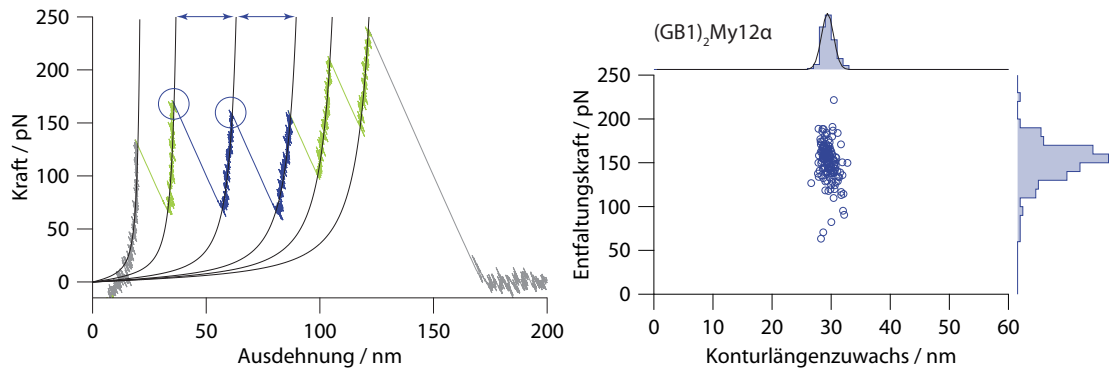


Abbildung 10.7. Links: Beispielkurve einer Messung an $(\text{GB1})_2\text{My12Ca}$. Die schwarzen Kurven sind Fitkurven nach dem WLC-Modell. Die Entfaltungen mit den kürzeren Konturlängenzuwächsen sind GB1 (grün), die mit den längeren My12 (blau) zuzuordnen. Rechts: Zusammenstellung der Kräfte und Konturlängenzuwächse von My12-Entfaltungen mit Histogrammen. Die schwarze Kurve ist eine angepasste Normalverteilung.

und Abb. 9.2, unten). Die gemessene Stabilität der Domänen ist somit diejenige der Domänen in Abwesenheit der jeweiligen α -Helix. Zumindest teilweise weisen die α -Helices allerdings eine ausgeprägte Wechselwirkungsgrenzfläche zur N-terminal angrenzenden Ig-Domäne auf. Welchen Einfluss diese Wechselwirkungen auf die Stabilität der Domäne haben, kann nur untersucht werden, wenn die Domäne mit Kraft belastet werden kann, ohne dass die α -Helix entfaltet oder auf andere Weise von der Domäne getrennt wird.

Das zu ermöglichen, ist das Konstrukt $(\text{GB1})_2\text{My12Ca}$ entworfen worden, bei dem in My12 α das Glycin (G1548), das den Übergang zwischen My12 und α^{12} markiert, gegen ein Cystein mutiert wurde. Als Platzhalter und Aufgriffsmöglichkeit für die AFM-Blattfeder wurden zudem zwei GB1-Domänen [21, 43] vor My12Ca kloniert. Das fertige Konstrukt hat einen N-terminalen His₆-Tag und dimerisiert an der Stelle der Cystein-Mutation über eine kovalente Disulfidbrücke. Wenn das Dimer über einen seiner His₆-Tags an die Objektträgeroberfläche bindet und durch die AFM-Blattfeder auf seiner anderen Seite aufgegriffen wird, so werden die beiden My12-Domänen jeweils zwischen N-Terminus und Cystein mit Kraft belastet; die Helix α^{12} erfährt dagegen keine Kraft.

Die Ergebnisse

In den Messkurven zu $(\text{GB1})_2\text{My12Ca}$ lassen sich kürzere Entfaltungen mit Konturlängenzuwächsen um die 18 nm von längeren bei $29,4 \pm 0,08$ nm ($n = 149$) deutlich unterscheiden (vgl. Abb. 10.7, links). Während die kürzeren eindeutig GB1 zugeordnet werden können [21], stimmen die längeren sehr gut mit den an $(\text{My12}\alpha)_8$ gemessenen Konturlängenzuwächsen überein; sie können daher als das Ergebnis der Entfaltung von My12-Domänen identifiziert werden. Durch die gute Übereinstimmung mit den $(\text{My12}\alpha)_8$ -Längen wird zudem die Wahl von G1548 für den Übergang zwischen Ig-Domäne und α -Helix als sinnvoll bestätigt. Die an $(\text{GB1})_2\text{My12Ca}$ gemessene Kraftverteilung der My12-

Entfaltung weist einen Maximalwert bei 154 ± 1 pN ($n = 149$) auf (Abb. 10.7, rechts). Dieser Wert ist beinahe doppelt so groß wie die an (My12 α)₈ gemessene wahrscheinlichste Entfaltungskraft (siehe Kapitel 9.1). Auf die besondere Geometrie des Konstruktes kann dieser Unterschied nicht zurückgeführt werden, da die Kraft bei (GB1)₂My12Ca genauso N/C-terminal an My12 angreift, wie es bei (My12 α)₈ nach der Entfaltung der Helices im Plateau auch der Fall ist. Weil also das Vorhandensein bzw. Fehlen der gefaltet vorliegenden Helix α^{12} der einzige relevante Unterschied bei der kraftinduzierten Entfaltung der My12-Domänen in (GB1)₂My12Ca und (My12 α)₈ ist, muss die bei (GB1)₂My12Ca beobachtete Stabilisierung von My12 durch die Wechselwirkung mit α^{12} verursacht sein.

10.4. Diskussion der Detailuntersuchungen an My12 α

Mit Hilfe verschiedener Techniken sind Detailuntersuchungen an My12 α mit dem Fokus auf die Wechselwirkungen zwischen My12 und α^{12} vorgenommen worden. Die Molekulardynamik-Simulation stellt dabei die mechanische Denaturierung des Domäne-Helix-Paares My12 α nach, wie sie auch in den kraftspektroskopischen Experimenten erfolgt. Sie ergänzt diese Experimente insofern, als sie mit atomarer Längen- und hoher zeitlicher Auflösung Einblicke in die Abläufe der Entfaltung geben kann. Aufgrund der großen Komplexität des Systems, die schon aus der bloßen Zahl der Atome der Probe und des umgebenden Wassers von rund 190000 ersichtlich wird, ist zur Berechnung nur kurzer Zeiträume (in der Größenordnung von Pikosekunden) erhebliche Rechenzeit (in der Größenordnung von Wochen) notwendig. Um in der kurzen simulierten Zeit kraftinduzierte Entfaltung beobachten zu können, muss mit hoher Geschwindigkeit an der Probe gezogen werden, die zu unnatürlich hohen gemessenen Kräften führt. Dadurch wird allerdings in der Regel die mechanische Hierarchie innerhalb des Moleküls nicht beeinträchtigt, wie die gute Übereinstimmung von in Simulation und Experiment erhobenen Daten zeigt [73, 91]. Auch im vorliegenden Fall decken sich die Ergebnisse der Simulation, dass unter Krafteinwirkung als erstes die α -Helix entfaltet, während die Ig-Domäne gefaltet bleibt, und dass diese Entfaltung zu einem Kraftplateau im ansonsten steilen Kraftanstieg führt, mit der Interpretation der kraftspektroskopischen Messungen. Neu hinzu kommt, dass die Helixentfaltung in zwei getrennte Ereignisse aufgeteilt werden kann: zunächst die Entfaltung des N-terminalen Drittels der Helix bei geringerer Kraft, dann bei höherer Kraft die Entfaltung der übrigen zwei Drittel. Da nur letztere über Wechselwirkungen mit My12 verbunden sind [85], zeigt dies bereits die Bedeutung der gemeinsamen Grenzfläche mit My12 für die Stabilität von α^{12} .

Der Einfluss der Wechselwirkungen auch auf die thermodynamische Stabilität von α^{12} geht deutlich aus den CD-spektroskopischen Messungen hervor. Die in Puffer gelösten isolierten α -Helices falten zwar durchaus auch in Abwesenheit der Ig-Domäne My12, al-

10. Detailuntersuchungen an My12 α

lerdings selbst bei einer niedrigen Temperatur von 20 °C nur zu etwa 50%. Die niedrige Schmelztemperatur und der breite temperaturabhängige Übergang bei thermischer Denaturierung deuten auf eine geringe thermodynamische Stabilität von α^{12} hin. In Verbindung mit My12 in My12 α dagegen zeigt α^{12} ein ganz anderes Verhalten. Durch die Zerlegung der an My12 α gemessenen CD-Spektren in Basisspektren kann der Beitrag der α -Helix zur Gesamtstruktur temperaturabhängig verfolgt werden. Bis zu der vergleichsweise hohen Schmelztemperatur von 69 °C, einem Wert, wie er auch in etwa für die stabileren unter den Ig-Domänen Titins gemessen wurde [87], ist My12 α als ganzes stabil. Erst darüber hinaus entfaltet der Komplex aus α^{12} und My12 offensichtlich kooperativ, wie an dem Temperaturverlauf der Koeffizienten zur Rekonstruktion der gemessenen Daten aus den Basisspektren zu sehen ist, der auf einen reinen Zweizustandsentfaltungsübergang hindeutet. Durch das Vorhandensein der Ig-Domäne wird α^{12} also wesentlich stabilisiert; in dem Moment aber, da die Domäne entfaltet, bricht auch die Struktur der Helix zusammen. Dieser Effekt lässt sich wiederum auf die Wechselwirkungen zwischen α^{12} und My12 zurückführen und zeigt erneut deren Wichtigkeit.

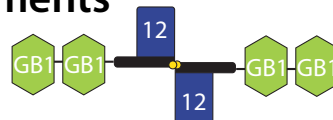
Es ist nicht klar, warum beim Abkühlen nach der thermischen Denaturierung nur α^{12} , nicht aber My12 zurückfaltet. Aggregation ist als Ursache zwar denkbar, aber unwahrscheinlich, weil nicht zu erwarten ist, dass α^{12} inmitten aggregierter Domänen in der Lage ist zurückzufalten. Worin auch immer die Ursache zu suchen ist, dürfte es sicher sein, dass die Entfaltung einer der Ig-Domänen *in vivo* ein ernsteres Problem für die Integrität des Proteins darstellt als die Entfaltung der α -helikalen Verbindungen zwischen den Domänen.

Die AFM-Messungen an (GB1)₂My12Ca bestätigen die Wichtigkeit der Wechselwirkungen zwischen Helix und Domäne. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der CD-spektroskopischen Untersuchung von My12 α wird hier jedoch nicht die Stabilisierung von α^{12} durch My12, sondern umgekehrt die Stabilisierung der Ig-Domäne durch die α -Helix beobachtet. Wie aus den Messungen an (My12 α)₈ und der MD-Simulation an My12 α hervorging, entfaltet unter Kraftbelastung zunächst α^{12} ; erst danach wird My12 N/C-terminal mit Kraft belastet und entfaltet bei einer mittleren Kraft von 83 pN. Wird My12 ebenso N/C-terminal, aber bei gefalteter und mit My12 über die gemeinsame Grenzfläche wechselwirkender α -Helix α^{12} mit Kraft belastet, kann es fast doppelt so hohen Kräften standhalten. So zeigen auch die AFM-Messungen, dass das Zusammenwirken von My12 und α^{12} über die Summe der Eigenschaften von isolierter Ig-Domäne und isolierter α -Helix hinaus einen wesentlichen Beitrag zur Stabilität von My12 α leistet.

11. Faltungskinetik der α -Helix α^{12}

Die Messungen am nativen My9-My13 sowie an den Konstrukten, die ebenso wie My9-My13 eine Abfolge von sich abwechselnden Ig-Domänen und α -Helices aufweisen, haben gezeigt, wie unterschiedlich die elastischen Beiträge dieser beiden Strukturen zur Elastizität Myomesins sind: Bei relativ scharf um die 30 pN verteilten Kräften entfalten zunächst alle α -Helices, die, sobald die Kraft unter diesen Schwellenwert fällt, schnell wieder zurückfalten. Die Ig-Domänen dagegen sind zwar stabiler und halten im Mittel bei derselben Ziehgeschwindigkeit mehr als doppelt so hohen Kräften stand; da ihre Entfaltung aber bei dieser Geschwindigkeit fern vom Gleichgewicht erfolgt, findet Rückfaltung nur bei signifikant geringerer Kraft statt und konnte in einzelnen Rückfaltungsversuchen experimentell nur für den kraftfreien Fall beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Während im AFM-Experiment die Entfaltung einer der Ig-Domänen den vollständigen Zusammenbruch aller ihrer die Tertiärstruktur stabilisierenden Wechselwirkungen und, davon nicht zu trennen, zugleich den Zusammenbruch der Sekundärstruktur darstellt, können im Fall der α -Helix, zwar abhängig von Wechselwirkungen mit der benachbarten gefalteten Domäne, aber dennoch separat von dieser, sowohl die Entfaltung als auch die Rückfaltung eines einzelnen Sekundärstrukturelements beobachtet werden. Im folgenden werden die Ergebnisse von Untersuchungen dieser ungewöhnlichen, schnellen Konformationskinetik eines einzelnen Sekundärstrukturelements vorgestellt.

11.1. Schnelle Reversibilität des Faltungsübergangs eines einzelnen Sekundärstrukturelements



Das Konstrukt

Die wesentlich zur Elastizität von Myomesin beitragende Eigenschaft der α -Helices, bei Kräften oberhalb eines scharfen Grenzwertes zu entfalten und unterhalb desselben Grenzwertes gegen Kraft zurückzufalten, ist abhängig davon, dass die jeweils N-terminal benachbarte Ig-Domäne im gefalteten Zustand vorliegt. Dies ist für My10 α und My12 α gezeigt worden (vgl. Kapitel 9.1) und kann für My9 α und My11 α aus Gründen der Analogie zumindest angenommen werden. Um die Entfaltung und Rückfaltung einer einzelnen α -Helix im Detail studieren zu können, ist es daher notwendig, sicherzustellen, dass die zugehörige Ig-Domäne im nativen Zustand verbleibt und so die benötigte Grenzfläche zu α^{12} zu Verfügung stellt. Die Domäne sollte folglich möglichst nicht mit Kraft belastet werden, während die Helix mechanisch manipuliert wird.

11. Faltungskinetik der α -Helix α^{12}

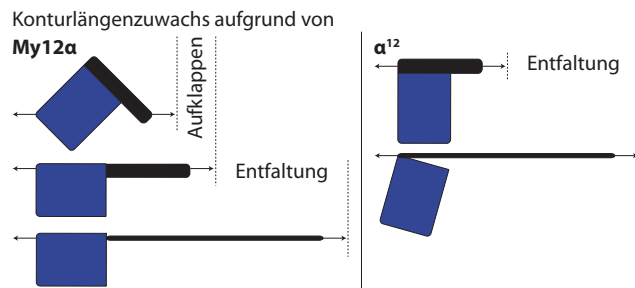


Abbildung 11.1. Messbare Konturlängenzuwächse der α^{12} -Entfaltung. Wirkt die Kraft nicht longitudinal (z.B. bei My12 α , links) enthält der gemessene Zuwachs Anteile, die aus der Umorientierung der Elemente zueinander („Aufklappen“) resultieren.

lisierte Objektträgeroberfläche bindet und die AFM-Blattfederspitze das Dimer an einer der beiden gegenüberliegenden GB1-Domänen aufgreift, werden die beiden α -Helices N/C-terminal mit Kraft belastet, während die beiden My12-Domänen kraftfrei und somit voraussichtlich gefaltet bleiben. Messkurven, in denen dies der Fall ist, können über die Zahl der gemessenen GB1-Entfaltungen identifiziert werden. Da im Wildtyp und wildtyp-ähnlichen Konstrukten die auf α^{12} wirkende Kraft am N-Terminus von My12 und am C-Terminus von α^{12} angreift, wird α^{12} diagonal zu seiner Achse mit Kraft belastet; der zum Beispiel an (My12 α)₈ gemessene Konturlängenzuwachs einer α^{12} -Entfaltung von 6 nm setzt sich daher zusammen aus dem „Aufklappen“ von My12 und α^{12} und der Streckung von α^{12} (vgl. Abb. 11.1, links). In My12Ca(GB1)₂ dagegen wird α^{12} von seinem N- zu seinem C-Terminus, also entlang der Helix-Achse mit Kraft belastet; der Konturlängenzuwachs resultiert dann nur aus der Streckung von α^{12} bei der Entfaltung (Abb. 11.1, rechts). Der erwartete Konturlängenzuwachs beträgt in diesem Fall $22 \cdot 0,365 \text{ nm} - 3,35 \text{ nm} = 4,7 \text{ nm}$.

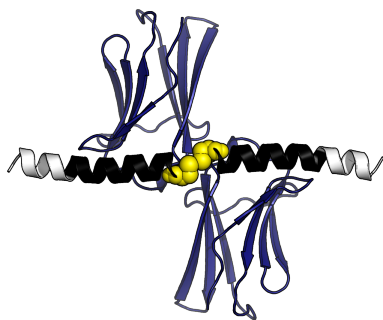
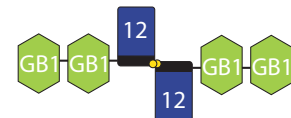


Abbildung 11.2. Cartoon-Darstellung eines My12Ca-Dimers. Die Cysteine sind gelb, der in My12Ca' fehlende Teil der Helix ist weiß eingefärbt.

kungsgrenzfläche zu My12 aufweisen, sind für die entfernten acht Aminosäuren keine Wechselwirkungen zur Ig-Domäne bekannt [85].



Außerdem wurde ein Konstrukt My12Ca'(GB1)₂ entworfen, das sich von My12Ca(GB1)₂ nur darin unterscheidet, dass die α -Helix um die acht C-terminalen Aminosäuren QAAIAEKN gekürzt wurde, was etwa einem Drittel der Helix entspricht. Während die verbleibenden zwei Drittel der α -Helix über die aromatischen Aminosäuren Y1551, Y1555 und F1558 sowie die geladene Aminosäure K1562, die den neuen C-Terminus der α -Helix darstellt, eine Wechselwir-

11.1. Schnelle Reversibilität des Faltungsübergangs eines einzelnen Sekundärstrukturelements

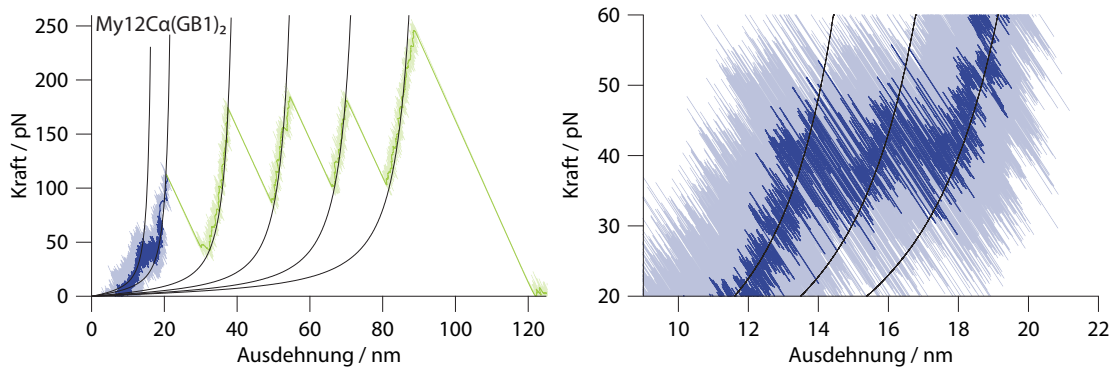
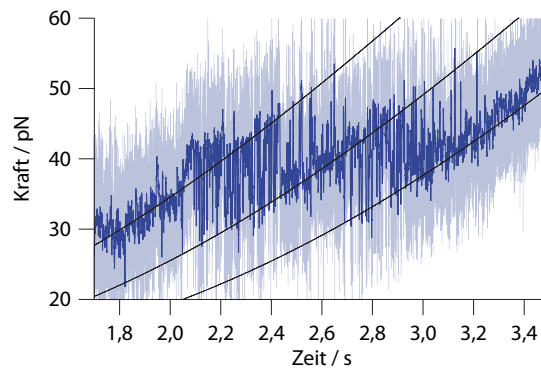


Abbildung 11.3. Links: An dimerem My12Ca(GB1)₂ gemessene Kraft-Ausdehnungs-Kurve. Die GB1-Entfaltungen sind grün dargestellt; die Konformationsübergänge von α^{12} finden im blau eingefärbten Teil statt. Rohdaten sind hell im Hintergrund, gemittelte Werte dunkel davor zu sehen. Die schwarzen Kurven sind WLC-Fitkurven. Rechts: Vergrößerte Darstellung des Bereichs, in dem die Konformationsübergänge stattfinden. Darunter derselbe Kraftbereich gegen die Zeit aufgetragen.



Die Ergebnisse

In an My12Ca(GB1)₂ gemessenen Kraft-Ausdehnungs-Kurven sind klar die Entfaltungen der GB1-Domänen mit Konturlängenzuwächsen um die 18 nm und Kräften zwischen 100 pN und 250 pN zu erkennen (vgl. Abb. 11.3, links, grün). Da die Stabilität von GB1 die von α^{12} bei weitem übertrifft, sind Konformationsübergänge der beiden α -Helices des dimeren Konstruktes im ersten Kraftanstieg vor den GB1-Entfaltungen zu erwarten (Abb. 11.3, blau, Vergrößerungen rechts). Tatsächlich lässt sich dort jeweils ein Bereich bei einer Kraft von etwa 40 pN identifizieren, der zahlreiche schnelle Übergänge gekennzeichnet durch Sprünge in den Kraftwerten aufweist (Abb. 11.3, rechts unten). Um die Zahl der gemessenen Datenpunkte in diesem Bereich zu maximieren, ist die Abtastrate der Datenerfassung von 20 kHz auf 200 kHz erhöht und zudem im relevanten Bereich die Ziehgeschwindigkeit auf 5-10 nm/s reduziert worden. Diese Geschwindigkeit stellt eine untere Grenze dar, denn wird die Geschwindigkeit weiter reduziert, desorbiert in fast allen Messungen das Protein von der Blattfederspitze, bevor der relevante Bereich durchlaufen ist und die daran anschließenden und als „Fingerabdruck“ für die Messung wichtigen GB1-Entfaltungen auftreten können.

Die erhöhte Zahl an Datenpunkten erlaubt es, Details im Bereich der schnellen Übergänge aufzulösen. Betrachtet man den Kraftverlauf, sind Sprünge zwischen drei verschie-

11. Faltungskinetik der α -Helix α^{12}

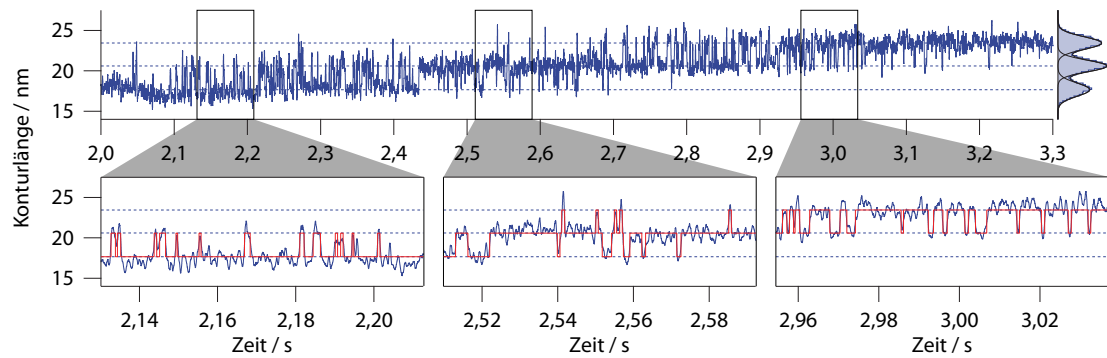


Abbildung 11.4. Konturlängen des Übergangsbereichs der in Abb. 11.3 gezeigten Daten gegen die Zeit aufgetragen (blau). Die Konturlängen in diesem Bereich sind um drei konstante Niveaus normalverteilt, wie rechts die an das Histogramm angepassten Fitkurven (schwarz) zeigen. Unten sind drei Zeitbereiche vergrößert dargestellt. Die roten Linien sind Rekonstruktionen der Daten mit Hilfe eines modifizierten Hidden-Markov-Modells (vgl. Kapitel 5.2).

denen Niveaus zu erkennen, die jeweils unterschiedlichen Konturlängen entsprechen (schwarze Kurven in Abb. 11.3, rechts). Die Niveaus können den Faltungszuständen der beiden α -Helices im My12Ca(GB1)₂-Dimer zugeordnet werden: beide Helices gefaltet (kürzeste); eine Helix gefaltet, eine entfaltet (mittlere); beide Helices entfaltet (längste Konturlänge). Um auf direktere Weise die Abfolge dieser Zustände darzustellen, wird, ähnlich wie von Puchner *et al.* vorgeschlagen [90], der zeitliche Verlauf der Konturlänge aufgetragen, die sich mit Hilfe der Gleichung 3.9 für jeden Zeitpunkt aus der Kraft und der Ausdehnung berechnen lässt. Durch diese Transformation werden die drei in den Kraft-Ausdehnungs-Daten gekrümmten zu horizontalen Niveaus, wobei zu beachten ist, dass bei einer Entfaltung die Kraft einbricht und bei einer Rückfaltung ansteigt, die Konturlänge dagegen bei einer Entfaltung zunimmt und bei einer Rückfaltung abnimmt; das oberste Kraftniveau entspricht also dem untersten Konturlängenniveau und das unterste Kraftniveau dem obersten Konturlängenniveau (vgl. Abb. 11.4).

Durch das langsame Ziehen wird die Kraft kontinuierlich erhöht. Wie aus den Daten klar erkannt werden kann (siehe auch Abb. 11.5), verschiebt sich als Folge davon die Besetzungswahrscheinlichkeit der drei möglichen Zustände des aus den zwei α^{12} -Helices bestehenden Systems mit der Zeit. Ist zunächst der doppelt gefaltete Zustand der wahrscheinlichste (Abb. 11.4, Vergrößerung links), verlagert sich das Gleichgewicht auf die Mischung aus einer gefalteten und einer entfalteten Helix (Mitte), bis schließlich der doppelt entfaltete Zustand am wahrscheinlichsten eingenommen wird (rechts).

Die Messdaten sind um die drei Konturlängenniveaus herum verteilt. Durch Anpassen von Normalverteilungen an die Daten kann aus den Maxima der Fitkurven der Konturlängenzuwachs zwischen den drei Niveaus bestimmt werden (Abb. 11.4, oben rechts). Im Mittel beträgt er für beide Übergänge $3,05 \pm 0,06$ nm ($n = 32$). Das ist deutlich kleiner als die erwarteten 4,7 nm für eine vollständige Helix-Entfaltung und entspricht eher

11.1. Schnelle Reversibilität des Faltungsübergangs eines einzelnen Sekundärstrukturelements

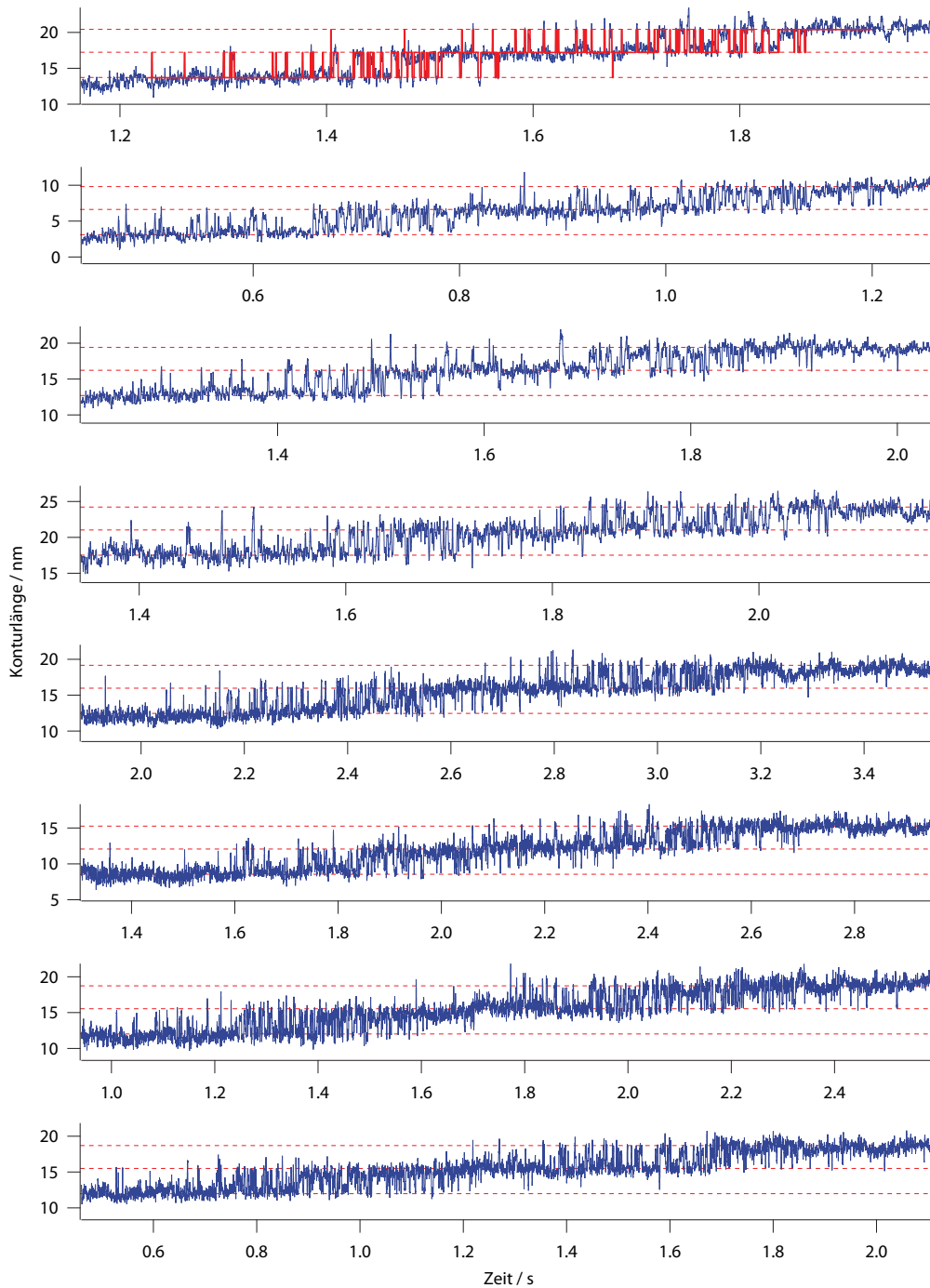


Abbildung 11.5. Zusammenstellung der Bereiche schneller Übergänge verschiedener Einzelmessungen als Konturlänge gegen die Zeit aufgetragen. Die oberen vier Datensätze sind bei 10 nm/s, die unteren vier bei 5 nm/s gemessen worden. Die gestrichelten Linien bezeichnen die Konturlängen, die den drei Konformationszuständen – beide Helices gefaltet (unten); eine gefaltet, eine entfaltet (Mitte); beide entfaltet (oben) – entsprechen. Die rote Kurve in der obersten Messung ist eine automatische Rekonstruktion der Übergänge mit Hilfe eines Hidden-Markov-Modells.

11. Faltungskinetik der α -Helix α^{12}

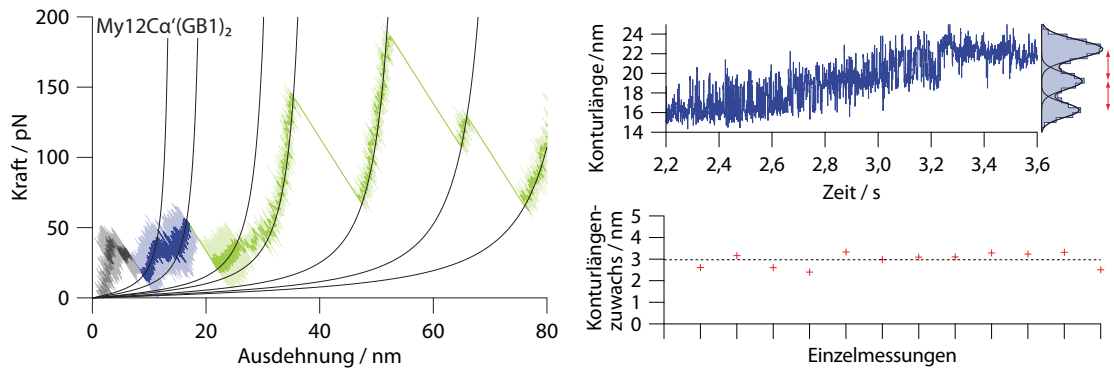


Abbildung 11.6. Links: Kraft-Ausdehnungs-Kurve einer Messung an dimerem My12Ca'(GB1)₂ mit verkürzter α -Helix. GB1-Entfaltungen sind grün, der Bereich, in dem die Helix-Entfaltungen und -Rückfaltungen stattfinden, blau dargestellt. Rechts: Bestimmung des Konturlängenzuwachses pro α -Helix. Die Messung der Zuwächse erfolgt durch das Anpassen von Normalverteilungen an das Konturlängenhistogramm (oben). Die Zuwächse (rot) sind um einen Mittelwert von 2,97 nm verteilt (unten, gestrichelte Linie).

einem Wert, den man für eine Entfaltung der N-terminalen zwei Drittel von α^{12} bis zu K1562 erwarten würde, dem Teil der Helix also, der eine Wechselwirkungsgrenzfläche zu My12 aufweist.

Um zu überprüfen, ob das C-terminale, lösungsmittlexponierte Drittel der α -Helix α^{12} tatsächlich keinen Beitrag zu den gemessenen schnellen Übergängen leistet, sind Messungen an dem Konstrukt My12Ca'(GB1)₂ durchgeführt worden, bei dem ebendiese acht C-terminalen Aminosäuren nicht vorhanden sind. Auch bei diesem Konstrukt sind schnelle Übergänge in einem Bereich um die 40 pN klar zu beobachten (vgl. Abb. 11.6). Nach Transformation der Kraft-Ausdehnungs-Daten in Konturlängen können die Verteilungen durch Normalverteilungen angepasst werden; aus dem Abstand zwischen den Mittelwerten zweier Normalverteilungen wird dann der Konturlängenzuwachs bestimmt (Abb. 11.6, rechts). Er beträgt $2,97 \pm 0,1$ nm ($n = 12$) pro Helix und steht damit in guter Übereinstimmung mit den Werten für My12Ca(GB1)₂.

Zur Auswertung der schnellen Übergänge ist ein erweitertes Hidden-Markov-Modell entwickelt worden, das über eine explizite Zeitabhängigkeit die Kraftabhängigkeit der Übergangswahrscheinlichkeiten von einem Zustand in einen anderen zu berücksichtigen in der Lage ist (siehe Kapitel 5, insbesondere 5.2). Mit Hilfe dieses Modells können die gemessenen Konturlängendaten auf automatisierte und objektive Weise in eine direkte Abfolge von Zuständen umgewandelt werden (vgl. Abb. 11.4, rote Kurven in den Vergrößerungen, und Abb. 11.5, oben). Da diese Zustände jeweils direkt einem Konturlängenzuwachs entsprechen, kann der Algorithmus auch als idealer Filter aufgefasst werden, der das Messsignal vom Rauschen befreit.

Aus den so prozessierten Daten können gemäß der in Kapitel 6.2 beschriebenen Methode die vier Übergangsraten zwischen den drei Zuständen in Abhängigkeit von der je-

11.1. Schnelle Reversibilität des Faltungsübergangs eines einzelnen Sekundärstrukturelements

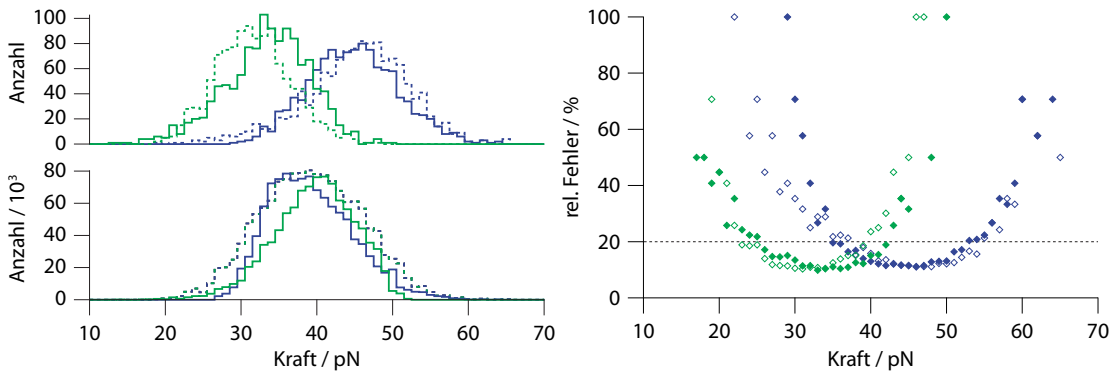


Abbildung 11.7. Links: Histogramme der α -Helix-Entfaltungs-/Rückfaltungsereignisse (oben) bzw. der bei der jeweiligen Kraft gemessenen Datenpunkte (unten). Entfaltungen sind blau, Rückfaltungen grün dargestellt. Die Übergänge sind je nach Ausgangszustand der beiden α -Helices zu unterscheiden: Durchgezogene Linien bezeichnen Übergänge aus dem doppelt ge-/entfalteten Zustand; gestrichelte Linien Übergänge aus dem gemischten Zustand. Rechts: Relative Fehler der aus den Histogrammen links berechneten Raten. Farben wie links; gefüllte Kreise entsprechen den durchgezogenen Linien links, leere Kreise den gestrichelten Linien.

weils aktuell anliegenden Kraft bestimmt werden. Dazu wird abhängig von der Kraft gezählt, zu wie vielen Messzeitpunkten ein bestimmter Zustand vorlag und wie viele Übergänge von dort aus stattgefunden haben (vgl. Histogramme in Abb. 11.7, links). Entsprechend Gleichung 6.11 können daraus die kraftabhängigen Raten ermittelt werden. Die Zahl der Messpunkte und der Übergänge schwankt stark für verschiedene Kräfte, so dass die Raten mit unterschiedlichen Unsicherheiten behaftet sind. Gemäß den Ausführungen in Kapitel 6.2.2 können mit Hilfe der Gleichung 6.18 für jede Rate die Standardabweichung und daraus die relative Abweichung bestimmt werden (vgl. Abb. 11.7, rechts). Für die weitere Betrachtung der kraftabhängigen Raten sind nur diejenigen Werte verwendet worden, deren relative Abweichung kleiner als 20% ist (vgl. Abb. 11.8).

Obwohl insgesamt vier Raten die Kinetik der Übergänge zwischen den drei Zuständen bestimmen, handelt es sich im Grunde um nur zwei Raten: die Entfaltungsratesowie die Rückfaltungsrates einer einzelnen α -Helix. Weil das betrachtete System aus zwei identischen Helices besteht, lassen sich zwei der vier gemessenen Raten wie folgt auf die anderen beiden zurückführen: Die gemessene Rate für den Übergang vom doppelt gefalteten in den gemischten Zustand ist gerade das Doppelte der Entfaltungsrates einer Einzelhelix;

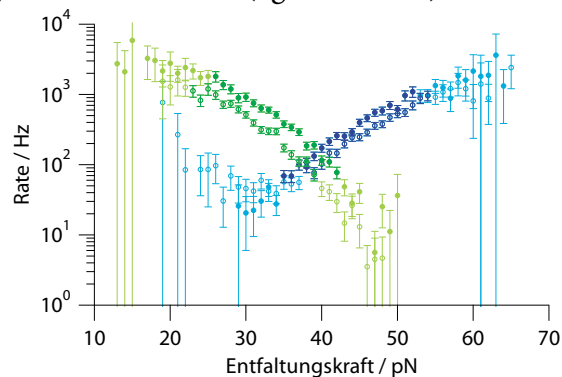


Abbildung 11.8. α -Helix-Entfaltungs-/Rückfaltungsraten. Farben wie in Abb. 11.7. Werte mit relativem Fehler über 20% sind heller dargestellt.

11. Faltungskinetik der α -Helix α^{12}

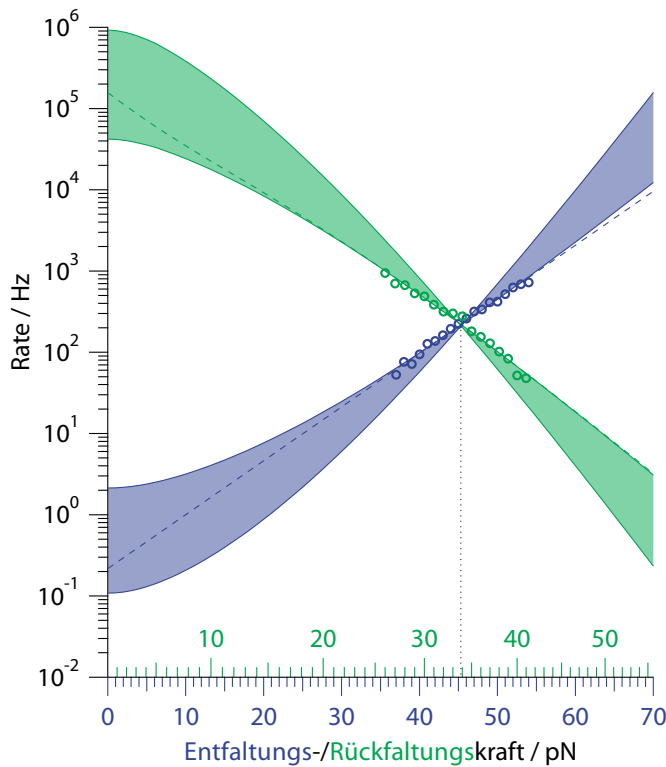


Abbildung 11.9. Kraftabhängige α -Helix-Raten. Die gemessenen Entfaltungsraten (blaue Kreise) und Rückfaltungsraten (grüne Kreise) sind gegen zwei verschiedene Achsen für Entfaltungs- bzw. Rückfaltungskraft aufgetragen, wobei diese so zueinander skaliert sind, dass jeder Entfaltungskraft gerade diejenige Rückfaltungskraft gegenübersteht, die nach einer Entfaltung bei dieser Entfaltungskraft eingenommen würde, und umgekehrt. Die grünen und blauen Linien stellen mögliche Extrapolationen für die Kraftabhängigkeit der Raten dar (zu den verwendeten Modellen siehe Text). Die gepunktete Linie markiert die Entfaltungs- und die Rückfaltungskraft, bei denen Ratengleichgewicht herrscht.

ebenso ist die gemessene Rate für den Übergang vom doppelt entfalteten in den gemischten Zustand gerade das Doppelte der Rückfaltungsrate einer Einzelhelix. Für Kräfte, für die beide Entfaltungsraten bzw. beide Rückfaltungsraten vorliegen, können diese zu einem einzelnen Wert gemittelt werden.

Die Entfaltungs- und Rückfaltungsraten können gegen die Kraft aufgetragen werden, für die sie ausgewertet wurden. Dabei ist zu beachten, dass sich im Moment des Entfaltungs- bzw. Rückfaltungsereignisses die Kraft jeweils verändert. Während Entfaltungsereignisse der Kraft zugeordnet werden, die unmittelbar vor der Entfaltung wirkte, als die α -Helix also in gefaltetem Zustand war, werden Rückfaltungsereignisse der Kraft zugeordnet, die unmittelbar vor der Rückfaltung wirkte, als die α -Helix also in ungefaltetem Zustand war. Es ist daher zweckmäßig, die beiden Raten gegen zwei verschiedene Kraftachsen aufzutragen, wie es in Abb. 11.9 der Fall ist. Dabei ist die Rückfaltungskraftachse gegenüber der anderen gerade so gedehnt, dass sich zueinander gehörende Entfaltungs-/Rückfaltungskraftpaare an derselben Stelle befinden.¹⁷ Auf diese Weise kennzeichnet der Schnittpunkt der kraftabhängigen Verläufe der Entfaltungs- und der Rückfaltungs-

¹⁷Für die Umrechnung der Entfaltungskraft F_N in die Rückfaltungskraft F_U wird anhand der in Kapitel 3.2 genannten Formeln zunächst aus F_N und der Konturlänge L des gefalteten Zustands die Piezoposition z berechnet, und aus dieser und der Konturlänge $L + \Delta L$ des ungefalteten Zustands dann die Kraft F_U . Als mittlere Konturlänge des gefalteten Zustands ist $L = 15$ nm, als mittlere Federkonstante $k_C = 7$ pN/nm verwendet worden.

raten gerade dasjenige Kräftepaar, bei dem die Besetzungswahrscheinlichkeiten für den gefalteten wie für den ungefalteten Zustand gleich sind (Abb. 11.9, gepunktete Linie). Für die Entfaltungs-/Rückfaltungsübergänge von α^{12} herrscht dieses Gleichgewicht zwischen der Entfaltungskraft 45,3 pN und der Rückfaltungskraft 33,8 pN.

Die gegen die Kraft aufgetragenen Entfaltungs- und Rückfaltungsraten entsprechen bei logarithmischer Auftragung mit ihrer V-Form einem typischen *chevron plot*, wobei die angelegte Kraft das Denaturans darstellt. Innerhalb des Kraftbereichs, für den Werte experimentell gemessen werden konnten, erscheint die Kraftabhängigkeit in guter Näherung einfach exponentiell. Für die Extrapolation der Kraftabhängigkeit auch auf die übrigen Kraftbereiche können verschiedene Modelle herangezogen werden. Die einfachste Näherung stellt das bezüglich der kraftinduzierten zusätzlichen Energiebarriere lineare Bell-Modell dar (vgl. Kapitel 4.1; gestrichelte Linien in Abb. 11.9), das Null-Kraft-Raten von $2,2 \cdot 10^{-1}$ Hz und $1,6 \cdot 10^5$ Hz und Potentialbreiten von 6,3 Å und 8,0 Å für Entfaltung bzw. Rückfaltung liefert. Auch das in Kapitel 4.2 vorgestellte nicht-lineare Modell, das die elastischen Beiträge der bereits entfalteten Polypeptidkette und der AFM-Blattfeder sowie der Kontraktion bzw. Elongation des faltenden bzw. entfaltenden Elements berücksichtigt, kann zur Extrapolation herangezogen werden. Wenn für den Parameter a in den Gleichungen 4.11 und 4.12, der angibt, zu welchem Anteil die Probe im Übergangszustand entfaltet ist, verschiedene Werte für die Entfaltungsraten und die Rückfaltungsraten zugelassen werden, reproduziert das Modell mit Null-Kraft-Raten von 2,1 Hz bzw. $4,2 \cdot 10^4$ Hz und $a = 0,30$ bzw. $a = 0,68$ die Daten im gemessenen Bereich sehr gut (innere Ränder der eingefärbten Flächen in Abb. 11.9); wird dagegen durch Vorgabe desselben a für beide Raten derselbe Übergangszustand sowohl für Entfaltung als auch für Rückfaltung erzwungen, weicht die Anpassung, die für die Null-Kraft-Raten Werte von $1,1 \cdot 10^{-1}$ Hz bzw. $9,2 \cdot 10^5$ Hz bei $a = 0,49$ ergibt, von den gemessenen Werten deutlich, wenn auch nicht wesentlich ab (äußere Ränder). Liegt der Parameter a zwischen diesen beiden Extremen, kommen die gesamten in Abb. 11.9 blau bzw. grün eingefärbten Bereiche für die Extrapolation in Frage.

11.2. Diskussion der α^{12} -Faltungskinetik

Die vorgestellten Messungen an der α -Helix α^{12} eröffnen Einblicke von hohem Detailreichtum in die Kinetik der Faltung und Entfaltung eines einzelnen Sekundärstrukturelements. Dazu ist es notwendig, Längenunterschiede mit Subnanometerpräzision zu bestimmen. Denn während der Konturlängenzuwachs der α^{12} -Entfaltung einen Wert von 3 nm aufweist, beträgt die tatsächlich zu messende Zunahme der Ausdehnung nach einer Entfaltung bei etwa 40 pN nur 1,5 nm. Die große Längenpräzision des Rasterkraftmikroskops zusammen mit den erstaunlich hohen Kräften der α -Helix-Entfaltung und -Rückfaltung ermöglicht eine eindeutige Umrechnung der gemessenen Längen und Kräfte in Konturlängen und mit Hilfe des Hidden-Markov-Modells deren zuverlässige

11. Faltungskinetik der α -Helix α^{12}

Zuordnung zu Konformationszuständen der Helix. Die Häufigkeit der Übergänge zwischen der gefalteten und ungefalteten Konformation ist ein direktes Maß für die Kinetik der Helixentfaltung und -rückfaltung.

Wie in den Ergebnissen bereits dargestellt, hängt der erwartete Konturlängenzuwachs aus der α^{12} -Entfaltung von der Richtung der angelegten Kraft ab (vgl. Abb. 11.1) und ist bei longitudinaler Krafteinwirkung um etwa ein Viertel kleiner als bei diagonalen. Betrachtet man für eine einfache Abschätzung die freie Energie der Entfaltung als Produkt aus Kraft und Längendifferenz, ist zu erwarten, dass bei um ein Viertel verminderter Längendifferenz die Entfaltung desselben Objekts bei um ein Drittel höheren Kräften stattfindet. Da das Kraftplateau in den Messungen mit diagonalen Krafteinwirkung bei etwa 30 pN zu beobachten ist, sind in den Messungen mit longitudinaler Krafteinwirkung Übergänge bei etwa 40 pN zu erwarten. Das entspricht gut dem Mittelwert zwischen den gemessenen Gleichgewichtskräften von 45,3 pN und 33,8 pN.

Auch nach Berücksichtigung der speziellen Geometrie der Krafteinwirkung ist der gemessene Konturlängenzuwachs der schnellen α^{12} -Entfaltungs- und -rückfaltungsübergänge kleiner als erwartet. Werden die Messungen an einem Konstrukt mit einer um acht C-terminale Aminosäuren verkürzten Helix wiederholt, verändert sich der Konturlängenzuwachs nicht. Das zeigt, dass im Bereich der schnellen Helixübergänge die Entfaltung und Rückfaltung nur der übrigen N-terminalen zwei Drittel der Helix α^{12} stattfindet. Die Entfaltung des C-terminalen Drittels dürfte innerhalb des ersten Kraftanstiegs vor oder mit der ersten Entfaltung der gesamten Helix erfolgen und im Gegensatz zum Rest der Helix bei Kräften wie der Plateaukraft irreversibel sein. Das C-terminal etwa ein Drittel von α^{12} eine geringere Stabilität als der Rest aufweist, deckt sich sehr gut mit den Ergebnissen der in Kapitel 10.1 vorgestellten Molekuldynamik-Simulation. Während das C-terminale Drittel vollständig lösungsmittel exponiert ist, weisen die N-terminalen zwei Drittel polare Wechselwirkungen zu My12 auf, die, wie in Kapitel 9.1 gezeigt wurde, notwendig für die Rückfaltung von α^{12} gegen Kraft sind. Die gemeinsame Grenzfläche der α -Helix mit der Ig-Domäne ermöglicht demnach nur demjenigen Teil von α^{12} , der polare Wechselwirkungen mit My12 eingeht, die beobachtete schnelle Reversibilität.

Nachdem in früheren Messungen zunächst nur die Proteinentfaltung mit dem AFM untersucht worden ist, sind in den letzten Jahren auch kraftspektroskopische Untersuchungen der Proteinfaltung durchgeführt worden. Diese beschränken sich zumeist darauf, die Kraft nach der Entfaltung für eine gewisse Zeit auf Null zu relaxieren und so die Zeitabhängigkeit der Rückfaltung im kraftfreien Fall zu untersuchen [93, 103]. In neueren Messungen wird das AFM nicht bei konstanter Ziehgeschwindigkeit betrieben, sondern die angelegte Kraft über eine Rückkopplung konstant gehalten [97]; in solchen Experimenten ist die Rückfaltung von Proteindomänen gegen angelegte Kräfte von etwa 15 pN beobachtet worden [32, 36]. Die Interpretation der Messungen ist jedoch umstritten [15, 107]; zudem könnte das System anfällig für Artefakte aus dem Rückkopplungsmechanismus sein. Alle diese Experimente stellen die Rückfaltung nur indirekt als

Verkürzung der Polypeptidkette fest, die im Nachhinein überprüft wird; nur in wenigen Experimenten konnte bisher direkt Rückfaltung gegen Kraft beobachtet werden [54, 96, 99]. Zwar ermöglichen Messungen bei konstanter Kraft die direktere Analyse kinetischer Größen aus den Messdaten, wie aber in Kapitel 6.2.1 gezeigt wurde, lassen sich Messungen bei variabler Kraft als Reihe von Messungen bei konstanter Kraft betrachten und dann ebenso direkt wie diese auswerten. Ein Vorteil der graduellen Veränderung der Kraft im Laufe der Messung ist ferner, dass dadurch unmittelbar auch die Kraftabhängigkeit der Kinetik abgebildet wird, wie es für die Messungen an My12Ca(GB1)₂ über einen Kraftbereich von ca. 25-55 pN erfolgt ist.

Der in diesem Kraftbereich erhobene Datensatz ist ausreichend umfangreich für eine klare Bestimmung der Kraftabhängigkeit der Entfaltung- und Rückfaltungsraten von α^{12} . In guter erster Näherung verändern sich die Raten einfach exponentiell mit der Kraft, wie schon optisch an der Linearität in der logarithmischen Auftragung zu erkennen ist. Neben der konkreten Kraftabhängigkeit der Raten über einen gewissen Kraftbereich interessieren insbesondere auch die Raten im kraftfreien Fall, da sie Aussagen über die Grundstabilität des Proteins und den Vergleich mit anderen Proteinen ermöglichen. Zwar lässt sich durch Vergrößerung der Zahl der Messungen der experimentell vermessene Kraftbereich erweitern; aber schon die gaußförmigen Verteilungen der bei verschiedenen Kräften gemessenen Übergangereignisse in Abb. 11.7 zeigen, dass sich für α^{12} -Übergänge der Kraftbereich realistisch nie bis zu Null wird ausweiten lassen. Die Null-Kraft-Raten können daher nur durch die Extrapolation des vorhandenen Datensatzes bestimmt werden, die allerdings nicht eindeutig, sondern von der Wahl des entsprechenden Modells abhängig ist.

Ein in der Hinsicht, dass es die beobachtete exponentielle Abhängigkeit auch für den gesamten übrigen Kraftbereich annimmt, besonders einfaches Modell ist das Bell-Modell, das sich offensichtlich gut an den gemessenen Kraftbereich anpassen lässt. Wie zuvor erläutert (Kapitel 4.1), stellt die Verwendung eines festen absoluten Abstands zwischen Ausgangs- und Übergangszustand im Bell-Modell eine sehr starke Vereinfachung dar; auch sonst wird das Bell-Modell vielfach als zu einfach kritisiert [28, 45, 98, 116]. Darum soll hier außerdem das in Kapitel 4.2 vorgestellte Modell verwendet werden, das zunächst unabhängig von der Position des Übergangszustandes alle im System aus AFM, bereits entfalteter Polypeptidkette und entfaltendem/rückfaltendem Protein vorhandenen elastischen Beiträge zur Veränderung der Energiedifferenz zwischen nativem und entfaltetem Zustand berücksichtigt. Von der so berechneten Gesamtenergie entfällt ein Anteil auf die Absenkung der Entfaltungsbarriere und ein anderer Anteil auf die Erhöhung der Faltungsbarriere (a bzw. $1 - a$ in den Gleichungen 4.11 und 4.12). Durch ein kraftunabhängiges a wird somit letztlich der Übergangszustand nicht absolut, sondern nur relativ zwischen nativem und entfaltetem Zustand fixiert. Es wäre zu erwarten, dass für die Entfaltung und die Rückfaltung dasselbe a zu wählen ist, dass also der Übergangszustand für beide Richtungen des Übergangs derselbe ist. Mit dieser Einschränkung lässt sich das Modell jedoch wesentlich schlechter an die Daten anpassen als beim Zulassen

11. Faltungskinetik der α -Helix α^{12}

unterschiedlicher Positionen des Entfaltungs- und des Rückfaltungsübergangszustands. Ein Anteil von 30% der jeweiligen Gesamtenergie begünstigt die Entfaltung, ein Anteil von 32% erschwert die Rückfaltung, so dass eine energetische „Lücke“ von 38% verbleibt. Es ist unklar, worauf diese zurückzuführen ist. Eine mögliche Interpretation kann darin bestehen, dass ein breiter Übergangszustand vorliegt, dessen energetisches Maximum durch die kraftabhängige Verformung des Potentials bei Entfaltung oder Rückfaltung stark verschoben wird; oder dass das Potential für Entfaltung und Rückfaltung (über die kraftabhängigen Effekte hinaus) nicht dasselbe ist, sondern unterschiedlichen Reaktionskoordinaten folgt (vgl. [96]). Der „übrige“ Energieanteil könnte einer Rekonfigurationsenergie entsprechen, die aus dem Übergang von der geordneten Geometrie einer gefalteten Struktur zur auf keine Struktur festgelegten Polypeptidkette resultiert.

Aus den gemessenen Daten können darüber keine konkreten Erkenntnisse gewonnen werden. Ohnehin ist bezweifelt worden, dass aus der Extrapolation von unter Kraft gemessenen Daten auf die Raten im kraftfreien Fall geschlossen werden kann, weil sich schon bei geringen Kräften die Potentiallandschaft von der des kraftfreien Falls qualitativ wesentlich unterscheidet [119, 120]. Insbesondere im Fall der kraftinduzierten α^{12} -Entfaltung und -Rückfaltung, die nicht bloß unter experimentellen Umständen verursacht wird, sondern von der anzunehmen ist, dass sie regelmäßig *in vivo* stattfindet und eine wichtige physiologische Rolle spielt (siehe dazu die abschließende Diskussion in Kapitel 12), sind die Null-Kraft-Raten von geringerem Interesse als die konkrete Kraftabhängigkeit der Entfaltung und Rückfaltung im gemessenen Kraftbereich, der auch dem physiologisch relevanten Bereich entspricht.

Dass überhaupt gegen Kräfte in der Größenordnung von einigen zehn Piconewton Proteinfaltung stattfinden kann, ist vergleichsweise ungewöhnlich. Dies kann nur regelmäßig erfolgen, wenn der Energiegewinn aus der Faltung das aus der angelegten Kraft resultierende Anwachsen der Übergangsbarriere kompensiert. Die Faltung wird begünstigt, wenn die faltende Struktur klein ist, weil dann die übrigen elastischen Elemente durch die Faltung nur wenig gedehnt werden und die Kraft nur wenig ansteigt; die Wechselwirkung mit stabilisierenden Strukturen wirkt sich zudem positiv auf die Faltung aus, da die Energie dieser Wechselwirkung zur internen Faltungsenergie der Probe hinzukommt. Dies beides ist für die Faltung von α^{12} erfüllt. Obwohl in anderen Experimenten durchaus die Entfaltung ähnlich kurzer Sekundärstrukturelemente aus einem größeren strukturellen Verbund heraus untersucht worden ist (z.B. [27, 91]), konnte hier zum ersten Mal eine derartige Rückfaltung gegen beträchtliche externe Kräfte, die zudem einem physiologischen Vorgang entspricht, gemessen und analysiert werden.

12. Gesamtbetrachtung der Ergebnisse

Aus den Ergebnissen der vorgestellten Messungen sind wichtige Erkenntnisse über die mechanische Entfaltung und Rückfaltung Myomesins gewonnen worden. In ihrem Entfaltungsverhalten unterscheiden sich die Ig-Domänen und die sie verbindenden α -Helices erheblich. Die α -Helices entfalten bei einer scharf definierten Plateaukraft und stets, bevor eine der Domänen entfaltet. Die Entfaltung der Ig-Domänen findet also bei N/C-terminaler Kraftereinwirkung auf My9-My13 erst statt, wenn die α -Helices bereits entfaltet sind, wie sich in den Messungen an diesem Konstrukt und den einzelnen Domäne-Helix-Paaren gezeigt hat und was durch die Molekulardynamik-Simulation bestätigt wird. Die Ig-Domänen sind mit Ausnahme der etwas schwächeren Domäne My9 einander in ihrer Stabilität sehr ähnlich und werden durch die Wechselwirkung mit der jeweils C-terminalen α -Helix stabilisiert (siehe Messung an $(\text{GB1})_2\text{My12Ca}$). Das erklärt, warum trotz breiter Entfaltungskraftverteilung Domänenentfaltung stets erst nach der Entfaltung der α -Helices im Plateau beobachtet wurde.

Auch hinsichtlich der Rückfaltung sind die Ig-Domänen und α -Helices sehr verschieden. Nach Entfaltung faltet in Abwesenheit von Kraft die Domäne My10 auf einer Zeitskala von Sekunden zurück [12, 100]; das entspricht einer Größenordnung, die auch für andere Ig-Domänen beobachtet worden ist [55, 93]. Obwohl keine Messungen dazu durchgeführt worden sind, ist aufgrund dieser Zeitskala nicht damit zu rechnen, dass Faltung von Myomesin-Ig-Domänen gegen Kraft gemessen werden könnte, wenn sogar die Filamin-Ig-Domäne 4 aus *dictyostelium*, die kraftfrei innerhalb von Millisekunden zurückfalten kann, bei langsamer Relaxation der Kraft nach Entfaltung erst bei Kräften unter 4 pN zurückfaltet [96, 103]. Im Gegensatz zu den Ig-Domänen falten die α -Helices Myomesins gegen Kräfte in demselben Kraftbereich zurück, in dem sie auch entfalten. Aufgrund der beobachteten Kraftplateaus in den Messungen an My9-My13 dürfte das für alle vier α -Helices gleichermaßen gelten, für α^{10} und α^{12} ist es erwiesen. Diese bemerkenswerte Reversibilität der Entfaltung gegen hohe Kräfte ist allerdings nur möglich, wenn die entsprechende N-terminal benachbarte Ig-Domäne gefaltet vorliegt und so die gemeinsame Wechselwirkungsgrenzfläche zur Verfügung stellt. Wie auch die Temperaturreihen der Zirkulardichroismus-Messungen zeigen, sind diese Wechselwirkungen essentiell für die Stabilität des Domäne-Helix-Paares. Nicht nur stabilisiert die Helix die Domäne (siehe oben), sondern die Domäne auch die Helixfaltung.

Ergänzend zu den kraftspektroskopischen Untersuchungen der Ig-Domänen- und α -Helix-Entfaltung und -Rückfaltung sind von Morten Bertz AFM-Messungen zur Untersuchung der Dimerstabilität durchgeführt worden. Er hat dazu das in Kapitel 9.3.2 vorgestellte $(\text{Ubi})_3\text{My11-My13}$ -Konstrukt entwickelt, das es ermöglicht, die Dimerdis-

12. Gesamtbetrachtung der Ergebnisse

soziation als Ereignis, das einen Konturlängenzuwachs bewirkt und daran identifiziert werden kann, in Kraftspektroskopie-Daten zu messen. Die gemessene Verteilung der Dimerdissoziationskräfte ist ein Maß für die Stabilität der Dimerbindung; sie ist breit verteilt über einen Bereich von 80-180 pN mit einem Maximum bei 137 pN, das klar über dem Kraftverteilungsmaximum der Ig-Domänenentfaltung bei etwa 88 pN liegt. Dass die Messungen an dem dimeren My9-My13 selten mehr als vier Domänenentfaltungen zeigen, liegt vermutlich daran, dass sich die Entfaltungskraft- und Dimerdissoziationskraftverteilung überlappen und das Dimer bricht, bevor alle Domänen entfaltet werden können.

Mit diesem Wissen über die Entfaltung und Rückfaltung und die gegenseitigen Wechselwirkungen der C-terminalen Ig-Domänen und α -Helices Myomesins sowie über die Stabilität der Dimerbindung sind alle wesentlichen Elemente, die die mechanischen Eigenschaften Myomesins ausmachen, bekannt. Im folgenden soll deren Zusammenwirken im Hinblick auf die physiologische Funktion Myomesins in der M-Bande diskutiert werden.

Wegen der Rolle Myomesins als Quervernetzer der Myosinfilamente sind dessen elastische Eigenschaften und die Stabilität der Dimerbindung von unmittelbarer Bedeutung für die Integrität des Zentrums des Sarkomers. Frühere mechanische Untersuchungen an Myomesin haben, als die Struktur des C-terminalen Endes Myomesins und insbesondere das spezielle Faltungsmotiv der α -helikalen Verbindungen zwischen den Ig-Domänen noch nicht durch Röntgenstrukturanalyse aufgelöst worden war, nur die Stabilität einzelner Ig- und Fibronektindomänen untersucht. Dabei sind im Speziellen die Rolle des auch nativ unstrukturiert vorliegenden EH-Segments, das eine Länge von etwa 100 Aminosäuren aufweist, und seine Beiträge an entropischer Elastizität zur Elastizität des gesamten Moleküls untersucht worden [12, 100]. Myomesin, das dieses EH-Segment zwischen den Fibronektindomänen My6 und My7 aufweist, ist zunächst für ein eigenes Protein gehalten und Skelemin getauft worden, stellt aber eine besondere Isoform von Myomesin dar [110]. Dieses EH-Myomesin tritt ausschließlich in embryonischen Herzen von Wirbeltieren auf und wird um den Zeitpunkt der Geburt rasch herunterreguliert [2]; es kann daher ausgeschlossen werden, dass das EH-Segment eine allgemein wichtige Rolle in der M-Bande spielt. Es ist vielmehr infolge der Auflösung der genauen Struktur der Dimerbindung und der Entdeckung der α -helikalen Verbindungen in Myomesin spekuliert worden, dass gerade diese α -Helices wesentliche neuartige Beiträge zur Elastizität des gesamten Moleküls leisten könnten [85].

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse zeichnen ein detailliertes Bild der Elastizität des C-terminalen Endes Myomesins. Drei mechanische Elemente, die zusammen das elastische Verhalten des Proteins ausmachen und eine hierarchische Stufung aufweisen, sind zu unterscheiden: Das schnelle und reversible Entfalten und Zurückfalten der α -Helices zwischen den Ig-Domänen findet in dem schmalen Kraftbereich der beobachteten Plateaus bei den niedrigsten Kräften statt; erst bei in der Regel klar darüber

liegenden Kräften (mit Ausnahme von My9) entfalten auch die Ig-Domänen; Dimerdissoziation schließlich findet im Mittel bei den höchsten Kräften statt. Somit ist die schnelle Reversibilität der α -Helices die erste und, solange die Ausdehnung der Helices ein weiteres Ansteigen der Kraft wirkungsvoll verhindert, die dominierende elastische Antwort auf die Streckung Myomesins in der M-Bande.

In den Messungen an My12Ca(GB1)₂, bei denen ganz spezifisch nur die α -Helices mit Kraft belastet werden, ist die schnelle Reversibilität der α -Helix-Entfaltung und -Rückfaltung direkt in den Messdaten zu erkennen. Es lassen sich die einzelnen Übergänge identifizieren und Übergangsraten bestimmen, die im mittleren Kraftbereich bei etwa 40 pN, in dem zahlreiche Entfaltungen und Rückfaltungen beobachtet werden können und der dem für das Kraftplateau verantwortlichen Bereich entspricht, 10^2 - 10^3 Hz sowohl für Entfaltung als auch für Rückfaltung betragen. Die Größenordnung der mittleren Dauer, innerhalb derer ein Sarkomer bis zur maximalen Spannung kontrahiert, ist mit 100 ms demnach wesentlich größer als die Zeitskala, auf der die α -Helix-Übergänge stattfinden [74]. Durch Extrapolation auf den Wert in Abwesenheit von Kraft erhält man eine Rückfaltungsrate von 10^5 - 10^6 Hz. Wenn auch aufgrund der unsicheren Wahl des richtigen Modells die Extrapolation nicht eindeutig ist, dürfe dieser Bereich eine gute Abschätzung der Null-Kraft-Rate darstellen; sie steht zudem in sehr guter Übereinstimmung mit Werten, die für die Faltung einer α -Helix in Lösung experimentell und in theoretischen Modellen bestimmt wurden [29, 61].

Unabhängig vom Modell für die kraftabhängige Veränderung der Höhe der Übergangsbarriere der α -Helix-Entfaltung und -Rückfaltung kann die Differenz in der freien Energie zwischen gefalteter und entfalteter α -Helix aus der durch die Faltungsübergänge begrenzten Fläche zwischen den Kraft-Ausdehnungs-Kurven des gefalteten und des entfalteten Zustands gemessen werden. Dies ist nur möglich, wenn wie im Fall der Messungen an α^{12} die Geschwindigkeit der Entfaltungs-/Rückfaltungsübergänge schnell im Vergleich zur experimentellen Zeitskala ist und somit ein Gleichgewicht abgebildet wird. Der so gemessene Wert von $16 k_B T$ ist insbesondere im Vergleich zu freien Energien der Faltung ganzer Domänen beachtlich; für Ig-Domänen z.B. liegen sie typischerweise bei Werten von 4-15 $k_B T$ [22, 87]. Daraus wird ersichtlich, dass hier große Teile der zur Verfügung stehenden freien Energie für die Wechselwirkung der Ig-Domäne mit der α -Helix aufgebracht werden, um auf diese Weise die schnelle Rückfaltung eines Strukturelements zu ermöglichen, dessen Längenzuwachs bei Entfaltung dadurch auch gegen relativ hohe Kräfte noch reversibel ist.

Die wichtige Rolle des reversiblen Längenzuwachses wird aus der Funktion Myomesins in der M-Bande ersichtlich, die durch die Quervernetzung von Myosin vor allem in der Stabilisierung der M-Banden-Struktur besteht. Weil bei Muskelkontraktion die Aktin- und Myosinfilamente aneinander entlanggleiten und Myosin im Gegensatz zu Aktin nicht starr fixiert ist, ist die zentrale Positionierung des Myosinfilaments intrinsisch instabil. Kleine Asymmetrien in der longitudinalen Position der Myosinfilamente bewirken zwangsläufig ein Ungleichgewicht in der Anzahl der Myosinmotordomänen in

12. Gesamtbetrachtung der Ergebnisse

beiden Hälften des Sarkomers. Dieses führt dazu, dass von beiden Seiten der M-Bande unterschiedliche Kräfte auf die Filamente einwirken [50, 68, 111]. Ohne Stabilisierung würde sich ein solches Ungleichgewicht dadurch selbst noch verstärken und die gesamte A-Bande weit aus dem Zentrum gleiten, wie elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigen [81]. Um die Stabilität des Kontraktionsmechanismus im Sarkomer zu gewährleisten, muss nach der Kontraktion die strukturelle Ordnung wiederhergestellt werden. Die Fehlpositionierung der Myosinfilamente relativ zum gesamten Sarkomer wird vor allem durch Titin kompensiert [48], die Verschiebungen der Myosinfilamente zueinander durch das M-Banden-Netzwerk, im Wesentlichen also durch Myomesin [3]. Die dabei entstehenden Kräfte können durch die Länge der Verschiebung zwischen den Filamenten und den Vergleich mit auf Titin in der M-Bande wirkenden Kräften auf wenige zehn Pikonewton abgeschätzt werden, die an Myomesin anliegen [91].

Diese Kräfte wirken vor allem auf die C-terminalen Domänen Myomesins, die aktuellen Modellen zufolge parallel zur Sarkomerachse orientiert sind, während die übrigen Domänen transversal dazu verlaufen [1, 64, 80]. Dass in der N-terminalen Hälfte Myomesins Bindungsstellen für Titin, Obscurin und Kreatinkinase identifiziert wurden [35, 47, 78], legt die Interpretation nahe, dass dieser Bereich der Verankerung Myomesins in das Proteinnetzwerk dient. Die elastische Antwort Myomesins auf externe Zugkräfte ist deshalb im Wesentlichen von den elastischen Eigenschaften der C-terminalen Myomesin-Ig-Domänen mit ihren α -helikalen Verbindungen sowie von der Stabilität der Dimerisierung geprägt.

Bricht die Dimerbindung aufgrund von Zugkräften auseinander, ist die Quervernetzung der Myosinfilamente irreversibel zerstört, solange die einzelnen Monomere durch die Zugkräfte räumlich voneinander getrennt sind. Die mittlere Dimerdissoziationskraft von 137 pN stellt daher eine obere Grenze dafür dar, welcher Kraft Myomesin *in vivo* sinnvollerweise ausgesetzt sein darf. Die Verteilungen der (schwächeren) Domänenentfaltungs- und der (stärkeren) Dimerdissoziationskräfte sind breit und überlappen (vgl. dazu [13]). Während für Titin die Entfaltung einzelner Ig-Domänen durchaus zur Kompensation extremer Kräfte als physiologisch relevant angesehen wird [69], ist es daher unwahrscheinlich, dass Myomesin im Verlauf von Sarkomerkontraktionen regelmäßig auch nur mit typischen Domänenentfaltungskräften im Bereich von 75-100 pN belastet wird; zu groß wäre die Gefahr der Dimerdissoziation. Das gelegentliche Entfalten einer Myomesin-Ig-Domäne auch bei geringen Kräften stellt keine ähnlich gravierende Gefahr dar, da es die Funktion Myomesins als Quervernetzer nicht kompromittiert und, wenn auch auf einer langsamen Zeitskala von Sekunden, reversibel ist [12, 100]. Durch die langsame Reversibilität und die breite Entfaltungskraftverteilung erscheint die Ig-Domänen-Entfaltung aber als träger und unpräziser Mechanismus verglichen mit dem elastischen Verhalten der α -helikalen Verbindungen.

Die α -Helices zwischen den C-terminalen Ig-Domänen Myomesins stellen die eigentlich wesentlichen elastischen Elemente des Myomesindimers dar. Vor diesem Hintergrund ist die eigentliche Aufgabe der Ig-Domänen, die Wechselwirkungsgrenzfläche be-

reitzustellen, die die Gleichgewichts-entfaltungs- und -rückfaltungsübergänge der Helices ermöglicht. Durch diese Gleichgewichtsübergänge wird bei etwa 30 pN ein Schwellenwert sehr scharf definiert, unterhalb dessen die Helices gefaltet bleiben und durch ihre Bindung an die Ig-Domänen diese stabilisieren, und oberhalb dessen die Helices entfalten und so die Konturlänge vergrößern. Dadurch ist gleichzeitig gewährleistet, dass Myomesin einerseits bis zu dieser Kraft eine relativ starre Länge hat und Zugkräften nicht nachgibt, und es andererseits das weitere Ansteigen der Kraft über diesen Schwellenwert hinaus durch erheblichen Längenzuwachs verhindert. Wenn auch der Zuwachs pro Helix nur etwa 6 nm beträgt, bedeutet die Entfaltung aller acht α -Helices im dimeren Wildtyp eine Vergrößerung der Gesamtlänge auf 150% des Ausgangszustands; bezogen nur auf die C-terminale Hälfte Myomesins kann sogar eher von einer Verdoppelung der Länge ausgegangen werden.

Durch die Helixentfaltung wird die Kraft auf Plateauniveau konstant gehalten, was einen Schutz der Dimerbindung bedeutet. Anhand der Parameter einer Monte-Carlo-Simulation zur Rekonstruktion der Dimerdissoziationskraftverteilung kann die Lebensdauer des Dimers bei der Plateaukraft von 30 pN auf 12 s abgeschätzt werden [13], was selbst bei um etwa eine Größenordnung zu groß angenommenen Kontraktionsdauern des Sarkomers von 1 s zu einer Dissoziationswahrscheinlichkeit von nur 0,08 führen würde. Wenn nach der Muskelkontraktion die Spannung auf Myomesin nachlässt, wird durch die schnelle Reversibilität der Entfaltung der α -Helices die Kraft bis zur vollständigen Rückfaltung auf Plateauniveau konstant gehalten. Auf diese Weise trägt Myomesin durch einen aktiven elastischen Beitrag zur Wiederherstellung der komplexen Anordnung der Myosinfilamente in der M-Bande bei.

Die besonderen mechanischen Eigenschaften der neu entdeckten α -helikalen Verbindungen zwischen den C-terminalen Ig-Domänen Myomesins machen es zu einem idealen Quervernetzer im Proteinnetzwerk der M-Bande, der – ähnlich wie die gesamte M-Bande – Elastizität und Nachgiebigkeit während der Kontraktion mit Zuverlässigkeit und Stabilität bei der Wiederherstellung und Aufrechterhaltung der strukturellen Ordnung im Sarkomer verbindet. Die vorgestellten detaillierten Erkenntnisse zu den Mechanismen der Elastizität Myomesins bilden einen wichtigen Baustein zum mechanischen und strukturellen Verständnis der M-Bande.

Anhang

Anhang A.

Klonierung nach dem Baukastenprinzip

Für die Klonierung der Mehrzahl der verwendeten Konstrukte wurde eine Strategie verfolgt, die durch die *BioBrick standard assembly* [58] inspiriert wurde, ein Verfahren der Systembiologie, um standardisierte DNA-Sequenzen, die für funktionale Proteinsequenzen kodieren, nach einem einheitlichen Schema linear miteinander zu verknüpfen. Die zu verknüpfenden DNA-Sequenzen liegen dabei jeweils flankiert von immer denselben speziellen Restriktionsschnittstellen vor; bei den BioBrick-Bausteinen sind dies EcoRI und XbaI am 5'-Ende sowie SpeI und PstI am 3'-Ende. Wichtig für das Verfahren ist, dass die direkt an den DNA-Baustein angrenzenden Schnittstellen miteinander kompatibel sind, d.h. die einsträngigen Überhänge nach Verdau identisch sind, wie das für XbaI (t[~]c t a g_a) und SpeI (a[~] c t a g_t) der Fall ist.

Um mit den am Lehrstuhl vorhandenen Vektoren und Restriktionsenzymen arbeiten zu können, habe ich mich für die Restriktionsschnittstellen NdeI und NheI (5') sowie SpeI und XhoI (3') entschieden. Die *multiple cloning site* des verwendeten pET-21b(+)-Vektors beginnt mit NdeI und NheI und endet mit XhoI, so dass nur das mit NheI (g[~] c t a g_c) kompatible SpeI neu einzubauen war. Um die Grundbausteine (die zu verknüpfenden einzelnen DNA-Sequenzen, die im vorliegenden Fall jeweils für eine vollständige Protein-Domäne kodieren) zu erstellen, wurde die jeweilige Templatsequenz¹⁸ durch Polymerasekettenreaktion (PCR) und Verwendung geeigneter Primer zunächst amplifiziert und mit den gewünschten flankierenden Schnittstellen versehen. Das Produkt entspricht dann folgendem Schema: NheI-X-SpeI-XhoI, wobei X für die Sequenz des DNA-Bausteins steht. Durch Verdau des PCR-Produktes sowie des pET-21b(+)-Vektors mit NheI und XhoI und anschließende Ligation erhält man ein Plasmid, das in direkter linearer Folge einen Promotor und Transkriptionsanfang, die Sequenz NdeI-NheI-X-SpeI-XhoI sowie einen C-terminalen His₆-Tag mit abschließendem Stop-Codon aufweist. Plasmide dieser Art lassen sich nach dem im folgenden beschriebenen Verfahren einfach verknüpfen.

Soll die Sequenz A aus dem Plasmid \bar{A} in das Plasmid \bar{B} vor dessen Sequenz B eingefügt werden, so wird durch Verdau mit NdeI und SpeI und anschließende Größenaufreinigung mittels Gelextraktion die Sequenz A aus dem Plasmid \bar{A} herausgeschnitten;

¹⁸Es ist darauf zu achten, dass die Templatsequenz selber keine der vier Restriktionsschnittstellen NdeI, NheI, SpeI und XhoI enthält. Gegebenenfalls muss eine vorhandene Schnittstelle zunächst durch eine konservative Punktmutation beseitigt werden.

Anhang A. Klonierung nach dem Baukastenprinzip

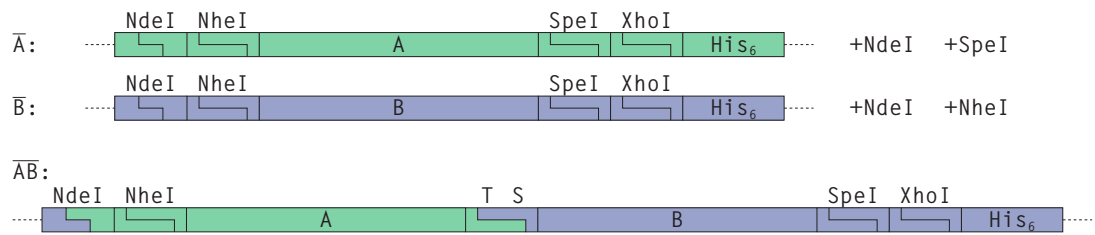


Abbildung A.1. Schema des Einbaus der Sequenz A aus dem Plasmid \bar{A} vor die Sequenz B aus dem Plasmid \bar{B} mit dem resultierenden Plasmid \overline{AB} . \bar{A} wird mit NdeI und SpeI verdaut, \bar{B} mit NdeI und NheI. Durch die Ligation der miteinander kompatiblen Schnittstellen SpeI und NheI wird eine dann nicht mehr schneidbare, die Aminosäuren Threonin (T) und Serin (S) codierende Sequenz zwischen A und B eingefügt. \overline{AB} entspricht dem Schnittstellen-Schema der Grundbausteine und kann nach demselben Prinzip mit anderen Bausteinen weiterverknüpft werden.

gleichzeitig wird das Plasmid \bar{B} durch Verdau mit NdeI und NheI direkt vor der Sequenz B aufgeschnitten. Sequenz A und Plasmid \bar{B} können dann über die jeweils einsträngigen NdeI-Überhänge sowie über die zueinander kompatiblen Überhänge von NheI und SpeI zu einem neuen Plasmid \overline{AB} ligiert werden. Durch die Fusion der NheI- und der SpeI-Schnittstelle entsteht die Sequenz actagc, die selber nicht mehr geschnitten werden kann und die zwischen die verknüpften Sequenzen A und B die zwei Aminosäuren Threonin (act = T) und Serin (agc = S) einfügt, die relativ klein und flexibel sind. Das neue Plasmid \overline{AB} weist dann zwischen Transkriptionsanfang und His₆-Tag eine Sequenz der Art NdeI-NheI-A-TS-B-SpeI-XhoI auf und entspricht insofern wiederum dem ursprünglichen Baustein-Schema, so dass diese neu zusammengesetzte Sequenz ihrerseits zur Verknüpfung mit anderen Bausteinen herangezogen werden kann.

Der Einbau einer Sequenz A *hinter* eine Sequenz B erfolgt ganz analog mit dem Unterschied, dass die Sequenz A in diesem Fall mit den Restriktionsenzymen NheI und XhoI aus dem Plasmid \bar{A} herausgeschnitten und das Plasmid \bar{B} mit SpeI und XhoI aufgeschnitten wird.

Mit Hilfe dieser Technik lassen sich ausgehend von einmal konstruierten Grundbausteinen im Prinzip beliebige Aneinanderreihungen dieser Bausteine realisieren. Problematisch können Konstrukte werden, bei denen dieselbe Sequenz mehrfach wiederholt wird. So war es beispielsweise zwar möglich, die Domänen My10 und My12 in achtfacher Wiederholung aneinanderzureihen; bei My9 und My11 jedoch gelang der letzte Verdoppelungsschritt, die vierfache Sequenz vor sich selbst einzufügen, nicht, sondern es entstanden Sequenzen, denen größere Abschnitte fehlten. Vermutlich hatten die repetitiven Sequenzen unerwünschte Reparaturmechanismen des verwendeten *E.coli*-Klonierungsstammes ausgelöst oder Überstrukturen ausgebildet, die bei der Reduplikation Störungen verursacht haben.

Anhang B.

Kraftspektroskopie mit dem Rasterkraftmikroskop

Für die kraftspektroskopischen Messungen wurde ein Rasterkraftmikroskop (*atomic force microscope*, AFM) eingesetzt, das von Ingo Schwaiger am Lehrstuhl für Biophysik gebaut wurde [102], fortlaufend weiterentwickelt wird und inzwischen auf besondere Stabilität gegen Drift optimiert ist [54]. Zur Steuerung des AFM über das Piezostellsystem sowie zur Datenerfassung und anschließenden -analyse habe ich das Makro-Paket Zupfer2 geschrieben, das innerhalb der Software Igor Pro (WaveMetrics Inc., Lake Oswego, OR, USA) ausgeführt wird. Die Datenerfassung erfolgt üblicherweise mit Abtastraten von 20 kHz; bei besonders langsamen Messungen mit Ziehgeschwindigkeiten von 5 nm/s und weniger wurde mit 200 kHz gemessen.

Alle AFM-Messungen haben in PBS (*phosphate buffered saline*) bei pH 7,4 stattgefunden. Zur spezifischen Anbindung der Proteinmoleküle an die Objektträgeroberfläche sind die Objektträger mit Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriessigsäure) funktionalisiert worden. Proteine, die terminal mit einem His₆-Tag (Sequenz von sechs Histidinen) versehen sind, binden darüber mit hoher Affinität an Ni-NTA. Sämtliche verwendeten Proteinkonstrukte weisen solche His₆-Tags auf, da die Bindung an Ni-NTA ohnehin zur Reinigung der Proteine mittels Affinitätschromatographie über eine Ni-NTA-Säule genutzt worden ist. Als AFM-Blattfedern sind mit Gold beschichtete BioLever Typ B (Olympus, Tokio, Japan) mit einer nominellen Federkonstanten von 6 pN/nm zum Einsatz gekommen. Die Anbindung des Proteins an die Blattfedern erfolgte unspezifisch.

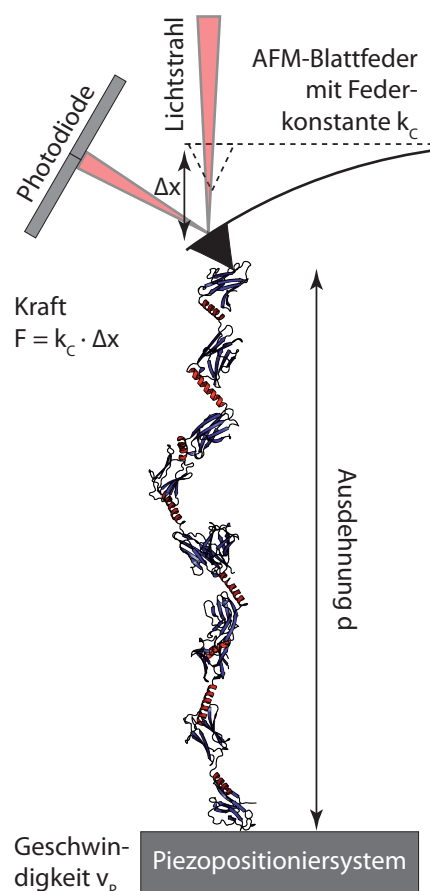


Abbildung B.1. Schematische Darstellung eines zur Kraftspektroskopie verwendeten AFM.

Anhang C.

Lösung kubischer WLC-Gleichungen

Gleichungen der Form¹⁹

$$X = C \left(AD + \frac{1}{4(1-D)^2} - \frac{1}{4} \right) \quad (\text{C.1})$$

lassen sich mit $B = \frac{X}{C}$ umformen zu

$$AD + \frac{1}{4(1-D)^2} - \frac{1}{4} - B = 0, \quad (\text{C.2})$$

was sich wie folgt als Polynom 3. Grades in D schreiben lässt:

$$AD^3 - \left(2A + \left(B + \frac{1}{4} \right) \right) D^2 + \left(A + 2 \left(B + \frac{1}{4} \right) \right) D - B = 0. \quad (\text{C.3})$$

Mit $Z = \frac{B + \frac{1}{4}}{A}$ und $Y = \frac{B}{A}$ lässt sich das vereinfachen zu

$$D^3 - (2 + Z) D^2 + (1 + 2Z) D - Y = 0. \quad (\text{C.4})$$

Durch Substitution von $D = \delta + \frac{Z+2}{3}$ wird der quadratische Term eliminiert:

$$\delta^3 - \frac{(Z-1)^2}{3} \delta - \frac{(Z+2)(2Z^2 - 10Z - 1) + 27Y}{27} = 0 \quad (\text{C.5})$$

Mit den Koeffizienten

$$p = -\frac{(Z-1)^2}{3} \quad q = -\frac{(Z+2)(2Z^2 - 10Z - 1) + 27Y}{27} \quad (\text{C.6})$$

lautet die Diskriminante dieser reduzierten kubischen Gleichung

$$\Delta(Z) = \left(\frac{q}{2} \right)^2 + \left(\frac{p}{3} \right)^3 = -\frac{(Z-Y)(4Z^3 - 12Z^2 - 15Z + 27Y - 4)}{108} \quad (\text{C.7})$$

¹⁹Für die Invertierung der WLC-Formel (Gleichung 3.2) wird $X = F$, $C = \frac{k_B T}{p}$ und $A = 1$ gesetzt. Für die Lösung der Gleichung 3.7 nach D wird $X = z$, $C = \frac{k_B T}{p \cdot k_c}$ und $A = 1 + \frac{l}{c}$ gesetzt.

bzw.

$$\begin{aligned} \Delta(X) = \frac{1}{6912A^4C^4} & \left[(256A - 256) X^4 + \right. \\ & + (-768A^2 + 960A - 256) CX^3 + \\ & + (1728A^4 - 2688A^3 + 576A^2 + 624A - 96) C^2X^2 + \\ & + (-256A^4 - 416A^3 + 432A^2 + 148A - 16) C^3X + \\ & \left. + (64A^3 + 60A^2 + 12A - 1) C^4 \right]. \end{aligned} \quad (\text{C.8})$$

Für $A = 1$ vereinfacht sich dieser Ausdruck zu

$$\Delta(X) = \frac{-64X^3 + 144CX^2 - 108C^2X + 135C^3}{6912C^3} \quad (\text{C.9})$$

Für $\Delta > 0$ hat die zu lösende Gleichung eine reelle Lösung, für $\Delta < 0$ drei reelle Lösungen und für $\Delta = 0$ drei reelle Lösungen, von denen mindestens zwei identisch sind.

Mit Hilfe der Cardanischen Formel [18] kann die reduzierte kubische Gleichung C.5 gelöst werden. Dazu wird erneut substituiert: $\delta = u + v$. Da $\delta^3 = u^3 + v^3 + 3uv\delta$ gilt, ergibt sich daraus durch Koeffizientenvergleich mit Gleichung C.5

$$p = -3uv \quad q = -(u^3 + v^3). \quad (\text{C.10})$$

Wegen $u^3v^3 = -(\frac{p}{3})^3$ und $(u^3 + v^3) = -q$ ist dann nach dem Satz von Viëta [18]

$$u = \sqrt[3]{-\frac{q}{2} + \sqrt{\Delta}} \quad \text{und} \quad v = \sqrt[3]{-\frac{q}{2} - \sqrt{\Delta}}. \quad (\text{C.11})$$

Die Lösungen von δ ergeben sich dann aus den drei möglichen kubischen Wurzeln:

$$\delta_1 = u + v \quad (\text{C.12a})$$

$$\delta_2 = \frac{1}{2} \left[-(u + v) + (u - v) i\sqrt{3} \right] \quad (\text{C.12b})$$

$$\delta_3 = \frac{1}{2} \left[-(u + v) - (u - v) i\sqrt{3} \right] \quad (\text{C.12c})$$

Entsprechend dem Zusammenhang $D_n = \delta_n + \frac{Z+2}{3} = \delta_n + \frac{1}{3} \left(\frac{X+1}{A} + 2 \right)$ folgen daraus auch die Lösungen für D .

Abhängig vom Vorzeichen der Diskriminante sind entweder alle drei Lösungen reell oder nur eine. Aus Kontinuitätsgründen ist diejenige Lösung die physikalisch sinnvolle,

die über den gesamten Wertebereich reell ist. Welche der drei Lösungen das ist, hängt davon ab, welche der drei möglichen kubischen Wurzeln zur Berechnung von u herangezogen wird. Wird (wie es in vielen Programmiersprachen der Fall ist) der Hauptwert der Wurzel verwendet, ist D_2 die gesuchte Lösung.

Wegen der starken Verbreitung der Software Igor Pro (Wavemetrics Inc., Lake Oswego, Oregon, USA) in den führenden Arbeitsgruppen zur Einzelmolekül-Kraftspektroskopie ist im folgenden der Programmcode zur Berechnung von D in Abhängigkeit von X bei gegebenen C und A als Makro für Igor Pro angegeben.

Programmcode C.1 Igor-Pro-Makro zur Invertierung einer WLC-Formel

```
1: Function D_von_X(X, C, A)
2:   Variable X, C, A
3:
4:   Variable B = X/C
5:   Variable Y = B / A
6:   Variable Z = (B + 1/4) / A
7:
8:   Variable p = -(Z - 1)^2 / 3
9:   Variable q = -((Z + 2) * (2*Z^2 - 10*Z - 1) + 27*Y) / 27
10:
11:   Variable Delta = (q/2)^2 + (p/3)^3
12:
13:   Variable/C u = (-q/2 + sqrt(Delta))^(1/3)
14:   Variable/C v = -p/(3*u)
15:
16: // Variable/C D1 = u + v
17: Variable/C D2 = 1/2 * -(u + v) + (u - v) * cmplx(0, 1) * sqrt(3)
18: // Variable/C D3 = 1/2 * -(u + v) - (u - v) * cmplx(0, 1) * sqrt(3)
19:
20:   return real(D2) + (Z + 2) / 3
21: End
```

Anhang D.

Pseudocode für HMM-Algorithmus

Pseudocode 1 Kombinerter Viterbi- und Baum-Welch-Algorithmus

```
1: repeat
2:   for  $i \leftarrow \{0 \dots N\}$  do
3:      $\alpha_0[i] \leftarrow a_{*i} \cdot b_i(o_0)$ 
4:      $\beta_T[i] \leftarrow 1$ 
5:      $\delta_0[i] \leftarrow \alpha_0[i]$ 
6:      $\psi_0[i] \leftarrow 0$ 
7:   end for

8:   for  $t \leftarrow \{1 \dots T\}$  do
9:     for  $i \leftarrow \{0 \dots N\}$  do
10:       $\alpha_t[i] \leftarrow \alpha_{t-1}[0] \cdot a_{0i} \cdot b_i(o_{t-1})$ 
11:       $\beta_{T-t}[i] \leftarrow a_{i0} \cdot b_0(o_{T-t+1}) \cdot \beta_{T-t+1}[0]$ 
12:       $\delta_t[i] \leftarrow \delta_{t-1}[0] \cdot a_{0i}$ 
13:       $\psi_t[i] \leftarrow 0$ 
14:      for  $j \leftarrow \{1 \dots N\}$  do
15:         $\alpha_t[i] += \alpha_{t-1}[j] \cdot a_{ji} \cdot b_i(o_{t-1})$ 
16:         $\beta_{T-t}[i] += a_{ij} \cdot b_j(o_{T-t+1}) \cdot \beta_{T-t+1}[j]$ 
17:        if  $\{\delta_{t-1}[j] \cdot a_{ji} > \delta_t[i]\}$  then
18:           $\delta_t[i] \leftarrow \delta_{t-1}[j] \cdot a_{ji}$ 
19:           $\psi_t[i] \leftarrow j$ 
20:        end if
21:      end for
22:       $\delta_t[i] := b_i(o_t)$ 
23:    end for
24:  end for

25:  $P(\mathbf{O}) \leftarrow \alpha_T[0]$ 
26:  $P^*(\mathbf{O}) \leftarrow \delta_T[0]$ 
27:  $s_T^* \leftarrow 0$ 
28: for  $i \leftarrow \{1 \dots N\}$  do
29:    $P(\mathbf{O}) += \alpha_T[i]$ 
30:   if  $\{\delta_T[i] > P^*(\mathbf{O})\}$  then
```

1. Initialisierungen für $t = 0$

2. Rekursion für $t = 1 \dots T$

äußere Schleife über alle Zustände

innere Schleife zur Berechnung:

von \sum_j ,

von \max_j

und von argmax_j

3. Rekursionsabschluss

Produktionswahrscheinlichkeit $P(\mathbf{O}) = \sum_i \alpha_T(i)$

```

31:          $P^*(\mathbf{O}) \leftarrow \delta_T[i]$ 
32:          $s_T^* \leftarrow i$            wahrscheinlichster Endzustand  $s_T^* = \operatorname{argmax}_i \delta_T(i)$ 
33:     end if
34: end for

35: for  $t \leftarrow \{T - 1 \dots 0\}$  do           4. Rekonstruktion der
36:      $s_T^* \leftarrow \psi_{t+1}[s_{t+1}^*]$        wahrscheinlichsten Zustandsfolge
37: end for

38: for  $t \leftarrow \{T - 1 \dots 0\}$  do           5. Zwischenrechnung zur
39:     for  $i \leftarrow \{0 \dots N\}$  do       Bestimmung der a-posteriori-Wahrscheinlichkeiten
40:         for  $j \leftarrow \{0 \dots N\}$  do
41:              $\Gamma_t[i] \leftarrow \alpha_t[i] \cdot \beta_t[i] / P(\mathbf{O})$ 
42:              $\gamma_t[i][j] \leftarrow \alpha_t[i] \cdot a_{ij} \cdot b_j(o_{t+1}) \cdot \beta_{t+1}[j] / P(\mathbf{O})$ 
43:         end for
44:     end for
45: end for

46: for  $i \leftarrow \{0 \dots N\}$  do           6. Optimierung
47:      $\Gamma_\Sigma[i] \leftarrow \Gamma_0[i]$ 
48:     for  $t \leftarrow \{1 \dots T - 1\}$  do
49:          $\Gamma_\Sigma[i] += \Gamma_t[i]$ 
50:     end for
51:     for  $j \leftarrow \{0 \dots N\}$  do
52:          $\gamma_\Sigma[i][j] \leftarrow \gamma_0[i][j]$ 
53:         for  $t \leftarrow \{1 \dots T - 1\}$  do
54:              $\gamma_\Sigma[i][j] += \gamma_t[i][j]$ 
55:         end for
56:          $a_{ij} \leftarrow \gamma_\Sigma[i][j] / \Gamma_\Sigma[i]$        die neuen Übergangswahrscheinlichkeiten
57:     end for
58:      $\Gamma_\Sigma^k[i] \leftarrow 0$ 
59:     for all  $\{k \in \mathbf{O}\}$  do
60:         for  $t \leftarrow \{0 \dots T - 1\}$  do
61:             if  $\{o_t = o\}$  then
62:                  $\Gamma_\Sigma^k[i] += \Gamma_t[i]$ 
63:             end if
64:         end for
65:          $b_i(k) \leftarrow \Gamma_\Sigma^k[i] / \Gamma_\Sigma[i]$        die neuen Emissionswahrscheinlichkeiten
66:     end for
67: end for
68: until  $P(\mathbf{O}) \approx \text{const}$            So lange wiederholen, bis  $P(\mathbf{O})$  kaum noch größer wird.

```

Literaturverzeichnis

- [1] I. Agarkova und J.-C. Perriard: The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends Cell Biol* **15**, 9 (2005), S. 477–485. doi:10.1016/j.tcb.2005.07.001.
- [2] I. Agarkova *et al.*: A novel marker for vertebrate embryonic heart, the EH-myomesin isoform. *J Biol Chem* **275**, 14 (2000), S. 10256–10264. doi:10.1074/jbc.275.14.10256.
- [3] I. Agarkova *et al.*: M-band: a safeguard for sarcomere stability? *J Muscle Res Cell Motil* **24**, 2-3 (2003), S. 191–203. doi:10.1023/A:1026094924677.
- [4] N. Akiyama *et al.*: Transverse Stiffness of Myofibrils of Skeletal and Cardiac Muscles Studied by Atomic Force Microscopy. *J. Physiol. Sci* **56**, 2 (2006), S. 145–151. doi:10.2170/physiolsci.RP003205.
- [5] C. B. Anfinsen *et al.*: Studies on the gross structure, cross-linkages, and terminal sequences in ribonuclease. *J Biol Chem* **207**, 1 (1954), S. 201–210.
- [6] S. Arrhenius: Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **4** (1889), S. 226–248.
- [7] Y. Au: The muscle ultrastructure: a structural perspective of the sarcomere. *Cell Mol Life Sci* **61**, 24 (2004), S. 3016–3033. doi:10.1007/s00018-004-4282-x.
- [8] M. Bähler, T. Wallimann und H. M. Eppenberger: Myofibrillar M-band proteins represent constituents of native thick filaments, frayed filaments and bare zone assemblages. *J Muscle Res Cell Motil* **6**, 6 (1985), S. 783–800. doi:10.1007/BF00712242.
- [9] L. E. Baum *et al.*: A Maximization Technique Occurring in the Statistical Analysis of Probabilistic Functions of Markov Chains. *The Annals of Mathematical Statistics* **41**, 1 (1970), S. 164–171. doi:10.1214/aoms/1177697196.
- [10] G. I. Bell: Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science* **200**, 4342 (1978), S. 618–627. doi:10.1126/science.347575.
- [11] F. Berkemeier *et al.*: Fast Folding α -Helices as Reversible Strain Absorbers in the Muscle Protein Myomesin (2011). Manuskript in Vorbereitung.
- [12] P. Bertoncini *et al.*: Study of the mechanical properties of myomesin proteins using dynamic force spectroscopy. *J Mol Biol* **348**, 5 (2005), S. 1127–1137. doi:10.1016/j.jmb.2005.03.040.

- [13] M. Bertz: “Dissoziationsmechanik einzelner Proteinkomplexe”. Dissertation. Technische Universität München, 2010.
- [14] M. Bertz, M. Wilmanns und M. Rief: The titin-telethonin complex is a directed, superstable molecular bond in the muscle Z-disk. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 32 (2009), S. 13307–133310. doi:10.1073/pnas.0902312106.
- [15] R. B. Best und G. Hummer: Comment on Force-clamp spectroscopy monitors the folding trajectory of a single protein. *Science* **308**, 5721 (2005), S. 498. doi:10.1126/science.1106969.
- [16] P. Bork, L. Holm und C. Sander: The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *Journal of Molecular Biology* **242**, 4 (1994), S. 309–320. doi:10.1006/jmbi.1994.1582.
- [17] C. Bouchiat *et al.*: Estimating the persistence length of a worm-like chain molecule from force-extension measurements. *Biophys J* **76**, 1 Pt 1 (1999), S. 409–413. doi:10.1016/S0006-3495(99)77207-3.
- [18] I. N. Bronstein und K. A. Semedjajev: *Taschenbuch der Mathematik*. Hrsg. von G. Grosche, V. Ziegler und D. Ziegler. 24. Aufl. Verlag Harri Deutsch, Thun, Frankfurt/Main 1989.
- [19] J. Buchner *et al.*: Alternatively folded states of an immunoglobulin. *Biochemistry* **30**, 28 (1991), S. 6922–6929. doi:10.1021/bi00242a016.
- [20] C. Bustamante *et al.*: Entropic elasticity of lambda-phage DNA. *Science* **265**, 5178 (1994), S. 1599–1600. doi:10.1126/science.8079175.
- [21] Y. Cao *et al.*: Nonmechanical protein can have significant mechanical stability. *Angew Chem Int Ed* **45**, 4 (2006), S. 642–645. doi:10.1002/anie.200502623.
- [22] M. Carrion-Vazquez *et al.*: Mechanical and chemical unfolding of a single protein: a comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 7 (1999), S. 3694–3699. doi:10.1073/pnas.96.7.3694.
- [23] M. Carrion-Vazquez *et al.*: The mechanical stability of ubiquitin is linkage dependent. *Nature* **10**, 9 (2003), S. 738–743. doi:10.1038/nsb965.
- [24] K. A. Clark *et al.*: Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18** (2002), S. 637–706. doi:10.1146/annurev.cellbio.18.012502.105840.
- [25] J. Clarke, S. J. Hamill und C. M. Johnson: Folding and stability of a fibronectin type III domain of human tenascin. *Journal of Molecular Biology* **270**, 5 (1997), S. 771–778. doi:10.1006/jmbi.1997.1147.
- [26] N. Crampton und D. J. Brockwell: Unravelling the design principles for single protein mechanical strength. *Curr Opin Struct Biol* **20**, 4 (2010), S. 508–517. doi:10.1016/j.sbi.2010.05.005.

- [27] H. Dietz und M. Rief: Exploring the energy landscape of GFP by single-molecule mechanical experiments. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 46 (2004), S. 16192–16197. doi:10.1073/pnas.0404549101.
- [28] O. K. Dudko, G. Hummer und A. Szabo: Intrinsic rates and activation free energies from single-molecule pulling experiments. *Phys Rev Lett* **96**, 10 (2006), S. 108101. doi:10.1103/PhysRevLett.96.108101.
- [29] W. A. Eaton *et al.*: Submillisecond kinetics of protein folding. *Curr Opin Struct Biol* **7**, 1 (1997), S. 10–14. doi:doi:10.1016/S0959-440X(97)80003-6.
- [30] S. R. Eddy: What is a hidden Markov model? *Nat Biotechnol* **22**, 10 (2004), S. 1315–1316. doi:10.1038/nbt1004-1315.
- [31] E. Ehler *et al.*: Myofibrillogenesis in the developing chicken heart: assembly of Z-disk, M-line and the thick filaments. *J Cell Sci* **112** (Pt 10) (1999), S. 1529–1539.
- [32] J. M. Fernandez und H. Li: Force-clamp spectroscopy monitors the folding trajectory of a single protein. *Science* **303**, 5664 (2004), S. 1674–1678. doi:10.1126/science.1092497.
- [33] B. Fierz, A. Reiner und T. Kiefhaber: Local conformational dynamics in alpha-helices measured by fast triplet transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 4 (2008), S. 1057–1062. doi:10.1073/pnas.0808581106.
- [34] P. J. Flory: *Statistical Mechanics Of Chain Molecules*. Hanser, München 1988, S. 164–171.
- [35] A. Fukuzawa *et al.*: Interactions with titin and myomesin target obscurin and obscurin-like 1 to the M-band: implications for hereditary myopathies. *J Cell Sci* **121**, Pt 11 (2008), S. 1841–1851. doi:10.1242/jcs.028019.
- [36] S. Garcia-Manyes *et al.*: Force-clamp spectroscopy of single-protein monomers reveals the individual unfolding and folding pathways of I27 and ubiquitin. *Biophys J* **93**, 7 (2007), S. 2436–2446. doi:10.1529/biophysj.107.104422.
- [37] M. Gautel: The sarcomeric cytoskeleton: who picks up the strain? *Curr Opin Cell Biol* (2010). doi:10.1016/j.ceb.2010.12.001.
- [38] H. L. Granzier und S. Labeit: Titin and its associated proteins: the third myofilament system of the sarcomere. *Adv Protein Chem* **71** (2005), S. 89–119. doi:10.1016/S0065-3233(04)71003-7.
- [39] N. J. Greenfield: Applications of circular dichroism in protein and peptide analysis. *Trends in Analytical Chemistry* **18**, 4 (1999), S. 236–244. doi:10.1016/S0165-9936(98)00112-5.

- [40] N. J. Greenfield: Determination of the folding of proteins as a function of denaturants, osmolytes or ligands using circular dichroism. *Nature protocols* **1**, 6 (2006), S. 2733–2741. doi:10.1038/nprot.2006.229.
- [41] N. J. Greenfield: Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nature protocols* **1**, 6 (2006), S. 2527–2535. doi:10.1038/nprot.2006.204.
- [42] N. J. Greenfield: Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature protocols* **1**, 6 (2006), S. 2876–2890. doi:10.1038/nprot.2006.202.
- [43] A. M. Gronenborn *et al.*: A novel, highly stable fold of the immunoglobulin binding domain of streptococcal protein G. *Science* **253**, 5020 (1991), S. 657–661. doi:10.1126/science.1871600.
- [44] B. K. Grove *et al.*: A new 185,000-dalton skeletal muscle protein detected by monoclonal antibodies. *J Cell Biol* **98**, 2 (1984), S. 518–524. doi:10.1083/jcb.98.2.518.
- [45] F. Hanke und H. J. Kreuzer: Breaking bonds in the atomic force microscope: theory and analysis. *Physical review E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics* **74**, 3 Pt 1 (2006), S. 031909. doi:10.1103/PhysRevE.74.031909.
- [46] K. C. Holmes und M. A. Geeves: The structural basis of muscle contraction. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* **355**, 1396 (2000), S. 419–431. doi:10.1098/rstb.2000.0583.
- [47] T. Hornemann *et al.*: Muscle-type creatine kinase interacts with central domains of the M-band proteins myomesin and M-protein. *J Mol Biol* **332**, 4 (2003), S. 877–887. doi:10.1016/S0022-2836(03)00921-5.
- [48] R. Horowitz und R. J. Podolsky: The positional stability of thick filaments in activated skeletal muscle depends on sarcomere length: evidence for the role of titin filaments. *J Cell Biol* **105**, 5 (1987), S. 2217–2223. doi:10.1083/jcb.105.5.2217.
- [49] A. F. Huxley und R. Niedergerke: Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* **173**, 4412 (1954), S. 971–973. doi:10.1038/173971a0.
- [50] H. E. Huxley *et al.*: Time-resolved X-ray diffraction studies of the myosin layer-line reflections during muscle contraction. *J Mol Biol* **158**, 4 (1982), S. 637–684. doi:10.1016/0022-2836(82)90253-4.
- [51] H. Huxley und J. Hanson: Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* **173**, 4412 (1954), S. 973–976. doi:10.1038/173973a0.

- [52] C. Hyeon und D. Thirumalai: Can energy landscape roughness of proteins and RNA be measured by using mechanical unfolding experiments? *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 18 (2003), S. 10249–10253. doi:10.1073/pnas.1833310100.
- [53] T. Isgro *et al.*: *NAMD Tutorial*. 2006. (<http://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/>).
- [54] J. P. Junker, F. Ziegler und M. Rief: Ligand-dependent equilibrium fluctuations of single calmodulin molecules. *Science* **323**, 5914 (2008), S. 633–637. doi:10.1126/science.1166191.
- [55] M. S. Z. Kellermayer *et al.*: Folding-unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers. *Science* **276**, 5315 (1997), S. 1112–1116. doi:10.1126/science.276.5315.1112.
- [56] S. M. Kelly, T. J. Jess und N. C. Price: How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* **1751**, 2 (2005), S. 119–139. doi:10.1016/j.bbapap.2005.06.005.
- [57] G. G. Knappeis und F. Carlsen: The ultrastructure of the M line in skeletal muscle. *J Cell Biol* **38**, 1 (1968), S. 202–211. doi:10.1083/jcb.38.1.202.
- [58] T. Knight: Idempotent Vector Design for Standard Assembly of Biobricks. *MIT Synthetic Biology Working Group Technical Reports* (2003).
- [59] J. Kovac und C. C. Crabb: Modified Gaussian Model For Rubber Elasticity. 2. The Wormlike Chain. *Macromolecules* **15**, 2 (1982), S. 537–541. doi:0.1021/ma00230a063.
- [60] O. Kratky und G. Porod: Röntgenuntersuchung gelöster Fadenmoleküle. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas-Journal of the Royal Netherlands Chemical Society* **68**, 12 (1949), S. 1106–1122. doi:10.1002/rec1.19490681203.
- [61] J. Kubelka, J. Hofrichter und W. A. Eaton: The protein folding 'speed limit'. *Curr Opin Struct Biol* **14**, 1 (2004), S. 76–88. doi:10.1016/j.sbi.2004.01.013.
- [62] S. Labeit und B. Kolmerer: Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* **270**, 5234 (1995), S. 293–296. doi:10.1126/science.270.5234.293.
- [63] E. S. Lander *et al.*: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 6822 (2001), S. 860–921. doi:10.1038/35057062.
- [64] S. Lange *et al.*: Dimerisation of myomesin: implications for the structure of the sarcomeric M-band. *J Mol Biol* **345**, 2 (2005), S. 289–298. doi:10.1016/j.jmb.2004.10.040.
- [65] J. G. Lees *et al.*: A reference database for circular dichroism spectroscopy covering fold and secondary structure space. *Bioinformatics* **22**, 16 (2006), S. 1955–1962. doi:10.1093/bioinformatics/btl327.

- [66] H. Li *et al.*: Reverse engineering of the giant muscle protein titin. *Nature* **418**, 6901 (2002), S. 998–1002. doi:10.1038/nature00938.
- [67] L. Li *et al.*: Stepwise unfolding of ankyrin repeats in a single protein revealed by atomic force microscopy. *Biophys J* **90**, 4 (2006), S. L30–2. doi:10.1529/biophysj.105.078436.
- [68] M. Linari *et al.*: Interference fine structure and sarcomere length dependence of the axial x-ray pattern from active single muscle fibers. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 13 (2000), S. 7226–7231. doi:10.1073/pnas.97.13.7226.
- [69] W. A. Linke und J. M. Fernandez: Cardiac titin: molecular basis of elasticity and cellular contribution to elastic and viscous stiffness components in myocardium. *J Muscle Res Cell Motil* **23**, 5-6 (2002), S. 483–497. doi:10.1023/A:1023462507254.
- [70] P. K. Luther und J. M. Squire: Three-dimensional structure of the vertebrate muscle M-region. *J Mol Biol* **125**, 3 (1978), S. 313–324. doi:10.1016/0022-2836(78)90405-9.
- [71] A. D. MacKerell Jr. *et al.*: All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *J. Phys. Chem. B* **102**, 18 (1998), S. 3586–3616. doi:10.1021/jp973084f.
- [72] J. F. Marko und E. D. Siggia: Stretching DNA. *Macromolecules* **28**, 26 (1995), S. 8759–8770. doi:10.1021/ma00130a008.
- [73] P. E. Marszalek *et al.*: Mechanical unfolding intermediates in titin modules. *Nature* **402**, 6757 (1999), S. 100–103. doi:10.1038/47083.
- [74] A. J. McComas und H. C. Thomas: Fast and slow twitch muscles in man. *Journal of the Neurological Sciences* **7**, 2 (1968), S. 301–307. doi:10.1016/0022-510X(68)90150-0.
- [75] B. M. Millman: The filament lattice of striated muscle. *Physiol Rev* **78**, 2 (1998), S. 359–391.
- [76] F. Nakamura *et al.*: Structural basis of filamin A functions. *J Cell Biol* **179**, 5 (2007), S. 1011–1025. doi:10.1083/jcb.200707073.
- [77] L. Oberbarnscheidt, R. Janissen und F. Oesterhelt: Direct and model free calculation of force-dependent dissociation rates from force spectroscopic data. *Biophys J* **97**, 9 (2009), S. L19–21. doi:10.1016/j.bpj.2009.08.015.
- [78] W. M. Obermann *et al.*: Molecular structure of the sarcomeric M band: mapping of titin and myosin binding domains in myomesin and the identification of a potential regulatory phosphorylation site in myomesin. *EMBO J* **16**, 2 (1997), S. 211–220. doi:10.1093/emboj/16.2.211.

- [79] W. M. Obermann *et al.*: Purification and biochemical characterization of myomesin, a myosin-binding and titin-binding protein, from bovine skeletal muscle. *Eur J Biochem* **233**, 1 (1995), S. 110–115. doi:10.1111/j.1432-1033.1995.110_1.x.
- [80] W. M. Obermann *et al.*: The structure of the sarcomeric M band: localization of defined domains of myomesin, M-protein, and the 250-kD carboxy-terminal region of titin by immunoelectron microscopy. *J Cell Biol* **134**, 6 (1996), S. 1441–1453. doi:10.1083/jcb.134.6.1441.
- [81] S. G. Page und H. E. Huxley: Filament Lengths in Striated Muscle. *J Cell Biol* **19** (1963), S. 369–390. doi:10.1083/jcb.19.2.369.
- [82] H. T. Pask *et al.*: M-band structure, M-bridge interactions and contraction speed in vertebrate cardiac muscles. *J Muscle Res Cell Motil* **15**, 6 (1994), S. 633–645. doi:10.1007/BF00121071.
- [83] A. Perczel *et al.*: Convex constraint analysis: a natural deconvolution of circular dichroism curves of proteins. *Protein Eng* **4**, 6 (1991), S. 669–679. doi:10.1093/protein/4.6.669.
- [84] J. C. Phillips *et al.*: Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem* **26**, 16 (2005), S. 1781–1802. doi:10.1002/jcc.20289.
- [85] N. Pinotsis *et al.*: Molecular basis of the C-terminal tail-to-tail assembly of the sarcomeric filament protein myomesin. *EMBO J* **27**, 1 (2008), S. 253–264. doi:10.1038/sj.emboj.7601944.
- [86] N. Pinotsis *et al.*: Superhelical architecture of the elastic myomesin end-to-end filament with repetitive immunoglobulin-helix domain unit (2011). Manuskript in Vorbereitung.
- [87] A. S. Politou, D. J. Thomas und A. Pastore: The folding and stability of titin immunoglobulin-like modules, with implications for the mechanism of elasticity. *Biophys J* **69**, 6 (1995), S. 2601–2610. doi:10.1016/S0006-3495(95)80131-1.
- [88] M. J. Potthoff *et al.*: Regulation of skeletal muscle sarcomere integrity and postnatal muscle function by Mef2c. *Mol Cell Biol* **27**, 23 (2007), S. 8143–8151. doi:10.1128/MCB.01187-07.
- [89] P. L. Privalov: Thermodynamic problems of protein structure. *Annu Rev Biophys Chem* **18** (1989), S. 47–69. doi:10.1146/annurev.bb.18.060189.000403.
- [90] E. M. Puchner *et al.*: Comparing proteins by their unfolding pattern. *Biophys J* **95**, 1 (2008), S. 426–434. doi:10.1529/biophysj.108.129999.
- [91] E. M. Puchner *et al.*: Mechanoenzymatics of titin kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 36 (2008), S. 13385–13390. doi:10.1073/pnas.0805034105.

- [92] L. R. Rabiner und B.-H. Juang: An introduction to hidden markov models. *IEEE assp magazine* (1986), S. 4–16. doi:10.1109/MASSP.1986.1165342.
- [93] M. Rief *et al.*: Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science* **276**, 5315 (1997), S. 1109–1112. doi:10.1126/science.276.5315.1109.
- [94] M. Rief *et al.*: Single molecule force spectroscopy of spectrin repeats: low unfolding forces in helix bundles. *J Mol Biol* **286**, 2 (1999), S. 553–561. doi:10.1006/jmbi.1998.2466.
- [95] J. A. Schellman: The thermodynamic stability of proteins. *Annu Rev Biophys Biochem* **16** (1987), S. 115–137. doi:10.1146/annurev.bb.16.060187.000555.
- [96] M. Schlierf, F. Berkemeier und M. Rief: Direct observation of active protein folding using lock-in force spectroscopy. *Biophys J* **93**, 11 (2007), S. 3989–3998. doi:10.1529/biophysj.107.114397.
- [97] M. Schlierf, H. Li und J. M. Fernandez: The unfolding kinetics of ubiquitin captured with single-molecule force-clamp techniques. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 19 (2004), S. 7299–7304. doi:10.1073/pnas.0400033101.
- [98] M. Schlierf und M. Rief: Single-molecule unfolding force distributions reveal a funnel-shaped energy landscape. *Biophys J* **90**, 4 (2006), S. L33–35. doi:10.1529/biophysj.105.077982.
- [99] M. Schlierf und M. Rief: Surprising simplicity in the single-molecule folding mechanics of proteins. *Angew Chem Int Ed Engl* **48**, 4 (2009), S. 820–822. doi:10.1002/anie.200804723.
- [100] R. Schoenauer *et al.*: Myomesin is a molecular spring with adaptable elasticity. *J Mol Biol* **349**, 2 (2005), S. 367–379. doi:10.1016/j.jmb.2005.03.055.
- [101] J. M. Scholtz *et al.*: Calorimetric determination of the enthalpy change for the alpha-helix to coil transition of an alanine peptide in water. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 7 (1991), S. 2854–2858. doi:10.1073/pnas.88.7.2854.
- [102] I. Schwaiger: “Kraftspektroskopische Untersuchung einzelner Zytoskelett-Proteine”. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München, 2005.
- [103] I. Schwaiger *et al.*: The folding pathway of a fast-folding immunoglobulin domain revealed by single-molecule mechanical experiments. *EMBO Rep* **6**, 1 (2005), S. 46–51. doi:10.1038/sj.embor.7400317.
- [104] I. Schwaiger *et al.*: The myosin coiled-coil is a truly elastic protein structure. *Nature materials* **1**, 4 (2002), S. 232–235. doi:10.1038/nmat776.

- [105] B. Sjöblom, A. Salmazo und K. Djinović-Carugo: Alpha-actinin structure and regulation. *Cell Mol Life Sci* **65**, 17 (2008), S. 2688–2701. doi:10.1007/s00018-008-8080-8.
- [106] M. Sjöström und J. M. Squire: Fine structure of the A-band in cryo-sections. The structure of the A-band of human skeletal muscle fibres from ultra-thin cryo-sections negatively stained. *J Mol Biol* **109**, 1 (1977), S. 49–68. doi:10.1016/S0022-2836(77)80045-4.
- [107] T. R. Sosnick: Comment on Force-clamp spectroscopy monitors the folding trajectory of a single protein. *Science* **306**, 5695 (2004), S. 411. doi:10.1126/science.1100962.
- [108] E. J. Speel *et al.*: Assignment of the human gene for the sarcomeric M-band protein myomesin (MYOM1) to 18p11.31-p11.32. *Genomics* **54**, 1 (1998), S. 184–186. doi:10.1006/geno.1998.5503.
- [109] J. M. Squire: Architecture and function in the muscle sarcomere. *Curr Opin Struct Biol* **7**, 2 (1997), S. 247–257. doi:10.1016/S0959-440X(97)80033-4.
- [110] F. Steiner, K. Weber und D. O. Fürst: M band proteins myomesin and skelemin are encoded by the same gene: analysis of its organization and expression. *Genomics* **56**, 1 (1999), S. 78–89. doi:10.1006/geno.1998.5682.
- [111] I. A. Telley *et al.*: Dynamic behaviour of half-sarcomeres during and after stretch in activated rabbit psoas myofibrils: sarcomere asymmetry but no 'sarcomere popping'. *J Physiol (Lond)* **573**, Pt 1 (2006), S. 173–185. doi:10.1113/jphysiol.2006.105809.
- [112] L. Tskhovrebova *et al.*: Elasticity and unfolding of single molecules of the giant muscle protein titin. *Nature* **387**, 6630 (1997), S. 308–312. doi:10.1038/387308a0.
- [113] A. W. P. Vermeer und W. Norde: The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein. *Biophys J* **78**, 1 (2000), S. 394–404. doi:10.1016/S0006-3495(00)76602-1.
- [114] U. Vinkemeier *et al.*: The globular head domain of titin extends into the center of the sarcomeric M band. cDNA cloning, epitope mapping and immunoelectron microscopy of two titin-associated proteins. *J Cell Sci* **106 (Pt 1)** (1993), S. 319–330.
- [115] A. J. Viterbi: Error bounds for convolutional codes and an asymptotically optimum decoding algorithm. *IEEE transactions on Information Theory* **13**, 2 (1967), S. 260–269. doi:10.1109/TIT.1967.1054010.
- [116] S. Walcott: The load dependence of rate constants. *J Chem Phys* **128**, 21 (2008), S. 215101. doi:10.1063/1.2920475.

- [117] L. Whitmore und B. A. Wallace: DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* **32**, Web Server issue (2004), W668–673. doi:10.1093/nar/gkh371.
- [118] L. Whitmore *et al.*: PCDDDB: the Protein Circular Dichroism Data Bank, a repository for circular dichroism spectral and metadata. *Nucleic Acids Res* **39**, Database issue (2011), S. D480–486. doi:10.1093/nar/gkq1026.
- [119] Z. T. Yew, S. Krivov und E. Paci: Free-energy landscapes of proteins in the presence and absence of force. *The journal of physical chemistry A* **112**, 51 (2008), S. 16902–16907. doi:10.1021/jp807316e.
- [120] Z. T. Yew *et al.*: Direct evidence of the multidimensionality of the free-energy landscapes of proteins revealed by mechanical probes. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **81**, 3 Pt 1 (2010), S. 031923. doi:10.1103/PhysRevE.81.031923.
- [121] P. Zou *et al.*: Palindromic assembly of the giant muscle protein titin in the sarcomeric Z-disk. *Nature* **439**, 7073 (2006), S. 229–233. doi:10.1038/nature04343.

Danksagung

Zum Gelingen der vorliegenden Arbeit hat eine Vielzahl von Personen beigetragen. Ihnen meinen Dank auszudrücken, möchte ich die letzte Seite dieser Arbeit nutzen.

Mein erster Dank gilt Prof. Matthias Rief, der diese Arbeit natürlich schon dadurch überhaupt erst ermöglicht hat, dass er sie mir gab und betreut hat, und der aber weit darüber hinaus auch den wichtigen Rahmen für ein selbständiges und erfolgreiches Arbeiten in einer bereichernden Atmosphäre geschaffen hat. Die interessante und vielfältig herausfordernde Aufgabenstellung, die hervorragende Ausstattung des Lehrstuhls, die gute Erreichbarkeit des Betreuers bei Fragen und Schwierigkeiten und das angenehm kollegiale Verhältnis stellen keine Selbstverständlichkeiten dar.

Dankbar bin ich auch für die vielen Anregungen und Hilfestellungen, die mich im Lauf der Arbeit immer wieder vorangebracht haben, seien es die Einführung in Labortechniken, die Diskussion theoretischer Modelle, Vorschläge zur experimentellen Umsetzung oder kritische Anmerkungen zu den Ergebnissen. An dieser Stelle sei besonders Morten Bertz, Michael Schlierf, Philipp Junker und Christof Gebhardt gedankt.

Während die eigene Arbeit mal Freude, mal Anstrengung bedeutete, war auf die gute Stimmung und positive Atmosphäre an den Lehrstühlen Rief, Bausch, Hugel und Dietz immer Verlass. Für die angenehme Zeit und die guten Gespräche, ob es um Biophysik oder anderes ging, danke ich ganz besonders meinen Bürokollegen Melanie Brunnbauer, Christina Lumme sowie Christine Wurm, Fabian Kilchherr und den oben bereits Genannten. Ohne Euch wäre es nur Arbeit gewesen.

Außerdem bin ich für zahlreiche tatkräftige Unterstützung unseren technischen Mitarbeitern Monika Rusp, Gabriele Chmel, Karin Vogt und Daniela Scheikl sowie Rudolf Lehrhuber dankbar.

Zuletzt, aber sicherlich nicht am wenigsten, danke ich für die konsequente liebevolle Unterstützung in allen Dingen meiner Frau Korinna.

Vielen Dank!