



Dissertation am Physik-Department
der Technischen Universität München

Ligandenabhängige Gleichgewichtsfluktuationen einzelner Proteine

Jan Philipp Junker

München, 15. Juli 2009

betreut durch Prof. Dr. Matthias Rief

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Physik-Department
Lehrstuhl für Biophysik E22

Ligandenabhängige Gleichgewichts- fluktuationen einzelner Proteine

Jan Philipp Junker

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Martin Zacharias

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Matthias Rief
2. Univ.-Prof. Dr. Thomas Kiefhaber

Die Dissertation wurde am 15.07.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 20.08.2009 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	vii
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
3 Grundlagen	5
3.1 Das Kraftmikroskop	5
3.2 Elastizität von Proteinen	6
3.3 Faltung und Entfaltung unter Kraft	7
4 Calmodulin	13
5 Freie Enthalpie der Ligandenbindung	17
6 Faltung und Entfaltung von Calmodulin unter Kraft	23
6.1 Faltungs- und Entfaltungs-Übergänge von Calmodulin im Gleichgewicht	23
6.2 Kopplung von Ligandenbindung und Faltung/Entfaltung	29
6.3 Vergleich von skMLCK und Mastoparan	35
7 Direkte Beobachtung von Peptidbindung und -entbindung	43
7.1 Anlegen von Kraft an Peptidliganden	43
7.2 Peptidbindungs- und -entbindungsübergänge von skMLCK und CaMKK	46
7.3 Detaillierte Analyse der Peptidbindungen	55
8 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse	61
9 Ausblick	63
9.1 Hochauflösende Experimente mit der optischen Pinzette	63
9.2 Untersuchung weiterer Calmodulin-Liganden	63
9.3 Erkundung der Energielandschaft von Calmodulin in anderen Zugrichtungen	64
9.4 Steuerung von Bindungs- und Reaktionskinetik durch mechanische Kraft	65
A Material und Methoden	67
A.1 Krafteichung	67
A.2 Messprotokoll	68
A.3 Bearbeitung der Rohdaten	70
A.4 Einfluss von Polypeptid-Spacern und Disulfid-Crosslinks	71
A.5 Monte-Carlo-Simulationen	74
A.6 Molekularbiologische Methoden	76
A.7 Sequenzinformationen	76
B Ensemble-Herleitung der Ligandenbindungs-Energie	79

C Alternative Zugrichtungen	81
C.1 Methode zur Herstellung von Proteinkonstrukten mit alternativen Verknüpfungsgeometrien	81
C.2 Untersuchung von Calmodulin unter alternativen Zugrichtungen	83
Literaturverzeichnis	87

Abbildungsverzeichnis

3.1	Skizze des Experiments	6
3.2	Elastizität von gefalteten und entfaltenen Proteinen	7
3.3	Modell für Protein-Entfaltung unter Kraft	8
3.4	Modell für Protein-Faltung unter Kraft	9
3.5	Mechanische Proteinfaltung unter Gleichgewichts- und Nichtgleichgewichts-Bedingungen	10
4.1	Calmodulin in verschiedenen Konformationen	13
5.1	Modell für die Kopplung von Faltung und Ligandenbindung	17
5.2	Zusätzliche freie Enthalpie durch Ligandenbindung	20
6.1	Kraft-Abstands-Kurve von Calmodulin bei einer Ziehgeschwindigkeit von 1 nm/s	24
6.2	Konturlängenhistogramme und Kraft-Abstands-Kurven von Calmodulin mit verschiedenen Crosslinks in der C-terminalen Domäne	25
6.3	Einzeldomänen von Calmodulin	26
6.4	Faltungs-Energielandschaft der C-terminalen Domäne von Calmodulin	27
6.5	C-terminale Domäne von Calmodulin unter verschiedenen Ligandenbedingungen	30
6.6	Interpretation des Ligandeneffekts	32
6.7	Modellierung des Ligandeneffekts	33
6.8	N-terminale Domäne von Calmodulin unter verschiedenen Ligandenbedingungen	34
6.9	Kraft-Abstandskurven von Calmodulin und von Einzeldomänen in Anwesenheit von Mastoparan und skMLCK	37
6.10	Modell zur Bestimmung der Peptid-Stöchiometrie	39
6.11	Überprüfung der Bindungsmodi durch alternative Crosslinks	40
7.1	Proteinkonstrukte zur direkten Beobachtung von Ligandenbindung und -entbindung	44
7.2	Kraft-Abstands-Kurven von CaM-skMLCK und CaM-CaMKK	45
7.3	Kraft-Zeit-Kurve von CaM-skMLCK	47
7.4	CaM-skMLCK + Mastoparan	48
7.5	Detaillierte Analyse von CaM-CaMKK	51
7.6	Konturlängenzuwächse von CaM-skMLCK und CaM-CaMKK	53
7.7	Ausschnitt aus den Signalübertragungswegen Calmodulin-abhängiger Kinasen	55
7.8	Kürzungsmutanten von skMLCK und CaMKK	56
7.9	Energielandschaften für Peptidbindung und -entbindung	58
7.10	Gleichgewichtsübergänge anderer Target-Peptide	59
A.1	Skizze des Messprotokolls: Piezobewegung	69
A.2	Skizze des Messprotokolls: Kraft-Abstands-Kurven	69
A.3	Driftkorrektur	70

Abbildungsverzeichnis

A.4	Verringerung des Krafrauschens durch Glätten der Daten	71
A.5	Kraft-Abstandskurven von Calmodulin bei unterschiedlichen Ziehgeschwindigkeiten	72
A.6	Einfluss von Polypeptid-Spacern und Disulfid-Crosslinks auf die Kinetik von Gleichgewichtsübergängen	73
A.7	Simulierte Kraft-Abstands-Kurve	75
C.1	Herstellung von Proteinkonstrukten mit alternativen Zugrichtungen	82
C.2	Kraft-Abstands-Kurven von Calmodulin unter alternativen Zugrichtungen	85
C.3	Calmodulin unter alternativen Zugrichtungen – mögliche Projekte	86

Tabellenverzeichnis

4.1	Aminosäure-Sequenzen der untersuchten Target-Peptide von Calmodulin . .	15
6.1	Mittlere Entfaltungskräfte und Übergangsraten von Calmodulin	38
7.1	Konturlängenzuwächse von CaM-skMLCK und CaM-CaMKK	49
7.2	Dissoziationskräfte verschiedener Targetpeptide von CaM	55
7.3	Konturlängenzuwächse und mittlere Dissoziationskräfte von DomC-CaMKK(1-26) und DomC-CaMKK(9-26)	57

1 Zusammenfassung

Mechanische Einzelmolekül-Experimente haben in den letzten Jahren zahlreiche neue Einsichten in die Funktion und Struktur von Proteinen und anderen Biomolekülen gewährt. Mittels Einzelmolekül-Kraftspektroskopie kann die Kinetik von Reaktionen durch Anlegen mechanischer Kraft an ein einzelnes Molekül hochpräzise gesteuert werden. Auf diese Weise können beispielsweise Proteine unter Kraft entfaltet oder Protein-Ligand-Komplexe zur Dissoziation gebracht werden. Bedingt durch experimentelle Schwierigkeiten waren solche Experimente bislang weitgehend auf Protein-Entfaltung und Liganden-Entbindung beschränkt, während Protein-Faltung und Liganden-Bindung unter Kraft kaum zugänglich waren. In dieser Arbeit werden nun erstmals mechanisch induzierte Faltungs-/Entfaltungs-Übergänge eines Proteins zwischen dem vollständig gefalteten und dem vollständig entfalteten Zustand im thermodynamischen Gleichgewicht direkt beobachtet. Zudem werden auf ähnliche Weise auch Bindungs- und Entbindungs-Übergänge von Liganden detektiert und analysiert.

Mit Einzelmolekül-Kraftspektroskopie wurde hier das Calcium-abhängige Signalmolekül Calmodulin untersucht. Durch Bindung von Ca^{2+} -Ionen wird Calmodulin in einen aktivierten Zustand versetzt, in dem es an Bindungssequenzen in Zielproteinen binden kann. In der vorliegenden Arbeit werden Faltungs-/Entfaltungs-Übergänge von Calmodulin unter Kraft detektiert. Dies erlaubt es, eine Kopplung zwischen Ligandenbindung und Proteinfaltung zu beobachten: Ca^{2+} bindet bereits mit beträchtlicher Affinität an den Faltungsübergangszustand von Calmodulin, so dass die Faltung durch hohe Ca^{2+} -Konzentrationen erheblich beschleunigt werden kann. Von besonderem Interesse ist auch die Bindung von Calmodulin an Erkennungssequenzen aus Zielproteinen. Durch den Einfluss von frei in Lösung hinzugegebenen Peptid-Liganden auf die Faltungs- und Entfaltungskinetik von Calmodulin konnten neue Einsichten in Stöchiometrien und Bindungsmodi verschiedener Target-Peptide gewonnen werden. Die einzelnen Schritte der Bindung von Calmodulin an Target-Peptide wurden durch Anlegen von Kraft direkt an den Peptid-Liganden zugänglich, was die Beobachtung von Bindungs-/Entbindungs-Übergängen in Echtzeit ermöglichte.

Durch Anlegen von Kraft an Proteine und an Protein-Ligand-Komplexe kann die Kinetik sehr langsamer und sehr schneller Prozesse in gut auflösbare Zeitskalen von Sekunden oder Sekundenbruchteilen verschoben werden. Proteine und Protein-Ligand-Komplexe können schrittweise durch ihre komplexe Energielandschaft vom vollständig gefalteten und ligandenbindenden Zustand bis zum vollständig entfalteten Zustand gesteuert werden. Verschiedene Prozesse können damit getrennt voneinander beobachtet werden, was durch nicht-mechanische Methoden nur schwer zu erreichen ist. So können beispielsweise beide Domänen von Calmodulin nacheinander entfaltet werden, ebenso kann die Peptid-Dissoziation von der Proteinentfaltung getrennt werden. Durch die hier vorgestellten Gleichgewichts-Experimente lassen sich ungleich mehr Informationen als durch frühere Messungen im Nichtgleichgewicht gewinnen. Diese Arbeit öffnet die Tür zu detaillierten Untersuchungen von Proteinfaltung, Ligandenbindung und Konformationsänderungen durch gezielte Steuerung von Reaktionsgeschwindigkeiten unter Kraft.

1 Zusammenfassung

2 Einleitung

Um zu überleben müssen Zellen in angemessener Weise auf externe Stimuli wie eine veränderte Temperatur oder die Anwesenheit bzw. das Fehlen bestimmter Nährstoffe in der Umgebung reagieren können. Speziell für mehrzellige Lebewesen spielt zudem der Austausch von Informationen zwischen verschiedenen Zellen eine extrem wichtige Rolle, um das korrekte Ablaufen verschiedenster Vorgänge im Organismus von der Zelldifferenzierung bis zur Muskelkontraktion zu gewährleisten. Das extrazelluläre Signal selbst, z.B. eine chemische Substanz als sogenannter *first messenger*, muss dazu in ein intrazelluläres Signal, einen *second messenger*, umgewandelt werden. Dabei ist die Geschwindigkeit und die Genauigkeit der Signalübermittlung von hoher Bedeutung. Calcium-Ionen stellen dabei einen idealen Botenstoff dar, indem ein extrazelluläres Signal zu einer Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle führt. Da intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen typischerweise um einen Faktor 10.000 unter der Konzentration im extrazellulären Medium oder in Organellen liegen, können Ca^{2+} -Ionen sehr schnell in die Zelle einströmen. Darüber hinaus erlauben die chemischen Eigenschaften des divalenten Ca^{2+} -Ions eine starke und spezifische Bindung an Ca^{2+} -bindende Moleküle, die das Signal innerhalb der Zelle weiterleiten können [88].

Das wichtigste und am besten untersuchte Ca^{2+} -abhängige Signalmolekül ist Calmodulin. Dieses mit 148 Aminosäuren relativ kleine Protein wird durch Bindung von Ca^{2+} -Ionen in einen aktivierten Zustand versetzt, in dem es an eine große Zahl an Zielproteinen binden kann, deren Aktivität daraufhin durch Calmodulin geregelt wird. Die Aufgabe von Calmodulin besteht also darin, das Ca^{2+} -Signal auf die Größenskala von Proteinen zu übersetzen und an Zielproteine weiterzugeben. Die große Bedeutung von Calmodulin wird eindrucksvoll klar, wenn man sich vor Augen führt, dass dieses Protein eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie beispielsweise Apoptose, Muskelkontraktion und Nervenwachstum in Ca^{2+} -abhängiger Weise steuert und reguliert. Calmodulin kommt in allen Eukaryonten hochkonserviert vor und wurde im Laufe der letzten 1 Milliarde Jahre nur noch minimal evolutionär verändert. In allen Wirbeltieren ist die Aminosäure-Sequenz von Calmodulin sogar exakt identisch [19].

In der vorliegenden Arbeit werden die Eigenschaften von Calmodulin durch Einzelmolekül-Kraftspektroskopie erforscht. Zunächst wird die Faltung des Proteins, d.h. der Übergang von der unstrukturierten Aminosäurekette zur funktionalen dreidimensionalen Struktur untersucht. Dabei steht unter anderem die Frage im Mittelpunkt, inwieweit die Faltung durch die Liganden von Calmodulin, also durch Ca^{2+} und durch Calmodulin-bindende Peptidsequenzen aus Zielproteinen, beeinflusst wird. So lässt sich hier eine Kopplung von Faltung und Ligandenbindung am Beispiel von Calmodulin beobachten. Weiterhin wird auch die Funktion von Calmodulin näher betrachtet, indem die Bindung von Peptidliganden direkt untersucht wird, um ein detaillierteres Bild davon zu gewinnen, wie Calmodulin zwischen seinen verschiedenen Zielproteinen unterscheiden kann. Für verschiedene Target-Peptide finden sich unterschiedliche Bindungsstöchiometrien und unterschiedliche Grade an Bindungskoopertivität, was potentiell eine wichtige Rolle für die physiologische Funktion von Calmodulin spielt.

2 Einleitung

Bei der hier verwendeten Methode, der Einzelmolekül-Kraftspektroskopie mittels AFM, wird durch Anlegen mechanischer Kraft an das Protein oder an die Peptidliganden die Kinetik von Faltungs-/Entfaltungsvorgängen sowie von Ligandenbindungs-/entbindungs-Ereignissen gezielt modifiziert, so dass sich die einzelnen Schritte getrennt voneinander auf einer gut zu beobachtenden Zeitskala detektieren lassen. Durch experimentelle Einschränkungen war diese Technik bislang weitgehend auf die Untersuchung von Entfaltungs- und Entbindungs-Vorgängen beschränkt, während Faltung und Ligandenbindung experimentell nicht zugänglich waren. Hier sollen nun erstmalig die Übergänge von Faltung und Entfaltung sowie Bindung und Entbindung im thermodynamischen Gleichgewicht beobachtet werden. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass solche Gleichgewichtsdaten ungleich mehr und detailliertere Informationen als frühere Nichtgleichgewichts-Messungen enthalten.

3 Grundlagen

3.1 Das Kraftmikroskop

Die Rasterkraftmikroskopie hat seit ihrer Entwicklung 1986 große Bedeutung als hochauflösende Abbildungstechnik für verschiedenste Oberflächen erlangt [6]. Bei dieser Technik wird eine Probe mit einer sehr scharfen Spitze abgerastert, die mit der Oberfläche durch verschiedene Wechselwirkungen interagiert und der Topographie folgt. Das Rasterkraftmikroskop oder AFM (*atomic force microscope*) lässt sich jedoch nicht nur zu Abbildungszwecken einsetzen, sondern auch zur Kraftspektroskopie, indem beispielsweise DNA oder Proteine zwischen Oberfläche und Spitze eingespannt und mit mechanischer Kraft belastet werden [67, 65].

Das in dieser Arbeit verwendete Kraftspektrometer ist schematisch in Abb. 3.1 A gezeigt. Die Probe befindet sich auf einem in z-Richtung hochpräzise verstellbaren Piezotisch. Die Nadel mit einem Durchmesser von ca. 30 nm an der Spitze ist in eine Blattfeder integriert, die sich proportional zur an der Spitze anliegenden Kraft mit einer Federkonstante k_c verbiegt. Die Auslenkung der Feder wird durch die Reflexion eines Laserstrahls auf der Blattfeder mittels einer segmentierten Photodiode gemessen. Das Differenzsignal zwischen den oberen und den unteren Diodensegmenten dient als Messgröße für die Auslenkung der Blattfederspitze und damit der anliegenden Kraft (siehe auch Anhang A.1). Details der Messung sind in Anhang A.2 und A.3 beschrieben.

Mit dieser Methode können nun die mechanischen Eigenschaften einzelner Moleküle mit hoher Präzision untersucht werden, indem man den Abstand zwischen Oberfläche und Spitze mit konstanter Geschwindigkeit erhöht und damit auf ein eingespanntes Molekül Kraft ausübt. Für die Einzelmolekül-Kraftspektroskopie an Proteinen wird das zu untersuchende Protein üblicherweise in ein Polyprotein-Konstrukt integriert (Abb. 3.1 B). Die terminalen Domänen dienen einerseits als "Griffe" für die Anbindung an Oberfläche und Spitze, andererseits aber auch als Marker für korrekte Einzelmolekül-Ereignisse in Kraft-Abstands-Kurven (siehe auch Abschnitt 3.2). Wird Kraft angelegt, so entfalten die einzelnen Proteindomänen in der Kette nacheinander. Auf diese Weise lässt sich beispielsweise die mechanische Stabilität von Proteinen untersuchen, die auch *in vivo* mechanischen Kräften ausgesetzt sind [60, 54, 76]. Darüber hinaus hat sich die Einzelmolekül-Kraftspektroskopie zum Beispiel auch als Methode zur Untersuchung der Proteinfaltung bewährt, insbesondere zur Detektion von Faltungsintermediaten [78, 5]. In diesen und in weiteren Anwendungsfeldern macht man sich zunutze, dass sich unter Kraft die Entfaltungsraten erhöhen und die Faltungsraten senken lässt (siehe Abschnitt 3.3).

Als alternative Methoden zur Einzelmolekül-Kraftspektroskopie mit dem AFM kommen optische und magnetische Pinzetten in Frage [59]. Diese Techniken erlauben eine höhere Kraftauflösung bei allerdings oftmals schlechterer Ortsauflösung. Darüber hinaus sind Experimente mit diesen Methoden ungleich aufwendiger als mit dem AFM. Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, lässt sich mit dem AFM bei sehr langsamen Ziehgeschwindigkeiten (1 nm/s anstelle von üblicherweise ca. 1000 nm/s) eine Kraftauflösung erreichen, die mit der optischen Pinzette konkurrieren kann (siehe auch Anhang A.3).

3 Grundlagen

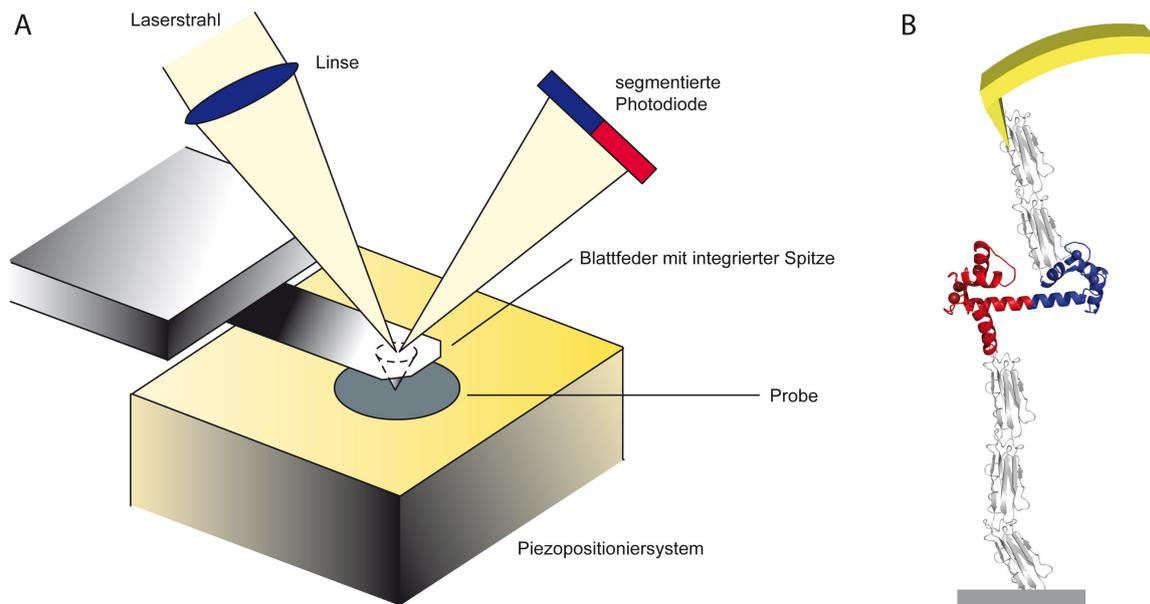


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. A. Die Verbiegung der Blattfeder, die über die Auslenkung eines auf der Blattfeder reflektierten Laserstrahls gemessen wird, gibt die an der Blattfederspitze wirkende Kraft an. Über ein Piezo-Positioniersystem kann der Abstand zwischen Objektträger und Blattfederspitze hochpräzise verändert werden. (Abbildung übernommen mit freundlicher Genehmigung von H. Dietz) B. Üblicherweise wird das zu untersuchende Protein (rot/blau) in ein Polyprotein-Konstrukt (grau) integriert, das als "Griff" dient und seinerseits an Objektträger und Blattfederspitze angebunden wird.

3.2 Elastizität von Proteinen

Für die Durchführung der im vorangehenden Abschnitt kurz skizzierten mechanischen Proteinentfaltungs-Experimente ist eine Analyse der Elastizität von Proteinen unabdingbar, dabei muss zwischen gefaltetem und ungefaltetem Protein unterschieden werden. Die Struktur von gefalteten Proteinen wird durch spezifische Wechselwirkungen vermittelt. Gefaltetes Protein ist daher wesentlich weniger elastisch als entfaltetes Polypeptid, d.h. es dehnt sich bei der gleichen anliegenden Kraft deutlich weniger aus (siehe Abb. 3.2 A). Die Elastizität von entfaltenen Proteinen, also die Kraft F in Abhängigkeit von der Ausdehnung d , ist im Wesentlichen entropischen Ursprungs und lässt sich durch das *worm-like chain*-Modell (WLC) beschreiben (Gl. 3.1) [12]. Für die Persistenzlänge von Polypeptidketten wurde ein fester Wert von $p = 0,5 \text{ nm}$ verwendet, so dass die Konturlänge entlang des Aminosäurerückgrats L als einziger Fitparameter der WLC-Kurve verbleibt.

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

Werden im AFM Multidomänen-Konstrukte wie in Abb. 3.1 B entfaltet, so erhöht sich die freie Konturlänge des entfaltenen Polypeptids mit jedem Entfaltungsereignis. Da die Elastizität der gefalteten Proteindomänen demgegenüber vernachlässigbar ist, stellen sich Entfaltungskurven von Polyprotein-Konstrukten schlichtweg als aufeinanderfolgende WLC-Segmente dar (Abb. 3.2 B). Dies führt zu einem charakteristischen Sägezahnmuster der Kraftabstandskurven, bei dem die Peaks jeweils einzelnen Domänenentfaltungen entspre-

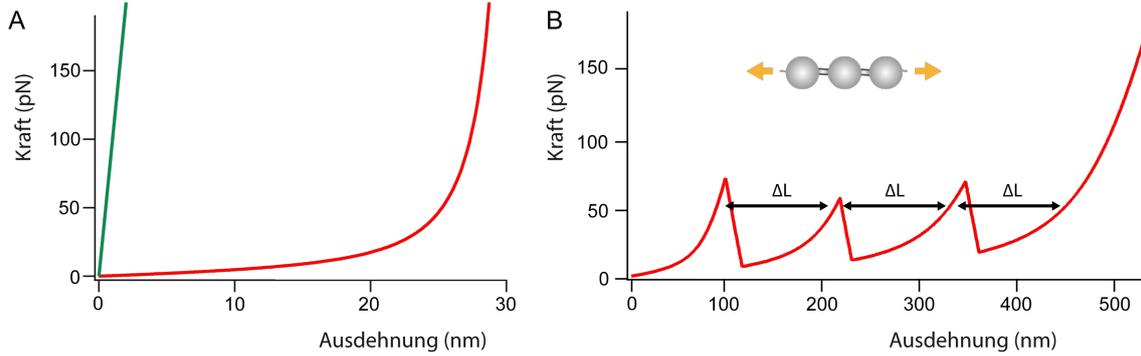


Abbildung 3.2: A. Elastizität von gefalteten (grün) und entfalteten (rot) Proteinen. Die nichtlineare Elastizität von entfaltetem Polypeptid lässt sich durch das WLC-Modell beschreiben und ist wesentlich höher als die hier nur schematisch gezeichnete Elastizität von gefaltetem Protein. B. Kraft-Abstands-Kurve für die mechanische Entfaltung eines Proteinkonstrukts aus mehreren identischen Domänen. Bei jedem Entfaltungsereignis erhöht sich die Konturlänge der entfaltenen Polypeptidkette, so dass sich die Kraft-Abstands-Kurven als Abfolge von WLC-Kurven mit steigenden Konturlängen L beschreiben lassen.

chen. Der Konturlängenzuwachs pro Entfaltungsereignis ΔL lässt sich folgendermaßen bestimmen:

$$\Delta L = d_{aa} \cdot n - d_{folded}^1 + d_{folded}^2 \quad (3.2)$$

Dabei ist d_{aa} der Konturlängenzuwachs pro Aminosäure, n ist die Anzahl der entfaltenen Aminosäurereste. Weiterhin bezeichnen d_{folded}^1 und d_{folded}^2 die Abstände zwischen N- und C-Terminus in der gefalteten Struktur vor bzw. nach dem Entfaltungsereignis. Der Konturlängenzuwachs pro entfaltender Aminosäure wurde für das in dieser Arbeit verwendete Instrument zu $d_{aa} = 0,365 \text{ nm}$ bestimmt [25]. Durch Bestimmen der experimentellen Konturlängenzuwächse ΔL lassen sich mit Hilfe von Gl. 3.2 die beobachteten Entfaltungsereignisse mit einer Genauigkeit von wenigen Aminosäuren strukturell interpretieren. In dieser Arbeit wird, zusätzlich zum statistischen Fehler bei der Bestimmung des Konturlängenzuwachses, noch ein systematischer Fehler von $1,0 \text{ nm}$ addiert, der im Wesentlichen durch fehlerhafte Nullpunktsbestimmung und Drift zustande kommt.

3.3 Faltung und Entfaltung unter Kraft

Eine wesentliche Motivation für das Verwenden mechanischer Kraft zur Untersuchung von Proteinfaltung und -entfaltung liegt darin begründet, dass sich Faltungs- und Entfaltungsraten unter Kraft in sehr gut kontrollierbarer Weise verändern lassen. Die Konformationskinetik von Proteinen lässt sich durch ein einfaches Energielandschafts-Modell beschreiben, für das die Zustände N (gefaltetes Protein, *native*), TS (Übergangszustand, *transition state*) und U (entfaltetes Protein, *unfolded*) unterschieden werden (Abb. 3.3 A). Es können nun thermisch aktivierte Übergänge zwischen den Zuständen N und U stattfinden, die Entfaltungsrates k_u und die Faltungsrates k_f hängen dabei nach *Transition State Theory* exponentiell von der Höhe der Barriere, ΔG_{N-TS} bzw. ΔG_{U-TS} ab. Anlegen einer konstanten äußeren Kraft führt zu einem zusätzlichen, linearen Potential, das auf das Protein wirkt¹.

¹Die Annahme eines linearen Potentials stellt bereits eine Näherung dar. Wird das Protein über eine Feder (hier eine Kombination von Cantilever und entfalteter Polypeptidkette) einer Kraft ausgesetzt, so führt dies bei konstanter Ziehgeschwindigkeit v des Cantilevers zu einem näherungsweise quadratischen zusätzlichen

3 Grundlagen

Durch dieses zusätzliche Potential wird die Energielandschaft verkippt, so dass sich die Barrieren für Faltung und Entfaltung verändern (Abb. 3.3 B). Die Reaktionskoordinate hat nun die Dimension einer Länge, wobei der mechanisch weichere entfaltete Zustand eine höhere Ausdehnung als der vergleichsweise starre gefaltete Zustand hat (siehe auch Abschnitt 3.2). Nimmt man vereinfachend an, dass sich die Potentialbreite Δx_{N-TS} unter Kraft nicht ändert und dass die anliegende Kraft bei der Ausdehnung des Proteins von N nach TS konstant bleibt, so erhält man für die Kraftabhängigkeit der Entfaltungsrate [3,28].

$$k_u(F) = k_u^0 \cdot e^{-\frac{\Delta G_{N-TS}}{k_B T}} \cdot e^{\frac{F \cdot \Delta x_{N-TS}}{k_B T}} = k_u(F=0) \cdot e^{\frac{F \cdot \Delta x_{N-TS}}{k_B T}} \quad (3.3)$$

In die Berechnung nach Gl. 3.3 geht also nur die Barrierenhöhe (bzw. Nullkraft-rate) und die Potentialbreite ein. Die genaue Form der Energiebarriere, also beispielsweise die Frage, ob es sich beim Übergangszustand um ein breites Plateau oder eine schmale Spitze handelt, spielt dagegen keine Rolle. Bei speziellen experimentellen Systemen, die eine sehr exakte Bestimmung von Entfaltungskraftverteilungen erlauben, lassen sich dagegen über Kramers-Korrekturen auch detailliertere Informationen über die Gestalt der Barriere gewinnen [73,27]. Im Rahmen dieser Arbeit wird stets von einem einfachen exponentiellen Zusammenhang zwischen Übergangszustand und Barrierenhöhe ausgegangen, ohne dass durch die Form der Barriere bedingte Abweichungen in Betracht gezogen werden.

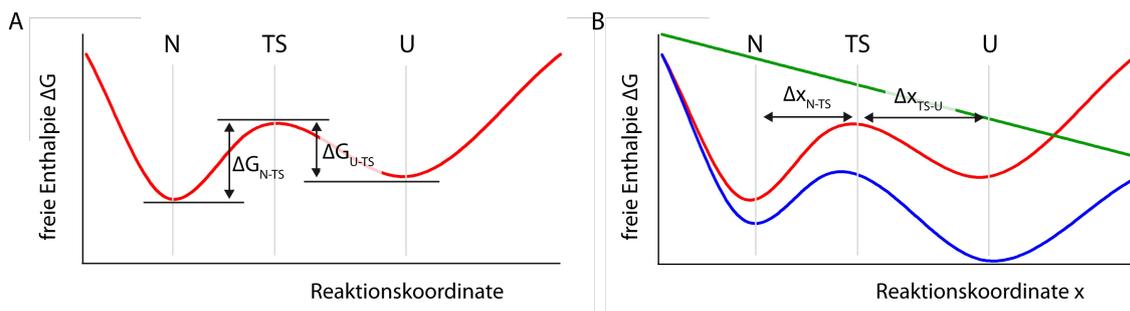


Abbildung 3.3: Das Zwei-Zustands-Modell für Protein-Entfaltung unter Kraft. A. Die Proteinfaltung lässt sich in einem Energielandschafts-Modell (rot) beschreiben, für das die Zustände N (gefaltetes Protein, *native*), TS (Übergangszustand, *transition state*) und U (entfaltetes Protein, *unfolded*) unterschieden werden. Die Raten für die Übergänge zwischen N und U hängen exponentiell von der Energiebarriere zum Übergangszustand ab. B. Anlegen einer konstanten Kraft führt zu einem zusätzlichen, linearen Potential (grün), das auf das Protein wirkt. Durch dieses zusätzliche Potential wird die Energielandschaft verkippt (blau), so dass sich die Barrieren für Faltung und Entfaltung verändern.

Die Entfaltungsrate steigt nach dem hier verwendeten Modell also exponentiell mit der Kraft an, wobei die Potentialbreite Δx_{N-TS} die Rolle einer Kraftempfindlichkeit spielt. Eine entsprechende Gleichung ließe sich natürlich auch für die Faltungsrate $k_f(F)$ aufstellen, was zu einer exponentiell mit der Kraft sinkenden Faltungsrate führen würde. Allerdings sind für die Faltung unter Kraft die obigen Bedingungen für das einfache Modell nicht erfüllt, insbesondere ist die Potentialbreite für die Rückfaltung Δx_{TS-U} nicht mehr kraft-unabhängig. Die Potentialbreite lässt sich direkt aus dem bekannten elastischen Verhalten

Potential $V_i(x) = \frac{1}{2}\kappa \cdot (x - vt)^2$. Da die effektive Federkonstante des Proteins viel höher als diejenige des externen Potentials ist, kann das zusätzliche Potential auf der Längenskala der Potentialbreite des Proteins in guter Näherung als linear betrachtet werden.

von entfaltenen Polypeptidketten unter Kraft berechnen (Abschnitt 3.2), so dass Δx_{TS-U} im Gegensatz zur Entfaltung kein freier Parameter mehr ist. Als Potentialbreite Δx_{TS-U} verwenden wir daher die reale Ausdehnung des entfaltenen Proteins unter der anliegenden Kraft, abzüglich der Länge des Proteins im Übergangszustand TS. Für die Faltung wird angenommen, dass unter Kraft die natürliche Faltungsbarriere des Proteins durch eine zusätzliche mechanisch induzierte Energiebarriere vergrößert wird. Diese mechanische Barriere berechnet sich als die Energie, die zur Kontraktion des entfaltenen Proteins auf seinen End-zu-End-Abstand im Übergangszustand TS nötig ist. Die Energiebeiträge sind im einzelnen die Energie, die durch die Kontraktion des entfaltenen Proteins frei wird, sowie die Energien, die zur Streckung des Polypeptid-Spacers und zur Verbiegung des Cantilevers benötigt werden (Abb. 3.4) [72,74]. Dies führt zu Abweichungen von einer rein exponentiellen Kraftabhängigkeit.

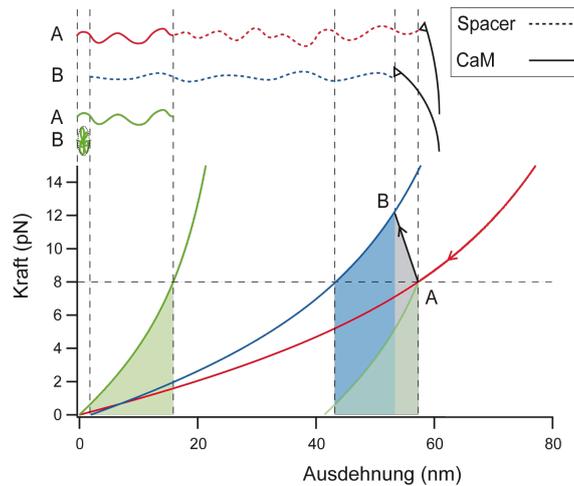


Abbildung 3.4: Das Kontraktions-Modell für Protein-Faltung unter Kraft. Zusätzlich zur natürlichen Faltungsbarriere des Proteins wird die Höhe der mechanisch induzierten zusätzlichen Energiebarriere bestimmt. Diese berechnet sich als die Energie, die zur Kontraktion des entfaltenen Proteins auf seinen End-zu-End-Abstand in der gefalteten Form nötig ist. Die Energiebeiträge sind im einzelnen die Energie, die durch die Kontraktion des entfaltenen Proteins frei wird (grün), sowie die Energien, die zur Streckung des Polypeptid-Spacers (blau) und zur Verbiegung des Cantilevers (grau) benötigt werden. (Abbildung übernommen mit freundlicher Genehmigung von F. Berkemeier)

Unter Kraft wird die Entfaltungskinetik also beschleunigt, während die Faltung verlangsamt wird. Dies führt dazu, dass in Einzelmolekül-Kraftspektroskopie-Experimenten überwiegend lediglich Entfaltungsübergänge beobachtet werden können, während Rückfaltung unter Kraft experimentell nicht zugänglich ist [67, 60]. Dieses Szenario wird im Folgenden als Nicht-Gleichgewichts-Fall bezeichnet. Im Gleichgewicht bezüglich der Proteinfaltung können dagegen Übergänge von N nach U und auch zurück von U nach N beobachtet werden. Gleichgewicht zwischen Faltung und Entfaltung liegt dann vor, wenn $k_u(F)$ und $k_f(F)$ den gleichen Wert annehmen, also am Schnittpunkt beider Kurven in Abb. 3.5 (k_u : grün, k_f : violett). Gleichgewichtsübergänge zwischen N und U lassen sich nur dann beobachten, wenn dieser Schnittpunkt innerhalb der experimentell gegebenen zeitlichen Auflösungsgrößen liegt (horizontale schwarze Linien in Abb. 3.5). Die untere Grenze ist durch die Dauer des Experiments gegeben: Übergänge, die sich auf Zeitskalen abspielen, die länger als die Aufnahmedauer einer Messkurve sind, können nicht beobachtet werden, weil sie nur mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit stattfinden. Die obere Grenze wird durch

3 Grundlagen

die endliche Geschwindigkeit des Cantilevers gegeben: Wenn Übergänge schneller stattfinden, als der Cantilever folgen kann, so können sie nicht mehr als getrennte Ereignisse detektiert werden.

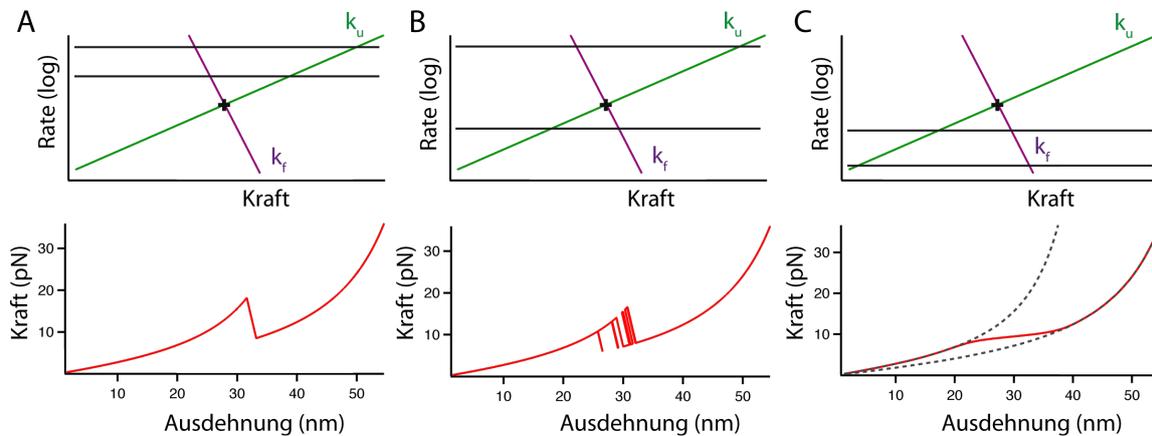


Abbildung 3.5: Mechanische Proteinfaltung unter Gleichgewichts- und Nichtgleichgewichtsbedingungen. Oben ist jeweils der Schnittpunkt von Faltungs- und Entfaltungsraten (Gleichgewichtsbedingungen) im Verhältnis zu den durch die Dauer des Experiments und die Ziehgeschwindigkeit gegebenen zeitlichen Auflösungsgrenzen gezeigt (schwarze Linien). Unten sind berechnete Beispielkurven für das jeweilige Szenario abgebildet. A. Nichtgleichgewichtsbedingungen, lediglich Entfaltung beobachtbar. B. Gleichgewichtsbedingungen, Beobachtung einzelner Gleichgewichtsübergänge möglich. C. Gleichgewichtsbedingungen mit sehr schnellen Übergangsraten, so dass keine einzelnen Faltungs-/Entfaltungseignisse aufgelöst werden können.

In Abb. 3.5 A liegt der Schnittpunkt unterhalb der unteren Auflösungsgrenze, Rückfaltung ist also zu unwahrscheinlich um beobachtet werden zu können. Entsprechend wird nur ein Entfaltungsspeak pro Domäne detektiert, es liegt kein Gleichgewicht zwischen den Zuständen N und U vor. Dies ist der übliche Fall für kraftspektroskopische Experimente an einzelnen Proteinen. In Abb. 3.5 B dagegen befindet sich der Schnittpunkt der Raten innerhalb der Auflösungsgrenzen, so dass Faltungs- und Entfaltungsübergänge im Gleichgewicht beobachtet werden können. In den Daten zeigt sich dies durch mehrfache Übergänge zwischen den beiden WLC-Kurven. Ist die Kinetik dagegen so schnell, dass der Schnittpunkt oberhalb der durch den Cantilever gegebenen Auflösungsgrenze liegt (Abb. 3.5 C), so lassen sich keine individuellen Übergänge mehr ausmachen, obwohl Gleichgewichtsbedingungen vorliegen [55, 77]. Bedingt durch sehr schnelle Gleichgewichtsübergänge lässt sich dann zu jeder Piezo-Position nur eine mittlere Cantilever-Position und somit ein mittlerer Kraft-Level bestimmen.

Gleichgewichtsübergänge zwischen N und U lassen sich also nur in Szenario B untersuchen². Gleichzeitig ist dieser Fall der interessanteste, weil ein direkter Zugang zu k_u und k_f und damit zur gesamten Energielandschaft des Proteins möglich ist. Es hat sich experimentell gezeigt, dass für Proteinfaltung meist die untere Grenze, die durch die Dauer des Experiments bestimmt ist, der limitierende Faktor ist [72]. Um Gleichgewichtsübergänge beobachten zu können muss daher die Ziehgeschwindigkeit v_{pull} drastisch verringert werden, um die Beobachtungsdauer zu erhöhen. In dieser Arbeit wurden Geschwindigkeiten

²Hier befindet sich das Gesamtsystem von Protein und Cantilever im Gleichgewicht bezüglich der zwei möglichen Zustände. Der deutliche Kraftsprung zwischen den Zuständen sorgt dafür, dass sich die in der Cantilever-Verbiegung gespeicherte Energie bei Gleichgewichtsübergängen deutlich verändert.

von $v_{pull} \sim 1 \text{ nm/s}$ verwendet, was ca. um einen Faktor 1000 unter üblichen Werten liegt. Dies stellt erhebliche Anforderungen an die Stabilität des Aufbaus (siehe auch Anhang A.2 und A.3).

In früheren Arbeiten, bei denen Proteine unter Kraft entfaltet wurden, konnte Rückfaltung nur unter Nichtgleichgewichtsbedingungen, d.h. im kraftfreien Fall [76] oder bei sehr niedrigen Kräften [72] untersucht werden. Bei solchen Messungen finden Faltung und Entfaltung im Allgemeinen entlang von verschiedenen Pfaden auf der hochdimensionalen Energielandschaft des Proteins statt, was in vielen Fällen eine schwerwiegende Einschränkung bei der Dateninterpretation bedeutet. Mechanisch induzierte Gleichgewichtsübergänge von Proteinen zwischen den Zuständen N und U konnten bislang noch nicht mit Einzelmolekül-Kraftspektroskopie experimentell realisiert werden, sondern wurden in der vorliegenden Arbeit erstmalig beobachtet. Übergänge zwischen einem Faltungsintermediat und der entfalteten Struktur des Proteins RNase H konnten dagegen in Einzelmolekül-Kraftspektroskopie mittels optischer Pinzette detektiert werden [16]. Mit einer ähnlichen Technik wurden vollständige Faltungs-/Entfaltungsübergänge von DNA-Hairpins und RNA-Aptameren beobachtet und analysiert [87,33].

4 Calmodulin

Das Element Calcium ist in Form des Ca^{2+} -Ions für viele biologische Prozesse von Bedeutung. In den meisten Organismen ist die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration mit $< 10^{-7}$ M sehr niedrig im Vergleich zur Konzentration von Ca^{2+} -Ionen in der extrazellulären Flüssigkeit, die typischerweise bei $\sim 10^{-3}$ M liegt. Dieser starke Konzentrationsunterschied wird von Zellen zur Signalübermittlung genutzt, indem externe Stimuli zur Öffnung von Calcium-Kanälen in der Plasmamembran oder zur Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern führen können, so dass der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel ansteigt. Verschiedene Proteine reagieren auf ein solches Ca^{2+} -Signal, das bekannteste und am besten untersuchte dieser Ca^{2+} -Sensor-Proteine ist Calmodulin (CaM) [18].

Calmodulin ist ein mit 148 Aminosäuren relativ kleines Zwei-Domänen-Protein, das erstmalig 1974 isoliert wurde [48]. Es kommt hochkonserviert in allen Eukaryonten vor, in allen Wirbeltieren ist die Sequenz exakt identisch. Calmodulin spielt eine wichtige Rolle in Second-Messenger-Systemen und aktiviert in seiner Ca^{2+} -bindenden Form Proteine, die für Apoptose, Muskelkontraktion, Nervenwachstum und viele weitere Prozesse wichtig sind. Calmodulin gehört zur Familie der EF-Hand-Proteine; ein EF-Hand-Motiv besteht aus einer N-terminalen Helix gefolgt von einem zentralen Ca^{2+} -bindenden Loop und einer C-terminalen Helix. Calmodulin besitzt vier solcher EF-Hand-Motive, zwei in jeder der beiden homologen Domänen (siehe Abb. 4.1). Die Faltungsenergie der beiden Calmodulin-Domänen ist mit $4,6 k_B T$ (N-terminale Domäne) und $3,2 k_B T$ (C-terminale Domäne) im apo-Zustand relativ niedrig [56], kann sich durch Ligandenbindung jedoch erheblich erhöhen.

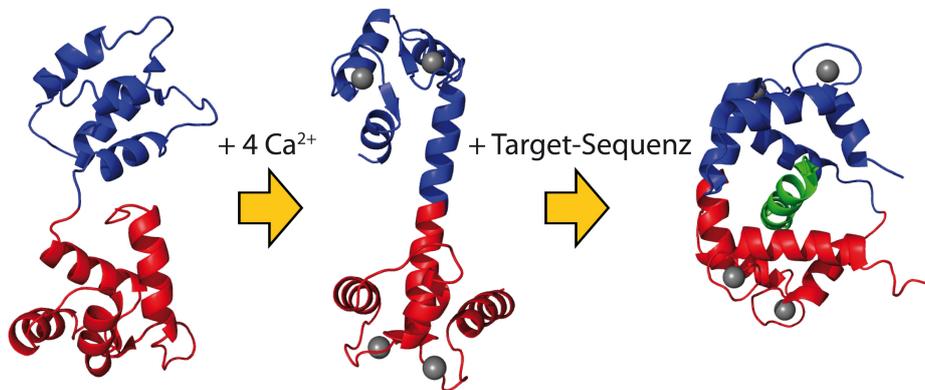


Abbildung 4.1: Calmodulin in verschiedenen Konformationen. Die N-terminale Domäne (DomN) ist rot, die C-terminale Domäne (DomC) blau gezeigt. Links. Ca^{2+} -freies Calmodulin (apo-Konformation) (PDB-ID 1DMO) [89]. Mitte. Ca^{2+} -bindendes Calmodulin (holo-Konformation), die Ca^{2+} -Ionen sind durch graue Kugeln symbolisiert (PDB-ID 1CLL) [17]. Rechts. Struktur von holo-Calmodulin mit Target-Peptid (grün) (PDB-ID 2BBM) [41].

Die Bindung von Ca^{2+} -Ionen führt zu einer deutlichen Konformationsänderung von Calmodulin: Die Anordnung der α -Helizes zueinander verschiebt sich, das Protein geht in eine gestrecktere Konformation über und einige hydrophobe Aminosäuren im

4 Calmodulin

Verbindungsbereich zwischen den Domänen und dem α -helikalen Interdomänen-Linker werden löungsmittel-exponiert [89]. In der Ca^{2+} -bindenden Form kann Calmodulin nun an Target-Sequenzen in verschiedensten Ziel-Proteinen binden. Zur Zeit sind mehrere hundert Erkennungs-Sequenzen für Calmodulin bekannt [79], die sich insbesondere anhand hydrophober Aminosäuren mit charakteristischen Abständen in der Primärsequenz in verschiedene Klassen einteilen lassen [88]. Die Bindung von Calmodulin an Target-Sequenzen führt zu einem relativ großen Konformationsübergang, bei dem sich das Protein gleichsam um die Zielsequenz herumwickelt (siehe Abb. 4.1).

Eine der zentralen Anforderungen an Calmodulin ist es, im Bereich biologisch relevanter Ca^{2+} -Konzentrationen von 10^{-7} – 10^{-8} M Schwankungen im Ca^{2+} -Spiegel zu detektieren und darauf zu reagieren. Die effektiven Dissoziationskonstanten von Calmodulin liegen genau in diesem Bereich typischer intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen, so dass eine optimale Sensitivität des Moleküls auf Ca^{2+} -Schwankungen im physiologischen Bereich gewährleistet ist. Eine noch feinere Steuerung des Ca^{2+} -Bindungsverhaltens ist darüber hinaus dadurch möglich, dass die C-terminale Domäne von Calmodulin (DomC) eine drei- bis fünffach höhere Affinität für Ca^{2+} hat als die N-terminale Domäne (DomN) [18]. Zwischen den beiden Ca^{2+} -Bindungsstellen einer Domäne besteht eine beträchtliche positive Kooperativität, so dass beide Domänen vorwiegend in der Ca^{2+} -freien oder in der mit 2 Ca^{2+} -Ionen komplett gesättigten Form vorliegen. Die Dissoziationskonstanten sind im einzelnen für die N-terminale Domäne $K_1^N K_2^N = 1,6 \cdot 10^{-10} \text{ M}^2$ und $K_1^N = 1,6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ und für die C-terminale Domäne $K_1^C K_2^C = 3 \cdot 10^{-12} \text{ M}^2$ und $K_1^C = 8 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ [56, 50] (siehe auch Kapitel 5).

Die Dissoziationskonstanten von Ca^{2+} -gesättigtem Calmodulin für Target-Proteine liegen meist im Bereich 10^{-11} – 10^{-8} M [21]. Unter den Ziel-Enzymen von Calmodulin befinden sich vor allem etliche Kinasen, die durch Calmodulin in Ca^{2+} -abhängiger Weise aktiviert werden. Für diese Kinasen findet man häufig einen Aktivierungsmodus, bei dem die Bindung von Calmodulin an die Target-Sequenz diese Zielsequenz zusammen mit einer autoinhibierenden Region vom katalytischen Zentrum der Kinase wegzieht, so dass diese in einen funktionalen Zustand versetzt wird [46]. Für Bindungsstudien werden anstelle der vollständigen Target-Enzyme überwiegend lediglich Peptide der Erkennungssequenz verwendet. Im Allgemeinen scheint die Interaktion der C-terminalen Domäne von Calmodulin mit Target-Peptiden stärker als die der N-terminalen Domäne zu sein, so dass in der Literatur weitgehend davon ausgegangen wird, dass die Assoziation des Target-Peptids mit der C-terminalen Domäne von Calmodulin der erste Schritt bei der Bindung an Erkennungssequenzen ist [88]. Diese Target-Sequenzen sind durch eine charakteristische Abfolge von hydrophoben Anker-Aminosäuren gekennzeichnet (siehe Tab. 4.1). Die Sequenzen unterscheiden sich in der Anzahl dieser charakteristischen hydrophoben Aminosäuren, insbesondere aber auch in ihrem Abstand. Im kanonischen Bindungsmotiv liegen die zwei äußeren hydrophoben Aminosäuren im Abstand von 14 Aminosäureresten auseinander, neben diesem 1-14 Motiv finden sich jedoch auch die Abstände 1-10 und 1-16 [88].

Auch wenn nur für die wenigsten Target-Peptide von Calmodulin detaillierte strukturelle Informationen vorhanden sind, so gilt doch die in Abb. 4.1 abgebildete Struktur von Calmodulin mit dem Peptid skMLCK, einem 26-Aminosäuren-Fragment der *skeletal muscle myosin light chain kinase*, als typisch für die Interaktion von Calmodulin mit seinen Zielproteinen [41]. skMLCK phosphoryliert, genauso wie smMLCK, das entsprechende Enzym in der glatten Muskulatur (*smooth muscle myosin light chain kinase*), die regulatorischen

leichten Ketten von Myosin [7, 80]. Weiterhin werden in dieser Arbeit die Target-Sequenz von CaMKK (*calmodulin dependent kinase kinase*) [82] und das Peptid Mastoparan (Mas) [51] aus Wespengift untersucht. CaMKK phosphoryliert unter anderem weitere Kinasen, die wiederum von Calmodulin aktiviert werden [85]. Interessant an CaMKK ist insbesondere, dass das Peptid als einzige Targetsequenz mit im Vergleich zu skMLCK inverser Orientierung an Calmodulin bindet, nämlich mit dem N-terminalen Ende des Peptides an die N-terminale Domäne von Calmodulin und umgekehrt [61]. Zudem ist es das einzige bekannte Target-Peptid mit einem 1-16 Motiv der hydrophoben Anker-Aminosäuren. Neben diesen strukturellen Unterschieden deutet auch eine Proteindynamik-Studie mittels NMR auf fundamental andere Bindungsinteraktionen von CaMKK im Vergleich zu MLCK hin [53].

Für Mastoparan liegen keine detaillierten strukturellen Informationen vor. Dennoch ist dieses Peptid sehr interessant, da die physiologische Funktion des Giftes, und damit vermutlich auch der Interaktionsmodus mit Calmodulin, deutlich anders als ist für die MLCK-Peptide und CaMKK [36]. Die Sequenzen der genannten Peptide sind in Tab. 4.1 angegeben.

Tabelle 4.1: Aminosäure-Sequenzen der untersuchten Target-Peptide von Calmodulin. Charakteristische hydrophobe Aminosäuren sind fett gedruckt.

skMLCK	KRR W KKN F IA V SAANR F KKISSSGAL
smMLCK	RRK W QKTGHAVRAIGR L SSS
CaMKK	VKLIP S WTTVILVK S MLRKR S F GNPF
Mastoparan	I NLKALAA L AK K I L

Generell gilt, dass über die meisten Target-Sequenzen von Calmodulin nur sehr wenig bekannt ist. Bindungsmodus, Assoziation mit Einzeldomänen und Stöchiometrie sind nur für einige wenige der über hundert Target-Peptide detailliert untersucht worden. Die Frage, in wie weit der Vielfalt an Ziel-Sequenzen auch eine entsprechende Heterogenität an Bindungsmodi gegenübersteht, soll in dieser Arbeit zum Teil angegangen werden.

Eine weiteres Thema, zu dem noch viele Fragen offen stehen, ist die Faltung von Calmodulin. Bislang liegt nur eine Faltungsstudie zur Ca²⁺-freien C-terminalen Domäne von Calmodulin vor. Durch ein Temperatursprung-Experiment konnte für die apo-C-Domäne eine Faltungsrate von $k_f \approx 5000 \text{ s}^{-1}$ gefunden werden [64]. Faltungsstudien zu Calmodulin in Anwesenheit von Liganden (in erster Linie Ca²⁺) wurden bislang noch nicht durchgeführt. Mittels der in dieser Arbeit verwendeten Methode der Einzelmolekül-Kraftspektroskopie mit dem AFM lassen sich hier interessante Aspekte bezüglich der Kopplung von Faltung und Ligandenbindung untersuchen.

4 *Calmodulin*

5 Freie Enthalpie der Ligandenbindung

Im Rahmen dieser Arbeit soll der Einfluss von Ligandenbindung auf die Faltung und Entfaltung von Proteinen untersucht werden. Dazu wird hier beschrieben, wie Liganden die Energielandschaft für Faltung und Entfaltung (siehe Abschnitt 3.3) beeinflussen können. In Abb. 5.1 ist das Modell abgebildet, das dabei verwendet wird. Das Protein kann prinzipiell in 4 Konformationen vorliegen: N: nativ, ligandenfrei, NL: nativ, ligandenbindend, U: entfaltet, ligandenfrei, UL: entfaltet, ligandenbindend. Wir nehmen an, dass auch der Übergangszustand in ligandenfreier (TS) und im ligandenbindenden Form (TSL) vorhanden sein kann und betrachten den Übergangszustand als eine eigene Spezies [8]. Übergänge zwischen den Konformationen werden durch die Entfaltungs- und Faltungsraten k_u und k_f sowie durch die Liganden-Entbindungs- und Bindungsraten k_{off} und k_{on} beschrieben. Zur Vereinfachung gehen wir im Folgenden davon aus, dass der Austausch des Liganden schnell im Vergleich zur Faltungs- und Entfaltungskinetik ist. Dann lässt sich das Schema in Abb. 5.1 A durch Annahme eines thermodynamischen Gleichgewichts zwischen N und NL sowie zwischen U und UL vereinfachen. Für die Ligandenbindung wird dann anstelle der Raten k_{off} und k_{on} lediglich die Dissoziationskonstante $K = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}}$ benötigt.

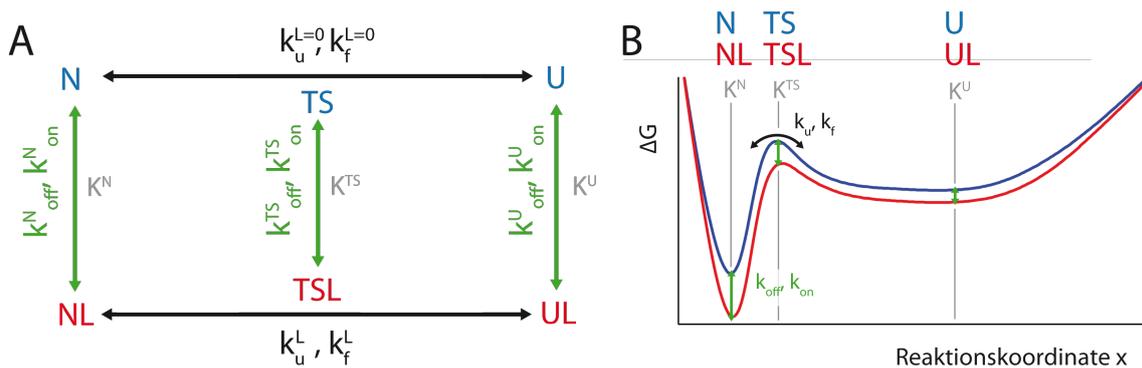


Abbildung 5.1: Modell für die Kopplung von Faltung und Ligandenbindung. A. Skizze der Konformationszustände des Proteins und der jeweiligen Übergangsraten. N: nativ, ligandenfrei, NL: nativ, ligandenbindend, TS: Übergangszustand, ligandenfrei, TSL: Übergangszustand, ligandenbindend, U: entfaltet, ligandenfrei, UL: entfaltet, ligandenbindend. B. Energielandschaft im ligandenfreien Fall (blau) und im ligandenbindenden Fall (rot).

N, NL, TS, TSL, U und UL bezeichnen im Folgenden die Konzentrationen der jeweiligen Spezies, L ist die Konzentration des freien Liganden, wobei wir annehmen, dass $L \gg N + NL + TS + TSL + U + UL$ gilt, so dass die Konzentration des freien Liganden sich nicht nennenswert durch Bindung an das Protein verringert. Die Dissoziationskonstanten¹ sind definiert als $K^N = \frac{N \cdot L}{NL} = e^{-\frac{\Delta G_N^L}{k_B T}}$, $K^{TS} = \frac{TS \cdot L}{TSL} = e^{-\frac{\Delta G_{TS}^L}{k_B T}}$ und $K^U = \frac{U \cdot L}{UL} = e^{-\frac{\Delta G_U^L}{k_B T}}$, wobei ΔG_N^L , ΔG_{TS}^L und ΔG_U^L die Energiedifferenzen zwischen ligandenbindendem und ligandenfreiem Protein in der jeweiligen Konformation bezeichnen. Für den Anteil an ligandenfreiem und ligandenbindendem Protein in gefalteter und entfalteter Konformation folgt damit

¹Die Affinität bezeichnet den Kehrwert der Dissoziationskonstante. In dieser Arbeit werden beide Begriffe verwendet.

5 Freie Enthalpie der Ligandenbindung

$$P(N) = \frac{N}{N + NL} = \frac{1}{1 + \frac{L}{K^N}} \quad (5.1)$$

$$P(NL) = \frac{NL}{N + NL} = \frac{\frac{L}{K^N}}{1 + \frac{L}{K^N}} \quad (5.2)$$

$$P(TS) = \frac{TS}{TS + TSL} = \frac{1}{1 + \frac{L}{K^{TS}}} \quad (5.3)$$

$$P(TSL) = \frac{TSL}{TS + TSL} = \frac{\frac{L}{K^{TS}}}{1 + \frac{L}{K^{TS}}} \quad (5.4)$$

$$P(U) = \frac{U}{U + UL} = \frac{1}{1 + \frac{L}{K^U}} \quad (5.5)$$

$$P(UL) = \frac{UL}{U + UL} = \frac{\frac{L}{K^U}}{1 + \frac{L}{K^U}} \quad (5.6)$$

In der in Abb. 5.1 B dargestellten Energielandschaft gilt $K^N < K^{TS} < K^U$. Damit sinkt durch Ligandenbindung die Entfaltungsrate, während sich die Faltungsrate erhöht. Der Zusammenhang zwischen den ligandenfreien Raten $k^{L=0}$ und den Raten im ligandenbindenden Fall k^L ist damit

$$k_u^L = k_u^{L=0} \cdot e^{-\frac{\Delta G_N^L - \Delta G_{TS}^L}{k_B T}} \quad (5.7)$$

$$k_f^L = k_f^{L=0} \cdot e^{-\frac{\Delta G_U^L - \Delta G_{TS}^L}{k_B T}} \quad (5.8)$$

Wir nehmen nun an, dass das Überqueren der Energiebarriere schnell im Vergleich zur Kinetik des Ligandenaustauschs ist, dass also während des Faltungs- und Entfaltungsprozesses keine Ligandenbindung und -entbindung auftritt. Die effektive Entfaltungsrate [29, 8] bei einer Ligandenkonzentration L berechnet sich dann als

$$\begin{aligned} k_u(L) &= P(N) \cdot k_u^{L=0} + P(NL) \cdot k_u^L \\ &= \frac{1}{1 + \frac{L}{K^N}} \cdot k_u^{L=0} + \frac{\frac{L}{K^N}}{1 + \frac{L}{K^N}} \cdot k_u^{L=0} \cdot e^{-\frac{\Delta G_N^L - \Delta G_{TS}^L}{k_B T}} \\ &= k_u^{L=0} \cdot \frac{1 + \frac{L}{K^N} \cdot \frac{K^N}{K^{TS}}}{1 + \frac{L}{K^N}} \\ &= k_u^{L=0} \cdot \frac{1 + \frac{L}{K^{TS}}}{1 + \frac{L}{K^N}} \end{aligned} \quad (5.9)$$

und entsprechend erhält man für die effektive Faltungsrate

$$k_f(L) = P(U) \cdot k_f^{L=0} + P(UL) \cdot k_f^L = k_f^{L=0} \cdot \frac{1 + \frac{L}{K^{TS}}}{1 + \frac{L}{K^U}} \quad (5.10)$$

Die Änderung der Barrierenhöhe durch Ligandenbindung ist somit unter der Annahme, dass sich der präexponentielle Faktor nicht verändert, gegeben durch

$$\frac{\Delta G_{N-TS}^L(L)}{k_B T} = -\ln \left(\frac{k_u(L)}{k_u^{L=0}} \right) = \ln \frac{1 + \frac{L}{K^N}}{1 + \frac{L}{K^{TS}}} \quad (5.11)$$

$$\frac{\Delta G_{U-TS}^L(L)}{k_B T} = -\ln \left(\frac{k_f(L)}{k_f^{L=0}} \right) = \ln \frac{1 + \frac{L}{K^U}}{1 + \frac{L}{K^{TS}}} \quad (5.12)$$

Die zusätzliche freie Enthalpie der Proteinfaltung durch Ligandenbindung ergibt sich daraus unmittelbar zu

$$\frac{\Delta G_{N-U}^L(L)}{k_B T} = \ln \frac{k_f(L)}{k_u(L)} = \ln \frac{1 + \frac{L}{K^N}}{1 + \frac{L}{K^U}} \quad (5.13)$$

Hier wurde angenommen, dass während der Überquerung von TS bzw. TSL keine Ligandenbindung oder -entbindung stattfinden kann. Es zeigt sich allerdings, dass Gl. 5.11, 5.12 und 5.13 unverändert gelten, wenn auch für TS/TSL ein schneller Ligandenaustausch angenommen wird [8]. Die Gleichung 5.13 wurde hier über k_u und k_f hergeleitet, was stark an der vorliegenden experimentellen Situation orientiert ist, bei der einzelne Faltungs- und Entfaltungsübergänge beobachtet werden. Selbstverständlich lässt sich die Gleichung auch in einem Ensemble-Bild ableiten, ohne dass dazu explizit die Übergangsraten berücksichtigt werden, siehe Anhang B. Im Ensemble-Bild fällt die Verallgemeinerung auf den Fall der Bindung mehrerer Liganden pro Protein leichter. Für die Bindung von Ca^{2+} -Ionen (zwei Liganden pro Calmodulin-Domäne) erhalten wir mit den Dissoziationskonstanten $K_1^N = \frac{N \cdot L}{NL}$, $K_2^N = \frac{NL \cdot L}{NL^2}$, $K_1^U = \frac{U \cdot L}{UL}$ und $K_2^U = \frac{UL \cdot L}{UL^2}$

$$P(NL^2) = \frac{\frac{L^2}{K_2^N K_1^N}}{\frac{L^2}{K_2^N K_1^N} + \frac{L}{K_1^N} + 1} \quad (5.14)$$

$$P(UL^2) = \frac{\frac{L^2}{K_2^U K_1^U}}{\frac{L^2}{K_2^U K_1^U} + \frac{L}{K_1^U} + 1} \quad (5.15)$$

$$\frac{\Delta G_{N-U}^L(L)}{k_B T} = \ln \left(\frac{\frac{L^2}{K_2^N K_1^N} + \frac{L}{K_1^N} + 1}{\frac{L^2}{K_2^U K_1^U} + \frac{L}{K_1^U} + 1} \right) \quad (5.16)$$

In Abb. 5.2 sind der Anteil an ligandengesättigtem Protein (Gl. 5.2, 5.6, 5.14 und 5.15) sowie die zusätzliche freie Enthalpie der Proteinfaltung durch Ligandenbindung (Gl. 5.13 und 5.16) für einen bindenden Liganden (A und B) sowie für zwei bindende Liganden (C und D) dargestellt. Wie in Abb. 5.2 A zu sehen ist, entspricht die Dissoziationskonstante bei einer Stöchiometrie von 1:1 (nur ein Ligand bindet an das Protein) der Ligandenkonzentration, bei der das Protein zu 50 % Prozent in ligandenbindender Form vorliegt. In Abb. 5.2 B entsprechen die Dissoziationskonstanten K^N und K^U Knickpunkten in der Ligandenabhängigkeit der freien Enthalpie: Nur bei Konzentrationen zwischen K^N und K^U führt eine Erhöhung der Ligandenkonzentration zu einer zunehmenden Stabilisierung des Proteins. Während bei Konzentrationen unterhalb von K^N kein nennenswerter Anteil des Proteins in ligandenbindender Form vorliegt, sind oberhalb von K^U sowohl der native als auch der entfaltete Zustand komplett ligandengesättigt, so dass sich auch bei einer weiteren Erhöhung der Konzentration keine zusätzliche energetische Stabilisierung mehr erreichen

5 Freie Enthalpie der Ligandenbindung

lässt². Im Konzentrationsbereich zwischen K^N und K^U steigt ΔG_{N-U}^L logarithmisch mit der Ligandenkonzentration an.

Da Gl. 5.11 und 5.12 mathematisch die gleiche Form wie Gl. 5.13 haben, lässt sich diese Diskussion unmittelbar auf die Faltungs- und Entfaltungsrates übertragen. Wird die Ligandenkonzentration ausgehend von Null erhöht, so sinkt zunächst bei Konzentrationen zwischen K^N und K^{TS} die Entfaltungsrates k_u , während zwischen K^{TS} und K^U die Faltungsrates k_f ansteigt. In den Konzentrationsbereichen $L < K^N$ und $L > K^U$ hat eine Änderung der Ligandenkonzentration keinen Einfluss auf die Übergangsrates. Die Ligandenabhängigkeit von Faltungs- und Entfaltungsrates wird in Abschnitt 6.2 und 6.3 anhand experimentell beobachteter Effekte eingehend diskutiert.

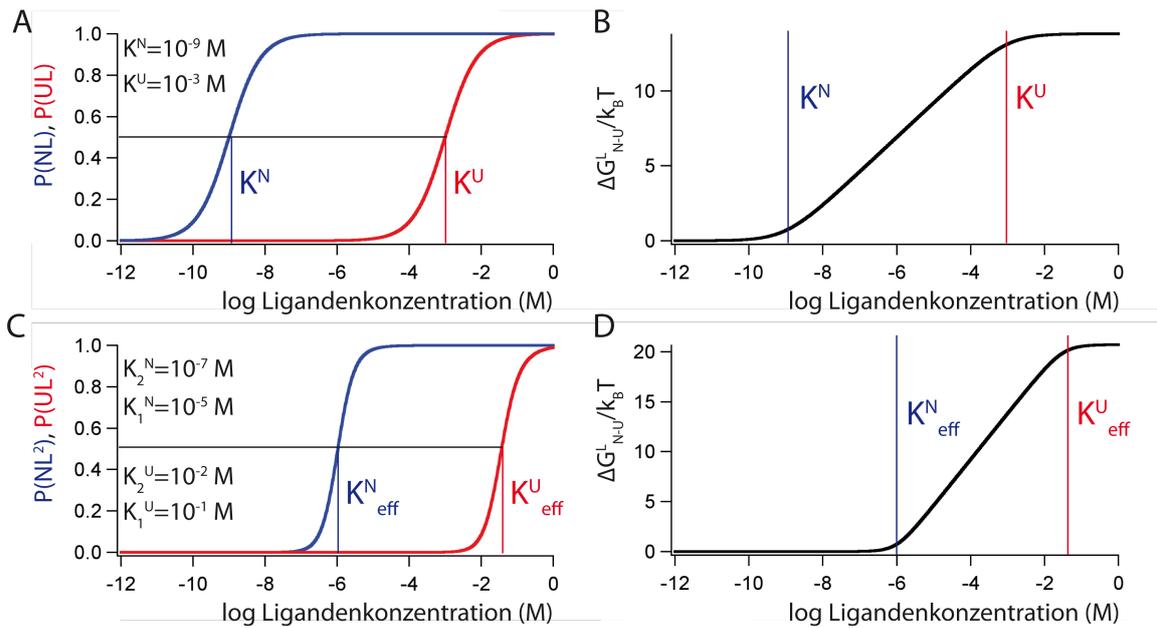


Abbildung 5.2: Zusätzliche freie Enthalpie durch Ligandenbindung. A. Anteil an ligandengesättigtem Protein in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration für den Fall, dass nur ein Ligand pro Proteinmolekül bindet (Stöchiometrie 1:1). B. Zusätzliche freie Enthalpie durch Ligandenbindung als Funktion der Ligandenkonzentration für eine 1:1 Stöchiometrie. C. Anteil an ligandengesättigtem Protein in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration für den Fall, dass zwei Liganden pro Proteinmolekül binden (Stöchiometrie 2:1). D. Zusätzliche freie Enthalpie durch Ligandenbindung als Funktion der Ligandenkonzentration für eine 2:1 Stöchiometrie.

Im Falle einer Stöchiometrie von 2:1 (zwei Liganden binden an ein Protein-Molekül) lässt sich, bedingt durch das Vorhandensein zweier Dissoziationskonstanten für jede Konformation, keine anschauliche Interpretation der Dissoziationskonstante à la $P(NL)$ ($L = K^N$) = 0,5 mehr angeben. Stattdessen lassen sich effektive Dissoziationskonstanten K_{eff}^N und K_{eff}^U definieren, die wieder den Ligandenkonzentrationen entsprechen, bei der das Protein zu 50 % Prozent in ligandenbindender Form vorliegt (Abb. 5.2 C). Für diese effektiven Dissoziationskonstanten hat auch die Interpretation als Knickpunkte im Graph für die Ligandenabhängigkeit der zusätzlichen freien Enthalpie Bestand (Abb. 5.2 D). In Abb. 5.2 B+D ist zu erkennen, dass im Falle von zwei bindenden Liganden ΔG_{N-U}^L

²In vielen Fällen wird die Ligandenaffinität des entfaltenen Zustands so gering sein, dass der Konzentrationsbereich in dem der Zustand U ligandengesättigt ist, experimentell nicht zugänglich ist.

im auf Konzentrationsänderungen sensitiven Bereich doppelt so stark steigt wie bei nur einem bindenden Liganden.

Mit Gl. 5.13 und 5.16 lässt sich nun für Calmodulin die zusätzliche freie Enthalpie der Proteinfaltung in Anwesenheit von Ca^{2+} (2 Ionen pro Domäne) und Peptidliganden (1 Ligand pro Molekül) aus den entsprechenden Affinitäten (siehe auch Kapitel 4) berechnen. Bei unter Gleichgewichtsbedingungen gemessenen Kraft-Abstands-Kurven entspricht die durch zwei aufeinanderfolgende WLC-Kurven und die Gleichgewichtsübergänge umschlossene Fläche der gesamten freien Enthalpie der Proteinfaltung (siehe auch Abschnitt 3.2 und 3.3). Für die in Kapitel 6 gezeigten Kraft-Abstands-Kurven zeigt sich durch eine Abschätzung dieser Flächen, dass die Ligandenaffinitäten von Calmodulin im hier verwendeten Protein-konstrukt im Rahmen der Messgenauigkeit mit veröffentlichten Werten übereinstimmen.

6 Faltung und Entfaltung von Calmodulin unter Kraft

In diesem Abschnitt soll die Faltung von Calmodulin untersucht werden. Wie sich zeigen wird, ist in Anwesenheit von Ca^{2+} die Faltungsrate von Calmodulin sehr hoch, während die Entfaltungsrate vergleichsweise niedrig ist. Unter Kraft kann nun die Faltungsrate verlangsamt werden, während die Entfaltung beschleunigt wird. Dadurch können Faltungs- und Entfaltungsübergänge auf einer Zeitskala von Sekunden bzw. Sekundenbruchteilen auf Einzelmolekülebene beobachtet werden. Insbesondere wird es dadurch möglich, die Abhängigkeit der Faltungs- und Entfaltungsrate von Calmodulin von seinen Liganden zu untersuchen. Dies erlaubt es, die Kopplung von Ca^{2+} -Bindung und Proteinfaltung zu untersuchen und unterschiedliche Bindungsmodi für zwei verschiedene Target-Peptide zu identifizieren [43].

Zur Untersuchung von Calmodulin im Kraftmikroskop wurde in dieser Arbeit das in Abb. 6.1 A gezeigte Proteinkonstrukt verwendet, bei dem Calmodulin zwischen die Domänen 3 und 4 von *Dictyostelium discoideum* Filamin 1-5 kloniert wurde (siehe Anhang A.6). Das bekannte Entfaltungsmuster von Filamin 1-5 wurde als Marker für korrekte Einzelmolekülereignisse vorausgesetzt [76].

6.1 Faltungs- und Entfaltungs-Übergänge von Calmodulin im Gleichgewicht

In Abb. 6.1 B unten ist eine Kraft-Abstandskurve von Calmodulin gezeigt, die bei einer Ziehgeschwindigkeit von 1 nm/s und 10 mM Ca^{2+} aufgenommen wurde. Es sind deutlich zwei Peaks zu erkennen, die sich als Entfaltungsübergänge der beiden Domänen von Calmodulin interpretieren lassen. Da beide Domänen in der Struktur durch einen ca. 15 Aminosäuren langen α -helikalen Linker deutlich voneinander getrennt sind, ist es nicht verwunderlich, dass sie getrennt voneinander entfalten. Um die beiden homologen Domänen von Calmodulin unterscheiden zu können, wurde für diese Messung eine Disulfidbrücke zwischen den Aminosäurepositionen 128 und 144 eingeführt (CaM 128x144), um den Konturlängenzuwachs der C-terminalen Domäne um die Anzahl der überbrückten Aminosäurereste zu verkürzen (siehe auch Gl. 3.2 und Abb. 6.2 C) [5]. Daraus ergibt sich unmittelbar, dass im ersten Entfaltungsschritt, $\Delta L_I = 25,7 \pm 1,4 \text{ nm}$, die N-terminale Domäne (DomN) entfaltet, während $\Delta L_{II} = 17,9 \pm 1,7 \text{ nm}$ der C-terminalen Domäne (DomC) entspricht¹. Diese Längenzuwächse sind in guter Übereinstimmung mit den nach Gl. 3.2 erwarteten Werten.

$$\Delta L_{\text{DomN}} = 0,365 \cdot 75 - 3,4 + 1,0 = 25,0 \text{ nm} \quad (6.1)$$

$$\Delta L_{\text{DomC}} = 0,365 \cdot 54 - 1,0 = 18,7 \text{ nm} \quad (6.2)$$

Die Abstände zwischen N- und C-Terminus (d_{folded} in Gl. 3.2) wurden dabei aus der Kristallstruktur von Ca^{2+} -gesättigtem Calmodulin (PDB-ID 1CLL) [17] als Abstände zwischen den C_α -Atomen der jeweiligen Aminosäurereste bestimmt. Für beide Entfaltungspeaks in Abb. 6.1 B unten sind deutlich zahlreiche Übergänge zwischen beiden Kraftniveaus

¹Längenhistogramme sind in Abb. 6.2 A+B gezeigt. Zur Verbesserung der Längenauflösung wurden dort Daten analysiert, die in Anwesenheit des Target-Peptids Mastoparan gemessen wurden (Abschnitt 6.2).

6 Faltung und Entfaltung von Calmodulin unter Kraft

zu erkennen. Der obere Level entspricht jeweils dem gefalteten Zustand, der untere dem entfalteten Zustand. Es können hier erstmalig mit dieser Methode mechanisch induzierte Gleichgewichtsübergänge eines Proteins zwischen dem gefalteten und dem entfalteten Zustand beobachtet werden. Insbesondere aus den Kraft-Zeit-Kurven der Übergangsregionen (Abb. 6.1 B oben) geht klar hervor, dass es für keine der beiden Domänen stabile Intermediate gibt, so dass das in Abschnitt 3.3 vorgestellte Zwei-Zustands-Modell die vorliegende experimentelle Situation gut beschreibt. Es ist weiterhin hervorzuheben, dass zur Beobachtung der Gleichgewichtsübergänge von Calmodulin sehr langsame Ziehgeschwindigkeiten von 1 nm/s notwendig sind. Dies ist einerseits nötig, um die Kraftauflösung so weit zu erhöhen, dass die bei vergleichsweise niedrigen Kräften stattfindenden Entfaltungsereignisse von Calmodulin aufgelöst werden können (siehe Anhang A.3). Andererseits wird dadurch auch die experimentelle Beobachtungsdauer so weit verlängert, dass die vergleichsweise langsamen Rückfaltungsereignisse detektiert werden können (siehe auch Abschnitt 3.3).

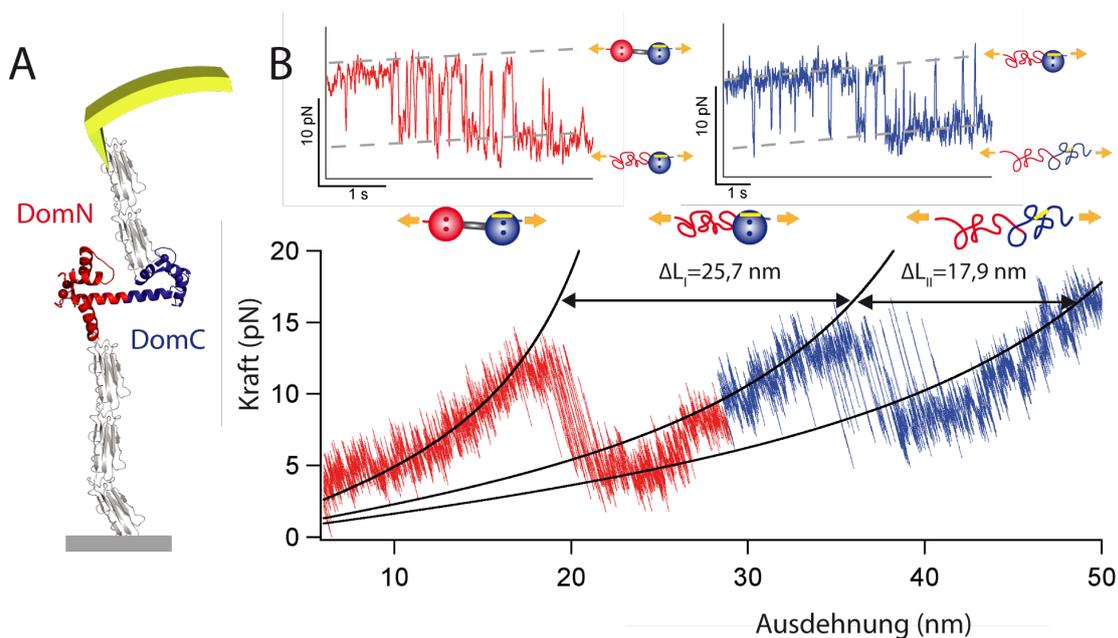


Abbildung 6.1: A. Verwendetes Proteinkonstrukt. Calmodulin (N-terminale Domäne: rot, C-terminale Domäne: blau) ist zwischen die Domänen 3 und 4 von *Dictyostelium discoideum*-Filamin eingefügt (grau). B. unten. Kraft-Abstands-Kurve von Calmodulin 128x144 bei einer Ziehgeschwindigkeit von 1 nm/s (10 mM Ca^{2+} , keine Peptidliganden hinzugefügt). Beide Domänen von Calmodulin entfalten getrennt voneinander. WLC-Fits an die Kurve sind in schwarz gezeigt. Kraft-Zeit Kurven der beiden Peaks sind als Zoom oberhalb der Kraft-Abstands-Kurve abgebildet. Es ist deutlich zu erkennen, dass für beide Peaks Gleichgewichtsübergänge zwischen dem oberen, gefalteten Zustand und dem unteren, entfalteten Zustand stattfinden. Schemazeichnungen illustrieren die strukturelle Interpretation der einzelnen Zustände.

Um die Interpretation der zwei Entfaltungsereignisse von Calmodulin als voneinander unabhängige Entfaltungsübergänge der beiden Domänen zu bestätigen, wurden Einzeldomänenkonstrukte von Calmodulin erstellt. Dabei wurde aus dem in Abb. 6.1 A gezeigten Proteinkonstrukt entweder die N-terminale Domäne oder die C-terminale Domäne mit molekularbiologischen Methoden entfernt (Anhang A.6 und A.7). Kraft-Zeit-Daten der isolierten N- und C-terminalen Domänen von Calmodulin sind in Abb. 6.3 abgebildet. Wie deutlich zu erkennen ist, zeigen die isolierten Domänen das gleiche

6.1 Faltungs- und Entfaltungs-Übergänge von Calmodulin im Gleichgewicht

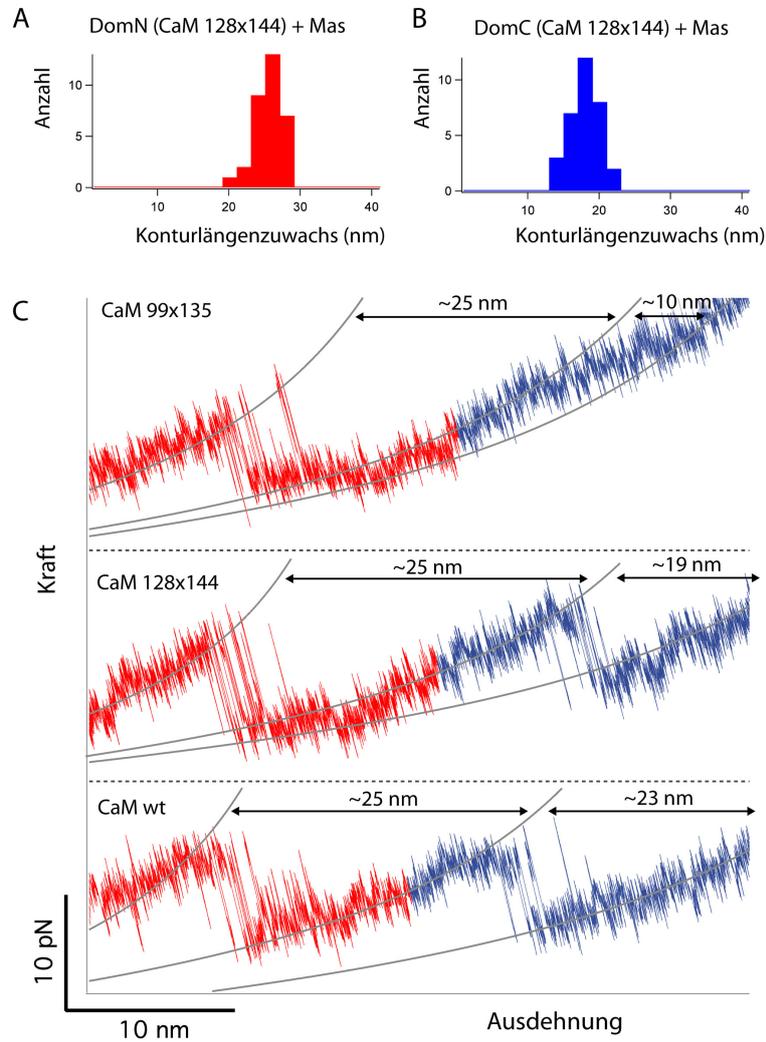


Abbildung 6.2: A+B. Konturlängenhistogramme von CaM 128x144 bei 10 mM Ca^{2+} und 100 μM Mastoparan. Die mittleren Konturlängenzuwächse sind A. $\Delta L_{\text{DomN}} = 25,7 \pm 1,4 \text{ nm}$ und B. $\Delta L_{\text{DomC}} = 17,9 \pm 1,7 \text{ nm}$. Die Fehler setzen sich zusammen aus dem Standardfehler des Mittelwerts zuzüglich eines systematischen Fehlers von 1,0 nm. C. Kraft-Abstands-Kurven von CaM mit verschiedenen Crosslinks in DomC bei 10 mM CaCl_2 , 10 μM Mastoparan. In CaM 128x144 ist das zweite Entfaltungsereignis gegenüber dem Wildtyp (CaM wt) deutlich verkürzt. Bei dem radikalen Crosslink CaM 99x135 ist durch die starke Verkürzung kein deutliches Entfaltungsereignis von DomC mehr auflösbar.

6 Faltung und Entfaltung von Calmodulin unter Kraft

Faltungs-/Entfaltungsverhalten wie ihre Gegenstücke im vollständigen Calmodulin². Es lässt sich also im Rahmen der hier vorliegenden Genauigkeit und in Übereinstimmung mit der Literatur keine gegenseitige Beeinflussung der beiden Domänen in ihrem Faltungs- und Entfaltungsverhalten feststellen [56].

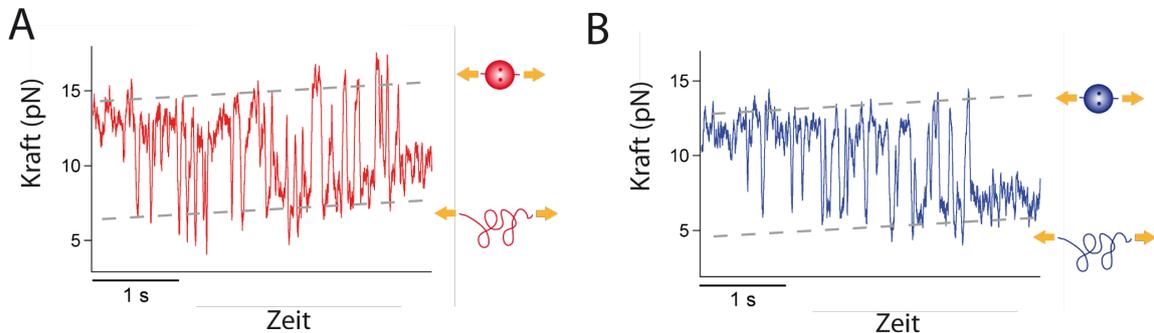


Abbildung 6.3: Kraft-Zeit-Kurven der Einzeldomänen von Calmodulin (A. DomN, B. DomC), 10 mM Ca^{2+} . Die isolierten Domänen zeigen das gleiche Faltungs-/Entfaltungsverhalten wie ihre Gegenstücke im vollständigen Calmodulin.

Da sich bei Einzeldomänen-Konstrukten nun jegliche Durchmischung der Gleichgewichtsübergänge beider Domänen mit Sicherheit ausschließen lässt, sind die isolierten Domänen besonders gut für eine quantitative Analyse geeignet. Im nächsten Schritt sollen die Null-Kraft-Faltungs- und -Entfaltungs-Raten von DomC bestimmt werden. Zu diesem Zweck wird zunächst die charakteristische Übergangsrate der Gleichgewichtsübergänge bestimmt. Dazu werden integrierte Histogramme der Lebensdauern des gefalteten und des ungefalteten Zustands aus der Übergangsregion der Kurven erstellt. Werden diese Histogramme mit einer Exponentialfunktion gefittet, so erhält man die Entfaltungs- und die Faltungsrate unter Gleichgewichtsbedingungen (Abb. 6.4 A). Im Gleichgewicht sollten diese beiden Raten gleich sein, durch experimentelle Einschränkungen (insbesondere durch die Tatsache, dass die Kraft nicht konstant gehalten wird, sondern während der Aufnahme einer Kurve ansteigt), kann es jedoch zu leichten Unterschieden zwischen den so ermittelten Faltungs- und Entfaltungsraten kommen. In dieser Arbeit wird daher stets der Mittelwert beider Raten als charakteristische Übergangsrate bezeichnet. Für DomC bei 10 mM CaCl_2 findet man auf diese Weise eine Übergangsrate von $12,4 \text{ s}^{-1}$ und eine mittlere Entfaltungskraft von $12,1 \text{ pN}$.

Reproduziert man die experimentellen Daten durch Monte-Carlo-Simulationen (Anhang A.5), so erhält man Zugang zu Parametern wie der Potentialbreite Δx_{N-TS} und der Faltungs- und Entfaltungsrate im kraftfreien Fall, k_f und k_u . Die unter Kraft gemessenen Faltungs- und Entfaltungsraten lassen sich so also auf Null-Kraft extrapolieren. Als Kontrolle wurden die Potentialbreite Δx_{N-TS} und die Nullkraft-Entfaltungsrate k_u in einem unabhängigen Experiment durch Messen der Ziehgeschwindigkeits-Abhängigkeit der Entfaltungskraft unter Nichtgleichgewichtsbedingungen bestimmt (Abb. 6.4 B). Diese hängt von der Potentialbreite ab [27, 67], so dass sich Δx_{N-TS} und k_u mit hoher Präzision durch Vergleich dieser Daten mit Monte-Carlo Simulationen ergeben. Nun wurde die

²Eine detaillierte Analyse zeigt, dass die Übergänge von DomC im gecrosslinkten CaM 128x144 etwas schneller sind als in der isolierten DomC. Dies ist eine direkte Konsequenz der verkürzten Konturlänge ΔL , die nach dem in Abschnitt 3.3 vorgestellten Modell zu einer höheren Faltungsrate unter Kraft führt. Dieser Effekt wird auch in Anhang A.4 diskutiert.

6.1 Faltungs- und Entfaltungs-Übergänge von Calmodulin im Gleichgewicht

Nullkraft-Faltungsrate k_f , die als einziger freier Parameter verbleibt³, so angepasst, dass die simulierten Daten die experimentellen Ergebnisse optimal reproduzieren.

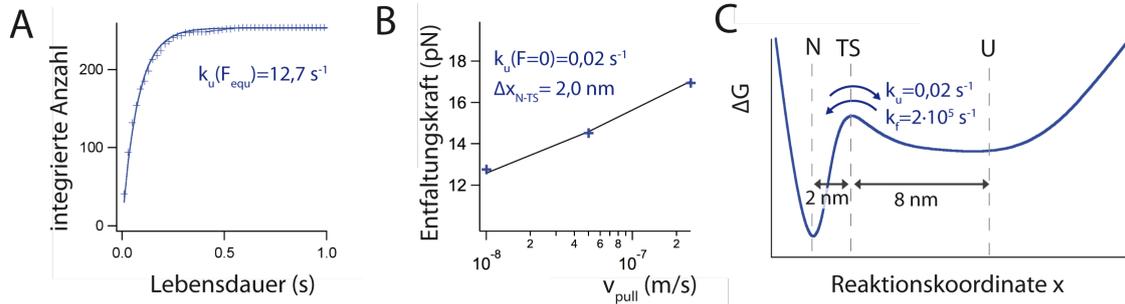


Abbildung 6.4: A. Integriertes Histogramm der Lebensdauern von DomC im gefalteten Zustand (blaue Kreuze) bei 10 mM Ca^{2+} und angefitzte Exponentialfunktion (blaue Linie) zur Bestimmung der Entfaltungsrate. Die charakteristische Übergangsrate ergibt sich aus dem Mittelwert dieser Entfaltungsrate und der ebenso bestimmten Faltungsrate. B. Mittlere Entfaltungskräfte von DomC bei verschiedenen Zieh-Geschwindigkeiten (blaue Kreuze) bei 10 mM Ca^{2+} unter Nichtgleichgewichtsbedingungen. Monte-Carlo-Simulationen (schwarz) erlauben eine unabhängige Bestimmung der Potentialbreite Δx_{N-TS} und der Nullkraft-Entfaltungsrate k_u . C. Schematische Faltungs-Energielandschaft von DomC. Die Faltungsrate von $k_f = 2 \cdot 10^5 / \text{s}$ macht CaM zu einem der schnellstfaltenden bekannten Proteine.

In Abb. 6.4 C sind die auf diese Art bestimmten Werte für Raten und Potentialbreite der isolierten C-terminalen Domäne von Calmodulin bei 10 mM Ca^{2+} gezeigt. Die Potentialbreite $\Delta x_{N-TS} = 2 \text{ nm}$ liegt im Bereich üblicher Werte für ein α -helikales Protein [47]. Die Faltungsrate von $k_f = 2 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ dagegen macht Calmodulin unter diesen Ligandenbedingungen zu einem der am schnellsten faltenden bekannten Proteine [58]. Doch ist dieser Wert realistisch? Schließlich wurde diese Faltungsrate hier nicht direkt gemessen, sondern lediglich zu Null-Kraft extrapoliert. Es gibt aber in der Tat einige Hinweise, die das Ergebnis der Extrapolation stützen: Für apo-DomC wurde in einem Temperatursprung-Experiment bereits eine recht hohe Faltungsrate von 5000 s^{-1} gemessen [64]; die im nächsten Kapitel vorgestellten Ergebnisse zeigen zudem, dass sich die Faltungsrate durch Zugabe von Ca^{2+} weiter erhöht. Darüber hinaus lässt sich die gesamte freie Enthalpie des Proteins ΔG als Kontrolle für die Extrapolation heranziehen. Wir finden hier $\frac{\Delta G}{k_B T} = \ln \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}} = 16,1$. Dies ist in guter Übereinstimmung mit Literaturwerten für ΔG [56] und mit dem aus der eingeschlossenen Fläche zwischen den beiden aufeinanderfolgenden WLC-Kurven berechneten Wert für die freie Enthalpie von DomC. Auch dies spricht dafür, dass die Extrapolation zumindest im Rahmen einer Größenordnung korrekt ist.

Zu der in Abb. 6.4 C dargestellten Energielandschaft soll angemerkt werden, dass Details der Energiebarriere experimentell nicht zugänglich ist. Wir messen hier lediglich die Abstände zwischen den Zuständen N, TS und U entlang der Reaktionskoordinate. Darüber hinaus lassen sich k_u und k_f im Prinzip nach $k_u = k_u^0 \cdot e^{-\frac{\Delta G_{N-TS}}{k_B T}}$ und $k_f = k_f^0 \cdot e^{-\frac{\Delta G_{U-TS}}{k_B T}}$ in eine Barrierenhöhe umrechnen, wenn man einen Wert für den Vorfaktor k_u^0 bzw. k_f^0 annimmt. Die genaue Form der Energiebarriere, also ob beispielsweise der Übergangszustand

³Die Potentialbreite für die Rückfaltung, Δx_{TS-U} ist kein freier Parameter, da wir hier die reale Ausdehnung des entfalteten Polypeptids unter der anliegenden Kraft, abzüglich der Länge des Proteins im Übergangszustand TS, als Potentialbreite verwenden (siehe auch Abschnitt 3.3)

ein breites oder ein schmales Maximum der Energielandschaft darstellt, lässt sich so nicht bestimmen.

Diskussion

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass erstmals mechanisch induzierte Faltungs-/Entfaltungs-Übergänge eines Proteins vom vollständig gefalteten zum vollständig entfalteten Protein im thermodynamischen Gleichgewicht aufgelöst werden konnten. Grundlage dafür war, neben der Wahl des schnell faltenden Proteins Calmodulin als Untersuchungsobjekt, vor allem die erhöhte Stabilität des AFM-Aufbaus, der nun Messungen bei sehr niedrigen Ziehgeschwindigkeiten ermöglicht⁴. Dadurch konnte einerseits die Kraftauflösung verbessert werden, andererseits ermöglichen längere Beobachtungsdauern nun auch die Detektion seltener Ereignisse wie beispielsweise Proteinfaltung unter Kraft. Es soll betont werden, dass bei den hier beschriebenen Gleichgewichtsübergängen das Gesamtsystem aus Protein und Cantilever im thermodynamischen Gleichgewicht bezüglich der zwei Zustände N und U ist. Die Cantilever-Relaxation nach einer Entfaltung führt dazu, dass die Rückfaltung bei wesentlich niedrigeren Kräften als die Entfaltung stattfindet.

In den hier vorgestellten Daten konnte Calmodulin bei 10 mM Ca^{2+} als eines der schnellstfaltenden bislang bekannten Proteine identifiziert werden. Durch Anlegen von Kraft können die Faltungs-/Entfaltungsübergänge von Calmodulin auf einer gut auflösbaren Zeitskala im oberen Millisekundenbereich aufgelöst werden, während im kraftfreien Fall die extrem schnelle Faltungskinetik von Calmodulin bei gleichzeitig vergleichsweise langsamer Entfaltung die Detektion von Faltungsereignissen erschwert. Dies zeigt sehr deutlich den wesentlichen Vorteil der vorgestellten Methode, dass sich durch Anlegen von Kraft Kinetiken in kontrollierter Weise beeinflussen lassen. Nach Gl. 5.13 und 5.16 erhöht sich ΔG bei Konzentrationen zwischen K^N und K^U logarithmisch mit der Konzentration. Aus diesem Grunde wurden in dieser Arbeit relativ hohe Ligandenkonzentrationen verwendet (hier beispielsweise 10 mM CaCl_2), um durch eine energetische Stabilisierung des Proteins das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Messkurven zu verbessern und somit die Datenanalyse zu vereinfachen.

Die in diesem Kapitel verwendete Auswertemethode, bei der die Gleichgewichtsübergänge durch die mittlere Entfaltungskraft und eine mittlere Übergangsrate charakterisiert werden, ist im Prinzip nicht ideal, da Übergangskinetiken bei verschiedenen Kräften vermischt werden. In den Daten, beispielsweise in Abb. 6.3, ist aber deutlich zu erkennen, dass sich die Entfaltungsrate innerhalb des Kraftbereichs, in dem Gleichgewichtsübergänge beobachtet werden können, mit leicht steigenden Kräften deutlich erhöht, während die Faltungsrate stark sinkt. Bei niedrigeren Kräften sind die Lebensdauern im gefalteten Zustand deutlich länger als im entfalteten Zustand, während sich bei nur 1-2 pN höheren Kräften die Verhältnisse bereits umgekehrt haben. Wünschenswert wäre es daher, zu jeder Lebensdauer die zugehörige Kraft einzeln zu bestimmen und damit die Faltungs- und Entfaltungskinetik bei verschiedenen Kräften getrennt zu analysieren. Um das Experiment weiter zu optimieren, könnte anstelle der hier verwendeten leichten Kraframpe auch die Faltungs- und Entfaltungskinetik bei verschiedenen konstanten Kräften nahe am Gleichgewicht untersucht werden. Durch die beschränkte Kraftauflösung des Experiments (z.B.

⁴In früheren Arbeiten zur mechanischen Entfaltung einzelner Calmodulin-Moleküle konnte das Entfaltungsmuster von Calmodulin durch zu geringe Kraftauflösung [15] und durch Mängel in der Gestaltung des Experiments [40,35] nicht gefunden werden.

durch Drift im Detektionssignal) ist eine solche detaillierte Analyse allerdings im Moment nicht möglich. Durch Verwendung von optischen Pinzetten wird sich die Kraftauflösung in Zukunft allerdings weiter verbessern lassen, so dass die hier vorgeschlagene Erweiterung der Datenanalyse möglich werden wird. Durch Erstellen von Positionshistogrammen auch für den Übergangsbereich zwischen den beiden Zuständen wäre es dann insbesondere auch denkbar, die Energielandschaft für die Faltung von Calmodulin direkt und ohne Verwendung eines anderweitig bestimmten Vorfaktors für die Übergangsraten zu berechnen [87].

Die hier vorgestellte Methode erlaubt also keine Datenanalyse mit optimaler Genauigkeit. Dafür liegt die große Stärke der Technik in einem vergleichsweise einfachen und zuverlässigen experimentellen Aufbau, der es ermöglicht, mit überschaubarem Aufwand eine Vielzahl an Proteinkonstrukten und Ligandenbedingungen zu untersuchen. Dementsprechend wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit ein Schwerpunkt auf Experimente gelegt, die deutlich messbare relative Effekte liefern, während auf detailliertere Untersuchungen der Energielandschaft und exaktere Extrapolationen zu Nullkraft-Raten zugunsten geplanter zukünftiger Experimente mit optischen Pinzetten verzichtet wurde.

6.2 Kopplung von Ligandenbindung und Faltung/Entfaltung

Die extrapolierte Null-Kraft-Faltungsrate von DomC bei 10 mM Ca^{2+} ist ungefähr um einen Faktor 50 größer als die in einem Temperatursprung-Experiment ermittelte Faltungsrate der Ca^{2+} -freien C-terminalen Domäne [64]. Um zu klären, ob sich dieser Unterschied auf die Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen in der Pufferlösung zurückführen lässt, sind nun Messungen bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen nötig. Um die Ligandenabhängigkeit der Faltung und Entfaltung von Calmodulin noch detaillierter zu untersuchen, wurde zudem auch das CaM-bindende Peptid Mastoparan (Tab. 4.1) in verschiedenen Konzentration zu der untersuchten Calmodulin-Lösung hinzugegeben. Als Modellsystem wurde zunächst wiederum die isolierte C-terminale Domäne von Calmodulin gewählt.

Wie in Abb. 6.5 A deutlich zu erkennen ist, sinkt mit steigender Mastoparan-Konzentration die Übergangsrate von DomC erheblich. Für eine Variation der Ca^{2+} -Konzentration finden wir dagegen einen entgegengesetzten Effekt. Hier steigt die Übergangsrate bei erhöhter Konzentration an (Abb. 6.5 B). In Abb. 6.6 A und Abb. 6.6 C sind die charakteristischen Übergangsraten und die mittleren Entfaltungskräfte von DomC für die verschiedenen untersuchten Ligandenbedingungen abgebildet. Es ist festzustellen, dass die mittleren Entfaltungskräfte für beide Liganden ansteigen, im Gegensatz zur Übergangsrate zeigen für die Kräfte also Mastoparan und Ca^{2+} den gleichen Effekt. Doch wie lässt sich dieses unterschiedliche Verhalten verstehen?

Prinzipiell ist klar, dass Ligandenbindung zu einer thermodynamischen Stabilisierung des Proteins führt (siehe auch Kapitel 5). Doch grundsätzlich kann dies auf zwei Arten geschehen: Entweder durch Verringerung der Entfaltungsrate oder durch Erhöhung der Faltungsrate. Es stellt sich nun heraus, dass unter den gegebenen Bedingungen für Mastoparan ersteres der Fall ist, während für Ca^{2+} letzteres zutrifft. In Abb. 6.6 B ist links die Kraftabhängigkeit der Entfaltungsrate k_u und der Faltungsrate k_f gezeigt. Nehmen wir also an, dass sich bei einer Erhöhung der Mastoparan-Konzentration die Entfaltungsrate zu niedrigeren Werten verschiebt (von der dünnen grünen Linie zur dicken grünen Linie in Abb. 6.6 B links), während die Faltungsrate unverändert bleibt (violette Linie). Wie aus

6 Faltung und Entfaltung von Calmodulin unter Kraft

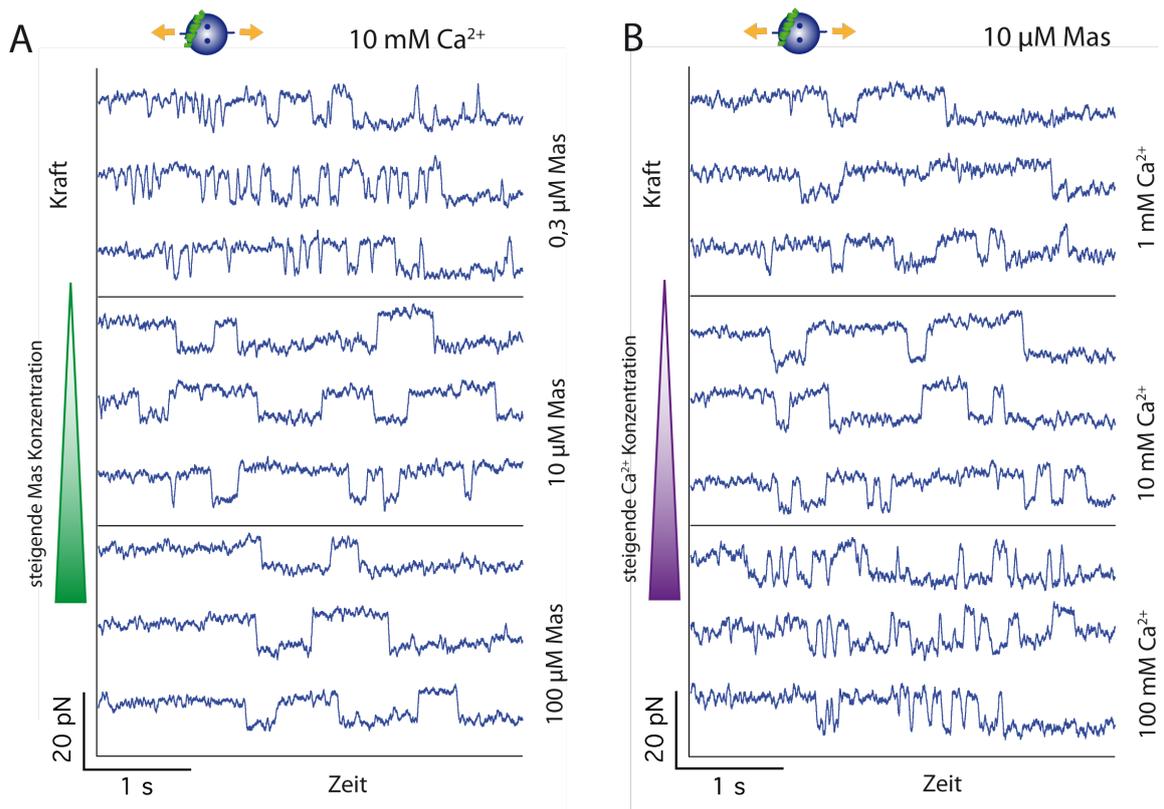


Abbildung 6.5: Kraft-Zeit-Kurven der C-terminalen Domäne von Calmodulin unter verschiedenen Ligandenbedingungen. A. Variation der Mastoparan-Konzentration. Es ist deutlich zu erkennen, dass mit steigender Konzentration die Übergangsrate sinkt. B. Variation der Ca^{2+} -Konzentration. Bei steigender Konzentration steigt die Übergangsrate.

der Abbildung unmittelbar ersichtlich ist, verschiebt sich dadurch der Schnittpunkt beider Raten, der Gleichgewichtsbedingungen definiert, zu höheren Kräften und zu niedrigeren Raten. Das ist genau die beobachtete experimentelle Situation. In Abb. 6.6 B rechts sind schematische Energielandschaften von DomC bei niedriger Mastoparan-Konzentration (dünne grüne Linie) und bei hoher Mastoparan-Konzentration (dicke grüne Linie) gezeichnet. Wenn Mastoparan nur auf die Entfaltungsrates wirkt, so bedeutet dies, dass der Übergangszustand bezüglich seiner Ligandenbindungseigenschaften dem entfalteten Zustand ähnelt, so dass sich durch eine Konzentrationsänderung des Liganden nur die Energiebarriere zwischen N und TS verändert.

Wenn umgekehrt eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration die Faltungsrate erhöht (dünne und dicke violette Linie in Abb. 6.6 D links) ohne die Entfaltungsrates (grüne Linie) zu verändern, so verschiebt sich dadurch der Schnittpunkt beider Raten zu höheren Kräften und zu höheren Raten. Dies entspricht wiederum der experimentell beobachteten Situation. Für die in Abb. 6.6 D rechts gezeigten Energielandschaften bedeutet dies, dass der Übergangszustand bezüglich seiner Ligandenbindungseigenschaften dem gefalteten Zustand ähnelt, so dass sich durch eine Konzentrationsänderung des Liganden nur die Energiebarriere zwischen TS und U verändert.

Um die Ligandeneffekte quantitativ zu modellieren, kann das in Kapitel 5 vorgestellte Modell verwendet werden. Das System wird dann durch die drei Zustände N, TS und U mit den Dissoziationskonstanten K^N , K^{TS} und K^U beschrieben. Die Veränderung der Faltungs- und Entfaltungsbarriere durch Ligandenbindung berechnet sich nach Gl. 5.11 und 5.12⁵:

$$\frac{\Delta G_{N-TS}^L}{k_B T} = \ln \left(\frac{1 + \frac{L}{K^N}}{1 + \frac{L}{K^{TS}}} \right)$$

$$\frac{\Delta G_{U-TS}^L}{k_B T} = \ln \left(\frac{1 + \frac{L}{K^U}}{1 + \frac{L}{K^{TS}}} \right)$$

Die Gleichungen 5.11 und 5.12 sind in Abb. 6.7 A gezeichnet. Im Konzentrationsbereich zwischen K^N und K^{TS} wirkt Ligandenbindung auf die Entfaltungsrates, bei Ligandenkonzentrationen zwischen K^{TS} und K^U beschleunigt eine Erhöhung der Konzentration die Faltung. Abgesehen von einem schmalen Übergangsbereich um K^{TS} herum sind beide Bereiche deutlich voneinander getrennt, so dass je nach vorliegender Konzentration eine Erhöhung der Ligandenkonzentration entweder k_u oder k_f beeinflusst. Bei den hier gezeigten Messreihen befinden wir uns also bei Mastoparan-Konzentrationen unterhalb K_{Mas}^{TS} und bei Ca^{2+} -Konzentrationen oberhalb von K_{Ca}^{TS} . Bei den in Abb. 6.6 B+D gezeigten Monte-Carlo-Simulationen wurde dieses Modell explizit in die Berechnung integriert. Im Rahmen der Messgenauigkeit kann das Modell die experimentellen Daten vollständig reproduzieren. Dabei wurden für die Dissoziationskonstanten des nativen Zustands von DomC zu Ca^{2+} (Kapitel 4) und Mastoparan [70, 52] Literaturwerte verwendet ($K_{Mas}^N = 3 \cdot 10^{-7}$ M für DomC), K^{TS} und K^U wurden als Fitparameter betrachtet. Die effektive Dissoziationskonstante des Übergangszustands für Ca^{2+} lässt sich aus der Simulation zu $< 1\text{mM}$ abschätzen. Es ist zu beachten, dass der Anstieg der mittleren Kraft mit zunehmender Konzentration für Ca^{2+} stärker als für Mastoparan ist. Dies spiegelt direkt die Tatsache wieder, dass Ca^{2+} mit Stöchiometrie 2:1 an DomC bindet, Mastoparan

⁵Diese Gleichungen gelten für eine Stöchiometrie von 1:1. Für eine Stöchiometrie von 2:1, wie im Fall der Ca^{2+} -Bindung, müssen die Gleichungen entsprechend modifiziert werden.

6 Faltung und Entfaltung von Calmodulin unter Kraft

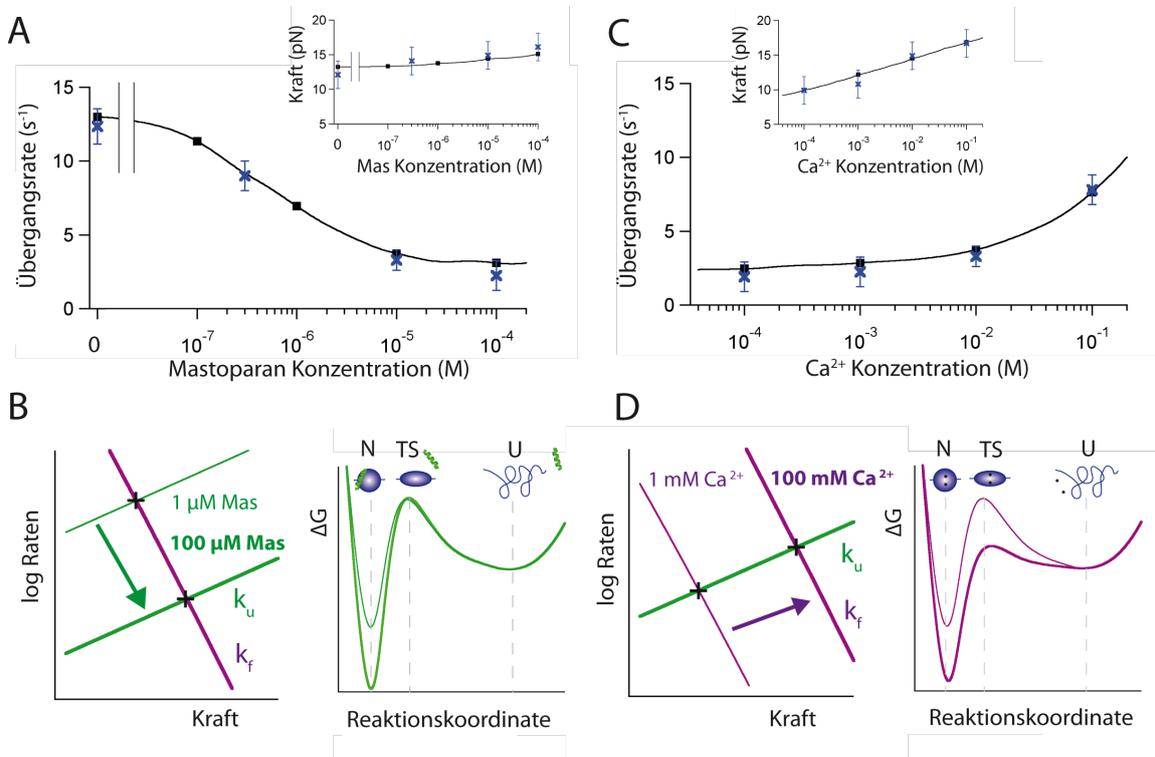


Abbildung 6.6: Interpretation des Ligandeneffekts. A. Übergangsrate und mittlere Entfaltungskräfte von DomC bei 10 mM Ca²⁺ und verschiedenen Mastoparan-Konzentrationen (blau). Der Ligandeneffekt kann durch Monte-Carlo-Simulationen (schwarze Symbole und schwarze Interpolationskurve) vollständig reproduziert werden. B. links. Kraftabhängigkeit der Faltungsrate (violett) und der Entfaltungsrate (grün). Eine Erhöhung der Mas-Konzentration verschiebt die Entfaltungsrate von der dünnen grünen Kurve zur dicken grünen Kurve. Der Schnittpunkt (hier herrschen Gleichgewichtsbedingungen) verschiebt sich damit zu höheren Kräften und zu niedrigeren Raten. Rechts. Energielandschaft bei niedrigen (dünne grüne Linie) und hohen (dicke grüne Linie) Mas-Konzentrationen. C. Übergangsrate und mittlere Entfaltungskräfte von DomC bei 10 μM Mas und verschiedenen Ca²⁺-Konzentrationen (blau). Ergebnisse der Monte-Carlo-Simulation sind in schwarz gezeigt. D. links. Kraftabhängigkeit der Faltungsrate (violett) und der Entfaltungsrate (grün). Eine Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration verschiebt die Faltungsrate von der dünnen violetten Kurve zur dicken violetten Kurve. Der Schnittpunkt (Gleichgewichtsbedingungen) verschiebt sich damit zu höheren Kräften und zu höheren Raten. Rechts. Energielandschaft bei niedrigen (dünne violette Linie) und hohen (dicke violette Linie) Ca²⁺-Konzentrationen.

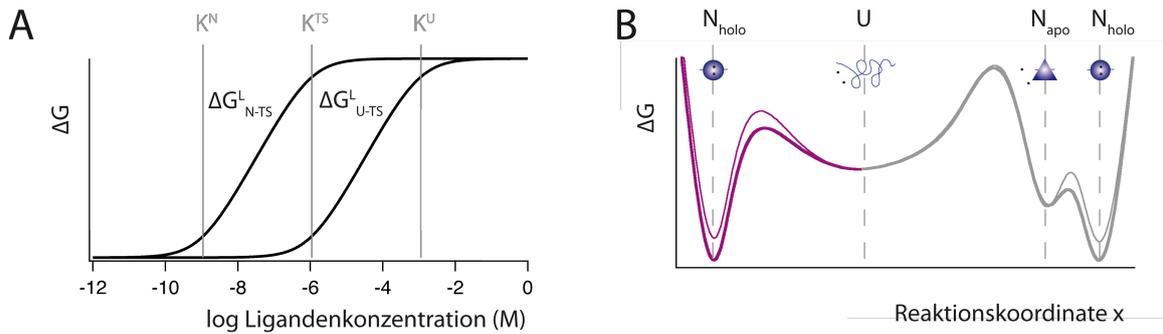


Abbildung 6.7: A. Änderung der Energiebarrieren für Faltung und Entfaltung in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration für eine Stöchiometrie von 1:1 gemäß Gl. 5.11 und 5.12. B. Schematische Energielandschaft für die Faltung von Calmodulin bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen (dünne Linien: niedrige Ca^{2+} -Konzentration, dicke Linien: hohe Ca^{2+} -Konzentration). Der rechte Zweig (Faltung über den apo-Zustand) kann weitgehend ausgeschlossen werden, da sich so die Beschleunigung der Faltung bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen nicht erklären lässt. Der linke Zweig (Faltung direkt in die holo-Form) scheint demgemäß deutlich wahrscheinlicher (siehe Text).

dagegen mit Stöchiometrie 1:1.

Das gleiche Experiment lässt sich nun natürlich auch mit der N-terminalen Domäne von Calmodulin wiederholen. In der Tat finden wir für DomN den gleichen Effekt: Mastoparan senkt die Entfaltungsrate, Ca^{2+} erhöht die Faltungsrate (siehe Abb. 6.8). Allerdings ist die Stärke des Effekts wegen der niedrigeren Affinität von DomN zu Mastoparan und zu Ca^{2+} etwas schwächer ausgeprägt als für DomC⁶.

Bei sehr niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen faltet Calmodulin in die flexible und sehr dynamische apo-Konformation, die nach Zugabe und Bindung von Ca^{2+} einen Konformationsübergang ausführt [89]. Wir finden hier einen neuen Faltungspfad, auf dem Calmodulin über einen Übergangszustand, der bereits Ca^{2+} -Ionen bindet, direkt in den holo-Zustand faltet. Dieser Pfad dominiert bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen (siehe Abb. 6.7 B). Ein Pfad, bei dem Calmodulin zunächst in den apo-Zustand faltet, der aber gleichzeitig durch Ca^{2+} beschleunigt wird, scheint unwahrscheinlich: Die Kinetik für den Übergang von der apo- in die holo-Form bei 3 mM Ca^{2+} wurde von Park *et al.* direkt gemessen [62]. Der gefundene Wert von $\sim 2000 s^{-1}$ ist 2 Größenordnungen langsamer als die von uns bestimmte Faltungsrate bei 10 mM Ca^{2+} , ein Pfad über den apo-Zustand kann somit weitgehend ausgeschlossen werden. Auf diesem Faltungspfad direkt zur holo-Form könnten die Ca^{2+} -Bindungsstellen als Faltungskeime dienen, da die Bindung, wie wir gesehen haben, zu einem vergleichsweise frühen Zeitpunkt auf dem Faltungspfad auftritt.

Diskussion

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass Ca^{2+} und das Target-Peptid Mastoparan in den untersuchten Konzentrationsbereichen die Faltungs-Energielandschaft

⁶Die Daten für die Ca^{2+} -Abhängigkeit von DomN wurden zum Teil entnommen aus der Diplomarbeit von Fabian Ziegler [90]. In der gleichen Arbeit wurden auch Kontrollexperimente durchgeführt, bei denen die Ionenstärke in der Lösung durch Zugabe von NaCl für alle Ca^{2+} -Konzentrationen konstant gehalten wurde. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass Unterschiede in der Ionenstärke für die Veränderung der Faltungsrate von CaM bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen verantwortlich sind.

6 Faltung und Entfaltung von Calmodulin unter Kraft

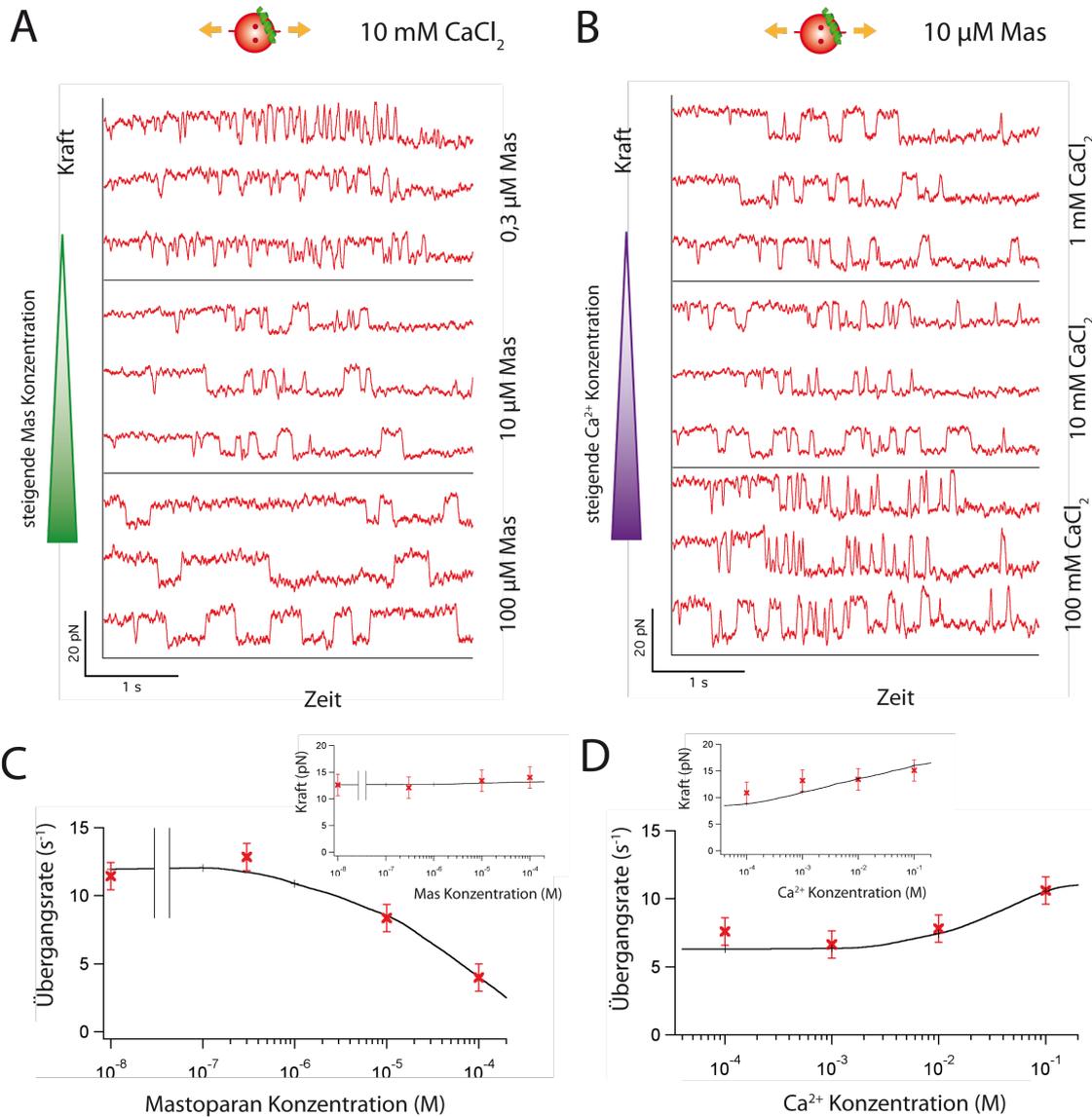


Abbildung 6.8: Kraft-Zeit-Kurven der N-terminalen Domäne von Calmodulin unter verschiedenen Ligandenbedingungen. A. Variation der Mastoparan-Konzentration. Mit steigender Konzentration sinkt die charakteristische Übergangsrate. B. Variation der Ca^{2+} -Konzentration. Bei steigender Konzentration steigt die Übergangsrate, allerdings ist der Effekt relativ schwach ausgeprägt. Dies ist vermutlich durch ein geringeres $K_{\text{Ca}}^{\text{TS}}$ von DomN im Vergleich zu DomC bedingt. C+D. Monte-Carlo-Simulationen (schwarz) können die experimentell Daten (rot) im Rahmen der Messgenauigkeit weitgehend reproduzieren.

von Calmodulin in unterschiedlicher Weise beeinflussen. Mastoparan verlangsamt die Entfaltung, Ca^{2+} beschleunigt die Faltung. Während bereits in einigen früheren Arbeiten mittels Einzelmolekül-Kraftspektroskopie eine Verringerung der Entfaltungsrate durch Ligandenbindung festgestellt werden konnte [42, 45, 14, 63], wird nun erstmals auch eine Kopplung zwischen Faltung und Ligandenbindung experimentell beobachtbar. Die Veränderung der Übergangsrate in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration ermöglicht hier direkt zu unterscheiden, ob im jeweiligen Konzentrationsbereich k_u oder k_f sensitiv auf Konzentrationsänderungen des Liganden ist.

Ein quantitatives und vereinheitlichtes Modell für beide Liganden, bei dem die Affinitäten für den nativen Zustand, den Übergangszustand und den entfalteten Zustand berücksichtigt werden, kann die Daten im Rahmen der Messgenauigkeit vollständig reproduzieren. Bei den gemessenen Bedingungen bindet Ca^{2+} vor und Mastoparan nach dem Übergangszustand, wenn der Übergang von der entfalteten zur gefalteten Struktur beobachtet wird. Es ist einsichtig, dass der wesentlich größere und komplexere Peptidligand eine stärker der nativen Form ähnelnde Struktur für eine effektive Bindung benötigt als Ca^{2+} -Ionen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird sich zeigen, dass sämtliche untersuchten Peptide, in Vollängen-Konstrukten ebenso wie bei Einzeldomänen, stets nur die Entfaltungsrate beeinflussen und die Faltungsrate unverändert lassen. Darüber hinaus ist auf diese Weise auch die übliche Bindungsreihenfolge – zuerst Ca^{2+} , dann Mastoparan – erhalten. Peptidliganden benötigen Ca^{2+} -bindendes Calmodulin für eine Bindung mit hoher Affinität. Die beschleunigte Faltungsrate von Calmodulin in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen legt einen neuen Faltungspfad nahe, auf dem Calmodulin bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen direkt in den holo-Zustand faltet.

Es wäre interessant zu untersuchen, ob der hier postulierte neue Entfaltungspfad bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen auch mit nicht-mechanischen Methoden detektiert werden kann. Darüber hinaus wäre die Messung der Übergangsrate von Calmodulin bei niedrigeren Ca^{2+} -Konzentrationen lohnenswert, da sich so die effektive Affinität des Übergangszustands bestimmen ließe. Bei einer Senkung der Konzentration von hohen Ca^{2+} -Konzentrationen ausgehend sollte die Übergangsrate zunächst sinken, bei Unterschreiten von K^{TS} sollte sie dagegen wieder ansteigen. Für die N-terminale Domäne ist dieser Bereich möglicherweise schon bei den in dieser Arbeit vorgestellten Daten erreicht (in Abb. 6.8 scheint die Übergangsrate beim Senken der Ca^{2+} -Konzentration von 1 mM auf 100 μM leicht anzusteigen), die Messgenauigkeit und der zur Verfügung stehende Ca^{2+} -Konzentrationsbereich reichen für eine definitive Aussage allerdings noch nicht aus. Messungen bei niedrigeren Ca^{2+} -Konzentrationen sind schwierig, da die Gleichgewichtsübergänge dann bei sehr niedrigen Kräften stattfinden und nur schwer vom Krafttauschen zu unterscheiden sind. Hochauflösende Daten, wie sie beispielsweise mit optischen Pinzetten gemessen werden können, könnten hier helfen.

6.3 Vergleich von skMLCK und Mastoparan

Was die Peptidsequenzen von Calmodulin-Bindungsmotiven betrifft, so wurde in dieser Arbeit bislang nur die Interaktion von Mastoparan mit Einzeldomänen-Konstrukten von Calmodulin untersucht. Der nächste logische Schritt ist nun, die Wechselwirkung von Peptiden mit vollständigem Calmodulin zu analysieren. Dazu wird in diesem Abschnitt die Bindung von Calmodulin an Mastoparan und an skMLCK (siehe Tab. 4.1) verglichen. Sicherlich eine der interessantesten Eigenschaften von CaM ist die große Zahl an Target-

Sequenzen. Bislang ist weitgehend ungeklärt, ob und inwiefern sich die Bindungsmodi dieser verschiedenen Peptide unterscheiden. Mastoparan und skMLCK sind in diesem Zusammenhang zwei sehr interessante Peptide: Da beide Peptide sehr unterschiedliche physiologische Rollen spielen (Mastoparan ist ein Peptid aus dem Wespengift, während skMLCK die Erkennungssequenz einer Kinase ist, siehe auch Kapitel 4), erscheinen Unterschiede im Bindungsverhalten relativ wahrscheinlich.

In Abb. 6.9 A+B sind Kraft-Abstands-Kurven von vollständigem Calmodulin (oben) sowie von Einzeldomänenkonstrukten (unten) in Anwesenheit von Mastoparan und von skMLCK gegenübergestellt. In Abb. 6.9 A oben ist deutlich zu erkennen, dass sowohl DomN als auch DomC des vollständigen Calmodulin durch Mastoparan mechanisch stabilisiert werden. Diese Stabilisierung äußert sich durch höhere Kräfte und niedrigere Übergangsraten (Tab. 6.1). Die Stabilisierungseffekte beider Domänen finden offensichtlich unabhängig voneinander statt, da die beiden Domänen aus dem vollständigen CaM in der gleichen Weise stabilisiert werden wie die Einzeldomänen (Abb. 6.9 A unten). Eine quantitative Analyse der Raten und Kräfte zeigt keine signifikanten Unterschiede⁷ (Tab. 6.1). Dieses Resultat ist erstaunlich, wenn man bedenkt, dass in der Literatur für Mastoparan – ebenso wie für skMLCK und die anderen Calmodulin-bindenden Peptide – eine Stöchiometrie von 1:1 angenommen wird [49]. Bei einer solchen Stöchiometrie sollte man allerdings durch Bindungskoopertivität zwischen beiden Domänen eine deutlich höhere Bindungsenergie im Fall des vollständigen Calmodulins erwarten. Denn sobald eine Domäne Mastoparan gebunden hat, würde die zweite Domäne von CaM einer deutlich erhöhten effektiven Konzentration ausgesetzt sein, was zu einer Gesamtbindungsenergie führen sollte, die höher als die Summe der Interaktionsenergien mit den isolierten Domänen ist. Die Daten legen daher nahe, dass Calmodulin Mastoparan in einer 2:1 Stöchiometrie bindet, bei der jede Domäne mit einem einzelnen Peptid assoziiert.

Es ist nun interessant, dieses Experiment mit skMLCK zu wiederholen. Für skMLCK kann eine Bindungsstöchiometrie von 1:1 als gesichert gelten [41], wir würden also erwarten, dass für dieses Peptid in Übereinstimmung mit der Literatur die Stabilisierung des vollen CaM deutlich stärker ausfällt als die Summe der Stabilisierungen der Einzeldomänen [2]. In der Tat ist in Abb. 6.9 B oben zu erkennen, dass das erste Entfaltungsereignis (DomN) von CaM 128x144 bei deutlich höheren Kräften stattfindet als im Fall von Mastoparan, während der Stabilisierungseffekt für die verbleibende C-terminale Domäne nach dem ersten Entfaltungsereignis vergleichbar zum Effekt von Mastoparan ist (Tab. 6.1). Für die Einzeldomänen (Abb. 6.9 B unten) finden wir, dass isolierte DomC mit ähnlicher Affinität wie ihr Gegenstück im Volllängenkonstrukt an skMLCK bindet. Dies war zu erwarten, da keine Beeinflussung der Affinität von DomC durch die in Abb. 6.9 B oben zum Untersuchungszeitpunkt bereits entfaltete DomN anzunehmen ist. Im Gegensatz dazu lässt sich keinerlei Stabilisierung der isolierten DomN durch skMLCK detektieren, was auf eine sehr geringe Affinität hindeutet. Diese sehr starke Abhängigkeit der DomN-Stabilisierung von der Existenz einer gefalteten DomC ist ein Beleg für eine starke Bindungskoopertivität zwischen beiden Domänen für die Assoziation mit skMLCK. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Bindungsstöchiometrie von 1:1.

Das ungewöhnliche Bindungsverhalten von Mastoparan wurde oben als Beleg für eine Stö-

⁷Die leicht schnellere Übergangsrate sowie die etwas erhöhte mittlere Entfaltungskraft von DomC aus CaM 128x144 im Vergleich zu isolierter DomC lässt sich auf die Disulfidbrücke zurückführen, die die Faltungsrate unter Kraft erhöht, siehe auch Anhang A.4.

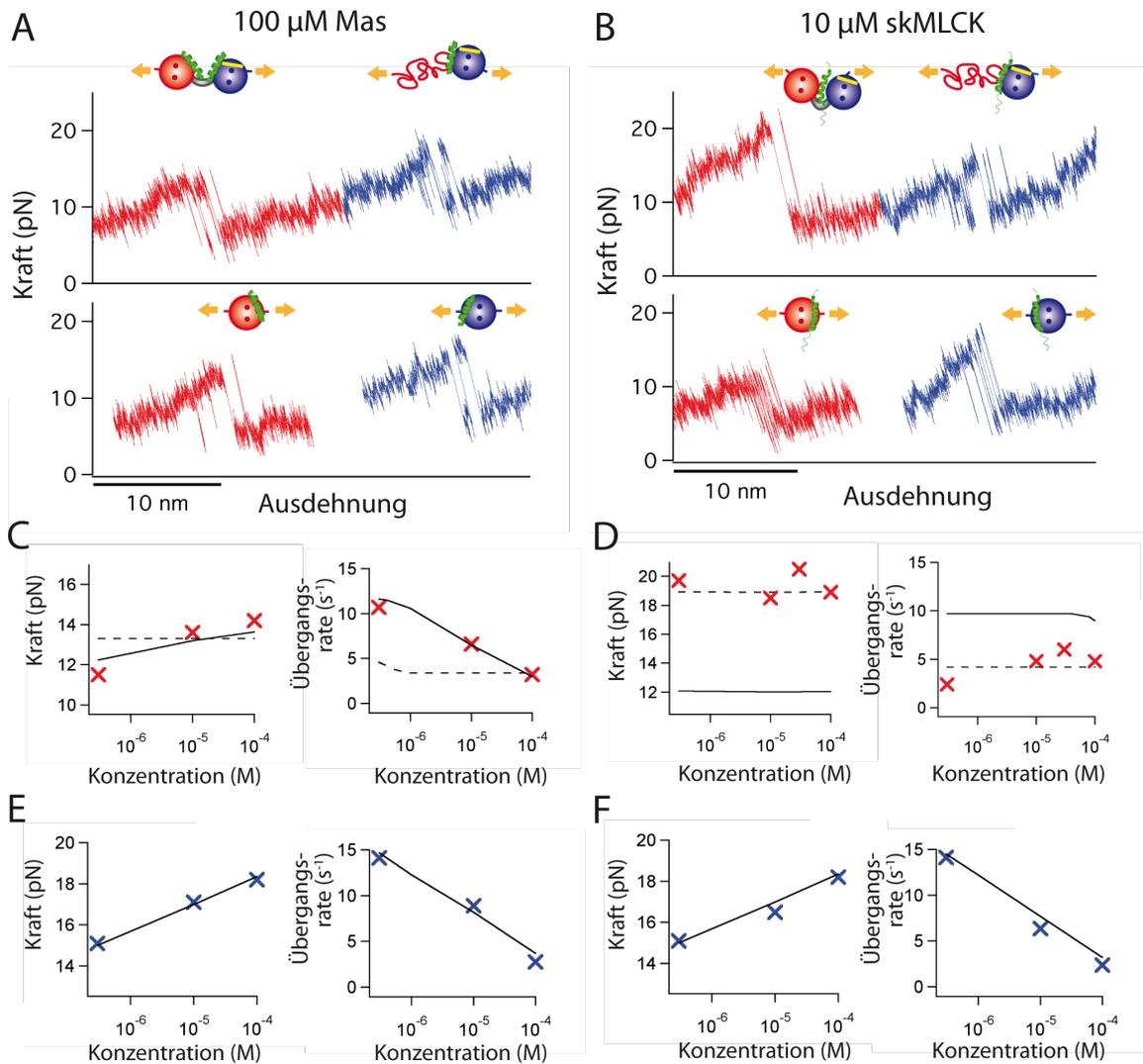


Abbildung 6.9: Kraft-Abstandskurven von Calmodulin und von Einzeldomänen in Anwesenheit von Mastoparan und skMLCK bei 10 mM CaCl_2 . A. 100 μM Mas. B. 10 μM skMLCK. C+D. Experimentell gemessene Kräfte und Übergangsraten des ersten Entfaltungsereignisses von CaM 128x144 (DomN, rote Symbole) bei Variation von Mas (C) und skMLCK (D). Monte-Carlo-Simulationen für eine Stöchiometrie von 1:1 (gestrichelte Linien) und von 2:1 (durchgezogene Linien) sind in schwarz gezeigt. E+F. Experimentell gemessene Kräfte und Übergangsraten des zweiten Entfaltungsereignisses von CaM 128x144 (DomC, blaue Symbole) bei Variation von Mas (E) und skMLCK (F). Monte-Carlo-Simulationen sind in schwarz gezeichnet.

Tabelle 6.1: Mittlere Entfaltungskräfte und Übergangsraten von CaM bei 10 mM CaCl₂ in Anwesenheit von Mastoparan und skMLCK

Peptide	DomN ^(isoliert)		DomC ^(isoliert)		DomN ^(CaM 128x144)		DomC ^(CaM 128x144)	
	Kraft	Rate	Kraft	Rate	Kraft	Rate	Kraft	Rate
ohne Peptid	12,6 pN	11,5 s ⁻¹	12,1 pN	12,4 s ⁻¹	11,8 pN	11,9 s ⁻¹	14,2 pN	19,5 s ⁻¹
100 μM Mas	14,0 pN	4,0 s ⁻¹	16,1 pN	2,1 s ⁻¹	14,2 pN	3,2 s ⁻¹	18,2 pN	2,8 s ⁻¹
10 μM skMLCK	12,2 pN	12,2 s ⁻¹	14,9 pN	2,6 s ⁻¹	19,5 pN	4,9 s ⁻¹	15,5 pN	5,4 s ⁻¹

chiometrie von 2:1 interpretiert, bei der jede Domäne unabhängig von der anderen einzelnes Mastoparan-Molekül bindet. Doch wie lässt sich dieses Modell überprüfen? Es zeigt sich, dass eine Analyse der Peptidkonzentrationsabhängigkeit von Übergangsraten und mittleren Entfaltungskräften des ersten Peaks (DomN) Klarheit schaffen kann. Dazu muss das in Abb. 5.1 vorgestellte Modell für die Ligandenabhängigkeit von Faltungs- und Entfaltungsraten geringfügig erweitert werden. In Abb. 6.10 A ist eine Energielandschaft für vollständiges CaM im peptidbindenden (dicke grüne Linie) und im peptidfreien (dünne grüne Linie) Zustand gezeichnet. Wir nehmen eine Bindungsstöchiometrie von 1:1 an, darüber hinaus gehen wir davon aus, dass der Ligand jeweils nur auf die Entfaltungsraten wirkt, dass also die Dissoziationskonstanten der Übergangszustände denjenigen der jeweils rechts daneben liegenden entsprechenden entfalteten Zustände entsprechen. Das System lässt sich dann durch drei Zustände, N_2 , N_1 und U (vollständig gefaltet, eine Domäne entfaltet, vollständig entfaltet), mit den Dissoziationskonstanten K_2 , K_1 und K_0 , beschreiben. Dabei gilt $K_2 < K_1 < K_0$. Aus Gl. 5.11 erhalten wir damit für die energetische Stabilisierung des ersten Entfaltungsereignisses ΔG_{2-1}^L bzw. des zweiten Entfaltungsereignisses ΔG_{1-0}^L :

$$\frac{\Delta G_{2-1}^L}{k_B T} = \ln \left(\frac{1 + \frac{L}{K_2}}{1 + \frac{L}{K_1}} \right) \quad (6.3)$$

$$\frac{\Delta G_{1-0}^L}{k_B T} = \ln \left(\frac{1 + \frac{L}{K_1}}{1 + \frac{L}{K_0}} \right) \quad (6.4)$$

Die Gleichungen 6.3 und 6.4 sind in Abb. 6.10 B dargestellt. Die Peptidkonzentrationsbereiche, in denen eine Erhöhung der Konzentration ΔG_{2-1}^L oder ΔG_{1-0}^L beeinflusst, sind bis auf einen schmalen Konzentrationsbereich um K_1 deutlich voneinander getrennt. Eine Erhöhung der Peptidkonzentration sollte im Falle einer Stöchiometrie von 1:1 also entweder DomN oder DomC beeinflussen. Für eine Stöchiometrie von 2:1 dagegen sind die Stabilisierungen beider Domänen unabhängig voneinander und lassen sich beide durch Gl. 5.11 beschreiben. Damit können, ähnliche Affinitäten vorausgesetzt, auch beide Domänen im gleichen Konzentrationsbereich sensitiv auf Konzentrationsänderungen sein. Bei den gemessenen Peptid-Konzentrationen (0,3 μM bis 100 μM) befinden wir uns in dem Ligandenbereich, bei dem im Falle einer 1:1 Stöchiometrie die zweite Domäne, DomC, sensitiv auf Konzentrationsänderungen ist⁸. Es ist hier also die Konzentrationsabhängigkeit der Gleichgewichtsübergänge von DomN, der zuerst entfaltenden Domäne, die die Unterscheidung zwischen Stöchiometrie 1:1 und 2:1 erlaubt. Wie in Abb. 6.9 C zu sehen ist,

⁸Ein einfaches thermodynamisches Argument kann auch anschaulich begründen, warum Entfaltungskräfte und Übergangsraten der zuerst entfaltenden Domäne von CaM unabhängig von der Ligandenkonzentration sind. Wir beobachten hier den Übergang von vollständig gefaltetem Calmodulin zu Calmodulin mit entfalteter N-terminaler Domäne. Bei den hier verwendeten Ligandenkonzentrationen (> 0,3 μM) sind diese beiden Zustände weitgehend mit Mastoparan gesättigt, so dass eine Erhöhung der Konzentration die Energetik des Übergangs nicht weiter beeinflussen kann.

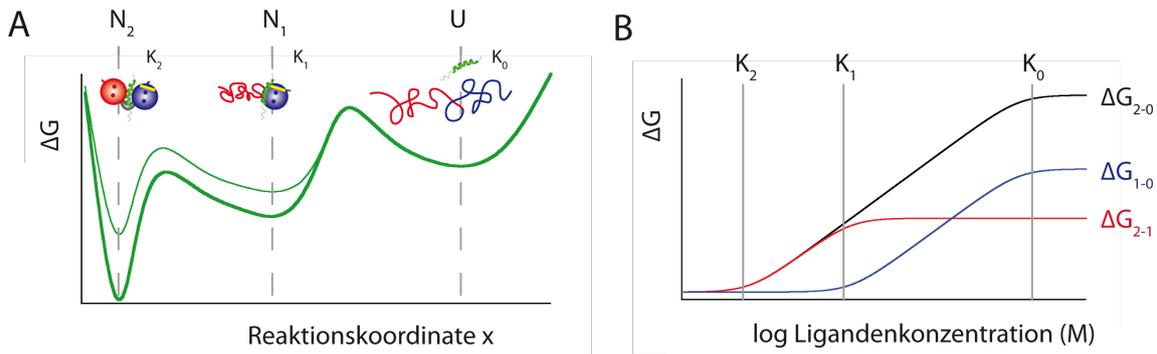


Abbildung 6.10: A. Energielandschafts-Modell zur Bestimmung der Peptid-Stöchiometrie. N_2 : vollständig gefaltetes CaM, N_1 : CaM mit einer gefalteten und einer entfalteten Domäne, U : vollständig entfaltetes CaM. Es wird angenommen, dass die Dissoziationskonstanten der Übergangszustände TS_2 und TS_1 jeweils denen der entfalteten Zustand entsprechen, die hier unmittelbar rechts von den Übergangszuständen liegen. Im Falle einer 1:1 Stöchiometrie ist das System durch die Dissoziationskonstanten K_2 , K_1 und K_0 vollständig beschrieben. B. Zusätzliche freie Enthalpie durch Ligandenbindung für das erste (rot) und das zweite Entfaltungsereignis (blau) in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration. Die Konzentrationsbereiche, in denen eine Erhöhung der Ligandenkonzentration auf die erste und auf die zweite entfaltende Domäne wirkt sind, abgesehen von einem kleinen Bereich um K_1 herum, klar voneinander getrennt.

reagiert in diesem Bereich DomN aus CaM 128x144 auf eine Veränderung der Mastoparan-Konzentration. Wird skMLCK variiert, so bleiben Kräfte und Übergangsraten von DomN aus CaM 128x144 dagegen konstant (Abb. 6.9 D). In Übereinstimmung mit der in Abschnitt 6.2 gemessenen Mastoparan-Abhängigkeit der Gleichgewichtsübergänge von isolierter DomC steigen für das zweite Entfaltungsereignis von CaM 128x144 (DomC) bei einer Erhöhung der Mastoparan- oder skMLCK-Konzentration die mittleren Entfaltungskräfte, während die Übergangsraten sinken (Abb. 6.9 E+F).

Dies belegt direkt, dass es sich bei Mastoparan in der Tat um eine Stöchiometrie von 2:1 handelt, während für skMLCK die Stöchiometrie von 1:1 bestätigt wird. Monte-Carlo-Simulationen zeigen, dass das vorgestellte Modell die experimentell gemessenen Daten auch quantitativ korrekt reproduzieren kann (schwarze Linien in Abb. 6.9 C+D, gestrichelt: Stöchiometrie 1:1, durchgezogen: Stöchiometrie 2:1). Im Fall der 2:1 Stöchiometrie benutzen wir die Dissoziationskonstanten von isolierter DomN von Mastoparan aus den in Abschnitt 6.2 beschriebenen konzentrationsabhängigen Messungen ($K_N^{Mas} = 5 \cdot 10^{-6}$ M) [70], für K_N^{skMLCK} verwendeten wir einen Wert von $1 \cdot 10^{-4}$ M als untere Grenze, die aus der oben gezeigten Messung bei 100 μ M skMLCK abgeschätzt wurde [2]. Für die 1:1 Stöchiometrie wurden $K_N^{Mas} = 3 \cdot 10^{-10}$ M [51], $K_N^{skMLCK} = 1 \cdot 10^{-11}$ M [30] für das erste Entfaltungsereignis (DomN) und $K_C^{Mas} = 3 \cdot 10^{-7}$ M [52], $K_C^{skMLCK} = 1 \cdot 10^{-7}$ M [2] für das zweite Entfaltungsereignis (DomC) verwendet, weiterhin in voller Übereinstimmung mit der Literatur.

Es liegen nun also starke Indizien für eine 2:1 Stöchiometrie für die Bindung von Mastoparan an CaM 128x144 vor, doch es könnte sich hier möglicherweise um ein durch den Crosslink in der C-terminalen Domäne verursachtes Artefakt handeln. Dies lässt sich am leichtesten durch andere Crosslink-Varianten ausschließen. In Abb. 6.2 C ist eine Messkurve für CaM ohne Crosslink in Anwesenheit von Mastoparan gezeigt. Kräfte und Übergangsraten entsprechen weitgehend denen von CaM 128x144. Auch wenn sich in

6 Faltung und Entfaltung von Calmodulin unter Kraft

dieser Kurve die beiden Domänen nicht mit Sicherheit unterscheiden lassen, so stützt dies doch die Vermutung, dass durch den Crosslink 128x144 keine fundamentalen Veränderungen im Bindungsverhalten von CaM verursacht werden. Eine bessere Kontrolle wird durch einen anderen Crosslink ermöglicht. Wie in Abb. 6.2 A gezeigt, lässt sich durch eine Disulfidbrücke zwischen den Aminosäureresten 99 und 135 der Kontrollängenzuwachs der C-terminalen Domäne von CaM so weit verkürzen, dass er nicht mehr ohne Weiteres vom thermischen Rauschen unterschieden werden kann. Alle beobachteten Gleichgewichtsübergänge lassen sich nun zweifelsfrei der N-terminalen Domäne bei gleichzeitiger Anwesenheit einer gefalteten C-terminalen Domäne zuordnen. In Abb. 6.11 A sind Kraft-Zeit-Kurven von CaM 99x135 bei verschiedenen Mastoparan-Konzentrationen gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass eine Erhöhung der Mastoparan-Konzentration zu langsameren Übergangsraten führt, während für eine Stöchiometrie von 1:1 im untersuchten Konzentrationsbereich konstante Übergangsraten zu erwarten wären. DomN von CaM 99x135 zeigt also das gleiche Verhalten wie DomN von CaM 128x144, somit finden wir für beide Crosslink-Varianten eine Stöchiometrie von 2:1. Dieser Befund legt nahe, dass die 2:1 Stöchiometrie nicht durch die vorgenommenen Mutationen verursacht wird.

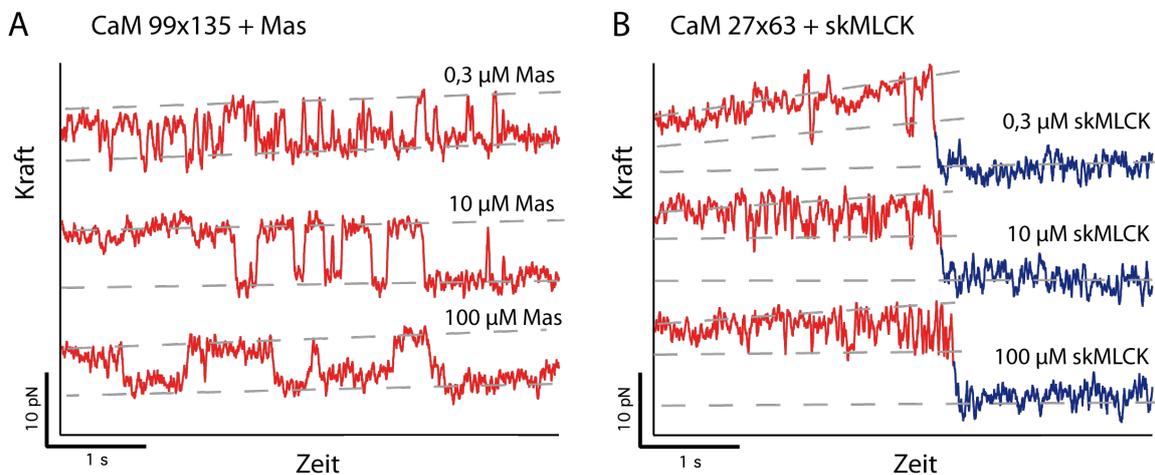


Abbildung 6.11: Überprüfung der Bindungsmodi durch alternative Crosslinks, 10 mM CaCl_2 . A. CaM 99x135 + Mas. Die Übergangsraten von DomN sind ununterscheidbar von den für CaM 128x144 beobachteten Raten. B. CaM 27x63 + skMLCK. Es sind Übergänge zwischen 3 Zuständen zu beobachten. Übergänge zwischen dem oberen und dem mittleren Level entsprechen der Entfaltung der verkürzten DomN, Übergänge zwischen dem mittleren und dem unteren Zustand entsprechen der Entfaltung von DomC. Da skMLCK sowohl den oberen als auch den mittleren Level stabilisiert, verlängert eine Erhöhung der Peptidkonzentration den Zeitraum, in dem Übergänge zwischen dem oberen und dem mittleren Level auftreten. Die Hierarchie (erst DomN, dann DomC) ist immer gewahrt.

Bedingt durch die hohen Entfaltungskräfte von DomN aus CaM 128x144 in Anwesenheit von skMLCK finden in den entsprechenden Messkurven für das erste Entfaltungsereignis häufig nur wenige oder keine Rückfaltungsereignisse von DomN statt. Um dennoch Gleichgewichtsbedingungen herzustellen, wurde die Rückfaltungsrate unter Kraft von DomN durch einen Crosslink in der N-terminalen Domäne zwischen den Aminosäureresten 27 und 63 beschleunigt (siehe Anhang A.4). Wie in Abb. 6.11 B zu erkennen ist, ist der Kraftsprung nach Faltungs-/Entfaltungs-Übergängen bei DomN aus CaM 27x63 deutlich verringert, dafür ist die Übergangsrate signifikant erhöht. Es sind Übergänge

zwischen drei Zuständen zu beobachten. Übergänge zwischen dem oberen und dem mittleren Level entsprechen der Entfaltung der verkürzten DomN, Übergänge zwischen dem mittleren und dem unteren Zustand entsprechen der Entfaltung von DomC. Auf den ersten Blick ist es erstaunlich, dass bei steigender Konzentration von skMLCK die Anzahl der Gleichgewichtsübergänge steigt, während bei DomN aus CaM 128x144 im gleichen Konzentrationsbereich konstante Übergangsraten beobachtet wurden (Abb. 6.9 D). Dieser Effekt wird allerdings klar, wenn man bedenkt, dass der mittlere Level, also isolierte DomC, durch skMLCK stabilisiert wird. Je höher die skMLCK-Konzentration ist, desto geringer ist die Übergangsrate vom mittleren zum unteren Level, und folglich sind für einen längeren Zeitraum Übergänge vom mittleren zum oberen Level möglich.

Diskussion

In diesem Abschnitt wurden die Übergangsraten und Entfaltungskräfte von Einzeldomänen und von vollständigem Calmodulin in Anwesenheit von Targetpeptiden untersucht. Für Mastoparan finden wir, im Gegensatz zu skMLCK, keine detektierbare Bindungskoperativität zwischen den beiden Domänen von CaM. Daraus und aus der Modellierung der Ligandenbindungsenergien von Einzeldomänen und vollständigem CaM, lässt sich schlussfolgern, dass Mastoparan mit einer Stöchiometrie von 2:1 und skMLCK mit einer Stöchiometrie von 1:1 an CaM bindet. Die verschiedenen Bindungsmodi spiegeln vermutlich die unterschiedlichen physiologischen Rollen von Mastoparan und skMLCK wider: Für das Zielprotein skMLCK finden wir eine sehr starke und kooperative Bindung an vollständiges Calmodulin, was für zuverlässige Signalübermittlung auch bei niedrigen Calmodulin-Konzentrationen von hoher Wichtigkeit ist. Für das Gift Mastoparan dagegen ist keine optimierte Bindungssequenz nötig, es muss beispielsweise kein Konformationsübergang induziert werden. Insofern ist es für die Funktion von Mastoparan völlig ausreichend, mit mäßiger Affinität bei hohen Konzentrationen die Bindungsstellen von Calmodulin zu blockieren. Mit der vorgestellten Methode könnten in zukünftigen Arbeiten auch die Bindungsmodi weiterer Calmodulin-Liganden untersucht werden, die mit bislang unbekannter Stöchiometrie binden. Als Beispiel ist hier das Schizophrenie-Medikament Trifluoperazin (TFP) zu nennen [20, 84]. Während in der Literatur bislang überwiegend die Interaktion von Calmodulin mit Peptidsequenzen aus Target-Proteinen untersucht wurde, kann mit der hier vorgestellten Technik prinzipiell auch die Bindung von vollständigen Target-Proteinen an Calmodulin untersucht werden. Die Lösung der Frage, ob sich deutliche Unterschiede zu den mit Peptid-Liganden erhaltenen Ergebnissen feststellen lassen, ist eine wichtige Aufgabe für zukünftige Arbeiten.

Die Bindung von Ca^{2+} wurde bislang nur auf Ebene der Einzeldomänen untersucht (Abschnitt 6.2). Prinzipiell wäre auch denkbar, dass eine gewisse gegenseitige Beeinflussung der beiden Domänen hinsichtlich der Ca^{2+} -Bindung stattfindet. In Übereinstimmung mit der Literatur [50] konnten für CaM im Rahmen der mit Einzelmolekül-Kraftspektroskopie erreichbaren Genauigkeit keine signifikanten Unterschiede im Ca^{2+} -Bindungsverhalten zwischen Einzeldomänen-Konstrukten und den entsprechenden Domänen in vollständigem Calmodulin festgestellt werden (Diplomarbeit Fabian Ziegler [90]).

6 Faltung und Entfaltung von Calmodulin unter Kraft

7 Direkte Beobachtung von Peptidbindung und -entbindung

Calmodulin bindet an eine beeindruckende Vielfalt von Zielproteinen. Im menschlichen Proteom konnten über 300 Target-Sequenzen für Calmodulin identifiziert werden [79]. Doch wie ist es Calmodulin möglich, zwischen seinen verschiedenen Zielproteinen zu unterscheiden? Die Antwort besteht zum Teil sicherlich darin, dass in jeder Zelle stets nur ein Teil der möglichen Zielproteine exprimiert wird, darüber hinaus können verschiedene Arten von Targets auch innerhalb einer Zelle räumlich getrennt werden und durch lokalisierte Ca^{2+} -Signale einzeln angesprochen werden [18]. Doch die Beobachtung aus dem vorangegangenen Abschnitt, dass verschiedene Target-Sequenzen unterschiedliche Bindungsmodi an Calmodulin aufweisen können, stellt möglicherweise eine weitere Möglichkeit zur Differenzierung zwischen verschiedenen Targets dar. Während mit der Kinase-Sequenz skMLCK und dem Wespengift-Peptid Mastoparan bislang zwei in ihrer physiologischen Funktion höchst verschiedene Peptide untersucht wurden, soll skMLCK nun in diesem Kapitel mit der Bindungssequenz aus CaMKK (*calmodulin dependent kinase kinase*), einer Kinase, die andere Kinasen phosphoryliert, verglichen werden, siehe auch Kapitel 4 und Tab. 4.1). Wie sich zeigen wird, lassen sich mit Einzelmolekül-Kraftspektroskopie unterschiedliche Bindungsmodi dieser beiden Peptide identifizieren, die potentiell von hoher biologischer Relevanz sind.

Im Prinzip könnten nun die Experimente aus dem vorherigen Abschnitt für CaMKK wiederholt werden, indem mechanisch induzierte Faltungs-/Entfaltungsübergänge von Calmodulin bei verschiedenen Konzentrationen des CaMKK-Peptids aufgezeichnet werden. Allerdings ist diese Methode relativ indirekt, da Faltung/Entfaltung als Reporter für die Peptid-Bindung genutzt wird. Dagegen es wäre natürlich wünschenswert, Peptidbindung und -entbindung direkt messen zu können. Ferner basiert die Datenanalyse bei der in Abschnitt 6.3 vorgestellten Methode zum Teil darauf, dass Gleichgewicht bezüglich Ligandenbindung und -entbindung für das Protein in den Zuständen N und U angenommen wird, d.h. dass der Ligandenaustausch schneller als die Gleichgewichtsübergänge stattfindet. Bei Liganden wie beispielsweise skMLCK, die mit sehr hoher Affinität binden, ist diese Bedingung allerdings nicht mehr unbedingt erfüllt, da hier vergleichsweise langsame Dissoziationsraten auftreten können. Um die direkte Beobachtung von Peptidbindung und -entbindung zu beobachten, kann Kraft an den Peptidliganden angelegt werden, so dass die Dissoziationsrate k_{off} erhöht wird und der Ligand gleichsam aus seiner Bindungstasche herausgezogen wird. In diesem Kapitel soll die Strategie zur Messung von Ligandenbindung und -entbindung unter Kraft im thermodynamischen Gleichgewicht vorgestellt werden. Wie sich zeigen wird, kann der Übergang vom vollständig gefalteten und ligandenbindenden Protein zum komplett entfalteten Protein mechanisch induziert und mit hoher Genauigkeit in all seinen Einzelschritten aufgelöst werden [44].

7.1 Anlegen von Kraft an Peptidliganden

Das naheliegendste Experiment zur Untersuchung von Ligandenbindung unter Kraft besteht darin, den Protein-Target-Komplex durch Anlegen von Kraft an das Protein auf der einen und an den Liganden auf der anderen Seite auseinander zu ziehen und so zur Dissoziation zu bringen. In der Tat wurden die ersten Experimente auf diese Art und Weise

7 Direkte Beobachtung von Peptidbindung und -entbindung

durchgeführt [31], die Analyse ist allerdings durch zwei Probleme beeinträchtigt: Erstens lässt sich nur Entbindung, aber keine Rückbindung untersuchen, da der Komplex nach dem ersten Dissoziationsereignis irreversibel zerfällt. Und zweitens besteht das Signal für die Dissoziation lediglich aus einem Abfallen des Kraftsignals auf den Nullwert, korrekte Dissoziationsereignisse können durch das Fehlen eines charakteristischen Entbindungssignals daher nur schwer von unspezifischen Interaktionen und vom vorzeitigen spontanen Ablösen des Komplexes von Cantilever oder Oberfläche unterschieden werden. Dies beeinträchtigt insbesondere die quantitative Datenanalyse erheblich.

Um diese Probleme zu lösen, wurde hier eine neuartige Strategie entwickelt. Da es sich bei den zu untersuchenden Liganden um Peptid-Sequenzen handelt, lassen sich die Target-Peptide mittels molekularbiologischer Methoden problemlos über kurze Peptid-Linker an Calmodulin anhängen bzw. in die Sequenz integrieren (siehe auch Anhang A.6). Nach der Dissoziation bleibt das Peptid somit weiterhin fest mit dem Protein verbunden, so dass eine Rückbindung unter Kraft ohne Weiteres möglich ist. Das Entbindungsereignis lässt sich dann, analog zur Proteinfaltung, durch den entsprechenden Konturlängenzuwachs detektieren. Das Dissoziationsereignis wird also als Entfaltungsereignis messbar, indem das Target-Peptid zu einem Teil der gefalteten Struktur des Proteinkonstrukts gemacht wird.

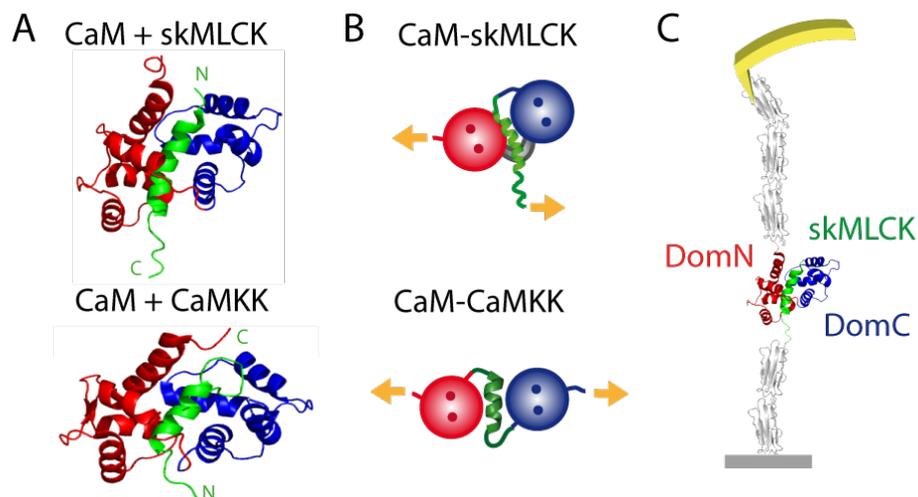


Abbildung 7.1: Calmodulin (DomN: rot, DomC: blau) und Target-Peptide (grün). A. oben. Struktur des Calmodulin-skMLCK Komplexes, PDB-ID 2BBM [41], unten. Calmodulin und CaMKK, PDB-ID 1CKK [61]. B. Proteinkonstrukte zur direkten Beobachtung von Ligandenbindung und -entbindung. skMLCK wird mit dem C-Terminus von Calmodulin verbunden, CaMKK wird in den Interdomänen-Linker integriert. C. Proteinkonstrukt CaM-skMLCK einschließlich Filamin-Domänen. Das CaM-CaMKK-Konstrukt wurde auf die gleiche Weise mit Filamin-"Griffen" versehen.

Für skMLCK und für CaMKK wurden dabei zwei unterschiedliche Strategien gewählt, die sich jeweils an der Struktur des Protein-Ligand-Komplexes orientieren. Wie in Abb. 7.1 A zu erkennen ist, bindet CaMKK mit im Vergleich zu skMLCK inverser Orientierung an Calmodulin, d.h. während das N-terminalen Ende von skMLCK vorwiegend mit der C-terminalen Domäne von Calmodulin interagiert (und vice versa), bindet CaMKK mit dem C-terminalen Ende an die N-terminale Domäne von Calmodulin. Dies ist einzigartig unter allen bekannten Targetpeptid-Sequenzen. Aus der Struktur ergibt sich, dass sich skMLCK über einen kurzen Peptid-Linker mit dem C-Terminus von Calmodulin verbinden

lässt (Abb. 7.1 B oben) [57]. Diese Strategie lässt sich wegen der inversen Orientierung des Peptids nicht direkt auf CaMKK übertragen. CaMKK wurde daher in den α -helikalen Interdomänen-Linker von Calmodulin integriert (Abb. 7.1 B unten) [83]. Beide Geometrien sind schematisch in Abb. 7.1 B gezeigt, Details zu den Proteinkonstrukten finden sich in Anhang A.7. Anlegen von Kraft führt nun für beide Peptide zur mechanisch induzierten Dissoziation des Protein-Ligand-Komplexes, indem das Target-Peptid aus seiner Bindungstasche herausgezogen wird. Wie in Kapitel 6 wird der Calmodulin-Peptid-Komplex wiederum in ein Proteinkonstrukt aus Filamin-Domänen integriert (siehe Abb. 7.1 C), um Griffe für die Anbindung an Oberfläche und Cantilever bereitzustellen.

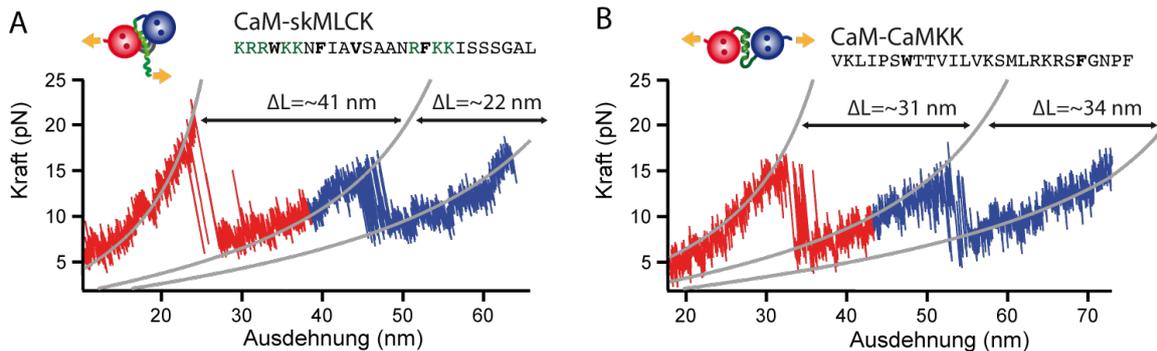


Abbildung 7.2: A. Kraft-Abstands-Kurve von CaM-skMLCK, $v_{pull} = 0,5 \text{ nm/s}$, 10 mM CaCl_2 . In der Aminosäure-Sequenz sind charakteristische hydrophobe Aminosäuren fett gedruckt, direkt an diese anschließende geladene Aminosäuren sind grün dargestellt. B. Kraft-Abstands-Kurve von CaM-CaMKK, $v_{pull} = 1 \text{ nm/s}$, 10 mM CaCl_2 . In beiden Proteinkonstrukten entfalten DomN (rot) und DomC (blau) getrennt voneinander. Der Gesamtkonturlängenzuwachs verteilt sich dabei bei den beiden Konstrukten unterschiedlich auf die zwei Entfaltungseignisse, was ein erstes Indiz für unterschiedliche Bindungsmodi von skMLCK und CaMKK darstellt.

In Abb. 7.2 sind typische unter Gleichgewichtsbedingungen gemessene Kraft-Abstands-Kurven für CaM-skMLCK und CaM-CaMKK gezeigt. Diese Kurven, sowie alle anderen in diesem Kapitel vorgestellten Messdaten, wurden bei 10 mM CaCl_2 aufgenommen. Diese Konzentration liegt zwar deutlich über physiologischen Ca^{2+} -Konzentrationen ($< 1 \mu\text{M}$), allerdings lässt sich durch eine höhere Konzentration erstens sicherstellen, dass alle Ca^{2+} -Bindungsstellen vollständig gesättigt sind, zweitens verbessert die erhöhte Stabilität von Calmodulin bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen (Gl. 5.13) das Signal-zu-Rausch-Verhältnis und erleichtert somit die Datenanalyse. Wie in Abb. 7.2 A+B zu erkennen ist, zeigen sich sowohl für CaM-skMLCK als auch für CaM-CaMKK weiterhin zwei getrennte Entfaltungspeaks, die sich, entsprechend der Ergebnisse für Calmodulin ohne angefügtes Peptid, vorläufig der N- und der C-terminalen Domäne von Calmodulin zuordnen lassen. Für alle Entfaltungspeaks können wir Gleichgewichtsübergänge detektieren. Wie bei den Daten mit freiem skMLCK in Lösung finden wir, dass für CaM-skMLCK der erste Peak bei deutlich höheren Kräften als der zweite Peak entfaltet. Für CaM-CaMKK finden wir dagegen zwei Entfaltungseignisse bei vergleichbaren Kräften, wobei die Werte signifikant über denen für peptidfreies Calmodulin liegen (siehe Tab. 7.2). Die Gesamtkonturlängenzuwächse von $\sim 63 \text{ nm}$ (CaM-skMLCK) und $\sim 65 \text{ nm}$ (CaM-CaMKK) entsprechen sehr gut den erwarteten Werten für diese Proteinkonstrukte¹.

¹ $\Delta L_{CaM-skMLCK} = 0,365 \text{ nm} \cdot (n_{CaM} + n_{skMLCK} + n_{Spacer}) - d_{CaM-skMLCK} = 0,365 \text{ nm} \cdot (148 + 23 + 4) - 2,4 \text{ nm} = 61,5 \text{ nm}$ (hier wurde angenommen, dass die drei C-terminalen Aminosäuren, die sich in der Struktur (PDB-ID 2BBM, [41]) klar außerhalb der Bindungstasche befinden, nicht gebunden sind und somit

Die Proteinkonstrukte scheinen also nicht nur ein ähnliches Entfaltungsmuster wie peptid-freies Calmodulin zu haben, zudem können wir aus den korrekten Gesamtkonturlängen-zuwächsen auch direkt schließen, dass die Target-Peptide an Calmodulin gebunden sind und somit ein Teil der gefalteten Struktur des Proteinkonstrukts geworden sind. Betrachtet man die einzelnen Konturlängenzuwächse des ersten und des zweiten Entfaltungsereignisses, so zeigen sich Unterschiede zwischen CaM-skMLCK und CaM-CaMKK. Während für CaM-skMLCK ein langes Entfaltungsereignis ($\Delta L_N \sim 41 \text{ nm}$) gefolgt von einem kurzen Entfaltungsereignis ($\Delta L_C \sim 22 \text{ nm}$) auftritt, finden wir für CaM-CaM zwei Entfaltungsereignisse von vergleichbarer Länge ($\Delta L_N \sim 31 \text{ nm}$, $\Delta L_C \sim 34 \text{ nm}$). Diese Beobachtung stellt, ebenso wie die Unterschiede bei den Dissoziationskräften, ein Indiz für möglicherweise unterschiedliche Bindungsmodi von CaM-skMLCK und CaM-CaMKK dar.

7.2 Peptidbindungs- und -entbindungsübergänge von skMLCK und CaMKK

Um ein genaueres Verständnis der Peptiddissoziation unter Kraft zu erhalten, werden nun die Gleichgewichtsübergänge der in Abb. 7.2 gezeigten Messkurven näher analysiert. Dazu betrachten wir zunächst die Entfaltungspeaks von CaM-skMLCK in Kraft-Zeit-Darstellung etwas gründlicher. In Abb. 7.3 A+B sind die Gleichgewichtsübergänge des ersten (A) und des zweiten (B) Peaks von CaM-skMLCK dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Gleichgewichtsübergänge für den ersten Peak mit niedrigerer Frequenz als für den zweiten Peak stattfinden, was sich, wie in Abschnitt 6.2 diskutiert, darauf zurückführen lässt, dass Peptidbindung die Entfaltungsrate senkt aber die Rückfaltungsrate unverändert lässt. Eine genauere Beobachtung der Gleichgewichtsübergänge in Abb. 7.3 A erlaubt es, ein sehr kurzlebige Intermediat zu identifizieren (siehe Pfeile, bzw. mittlere gestrichelte Linie), während kein solcher Zustand für den zweiten Peak (Abb. 7.3 B) gefunden werden kann. Werden die Daten bei einer etwas geringeren Glättungsstufe, also effektiv höherer Samplingrate (siehe auch Anhang A.3), analysiert, so zeigt sich, dass der Zwischenzustand im ersten Entfaltungspeak von CaM-skMLCK in fast allen Übergängen detektiert werden kann (Abb. 7.3 C). Wegen der sehr kurzen Lebensdauer des Intermediats ist es schwierig, die Konturlängenzuwächse der zwei Übergänge im ersten Entfaltungspeak von CaM-skMLCK mit hoher Genauigkeit zu bestimmen. WLC-Fitkurven zeigen allerdings deutlich, dass der erste Übergang (vom oberen zum mittleren Level) mit einem kürzeren Konturlängenzuwachs einhergeht als der zweite Übergang (vom mittleren zum unteren Level) (siehe Abb. 7.3 D). Da der zweite Entfaltungsübergang ungefähr dem in Abschnitt 6.1 ermittelten Konturlängenzuwachs der N-terminalen Domäne von Calmodulin entspricht, liegt hier die Interpretation nahe, dass im ersten Schritt die mechanisch induzierte Dissoziation von skMLCK von Calmodulin beobachtet wird, während im zweiten Schritt die Entfaltung von DomN stattfindet. Zuletzt entfaltet, wie im Fall von Calmodulin ohne angefügtes Peptid, die C-terminale Domäne.

Diese vorläufige Interpretation der Daten ist jedoch noch durch die sehr kurze Lebensdauer des Zwischenzustands eingeschränkt. Insbesondere ist unklar ob es sich um ein obligatorisches Intermediat handelt, ferner können Konturlängenzuwächse nur mit erheblicher Ungenauigkeit bestimmt werden. Es wäre daher wünschenswert, den Zwischenzustand selektiv zu stabilisieren. Dazu muss eine Möglichkeit gefunden werden, gleichzeitig die Rückbindungsrate von skMLCK (also die Rate für den Übergang vom mittleren zum

nicht zum Konturlängenzuwachs beitragen.), $\Delta L_{CaM-CaMKK} = 0,365 \text{ nm} \cdot (n_{CaM} + n_{CaMKK} + n_{Spacer}) - d_{CaM-CaMKK} = 0,365 \text{ nm} \cdot (148 + 26 + 8) - 1,9 \text{ nm} = 65,2 \text{ nm}$ [61]

7.2 Peptidbindungs- und -entbindungsübergänge von skMLCK und CaMKK

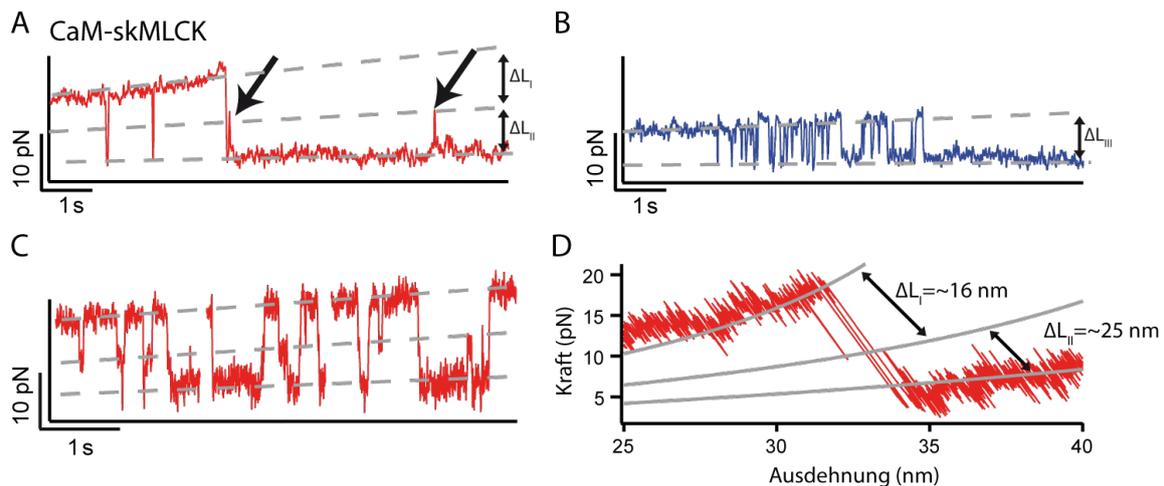


Abbildung 7.3: Kraft-Zeit-Kurve von CaM-skMLCK. A. Für den ersten Entfaltungspeak (DomN, rot) ist ein kurzlebiges Intermediat beobachtbar (mittlerer Level, siehe Pfeile). B. Für den zweiten Peak (DomC, blau) ist kein solcher Zwischenzustand detektierbar. C. Ausschnitte aus drei verschiedenen Messkurven von CaM-skMLCK bei geringerer Datenglättung. Der Zwischenzustand ist bei fast allen Übergängen beobachtbar. D. Ausschnitt aus einer Kraft-Abstands-Kurve von CaM-skMLCK mit WLC-Fitkurven (grau). Die Konturlängenzuwächse legen nahe, dass im ersten Übergang das Peptid von CaM dissoziiert, während im zweiten Ereignis DomN entfaltet.

oberen Level) und auch die Entfaltungsrate von DomN (d.h. die Rate für den Übergang vom mittleren zum unteren Level) zu senken. Dieses Ziel kann durch ein kompetitives Experiment, bei dem das Peptid Mastoparan zusätzlich frei in Lösung dem Messpuffer hinzugegeben wird, erreicht werden. Sobald skMLCK unter Kraft dissoziiert, kann Mastoparan die Target-Bindungsstellen von Calmodulin besetzen und dadurch die Rückbindung von skMLCK verlangsamen. Gleichzeitig senkt Mastoparan, wie in Abschnitt 6.2 diskutiert, die Entfaltungsrate k_u . In Abb. 7.4 A ist deutlich zu erkennen, dass die Zugabe von 100 μM Mastoparan zum Messpuffer die Lebensdauer des Zwischenzustands signifikant erhöht. Der mittlere Level ist nun in allen Messkurven gut beobachtbar, was die Existenz eines obligatorischen Intermediats bestätigt. Die Tatsache, dass dieses kompetitive Experiment funktioniert, liefert zugleich eine erste Bestätigung für die strukturelle Interpretation des Intermediats. Schließlich besteht eine Voraussetzung für die Gelingen dieses Versuchs darin, dass im Zwischenzustand Calmodulin gefaltet aber das Peptid dissoziiert ist. Für DomC ist weiterhin kein Zwischenzustand zu erkennen (Abb. 7.4 B), dies lässt unmittelbar die Schlussfolgerung zu, dass skMLCK unter Kraft nicht stark genug mit einer einzelnen C-terminalen Domäne assoziiert um die Beobachtung von Bindung und Entbindung unter Kraft zu erlauben. Der einzige erkennbare Effekt von Mastoparan auf DomC besteht darin, dass die Übergangsrate sinkt und die Entfaltungskraft steigt, was sich, wie in Abschnitt 6.2 diskutiert, mit einer durch Mastoparan induzierten Erhöhung der mechanischen Stabilität von DomC erklären lässt.

Die deutlich erhöhte Lebensdauer des Zwischenzustands lässt sich nun auch dazu nutzen, die Konturlängenzuwächse der einzelnen Übergänge mit höherer Genauigkeit zu bestimmen. In Abb. 7.4 C ist eine Beispielkurve für CaM-skMLCK in Anwesenheit von Mastoparan gezeigt, die bei einer Ziehgeschwindigkeit von 10 nm/s aufgezeichnet wurde. WLC-Fits ermöglichen es, die oben gegebene strukturelle Interpretation der einzelnen Entfaltungsübergänge zu bestätigen. Im ersten Schritt dissoziiert skMLCK von CaM,

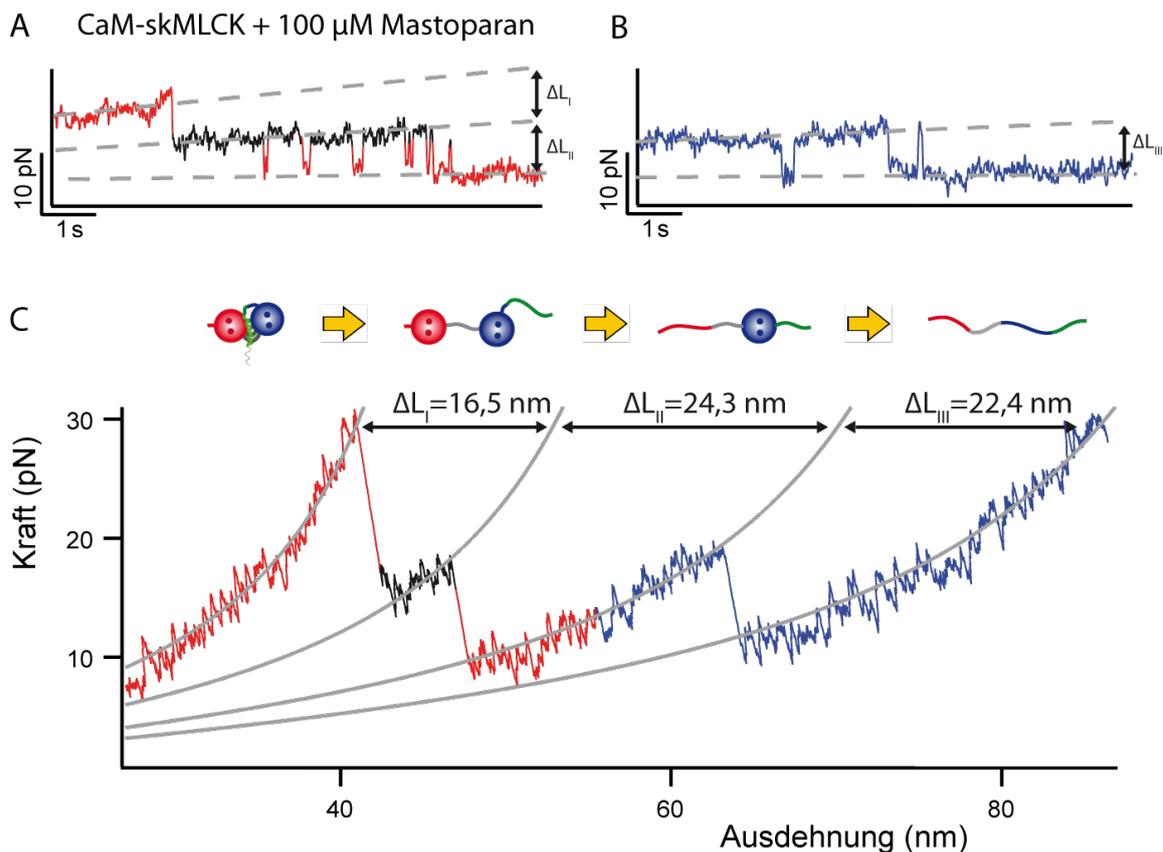


Abbildung 7.4: A+B. CaM-skMLCK + 100 μM Mastoparan, $v_{pull} = 1 \text{ nm/s}$. Die Lebensdauer des Intermediats im ersten Entfaltungsspeak (A) ist bei Anwesenheit von Mastoparan in der Pufferlösung deutlich erhöht (schwarzer Level). Der Zwischenzustand ist nun in allen Kurven deutlich sichtbar, es handelt sich also um ein obligatorisches Intermediat. Für den zweiten Entfaltungsspeak ist weiterhin kein Zwischenzustand auffindbar (B). C. Kraft-Abstands-Kurve von CaM-skMLCK, 100 μM Mastoparan, $v_{pull} = 10 \text{ nm/s}$. WLC-Fits ermöglichen eine eindeutige Zuordnung der Entfaltungsübergänge zu strukturellen Ereignissen. Im ersten Schritt dissoziiert skMLCK, dann entfalten DomN und schließlich DomC (siehe schematische Darstellung über der Beispielkurve).

7.2 Peptidbindungs- und -entbindungsübergänge von skMLCK und CaMKK

daraufhin entfaltet DomN und zuletzt DomC (siehe auch Schemazeichnungen über Abb. 7.4 C).

Eine detaillierte Analyse der Konturlängenzuwächse (siehe auch Tab. 7.1 und Konturlängenhistogramme in Abb. 7.6 A) modifiziert dieses Bild nur in einem Punkt: Der gemessene Wert für das erste Entfaltungsereignis von CaM-skMLCK ist mit $\Delta L_I = 16,5 \pm 1,4 \text{ nm}$ deutlich größer als der berechnete Wert für die Dissoziation von skMLCK (Abstände entnommen aus der Struktur von CaM mit gebundenem skMLCK, PDB-ID 2BBM [41]):

$$\begin{aligned}\Delta L_{skMLCK} &= 0,365 \text{ nm} \cdot (n_{skMLCK} + n_{spacer}) - d_{CaM-skMLCK} + d_{CaM} \\ &= 0,365 \text{ nm} \cdot (23 + 4) - 2,4 \text{ nm} + 1,7 \text{ nm} \\ &= 9,2 \text{ nm}\end{aligned}$$

Dies legt nahe, dass ein Teil des α -helikalen Interdomänenlinkers (ca. 15 Aminosäurereste) zusammen mit dem Target-Peptid entfaltet, was zu

$$\begin{aligned}\Delta L_{skMLCK} &= 0,365 \text{ nm} \cdot (n_{skMLCK} + n_{spacer} + n_{Linker}) - d_{CaM-skMLCK} + d_{DomN} + d_{DomC} \\ &= 0,365 \text{ nm} \cdot (23 + 4 + 15) - 2,4 \text{ nm} + 2,1 \text{ nm} + 1,4 \text{ nm} \\ &= 16,4 \text{ nm}\end{aligned}$$

führt. Die zwei darauf folgenden Entfaltungsereignisse führen zu einem gesamten Konturlängenzuwachs von $\Delta L_{II} + \Delta L_{III} = 46,7 \pm 1,3 \text{ nm}$, was nahe beim erwarteten Wert von $\Delta L_{CaM} = 0,365 \text{ nm} \cdot 133 - 2,1 \text{ nm} - 1,4 \text{ nm} = 45,4 \text{ nm}$ liegt. Die Tatsache, dass die α -Helix zusammen mit dem Target-Peptid skMLCK entfaltet zeigt, dass skMLCK die beiden Domänen von Calmodulin wie eine Klammer zusammenhält und dadurch den mechanisch instabilen Interdomänen-Linker von der Kraft abschirmt. Nach der Dissoziation von skMLCK wird die α -Helix der angelegten Kraft ausgesetzt und entfaltet daraufhin sofort.

Tabelle 7.1: Konturlängenzuwächse von CaM-skMLCK und CaM-CaMKK, bestimmt bei $v_{pull} = 10 \text{ nm/s}$ und $[\text{Mas}] = 100 \text{ } \mu\text{M}$. Der angegebene Fehler setzt sich aus dem Standardfehler des Mittelwerts zuzüglich eines systematischen Fehlers von 1,0 nm zusammen.

skMLCK(1-26)	skMLCK(1-18)	DomN _{skMLCK}	DomC _{skMLCK}
$16,5 \pm 1,4 \text{ nm}$	$15,5 \pm 1,3 \text{ nm}$	$24,3 \pm 1,3 \text{ nm}$	$22,4 \pm 1,3 \text{ nm}$
CaMKK N	DomN _{CaMKK}	CaMKK C	DomC _{CaMKK}
$12,9 \pm 1,3 \text{ nm}$	$17,7 \pm 1,4 \text{ nm}$	$11,1 \pm 1,2 \text{ nm}$	$22,8 \pm 1,2 \text{ nm}$

Zusammenfassend ist also festzuhalten, dass skMLCK in einem einzigen Schritt von Calmodulin dissoziiert, ohne dass teilweise gebundene Zustände beobachtet werden können. Die Bindung ist stark kooperativ, insbesondere bindet das Peptid nur an vollständig gefaltetes Calmodulin mit so hoher Affinität, dass kraftinduzierte Bindungs-/Entbindungsübergänge beobachtet werden können. Dieses Ergebnis ist vollständig vereinbar mit den Experimenten zur Faltung und Entfaltung von Calmodulin mit freiem skMLCK in Lösung (Abschnitt 6.3). Auch bei diesen Messungen zeigte sich, dass skMLCK vollständiges Calmodulin deutlich stärker stabilisiert als einzelne Domänen. Die Tatsache, dass bei freiem skMLCK die C-terminale Domäne von Calmodulin eine erhebliche Stabilisierung erfährt, während bei angehängtem skMLCK kein Zwischenzustand für den Entfaltungsspeak von DomC zu sehen ist, kann ebenfalls leicht verstanden werden:

7 Direkte Beobachtung von Peptidbindung und -entbindung

Bei einer diffusionslimitierten Bindungsrate von skMLCK lässt sich für die Bindung an DomC eine Dissoziationsrate von $k_{\text{off}} \sim 100 \text{ s}^{-1}$ abschätzen [11]. Diese Rate erhöht sich unter Kraft noch zusätzlich. Daraus folgt direkt, dass keine stabile, langlebige Bindung unter Kraft möglich sein kann.

Für die Interaktion von skMLCK mit Calmodulin ergibt sich also ein klares und in sich geschlossenes Bild. Doch wie lassen sich die Entfaltungskurven des CaM-CaMKK-Proteinkonstrukts interpretieren? In Abb. 7.5 A+B sind der erste und der zweite Entfaltungsspeak von CaM-CaMKK in Kraft-Zeit-Darstellung abgebildet. Wie bereits für CaM-skMKCK können etliche Gleichgewichtsübergänge für beide Entfaltungsspeaks beobachtet werden. Im Gegensatz zu CaM-skMLCK finden wir hier allerdings ein kurzlebige Intermediat für beide Entfaltungsereignisse (mittlere gestrichelte graue Linien). Diese beiden Zwischenzustände erscheinen zwar deutlich häufiger als das Intermediat von CaM-skMLCK, wegen der geringen Kraftsprünge zwischen den jeweiligen Niveaus ist die Identifizierung des Zwischenzustands bedingt durch das hier vergleichsweise schlechte Signal-zu-Rausch-Verhältnis aber erschwert. Die Tatsache, dass sich hier ein zusätzliches Intermediat beobachten lässt, legt nahe, dass das Target-Peptid CaMKK in zwei Schritten dissoziiert. Eine vorläufige Interpretation könnte sein, dass in Analogie zu den Experimenten mit CaM-skMLCK die mittleren Niveaus Zuständen entsprechen, bei denen der Peptidligand von der N-terminalen Domäne (A) bzw. von der C-terminalen Domäne (B) dissoziiert ist, während die betreffenden Domänen jeweils noch in gefalteter Form vorliegen.

Um diese Interpretation zu stützen und um eine deutliche Identifizierung der Intermediate zu ermöglichen, wurde erneut ein kompetitives Experiment mit Mastoparan in Lösung durchgeführt. In Abb. 7.5 C+D sind die Lebensdauern der intermediären Zustände deutlich erhöht, was direkt bestätigt, dass die Zwischenzustände Konformationen entsprechen, in denen das Peptid zumindest teilweise von Calmodulin dissoziiert ist. Durch WLC-Fits an Messkurven, die bei höheren Ziehgeschwindigkeiten aufgenommen wurden, lässt sich über eine Analyse der Konturlängenzuwächse eine strukturelle Interpretation der vier Entfaltungsübergänge vornehmen (Abb. 7.5 E). Wie erwartet weisen die vermutlichen Peptid-Dissoziationen ($\Delta L_I = 12,9 \pm 1,3 \text{ nm}$, $\Delta L_{III} = 11,1 \pm 1,2 \text{ nm}$) kürzere Konturlängenzuwächse auf als die Domänenentfaltungen ($\Delta L_{II} = 17,7 \pm 1,4 \text{ nm}$, $\Delta L_{IV} = 22,8 \pm 1,2 \text{ nm}$). Die Tatsache, dass ΔL_I kleiner als der erwartete Konturlängenzuwachs für die Dissoziation des vollständigen CaMKK-Peptids ist ($\sim 20 \text{ nm}$) zeigt deutlich, dass im ersten Entfaltungsschritt nicht das ganze Peptid, sondern nur ein relativ großer N-terminaler Teil des Peptids von CaM entbindet, während im dritten Schritt der C-terminale Teil (CaMKK C) dissoziiert. Zusammenfassend erhält man also folgendes Bild für die Reihenfolge der Entfaltungsübergänge: Zunächst dissoziiert ein N-terminaler Teil von CaMKK (CaMKK N) von der N-terminalen Domäne von CaM, welche dann im zweiten Schritt entfaltet. Als nächstes entbindet der C-terminale Teil von CaMKK (CaMKK C) von der C-terminalen Domäne von CaM, die dann zuletzt entfaltet. Die Abfolge der Ereignisse ist in den Schemazeichnungen oberhalb von Abb. 7.5 E schematisch dargestellt.

Eine detaillierte Analyse der Konturlängenzuwächse (Tab. 7.1, Konturlängenhistogramme in Abb. 7.6 B) modifiziert dieses Bild nur in einem Punkt: Für CaM-CaMKK erhalten wir einen Wert von $\Delta L_I + \Delta L_{III} = 24,0 \pm 1,3 \text{ nm}$ für die Summe der beiden Peptid-Dissoziationsübergänge, was deutlich über dem erwarteten Wert von

7.2 Peptidbindungs- und -entbindungsübergänge von skMLCK und CaMKK

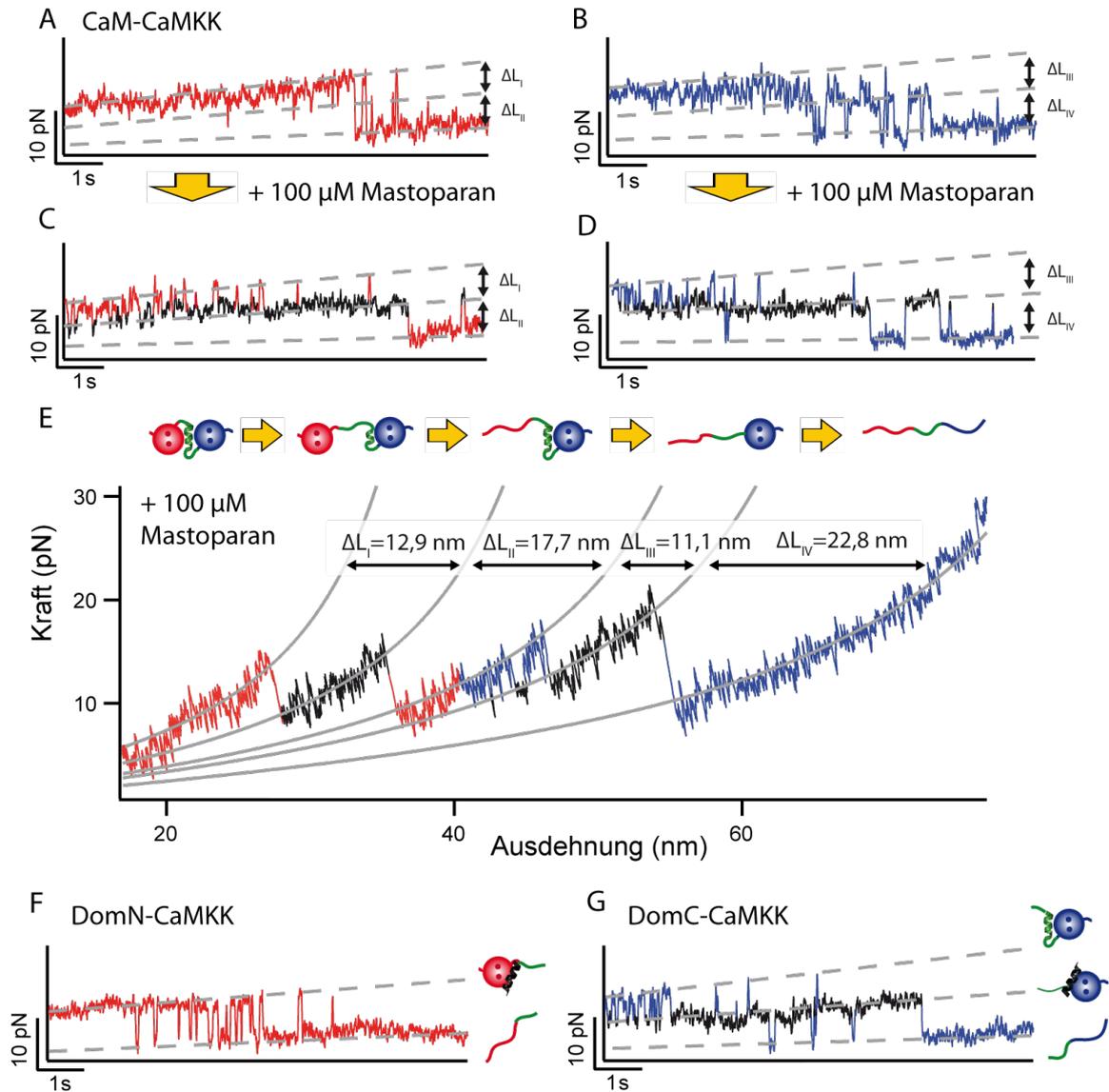


Abbildung 7.5: A+B. Kraft-Zeit-Kurven des ersten (A) und des zweiten (B) Entfaltungspeaks von CaM-CaMKK, $v_{pull} = 1 \text{ nm/s}$. Für beide Peaks ist ein kurzlebiger Zwischenzustand sichtbar. C+D. Durch Hinzugabe von $100 \mu\text{M}$ Mastoparan lässt sich das Intermediat in beiden Peaks stabilisieren. E. Kraft-Abstands-Kurve von CaM-CaMKK, $100 \mu\text{M}$ Mastoparan, $v_{pull} = 10 \text{ nm/s}$. WLC-Fits ermöglichen eine eindeutige Zuordnung der Entfaltungsereignisse zu strukturellen Ereignissen. Im ersten Schritt dissoziiert der N-terminale Teil von CaMKK (CaMKK N) von DomN, daraufhin entfaltet DomN. Als nächstes entbindet der verbleibende C-terminale Teil von CaMKK (CaMKKC) von DomC, welche schließlich als letztes entfaltet (siehe schematische Darstellung über der Beispielkurve). F+G. Interaktion von isolierten Domänen mit CaMKK, $10 \mu\text{M}$ Mastoparan. Für DomN-CaMKK lässt sich kein Intermediat feststellen, was einer nur geringen Affinität von DomN zu CaMKK entspricht (F). Für DomC-CaMKK dagegen finden wir einen Zwischenzustand, das Peptid bindet also bereits an eine einzelne C-terminale Domäne sehr stark (G).

7 Direkte Beobachtung von Peptidbindung und -entbindung

$$\begin{aligned}\Delta L_{CaMKK} &= 0,365 \text{ nm} \cdot (n_{CaMKK} + n_{Spacer} + n_{Linker}) - d_{CaM-CaMKK} + d_{DomN} + d_{DomC} \\ &= 0,365 \text{ nm} \cdot (26 + 8 + 15) - 1,2 \text{ nm} + 1,9 \text{ nm} + 1,5 \text{ nm} \\ &= 20,1 \text{ nm}\end{aligned}$$

liegt, während die Summe der beiden Calmodulin-Entfaltungsereignisse, $\Delta L_{II} + \Delta L_{IV} = 40,5 \pm 1,4 \text{ nm}$, kleiner als der Erwartungswert

$$\Delta L_{CaM} = 0,365 \text{ nm} \cdot 133 - 1,9 \text{ nm} - 1,5 \text{ nm} = 45,1 \text{ nm}$$

ist (Abstände entnommen aus der Struktur von CaM mit gebundenem CaMKK, PDB-ID 1CKK [61]). Da der geringere Konturlängenzuwachs durch Entfaltung von CaM sich ausschließlich auf die N-terminale Domäne zurückführen lässt ($\Delta L_{II} = 17,7 \pm 1,4 \text{ nm}$, im Vergleich zu einem erwarteten Wert von $\Delta L_{DomN} \approx 24 \text{ nm}$), können wir davon ausgehen, dass ein Teil von CaMKK N an DomC zurückbindet, wenn DomN entfaltet. Dadurch verkürzt sich der effektive Konturlängenzuwachs ΔL_{II} um einige Nanometer, während sich ΔL_{III} entsprechend verlängert. Mit $\Delta L_{IV} = 22,8 \pm 1,2 \text{ nm}$ stimmt der Konturlängenzuwachs nach Entfaltung von DomC aus CaM-CaMKK sehr gut mit dem früher ermittelten Wert für die entsprechende Domäne aus CaM-skMLCK ($22,4 \pm 1,3 \text{ nm}$) überein (Tab. 7.1). Der Gesamtkonturlängenzuwachs von CaM-CaMKK entspricht mit $\Delta L_I + \Delta L_{II} + \Delta L_{III} + \Delta L_{IV} = 64,5 \text{ nm}$ sehr gut dem Erwartungswert, was eine hohe Genauigkeit der Längenmessungen nahelegt:

$$\begin{aligned}\Delta L_{CaM-CaMKK} &= 0,365 \text{ nm} \cdot (n_{CaM} + n_{CaMKK} + n_{Spacer}) - d_{CaM-CaMKK} \\ &= 0,365 \text{ nm} \cdot (148 + 26 + 8) - 1,9 \text{ nm} \\ &= 65,2 \text{ nm}\end{aligned}$$

Aus den bislang gezeigten Daten geht noch nicht hervor, ob die beobachtete Interaktion zwischen CaMKK und DomN die Anwesenheit von gefalteter DomC erfordert, d.h. ob gefaltete und Ca^{2+} -geladene DomN ausreichend für die Bindung an CaMKK ist. Aus diesem Grunde wurde DomC aus dem CaM-CaMKK-Proteinkonstrukt entfernt (DomN-CaMKK). Für dieses Proteinkonstrukt lässt sich kein Zwischenzustand detektieren (Abb. 7.5 F). Daraus lässt sich schließen, dass eine isolierte N-terminale Domäne von Calmodulin nicht ausreichend für eine starke Bindung an CaMKK ist. Die Beobachtung, dass der N-terminale Teil von CaMKK nur an vollständig gefaltetes Calmodulin binden kann, weist auf einen kooperativen Bindungsmodus hin, bei dem beide Domänen mit dem Peptid-Segment interagieren müssen, um die Bildung einer starken Assoziation zu ermöglichen. Wie erwartet können wir im DomC-CaMKK-Proteinkonstrukt, in dem DomN entfernt wurde, weiterhin Bindungs-/Entbindungsübergänge detektieren (Abb. 7.5 G). Die gemessenen Konturlängenzuwächse und Dissoziationskräfte stimmen genau mit den Werten für die entsprechenden Übergänge in vollständigem CaM-CaMKK überein. Dies stellt eine weitere Bestätigung der obigen Interpretation der vier Entfaltungsereignisse in Abb. 7.5 E dar.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass CaMKK in zwei Schritten von Calmodulin dissoziiert – zuerst von der N-terminalen Domäne, dann von der C-terminalen Domäne. Gleichzeitig konnte ein bislang nicht bekannter Bindungsmodus von CaMKK identifiziert werden, bei dem das Peptid mit sehr hoher Affinität an eine isolierte C-terminale Domäne von Calmodulin bindet. Die Dissoziationskonstante von CaMKK zu DomC ist also deutlich niedriger als die von skMLCK oder Mastoparan, die im Bereich $\sim 10^{-7} \text{ M}$ liegt [2,52]

7.2 Peptidbindungs- und -entbindungsübergänge von skMLCK und CaMKK

(siehe auch Abschnitt 6.3). Bei Experimenten mit freiem CaMKK in Lösung wäre zu erwarten, dass sich in Analogie zu den hier vorgestellten Ergebnissen eine stärkere Stabilisierung von DomC und eine schwächere Stabilisierung von DomN aus vollständigem CaM im Vergleich zu skMLCK ergibt. Solche Untersuchungen könnten auch die Berechnung der Dissoziationskonstante von CaMKK für DomC ermöglichen, was bei Experimenten mit in das Proteinkonstrukt integriertem Peptid nicht ohne Weiteres möglich ist, da die effektive Ligandenkonzentration für ein solches Szenario nur schwer zu bestimmen ist.

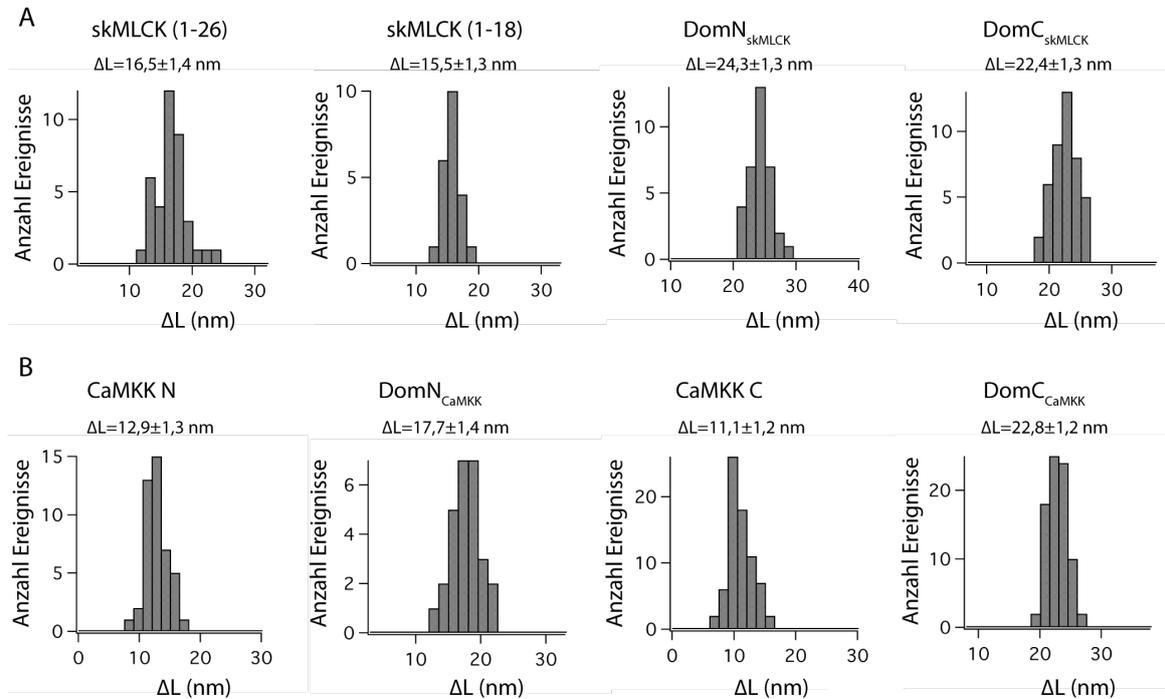


Abbildung 7.6: Konturlängenzuwächse von CaM-skMLCK (A) und CaM-CaMKK (B) aus WLC-Fits an die Messkurven. Alle hier analysierten Daten wurden bei $v_{pull} = 10 \text{ nm/s}$, $[\text{Ca}^{2+}] = 10 \text{ mM}$ und $[\text{Mas}] = 100 \text{ }\mu\text{M}$ aufgenommen.

Diskussion

Die in diesem Kapitel vorgestellte Methode erlaubt es, Ligandenbindung auf die gleiche Weise wie zuvor Proteinfaltung durch Einzelmolekül-Kraftspektroskopie mit dem AFM zu untersuchen. Hierzu wurden die Target-Peptide auf DNA-Ebene in geeigneter Weise mit Calmodulin verbunden, so dass kraftinduzierte Bindungs- und Entbindungs-Übergänge der Liganden im Gleichgewicht beobachtet werden konnten. Das Peptid skMLCK wurde dabei mit dem C-Terminus von Calmodulin verbunden, CaMKK wurde aus strukturellen Gründen in den Interdomänen-Linker von CaM integriert. Für beide Konstrukte war die Hierarchie von Peptid-Dissoziation und Domänenentfaltung in allen Messkurven gewahrt. Des weiteren konnten Unterschiede in der Interaktion der beiden Peptide mit Calmodulin gefunden werden. Insbesondere war es möglich, einen neuen Bindungsmodus zu identifizieren, bei dem CaMKK bereits mit sehr hoher Affinität an eine isolierte C-terminale Domäne von Calmodulin bindet.

Nun ließe sich einwenden, dass die beobachteten Unterschiede zwischen CaM-skMLCK

und CaM-CaMKK möglicherweise nur auf die unterschiedliche Geometrie der Proteinstrukturen zurückzuführen sein könnten. In der Tat wäre ein solcher Effekt theoretisch denkbar, da beispielsweise in CaM-skMLCK das Peptid direkt mit Kraft belastet wird, während DomC zunächst weitgehend von Kraft abgeschirmt ist, während bei CaM-CaMKK das Peptid nur über die beiden Domänen einer Kraft ausgesetzt wird, an denen die Kraft direkt anliegt (siehe auch Abb. 7.1 B). Für die vielleicht wichtigste Aussage des Kapitels, die hohe Affinität von CaMKK zu DomC, lässt sich diese Vermutung allerdings weitgehend entkräften. Denn nach Entfaltung von DomN besteht kein grundsätzlicher Unterschied mehr zwischen den Geometrien der beiden Konstrukte: Sowohl für CaM-skMLCK als auch für CaM-CaMKK werden sowohl das Peptid als auch die verbleibende DomC mit Kraft belastet. Gleichwohl beobachten wir Gleichgewichtsübergänge für CaMKK, aber nicht für skMLCK, woraus wir direkt auf einen deutlichen Unterschied in der Affinität für DomC schließen können. Grundsätzlich liefert die hier vorgestellte Methode ein deutlich detaillierteres Bild der Ligandenbindung als die in Kapitel 6 vorgestellten Experimente mit freiem Peptid in Lösung. Im Gegensatz zu diesen Messungen werden hier die einzelnen Schritte der Liganden-Dissoziation direkt aufgelöst, zudem erhält man Zugriff auf die Kinetik der Bindungs- und Entbindungsereignisse.

Was könnte die potentielle physiologische Rolle des hier identifizierten neuen Bindungsmodus von CaMKK sein, bei dem das Peptid mit hoher Affinität an DomC bindet? Zur Diskussion dieser Frage ist es sinnvoll, sich in Erinnerung zu rufen, dass die beiden Domänen von Calmodulin deutlich unterschiedliche Dissoziationskonstanten für Ca^{2+} haben [2, 56]. DomC bindet Ca^{2+} mit signifikant höherer Affinität als DomN, so dass bei einem vergleichsweise schwachen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nur die C-terminale Domäne von Calmodulin in Ca^{2+} -gesättigter Form vorliegt. Eine solche teilweise Ca^{2+} -gesättigte Form von Calmodulin könnte nun bereits mit hoher Affinität an CaMKK binden, während die Bindung an andere Target-Peptide wie beispielsweise skMLCK noch schwach wäre. Über die Intensität eines Ca^{2+} -Signals ließe sich CaMKK so von anderen Target-Sequenzen unterscheiden. Eine solche Feinsteuerung des Ca^{2+} -Signal systems könnte für CaMKK von besonderer Bedeutung sein, da sich dieses Enzym an der Spitze etlicher Signalkaskaden befindet (siehe Abb. 7.7) [85]. Insbesondere sind einige der Ziel-Kinasen von CaMKK wiederum von Calmodulin reguliert, beispielsweise CaMKI und CaMKIV (*calmodulin dependent kinase I / IV*). Diese Enzyme könnten bei niedrigem Ca^{2+} in einem inaktiven Zustand gefangen bleiben, da sie zu ihrer Aktivierung nicht nur Phosphorylierung durch aktiviertes CaMKK, sondern zusätzlich noch die Bindung von vollständig Ca^{2+} -gesättigtem Calmodulin benötigen würden. Nicht-Calmodulin-abhängige Zielproteine von CaMKK wie PKB (*protein kinase B*) könnten dagegen auf diese Weise bereits bei niedrigerem Ca^{2+} aktiviert werden.

Zusammenfassend können wir festhalten, dass für die drei bislang untersuchten Target-Peptide skMLCK, CaMKK und Mastoparan unterschiedliche Grade an Bindungskoopertivität auftreten. Das Peptid skMLCK bindet nur an vollständiges Calmodulin mit hoher Affinität, zeigt also eine sehr starke Interdomänen-Bindungskoopertivität. Für CaMKK finden wir einen mittleren Grad an Koopertivität, da DomC für eine starke Bindung ausreicht, während DomN dafür zusätzlich das Zusammenspiel mit gefalteter DomC benötigt. Mastoparan schließlich bindet, wie in Abschnitt 6.3 diskutiert, mit einer Stöchiometrie von 2:1 an Calmodulin. Beide Domänen binden dabei unabhängig voneinander an das Target-Peptid, ohne sich in nennenswerter Weise zu beeinflussen. Für Mastoparan besteht also keine detektierbare Bindungskoopertivität zwischen den beiden Domänen von Calmodulin.

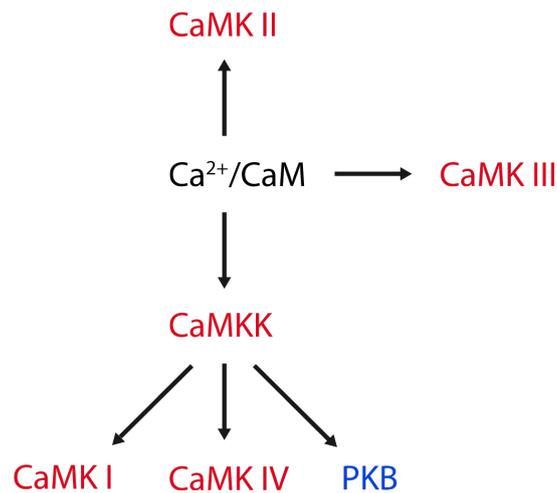


Abbildung 7.7: Ausschnitt aus den Signalübertragungswegen Calmodulin-abhängiger Kinasen. Schwarze Pfeile geben die Aktivierungsrichtung an. Kinasen, die durch Calmodulin reguliert werden, sind rot dargestellt, andere Kinasen sind blau eingezeichnet.

Solche Unterschiede im Bindungsmodus können möglicherweise eine physiologische Rolle für die Unterscheidung verschiedener Signalkaskaden spielen. Es wäre daher interessant, in zukünftigen Experimente weitere Target-Peptide von Calmodulin mit dieser Methode zu untersuchen. Nützlich kann die hier vorgestellte Technik vor allem für solche Peptid-Liganden sein, für die bislang keine Strukturen oder keine detaillierten Bindungsstudien vorhanden sind. Besondere Bedeutung kommt dabei der Klasse der *IQ-Repeats* zu [88, 1]. Diese Peptide binden auch an Ca^{2+} -freies Calmodulin, Hinzugabe von Ca^{2+} führt möglicherweise zu Änderungen von Stöchiometrie und Bindungsmodus. In diesem Zusammenhang sind Experimente bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen von größtem Interesse.

7.3 Detaillierte Analyse der Peptidbindungen

Nachdem im letzten Abschnitt die Entfaltungsmuster von CaM-skMLCK und CaM-CaMKK analysiert und Unterschiede im Bindungsmodus identifiziert wurden, soll nun eine etwas detailliertere Analyse des Bindungsverhaltens der beiden Peptide folgen. Dazu werden Kürzungsmutanten von skMLCK und CaMKK erstellt, um Schlüsselaminosäuren für die Assoziation und minimale Bindungsmotive zu identifizieren. Ebenso werden auch smMLCK, die MLCK-Variante aus der glatten Muskulatur (*smooth muscle myosin light chain kinase*) und Mastoparan mit der vorgestellten Methode von an Calmodulin angefügten Peptidliganden untersucht. Abschließend werden erste Schritte zu einer quantitativen Analyse der Bindungs- und Dissoziationskinetik von skMLCK und CaMKK unternommen.

Tabelle 7.2: Mittlere Dissoziationskräfte verschiedener Targetpeptide von CaM unter Gleichgewichtsbedingungen. Der Fehler wurde als Standardfehler des Mittelwerts zuzüglich eines systematischen Fehlers von 2 % aus der Cantilever-Eichung berechnet.

skMLCK(1-26)	skMLCK(1-18)	smMLCK	CaMKK N	CaMKK C
$19,3 \pm 0,8$ pN	$16,8 \pm 0,7$ pN	$16,6 \pm 0,7$ pN	$14,5 \pm 0,6$ pN	$15,4 \pm 0,6$ pN

7 Direkte Beobachtung von Peptidbindung und -entbindung

In der skMLCK-Sequenz, die aus 26 Aminosäuren besteht, entsprechen Aminosäuren 5 bis 17 dem kanonischen Calmodulin-Bindungsmotiv (Tab. 4.1), das durch ein Muster charakteristischer hydrophober Aminosäuren gekennzeichnet ist. In den meisten Bindungsstudien wurde bislang ein gekürztes Peptid, skMLCK(1-18), verwendet, das das vollständige hydrophobe Motiv enthält [30, 39]. In Abb. 7.8 A+B sind Beispielkurven für CaM-skMLCK(1-18) in Anwesenheit von Mastoparan gezeigt. Es erscheint wiederum ein Zwischenzustand für DomN (Abb. 7.8 A) aber nicht für DomC (Abb. 7.8 B), so dass dieses Proteinkonstrukt qualitativ das gleiche Bindungs-/Entbindungsverhalten wie CaM-skMLCK(1-26) aufweist. Eine detailliertere Analyse der mittleren Dissoziationskräfte zeigt allerdings, dass die Kräfte für das verkürzte Peptid etwas niedriger sind (Tab. 7.2). Dieses Ergebnis legt nahe, dass die C-terminalen Aminosäuren von skMLCK nach Phe17 eine wichtige Rolle zur Optimierung der Bindungsstärke spielen.

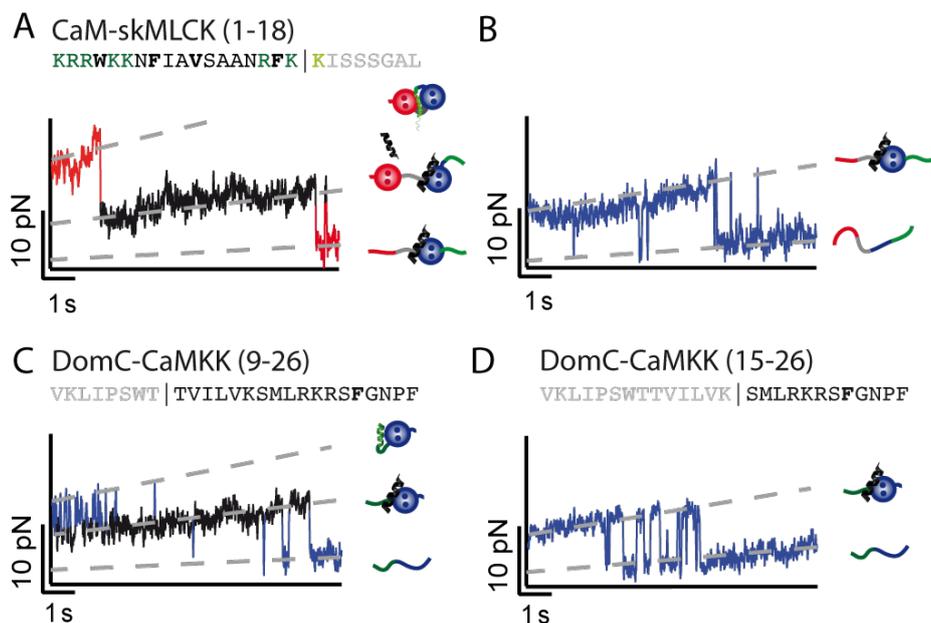


Abbildung 7.8: Kürzungsmutanten von skMLCK und CaMKK. A+B. Kraft-Zeit-Kurve von CaM-skMLCK (1-18) 100 μ M Mastoparan, $v_{pull}=1$ nm/s. Für DomN zeigt sich ein Zwischenzustand (A) für DomC dagegen nicht (B). Qualitativ entsprechen die Daten also dem ungekürzten CaM-skMLCK(1-26). Wie zuvor sind charakteristische hydrophobe Aminosäurereste fett gedruckt, direkt daran anschließende geladene Aminosäuren sind grün gezeigt. Die vom Peptid entfernten Aminosäuren werden hier in grau bzw. hellgrün dargestellt. C+D. Kraft-Zeit-Kurve von CaM-CaMKK (9-26) (C) und von CaM-skMLCK (15-26) (D), jeweils 10 μ M Mastoparan, $v_{pull}=1$ nm/s. Während der intermediäre Zustand für CaM-CaMKK (9-26) noch unverändert vorhanden ist, lässt sich für CaM-CaMKK (15-26) kein Zwischenzustand mehr feststellen. Die minimale Bindungssequenz von CaMKK für die Assoziation mit DomC beginnt also zwischen Aminosäuren 9 und 14.

Als nächstes wurde die minimale Sequenz von CaMKK ermittelt, die für eine starke Bindung an DomC nötig ist. Dazu wurden zwei Kürzungsmutanten erstellt, bei denen die 8 bzw. 14 N-terminalen Aminosäurereste von CaMKK aus dem DomC-CaMKK-Proteinkonstrukt entfernt wurden (Abb. 7.8 C+D). CaMKK(9-26) bindet weiterhin so stark an DomC, dass mittlere Dissoziationskräfte und Konturlängenzuwächse ununterscheidbar vom vollständigen CaMKK sind (Abb. 7.8 C, siehe auch Tab. 7.3). Dies bedeutet insbesondere, dass die charakteristische hydrophobe Aminosäure Trp7 aus CaMKK, die im Komplex

mit vollständigem Calmodulin mit DomN interagiert, nicht an eine isolierte C-terminale Domäne bindet. Werden die nächsten 6 Aminosäuren entfernt (CaM-CaMKK(15-26)), so lässt sich keine Bindung an DomC mehr feststellen (Abb. 7.8 D). Daraus kann man schließen, dass das minimale Bindungsmotiv von CaMKK für die Bindung an DomC zwischen Aminosäureresten 9 und 14 von CaMKK beginnt.

Tabelle 7.3: Konturlängenzuwächse und Dissoziationskräfte von DomC-CaMKK(1-26) und DomC-CaMKK(9-26).

Konstrukt	ΔL_{CaMKK}	ΔL_{DomC}	F_{Diss}
DomC-CaMKK(1-26)	$11,5 \pm 1,4 \text{ nm}$	$23,1 \pm 1,4 \text{ nm}$	$15,1 \pm 0,6 \text{ pN}$
DomC-CaMKK(9-26)	$11,2 \pm 1,4 \text{ nm}$	$22,7 \pm 1,3 \text{ nm}$	$15,3 \pm 0,5 \text{ pN}$

Um die beobachtete Ligandenbindungskinetik zu Nullkraft zu extrapolieren, wurden wie in Abschnitt 6.1 ergänzende Messungen der Ziehgeschwindigkeitsabhängigkeit der Dissoziationskräfte von skMLCK und CaMKK unter Nichtgleichgewichtsbedingungen durchgeführt. Auf diese Weise lassen sich k_{off} und Δx_{N-TS} bestimmen. Daraufhin wird in Monte-Carlo-Simulationen die Bindungsrate k_{on} variiert, bis die experimentellen Daten unter Gleichgewichtsbedingung durch die Simulationen reproduziert werden (siehe auch Anhang A.5). Die mittleren Entbindungskräfte für vollständiges skMLCK und für das gekürzte Peptid skMLCK (1-18) unter Nichtgleichgewichtsbedingungen sind in Abb. 7.9 A gezeigt. Wie zuvor unter Gleichgewichtsbedingungen liegt die mittlere Dissoziationskraft von skMLCK(1-18) bei allen Ziehgeschwindigkeiten unter der von skMLCK(1-26). Für skMLCK(1-18) finden wir eine ca. zehnfach höhere Dissoziationsrate k_{off} als für skMLCK(1-26), während die Potentialbreite Δx_{N-TS} ungefähr gleich bleibt (siehe Energielandschaften in Abb. 7.9 B). Die angegebenen Bindungsraten k_{on} können hier nur als eine grobe Orientierung dienen, die Genauigkeit liegt im Rahmen einer Größenordnung. Grund dafür ist vor allem, dass hier Übergänge zwischen drei Zuständen beobachtet werden, so dass Fehler bei der Bestimmung der Faltungs- und Entfaltungsrate auch die Bindungs- und Entfaltungsrate beeinflussen.

In einer weiteren Reihe von Experimenten wurde auch die Ziehgeschwindigkeitsabhängigkeit der Dissoziationskräfte von CaMKK gemessen. In Abb. 7.9 C sind die mittleren Entbindungskräfte für die zwei Dissoziationsübergänge von CaMKK (CaMKK N und CaMKK C) bei unterschiedlichen Ziehgeschwindigkeiten abgebildet. Die Dissoziationskräfte von CaMKK N liegen $\sim 1 \text{ pN}$ unter den entsprechenden Werten für DomC, was erneut zeigt, dass eine sehr starke Interaktion von CaMKK mit DomC stattfindet. In der extrapolierten Energielandschaft unter Nullkraft-Bedingungen finden wir etwas größere Werte für die Potentialbreite Δx_{N-TS} als bei skMLCK (Abb. 7.9 D). Die Lebensdauern des gebundenen Zustands sind für vollständiges Calmodulin und für DomC von der Größenordnung $\sim 100 \text{ s}$, ähnlich zu den für skMLCK gefundenen Werten.

Abschließend wurden weitere Experimente mit anderen Target-Peptiden bzw. mit anderen Kürzungsmutanten durchgeführt. In Abb. 7.10 A+B sind Messkurven von CaM-skMLCK(1-18) und von CaM-skMLCK(4-17), also der minimalen Peptidlänge, die mit dem Erhalt des vollen hydrophoben Aminosäuremotivs vereinbar ist, gegenübergestellt. Wie zu erkennen ist, findet für CaM-skMLCK(4-17) keine detektierbare Bindung an CaM mehr statt. Wir finden hier also eine wichtige Rolle für die geladenen Aminosäuren am N-Terminus von skMLCK für eine Bindung mit hoher Affinität. Diese geladenen

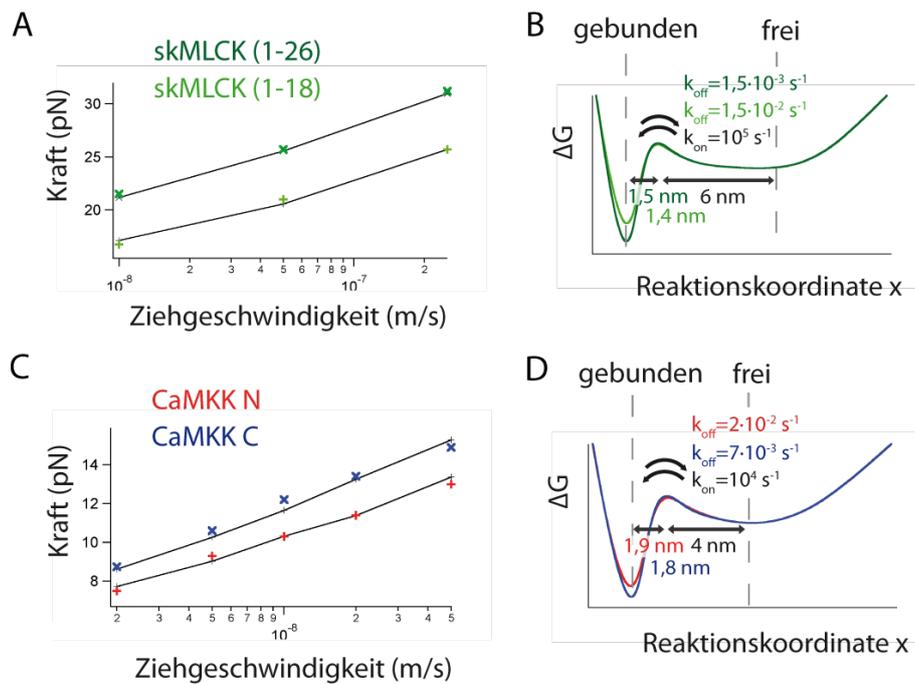


Abbildung 7.9: A. Geschwindigkeitsabhängigkeit der mittleren Dissoziationskraft (erster Peak in den Messkurven) von skMLCK(1-26) (dunkelgrün) und skMLCK(1-18) (hellgrün) unter Nichtgleichgewichtsbedingungen. Ergebnisse von Monte Carlo-Simulationen sind in schwarz gezeichnet. B. Berechnete Energielandschaft bei Nullkraft für die Bindung/Entbindung von skMLCK(1-26) und skMLCK(1-18) an CaM. C. Dissoziationskräfte in Abhängigkeit von der Ziehgeschwindigkeit für CaMKK N (erster Peak in den Messkurven) und CaMKK C (dritter Peak in den Messkurven) sind in rot und blau dargestellt. Da bei niedrigen Ziehgeschwindigkeiten Gleichgewichtsbedingungen vorliegen, wurde hier jeweils der erste Entfaltungsübergang in die Analyse einbezogen. Ergebnisse von Monte Carlo-Simulationen sind in schwarz gezeigt. D. Berechnete Energielandschaft bei Nullkraft für die Bindung/Entbindung von CaMKK N und CaMKK C.

Aminosäurereste werden in der Literatur überwiegend im Zusammenhang mit der Orientierung des Peptids in der Bindungstasche diskutiert [88, 61]. Ferner dissoziiert die MLCK-Variante aus der glatten Muskulatur, smMLCK, bei ähnlichen Kräften wie skMLCK(1-18) von Calmodulin (Abb. 7.10 C, Tab. 7.2), wohingegen für C-terminal an Calmodulin angefügtes Mastoparan keine Bindung mit hoher Affinität unter Kraft detektiert werden kann (Abb. 7.10 D). Mastoparan kann also anscheinend nicht in eine 1:1 Stöchiometrie mit einer zu skMLCK vergleichbaren hohen Affinität gezwungen werden. Dies bestätigt das frühere Resultat einer 2:1 Stöchiometrie von Mastoparan mit niedrigeren Affinitäten zu Calmodulin (siehe auch Abschnitt 6.3).

Es ließe sich einwenden, dass das Fehlen einer detektierbaren starken Bindung von skMLCK(4-17) und Mastoparan an Calmodulin möglicherweise dadurch verursacht sein könnte, dass diese Peptide mit 14 Aminosäuren zu kurz sein könnten, um bei Anhängen an den C-Terminus von Calmodulin korrekt in die Bindungstasche eingefügt zu werden. Um dies auszuschließen, wurden am N- und am C-Terminus von skMLCK(4-17) und Mastoparan kurze Peptidspacer hinzugefügt (Wiederholungen der Sequenz AGSA mit verschiedenen Längen), um zu skMLCK(1-26) vergleichbare Peptid-Längen herzustellen. Doch auch für solche Proteinkonstrukte ließ sich keine unter Kraft messbare Interaktion der beiden Peptide mit Calmodulin feststellen.

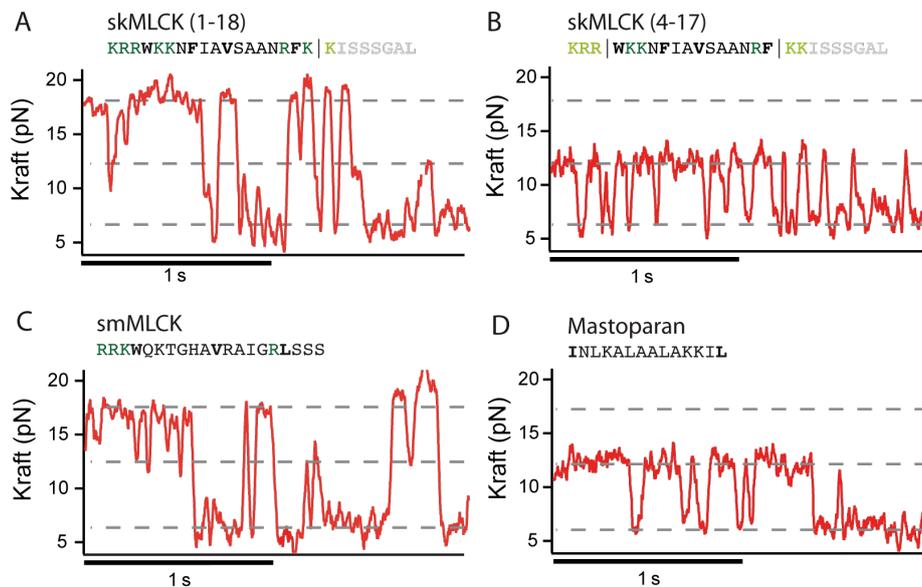


Abbildung 7.10: Kraft-Zeit-Kurven der Übergangsregion von DomN. A. CaM-skMLCK(1-18), B. CaM-skMLCK(4-17), C. CaM-smMLCK, D. CaM-Mastoparan. Während für CaM-skMLCK(1-18) und CaM-smMLCK ein Zwischenzustand detektiert werden kann, gibt es bei CaM-skMLCK(4-17) und CaM-Mastoparan kein entsprechendes Intermediat. Dies legt nahe, dass keine hinreichend stabile Bindung zwischen CaM und den beiden letztgenannten Peptiden geformt werden kann. In der Aminosäuresequenz der Targetpeptide sind charakteristische hydrophobe Aminosäuren fett gedruckt. Entfernte Aminosäuren sind in grau bzw. hellgrün dargestellt.

Diskussion

Zusammenfassend können wir festhalten, dass sich mit der vorgestellten Methode ein sehr detailliertes Bild der Interaktion von Target-Peptiden mit Calmodulin gewinnen

lässt. Insbesondere zeigt sich deutlich, dass das Muster hydrophober Aminosäuren, das vorwiegend zur Charakterisierung von CaM-Target-Sequenzen herangezogen wird [88], keine vollständige Beschreibung der Peptide liefern kann. Für skMLCK finden wir, dass sich bei einer C-terminalen Verkürzung des Peptids die Dissoziationsrate um einen Faktor 10 erhöhen lässt. Zusätzliches Entfernen der geladenen Aminosäuren am N-Terminus senkt die Affinität so weit ab, dass keine Bindungs-/Entbindungsereignisse unter Kraft mehr beobachtet werden können. Für CaMKK stellen wir fest, dass das Peptid auch nach Entfernen des ersten von nur zwei charakteristischen hydrophoben Resten mit unveränderter Affinität an DomC bindet. Für smMLCK lässt sich der gleiche Bindungsmodus wie für skMLCK feststellen, darüber hinaus scheinen die Affinitäten ähnlich zu sein. Interessanterweise lässt sich Mastoparan auch bei Anbindung an den C-Terminus von Calmodulin nicht in einen zu skMLCK vergleichbaren Bindungsmodus mit Stöchiometrie 1:1 und hoher Affinität zwingen.

Eine große Stärke der hier vorgestellten Methode ist es, dass starke Ligandenbindungen sich sehr deutlich von schwächeren Interaktionen unterscheiden lassen. Während erstere durch Gleichgewichtsübergänge ein deutliches Signal in den Messkurven verursachen, können bei letzteren keine Dissoziationsereignisse unter Kraft beobachtet werden. Quantitative Informationen ließen sich hier durch Experimente mit variierender Ziehgeschwindigkeit in Kombination mit Monte-Carlo-Simulationen gewinnen. Für alle im Detail untersuchten Bindungsereignisse (skMLCK(1-26), skMLCK(1-18), CaMKK N, CaMKK C) konnten Lebensdauern des gebundenen Zustands von ~ 100 s extrapoliert werden. Interessanterweise haben die "echten" Calmodulin-Targetsequenzen deutlich längere Bindungsdauern als das Wespengift Mastoparan ($\sim 0,01$ s, abgeschätzt aus der gemessenen Affinität bei Annahme einer diffusionslimitierten Bindungsrate [11]). Solche langen Lebensdauern können möglicherweise eine wichtige physiologische Rolle spielen, da Ca^{2+} -Signale häufig in Form kurzlebiger Spikes auftreten [4, 34], so dass, falls nötig, eine Signalkaskade länger aktiviert werden kann als das Ca^{2+} -Signal andauert. Außerdem übersteigt die Anzahl an Target-Sequenzen in Zellen oft die Konzentration an Ca^{2+} -gesättigtem Calmodulin, so dass bei limitierendem Calmodulin eine lange Bindungsdauer für zuverlässige Signalweitergabe wichtig sein könnte [81].

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Experimente zeigen auf, auf welche Weise mit der hier entwickelten Methode ein noch detaillierteres Bild der Interaktion von Peptidliganden mit Calmodulin erreicht werden könnte. Eine genauere Analyse der Assoziations- und Dissoziationskinetik durch hochauflösende Daten, beispielsweise mit optischen Pinzetten, könnte ein noch wesentlich genaueres Bild der Ligandeninteraktion zeichnen. Im Prinzip kann durch Kürzungsmutanten und andere Mutationen der Beitrag einzelner Aminosäuren auf die Affinität von Target-Peptiden untersucht werden. Auf diese Weise werden sich in zukünftigen Arbeiten detaillierte Informationen über weitere Target-Peptide von Calmodulin gewinnen lassen.

8 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse aus Kapitel 6 und 7 zeigen, dass die hier vorgestellte Methode es erlaubt, durch Anlegen mechanischer Kraft die Kinetik von Faltungs-/Entfaltungs- und Bindungs-/Entbindungs-Prozessen auf sehr präzise Weise zu kontrollieren. Proteine und Protein-Ligand-Komplexe können schrittweise durch ihre komplexe Energielandschaft vom vollständig gefalteten und ligandenbindenden Zustand bis zum vollständig entfalteten Zustand gesteuert werden. Verschiedene Prozesse können damit getrennt voneinander beobachtet werden, was mit herkömmlichen Methoden nur schwer zu erreichen ist. So lassen sich beispielsweise beide Domänen von Calmodulin nacheinander entfalten, ebenso kann die Peptid-Dissoziation von der Proteinentfaltung getrennt werden. Die Kinetik von Gleichgewichtsübergängen kann dabei auf eine komfortable zu beobachtende Zeitskala von Sekunden bzw. Sekundenbruchteilen verschoben werden. Die Möglichkeit, die Geschwindigkeit verschiedenster an eine Längenänderung gekoppelter Reaktionen gezielt zu verändern, stellt einen der wesentlichen Vorteile von Einzelmolekül-Kraftspektroskopie dar. Hier werden erstmals Gleichgewichtsübergänge der Proteinfaltung und der Ligandenbindung mechanisch induziert und direkt auf Einzelmolekülebene beobachtet. Bei Messungen im Gleichgewicht ist der Informationsgehalt gegenüber früheren Nichtgleichgewichts-Experimenten erheblich erhöht. Die Tatsache, dass Kraft gleichzeitig zur Steuerung und auch zur Detektion von molekularen Vorgängen genutzt wird, unterscheidet diese Technik fundamental von Einzelmolekül-Fluoreszenz-Methoden, bei denen das zu untersuchende System idealerweise durch Fluoreszenzmarkierung und Beleuchtung nicht nennenswert beeinflusst wird.

In den hier vorgestellten Experimenten konnten nicht nur erstmals mechanisch induzierte Gleichgewichtsübergänge von Calmodulin beobachtet werden, sondern es ergab sich auch ein detailliertes Bild der Ligandenabhängigkeit von Faltung und Entfaltung. Interessanterweise scheint Ca^{2+} bereits mit nennenswerter Affinität an den Faltungsübergangszustand von Calmodulin zu binden, so dass die Faltung durch hohe Ca^{2+} -Konzentrationen erheblich beschleunigt werden kann. Für die deutlich größeren und komplexeren Peptidliganden ließ sich experimentell keine Bindung an den Übergangszustand detektieren. Diese Liganden wirken nur auf die Entfaltungsrate.

Durch zwei komplementäre Reihen von Experimenten mit freiem Peptid in Lösung und mit in das Proteinkonstrukt integrierten Target-Sequenzen konnten verschiedene Bindungsmodi und Stöchiometrien für skMLCK, CaMKK und Mastoparan unterschieden werden. Während die erstgenannte Methode vor allem bei vergleichsweise geringen Affinitäten und unklaren Stöchiometrien von Vorteil ist, kann die zweite Methode insbesondere bei sehr hohen Ligandenaffinitäten ein klares Bild von der Sequenz der Bindungsereignisse zeichnen. Für die untersuchten Peptide lassen sich unterschiedliche Grade an Bindungskoopertivität zwischen beiden Domänen finden: Während skMLCK eine sehr hohe Bindungskoopertivität aufweist und nur an vollständiges Calmodulin mit hoher Stabilität bindet, finden wir für CaMKK einen mittleren Grad an Koopertivität. CaMKK bindet bereits an eine isolierte C-terminale Domäne sehr stark, während DomN für stabile Assoziation eine gefaltete DomC benötigt. Mastoparan bindet mit Stöchiometrie 2:1 ohne messbare Koopertivität zwischen beiden Domänen.

Die Unterschiede im Bindungsverhalten zwischen den drei Peptiden spiegeln möglicherweise ihre verschiedenen physiologischen Rollen wider. Während die Kinase-Fragmente skMLCK und CaMKK für eine hochaffine und kooperative Bindung optimiert sind, reicht es für das Gift Mastoparan aus, mit mäßiger Affinität die Bindungsstellen von Calmodulin zu blockieren. Für zuverlässige Signalübermittlung der Kinasen sind lange Lebensdauern des Calmodulin-gebundenen Zustands von ~ 100 s vorteilhaft, während diese Notwendigkeit für Mastoparan nicht besteht (Lebensdauer $\sim 0,01$ s). Der neu entdeckte Bindungsmodus von CaMKK, bei dem das Peptid mit hoher Affinität an eine Ca^{2+} -gesättigte C-terminale Domäne bindet, hat potentiell hohe biologische Relevanz. Da bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen nur die C-terminale Domäne Ca^{2+} bindet, kann so bei niedrigem Ca^{2+} -Spiegel gezielt nur CaMKK aktiviert werden. Da sich CaMKK an der Spitze mehrerer CaM-abhängiger Signalkaskaden befindet, ist die Möglichkeit, zwischen verschiedenen Ziel-Kinasen von CaMKK zu unterscheiden, von hoher Wichtigkeit für korrekte Signalweiterleitung. Aktivierung von CaMKK durch nur teilweise Ca^{2+} -geladenes Calmodulin könnte einen Mechanismus zur Differenzierung zwischen verschiedenen Signalkaskaden darstellen.

9 Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente und Analysen zu mechanisch induzierten Gleichgewichtsübergängen einzelner Calmodulin-Moleküle öffnen die Tür zu vielen weiteren interessanten Fragestellungen. Einige mögliche Stoßrichtungen für zukünftige Projekte sollen hier kurz vorgestellt werden.

9.1 Hochauflösende Experimente mit der optischen Pinzette

Die hier durchgeführte Datenanalyse von Gleichgewichtsübergängen nutzt bei weitem noch nicht den vollständigen möglichen Informationsgehalt der Messdaten aus. Bislang wurden lediglich mittlere Übergangsraten im Gleichgewichtsbereich bestimmt, Informationen über die Potentialbreite konnten nur über zusätzliche Nichtgleichgewichtsexperimente gewonnen werden. Messungen mit optischen Pinzetten bei deutlich höherer Kraftauflösung können dagegen solche Informationen über die Energielandschaft direkt zugänglich machen, indem die Faltungs- und Entfaltungskinetik bei verschiedenen leicht unterschiedlichen Kräften nahe am Gleichgewicht gemessen wird. Derartige Experimente mit verbesserter Kraftauflösung, bei denen die Ca^{2+} -Konzentration über einen größeren Konzentrationsbereich als den hier zugänglichen variiert wird, können dann eine genaue Bestimmung der Ca^{2+} -Dissoziationskonstante des Übergangszustands K^{TS} ermöglichen.

Geht man noch einen Schritt weiter und bezieht nicht nur die Lebensdauern in den Potentialminima N und U in die Auswertung mit ein, sondern analysiert auch die (sehr geringen) Aufenthaltswahrscheinlichkeiten an anderen Punkten, so lassen sich noch deutlich detailliertere Informationen über die Form der Energiebarriere gewinnen. Durch den Zusammenhang $\Delta G(x) = -k_B T \cdot \ln P(x)$ zwischen der Energielandschaft $\Delta G(x)$ und der Aufenthaltswahrscheinlichkeit $P(x)$ lässt sich die Energielandschaft direkt bestimmen, ohne dass weitere Parameter angenommen werden müssen. Diese Methode wurde bereits für DNA-Hairpins erfolgreich demonstriert [87]. Durch Vergleich der beobachteten Daten mit der ermittelten Energielandschaft lässt sich der präexponentielle Faktor für die Faltungs- und Entfaltungsübergänge bestimmen. Die zentrale Herausforderung für diese Form der Analyse liegt darin, den Einfluss des "Krafthebels" (Kugeln und Linker-Moleküle bei der optischen Pinzette) auf die gemessenen Daten korrekt zu berücksichtigen.

9.2 Untersuchung weiterer Calmodulin-Liganden

Die in Abschnitt 6.3 eingeführte Methode zur Bestimmung von Liganden-Stöchiometrien kann möglicherweise dabei helfen, bislang unbekannte Bindungsstöchiometrien von Calmodulin-Liganden wie beispielsweise die des Schizophrenie-Medikaments Trifluoperazin (TFP) zu bestimmen [20,84]. Hierbei ist von Vorteil, dass diese Technik im Wesentlichen Ligandenaffinitäten misst, so dass unspezifische und schwache Bindungen, wie sie beispielsweise als Kristallisations-Artefakte bei der Röntgenstrukturanalyse auftreten können, leicht zu identifizieren sind.

Von sehr großem Interesse wird auch die Untersuchung weiterer Target-Peptide von Calmodulin mit der in Kapitel 7 vorgestellten Methode sein, bei der Peptidliganden in die

Proteinkonstrukte integriert werden. Hervorzuheben ist insbesondere die Klasse der IQ-Repeats: Diese Target-Peptide binden auch an Ca^{2+} -freies Calmodulin, bei Zugabe von Ca^{2+} kann es zu Änderungen in Bindungsmodus und Stöchiometrie kommen [88, 1]. In diesem Zusammenhang sind daher Untersuchungen bei unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen von hoher Relevanz.

Ähnliches gilt für CaMKK: Messungen bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen könnten die Konzentrationsschwelle identifizieren, ab der CaMKK über den neu identifizierten Bindungsmodus an Ca^{2+} -gesättigte DomC aktiviert wird. Es wäre interessant, in unabhängigen biochemischen Experimenten zu untersuchen, ob der Komplex von teilweise Ca^{2+} -gesättigtem Calmodulin und CaMKK bereits funktional ist, d.h. ob und mit welcher Kinetik die Phosphorylierung von CaMKK-Zielproteinen stattfindet. Solche Messungen könnten entweder bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen oder mit CaM-Mutanten, bei denen die N-terminalen Ca^{2+} -Bindungsstellen inaktiviert worden sind, durchgeführt werden. Die Analyse der Bindungsmodi weiterer Target-Sequenzen von Calmodulin aus den CaMKK-abhängigen Signalkaskaden mittels Einzelmolekül-Kraftspektroskopie wird dabei helfen können, die Feinsteuerung der Signalübermittlung durch Ca^{2+} -Ionen besser zu verstehen.

Von hoher potentieller physiologischer Relevanz könnten auch Messungen mit vollständigen Target-Proteinen anstelle der entsprechenden Peptid-Liganden sein. Bislang liegen nur Bindungsstudien zu Target-Peptiden vor, zur Interaktion von Calmodulin mit vollständigen Proteinen gibt es kaum Informationen. Es wäre interessant zu untersuchen, ob sich Unterschiede in Bindungsmodus, Kinetik und Affinität finden lassen.

9.3 Erkundung der Energielandschaft von Calmodulin in anderen Zugrichtungen

Bislang wurden in dieser Arbeit Calmodulin-Konstrukte und Calmodulin-Peptid-Komplexe stets in N-C-terminaler-Richtung über Filamin-Handles mit Kraft belastet. Über Disulfidbrücken zwischen lösungsmittel-exponierten Cystein-Resten, die durch gezielte Mutagenese in die Struktur eingefügt werden, können aber auch Protein-Polymere mit weitgehend frei wählbarer Verknüpfungsrichtung hergestellt werden [24]. Durch solche alternativen Zugrichtung lässt sich die Energielandschaft von Calmodulin in verschiedenen Richtungen untersuchen. Erste Experimente (siehe Anhang C.1 und C.2) haben bereits gezeigt, dass die Stabilität von Calmodulin in verschiedenen Zugrichtungen höchst unterschiedlich ausfällt.

Aus zukünftigen Messungen wird sich ergeben, ob bei verschiedenen Zugrichtungen nur die Potentialbreite oder auch die Barrierenhöhe variiert. Möglicherweise lässt sich so herausfinden, ob ein einziger Übergangszustand die Faltungs-Energielandschaft dominiert oder ob je nach Zugrichtungen unterschiedliche Übergangszustände überschritten werden müssen. Es ist a priori nicht klar, ob sich auch für die stabileren Zuggeometrien Gleichgewichtsbedingungen bezüglich Faltung und Entfaltung erreichen lassen. Gegebenenfalls kann das Crooks Fluktuations-Theorem das Ermitteln von Gleichgewichtsinformationen wie ΔG aus Nichtgleichgewichts-Daten ermöglichen [22, 10].

Nach Gl. 3.2 hängt der Konturlängenzuwachs eines Entfaltungsereignisses auch von der Distanz zwischen den Kraftangriffspunkten ab. Im Prinzip kann auf diese Weise die Konfor-

mationsänderung von Proteinen wie Calmodulin detektiert werden. Da sich durch die peptidinduzierte Konformationsänderung von Calmodulin der Abstand zwischen N- und C-Terminus nur minimal ändert, sind hierfür alternative Kraftangriffspunkte, die das Signal optimieren, vonnöten. Durch die Zugrichtungen CaM 17,110, CaM 38,118 und CaM 21,113 wurde in dieser Arbeit bereits versucht, die Konformationsänderung von Calmodulin zu messen. Bislang konnte allerdings keine Änderung des Konturlängenzuwachses nach Zugabe von Target-Peptiden beobachtet werden. Dies liegt vermutlich daran, dass der real detektierbare Konturlängenunterschied etwas von den berechneten Werten von ca. 2 – 3 nm abweichen kann, wenn sich die Proteinstruktur unter Kraft schon vor der Entfaltung etwas verformt. Zukünftige Messungen mit höherer Genauigkeit bei der Längenbestimmung sowie mit deutlich verbesserter Statistik könnten dieses Problem allerdings lösen. Gleichwohl bleibt das Problem, dass der α -helikale Interdomänenlinker von Calmodulin schon bei sehr niedrigen Kräften entfalten kann, wenn er nicht durch Peptidbindung von Kraft abgeschirmt wird. Diese spezifische Komplikation von Calmodulin verursacht ein der Konformationsänderung entgegengesetztes Signal; unter Umständen wäre es also sinnvoll, ein anderes Protein als Calmodulin als Modellsystem für eine mechanische Detektion von Konformationsübergängen zu wählen.

9.4 Steuerung von Bindungs- und Reaktionskinetik durch mechanische Kraft

Es ist potentiell von großem Interesse, die hier vorgestellte Methodik mechanisch induzierter Gleichgewichtsübergänge auch auf andere Systeme zu übertragen. Auf ähnliche Weise wie hier könnten auch andere Protein-Ligand-Wechselwirkungen im Gleichgewicht untersucht werden, um detaillierte Informationen über die einzelnen Reaktionsschritte zu erhalten. In den letzten Jahren hat die mechanisch induzierte Manipulation von Reaktionskinetiken auch jenseits der klassischen Anwendungsgebiete von Proteinfaltung und Motorproteinen bemerkenswerte Ergebnisse erbracht. So konnten beispielsweise "verborgene" Bindungsstellen für Liganden durch Krafteinwirkung zugänglich gemacht werden [68], so dass sich Bindungsaffinitäten durch Anlegen von Kraft deutlich erhöhen ließen. Weiterhin wurde die enzymatische Spaltung von Disulfidbrücken durch Anlegen von Kraft an das Polypeptidsubstrat in ihrer Reaktionsgeschwindigkeit beeinflusst, wodurch sich detaillierte Einblicke in Funktionsweise des Enzyms Thioredoxin ergaben [86]. In Fortsetzung dieser Entwicklung könnten auch Reaktionskinetiken durch Anlegen von Kraft an Enzyme kontrolliert werden, indem beispielsweise eine für die katalytische Reaktion nötige Proteinkonformation durch Kraft in einen energetisch günstigeren oder ungünstigeren Zustand versetzt wird. Analog zu der hier vorgestellten Untersuchung zu Ligandenbindung unter Kraft könnten so schnelle Prozesse gezielt verlangsamt und Teilschritte der Reaktion getrennt voneinander aufgelöst werden. Für solche Experimente müssen die angelegten Kräfte sorgfältig gewählt werden, um die Reaktionskinetik zu verlangsamen ohne das Enzym bereits zu entfalten.

A Material und Methoden

A.1 Krafteichung

Die Federkonstante des Cantilevers wurde in dieser Arbeit aus dem thermischen Rauschen der freien Blattfeder bestimmt. Das mittlere Auslenkungsquadrat $\langle x^2 \rangle$ hängt über den Gleichverteilungssatz $k_c \langle x^2(t) \rangle = k_B T$ mit der Federkonstanten k_c zusammen. Bezieht man mit ein, dass als Messsignal nicht direkt die Verbiegung des Cantilevers, sondern die Verschiebung des an der Spitze des Cantilevers reflektierten Lasersignals auf der Photodiode dient, so erhält man leichte Korrekturen. Eine detaillierte Analyse der experimentellen Situation bei der Krafteichung [13,32] führt zu

$$k_c = 0,8 \cdot \frac{k_B T}{\langle x(t) \rangle^2} \quad (\text{A.1})$$

Zur Berechnung der Federkonstante in pN/nm muss noch das Messsignal der Photodiode, die die Auslenkung des am Cantilever reflektierten Laserstrahls detektiert (Volt), in die Ausdehnung der Blattfederspitze (nm) umgerechnet werden. Hierzu benutzt man die Eindrückkurve an der Oberfläche: Wenn die Blattfederspitze die Oberfläche berührt, so kann man bei einer Bewegung des Piezo-Tischs um eine definierte Distanz zum Cantilever hin die entsprechende Änderung des Photodiodensignals messen. Der Quotient aus der Änderung der gemessenen Spannung und der gefahrenen Distanz ergibt den Umrechnungsfaktor zwischen Volt und nm. In der gegebenen experimentellen Situation ist diese Relation mit guter Genauigkeit linear. Aus der Bestimmung dieses Umrechnungsfaktors resultiert der größte Teil der Unsicherheit bei der Bestimmung der Federkonstante. Mit der hier vorgestellten Eichmethode lassen sich Federkonstanten mit einem Fehler von $\approx 10\%$ bestimmen.

Zur Verringerung dieser Fehlerquelle wurde zusätzlich zur thermischen Eichung die Varianz der Cantilever-Resonanzfrequenz beobachtet. In einer ersten Näherung lässt sich die Blattfeder als harmonischer Oszillator beschreiben. Es gilt dann

$$\omega = \sqrt{\frac{k_c}{m}} \quad (\text{A.2})$$

Nimmt man an, dass die Cantilever aus einer Produktionscharge eine vergleichbare Masse $m_1 = m_2$ besitzen, so gilt folgender Zusammenhang

$$\frac{\omega_1^2}{k_{C,1}} = \frac{\omega_2^2}{k_{C,2}} \quad (\text{A.3})$$

Zur Kontrolle der thermischen Eichung und zur Reduktion von Eichfehlern wurde eine Referenzfederhärte pro Cantilever-Charge festgelegt. Falls signifikante Abweichungen von Gl. A.3 auftraten, wurde die Federkonstante entsprechend nachgeeicht.

Eine weitere Verbesserung der Krafteichung ließ sich dadurch erzielen, dass in jedem Experiment zusätzlich zu den Entfaltungskräften von Calmodulin auch die Entfaltungskräfte der Filamin-Domäne 4 aus dem Proteinkonstrukt gemessen wurde [76]. Die Stabilität dieser Proteindomäne sollte unabhängig von der Anwesenheit von Calmodulin-Targetsequenzen

in der Lösung sein und stets zu im Mittel gleichen Entfaltungskräften führen. Da diese Korrektur modellunabhängig ist und sich insbesondere auch für Blattfedern mit unterschiedlicher Masse (z.B. aus unterschiedlichen Produktionschargen) anwenden lässt, wurde die Korrektur der Krafteichung über Filamin in dieser Arbeit vorgezogen. Allerdings lassen sich so nur Messungen bei konstanter Ca^{2+} -Konzentration vergleichen, da nicht unbedingt davon ausgegangen werden kann, dass Ca^{2+} die Entfaltung von Filamin nicht beeinflusst. In der Tat schienen hohe Ca^{2+} -Konzentrationen zu einer mechanischen Stabilisierung von Domäne 4 des Filamin-Proteinkonstrukts zu führen, so dass für die Messung der Ca^{2+} -Abhängigkeit der Entfaltungskräfte von Calmodulin die Eichkorrektur über die Resonanzfrequenz vorgezogen wurde. Der verbleibende systematische Fehler bei der Kraftbestimmung nach diesen Korrekturen wird für diese Arbeit mit 2 % abgeschätzt.

A.2 Messprotokoll

In allen Experimenten wurden Gold-bedampfte Blattfedern (Biolever Typ B, Olympus, Tokyo, Japan) mit einer typischen Federkonstante von 6 pN/nm verwendet. Um Detektions-Drift durch Fluktuationen im Brechungsindex des Puffers zu vermeiden, wurde durch eine neu konstruierte Fluidzelle die Pfadlänge des Laserlichts in der Pufferlösung minimiert. Weiterhin wurde der Cantilever unmittelbar vor Beginn einer Messung in Ethanol und ddH₂O gewaschen, alle Messpuffer wurden jeweils frisch entgast und sterilfiltriert. Vor jeder Messung wurde zudem die betreffende Fluidzelle sowie die Pinzette zum Einsetzen des Cantilever-Chips mit 2 % Hellmanex und reichlich ddH₂O gereinigt, um Detektions-Drift durch Staub und andere Verunreinigungen zu minimieren.

Sämtliche Messungen wurden bei Raumtemperatur in 50 mM Tris, 150 mM KCl bei pH 8,0 durchgeführt. Die gewünschte Ca^{2+} -Konzentration wurde durch Zugabe von CaCl_2 zur Pufferlösung eingestellt. Die Konzentration des zu untersuchenden Proteinkonstrukts in der Messzelle betrug $\approx 0,1 \mu\text{M}$. Zur Anbindung der Proteinkonstrukte an die Oberfläche wurde eine Ni^{2+} -NTA-Funktionalisierung der Messoberflächen vorgenommen, so dass eine spezifische Bindung an den 6xHis-Tag der Proteinkonstrukte hergestellt wurde [69]. Die unspezifische Anbindung an die goldbedampften Cantilever ist stark genug um eine Beobachtungszeit einzelner Moleküle von bis zu einigen Minuten zu ermöglichen.

Das Messprotokoll besteht aus drei Stufen (siehe Abb. A.1). In der ersten Phase (Abb. A.1 A) wird über die Handsteuerung des Piezopositioniersystems ein Proteinkonstrukt zwischen Oberfläche und Cantilever eingespannt. Dabei wird das Cantileversignal nicht aufgezeichnet, sondern nur unmittelbar auf dem Oszilloskop verfolgt. Um zu verifizieren, dass genau ein Calmodulin-Molekül beobachtet wird, wird nun die Blattfeder mit definierter Geschwindigkeit (50 nm/s) von der Oberfläche entfernt und wieder angenähert, wobei Kraft- und Abstandssignal gespeichert werden (Abb. A.1 B). Zuletzt wird die eigentliche Messkurve erstellt (Abb. A.1 C): Zunächst wird die Blattfeder mit einer Geschwindigkeit von 1 nm/s von der Oberfläche entfernt, um Gleichgewichtsübergänge von Calmodulin aufzuzeichnen (a). Danach werden die Filamin-Domänen bei höheren Ziehgeschwindigkeiten entfaltet (b), abschließend werden das Null-Kraft-Signal (c) und das Null-Ausdehnungs-Signal (d) bestimmt. Kraft-Abstandskurven zu den in Abb. A.1 B und C gezeigten Piezobewegungen sind in Abb. A.2 beispielhaft gezeigt.

Trägt man Kraft-Nullpunkte und Ausdehnungs-Nullpunkte der einzelnen Messkurven über die Messzeit auf, so kann man die Cantilever- und Oberflächendrift bestimmen. Ge-

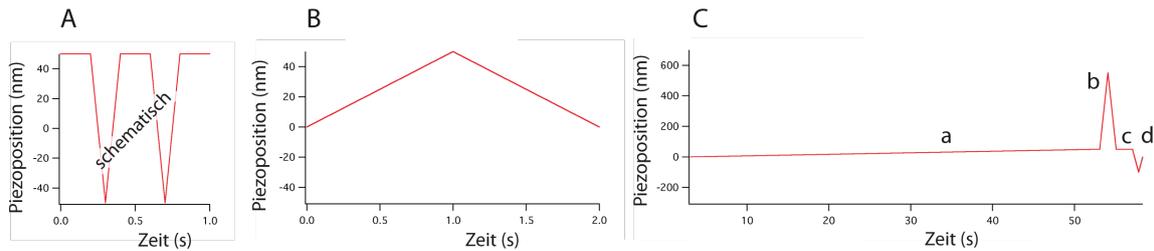


Abbildung A.1: Skizze des Messprotokolls. Zunächst wird die Blattfederspitze über die Handsteuerung des Piezosystems wiederholt in Oberflächenkontakt gebracht und danach wieder von der Oberfläche entfernt, um ein Protein zwischen Spitze und Oberfläche einzuspannen (A). Nun wird der Cantilever mit definierter Geschwindigkeit (50 nm/s) von der Oberfläche entfernt und wieder angenähert (B). Dabei werden eine Entfaltungskurve und eine Rückfaltungskurve unter Nichtgleichgewichtsbedingungen aufgenommen. Zuletzt wird die eigentliche Messkurve erstellt (C): Zunächst wird der Cantilever mit einer Geschwindigkeit von 1 nm/s von der Oberfläche entfernt, um Gleichgewichtsübergänge von Calmodulin aufzuzeichnen (a). Schließlich ist die Entfernung zwischen Oberfläche und Blattfeder so groß, dass keine Calmodulin-Faltungsereignisse mehr auftreten. Nun wird die Ziehgeschwindigkeit auf 500 nm/s erhöht, um zu Kontrollzwecken auch die Filamin-domänen zu entfalten und das Proteinkonstrukt von Blattfeder oder Oberfläche abzureißen (b). Anschließend wird der Cantilever wieder an die Oberfläche angenähert. Dabei wird das Null-Kraft-Signal durch Warten in einigem Abstand von der Oberfläche bestimmt (c), die Null-Ausdehnungs-Position wird durch Eindrücken des Cantilevers in die Oberfläche ermittelt (d).

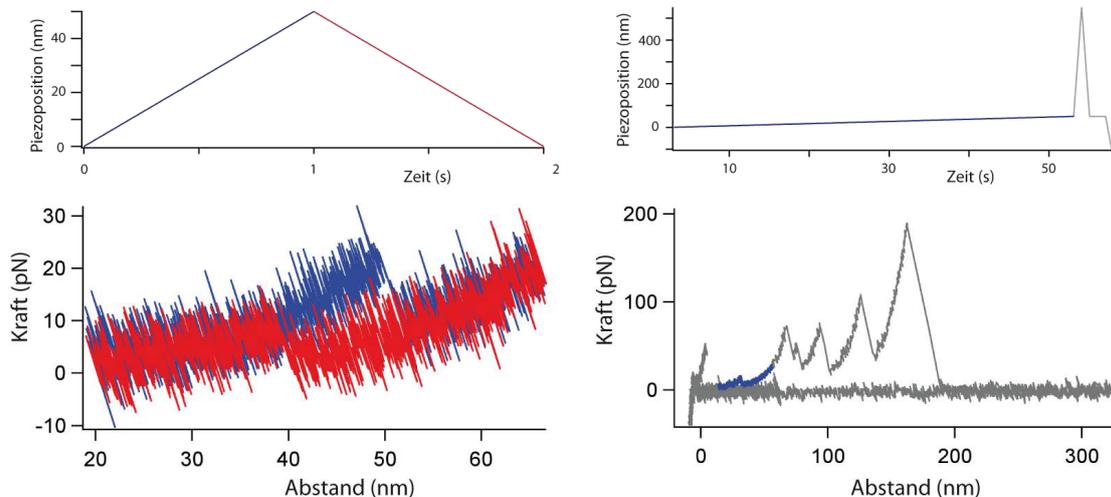


Abbildung A.2: Kraft-Abstandskurven der C-terminalen Domäne von Calmodulin gemäß Messprotokoll aus Abb. A.1 B und C. Links wurde die Blattfeder mit einer Geschwindigkeit von 50 nm/s um 50 nm von der Oberfläche weg bewegt (blau) und daraufhin wieder angenähert (rot). Dies führte zur Entfaltung der Domäne bei ca. 20 pN (blau) und zur Rückfaltung bei ca. 5 pN (rot). Rechts ist eine Beispielkurve des gleichen Proteinkonstrukts gezeigt, bei der die Blattfeder zunächst für 50 s mit einer Geschwindigkeit von 1 nm/s von der Oberfläche entfernt wurde, so dass Faltungs- und Entfaltungsübergänge beobachtet werden konnten (blau). Daraufhin wurde der oben beschriebene restliche Bewegungszyklus durchgeführt, um die vorhandenen Filamin-domänen zu entfalten, das Proteinkonstrukt vom Cantilever abzureißen und die Nullpunkte für Kraft und Abstand zu bestimmen (grau).

ringförmige Drift lässt sich herausrechnen, indem man die Nullpunkts-Veränderung als linear in der Zeit annimmt und eine Drift-Gerade vom Kraft- und Ausdehnungssignal abzieht (siehe Abb. A.3). Bei stärkerer Drift wurde das jeweilige Experiment verworfen.

A.3 Bearbeitung der Rohdaten

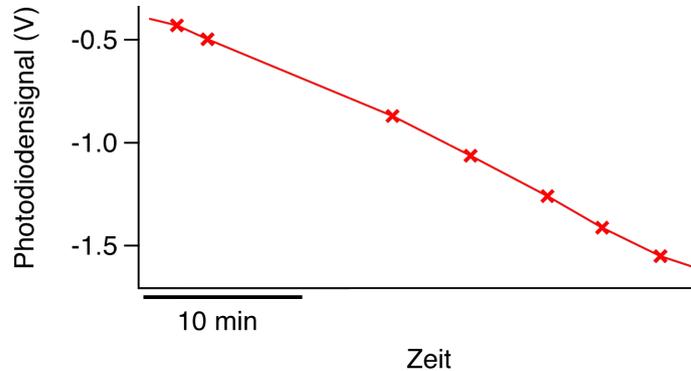


Abbildung A.3: Kraft-Nullpunkte für einige aufeinanderfolgende Messkurven. Es zeigt sich deutlich, dass das Photodiodensignal im Lauf der Messung absinkt. Diese Kraft-Drift kann für die Zeit, die zum Aufnehmen einer Kurve benötigt wird (ca. 1 min), als linear angenommen werden. Das Kraftsignal lässt sich so durch Abziehen einer Drift-Gerade von den Rohdaten korrigieren. Ein entsprechendes Vorgehen ist auch für den Ausdehnungs-Nullpunkt möglich.

Im Experiment werden gleichzeitig die Kraft $F_c(t)$, die an der Blattfeder anliegt, und die Position des Piezotischs $z(t) = v \cdot t$ detektiert. Die kraftspektroskopisch relevanten Daten sind nun die Kraft, die auf das Protein wirkt $F(t)$, sowie die Ausdehnung des Proteins $d(t)$. Es gilt $F(t) = F_c(t)$, weil es sich bei Protein und Blattfeder um zwei in Reihe geschaltete Federn handelt. Die Ausdehnungen des Proteins und der Blattfeder addieren sich allerdings, $z(t) = d(t) + d_c(t)$, so dass sich $d(t)$ wie folgt berechnet

$$d(t) = z(t) - d_c(t) = v \cdot t - \frac{F(t)}{k_c} \quad (\text{A.4})$$

Wird nun $F(t)$ über $d(t)$ aufgetragen, so erhält man Kraft-Abstands-Kurven, bzw. Kraft-Ausdehnungs-Kurven, wie sie in dieser Arbeit häufig gezeigt werden.

Die Messdaten wurden mit der maximalen zur Verfügung stehenden Samplingrate von 20 kHz aufgenommen. In den direkten Messdaten ist allerdings das thermische Rauschen des Cantilevers so groß, dass Faltungs- und Entfaltungsübergänge nicht zuverlässig ausgemacht werden können. Dieses Krafrauschen ist prinzipiell unvermeidbar, allerdings lässt sich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis durch nachträgliches Glätten der Daten deutlich verbessern (siehe auch Abb. A.4). Je mehr Datenpunkte für einen bestimmten Wert der Proteinausdehnung vorliegen, d.h. je langsamer die Ziehgeschwindigkeit ist, desto geringer werden Schwankungen des Mittelwerts um den Erwartungswert der Kraft ausfallen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten sehr langsamen Ziehgeschwindigkeiten von $\approx 1 \text{ nm/s}$ ermöglichen also eine deutlich bessere Kraftauflösung im Vergleich zu früheren Experimenten bei höheren Ziehgeschwindigkeiten, da die Daten vergleichsweise stark geglättet werden können, ohne die Ortsauflösung zu beeinträchtigen (siehe Abb. A.5). In

der Regel wurde in dieser Arbeit die Datenmenge zunächst um einen Faktor 10 dezimiert, indem je 10 aufeinanderfolgende Datenpunkte der Rohdaten zu einem Punkt gemittelt wurden. Die erhaltenen Datenreihen wurden dann mit einer Boxfilter mit einer Breite von 41 Punkten weiter geglättet.

Durch das Glätten der Daten erhöht sich also die Kraftauflösung, gleichzeitig sinkt allerdings die Zeitauflösung. Im Gegensatz zu anderen Methoden zur Erhöhung der Kraftauflösung wie dem Mitteln mehrerer bei hohen Ziehgeschwindigkeiten gezogener Kurvensegmente [9] oder der Lock-in-Kraftspektroskopie [72] bleibt die zeitliche Auflösung dennoch vergleichsweise gut. Es kann davon ausgegangen werden, dass Calmodulin-Faltungs- und Entfaltungsübergänge zuverlässig detektiert werden können, wenn die Lebensdauer des jeweiligen Zustandes mindestens 10 *ms* beträgt.

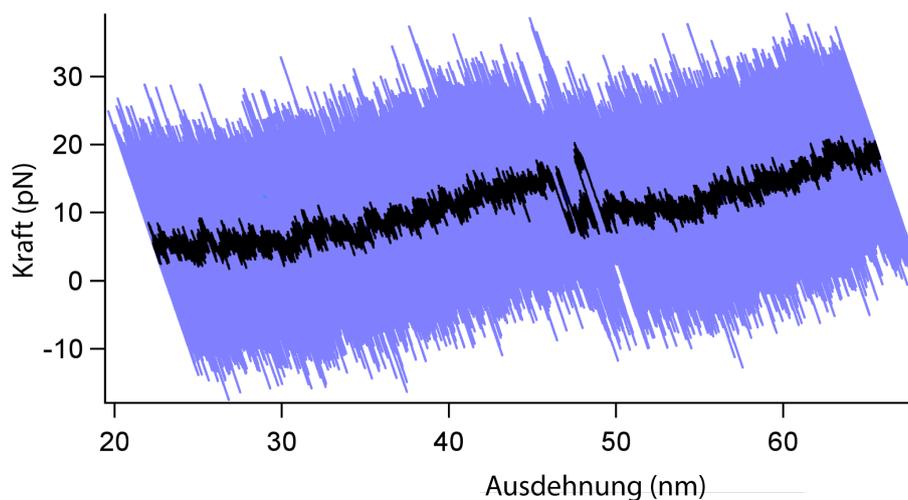


Abbildung A.4: Kraft-Abstands-Kurve einer C-terminalen Domäne von Calmodulin bei einer Ziehgeschwindigkeit von 1 nm/s vor und nach der Glättung der Daten. Die ungeglätteten Daten sind in hellblau gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Auflösung durch Glätten der Daten erheblich erhöhen lässt (schwarz).

A.4 Einfluss von Polypeptid-Spacern und Disulfid-Crosslinks

Kraft-Abstandskurven unterscheiden sich in ihrer charakteristischen Übergangsrate je nachdem, wie viele Filamin-Domänen in einem Calmodulin-Filamin-Proteinkonstrukt zu Beginn einer Messkurve schon in entfalteter Form vorliegen. Der Einfluss der Länge dieses Polypeptid-Spacers auf die beobachtete Kinetik von Gleichgewichtsübergängen soll in diesem Abschnitt besprochen werden. Ferner wird auch der Einfluss von Disulfid-Crosslinks auf die Gleichgewichtsübergänge von Calmodulin diskutiert.

In Abb. A.6 A ist der Effekt eines längeren Polypeptid-Spacers auf den Kraftsprung nach einem Entfaltungsereignis schematisch gezeigt. Bei gleicher Entfaltungskraft und bei gleichem Konturlängenzuwachs ΔL relaxiert die Kraft bei längerem L auf einen höheren Wert. Die Rückfaltung muss daher von einer höheren Kraft aus stattfinden, dadurch ist die Faltungsrate niedriger. Gleichzeitig benötigt die Dehnung des längeren Polypeptid-Spacers nach dem in Abschnitt 3.3 vorgestellten Modell für Rückfaltung gegen Kraft weniger Energie. Modellrechnungen zeigen allerdings klar, dass der erste Effekt, der verringerte

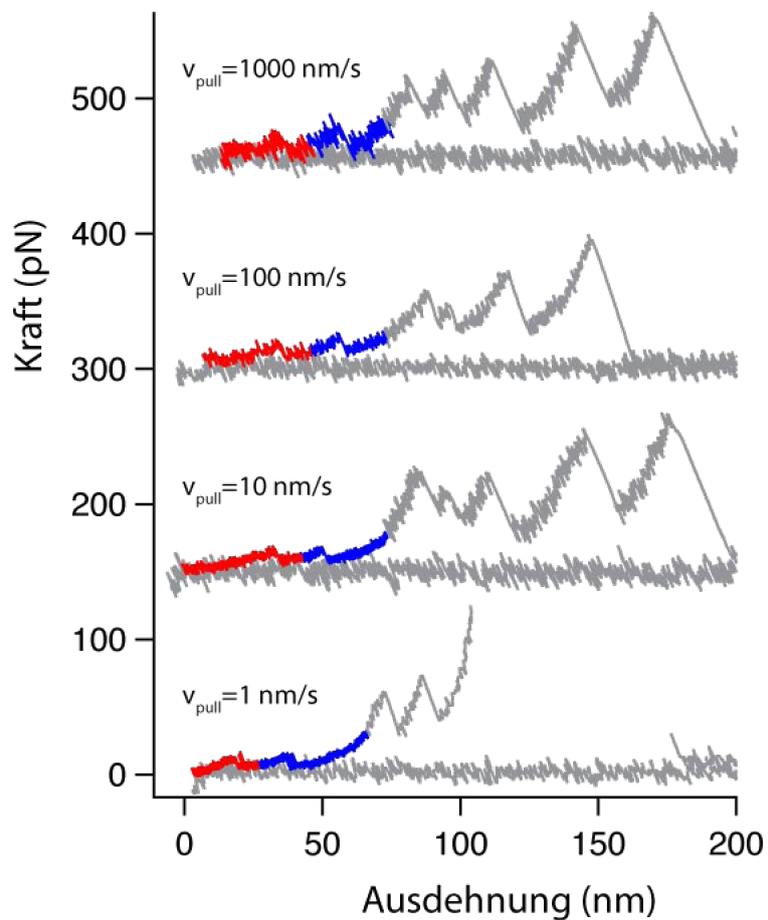


Abbildung A.5: Kraft-Abstandskurven von Calmodulin bei unterschiedlichen Ziehgeschwindigkeiten, 10 mM CaCl_2 , 100 μM Mastoparan. Calmodulin ist in rot und blau dargestellt, Filamin-Domänen sind grau gezeichnet. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich das Krafrauschen bei langsameren Ziehgeschwindigkeiten durch Glätten der Daten erheblich verringern lässt.

Kraftsprung, das Verhalten der Gleichgewichtsübergänge immer dominiert. Ein längerer Polypeptid-Spacer führt daher zu einer niedrigeren beobachteten Faltungsrates und damit zu langsameren Gleichgewichtsübergängen. Hier wurden in den Experimenten daher immer möglichst kurze Spacerlängen angestrebt. Dies verbessert einerseits durch den größeren Kraftsprung das Signal-zu-Rausch-Verhältnis, andererseits können in einer Messkurve durch eine schnellere Übergangsrate mehr Gleichgewichtsübergänge aufgezeichnet werden. Es ist jedoch zu beachten, dass es bei Monte-Carlo-Simulationen (Anhang A.5) zu einem gewissen Fehler kommen kann, wenn die experimentellen Spacerlängenverteilungen nicht korrekt berücksichtigt werden.

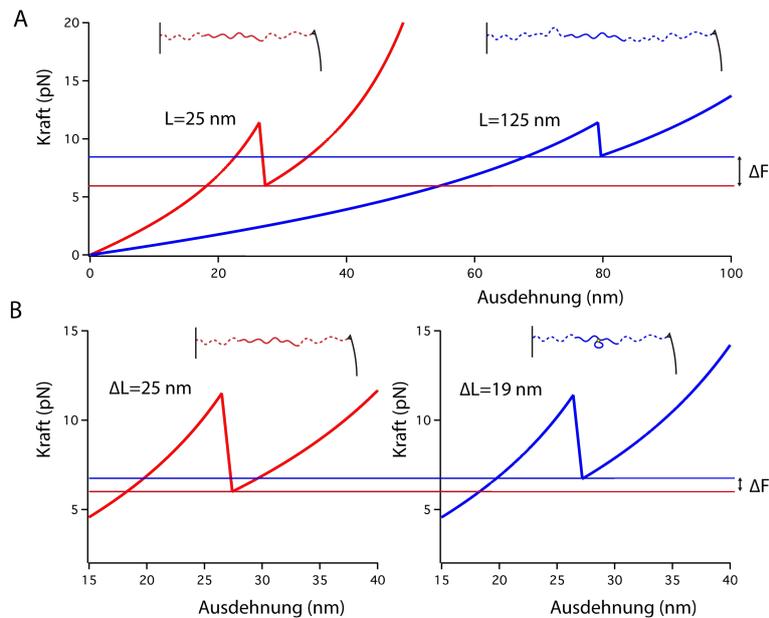


Abbildung A.6: Einfluss von Polypeptid-Spacern und Disulfid-Crosslinks auf die Kinetik von Gleichgewichtsübergängen. A. Bei einem längeren Polypeptid-Spacer sinkt der Kraftsprung bei identischem Konturlängenzuwachs (hier: $\Delta L = 25 \text{ nm}$, $L = 25 \text{ nm}$ (rot) und 125 nm (blau)). Bei gleicher Entfaltungskraft findet daher die Rückfaltung bei größerem Konturlängenzuwachs von einem höheren Kraftniveau aus statt. B. Durch einen Disulfid-Crosslink verkürzt sich der Konturlängenzuwachs eines Entfaltungsereignisses (hier von 25 nm (rot) auf 19 nm (blau)). Bei gleicher Entfaltungskraft muss daher die Rückfaltung von einem höheren Kraftniveau aus stattfinden.

Auch durch Disulfid-Crosslinks wird die Kinetik der Gleichgewichtsübergänge beeinflusst. In Abb. A.6 B ist gezeigt, dass sich der Kraftsprung nach einem Entfaltungsereignis bei einem Crosslink durch den geringeren Konturlängenzuwachs ΔL verringert. Ähnlich wie bei längeren Polypeptid-Spacern muss daher die Rückfaltung bei gleicher Entfaltungskraft von einem höheren Kraftwert aus stattfinden, die Faltungsrate ist dadurch erniedrigt. Ein gegenläufiger Effekt ergibt sich allerdings dadurch, dass nach dem Modell für Faltung unter Kraft aus Abschnitt 3.3 durch einen Crosslink eine kürzere Polypeptidlänge zur Faltung kontrahiert werden muss als ohne einen Crosslink. Die Energiebarriere für die Faltung sinkt daher. Modellrechnungen zeigen, dass der zweite Effekt immer überwiegt. Deshalb steigt die beobachtete Rate der Gleichgewichtsübergänge durch einen Disulfid-Crosslink an. Es ist daher möglich, dass die beobachtete Reihenfolge der Domänenentfaltungen in CaM 128x144 (erst DomN, dann DomC) durch den Crosslink induziert ist, der die Faltungsrate von DomC unter Kraft erhöht.

Auch wenn der Einfluss von Polypeptid-Spacerlängen und von Disulfid-Crosslinks die Datenanalyse unter Umständen erschweren kann, so zeigt sich doch, dass wir bei den gemessenen Daten eine relativ geringfügige Streuung der Spacerlängen und eine vergleichsweise geringe Verkürzung der Konturlänge durch den Crosslink 128x144 finden. Die dadurch verursachten Abweichungen lassen sich daher als Effekte zweiter Ordnung betrachten und bis auf Weiteres vernachlässigen.

A.5 Monte-Carlo-Simulationen

In dieser Arbeit werden Entfaltungskräfte, Rückfaltungskräfte und Lebensdauern im entfalteten und gefalteten Zustand von Proteinen unter Kraft bestimmt. Die entscheidenden Parameter, die diese Größen bestimmen, sind die Potentialbreite Δx_{N-TS} und die kraftfreie Entfaltungsrate k_u (siehe Abschnitt 3.3) sowie der mit dem Entfaltungsereignis verbundene Konturlängenzuwachs ΔL und die kraftfreie Faltungsrate k_f (siehe Abschnitt 3.3). Die experimentellen Daten lassen sich durch Monte-Carlo-Simulationen mit geeigneter Parameterwahl für Δx_{N-TS} , k_u , ΔL und k_f reproduzieren. Monte-Carlo-Simulationen sind hier eine geeignete Methode, da Faltungs- und Entfaltungsprozess statistischer Natur sind und sich durch Raten beschreiben lassen [66]. Experimentelle Parameter wie die Federkonstante k_c und die Konturlänge des entfalteten Polypeptids L , bei der das Entfaltungsereignis auftritt, lassen sich problemlos in die Simulation integrieren.

Bei einer solchen Simulation wird ein virtuelles Polypeptid mit Konturlänge L schrittweise (z.B. Geschwindigkeit $v = 1 \text{ nm/s}$, Zeitschritt $\Delta t = 0,5 \text{ ms}$) gedehnt, ausgehend von einer anfänglichen Ausdehnung von $d = 0 \text{ nm}$. Die jeweils anliegende Kraft ist bestimmt durch das Worm-Like-Chain-Modell (Abschnitt 3.2).

$$F(n) = \frac{k_B T}{p} \cdot \left(\frac{v \Delta t n}{L} + \frac{1}{4 \cdot \left(1 - \frac{v \Delta t n}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \right) \quad (\text{A.5})$$

Zu jedem Zeitschritt lassen sich damit Faltungs- und Entfaltungsrate berechnen.

$$k_u(n) = k_u \cdot \exp\left(\frac{F(n) \Delta x_{N-TS}}{k_B T}\right) \quad (\text{A.6})$$

$$k_f(n) = k_f \cdot \exp\left(\frac{-E_{fold}(F(n), \Delta L, L, k_c)}{k_B T}\right) \quad (\text{A.7})$$

Befindet sich das Protein zum Zeitpunkt $T = n \cdot \Delta t$ im gefalteten Zustand, so erhalten wir demgemäß eine Entfaltungswahrscheinlichkeit von

$$P_{N-U}(n) = k_u(n) \cdot \Delta t \quad (\text{A.8})$$

für den nächsten Zeitschritt. Lag das Protein zum Zeitpunkt $T = n \cdot \Delta t$ dagegen in entfalteter Form vor, so erhalten wir die Faltungswahrscheinlichkeit

$$P_{U-N}(n) = k_f(n) \cdot \Delta t \quad (\text{A.9})$$

für den nächsten Zeitschritt.

Für jeden Zeitschritt wird nun eine Zufallszahl R im Intervall $[0, 1]$ ermittelt. Bei $R < P_{N-U}$ findet das Entfaltungsereignis statt, entsprechend verlängert sich die Konturlänge L um

den experimentell bestimmten Konturlängenzuwachs ΔL . Es folgt eine Relaxationsphase der Blattfeder zu einem niedrigeren Kraftwert gemäß $F = F_{\text{Entfaltung}} - k_c \cdot d$, bis zu der Ausdehnung d , bei der sich diese Gerade mit der neuen WLC-Kurve mit Konturlänge $L + \Delta L$ schneidet¹. Nun steigt die Kraft wieder gemäß dem WLC-Modell mit $L + \Delta L$ an. Zu jedem Zeitschritt wird nun die Faltungswahrscheinlichkeit $P_{U-N}(n)$ ausgerechnet und wieder mit der Zufallszahl R verglichen. Bei $R < P_{U-N}$ findet ein Rückfaltungsereignis statt, die Konturlänge verkürzt sich um ΔL und der Cantilever springt zu einem höheren Kraft-Wert. In Abhängigkeit von den gewählten Parametern lassen sich dann in einer solchen simulierten Kraft-Abstands-Kurve etliche Übergänge zwischen dem gefalteten und dem entfalteten Zustand beobachten (siehe Abb. A.7). Zu jedem Faltungs- und Entfaltungsereignis wird die Kraft, bei der der Übergang auftritt und die Lebensdauer des jeweiligen Zustands $t = \Delta n \cdot \Delta t$ bestimmt. Es ist wichtig zu beachten, dass der Zeitschritt Δt so klein gewählt werden muss, dass die Übergangswahrscheinlichkeiten in jedem Zeitschritt deutlich kleiner als 1 sind [66].

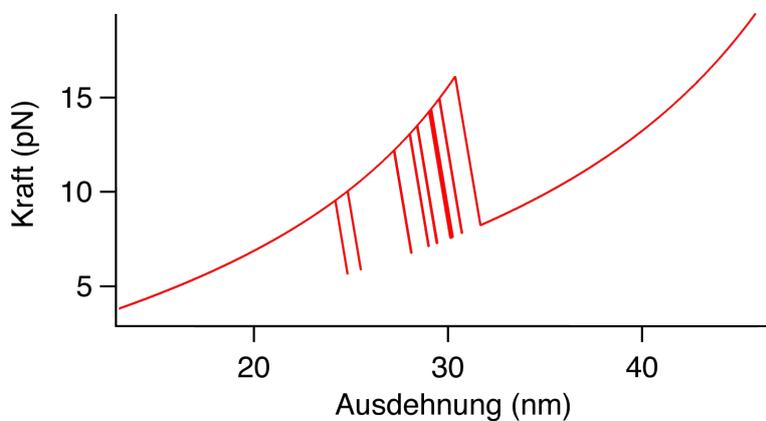


Abbildung A.7: Simulierte Kraft-Abstands-Kurve einer Calmodulin-Domäne. Es sind mehrere Übergänge zwischen dem gefalteten und dem entfalteten Zustand sichtbar.

Ein großer Vorteil von Monte-Carlo-Simulationen besteht darin, dass sich die experimentellen Bedingungen (einschließlich Schwankungen der Konturlänge ΔL und der Federkonstante k_c) exakt modellieren lassen. Hier wurde insbesondere eine zeitliche Auflösungsgrenze von 10 ms eingeführt; kurzlebige Ereignisse lassen sich experimentell nicht mehr zuverlässig detektieren, sie werden daher auch in der Simulation als nicht auflösbar angenommen. In der vorliegenden Arbeit wurden Monte-Carlo-Simulationen zunächst dazu genutzt, die kraftfreien Faltungs- und Entfaltungsraten von Calmodulin sowie die Potentialbreite für die Entfaltung mittels etablierter Modelle zu bestimmen (Abschnitt 6.1). Die Ligandenabhängigkeit der Faltungs- und Entfaltungsraten wurde für die Analyse der Daten aus Kapitel 6 über die in Kapitel 5 vorgestellte Gleichgewichtstheorie in die Simulationen integriert. Dadurch ließ sich die in Abschnitt 6.2 experimentell gezeigte Veränderung der Übergangsraten der Gleichgewichtsübergänge von Calmodulin quantitativ korrekt reproduzieren.

Probeweise wurden in einer Monte-Carlo-Simulation auch die Ligandenbindungs- und -entbindungsübergänge explizit über kraftunabhängige Raten k_{on} und k_{off} in der Berech-

¹In der Modellierung wird zur Vereinfachung angenommen, dass die Cantilever-Relaxation instantan stattfindet.

nung berücksichtigt. Es ergaben sich für DomC in Anwesenheit von Mastoparan bei realistischen Raten keine signifikanten Abweichungen vom Gleichgewichtsmodell aus Kapitel 5. Lediglich bei sehr niedriger Dissoziationskonstante und gleichzeitig sehr geringer Peptid-Konzentration sind signifikante Fehler zu erwarten. Die Population zerfällt dann bedingt durch langsamen Ligandenaustausch in zwei Fraktionen, ligandenfreies und ligandenbindendes Calmodulin.

A.6 Molekularbiologische Methoden

Die DNA für Wirbeltier-Calmodulin wurde in für die Expression in *E.coli* codonoptimierter Sequenz synthetisiert (Firma Genart, Regensburg). Über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *BstEII* wurde die Calmodulin-Sequenz zwischen Domänen 3 und 4 eines *Dictyostelium discoideum* Filamin 1-5 Proteinkonstrukts kloniert [76,25], das bereits in einem pet28a-Vektor (Firma Novagen, Madison, USA) vorlag. Punktmutationen wurden mittels QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Firma Stratagene, Amsterdam, Niederlande) eingefügt, längere Insertionen (beispielsweise DNA für Peptid-Liganden) wurden mit dem Phusion Mutagenesis Kit (Firma Finnzymes, Espoo, Finnland) durchgeführt. Alle Proteinkonstrukte wurden durch Sequenzieren verifiziert (Firma GATC, Konstanz).

Die Proteinkonstrukte wurden in *E.coli* BL21 exprimiert und über Ni²⁺-NTA Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt [37]. Als weiterer Aufreinigungsschritt und zum Wechsel der Pufferlösung wurde eine Größenauftrennung durch Gelfiltrations-Chromatographie vorgenommen.

A.7 Sequenzinformationen

Aminosäure-Sequenz von Wirbeltier-Calmodulin (148 Aminosäuren):
ADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDTITTKELGTVMRS LGQNPTAEALQD
MINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARKMKD TDSEEEIREAFRVFDKDGNGY
ISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK

Für Einzeldomänen-Experimente wurden nur die Aminosäurereste 1-76 (N-terminale Domäne) und 74-148 (C-terminale Domäne) in das Filamin-Konstrukte eingebaut.

Das Target-Peptide Mastoparan (INLKALAALAKKIL) wurde bei der Firma Peptanova (Sandhausen) erworben, skMLCK (KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL) wurde von der Firma Metabion (Planegg-Martinsried) synthetisiert. Mastoparan ist gut wasserlöslich und konnte als 10 µM Stocklösung in 50 mM Tris, 150 mM KCl, pH 8,0 aliquotiert und eingefroren werden. Das Peptid skMLCK neigt dagegen in wässriger Lösung zur Aggregation. Daher wurde skMLCK im Idealfall unmittelbar vor der Messung in Konzentrationen von bis zu 100 µM in den Messpuffer eingewogen. 100 µM skMLCK-Lösungen sind nur wenige Tage bei 4 °C haltbar, bevor die Lösung irreversibel aggregiert.

Die Target-Sequenzen Mastoparan, skMLCK, smMLCK (RRKWQKTGHAVRAIGRLSSS) und CaMKK (VKLIPSWTTVILVKSMLRKR SFGNPF) wurden auch auf DNA-Ebene (Primer der Firma Metabion, Planegg-Martinsried) in das Filamin-Konstrukt eingebaut. Mastoparan, skMLCK und smMLCK wurden mit einem N-terminalen Spacer von 4 Aminosäuren und einem C-terminalen Spacer von 2 Aminosäuren zwischen den C-Terminus von Calmodulin und den N-Terminus von Filamin-Domäne 4 eingefügt. CaMKK wurde mit ei-

nem Spacer von je 4 Aminosäuren am N- und C-Terminus zwischen Aminosäure 79 und 80 von CaM eingefügt und somit zwischen die beiden globulären Domänen von CaM kloniert.

B Ensemble-Herleitung der Ligandenbindungs-Energie

Die freie Enthalpie durch Ligandenbindung lässt sich ohne Weiteres auch in einem Ensemble-Bild herleiten. Da sich diese Darstellung leichter auf den Fall mehrerer Liganden erweitern lässt, soll die Rechnung hier kurz vorgestellt werden (modifiziert nach [71]). P bezeichnet im Folgenden die Konzentration des ligandenfreien Proteins, L ist die Konzentration des freien Liganden. Mit PL bezeichnen wir die Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes, so dass sich die Dissoziationskonstante definieren lässt als $K = \frac{P \cdot L}{PL}$. Ferner bleibt die Gesamtkonzentration des Proteins konstant, $P + PL = P_0$, außerdem sei $L \gg P_0$. Für den Anteil an ligandenfreiem und ligandenbindendem Protein folgt damit

$$\frac{P}{P_0} = \frac{P}{P + PL} = \frac{1}{1 + \frac{L}{K}} \quad (\text{B.1})$$

$$\frac{PL}{P_0} = \frac{PL}{P + PL} = \frac{\frac{L}{K}}{1 + \frac{L}{K}} \quad (\text{B.2})$$

Die freie Enthalpie des Systems können wir unmittelbar als Summe der chemischen Potentiale der verschiedenen beteiligten Moleküle schreiben. Dabei berechnen wir zunächst die Energie G_I für den Fall, dass Protein und Ligand nicht miteinander interagieren. Wird nun die Interaktion "eingeschaltet", so erhalten wir die (niedrigere) freie Enthalpie G_{II} . Hier ist zu beachten, dass wir in G_{ex} die freie Enthalpie von überschüssigen Liganden-Molekülen, Lösungsmittel und eventuellen weiteren in der Lösung vorliegenden Molekülen zusammengefasst haben.

$$G_I = \mu_P^0 + RT \ln P_0 + \frac{\frac{L}{K}}{1 + \frac{L}{K}} \cdot (\mu_L^0 + RT \cdot \ln L) + G_{ex} \quad (\text{B.3})$$

$$\begin{aligned} G_{II} &= \frac{1}{1 + \frac{L}{K}} (\mu_P^0 + RT \ln P) + \frac{\frac{L}{K}}{1 + \frac{L}{K}} \cdot (\mu_{PL}^0 + RT \cdot \ln PL) + G_{ex} \\ &= \mu_P^0 + RT \ln P + \frac{\frac{L}{K}}{1 + \frac{L}{K}} \cdot [(\mu_{PL}^0 + RT \cdot \ln PL) - (\mu_P^0 + RT \cdot \ln P)] + G_{ex} \end{aligned} \quad (\text{B.4})$$

Die Energie, die durch Ligandenbindung frei wird, errechnet sich dann zu

$$\begin{aligned} \Delta G^L &= G_{II} - G_I \\ &= RT \cdot \ln \frac{P}{P_0} + \frac{\frac{L}{K}}{1 + \frac{L}{K}} \cdot [(\mu_{PL}^0 + RT \cdot \ln PL) - (\mu_P^0 + RT \cdot \ln P) - (\mu_L^0 + RT \cdot \ln L)] \\ &= RT \cdot \ln \frac{P}{P + PL} + \left(RT \cdot \ln \frac{PL}{P \cdot L} + (\mu_{PL}^0 - \mu_P^0 - \mu_L^0) \right) \cdot \frac{\frac{L}{K}}{1 + \frac{L}{K}} \\ &= -RT \cdot \ln \left(1 + \frac{L}{K} \right) \end{aligned} \quad (\text{B.5})$$

Diese Gleichung gilt nun natürlich gleichermaßen für den nativen Zustand des Proteins wie für die entfaltete Konformation. Daraus ergibt sich für die zusätzliche freie Enthalpie der Proteinfaltung durch Ligandenbindung

B Ensemble-Herleitung der Ligandenbindungs-Energie

$$\Delta G_{N-U}^L(L) = -RT \cdot \ln \frac{1 + \frac{L}{K^N}}{1 + \frac{L}{K^U}} \quad (\text{B.6})$$

Bindet das Protein mehr als einen Liganden, so wie z.B. jede Calmodulin-Domäne zwei Ca^{2+} -Ionen bindet, so muss Gl. B.5 leicht modifiziert werden. Eine verallgemeinerte Darstellung führt zu $\Delta G^L = -RT \cdot \ln \Sigma$ mit $\Sigma = 1 + \frac{L}{K_1} + \dots + \frac{L^n}{K_n \cdot \dots \cdot K_1}$, wobei K_i die makroskopische Dissoziationskonstante¹ des *iten* Liganden ist. Im für Calmodulin relevanten Spezialfall $n = 2$ erhalten wir

$$\Delta G_{N-U}^L(L) = -RT \cdot \ln \frac{1 + \frac{L}{K_1^N} + \frac{L^2}{K_2^N K_1^N}}{1 + \frac{L}{K_1^U} + \frac{L^2}{K_2^U K_1^U}} \quad (\text{B.7})$$

¹Die *ite* makroskopische Dissoziationskonstante ist die Dissoziationskonstante für die Bindung des *iten* Liganden, während die entsprechende mikroskopische Dissoziationskonstante die *iten* Bindungsstelle des Proteins für den Liganden bezeichnet.

C Alternative Zugrichtungen

Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Polyprotein-Konstrukten sind die Punkte, an denen Kraft an das zu untersuchende Protein angelegt wird, auf den N- und C-Terminus beschränkt. Aufgrund der Vektoreigenschaften mechanischer Kraft wäre es dagegen wünschenswert, Calmodulin auch in anderen Zugrichtungen mit Kraft zu belasten. In diesem Kapitel werden Strategien zur Erzeugung von Proteinkonstrukten mit alternativen Verknüpfungspunkten sowie erste Daten und mögliche zukünftige Projekte diskutiert.

C.1 Methode zur Herstellung von Proteinkonstrukten mit alternativen Verknüpfungsgeometrien

Um Proteinkonstrukte zu erstellen, die die Entfaltung einzelner Calmodulin-Moleküle unter nicht-N-C-terminalen Kraftangriffspunkten erlauben, wurde die von Dietz *et al.* vorgestellte Methode der Cystein-vermittelten Protein-Polymerisation weiterentwickelt [24, 26]. Diese Methode beruht darauf, dass sich über lösungsmittlexponierte Cystein-Reste, die durch gezielte Mutagenese anstelle einer im Wildtyp vorhandenen anderen Aminosäure eingefügt werden, Protein-Polymere mit weitgehend frei wählbarer Verknüpfungsrichtung herstellen lassen. Disulfidbrücken sorgen dabei für die Verbindung zwischen den einzelnen Proteinelementen (siehe Abb. C.1 A).

Derartige Polyproteine sind allerdings mit etlichen His-Tags ausgestattet, was bei Verwendung von Ni^{2+} -NTA-Oberflächen (Anhang A.2) die Qualität des Experiments durch mehrfache Oberflächenanbindung verschlechtert. Darüber hinaus sind die Polymere von unterschiedlicher Länge, die Polymerisations-Kinetik ist zudem schlecht zu kontrollieren. Für Calmodulin ist es außerdem hilfreich, nur ein Calmodulin-Molekül in jedes Proteinkonstrukt zu integrieren, um eine klare Zuordnung von Entfaltungsübergängen zu strukturellen Ereignissen zu ermöglichen. Bei Poly-Calmodulin könnte sich die Dateninterpretation beispielsweise dadurch erschweren, dass zu jedem Zeitpunkt Domänen aus verschiedenen Calmodulin-Proteinen falten bzw. entfalten könnten. Eine Lösung dieses Problems kann durch Proteinkonstrukte wie in Abb. C.1 B gezeigt erreicht werden. Hier wurde eine Calmodulin-Domäne auf DNA-Ebene mit Domänen 3-5 aus *Dictyostelium discoideum* Filamin verbunden, die als "Handle"-Proteine dienen. Durch Bildung von Dimeren kann so ein Proteinkonstrukt mit zwei identischen Calmodulin-Domänen und einem weitgehend frei wählbaren Kraftangriffspunkt erstellt werden. Über Gelfiltrations-Chromatographie können die Dimere von monomeren Proteinkonstrukten abgetrennt werden.

Diese Lösung ist jedoch noch mit verschiedenen Nachteilen verbunden: Erstens liegen immer noch zwei His-Tags vor, was die Qualität der Messungen auf Ni^{2+} -NTA-Oberflächen beeinträchtigt, zweitens lassen sich keine einzelnen Domänen untersuchen, weil immer zwei identische Proteindomänen im fertigen Konstrukt vorliegen, und drittens lässt sich nur einer der zwei Kraftangriffspunkte frei wählen. Die ersten beiden Probleme lassen sich lösen, wenn Hetero-Dimere statt wie bisher Homo-Dimere konstruiert werden. In Abb. C.1 C wurde ein modifizierter Bindungspartner für das DomN-Filamin-Konstrukt erstellt, der aus drei Filamin-Domänen und einem Ubiquitin mit C-terminalem Cystein

C Alternative Zugrichtungen

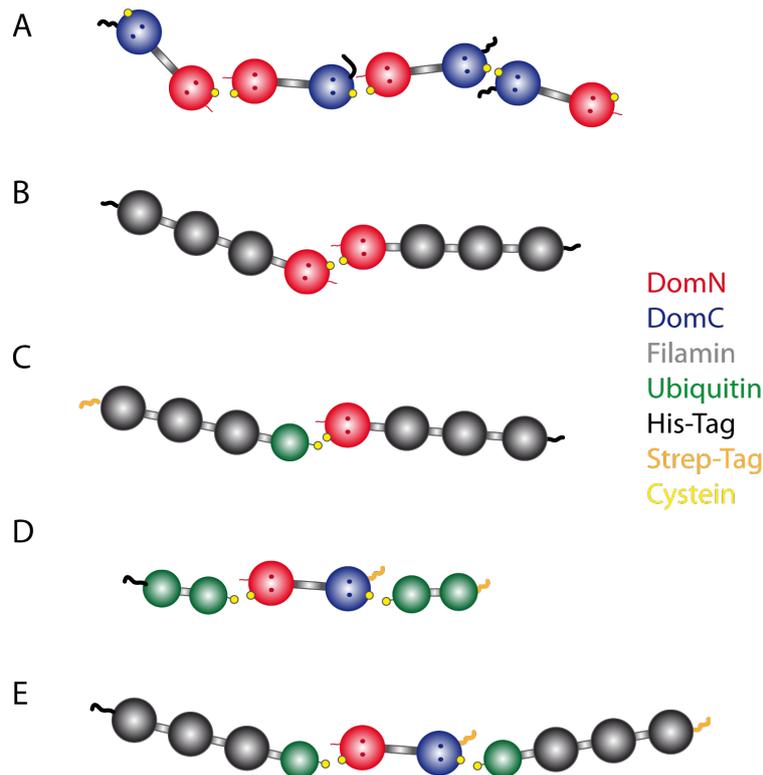


Abbildung C.1: Herstellung von Proteinkonstrukten mit alternativen Zugrichtungen. A. Polymere, B+C. Dimere, D+E. Trimere. Die einzelnen Strategien sind im Text im Detail beschrieben.

besteht. Darüber hinaus wird dieses Protein-Konstrukt nicht über einen His-Tag, sondern über einen Strep-Tag [75] aufgereinigt, so dass das korrekte Hetero-Dimer wie die im Hauptteil dieser Arbeit vorgestellten Proteinkonstrukte nur einen einzigen His-Tag für die Anbindung an die Oberfläche besitzt. Um die Bildung von Homo-Dimeren mit zwei His-Tags zu verhindern, wird das DomN-Filamin-Proteinkonstrukt mit Dithiodipyridin behandelt. Dadurch werden die Cysteine in einen aktivierten Zustand versetzt, gleichzeitig können zwei solcherart aktivierte Cysteine nicht mehr miteinander zu einer Disulfidbrücke reagieren [38]. Homo-Dimere des Filamin-Ubiquitin-Konstrukts stören die Messung nur unerheblich, da sie keinen His-Tag besitzen und folglich nur zu einem geringen Teil an Ni^{2+} -NTA-Oberflächen binden. Gleichwohl können sie über Ni^{2+} -NTA Affinitäts-Chromatographie (oder bei einem signifikanten Größenunterschied auch über Gelfiltrations-Chromatographie) von den Hetero-Dimeren getrennt werden.

Sollen dagegen beide Kraftangriffspunkte frei wählbar sein, so müssen Proteinkonstrukte aus drei Untereinheiten in Lösung zusammengesetzt werden. In Abb. C.1 D ist ein solches Szenario für Calmodulin skizziert, das mit zwei Handles aus Di-Ubiquitin-Konstrukten (1x His-Tag, 1x Strep-Tag) verbunden wird. Mit diesen Handles wurden beispielsweise die in Abb. C.2 gezeigten Daten gemessen. Da hier drei verschiedene Bausteine in korrekter Weise zusammengesetzt werden müssen, wird hier die Assemblierung nach dem Prinzip einer Festkörpersynthese vorgenommen: Monomere Handle-Proteine mit His-Tag werden auf eine Ni^{2+} -NTA-Matrix aufgetragen, an die sie binden. Überschüssiges Protein wird herausgespült. Im nächsten Schritt wird cysteinmutiertes Calmodulin mit Strep-Tag im

Überschuss hinzugegeben¹. Die Mischung wird für mehrere Tage bei 4 °C inkubiert, danach wird das nicht-gebundene Calmodulin mit reichlich Puffer herausgespült. Als letzter Assemblierungs-Schritt werden nach dem gleichen Prinzip Handle-Proteine mit Strep-Tag als Kettenabschluss angefügt. Durch einen Imidazol-haltigen Puffer wird schließlich das fertige Protein eluiert. Über Gelfiltrations-Chromatographie können die korrekten, vollständigen Proteinkonstrukte von unvollständigen Proteinkonstrukten abgetrennt werden. Über diese Methode lassen sich also nahezu beliebige Proteinkonstrukte herstellen. Ein gewisser Nachteil besteht jedoch darin, dass die Kinetik der Bildung von Disulfidbrücken, die häufig bereits bei freien Proteinlösung relativ langsam ist, auf einer Ni²⁺-NTA-Matrix noch zusätzlich gebremst wird. Dadurch lassen sich korrekte trimere Proteinkonstrukte nur mit vergleichsweise niedriger Ausbeute herstellen.

In Abb. C.1 C+D wurden jeweils Ubiquitin-Domänen zur Vermittlung einer Disulfidbrücke zu Calmodulin verwendet. Diese Wahl erklärt sich daraus, dass sich mit Ubiquitin-Domänen eine relativ schnelle Reaktionskinetik der Bildung von Disulfidbrücken erzielen ließ, während verschiedene Varianten von cysteinmutierten Filamin-Konstrukten allesamt nahezu unreaktiv waren. Möglicherweise ist dies auf die vergleichsweise starke Oberflächenladung von Filamin zurückzuführen. Experimentell stellt sich allerdings heraus, dass Ubiquitin deutlich kürzere Messdauern im AFM zulässt als Filamin, bedingt durch scheinbar schlechtere Adsorption an den Cantilever. Aus diesem Grund sind kombinierte Handle-Konstrukte wie in Abb. C.1 C+E von Vorteil, bei denen Filamin-Domänen die Adsorption an den Cantilever vermitteln, während Ubiquitin die Reaktionskinetik der Bildung von Disulfidbrücken optimiert. Als weiteres Handle-Konstrukt wurden auch die Titin-Domänen I27-I29 verwendet, die ebenfalls eine akzeptable Reaktionskinetik von Cysteinen ermöglichen. Allerdings scheint die Datenqualität unter einer gewissen Multimerisierungstendenz der Titin-Domänen zu leiden.

Die aufwendige und vergleichsweise ineffiziente Assemblierungsmethode über eine Festkörpersynthese-Methode lässt sich auch für Trimer-Konstrukte vermeiden, sofern man bereit ist, zwei His-Tags zu akzeptieren. Wird Dithiodipyridin-behandeltes Calmodulin mit Strep-Tag frei in Lösung mit einem Handle-Protein mit His-Tag zusammengegeben, so bilden sich Trimer-Konstrukte, die denen aus Abb. C.1 E entsprechen, außer dass an beiden Enden ein His-Tag vorliegt. Dies vereinfacht und beschleunigt das Protokoll erheblich, außerdem steigt die Ausbeute deutlich an. Messungen an Proteinkonstrukten mit zwei His-Tags haben ergeben, dass die Verschlechterung der Messungen durchaus tolerierbar sein kann [74].

C.2 Untersuchung von Calmodulin unter alternativen Zugrichtungen

Beispielkurven für Calmodulin unter drei verschiedenen Zugrichtungen sind in Abb. C.2 gezeigt. Es ist deutlich zu sehen, dass die mechanische Stabilität in verschiedenen Zugrichtungen große Unterschiede aufweist. Insbesondere finden wir eine erhebliche Stabilisierung der N-terminalen Domäne von Calmodulin, wenn Cys17 als Verknüpfungsrichtung gewählt wird sowie einen etwas geringeren Grad an Stabilisierung für Cys38. Die Entfaltungskraft von Calmodulin-Domänen lässt sich also durch die Wahl der Zuggeometrie in einem weiten Bereich variieren. Interessant ist zudem, dass sich durch Verändern von nur einem Kraftangriffspunkt pro Domäne bereits ein deutlicher Effekt

¹Um die Bildung von Poly-Calmodulin zu verhindern, wird die Calmodulin-Proteinlösung wiederum mit Dithiodipyridin behandelt.

C Alternative Zugrichtungen

erzielen lässt. Bei den in Abb. C.2 gezeigten drei verschiedenen Zugrichtungen sind jeweils beide Domänen von Calmodulin im Proteinkonstrukt enthalten, über den Interdomänen-Linker wird also DomN stets am C-Terminus und DomC am N-Terminus der Domäne mit Kraft belastet. Wird der Kraftangriffspunkt an einer Domäne verändert, so bleibt die Entfaltungskraft der anderen Proteindomäne unverändert (vgl. CaM 17,110 / CaM 17,118 oder CaM 17,118 / CaM 38,118). In der Beispielkurve für CaM 17,110 (ganz unten in Abb. C.2) sind die Gleichgewichtsübergänge der C-terminalen Domäne sogar zweimal zu sehen: Nach der Entfaltung der stabilisierten DomN bei ~ 50 pN relaxiert die Kraft auf einen Wert der niedrig genug ist, um die Rückfaltung der bereits zuvor entfalteten DomC zu ermöglichen. Dies ist nur durch die starke Verkürzung des Konturlängenzuwachses der C-terminalen Domäne durch die Zugrichtung Cys110 möglich (siehe auch Anhang A.4). Die Tatsache, dass sich zwischen den beiden hier beobachteten Entfaltungen von DomC keine erkennbaren Unterschiede zeigen, bestätigt erneut, dass beide Domänen von Calmodulin unabhängig voneinander falten und entfalten.

Solche Experimente erlauben es nun also, die Energielandschaft von Calmodulin in verschiedenen Richtungen zu untersuchen. Zukünftige Messungen werden zeigen können, ob die Barrierenhöhe der Entfaltung bei allen Zugrichtungen die gleiche ist, so dass die unterschiedlichen Stabilitäten lediglich auf veränderte Potentialbreiten zurückzuführen sind (wie bei GFP beobachtet [23]), oder ob andere Barrieren auftreten. Diese Frage ist interessant, da sich im Gleichgewicht wegen $\Delta G = \ln \frac{k_f}{k_u}$ bei veränderter Entfaltungsrate die Faltungsrate ebenfalls ändern müsste (Abb. C.3 A+B). Eine weitere Anwendung alternativer Zugrichtungen bei Calmodulin könnte darin bestehen, dass sich nun die Reihenfolge der Entfaltungsereignisse durch die Wahl einer stabilen oder einer instabilen Zugrichtung gezielt steuern lässt (Abb. C.3 C+D). Dies eröffnet Möglichkeiten insbesondere zur Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen wie in Kapitel 7 beschrieben. Zum jetzigen Zeitpunkt ist unklar, ob sich auch für die stabilisierten Zugrichtungen von Calmodulin Gleichgewichtsbedingungen bezüglich Faltung und Entfaltung erreichen lassen. Gegebenenfalls kann eine Anwendung des Crooks Fluktuations-Theorems das Ermitteln von Gleichgewichtsinformationen wie ΔG aus Messungen im Nichtgleichgewicht ermöglichen [22,10].

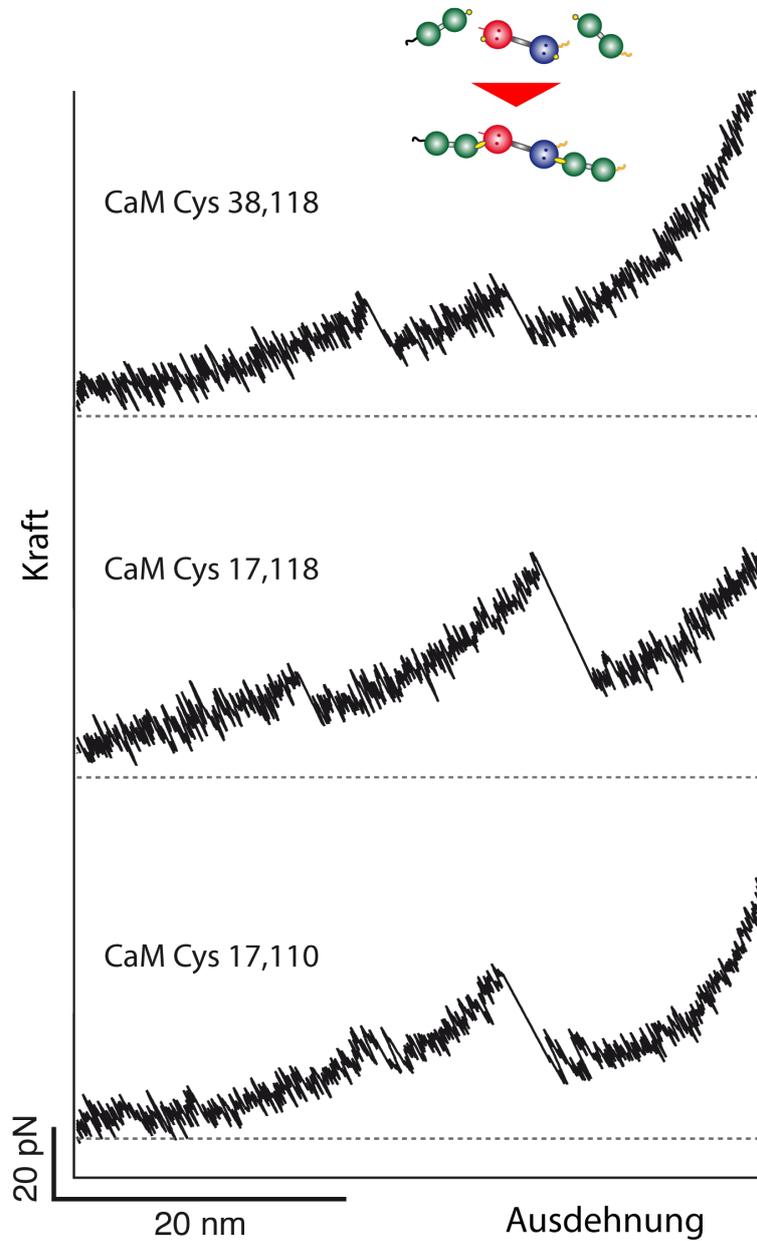


Abbildung C.2: Kraft-Abstands-Kurven von Calmodulin unter alternativen Zugrichtungen, 10 mM CaCl_2 , $v_{\text{pull}} = 50 \text{ nm/s}$. Die Stabilität der beiden Domänen von Calmodulin lässt sich durch Wahl der Kraftangriffspunkte modulieren. Die Skizze oben in der Abbildung verdeutlicht die Assemblierung der Proteinkonstrukte aus Calmodulin und Di-Ubiquitin-Handles über Disulfidbrücken.

C Alternative Zugrichtungen

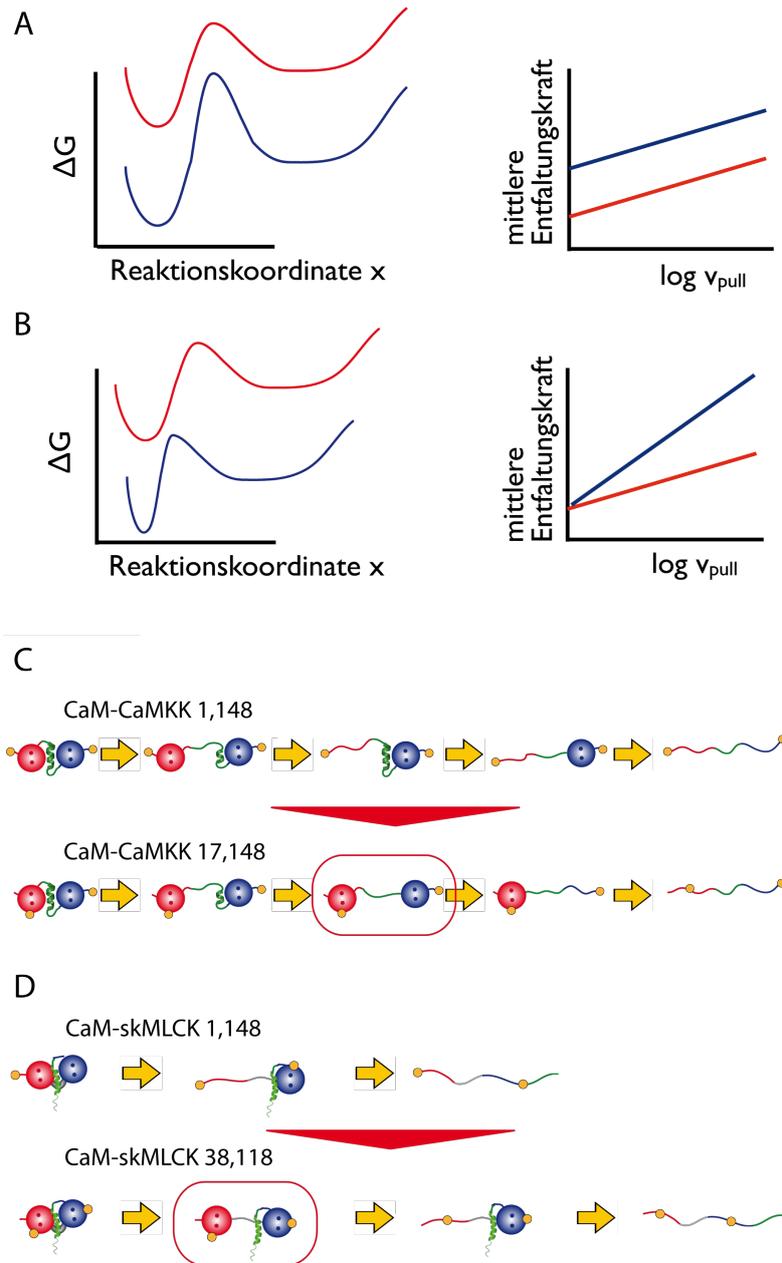


Abbildung C.3: A+B. Veränderung der Faltungs-Energielandschaft durch alternative Zugrichtungen. Die mechanische Stabilisierung von Calmodulin durch alternative Zugrichtungen kann prinzipiell auf zwei Weisen geschehen. Entweder durch Erhöhung der Energiebarriere (A) oder durch Verringerung der Potentialbreite Δx_{N-TS} (B). Die beiden Szenarien lassen sich durch eine Analyse der Ziehgeschwindigkeitsabhängigkeit der mittleren Entfaltungskraft unterscheiden. C+D. Variation der Reihenfolge von Entfaltungsereignissen durch alternative Zugrichtungen. C. Durch Stabilisierung von DomN im CaM-CaMKK-Konstrukt (Zugrichtung DomN Cys 17) lässt sich die Entfaltung der N-terminalen Domäne nach hinten verschieben. Das zweite Ereignis wäre dann vermutlich nicht mehr die Entfaltung von DomN, sondern die Dissoziation von CaMKK C von der C-terminalen Domäne von CaM (roter Kasten). D. Werden beide Domänen von CaM stabilisiert (z.B. Zugrichtungen DomN Cys 38, DomC Cys 118), so lässt sich in der Anwesenheit von skMLCK, das nicht unter Kraft gesetzt ist, ein neues Intermediat induzieren. Bei diesem Zustand ist DomN vom Peptid dissoziiert, liegt aber weiterhin in gefalteter Form vor (roter Kasten).

Literaturverzeichnis

- [1] BÄHLER, M. und A. RHOADS: *Calmodulin signaling via the IQ motif*. FEBS Lett, 513(1):107–113, Feb 2002.
- [2] BAYLEY, P. M., W. A. FINDLAY und S. R. MARTIN: *Target recognition by calmodulin: dissecting the kinetics and affinity of interaction using short peptide sequences*. Protein Sci, 5(7):1215–28, 1996.
- [3] BELL, G.I.: *Models for the specific adhesion of cells to cells*. Science, 200:618–627, 1978.
- [4] BERRIDGE, M. J., P. LIPP und M. D. BOOTMAN: *The versatility and universality of calcium signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 1(1):11–21, 2000.
- [5] BERTZ, M. und M. RIEF: *Mechanical unfoldons as building blocks of maltose-binding protein*. J Mol Biol, 378(2):447–458, Apr 2008.
- [6] BINNIG, G., C. QUATE und C. GERBER: *Atomic force microscope*. Phys. Rev. Letters, 56:930–933, 1986.
- [7] BLUMENTHAL, D. K., K. TAKIO, A. M. EDELMAN, H. CHARBONNEAU, K. TITANI, K. A. WALSH und E. G. KREBS: *Identification of the calmodulin-binding domain of skeletal muscle myosin light chain kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 82(10):3187–91, 1985.
- [8] BODENREIDER, C. und T. KIEFHABER: *Interpretation of protein folding psi values*. J Mol Biol, 351(2):393–401, Aug 2005.
- [9] BORNSCHLOEGL, T. und M. RIEF: *Single molecule unzipping of coiled coils: sequence resolved stability profiles*. Phys Rev Lett, 96(11):118102, Mar 2006.
- [10] BORNSCHLOEGL, T. und M. RIEF: *Single-molecule dynamics of mechanical coiled-coil unzipping*. Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids, 24(4):1338–42, 2008.
- [11] BROWN, S. E., S. R. MARTIN und P. M. BAYLEY: *Kinetic control of the dissociation pathway of calmodulin-peptide complexes*. J Biol Chem, 272(6):3389–97, 1997.
- [12] BUSTAMANTE, C., J. F. MARKO, E. D. SIGGIA und S. SMITH: *Entropic elasticity of lambda-phage DNA*. Science, 265(5178):1599–60, 1994.
- [13] BUTT, H. J. und M. JASCHKE: *Calculation of Thermal Noise in Atomic-Force Microscopy*. Nanotechnology Nanotechnology, 6(1):1–7, 1995.
- [14] CAO, Y., M. M. BALAMURALI, D. SHARMA und H. LI: *A functional single-molecule binding assay via force spectroscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 104(40):15677–81, 2007.
- [15] CARRION-VAZQUEZ, M., A. F. OBERHAUSER, T. E. FISHER, P. E. MARSZALEK, H. LI und J. M. FERNANDEZ: *Mechanical design of proteins studied by single-molecule force spectroscopy and protein engineering*. Prog Biophys Mol Biol, 74(1-2):63–91, 2000.
- [16] CECCONI, C., E. A. SHANK, C. BUSTAMANTE und S. MARQUSEE: *Direct observation of the three-state folding of a single protein molecule*. Science, 309(5743):2057–60, 2005.

- [17] CHATTOPADHYAYA, R., W. E. MEADOR, A. R. MEANS und F. A. QUIOCHO: *Calmodulin structure refined at 1.7 Å resolution*. Journal of Molecular Biology, 228(4):1177–1192, 1992.
- [18] CHIN, D. und A. R. MEANS: *Calmodulin: a prototypical calcium sensor*. Trends Cell Biol, 10(8):322–8, 2000.
- [19] CLAPHAM, DAVID E: *Calcium signaling*. Cell, 131(6):1047–1058, Dec 2007.
- [20] COOK, W. J., L. J. WALTER und M. R. WALTER: *Drug binding by calmodulin: crystal structure of a calmodulin-trifluoperazine complex*. Biochemistry, 33(51):15259–15265, Dec 1994.
- [21] CRIVICI, A. und M. IKURA: *Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 24:85–116, 1995.
- [22] CROOKS, G. E.: *Entropy production fluctuation theorem and the nonequilibrium work relation for free energy differences*. Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics, 60(3):2721–6, 1999.
- [23] DIETZ, H., F. BERKEMEIER, M. BERTZ und M. RIEF: *Anisotropic deformation response of single protein molecules*. Proc Natl Acad Sci USA, 103(34):12724–8, 2006.
- [24] DIETZ, H., M. BERTZ, M. SCHLIERF, F. BERKEMEIER, T. BORNSCHLOEGL, J. P. JUNKER und M. RIEF: *Cysteine engineering of polyproteins for single-molecule force spectroscopy*. Nat Protoc, 1(1):80–4, 2006.
- [25] DIETZ, H. und M. RIEF: *Exploring the energy landscape of GFP by single-molecule mechanical experiments*. Proc Natl Acad Sci USA, 101(46):16192–7, 2004.
- [26] DIETZ, H. und M. RIEF: *Protein structure by mechanical triangulation*. Proc Natl Acad Sci USA, 103(5):1244–7, 2006.
- [27] EVANS, E. und K. RITCHIE: *Dynamic strength of molecular adhesion bonds*. Biophys J, 72(4):1541–55, 1997.
- [28] EVANS, E. und K. RITCHIE: *Strength of a weak bond connecting flexible polymer chains*. Biophys J, 76(5):2439–47, 1999.
- [29] FERSHT, ALAN R: *Phi value versus psi analysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 101(50):17327–17328, Dec 2004.
- [30] FINDLAY, W. A., S. R. MARTIN, K. BECKINGHAM und P. M. BAYLEY: *Recovery of native structure by calcium binding site mutants of calmodulin upon binding of sk-MLCK target peptides*. Biochemistry, 34(7):2087–94, 1995.
- [31] FLORIN, E.-L., V.T. MOY und H.E. GAUB: *Adhesive forces between individual ligand-receptor pairs*. Science, 264:415–417, 1994.
- [32] FLORIN, E. L., M. RIEF, H. LEHMANN, M. LUDWIG, C. DORNMAIR, V. T. MOY und H. E. GAUB: *Sensing Specific Molecular-Interactions with the Atomic-Force Microscope*. Biosens Bioelectron, 10(9-10):895–901, 1995.
- [33] GREENLEAF, W. J., K. L. FRIEDA, D. A. FOSTER, M. T. WOODSIDE und S. M. BLOCK: *Direct observation of hierarchical folding in single riboswitch aptamers*. Science, 319(5863):630–3, 2008.

- [34] GU, X. und N. C. SPITZER: *Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca²⁺ transients*. Nature, 375(6534):784–7, 1995.
- [35] HERTADI, R. und A. IKAI: *Unfolding mechanics of holo- and apocalmodulin studied by the atomic force microscope*. Protein Sci, 11(6):1532–1538, Jun 2002.
- [36] HIGASHIJIMA, T., S. UZU, T. NAKAJIMA und E. M. ROSS: *Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins)*. J Biol Chem, 263(14):6491–6494, May 1988.
- [37] HOCHULI, E.: *Purification of recombinant proteins with metal chelate adsorbent*. Genet Eng (N Y), 12:87–98, 1990.
- [38] HOFFMANN, R. und L. OTVOS: *Selective dimerization of cysteines in glycopeptides and phosphopeptides*. Letters in Peptide Science, 3:371–377, 1997.
- [39] HULTSCHIG, C., H. J. HECHT und R. FRANK: *Systematic delineation of a calmodulin peptide interaction*. J Mol Biol, 343(3):559–68, 2004.
- [40] IDRIS, A., M. T. ALAM und A. IKAI: *Spring mechanics of alpha-helical polypeptide*. Protein Eng, 13(11):763–770, Nov 2000.
- [41] IKURA, M., G. M. CLORE, A. M. GRONENBORN, G. ZHU, C. B. KLEE und A. BAX: *Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR*. Science, 256(5057):632–8, 1992.
- [42] JUNKER, J. P., K. HELL, M. SCHLIERF, W. NEUPERT und M. RIEF: *Influence of substrate binding on the mechanical stability of mouse dihydrofolate reductase*. Biophys J, 89(5):L46–8, 2005.
- [43] JUNKER, J. P., F. ZIEGLER und M. RIEF: *Ligand-dependent equilibrium fluctuations of single calmodulin molecules*. Science, 323(5914):633–7, 2009.
- [44] JUNKER, J.P. und M. RIEF: *Single-molecule force spectroscopy distinguishes target binding modes of calmodulin*. Proc Natl Acad Sci U S A, akzeptiert, 2009.
- [45] KEDROV, A., M. KRIEG, C. ZIEGLER, W. KUHLBRANDT und D. J. MULLER: *Locating ligand binding and activation of a single antiporter*. EMBO Rep, 6(7):668–674, Jul 2005.
- [46] KRUEGER, J. K., G. A. OLAH, S. E. ROKOP, G. ZHI, J. T. STULL und J. TREWHELLA: *Structures of calmodulin and a functional myosin light chain kinase in the activated complex: a neutron scattering study*. Biochemistry, 36(20):6017–6023, May 1997.
- [47] LAW, R., G. LIAO, S. HARPER, G. YANG, D. W. SPEICHER und D. E. DISCHER: *Pathway shifts and thermal softening in temperature-coupled forced unfolding of spectrin domains*. Biophys J, 85(5):3286–3293, Nov 2003.
- [48] LIN, Y. M., Y. P. LIU und W. Y. CHEUNG: *Cyclic 3':5'-nucleotide phosphodiesterase. Purification, characterization, and active form of the protein activator from bovine brain*. J Biol Chem, 249(15):4943–4954, Aug 1974.
- [49] LINSE, S., T. DRAKENBERG und S. FORSEN: *Mastoparan binding induces a structural change affecting both the N-terminal and C-terminal domains of calmodulin : A 113Cd-NMR study*. FEBS Letters, 199(1):28–32, 1986.

- [50] LINSE, S., A. HELMERSSON und S. FORSÈN: *Calcium binding to calmodulin and its globular domains*. J Biol Chem, 266(13):8050–8054, May 1991.
- [51] MALENCIK, D. A. und S. R. ANDERSON: *High affinity binding of the mastoparans by calmodulin*. Biochem Biophys Res Commun, 114(1):50–6, 1983.
- [52] MALENCIK, D. A. und S. R. ANDERSON: *Peptide binding by calmodulin and its proteolytic fragments and by troponin C*. Biochemistry, 23(11):2420–8, 1984.
- [53] MARLOW, M. S. und A. J. WAND: *Conformational dynamics of calmodulin in complex with the calmodulin-dependent kinase kinase alpha calmodulin-binding domain*. Biochemistry, 45(29):8732–41, 2006.
- [54] MARSZALEK, P. E., H. LU, H. LI, M. CARRION-VAZQUEZ, A. F. OBERHAUSER, K. SCHULTEN und J. M. FERNANDEZ: *Mechanical unfolding intermediates in titin modules*. Nature, 402(6757):100–103, Nov 1999.
- [55] MARSZALEK, P. E., A. F. OBERHAUSER, Y. P. PANG und J. M. FERNANDEZ: *Poly-saccharide elasticity governed by chair-boat transitions of the glucopyranose ring*. Nature, 396(6712):661–664, Dec 1998.
- [56] MASINO, L., S. R. MARTIN und P. M. BAYLEY: *Ligand binding and thermodynamic stability of a multidomain protein, calmodulin*. Protein Sci, 9(8):1519–29, 2000.
- [57] MIYAWAKI, A, J. LLOPIS, R. HEIM, J. M. MCCAFFERY, J. A. ADAMS, M. IKURA und R. Y. TSIEN: *Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin*. Nature, 388(6645):882–887, 1997.
- [58] MUNOZ, V.: *Conformational dynamics and ensembles in protein folding*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 36:395–412, 2007.
- [59] NEUMAN, K. C. und A. NAGY: *Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy*. Nat Methods, 5(6):491–505, Jun 2008.
- [60] OBERHAUSER, A. F., P. E. MARSZALEK, H. P. ERICKSON und J. M. FERNANDEZ: *The molecular elasticity of the extracellular matrix protein tenascin*. Nature, 393(6681):181–185, May 1998.
- [61] OSAWA, M., H. TOKUMITSU, M. B. SWINDELLS, H. KURIHARA, M. ORITA, T. SHIBANUMA, T. FURUYA und M. IKURA: *A novel target recognition revealed by calmodulin in complex with Ca²⁺-calmodulin-dependent kinase kinase*. Nat Struct Biol, 6(9):819–824, Sep 1999.
- [62] PARK, H.Y., S. A. KIM, J. KORLACH, E. RHOADES, L. W. KWOK, W. R. ZIPFEL, M. N. WAXHAM, W. W. WEBB und L. POLLACK: *Conformational changes of calmodulin upon Ca²⁺ binding studied with a microfluidic mixer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 105(2):542–547, Jan 2008.
- [63] PUCHNER, E. M., A. ALEXANDROVICH, A. L. KHO, U. HENSEN, L. V. SCHAFER, B. BRANDMEIER, F. GRATER, H. GRUBMULLER, H. E. GAUB und M. GAUTEL: *Mechanoenzymatics of titin kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 105(36):13385–90, 2008.
- [64] RABL, C. R., S. R. MARTIN, E. NEUMANN und P. M. BAYLEY: *Temperature jump kinetic study of the stability of apo-calmodulin*. Biophys Chem, 101-102:553–64, 2002.

- [65] RIEF, M., H. CLAUSEN-SCHAUMANN und H. E. GAUB: *Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules*. Nat Struct Biol, 6(4):346–349, Apr 1999.
- [66] RIEF, M., J. M. FERNANDEZ und H. E. GAUB: *Elastically Coupled Two-Level-Systems as a Model for Biopolymer Extensibility*. Phys. Rev. Letters, 81(21):4764–4767, 1998.
- [67] RIEF, M., M. GAUTEL, F. OESTERHELT, J. M. FERNANDEZ und H. E. GAUB: *Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM*. Science, 276(5315):1109–12, 1997.
- [68] RIO, A. DEL, R. PEREZ-JIMENEZ, R. LIU, P. ROCA-CUSACHS, J. M. FERNANDEZ und M. P. SHEETZ: *Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding*. Science, 323(5914):638–641, Jan 2009.
- [69] SAKAKI, N., R. SHIMO-KON, K. ADACHI, H. ITOH, S. FURUIKE, E. MUNHEYUKI, M. YOSHIDA und K. KINOSITA: *One rotary mechanism for F1-ATPase over ATP concentrations from millimolar down to nanomolar*. Biophys J, 88(3):2047–2056, Mar 2005.
- [70] SANYAL, G., L. M. RICHARD, K. L. CARRAWAY und D. PUETT: *Binding of amphiphilic peptides to a carboxy-terminal tryptic fragment of calmodulin*. Biochemistry, 27(17):6229–6236, 1988.
- [71] SCHELLMAN, JOHN A.: *Macromolecular binding*. Biopolymers, 14(5):999–1018, 1975.
- [72] SCHLIERF, M., F. BERKEMEIER und M. RIEF: *Direct observation of active protein folding using lock-in force spectroscopy*. Biophys J, 93(11):3989–98, 2007.
- [73] SCHLIERF, M. und M. RIEF: *Single-molecule unfolding force distributions reveal a funnel-shaped energy landscape*. Biophys J, 90(4):L33–L35, Feb 2006.
- [74] SCHLIERF, M. und M. RIEF: *Surprising simplicity in the single-molecule folding mechanics of proteins*. Angew Chem Int Ed Engl, 48(4):820–2, 2009.
- [75] SCHMIDT, T. G. M. und A. SKERRA: *The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins*. Nat Protoc, 2(6):1528–1535, 2007.
- [76] SCHWAIGER, I., A. KARDINAL, M. SCHLEICHER, A. A. NOEGEL und M. RIEF: *A mechanical unfolding intermediate in an actin-crosslinking protein*. Nat Struct Mol Biol, 11(1):81–5, 2004.
- [77] SCHWAIGER, I., C. SATTLER, D. R. HOSTETTER und M. RIEF: *The myosin coiled-coil is a truly elastic protein structure*. Nat Mater, 1(4):232–5, 2002.
- [78] SCHWAIGER, I., M. SCHLEICHER, A. A. NOEGEL und M. RIEF: *The folding pathway of a fast-folding immunoglobulin domain revealed by single-molecule mechanical experiments*. EMBO Rep, 6(1):46–51, 2005.
- [79] SHEN, X., C. A. VALENCIA, J. W. SZOSTAK, B. DONG und R. LIU: *Scanning the human proteome for calmodulin-binding proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 102(17):5969–74, 2005.
- [80] STULL, J. T., P. J. LIN, J. K. KRUEGER, J. TREWHELLA und G. ZHI: *Myosin light chain kinase: functional domains and structural motifs*. Acta Physiol Scand, 164(4):471–482, Dec 1998.

- [81] TERUEL, M. N., W. CHEN, A. PERSECHINI und T. MEYER: *Differential codes for free Ca(2+)-calmodulin signals in nucleus and cytosol*. *Curr Biol*, 10(2):86–94, 2000.
- [82] TOKUMITSU, H., G. A. WAYMAN, M. MURAMATSU und T. R. SODERLING: *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase: identification of regulatory domains*. *Biochemistry*, 36(42):12823–12827, Oct 1997.
- [83] TRUONG, K., A. SAWANO, H. MIZUNO, H. HAMA, K. I. TONG, T. K. MAL, A. MIYAWAKI und M. IKURA: *FRET-based in vivo Ca²⁺ imaging by a new calmodulin-GFP fusion molecule*. *Nat Struct Biol*, 8(12):1069–73, 2001.
- [84] VANDONSELAAR, M., R. A. HICKIE, J. W. QUAIL und L. T. DELBAERE: *Trifluoperazine-induced conformational change in Ca(2+)-calmodulin*. *Nat Struct Biol*, 1(11):795–801, Nov 1994.
- [85] WAYMAN, G. A., Y. S. LEE, H. TOKUMITSU, A. SILVA und T. R. SODERLING: *Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity*. *Neuron*, 59(6):914–31, 2008.
- [86] WIITA, A. P., R. PEREZ-JIMENEZ, K. A. WALTHER, F. GRAETER, B. J. BERNE, A. HOLMGREN, J. M. SANCHEZ-RUIZ und J. M. FERNANDEZ: *Probing the chemistry of thioredoxin catalysis with force*. *Nature*, 450(7166):124–7, 2007.
- [87] WOODSIDE, M. T., P. C. ANTHONY, W. M. BEHNKE-PARKS, K. LARIZADEH, D. HERSCHLAG und S. M. BLOCK: *Direct measurement of the full, sequence-dependent folding landscape of a nucleic acid*. *Science*, 314(5801):1001–4, 2006.
- [88] YAMNIUK, A. P. und H. J. VOGEL: *Calmodulin's flexibility allows for promiscuity in its interactions with target proteins and peptides*. *Mol Biotechnol*, 27(1):33–57, 2004.
- [89] ZHANG, M., T. TANAKA und M. IKURA: *Calcium-induced conformational transition revealed by the solution structure of apo calmodulin*. *Nat Struct Biol*, 2(9):758–67, 1995.
- [90] ZIEGLER, F.: *Faltungskinetik von Calmodulin*. Diplomarbeit, Physik-Department E22, Technische Universität München, 2008.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den zahlreichen Menschen bedanken, die alle zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuvorderst danke ich Matthias Rief, unter dessen Leitung diese Arbeit entstand. Seine Betreuung, bei der ich intensive und inspirierende Diskussionen bei einem gleichzeitig hohen Grad an Freiheit für eigene Ideen und Projekte erfahren durfte, hat wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit gehabt.

Ebenfalls danken möchte ich meinen früheren Kollegen Hendrik Dietz und Michael Schlierf, deren Arbeiten eine wichtige Quelle der Inspiration für meine wissenschaftlichen Projekte waren. Größter Dank gebührt auch Morten Bertz und Felix Berkemeier für zahlreiche Diskussionen und Unterstützung auf allen Ebenen, von der Molekularbiologie bis zur Monte-Carlo-Simulation. Weiterhin bedanke ich mich bei Christof Gebhardt und Fabian Ziegler, die mit ihren eigenen Einzelmolekül-Messungen an Calmodulin wertvolle Beiträge zu dieser Arbeit geleistet und das Tor zur nächsten Phase des Calmodulin-Projekts weit aufgestoßen haben.

Für die tatkräftige Unterstützung bei Proteinexpression und -aufreinigung danke ich Claudia Antrecht, Gabi Chmel, Daniela Mayr, Monika Rusp und Karin Vogt. Peter Bayley und Stephen Martin bin ich für wertvolle Ratschläge in einer frühen Phase des Projekts sehr verbunden. Darüber hinaus möchte ich mich bei Andreas Bausch, Thomas Bornschlögl, Johannes Buchner, Elke Fehsenfeld, Nicole Mittermüller, Melanie Reisinger und vielen weiteren Menschen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt und motiviert haben.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes und dem Doktorandenkolleg "Materials Science of Complex Interfaces" danke ich für finanzielle und ideelle Unterstützung. Zu guter Letzt gebührt meinen Eltern, meinen Geschwistern und insbesondere Carolin Anwander größter Dank für jedwede Hilfe und Unterstützung.

