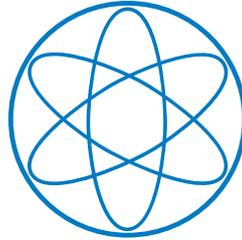


PHYSIK-DEPARTMENT



Einzelmolekülmechanik der Faltung
und Entfaltung von Proteinen

Dissertation

von

Michael Schlierf



TECHNISCHE UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biophysik E22, Physik Department
Technische Universität München

Einzelmolekülmechanik der Faltung und Entfaltung von Proteinen

Michael Schlierf

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. Harald Friedrich

Prüfer der Disseration:

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

Die Dissertation wurde am 3. Juni 2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 3. Juli 2008 angenommen.

Einzelmolekülmechanik der Faltung und Entfaltung von Proteinen

Dissertation an der Fakultät für Physik
der Technischen Universität München

vorgelegt von

Michael Schlierf
aus Nürnberg

München, den 3. Juni 2008

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	xiii
Einleitung	xiv
1 Kraftspektroskopie an Proteinen	1
1.1 Mechanische Entfaltung von Proteinstrukturen	1
1.2 Faltung von Proteinen ohne äußere Kraft	4
1.3 Faltung von Proteinen unter äußerer Kraft	6
2 Die Lock-in Kraftspektroskopie	9
2.1 Lock-in Erweiterung für den vorhandenen Aufbau	9
2.2 Auflösungsverbesserung	10
2.3 Identifikation von Faltungsereignissen	13
2.4 Zusammenfassung	14
3 Faltungskinetik unter Kraft	15
3.1 Zusätzliche mechanische Faltungsbarriere	15
3.2 Grenzen für kraftspektroskopische Untersuchungen	18
3.3 Zusammenfassung	23
4 Faltung von Filamin unter äußerer Kraft	25
4.1 Filamin ddFLN4 faltet bei 4 pN	25
4.2 Dreizustandsfaltung unter Kraft	27
4.3 Faltungspfad unter äußerer Kraft	30
4.4 Diskussion	32
4.5 Zusammenfassung	32
5 Faltung von Ubiquitin unter äußerer Kraft	33
5.1 Aktive Faltung von Ubiquitin _{1,76}	33
5.2 Aktive Faltungskraft nach Wunsch	38
5.3 Zusammenfassung	41
6 Die kraftfreie Faltungsbarriere	43
6.1 Ein Klammermechanismus zur Ausbildung des Zwischenzustands	44
6.2 Einpassen des nativen Zustands	47
6.3 Additive Effekte bei der Faltungsbarriere	49
6.4 Diskussion	50

6.5	Zusammenfassung	53
7	Die mechanische Entfaltungsbarriere	55
7.1	Nicht-lokale Wechselwirkungen stabilisieren ddFLN4	56
7.2	Entfaltungsbarriere des Zwischenzustands	60
7.3	Zusammenfassung	63
8	Ausblick	65
8.1	Produktive kurzlebige Faltungszwischenzustände	65
8.2	Gute und schlechte Lösungsmittel	69
8.3	Aktive Materialien	69
8.4	Konformationskinetik unter Kraft	70
A	Ensemble-Faltungsstudien an ddFLN4	71
A.1	Mechanische Double-Jump Experimente an verschiedenen ddFLN4 Tryptophan-Varianten	71
A.2	Chemischer Faltungs- und Entfaltungspfad	72
A.3	Thermodynamische Stabilität des Intermediats	75
B	Grenzen eines einfachen eindimensionalen Modells	79
C	Kraftinduziertes Quasi-Gleichgewicht	85
D	ddFLN4 Faltungskinetiken	89
E	Temperaturverhalten von Csp <i>Tm</i>	95
F	Materialien und Methoden	101
F.1	Das Kraftspektrometer	101
F.2	Lock-in Details	102
F.3	Wahrscheinlichkeitsverteilungen	103
F.4	Kraftladungsrate	104
F.5	Bestimmung von Entfaltungs- und Rückfaltungskräften	105
F.6	Monte-Carlo-Simulationen	106
F.7	Molekularbiologie	107
F.8	Oberflächenfunktionalisierung	108
	Literaturverzeichnis	109
	Danksagung	115

Abbildungsverzeichnis

1	Energiebarrieren	xvi
1.1	Skizze eines Kraftmikroskop-Experiments	2
1.2	Double-Jump Experimente an ddFLN4	4
1.3	Faltungskinetik des ddFLN4 Wildtyps	5
2.1	Lock-in Schema	10
2.2	Lock-in Signal-zu-Rausch Verhältnis	11
2.3	Persistenzlängenmessung	12
2.4	Detektion von Faltungsereignissen	13
3.1	Zusätzliche Faltungsbarriere	16
3.2	Anteile an der Energiebarriere	17
3.3	Ziehgeschwindigkeitsabhängige Rückfaltungswahrscheinlichkeitsverteilung	19
3.4	Rückfaltungskraft	20
3.5	Experimente mit einer optischen Pinzette	21
3.6	Vergleich der zusätzlichen Barriere am Kraftmikroskop und an der optischen Pinzette	22
4.1	Beispielrückfaltungskurven von ddFLN4	26
4.2	Faltungskraftverteilung ddFLN4	27
4.3	Einfangen des Zwischenzustands	29
4.4	Energielandschaft ddFLN4 unter Kraft	31
5.1	Rückfaltung von Hexa-Ubiquitin _{1,76}	34
5.2	Effektive Faltungsrate des Hexa-Ubi _{1,76}	35
5.3	Ig-Ubi _{1,76} Konstrukt	37
5.4	Ig-Ubi _{1,35} und Ig-Ubi _{1,16} Konstrukt	39
5.5	Ig-Ubi _{1,76} , Ig-Ubi _{1,35} und Ig-Ubi _{1,16} Faltungskräfte im Vergleich	40
6.1	Normalisierte Faltungskinetik des Zwischenzustands	45
6.2	Darstellung des Faltungszwischenzustands	46
6.3	Normalisierte Faltungskinetik des nativen Zustands	48
6.4	Normalisierte Faltungskinetik des nativen Zustands	49
6.5	Doppelmutanten von ddFLN4	50
6.6	Energiebarrierenveränderungen durch Mutationen	51
6.7	Die Mutation F91W	52
6.8	Vergleich ddFLN4 und I27	53

7.1	Entfaltungskinetik ddFLN4 Varianten	57
7.2	Schlüsselaminosäuren bei der Entfaltung von ddFLN4	59
7.3	Entfaltungskinetik des ddFLN4 Zwischenzustands	61
7.4	Schlüsselaminosäuren bei der Entfaltung des Zwischenzustands	62
8.1	Extreme Faltungskinetiken	66
8.2	Faltungspfad Domäne ddFLN3	67
8.3	Metastabile Faltungszwischenzustände	68
8.4	Aktive Materialien	69
A.1	Chevron-Plot der ddFLN4 Tryptophan Varianten	73
A.2	Vergleich chemisches und mechanisches Energielandschaftsbild	74
A.3	Double-Jump Experiment F24W	75
A.4	Thermodynamische Stabilität des Zwischenzustands	76
A.5	Mechanische Stabilität des Zwischenzustands	76
B.1	Vergleich der Modelle von Bell & Kramers	80
B.2	Kraft-Ausdehnungskurven bei niedrigen Ziehgeschwindigkeiten	81
B.3	Entfaltungskraftverteilung bei niedriger Kraftladungsrate	82
B.4	Lebensdauer Zwischenzustand	83
C.1	Quasi-Gleichgewicht	86
C.2	Simulation Quasi-Gleichgewicht	87
D.1	Faltungskinetik des ddFLN4 Zwischenzustands - Teil 1	89
D.2	Faltungskinetik des ddFLN4 Zwischenzustands - Teil 2	90
D.3	Faltungskinetik des nativen Zustands	91
D.4	Faltungskinetik der ddFLN4 Tryptophan Mutanten	92
D.5	Faltungskinetik des ddFLN4 Wildtyps mit Gdm-HCl	93
E.1	Struktur des Cold Shock Proteins	96
E.2	Cold shock protein _{10,67}	96
E.3	Entfaltungskräfte Cold-shock-protein _{10,67}	97
E.4	Entfaltungskräfte Cold shock protein _{2,55}	98
E.5	Übergangszustandsabstand als Funktion der Temperatur	99
F.1	Modifizierte Fluidzelle	101
F.2	Korrekturkraft Lock-in	102
F.3	Entfaltungskraftbestimmung	105

Tabellenverzeichnis

6.1	Faltungsraten für Mutationen im Bereich 43 – 95	44
6.2	Faltungsraten für Mutationen im Bereich 6 – 37	47
7.1	Entfaltungskinetik des nativen Zustands für die ddFLN4 Punktmutanten	59
7.2	Entfaltungskinetik des Zwischenzustands für die ddFLN4 Punktmutanten	61
A.1	Faltungskinetik der ddFLN4 Tryptophan-Varianten	72
A.2	Faltungskinetik des ddFLN4 Wildtyps mit Guanidiniumhydrochlorid	72
A.3	Raten aus Lösungsmittelexperimenten	73

Zusammenfassung

Der Proteinfaltungsprozess wird bis heute noch nicht eindeutig verstanden. Er wird als Diffusion auf einer hochdimensionalen Energielandschaft beschrieben. Von der unstrukturierten Aminosäurekette aus folgt ein Protein einem Pfad auf dieser Energielandschaft in das globale Minimum – die native Struktur. Fehlfaltungen von Proteinen werden durch lokale Minima der Energielandschaft beschrieben und sind als Ursache einiger Krankheiten beschrieben. Studien unterschiedlicher Proteine und detaillierte Kenntnisse der zugehörigen Energielandschaften ermöglichen allgemeine Prinzipien zu erkennen.

In dieser Arbeit wurde eine Lock-in Messmethode für Kraftspektrometer entwickelt, um die Kraftauflösung des Instruments um ein bis zwei Größenordnungen zu verbessern. Diese Technik ermöglichte es, den Faltungspfad der Filamin Domäne 4 aus *Dictyostelium discoideum* (ddFLN4) unter äußerer Kraft zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass ddFLN4 bei einer durchschnittlichen Kraft von 4 pN faltet und auch unter äußerer Kraft über den obligatorischen Zwischenzustand in den nativen Zustand findet. Es wurde ein Modell entwickelt, das die Faltungskinetik von Proteinen unter Kraft beschreibt und die experimentelle Faltungskraftverteilung von ddFLN4 sehr gut reproduziert.

Ein entscheidender Parameter des Modells ist die starke Abhängigkeit der zu erwartenden Rückfaltungskraft von der Länge der sich faltenden Aminosäurekette. Diese Hypothese konnte an dem Protein Ubiquitin überprüft werden. Dazu wurden reaktive Aminosäuren in Ubiquitin eingefügt, so dass drei verschiedene Kettenlängen entstanden: ein Volllängenkonstrukt, eine teilverkürzte und eine stark verkürzte Variante. Es wurde gezeigt, dass die aktive Faltungskraft von 4,3 pN auf bis zu 11,2 pN entsprechend der Vorhersage anwächst.

Durch eine ausführliche Mutationsstudie konnte neben der mechanischen Faltungsbarriere auch die kraftfreie Faltungsbarriere untersucht werden. Es konnten Schlüsselaminosäuren auf dem Faltungspfad von ddFLN4 identifiziert werden. Ferner wurde gezeigt, dass die Bildung des Zwischenzustands unabhängig von der des nativen Zustands ist. Neben der Faltungsbarriere, konnten mittels der eingefügten Mutationen auch kritische Wechselwirkungen der mechanischen Entfaltungsbarriere von ddFLN4 gefunden werden. Diese sind im Gegensatz zur Faltung nicht-lokal, d.h. die Stabilität des nativen Zustands von ddFLN4 ist von Mutationen im Zwischenzustand beeinflussbar.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse tragen zu einem besseren Verständnis der hochdimensionalen Energielandschaft bei.

Einleitung

Proteine gehören zu den wichtigsten Bestandteilen in Zellen. Sie reagieren auf Umwelteinflüsse, wie beispielsweise Licht, Temperatur oder chemische Gradienten, regulieren biochemische Prozesse, wandeln chemische Energie in mechanische Bewegung oder schaffen mechanische Stabilität. Damit Proteine diese unterschiedlichsten Aufgaben bewältigen können, besitzen sie eine spezifische, komplexe Tertiärstruktur. Proteine werden in der Zelle als lineare Kette aus zwanzig verschiedenen Aminosäuren hergestellt, die unterschiedlichste chemische Eigenschaften besitzen. In dieser linearen Kette ist die native Tertiärstruktur bereits kodiert. Viele topologisch einfache Proteine finden innerhalb weniger Millisekunden bis Sekunden ihre Tertiärstruktur selbstständig. Einige komplizierte Proteine erhalten für diesen Faltungsvorgang Hilfe durch so genannte Chaperone-Proteine. Bei manchen Proteinen kommt es allerdings zu Abweichungen des Faltungspfads, d.h. diese besitzen am Ende des Faltungsvorgangs nicht ihre native Tertiärstruktur, sondern weisen eine fehlgefaltete Struktur auf. Solche Fehlfaltungen zeigen sich häufig in Krankheitsbildern wie Alzheimer, Parkinson oder Creutzfeld-Jakob.

Bis heute wird der eigentliche Strukturfindungsprozess noch nicht verstanden. Theoretisch wird der Faltungsprozess als Diffusion in einer hochdimensionalen Energielandschaft beschrieben. Der gefaltete Zustand N wird energetisch dem entfalteten Zustand U bevorzugt. Der Faltungspfad auf der Energielandschaft führt vom unstrukturierten Polypeptid über einen hochenergetischen Übergangszustand \ddagger in den nativen Zustand. Diese Barriere kommt aufgrund verschiedenster Interaktionen zwischen den einzelnen Aminosäuren zustande. Ein Schema solch einer Energielandschaft ist in Abbildung 1 illustriert. Bei schnell-faltenden Proteinen ist die Höhe der Barriere zwischen U und N nur wenige $k_B T$. Doch auch Proteine mit sehr ähnlicher Tertiärstruktur können teilweise stark unterschiedliche Barrierehöhen aufweisen [1]. Es wäre somit wünschenswert, kritische Wechselwirkungen, die die natürliche Faltungsbarriere erhöhen oder erniedrigen, zu identifizieren.

Klassische Lösungsmittelexperimente an Proteinen ermöglichen teilweise die Rekonstruktion dieser Energielandschaft [2]. Bei diesen Experimenten wird allerdings über ein großes Ensemble an Molekülen gleichzeitig gemittelt, so dass individuelle Pfade und geringe Populationen einzelner Zustände unter Umständen nicht entdeckt werden. In den letzten Jahren etablierten sich unterschiedliche Einzelmolekültechniken, die es ermöglichen, einzelne Proteine auf ihrem Entfaltung- oder Faltungspfad zu verfolgen. Gerade die Einzelmolekülkraftspektroskopie stellte sich als besonders geeignet heraus, um die mechanischen Eigenschaften einzelner Proteine zu studieren [3]. Dabei wurde mittels Kraft ein Protein meist aus seinem nativen Zustand in einen entfalteten Zustand überführt. Zusätzlich bietet die Einzelmolekülkraftspektroskopie eine gut definierte Reaktionskoordinate in Form eines End-zu-End-Abstands. Erst kürzlich gelang es Schwaiger *et al.* mittels eines Kraftspektrometers nicht nur den Entfaltungspfad sondern auch den Faltungspfad eines einzelnen Proteins zu rekonstruieren [4]. Bei diesen

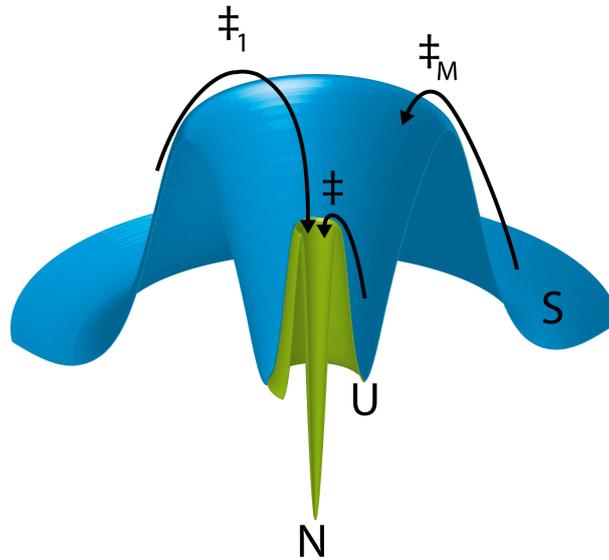


Abbildung 1: Energiebarrieren auf dem Faltungspfad

Studien konnte die Faltungskinetik unter Kraft nicht direkt beobachtet werden. Es ergeben sich noch zahlreiche offene Fragen:

- Ist der beobachtete Faltungspfad vergleichbar zu Ergebnissen aus Lösungsmittelstudien?
- Können Schlüsselinteraktionen auf dem Faltungspfad identifiziert werden?
- Wie setzt sich die mechanische Entfaltungsbarriere zusammen?
- Kann der eigentliche Faltungsvorgang direkt mit einem Kraftspektrometer beobachtet werden?

Bei der Untersuchung des Faltungspfads eines Proteins unter äußerer Kraft aus einem gestreckten Zustand S könnte das Protein unterschiedliche Faltungspfade nehmen. Es besteht die Möglichkeit, dass unter äußerer Kraft ein einzelner neuer Übergangszustand \ddagger_1 entsteht. Alternativ könnte der Faltungsvorgang sequenzielle Barrieren überwinden. Nachdem das Protein den Übergangszustand der mechanischen Barriere \ddagger_M überwunden hat, folgt es dem natürlchen Faltungspfad aus U über \ddagger in N.

In dieser Arbeit wurde mittels einer Lock-in Technik die Kraftauflösung und Driftstabilität eines Kraftspektrometers um ein bis zwei Größenordnungen verbessert. Damit konnte erstmals in Kraft-Ausdehnungsexperimenten die Faltung zweier unterschiedlicher Proteine unter äußerer Kraft studiert werden. Es wird ein Modell entwickelt, das die Beschreibung der Faltungskinetik unter äußerer Kraft ermöglicht und hilfreiche Vorhersagen für Konformationsänderungen unter Kraft liefert. Weiterhin wird eine umfangreiche Mutationsstudie an einem schnell-faltenden Protein durchgeführt, um dessen Faltungs- und Entfaltungsbarriere mit Einzelmolekülexperimenten zu charakterisieren.

Kapitel 1

Kraftspektroskopie an Proteinen

1.1 Mechanische Entfaltung von Proteinstrukturen

Seit etwa einer Dekade ist bekannt, dass man die Tertiärstruktur von Proteinen und DNA bzw. RNA mit Kraft gezielt zerstören kann [3, 5, 6]. Studien mittels optischer Pinzetten konzentrierten sich hauptsächlich auf die Struktur und Mechanik von DNA und RNA, die Funktionsweise von Enzymen und in wenigen Fällen auf die Proteinfaltung [7, 8, 9]. Das in dieser Arbeit verwendete eindimensional agierende Kraftmikroskop basiert auf dem von Binnig vorgestellten *Atomic-Force-Microscope (AFM)*. Es erwies sich als gut geeignet, um die Mechanik und Struktur von Proteinen zu untersuchen [10, 11, 12, 13, 14]. Zunächst konzentrierten sich die ersten Studien auf Proteine, die auch *in vivo* unter Kraftbelastung stehen, wie beispielsweise Titin [3, 12], Tenascin [15], Fibronectin [16], Filamin [13, 14], Ubiquitin [17, 18], DHFR [19] oder Myosin [20]. Später wurden auch Proteine, die in der Natur nicht unter äußerer Kraft stehen, wie beispielsweise GFP [21], MBP [22], E2lip3 [23], Im9 [24] oder Top7 [25], sowie Membranproteine wie Bacteriorhodopsin [26] kraftspektroskopisch untersucht.

Bei einem Experiment mit dem Kraftmikroskop wird die Kraft entweder konstant gehalten (*force feedback*, *force clamp*, [18, 27]) oder der Abstand zwischen einer Blattfederspitze und der Oberfläche mit konstanter Geschwindigkeit erhöht (*force extension*, [3]). In dieser Dissertation wurde für alle kraftspektroskopischen Untersuchungen die Technik mit konstanter Geschwindigkeit gewählt. Abbildung 1.1A skizziert den Aufbau eines Kraftspektrometers. Eine typische Kraft-Ausdehnungskurve für die Entfaltung der Proteindomänen 1-5 von Filamin aus *Dictyostelium discoideum* (ddFLN1-5) ist in Abbildung 1.1B gezeigt. Bei wachsender Ausdehnung steigt die Kraft auf das komplett gefaltete ddFLN1-5 Konstrukt zwischen Blattfeder und Oberfläche an, bis eine Domäne ihre Tertiärstruktur verliert, 100 bisher strukturierte Aminosäuren als Polypeptidkette (*Spacer*) freigibt und die Kraft abrupt abfällt (Punkt 1).

Eine Entfaltung von 100 Aminosäuren einer Filamindomäne ergibt einen Konturlängenzuwachs $\Delta L_C \approx 32,5$ nm und stimmt mit dem erwarteten Längenzuwachs sehr gut überein¹. Wird der Abstand zwischen Blattfeder und Oberfläche weiter mit konstanter Geschwindigkeit erhöht, dann steigt erneut die Kraft bis eine weitere Domäne ihre Tertiärstruktur verliert. Sind alle Domänen entfaltet, steigt die äußere Kraft auf das Polypeptid so lange an, bis entweder

¹ Der Konturlängenzuwachs durch eine Aminosäure beträgt $d_{aa} = 0,365$ nm [13]. Der gefaltete End-zu-End-Abstand einer Filamindomäne ist ca. $d_{1,100} = 4$ nm, so dass sich der erwartete Konturlängenzuwachs aus den entfaltenden Aminosäuren n_{aa} nach $\Delta L_C^{erwartet} = n_{aa} \cdot d_{aa} - d_{1,100}$ berechnet.

die Bindung an die Blattfeder oder die Oberfläche dissoziiert und die Kraft auf 0 pN abfällt (Punkt 2). Die Domäne ddFLN4 zeigt bei ihrer Entfaltung keinen kompletten Konturlängenzuwachs $\Delta L_C = 32,5$ nm, sondern einen mechanisch stabilen Entfaltungszwischenzustand [13]. Der mechanische Entfaltungsprozess zerlegt sich in zwei Schritte: Entfaltung des nativen Zustands mit $\Delta L_C \approx 15$ nm und Entfaltung des Zwischenzustands mit $\Delta L_C \approx 17,5$ nm (siehe die ersten beiden Entfaltungen in Abb. 1.1B). Schwaiger *et al.* charakterisierten diesen Entfaltungszwischenzustand ausführlich. Demzufolge besteht der erste Entfaltungsschritt aus zwei β -Strängen und der restliche Entfaltungsprozess umfasst die verbleibenden fünf β -Stränge [13].

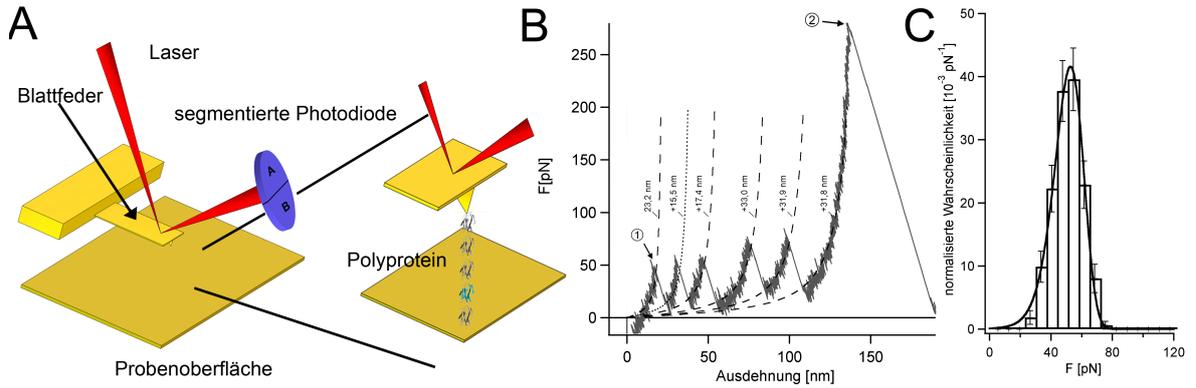


Abbildung 1.1: (A) Schematische Darstellung eines Kraftmikroskops. Das Polyprotein zwischen Blattfeder und Oberfläche wird mit konstanter Geschwindigkeit gestreckt. (B) Typische Kraft-Ausdehnungskurve des Proteins ddFLN1-5. Die Polypeptidelastizität kann durch die Anpassung von WLC-Modellen reproduziert werden. Die Domäne ddFLN4 entfaltet über einen mechanisch stabilen Zwischenzustand mit $\Delta L_C \approx 15$ nm und $\Delta L_C \approx 17,5$ nm. (C) Entfaltungskraftverteilung bei $v_P = 800 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ mit angepasster Entfaltungskraftverteilung $\frac{dP_U}{dF}(F)$

Viele der bisher kraftspektroskopisch studierten Proteine entfalten in einem Zwei-Zustands-Prozess, d.h. ohne mechanisch stabilen Zwischenzustand. Untersucht man komplexere größere Strukturen wie beispielsweise GFP oder MBP, dann zeigen sich häufig mechanisch stabile Untereinheiten (*unfoldons*) auf dem Entfaltungspfad [21, 22]. Zur strukturellen Charakterisierung der entfaltenden Einheit ist zunächst eine genaue Bestimmung des Konturlängenzuwachs von einem Entfaltungsereignis zum nächsten nötig. Dazu modelliert man die Elastizität des entfalteten Polypeptids mit einem entropischen Elastizitätsmodell, dem *Worm-like chain* Modell (WLC-Modell). Eine Interpolationsformel von Bustamante *et al.* beschreibt diese Elastizität nach Gl. 1.1 in Form der resultierenden Kraft F bei einer bestimmten Ausdehnung d mit den Polypeptidparametern Konturlänge L_C und dessen Persistenzlänge p , sowie der thermischen Energie $k_B T$ [28]:

$$F(d) = \frac{k_B T}{p} \cdot \left(\frac{d}{L_C} + \frac{1}{4 \cdot \left(1 - \frac{d}{L_C}\right)^2} - \frac{1}{4} \right) \quad (1.1)$$

Für eine exakte Konturlängenzuwachsmessung ist es nötig, bei der Anpassung der Konturlänge an die experimentellen Daten, die Persistenzlänge konstant zu halten und das Modell stets in einem ähnlichen Kraftbereich an die experimentellen Kraft-Ausdehnungskurven an-

zupassen². Als zuverlässige Persistenzlänge hat sich der Wert $p = 0,5$ nm herausgestellt, der auch in hochauflösenden Messungen im niedrigen Kraftbereich in Kapitel 2 gefunden wird. Neben Konturlängenzuwächsen können mit dem Kraftmikroskop auch die Entfaltungskräfte des Proteins genau bestimmt werden. Die Entfaltungskraftverteilung gibt Informationen über die Entfaltungsbarriere sowie die Potentialbreite entlang der Krafrichtung. Für die Entfaltung des nativen Zustands von ddFLN4 ist beispielhaft eine Entfaltungskraftverteilung in Abbildung 1.1C dargestellt. Der Entfaltungsvorgang kann als Poisson-Prozess beschrieben werden und es ergibt sich die Entfaltungswahrscheinlichkeitsdichte $\frac{dP_U}{dF}(F)$ (für eine detaillierte Herleitung siehe Anhang F.3). In die Berechnung der Entfaltungswahrscheinlichkeitsdichte geht ein Modell ein, das die Kraftabhängigkeit der Entfaltungsrate $k_u(F)$ beschreibt. Anhang B beschreibt sowohl das weitverbreitete Bell-Modell als auch ein Kramers-Modell zur Berechnung von $k_u(F)$. Aus dem in Grenzen verwendbaren Bell-Modell erhält man direkt die Barrierenposition Δx sowie die kraftfreie Entfaltungsrate k_u^0 . Das Kramers-Modell liefert eine kraftfreie Entfaltungsrate k_u^0 und eine detaillierte Energielandschaft bis zur Entfaltungsbarriere. Die kraftfreie Entfaltungsrate kann wiederum über Gl. 1.2 in eine Barrierenhöhe ΔG^\ddagger umgerechnet werden:

$$k_u^0 = A \cdot \exp\left(\frac{\Delta G^\ddagger}{k_B T}\right) \Rightarrow \Delta G^\ddagger(k_B T) = \ln\left(\frac{k_u^0}{A}\right) \quad (1.2)$$

mit dem Arrhenius-Vorfaktor $A = 1 \cdot 10^7 - 10^9 \text{ s}^{-1}$ der bisher noch nicht genau bestimmt werden konnte und unter anderem auch von der Rauheit der zugrunde liegenden Energielandschaft abhängt [29, 30, 31, 32]. Die Art der Wechselwirkungen auf Aminosäureebene, die diese Entfaltungsbarriere ΔG^\ddagger bilden, wird in Kapitel 7 für ddFLN4 untersucht. Da der mechanische Entfaltungspfad nur bedingt mit dem kraftfreien Entfaltungspfad vergleichbar ist, sind Vergleiche zwischen den hier extrahierten thermodynamischen Parametern und denen aus Ensemble Studien mit anderen Denaturanzien nur begrenzt möglich. Anhang A und B geben hierzu nähere Informationen.

Neben Entfaltungsuntersuchungen wurden in den letzten Jahren auch kraftspektroskopische Faltungsstudien durchgeführt. Dazu wurden Proteine unter Kraft entfaltet, auf geringe bis keine Kraft relaxiert und durch erneutes Entfalten deren Faltungszustand überprüft. Im folgenden Kapitel wird eine solche mechanische *Double-Jump* Methode nochmals kurz vorgestellt, da diese auch in Kapitel 6 verwendet wird um die kraftfreie Faltungsbarriere von ddFLN4 zu untersuchen. Während sich mit dieser Technik Faltungsraten sehr genau bestimmen lassen, ist die direkte Beobachtung des Faltungsprozesses nicht möglich. Der Faltungszustand muss, wie beschrieben, im Anschluss überprüft werden. Ein Ziel dieser Arbeit war, den Faltungsprozess von Proteinen unter äußerer Kraft sichtbar zu machen. Dazu mussten sowohl die Auflösungsfähigkeit als auch die Driftstabilität des Instruments verbessert werden. Die entscheidenden Kriterien und deren Umsetzung sind in Kapitel 1.3 und 2 aufgezeigt. Die gewonnenen Messdaten an ddFLN4 und Ubiquitin (Kapitel 4 und 5) konnten mittels des in Kapitel 3 vorgestellten Modells zur Beschreibung der Faltungskinetik unter äußerer Kraft erklärt werden.

² Der ähnliche Kraftbereich ist nötig, da das WLC-Modell eine entropisch basierte Elastizität beschreibt und nicht die Eigenschaften von Polypeptiden in unterschiedlichen Kraftbereichen berücksichtigt. Ein realistischeres Modell ist bisher noch nicht verfügbar. Alle Anpassungen (Fits) die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, sind mit dem Programm Igor Pro 6.03A mit dem integrierten Levenberg-Marquardt Algorithmus durchgeführt worden.

1.2 Faltung von Proteinen ohne äußere Kraft

Im Rahmen der Dissertation von Dr. Ingo Schwaiger entstand ein Protokoll, das es erlaubt Rückfaltungsraten von schnell faltenden Proteinen mit dem Kraftspektrometer zu messen [33]. Bei diesem Messprotokoll wurde der entfaltete Polypeptidstrang komplett relaxiert, so dass keine äußere Kraft wirken sollte. Das Rückfaltungsereignis kann somit auch nicht direkt beobachtet werden. Es wird indirekt durch anschließendes Strecken des Polypeptids und gegebenenfalls Entfalten überprüft. Der Messprotokollablauf und die zu erwartenden Ergebnisse sollen im Folgenden nochmals knapp dargestellt werden.

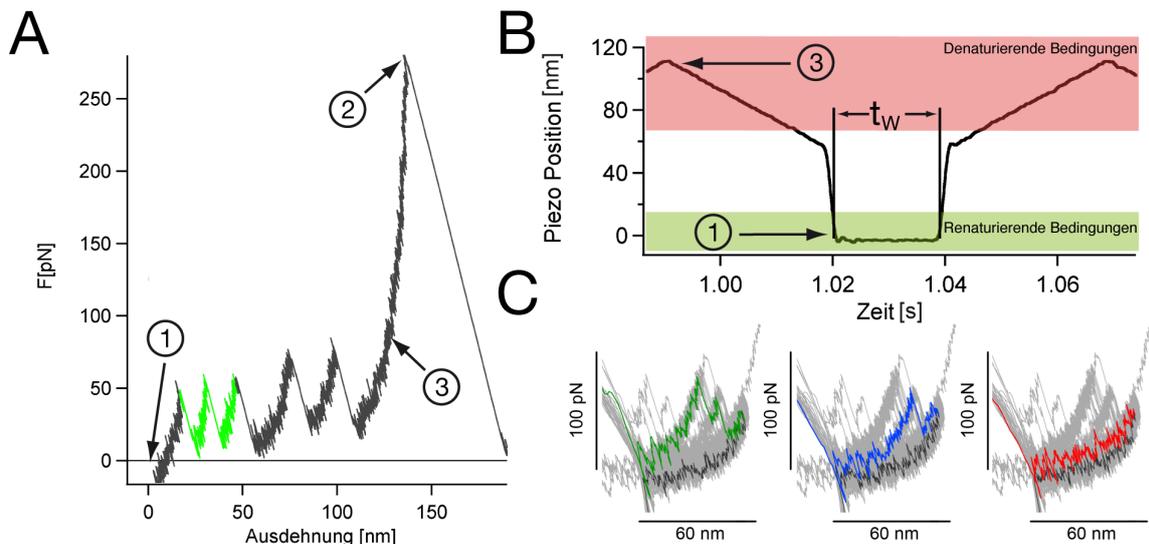


Abbildung 1.2: (A) Typische Kraftabstandskurve des Proteins ddFLN(1-5). Das charakteristische Entfaltungsmuster der Domäne ddFLN4 ist in grün hinterlegt. An Punkt 1 berührt die Blattfeder die Oberfläche und nimmt das Polyprotein auf. Durch Strecken des Polyproteins wächst die Kraft stets nicht-linear an, bis eine Untereinheit (Domäne) ihre kompakte dreidimensionale Struktur verliert. Sobald alle anfangs strukturierten Domänen entfaltet sind, wird das verbleibende Polypeptid entropisch gestreckt, bis es entweder von der Oberfläche oder der Blattfederspitze desorbiert (Punkt 2). Bricht man das Strecken der Polypeptidkette beispielsweise vorher ab (Punkt 3), dann bleibt das einzelne Protein zwischen Blattfederspitze und Oberfläche eingespannt. (B) Typischer Double-Jump Zyklus. Dabei wird die Polypeptidkette bis zum Umkehrpunkt 3 gespannt und dann durch kontinuierliches und sprunghaftes Relaxieren auf die Oberfläche entspannt (Punkt 1). Nach einer bestimmten Wartezeit t_W wird das Polypeptid erneut sprunghaft und dann kontinuierlich verlängert. Dabei wechseln sich die Faltungsbedingungen von denaturierenden zu renaturierenden Bedingungen, ähnlich denen aus Double-Jump Experimenten in *bulk*-Studien. (C) Beim erneuten Strecken der Polypeptidkette zeigte die Domäne ddFLN4 entweder ihr Entfaltungsmuster für eine nativ gefaltete Domäne (links) oder lediglich bis zum Zwischenzustand gefaltete Domäne (Mitte) oder eine nicht mechanisch stabile Struktur (rechts).

Bei einem typischen Einzelmolekül-Kraftspektroskopie-Experiment wird in der Regel das Protein mittels der Blattfederspitze von der Oberfläche aufgenommen (siehe Punkt 1 in Abbildung 1.2A) und so lange gestreckt, bis die Polypeptidkette entweder von der Oberfläche oder von der Blattfederspitze desorbiert (siehe Punkt 2 in Abbildung 1.2A). Der Trick eines Double-Jump Experiments liegt darin, dass das Protein nicht bis zum Punkt 2 gestreckt wird, sondern der Ausdehnungsvorgang bereits bei Punkt 3 umgekehrt wird. Danach wird periodisch

50 bis 300 Mal zwischen Punkt 1 und 3 die Piezo-Position gewechselt. Ein solcher periodischer Wechsel ist beispielhaft in 1.2B dargestellt. Dabei wird nach einer Umkehr an Punkt 3 zunächst mit kontinuierlicher Geschwindigkeit und anschließend sprunghaft die Oberfläche der Blattfeder (Punkt 1) angenähert. Nach einer frei wählbaren Wartezeit t_W wird die auf dem Piezotisch montierte Oberfläche erneut sprunghaft und dann kontinuierlich von der Blattfeder entfernt, bis erneut der Umkehrpunkt 3 erreicht wird.

Befindet sich die Blattfeder nahe der Oberfläche wie in Punkt 1, dann herrschen für die Polypeptidkette renaturierende Bedingungen, d.h. keine Ausdehnung und keine Kraft³. Ist die Oberfläche von der Blattfeder weiter entfernt, wird die Polypeptidkette gespannt und somit in denaturierende Bedingungen, d.h. hohe Ausdehnung und Kraft, überführt. Die sprunghaften Bewegungen dienen dazu, die Gesamtfahrzeit zu verkürzen und die Zeit, in der das Protein renaturierende Bedingungen erfährt, genauer zu kontrollieren. Die kontinuierlichen Fahrbereiche sind nötig, um über das dort gemessene Kraftsignal zwischen den drei Faltungszuständen (nativ, intermediär (Zwischenzustand) und entfaltet) der Domäne ddFLN4 zu unterscheiden (siehe Abbildung 1.2C).

Durch Abzählen der beobachteten Ereignisse pro Wartezeit und Normalisieren lässt sich die Faltungskinetik von ddFLN4 bestimmen. In Abbildung 1.3 ist mit den Datenpunkten bei den Wartezeiten 5 ms, 10 ms, 20 ms, 30 ms und 40 ms eine solche Kinetik dargestellt.

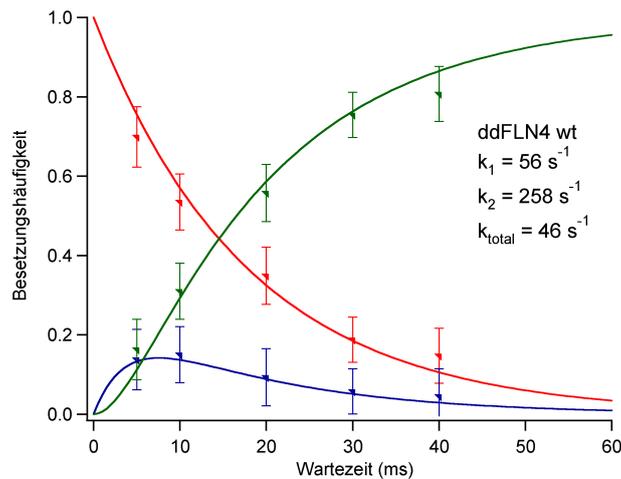


Abbildung 1.3: Faltungskinetik des ddFLN4 Wildtyps. Die Besetzung des entfalten Zustands (rot) nimmt einfach exponentiell ab, während zunächst der Zwischenzustand (blau) populierte wird. Bei längeren Wartezeiten findet der Faltungsschritt vom Zwischenzustand zum nativen Zustand statt (grün) und die Zwischenzustandspopulation nimmt ab.

Die Kinetik ließ sich lediglich mit einem Modell, das einen obligatorischen Faltungszwischenzustand beinhaltet, reproduzieren [4]. Die theoretischen Besetzungswahrscheinlichkeiten für den entfaltenen Zustand $P_U(t)$, den teilgefalteten Zustand $P_I(t)$ und den nativ gefalteten

³ Bei Experimenten kann es durchaus zur Oberflächendrift kommen. Diese kann ungünstigerweise den Polypeptidaufgriffspunkt vom Relaxationspunkt in x,y-Richtung entfernen. Die dadurch entstehende Spannung kann in der Polypeptidkette unter Umständen zu einer Restkraft und somit einem eingeschränkten Konformationsraum für die Faltung führen. Die dadurch entstehenden Verluste können mit maximal $1 k_B T$ abgeschätzt werden.

Zustand $P_N(t)$ lassen sich aus den entsprechenden Differentialgleichungen unter Vernachlässigung der Entfaltungsraten k_{NI} und k_{IU} herleiten [34].

Es ergibt sich:

$$P_U(t) = \exp(-k_{UI}t) \quad (1.3)$$

$$P_N(t) = \frac{k_{IN}}{k_{UI} - k_{IN}} \cdot \exp(-k_{UI}t) - \left(\frac{k_{IN}}{k_{UI} - k_{IN}} + 1 \right) \cdot \exp(-k_{IN}t) \quad (1.4)$$

$$P_I(t) = 1 - P_U(t) - P_N(t) \quad (1.5)$$

Die beschriebene Methodik zur Messung von Faltungskinetiken wird in Kapitel 6 verwendet um Informationen über die barrierebildenden Aminosäuren zu erhalten. Eine weitere Anwendung der Double-Jump Experimente findet sich bei der Bestimmung der Entfaltungskräfte mit gut definierten Kraftladungsraten. Dieses Vorgehen wird genauer in Kapitel 7, Anhang B und Anhang F.5 beschrieben.

1.3 Faltung von Proteinen unter äußerer Kraft

Im vorherigen Abschnitt wurde am Beispiel von ddFLN4 beschrieben, wie man mittels Einzelmolekülkraftspektroskopie Faltungskinetiken einzelner Proteine bestimmen kann. Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass bei dieser Methode das Rückfaltungsereignis nicht direkt beobachtet werden kann. Es ist somit nicht möglich den Faltungspfad bzw. eine Faltungsfolge zu beobachten und beispielsweise Aussagen über einen hydrophoben Kollaps zu treffen. Um diese Beobachtung durchführen zu können, sind deswegen Faltungsstudien unter äußerer Kraft nötig, da die Kraft die Observable des Kraftspektrometers ist.

Erste Abschätzungen⁴ und Experimente [15] ergaben Hinweise, dass die zu erwartenden Kräfte, bei denen Rückfaltung stattfindet im niedrigen Kraftbereich 0 – 10 pN liegt. Um diesen Kraftbereich mit möglichst hoher Auflösung und einer hohen Anzahl an Datenpunkten zu untersuchen, ist es nötig, die Ziehgeschwindigkeit des Experiments deutlich um zwei bis drei Größenordnungen zu reduzieren⁵. Der geeignete Ziehgeschwindigkeitsbereich liegt im Bereich von 0,5 – 10 $\frac{\text{nm}}{\text{s}}$. Es ergaben sich folgende Anforderungen:

1. Die Adsorption des einzelnen Moleküls zwischen Oberfläche und Blattfederspitze sollte mindestens 60s halten.
2. Oberflächen- und Blattfederdrift sollten deutlich unterhalb des Ziehgeschwindigkeitsbereichs liegen.
3. Kleine Kraftänderungen im niedrigen Kraftbereich sollten eindeutig identifizierbar und von Driftereignissen unterscheidbar sein.

Bei bisherigen kraftspektroskopischen Experimenten wurde das zu untersuchende Polyprotein meist unspezifisch an Blattfeder und Oberfläche angebunden. Diese Bindung funktionierte durchaus effektiv, sofern die Anbindung nicht länger als einige Sekunden dauern sollte. Um

⁴ Man nimmt an, dass die Entfaltungsrates k_u wesentlich kleiner als die Faltungsrate ist. Eine ganz grobe Abschätzung basierend auf der freien Faltungsenergie liefert somit: eine freie Faltungsenergie von $\approx 10 k_B T = 10 \cdot 4,1 \text{ pN nm} \approx 40 \text{ pN nm}$. Bei einer Kontraktion um 20 nm könnte man grob mit einer mittleren Faltungskraft von $\approx 40 \text{ pN nm} / 20 \text{ nm} = 2 \text{ pN}$ rechnen.

⁵ Typische kraftspektroskopische Entfaltungsexperimente werden bei Ziehgeschwindigkeiten zwischen $v_P = 300$ und $3000 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ durchgeführt.

diese Anbindungsdauer zu erhöhen, wurde das Protein an einem Terminus spezifisch an die Oberfläche angebunden. Dazu wurde die Oberfläche entsprechend Anhang F.8 funktionalisiert. Die Anbindung an die Blattfeder fand weiterhin über unspezifische Wechselwirkungen statt. Bereits durch die halbseitig spezifische Anbindung über einen Histidin-Ni²⁺-NTA Komplex ließen sich wesentlich längere Adsorptionszeiten und höhere Desorptionskräfte erzielen.

Für Oberflächendrift und Blattfederdrift gibt es mehrere Ursachen, die im Rahmen der Experimente minimiert wurden. Zunächst wurde versucht, ein thermisches Gleichgewicht für die Blattfeder zu erzielen, indem nach allen Justierungen und Eichungen das Kraftspektrometer für ca. 30 – 60 min equilibriert wurde. Die Oberflächendrift konnte minimiert werden, indem die Ni²⁺-NTA-funktionalisierten Glasplättchen zunächst per Zwei-Komponenten-Kleber auf einen Objektträger aufgebracht wurden und anschließend mittels Magneten auf dem Piezoverschiebetisch befestigt wurden. Drift durch Verdunstung oder Kondensation wurde verringert, indem das Kraftspektrometer in eine abgeschlossene Box mit ca. 60% Luftfeuchtigkeit gestellt wurde.

Die dritte Anforderung stellte sich als größte Herausforderung für ein Experiment heraus. Zu diesem Zweck wurde eine Lock-in Meßmethode entwickelt. Diese soll im folgenden Kapitel genauer beschrieben werden.

Kapitel 2

Die Lock-in Kraftspektroskopie

Die Lock-in Technik (dt. Phasengleichrichter) findet häufig Verwendung, um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis eines schwachen elektrischen Signals zu verbessern. Dabei wird auf das zu messende Signal eine Spannung mit bekannter Frequenz moduliert. Bei der Auswertung des Messsignals sucht man spezifisch nach der Referenzfrequenz, um Signalanteile von Rauschanteilen zu trennen. Es zeigt sich eine ähnliche Wirkung wie bei einem schmalen Bandpassfilter. Als Ausgangssignale stehen einem normalerweise die Amplituden- und Phaseninformationen zur Verfügung. Anstatt eines Hardware Lock-in Verstärkers wurde in den Versuchsaufbau ein software-basierter Lock-in Verstärker integriert. Dieser lieferte Informationen über die Elastizität des eingespannten Polypeptids, die wiederum durch Integration einem Kraftsignal zugeordnet werden konnte.

2.1 Lock-in Erweiterung für den vorhandenen Aufbau

Abbildung 2.1 zeigt die Erweiterung des vorhandenen Kraftspektrometersaufbaus für eine Lock-in Messung. Auf das normalerweise dreiecksförmige Annäherungs-Entfernungssignal zur Positionskontrolle der Oberfläche wird zusätzlich ein Signal bekannter Frequenz und Amplitude moduliert. Die Probenoberflächenbewegung mit konstanter Geschwindigkeit ist dadurch mit einer kleinen Oszillation von wenigen Nanometern überlagert. Typischerweise wurden Oszillationen mit einer Amplitude von 3 – 10 nm und einer Frequenz von 20 – 40 Hz verwendet¹. Das zwischen der Probenoberfläche und der AFM-Blattfeder eingespannte Polypeptid überträgt zusätzlich zum normalen Kraftsignal auch kraft- und somit positionsabhängig die Oszillation der Probenoberfläche. Über das Datenakquisitionssystem wurden das Piezopositionssignal mit der entsprechenden Oszillation und das Photodiodensignal aufgezeichnet.

In einem Post-Experiment-Prozess (detailliert beschrieben in Anhang F.2) wird mit einem Auswertalgorithmus der Software-Lock-in verwirklicht. Das Oszillationsreferenzsignal wird mit dem Photodiodensignal in Phase multipliziert. Bei einer unendlich steifen Verbindung zwischen Blattfeder und Oberfläche wird die gesamte Oszillationsamplitude der Probenoberfläche übertragen. Besteht keinerlei Verbindung zwischen Oberfläche und Blattfeder, dann enthält das Photodiodensignal keinerlei Amplituden-Information und das multiplizierte Signal enthält lediglich einen Rauschanteil. Somit enthält das Signal nach der Multiplikation

¹Im Rahmen der Dissertation wurden auch Experimente mit größeren Amplituden und höheren Frequenzen durchgeführt. Diese wurden allerdings nicht mit dem Lock-in Algorithmus ausgewertet. Siehe Kapitel 4.2 und Anhang C.

Informationen über die Polypeptidelastizität. Integriert man nun dieses Signal in einem weiteren Schritt, dann entspricht dies einem Low-pass-Filter und das Elastizitätssignal wird zu einer Art Kraftsignal. Dieses hat ein deutlich verbessertes Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Die integrierte Kraftkurve misst allerdings keine absoluten Kräfte, da die absolute Eichung bei dieser Art Lock-in aufgrund der fehlenden Kenntnis der Integrationskonstante verloren geht. Die fehlende Integrationskonstante lässt sich aber nachträglich unter gewissen Annahmen rekonstruieren. Dies wird in Anhang F.2 beschrieben.

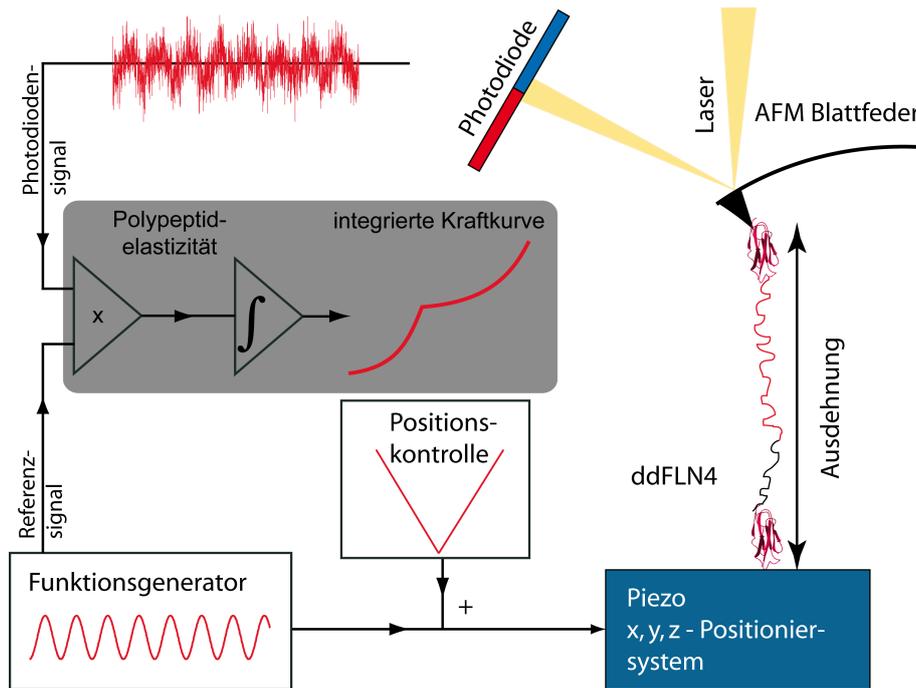


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Lock-in Erweiterung

Sowohl die Lock-in Daten als auch die direkten Kraftdaten helfen bei der Beobachtung und Interpretation von Rückfaltungsexperimenten und werden in den Kapiteln 4 und 5 verwendet, um die Rückfaltungskinetik der Filamindomäne ddFLN4 respektive des Ubiquitins unter Kraft zu messen. Zunächst sollen an dieser Stelle noch das verbesserte Kraftsignal-zu-Rausch-Verhältnis und die Unabhängigkeit der integrierten Lock-in Daten von Drift im optischen Pfad diskutiert werden. Zudem ermöglichen Lock-in Messungen eine genaue Bestimmung der Polypeptidelastizität bei niedriger Kraft und geringer Ausdehnung.

2.2 Auflösungsverbesserung

Abbildung 2.2 zeigt eine Kraft-Ausdehnungskurve eines Polypeptids mit einer Ziehgeschwindigkeit $v_P = 5 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ im niedrigen Kraftbereich. Das gestreckte, entfaltete Polypeptid wurde zu geringer Ausdehnung (ca. 20 nm) relaxiert und anschließend erneut ausgedehnt (graue Kurven in 10 kHz Bandbreite). Mit einem Boxfilter der Bandbreite 50 Hz reduziert sich das Kraustrauschen (hellgraue Kurve). Es zeigt sich allerdings eine deutliche Kraftsignaldrift von einigen pN (siehe Vergrößerung bei niedriger Ausdehnung und niedriger Kraft). Die blaue Kurve ist

das Lock-in Signal der Polypeptidrelaxation, die rote das Signal des anschließenden Streckens des Polypeptids. Zunächst lässt sich erkennen, dass das Signal-zu-Rausch-Verhältnis deutlich verbessert ist. Dies ist auf den relativ engen Bandpassfilter bei der anregenden Frequenz zurückzuführen. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt allerdings auch die signifikante Verbesserung der Kraftsignaldrift. Das Lock-in Signal ist unabhängig von "falschen" Kraftsignalen und misst lediglich die ankommende Amplitude, die von verrätischer optischer Drift weitgehend unabhängig ist. Die Relaxations- und die Ausdehnungskurve fallen nahezu perfekt aufeinander. Ein Polypeptidlastizitätsfit mit dem *Worm-like chain* Modell (nach Gl. 1.1, grüne gestri-

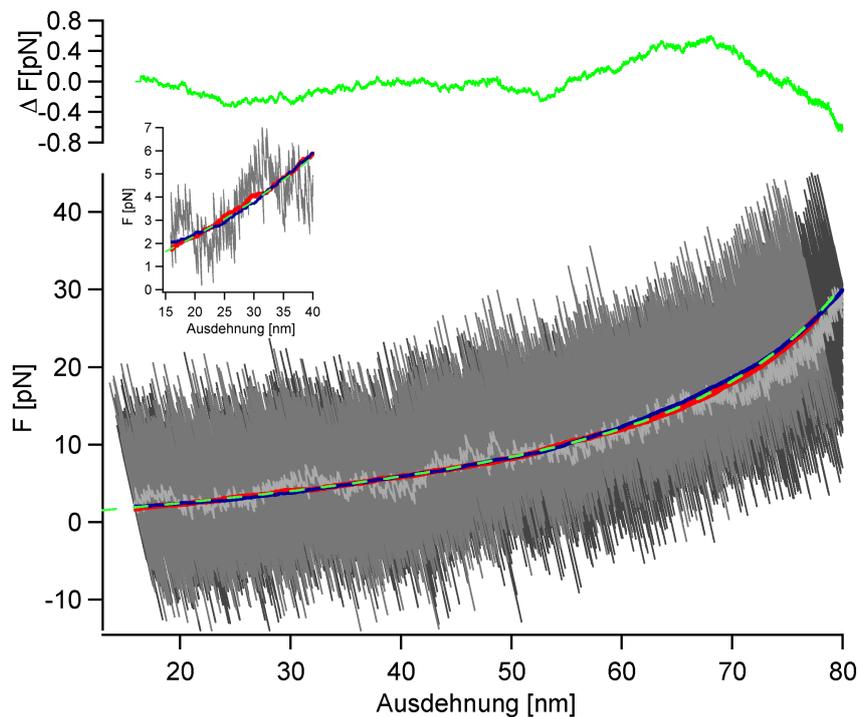


Abbildung 2.2: Lock-in Signal-zu-Rausch Verhältnis

chelte Linie) reproduziert sowohl die direkten Kraft-Ausdehnungsdaten als auch die Lock-in Daten am besten mit einer Persistenzlänge $p = 0,5 \text{ nm}$. Zu kleinen Kräften kann keine signifikante Abweichung bis zu einer Ausdehnung von $\approx 20\%$ der Konturlänge und Kräften bis ca. $1,7 \text{ pN}$ festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass dieses Polypeptid in dem untersuchten Bereich keinen hydrophoben Kollaps zeigt, der auf starke Wechselwirkungen hindeutet. Die Wechselwirkungen liegen pro faltender Domäne im Bereich $< 1,3 k_B T$. Für eine genauere Diskussion diesbezüglich sei auf Kapitel 4.2 verwiesen. Der obere Teil der Abbildung 2.2 zeigt die Abweichung des angepassten WLC-Modells zu den Lock-in Daten. Der Rauschlevel liegt im Sub-Pikonewton Bereich, so dass anhand dieser Anpassung die Auflösungsgrenze der Lock-in Kraftausdehnungskurven mit ca. 400 fN abgeschätzt werden kann. In Abbildung 2.3 sind zwei Kraft-Ausdehnungskurven verschiedener Polypeptide in einem relativ großen Kraftbereich dargestellt. Dabei wurde das Polypeptid von einer niedrigen Ausdehnung bis zum Ablösen bei ca. 250 pN mit ebenfalls $v_P = 5 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ gedehnt.

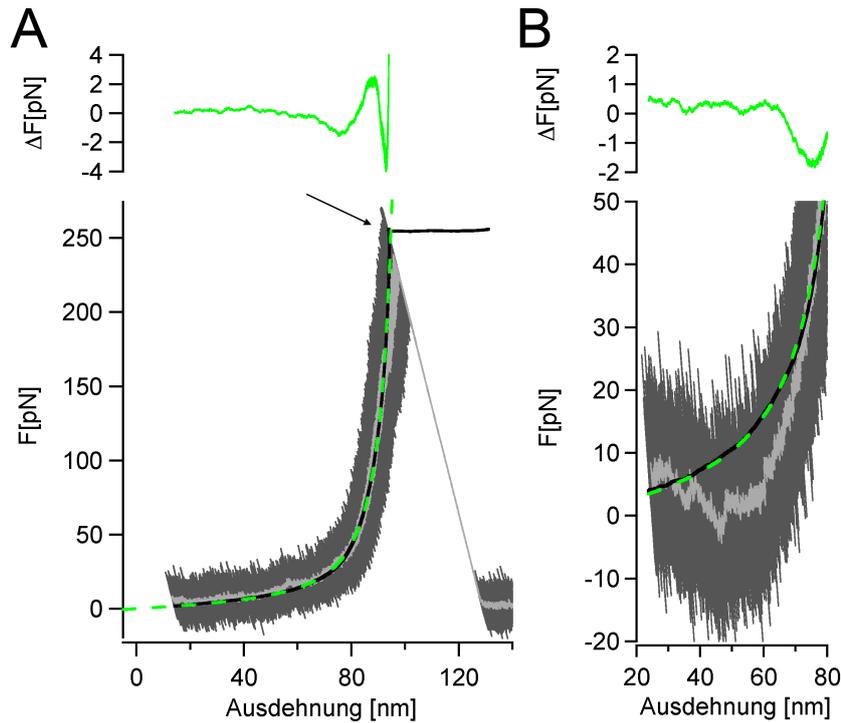


Abbildung 2.3: Persistenzlängenmessung mittels Lock-in Kraftspektroskopie

Das Lock-in Signal ist in diesen Kurven schwarz dargestellt. In Abbildung 2.3A fällt es sehr gut mit den direkten Daten zusammen. Deutlich wird bei dieser Kurve auch, dass Nicht-Gleichgewichtsinformationen komplett verloren gehen. Bei der Ausdehnung, bei der das Protein sich von der Blattfeder oder der Oberfläche löst (Pfeil) fehlt dem Lock-in Signal die Integrationskonstante, die den absoluten Kraftwert abbildet, so dass die Nullkraftlinie zwar horizontal ist, aber mit einem Offset von ca. 250 pN verläuft. Während einer Auswertung kann zur optischen Darstellung an der entsprechenden Stelle auf das Lock-in Signal ein entsprechender Offset addiert werden². An die Lock-in Kraft-Ausdehnungskurve wurde ein WLC-Modell angepasst, bei dem sowohl die Persistenzlänge als auch die Konturlänge frei gelassen wurden. Dies ist in diesem Fall möglich, da die hochauflösenden Lock-in Daten über den breiten Kraftbereich vorliegen. Die verwendete WLC-Anpassung konvergierte zuverlässig mit unterschiedlichen Startparametern mit einer Konturlänge $L_C = 104,5$ nm und einer Persistenzlänge $p = 4,94$ Å. Die Abweichung der Anpassung ist im oberen Teil dargestellt und zeigt lediglich im Bereich ab ca. 75 nm Ausdehnung einige Piconewton Unterschied zu den Lock-in Daten. In Abbildung 2.3B ist ebenfalls eine Kraft-Ausdehnungskurve mit denselben Parametern gezeigt. In diesem Fall zeigen allerdings die direkten Kraftdaten (graue Kurven) eine deutliche Abweichung vom Lock-in Signal. Diese Kurve zeigt starke Drift im optischen Detektionspfad. Das um ca. 10–15 pN falsche Kraftsignal liegt teilweise sogar im negativen Bereich. An dieser Stelle sieht man, dass das durch die Lock-in Technik gemessene Kraftsignal eindeutig unabhängig von entsprechenden Drifteffekten ist. Eine Anpassung mit dem WLC-Modell zeigt erneut nur

² Ein Beispiel hierzu wird in Kapitel 4.2 gezeigt. Diese Modifikation der Daten dient lediglich der Illustration, um das gewohnte Bild von Kraft-Ausdehnungskurven zu reproduzieren, beinhaltet aber keine zusätzliche Information.

geringe Abweichungen bis zu einer ähnlichen Ausdehnung wie in (A) und ergab mit frei variierender Konturlänge und Persistenzlänge eine optimale Anpassung bei $L_C = 105,3$ nm mit $p = 5,06$ Å. Entsprechend Abschnitt 1.1 ist für eine Längenmessung allerdings eine fixe Persistenzlänge notwendig, so dass im Folgenden die Polypeptidelastizität mit einem WLC-Modell mit $p = 5$ Å angepasst wird.

Die Abweichung des WLC-Modells von den Lock-in Daten im mittleren Ausdehnungs- und Kraftbereich ist selbst mit einer erweiterten Form der WLC-Interpolationsformel noch ähnlich prominent [35]. Dies lässt den Schluss zu, dass die Abweichungen wahrscheinlich ein Effekt der Lock-in Technik sind. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Lock-in Technik zur Bestimmung der Elastizität an einem Punkt über den Bereich der Oszillationsamplitude mittelt und somit die Steigung bei einer relativ starken Krümmung (d.h. Krümmungsradius in der Größenordnung der Oszillationsamplitude) unter- bzw. überschätzt, sozusagen auswäscht.

2.3 Identifikation von Faltungseignissen

Im vorherigen Abschnitt wurde bereits erwähnt, dass das Lock-in Signal keine Informationen über absolute Kraftwerte beinhaltet. Folglich ist auch ein Kraftsprung nicht als solcher detektierbar. In diesem Abschnitt soll ein objektives Kriterium eingeführt werden, wie man Rückfaltungseignisse eindeutig als solche identifizieren kann. Es wird ein Autodetektionsalgorithmus vorgestellt, der in Kapitel 4 Anwendung findet, um die Rückfaltungskräfte der Filamindomäne ddFLN4 zu bestimmen. Die verwendete Lock-in Technik misst die Federkon-

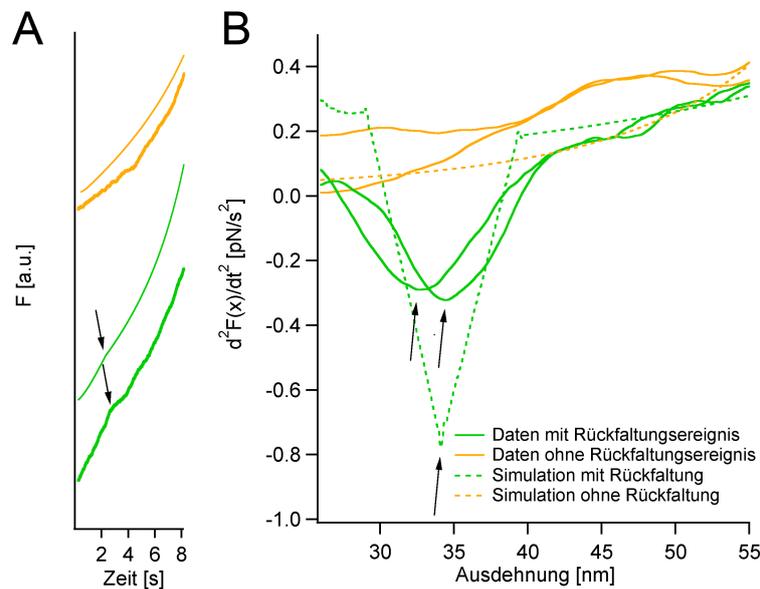


Abbildung 2.4: Detektion von Faltungseignissen. **(A)** Faltungseignisse zeigen einen deutlichen Knick in der Lock-in Kraftkurve. Die dünnen Kurven stellen Simulationsdaten dar. **(B)** Ein deutliches lokales Minimum in der zweiten Ableitung der Lock-in Kraftkurve gibt die Position des Knicks an. Zum Vergleich sind Simulationsdaten ohne experimentelles Rauschen gezeigt (gestrichelte Linien). Vergleichende Histogramme zwischen subjektiver und objektiver Bestimmung der Knickposition werden in Kapitel 4 gezeigt.

stante des zwischen Blattfeder und Oberfläche eingespannten Polypeptids. Diese hängt sowohl von der wirkenden Kraft, also der effektiven Ausdehnung d , als auch von der Konturlänge des

Polypeptids ab. Eine lokale Federhärte bei einer gewissen Ausdehnung d und Konturlänge L_C berechnet sich nach dem *Worm-like chain*-Modell wie folgt:

$$k_{Protein}(d) = \left[\frac{\partial F(d)}{\partial d} \right]_d = \frac{k_B T}{p} \cdot \left(\frac{1}{L_C} + \frac{1}{2 \cdot L_C \cdot \left(1 - \frac{d}{L_C}\right)^3} \right) \quad (2.1)$$

Während eines Faltungs- oder Entfaltungsvorgangs ändert sich sowohl die wirkende Kraft als auch die Konturlänge des Polypeptids. Beide Effekte helfen bei der Detektion eines Rückfaltungsereignisses. Trotz eines vermutlich kleinen Krafthubes (Kraftunterschied zwischen entfaltetem und gefaltetem Zustand) verringert sich auch die Konturlänge, so dass der Unterschied zwischen den beiden Federhärten deutlich detektierbar ist. Eine unterschiedliche Federhärte äußert sich in einem Knick in einer Lock-in Kraft-Ausdehnungskurve (siehe Abb. 2.4A).

Die Position der Knicke lässt sich über einen selbstprogrammierten Knickdetektor feststellen. Dabei wurde die zweite Ableitung $\frac{\partial^2 F}{\partial d^2}$ der Lock-in Kraft-Ausdehnungskurve berechnet. Diese weist ein deutliches lokales Minimum sowohl in Simulationsdaten als auch experimentellen Daten auf (siehe Pfeile in Abb. 2.4B). Daten und Simulationen ohne Faltungsereignis sind zum Vergleich in orange dargestellt.

2.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die Lock-in Technik für Kraftmikroskope eingeführt. Die Kraftauflösung für Kraft-Ausdehnungskurven wurde durch diese Technik um 1 bis 2 Größenordnungen erhöht. Dadurch ist eine genaue Vermessung von Polypeptidelastizität im niedrigen Kraftbereich möglich. Ferner wurde gezeigt, dass diese Technik eine Unabhängigkeit von Driftereignissen im optischen Detektionspfad ermöglicht. Dadurch sind Rückfaltungsexperimente, die häufig durch optische Drift nicht aussagekräftig waren, bei niedrigen Geschwindigkeiten möglich. Faltungsereignisse werden eindeutig durch Knicke in den Lock-in Kraftkurven subjektiv und objektiv erkannt. Diese Positionsinformation wird in den folgenden Kapiteln verwendet, um Rückfaltungskraftverteilungen experimentell zu bestimmen.

Kapitel 3

Faltungskinetik unter Kraft

Während eine äußere Kraft die Entfaltung von Proteinen beschleunigt, wird diese die Faltung von Proteinen verlangsamen. Für eine genaue theoretische Beschreibung dieser Vermutung wird in diesem Kapitel ein Modell vorgestellt, das rein auf energetischen Überlegungen basiert und eine Verlangsamung der Faltungskinetik unter äußerer Kraft beschreibt. Im Anschluss werden verschiedene kraftspektroskopische Experimente diskutiert und die Grenzen entsprechender Experimente aufgezeigt.

3.1 Zusätzliche mechanische Faltungsbarriere

Die durch die äußere Kraft erzeugte zusätzliche mechanische Barriere, limitiert neben der natürlichen Barriere die Faltungskinetik. Im Folgenden wird davon ausgegangen, dass eine solche mechanische Barriere rein energetisch die Faltungsgeschwindigkeit einschränkt und keine zusätzlichen entropischen Einschränkungen entstehen, sobald die erste Barriere überwunden wurde. Diese Vereinfachung ermöglicht eine direkte Berechnung der zusätzlichen Barriere. In den Kapiteln 4 und 5 werden experimentelle Daten vorgestellt, die diese Annahme bekräftigen.

In Abbildung 3.1 sind drei Kraft-Ausdehnungskurven von Polypeptiden in Form von WLC-Kurven schematisch dargestellt. Die Kurve mit der größten Konturlänge (rot) zeigt das komplett entfaltete initiale Polypeptid, das sich aus einem Spacer und dem entfaltetem Protein (Falter) zusammensetzt. Reduziert man die Kraft sukzessive, dann findet beispielsweise am Punkt (A) eine Faltung statt. Dadurch verkürzt sich das Polypeptid um die grüne WLC-Kurve und die Kraft auf die Blattfeder wächst (siehe Punkt (B)). Die finale Polypeptidelastizität ist nun von der des Spacers (blau) dominiert. Das gefaltete Protein wird dabei nicht in der Elastizitätsberechnung betrachtet, da dessen Federkonstante wesentlich höher wäre und in einer Serienschaltung von Federn, die schwächste Feder das Kraft-Ausdehnungsverhalten bestimmt. Die benötigte Energie, um bei einer Kraft von $F_A = 8 \text{ pN}$ zu falten, lässt sich in drei Anteile aufteilen: den Energieverlust um die Blattfeder zu verbiegen (graue Fläche), den Energieverlust um den verbleibenden Spacer zu strecken (blaue Fläche) und die gewonnene Energie des faltenden Proteins (grüne Fläche). Der Energieverlust durch die Blattfeder E_L berechnet sich nach:

$$E_L(F_A) = 0,5 \cdot (l_A(F_A) - l_B(F_B)) \cdot (F_A + F_B),$$

wobei $l_A(F_A)$ die Ausdehnung der initialen WLC-Kurve an der initialen Kraft F_A und $l_B(F_B)$ die Ausdehnung des finalen WLCs bei der finalen Kraft F_B bedeutet.

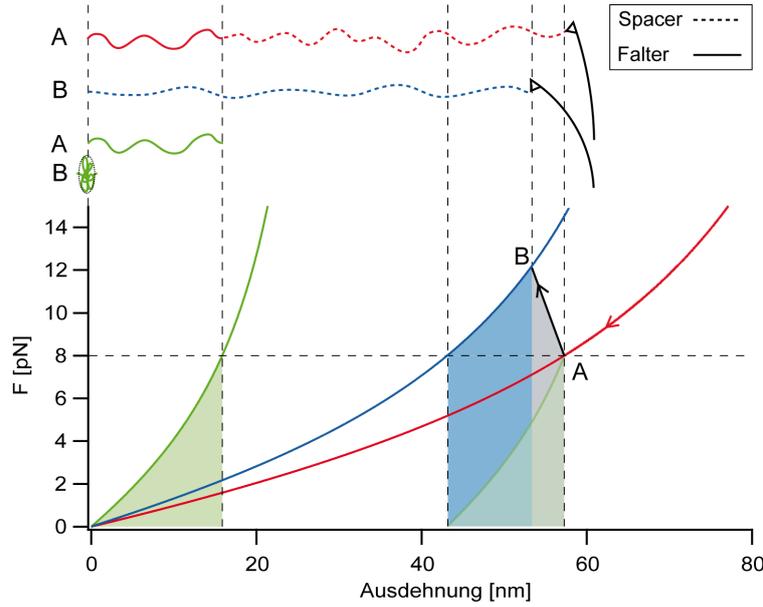


Abbildung 3.1: Zusätzliche Faltungsbarriere unter äußerer Kraft **oben:** Schematische Darstellung der Ausdehnung des Spacers, der Blattfeder und des Falters vor (A) und nach (B) dem Faltungsprozess. **unten:** Darstellung der Energieflächen zur Berechnung der zusätzlichen Barriere: die Biegung der Blattfeder (grau), das Strecken des Spacers (blau) und der Energiegewinn durch das faltende Protein (grün).

Der Energieverlust durch das Ausdehnen des Spacers E_S berechnet sich wie folgt:

$$E_S(F_A) = \int_{s_A}^{s_B} \frac{k_B T}{p} \cdot \left(\frac{s}{L_S} - \frac{1}{4 \cdot \left(1 - \frac{s}{L_S}\right)^2} - \frac{1}{4} \right) ds,$$

mit $s_A = s_A(F_A)$ als initiale Ausdehnung des Spacers der Konturlänge L_S bei der initialen Kraft F_A , $s_B = s_B(F_B)$ die finale Ausdehnung des Spacers der Konturlänge L_S bei der finalen Kraft F_B beschreibt, s die jeweilige Ausdehnung des Spacers über die integriert wird, $k_B T$ die thermische Energie und p die Persistenzlänge des Spacers¹.

Nach dem Falten des Proteins muss dessen Polypeptidkette nicht mehr gespannt gehalten werden, so dass ein entropischer Energiegewinn des Falters E_{Falter} vorliegt. Dieser berechnet sich nach:

$$E_{Falter}(F_A) = \int_{f_A}^{f_B} \frac{k_B T}{p} \cdot \left(\frac{f}{L_f} - \frac{1}{4 \cdot \left(1 - \frac{f}{L_f}\right)^2} - \frac{1}{4} \right) df, \quad (3.1)$$

wobei $f_A = f_A(F_A)$ die initiale Ausdehnung des Falters der Konturlänge L_f bei der initialen Kraft F_A bedeutet, $f_B = f_B(0)$ die finale Ausdehnung des Falters der Konturlänge L_f bei der Kraft 0 beschreibt. Die finale Ausdehnung des Falters f_B liegt im Allgemeinen bei 0. Man beachte, dass das Integral 3.1 negativ ist, da man von einer hohen Ausdehnung zu einer niedrigen Ausdehnung integriert. Es liegt stets ein Energiegewinn vor.

¹ Im Fall von Kraftmikroskopexperimenten die des Polypeptids $p = 0,5 \text{ nm}$. Bei Experimenten mit einem DNA-Spacer ist p noch genau zu bestimmen (siehe Abschnitt 3.2).

Die Summe dieser drei Energieanteile

$$E_{total}(F_A) = E_L(F_A) + E_S(F_A) + E_{Falter}(F_A) \quad (3.2)$$

ergibt somit die gesamte zusätzliche Energiebarriere für einen Faltungsprozess bei einer Kraft F_A . Diese ist graphisch in Abbildung 3.1 als Summe der grauen Fläche und der blauen Fläche abzüglich der grünen Fläche veranschaulicht.

Aufgrund der in die Berechnung einfließenden WLC-Elastizität hängt die Energie E_{total} nicht einfach linear oder exponentiell von der äußeren Kraft ab. Hierzu zeigt Abbildung 3.2A die Gesamtenergiebarriere und deren Anteile als Funktion der äußeren Kraft für einen Spacer von $L_S = 100$ nm und einer sich faltenden Struktur von $L_f = 25$ nm mit einer Blattfederhärte von $k_C = 6 \frac{\text{pN}}{\text{nm}}$.

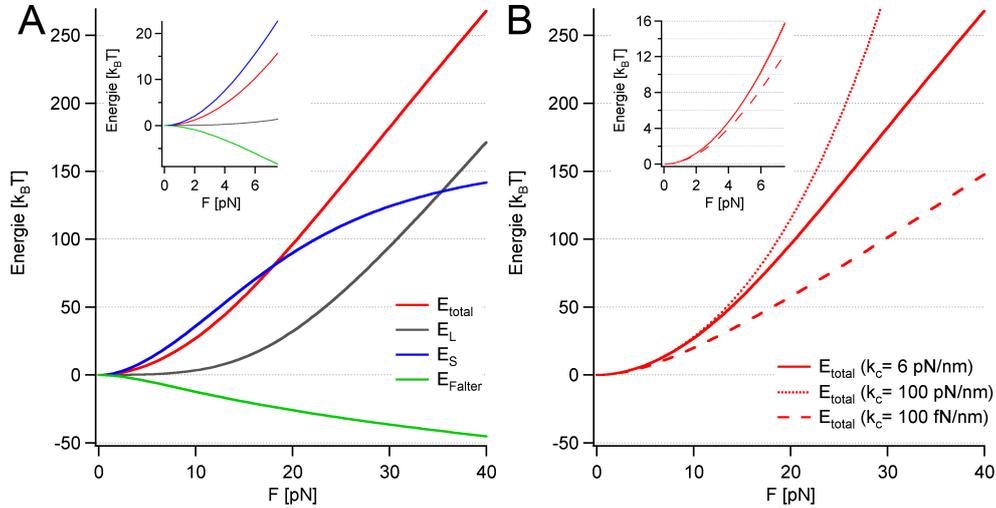


Abbildung 3.2: Anteile an der Energiebarriere als Funktion der äußeren Kraft. **(A)** Die totale Energiebarriere (rot) kann zerlegt werden in den Anteil der Blattfeder (grau), den Anteil des Spacers (blau) und den Energiegewinnanteil der sich faltenden Struktur (grün). **(B)** Abhängigkeit der totalen Energiebarriere von der Blattfederhärte.

Während zunächst hauptsächlich das Strecken des Spacers Energie kostet, ist bei höheren Kräften das Verbiegen der Blattfeder der größere Anteil. Allerdings ist in diesem Bereich die Barriere bereits auf über $100 k_B T$ angewachsen, so dass dieser Kraftbereich im Experiment nicht mehr relevant sein wird. Im niedrigeren Kraftbereich (siehe Vergrößerung in Abb. 3.2 A) dominiert eindeutig das Strecken des Spacers die Energiebarriere. Verändert man die Federhärte der Blattfeder $k_C = 0, 1, 6$ und $100 \frac{\text{pN}}{\text{nm}}$, sieht man wie erwartet hauptsächlich den Effekt bei höheren Kräften (Abb. 3.2 B). Im Bereich von niedrigen Kräften (siehe Inset) ergeben sich keine wesentlichen Energieunterschiede zwischen den Federhärten 6 und $100 \frac{\text{pN}}{\text{nm}}$. Eine Federhärte ähnlich der in einer optischen Pinzette ($100 \frac{\text{fN}}{\text{nm}}$, mit allen anderen Parametern L_S, L_f, p_S, p_F konstant), zeigt bei einer Kraft von 6 pN eine ca. $2 k_B T$ niedrigere Barriere.

Die Höhe der zusätzlichen Barriere wirkt sich in diesem Modell über eine Arrhenius-Gleichung auf die effektive Faltungsrate k_f^{eff} bei der Kraft F_A wie folgt aus [36]:

$$k_f^{eff}(F_A) = k_f(F=0) \cdot \exp\left(\frac{-E_{total}}{k_B T}\right) \quad (3.3)$$

Eine um $2k_B T$ niedrigere mechanische Faltungsbarriere würde somit die effektive Faltungsrate k_f^{eff} (6 pN) um einen Faktor $\approx 7,4$ erhöhen und damit eine Beobachtung von Rückfaltungsereignissen bereits bei höheren Kräften ermöglichen. Im folgenden Abschnitt werden sich ergebende Grenzen für kraftspektroskopische Untersuchungen sowie ein Vergleich zwischen typischen Experimenten in einem Kraftmikroskop und einer optischen Pinzette, speziell die unterschiedlichen Spacer, genauer diskutiert.

3.2 Grenzen für kraftspektroskopische Untersuchungen

Im Rahmen dieser Dissertation wurden kraftspektrometrische Experimente ausschließlich mit einem Einzelmolekülkraftspektrometer durchgeführt. Neben dem Kraftmikroskop werden auch mit optischen Pinzetten mechanische Proteinfaltungsexperimente durchgeführt. Deswegen sollen die verschiedenen möglichen Szenarien und Grenzen für Einzelmolekül-Faltungsexperimente an dieser Stelle diskutiert werden.

Experimente am Rasterkraftmikroskop

Im vorherigen Abschnitt wurde die theoretische Berechnung der Energiebarriere (Gl. 3.2) und der effektiven Faltungsrate (Gl. 3.3) eingeführt. Abbildung 3.3A zeigt den Verlauf der effektiven Faltungsrate als Funktion der äußeren Kraft. Für die Berechnung des Verlaufs wurden erneut die Parameter $L_S = 100$ nm, $L_f = 25$ nm und $k_C = 6 \frac{\text{pN}}{\text{nm}}$ verwendet. Da die Energiebarriere nicht-linear wächst (Abb. 3.2), fällt die effektive Rate auch stärker als einfach exponentiell ab. Es wird deutlich, dass die Dauer eines Experiments, also dessen Ziehgeschwindigkeit ein limitierender Faktor ist, um bei einer gewissen Kraft noch ein Faltungsereignis zu beobachten. D.h. bei einem 60s dauernden Experiment würde bei einer Kraft von 5,5 pN im Durchschnitt weniger als ein Ereignis beobachtet werden. Um Aussagen über beobachtbare Rückfaltungskräfte treffen zu können, muss zunächst die Wahrscheinlichkeitsdichte für den Übergang in den nativen Zustand, $\frac{dP_N}{dF}(F)$, berechnet werden. Anhang F.3 beschreibt eine Herleitung der Rückfaltungswahrscheinlichkeitsverteilung:

$$\frac{dP_N}{dF}(F) = k_f^0 \cdot \frac{1}{\dot{F}} \cdot \exp\left(\frac{-E_{total}(F)}{k_B T}\right) \cdot \exp\left(\int_0^F \frac{k_f^0}{\dot{F}'} \cdot \exp\left(\frac{-E_{total}(F')}{k_B T}\right) dF'\right), \quad (3.4)$$

mit $k_f^0 = k_f(F = 0)$ als natürlicher kraftfreier Faltungsrate, $E_{total}(F)$ der zusätzlichen Barriere unter der äußeren Kraft F , $k_B T$ der thermischen Energie und \dot{F} der Kraftladungsrate. Die Kraftladungsrate hängt sowohl von der Ziehgeschwindigkeit als auch von der Spacer- und Polypeptidelastizität ab. Sie kann entsprechend Anhang F.4 berechnet werden². Es sei darauf hingewiesen, dass im vorliegenden Fall eine negative Kraftladungsrate auftritt, da die Kraft über die Zeit reduziert wird. Im Gegensatz zu steigenden Kräften bei der Entfaltung von Proteinen mit höherer Ziehgeschwindigkeit, fällt die Rückfaltungskraft mit steigender Geschwindigkeit deutlich ab. Abbildung 3.3B stellt vier berechnete Kraftverteilungen für die Ziehgeschwindigkeiten $v_P = 0, 1, 1, 10$ und $100 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ dar. Dabei wurden wie vorher die Spacerlänge bei 100 nm, Persistenzlänge 0,5 nm, die faltende Domäne von 25 nm und eine kraftfreie Faltungsrate von $k_f^0 = 100 \text{ s}^{-1}$ angenommen.

² In die Berechnung der Kraftladungsrate geht neben der Ziehgeschwindigkeit auch die Steifigkeit des Polyprotein-Polymer Konstrukts ein. Eine Diskussion über den Effekt der Persistenzlänge des Spacers ist im

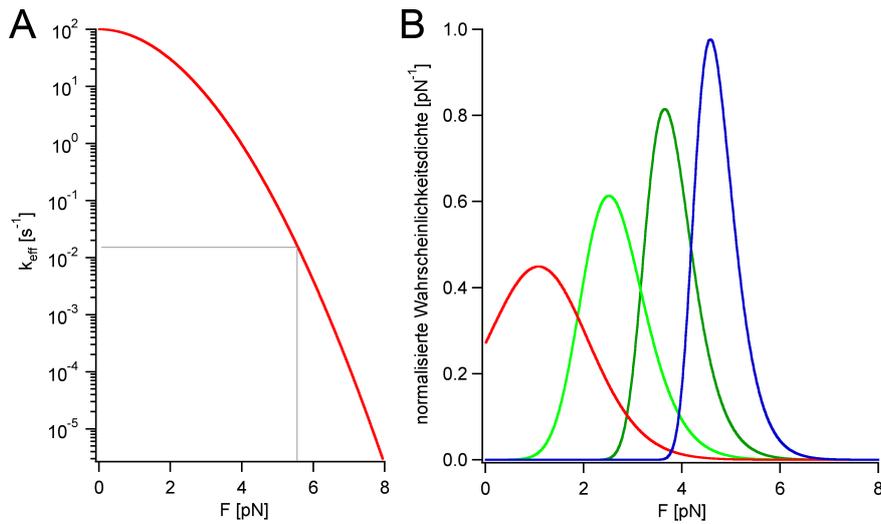


Abbildung 3.3: (A) Effektive Faltungsrate unter äußerer Kraft. (B) Normalisierte Wahrscheinlichkeitsdichte $\frac{dP_N}{dF}(F)$ bei unterschiedlichen Ziehgeschwindigkeiten: 0, 1 $\frac{\text{nm}}{\text{s}}$ (blau), 1 $\frac{\text{nm}}{\text{s}}$ (dunkelgrün), 10 $\frac{\text{nm}}{\text{s}}$ (grün) und 100 $\frac{\text{nm}}{\text{s}}$ (rot).

Die gezeigten Kraftverteilungen stellen jeweils die Wahrscheinlichkeitsdichte der Kräfte F_A des beschriebenen Modells dar, d.h. die Kräfte bei denen der Rückfaltungsprozess startet. Eine höhere Faltungskraft bedeutet somit auch gleichzeitig, dass der Hub beim Rückfaltungsexperiment größer und somit das eigentliche Rückfaltungssignal deutlicher zu beobachten wäre. Die beobachtbare Rückfaltungskraft hängt offensichtlich von folgenden Parametern ab:

- kraftfreie Rückfaltungsrate
- experimentelle Ziehgeschwindigkeit
- Größe der sich zu faltenden Domäne (Anzahl der Aminosäuren)
- Federhärte der Blattfeder oder des Laser-Potentials
- Elastizität des Spacers (Kontur- und Persistenzlänge)

Im Folgenden sollen zunächst die Abhängigkeit der Faltungsrate unter Kraft von der Ziehgeschwindigkeit und der Größe der sich faltenden Struktur bei verschiedenen kraftfreien Rückfaltungsraten betrachtet werden, während der Einfluss von Spacerelastizität und Federhärte im darauf folgenden Abschnitt diskutiert wird. Abbildung 3.4A zeigt das Maximum der Rückfaltungswahrscheinlichkeitsdichte $\frac{dP_N}{dF}$ berechnet für vier verschiedene, für Proteine typische, kraftfreie Faltungsraten $k_f^0 = 1, 10, 100, 1000 \text{ s}^{-1}$ als Funktion der Ziehgeschwindigkeit mit den konstanten Parametern $L_S = 100 \text{ nm}$, $L_f = 25 \text{ nm}$ und $k_C = 6 \frac{\text{pN}}{\text{nm}}$. Hält man hingegen die Ziehgeschwindigkeit konstant bei $v_P = 5 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ und variiert die Länge des Falter³ L_f , dann erhält man ebenfalls eine starke Abhängigkeit von der Anzahl der sich faltenden Aminosäuren (siehe Abb. 3.4B).

folgenden Abschnitt *Experimente mit optischen Pinzetten* zu finden.

³ Die Länge des Falter berechnet sich aus der Anzahl der Aminosäuren mit einer Länge von je 0,365 nm.

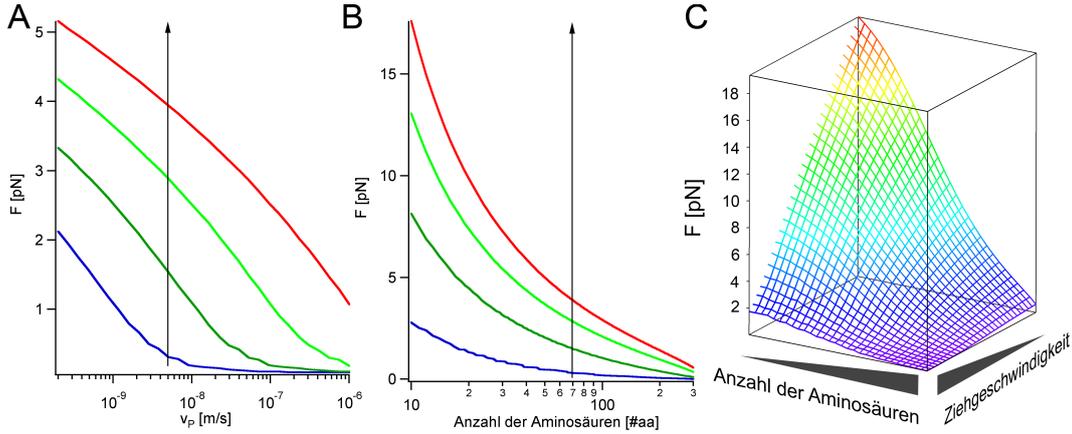


Abbildung 3.4: Maximum der Rückfaltungswahrscheinlichkeitsdichte für vier verschiedene kraftfreie Faltungsraten: $k_f^0 = 1$ (blau), 10 (dunkelgrün), 100 (grün), $1000 s^{-1}$ (rot) als Funktion der **(A)** Ziegeschwindigkeit bei $L_f = 25$ nm **(B)** der Anzahl der sich faltenden Aminosäuren bei konstanter $v_p = 5 \frac{nm}{s}$. Die Pfeile symbolisieren die Stelle einer orthogonalen Überlappung beider Graphen. **(C)** Schematische Darstellung einer aufgespannten Rückfaltungskraftfläche mit $k_f^0 = 100 s^{-1}$. Maximale Kräfte können bei kleiner Ziegeschwindigkeit und wenigen sich faltenden Aminosäuren erreicht werden.

Beide Graphen überlappen sich an den jeweils eingezeichneten senkrechten Pfeilen und spannen somit eine Fläche für mögliche beobachtbare Rückfaltungskräfte auf. Diese ist in Abbildung 3.4C für die kraftfreie Rückfaltungsrate $k_f^0 = 100 s^{-1}$ schematisch dargestellt. Für die gezeigten Rückfaltungskräfte jenseits der 18 pN (roter Teil der Fläche) gilt eine Ziegeschwindigkeit von weniger als $1 \frac{nm}{s}$ und lediglich ≈ 10 Aminosäuren ($L_f \approx 4$ nm), die sich falten. Die gewählte Faltungsrates liegt durchaus in einem Bereich von schnell-faltenden Proteinen. Somit stellt die Fläche in Abbildung 3.4C eine Art Obergrenze für beobachtbare Rückfaltungskräfte dar. Extremfälle können lediglich bei drastisch erhöhten Faltungsraten auftreten, wie sie beispielsweise für Calmodulin ($k_f^0 \approx 1\,000\,000 s^{-1}$, [37]) oder Leucinzippern ($k_f^0 \approx 800\,000 s^{-1}$, [38]) berichtet werden.

Fernandez und Li berichteten von Faltungsexperimenten an Ubiquitin bei $F = 20$ pN [39]. Diese Experimente wurden in einer Apparatur mit einem Krafrückkopplungsmechanismus (*force feedback*) durchgeführt und ergaben Faltungsraten $k_f^{eff}(20 \text{ pN}) = 0,5 s^{-1}$. Nach dem hier vorgestellten Modell wäre die zusätzliche Faltungsbarriere bei $F = 20$ pN in der Größenordnung von ca. $100 k_B T$. Der Arrheniusfaktor ist somit $exp(-100) \approx 1 \cdot 10^{-44}$. Es ergäbe sich eine extrapolierte kraftfreie Faltungsrate $k_f^0 = 0,5 \cdot 10^{44} s^{-1}$. Für chemische Reaktionen wird als maximal mögliche Rate die *Eyring-Rate* $\frac{k_B T}{h} = 10^{13} s^{-1}$ angenommen. Diese ist noch viele Größenordnungen kleiner als die hier extrapolierte Rate. Aus diesem und anderen Gründen befindet sich die oben genannte Veröffentlichung noch in breiter Diskussion [40]. An dieser Stelle sei lediglich auf mögliche experimentelle Probleme hingewiesen, den *force feedback* exakt bei der gewünschten Kraft zu halten. Wenige pN Abweichung zu niedrigeren Kräften in die Größenordnung 10 pN erniedrigen die zusätzliche Faltungsbarriere bereits auf $\approx 25 k_B T$ und machen damit Rückfaltungsereignisse deutlich wahrscheinlicher. Eigene Experimente an Ubiquitin zeigten im Vollängenkonstrukt niemals Rückfaltungskräfte > 9 pN und werden in Kapitel 5 diskutiert.

Experimente mit optischen Pinzetten

Neben den bisher variierten Parametern ergibt sich noch die Möglichkeit das Experiment anstatt mit einem Kraftmikroskop mit einer optischen Pinzette durchzuführen. An dieser Stelle soll nicht auf die technische Funktionsweise der optischen Pinzette eingegangen werden⁴, sondern auf Unterschiede im experimentellen Ansatz und der daraus resultierenden Veränderung der mechanischen Barriere. In Abbildung 3.5A ist schematisch ein Protein-Entfaltungs-/ Rückfaltungsexperiment an einer optischen Falle skizziert⁵. Um das zu untersuchende Protein an die Kugel für die optische Falle anzubinden, werden üblicherweise doppel-strängige DNA (dsDNA) Spacer verwendet. Anders als in Kraftspektroskopieexperimenten müssen diese mindestens je Seite 100 – 200 nm lang sein, damit die beiden Kugeln nicht miteinander wechselwirken. In den folgenden Rechenbeispielen wird eine gesamte Spacerlänge $L_S = 400$ nm angenommen. Dies entspricht in etwa üblichen Längen in Experimenten mit optischen Pinzetten zur RNA-Hairpin- oder Proteinfaltung⁶ [7]. Das gesamte gerechnete Hybridsystem aus DNA und Protein setzt sich somit zusammen aus 400 nm doppelsträngigem DNA Spacer und 25 nm Polypeptid. Anders als im vorherigen Rein-Polypeptid-Beispiel sind die Spacerlängen diesmal wesentlich höher, weshalb hier vergleichsweise mit langen Polypeptidspacern auch für das Kraftmikroskop gerechnet wird.

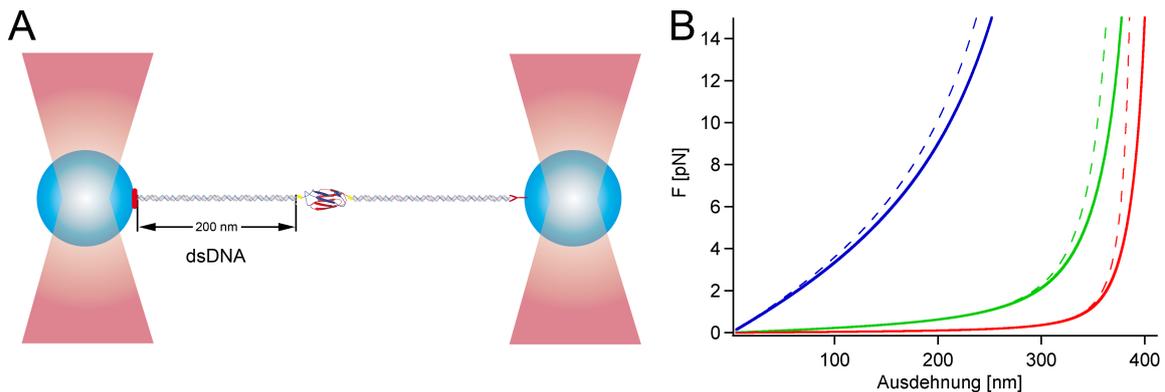


Abbildung 3.5: (A) Schematische Darstellung eines *dumbbell*-Experiments mit einer optischen Pinzette. Das zu untersuchende Protein wird mittels doppelsträngiger DNA an die Kugeln angebunden (nicht maßstabsgetreu). (B) Vergleich zwischen reiner Polypeptidelastizität ($p = 0,5$ nm, blau) und zwei Hybridsystemen aus dsDNA ($p = 8$ nm, grün, und $p = 50$ nm, rot) und Polypeptid.

Abbildung 3.5B zeigt eine reine Polypeptidelastizität (blaue Kurve) und zwei Hybridsysteme mit unterschiedlichen Persistenzlängen für die doppelsträngige DNA. Literaturwerte geben meistens für doppelsträngige DNA eine Persistenzlänge $p = 50$ nm an (rote Kurve) [35]. Kürzerere doppelsträngige und an frei rotierende Kugeln angebundene DNA zeigt allerdings eine deutlich kleinere Persistenzlänge [41, 42, 43]. Deshalb wird für diesen Fall in den folgenden

⁴ Es sei auf Greenleaf *et al.* verwiesen [9].

⁵ Es wurde ein *dumbbell* (dt. Hantel) Experiment skizziert, bei dem beide Kugeln in einem Laser-Potential gehalten werden. Alternativ könnte eine Kugel mittels einer Mikropipette fixiert werden und die andere mittels des Laser-Potentials. *Dumbbell* Experimente bieten allerdings eine bessere Driftstabilität, da diese komplett in Flüssigkeit stattfinden und es zu dem mechanischen Aufbau keinerlei direkte Verbindung gibt.

⁶ Die Spacer entsprechen ca. 500 – 600 Basenpaaren je Seite, d.h. 1100 Basenpaare mit einer helikalen Ganghöhe $3,4 \frac{\text{nm}}{10 \text{ bp}}$, also ca. 380 nm.

Rechnungen eine Persistenzlänge $p = 8$ nm angenommen (grüne Kurve). Bei einem Faltungsprozess verkürzt sich die gesamte Länge um die des Falters, so dass lediglich die Spacer für die Elastizitätsberechnung übrig bleiben (gestrichelte Kurven in Abbildung 3.5B). Neben der deutlich erhöhten Persistenzlänge des Spacers unterscheiden sich Experimente mit einer optischen Pinzette auch durch eine verringerte Federhärte, da das Laser-Potential, in dem die Kugel gefangen ist, wesentlich weicher ist im Vergleich zu üblichen Blattfedern. Für die folgenden Berechnungen wird deswegen eine Federhärte $k_{opt.Pinzette} = 100 \frac{fN}{nm}$ angenommen. Vergleicht man die zusätzliche Energiebarriere als Funktion der äußeren Kraft zwischen einem Hybrid-System und einem reinen Polypeptidsystem, ergeben sich bei geringen Kräften kaum sichtbare Unterschiede (siehe Differenzberechnung im oberen Teil der Abb. 3.6A). Diese zeigen sich erst bei höheren Kräften (siehe Abb. 3.6A). Die einzelne Energieverteilung dagegen ist anders. Während bei Kraftmikroskopexperimenten der hauptsächlich Energieanteil durch das Strecken des Spacers bestimmt ist, dominiert bei Experimenten mit einem Hybridsystem relativ früh die Energie, die benötigt wird, um die Kugeln auszulenken. Dies ist verständlich, da die Federhärte wesentlich geringer ist und dadurch entsprechend dem Modell in einem Faltungsprozess die Feder weiter ausgelenkt wird (siehe dazu Abb. 3.1, die Steigung zwischen Punkt A und B wäre wesentlich flacher, so dass der graue Anteil der zusätzlichen Energiebarriere größer wird während der blaue Anteil abnimmt.).

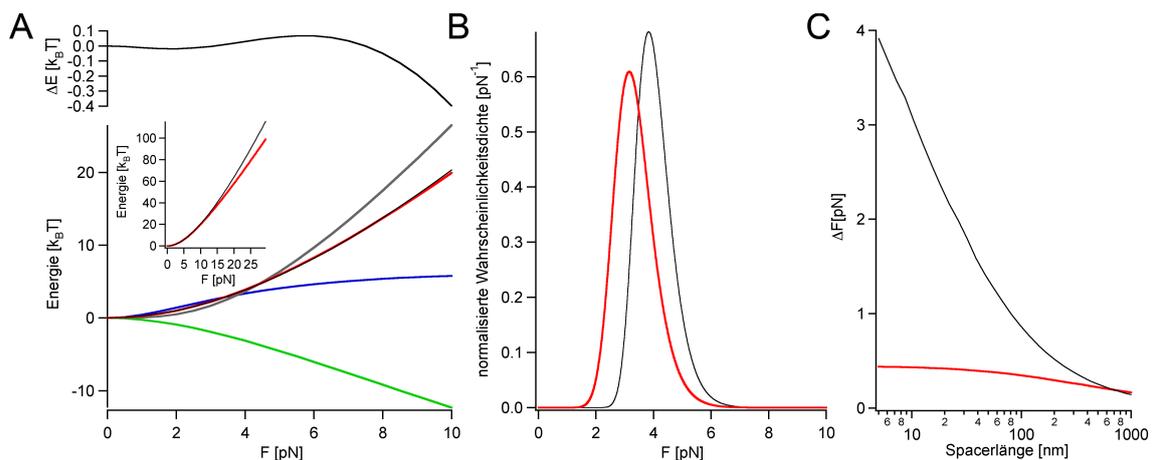


Abbildung 3.6: (A) Energieanteile des Hybridsystems als Funktion der äußeren Kraft. Bereits bei niedrigen Kräften ab 4 pN dominiert der Anteil der Kugelauslenkung (grau) gegenüber dem Strecken des Spacers (blau). Die totale Energiebarriere des Hybridsystems (rot) unterscheidet sich nur wenig von einer totalen Energiebarriere eines reinen Polypeptidsystems im Kraftmikroskop (schwarz). Während im Kraftbereich zwischen 3 und 8 pN das Kraftmikroskop-Polypeptidsystem sogar einen leichten energetischen Vorteil hat (oberer Teil ΔE des Graphen), zeigen sich bei höheren Kräften die Vorteile des Hybridsystems (Vergrößerung). (B) Der geringe Energievorteil des Kraftmikroskop-Polypeptidsystems ergibt eine bei leicht höheren Kräften liegende Rückfaltungskraftverteilung (schwarz) als die des Hybridsystems (rot). (C) Kraft-hub ($\Delta F = F_B - F_A$) bei einem Rückfaltungsereignis als Funktion der Spacerlänge für ein Polypeptid-Kraftmikroskopsystem (schwarz) und ein Hybridsystem mit einer optischen Pinzette (rot).

Der geringe Energievorteil des reinen Polypeptid-Kraftmikroskopsystems (schwarz) im Kraftbereich zwischen 3 und 8 pN ergibt eine bei etwas höheren Kräften liegende Rückfaltungswahrscheinlichkeitsdichte (Abb. 3.6B, $v_P = 5 \frac{nm}{s}$), wobei das Maximum der beiden Verteilungen sich lediglich um $\approx 0,5$ pN unterscheidet. Grundsätzlich lässt sich auch festhalten,

dass ein längerer Spacer die Energiebarriere günstig beeinflusst und somit die mögliche Rückfaltungskraft erhöht. Allerdings bringt ein längerer Spacer den Nachteil mit sich, dass sich der Krafthub, also die beobachtbare Kraftdifferenz $\Delta F = F_B - F_A$, verringert. Dieser Effekt tritt besonders stark bei einem reinem Polypeptidsystem im Kraftmikroskop zu Tage, während das Hybridsystem in einer optischen Falle über einen weiten Bereich nahezu einen konstanten Krafthub zeigt (Abb. 3.6C). Da das Kraftauflösungsvermögen des Kraftmikroskops im Vergleich zu optischen Pinzetten, selbst durch die Lock-in Technik noch begrenzt ist⁷ ist ein starker Krafthubeffekt beim Design eines Experiments zu berücksichtigen. Es wäre wünschenswert, den Spacer bei Kraftmikroskopexperimenten im Bereich zwischen 50 und 100 nm zu halten. Kürzere Spacer würden zwar einen größeren Krafthub erzeugen, allerdings findet das Rückfaltungsereignis dann erst bei kleineren Kräften statt.

3.3 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde ein Modell eingeführt, das die zusätzliche Faltungsbarriere für die Faltung eines Polypeptids unter äußerer Kraft berechnet. Anhand der zusätzlichen Barriere lassen sich die effektive Faltungsrate $k_f^{eff}(F)$ bei einer äußeren Kraft und die Rückfaltungswahrscheinlichkeitsdichte $\frac{dP_N}{dF}(F)$ berechnen. Es wurde gezeigt, dass sowohl die Konturlänge als auch die Persistenzlänge des Spacers sowie die Federhärte der Blattfeder bzw. des Laserpotentials einen deutlichen Einfluss auf die effektive Faltungsrate und somit die beobachtbare Rückfaltungskraft haben. Des Weiteren zeigt auch die Ziehgeschwindigkeit des Experiments einen deutlichen Einfluss auf die Rückfaltungskraft, da das Modell im Prinzip einen hoch beweglichen Übergangszustand beschreibt. Dies bedeutet: Der Abstand zwischen Minimum und Übergangszustand hängt stark von der äußeren Kraft ab. Dadurch entsteht eine Fokussierung der Rückfaltungskraftverteilung. Kürzlich wurde ein ähnliches Modell über Molekulardynamik-Simulationen gefunden, das zu ähnlichem Verhalten führt [44]. Im folgenden Kapitel wird das hier beschriebene Modell zur Analyse der Faltungskinetik und des Faltungspfads von ddFLN4 unter äußerer Kraft verwendet. Zu guter Letzt sei darauf hingewiesen, dass vor allem die Länge des sich faltenden Polypeptids die beobachtbare Rückfaltungskraft beeinflusst. Dies wird in Kapitel 5 anhand von Experimenten gezeigt.

⁷ Wie in Kapitel 2 beschrieben, beruht die genaue Rückfaltungskraftbestimmung darauf, die Knickposition im Lock-in Signal möglichst exakt zu bestimmen. Dieser Knick ist deutlicher, wenn sich die Federkonstante des Polypeptidkonstrukts in einem Faltungsvorgang stark ändert, d.h. je mehr Aminosäuren falten, desto größer ist die Änderung der Polypeptidelastizität bzw. je höher die Rückfaltungskraft, desto deutlicher die Änderung von $k_{Protein}(F)$.

Kapitel 4

Faltung von Filamin unter äußerer Kraft

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Rückfaltungskinetik der Filamindomäne ddFLN4 unter äußerer Kraft untersucht werden. Die Domäne ddFLN4 eignete sich hervorragend als Modellsystem für die ersten Experimente zu Rückfaltungen unter äußerer Kraft, da diese bereits intensiv in ihrer Entfaltungskinetik unter Kraft untersucht wurde [14, 13, 45]. Neben den Faltungsraten, die bereits mit Double-Jump Experimenten (siehe Kapitel 1.2) gemessen wurden, stellen sich noch nachfolgende Fragen, die in diesem Kapitel beantwortet werden sollen [4, 46]:

- Ist der Faltungspfad auch unter äußerer Kraft konserviert, d.h. wird der obligatorische Zwischenzustand populiert?
- Ist ein hydrophober Kollaps zu beobachten?
- Wie sieht die Faltungsenergielandschaft unter äußerer Kraft aus?
- Ist ddFLN4 unter geringer Kraft im Gleichgewicht zu beobachten?

4.1 Filamin ddFLN4 faltet bei 4 pN

Die Rückfaltung von ddFLN4 unter äußerer Kraft wurde an einem ddFLN1-5 Konstrukt auf funktionalisierten Oberflächen (siehe Anhang F.8) untersucht. Die halbseitig spezifische Anbindung des Proteins ermöglichte aufgrund der höheren Affinität langsamere Kraft-Ausdehnungskurven, so dass die Experimente mit einer relativ niedrigen Ziehgeschwindigkeit $v_P = 5 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$ durchgeführt werden konnten. Des Weiteren fand die in Kapitel 2 vorgestellte Lock-in Technik (Amplitude $A = 5 \text{ nm}$, Referenzfrequenz $f_L = 20 \text{ Hz}$) Verwendung, um unabhängig von der verbleibenden Drift im optischen Pfad zu werden. Abbildung 4.1(A-C) zeigt mehrere Faltungs-Entfaltungskurven an ddFLN4. Der experimentelle Ablauf startete bei einer hohen Ausdehnung von typischerweise 80 bis 100 nm. Anschließend wurde die Oberfläche mit konstanter Geschwindigkeit bis auf eine Ausdehnung von ca. 30 nm der Blattfeder angenähert. Danach wurde das Polypeptid wieder mit konstanter Geschwindigkeit gestreckt, so dass die gefaltete Domäne entfalten konnte. Anhand des charakteristischen Entfaltungsfingerabdrucks mit dem Entfaltungszwischenzustand konnte die Domäne ddFLN4 eindeutig identifiziert werden. Die

grauen Kurven stellen die direkten Kraft-Ausdehnungsdaten mit voller Bandbreite dar. Die hellblauen und hellroten Kurven zeigen gefilterte Kraft-Ausdehnungskurven ($f_F = 50$ Hz). In diesen ist zwar das thermische Krafrauschen wesentlich reduziert, man erkennt allerdings noch deutlich die eratischen Kraftsprünge, die auf Drift im optischen Detektionspfad hindeuten. In Abbildung 4.1C ist eine solche Driftbewegung mit einer > 10 pN-Schwankung am deutlichsten in der Relaxationskurve (hellblau) zu erkennen. Das Lock-in Signal hingegen ist unabhängig von absoluten Kraftwerten, also auch erratischen Driftbewegungen, und zeigt keinerlei Drift (rote oder blaue Kurven). Jedoch wird in den drei Beispielkurven deutlich, dass bei Entfaltungen bzw. Rückfaltungen die absolute Kraftänderung nicht detektiert wird, sondern die Lock-in Kraft-Ausdehnungskurve mit einem "falschen" Kraftwert weiterführt. Ein solches Nicht-Gleichgewichtsereignis, das den absoluten Kraftwert ändert, ist in den Lock-in Daten als Knick erkennbar (siehe Vergrößerungen in Abb. 4.1A und B).

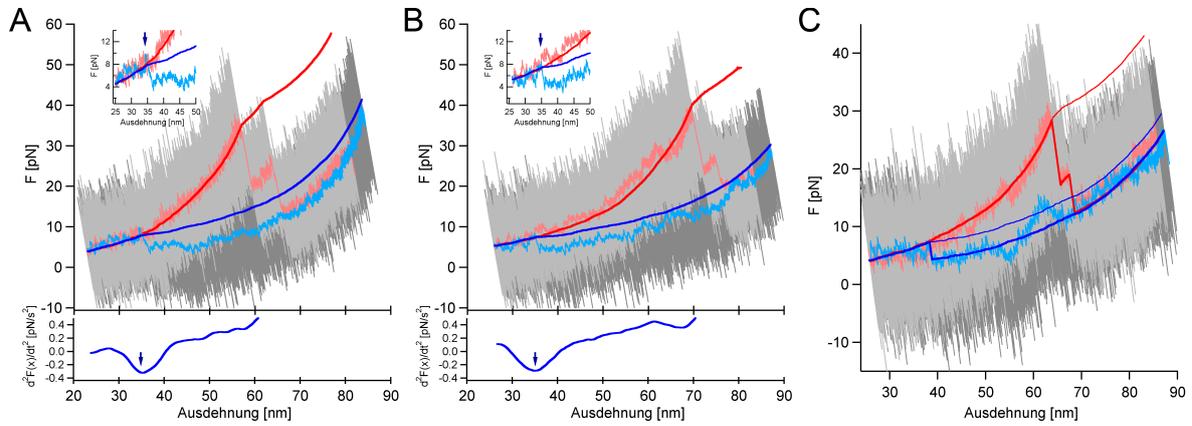


Abbildung 4.1: Beispielrückfaltungskurven von ddFLN4. **(A,B)** Faltungsereignisse zeigen einen deutlichen Knick in der Lock-in Kraftkurve. Siehe Pfeil in den Vergrößerungen. Die zweite Ableitung des Kraftsignals nach der Zeit zeigt ein lokales Minimum. **(C)** Rekonstruierte Lock-in Daten in der gewohnten Darstellung einer Kraft-Ausdehnungskurve.

Durch eine Minimumssuche in der zweiten zeitlichen Ableitung des Lock-in Signals kann die Position des Knicks eindeutig erfasst werden (siehe Abschnitt 2.3). Diese Ableitung ist für die Kraft-Ausdehnungskurven in Abb. 4.1A und B im unteren Teil dargestellt. Die Position des Minimums fällt mit der bereits subjektiv festgestellten Knickposition aus den Vergrößerungen zusammen. In den Vergrößerungen kann man ferner erkennen, dass die direkten Daten an dieser Stelle einen deutlichen Kraftsprung zeigen. Für eine optische Darstellung kann der im Lock-in Signal nicht vorhandene absolute Kraftunterschied an der Stelle des Knicks adaptiert werden, so dass ein gewohntes Erscheinungsbild der Lock-in Kraft-Ausdehnungskurven entsteht. Dies wurde exemplarisch für die Kraftkurve in Abbildung 4.1C gemacht. Dies dient aber lediglich der Veranschaulichung und wird nicht für die Auswertung der Daten verwendet. Hingegen gibt die Tatsache, dass sowohl direkte Daten als auch die Lock-in Daten bei den Rückfaltungsereignissen konsistent sind, Vertrauen, dass bei dieser Ausdehnung die Domäne ddFLN4 gegen die äußere Kraft gefaltet hat. Direkte Daten alleine hinterlassen gerade aufgrund häufiger Driftereignisse, wie sie in Abbildung 4.1C dargestellt sind, stets eine Unsicherheit.

Aus der Knickposition konnte die Rückfaltungskraft über die WLC-Interpolationsformel (Gl. 1.1) errechnet werden. Abbildung 4.2 zeigt die experimentell bestimmte Rückfaltungskraftverteilung. Die Filamindomäne ddFLN4 faltet bei einer äußeren Kraft $F = 4,0 \pm 1,1$ pN. Das Histogramm aus einer subjektiven Knickpositionsbestimmung (rot) ist im Rahmen der Fehlerbalken sehr gut deckungsgleich mit der objektiv bestimmten Faltungskraftverteilung (dunkelblau, vgl. Abschnitt. 2.3).

4.2 Dreizustandsfaltung unter Kraft

Aus kraftfreien Rückfaltungsexperimenten ist bekannt, dass ddFLN4 via einen obligatorischen Zwischenzustand faltet [4]. Dieser Zwischenzustand formt sich aus den β -Faltblättern C-G, beinhaltet ca. 60 Aminosäuren und ist in Abbildung 4.2B in grau dargestellt.

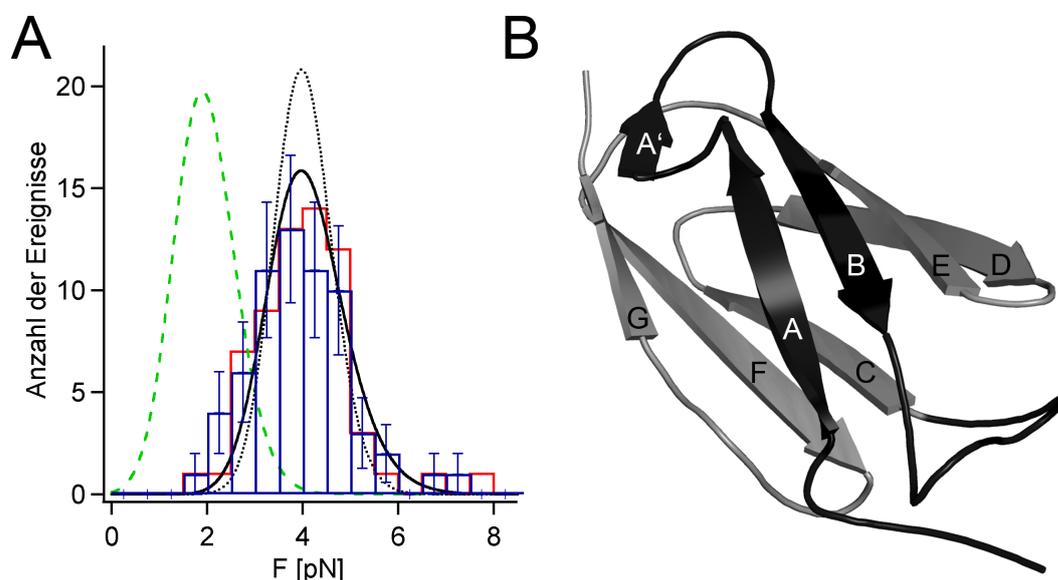


Abbildung 4.2: (A) Faltungskraftverteilung der Filamindomäne ddFLN4 und theoretische Modelle. Die subjektive Knickpositionsbestimmung (rot) sowie die objektive Auto-Knickbestimmung (dunkelblau) über die zweite Ableitung des Lock-in Signals stimmen gut überein. Für eine detaillierte Beschreibung wird auf den Text verwiesen. (B) Dreidimensionale schematische Röntgenkristallstruktur der Filamindomäne ddFLN4 (erstellt in *MacPyMol* anhand der Kristallstruktur 1WLH)

Anhand der Lock-in Daten und der direkten Kraftdaten ist nicht eindeutig festzustellen, ob dieser obligatorische Faltungszwischenzustand ebenfalls populiert wird. Berechnet man nun mit dem Modell für eine zusätzliche mechanische Faltungsbarriere aus Kapitel 3 die Rückfaltungskraftverteilung mit einer Faltungsrate $k_f^0 = 50 \text{ s}^{-1}$ und einem Zweizustandsmodell, d.h. alle 100 Aminosäuren der Domäne falten gemeinsam, dann erhält man die grüne Rückfaltungskraftverteilung aus Abbildung 4.2A. Offensichtlich liegt der Mittelwert von 2 pN weit ab der experimentellen Kraftverteilung. Nimmt man hingegen an, dass die Kraftverteilung den Faltungsprozess des Zwischenzustands darstellt, d.h. ebenfalls eine Faltungsrate $k_f^0 = 50 \text{ s}^{-1}$, allerdings nur mit 60 Aminosäuren Kontraktionslänge, dann ergibt sich die schwarze durchgezogene Verteilung aus Abbildung 4.2A. Diese Verteilung fällt perfekt mit den experimentel-

len Daten zusammen¹. Dies spricht eindeutig dafür, dass ddFLN4 auch unter äußerer Kraft über einen Zwischenzustand faltet. Es gibt unterschiedliche mögliche Ursachen, weshalb der Zwischenzustand nicht beobachtet werden kann. Zunächst wird das Lock-in Signal mit einer Referenzfrequenz $f_L = 20$ Hz erzeugt, so dass damit keine Lebensdauern geringer als 200 ms detektiert werden können². Schätzt man mit der bekannten kraftfreien Faltungsrate $k_{IN}^0 = 200$ s⁻¹ und dem Modell aus Kapitel 3 die effektive Faltungsrate bei einer Kraft von ca. 4 pN für die Faltung vom Zwischenzustand zum nativen Zustand ab, dann liegt die Rate zwischen 10 und 40 s⁻¹. Dies liegt gerade an der Auflösungsgrenze des Lock-in, so dass eine leichte Erhöhung der Oszillationsfrequenz in diesem Fall ebenfalls keine Detektion ermöglichen würde. Die direkten Kraftdaten hätten in der Tat eine höhere Zeitaufösung als die Lock-in Daten, bieten aber ein wesentlich schlechteres Signal-zu-Rausch Verhältnis (siehe Vergrößerungen in Abb.4.1A und B), so dass auch darüber keine Detektion des Zwischenzustands möglich gewesen wäre.

Als mögliche Lösung würde sich somit anbieten, die Faltungskinetik des Zwischenzustands zu verlangsamen oder das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der direkten Kraftdaten zu verbessern. Dies wurde durch ein Experiment mit größeren Oszillationsamplituden und einer leicht erhöhten Oszillationsfrequenz erreicht. In Abbildung 4.3A ist ein experimenteller Ablauf skizziert. Während man sich im Mittel mit konstanter Geschwindigkeit der Oberfläche annähert, sind dieser Bewegung Oszillationen mit großer Amplitude überlagert. Diese Oszillationen sorgen dafür, dass die auf das Polypeptid wirkende Kraft teils wesentlich geringer und teils wesentlich höher als die mittlere Kraft ist. Bei geeigneter Wahl der Oszillationsamplitude wechselt man während einer Periode zwischen einem für das Protein renaturierenden (grüne Bereiche) und denaturierenden Regime (blaue Bereiche).

Durch eine erhöhte Oszillationsfrequenz ($f = 52$ Hz) wird das renaturierende Regime nur maximal 10 ms lang eingenommen, bevor ein rascher Wechsel in das denaturierende Regime stattfindet. Im denaturierenden Regime ist die äußere Kraft soweit erhöht, dass in diesem Moment der Übergang zwischen dem Zwischenzustand und dem nativen Zustand kinetisch unterdrückt wird ($k_{IN}(F) \approx 0$). Die äußere Kraft wird aber noch so gering gehalten, dass die Entfaltungswahrscheinlichkeit des Zwischenzustands in diesem Moment ebenfalls noch sehr klein ist³. Durch die erhöhte Kraft wird sowohl die Faltungskinetik des Zwischenzustands verlangsamt, als auch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der direkten Kraftdaten verbessert. Allerdings ist aufgrund der großen Oszillationsamplitude keine Lock-in Messung mehr möglich, da der abgetastete Elastizitätsbereich des Polypeptids zu unterschiedlich ist.

Eine typische Kraft-Ausdehnungskurve eines solchen Experiments ist in Abbildung 4.3B dargestellt. Die Annäherungskurve (blau) zeigt deutlich den Faltungszwischenzustand. Die

¹ Bei der Messung der Ausdehnung für das Rückfaltungsereignis, aus der die Rückfaltungskraft berechnet wird, wurde ein Fehler von ± 15 nm angenommen. Dies führt zu einem Kraftbestimmungsfehler von ca. $\pm 0,5$ pN. Dieser Fehler kann also nicht die große Diskrepanz zwischen der vollen Kontraktionsverteilung (grün) und den Daten erklären. Dieser Fehler sorgt lediglich für eine Verbreiterung der Kraftverteilung. Diese künstliche Verbreiterung wurde ebenfalls bei der Berechnung der theoretischen Rückfaltungskraftverteilungen berücksichtigt. Des Weiteren sorgen die Oszillationen der Lock-in Technik für eine leichte Verschiebung ($+0,37$ pN) der experimentellen Daten. Auch diese Verschiebung wurde in der Berechnung aller theoretischen Verteilungen berücksichtigt. Vgl. Anhang F.2.

² Man nimmt an dieser Stelle an, dass mindestens vier Oszillationen für eine zuverlässige Detektion nötig sind. Oszillationsfrequenzen größer 100 Hz erzeugen zusätzliche hydrodynamische Reibung an der Blattfeder, so dass die Datenanalyse in diesem Fall zusätzlich erschwert werden würde.

³ Siehe Anhang B.

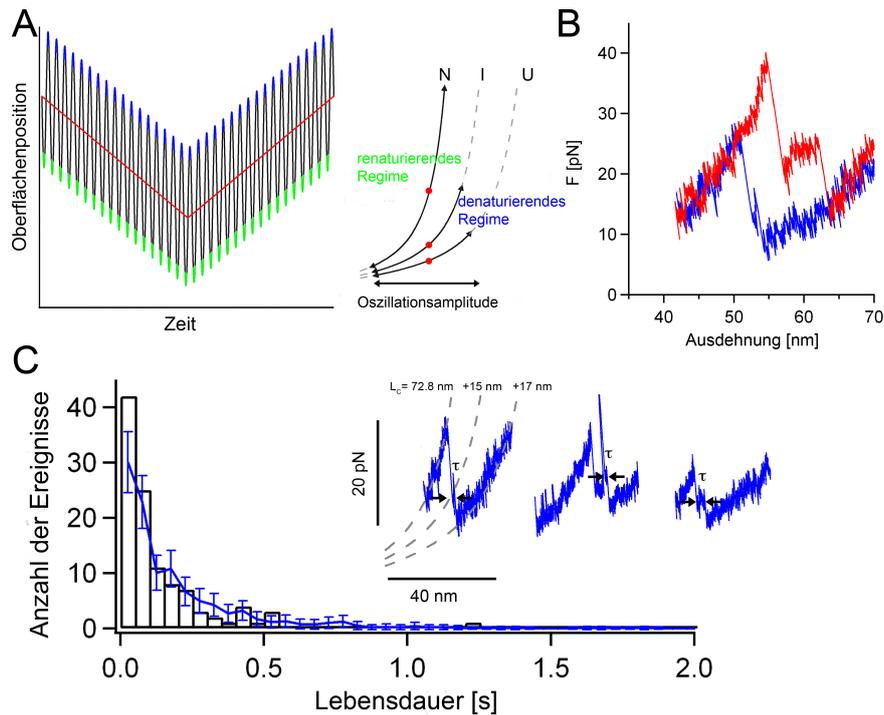


Abbildung 4.3: Einfangen des Zwischenzustands. **(A)** Schematische Darstellung eines Experiments mit großen Amplituden. Es wird zusätzlich zur linearen Annäherung der Oberfläche an die Blattfederspitze periodisch schnell zwischen einem renaturierenden (grün) und denaturierenden Regime (blau) gewechselt. Das Polypeptid kann dabei in den entfalteten Zustand (U), Zwischenzustand (I) oder nativen Zustand (N) wechseln, wobei nach einem Wechsel das Protein auch in dem entsprechenden Zustand durch den Wechsel in das denaturierende Regime gefangen werden kann. **(B)** Typische gefilterte Kraft-Ausdehnungskurve mit $v_p = 5 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ von ddFLN4 in einem Experiment mit großen Oszillationsamplituden. **(C)** Lebensdauerverteilung des Faltungszwischenzustands unter äußerer Kraft. Vergrößerungen: Messung der Lebensdauer des Faltungszwischenzustands.

Entfaltungskräfte (rot) scheinen relativ niedrig zu sein, während die Rückfaltungskräfte hoch erscheinen. Dies ist allerdings eine Verfälschung der wahren Faltungs- und Entfaltungskräfte, da jeweils nur die mittleren Kräfte dargestellt werden. Die eigentlichen Ereignisse finden in den Wendepunkten der Oszillation statt. Deswegen sollte man aus diesen Kurven auch keine direkten Kraftmessungen vornehmen, sondern lediglich die Lebensdauer des Faltungszwischenzustands bestimmen. Dies ist exemplarisch an drei Kurven in der Vergrößerung der Abbildung 4.3C dargestellt. Die mittlere Kurve zeigt sogar kurz nach dem Übergang vom entfalteten Zustand in den Zwischenzustand eine Faltung von diesem in den nativen Zustand. Der native Zustand wird allerdings bei dieser Ausdehnung während einer Oszillation nicht nur eingefroren, sondern sogar in denaturiert. Er entfaltet kurz darauf in den Zwischenzustand. Durch eine weitere Vergrößerung der Oszillationsamplitude kann man somit schnell zwischen renaturierenden und denaturierenden Bedingungen und somit Faltung und Entfaltung wechseln. Dies wird im Anhang C: *Quasi-Gleichgewicht*, genauer beschrieben. Mit Hilfe einer Monte-Carlo-Simulation des Experiments, die die reduzierte Faltungskinetik unter äußerer Kraft berücksichtigt, lässt sich die gewonnene Lebensdauerverteilung gut reproduzieren. Man erhält eine optimale kraftfreie Rückfaltungsrate $k_{IN}^0 = 200 - 240 \text{ s}^{-1}$, die mit den bisherigen Erkenntnissen in gutem Einklang steht [47, 4].

4.3 Faltungspfad unter äußerer Kraft

In den beiden vorherigen Abschnitten wurde gezeigt, dass die Filamindomäne ddFLN4 bei einer Kraft von ca. 4 pN faltet und auch unter äußerer Kraft einen obligatorischen Faltungszwischenzustand populiert. In der Proteinfaltung wird häufig auf dem Faltungspfad noch vor Zwischenzuständen eine Art *molten globule* Zustand beschrieben. Dieser entsteht durch einen starken hydrophoben Kollaps und ist eine sehr kompakte Struktur der sich faltenden Aminosäuren, mit einer durchschnittlich geringeren Ausdehnung als eine reine Gaußsche Kette. Zeigt ddFLN4 einen derartigen hydrophoben Kollaps unter äußerer Kraft?

Sowohl die Lock-in Daten als auch die Auswertung der Faltungskraftverteilung ergaben keinerlei Hinweise auf eine Art hydrophoben Kollaps. Die Lock-in Daten folgten einem rein entropischen Polypeptidelastizitätsmodell bis hin zu kleinen Ausdehnungen von ca. 20% der Konturlänge und zu Kräften von ca. 1,7 pN. Sollte ab dieser Ausdehnung ein hydrophober Kollaps stattfinden, dann sind dessen energetische Beiträge in der Größenordnung von ca. 1,3 k_BT pro Domäne. Dies stimmt mit bisherigen Erkenntnissen überein, dass nicht-native Interaktionen schwach sind im Vergleich zu nativen Interaktionen [48]. Schönbrunner *et al.* fanden in Ensemble Faltungsstudien des Proteins Tendamistat ebenfalls keine Hinweise für einen hydrophober Präfaltungskollaps [49]. Auch haben Hoffmann *et al.* mittels Einzelmolekül-FRET ebenfalls keine Anzeichen auf eine besonders kompakte Struktur auf dem Faltungspfad von CspTm (cold shock protein aus *Thermotoga maritima*) gefunden [50]. Selbst bei geringer Konzentration ihres Denaturierungsmittels konnte die Kettendynamik am besten mit einer Gaußschen Kette, also rein entropischer Elastizität, beschrieben werden. Per Definition ist ein hydrophober Kollaps die strukturunabhängige Aneinanderlagerung hydrophober Aminosäuren zur Energieminimierung bzw. Entropiemaximierung [51]. Für einen fehlenden obligatorischen hydrophoben Kollaps bei einer Faltung unter äußerer Kraft ergeben sich noch weitere Indizien. Ein deutlicher Anhaltspunkt findet sich in der Kraftabhängigkeit der Faltungsrate vom Zwischenzustand in den nativen Zustand. Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt wurde, lebt der Faltungszwischenzustand unter den experimentellen Bedingungen ≈ 1 s, wobei die Faltungszeit im kraftfreien Experiment nur ca. 5 ms betragen würde. Ein vor der Faltung, also dem Ausbilden des Zwischenzustands, stattfindender hydrophober Kollaps müsste somit spezifisch lediglich die sich faltenden Aminosäuren kollabieren lassen. Andernfalls erwartet man, dass sobald einmal die gesamte Aminosäurekette kollabiert ist, diese ihre Faltungsschritte im quasi kraftfreien Fall ausüben könnte. Gerade die Faltung des nativen Zustands zeigte eine starke Kraftabhängigkeit, so dass entweder im hydrophoben Kollaps strukturspezifische Informationen enthalten sein müssten oder kein klassischer hydrophober Kollaps stattfindet. Letzteres wird in diesem Fall als mögliche Erklärung angenommen, da die Strukturspezifität der klassischen Definition eines hydrophoben Kollaps widerspricht.

Die Faltungsenergielandschaft von ddFLN4 unter äußerer Kraft stellt sich nach den bisherigen Erkenntnissen wie folgt dar. Die Faltungskinetik konnte sehr gut mit dem Modell zur zusätzlichen Faltungsbarriere erklärt werden, so dass der entfaltete Teil der Energielandschaft auf einer End-zu-End-Abstands Koordinatenachse mit der Nebenbedingung von unstrukturierten Aminosäuren beschrieben werden kann (siehe Abb. 4.4A). Bei einem Faltungsvorgang wechselt das Protein auf der hochdimensionalen Energielandschaft die Koordinatenachse und lässt sich mit einer potentiellen Energie als Funktion des End-zu-End-Abstands mit strukturierten Aminosäuren beschreiben.

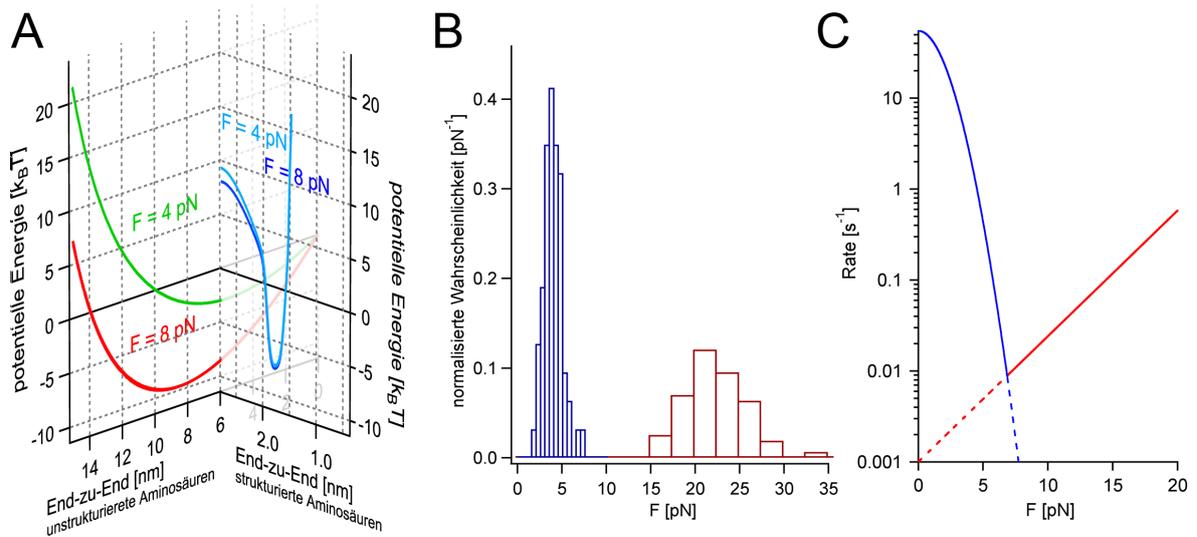


Abbildung 4.4: (A) Schematische Darstellung der Energielandschaft von ddFLN4. Auf der linken Koordinatenfläche ist die potentielle Energie eines entfalteten Proteins bei zwei verschiedenen äußeren Kräften dargestellt. Auf der rechten Koordinatenfläche ist die potentielle Energie der gefalteten Domäne ddFLN4 dargestellt. (B) Kraftverteilung für die Entfaltung (rot) und Faltung (blau) von ddFLN4 bei $v_P = 5 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$. (C) Theoretischer Kraft-Chevron-Plot für die Faltungsrate (blau) und Entfaltungsrate (rot) von ddFLN4.

Beide Potentiale zeigen ein deutlich unterschiedliches Kraftverhalten. Während im gefalteten Zustand sich bei einer Kraftveränderung von 4 zu 8 pN die Barrierenhöhe und deren Abstand zum Minimum nur wenig ändern [45], zeigt das zugrunde liegende Potential der unstrukturierten Aminosäurekette eine starke Kraftabhängigkeit. Dies spiegelt sich auch in den extrem schmalen, fokussierten Kraftverteilungen wieder. Würde man eine feste Potentialbreite für den Faltungsvorgang annehmen, dann wären die beobachteten Kraftverteilungen wesentlich breiter.

Mit den hier gezeigten Experimenten konnte erstmals eine Rückfaltungskraftverteilung eines Proteins gemessen werden. Abbildung 4.4B zeigt, dass die Rückfaltungskräfte (blau) im Vergleich zu den Entfaltungskräften (rot) extrem schmal verteilt sind. Analysiert man nun die Entfaltungskraftverteilung bei der verwendeten Ziehgeschwindigkeit mit einem Bell-Modell, dann erhält man eine Potentialbreite $\Delta x = 1,3 \text{ nm}$ und eine natürliche Entfaltungsrate $k_{IU}^0 = 0,001 \text{ s}^{-1}$ [52]. Es ergibt sich somit ein rechnerischer Kraft-Chevron-Plot, der in Abbildung 4.4C dargestellt ist. Bei einer Kraft von $\approx 7 \text{ pN}$ schneiden sich die Faltungsrate (blau) und Entfaltungsrate (rot). Die Domäne ddFLN4 wäre rechnerisch im Gleichgewicht und würde im Mittel ca. alle 120 s zwischen den Zuständen U und I wechseln. Eine solche Beobachtung wäre wünschenswert, bleibt aber aufgrund experimenteller zeitlicher Einschränkungen, da man mehrere Übergänge in Folge an einem Molekül beobachten sollte, ein Gedankenexperiment. Anhang B stellt Experimente bei niedrigen Kraftladungsraten an ddFLN4 vor. Diese deuten darauf hin, dass ddFLN4 anscheinend mechanisch stabiler wird, je niedriger die Kraftladungsrates des Experiments ist. Ein eindimensionales Bild für die mechanische Entfaltung bricht in diesem Fall zusammen.

4.4 Diskussion

Der Faltungszwischenzustand ermöglicht nicht nur einen Vorteil im kraftfreien Raum, sondern auch für die Faltung unter äußerer Kraft. Ein Faltungsszenario unter Kraft ist sicher nicht der Normalfall in Zellen; allerdings könnte dies bei einem zytoskelettverbindenden Protein wie Filamin unter Umständen durchaus vorkommen. Ein Faltungszwischenzustand, bei dem nur ein Teil der Aminosäuren strukturiert werden muss, kann die maximal mögliche Rückfaltungskraft deutlich erhöhen. Dies lässt sich leicht verstehen, wenn man annimmt, dass eine äußere Kraft in einem vereinfachten Bild die Faltungszeit mit einem Faktor $\exp(\frac{F \cdot x}{k_B T})$ verlängert. Nimmt man nun an, dass sich ein Protein in einem Schritt unter Kraft faltet, dann wäre die Verlangsamung $A = \exp(\frac{F \cdot l_{alle}}{k_B T})$, während eine Faltung über einen Zwischenzustand mit der Hälfte der Aminosäuren lediglich um $B = \exp(\frac{F \cdot 0,5 \cdot l_{alle}}{k_B T})$ verlangsamt wird. Die gesamte Faltungszeit bei einer Kraft F beträgt somit für den Zweizustandsfalter $t_{gesamt}(F) = A \cdot t_{gesamt}(0)$. Bei einer Faltung über einen Zwischenzustand ergibt sich $t_{gesamt}(F) = B \cdot t_1(0) + B \cdot t_2(0) = B \cdot (t_1(0) + t_2(0)) = B \cdot t_{gesamt}(0)$. Berücksichtigt man weiter, dass $A = B^2$ und $A, B > 1$, dann ist leicht ersichtlich, dass der Zweizustandsfalter stets mindestens quadratisch langsamer ist als das über den Zwischenzustand faltende Protein, selbst wenn im kraftfreien Raum die Faltungszeiten identisch wären. In Abbildung 4.2A ist eine theoretische Rückfaltungskraftverteilung für ein Protein mit 100 Aminosäuren ohne Faltungszwischenzustand, allerdings mit einer mittleren Faltungskraft von 4 pN schwarz gestrichelt dargestellt. Damit diese erreicht werden konnte, musste die kraftfreie Faltungsrate auf ca. $3500 - 4000 \text{ s}^{-1}$ erhöht werden. Eine solch hohe Faltungsrate ist bisher für Proteine mit einer Immunoglobulin-ähnlichen β -Sandwich Struktur nicht gefunden worden. Die bisher schnellste Immunoglobulin-ähnliche Domäne ist mit einer Faltungsrate von ca. 150 s^{-1} immer noch Größenordnungen entfernt [1].

4.5 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden Rückfaltungsexperimente unter äußerer Kraft an ddFLN4 vorgestellt. Es konnte gezeigt werden, dass ddFLN4 einen sehr ähnlichen, wenn nicht identischen Faltungspfad wie im kraftfreien Experiment hat und den obligatorischen Zwischenzustand populierte. Das in Kapitel 3 entwickelte Modell beschreibt die experimentelle Faltungskraftverteilung sehr gut.

Aus den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimenten ergaben sich keine Hinweise auf einen besonders kompakten hydrophoben Präfaltungskollaps. Gleichgewichtsexperimente an ddFLN4 sind mit den bisherigen Erkenntnissen und experimentellen Grenzen, sowie der unerwarteten mechanischen Stabilität bei niedrigen Kräften der Proteindomäne ddFLN4 eher unwahrscheinlich. Die beiden Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Faltungs- und Entfaltungskraft sind bei der niedrigen Ziehgeschwindigkeit immer noch deutlich voneinander getrennt, so dass auch eine Analyse der Gleichgewichtsenergielandschaft mit dem Crooks-Modell bisher unwahrscheinlich erscheint [53].

Kapitel 5

Faltung von Ubiquitin unter äußerer Kraft

Eine der ersten Arbeiten, die direkt den Faltungspfad eines Proteins mit dem Kraftmikroskop beobachtete, wurde an dem Protein Ubiquitin durchgeführt [39]. Ubiquitin ist ein kleines, 76 Aminosäuren umfassendes Protein, das eine α/β -Faltungsstruktur (*β -grasp*) aufweist. Es ist hoch konserviert¹ und wird im Zytosol als Markierungs- bzw. Signalprotein verwendet. Dabei werden teilweise mehrere Ubiquitine über verschiedene Richtungen miteinander verknüpft und dienen auch als mechanischer Anker bei der Proteindegradierung [54]. Die mechanische Entfaltung passiert zum größten Teil als Zweizustandsprozess, d.h. ohne mechanisch stabilen Entfaltungszwischenzustand [18]. In Lösung wurde Ubiquitin sowohl als Zweizustandsfalter als auch als Dreizustandsfalter beobachtet [55, 56]. Fernandez und Li beobachteten einen Faltungspfad, der in mehrere spezifische Abschnitte unterteilt wurde, beispielsweise einen starken hydrophoben Kollaps, der die Polypeptidkette stärker als eine Gaußsche Kette kompaktierte [57]. Außerdem wurden Rückfaltungsereignisse bis zu Kräften über 20 pN beobachtet. Nach dem in Kapitel 3 vorgestellten Modell sollte dies mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit vorkommen. In diesem Kapitel soll untersucht werden:

- Bei welcher Kraft faltet Ubiquitin zurück?
- Kann das Modell zur Faltungskinetik unter Kraft dies erklären?
- Faltet Ubiquitin in einem Zweizustandsprozess?
- Kann die durchschnittliche aktive Faltungskraft in einer Art *de novo* Design kontrolliert verändert werden?

5.1 Aktive Faltung von Ubiquitin_{1,76}

Die ersten Experimente wurden an einem Ubiquitin-Hexamer mit einer NC-terminalen Verlinkung der einzelnen Ubiquitindomänen durchgeführt. Abbildung 5.1A zeigt eine einzelne Ubiquitindomäne mit den in diesem Kapitel relevanten Aminosäuren 1, 16, 35 und 77² als

¹ 96% Sequenzidentität zwischen Hefeubiquitin und humanem Ubiquitin.

² Für das später eingeführte Ig-Handle Konstrukt wurde anstatt einer Punktmutation der 76. Aminosäure ein Cystein an der Stelle 77 eingeführt.

schematische Kristallstruktur. Bei der NC-terminalen Verlinkungsrichtung wurde auf DNA-Ebene eine Kette aus sechs Ubiquitinen an den Aminosäuren 1 und 76, dem natürlichen N- und C-Terminus des Proteins, verbunden (siehe Anhang F.7). Ubiquitin entfaltet in Kraft-Ausdehnungsexperimenten mit $v_P = 500 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ bei einer mittleren Kraft $F_U = 154 \pm 37 \text{ pN}$ und mit einem Konturlängenzuwachs $\Delta L_C(\text{Ubi}_{1,76}) = 23,5 \pm 0,9 \text{ nm}$. Für Rückfaltungsexperimente wurde auch in diesem Fall die Lock-in Technik aus Kapitel 2 verwendet. Dabei wurden zwischen drei und fünf Ubiquitine aus dem Hexamer entfaltet und anschließend mit einer Geschwindigkeit $v_P = 10 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ bis zu einer bestimmten Ausdehnung, deutlich über der Oberfläche, relaxiert³. Danach wurde das Konstrukt wieder gestreckt, so dass die gefalteten Ubiquitindomänen erneut entfaltet werden konnten. Abbildung 5.1B und C zeigen typische Kraft-Ausdehnungskurven von Rückfaltungsexperimenten am Ubiquitin-Hexamer. In grau sind jeweils die Daten bei voller Bandbreite dargestellt. Das gefilterte Kraftsignal (hellblau und hellrot) zeigt teilweise noch deutliche Kraftsignaldrift (Abb. 5.1B bei einer Ausdehnung von ca. 45 nm).

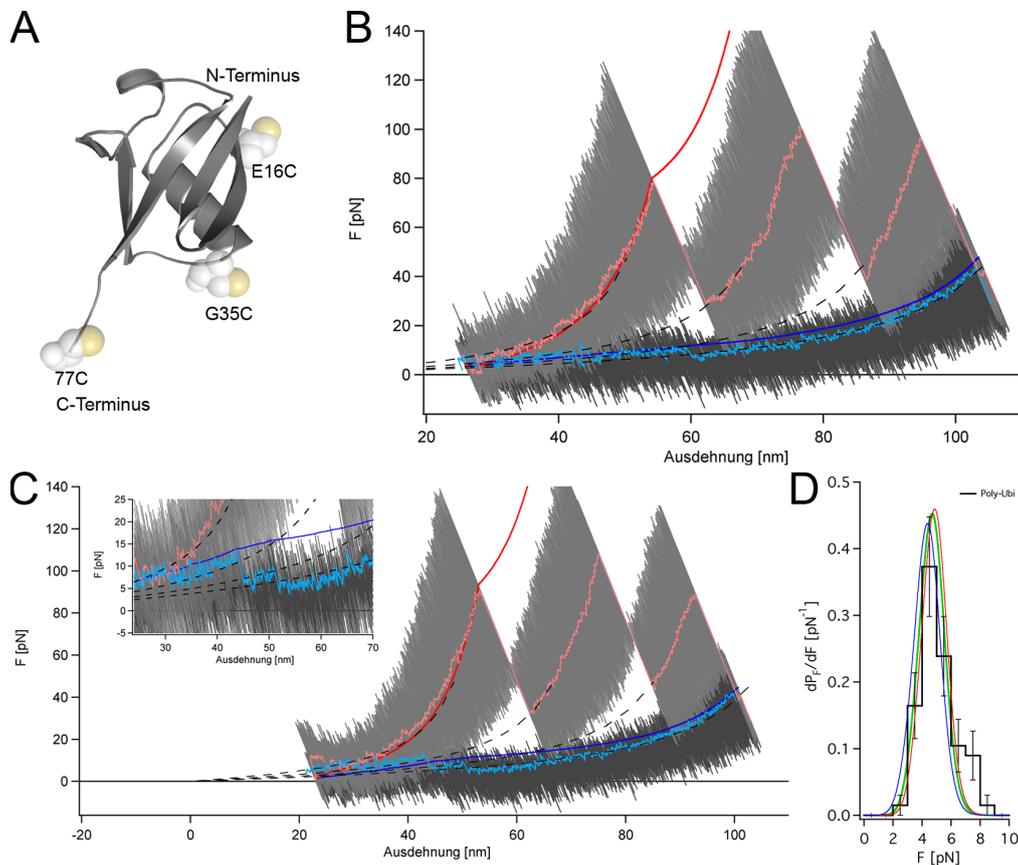


Abbildung 5.1: Rückfaltung von Hexa-Ubi_{1,76}. **(A)** Schematische Röntgenkristallstruktur von Ubiquitin (*MacPyMOL*, pdb: 1ubi). **(B)** Typische Rückfaltungskurve von Hexa-Ubiquitin_{1,76}. **(C)** Typische Rückfaltungskurve von Ubiquitin. Vergrößerung: Identifikation der Rückfaltungsereignisse in den direkten Daten sowie anhand der Knicke in den Lock-in Daten. **(D)** Rückfaltungskraftverteilung von Hexa-Ubiquitin_{1,76} mit theoretischer Faltungskraftverteilung (grün). Diskussion siehe Text.

³ Die Lock-in Parameter für diese Experimente waren eine Oszillationsamplitude $A = 10 \text{ nm}$ mit einer Oszillationsfrequenz $f_L = 40 \text{ Hz}$.

Diese ist, wie bereits erwähnt, in den Lock-in Daten (blau = Relaxation, rot = Ausdehnung) nicht mehr vorhanden. Die Rückfaltungsereignisse können dann sowohl in den direkten Daten als auch durch Knicke im Lock-in Signal identifiziert werden (Vergrößerung in Abb. 5.1C). Durch die Anpassung eines WLC-Modells ($\Delta L_C = 23,5$ nm) an die Rückfaltungsereignisse kann gezeigt werden, dass in diesem Fall eine unabhängige, vollständige Faltung von einzelnen Ubiquitindomänen stattfindet. Es wurde auch bis unmittelbar vor dem Faltungsereignis keine deutliche Abweichung von einer rein entropischen Elastizität beobachtet, so dass in diesem Fall mit hoher Wahrscheinlichkeit kein kollektiver hydrophober Kollaps stattfand. Die Rückfaltungskraft bei diesem Konstrukt bewegte sich im Bereich zwischen drei und acht Piconewton mit einer mittleren Kraft $F = 5,1 \pm 1,3$ pN ($n=68$) (Abb. 5.1D). Die Verteilung konnte mittels des in Kapitel 3 entwickelten Modells für eine kraftfreie Faltungsrate $k_f^0 = 200$ s⁻¹ reproduziert werden (grüne Kurve). Die blaue Kurve stellt die theoretische Verteilung mit einer kraftfreien Faltungsrate $k_f^0 = 100$ s⁻¹, die rote mit $k_f^0 = 300$ s⁻¹ dar. Alle Verteilungen passen vergleichbar gut an die gemessenen Daten und können ebenfalls die Abweichungen bei höheren Kräften (≈ 8 pN) nicht erklären. Es wurde nie eine Rückfaltung aller entfalteten Ubiquitindomänen beobachtet, da die Rückfaltungswahrscheinlichkeitsdichte zu immer kleineren Kräften verschoben wird, je kürzer der zur Verfügung stehende Spacer und je mehr gefaltete Domänen vorhanden sind (vgl. Kapitel 3 sowie Abb. 5.2B). Die breite Streuung der Rückfaltungskräfte lässt sich durch das Ubiquitin-Hexamerkonstrukt erklären. Sind zu Beginn beispielsweise fünf Ubiquitindomänen entfaltet, dann ist die Faltungsrate für die zuerst faltende Domäne fünffach erhöht, d.h. $k_f^{5 \times Ubi} = 5 \cdot k_f^{1 \times Ubi} = 5 \cdot 300$ s⁻¹. Die effektive Faltungsrate unter Kraft ist nicht nur durch die scheinbar höhere Nullkraftfaltungsrate erhöht, sondern auch durch die noch größere Spacerlänge. Abbildung 5.2A zeigt die effektive Faltungsrate unter Kraft für fünf iden-

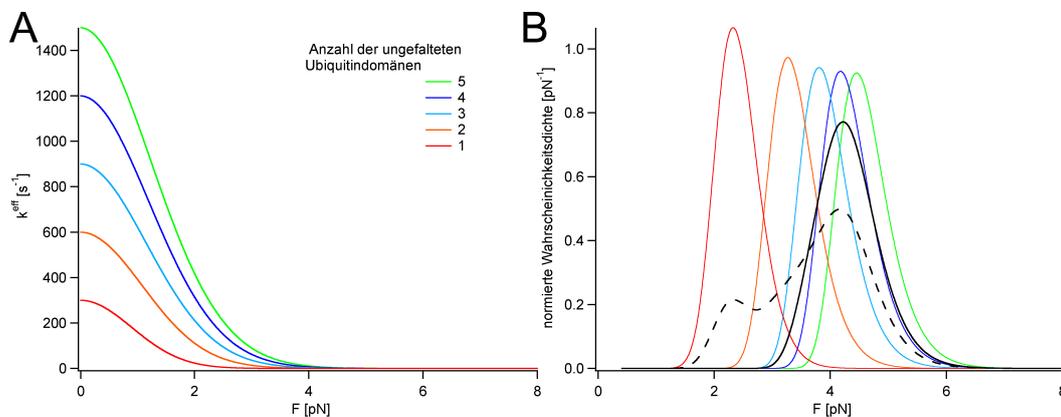


Abbildung 5.2: (A) Effektive Faltungsrate unter äußerer Kraft des Hexa-Ubi_{1,76}. Die Faltungsrate einer einzelnen Domäne wurde mit $k_f^0 = 300$ s⁻¹ angenommen; als Spacerlänge die Anzahl der entfalteten Domänen plus deren gefalteter End-zu-End Abstand ($5 \cdot 4$ nm). (B) Theoretische Rückfaltungswahrscheinlichkeitsdichte (Farbcode entsprechend A). Eine Überlagerung der fünf einzelnen Wahrscheinlichkeitsdichten zeigt eine deutliche Verbreiterung (schwarz gestrichelt). Experimentell wurden bei fünf entfalteten Domänen meist nur bis zu drei Rückfaltungen beobachtet. Die überlagerte Verteilung zeigt eine ähnlich Breite wie die der experimentellen Daten (schwarz).

tische nacheinander faltende Ubiquitindomänen. Die zugehörigen Wahrscheinlichkeitsdichten sind in Abbildung 5.2B dargestellt. Eine Überlagerung der fünf Wahrscheinlichkeitsdichten (schwarz gestrichelt) bzw. der ersten drei der fünf Wahrscheinlichkeitsdichten (schwarz) ergibt

eine vergleichbar breite Streuung der möglichen Rückfaltungskräfte wie beobachtet⁴.

Neben vollständigen Rückfaltungen wurden zu einem geringen Anteil bei dem Poly-Ubiquitinkonstrukt auch anscheinend teilgefaltete bzw. fehlgefaltete Strukturen gefunden. Aus Lösungsmittelstudien ist bereits bekannt, dass Ubiquitin unter hohen Konzentrationen zu Aggregation neigt [56]. Durch die miteinander verbundene Poly-Ubiquitin-Peptidkette ist die lokale Konzentration extrem hoch. Die Fehlfaltungen haben sich meist durch Konturlängenzuwächse von 10, 14 und 33 nm bei der anschließenden Entfaltung gezeigt und wurden für die hier gezeigte Analyse der Rückfaltungskräfte ausgeschlossen. Zwar wurden bereits in mechanischen Entfaltungsstudien von Poly-Ubiquitin mit einem geringen Prozentsatz Entfaltungszwischenzustände gefunden [18], aber an dieser Stelle wäre es auch denkbar, dass trotz äußerer Kraft eventuell einzelne Sekundärstrukturelemente benachbarter Domänen sich austauschen und somit mechanisch stabile Strukturen mit mehr als 76 Aminosäuren ausbilden. Da diese Fehlfaltungen nur sehr selten auftraten und womöglich durch die Art des Experiments induziert wurden, sollen diese somit nicht genauer analysiert werden.

Um die Streuung der Rückfaltungskräfte kompakter zu halten, wäre es optimal, Einzel-domänen oder zumindest maximal Zweidomänenkonstrukte zu betrachten. Hierzu wurde auf DNA-Ebene ein Konstrukt aus Immunoglobulindomänen des Titins (I27-I29, neue Notation I91-I93) und einer C-terminalen Ubiquitindomäne erstellt. An die C-terminale Ubiquitindomäne wurde ein Cystein angefügt, so dass das Immunoglobulin-Handle-Ubiquitin-Konstrukt (Ig-Ubi_{1,76}) dimerisieren kann. Zur spezifischen Anbindung des Konstrukts an die Ni²⁺-NTA-Oberflächen wurden Heterodimere mit N-terminalen Histidin- bzw. Strep-tags erzeugt (siehe Anhang F.7). Der Aufbau des Konstrukts ist in der linken Vergrößerung der Abbildung 5.3A skizziert. Eine zugehörige Kraft-Abstandskurve zeigt sowohl die beiden Ubiquitin-Entfaltungen mit $\Delta L_C \approx 23$ nm (grün), als auch die Entfaltungen der Titin-Domänen mit $\Delta L_C \approx 27$ nm (violett). Der Konturlängenzuwachsunterschied ermöglicht es, beide Entfaltungsereignisse deutlich voneinander zu trennen (siehe Vergrößerung). Die mittlere Entfaltungskraft von Ubiquitin ist niedriger als die der I27-I29 Domänen. Im Durchschnitt werden die Ubiquitindomänen zuerst entfalten. Bei einer anschließenden Relaxation werden die entfaltenen Ubiquitindomänen aufgrund der höheren Faltungsrates zuerst zurückfalten [58, 55].

Als zusätzlicher Spacer wurden üblicherweise noch zwei bis drei der Ig-Domänen entfaltet. Abbildung 5.3B zeigt eine typische Rückfaltungskurve des Dimerkonstrukts bei einer Ziehgeschwindigkeit $v_P = 5 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ mit den Lock-in Parametern $A = 7$ nm und $f_L = 40$ Hz. Es sind zwei deutliche Rückfaltungsereignisse sowohl in den direkten Daten als auch anhand der Knicke in den Lock-in Daten zu beobachten (siehe Pfeile in der Vergrößerung). Die anschließende Kraft-Ausdehnungskurve (hellgrau, hellrot) zeigt zur Kontrolle zwei Ubiquitinentfaltungsereignisse. Es wurden Rückfaltungsereignisse in einem Kraftbereich zwischen 2 und 7 pN beobachtet (Abb. 5.3C). Die mittlere Rückfaltungskraft beträgt $F(\text{Ubi}_{1,76}) = 4,3 \pm 0,9$ pN (n=44) und die erhaltene Rückfaltungskraftverteilung konnte mittels des Modells zur Faltungskinetik unter äußerer Kraft mit einer kraftfreien Faltungsrates $k_f^0 = 200 \text{ s}^{-1}$ sehr gut reproduziert werden. Dies bestätigt den bereits erhaltenen Wert aus den Poly-Ubiquitin Experimenten. Die durchschnittliche Rückfaltungskraft liegt bei diesem Experiment niedriger, da zum einen das Experiment mit einer geringeren Lock-in Amplitude durchgeführt wurde (vgl. Anhang F.2), zum anderen sind die Faltungskräfte niedriger, da nur zwei Ubiquitindomänen zur Fal-

⁴ Bei der theoretischen Berechnung wurde an dieser Stelle eine Verbreiterung durch eine experimentelle Unsicherheit der Nullkraft- und Nullausdehnungsbestimmung noch nicht berücksichtigt. Diese würde die zu erwartende Verteilung nochmals verbreitern.

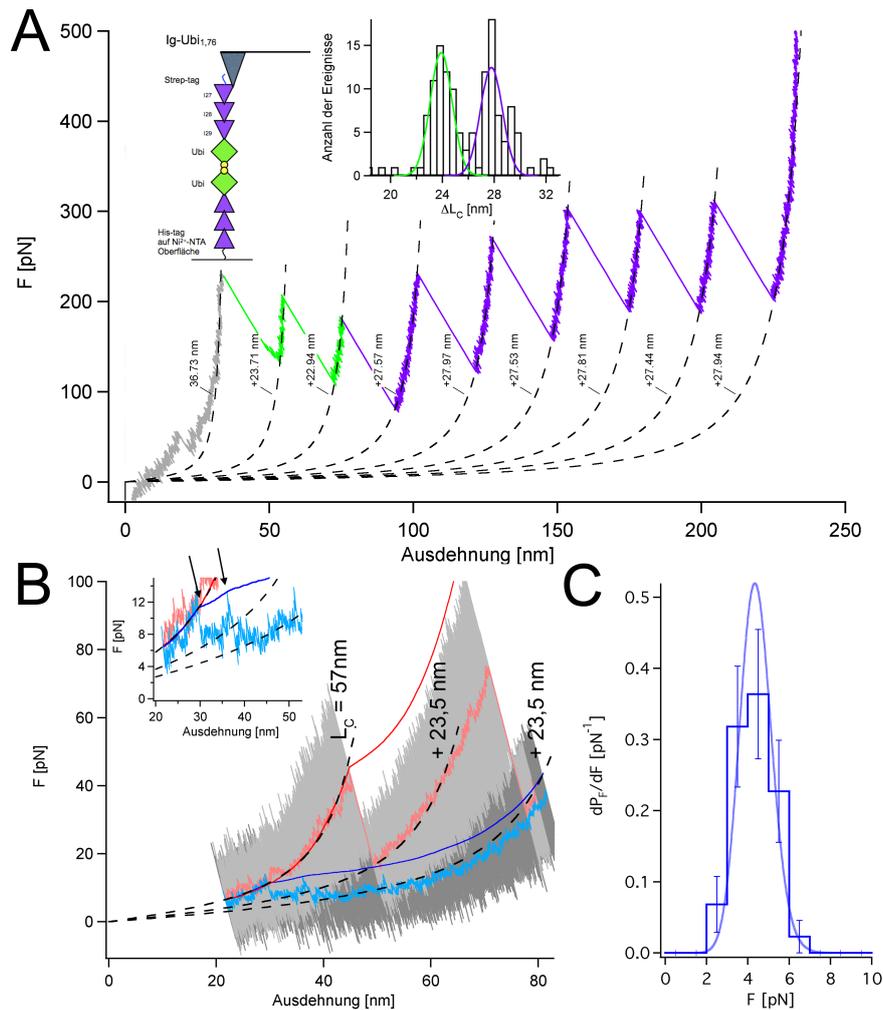


Abbildung 5.3: (A) Kraft-Ausdehnungskurve des Konstrukts Ig-Ubi_{1,76}. Ubi_{1,76} entfaltet mit einem Konturlängenzuwachs $\Delta L_C \approx 23$ nm, die Immunglobulin-Handles I27-29 mit $\Delta L_C \approx 27$ nm. Vergrößerung: Schematische Darstellung des Hetero-Dimerkonstrukts und Konturlängenzuwachsvverteilung. (B) Typische Rückfaltungskurve von Ig-Ubi_{1,76}. (C) Rückfaltungskraftverteilung von Ig-Ubi_{1,76}.

tungskraftverteilung beitragen (vgl. Abb. 5.2). Eine Unterscheidung zwischen einer kraftfreien Rückfaltungsrate $k_f^0 = 100 \text{ s}^{-1}$ oder $k_f^0 = 300 \text{ s}^{-1}$ ist allerdings in diesem Experiment trotz schmalerer Faltungskraftverteilung als im Poly-Ubikonstrukt immer noch nicht möglich, da sich die mittleren Rückfaltungskräfte bei diesen Raten nur um 0,5 pN unterscheiden. Auch in Lösungsmittelstudien kann die Faltungsrate von Ubiquitin nur in einem gewissen Bereich zwischen 1 und 250 s^{-1} in Abhängigkeit der Lösungsmittelbedingungen und der Ubiquitinkonzentration beobachtet werden [56, 59].

Bei den Experimenten an Ig-Ubi_{1,76} konnten weder eindeutige Anzeichen für einen hydrophoben Kollaps der Polypeptidkette noch Faltungszwischenzustände beobachtet werden. Went *et al.* berichteten kürzlich ebenfalls, dass die beobachteten Faltungszwischenzustände von Ubiquitin stark von den Lösungsmittelbedingungen abhängen (Stabilisierung des Zwischenzustands bspw. durch Zugabe von Natriumsulfat), so dass Ubiquitin im Allgemeinen und wie hier gefunden eine Zweizustandsfaltung zeigt [59]. Betrachtet man bei diesem Konstrukt die nied-

rige Rückfaltungskraftverteilung im Vergleich zu den relativ hohen Entfaltungskräften (siehe Abb. 5.3B, $\approx 60 - 100$ pN), dann wird deutlich, dass man trotz der niedrigen Kraftladungsrate noch weit von Gleichgewichtsexperimenten entfernt ist und die beiden experimentellen Kraftverteilungen sich nicht überschneiden würden. Der Unterschied ist bei diesen Daten sogar nach extremer als bei den Rückfaltungsexperimenten mit ddFLN4 (siehe Kapitel 4.2 und Anhang B). Alternativ wurde kürzlich von Best *et al.* in Simulationen gefunden, dass die Entfaltungsreaktionskoordinate von Ubiquitin entlang einer anderen Verlinkungsrichtung eher dem nativen Pfad entsprechen würde und somit unter Umständen die beiden Verteilungen einen Überlapp zeigen könnten [60].

5.2 Aktive Faltungskraft nach Wunsch

Das in Kapitel 3 vorgestellte Modell zur Berechnung der Faltungskinetik unter äußerer Kraft beinhaltet als einen entscheidenden Parameter die Anzahl der sich faltenden Aminosäuren. Kontrahieren sich weniger Aminosäuren mit derselben kraftfreien Faltungsrate, dann nimmt die aktive Faltungskraft deutlich zu (vgl. Abb. 3.4B und C). Um diese Annahme zu überprüfen, wurden zwei weitere Ubiquitinkonstrukte mit einer verkürzten Verlinkungsrichtung hergestellt. In dem bereits vorgestellten Handle-Konstrukt aus Immunoglobulin-Domänen und einer C-terminalen Ubiquitindomäne wurde anstatt eines C-terminalen Cysteins mittels Punktmutation eine halb verkürzte Variante Ubi_{1,35} und eine stark verkürzte Variante Ubi_{1,16} hergestellt (vgl. Abb. 5.1A). Abbildungen 5.4A und B zeigen schematisch die beiden in diesem Abschnitt verwendeten Ubiquitinkonstrukte. Es wurden sowohl Messungen mit Homodimeren mit zwei Histidin-Tags sowie Heterodimeren mit Strep-Tag und Histidin-Tag durchgeführt⁵. Sowohl die leicht verkürzte Ubiquitinvariante mit 35 Aminosäuren als auch die stark verkürzte, 16 Aminosäuren umfassende Variante entfalten bei Kräften deutlich niedriger als die Handle-Proteine Titin I27-I29 und das NC-terminale Ubiquitin Konstrukt (vgl. Abb. 5.3A). Die Entfaltungskinetik von Ubiquitin wurde bereits experimentell und theoretisch für verschiedene Verlinkungsrichtungen intensiv untersucht und die NC-terminale Verlinkungsrichtung war mechanisch stets am stabilsten [17, 60].

Das charakteristische Entfaltungsmuster für Ubi_{1,35} zeigt sich in Kraft-Ausdehnungskurven mit $v_P = 500 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ wie in Abbildung 5.4A dargestellt durch zwei Entfaltungen à ≈ 11 nm mit einer deutlich reduzierten Entfaltungskraft gegenüber der NC-terminalen Ubi_{1,76}-Verlinkungsrichtung. Die gemessene Konturlängenzuwachsverteilung ergibt $\Delta L_C = 11,2 \pm 0,3$ nm und stimmt mit dem erwarteten Konturlängenzuwachs $\Delta L_C = 10,7$ nm gut überein.

Abbildung 5.4C zeigt eine typische Rückfaltungs-Kraft-Ausdehnungskurve des Konstrukts Ig-Ubi_{1,35}. Der experimentelle Ablauf entspricht dem der ddFLN4-Rückfaltungsexperimente. Das Polyprotein wurde teilweise entfaltet, so dass die beiden symmetrischen Ubiquitindomänen ihre Tertiärstruktur verloren und zusätzlich zwei bis drei der Handle-Titindomänen entfalteten. Anschließend wurde mit einer Geschwindigkeit $v_P = 5 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ das gestreckte Polypeptid im Lock-in Modus ($A = 7$ nm, $f_L = 40$ Hz) relaxiert bis zu einer Ausdehnung zwischen 20 und 40 nm. Nach der Relaxation wurde das gefaltete Protein erneut gestreckt und wieder entfaltet, so dass das charakteristische Entfaltungsmuster als Fingerabdruck für das gefaltete

⁵ Sättigt man die Oberfläche mit einer hohen Konzentration an Homodimeren, dann zeigt sich in den meisten Fällen ein echtes Dimer. Die Heterodimer Lösung konnte in verschiedenen Konzentrationen verwendet werden und war somit einfacher zu handhaben. Die Herstellung von Heterodimeren stellte sich allerdings als deutlich aufwendiger heraus.

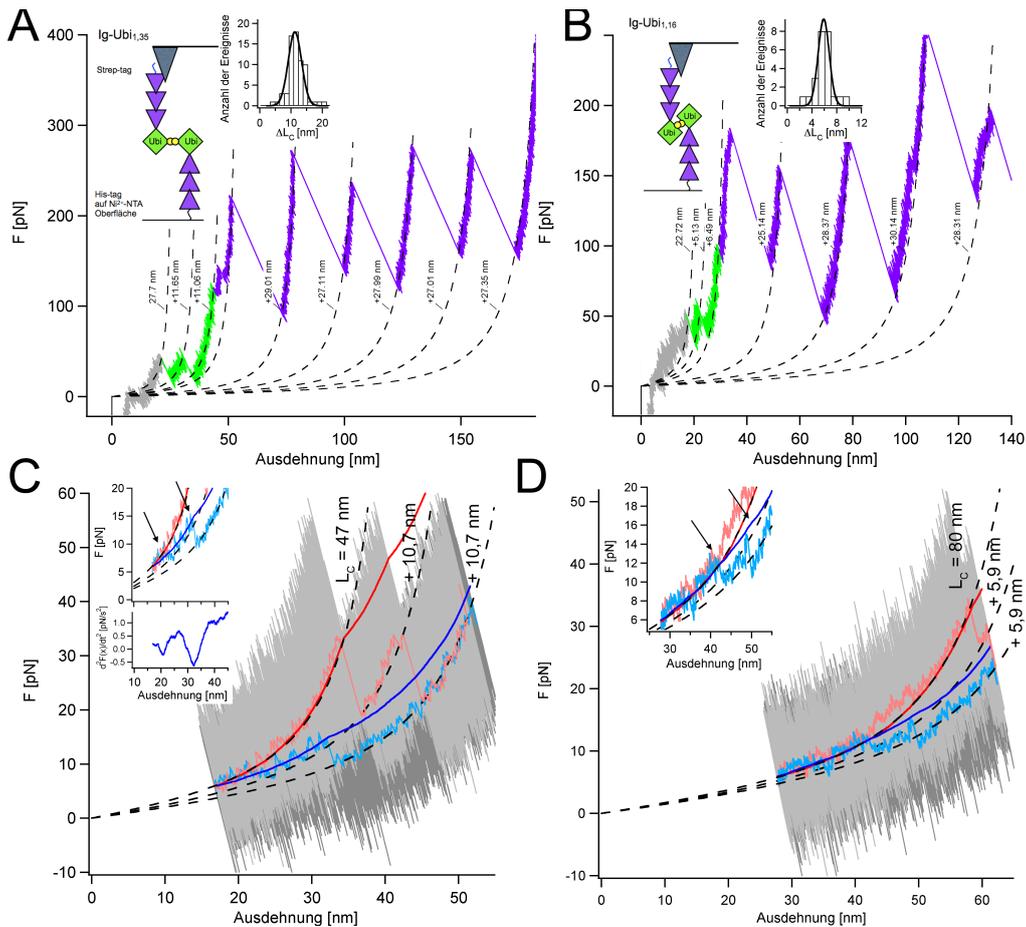


Abbildung 5.4: Schematische Darstellung und typische Kraftausdehnungskurven der **(A)** Ig-Ubi_{1,35} und **(B)** Ig-Ubi_{1,16} Konstrukte. Die Punktmutationen zu Cysteinen wurden an den Stellen 35 bzw. 16 (entsprechend Abb. 5.1A) eingefügt. Die kürzeste Variante Ig-Ubi_{1,16} umfasst lediglich die β -Faltblätter I und II, während bei der Ig-Ubi_{1,35} Variante noch die querliegende α -Helix enthalten ist. **(C)** Typische Rückfaltungskurve für Ig-Ubi_{1,35}. **(D)** Typische Rückfaltungskurve für Ig-Ubi_{1,16}.

Protein dient. Die direkten Daten in Abbildung 5.4C zeigen mindestens einen deutlichen Faltungsvorgang bei ≈ 32 nm Ausdehnung. Nimmt man noch zusätzlich das Lock-in Signal hinzu, dann weist dieses deutlich zwei Knickpunkte (bei ≈ 32 nm und ≈ 20 nm Ausdehnung, siehe Pfeile in der Vergrößerung) auf, die sich ebenfalls als Minima in der zweiten Ableitung des Lock-in Signals zeigten (unterer Teil der Vergrößerung in Abb. 5.4C). Berechnet man aus den Knickpositionen die Rückfaltungskraft für die Verlinkungsrichtung Ubi_{1,35}, dann liegt diese über der des NC-terminalen Konstrukts bei Kräften zwischen 3 und 10 pN mit einer Durchschnittskraft $F(\text{Ubi}_{1,35}) = 6,8 \pm 1,2$ pN ($n=41$).

Abbildung 5.5 zeigt die zugehörige Rückfaltungskraftverteilung (rot). Die berechnete Rückfaltungskraftverteilung (durchgezogene Linie) reproduziert die experimentellen Daten sehr gut mit einer kraftfreien Faltungsrate $k_f^0 = 200$ s⁻¹. Diese zu Ig-Ubi_{1,76} identische Rate deutet darauf hin, dass bei einer Kraftdenaturierung entlang der Aminosäuren 1 bis 35, Ubiquitin trotzdem die gesamte Struktur verliert bzw. eine verbleibende Struktur keinen Faltungskeim zur Verfügung stellt.

Abbildung 5.4D zeigt eine typische Rückfaltungs-Kraft-Ausdehnungskurve für das Titin-Ubiquitinkonstrukt Ig-Ubi_{1,16}. Dieses Konstrukt zeigte in “Single-Pull”-Experimenten bei $v_P = 500 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ (siehe (B)) ein charakteristisches Entfaltungsmuster mit zwei Längenzuwächsen $\approx 6 \text{ nm}$ ⁶. Die niedrigen Entfaltungskräfte erschweren eine zuverlässige Konturlängenmessung, so dass der bestimmte Konturlängenzuwachs von $\Delta L_C = 5,9 \pm 0,5 \text{ nm}$ einen relativ großen Fehler aufweist, dennoch mit dem erwarteten Zuwachs $\Delta L_C = 5,5 \text{ nm}$ in guter Übereinstimmung liegt. Bereits in der gezeigten Rückfaltungskurve lässt sich erkennen, dass die Rückfaltungskräfte erneut gegenüber denen des Ubi_{1,35}-Konstrukts ansteigen. Die mittlere Faltungskraft beträgt $F(\text{Ubi}_{1,16}) = 11,2 \pm 2,7 \text{ pN}$ ($n=51$). Abbildung 5.5 zeigt die experimentelle Rückfal-

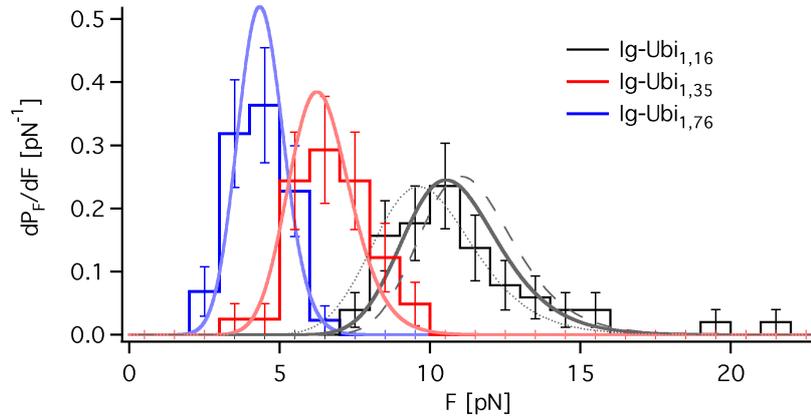


Abbildung 5.5: Rückfaltungskraftverteilungen der Verlinkungsrichtungen Ig-Ubi_{1,16}, Ig-Ubi_{1,35} und Ig-Ubi_{1,76} mit angepasstem Modell zur Faltungskinetik unter Kraft.

tungskraftverteilung sowie die Anpassung durch das Modell zur Faltungskinetik unter Kraft mit einer kraftfreien Rückfaltungsrate $k_f^0 = 200 \text{ s}^{-1}$ (graue durchgezogene Linie). Weiterhin ist die zu erwartende Kraftverteilung mit einer kraftfreien Faltungsrate $k_f^0 = 100 \text{ s}^{-1}$ (grau gepunktet) und $k_f^0 = 300 \text{ s}^{-1}$ (grau gestrichelt) dargestellt. Bei dieser kurzen Verlinkungsrichtung treten erstmals deutliche Unterschiede zwischen den drei theoretischen Kraftverteilungen auf, so dass die Verteilung mit $k_f^0 = 200 \text{ s}^{-1}$ eindeutig am besten an die experimentellen Daten passt. Außerdem zeigt sich durch die erneut sehr ähnlich extrapolierte kraftfreie Faltungsrate, dass auch bei einer Denaturierung via die kürzeste Verlinkungsrichtung Ubi_{1,16} das Protein scheinbar komplett entfaltet und kein produktiver Faltungskeim zwischen den Aminosäuren 17–76 erhalten bleibt, obwohl lediglich an 16 Aminosäuren eine denaturierende Kraft anliegt. Dies deutet daraufhin, dass Ubiquitin für die ersten strukturbildenden Schritte eindeutig die Aminosäuren 1–16 benötigt. Im Einklang dazu finden sich in der Literatur mehrere Ubiquitin-Fragmentstudien in Lösung, die zeigen, dass zwar die Aminosäuren 1–17 eine Sekundärstruktur (β -turn) ausbilden, aber beispielsweise die Aminosäuren 36–76 keine Anzeichen von irgendeiner Strukturbildung in Lösung zeigten [56, 61].

Kürzlich berichteten Best und Hummer von verlinkungsrichtungsabhängigen Faltungskinetiken bei Ubiquitin in Molekulardynamik-Simulationen unter äußerer Kraft [44]. Sie stellten

⁶ Aufgrund des geringen Konturlängenzuwachses und der niedrigen Entfaltungskraft sind diese allerdings nicht einfach zu identifizieren und werden oft aufgrund unspezifischer Adhäsion mehrerer Moleküle in den ersten Nanometern typischer “Single-Pull”-Kraft-Ausdehnungskurven überdeckt.

fest, dass eine kürzere Verlinkungsrichtung bei höherer Kraft zurückfalten sollte, da der apparente Übergangszustand näher liegt. Die Molekulardynamik-Simulation basierte allerdings auf einem Gō-Modell, das im Allgemeinen nur native Wechselwirkungen beinhaltet und somit nur begrenzt für die Simulation von Faltung verwendet werden kann [48]. Die berichteten Simulationsergebnisse entsprechen im wesentlichen dem in Kapitel 3 vorgestellten Modell und werden durch die hier gewonnenen Daten gestärkt. Die Interpretation basiert bei Best und Hummer allerdings eher auf einem Übergangszustandsabstand, der sich aus der Anzahl der Aminosäuren und einem Faktor berechnet. Des Weiteren wird das Rückfaltungspotential nach einem Modell zur Entfaltungskinetik berechnet und beinhaltet nicht die Elastizität des Polypeptids [62]. Ein Unterschied zwischen den beiden Modellen sollte sich in einem unterschiedlichen Fokussierungsverhalten der Kraftverteilung bei unterschiedlichen Kraftladungsraten zeigen. Für eine solche Untersuchung ist es allerdings nötig, die experimentellen Bedingungen noch deutlich zu verbessern.

Betrachtet man bei dem Konstrukt Ig-Ubi_{1,16} nicht nur die stark gestiegenen Rückfaltungskräfte, sondern auch die Entfaltungskräfte dieser Verlinkungsrichtung, dann zeigt sich, dass diese eindeutig gegenüber der NC-terminalen Verlinkungsrichtung gefallen sind und sich im Bereich zwischen 20 und 35 pN bewegen. Die Rückfaltungskräfte liegen deutlich höher und reichen bis zu 15 pN. Durch eine weitere Reduktion der Ziehgeschwindigkeit um eine Größenordnung sind somit bei dieser Verlinkungsrichtung Experimente nahe am Gleichgewicht möglich. Informationen über die Gleichgewichtselandtschaft könnten mittels des Crooks-Fluktuationstheorems gewonnen werden [53, 63]. Für ein derartiges Experiment ist eine höhere Driftstabilität nötig, die aber beispielsweise mit einer optischen Pinzette erzielt werden kann. Eine andere Möglichkeit wäre eine weitere Verkürzung der Verlinkungsrichtung, so dass die Rückfaltungskräfte erneut steigen und die Entfaltungskräfte fallen. Es wäre jedoch sicher zu stellen, dass bei einer kürzeren Verlinkungsrichtung noch die gesamte Tertiärstruktur unter äußerer Kraft verloren geht und nicht ein deutlich anderer Faltungspfad eingeschlagen wird. An dieser Stelle könnten Molekulardynamik-Simulationen helfen, um die optimale Verlinkungsrichtung zu finden [60, 64].

5.3 Zusammenfassung

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass bei identischer kraftfreier Faltungskinetik für die Rückfaltungskraft eines Proteins lediglich die Anzahl der sich faltenden Aminosäuren relevant ist. Die gewonnenen Daten stärken das in Kapitel 3 vorgestellte Minimalmodell zur Beschreibung von Faltungskinetiken unter äußerer Kraft. Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist in einer Art *de novo* Design die aktive Faltungskraft eines Proteins zu bestimmen. Man könnte neue aktive Materialien erzeugen, die je nach geschickt gewählter Verlinkungsrichtung unterschiedliche aktive Kontraktionskräfte ausüben könnten (siehe Ausblick in Kapitel 8.3).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch für Ubiquitin keine eindeutigen Hinweise auf einen obligatorischen hydrophoben Kollaps, der eine besonders kompakte Struktur erzeugt, vorliegen. Gerade die entfaltete Poly-Ubiquitin-Peptidkette aus dem ersten Abschnitt zeigte sowohl in den direkten Kraftdaten als auch in den Lock-in Daten keine signifikanten Abweichungen vom rein entropischen Polymerelastizitätsmodell. Ubiquitin verhält sich bis unmittelbar vor der Faltung als reine Gaußsche Kette (*random coil*).

Die Wahl der Verlinkungsrichtung ermöglicht es ferner, dass denaturierende Bedingungen, anders als im Ensemble Experiment, nur äußerst lokal eingesetzt werden können. Dies bedeutet, dass beispielsweise bei dem Konstrukt $\text{Ubi}_{1,16}$, lediglich die Aminosäuren 1 bis 16 unter denaturierenden Bedingungen standen und die restlichen Aminosäuren bereits in einer nativ-ähnlichen Struktur vorliegen hätten können. Da die extrapolierten Faltungsraten der drei Verlinkungsrichtungen allerdings im Rahmen des experimentellen Fehlers identisch waren, deutet dies darauf hin, dass keine signifikante Resttertiärstruktur bei $\text{Ubi}_{1,16}$ oder $\text{Ubi}_{1,35}$ vorhanden war. Im Ausblick 8.1: *Foldons* werden weiterführende Experimente vorgeschlagen.

Kapitel 6

Die kraftfreie Faltungsbarriere

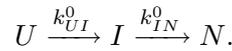
Nachdem in den vorherigen Kapiteln die zusätzliche Barriere durch eine äußere Kraft und die dadurch veränderte Faltungskinetik untersucht wurde, soll in diesem Kapitel die kraftfreie Faltungsbarriere behandelt werden. Selbst im kraftfreien Faltungsprozess ist meist eine Barriere zu überwinden, sofern es sich nicht um einen so genannten *down-hill folder* handelt. Die Höhe der Barriere ist in erster Ordnung strukturabhängig, d.h. eine komplexe Tertiärstruktur ist schwieriger auszubilden. Die Faltung eines komplexeren Proteins findet häufig auch nicht als Zweizustandsfaltung statt, sondern über einen oder mehrere Zwischenzustände. Wie allerdings im vorherigen Kapitel für ddFLN4 bereits gezeigt, bedeutet ein Zwischenzustand nicht zwingend eine Verlangsamung des Faltungspfads, sondern kann durchaus produktiv wirken. Eine ähnliche Tertiärstruktur kann allerdings dennoch eine deutlich unterschiedliche Barrierenhöhe besitzen. Beispielsweise zeigen Immunglobulin-ähnliche Strukturen Faltungsraten im Bereich von $0,4\text{s}^{-1}$ für ⁹FNIII über 45s^{-1} für ddFLN4 wt bis hin zu 155s^{-1} für ¹⁰FNIII, also ein Bereich von drei Größenordnungen, der bei einer ähnlichen Tertiärstruktur überspannt wird [1, 4]. Deswegen und auch um Fehlfaltungen, also Pfadabweichungen, genauer zu verstehen, ist es von Interesse nicht nur eine einfache Barrierenhöhe zu vermessen, sondern auch zu verstehen, wie diese Barriere zustande kommt. Eine mögliche strukturelle Information über die Proteindomäne am Punkt des Barrierenmaximums, dem eigentlichen Übergangszustand wäre ebenfalls wünschenswert. Solche Analysen werden in klassischer Art häufig in Form von Ensemble-Studien unter dem Begriff Φ -Wert Analyse durchgeführt [65]. Im Bereich Einzelmolekülkraftspektroskopie wurden bisher lediglich Analysen des Entfaltungspfads, mit einer variierten Definition der Φ -Wert Analyse durchgeführt [66]. Dazu findet sich in Kapitel 7 eine umfassendere Diskussion.

In diesem Kapitel wird mit einer Mutationsreihe die Faltungskinetik von ddFLN4 untersucht. Dabei wird durch systematische, konservative¹ Mutationen untersucht, welche Aminosäuren die Faltungsbarriere des ddFLN4 Wildtyps am Positivsten beeinflussen. Es wird ein Bild entwickelt, welche Aminosäuren elementar bei der Grundstrukturbildung sind.

¹ Unter konservativen Mutationen versteht man den Austausch von Aminosäuren zu kleineren, kaum strukturstörenden Aminosäuren, also beispielsweise der Austausch eines Valins zu einem Alanin.

6.1 Ein Klammermechanismus zur Ausbildung des Zwischenzustands

Bereits aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass die Domäne ddFLN4 über einen obligatorischen, produktiven Zwischenzustand faltet [4]. Obwohl die Struktur dieses Zwischenzustands nicht direkt bestimmt wurde, deuteten sowohl die Entfaltungslänge als auch die Entfaltungskraftverteilung darauf hin, dass dieser sehr ähnlich, wenn nicht sogar identisch zum mechanischen Entfaltungszwischenzustand ist. Der Faltungszwischenzustand des Wildtyps wird aus den Aminosäuren 43–98 mit einer Faltungsrate $k_{UI}^0(wt) = 56 \text{ s}^{-1}$ gebildet (siehe Abbildungen 1.3 und D.1). Aus dem Zwischenzustand² formt sich anschließend der native Zustand mit einer Rate $k_{IN}^0(wt) = 260 \text{ s}^{-1}$:



Selbst in der Primärstruktur sehr ähnliche Filamindomänen aus dem Konstrukt ddFLN1-5 falten mit einer Rate, die ein bis zwei Größenordnungen niedriger ist als die von ddFLN4.

- Welche Wechselwirkungen lassen die Faltungsbarriere von ddFLN4 entsprechend niedrig werden?
- Könnte man diese Faltungsrate auch noch erhöhen?

Um diese Fragen besser zu verstehen, wurden an den Aminosäuren 43–95 Punktmutationen zu Alaninen durchgeführt. Die punktmutierten Filaminkonstrukte wurden kinetisch mittels der mechanischen Double-Jump Technik (siehe Kapitel 1.2) untersucht. Tabelle 6.1 führt die entsprechenden Aminosäuren und deren Faltungskinetik für den ersten (k_{UI}^0) und den zweiten Faltungsschritt (k_{IN}^0) auf. Im Anhang D Abbildungen D.1 und D.2 sind alle gemessenen Kinetikdaten gezeigt.

Mutation	k_{UI}^0 [s^{-1}]	k_{IN}^0 [s^{-1}]	k_{total}^0 [s^{-1}]	k_{UI}^{norm}	k_{IN}^{norm}
Wildtyp	56	260	46	1	1
F43A	17	163	15	0,29	0,63
V45A	43	284	37	0,77	1,09
I47A	41	288	36	0,72	1,11
V53A	37	274	33	0,65	1,05
Y65A	26	281	46	0,46	1,08
F69A	23	265	21	0,41	1,02
I79A	15	229	14	0,27	0,88
L81A	30	219	27	0,54	0,85
V88A	39	276	34	0,69	1,06
F91A	21	191	19	0,37	0,74
V95A	33	232	29	0,59	0,89

Tabelle 6.1: Faltungsraten für ddFLN4 Mutationen im Bereich 43 – 95.

² Schwaiger *et al.* fanden die Faltungsraten $k_{UI}^0 = 55 \text{ s}^{-1}$ und $k_{IN}^0 = 179 \text{ s}^{-1}$. Die hier extrahierte höhere zweite Faltungsrate, deutet auf einen Barrierenunterschied von $0,37 \text{ k}_B\text{T}$ hin, der sich durch eine weitere entfaltete Opferdomäne erklären lässt. Die freie Diffusion bei der Rückfaltung wird dadurch noch weniger eingeschränkt.

Die Spalten mit der Faltungsrates k_{UI}^0 und deren Normierung auf die Wildtyprate sind hellgrau hinterlegt. Mutationen im Bereich der Aminosäuren 43 – 95 beeinflussen signifikant lediglich die Faltungsrates des Zwischenzustands, während die Faltungsrates des nativen Zustands, also der zweite Faltungsschritt, im Rahmen des Fehlers unbeeinflusst bleibt. Die Mutationen haben somit auf die Faltungsrates einen stark lokalen Einfluss. Abbildung 6.1A stellt die normierten Faltungsrates für die entsprechenden Mutationen dar. Während die normierte Faltungsrates des zweiten Faltungsschritts (blau) meist innerhalb des Fehlerintervalls ($\pm 15\%$) liegt, zeigen die Faltungsrates des ersten Faltungsschritts teilweise einen Einbruch auf bis zu 27% (I79A) der Wildtyprate. Eine Ausnahme für den lokalen Mutationseffekt zeigt sich nur

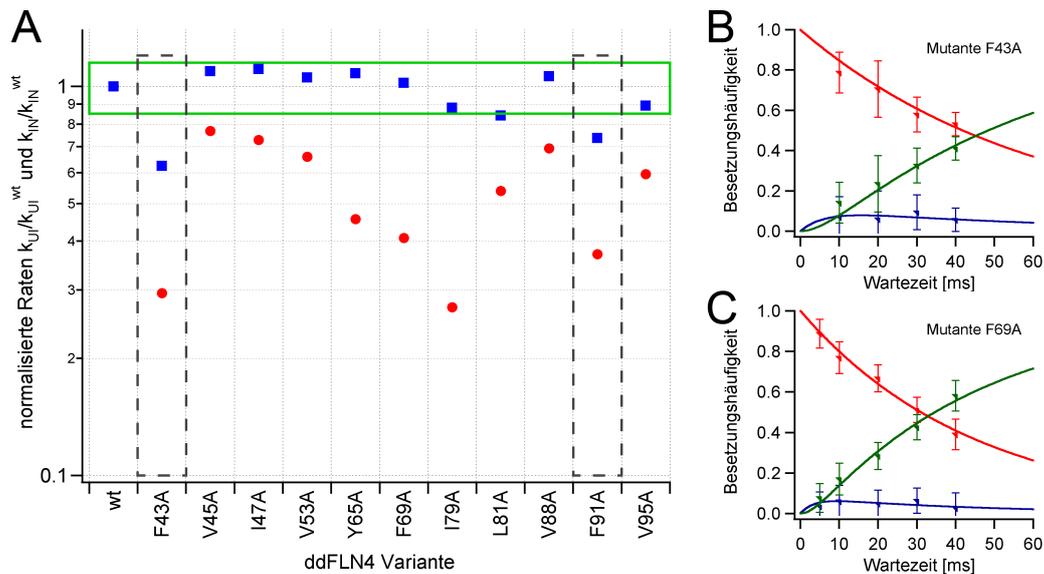


Abbildung 6.1: (A) Normalisierte Faltungskinetik der Punktmutanten für den ersten Faltungsschritt. Zur Normalisierung wurden $k_{UI}^0 = 56 \text{ s}^{-1}$ und $k_{IN}^0 = 260 \text{ s}^{-1}$ verwendet. (B) Faltungskinetik der ddFLN4 Mutation F43A. (C) Faltungskinetik der ddFLN4 Mutation F69A.

bei den Mutationen F43A und F91A (dunkelgrau hinterlegt). Die Tatsache, dass die meisten Mutationen keinen signifikanten Effekt auf die zweite Faltungsrates hatten, deutet daraufhin, dass die gebildete bzw. nicht gebildete Interaktion während des Übergangs von I zu N nicht weiter verändert wird. Beispielhaft für eine Mutation die beide Rates beeinflusst, ist in Abbildung 6.1B die Faltungskinetikdaten der Mutation F43A dargestellt. Die Besetzungshäufigkeit des entfalteten Zustands U (rot), des Zwischenzustands I (blau) und des nativen Zustands N (grün) ist als Funktion der Wartezeit gezeigt. An die Datenpunkte wurden das kinetische Modell aus Kapitel 1.2 angepasst³. Dabei stellte sich bei allen Mutationen das Modell mit dem obligatorischen Faltungszwischenzustand stets als beste Lösung heraus. In Abbildung 6.1C sind die kinetischen Daten für die Mutation F69A gezeigt, die ausschließlich den ersten Faltungsschritt beeinflusst. Bei dieser Mutation sieht man deutlich, dass die reine Population des Zwischenzustands umso geringer ist, je größer die zweite Rate im Vergleich zur ersten ist. Eine stark reduzierte erste Rate ($\leq 20 \text{ s}^{-1}$), aber eine konstant hohe zweite Rate ($\approx 200 \text{ s}^{-1}$), die aus dem Zwischenzustand die native Struktur bildet, erzeugt somit eine sehr niedrige Population

³ Da die Verteilung des Zwischenzustands und des nativen Zustands sowohl von der Rate k_{UI}^0 und der Rate k_{IN}^0 abhängen, wurden stets alle drei Wartezeitverteilungen gleichzeitig angepasst.

des Zwischenzustands ($\leq 10\%$). Aufgrund der hier durchgeführten Einzelmolekülexperimente können diese seltenen Ereignisse aber eindeutig identifiziert werden. An dieser Stelle sei auch auf den Ausblick in Kapitel 8.1 verwiesen.

Die Effekte der Mutationen lassen sich in Form einer Arrhenius-Ratengleichung als Barriereerhöhung oder als Vorfaktor darstellen:

$$k_{UI}^0(mut) = A \cdot \exp\left(\frac{-(\Delta G^\ddagger + \Delta G_{mut}^\ddagger)}{k_B T}\right) = A \cdot M \cdot \exp\left(\frac{-\Delta G^\ddagger}{k_B T}\right), \quad (6.1)$$

mit A als Arrhenius-Präfaktor, ΔG^\ddagger als Wildtyp-Barrierehöhe und $k_B T$ als thermische Energie. Der Mutationsvorfaktor $M = \exp\left(\frac{-\Delta G_{mut}^\ddagger}{k_B T}\right)$ gibt somit die zusätzlich Barriere an, durch die die Faltungsrate verlangsamt wird. Die normalisierten Faltungsraten stellen M direkt zur Verfügung. Eine grobe Abschätzung ergibt, dass mit der mechanischen Double-Jump Methode selbst geringe Barrierenhöhenunterschiede von lediglich $0,16 k_B T$ gemessen werden können⁴. Die vorliegenden Mutationen wurden anhand ihrer normierten Faltungsrate $k_{UI}^{norm} = \frac{k_{UI}^{mut}}{k_{UI}^{wt}} = M$ in zwei Klassen aufgeteilt: ein starker Effekt mit $M = 0,2 - 0,5$ und ein schwächerer Effekt mit $M = 0,5 - 0,8$. Die Mutationen F43A, Y65A, F69A, I79A und V95A erhöhen die Barriere relativ stark und sind somit für Kerninteraktionen zur Ausbildung des Zwischenzustands wichtiger als die Mutationen V45A, I47, V53A, L81A, V88A und V95A, die die zweite schwächere Klasse darstellen. Abbildung 6.2A zeigt in der schematischen Röntgenkristallstruktur die Aminosäuren aus der ersten Klasse in Kugeldarstellung⁵. Die kritischen Aminosäuren liegen meist am Ende von β -Faltblättern und bilden eine Art Klammer. Die Aminosäuren, deren Mutation einen weniger starken Effekt haben, liegen meist in der Mitte von β -Faltblättern und füllen die Klammer auf (Abbildung 6.2B, violett).

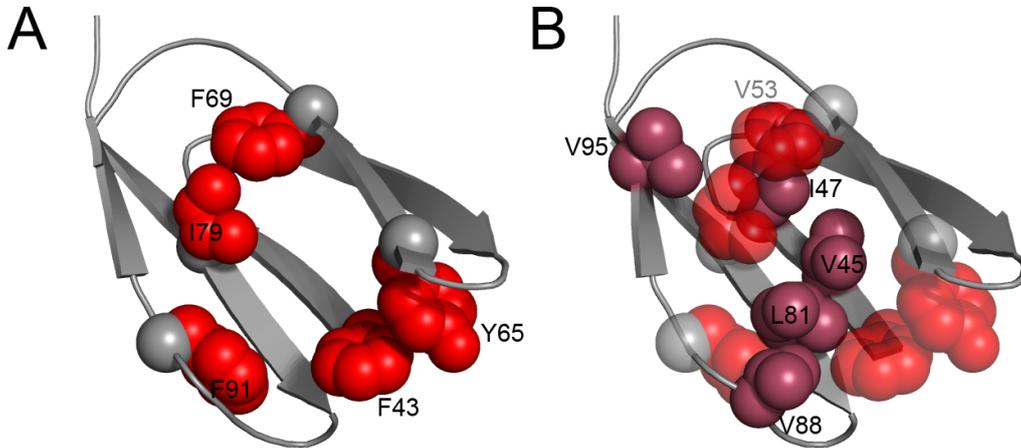


Abbildung 6.2: Mutationen im Faltungszwischenzustand mit **(A)** starken Effekten (Klammerbildung, rot) und **(B)** mittleren Effekten (violett). Zur Orientierung sind die Schlüsselaminosäuren aus (A) transparent dargestellt.

⁴ Die gemessenen normalisierten Faltungsraten liegen $\leq 85\%$ der Wildtyprate. Dafür ergibt sich eine $\Delta G_{mut}^\ddagger \geq 0,16 k_B T$.

⁵ Die hier gezeigte Röntgenkristallstruktur ist lediglich als Schema zu verstehen, da vom Faltungszwischenzustand keine eigene Struktur zur Verfügung steht. Es wurden aus der nativen Faltungsstruktur die β -Faltblätter A und B entfernt.

Eine Angabe von Φ -Werten ist bei Mutationsexperimenten dieser Art nicht möglich, da Grundvoraussetzungen für die Berechnung von Φ -Werten, Mikroreversibilität des Pfades sowie Gleichgewichtsinformationen, fehlen. Die Gleichgewichtsstabilität des Zwischenzustands ist nicht direkt zugänglich⁶, da durch eine mechanische Entfaltung mit hoher Wahrscheinlichkeit ein anderer Übergangszustand relevant ist als im kraftfreien Rückfaltungspfad [67]. Für Lösungsmittelstudien wird die Pfadgleichheit im Allgemeinen angenommen und für einzelne Proteine bis hin zu kleinen Denaturanzkonzentrationen vermessen [68].

Obwohl eine klassische Φ -Wert Analyse aus den gegebenen Argumenten nicht möglich ist, liefern diese Daten einen direkten Hinweis, dass, sofern die Faltungsrates durch eine Mutation beeinflusst ist, diese Aminosäure auch beim Strukturfindungsprozess beteiligt sein muss. Es ergaben sich auch im Laufe dieser Studie Mutationen die keinerlei signifikanten Effekt auf die Faltung des Proteins hatten. Diese werden im folgenden Abschnitt vorgestellt und verleihen der Methode zusätzlichen Rückhalt.

6.2 Einpassen des nativen Zustands

Nach der Bildung des Faltungszwischenzustands lagern sich die verbliebenden β -Faltblätter A und B an. Um zu untersuchen, ob diese ebenfalls ihre Struktur über eine Art Klammer an den Enden der β -Faltblätter finden, wurden ebenfalls Punktmutationen eingeführt. Tabelle 6.2 zeigt eine Zusammenfassung der eingeführten Mutationen und deren Effekte auf die entsprechenden Faltungsrates. Zusätzlich sind die beiden Mutationen aus dem Zwischenzustand gezeigt, die ebenfalls die Rate k_{IN}^0 beeinflussten (dunkelgrau unterlegt). Zunächst fällt auf, dass die eingeführten Mutationen bei den Aminosäuren 6 – 37 keinen signifikanten Effekt auf die Faltungsrates k_{UI}^0 zeigen. Einerseits erscheint diese Beobachtung trivial, da die mutierten Aminosäuren nicht in der Struktur des Zwischenzustands enthalten sind, andererseits sind auch nicht-native Wechselwirkungen, wenn auch schwacher Art, teilweise auf Faltungspfaden zu beobachten [69, 48]. Aus den hier untersuchten Faltungskinetiken der mutierten Aminosäuren ergeben sich keine Anzeichen auf signifikante nicht-native Wechselwirkungen, d.h. falls Barrierenänderungen eingeführt wurden, liegen diese im Bereich $< 0,16$ k_BT.

Mutation	k_{UI}^0 [s ⁻¹]	k_{IN}^0 [s ⁻¹]	k_{total}^0 [s ⁻¹]	k_{UI}^{norm}	k_{IN}^{norm}
Wildtyp	56	260	46	1	1
S6A	61	128	41	1,08	0,49
L13A	60	151	43	1,07	0,58
S22A	51	161	39	0,92	0,62
F24A	50	37	21	0,89	0,14
I26A	59	88	36	1,05	0,34
V34A	56	285	47	1	1,09
T37A	54	291	46	0,96	1,12
F43A	17	163	15	0,29	0,63
F91A	21	191	19	0,37	0,74

Tabelle 6.2: Übersicht der Faltungsrates für Mutationen im Bereich 6 – 37.

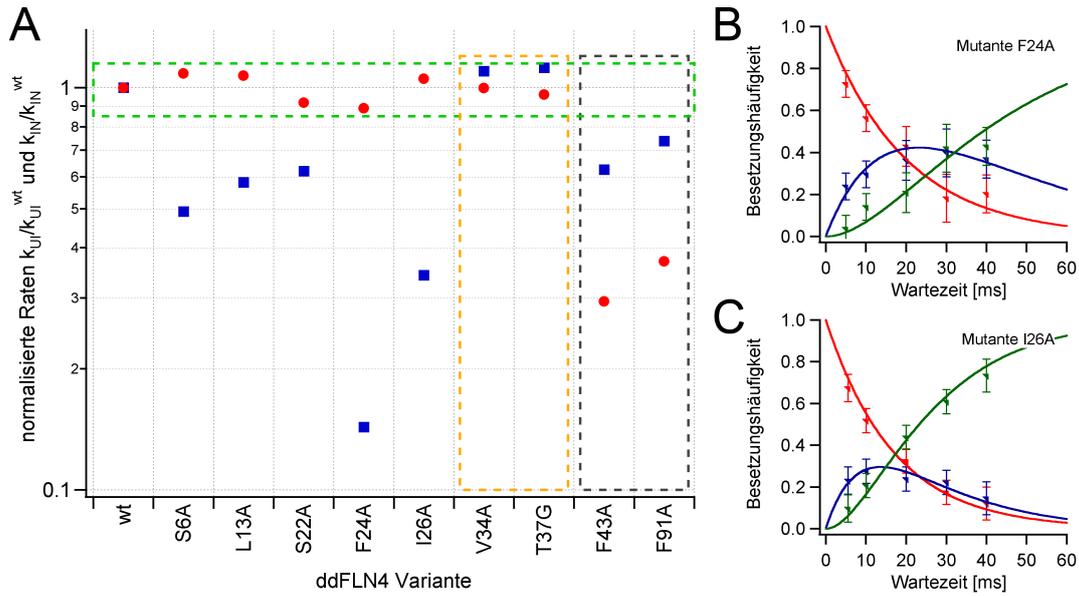


Abbildung 6.3: (A) Normalisierte Faltungskinetik der Punktmutanten für den zweiten Faltungsschritt. Zur Normalisierung wurden $k_{UI}^0 = 56 \text{ s}^{-1}$ und $k_{IN}^0 = 260 \text{ s}^{-1}$ verwendet. (B) Faltungskinetik der ddFLN4 Mutation F24A. (C) Faltungskinetik der ddFLN4 Mutation I26A.

Allerdings konnte die zweite Faltungsrate $k_{IN}^0(\text{mut})$ durch fast alle Mutationen in diesem Bereich deutlich beeinflusst werden, so dass sogar der Faltungsschritt bis auf 14% der ursprünglichen Rate reduziert wurde (siehe Tabelle 6.2, hellgrau hinterlegt und Abbildung 6.3A).

Beispielhaft ist an dieser Stelle die Kinetik für die Mutation F24A und I26A gezeigt (Abb. 6.3B und C). Beide liegen im β -Strang B und zeigten den stärksten Effekt auf die Faltungsrate k_{IN}^0 . Sie stellen somit Schlüsselaminosäuren für den Faltungsschritt vom Zwischenzustand zum nativen Zustand dar. Man erkennt die Akkumulation des Zwischenzustands, der bei F24A sogar bei einer Wartezeit $t_{\text{warte}} \approx 20 \text{ ms}$ ein Maximum der Besetzungshäufigkeit $> 40\%$ aufweist. Die extrahierte Faltungsrate $k_{IN}^0(\text{F24A}) = 37 \text{ s}^{-1}$ liegt unterhalb der ersten Faltungsrate ($k_{UI}^0(\text{F24A}) = 50 \text{ s}^{-1}$). Weitere Mutationen vor und hinter diesen Aminosäuren zeigten teilweise ebenfalls eine Verlangsamung der Faltungsgeschwindigkeit, aber lediglich im Bereich zwischen $M = 0,5 - 0,8$.

Die beiden Mutationen V34A und T37G (Abb. 6.3A, orange Umrahmung) zeigten weder für den ersten noch dem zweiten Faltungsschritt eine signifikante Veränderung, so dass diese Aminosäuren bei keinem der beiden Faltungsschritte Schlüsselinteraktionen ausbilden. Obwohl diese Mutationen keine Veränderung der Faltungsraten bewirkten, zeigen sie nochmals die Zuverlässigkeit des mechanischen Double-Jump Experiments mit Punktmutationen.

In Abbildung 6.4A sind die Schlüsselaminosäuren für den zweiten Faltungsschritt dargestellt. Anders als bei der Bildung des Zwischenzustands bilden diese keine Klammer aus, sondern füllen den hydrophoben Kernbereich des Zwischenzustands aus. Die kritischen Aminosäuren S6, F24 und I26 werden in den aus den β -Faltblättern E und G gebildeten Rahmen eingepasst. Die weniger stark involvierten Aminosäuren stabilisieren vermutlich die Kerninter-

⁶ Auch Gleichgewichtsexperimente in Lösung konnten an dieser Stelle noch keine zuverlässigen Daten liefern (siehe Anhang A).

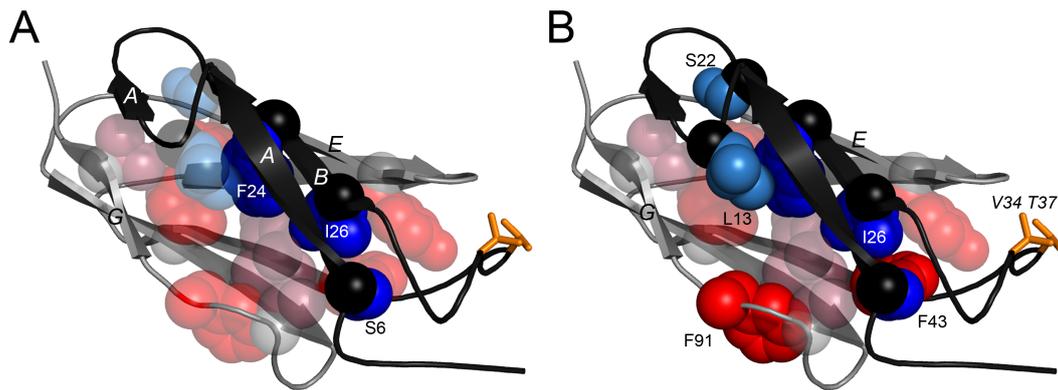


Abbildung 6.4: (A) Schematische Röntgenkristallstruktur zur Bildung des nativen Zustands durch Schlüsselaminosäuren (dunkelblau) und (B) weniger stark involvierte Aminosäuren (hellblau sowie F43 und F91). Zur Orientierung sind die wichtigen Aminosäuren zur Bildung des Zwischenzustands aus dem vorherigen Kapitel transparent dargestellt.

aktionen und liegen meist im Bereich von Loop-Regionen (Abb. 6.4B). Die Aminosäuren F43 und F91 liegen nicht im Aminosäurebereich der β -Stränge A und B und durchbrechen den Eindruck von rein lokalen Effekten auf dem Faltungspfad von ddFLN4 (in Abbildung 6.4B rot hervorgehoben). Für F43 erkennt man deutlich die hydrophobe Berührungsfläche zur Aminosäure I26. Dagegen lässt die Position der Aminosäure F91 in der finalen Röntgenstruktur keine direkte Erklärung des beobachteten Effekts zu. Anders als bisher angenommen, könnten somit durch dieses Experiment durchaus Erkenntnisse über Interaktionen am Übergangszustand gewonnen werden, sofern die Aminosäure F91 beispielsweise am Übergangszustand noch in direktem Kontakt zu den β -Faltblättern A und B stand.

6.3 Additive Effekte bei der Faltungsbarriere

Um Herauszufinden, ob ausgewählte Mutationen voneinander unabhängig agieren, wurden zwei Doppelmутanten erzeugt: I47A mit Y65A (#1) und V53A mit V95A (#2)⁷. Diese liegen ausschließlich im Zwischenzustand und sind als farbiges Paar in Abbildung 6.5A hervorgehoben. Es wurde darauf geachtet, dass für diese Untersuchung keine direkt miteinander wechselwirkenden Aminosäuren genommen wurden, um deren Unabhängigkeit zu testen. Abbildungen 6.5B und C stellen die Faltungskinetik der beiden Paare dar. Die Doppelmутante #1 zeigt eine starke reduzierte erste Faltungsrate $k_{UI}^0(\#1) = 17 \text{ s}^{-1}$ und eine Wildtyp-ähnliche zweite Faltungsrate $k_{IN}^0(\#1) = 290 \text{ s}^{-1}$. Somit ist auch bei einer Doppelmутante der zweite Faltungsschritt vollkommen unabhängig vom ersten Faltungsschritt. Die andere Doppelmутante #2 reduzierte die erste Faltungsrate nur auf $k_{UI}^0(\#2) = 22 \text{ s}^{-1}$ und ließ die zweite Faltungsrate $k_{IN}^0(\#2) = 268 \text{ s}^{-1}$ auch unverändert.

Der M-Wert für den ersten Faltungsschritt der Mutation I47A lag bei $M = 0,72$ und der der Mutation Y65A bei $M = 0,45$. Geht man von einer Unabhängigkeit der Beiträge zur Faltungsbarriere aus, dann müsste die Doppelmутante die Faltungsbarriere um die

⁷ Es wurde auch kinetisch eine Doppeltryptophanmutante untersucht. Diese sollte aber die Faltungsbarriere möglichst unverändert lassen und wird in Anhang A diskutiert.

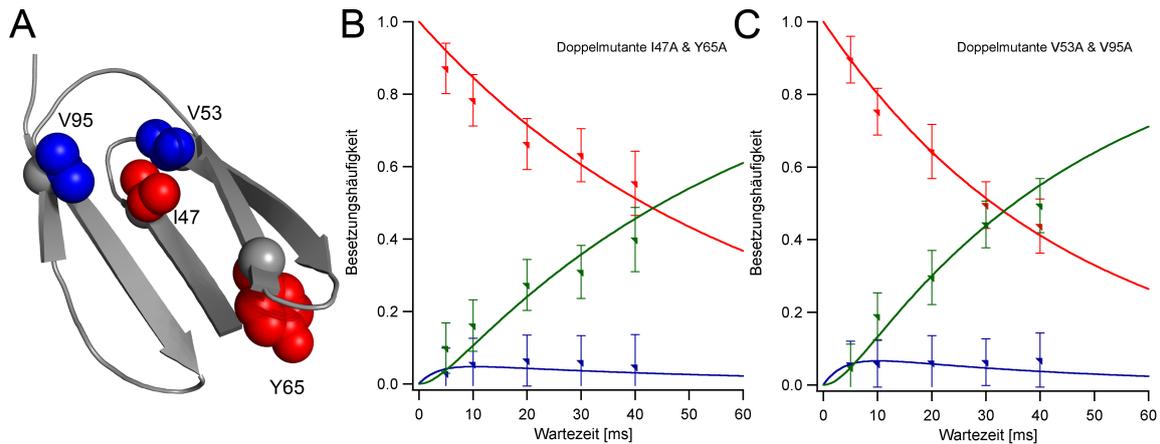


Abbildung 6.5: (A) Schematische Darstellung der Doppelmutanten I47A & Y65A (rot) sowie V53A & V95A (blau). Die β -Stränge A und B wurde der Übersicht halber entfernt. (B) Faltungskinetik der ddFLN4 Mutation I47A & Y65A. (C) Faltungskinetik der ddFLN4 Mutation V53A & V95A.

Einzelbeiträge erhöht haben und somit sich ein $M_{theo.} = 0,73 \cdot 0,45 = 0,32$ ergeben. Die Normalisierung der Doppelmutante auf die Wildtyp-Faltungsrate ergibt einen M-Wert von $M = \frac{17s^{-1}}{56s^{-1}} = 0,30$ und ist im Rahmen des experimentellen Fehlers gleich mit dem erwarteten Wert. Für die Doppelmutation #2 ergibt sich sogar eine noch bessere Übereinstimmung zwischen $M_{theo.} = 0,65 \cdot 0,6 = 0,39$ und $M = \frac{22s^{-1}}{56s^{-1}} = 0,39$.

Die hier gezeigten Mutationen liefern somit unabhängige Beiträge zur Faltungsbarriere. Es gibt sicherlich Doppel- oder Mehrfachmutationen an stark miteinander wechselwirkenden Aminosäuren, die diese Unabhängigkeit nicht mehr zeigen. Bei den restlichen Mutationen kann man von additiven Effekten auf die Faltungsbarriere und somit multiplikativen Effekten für die Faltungsraten ausgehen. Es ist somit theoretisch möglich die Faltungsrate von ddFLN4 in einem gewissen Rahmen *a priori* zu designen.

6.4 Diskussion

In den vorherigen Abschnitten wurden die Effekte von Punktmutationen auf die Faltungsbarrieren untersucht. Obwohl diese Effekte äußerst lokal agieren, d.h. Mutationen im Zwischenzustand lediglich dessen Barriere erhöhen und Mutationen im nativen Zustand auch nur die dort herrschenden Barrieren beeinflussen, ist die Darstellung in Form einer Energielandschaft bereits äußerst komplex. In Abbildung 6.6 sind verschiedene Szenarien für die hier erhaltenen Erkenntnisse in Form von 1-dimensionalen Energiediagrammen skizziert. Geht man vom Wildtyp Faltungspfad (schwarz) aus, dann können Mutationen, die die erste Faltungsbarriere von U nach I verändern, bereits zwei extreme alternative Pfade generieren. Ein mögliches Szenario ist, dass sich sowohl die Faltungsbarriere als auch die Entfaltungsbarriere durch die Mutation erhöhen, d.h. die freie Faltungsenergie des Zwischenzustands I gegenüber der des entfalteten Zustands unverändert bleibt (rot). Eine höhere Entfaltungsbarriere bedeutet in diesem Fall allerdings nicht zwangswise auch eine höhere mechanische Stabilität, da auf dem mechanischen Entfaltungspfad eine andere Entfaltungsbarriere genommen werden kann. Ein solches Szenario könnte beispielsweise mit Lösungsmittelexperimenten getestet werden, sofern auch in diesem Fall gleiche Pfade vorliegen. Alternativ und sogar wahrscheinlicher könnte

die Entfaltungsbarriere durch eine Mutation im Zwischenzustand erhalten bleiben, so dass dieser Zwischenzustand thermodynamisch instabiler erscheint (blau). In beiden Fällen bleibt die folgende Faltungsbarriere vom Zwischenzustand zum nativen Zustand ungestört. Nimmt man an, dass der native Zustand jeweils die selbe freie Energie gegenüber dem Zwischenzustand behält, dann verändert sich im zweiten Szenario die gesamte freie Faltungsenergie des Proteins (N liegt höher im blauen Energiediagramm). Aus mechanischer Sicht wird sich im folgenden Kapitel zeigen, dass Mutationen im Zwischenzustand sowohl die mechanische Entfaltungsbarriere des Zwischenzustands als auch die des nativen Zustands beeinflussen können. Das relativ einfache, unabhängige Barrierenbild, das sich auf Sekundärstrukturelemente beschränkt, ist für die mechanische Entfaltung somit begrenzt gültig. Betrachtet man Mutationen im nativen

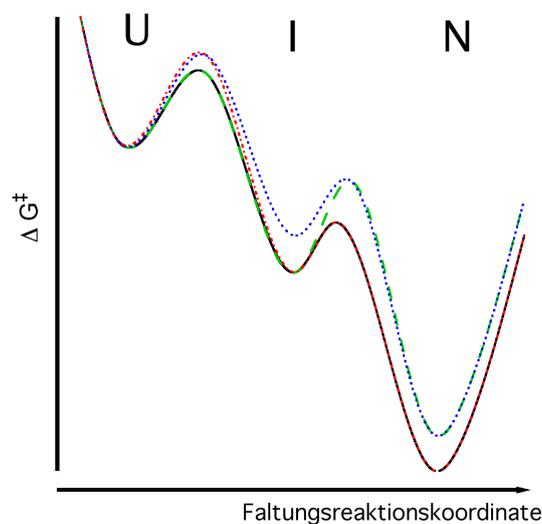


Abbildung 6.6: Energiebarrierenveränderung durch Mutationen

Zustand, die dessen Faltungsrate reduzieren, aber die Entfaltungsbarriere ungestört lassen, dann würde sich das grün skizzierte Energiediagramm ergeben. In diesem Fall wird der native Zustand thermodynamisch instabiler. Auch diese Entfaltungsbarriere kann mittels mechanischer Entfaltungsexperimente nicht ohne weiteres überprüft werden. Das alternative Szenario, dass keine thermodynamische Destabilisierung des nativen Zustands annimmt ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet⁸.

Die Punktmutation F91W wurde ebenfalls mittels mechanischer Double-Jump Experimente untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass diese mit einer deutlich höheren ersten Faltungsrate den Zwischenzustand bildet ($k_{UI}^0(\text{F91W}) = 72 \text{ s}^{-1}$), die zweite Faltungsrate aber im Rahmen der Messgenauigkeit unverändert bleibt ($k_{IN}^0(\text{F91W}) = 290 \text{ s}^{-1}$). In Abbildung 6.7A ist die Faltungskinetik von F91W dargestellt. Die erste Faltungsbarriere ist um $\approx 0,25 \text{ k}_B\text{T}$ gesenkt worden. Das Tryptophan ist hydrophober als das native Phenylalanin und hilft somit die in

⁸ Es gibt in der Literatur nur wenige Beispiele, bei denen die thermodynamische Stabilität durch das Entfernen einer hydrophoben Wechselwirkung ähnlich ist, so dass meist mit dem Erhöhen der Faltungsbarriere der gefaltete Zustand thermodynamisch instabiler wird [70]. In klassischen Φ -Wert Studien muss zwangsweise der Faltungszustand ausreichend stark destabilisiert sein, um überhaupt signifikante Aussagen treffen zu können [71, 72].

Abschnitt 6.1 postulierte Klammer schneller auszubilden⁹. Betrachtet man in diesem Fall die mechanische Stabilität dieser Mutation (Abb. 6.7B), dann zeigt sich, dass der native Zustand deutlich instabiler geworden ist und sogar bei geringeren Kräften als der Zwischenzustand entfaltet. Der Zwischenzustand scheint weitgehend ungestört zu sein. In einem Energielandschaftsbild stellt sich an dieser Stelle wieder die Frage, ob der Zwischenzustand aufgrund dieser Mutation thermodynamisch instabiler wurde. Aus mechanischer Sicht würde sich sowohl die Barriere zum gefalteten Zwischenzustand als auch vom nativen Zustand zum Zwischenzustand absenken (gestrichelte Kurve in Abb. 6.7C). Durch die Mutation F91W wird somit der entfaltete Zustand, sowie der gefaltete Zustand destabilisiert. Ensemble Faltungsstudien in Lösung ergaben (siehe Anhang A), dass die Mutation ebenfalls eine erhöhte Faltungsrate hat und thermodynamisch instabiler erscheint. Somit entspricht das gestrichelte Energielandschaftsszenario beiden Ergebnissen, bis auf die Tatsache, dass der Faltungszwischenzustand bei den in Anhang A beschriebenen Lösungsmittelstudien für F91W nicht beobachtet wurde. Dieses Beispiel zeigt trotz der wahrscheinlich unterschiedlichen Pfade eine gewisse Übereinstimmung zwischen mechanischer Stabilität und chemischer Denaturanz Stabilität.

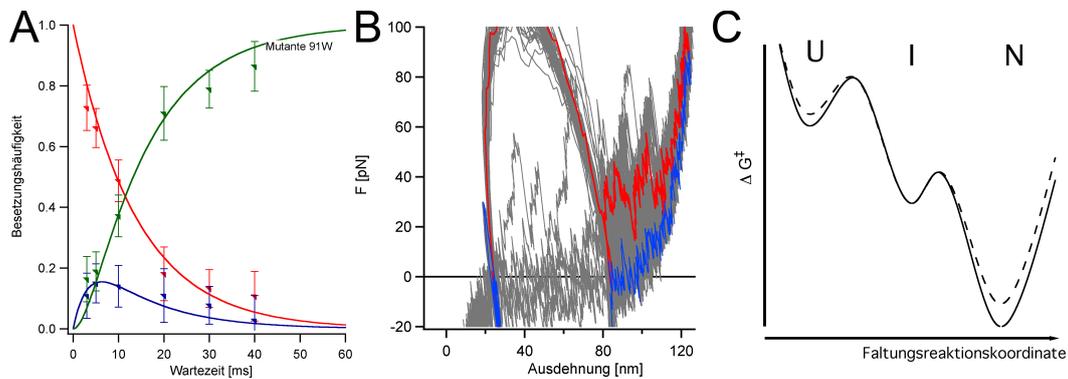


Abbildung 6.7: (A) Faltungskinetik von F91W. (B) Entfaltungskräfte von F91W. (C) Energielandschaft F91W (gestrichelt) im Vergleich zum Wildtyp (durchgezogen).

Obwohl in den hier durchgeführten mechanischen Faltungsstudien keine Übergangszustandsstrukturen untersucht wurden, sondern nur Beiträge zur kraftfreien Faltungsbarriere, sollen an dieser Stelle die gewonnenen Erkenntnisse vergleichend zu ausgiebigen Φ -Wert Analyse für die ebenfalls Immunoglobulin-ähnlichen Domänen I27 (I91) aus humanem Titin und TNfn3, die dritte Fibronectin Typ III Domäne aus humanem Tenascin diskutiert werden [73, 74]. Beide Domänen falten mittels eines kompakten Kerns im Übergangszustand, der bei I27 rund um Tryptophan 34 liegt. Bei TNfn3 ist dieser Kern zwar weniger kompakt, die Hauptinteraktionen finden aber zwischen in der Tertiärstruktur gleich angeordneten Aminosäuren statt. Titin I27 zeigt zudem noch bei niedrigen Denaturanzkonzentrationen einen Faltungszwischenzustand. Dieser formt sich aus den Aminosäuren 23, 25, 58, 60, 71 und 73 um das Tryptophan 34. Anders als bei der Domäne ddFLN4 ist die Struktur des Zwischenzustands nicht eine Art Trog, der anschließend noch die restlichen beiden β -Stränge aufnimmt. Der Zwischenzustand von I27 bildet sich aus dem Faltungskern der Aminosäuren I23, W34, L58 und F73 sowie den umliegenden

⁹ Das Maß an Hydrophobizität kann nach unterschiedlichen Skalen angegeben werden. Je nach Skala zählt Isoleucin (Kyte & Doolittle, 1982), Phenylalanin (Hessa *et al.*, 2005) oder Tryptophan (Wimley & White, 1996) als hydrophobste Aminosäure.

den Aminosäuren der β -Stränge BCEF (siehe rot und blau gekennzeichnete Aminosäuren in Abbildung 6.8A). Die Aminosäuren 13, 15, 63, 67, 84 und 86 sind nicht am Zwischenzustand beteiligt und lagern sich in einem zweiten Faltungsschritt an (grün in Abb. 6.8A). Die Domäne TNfn3 hat einen weitgehend vergleichbaren Faltungspfad wie I27, obwohl diese evolutionär weit entfernt ist [74]. Die kritischen Aminosäuren in der Bildung des Übergangszustands bei TNfn3 sind andere als bei I27, liegen aber an ähnlichen Stellen der Tertiärstruktur. Ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Domänen ist die Kompaktheit des Faltungskerns, die bei I27 höher ist.

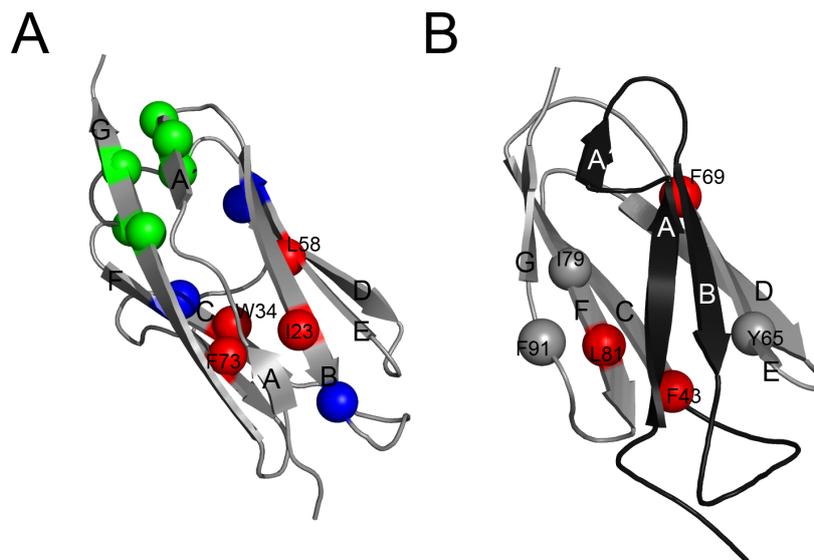


Abbildung 6.8: (A) Schlüsselaminosäuren bei der Faltung von I27. (B) Vergleichbare Aminosäuren bei der Faltung von ddFLN4.

Für ddFLN4 ist es nicht möglich aufgrund der mechanischen Studien Aussagen über die Kompaktheit eines Faltungskerns zu extrahieren. Bei einem strukturellen Vergleich zeigt ddFLN4 lediglich an drei Stellen der Tertiärstruktur ähnlich wichtige Aminosäuren: F43 \doteq W34, L81 \doteq F73 und F69 \doteq L58/L60 (kursiv entspricht den Aminosäuren aus I27, siehe auch Abb. 6.8B). Für die I27 Aminosäure 23 kann kein Äquivalent gefunden werden, da der β -Strang B bei ddFLN4 nicht an der Formation des Zwischenzustands beteiligt ist.

Es treten somit ähnliche kritische Aminosäurepositionen in der Tertiärstruktur auf. Grundsätzlich kann man aber festhalten, dass der Faltungsmechanismus der Ig-ähnlichen Domäne ddFLN4 auch aufgrund des deutlich stabileren Zwischenzustands, mit den hier gefundenen Erkenntnissen anders als bei I27 ist.

6.5 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass Mutationen einzelner Aminosäuren die Faltungsbarrieren von ddFLN4 äußerst lokal beeinflussen. Es wurde aufgrund der gefundenen Schlüsselaminosäuren ein Mechanismus einer Klammerbildung zur Strukturfindung für den Zwischenzustand vorgeschlagen. Der native Zustand wird durch eine Art Einpassen der Schlüsselaminosäuren bildet. Es konnte ferner gezeigt werden, dass einzelne Mutationen unabhängig voneinander

die Faltungsbarriere beeinflussen können. Obwohl ähnliche Schlüsselaminosäuren wie bei I27 erkennbar sind, zeigt ddFLN4 einen grundlegend anderen Faltungspfad.

Kapitel 7

Die mechanische Entfaltungsbarriere

In mechanischen Entfaltungsstudien zu zahlreichen Proteinen wurden unterschiedlichste mechanische Stabilitäten gefunden. Mechanische Entfaltungsexperimente an E2lip3, Ubiquitin (siehe auch Kapitel 5) oder GFP zeigten beispielsweise eine deutliche Anisotropie in ihrer mechanischen Stabilität [17, 23, 75]. Die mechanische GFP Anisotropie konnte mit einem elastischen Netzwerkmodell, das lediglich die Faltungsstruktur, nicht aber die genaue Aminosäurezusammensetzung berücksichtigt, erklärt werden [76]. Es wäre wünschenswert, detailliertere Aussagen über die Zusammensetzung der mechanischen Entfaltungsbarriere und des mechanischen Entfaltungsübergangszustands treffen zu können.

- Bestimmt lediglich die Faltungsstruktur die mechanische Stabilität oder auch die genaue Wechselwirkung einzelner Aminosäuren?
- Haben Mutationen in der Struktur einen ähnlich lokalen Effekt auf die Entfaltungskinetik wie auf die Faltungskinetik?
- Welche Aminosäuren tragen zur mechanischen Stabilität bzw. dem mechanischen Übergangszustand bei?

Mit Hilfe der Double-Jump Experimente der Punktmutanten von ddFLN4 lassen sich nicht nur Effekte der Mutationen auf den Faltungspfad extrahieren, sondern auch Informationen über den mechanischen Entfaltungspfad gewinnen. Aufgrund der gut kontrollierten Kraftladungsbedingungen¹ konnten die Entfaltungskraftverteilungen mit einem semi-analytischen Bell-Modell angepasst werden [77, 18]. Eine Herleitung der Entfaltungswahrscheinlichkeitsdichte $\frac{dP_U}{dF}(F)$ ist in Anhang F.3 zu finden:

$$\frac{dP_U(F)}{dF} = \frac{k_u^0}{\dot{F}} \cdot \exp\left(\frac{F\Delta x}{k_B T}\right) \cdot \exp\left(-\int_0^F \frac{k_u^0}{\dot{F}'} \cdot \exp\left(\frac{F'\Delta x}{k_B T}\right) dF'\right), \quad (7.1)$$

mit \dot{F} der Kraftladungsrate, die für jede Entfaltungskraft F aus der Ziehgeschwindigkeit und Polypeptidelastizität berechnet werden kann [77], k_u^0 der kraftfreien Entfaltungsrate, Δx dem Übergangszustandsabstand und $k_B T$ der thermischen Energie. Obwohl in früheren Studien gezeigt wurde, dass das Bell-Modell nicht geeignet ist, um die Energielandschaft von ddFLN4 detailliert über einen großen Kraftladungsbereich konsistent zu beschreiben, können dennoch

¹ Die Entfaltungskurven liegen jeweils auf einem ähnlichen Spacer mit geringer Konturlängenschwankung zwischen den verschiedenen Molekülen [14, 45].

mittels dieses Modells für einen spezifischen Kraftladungsbereich vergleichende Untersuchungen durchgeführt werden [45]. Bei einer Analyse dieser Art geht die gemessene absolute Entfaltungskraft direkt in die Entfaltungsrates ein, so dass eine sichere Krafteichung unabdingbar ist². Es zeigten sich zwischen Experimenten mit Blattfedern aus einer Charge stets Schwankungen in den Federkonstanten. Diese konnten entsprechend Anhang F.5 reduziert werden, so dass vergleichende Aussagen getroffen werden konnten. Die Entfaltungskräfte für diese Analyse wurden mit der Maximumsmethode entsprechend Anhang F.5 bestimmt.

7.1 Nicht-lokale Wechselwirkungen bei der Entfaltung des nativen Zustands von ddFLN4

Im Gegensatz zum Faltungspfad wird in Entfaltungsexperimenten zunächst aus dem nativen Zustand N der Zwischenzustand I und schließlich der entfaltete Zustand U populiert. Aus diesem Grund wird in diesem Kapitel zunächst die Entfaltung des nativen Zustands und der Effekt der entsprechenden Mutanten darauf untersucht. Für die Entfaltungskraftverteilungen wurden je Punktmutante in etwa 50 – 200 Entfaltungsereignisse verwendet. Nach Anpassen der Gleichung 7.1 konnten die Potentialbreite Δx und die zugehörige extrapolierte kraftfreie Entfaltungsrates k_{NI}^0 gewonnen werden. Entsprechende Entfaltungskraftverteilungen sind beispielhaft in Abbildung 7.1A dargestellt. Vergleicht man die Entfaltungskraftverteilung der Mutanten S6A und Y65A mit der des Wildtyps, dann erkennt man, dass die Entfaltungskraftverteilung des nativen Zustands bei deutlich niedrigeren Kräften liegt. Bereits an typischen Double-Jump Kraft-Ausdehnungskurven einzelner Moleküle der mutierten Domäne ddFLN4 im Vergleich zum Wildtyp (Abbildungen 7.1 B-D) lassen sich Destabilisierungen deutlich erkennen. Die Mutante Y65A beispielsweise liegt im β -Strang E und somit nicht in dem sich zunächst entfaltenden Bereich. Dennoch sieht man, dass der Wegfall der nicht-lokalen Wechselwirkung³ zwischen Y65 und der β -Faltblätter A und B deren mechanische Stabilität stark mindert. Die Übergangszustandsposition Δx dieser Mutante ist ähnlich der des Wildtyps. Dieses Bild zeichnet sich für fast alle Mutationen ab (siehe Abbildung 7.1E, linke Achse). Die extrapolierte Entfaltungsrates k_{NI}^0 zeigt dagegen bei einigen Punktmutanten eine starke Abweichung zum Wildtyp. Für die Mutante Y65A ist diese etwa einen Faktor zwölf größer als die des Wildtyps. Die Aminosäure Y65A ist somit mit einer Schlüsselinteraktion an der Bildung der mechanischen Entfaltungsbarriere beteiligt. Als Fehler für die Entfaltungsrates wurde jeweils ein Faktor drei angenommen (blaue gestrichelte Linien), während die Position des Übergangszustands genauer bestimmt werden konnte und in einem Fehlerintervall $\pm 10\%$ (rote gestrichelte Linien) dargestellt ist. Eine deutliche Veränderung des Übergangszustandsabstands tritt nur bei der Mutation V95A auf. Bei dieser Mutation erhöht sich der Abstand sogar um einen Faktor 1,5, was sich in einer äußerst schmalen Entfaltungskraftverteilung und einer größeren Kraftempfindlichkeit bemerkbar macht. Die extrapolierte Entfaltungsrates deutet auf eine Stabilisierung hin⁴.

Die beiden Aminosäuren, die die Entfaltungsbarriere des nativen Zustands am stärksten

² Die Übergangszustandsposition Δx hängt von der Breite der Entfaltungskraftverteilung ab.

³ Die Definition nicht-lokal bezieht sich in diesem Fall auf den großen Abstand in der Primärsequenz und nicht in der Tertiärstruktur.

⁴ Die Ursache dieser "Scheindestabilisierung" liegt daran, dass das Bell-Modell zur Bestimmung absoluter Entfaltungsrates ungeeignet ist.

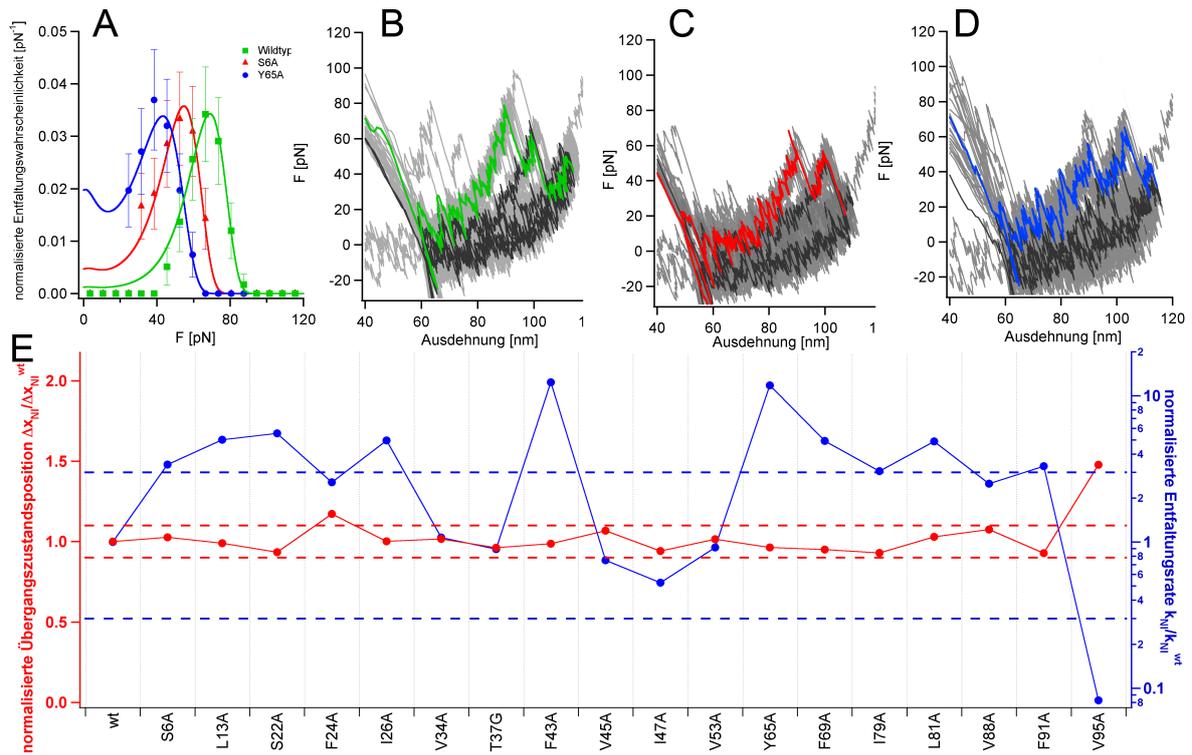


Abbildung 7.1: Entfaltungskinetik ddFLN4 Varianten. **(A)** Entfaltungskraftverteilung des ddFLN4 Wildtyps (grün), der Punktmutante S6A (rot) und der Punktmutante Y65A (blau) mit angepasster theoretischer Verteilung nach Gl. 7.1 (durchgezogene Linien). **(B)** Double-Jump Kurve des ddFLN4 Wildtyps. Das typische Entfaltungsmuster zeigt einen Entfaltungsspeak des nativen Zustands zwischen 60 und 80 pN und einen des Zwischenzustands zwischen 40 und 60 pN. **(C)** Typische Double-Jump Kurve der ddFLN4 S6A Mutante. Der native Zustand entfaltet bei ähnlichen Kräften wie der Zwischenzustand. **(D)** Typische Double-Jump Kurve der ddFLN4 Y65A Mutante. Fehlende nicht-lokale Wechselwirkungen destabilisieren den nativen Zustand, so dass dieser sogar bei geringeren Kräften als der Zwischenzustand entfaltet. **(E)** Zusammenfassung der Übergangszustandsposition Δx_{NI} und der extrapolierten Entfaltungsrates k_{NI}^0 normalisiert auf die des Wildtyps: $\Delta x_{NI}(wt) = 4,5 \text{ \AA}$ und $k_{NI}^0(wt) = 0,29 \text{ s}^{-1}$.

senken, liegen bemerkenswerterweise nicht in den β -Faltblättern A und B, sondern an den Stellen F43 und Y65. Dennoch finden sich, wie an der Mutation S6A gezeigt, auch einige Aminosäuren in der eigentlich sich entfaltenden Struktur.

Mutationsexperimente zur mechanischen Destabilisierung von Proteindomänen wurden bisher nur an wenigen Proteinen, wie beispielsweise der Immunoglobulindomäne I27 aus humanem Titin und der Tenascindomäne TNfn3, durchgeführt [66, 78, 79]. Li *et al.* fanden beispielsweise, dass die mechanische Stabilität von Titin I27 durch nicht-konservative Mutationen⁵ von Valin zu Prolin oder Tyrosin zu Prolin stark verändert werden kann. Während die meisten strukturbrechenden Mutationen zu einer geringeren Entfaltungskraft führten, zeigte die I27 Mutation Y9P sogar eine höhere Entfaltungskraft. Durch eine solch starke strukturstörende Mutation können somit nicht nur Interaktionen genommen werden, sondern auch neue, stabilisierende Interaktionen erzeugt werden.

⁵ Prolin ist eine Aminosäure, die sowohl α -Helix als auch β -Strang brechend wirkt, und somit die Struktur stark stört. Aus diesem Grund gelten Mutationen dieser Art als nicht-konservativ.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Mutationen sind eher konservativer Art, wie sie auch von Best *et al.* und Ng *et al.* an den Proteinen Titin I27 und Tenascin TNfn3 verwendet wurden [66, 79]. Beide Studien präsentierten allerdings lediglich wenige Punktmutationen und eine Interpretation in Form von Φ -Werten. Die Berechnung von Φ -Werten basiert normalerweise auf der Annahme von Mikroreversibilität des Faltungs- und Entfaltungspfads an jeder Stelle [2]. Best *et al.* definierten den mechanischen Φ -Wert wie folgt:

$$\Phi = 1 + k_B T \ln(k_u^0(wt)/k_u^0(mut))/\Delta\Delta G_{UN}, \quad (7.2)$$

wobei der Parameter $\Delta\Delta G_{UN}$ über Ensemble-Gleichgewichtsstudien im Lösungsmittel ermittelt wurde und für die Bestimmung der Entfaltungsraten k_u^0 die Übergangszustandsposition Δx konstant angenommen wurde. Die letzte Annahme ist nötig, wenn man Aussagen über den Übergangszustand an sich mittels Mutationen machen möchte, da dieser natürlich durch die Mutation nur wenig verändert werden sollte. Dennoch ist die Erweiterung der Φ -Wertanalyse wie von Best *et al.* vorgeschlagen kritisch zu betrachten, da im Allgemeinen zwei verschiedene Pfade bei der Analyse gemischt werden: der mechanische Entfaltungspfad und der kraftfreie Faltungspfad. Gerade die Unterschiede in dieser Studie – also die lokalen Mutationseffekte auf dem kraftfreien Faltungspfad im Gegensatz zu den nicht-lokalen Effekten bei der Entfaltung, sowie den Erkenntnissen aus der Faltung unter äußerer Kraft – zeigen, dass eine Interpretation der Mutationsdaten in Form von Φ -Werten äußerst fragwürdig ist.

Deswegen soll an dieser Stelle eine alternative Interpretation vorgeschlagen werden. Die meisten Mutationsdaten veränderten die extrahierte Übergangszustandsposition kaum, so dass diese als äußerst ähnlich angenommen wird. Außerdem wird angenommen, dass die Mutation die Gesamtstruktur der Domäne ddFLN4 ebenfalls nicht wesentlich störte, da die Konturlängenzuwächse vom nativen Zustand zum Zwischenzustand und vom Zwischenzustand zum entfalteten Zustand im Rahmen des Fehlers identisch waren. Als wesentliche Änderung durch die Mutation ergibt sich aufgrund der mutationsabhängigen Entfaltungsrates k_{NI}^0 eine veränderte Barrierenhöhe (vgl. Gl. 1.2). Würde eine Aminosäure nicht zur Entfaltungsbarriere beitragen, dann würde eine Mutation dieser Aminosäure ebenfalls keine Veränderung in der Entfaltungsrates ergeben, wie für die Aminosäuren V34 und T37, sowie V45, V53 und zu einem gewissen Grad auch I47 gezeigt wurde. Somit wird an dieser Stelle vorgeschlagen die Interpretation der Mutationsdaten in vier Klassen vorzunehmen:

- I. kein Effekt
- II. schwacher Effekt
- III. starker Effekt
- IV. Übergangszustand verändernder Effekt

In Tabelle 7.1 sind alle extrahierten Parameter zusammengefasst. In der letzten Spalte sind die entsprechenden Klasseneinteilungen vermerkt. Die extrahierten Parameter und Klasseninformationen lassen sich am Besten beim Betrachten der Tertiärstruktur verstehen. In Abbildung 7.2A und B sind farblich kodiert die Schlüsselaminosäuren für die mechanische Stabilisierung dargestellt. Aminosäuren mit dem stärksten Einfluss (Klasse III) sind in blau und schwächere in hellblau (Klasse II) markiert. Die Aminosäure V95 ist rot eingefärbt, da diese hauptsächlich den Übergangszustandsabstand vergrößerte (Klasse IV), die mittlere Entfaltungskraft dabei

Mutation	Δx_{NI} [Å]	k_{NI}^0 [s ⁻¹]	Δx_{NI}^{norm}	k_{NI}^{norm}	Klasse
Wildtyp	4,5	0,29	1	1	-
S6A	4,7	1,01	1,0	3,4	II
L13A	4,5	1,50	1,0	5,0	III
S22A	4,3	1,65	0,9	5,5	III
F24A	5,4	0,77	1,2	2,6	II
I26A	4,6	1,49	1,0	5,0	III
V34A	4,6	0,32	1,0	1,1	I
T37A	4,4	0,27	1,0	0,9	I
F43A	4,5	3,71	1,0	12	III
V45A	4,9	0,22	1,1	0,8	I
I47A	4,3	0,16	0,9	0,5	I
V53A	4,6	0,27	1,0	0,9	I
Y65A	4,4	3,52	1,0	12	III
F69A	4,3	1,47	0,9	4,9	III
I79A	4,2	0,91	0,9	3,1	II
L81A	4,7	1,46	1,0	4,9	II
V88A	4,9	0,75	1,1	2,5	II
F91A	4,2	0,99	0,9	3,3	II
V95A	6,7	0,03	1,5	0,1	IV

Tabelle 7.1: Entfaltungskinetik des nativen Zustands für die ddFLN4 Punktmutanten

aber wenig veränderte. Die Aminosäuren aus den β -Strängen C-G sind trotz ihrer Schlüssel-funktion leicht transparent dargestellt, da diese bei der Entfaltung des nativen Zustands selbst noch strukturiert bleiben.

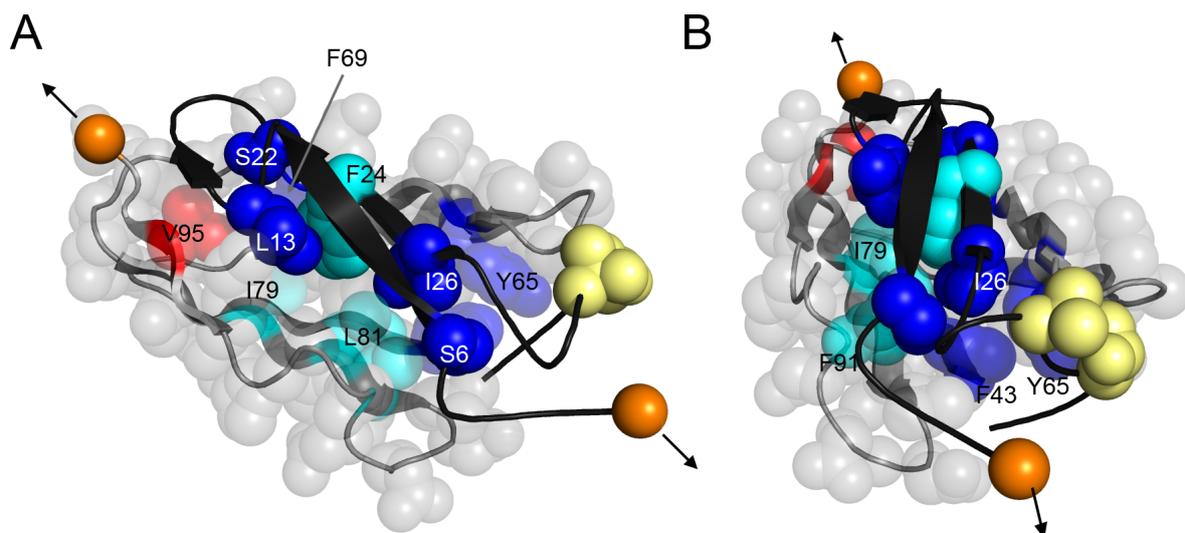


Abbildung 7.2: Schlüsselaminosäuren bei der Entfaltung des nativen Zustands. Für eine genaue Beschreibung siehe Text.

In der nativen Struktur sitzen die β -Faltblätter A und B scheinbar wie in einer Tasche, die durch den Zwischenzustand gebildet wird. Legt man an die beiden Termini (orange Kugeln in Abb. 7.2) eine äußere Kraft an, dann könnten beispielsweise die beiden β -Stränge A und B entlang der Kraftachse aus dem gefalteten Zustand herausrutschen. Dieses Bild wird durch die beiden Aminosäuren F43 und Y65 gestärkt, da diese das Rutschen aus sterischen Gründen behindern würden. Deutlicher wird dieses Bild auch durch Abbildung 7.2B. Dort zeigt sich, dass I26 direkt mit Y65 wechselwirkt und bei einem Herausrutschen “über” die Aminosäure F43 gleiten müsste. Nimmt man die relativ sperrige hydrophobe Seitengruppe von F43 weg, dann fällt die mechanische Entfaltungskraft und damit die Entfaltungsbarriere. Der Loop zwischen den β -Strängen A und B scheint mechanisch über die Aminosäuren S22 und F69 stabilisiert zu werden. Generell zeigen sich hydrophobe Wechselwirkungen bei der mechanischen Stabilisierung des nativen Zustands von ddFLN4 als äußerst wichtig. Bereits die Veränderung einzelner Aminosäuren wie F69, F43 oder I26 zu Alanin, also weniger Hydrophobizität, erniedrigen die mechanische Barriere deutlich. Dies steht im Gegensatz bzw. als Erweiterung zu den bisherigen Annahmen in mechanischen Proteinentfaltungstudien von Immunoglobulindomänen. Deren hohe mechanische Stabilität wurde stets auf wenige Wasserstoffbrückenbindungen reduziert, die entweder geschert oder entzippt wurden⁶ [17, 12, 81].

7.2 Entfaltungsbarriere des Zwischenzustands

In diesem Abschnitt soll untersucht werden, welche Aminosäuren maßgeblich bei der mechanischen Entfaltungsbarriere für den Zwischenzustand beteiligt sind. Nach der Entfaltung des nativen Zustands, setzt sich der mechanisch stabile Entfaltungszwischenzustand aus den β -Stränge C-G zusammen. In Abbildung 7.3 sind sowohl der normalisierte Abstand des Übergangszustands als auch die normalisierte Entfaltungsrate in Abhängigkeit der Punktmutation dargestellt. Intuitiv vermutet man, dass somit Mutationen, die im Bereich der β -Faltblätter A und B vorliegen, keinen Einfluss mehr auf die Entfaltungskinetik zeigen sollten. Entsprechend der Vermutung zeigt sich, dass die Mutationen bis zur Aminosäure T37 sowohl die Entfaltungsrate k_{IU}^0 als auch der Abstand des Übergangszustands Δx unverändert lassen und lediglich im Rahmen des experimentellen Fehlers schwanken. Ähnlich wie beim nativen Zustand wird die Übergangszustandsposition generell wenig durch die Mutationen beeinflusst. Der hauptsächliche Effekt von Mutationen zeigt sich bei der extrapolierten kraftfreien Entfaltungsrate, also der Barrierenhöhe (rechte Achse in Abbildung 7.3). Die Aminosäure F43 agierte bereits bei der Entfaltung des nativen Zustands als Schlüsselaminosäure und scheint auch bei der Stabilisierung des Zwischenzustands wichtig zu sein. Entsprechend zum nativen Zustand soll auch bei dieser Analyse eine Klasseneinteilung stattfinden (siehe Seite 58). Diese ist mit den Entfaltungsraten und Übergangszustandspositionen in Tabelle 7.2 zusammengefasst. In Abbildung 7.4 sind die entsprechenden Schlüsselaminosäuren farblich anhand der Klassen eingezeichnet. An dieser Stelle sei nochmals darauf hingewiesen, dass die gezeigte Struktur keine wahre Kristallstruktur des Zwischenzustands darstellt, sondern, dass lediglich die ersten 40 Aminosäuren der Gesamtstruktur entfernt wurden.

⁶ Bei einem Entzippvorgang wird die Wasserstoffbrücke entlang ihrer Wechselwirkungsachse belastet, wohingegen bei einer Scherung die Kraft zunächst orthogonal wirkt. Damit die Wasserstoffbrücke ihre Struktur verliert, ist bei einer Scherung im Vergleich zu einem Entzippvorgang eine höhere Kraft nötig [80].

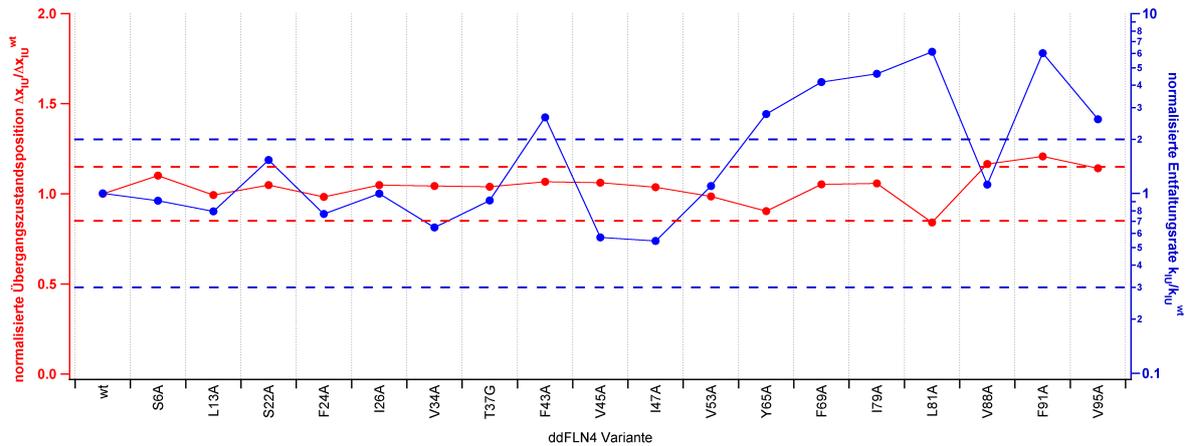


Abbildung 7.3: Entfaltungsbarrierenposition und -rate des Zwischenzustands der ddFLN4 Varianten normalisiert auf den Wildtyp: $\Delta x_{IU}(wt) = 5,3 \text{ \AA}$ und $k_{IU}^0(wt) = 0,35 \text{ s}^{-1}$.

Mutation	Δx_{IU} [Å]	k_{IU}^0 [s ⁻¹]	Δx_{IU}^{norm}	k_{IU}^{norm}	Klasse
Wildtyp	5,3	0,35	1	1	-
S6A	5,9	0,32	1,1	0,9	I
L13A	5,3	0,28	1,0	0,8	I
S22A	5,6	0,53	1,0	1,5	I
F24A	5,3	0,26	1,0	0,8	I
I26A	5,6	0,35	1,0	1,0	I
V34A	5,6	0,23	1,0	0,6	I
T37A	5,6	0,32	1,0	0,9	I
F43A	5,7	0,92	1,1	2,7	II
V45A	5,7	0,20	1,1	0,6	I
I47A	5,5	0,19	1,0	0,5	I
V53A	5,3	0,38	1,0	1,1	I
Y65A	4,8	0,96	0,9	2,8	II
F69A	5,6	1,45	1,1	4,2	III
I79A	5,6	1,61	1,1	4,6	III
L81A	4,5	2,13	0,8	6,1	III
V88A	6,2	0,39	1,2	1,1	I
F91A	6,5	2,10	1,2	6,0	III
V95A	6,1	0,90	1,1	2,5	II

Tabelle 7.2: Übersicht der Entfaltungskinetik des Zwischenzustands für die ddFLN4 Punktmutanten

Es ist somit durchaus möglich bzw. sehr wahrscheinlich, dass die eigentliche Struktur kompakter ist, da der offene hydrophobe Kern energetisch und entropisch von Nachteil wäre. Die N-terminale Stabilisierung der Domäne scheint über die Aminosäuren F43 und Y65 gegeben zu sein. Diese stehen bereits in der noch unkompaktierten Teilstruktur (siehe Abb. 7.4A) in Kontakt. Es ist deswegen wahrscheinlich, dass diese bei einer Kompaktierung den N-Terminus stabilisieren. Im D-Strang wurde keine Mutation gefunden, die die mechanische Stabilität beeinflusst. Dagegen weist der F-Strang die beiden stark hydrophobe Aminosäure I79 und L81

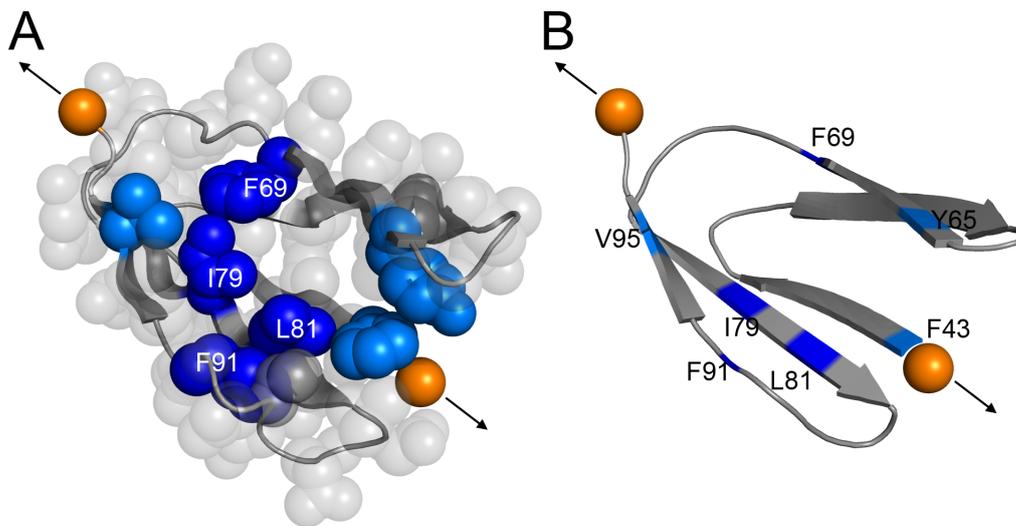


Abbildung 7.4: Schlüsselaminosäuren bei der Entfaltung des Zwischenzustands

auf. Deren Substituierung durch Alanine führt zu einer deutlichen Reduktion der Entfaltungsbarriere. Beide Aminosäuren bilden einen Teil des hydrophoben Kerns der durch die Entfaltung der β -Stränge A und B freigelegt wurde. Eine Kompaktierung könnte bspw. ein Zusammenklappen zu einer globuläreren Struktur bedeuten, so dass sich die Aminosäuren F91 und V95 ebenfalls in den hydrophoben Kern orientieren. Die kritischen Aminosäuren bei der mechanischen Entfaltungsbarriere des Zwischenzustands würde somit einen stark hydrophoben Kern bilden.

Obwohl viele der hier gezeigten Schlüsselaminosäuren, gerade bei der Entfaltung des Zwischenzustands, ebenfalls Schlüsselaminosäuren auf dessen Faltungspfad sind und eine Φ -Wert Analyse verlockend wirkt, soll diese aus den bereits genannten Argumenten an dieser Stelle nicht versucht werden. Der mechanische Entfaltungspfad findet entlang der kraftgewählten Reaktionskoordinate statt. Bei der kraftfreien Faltung hingegen kann die Polypeptidkette relativ frei diffundieren und nimmt mit hoher Wahrscheinlichkeit einen anderen Pfad. Über die Pfadwahl finden sich auch in Anhang A Daten. Selbst bei Rückfaltungsexperimenten unter äußerer Kraft an ddFLN4 (siehe Kapitel 4) ergab sich, dass zwar die äußere Kraft eine zusätzliche mechanische Barriere erzeugt, aber nach der Überwindung dieser Barriere der anschließende Faltungsvorgang einen ähnlichen Pfad wie im absolut kraftfreien Raum nimmt.

Die hier gewonnenen Daten helfen somit die Entfaltungsbarriere zu verstehen, können aber keine Übergangszustandsstruktur angeben. Aus mechanischen Entfaltungsexperimenten an GFP konnte mit hoher Genauigkeit der strukturelle Abstand einzelner Aminosäuren ausgemessen werden [11]. Obwohl einzelne Entfaltungsereignisse sogar bei sehr hohen Kräften stattfanden, stimmten die bestimmten Abstände mit der Röntgenkristallstruktur sehr gut überein, so dass in diesem Fall keine deutliche strukturelle Veränderung vor der Entfaltung beobachtet wurde. Nimmt man an, dass für ddFLN4 ähnliches gilt, dann sind die entscheidenden Aminosäuren bei der Barrierenausbildung höchstwahrscheinlich ebenfalls am Übergangszustand beteiligt.

7.3 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden die Effekte von lokalen Punktmutationen auf die mechanische Stabilität der Domäne ddFLN4 vorgestellt. Anders als für den Faltungspfad zeigten sich gerade bei der Entfaltung des nativen Zustands nicht-lokale Effekte. Dies bedeutet, dass auch einzelne Punktmutationen im Zwischenzustand die Entfaltungsbarriere des nativen Zustands beeinflusst haben. Betrachtet man die kritischen Aminosäuren in der dreidimensionalen Kristallstruktur, dann kann diese Art der Barrierenbeeinflussung mit einem anschaulichen Bild von sterischen und hydrophoben Argumenten erklärt werden. Es wurde deutlich, dass zur mechanischen Stabilisierung der Immunoglobulin-ähnlichen Domäne ddFLN4 nicht nur Wasserstoffbrückenbindungen notwendig sind, sondern zu einem großen Anteil hydrophobe Wechselwirkungen. Einzelne Mutationen, wie beispielsweise F43A oder Y65A, destabilisieren den nativen Zustand um je $2,5 k_B T$, also ca. 12% der gesamten extrapolierten Entfaltungsbarriere. Die gefaltete Tertiärstruktur der Mutanten ist allerdings aufgrund der vergleichbaren Konturlängenzuwächse ähnlich zu der des Wildtyps.

Kapitel 8

Ausblick

In diesem Abschnitt werden mehrere mögliche Experimente vorgeschlagen, die sich aufgrund der in dieser Dissertation gewonnenen Erkenntnisse – zu Faltungszwischenzuständen, Faltungsbarrieren und Faltungskinetik unter äußerer Kraft – anbieten. Des Weiteren wird vorgeschlagen die hier entwickelte Lock-in Technik zur Vermessung von Polymereigenschaften zu verwenden.

8.1 Produktive kurzlebige Faltungszwischenzustände

Bereits in Kapitel 6 wurde deutlich, dass mittels Einzelmolekültechniken auch Populationen von Faltungszwischenzuständen $\leq 10\%$ eindeutig detektiert werden können. In Lösungsmittelstudien können aufgrund der Mittelung über viele Moleküle geringe Populationen, zumal wenn diese auch noch eine kleine Signalamplitude besitzen, leicht übersehen werden (vgl. Anhang A). In der Literatur finden sich viele Proteine aus Lösungsmittelstudien als Zweizustandsfalter beschrieben [55]. Sind in diesen Experimenten Faltungszwischenzustände nicht detektiert worden? Kann die Kraftspektroskopie an Einzelmolekülen dabei helfen Faltungszwischenzustände zu entdecken?

Thermodynamisch stabile Zwischenzustände

Im ersten Abschnitt dieses Kapitels sollen zunächst thermodynamisch stabile Zwischenzustände untersucht werden. Abbildung 8.1A zeigt ein Gedankenexperiment für die Faltung eines Proteins mit einem Zwischenzustand. Dabei ist die Faltungsrate in diesen mit $k_{UI}^0 = 5 \text{ s}^{-1}$ und zum nativen Zustand mit $k_{IN}^0 = 200 \text{ s}^{-1}$ angenommen. Erst in der Vergrößerung kann man erkennen, dass der Faltungszwischenzustand bei $t \approx 20 \text{ ms}$ seine maximale Besetzungshäufigkeit mit ca. 2% besitzt. Dies würde wiederum bedeuten, dass in einem mechanischen Double-Jump Experiment mit 50 Zyklen, der Faltungszwischenzustand im Durchschnitt nur einmal auftritt. Die Stärke des Einzelmolekülexperiments liegt darin, diese seltenen Ereignisse zuverlässig zu detektieren. In Lösungsmittelexperimenten, sofern dieser Schritt nicht einen Großteil der Fluoreszenzamplitude enthält, wird der Faltungszwischenzustand wahrscheinlich nicht detektiert. Dennoch würde dieses Protein über einen Faltungszwischenzustand falten. In der Literatur findet sich beispielsweise das Protein Fyn SH3, das zunächst als Zweizustandsfalter beschrieben wurde. Erst kürzlich durchgeführte NMR Experimente, die die geringe Populationen des obligatorischen Faltungszwischenzustands messen konnten, zeigten, dass dieses Protein als Dreizustandsfalter zu seiner nativen Struktur findet [82].

Nimmt man an, dass voneinander unabhängig entweder die zweite Faltungsrate verlangsamt oder die erste beschleunigt werden könnte, dann ließe sich die Population des Zwischenzustands einfacher “detektierbar” machen. In Abbildung 8.1B ist eine theoretische Faltungskinetik mit unverändertem $k_{UI}^0 = 5 \text{ s}^{-1}$ und verlangsamteten $k_{IN}^0 = 20 \text{ s}^{-1}$ dargestellt. Eine Punktmutation mit einer derart starken Reduktion der zweiten Faltungsrate ist selten, konnte aber bei ddFLN4 mit der Mutation F24A beobachtet werden. Bei diesem Faltungsratenverhältnis wäre der Zwischenzustand bei $t \approx 100 \text{ ms}$ zu ca. 15% besetzt und könnte somit in Einzelmolekülexperimenten leicht beobachtet werden. Alternativ könnte der erste Faltungsschritt beschleunigt werden. Ein solches kinetisches Schema ist in Abbildung 8.1C für $k_{UI}^0 = 25 \text{ s}^{-1}$ und $k_{IN}^0 = 200 \text{ s}^{-1}$ gezeigt. In diesem Fall wäre die Dreizustandskinetik eindeutig, wie anhand ddFLN4 gezeigt, in Einzelmolekülexperimenten identifizierbar. Bei beiden Ansätzen galt als Voraussetzung, dass eine Punktmutation den Faltungspfad nicht grundsätzlich verändert, sondern lediglich das Barrierenhöhenverhältnis verschiebt.

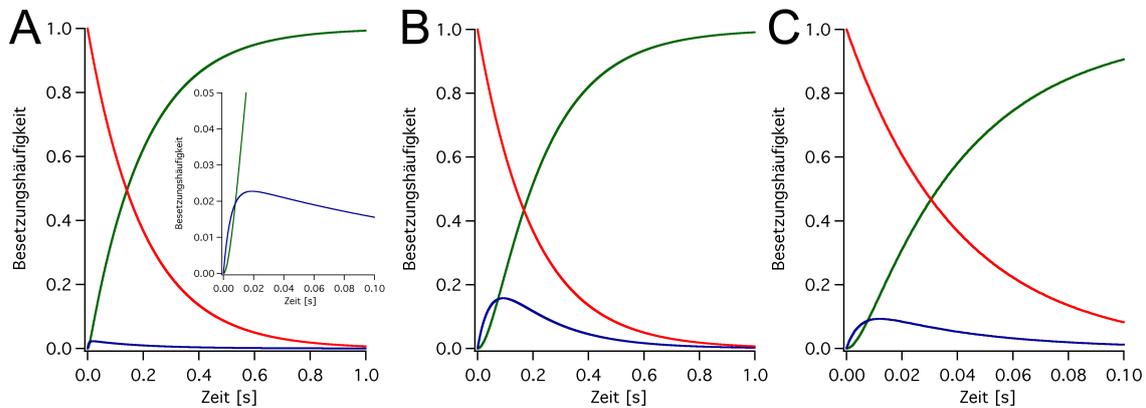


Abbildung 8.1: Theoretische Faltungskinetik für einen obligatorischen Faltungszwischenzustand mit **(A)** $k_{UI}^0 = 5 \text{ s}^{-1}$, $k_{IN}^0 = 200 \text{ s}^{-1}$ **(B)** $k_{UI}^0 = 5 \text{ s}^{-1}$, $k_{IN}^0 = 20 \text{ s}^{-1}$ und **(C)** $k_{UI}^0 = 25 \text{ s}^{-1}$, $k_{IN}^0 = 200 \text{ s}^{-1}$.

Für die Filamin Domänen ddFLN1-3 und 5 ist bekannt, dass diese mit einer Faltungsrate von ein bis zwei Größenordnungen langsamer als ddFLN4 falten. Entfernt man aus dem ddFLN1-5 Konstrukt die Domäne ddFLN4, dann kann in Kraft-Ausdehnungskurven der für ddFLN4 bekannte Entfaltungszwischenzustand nicht mehr beobachtet werden. Rückfaltungsexperimente an diesem Konstrukt mittels der Double-Jump Technik liefern eine erste Abschätzung der Faltungsrate in der Größenordnung $3 - 5 \text{ s}^{-1}$ für alle verbleibenden Domänen zusammen. Ein Faltungszwischenzustand konnte nicht beobachtet werden. Abbildung 8.2A zeigt ein Sequenzalignment zwischen Domäne ddFLN3 und Domäne ddFLN4. Bisher existiert noch keine Röntgenkristallstruktur der Domäne ddFLN3, aber aufgrund der bekannten Entfaltungskonturlänge sowie der Struktur der Domäne ddFLN5, wird im Folgenden davon ausgegangen, dass ddFLN3 auch eine Immunoglobulin-ähnliche β -Sandwich Struktur besitzt.

Obwohl es durch verschiedene Mutationen einfacher ist die Faltungsrate eines Proteins zu verlangsamen (vgl. Kapitel 6), sollte für diese Untersuchung am Einzelmolekülkraftspektrometer ein anderer Ansatz gewählt werden. Dies begründet sich durch die in Abbildung 8.1B skizzierte Kinetik. In diesem Fall ist der zweite Faltungsschritt zwar verlangsamt worden, allerdings läge die gesamte Faltungszeit noch in einem Bereich der bisher durch mechanische

auch theoretisch der bei einem solchen hochenergetischen Faltungszwischenzustand auftretende zweite Faltungsschritt ebenfalls verlangsamt werden. Hierzu werden an dieser Stelle Experimente mit großen Oszillationsamplituden, wie in Kapitel 4.2, vorgeschlagen. Durch die geeignete Wahl von Oszillationsamplitude und Frequenz, sowie mit der Annahme, dass der hochenergetische Faltungszwischenzustand eine mechanisch stabile Struktur ausbildet, könnten mit Experimenten dieser Art gezielt Zwischenzustände eingefroren werden. Abbildung 8.3B skizziert eine mögliche Störung einer Energielandschaft durch äußere, oszillatorische Kraft, die somit eine beobachtbare Population des Zwischenzustands erzeugt. Dabei wird durch die Oszillationen das Protein in eine Art Quasi-Gleichgewicht gebracht, d.h. alle Zustände können populierte werden (vgl. Anhang C).

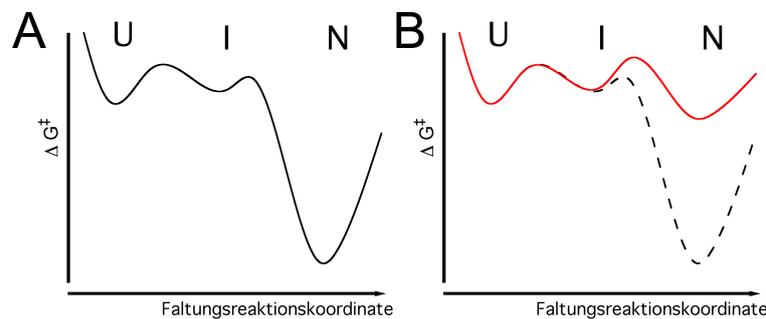


Abbildung 8.3: (A) Metastabiler Faltungszwischenzustand (B) Durch Kraftoszillationen entsteht eine verzerrte Energielandschaft die eine Art Quasi-Gleichgewicht schafft.

Foldons

Foldons sind sich unabhängig ausbildende Untereinheiten aus Sekundärstrukturelementen auf dem Faltungspfad von Proteinen [83]. Für das Protein Ubiquitin wurde in Fragmentfaltungsstudien gefunden, dass ohne die Aminosäuren 1 – 35, Ubiquitin keine Struktur findet [56, 61]. Zerella *et al.* fanden, dass die Aminosäuren 1 – 17 selbst bereits eine Struktur ausbilden [84]. Bolton *et al.* erkannten, dass die Aminosäuren 1 – 51 eine sehr native Struktur in Lösung annehmen [85]. Wie bereits erwähnt, wirkt bei klassischen Ensemble Faltungsstudien das Denaturierungsmittel stets auf alle Aminosäuren. Mit dem hier entwickelten Ansatz zur Studie der Rückfaltung unter Kraft, können im Gegensatz zu Ensemble Experimenten, lokale Denaturierungsbedingungen geschaffen werden (siehe Kapitel 5). Die äußere Kraft wirkt beispielsweise nur auf die Aminosäuren zwischen Position 1 und 16, so dass die verbleibenden Aminosäuren im kraftfreien Raum bereits eigene Unterstrukturen (Foldons) bilden können. Dies würde unter Umständen eine unterschiedliche extrapolierte Nullkraft-Faltungsrate ergeben. Bei den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimenten an den Ubiquitinkonstrukten $\text{Ubi}_{1,76}$, $\text{Ubi}_{1,35}$ und $\text{Ubi}_{1,16}$ wurden übereinstimmende extrapolierte Faltungsraten gefunden. Es werden an dieser Stelle weitere Experimente, beispielsweise an den Konstrukten $\text{Ubi}_{51,76}$ oder $\text{Ubi}_{60,76}$ vorgeschlagen. Bei diesen Verlinkungsrichtungen sind die Aminosäuren 1 bis 51 bzw. 60 ohne äußere Kraft und könnten somit bereits Foldons ausbilden, die die extrapolierte kraftfreie Faltungsrate verändern würden. Durch gezielte Verlinkungsrichtungsstudien können somit für die native Struktur essentielle Aminosäuren, sowie für den Faltungspfad wichtige Foldons, identifiziert werden.

8.2 Gute und schlechte Lösungsmittel

Sowohl in Kapitel 4 als auch Kapitel 5 wurde untersucht, ob bei der Relaxation eines unstrukturierten Polypeptids deutliche Abweichungen von einer rein entropischen Elastizität beobachtet werden können. Für den Fall von ddFLN4 und von Ubiquitin konnte dies nicht bis zu Kräften von 1,7 pN festgestellt werden. Eine Abweichung könnte Hinweise geben, ob beispielsweise ein hydrophober Kollaps, der die Polypeptidkette stärker als eine Gaußsche Kette kompaktiert, vor dem eigentlichen Faltungsprozess notwendig ist. Hierzu wurden in der Gruppe von Prof. Fernandez Experimente durchgeführt, die über Rückfaltung unter konstanter Kraft in verschiedenen Lösungsmitteln (Puffer, Alkohol) diesen hydrophoben Kollaps untersuchten [57].

Ein hydrophober Kollaps ist somit auch ein Zeichen eines schlechten Lösungsmittels für das entsprechende Polypeptid. Mit der hier eingeführten Lock-in Meßmethode wurde die Grundlage geschaffen, Polymer-/Polypeptidelastizität mittels Einzelmolekülkraftspektroskopie hochauflösend auszumessen. Um einen hydrophoben Kollaps zu untersuchen könnte man mittels Lock-in Kraft-Ausdehnungskurven das elastische Verhalten von Poly-Alaninketten bzw. Poly-Leucinketten sowohl in Alkohol als auch in Wasser vermessen. Als Referenz wären Experimente an hydrophilen Poly-Lysinketten denkbar.

8.3 Aktive Materialien

In diesem Abschnitt sollen Experimente für neue aktive Materialien vorgestellt werden. Kapitel 5.2: *Aktive Faltungskraft nach Wunsch* stellte Experimente an Ubiquitin vor, die zeigten, dass durch die geschickte Wahl von Verlinkungsrichtungen Proteine unterschiedlich hohe aktive Faltungskräfte ausüben können. Dabei fand die Denaturierung stets mit einer äußeren Kraft statt. In diesem Beispiel soll die Denaturierung auf chemischer Basis stattfinden. Abbildung 8.4 skizziert ein Gedankenexperiment für aktive Materialien. Man geht von zwei Oberflächen aus, die ihrerseits mit dem Protein X in der entsprechenden Verlinkungsrichtung verbunden sind und durch eine geringe Kraft auseinander gehalten werden.

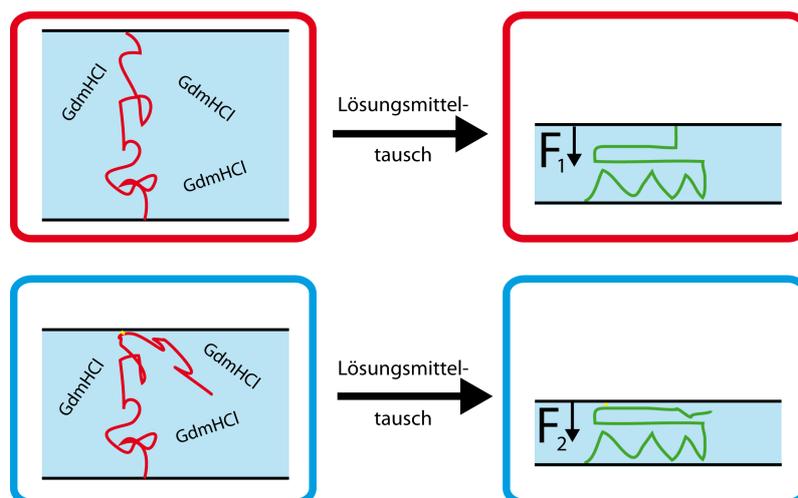


Abbildung 8.4: Aktive Materialien

Im ersten Fall (rot) ist das Protein beispielsweise mit dem N- und C-Terminus kovalent an

die beiden Oberflächen angebonden. Im zweiten Fall (blau) ist das Protein in einer verkürzten Form zwischen beiden Oberflächen angebracht. Zwischen beiden Oberflächen befindet sich ein Lösungsmittel, das getauscht werden kann. Enthält das Lösungsmittel eine Denaturanz (bspw. Guanidiniumhydrochlorid, GdmHCl) ist das Protein entfaltet. Unter geringer Kraft (Druck, hydrodynamische Reibung), die die beiden Oberflächen auseinander hält, liegt das Protein in einer gestreckten Konformation vor. Nach einem Lösungsmitteltausch zu renaturierenden Bedingungen wird das Protein die native Konformation annehmen. Dieser Zustand ist deutlich kompakter als der unter äußerer Kraft leicht gestreckte Zustand, so dass die beiden Oberflächen mit einer gewissen Kraft F_1 bzw. F_2 je nach Verlinkungsrichtung zusammengezogen werden. Durch eine geeignete Wahl der Verlinkungsrichtung und des Proteins (k_f^0 ist ein kritischer Parameter) können Piconewton-genaue aktive Kontraktionskräfte bis zu ≈ 18 pN (vgl. Kapitel 3) erzeugt werden. Durch eine Parallelisierung lassen sich durchaus noch höhere Kräfte erzeugen. Eine größere Längenänderung kann beispielsweise durch eine Serienschaltung der einzelnen Proteine erzeugt werden.

Ein mögliches Anwendungsgebiet dieses Gedankenexperiments wäre in der Proteinnanotechnologie als lösungsmittelabhängiger Schalter. Des Weiteren ist ein Einsatz in einer Art selbstorganisierenden Nanostrukturierung denkbar.

8.4 Konformationskinetik unter Kraft

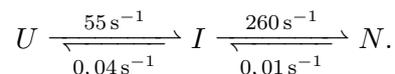
Viele Enzyme in der Natur führen Konformationsänderungen während ihres katalytischen Zyklus aus. Dabei findet beispielsweise auch eine Längenänderung entlang einer bestimmten Achse statt. Der katalytische Zyklus dieser Enzyme ist häufig so schnell, dass eine genaue Beobachtung nicht möglich ist. Zur Studien von molekularen Motoren verwendet man schon seit einigen Jahren eine äußere Kraft, um deren chemo-mechanischen Zyklus zu verlangsamen. Zusammen mit dem in Kapitel 3 vorgeschlagenen Modell kann man auch über eine Anwendung für andere Enzyme nachdenken. Bei einer Enzymkonformationsänderung findet zwar kein Faltungsprozess statt, dennoch verändert sich die Ausdehnung entlang einer betrachteten Achse. Zusammen mit dem hier entwickelten Modell der kraftabhängigen Kinetik bei einer Längenänderung unter äußerer Kraft könnte der ansonsten sehr schnelle chemo-mechanische Zyklus verlangsamt und im Einzelmolekülexperiment beobachtet werden. Für Experimente dieser Art ist höchstwahrscheinlich die Kraftauflösung und -stabilität eines Kraftspektrometers nicht hoch genug, so dass auf Experimente mit optischen Pinzetten zurückgegriffen werden muss.

Nicht nur Enzyme führen Konformationsänderungen aus. Viele Strukturen auf Basis von DNA oder RNA führen häufige Reorganisationen durch. Diese können unter Umständen auch auf Zeitskalen stattfinden, die mit bisherigen Methoden nicht zugänglich sind. Mittels einer äußeren Kraft können diese Konformationsänderungen verlangsamt werden. Das hier entwickelte Modell hilft bei der Planung sowie der Auswertung der kinetischen Informationen. Kürzlich wurde bereits die Dynamik einer *Holliday-Junction* durch äußere Kraft gezielt verlangsamt, so dass einzelne Übergänge und somit die Energielandschaft mittels FRET beobachtbar waren [86].

Anhang A

Ensemble-Faltungsstudien an ddFLN4

In einem Kollaborationprojekt mit der Arbeitsgruppe von Dr. Jane Clarke (Chemistry Department, Cambridge University, UK) sollte der Faltungs- und Entfaltungspfad von ddFLN4 in Lösung untersucht werden. Aus den bisherigen Einzelmolekülexperimenten war bekannt, dass ddFLN4 über einen mechanisch stabilen Zwischenzustand entfaltet [13]. Des Weiteren wurde ein obligatorischer Faltungszwischenzustand gefunden, so dass sich das kinetische Schema für ddFLN4 wie folgt darstellen lässt [4]:



A.1 Mechanische Double-Jump Experimente an verschiedenen ddFLN4 Tryptophan-Varianten

Ziel der Lösungsmittelexperimente war, das aus Einzelmolekülkraftspektroskopiedaten erzeugte kinetische Schema zu überprüfen. In Lösungsmittelstudien beobachtet man die Veränderung der Fluoreszenz des Proteins als Funktion der Denaturanzkonzentration. Entfaltet ein Protein, dann verändert sich häufig die Umgebung der fluoreszierenden Aminosäuren, so dass sich ein deutliches Signal ergeben sollte. Typischerweise verfolgt man die Fluoreszenz der Aminosäure Tryptophan, angeregt bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ bei $\lambda_{obs} = 345 \text{ nm}$ ¹. Da ddFLN4 kein natives Tryptophan enthält, war es nötig durch Punktmutationen an geeigneten Stellen Tryptophane einzubauen. Als mögliche Mutationen ergaben sich: F24W, V43W², V44W, F91W und K93W sowie die Doppelmutation F24W-K93W. Diese Mutanten wurden mittels mechanischer Double-Jump Experimente charakterisiert (siehe Anhang D, Abbildung D.4). Alle Mutationen zeigten den obligatorischen Faltungszwischenzustand; die extrahierten Raten sind in Tabelle A.1 zusammengefasst. Es zeigte sich sogar, dass die Mutation F91W die erste Faltungsrate deutlich von 55 s^{-1} auf 70 s^{-1} erhöhte. Weiterhin wurde mit Einzelmolekülexperimenten überprüft, ob unter veränderten Lösungsmittelbedingungen, d.h. mit dem Denaturanz Guanidiniumhydrochlorid (GdmHCl), der Faltungszwischenzustand noch beobachtet werden kann. Dazu wurden Messungen bei 0 M, 0,25 M, 0,5 M und 1 M GdmHCl in PBS durchgeführt. Eine Messung

¹ In Double-Jump Experimenten verwendet man meist einen Langpassfilter, um das Signal-zu-Rauschverhältnis zu verbessern. Man beobachtet die Fluoreszenzveränderung ab $\lambda = 305 \text{ nm}$ aufwärts.

² Diese Punktmutation wurde nur im Einzelmolekülexperiment charakterisiert.

Mutation	k_{UI}^0 [s ⁻¹]	k_{IN}^0 [s ⁻¹]	k_{total}^0 [s ⁻¹]
Wildtyp	56	260	46
F24W	58	184	44
V43W	56	295	49
V44W	58	208	45
F91W	72	297	58
K93W	50	174	39
F24W-K93W	40	221	34

Tabelle A.1: Faltungskinetik der ddFLN4 Tryptophan-Varianten

bei höheren Denaturanzkonzentrationen führt entweder zu sehr viel unspezifischen Adhäsionsereignissen bzw. zu stark erhöhtem optischen Drift. Wie erwartet verlangsamte sich die Faltungskinetik von ddFLN4 deutlich unter leicht denaturierenden Bedingungen. Der Faltungszwischenzustand war eindeutig beobachtbar. Die entsprechenden Kinetiken sind in Anhang D in Abbildung D.5 dargestellt und in Tabelle A.2 zusammengefasst. Die extrahierten Faltungsraten stimmen gut mit den beobachteten Raten der Lösungsmittelexperimente überein (vgl. Abb. A.1).

GdmHCl	k_{UI}^0 [s ⁻¹]	k_{IN}^0 [s ⁻¹]	k_{total}^0 [s ⁻¹]
0 M	56	260	46
0, 25 M	49	184	38
0, 5 M	27	78	20
1 M	20	47	14

Tabelle A.2: Faltungskinetik des ddFLN4 Wildtyps mit Guanidiniumhydrochlorid

A.2 Chemischer Faltungs- und Entfaltungspfad

Die Lösungsmittelstudien wurden in Jane Clarkes Labor von Sarah Batey durchgeführt. Dazu wurden sowohl Gleichgewichtsübergänge als auch Chevron-Plots der Punktmutanten erzeugt³. Abbildung A.1A zeigt zusammenfassend in einem Chevron-Plot die Mutationen F24W, V44W, F91W, K93W sowie F24W-K93W. Die typische V-Form setzt sich aus einem Faltungsast (links) und dem Entfaltungsast (rechts) zusammen. Am Schnittpunkt beider Äste, das Minimum dieser V-Form, sind Entfaltungsrate = Faltungsrate und man kann Informationen über die Stabilität des Proteins gewinnen. Die Mutationen V44W und K93W sind demnach die biochemisch stabilsten, während beispielsweise die Mutation F91W bereits bei einer GdmHCl Konzentration $c_m(\text{F91W}) = 2 \text{ M}$ ein Minimum zeigt. Die Krümmung des Entfaltungsasts ist ein Zeichen für einen Entfaltungszwischenzustand unter höheren GdmHCl Konzentrationen. Es gilt eine andere beobachtete Entfaltungsrate bei hohen GdmHCl Konzentrationen als bei niedrigeren. Extrapoliert man den Entfaltungsast zu denaturanzfreien Bedingungen unter der Annahme die Steigung verändert sich nicht mehr, dann kann die natürliche Entfaltungsrate extrahiert werden. Auf dem Faltungsast konnte bei allen Mutationen keine Krümmung beob-

³ Ein Chevron-Plot ist eine Zusammenfassung der jeweils beobachteten Rate k_{obs} bei einer entsprechenden GdmHCl Konzentration.

achtet werden. Dies lässt allerdings nicht den Schluss zu, dass kein Faltungszwischenzustand existiert, sondern lediglich dieser nicht deutlich sichtbar die effektiv beobachtete Faltungsrate beeinflusst.

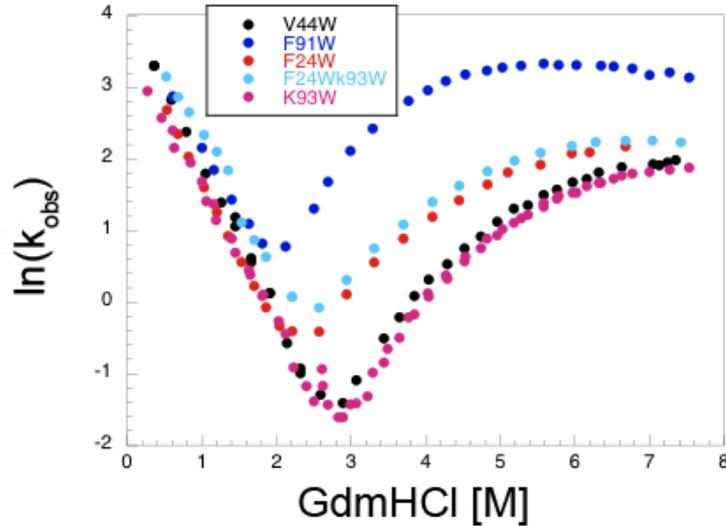


Abbildung A.1: Chevron-Plot der ddFLN4 Tryptophan Varianten

Zusammen mit dem Entfaltungszwischenzustand entsteht ein Modell mit einem metastabilen hochenergetischen Zwischenzustand auf dem Faltungs- und Entfaltungspfad von ddFLN4 unter Denaturanzbedingungen. Für die Mutationen V44W und K93W sind die extrahierten Raten aus den Lösungsmittelexperimenten in Tabelle A.3 zusammengefasst.

	V44W	K93W
$k_1 = k_f$ [s ⁻¹]	$56 \pm 3,5$	$32 \pm 2,4$
m_1 [M ⁻¹]	$2,1 \pm 0,04$	$1,9 \pm 0,5$
k_{-1} [s ⁻¹]	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$
m_{-1} [M ⁻¹]	0	0
k_2 [s ⁻¹]	$7,3 \cdot 10^8$	$9,5 \cdot 10^8$
m_2 [M ⁻¹]	$2,5 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,3$
k_{-2} [s ⁻¹]	$0,69 \pm 0,47$	$0,2 \pm 0,07$
m_{-2} [M ⁻¹]	$0,22 \pm 0,08$	$0,2 \pm 0,05$
$k_u = \frac{k_{-1} \cdot k_{-2}}{k_2}$ [s ⁻¹]	$9,5 \cdot 10^{-5}$	$2,1 \cdot 10^{-5}$

Tabelle A.3: Raten aus Lösungsmittelexperimenten. Bei der Modellanpassung festgehaltene Raten sind kursiv dargestellt. Die m -Werte geben die Empfindlichkeit auf Denaturanzmitteländerungen an (vgl. Δx -Wert in mechanischen Experimenten).

Vergleicht man die Faltungsraten aus den Einzelmolekülexperimenten mit denen aus den Lösungsmittelexperimenten (Tab. A.1 und Tab. A.3, $k_f = k_{total}$), dann findet man eine äußerst gute Übereinstimmung. Zusammen mit der Tatsache, dass bereits eine geringe Kraft die effektive Faltungsrate deutlich verlangsamt (vgl. Kapitel 3), deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass in den mechanischen Double-Jump Experimenten trotz der Fixierung der Termini des Pro-

teins keine wesentliche restliche Kraft auftritt. Des Weiteren liefern die Lösungsmitteldaten unterstützende Daten bezüglich der Entfaltungsrate. Herkömmlicherweise wurde die mechanische Entfaltungskinetik mittels eines Bell-Modells analysiert ($k_u^{Bell} \approx 10^{-3} - 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). Diese ergab allerdings häufig Entfaltungsraten größer der natürlichen Entfaltungsrate. In Anhang B wird das Kramers-Modell als Alternative vorgestellt, welches eine bessere Übereinstimmung bzw. ein logischeres Verhältnis der hier extrahierten Entfaltungsrate ($\approx 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) mit der mechanischen Entfaltungsrate ($k_u^{Kramers} \approx 10^{-6} \text{ s}^{-1}$)⁴ zeigt. Leider konnten im Rahmen dieser Experimente keine Hinweise auf einen stabilen Faltungszwischenzustand gefunden werden, so dass sich folgende unterschiedliche Energielandschaftsbilder ergaben:

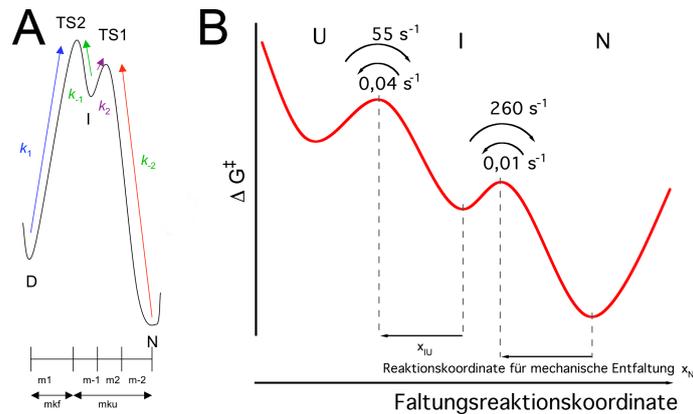


Abbildung A.2: (A) Chemisches Energielandschaftsbild mit hochenergetischem Zwischenzustand (Darstellung übernommen von Sarah Batey und Jane Clarke) (B) Mechanisches Energielandschaftsbild mit thermodynamisch stabilem Zwischenzustand. Zu beachten sind die unterschiedlichen Reaktionskoordinaten für Faltung und Entfaltung.

Die Existenz des produktiven, obligatorischen Faltungszwischenzustands könnte mittels schneller Double-Jump Experimente ohne Prolin-Isomerisierung⁵ bestätigt werden. Erste eigene Experimente im Labor von Thomas Kiefhaber in Zusammenarbeit mit Annett Bachmann ergaben, dass tatsächlich in der Fluoreszenzzunahme eine zweite schnelle Rate verborgen ist. Abbildung A.3 zeigt eine Faltungskinetikkurve der ddFLN4 F24W Variante bei einer finalen GdmHCl Konzentration 0,5 M⁶. Passt man anstatt einer einfach exponentiellen Kinetik eine doppelt exponentielle Kinetik an, zeigt sich eine deutliche Verbesserung der Residuen im Bereich 5 – 15 ms. Es ergibt sich für den langsamen Faltungsschritt die Rate $k_1 = 25 \text{ s}^{-1}$ und für den schnellen Faltungsschritt die Rate $k_2 = 68 \text{ s}^{-1}$. Diese stimmen sehr gut mit den

⁴ Der natürliche Entfaltungspfad sollte stets die größere oder gleiche Entfaltungsrate besitzen, als der mechanische Entfaltungspfad. Ist die Entfaltungsrate des mechanischen Entfaltungspfads größer, deutet dies auf einen Modellfehler zur Analyse der mechanischen Daten hin, da ansonsten diese getestete Barriere auch der natürlichen Barriere entspräche.

⁵ Entfaltet man ein Protein über längere Zeit, dann nimmt die Aminosäure Prolin ein Isomerisierungsgleichgewicht zwischen dem *cis* und *trans* Zustand an. Die Isomerisierungszeit beträgt ca. 100 s bei 20°C. Da ddFLN4 10 Proline enthält, zeigt eine Faltungskinetik aus diesem Gleichgewicht zu einem großen Signalanteil die Isomerisierungskinetik und nicht die eigentliche Faltungskinetik. Um dies zu verhindern, kann man mittels eines pH-Sprungs zu pH = 2 die Entfaltungskinetik deutlich beschleunigen und durch sofortiges schnelles Rückfalten eine Isomerisierung der Proline verhindern.

⁶ Die Entfaltung fand bei pH 2, 3 M GdmHCl für 100 ms statt. Anschließend wurde das Protein in renaturierende Bedingungen pH 7,4, 0,5 M GdmHCl überführt.

Einzelmoleküldaten aus Tabelle A.2 ($k_{UI}^{0,5M}(\text{wt}) = 27 \text{ s}^{-1}$ $k_{IN}^{0,5M}(\text{wt}) = 78 \text{ s}^{-1}$) überein. Die Abweichungen bei $t \approx 35 \text{ ms}$ kommen aufgrund einer Druckschwankung in der Double-Jump Apparatur zustande.

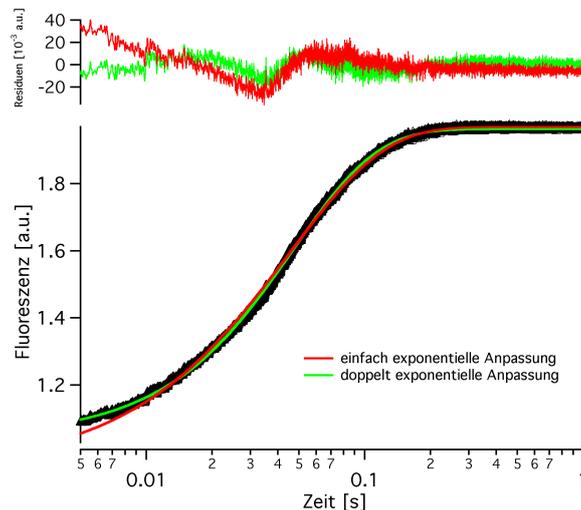


Abbildung A.3: Faltungskinetik der ddFLN4 Variante F24W in 0,5 M GdmHCl mit Anpassung einer einfach und einer doppelt exponentiellen Kinetik.

A.3 Thermodynamische Stabilität des Intermediats

Sowohl die mechanischen Einzelmoleküldaten als auch die zuletzt vorgestellten Lösungsmittel Double-Jump Daten deuten auf einen stabilen Faltungszwischenzustand hin. Um dessen thermodynamische Stabilität zu untersuchen, wurden auf DNA Ebene die beiden β -Stränge A und B entfernt und die verbleibende Domäne wurde exprimiert und aufgereinigt. Diese Struktur wurde aus mechanischen Experimenten als potentielle Zwischenzustandsstruktur vorgeschlagen [13]. Zur strukturellen Charakterisierung wurde CD-Spektroskopie verwendet. Mittels *Circular Dichroism* kann zwischen α -helikal gefalteten Strukturen, β -Faltblattstrukturen und nicht strukturierten Proteinlösungen unterschieden werden. Dazu wird die Elliptizität der Probe bei einer bestimmten anregenden Wellenlänge gemessen. Die einzelnen Strukturen weisen charakteristische Spektren auf. In Abbildung A.4A ist das CD-Spektrum des Wildtyps von ddFLN4 sowie im Vergleich das Spektrum des postulierten Zwischenzustands gezeigt. Das Minimum beider Spektren liegt bei der charakteristischen Wellenlänge für β -Faltblattstrukturen. Die um A- und B-Strang verkürzte ddFLN4 Variante zeigt ein etwas weiteres Spektrum, welches eventuell auf einen größeren unstrukturierten Anteil hindeutet. Bestimmt man mittels des CD-Spektrometers einen thermischen Schmelzübergang, dann zeigt sich der Wildtyp wie erwartet thermodynamisch stabiler als der Zwischenzustand (Abb. A.4B). Dennoch entfaltet der Zwischenzustand kooperativ bei einer relativ hohen Temperatur. Dies deutet auf eine kompakt gefaltete thermodynamisch stabile Struktur hin. Zur endgültigen strukturellen Charakterisierung des Zwischenzustands ist allerdings eine Röntgenkristallstruktur oder eine NMR-Untersuchung nötig.

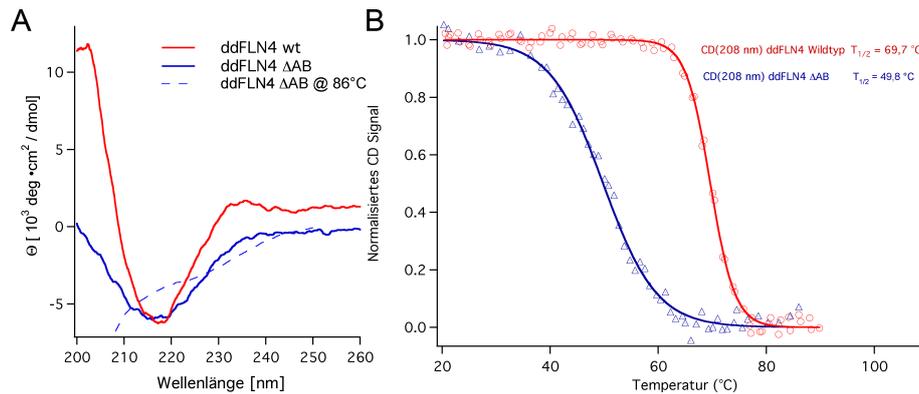


Abbildung A.4: (A) CD-Spektren des ddFLN4 Wildtyps (rot) und des ddFLN4 Zwischenzustands (ddFLN4 Δ AB, blau). Nach thermischer Denaturierung zeigt sich für ddFLN4 Δ AB bei $\vartheta = 86^\circ\text{C}$ das typische Spektrum eines unstrukturierten Knäuels (*random coil*, blau gestrichelt). (B) Thermischer Übergang des ddFLN4 Wildtyps im Vergleich zum Zwischenzustand beobachtet bei der CD-Wellenlänge $\lambda = 208 \text{ nm}$. Obwohl dem Zwischenzustand die β -Faltblätter A und B fehlen, ist dieser mit einer mittleren Schmelztemperatur $\vartheta_{1/2} = 50^\circ\text{C}$ relativ stabil.

Neben dem thermischen Stabilitätstest wurde der Zwischenzustand auch auf mechanische Stabilität untersucht. Dazu wurden aus dem Filaminkonstrukt ddFLN1-5 die β -Stränge A und B der Domäne ddFLN4 auf genetischer Ebene gelöscht. Das verkürzte Konstrukt ddFLN1-5 Δ AB-ddFLN4 wurde exprimiert und wie beschrieben aufgereinigt. In einfachen Kraftausdehnungskurven wurde der erwartete Entfaltungsfingerabdruck in Form eines Konturlängenzuwachses $\Delta L_C \approx 16 - 17 \text{ nm}$ gefunden (Abb. A.5A). Es ist sehr wahrscheinlich, dass dieses Entfaltungsereignis dem Zwischenzustand der Domäne ddFLN4 zugeordnet werden kann. Diese Annahme verstärkt sich, wenn man zusätzlich die Entfaltungskraft untersucht. Im Gegensatz zur thermischen Denaturierung scheint der Zwischenzustand mechanisch äh-

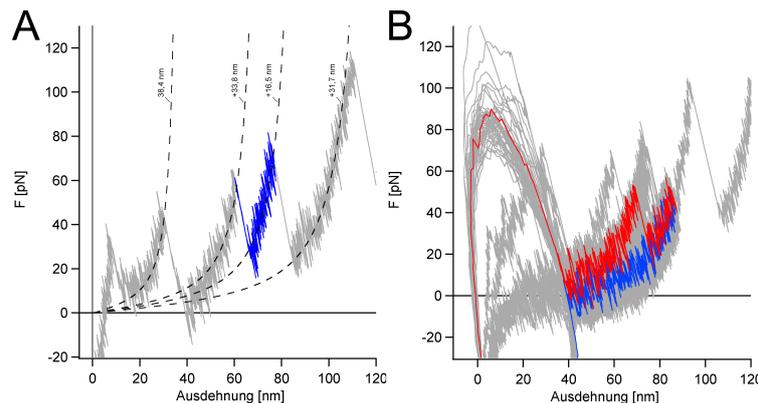


Abbildung A.5: (A) Kraftausdehnungskurve an ddFLN1-5 Δ AB-ddFLN4. Der Zwischenzustand (blau) ist vergleichbar mechanisch stabil wie im Volllängenkonstrukt und zeigt den erwarteten Konturlängenzuwachs. (B) Typische Double-Jump Kurve an ddFLN1-5 Δ AB-ddFLN4.

lich stabil zu sein wie im Volllängenkonstrukt (Abb. A.5A). In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob dieses verkürzte Konstrukt auch eine vergleichbare Rückfaltungskinetik auf-

zeigt. Dazu wurden mechanische Double-Jump Experimente an dem Konstrukt ddFLN1-5 Δ AB-ddFLN4 durchgeführt. Eine typische Double-Jump Kurve ist in Abbildung A.5 für die Wartezeit $t_W = 20$ ms gezeigt. Bei dieser Wartezeit tritt der Zwischenzustand zu etwa 49% (n=148) auf. Die Faltungsrates ist somit ca. $k_f^0 = 35 \text{ s}^{-1}$ und liegt im Rahmen des Fehlers und des stark verkürzten Konstrukts in guter Übereinstimmung mit der des Volllängenkonstrukts ($k_{UI}^0(\text{ddFLN4wt}) = 56 \text{ s}^{-1}$).

Anhang B

Grenzen eines einfachen eindimensionalen Modells

Bereits in früheren Experimenten an der Filamindomäne ddFLN4 wurde festgestellt, dass die durch ein Bell-Modell extrahierte Übergangszustandsposition sich je nach Ziehgeschwindigkeit sowohl für den nativen als auch den intermediären Zustand verschiebt [45]. Diese Experimente verdeutlichten, dass das Bell-Modell die Energielandschaft eines Proteins nur hinlänglich gut beschreibt. Als Alternative wurde die Beschreibung mittels eines Kramers-Modells vorgeschlagen. Dabei kann man entweder eine vollkommen beliebige Energielandschaft verwenden [45] oder unter speziellen Annahmen über die Form der Energielandschaft, die Diffusion über die Barriere analytisch beschreiben [62]. Im Folgenden sollen nochmals kurz die bereits gewonnenen Erkenntnisse aus Experimenten mit Ziehgeschwindigkeiten $v_P = 200 \frac{\text{nm}}{\text{s}} - 4000 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ zusammengefasst werden.

Die Entfaltungskraftverteilungen des nativen Zustands von ddFLN4 verschmälerten sich deutlich, je niedriger die Ziehgeschwindigkeit wurde (siehe Abbildungen B.1C und F). Während das bisher übliche Bell-Modell noch den Verlauf der mittleren Entfaltungskraft reproduzieren konnte (Abb. B.1A), wurde die jeweilige Form der experimentellen Entfaltungskraftverteilung $\frac{dP_U(F)}{dF}$ nicht zufriedenstellend reproduziert (Abb. B.1C). Ebenfalls erschien die extrapolierte natürliche Entfaltungsrate des nativen Zustands $k_{NI}(F=0) = 0,35 \text{ s}^{-1}$ sehr hoch¹. Das Kramers-Modell beschreibt den Entfaltungsvorgang mit einer Diffusion eines Teilchens in einem Potential über eine Barriere [87, 88, 45]. Dabei wird bei der Berechnung der *mean first passage time* für das diffundierende Teilchen nicht nur Barrierenhöhe und -position berücksichtigt, sondern auch der gesamte Verlauf der zu Grunde liegenden Potentiallandschaft. Durch Anpassen der theoretischen Kraftverteilungen an die experimentellen Daten mit der Bedingung, dass möglichst alle Verteilungen vergleichbar gut reproduziert werden sollten, konnte eine potentielle Energielandschaft für die Entfaltung des nativen Zustands von ddFLN4 gefunden werden (Abb. B.1E). Die extrapolierte natürliche Entfaltungsrate $k_{NI}^0 = 0,01 \text{ s}^{-1}$ lag zudem in erwarteter Größenordnung.

Das Bell-Modell gibt somit eine erste grobe Schätzung für Position und Höhe des Über-

¹Anhang A beschreibt einen Vergleich zwischen einer *bulk*-Studie zu ddFLN4 und den entsprechenden Einzelmolekül-Kraftspektroskopie Daten. Die *bulk*-Daten unterstützen in diesem Fall ebenfalls die These, dass die durch das Bell-Modell extrapolierte natürliche Entfaltungsrate zu hoch ist. Für weitere Details sei auf Anhang A verwiesen.

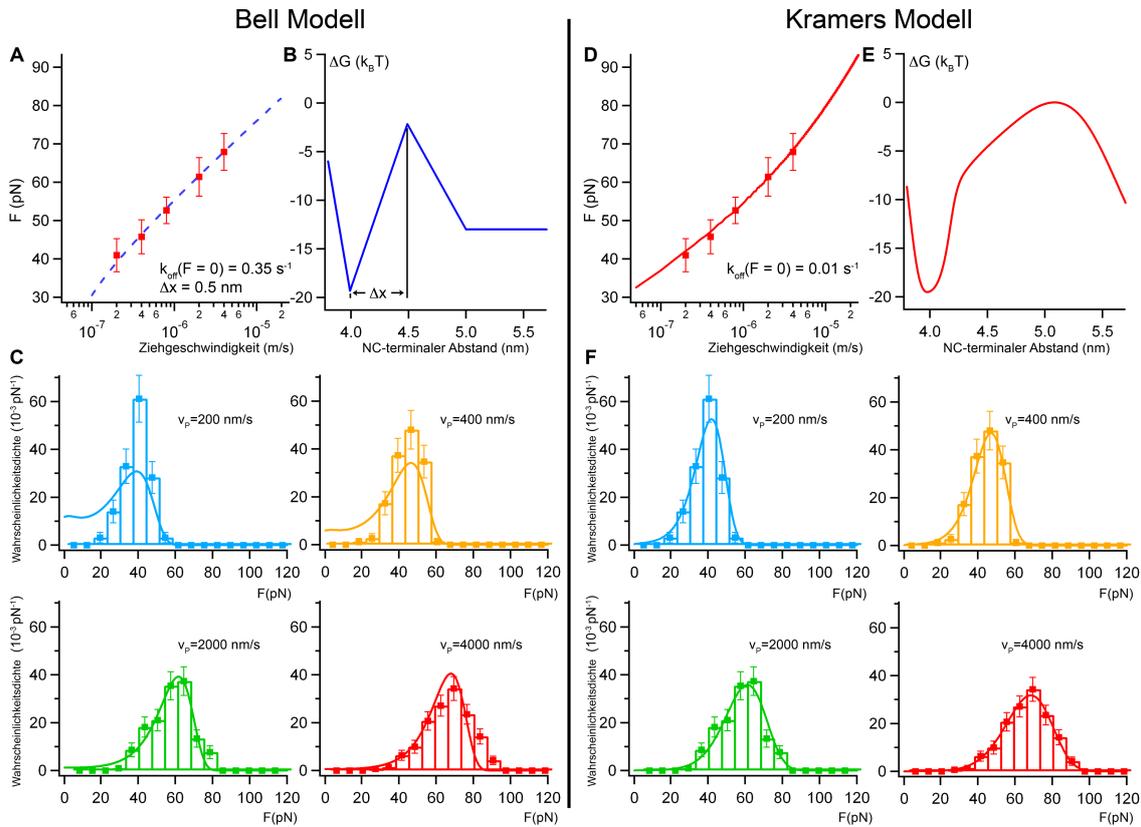


Abbildung B.1: Vergleich der Modelle von Bell & Kramers. **(A)** Mittlere Entfaltungskraft als Funktion der Ziehgeschwindigkeit. Die Anpassung des Bell-Modells ergibt eine natürliche Entfaltungsrate $k_{off}(F=0) = 0,35 \text{ s}^{-1}$ und einen Barrierenabstand $\Delta x = 0,5 \text{ nm}$. **(B)** Schematische Darstellung einer Energielandschaft nach dem Bell-Modell. **(C)** Experimentell bestimmte Entfaltungskraftverteilungen für die Ziehgeschwindigkeiten $v_p = 200, 400, 2000$ und $4000 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$. Die durchgezogene Linie stellt jeweils eine berechnete Bell-Kraftverteilung nach den in A bestimmten Parametern dar. Während die mittlere Entfaltungskraft gut übereinstimmt, wird die Form der gemessenen Verteilungen keineswegs reproduziert. **(D)** Das Kramers-Modell reproduziert die mittlere Entfaltungskraft in Abhängigkeit der Ziehgeschwindigkeit mit einer deutlichen entgegen gesetzten Krümmung als das Bell-Modell. Die extrapolierte natürliche Entfaltungsrate ist $k_{off}(F=0) = 0,01 \text{ s}^{-1}$. **(E)** Das Kramers-Modell berücksichtigt nicht nur eine fixe Barrierenhöhe und einen fixen Barrierenabstand sondern die gesamte Form und Krümmung des zugrunde liegenden Potentials. **(F)** Die optimale Potentialform wurde durch iterative Anpassung der berechneten Kramers-Kraftverteilungen an die experimentellen Kraftverteilungen gefunden [45].

gangszustands bei einer bestimmten Ziehgeschwindigkeit an, kann aber keinerlei zuverlässige Extrapolationen zu einer natürlichen Entfaltungsrate liefern. Die extrapolierte Rate liegt entgegen der Erwartung meist über einer natürlichen Entfaltungsrate. Zudem ist auch noch die Möglichkeit unterschiedlicher Entfaltungspfade auf der eigentlich hoch-dimensionalen Energielandschaft zu berücksichtigen.

Durch die verbesserte, halbseitig-spezifische Anbindung von Proteinen (siehe Anhang F.8) konnte der Ziehgeschwindigkeitsbereich noch deutlich nach unten erweitert werden. Es konnten Experimente bis zu einer Ziehgeschwindigkeit von $1 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ gemacht werden. Es ergab sich eine noch schmaler werdende Kraftverteilung für den nativen Zustand von ddFLN₄, die al-

lerdings nicht mehr stark in der mittleren Entfaltungskraft gefallen ist. Um Eichfehler auszuschließen, wurde eine Referenzkraftverteilung bei $v_P = 200 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ aufgenommen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die neuen Daten auf die bereits veröffentlichten Daten skaliert². Abbildung B.3A zeigt als Ergänzung zu der Referenzkraftverteilung die zwei neuen Kraftverteilungen bei $v_P = 1$ und $20 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$. Bei einer Ziehgeschwindigkeit von $1 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ dauert eine Kraft-Ausdehnungskurve ca. 60–100 s. Zusammen mit der vorher im Kramers-Modell extrapolierten natürlichen Entfaltungsrate $k_{NI}(F = 0) = 0,01 \text{ s}^{-1}$, sollte man erwarten, dass sich eine einfach exponentielle Kraftverteilung ergibt, die hauptsächlich den natürlichen Entfaltungspfad widerspiegelt. Dieser mögliche Pfadwechsel wurde bereits von Williams *et al.* postuliert [67], konnte aber bisher aufgrund der limitierten Ziehgeschwindigkeit nicht experimentell überprüft werden. Abbildung B.2 zeigt typische Kraft-Ausdehnungskurven bei entsprechend niedrigen Ziehgeschwindigkeiten.

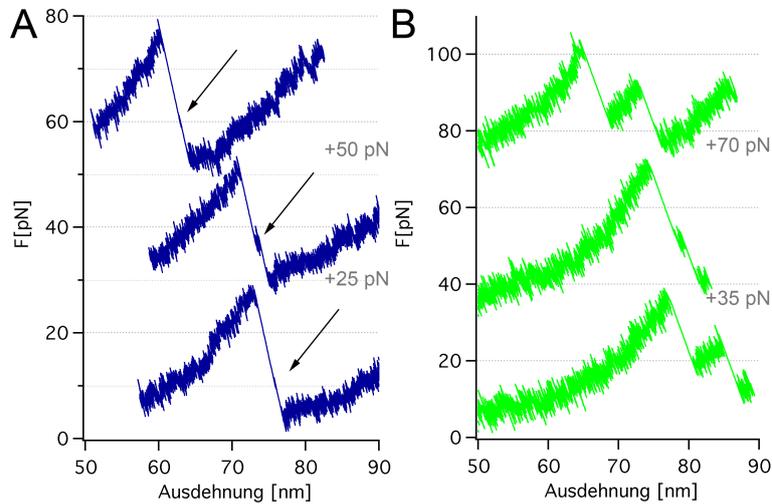


Abbildung B.2: Typische Kraft-Ausdehnungskurven bei **(A)** $1 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ und **(B)** $20 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$. Die Kurven wurden der Übersichtlichkeit wegen mit einem Boxfilter von 50 Hz Abschnidefrequenz geglättet sowie mit einem Offset versehen (graue Beschriftung). Bei den langsamsten Kraft-Ausdehnungskurven mit $1 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ ist deutlich die kurze Lebensdauer des Entfaltungszwischenszustands zu erkennen (Pfeile).

Diese Kraftkurven eröffnen erstmalig eine neue Perspektive zu extrem niedrigen Kraftladungsraten in Kraftmikroskop Experimenten und deuten bereits darauf hin, dass in diesem Fall kein Pfadwechsel stattfindet, sondern der native Zustand des Proteins, je kleiner die Ziehgeschwindigkeit wird, umso stabiler erscheint. Der Entfaltungszwischenszustand allerdings, noch deutlich bei den Beispielkurven mit $v_P = 20 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ zu erkennen, scheint in den Kraft-Ausdehnungskurven bei $v_P = 1 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ eine sehr geringe Lebensdauer zu besitzen (siehe Pfeile). Im Folgenden wird zunächst die Stabilität des nativen Zustands und im Anschluss die Stabilität des Zwischenszustands diskutiert.

Abbildung B.3 zeigt, dass sowohl die mittlere Entfaltungskraft als auch die Kraftverteilungsform über den gesamten Ziehgeschwindigkeitsbereich weder mit dem veröffentlichten Potential (rote Linie in Abb. B.3B und D), noch einem erweiterten Potential (blaue

² Bei der Renormalisierung wurden die mittleren Kräfte noch verringert, so dass die hier gezeigte Kraftverteilung eher ein unteres Limit der mechanischen Stabilität von ddFLN4 darstellt.

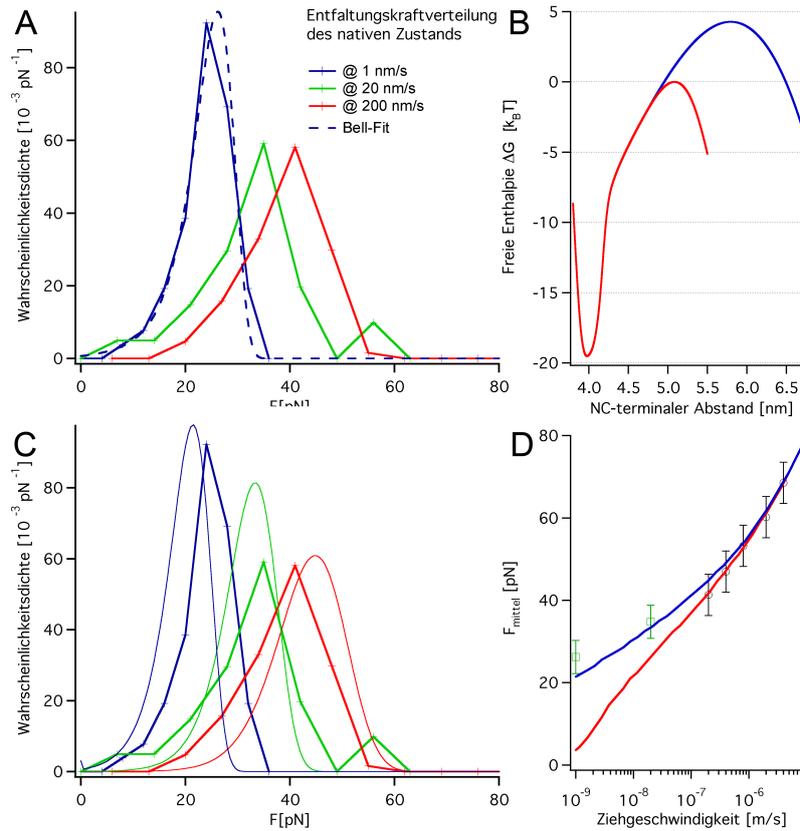


Abbildung B.3: (A) Entfaltungskraftverteilung bei den Ziehgeschwindigkeiten 1 (blau), 20 (grün) und 200 $\frac{\text{nm}}{\text{s}}$ (rot). Fittet man die Kraftverteilung bei 1 $\frac{\text{nm}}{\text{s}}$ mit einem Bell-Modell (blaue gestrichelte Linie), dann kann man ein $\Delta x = 13 \text{ \AA}$ und eine extrapolierte, natürliche Entfaltungsrate $k_{NI}(F = 0) = 8 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ extrahieren. (B) Schematische Darstellung des veröffentlichten Potentials (rot) und eines erweiterten Potentials (blau). (C) Selbe experimentelle Entfaltungskraftverteilungen wie in A. Das erweiterte Potential reproduziert die mittleren Entfaltungskräfte besser, die theoretischen Kraftverteilungsformen weichen allerdings stark von den Daten ab. (D) Die mittlere Entfaltungskraft als Funktion der Ziehgeschwindigkeit weicht bei den neu gewonnenen Datenpunkten (grün) deutlich vom veröffentlichten Kramers-Potential (rot) ab. Das erweiterte Potential zeigt eine stärkere Krümmung, die sich den Daten annähert, aber wie in C gezeigt deutliche Abweichungen bei den Kraftverteilungen zur Folge hat.

Linie in Abb. B.3B und D) konsistent reproduziert werden konnten. Eine Anpassung mit dem Bell-Modell (Abb. B.3A, blaue gestrichelte Linie) an die gemessene Kraftverteilung ergibt einen Übergangszustandsabstand $\Delta x_{NI} = 13 \text{ \AA}$ und eine extrapolierte Entfaltungsrate $k_{NI}(F = 0) = 8 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Damit würde der Übergangszustandsabstand ca. 30% der gesamten Domäne betragen. In einer klassischen Betrachtung würde dies bedeuten, dass sich die Domäne ddFLN4 um ca. 30% ihrer ursprünglichen Größe dehnen ließe, bevor sie ihre mechanische Stabilität und Struktur verlieren würde.

Betrachtet man den Entfaltungszwischenzustand, dann verhält sich dieser deutlich anders. Sein Verhalten folgt zwar ebenfalls nicht dem klassischen Bell-Modell, allerdings scheint seine Stabilität nicht zuzunehmen, wenn die Kraft-Ladungsrate verringert wird. Aus den ersten Ziehgeschwindigkeitsexperimenten ($v_P = 200 \frac{\text{nm}}{\text{s}} - 4000 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$) konnte mittels des Kramers-Modells abgeschätzt werden, dass die natürliche Entfaltungsrate des Zwischenzustands ca.

$k_{IU}^0 = 0,04 \text{ s}^{-1}$ beträgt. Abbildung B.2A zeigt bereits in den Beispielkurven für die langsamste Ziehgeschwindigkeit, dass die Lebensdauer des Zwischenzustands nicht der des nativen Zustands folgt. Da diese Lebensdauer und somit die Entfaltungskraft deutlich von der Entfaltungskraft des nativen Zustands abhängt (kommunizierende Entfaltungsereignisse [21]) wurde in diesem Fall keine Entfaltungskraftverteilung bestimmt sondern die extrapolierte Entfaltungskraft mittels einer Monte-Carlo-Simulation des Systems bestimmt³.

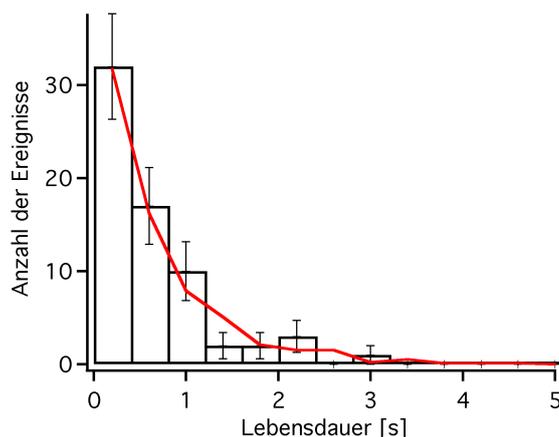


Abbildung B.4: Lebensdauer des Entfaltungszwischenzustands bei $v_P = 1 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$. Die Monte-Carlo-Simulation (rote Linie) ergibt eine Entfaltungskraft $k_{IU}^0(1 \frac{\text{nm}}{\text{s}}) = 0,01 \text{ s}^{-1}$ bei einer Übergangszustandsposition $\Delta x = 12 \text{ \AA}$.

In Abbildung B.4 ist die Lebensdauererzeugung des Zwischenzustands (Balken) sowie die beste Monte-Carlo-Simulation (rote Linie) dargestellt. Die extrapolierte Entfaltungskraft beträgt in diesem Fall $k_{IU}^0(1 \frac{\text{nm}}{\text{s}}) = 0,01 \text{ s}^{-1}$ bei einer Übergangszustandsposition $\Delta x_{IU} = 12 \text{ \AA}$. Die Rate ist in diesem Fall lediglich um den Faktor vier geringer im Vergleich zum Faktor 125 des nativen Zustands. Die Übergangszustandsposition ist dagegen in ähnlicher Größenordnung.

Der extrahierte Parameter Δx ist anders als in früheren Veröffentlichungen vermutet, wahrscheinlich keine reale Distanz, die eine tatsächliche Veränderung der Proteinstruktur bis zum Übergangszustand widerspiegelt, sondern lediglich eine Distanz auf der Reaktionskoordinate des beschreibenden Potentials [60, 89]. Für eine korrekte Beschreibung, ist womöglich die zugrunde liegende Energielandschaft um eine oder mehrere Reaktionskoordinaten zu erweitern. Eine Beschreibung auf einer eindimensionalen Energielandschaft ist nicht mehr möglich.

Kürzlich durchgeführte Molekulardynamik-Simulationen zu ddFLN4 von Paci *et al.* zeigten ähnliche Stabilisierungserscheinungen unter niedrigen Kraftladungsraten wie in diesem Kapitel beschrieben⁴. Andere Proteindomänen zeigten diesen Stabilisierungseffekt nicht. Eine Auswertung auf Aminosäureebene wird derzeit noch durchgeführt und könnte somit wertvolle Informationen über die Abweichungen von beiden Modellen zur Beschreibung der kraftabhängigen Entfaltungskinetik dieser Domäne liefern.

³ Der Monte-Carlo-Simulation lag das Bell-Modell zugrunde, so dass in diesem Fall eine extrapolierte Entfaltungskraft und Übergangszustandsposition bei der entsprechenden Ziehgeschwindigkeit ermittelt werden konnte.

⁴ Persönliche Mitteilung unveröffentlichter Daten.

Anhang C

Kraftinduziertes Quasi-Gleichgewicht

Die zugrunde liegende Energielandschaft bestimmt den Faltungspfad eines Proteins. Häufig können durch kraftspektroskopische Experimente entweder Informationen über die Faltungs- oder Entfaltungsbarriere gewonnen werden. Erst wenn man ein Protein im Gleichgewicht betrachten könnte, dann wäre es möglich gleichzeitig umfassende Informationen über die zugrunde liegende Energielandschaft aus einem Experiment zu gewinnen [90]. Im kraftfreien Raum liegen Übergangszeiten meist für die Entfaltung im Bereich von mehreren tausend Sekunden und für die Faltung im Bereich von Millisekunden bis Sekunden. Mittels Kraft konnte gezeigt werden, dass die Entfaltungskinetik stark beschleunigt wird (siehe Anhang B) und die Faltung aufgrund der zusätzlichen mechanischen Barriere deutlich verlangsamt wird (siehe Kapitel 3, 4, 5). Ein möglicher Kraftgleichgewichtspunkt für die Bildung und die Entfaltung des Zwischenzustands von ddFLN4 ist in Abbildung 4.4C in einem Kraft-Chevron-Plot dargestellt. Die durchschnittliche Zeit für einen Übergang wäre in diesem Fall $\tau \approx 120$ s. Da mehrere Übergänge beobachten werden soll, ist ein solches Experiment aus technischen Gründen mit einem Kraftspektrometer noch nicht möglich. Die meisten Proteine zeigen bei Kraftexperimenten im Rahmen der durchschnittlichen Experimentdauer ein solches, weit vom Gleichgewicht entferntes, Verhalten. Nur in wenigen Ausnahmen konnten mittels Kraft Proteine in eine Art Gleichgewicht gebracht werden [38, 37, 7]. Um dennoch in einer Art Quasi-Gleichgewicht Faltungs- und Entfaltungsübergänge mehrfach an einem Protein mittels eines Kraftmikroskops beobachten zu können wurden Experimente mit einer großen Oszillationsamplitude durchgeführt. Ähnlich den Lock-in Experimenten wurde das Protein zwischen Blattfederspitze und Oberfläche eingespannt und auf eine bestimmte Ausdehnung gebracht. Anstatt allerdings nun die Blattfederspitze mit einer langsamen kontinuierlichen Bewegung der Oberfläche anzunähern, wurden auf die Probenoberfläche Oszillationen mit einer großen Amplitude $A = 25 - 30$ nm und einer Frequenz $f \approx 20 - 50$ Hz moduliert während die mittlere Ausdehnung des Proteins konstant gehalten wurde. Ein Schema des Experimentierablaufs ist in Abbildung C.1A dargestellt. Die mittlere Ausdehnung des Polypeptids wird konstant gehalten (rote Punkte), aber aufgrund der Oszillationen zu höheren Kräften (denaturierende Bedingungen) und zu niedrigeren Kräften (renaturierende Bedingungen) kann das Protein zwischen den Zuständen N, I und U wechseln und folgt während einer Oszillation den zugehörigen WLC-Kurven. Misst man die durchschnittliche Kraft bei der festgehaltenen Ausdehnung, dann zeigen sich die drei Zustände N, I und U durch unterschiedliche Kraftlevel. Abbildung C.1B zeigt drei Kraft-Zustands-Kurven. Je nach Wahl der mittleren Ausdehnungsposition befindet sich das Proteine hauptsächlich im gefalteten Zustand (gelb), entfalteten Zustand (blau) oder im stetigen Wechsel (rot). Bei geeigneter

Wahl befindet sich ddFLN4 auch für einige 100 ms im Zwischenzustand I. Weiterhin kann man festhalten, dass alle Übergänge von N nach U oder umgekehrt stets über den Zwischenzustand I verlaufen.

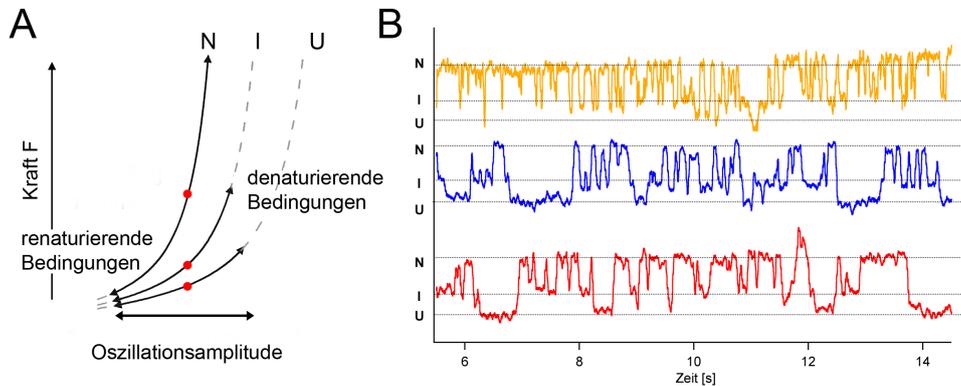


Abbildung C.1: (A) Schematische Darstellung eines Quasi-Gleichgewichtsexperiments (B) Zeit-Zustands-Kurven aus Quasi-Gleichgewichtsexperimenten.

Wie aus den vorherigen Kapiteln bekannt, steigt bzw. fällt die Wahrscheinlichkeit mindestens exponentiell mit der äußeren Kraft eine Entfaltung bzw. eine Faltung zu beobachten. Weiter kann angenommen werden, dass während einer Oszillation ca. 20 % der Oszillationszeit bei der maximalen Kraft (Ausdehnung $> 0,85 \cdot$ Ausdehnungsmaximum, denaturierenden Bedingungen) und 20 % der Zeit bei der minimalen Kraft (Ausdehnung $< 0,15 \cdot$ Ausdehnungsmaximum, renaturierenden Bedingungen) verbracht wird. Übergänge zwischen Zuständen finden somit lediglich in diesen Ausdehnungsmaxima und -minima statt. Der Oszillationszyklus vereinfacht sich wie in Abbildung C.2A zu einer Art Rechtecksignal mit Pausen. Mit den hier getroffenen Annahmen kann eine Monte-Carlo-Simulation des Experiments durchgeführt werden. Dabei verwendet man zunächst die über ddFLN4 bereits bekannten Informationen über die Energielandschaften, d.h. für die Entfaltungsraten die aus Anhang B bekannten Kramers Entfaltungsraten und für die Rückfaltung das in Kapitel 3 vorgestellte Modell [45, 47]. Stellt man den Besetzungszustand als Funktion der Zeit für die Domäne ddFLN4 dar, dann ergibt sich mit einer Oszillationsfrequenz $f = 50$ Hz, einer Oszillationsamplitude $A = 30$ nm, einer mittleren Ausdehnung $46,5$ nm und einer entfalteten Konturlänge $L_C = 120$ nm die in Abbildung C.2B dargestellte Kurve. Diese sieht den hier gewonnenen Daten sehr ähnlich. Rekursiv könnte man nun durch Anpassen der einzelnen Parameter die gesamte Entfaltungskinetik und Faltungskinetik des untersuchten Proteins aus einem Quasi-Gleichgewichtsexperiment bestimmen. Abbildung C.2C stellt die Verteilung der besetzten Zustände aus Simulation und Experiment dar. Die Zeitkurven aus Abbildung C.1B zeigen bereits ein deutlich unterschiedliches Verhalten für die gelbe und beispielsweise die blaue Kurve. Die Abhängigkeit von experimentellen Faktoren wie mittlere Ausdehnung, Konturlänge der entfalteten Proteindomäne sowie Oszillationsamplitude auf die mögliche Daten können mittels Monte-Carlo-Simulationen untersucht werden. Es zeigt sich beispielsweise, dass nur ein geringer Unterschied in der Konturlänge des entfalteten Polypeptids von 4 nm die Besetzungsverteilung stark verändern kann (siehe Abb. C.2D). Ein vergleichbar starker Effekt ist ebenfalls für die Wahl der mittleren Ausdehnung zu beobachten.

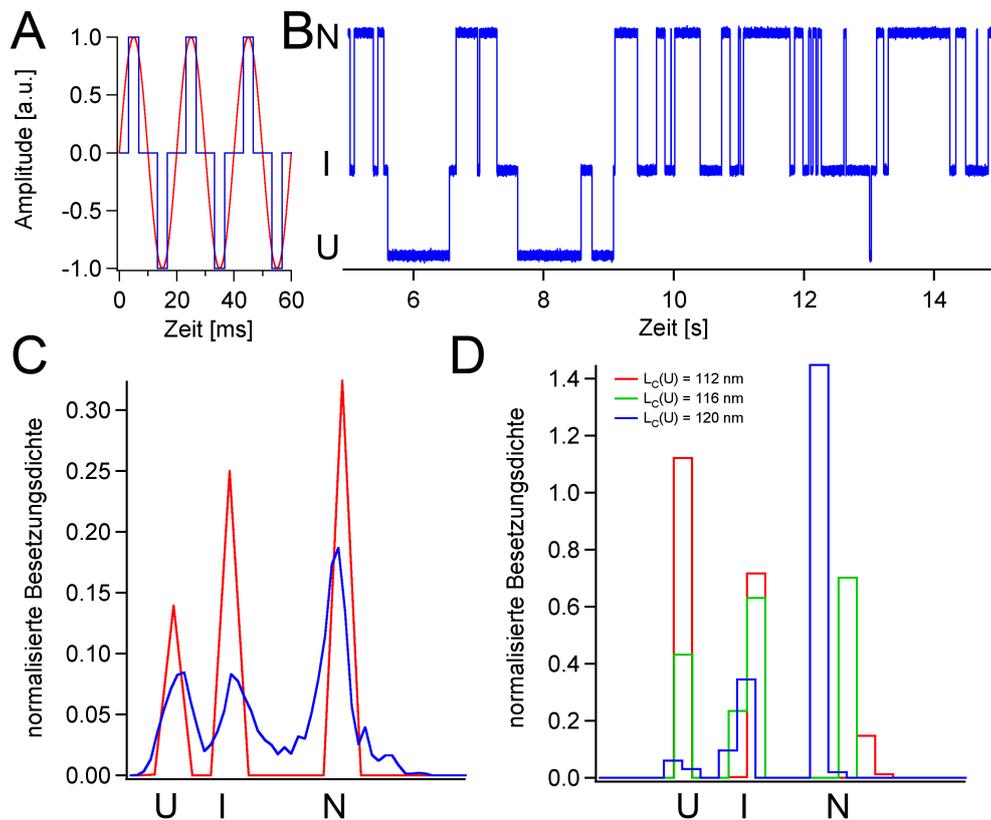


Abbildung C.2: (A) Vereinfachung der experimentellen Sinuskraftvariation zu einer Rechteck-ähnlichen Kraftvariation. (B) Zeit-Zustands-Kurve aus einer Monte-Carlo-Simulation. (C) Vergleich der Besetzungsdichte zwischen Experiment und Simulation. Die experimentellen Daten sind aufgrund verschiedener Drift-effekte verbreitert. (D) Die Besetzungsdichten sind empfindlich auf geringe Konturlängenänderungen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die hier vorgestellten Experimente die Möglichkeit eröffnen mittels des künstlich erzeugten Quasi-Gleichgewichts die Energielandschaft bzw. die Barrieren eines Proteins innerhalb eines Experiments komplett auszutesten. Es können Faltungspfade verfolgt werden, d.h. ob ein Protein bei jedem Übergang von N zu U oder umgekehrt stets über den Zwischenzustand I verläuft, oder ob es unterschiedliche Zwischenzustände bzw. alternative Pfade gibt. Als kritische Parameter für das Gelingen eines solchen Experiments haben sich die Kontrolle der mittleren Ausdehnung sowie der Konturlänge herausgestellt. Bereits geringer Oberflächendrift ($\sim \frac{\text{Å}}{\text{s}}$) über die Dauer des Experiments kann die Besetzungsverteilung künstlich verfälschen. Auch sollte als möglicher Wechsel zwischen den beiden Zuständen – denaturierende und renaturierende Bedingungen – über eine Rechteckfunktion anstatt eines Sinus nachgedacht werden.

Anhang D

ddFLN4 Faltungskinetiken

In diesem Abschnitt werden alle Kinetiken der ddFLN4 Mutanten gezeigt. Abbildungen D.1 und D.2 zeigen die gemessene Kinetik für die Faltung des Intermediats, während Abbildung D.3 die Kinetiken der Punktmutanten zur Bildung des nativen Zustands zeigen. Abbildung D.4 zeigt die Faltungskinetiken der ddFLN4 Tryptophanmutanten. Die Faltungskinetik von ddFLN4 wurde auch unter leicht denaturierenden Bedingungen untersucht und ist in Abbildung D.5 dargestellt.

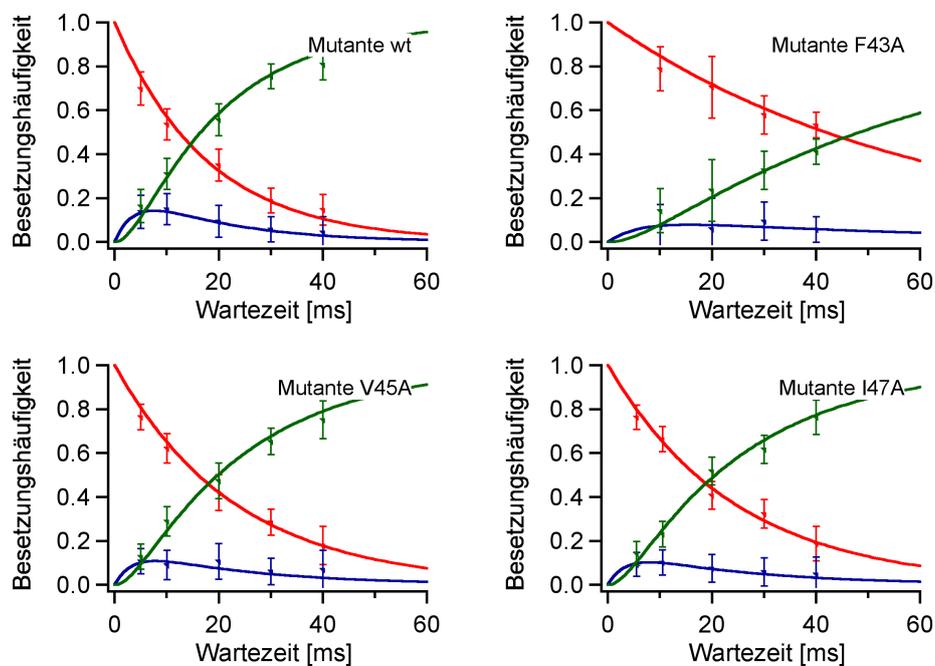


Abbildung D.1: Faltungskinetik: Daten der Punktmutanten für den ersten Faltungsschritt (Teil 1).

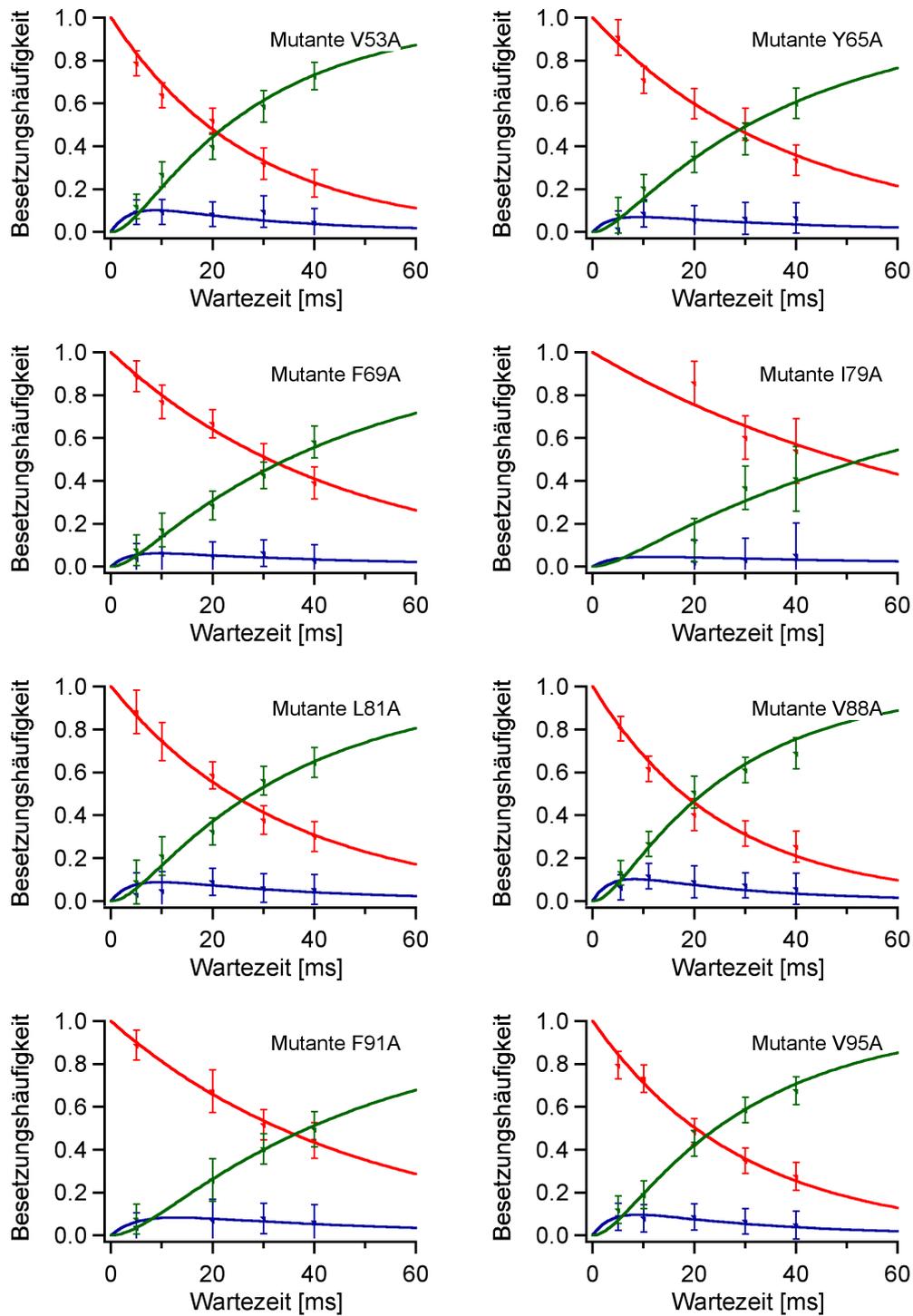


Abbildung D.2: Faltungskinetik: Daten der Punktmutanten für den ersten Faltungsschritt (Teil 2).

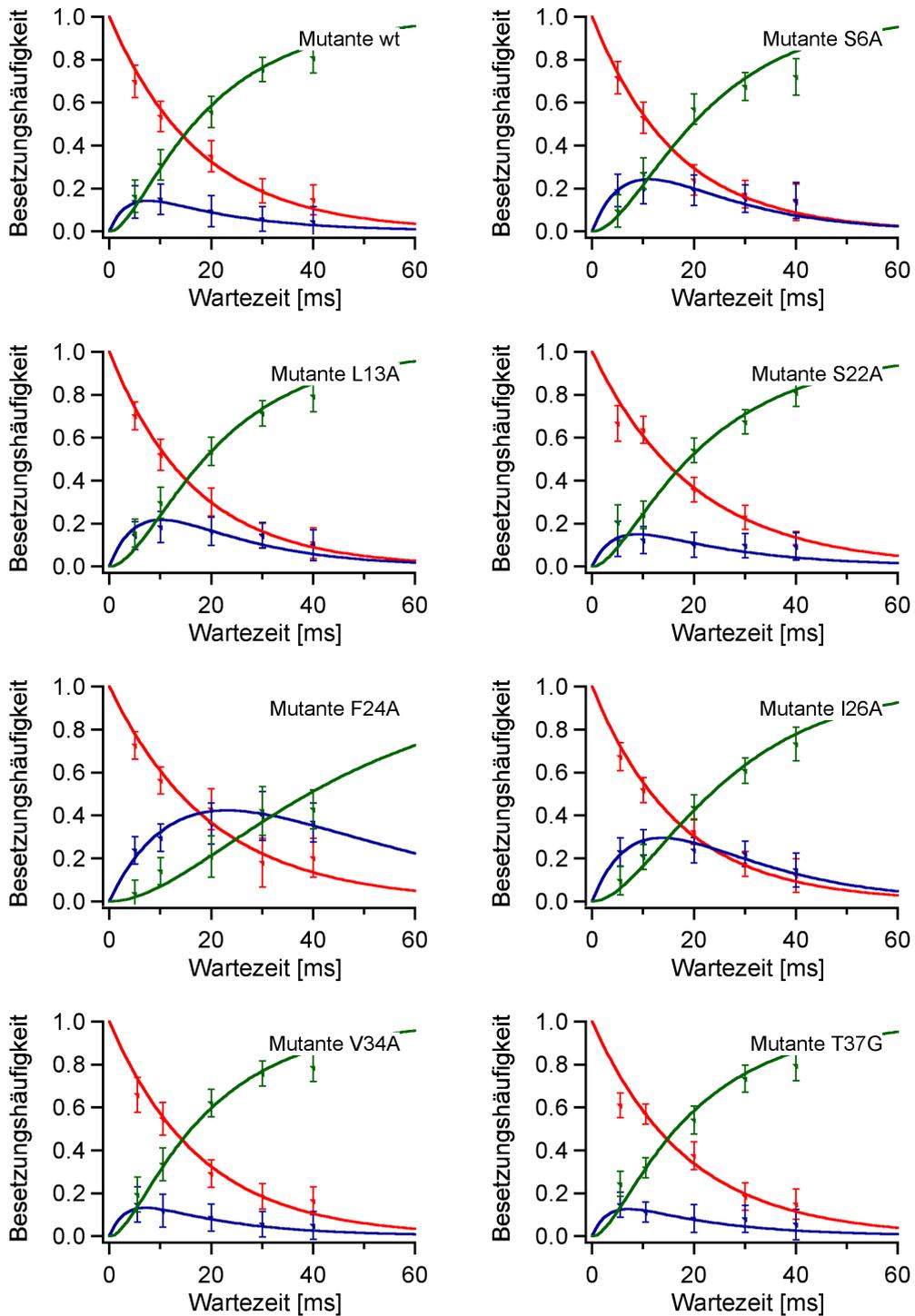


Abbildung D.3: Faltungskinetik: Daten der Punktmutanten für den zweiten Faltungsschritt.

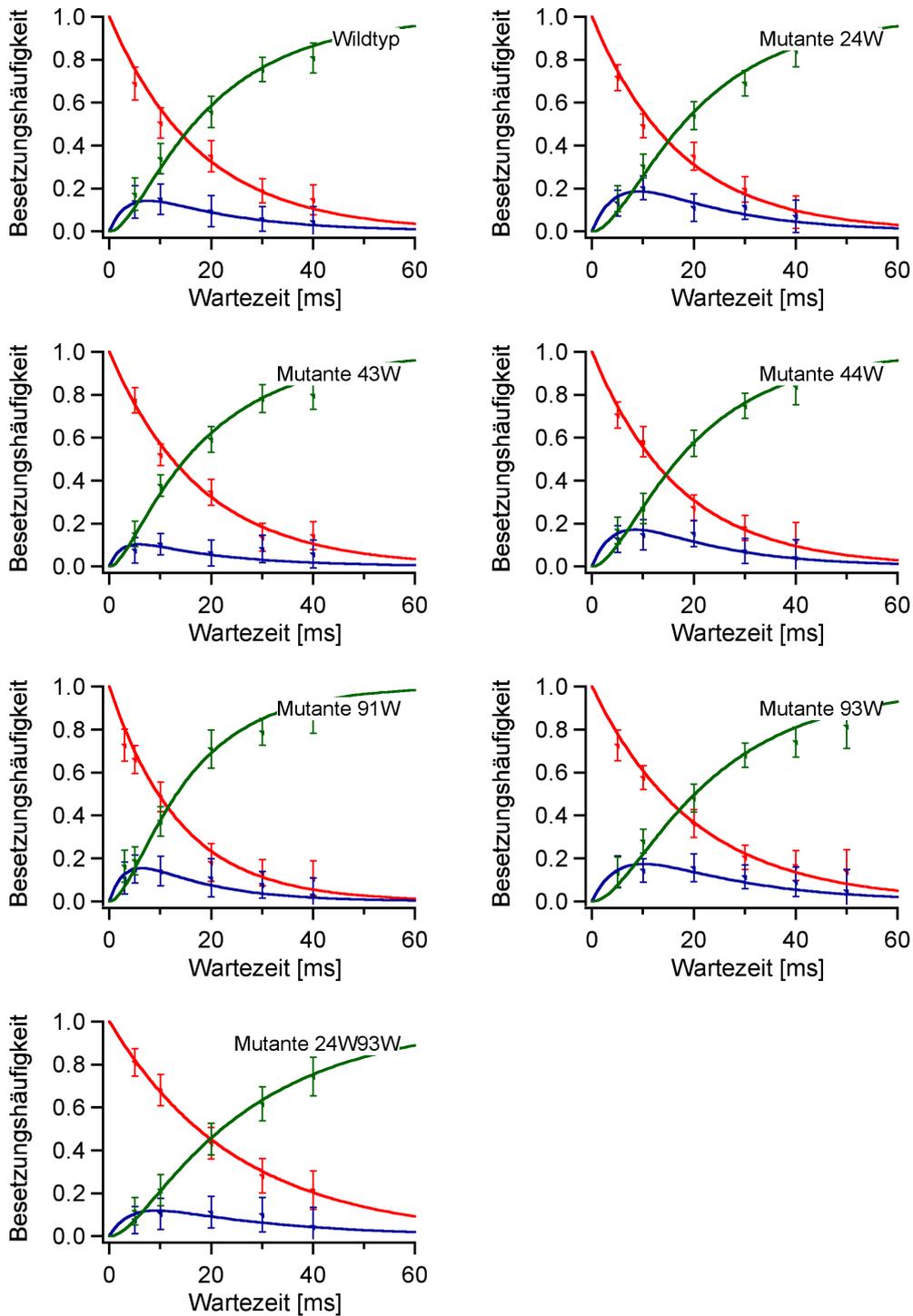


Abbildung D.4: Faltungskinetik: Daten der ddFLN4 Tryptophan Mutanten.

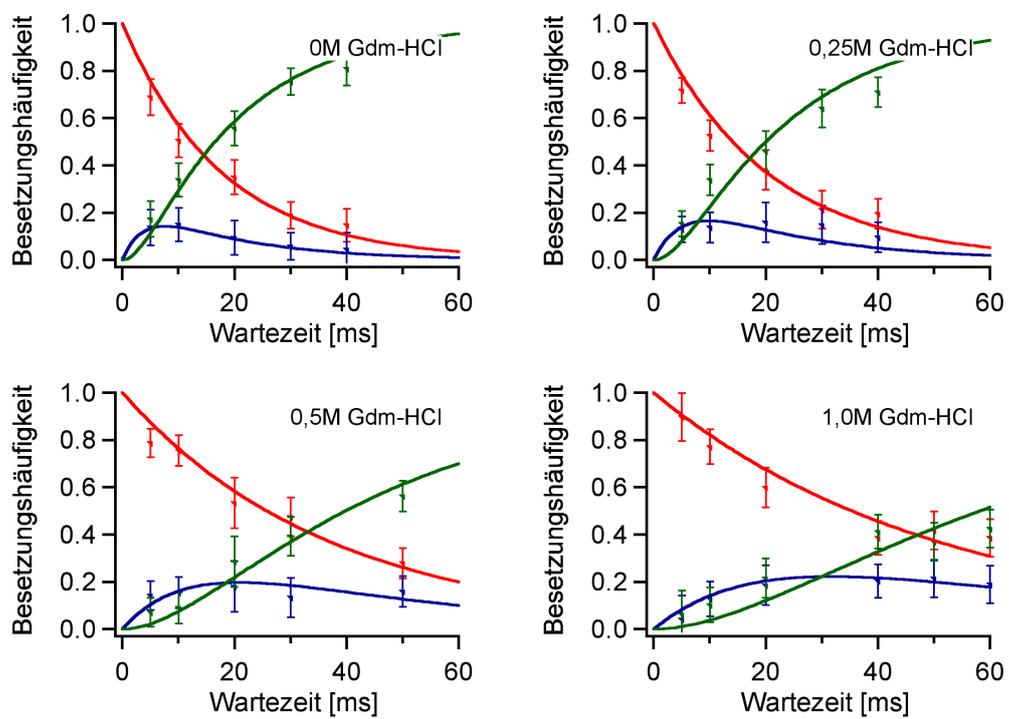


Abbildung D.5: Faltungskinetik: Daten des ddFLN4 Wildtyps mit verschiedenen Konzentrationen des Denaturierungsmittels Guanidiniumhydrochlorid (Gdm-HCl).

Anhang E

Temperaturverhalten von *CspTm*

Die Filamindomäne ddFLN4 zeigte bei steigender Temperatur von 5°C bis 37°C eine deutliche Veränderung des mechanischen Entfaltungsübergangszustands. Der Entfaltungsübergangszustand des nativen Zustands vergrößerte sich von 2,7 Å auf 7,8 Å und wurde als molekulares Aufweichen bzw. Anti-Hammond Effekt beschrieben [91, 14]. Während Übergangszustandsabständen im Bereich weniger Ångström bisher stets Wasserstoffbrücken als stabilisierende Wechselwirkung zugeschrieben wurden, fiel die Interpretation für größere Abstände im Bereich $> 5 \text{ Å}$ auf den hydrophoben Effekt. Die Art der stabilisierenden Wechselwirkung scheint bei ddFLN4 somit stark temperaturabhängig zu sein.

- Ist dies ein Effekt, der auch bei anderen Proteinen beobachtbar ist?
- Hängt der Effekt mit der Art der stabilisierenden Wechselwirkung zusammen?
- Zeigt ein Protein aus einem thermophilen Organismus einen besonders starken Effekt dieser Art?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde als zweites Modell-Protein neben ddFLN4 ein Cold-shock-protein aus *Thermotoga maritima* (*CspTm*) ausgewählt. Dieses wurde in herkömmlichen Lösungsmittelstudien und mit Einzelmolekül FRET-Experimenten ausführlich im kraftfreien Raum charakterisiert [92, 50]. *CspTm* ist ein kleines β -barrel Protein mit 66 Aminosäuren und ist in Abbildung E.1 mit den entsprechenden Cystein-Mutationen, über die das Protein polymerisiert wurde, dargestellt [93]. Es wurden zwei verschiedene Zuggeometrien untersucht: *CspTm*_{10,67} und *CspTm*_{2,55}. Zur Poly-Proteinkonstruktion wurde das lyophilisierte *CspTm* in PBS mit einer finalen Konzentration von ca. 200 μM gelöst. Die Polymerisation wurde für ca. 1 Woche bei 4°C durchgeführt. Die Polymere wurden auf Gold für einige Minuten inkubiert. Nicht adsorbierte Moleküle wurden mit PBS Puffer gespült. Die Poly-Proteine konnten ebenfalls durch unspezifische Adsorption an die Blattfeder aufgenommen werden. Es ergaben sich Längen von wenigen *CspTm* Untereinheiten bis zu mehr als 30 anfangs gefalteten *CspTm* Domänen, die unter äußerer Kraft unabhängig voneinander mit je einem Konturlängenzuwachs $\Delta L_C(\text{CspTm}_{10,67}) = 19,6 \pm 1,3 \text{ nm}$ entfalteten.

Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass *CspTm* mit einer Faltungsrate $k_f^0 = 83 \text{ s}^{-1}$ ein relativ schnell faltendes Protein ist [92]. Aus diesem Grund wurden an *CspTm* stets Ausdehnungs-Relaxations-Experimente (Stretch-and-Relax) durchgeführt. Dies bedeutet, dass

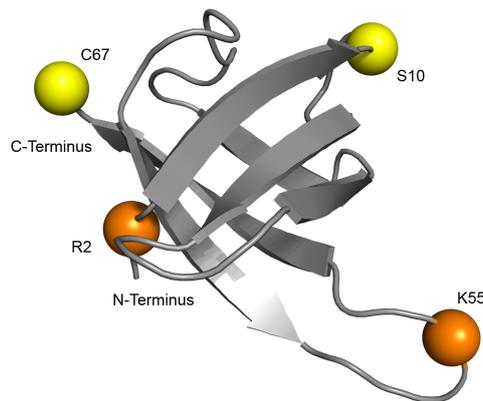


Abbildung E.1: Röntgenkristallstruktur des Cold Shock Proteins mit den Cysteinmutationen an Stelle 2, 10, 55 und 67.

das Poly-Protein ähnlich wie bei Double-Jump-Experimenten ab einer bestimmten Ausdehnung relaxiert wurde, um anschließend erneut gestreckt zu werden. Es wurde allerdings auf die Sprungphasen verzichtet, da speziell bei der erneuten Kraft-Ausdehnungskurve alle wieder gefalteten Domänen untersucht werden sollten und somit kein spezielles Ausdehnungsfenster von Interesse war. Bei Raumtemperatur wurde die Faltungsrate von *CspTm*_{10,67} auf $k_f^0 \geq 60 \text{ s}^{-1}$ abgeschätzt und liegt damit in guter Übereinstimmung mit dem bisherigen Literaturwert. Typische Stretch-and-Relax Kurven für Poly-Proteine von *CspTm*_{10,67} sind für die Temperaturen 8°C, 20°C und 40°C in Abbildung E.2 dargestellt. Dabei sind die jeweiligen

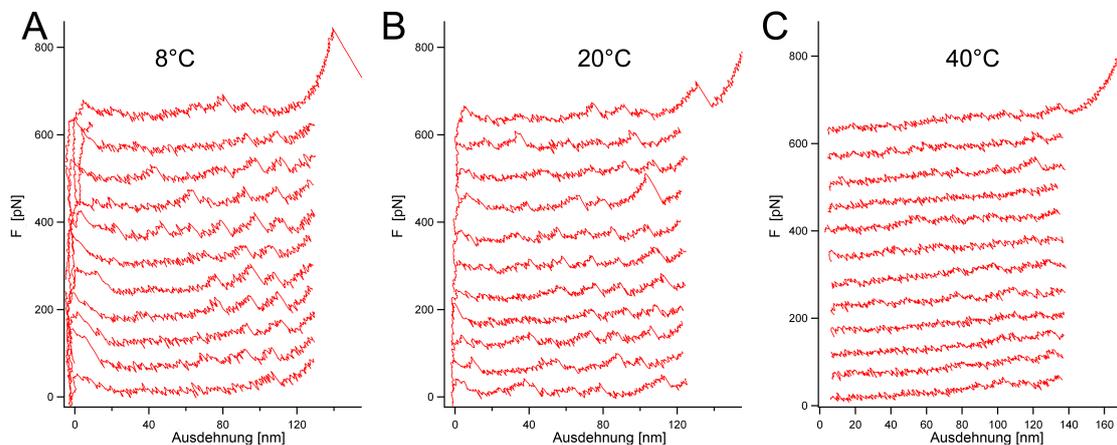


Abbildung E.2: Cold shock protein_{10,67} Beispielkurven bei 8°C, 20°C und 40°C

Entfaltungszyklen übereinander mit einem Kraftoffset gezeigt, bis dann im letzten Zyklus die Blattfeder weiter von der Oberfläche entfernt wurde und das Poly-Protein von Oberfläche oder Blattfederspitze abgelöst wurde. Das gezielte finale Ablösen ermöglichte ein Abzählen der sich faltenden und entfaltenden *CspTm* Domänen und somit eine genaue Auswertung der Faltungsraten sowie der Entfaltungsraten durch Monte-Carlo-Simulationen. Zunächst fällt auf, dass bei einer Temperaturerhöhung die mechanische Entfaltungskraft des *CspTm*_{10,67} stark

fällt, obwohl die optimale Lebenstemperatur des Organismus *Thermotoga maritima* bei ca. 80°C liegt. Da bereits bei 40°C die Auflösungsgrenze des Kraftspektrometers erreicht wurde und bei höheren Temperaturen weitere Herausforderungen bzgl. Verdunstung und Drift mit dem Versuchsaufbau auftreten würden, wurde darauf verzichtet bei höheren Temperaturen Experimente durchzuführen. Die experimentellen Entfaltungskraftverteilungen sind in Abbildung E.3 gezeigt. Csp $Tm_{10,67}$ entfaltet bei einer Ziehgeschwindigkeit $v_P = 500 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ mit einer mittleren Kraft $F(8^\circ\text{C}) = 33,5 \pm 10,3 \text{ pN}$ ($n=49$), $F(20^\circ\text{C}) = 24,5 \pm 10,1 \text{ pN}$ ($n=87$) und $F(40^\circ\text{C}) = 19,3 \pm 10,4 \text{ pN}$ ($n=47$). Die Stretch-und-Relax Experimente wurden mittels einer Monte-Carlo Simulation reproduziert, indem die Proteinparameter Δx und k_u^0 variiert wurden¹. Der Übergangszustandsabstand veränderte sich innerhalb des experimentellen Fehlers nicht temperaturabhängig und lag bei $\Delta x_{10,67} = 0,89 \text{ nm}$. Die unterschiedlichen Entfaltungskräfte konnten mit einer Veränderung der Höhe der Entfaltungsbarriere ΔG_{NU}^\ddagger bzw. der extrapolierten kraftfreien Entfaltungsrate k_u^0 erklärt werden (siehe Abb. E.3A).

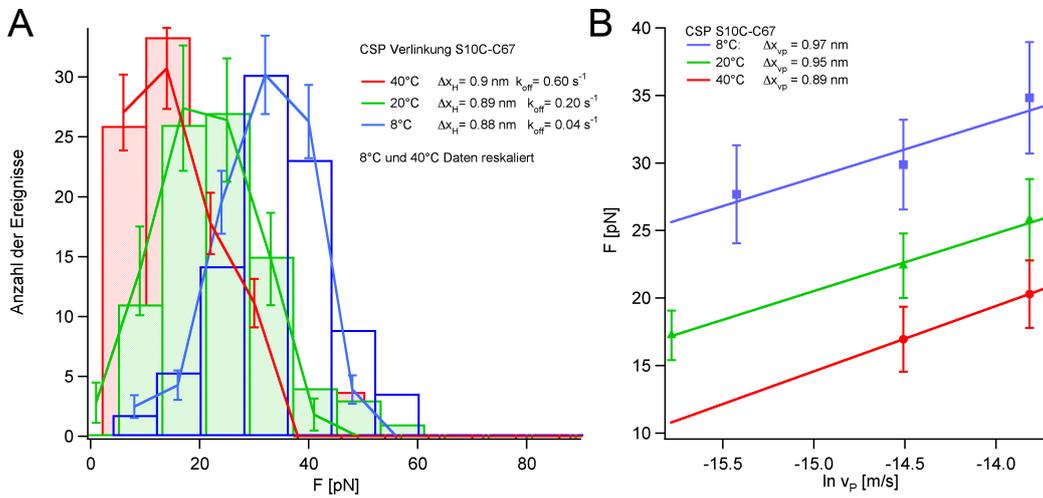


Abbildung E.3: Entfaltungskräfte Cold-shock-protein $_{10,67}$ **(A)** Entfaltungskraftverteilung bei 8°C, 20°C und 40°C reproduziert durch Monte-Carlo-Simulationen. **(B)** Mittlere Entfaltungskräfte als Funktion der Ziehgeschwindigkeit bei 8°C, 20°C und 40°C.

Zur Überprüfung der Parameter aus dem Anpassen der Monte-Carlo Simulation an die Entfaltungskraftverteilungen wurden ebenfalls Ziehgeschwindigkeitsexperimente durchgeführt. Die wahrscheinlichste Entfaltungskraft (\bar{F}) erhöht sich logarithmisch mit steigender Ziehgeschwindigkeit, also Kraftladungsrate, gemäß:

$$\bar{F} = \frac{k_B T}{\Delta x} \cdot \ln \left(\frac{\dot{F} \cdot \Delta x}{k_u^0 \cdot k_B T} \right) .$$

In erster Näherung ist die Kraftladungsrate \dot{F} direkt proportional zur Ziehgeschwindigkeit und berechnet sich aus der Federkonstante des Polypeptids kurz vor der Entfaltung und der Ziehgeschwindigkeit $\dot{F} = k_{\text{protein}} \cdot v_P$. Aus der Steigung dieser Ziehgeschwindigkeitsabhängigkeit kann direkt der Übergangszustandsabstand Δx bestimmt werden. Es wurden für folgende

¹Für die Monte-Carlo Simulation wurde als Modell zur Berechnung der kraftabhängigen Entfaltungsrate das Bell-Modell herangezogen.

drei Ziehgeschwindigkeiten $v_P = 200, 500$ und $1000 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ die mittleren Entfaltungskräfte jeweils bei 8°C , 20°C und 40°C ² bestimmt und als Funktion der logarithmierten Ziehgeschwindigkeit aufgetragen (Abbildung E.3B). Es ergeben sich konsistente, temperaturunabhängige Übergangszustandsabstände $\Delta x \approx 0,9 \text{ nm}$.

Die Verlinkungsrichtung CspTm_{2,55} wurde bei 8°C und 25°C mit jeweils drei Ziehgeschwindigkeiten untersucht. Die durchschnittliche Entfaltungskraft dieser Verlinkungsrichtung lag leicht über der von CspTm_{10,67}. Abbildung E.4A und B zeigt die erhaltenen Entfaltungskraftverteilungen respektive bei 8°C und 25°C . Sowohl die Auswertung der Verteilungen als auch der mittleren Entfaltungskraft als Funktion der Ziehgeschwindigkeit deuten darauf hin, dass sich bei dieser Verlinkungsrichtung eine leichte Veränderung der Übergangszustandsbreite von $\Delta x(8^\circ\text{C}) = 5,1 \pm 0,7 \text{ \AA}$ auf $\Delta x(25^\circ\text{C}) = 7,6 \pm 0,7 \text{ \AA}$ ergibt. Diese ist allerdings wesentlich weniger stark ausgeprägt als bei ddFLN4.

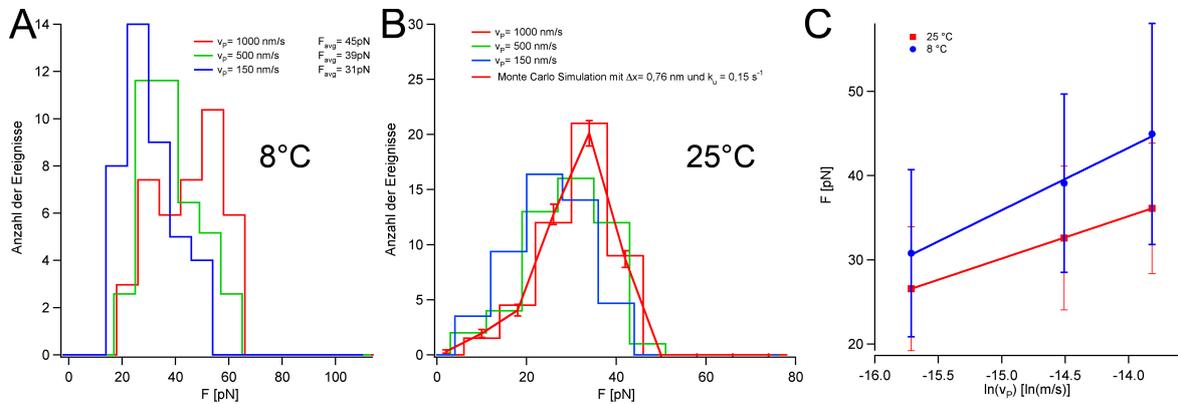


Abbildung E.4: Entfaltungskräfte Cold shock protein_{2,55}. **(A)** Entfaltungskraftverteilungen bei 8°C . **(B)** Entfaltungskraftverteilungen bei 25°C . **(C)** Mittlere Entfaltungskraft als Funktion der Ziehgeschwindigkeit.

Grundsätzlich wird dem Abstand des Übergangszustands die dominante wechselwirkende Kraft zugeordnet, d.h. bei einem kleinen Abstand von wenigen Ångström bspw. Wasserstoffbrückenbindungen und bei einem größeren Abstand eher hydrophobe Wechselwirkungen [3, 14, 94]. Es scheint, dass zumindest entlang der Zugrichtung CspTm_{10,67} hauptsächlich von hydrophoben Wechselwirkungen stabilisiert wird und kein Wechsel der dominierenden stabilisierenden Kraft stattfindet. CspTm_{2,55} scheint auch bereits bei 8°C einen großen Anteil an hydrophoben Wechselwirkungen als stabilisierende Kraft zu haben, jedoch scheinen durch die steigenden Temperaturen die noch stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen weniger zu werden. Trägt man den Übergangszustandsabstand als Funktion der Temperatur für ddFLN4 und die beiden CspTm Verlinkungsrichtungen auf, dann entsteht der Eindruck, dass es einen maximalen Übergangszustandsabstand $\Delta x \sim 10 \text{ \AA}$ als Funktion der Temperatur gibt (siehe Abb. E.5). Bisher wurden auch unter den üblichen Ziehgeschwindigkeitsbedingungen kaum Abstände größer als 10 \AA gefunden³ [94].

²Die Entfaltungskräfte der Verlinkungsrichtung CspTm_{10,67} waren bei dieser Temperatur mit der geringsten Ziehgeschwindigkeit bereits so niedrig, dass keine zuverlässige Bestimmung im Rahmen der Auflösungsfähigkeit des Instruments möglich war und an dieser Stelle lediglich zwei Ziehgeschwindigkeiten ausgewertet werden.

³Die großen Δx -Werte bei extrem langsamer Ziehgeschwindigkeit von ddFLN4 aus Anhang B sollten an dieser Stelle nicht berücksichtigt werden.

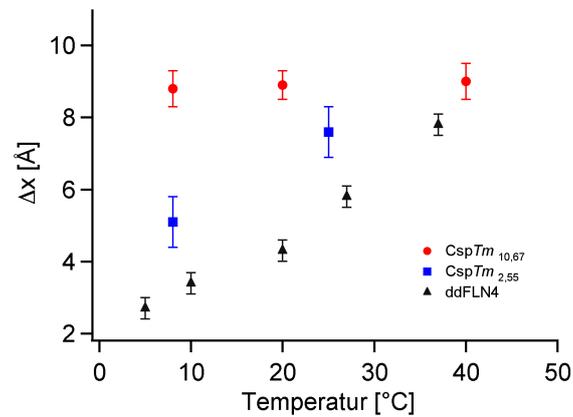


Abbildung E.5: Übergangszustandsabstand als Funktion der Temperatur

Zusammenfassend betrachtet scheint das thermophile Protein *CspTm* keine besonders starke Temperaturabhängigkeit bei der Position des Übergangszustandsabstand zu zeigen. Dennoch deuten die Ergebnisse der alternativen Verlinkungsrichtung *CspTm*_{2,55} darauf hin, dass die entscheidende Wechselwirkung der mechanischen Entfaltungsbarriere je nach Kraftrichtung auf die Temperaturabhängigkeit einen Einfluss haben könnte. Dies würde bedeuten, dass Proteine, sofern sie bereits bei niedrigen Temperaturen ihren maximalen Übergangszustand erreicht haben, diese bei steigender Temperatur keine Veränderung (siehe *CspTm*_{10,67}) zeigen.

Anhang F

Materialien und Methoden

F.1 Das Kraftspektrometer

Für alle im Rahmen dieser Dissertation beschriebenen Experimente wurde ein Eigenbau-Kraftspektrometer verwendet. Eine schematische Zeichnung findet sich dazu in Kapitel 1.1 in Abbildung 1.1. Dieses wurde zur Driftoptimierung in eine Styroporkiste gestellt, um gleichmässige Temperatur und Luftfeuchtigkeit sowie reduzierte Luftströmungen zu ermöglichen. Weiterhin wurden die Probenoberflächen über Magnete am piezoelektrischen Verschiebetisch festgeklemmt, so dass auch in diesem Fall die Oberflächendrift minimiert werden konnte. Es konnte somit bei Rückfaltungsexperimenten unter äußerer Kraft eine Oberflächendrift von nur $0,1 - 1,4 \frac{\text{\AA}}{\text{s}}$ erreicht werden. Die Blattfederdrift wurde über die Auswahl einer geeigneten Blattfeder-Charge und durch längeres thermisches Equilibrieren auf weniger als $0,1 \frac{\text{\AA}}{\text{s}}$ minimiert.

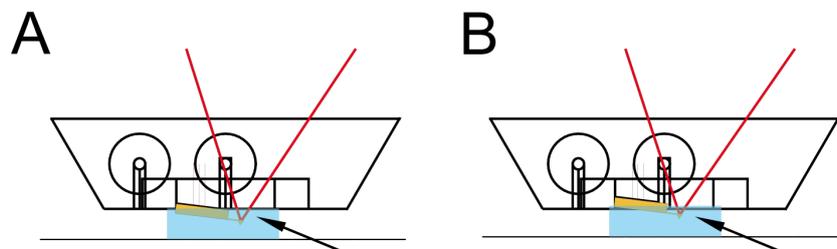


Abbildung F.1: Modifizierte Fluidzelle

Die Drift, die aufgrund thermischer Dichteänderungen oder Teilchen im optischen Pfad zustande kam, wurde durch ein verbessertes Fluidzellendesign drastisch reduziert. In Abbildung F.1A ist eine typische Fluidzelle schematisch dargestellt. Damit die Verbiegung der Blattfeder gemessen werden kann wird ein Laserstrahl auf die Spitze der Blattfeder fokussiert. Dieser Laserstrahl durchdringt vor und nach der Reflektion den Messpuffer (siehe Pfeilspitze). Durch eine Modifikation der Fluidzelle kann der Blattfederchip in der Fluidzelle versenkt montiert werden, so dass schließlich der Lichtpfad durch den Puffer auch reduziert werden kann (siehe Abbildung F.1B). Es ergab sich als optimaler Wert eine Versenkung des Blattfederchips von $200 - 300 \mu\text{m}$ und somit eine Reduktion des drifthanfälligen Lichtpfads von ca. 50% ¹.

¹ Die verwendeten Blattfedern BL-RC150VB-C1 (Olympus, Japan) sind an einem Chip mit einer Dicke

Dieses verbesserte Fluidzellendesign wurde bei den Experimenten zur Ubiquitinrückfaltung (Kap. 5) und für die Experimente unter sehr niedriger Kraftladungsrate an ddFLN4 (Anhang B) verwendet. Weiterhin wurden stets die Puffer vor dem Experiment frisch entgast und durch einen Filter mit der Porengröße 200 nm filtriert.

F.2 Lock-in Details

Korrekturkraft aufgrund der Oszillationen

Aufgrund der Oszillationen wird die Kraft, die auf das Polypeptid wirkt, ebenfalls stets leicht erniedrigt und erhöht. Das Lock-in Signal geht von einer mittleren Kraft aus, also der Kraft, um die oszilliert wird. Das Rückfaltungsereignis wird voraussichtlich, da dies energetisch einen Vorteil hat, bei einer niedrigeren Kraft am unteren Umkehrpunkt der Oszillation stattfinden. Mittels einer Monte-Carlo Simulation eines Lock-in Experiments kann sowohl die reale Rückfaltungskraft (grün) als auch die gemessene Rückfaltungskraft (rot) als Funktion der Lock-in Amplitude (siehe Abb. F.2A) bestimmt werden. Die Differenz zwischen realer und gemessener

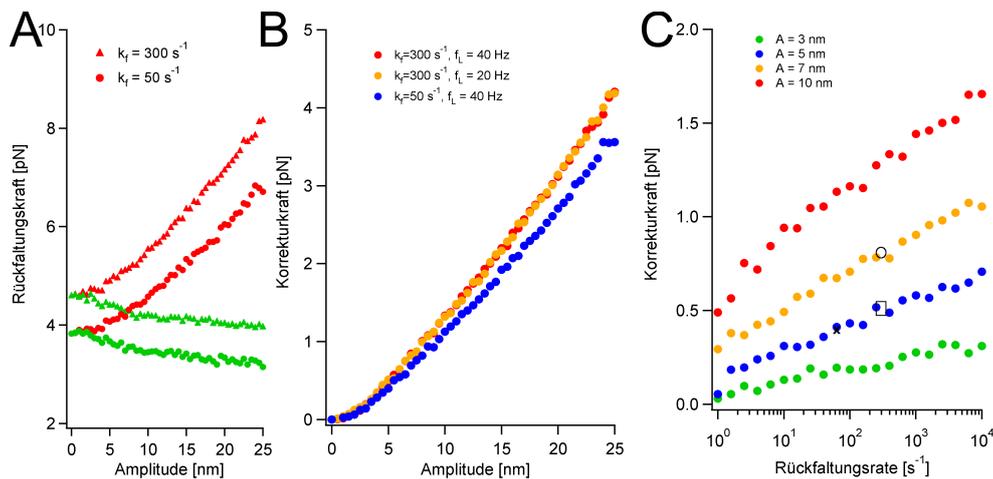


Abbildung F.2: Korrekturkraft Lock-in

Faltungskraft ist unabhängig von der Oszillationsfrequenz, zeigt allerdings eine leichte Abhängigkeit von der kraftfreien Faltungsrate (Abb. F.2B). Diese Abhängigkeit ist nochmals für verschiedene Oszillationsamplituden ($A = 3 \text{ nm}$ (grün), $A = 5 \text{ nm}$ (blau), $A = 7 \text{ nm}$ (gelb) und $A = 10 \text{ nm}$ (rot)) als Funktion der Rückfaltungsrate in Abbildung F.2C dargestellt. Anhand dieser Korrekturkurven kann die Korrekturkraft direkt abgelesen werden (\times für ddFLN4, \circ für Ubiquitinexperimente mit Amplitude $A = 7 \text{ nm}$, \square für Ubiquitinexperimente mit $A = 5 \text{ nm}$).

Berechnung des Lock-in Signals

Der Software-Lockin multipliziert phasenrichtig das Referenzsignal mit dem Messsignal. Dabei ist eine Eichung des Kraft-Lock-in Signals eine Voraussetzung. Dazu benötigt man den

von $\approx 510 \mu\text{m}$ montiert. Somit durchdringt der Laserstrahl bei einer optimalen Positionierung des Chips eine Strecke von $\approx 1020 \mu\text{m}$. Diese wird durch eine versenkte Montage des Chips um $\approx 250 \mu\text{m}$, somit auf $\approx 520 \mu\text{m}$ reduziert.

Eichfaktor C , der wie folgt hergeleitet werden kann:

$$\begin{aligned} A_F(z(t)) &= \frac{A_z}{z'(F(t))} \quad z \rightarrow t \\ \frac{d}{dt}z(F(t)) &= \frac{\partial}{\partial t}(z(t)) \cdot \left(\frac{\partial t}{\partial F}\right) = \frac{\frac{\partial}{\partial t}z(t)}{\frac{\partial}{\partial t}F(t)} \\ \Rightarrow A_F(t) &= A_z \cdot \frac{\dot{F}(t)}{\dot{z}(t)} \end{aligned}$$

Eine Lock-in Multiplikation ergibt:

$$\begin{aligned} A_L(t) &= A_z \cdot \sin(\omega t) \cdot A_F(t) \cdot \sin(\omega t + \varphi) \\ &= A_z A_F(t) \cdot \frac{1}{2} (\cos(\omega t + \varphi) + \cos(\varphi)) \end{aligned}$$

Phasenrichtige Multiplikation sowie Ersetzen von $A_F(t)$ ergibt:

$$A_L(t) = \frac{A_z^2 \cdot \dot{F}(t)}{2 \dot{z}(t)}$$

Durch Integration erhält man die Kraft F :

$$\begin{aligned} F &= C \cdot \int \frac{A_z^2}{2 \dot{z}(t)} \cdot \dot{F}(t) dt \quad \text{mit} \quad \dot{z}(t) = v_P = \text{const.} \\ F &= C \cdot \frac{A_z^2}{2 v_P} \cdot \int \dot{F}(t) dt = C \cdot \frac{A_z^2}{2 v_P} \cdot F + C_0 \\ \Rightarrow C &= \frac{2 v_P}{A_z^2} \end{aligned}$$

F.3 Wahrscheinlichkeitsverteilungen

In diesem Abschnitt wird die Wahrscheinlichkeitsverteilung für Rückfaltung $\frac{dP_N}{dF}(F)$ und Entfaltung $\frac{dP_U}{dF}(F)$ unter äußerer Kraft hergeleitet. Für ein Zweizustandssystem gilt:



Die Wahrscheinlichkeit im nativen Zustand N zu sein ($P_N(t)$), berechnet sich nach:

$$\frac{dP_N}{dt}(t) = k_f \cdot P_U(t) - k_u \cdot P_N(t) = k_f - P_N(t)(k_f + k_u), \quad (\text{F.2})$$

mit $P_N(t) + P_U(t) = 1$. Eine Lösung dieser Differentialgleichung ergibt:

$$P_N(t) = \left(P_N(0) - \frac{k_f}{k_f + k_u}\right) \cdot \exp(-k_f \cdot t - k_u \cdot t) + \frac{k_f}{k_f + k_u} \quad (\text{F.3})$$

Im Falle der Faltung, also unter niedrigen Kräften vereinfacht sich die Lösung mit den Annahmen, dass $k_u \ll k_f$, $P_N(0) = 0$ und einer zeitlich veränderbaren Faltungsrate, da die Kraft im

Experiment verringert wird, $k_f(t)$, zu:

$$P_N(t) = 1 - \exp\left(-\int_0^t k_f(t') dt'\right). \quad (\text{F.4})$$

Nach Kapitel 3 wird anstatt einer zeitlich abhängigen Faltungsrates $k_f(t)$ eine kraftabhängige Faltungsrates $k_f(F) = k_f^0 \cdot \exp\left(\frac{-E_{total}(F)}{k_B T}\right)$ berechnet. Nach der Transformation der Koordinaten $t \rightarrow F$ mit $dt = \frac{dF}{\dot{F}}$, ergibt sich die kraftabhängige Wahrscheinlichkeit im nativen Zustand zu sein $P_N(F)$:

$$P_N(F) = 1 - \exp\left(-\int_F^0 k_f^0 \cdot \exp\left(\frac{-E_{total}(F')}{k_B T}\right) \frac{1}{\dot{F}'} dF'\right), \quad (\text{F.5})$$

wobei die untere Integrationsgrenze F so gewählt sein muss, dass $k_f(F) \approx 0$. Nach einer Differentiation ergibt sich:

$$\frac{dP_N}{dF}(F) = k_f^0 \cdot \frac{1}{\dot{F}} \cdot \exp\left(\frac{-E_{total}(F)}{k_B T}\right) \cdot \exp\left(\int_0^F \frac{k_f^0}{\dot{F}'} \cdot \exp\left(\frac{-E_{total}(F')}{k_B T}\right) dF'\right). \quad (\text{F.6})$$

Für den Fall der Entfaltung gilt eine ähnliche Argumentation. Man vernachlässigt bei entsprechend hohen Kräften die Faltungsrates $k_f \ll k_u$. Es ergibt sich analog zu Gl. F.4 nach der Variablentransformation:

$$P_U(t) = 1 - \exp\left(-\int_0^F k_u(F) \frac{1}{\dot{F}'} dF'\right). \quad (\text{F.7})$$

Die kraftabhängige Entfaltungsrates $k_u(F)$ kann entweder nach einem Bell-Modell oder einem Kramers-Modell beschrieben werden (vgl. Anhang B). Für den Fall eines Bell-Modells mit einem Barrierenabstand Δx ergibt sich $k_u(F) = k_u^0 \cdot \exp\left(\frac{F \cdot \Delta x}{k_B T}\right)$ und somit die Entfaltungskraftwahrscheinlichkeitsverteilung:

$$\frac{dP_U(F)}{dF} = \frac{k_u^0}{\dot{F}} \cdot \exp\left(\frac{F \Delta x}{k_B T}\right) \cdot \exp\left(-\int_0^F \frac{k_u^0}{\dot{F}'} \cdot \exp\left(\frac{F \Delta x}{k_B T}\right) dF'\right). \quad (\text{F.8})$$

F.4 Kraftladungsrate

Die Kraftladungsrate ist eine entscheidende Größe bei der Berechnung der Entfaltungs- und Faltungswahrscheinlichkeitsverteilung $\frac{dP}{dF}(F)$. Eine notwendige Voraussetzung, dass eine semi-analytische Betrachtung der Entfaltungs- bzw. Faltungskraftverteilung möglich ist, ist eine geringe Konturlängeschwankung vor dem Entfaltungs- bzw. Faltungsereignis. Dies war sowohl bei den Rückfaltungsstudien unter äußerer Kraft zu ddFLN4 (Kap. 4) und den verschiedenen Ubiquitinvarianten (Kap. 5), sowie für die Double-Jump Entfaltungsexperimente gegeben (Kap. 7). Die Kraftladungsrate $\frac{dF}{dt}(F)$ berechnet sich rekursiv aus der Polypeptidlastizität wie folgt:

$$F(x) = \frac{k_B T}{p} \cdot \left(\frac{x}{L_C} + \frac{1}{4 \cdot \left(1 - \frac{x}{L_C}\right)^2} - \frac{1}{4} \right)$$

$$t(x) = \frac{x + \frac{F(x)}{k_C}}{v_P}$$

mit $k_B T$ als thermische Energie, p der Polypeptid-Persistenzlänge, x der Ausdehnung und L_C der Konturlänge der Polypeptids, k_C der Federhärte der Blattfeder und v_P der experimentellen Ziehgeschwindigkeit. Aus dem Zusammenhang der Kraft als Funktion der Ausdehnung $F(x)$, sowie der Zeit als Funktion der Ausdehnung $t(x)$, lässt sich die Kraft als Funktion der Zeit $F(t)$ berechnen. Nach einmaligen Ableiten erhält man $\frac{dF}{dt} = \dot{F}$ und somit die Kraftladungsrate. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die Kraftladungsrate für Rückfaltungsexperimente negativ und für Entfaltungsexperimente positiv ist. Dies ergibt sich aus dem Vorzeichen der Ziehgeschwindigkeit v_P .

F.5 Bestimmung von Entfaltungs- und Rückfaltungskräften

Entfaltungskräfte

Die Bestimmung der Entfaltungskräfte erfolgte auf zwei verschiedenen Arten. Einerseits wurde an das Entfaltungsereignis das WLC (Worm-like chain) Modell zur Beschreibung der Polymerelastizität angepasst und anschliessend der Schnittpunkt mit einer Geraden an die Blattfederrelaxation bestimmt. Dieser Schnittpunkt wurde als Entfaltungskraft gewertet (siehe Abbildung F.3A). Diese Methode wurde hauptsächlich bei der Bestimmung der Entfaltungskräfte der langsamen Kraft-Ausdehnungskurven verwendet. Andererseits wurde die Maximumsmethode verwendet, bei der das Maximum des Entfaltungsereignisses in einem gewissen Bereich bestimmt und danach korrigiert wurde (siehe Abbildung F.3B) [14].

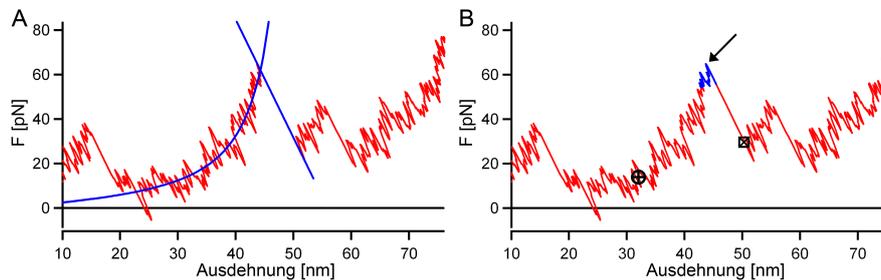


Abbildung F.3: Vergleich zwischen der Fitmethode zur Entfaltungskraftbestimmung und der Maximumsmethode. Darstellung in Anlehnung an [91].

Diese Methode wurde hauptsächlich bei der Bestimmung der Entfaltungskräfte der Punktmutanten und bei Ziehgeschwindigkeitsexperimenten mit hoher Geschwindigkeit verwendet. Ein Vergleich beider Methoden findet sich in [91]. Gegebenenfalls wurden hydrodynamische Korrekturen bei hohen Ziehgeschwindigkeiten durchgeführt [91, 4].

Rückfaltungskräfte

Eine direkte Bestimmung der Rückfaltungskräfte ist mit einigen Fehlern behaftet. Die typischen Rückfaltungskräfte bewegen sich im Bereich von 0 – 10 pN. Die Bestimmung des absoluten Kraftnullpunkts ist allerdings mit mindestens einem Fehler von ± 1 pN belegt, beispielsweise bei einer Rückfaltungskraft von 4 pN mit einem 25 % Fehler. Fehler dieser Art hätten eine genaue Bestimmung von Rückfaltungskräften und Kinetiken nicht erlaubt. Die Bestimmung des absoluten Ortsnullpunkts erwies sich als stabiler und ergab einen Fehler von

± 15 nm. Dies resultierte in einen Kraftfehler von $\approx 0,5 - 0,7$ pN. Somit wurde in erster Linie nicht direkt die Rückfaltungskraft bestimmt, sondern die Ausdehnung des Polypeptids bei der das Rückfaltungsereignis stattfindet. Ist die Konturlänge des Polypeptids bekannt sowie dessen Persistenzlänge, dann lässt sich die Rückfaltungskraft über die Interpolationsformel von Bustamante *et al.* [28] (siehe Gl. 1.1) eindeutig berechnen. Die Position für das Rückfaltungsereignisses wurde entweder per Auge im Lock-in Signal als Knick identifiziert, in den direkten Daten beobachtet, oder per Algorithmus (siehe Abschnitt 2.3) bestimmt.

Blattfedereichung

Bei der direkten Messung von Entfaltungskräften ist die Bestimmung der Blattfederkonstante eine entscheidende Fehlerquelle. Es kommt durchaus vor, dass bei einer alleinigen Eichung über das thermische Rauschspektrum trotzdem noch starke Schwankungen von Experiment zu Experiment auftreten. Um diese Fehlerquelle zu Verringern wurden zusätzlich zur thermischen Eichung die Schwankungen der Blattfederresonanzfrequenz beobachtet. In einer ersten Näherung lässt sich die Blattfeder als harmonischer Oszillator beschrieben, d.h. $\omega = \sqrt{\frac{k_C}{m}}$. Nimmt man an, dass die Blattfeder aus einer Produktionscharge eine vergleichbare Masse $m_1 = m_2$ besitzen, dann gilt folgender Zusammenhang: $\frac{\omega_1^2}{\omega_2^2} = \frac{k_1}{k_2}$. Zur Reduktion von Eichfehlern wurde somit eine Referenzfederhärte pro Blattfedercharge festgelegt und falls nötig die weiteren Blattfeder über obigen Zusammenhang der Resonanzfrequenzen nachgeeicht. Entfaltungskraftverteilungen aus verschiedenen Experimenten wurden wesentlich reproduzierbarer und konnten für die Analyse der Punktmutationsstabilitäten aus Kapitel 7 verwendet werden. Eine Überprüfung der geringen Schwankung stellt in diesem Zusammenhang ein Teil der in Kapitel 7 beschrieben Mutationsdaten dar. Bei Punktmutationen im nativen Zustand, sollte die Entfaltungskraftverteilung des Zwischenzustands unbeeinflusst sein, da die Mutation bereits von der noch gefalteten Struktur weit entfernt ist (vgl. Mutationen S6A - T37G in Abb. 7.3).

F.6 Monte-Carlo-Simulationen

Für die Bestimmung der Lebensdauer des Faltungszwischenzustands von ddFLN4 unter äußerer Kraft im Kapitel 4, sowie die Lebensdauer des Entfaltungszwischenzustands im Kapitel B und die Analyse der Cold Shock Proteine Polymere wurden Monte-Carlo-Simulationen verwendet. In einer Monte-Carlo-Simulation wird ein virtuelles Polymer (Polypeptid) mit der Konturlänge L_C mit konstanter Ziehgeschwindigkeit v_P gestreckt. Nach jedem Zeitschritt Δt ergibt sich eine Veränderung der Ausdehnung $\Delta d = v_P \cdot \Delta t$. Nach jedem Zeitschritt Δt wird die momentan wirkende Kraft mit der WLC-Formel F.9 für die momentane Ausdehnung berechnet:

$$F(d) = \frac{k_B T}{p} \cdot \left(\frac{d}{L_C} + \frac{1}{4 \cdot \left(1 - \frac{d}{L_C}\right)^2} - \frac{1}{4} \right) \quad (\text{F.9})$$

Bei der Simulation des Lock-in Experiments wurde das Kraftsignal zusätzlich mit der Oszillation der Probenoberfläche versehen. Da das simulierte Polypeptid Strukturen enthält, die sich im Zeitverlauf unter Krafteinfluss verändern und eine Konturlängenveränderung von

ΔL_C hervorrufen können, wird die momentane Entfaltungsrates k_{off} bzw. Faltungsrates k_f^{eff} nach jedem Zeitschritt neu berechnet. Für die Faltungsratesberechnung wurde das in Kapitel 3 beschriebene Modell verwendet. Für die Berechnung der Entfaltungsrates wurde das Bell-Modell oder das Kramers-Modell aus Anhang B verwendet [52, 91]. Die Wahrscheinlichkeit für eine Strukturänderung des Polypeptids berechnet sich dann nach Gleichung F.10:

$$P(F) = k(F) \cdot \Delta t \quad (\text{F.10})$$

Für den Fall einer Faltung entspricht $P(F) = P_F(F)$, bei der Simulation eines Entfaltungsvorgangs ist diese Wahrscheinlichkeit die Entfaltungswahrscheinlichkeit $P_U(F)$. Es wurden stets beide Wahrscheinlichkeiten berechnet, wobei im Allgemeinen im Fall der Faltungssimulation lediglich Faltungsereignisse beobachtet wurden und im Fall der Entfaltungssimulation lediglich Entfaltungsereignisse. Diese berechnete Wahrscheinlichkeit wird mit einer durch einen Zufallsgenerator gegebenen Zahl ξ im Intervall $[0,1]$ verglichen. Ist P größer als ξ , dann entscheidet sich die Simulation für die Strukturänderung und das Polypeptid hat die neue Konturlänge $L_C + \Delta L_C$. Es wurde nach jeder Konformationsänderung (Entfaltung/Faltung) die Blattfederrelaxationsphase nach $F(d) = \mp k_c \cdot d$ berechnet, bis $F(d)$ der Kraft für ein Polypeptid mit der neuen Konturlänge $L_C + \Delta L_C$ nach Gleichung F.9 entsprach. Danach wurde das Kraftverhalten wieder nach Gleichung F.9 berechnet. Es ist stets darauf zu achten, dass der Zeitschritt klein genug gewählt wird, so dass die berechneten Wahrscheinlichkeiten immer deutlich unter eins bleiben [95].

F.7 Molekularbiologie

Filamin Konstrukte

Das Protein ddFLN1-5 lag bereits fertig kloniert im Vektor pET 28a+ zwischen den Schnittstellen *Nco I* und *Xho I* vor. Die verwendeten Punktmutationen wurden mittels des Stratagene QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit erzeugt und per anschließender Sequenzierung überprüft.

Das Protein ddFLN1-5 und alle beschriebenen Punktmutanten wurden in *E.coli* Bakterien des Stamms BL21 DE3 Codon Plus RIL exprimiert, zunächst mit einer Ni^{2+} -Affinitätssäule und anschließend mittels Ausschlussäulenchromatographie aufgereinigt.

Ubiquitin Konstrukte

Für Messungen an Ubiquitin wurden zwei unterschiedliche Konstrukte verwendet. Für eine NC-terminale Verlinkung wurde ein Konstrukt aus zwei mal drei homologen Ubiquitinen in den pET28a Vektor zwischen die Schnittstellen *NcoI* und *EcoRI* sowie *BamHI* und *XhoI* geklont. Das Templat wurde als cDNA über Imagenes (Best. Nr.: HU3_p983C0236D, Imagenes GmbH, Berlin) bezogen. [52]

Für Messungen an verschiedenen Verlinkungsrichtungen in Ubiquitin wurde ein Titin-Ubiquitinkonstrukt erstellt. Dazu wurde ein N-terminaler Histag, anschließend drei Titin Domänen (I27-I29) und ein Ubiquitin kloniert. In das C-terminale Ubiquitin wurden bestimmte Codons für die Aminosäuren 16, 35 und 76 durch den Stratagene QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit durch Cystein Codons ausgetauscht, so dass sich die Verlinkungsrichtung N-terminus zu Aminosäuren 16, 35 oder 76 (letztere entspricht einer N-C-terminalen Verlinkung) ergaben.

Die Ubiquitinkonstrukte wurden in *E. coli* Bakterien des Stamms BL21 DE3 Codon Plus RIL exprimiert, zunächst mit einer Ni²⁺-Affinitätssäule und anschließend mittels Ausschlusssäulenchromatographie aufgereinigt. Eine Dimerisierung der Ubiquitin-Titinkonstrukte wurde durch SDS-Page Gelelektrophorese und einer Ausschlusssäulenchromatographie überprüft.

Cold Shock Protein Konstrukte

Die Cold-Shock Proteine wurden purifiziert und lyophilisiert freundlicherweise von Prof. Ben Schuler (Universität Zürich) zur Verfügung gestellt. Zur Polymerisation wurde lediglich PBS Puffer hinzugegeben, so dass die finale Konzentration ca. 3 mg/ml betrug. Nach ca. 3–10 Tagen konnten die ersten Poly-Proteine sowohl auf einem SDS-Gel als auch auf dem Kraftmikroskop beobachtet werden.

F.8 Oberflächenfunktionalisierung

Die Anbindung eines Proteins zwischen Oberfläche und Cantileverspitze erfolgte überwiegend in den letzten Jahren über nicht-spezifische Adsorption. Dabei wurde meist die Probenfläche mit einer ca. 50 nm dicken Goldschicht bedampft und die Blattfedern sollten bereits vom Hersteller goldbedampft geliefert werden. Um die Anbindung zu verbessern, wurden die Oberflächen mit einer NTA-Gruppe funktionalisiert. Diese Nickel-aktivierte NTA-Gruppe ermöglicht es, Probenmoleküle mit einem Histidin-Tag spezifisch anzubinden. Diese einseitig spezifische Anbindung ermöglichte längere Messungen an einem Molekül. Im Folgenden wird das an Sakaki *et al.* [96] angelehnte Oberflächenfunktionalisierungsprotokoll stichpunktartig geschildert:

- Die Glasplättchen wurden gründlich in 2 % Hellmanex und anschließend zweimal in Millipore-Wasser für 10 Minuten sonifiziert und schließlich in einem 70 °C Schrank getrocknet.
- Die getrockneten Glasplättchen wurden für zwei Minuten in einem Plasma-Cleaner (Fa. Harrick, PDC-32G) aktiviert.
- Die Silanisierung fand in einer Toluol Lösung mit 0,5 % v/v 3-Mercapto-Propyl-Trimethoxy-Silan (ABCR AB111219) über Nacht statt.
- Nach zweimaliger Wäsche der Glasplättchen durch reinen Alkohol und zweimaliger Wäsche in Millipore-Wasser wurden die Plättchen für ca. 2 h in wässriger Lösung reduziert (PBS + 5 mM EDTA + 10 mM DTT).
- Die reduzierten Plättchen wurden nach einmaliger Millipore-Wasser Wäsche für ca. 2,5 h bei 70 °C getrocknet.
- Die getrockneten Plättchen wurden auf einer begrenzten Fläche mit ca. 10 μ l einer 2,5 mg/ml Lösung von Maleimido-C3-NTA (Fa. Interchim T3212A) über Nacht inkubiert und am nächsten Tag intensiv mit Millipore-Wasser gewaschen. Die Plättchen wurden entweder in 50 mM NiCl₂ Lösung oder in einer Vakuumkammer gelagert.
- Unmittelbar vor einer Messung wurde die funktionalisierte NTA-Fläche mit 50 mM NiCl₂ aktiviert und anschließend wurde ungebundenes NiCl₂ mit Millipore-Wasser abgespült. Der verbleibende Tropfen wurde mehrfach mit dem im Experiment verwendeten Puffer (meist PBS) gespült, bevor die Proteinlösung aufgetragen wurde.

Literaturverzeichnis

- [1] PLAXCO, K W. ; SPITZFADEN, C ; CAMPBELL, I D. ; DOBSON, C M.: A comparison of the folding kinetics and thermodynamics of two homologous fibronectin type III modules. *J Mol Biol* 270 (1997), S. 763–70
- [2] FERSHT, A R.: *Structure and Mechanism in Protein Science. Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. New York, USA : W H Freeman, 1999
- [3] RIEF, Matthias ; GAUDEL, Mathias ; OESTERHELT, Filipp ; FERNANDEZ, Julio M. ; GAUB, Hermann E.: Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science* 276 (1997), S. 1109–12
- [4] SCHWAIGER, I ; SCHLEICHER, M ; NOEGEL, A A. ; RIEF, M: The Folding Pathway of a Fast Folding Immunoglobulin Domain Revealed by Single Molecule Mechanical Experiments. *EMBO Reports* 6 (2005), S. 46–51
- [5] KELLERMAYER, M S Z. ; SMITH, S B. ; GRANZIER, H L. ; BUSTAMANTE, C: Folding-unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers. *Science* 276 (1997), S. 1112–16
- [6] TSKHOVREBOVA, L ; TRINICK, J ; SLEEP, J A. ; SIMMONS, R M.: Elasticity and unfolding of single molecules of the giant muscle protein titin. *Nature* 387 (1997), S. 308–12
- [7] CECCONI, C ; SHANK, E A. ; BUSTAMANTE, C ; MARQUSEE, S: Direct observation of the three-state folding of a single protein molecule. *Science* 309 (2005), S. 2057–60
- [8] CORNISH, P V. ; HA, T: A survey of single-molecule techniques in chemical biology. *ACS Chem Biol* 2 (2007), S. 53–61
- [9] GREENLEAF, W J. ; WOODSIDE, M T. ; BLOCK, S M.: High-resolution, single-molecule measurements of biomolecular motion. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 36 (2007), S. 171–90
- [10] BINNIG, G ; QUATE, C ; GERBER, C: Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* 56 (1986), S. 930–33
- [11] DIETZ, H ; RIEF, M: Protein structure by mechanical triangulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (2006), S. 1244–7
- [12] MARSZALEK, P E. ; LU, H ; LI, H ; CARRION-VAZQUEZ, M ; OBERHAUSER, A F. ; SCHULTEN, K ; FERNANDEZ, J M.: Mechanical unfolding intermediates in titin modules. *Nature* 402 (1999), S. 100–3
- [13] SCHWAIGER, I ; KARDINAL, A ; SCHLEICHER, M ; NOEGEL, A A. ; RIEF, M: A mechanical unfolding intermediate in an actin-crosslinking protein. *Nat Struct Mol Biol* 11 (2004), S. 81–85
- [14] SCHLIERF, M ; RIEF, M: Temperature Softening of a Protein in Single-Molecule Experiments. *J Mol Biol* 354 (2005), S. 497–503
- [15] OBERHAUSER, A F. ; MARSZALEK, P E. ; ERICKSON, H P. ; FERNANDEZ, J M.: The molecular elasticity of the extracellular matrix protein tenascin. *Nature* 393 (1998), S. 181–5

- [16] RIEF, M ; GAUTEL, M ; SCHEMMELE, A ; GAUB, H E.: The Mechanical Stability of Immunoglobulin and Fibronectin III Domains in the Muscle Protein Titin Measured by AFM. *Biophys J* 75 (1998), S. 3008–14
- [17] CARRION-VAZQUEZ, M ; LI, H ; LU, H ; MARSZALEK, P E. ; OBERHAUSER, A F. ; FERNANDEZ, J M.: The mechanical stability of ubiquitin is linkage dependent. *Nat Struct Biol* 10 (2003), S. 738–43
- [18] SCHLIERF, M ; LI, H ; FERNANDEZ, J M.: The unfolding kinetics of ubiquitin captured with single-molecule force-clamp techniques. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (2004), S. 7299–304
- [19] JUNKER, J P. ; HELL, K ; SCHLIERF, M ; NEUPERT, W ; RIEF, M: Influence of substrate binding on the mechanical stability of mouse dihydrofolate reductase. *Biophys J* 89 (2005), S. L46–8
- [20] SCHWAIGER, I ; SATTLER, C ; HOSTETTER, D R. ; RIEF, M: The myosin coiled-coil is a truly elastic protein structure. *Nat Mater* 1 (2002), S. 232–5
- [21] DIETZ, H: Mechanik des Grün Fluoreszierenden Proteins. *Diplomarbeit an der Fakultät für Physik der LMU München* (2004)
- [22] BERTZ, M ; RIEF, M: Mechanical unfoldons as building blocks of maltose-binding protein. *J Mol Biol* 378 (2008), S. 447–58
- [23] BROCKWELL, D J. ; PACI, E ; ZINOBER, R C. ; BEDDARD, G S. ; OLMSTED, P D. ; SMITH, D A. ; PERHAM, R N. ; RADFORD, S E.: Pulling geometry defines the mechanical resistance of a beta-sheet protein. *Nat Struct Biol* 10 (2003), S. 731–7
- [24] HANN, E ; KIRKPATRICK, N ; KLEANTHOUS, C ; SMITH, D A. ; RADFORD, S E. ; BROCKWELL, D J.: The effect of protein complexation on the mechanical stability of Im9. *Biophys J* 92 (2007), S. L79–81
- [25] SHARMA, D ; PERISIC, O ; PENG, Q ; CAO, Y ; LAM, C ; LU, H ; LI, H: Single-molecule force spectroscopy reveals a mechanically stable protein fold and the rational tuning of its mechanical stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007), S. 9278–83
- [26] OESTERHELT, F ; OESTERHELT, D ; PFEIFFER, M ; ENGEL, A ; GAUB, H E. ; MULLER, D J.: Unfolding pathways of individual bacteriorhodopsins. *Science* 288 (2000), S. 143–6
- [27] OBERHAUSER, A F. ; HANSMA, P K. ; CARRION-VAZQUEZ, M ; FERNANDEZ, J M.: Stepwise unfolding of titin under force-clamp atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (2001), S. 468–72
- [28] BUSTAMANTE, C ; MARKO, J F. ; SIGGIA, E D. ; SMITH, S: Entropic elasticity of lambda-phage DNA. *Science* 265 (1994), S. 1599–1600
- [29] BIERI, O ; WIRZ, J ; HELLRUNG, B ; SCHUTKOWSKI, M ; DREWELLO, M ; KIEFHABER, T: The speed limit for protein folding measured by triplet-triplet energy transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999), S. 9597–601
- [30] HYEON, C B. ; THIRUMALAI, D: Can energy landscape roughness of proteins and RNA be measured by using mechanical unfolding experiments? *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (2003), S. 10249–10253
- [31] MOGLICH, A ; JODER, K ; KIEFHABER, T: End-to-end distance distributions and intrachain diffusion constants in unfolded polypeptide chains indicate intramolecular hydrogen bond formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (2006), S. 12394–9
- [32] FIERZ, B ; SATZGER, H ; ROOT, C ; GILCH, P ; ZINTH, W ; KIEFHABER, T: Loop formation in unfolded polypeptide chains on the picoseconds to microseconds time scale. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (2007), S. 2163–8

- [33] SCHWAIGER, I: *Kraftspektroskopische Untersuchung einzelner Zytoskelett-Proteine*. Dissertation an der Fakultät für Physik der LMU München, 2005
- [34] NÖLTING, B: *Protein Folding Kinetics - Biophysical Methods*. Berlin Heidelberg New York : Springer-Verlag, 1999
- [35] BOUCHIAT, C ; WANG, M D. ; ALLEMAND, J ; STRICK, T ; BLOCK, S M. ; CROQUETTE, V: Estimating the persistence length of a worm-like chain molecule from force-extension measurements. *Biophys J* 76 (1999), S. 409–13
- [36] ARRHENIUS, S: Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. *Z Phys Chem* 4 (1889), S. 226
- [37] JUNKER, J P.: *persönliche Mitteilung* (2008)
- [38] BORNSCHLÖGL, T: *persönliche Mitteilung* (2008)
- [39] FERNANDEZ, J M. ; LI, H: Force-clamp spectroscopy monitors the folding trajectory of a single protein. *Science* 303 (2004), S. 1674–8
- [40] BEST, R B. ; HUMMER, G: Comment on "Force-clamp spectroscopy monitors the folding trajectory of a single protein". *Science* 308 (2005), S. 498
- [41] GEBHARDT, J C M.: *persönliche Mitteilung* (2008)
- [42] SEOL, Y ; LI, J ; NELSON, P C. ; PERKINS, T T. ; BETTERTON, M D.: Elasticity of short DNA molecules: theory and experiment for contour lengths of 0.6-7 microm. *Biophys J* 93 (2007), S. 4360–73
- [43] WEN, J D. ; MANOSAS, M ; LI, P T. ; SMITH, S B. ; BUSTAMANTE, C ; RITORT, F ; I TINOCO, Jr.: Force unfolding kinetics of RNA using optical tweezers. I. Effects of experimental variables on measured results. *Biophys J* 92 (2007), S. 2996–3009
- [44] BEST, R B. ; HUMMER, G: Protein folding kinetics under force from molecular simulation. *J Am Chem Soc* 130 (2008), S. 3706–7
- [45] SCHLIERF, M ; RIEF, M: Single-molecule unfolding force distributions reveal a funnel-shaped energy landscape. *Biophys J* 90 (2006), S. L33–5
- [46] BERKEMEIER, F ; SCHLIERF, M ; RIEF, M: Mechanically controlled preparation of protein intermediates in single molecule experiments. *Physica Status Solidi a* 203 (2006), S. 3492–95
- [47] SCHLIERF, M ; BERKEMEIER, F ; RIEF, M: Direct Observation of Active Protein Folding Using Lock-in Force Spectroscopy. *Biophys J* 93 (2007), S. 3989–98
- [48] PACI, E ; VENDRUSCOLO, M ; KARPLUS, M: Validity of Go models: comparison with a solvent-shielded empirical energy decomposition. *Biophys J* 83 (2002), S. 3032–8
- [49] SCHÖNBRUNNER, N ; KOLLER, K P. ; KIEFHABER, T: Folding of the disulfide-bonded beta-sheet protein tendamistat: rapid two-state folding without hydrophobic collapse. *J Mol Biol* 268 (1997), S. 526–38
- [50] HOFFMANN, A ; KANE, A ; NETTELS, D ; HERTZOG, D E. ; BAUMGARTEL, P ; LENGFELD, J ; REICHARDT, G ; HORSLEY, D A. ; SECKLER, R ; BAKAJIN, O ; SCHULER, B: Mapping protein collapse with single-molecule fluorescence and kinetic synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (2007), S. 105–10
- [51] FLORY, P J.: *Statistical Mechanics of Chain Molecules*. München : Hanser, 1988
- [52] BELL, G I.: Models for the Specific Adhesion of Cells to Cells. *Science* 200 (1978), S. 618–27
- [53] 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 (1999), S. 2721–6

- [54] VALE, R D.: AAA proteins. Lords of the ring. *J Cell Biol* 150 (2000), S. F13–9
- [55] JACKSON, S E.: How do small single-domain proteins fold? *Fold Des* 3 (1998), S. R81–91
- [56] JACKSON, S E.: Ubiquitin. a small protein folding paradigm. *Organic and Biomolecular Chemistry* 4 (2006), S. 1845–53
- [57] WALTHER, K A. ; GRATER, F ; DOUGAN, L ; BADILLA, C L. ; BERNE, B J. ; FERNANDEZ, J M.: Signatures of hydrophobic collapse in extended proteins captured with force spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007), S. 7916–21
- [58] CARRION-VAZQUEZ, M ; OBERHAUSER, A F. ; FOWLER, S B. ; MARSZALEK, P E. ; BROEDEL, S E. ; CLARKE, J ; FERNANDEZ, J M.: Mechanical and chemical unfolding of a single protein: a comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999), S. 3694–9.
- [59] WENT, H M. ; BENITEZ-CARDOZA, C G. ; JACKSON, S E.: Is an intermediate state populated on the folding pathway of ubiquitin? *FEBS Lett* 567 (2004), S. 333–8
- [60] BEST, R B. ; PACI, E ; HUMMER, G ; DUDKO, O K.: Pulling Direction as a Reaction Coordinate for the Mechanical Unfolding of Single Molecules. *J Phys Chem B* (2008)
- [61] JOURDAN, M ; SEARLE, M S.: Cooperative assembly of a natively like ubiquitin structure through peptide fragment complexation: energetics of peptide association and folding. *Biochemistry* 39 (2000), S. 12355–64
- [62] DUDKO, O K. ; HUMMER, G ; SZABO, A: Intrinsic rates and activation free energies from single-molecule pulling experiments. *Phys Rev Lett* 96 (2006), S. 108101
- [63] BORNSCHLÖGL, T ; RIEF, M: Single-molecule dynamics of mechanical coiled-coil unzipping. *Langmuir* 24 (2008), S. 1338–42
- [64] WEST, D K. ; BROCKWELL, D J. ; PACI, E: Prediction of the translocation kinetics of a protein from its mechanical properties. *Biophys J* 91 (2006), S. L51–3
- [65] FERSHT, A R. ; MATOUSCHEK, A ; SERRANO, L: The folding of an enzyme. I. Theory of protein engineering analysis of stability and pathway of protein folding. *J Mol Biol* 224 (1992), S. 771–82
- [66] BEST, R B. ; FOWLER, S B. ; TOCA-HERRERA, J L. ; CLARKE, J: A simple method for probing the mechanical unfolding pathway of proteins in detail. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (2002), S. 12143–8
- [67] WILLIAMS, P M. ; FOWLER, S B. ; BEST, R B. ; TOCA-HERRERA, J L. ; SCOTT, K A. ; STEWARD, A ; CLARKE, J: Hidden complexity in the mechanical properties of titin. *Nature* 422 (2003), S. 446–9
- [68] BACHMANN, A ; KIEFHABER, T: Apparent two-state tendamistat folding is a sequential process along a defined route. *J Mol Biol* 306 (2001), S. 375–86
- [69] BROCKWELL, D J. ; RADFORD, S E.: Intermediates: ubiquitous species on folding energy landscapes? *Curr Opin Struct Biol* 17 (2007), S. 30–7
- [70] GROMIHA, M M.: Prediction of protein stability upon point mutations. *Biochem Soc Trans* 35 (2007), S. 1569–73
- [71] SANCHEZ, I E. ; KIEFHABER, T: Origin of unusual phi-values in protein folding: evidence against specific nucleation sites. *J Mol Biol* 334 (2003), S. 1077–85
- [72] RIOS, M A. I. ; MURALIDHARA, B K. ; WILDES, D ; SOSNICK, T R. ; MARQUSEE, S ; WITTUNG-STAFSHEDE, P ; PLAXCO, K W. ; RUCZINSKI, I: On the precision of experimentally determined protein folding rates and phi-values. *Protein Sci* 15 (2006), S. 553–63

- [73] FOWLER, S B. ; CLARKE, J: Mapping the Folding Pathway of an Immunoglobulin Domain. Structural Detail from Phi Value Analysis and Movement of the Transition State. *Structure* 9 (2001), S. 355–66
- [74] GEIERHAAS, C D. ; PACI, E ; VENDRUSCOLO, M ; CLARKE, J: Comparison of the transition states for folding of two Ig-like proteins from different superfamilies. *J Mol Biol* 343 (2004), S. 1111–23
- [75] DIETZ, H ; BERKEMEIER, F ; BERTZ, M ; RIEF, M: Anisotropic deformation response of single protein molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (2006), S. 12724–8
- [76] DIETZ, H ; RIEF, M: Elastic bond network model for protein unfolding mechanics. *Phys Rev Lett* 100 (2008)
- [77] EVANS, E ; RITCHIE, K: Strength of a weak bond connecting flexible polymer chains. *Biophys J* 76 (1999), S. 2439–47
- [78] LI, H ; CARRION-VAZQUEZ, M ; OBERHAUSER, A F. ; MARSZALEK, P E. ; FERNANDEZ, J M.: Point mutations alter the mechanical stability of immunoglobulin modules. *Nat Struct Biol* 7 (2000), S. 1117–20
- [79] NG, S P. ; ROUNSEVELL, R W. ; STEWARD, A ; GEIERHAAS, C D. ; WILLIAMS, P M. ; PACI, E ; CLARKE, J: Mechanical unfolding of TNfn3: the unfolding pathway of a fnIII domain probed by protein engineering, AFM and MD simulation. *J Mol Biol* 350 (2005), S. 776–89
- [80] RIEF, M ; CLAUSEN-SCHAUMANN, H ; GAUB, H E.: Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules. *Nat Struct Biol* 6 (1999), S. 346–9
- [81] LU, H ; SCHULTEN, K: The key event in force-induced unfolding of titin's immunoglobulin domains. *Biophys J* 79 (2000), S. 51–65
- [82] NEUDECKER, P ; ZARRINE-AFSAR, A ; DAVIDSON, A R. ; KAY, L E.: Phi-value analysis of a three-state protein folding pathway by NMR relaxation dispersion spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (2007), S. 15717–22
- [83] ENGLANDER, S W. ; MAYNE, L ; KRISHNA, M M.: Protein folding and misfolding: mechanism and principles. *Q Rev Biophys* 40 (2007), S. 287–326
- [84] ZERELLA, R ; CHEN, P Y. ; EVANS, P A. ; RAINE, A ; WILLIAMS, D H.: Structural characterization of a mutant peptide derived from ubiquitin: implications for protein folding. *Protein Sci* 9 (2000), S. 2142–50
- [85] BOLTON, D ; EVANS, P A. ; STOTT, K ; BROADHURST, R W.: Structure and properties of a dimeric N-terminal fragment of human ubiquitin. *J Mol Biol* 314 (2001), S. 773–87
- [86] HOHNG, S ; ZHOU, R ; NAHAS, M K. ; YU, J ; SCHULTEN, K ; LILLEY, D M. ; HA, T: Fluorescence-force spectroscopy maps two-dimensional reaction landscape of the holliday junction. *Science* 318 (2007), S. 279–83
- [87] HOWARD, J: *Mechanics of Motor Proteins and the cytoskeleton*. Sunderland, USA : Sinauer Associates, Inc., 2001
- [88] KRAMERS, H A.: Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions. *Physica* 7 (1940), S. 284–304
- [89] WEST, D K. ; PACI, E ; OLMSTED, P D.: Internal protein dynamics shifts the distance to the mechanical transition state. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 74 (2006), S. 061912
- [90] WOODSIDE, M T. ; ANTHONY, P C. ; BEHNKE-PARKS, W M. ; LARIZADEH, K ; HERSCHLAG, D ; BLOCK, S M.: Direct measurement of the full, sequence-dependent folding landscape of a nucleic acid. *Science* 314 (2006), S. 1001–4

-
- [91] SCHLIERF, M: *Untersuchung der Energielandschaft von Proteinen mittels Einzelmolekülkraftspektroskopie*. Diplomarbeit an der Fakultät für Physik der LMU München, 2004
- [92] SCHULER, B ; LIPMAN, E A. ; EATON, W A.: Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy. *Nature* 419 (2002), S. 743–7
- [93] DIETZ, H ; BERTZ, M ; SCHLIERF, M ; BERKEMEIER, F ; BORNSCHLOGL, T ; JUNKER, J P. ; RIEF, M: Cysteine engineering of polyproteins for single-molecule force spectroscopy. *Nat Protoc* 1 (2006), S. 80–4
- [94] RIEF, M ; PASCUAL, J ; SARASTE, M ; GAUB, H E.: Single Molecule Force Spectroscopy of Spectrin Repeats: Low Unfolding Forces in Helix Bundles. *J Mol Biol* 286 (1999), S. 553–61
- [95] RIEF, M ; FERNANDEZ, J M. ; GAUB, H E.: Elastically Coupled Two-Level-Systems as a Model for Biopolymer Extensibility. *Phys Rev Let* 81 (1998), S. 4764–67
- [96] SAKAKI, N ; SHIMO-KON, R ; ADACHI, K ; ITOH, H ; FURUIKE, S ; MUNEYUKI, E ; YOSHIDA, M ; KINOSHITA, K J.: One rotary mechanism for F1-ATPase over ATP concentrations from millimolar down to nanomolar. *Biophys J* 88 (2005), S. 2047–56

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all den Menschen danken, die während der letzten Jahre nicht minder zum Erfolg dieser Dissertation beigetragen haben. Ein wesentlicher Faktor war die hervorragende Arbeitsatmosphäre am Lehrstuhl für Biophysik.

Insbesondere gebührt großer Dank Matthias Rief, unter dessen Betreuung diese Dissertation entstand. Sein Engagement, seine Ideen und sein kritisches Hinterfragen lieferten stets neue Motivation. So war ich schnell von der Schönheit einzelner Moleküle überzeugt. Sowohl die Freiheit einfach mal Neues auszuprobieren und die hervorragende technischen Ausstattung am Lehrstuhl ermöglichten diese Arbeit.

Weiterhin möchte ich den beiden Mitgründern des Büros von *The Joy Division*, Morten Bertz und Jan Philipp Junker, danken. Sie sorgten nicht nur für eine hervorragende Bürokultur bei der Erkundung des Inneren der Welt und eine “passion for force”, sondern ermöglichten auch jederzeit zahlreiche, hilfreiche Diskussionen und kritische Nachfragen. Danken möchte ich auch Felix Berkemeier für seine produktive Unterstützung bei simulationstechnischen Belangen und dem ein oder anderen Mac und L^AT_EX Tipp. Melanie Reisinger möchte ich für die tolle Zusammenarbeit beim Aufbau der Nanoday-Versuchs *Optische Pinzette* danken – der nun auch der Öffentlichkeit im Deutschen Museum präsentiert werden wird.

Auch möchte ich Thomas Kiefhaber und Annett Bachmann danken, die äußerst spontan und unkompliziert große Unterstützung bei der Suche nach einem Zwischenzustand leisteten. Jane Clarke und Sarah Batey gebührt Dank für die vielen Ensemble Experimente zur Faltung von ddFLN4.

Für die hervorragende technische Unterstützung bei der Proteinaufreinigung möchte ich Monika Rusp, Claudia Antrecht, Gabi Chmel und Karin Vogt danken. Rudi Lehrhuber sei für den technischemechanischen Support gedankt. Auch Johann Jaud, Christof Gebhardt, Thomas Bornschlögl, Murat Tutus, Jochen Oehlke, Fabian Ziegler, Angeliki Tsokou, Christina Lumme und dem restlichen E22 gebührt Dank für die hilfreiche Unterstützung, die fachlichen und nicht fachlichen Diskussionen.

Für die finanzielle und ideelle Unterstützung, die zahlreiche Konferenzbesuche ermöglichte, möchte ich dem Doktorandenkolleg NanoBioTechnologie sowie der Studienstiftung des deutschen Volkes danken. Zu guter Letzt möchte ich Michèle Theißen und Johannes Oberreuter, meinen Eltern und meinen Brüdern für die zahlreichen Unterstützungen jeglicher Art danken.

Lebenslauf

Michael Schlierf
Orléansstr. 47
81667 München

*1. November 1978	Nürnberg
1985 - 1989	Besuch der Grundschule Rednitzhembach
1989 - 1998	Besuch des Adam-Kraft-Gymnasiums Schwabach
26. Juni 1998	Allgemeine Hochschulreife
1998 - 1999	Zivildienst bei der Lebenshilfe Schwabach-Roth
1999 - 2004	Studium der Diplom-Physik an der Ludwig-Maximilians-Universität München
2001 - 2002	Studium der “physique fondamentale” an der Université Paris-Sud Orsay
04 – 07/2002	stage facultative im Labor von Prof. Leonard Rabinow
02 – 05/2003	Research scholar im Labor von Prof. Julio Fernandez
15. Dezember 2004	Diplom Physik
seit Februar 2005	Promotion an der Fakultät für Physik der Technischen Universität München
2001 - 2004	Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
2005 - 2008	Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
2005 - 2008	Stipendiat des Internationalen Doktoranden Kollegs für NanoBio-Technologie (IDK-NBT) des Elitenetzwerks Bayern