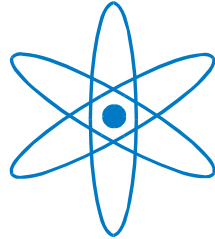


PHYSIK-DEPARTMENT



Dissoziationsmechanik einzelner Proteinkomplexe

Dissertation

von

Morten Bertz



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biophysik E22

Physikdepartment

Dissoziationsmechanik einzelner Proteinkomplexe

Morten H. Bertz

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Martin Zacharias

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Matthias Rief
2. Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner

Die Dissertation wurde am 11.03.2010 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Physik
am 12.04.2010 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	iii
Tabellenverzeichnis	vii
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
3 Grundlagen	5
3.1 Das Kraftmikroskop	5
3.2 Elastizität von Proteinen	6
3.3 Faltung und Entfaltung unter Kraft	8
3.4 Monte-Carlo-Simulationen	10
4 Proteinkomplexe im Muskel	13
4.1 Stabilität des Titin-Telethonin-Komplexes	15
4.2 Mechanische Stabilität der Interaktion zwischen Titin und Obscurin / Obscurin-like Protein in der M-Scheibe	23
4.3 Dimerstabilität des M-Scheiben-Proteins Myomesin	29
4.4 Stabilität der Dimerisierungsdomäne des Aktin-Quervernetzers Filamin	39
5 Proteinkomplexe aus Immunglobulindomänen	59
5.1 Dissoziationskraft des α -Crystallin Dimers aus Hsp16,5	60
5.2 Mechanische Stabilität des C _H 3-Dimers eines Antikörpers	75
6 Abschließende Diskussion	85
6.1 Messung von Dissoziationskräften verknüpfter Komplexe	85
6.2 Stabilität von Interaktionen zwischen Immunglobulindomänen	88

7 Ausblick	93
Anhang	97
A Mechanische Hierarchien in großen Proteinen	97
A.1 Unfoldons als Bausteine des Maltose-bindenden Proteins	98
A.2 Richtungsabhängige Stabilisierung durch Ligandenbindung des Maltose-bindenden Proteins	106
A.3 Mechanische Kontrolle des Entfaltungspfades des grün-fluoreszierenden Proteins	116
A.4 Abschließende Diskussion	124
B Methoden und Sequenzen	127
B.1 Methoden	127
B.2 Sequenzinformationen	128
Literaturverzeichnis	133
Danksagung	141

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Schematische Darstellung eines Kraftmikroskops. _____	6
Abbildung 3.2: Elastisches Verhalten von Proteinen nach dem WLC-Model. _____	7
Abbildung 3.3: Entfaltung eines Proteins aus identischen Untereinheiten. _____	8
Abbildung 3.4: Das Zwei-Zustands-Model für Proteinfaltung. _____	9
Abbildung 3.5: Simulierte Kraft-Ausdehnungs-Kurve mit drei gekoppelten Ereignissen. _____	11
Abbildung 4.1: Schematische Übersicht des Sarkomers. _____	13
Abbildung 4.2: Lokalisation der in Abschnitt 4.1 - 4.4 untersuchten Proteinkomplexen des Sarkomers. _____	14
Abbildung 4.3: Lokalisation und Struktur des Titin-Telethonin Komplexes _____	15
Abbildung 4.4: Cysteinmutanten machen den Bruch des Titin-Telethonin- Komplexes sichtbar. _____	16
Abbildung 4.5: Stabilität des Titin-Telethonin-Komplexes in C-terminaler Belastungsrichtung: _____	17
Abbildung 4.6: Stabilität des Z1-Z2 Domänenpaars. _____	19
Abbildung 4.7: Stabilität des Z1Z2 Domänenpaars im Komplex mit Telethonin. _____	19
Abbildung 4.8: Stabilität des Titin-Telethonin-Komplexes bei N-terminaler Belastung. _____	20
Abbildung 4.9: Der Titin-Telethonin-Komplex ist eine hochstabile, gerichtete Bindung. _____	21
Abbildung 4.10: Lage der Titin-Obscurin Interaktion im Sarkomer. _____	23
Abbildung 4.11: Mechanische Stabilität von M10-O1 / M10-OL1 _____	25
Abbildung 4.12: Dissoziation des M10-O(L)1 Komplexes. _____	26
Abbildung 4.13: Lage des M-Scheiben Proteins Myomesin im Sarkomer. _____	29
Abbildung 4.14: Stabilität des wildtyp Myomesin-Dimers. _____	31
Abbildung 4.15: Modellierter Struktur des cystein-verknüpften Myomesindimers _____	32
Abbildung 4.16: Stabilität des Cystein-verknüpften Myomesin-Homodimers. _____	34
Abbildung 4.17: Strukturelle Interpretation des Entbindungs-/ Entfaltungspfades von Myomesin 13. _____	35
Abbildung 4.18: Bruchkraftverteilungen der Entbindung/Entfaltung von Myomesin 13. _____	36
Abbildung 4.19: Lokalisation und Struktur von Filamin _____	40
Abbildung 4.20: Dissoziation von ddFLN6 unter Kraft. _____	42
Abbildung 4.21: Dissoziation von ddFLN6 bei verschiedenen Ziehgeschwindigkeiten. _____	43
Abbildung 4.22: Strukturelle Interpretation des Entbindungs-/ Entfaltungspfades von ddFLN6. _____	44
Abbildung 4.23: Thermodynamische Stabilität des ddFLN56 Domänenpaars und Einfluss des Interdomänenlinkers. _____	45

Abbildung 4.24: Mechanische Stabilität von ddFLN6 Δ Helix. _____	46
Abbildung 4.25: Struktur des Linkers zwischen ddFLN5 und ddFLN6. _____	47
Abbildung 4.26: Die N-terminale α -Helix erhöht die Lebensdauer des ddFLN6 Dimers unter Kraft. _____	48
Abbildung 4.27: Destabilisierung der β -Faltblätter von ddFLN6 durch eine N-terminale α -Helix. ____	51
Abbildung 4.28: Lokalisation und Struktur von Filamin. _____	53
Abbildung 4.29: Dissoziationskraft von FLNC24. _____	54
Abbildung 4.30: Entfaltung von FLNC23. _____	56
Abbildung 5.1: Struktur von Immunglobulindomänen _____	59
Abbildung 5.2: Struktur von Hsp16,5 aus <i>Methanococcus janashii</i> . _____	60
Abbildung 5.3: Gleichgewichtsstabilität von 16,5 α . _____	61
Abbildung 5.4: Mechanische Stabilität von wild-typ 16,5 α . _____	63
Abbildung 5.5: Dissoziation von disulfidverknüpftem 16,5 α . _____	64
Abbildung 5.6: Schrittweiser Bruch von disulfidverknüpftem 16,5 α . _____	65
Abbildung 5.7: Verknüpfungsmöglichkeiten des chimären Ubiquitin-16,5 α Proteins. _____	66
Abbildung 5.8: Entbindung und Entfaltung von Ubiquitin-verknüpftem 16,5 α . _____	67
Abbildung 5.9: Entfaltung von 16,5 α im Dimer. _____	68
Abbildung 5.10: Entbindungs-/ Entfaltungspfad von 16,5 α . _____	69
Abbildung 5.11: Bruchkraftverteilungen von der Entbindung / Entfaltung von 16,5 α . _____	70
Abbildung 5.12: Lokalisation des C _{H3} -Dimers in der Antikörperstruktur. _____	75
Abbildung 5.13: Dissoziation des oxidierten C _{H3} -Dimers: _____	78
Abbildung 5.14: Dissoziation des gemischt oxidierten / reduzierten C _{H3} -Dimers. _____	79
Abbildung 5.15: Dissoziation des vollständig reduzierten C _{H3} -Domänenpaars. _____	80
Abbildung 5.16: Dissoziationskraft von C _{H3} in Abhängigkeit des Redoxzustandes. _____	81
Abbildung 5.17: Größenausschlusschromatographie von C _{H3} . _____	84
Abbildung 6.1: Messung von Dissoziationskräften _____	87
Abbildung 6.2: Übersicht der untersuchten Proteinkomplexe _____	89
Abbildung 7.1: Messung der Mechanik von Proteinnetzwerken. _____	95
Abbildung A.1: Struktur (A) und Topologie (B) des Maltose-bindenden Proteins _____	98
Abbildung A.2: Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurven (A) und Bruchkraft-verteilungen (B) der vier Unfoldons von MBP. _____	99
Abbildung A.3: Disulfidmutanten von MBP. _____	100
Abbildung A.4: Strukturelle Interpretation des Entfaltungspfades von MBP. _____	102
Abbildung A.5: Thermodynamische Stabilität von MBP Kürzungsmutanten. _____	103

Abbildung A.6: Mechanische Stabilität von M23. _____	104
Abbildung A.7: Einfluss von Ligandenbindung auf die mechanische Stabilität von MBP _____	106
Abbildung A.8: Disulfidbrücken-verknüpfte Polymere von MBP. _____	107
Abbildung A.9: Entfaltung von MBP entlang der Richtung 53-141. _____	108
Abbildung A.10: Charakterisierung des Entfaltungsintermediats von MBP(53-141). _____	109
Abbildung A.11: Erhöhte mechanische Stabilität durch Ligandenbindung für MBP(53-141). _____	110
Abbildung A.12: Messen der Konformationsänderung von MBP. _____	111
Abbildung A.13: Die Stabilisierung von MBP(53-141) durch Maltose ist ein lokaler Effekt. _____	112
Abbildung A.14: Entfaltung von GFP(3-212). _____	117
Abbildung A.15: Entfaltung von GFP(3-212) Mutanten. _____	118
Abbildung A.16: Bruchkraftverteilungen von GFP(3-212) und Mutanten. _____	119
Abbildung A.17: Verschiedene Belastungsrichtungen von GFP: _____	120
Abbildung A.18: Entfaltung von GFP(3-198). _____	121
Abbildung A.19: Schematische Energielandschaft von GFP. _____	122

Tabellenverzeichnis

Tabelle A.1: Stabilität der vier Entfaltungübergänge von MBP	99
Tabelle A.2: Konturlängenzuwächse von wildtyp MBP und Disulfidmutanten.	101

1 Zusammenfassung

Bei vielen Vorgängen in Lebewesen wirken mechanische Kräfte. Kraftspektroskopische Experimente konnten in den vergangenen Jahren wichtige Einblicke in die Mechanik einzelner Proteine des Muskels und des Cytoskeletts liefern. In einem zellulären Kontext wirken diese Proteine allerdings nicht für sich alleine, sondern lagern sich mit anderen Proteinen oder mit sich selbst zu größeren Komplexen zusammen. Für ein vollständiges Verständnis des mechanischen Verhaltens dieser Proteine ist es daher notwendig, die Dissoziationskräfte dieser Protein-Protein-Wechselwirkungen zu kennen. In dieser Arbeit wurden Methoden entwickelt, um Dissoziationskräfte einzelner dimerer und trimerer Komplexe aus Proteinen des Cytoskeletts und des Muskels zu bestimmen und den gesamten Entbindungs-/ Entfaltungspfad dieser Komplexe zugänglich zu machen.

Im Muskel wirken bei Dehnung oder Kontraktion beträchtliche Kräfte. Das Protein Titin wirkt als elastische Feder diesen Kräften entgegen, was eine stabile Verankerung im Muskel erfordert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Verankerung über die Bildung eines Komplexes mit Telethonin eine hochstabile Bindung darstellt, allerdings nur, wenn sie in physiologischer Richtung mit Kraft belastet wird. Am anderen Ende des Filaments bildet Titin zusammen mit Obscurin oder Obscurin-like Protein einen Komplex, der sich als mechanisch nur wenig stabil erwies. Viele weitere Proteine des Muskels und des Cytoskeletts, die andere Filamente quervernetzen, bilden Dimere aus zwei gleichen Untereinheiten. So auch der Aktinquervernetzer Filamin, für den gezeigt werden konnte, dass diese Dimerbindung die mechanisch schwächste Komponente des Moleküls ist, was wichtige Implikationen für die mechanische Hierarchie dieses Proteins hat. Im Muskelprotein Myomesin, welches Myosinfilamente vernetzt, stellte sich die Dimerbindung dagegen als stabiler als der Rest des Moleküls heraus.

Komplexe aus ähnlich aufgebauten Untereinheiten treten auch zwischen Proteinen auf, die in der Zelle nicht mechanisch belastet werden. Zwei Komplexe aus einem Hitzeschockprotein beziehungsweise einem Antikörper wurden in dieser Arbeit untersucht. Neben den Dissoziationskräften der Dimere konnten auch die Stabilitäten der Monomere bestimmt werden, was Rückschlüsse auf die Bildung dieser Komplexe zulässt.

Die hier vorgestellten Messungen zu Entbindungs-/ Entfaltungspfaden einzelner Proteinkomplexe öffnen die Tür zu einer detaillierteren Untersuchung der Mechanik von Protein-Protein-Wechselwirkungen und zu einem besseren Verständnis mechanischer Hierarchien von Proteinen des Muskels und des Cytoskeletts.

2 Einleitung

Proteine sind die Grundbausteine der Zelle. Sie bilden die Grundlage für Replikation der Erbsubstanz, Gewinnung von Energie, Bewegung und Gestalt von zellulären Systemen. Um diese Aufgaben zu erfüllen, ist es zunächst erforderlich, dass Proteine eine wohl definierte Raumstruktur einnehmen, die als Tertiärstruktur bezeichnet wird. Allerdings wirken Proteine in der Zelle nicht für sich alleine, oft müssen sie sich, um funktionsfähig zu sein, zu Komplexen zusammenlagern. Diese Proteinkomplexe werden als Quartärstruktur bezeichnet, wobei die Interaktion der Proteine miteinander nur kurz oder auch von langer Dauer sein kann. Komplexe Proteinmaschinen aus teilweise mehreren Dutzend verschiedener Proteinen sind für so verschiedene Aufgaben wie den intrazellulären Transport, die Detektion von und die Reaktion auf externe Reize, die Synthese chemischer Stoffe und die Vervielfältigung der Erbinformation verantwortlich.

Viele Prozesse innerhalb einer Zelle sind mechanischer Natur und hängen damit von den mechanischen Eigenschaften der beteiligten Proteine ab. Das offensichtlichste Beispiel sind Muskelzellen: Hier ändert das Protein Myosin unter Verbrauch von Energie seine Konformation und kann an Filamenten, die aus dem Protein Aktin bestehen, entlang gleiten: Der Muskel kontrahiert, wodurch Gliedmaßen bewegt werden können. Neben den beiden kontraktilen Proteinen Aktin und Myosin ist eine ganze Reihe weiterer Proteine im Muskel dafür verantwortlich, Kraftungleichgewichte im Muskel auszugleichen und dafür Sorge zu tragen, dass der Muskel durch passives Dehnen keinen Schaden nimmt. Viele dieser Proteine sind ebenfalls lange Filamente, die ähnlich einer Perlenkette aus zahlreichen aneinandergereihten, ähnlich aufgebauten Untereinheiten zusammengesetzt sind. Die wichtigsten Vertreter dieser Untereinheiten sind Immunglobulin(Ig)-Domänen. Dieses Faltungsmotiv ist weit verbreitet und kommt neben strukturellen Proteinen des Cytoskeletts auch in den namensgebenden Antikörpern des Immunsystems vor. Ig-Domänen dienen nicht nur dem Aufbau der filamentösen Proteine, sie sorgen auch für Interaktionen mit anderen Proteinen, vor allem an den Enden der Filamente.

In den vergangenen Jahren konnten Einzelmolekülexperimente zahlreiche Einblicke in das mechanische Verhalten dieser Art von Proteinen liefern. Da filamentösen Proteine oft mehrmals reversibel entfaltet und rückgefaltet werden konnten, wird in vielen Fällen angenommen, dass die Entfaltung einzelner Untereinheiten dazu dienen könnte, das Protein bei Belastung zu verlängern und damit die Kraft, die auf die Proteinstruktur wirkt, zu verringern. Das mechani-

sche Verhalten eines Proteinnetzwerks wird jedoch von der schwächsten Komponente bestimmt. Eine Beschreibung der Mechanik dieser Proteine ist daher nur vollständig, wenn auch die Stabilität der Protein-Protein-Interaktionen bekannt ist. Diese Arbeit hat sich zum Ziel gesetzt, die mechanische Stabilität von Protein-Protein-Interaktionen unter Beteiligung von Immunglobulindomänen zu bestimmen, die einen großen Teil der strukturell bekannten Interaktionen von Muskelproteinen darstellen. Die Messung von Dissoziationskräften zwischen Proteinkomplexen mithilfe mechanischer Methoden basiert für gewöhnlich darauf, eine Oberfläche mit einem Protein und eine Sonde, beispielsweise die Blattfederspitze eines Kraftmikroskops, mit dem Bindungspartner zu funktionalisieren. Komplexe aus Ig-Domänen sind allerdings oftmals aus identischen Untereinheiten aufgebaut, die nur im Komplex ihre korrekte Struktur einnehmen, so dass diese Strategie nicht anwendbar ist. Statt dessen wurde eine Messmethode entwickelt, bei der die Untereinheiten des Komplexes kovalent miteinander verbunden wurden. Hierdurch wird über die Dissoziationskraft hinaus auch noch die Stabilität der Bestandteile des Komplexes zugänglich.

Diese Methode wurde eingesetzt, um zahlreiche strukturell unterschiedliche Komplexe aus Ig-Domänen eingehend zu untersuchen. Diese Daten ermöglichen eine vollständigere Beschreibung des mechanischen Verhaltens wichtiger Proteine des Muskels und des Cytoskeletts und gewähren darüber hinaus Einblicke, wie die Natur besonders stabile und langlebige Bindungen realisiert.

3 Grundlagen

3.1 Das Kraftmikroskop

Seit den frühen 1980er Jahren besitzt das Rasterkraftmikroskop (engl. *atomic force microscope AFM*) eine herausragende Bedeutung zur hochauflösenden Abbildung von Oberflächen (Binnig, Quate et al. 1986). Hierbei wird eine Probe mit einer sehr scharfen Spitze, die auf verschiedene Weise mit der Probe interagieren kann, abgerastert, um eine Topographie der Oberfläche zu erhalten. Jüngere Entwicklungen erlauben unter anderem eine höhere Abtastgeschwindigkeit (Shibata, Yamashita et al. 2010) oder das gleichzeitige Abbilden von Proben topographie und Bindungsstellen durch funktionalisierte Abtastspitzen (Stroh, Ebner et al. 2004).

Ein Rasterkraftmikroskop lässt sich allerdings nicht nur zur Bildgebung einsetzen, eine weitere wichtige Anwendung ist das Messen von Kräften auf der Ebene einzelner Biomoleküle (Kraftspektroskopie). So konnten durch kraftspektroskopische Experimente die mechanischen Eigenschaften von Zuckern (Rief, Oesterhelt et al. 1997), DNA (Clausen-Schaumann, Rief et al. 2000) und Proteinen (Rief, Gautel et al. 1997) gemessen werden, indem diese Moleküle zwischen Abtastfeder und Oberfläche eingespannt und mit Kraft belastet wurden.

In dieser Arbeit wurde ein Kraftmikroskop ähnlich dem in Abbildung 3.1 dargestellten verwendet. Die Probe befindet sich auf einem mit Piezotisch, der mit Nanometer-Präzision in vertikaler Richtung bewegt werden kann. Zur Kraftmessung dient eine Blattfeder, an deren Ende eine feine Nadel mit einem Krümmungsradius von ~ 30 nm angebracht ist. Die Verbiegung der Blattfeder wird mit einem Lichtzeiger auf einer segmentierten Photodiode detektiert, hierbei dient das Differenzsignal zwischen den oberen und unteren Diodensegmenten als Messgröße. Da der Radius der Blattfederspitze deutlich über der Ausdehnung von einzelnen Proteinen liegt, werden Polymere aus sich wiederholenden Proteinuntereinheiten eingesetzt, um die eingespannten Proteine zu entfalten (Abbildung 3.1 rechts). Das regelmäßige Entfaltungsmuster eines solchen Polyproteins erleichtert darüber hinaus die Identifizierung von Einzelmolekül-Entfaltungseignissen.

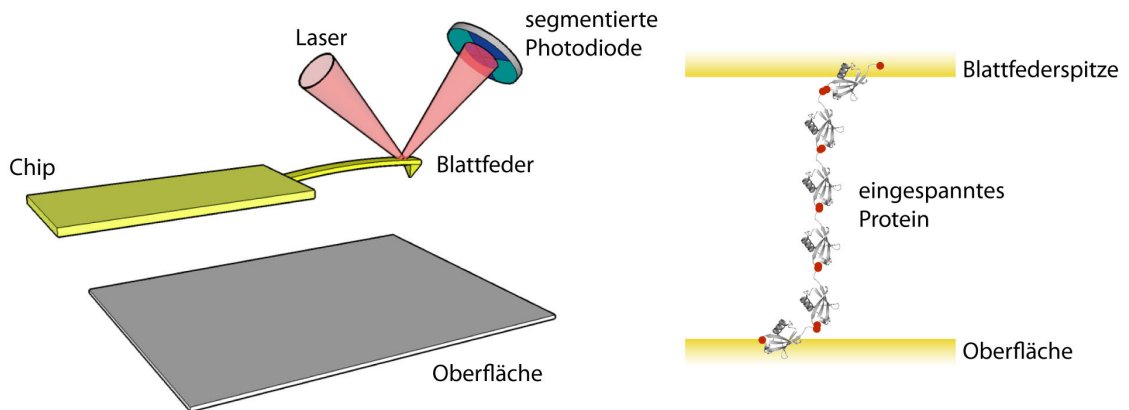


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung eines Kraftmikroskops.

In einem Kraftmikroskop wird ein Protein zwischen Blattfederspitze und Oberfläche eingespannt und mit Kraft belastet, indem der Abstand zwischen Blattfederspitze und Oberfläche erhöht wird. Die auf das Protein wirkende Kraft wird durch einen Lichtzeiger detektiert.

3.2 Elastizität von Proteinen

Zur Analyse von kraftspektroskopisch gewonnenen Entfaltungsdaten ist ein Verständnis der Elastizität von gefaltetem und entfaltetem Polypeptid erforderlich. In der gefalteten Struktur wird ein Protein von einer Vielzahl an Wechselwirkungen stabilisiert und kann deshalb durch eine Kraft nur wenig ausgedehnt werden (schematisch in Abbildung 3.2 schwarz). Die Elastizität von entfaltetem Protein ist in erster Linie entropischen Ursprungs und kann durch Polymerelastizitätsmodelle beschrieben werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die von Bustamante et al. vorgeschlagene Interpolationsformel (Bustamante, Marko et al. 1994) für das *worm-like chain* (WLC) Model angewendet, um die Elastizität der entfalteten Polypeptidkette zu beschreiben (Glg. 1). Im WLC-Model wird ein Polymer durch seine Gesamtlänge (Konturlänge) L und seine Persistenzlänge (Steifigkeit) p beschrieben.

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

Hierbei ist k_B die Boltzmannkonstante und T die Temperatur. Als Persistenzlänge für Polypeptidketten wurde ein fester Wert von $p = 0,5$ nm verwendet, so dass die Konturlänge L als einziger freier Parameter des WLC-Modells verbleibt (Abbildung 3.2 rot).

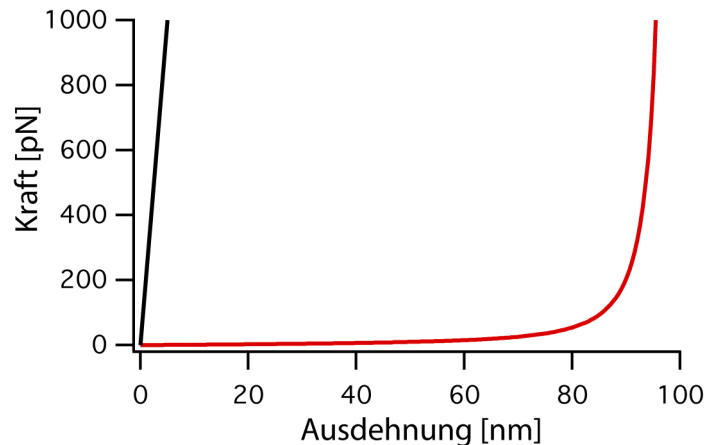


Abbildung 3.2: Elastisches Verhalten von Proteinen nach dem WLC-Model.

Elastisches Verhalten eines entfaltenen Polypeptids mit einer Persistenzlänge $p = 0,5$ nm und einer Konturlänge $L = 100$ nm ist rot dargestellt. Die schwarze Linie zeigt die (schematische) Elastizität eines gefalteten Proteins.

Wird ein Protein aus mehreren identischen Untereinheiten im Kraftmikroskop mit Kraft belastet, werden zunächst die Polypeptidkette ausgedehnt (Abschnitt 1 in Abbildung 3.3), bis die Kraft hoch genug ansteigt, um die einzelnen Untereinheiten zu entfalten (Abschnitt 2 in Abbildung 3.3). Das Entfalten einer Untereinheit erhöht die Konturlänge der Polypeptidkette, was zu einer charakteristischen sägezahnartigen Entfaltungskurve führt. Hierbei entspricht jeder Zacken der Entfaltung einer Untereinheit des Polyproteins. Aus der Höhe der Entfaltungszacken lässt sich die Entfaltungskraft des Proteins bestimmen während, aus dem Abstand der Entfaltungszacken mithilfe des WLC-Modells der Konturlängenzuwachs (ΔL) durch Ausstrecken des Peptidrückgrats der Proteinuntereinheit gewonnen werden kann. In Abschnitt 3 von Abbildung 3.3 sind alle eingespannten Untereinheiten entfaltet, und die Polypeptidkette löst sich von Blattfederspitze oder Oberfläche ab. Der Konturlängenzuwachs nach einem Entfaltungszacken lässt sich aus der Anzahl an entfaltenen Aminosäuren n und dem gefalteten End-zu-End-Abstand d_{gefaltet} der Untereinheit berechnen.

$$\Delta L = n \cdot d_{aa} - d_{\text{gefaltet}} \quad \text{Glg. 2}$$

Hierbei ist d_{aa} der Konturlängenzuwachs pro Aminosäure, der für die Persistenzlänge $p = 0,5$ nm und das verwendete Instrument zu $d_{aa} = 0,365$ nm / Aminosäure bestimmt wurde (Dietz und Rief 2006). Entfaltet das Protein nicht in einem Schritt, so muss noch der Abstand zwischen den Kraftangriffspunkten des Zwischenzustands $d_{\text{gefaltet}}^{\text{II}}$ berücksichtigt werden.

$$\Delta L = n \cdot d_{aa} - d_{\text{gefaltet}}^{\text{I}} + d_{\text{gefaltet}}^{\text{II}} \quad \text{Glg. 3}$$

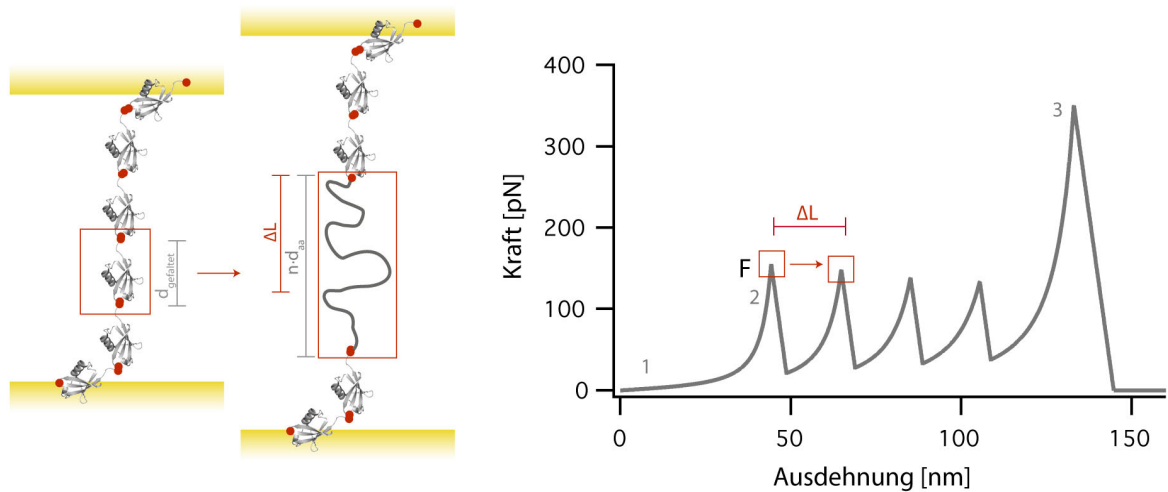


Abbildung 3.3: Entfaltung eines Proteins aus identischen Untereinheiten.

Schematische Entfaltung einer Untereinheit eines Proteins, das aus sechs sich wiederholenden Untereinheiten aufgebaut ist. Jedes Entfaltungsereignis einer Untereinheit erhöht die Konturlänge des Polypeptids, so dass sich die Kraft-Ausdehnungs-Kurve als Abfolge von WLC-Kurven mit steigender Konturlänge beschreiben lässt. Der Konturlängenzuwachs ΔL pro Entfaltungsereignis errechnet sich aus der Anzahl an gedehnten Aminosäuren und dem gefalteten End-zu-End-Abstand des Proteins.

3.3 Faltung und Entfaltung unter Kraft

Die Konformationskinetik von Proteinen lässt sich im einfachsten Fall durch ein einfaches Energielandschaftsmodell beschreiben, in dem zwischen dem gefalteten Zustand N, dem entfalteten Zustand U und dem Übergangszustand TS unterschieden werden kann (Abbildung 3.4 rechts). Zwischen N und U können durch thermische Aktivierung Übergänge stattfinden, hierzu muss das Protein den Übergangszustand TS durchlaufen. Nach der Theorie des Übergangszustands (*transition state theory*) hängen die Faltungsrate k_{on} und die Entfaltungsrate k_{off} exponentiell von der Höhe der Übergangsbarrrieren $\Delta G_{\text{U-TS}}$ und $\Delta G_{\text{N-TS}}$ ab. Eine äußere konstante Kraft führt zu einem zusätzlichen linearen Potential (grün Abbildung 3.4 rechts), das die Energielandschaft verkippt (violett in Abbildung 3.4 rechts); die Höhe der Entfaltungsbarrriere sinkt während die Höhe der Faltungsbarrriere ansteigt. Die Reaktionskoordinate x entspricht in diesem Fall der Ausdehnung des Proteins. Unter der Annahme, dass sich der Abstand des Übergangszustands vom gefalteten ($\Delta x_{\text{N-TS}}$) und entfalteten Zustand ($\Delta x_{\text{U-TS}}$) durch die Kraft nicht ändert, erhält man folgende Ausdruck für die Kraftabhängigkeit der Entfaltungsrate (Bell 1978)

$$k_{off}(F) = k_U^0 \cdot e^{-\frac{\Delta G_{N-TS}}{k_B T}} \cdot e^{\frac{F \cdot \Delta x_{N-TS}}{k_B T}} = k_U^{F=0} \cdot e^{\frac{F \cdot \Delta x_{N-TS}}{k_B T}} \quad \text{Glg. 4}$$

sowie für die Faltungsrate.

$$k_{on}(F) = k_N^0 \cdot e^{-\frac{\Delta G_{U-TS}}{k_B T}} \cdot e^{-\frac{F \cdot \Delta x_{U-TS}}{k_B T}} = k_N^{F=0} \cdot e^{-\frac{F \cdot \Delta x_{U-TS}}{k_B T}} \quad \text{Glg. 5}$$

Hierbei gehen nur Potentialbreite und -höhe in die Berechnung ein, die Form des Potentials bleibt unberücksichtigt. Die Entfaltungsrate steigt exponentiell mit der Kraft an, die Potentialbreite Δx_{N-TS} stellt hierbei eine Kraftempfindlichkeit dar.

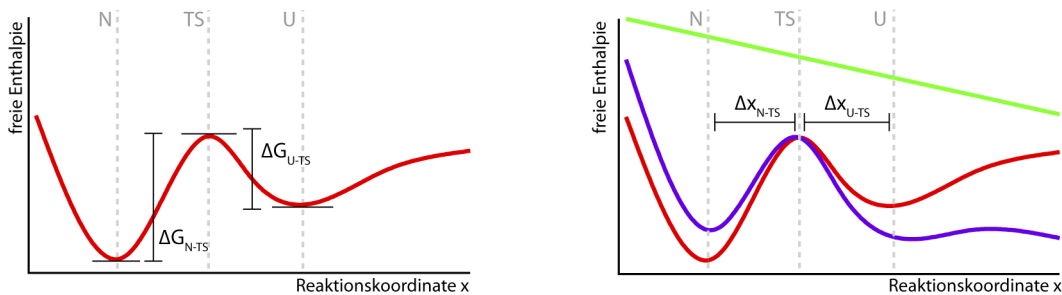


Abbildung 3.4: Das Zwei-Zustands-Modell für Proteinfaltung.

Schematische Energielandschaft eines Proteins, in der zwischen gefaltetem (N), entfaltetem (U) und Übergangszustand (TS) unterschieden werden kann (rechts). Das Anlegen einer Kraft führt zu einem Verkippen der Energielandschaft, was die Faltungs- und Entfaltungsbarrieren verändert (rechts).

Für die Faltung trifft die Annahme, dass die Potentialbreite Δx_{U-TS} unabhängig von der angelegten Kraft ist, nicht mehr zu, vielmehr setzt sie sich aus der Länge des Polypeptids bei der angelegten Kraft abzüglich der Ausdehnung des Proteins im Übergangszustand zusammen (Schlierf, Berkemeier et al. 2007). Die zusätzliche Faltungsbarriere besteht also aus der Energie, die das Protein benötigt, um auf seine Ausdehnung im Übergangszustand zu kontrahieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dennoch das Modell nach Bell genutzt, um die Gleichgewichtsfrequenzen der N-terminalen α -Helix von Domäne 6 des Aktinquervernetzlers Filamin aus *Dictyostelium discoideum* zu beschreiben (Abschnitt 4.4.1), da der Längenunterschied zwischen gefaltetem und entfaltetem Zustand für dieses System nur sehr gering ist.

Die hier vorgestellten Experimente wurden nicht bei konstanter Kraft sondern bei konstanter Ziehgeschwindigkeit v_p durchgeführt. Hierdurch entsteht eine zeitabhängige Krafterampe. Die Wahrscheinlichkeitsdichte für eine Entfaltung als Funktion der Kraft ergibt sich zu

$$\frac{dP_U(F)}{dF} = \frac{k_U}{\dot{F}} \cdot e^{\frac{F \cdot \Delta x}{k_B T} - \frac{1}{\dot{F}} \cdot \frac{k_B T \cdot k_U}{\Delta x} \left(e^{\frac{F \cdot \Delta x}{k_B T}} - 1 \right)}$$
Glg. 6

Hierbei ist \dot{F} die Kraft-Ladungsrate, der Anstieg des Kraftsignal vor dem Entfaltungseignis.

Die wahrscheinlichste Entfaltungskraft ist gegeben als

$$F = \frac{k_B T}{\Delta x} \cdot \ln\left(\frac{\Delta x}{k_U \cdot k_B T}\right) + \frac{k_B T}{\Delta x} \cdot \ln(\dot{F})$$
Glg. 7

Wird die mittlere Entfaltungskraft gegen den Logarithmus der Kraft-Ladungsrate aufgetragen, ergibt sich eine gerade mit einer Steigung invers proportional zu Δx und einem Achsenabschnitt, der vom Logarithmus des Kehrwerts von k_U abhängt.

3.4 Monte-Carlo-Simulationen

Die Entfaltung von Proteinen unter Kraft ist durch die kraftfreie Entfaltungsrate k_{off} und die Potentialbreite Δx bestimmt. Da Faltungs- und Entfaltungsprozesse stochastischer Natur sind, eignen sich Monte-Carlo-Simulationen, um die Daten zu beschreiben (Rief, Fernandez et al. 1998). Hierzu wird die Entfaltungskurve mit n Segmente diskretisiert und das Polypeptid der Konturlänge L in jedem Zeitschritt Δt mit der Geschwindigkeit v um $v \cdot \Delta t$ gedehnt. Die Kraft F_n berechnet sich nach dem WLC-Model. Zu jeder Kraft lassen sich Faltungs- und Entfaltungsraten berechnen, beispielhaft ist die Entfaltungsrate angegeben:

$$k_{U_n} = k_U \cdot e^{-\frac{F_n \cdot \Delta x_{N-TS}}{k_B T}}$$
Glg. 8

Die Wahrscheinlichkeit für die Entfaltung des Proteins zum Zeitpunkt $t = n \cdot \Delta t$ lautet.

$$P_{N \rightarrow U} = k_{U_n} \cdot \Delta t$$
Glg. 9

Diese Wahrscheinlichkeit wird mit einer Zufallszahl im Intervall $[0,1]$ verglichen. Ist die Wahrscheinlichkeit größer als die Zufallszahl, findet ein Entfaltungseignis statt und die Polypeptidkette verlängert sich um die Konturlänge um ΔL , ist sie kleiner, wird das Polypeptid weiter gedehnt. Aus diesen simulierten Kurven lassen sich Entfaltungskräfte gewinnen, die mit gemessenen Entfaltungskraftverteilungen verglichen werden können. Die Parameter k_{off} und Δx werden danach so lange verändert, bis es zu einer möglichst großen Übereinstimmung zwischen simulierter und gemessener Verteilung kommt.

Monte-Carlo-Simulationen eignen sich hervorragend, um experimentelle Details wie unterschiedliche Federkonstanten einzubeziehen. Insbesondere kann auch die Konturlänge von entfaltetem Polypeptid vor einem Entfaltungseignis in die Simulation einfließen ((1) in Abbildung 3.5). Darüber hinaus können auch gekoppelte Entfaltungseignisse, wie beispielsweise durch teilweises Entfalten eines Proteins bis zu einem Zwischenzustand, in der Simulation berücksichtigt werden. Dies ist besonders von Bedeutung für die Modellierung von Dissoziations-/ Entfaltungsdaten von Proteinkomplexen, bei denen nach der Entbindung des Komplexes Monomere entstehen, die daraufhin entfaltet werden (Abbildung 3.5). Da die Blattfeder nach der Dissoziation des Komplexes nicht zu Nullkraft relaxiert, werden die entstehenden Monomere sofort einer hohen Kraft ausgesetzt ((3) in Abbildung 3.5), wodurch diese Zustände oft nur eine kurze Lebensdauer haben. Durch die Entfaltung dieses Monomers verlängert sich die Polypeptidkette allerdings beträchtlich, so dass das zweite Monomer zunächst einer deutlich niedrigeren Kraft ausgesetzt ist, die dann langsam ansteigt ((4) in Abbildung 3.5). Monte-Carlo-Simulationen erlauben es, diese Effekte auf die Entfaltungskraftverteilungen leicht nachzustellen.

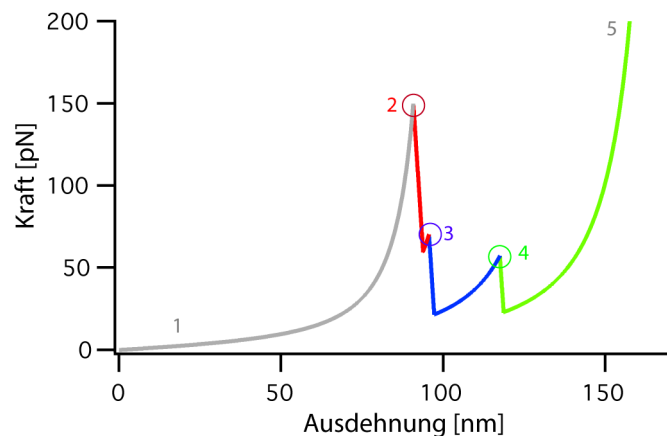


Abbildung 3.5: Simulierte Kraft-Ausdehnungs-Kurve mit drei gekoppelten Ereignissen. Die Polypeptidkette wird gedehnt (1), bis die Entfaltungswahrscheinlichkeit eine Zufallszahl übersteigt und ein Entfaltungseignis auftritt (2). Hierdurch entstehen zwei Zwischenzustände mit niedrigerer Stabilität, die in (3) und (4) entfalten. Danach wird das Polypeptid weiter gedehnt (5), bis alle Zeitschritte durchlaufen sind.

4 Proteinkomplexe im Muskel

Im Körper von Wirbeltieren sorgen Muskeln für aktiver Fortbewegung und sind die Grundlage für eine Vielzahl von inneren Körperfunktionen, beispielsweise den Herzschlag. Der Grundbaustein der Muskeln der Skelett- und Herzmuskulatur ist das Sarkomer, die kleinste kontraktile Einheit. Seine Länge beträgt einige Mikrometer und kann sich während der Kontraktions- und Relaxationszyklen beträchtlich ändern.

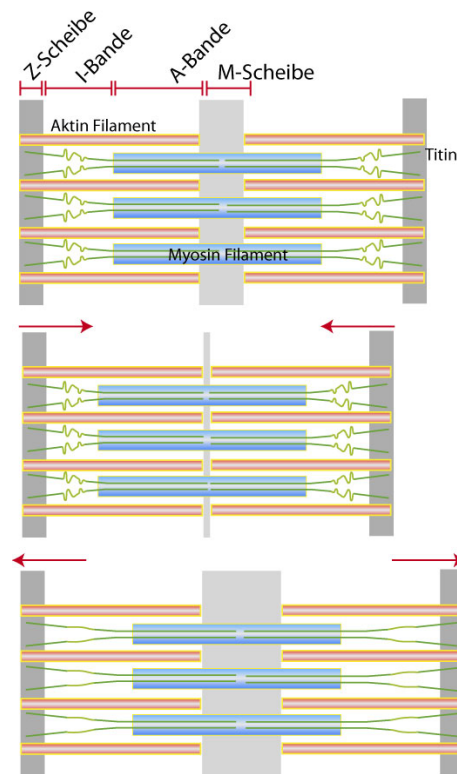


Abbildung 4.1: Schematische Übersicht des Sarkomers.

Die drei Hauptfilamente Aktin, Myosin und Titin sind in rot, blau bzw. grün gezeigt. Die Veränderung der Filamente zueinander bei Kontraktion (mitte) und Dehnung (unten) des Muskels wird im unteren Teil der Abbildung illustriert.

Sarkomere sind aus mehreren filamentartigen Proteinen aufgebaut, deren Verteilung sich in charakteristischen hellen und dunklen Abschnitten in elektronenmikroskopischen Bildern des Muskels zeigt: Auf das dichte Zentrum (M-Scheibe) des Sarkomers folgen die A- und die I-Bande, der äußerste Rand wird als Z-Scheibe bezeichnet und ist ebenfalls proteinreich (Abbildung 4.1 oben). Die zwei Hauptfilamente des Muskels, Aktin (dünnes Filament) und Myosin (dickes Filament) sorgen für die aktive Kontraktion des Muskels, bei der sich die beiden Filamente übereinander schieben (Abbildung 4.1 mitte).

Ein drittes Filament, Titin, besteht im Gegensatz zum dicken und dünnen Filament nicht aus nichtkovalent verbundenen Untereinheiten, sondern wird von einer einzelnen Polypeptidkette gebildet, die in mehrere hundert Immunglobulin- oder Fibronectin-3-Domänen gefaltet ist. Titin durchspannt das halbe Sarkomer von der Z-Scheibe zur M-Scheibe und legt die Länge des Sarkomers fest. Wird der Muskel gestreckt (Abbildung 4.1 unten), kann ein Abschnitt des Titinmolekül ausgedehnt werden, der sich beim Nachlassen der Belastung wieder kontrahiert. Darüber hinaus dient Titin als Anknüpfungspunkt für eine Vielzahl von Proteinkomplexen, besonders während der Ausbildung der Struktur des Sarkomers.

Über die drei vorgestellten Filamentsysteme hinaus gibt es eine Vielzahl an weiteren Proteinen im Muskel, die an der Steuerung der Muskelkontraktion beteiligt sind. Um die Verkürzung des einzelnen Sarkomers auf eine Muskelfaser und schlussendlich auf Gliedmaßen des Körpers zu übertragen, ist es nötig, dass die drei Hauptfilamente des Muskels im Sarkomer verankert sind. Dies geschieht durch Protein-Protein-Wechselwirkungen sowohl in der M-Scheibe im Zentrum des Sarkomers (Titin & Myosin) als auch in der peripheren Z-Scheibe (Titin & Aktin). Im folgenden Abschnitt sollen Messungen vorgestellt werden, bei denen die Dissoziationskräfte einiger dieser Protein-Protein Bindungen an einzelnen Proteinkomplexen bestimmt wurden.

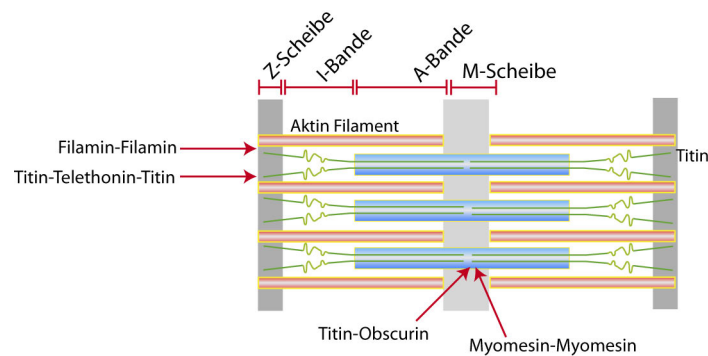


Abbildung 4.2: Lokalisation der in Abschnitt 4.1 - 4.4 untersuchten Proteinkomplexen des Sarkomers.

4.1 Stabilität des Titin-Telethonin-Komplexes

Das Protein Titin durchspannt die Hälfte des Sarkomers von der Z-Scheibe bis zur M-Scheibe und ist über seine Funktion als molekularer Längenmaßstab des Sarkomers hinaus vor allem für die passive Elastizität von Muskeln verantwortlich. Um diese Aufgabe als elastisches Element im Sarkomer erfüllen zu können, muss Titin fest in der Z-Scheibe verankert sein. Diese Verankerung erfolgt durch die Bildung eines trimeren Komplexes aus zwei verschiedenen Titinmolekülen mit dem Protein Telethonin (Struktur in Abbildung 4.3 B) (Zou, Pinotsis et al. 2006). Hierbei ordnen sich die beiden N-terminalen Immunglobulin(Ig)- Domänen (Z1 & Z2) von Titin in einem palindromischen Komplex an, der von Telethonin zusammengehalten wird. Da das restliche Titinmolekül vom C Terminus der Z2 Domäne aus durch die weitere Z-Scheibe in die I-Bande des Sarkomers übergeht, ist davon auszugehen, dass Kräfte, die durch passive Dehnung des Muskels entstehen, auf den C Terminus dieser Domäne wirken.

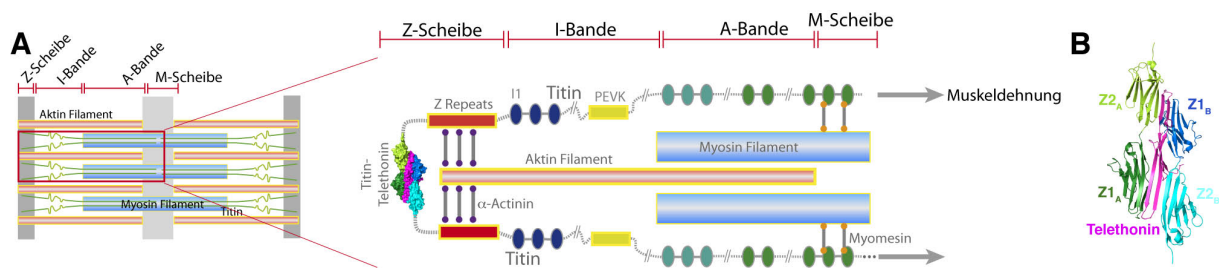


Abbildung 4.3: Lokalisation und Struktur des Titin-Telethonin Komplexes

(A) Schemazeichnung eines Sarkomers (links) mit den drei Hauptbestandteilen Aktin, Myosin und Titin. Der Titin-Telethonin Komplex verbindet zwei Titin-Filamente in der Z-Scheibe (rechts). (B) Struktur des Titin-Telethonin Komplexes: Die zwei N-terminalen Ig-Domänen Z1 und Z2 zweier Titin-Filamente bilden einen antiparallelen, palindromischen Komplex, der durch das Protein Telethonin (pink) zusammengehalten wird.

Im folgenden Abschnitt sollen Experimente vorgestellt werden, mit denen die Bruchkraft des Titin-Telethonin-Komplexes bestimmt wurde. Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Stabilität des Komplexes von der Belastungsrichtung abhängt. Es zeigt sich, dass der Komplex aus Titin und Telethonin bemerkenswert stabil ist, allerdings nur in physiologischer Belastungsrichtung. Kräfte, die in anderen Richtungen auf den Komplex einwirken, lösen ihn vergleichsweise leicht.

4.1.1 Ergebnisse

Um die mechanische Stabilität des Titin-Telethonin-Komplexes zu untersuchen, wurde ein chimäres Protein aus drei Untereinheiten des Proteins Ubiquitin und den zwei N-terminalen Ig-Domänen von Titin (Z1 und Z2) hergestellt. Hierbei wurden die drei Ubiquitineinheiten an den C Terminus der Ig-Domäne Z2 fusioniert, um die physiologische Kraftbelastungsrichtung nachzustellen. Die Ubiquitinuntereinheiten dienen als Angriffspunkte für die Anbindung an die Oberfläche und die Blattfeder des Kraftmikroskops. In vorherigen Arbeiten wurde Ubiquitin kraftspektroskopisch eingehend hinsichtlich seiner mechanischen Eigenschaften untersucht, so dass die Entfaltungssignatur dieses Proteins bekannt ist und zur Identifikation von Entfaltungskurven einzelner Moleküle genutzt werden kann (Carrion-Vazquez, Li et al. 2003). Mit einer Größe von 76 Aminosäuren kann Ubiquitin darüber hinaus eindeutig von Entfaltungsereignissen, die von den größeren Ig-Domänen Z1 & Z2 (94 Aminosäuren) herühren, unterschieden werden. Würde der wildtyp Titin-Telethonin-Komplex mechanisch an seinen Termini belastet, könnte zwischen einem Bruch des Komplexes und dem Abfallen des eingespannten Proteins von der Blattfeder des Kraftmikroskops nicht unterschieden werden (Abbildung 4.4 A).

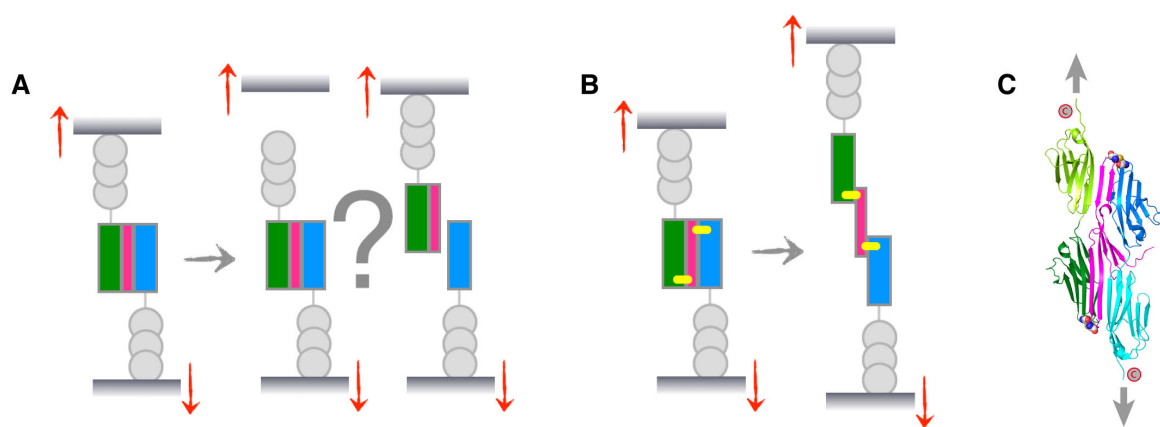


Abbildung 4.4: Cysteinmutanten machen den Bruch des Titin-Telethonin-Komplexes sichtbar.

(A) Bruch des Komplexes und Abfallen des Proteins von der Blattfeder sind ununterscheidbar. (B) Disulfidbrücken halten die Bestandteile des Komplexes nach der Dissoziation zusammen. (C) Struktur des Titin-Telethonin-Komplexes mit Disulfidbrücken zwischen Aminosäure 86 von Titin Domäne Z1 und den Aminosäuren 16 & 46 von Telethonin

Um dieses Problem zu umgehen und den Bruch des Titin-Telethonin-Komplexes sichtbar zu machen, wurden ausgehend von der Kristallstruktur Aminosäuren in Titin und Telethonin, die

sich im Komplex in räumlicher Nähe zueinander befinden, zu Cysteinen mutiert¹. Diese benachbarten Cysteinreste können im Komplex kovalente Disulfidbrücken miteinander ausbilden (Abbildung 4.4 C), welche auch nach dem Bruch des Komplexes intakt bleiben und die getrennten Bestandteile miteinander verbinden (Abbildung 4.4 B). Durch diese Vorgehensweise werden darüber hinaus auch Ereignisse nach dem Bruch des Komplexes beobachtbar. Die Disulfidbrücken wurden in diesem Fall so weit wie möglich vom Kraftangriffspunkt (C Termini der Z2 Domänen) entfernt, um eine Veränderung des Dissoziations-/ Entfaltungspfad des zu vermeiden.

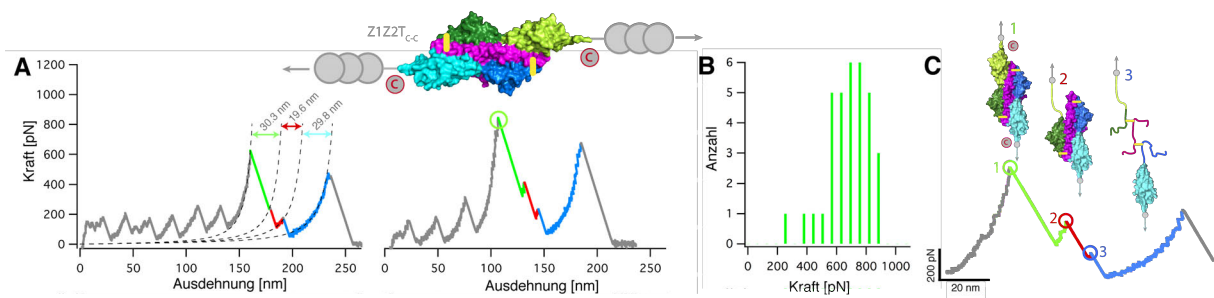


Abbildung 4.5: Stabilität des Titin-Telethonin-Komplexes in C-terminaler Belastungsrichtung:

(A) Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurven bei Belastung des Titin-Telethonin-Komplexes an seinen C Termin (Z1Z2T_{C-C}). Entfaltungseignisse der Ubiquitindomänen sind als graue Zacken dargestellt, der Bruch des Titin-Telethonin-Komplexes und die nachfolgende Entfaltung der Bestandteile in verschiedenen Farben. (B) Bruchkraftverteilung der Dissoziation des Titin-Telethonin Komplexes. (C) Strukturelle Interpretation der mechanischen Dissoziation des Titin-Telethonin-Komplexes.

Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurven dieses chimären Ubiquitin-Titin-Telethonin-Komplexes Z1Z2T_{C-C} sind in Abbildung 4.5 A dargestellt: Die charakteristische Entfaltungssignatur der Ubiquitindomänen ist in grau dargestellt, die Entfaltungseignisse erfolgen bei ~200 pN. Danach steigt die Kraft an und ein neues Entfaltungseignis wird sichtbar, das den Bruch des Komplexes und die darauffolgende Entfaltung der an der Komplexbildung beteiligten Proteine widerspiegelt (farbiger Abschnitt in Abbildung 4.5 A).

Bemerkenswert ist die hohe Kraft, die nötig ist, die mechanische Dissoziation des Komplexes einzuleiten. Mit einer mittleren Bruchkraft von 707 ± 24 pN (Bruchkraftverteilung in

¹ Zuvor wurden alle im wildtyp Telethonin vorkommenden Cysteine (insgesamt sieben) durch Serine ersetzt, um unkontrollierte Disulfidbrückenbildung schon während der Proteinreinigung zu verhindern. Diese Vorgehensweise wurde schon bei der Bestimmung der Kristallstruktur des Titin-Telethonin-Komplexes gewählt, der Cystein-freie Komplex kann daher als dem wildtyp äquivalent angesehen werden (Zou, Pinotsis et al., 2006).

Abbildung 4.5 B) bei einer Ziehgeschwindigkeit von $1\mu\text{m} / \text{s}$ ist die Stabilität des Titin-Telethonin-Komplexes die bislang höchste gemessene mechanische Stabilität eines Proteins, wobei auch kovalente Bindungen nur etwa doppelt so stabil sind (Grandbois, Beyer et al. 1999). Nach der Dissoziation des Komplexes (grün in Abbildung 4.5 A) können weitere Entfaltungseignisse in der Kraft-Ausdehnungs-Kurve beobachtet werden (rot und blau in Abbildung 4.5 A). Aus den Konturlängenzuwächsen (WLC-Kurven in Abbildung 4.5 A) nach diesen Entfaltungseignissen kann ein strukturelles Bild des Bruchs des Titin-Telethonin-Komplexes gewonnen werden (Abbildung 4.5 C). Im ersten Schritt (Konturlängenzuwachs $29,7 \pm 0,4 \text{ nm}$) wird eine der Z2 Domänen entfaltet, im zweiten Schritt ($19,7 \pm 0,5 \text{ nm}$) folgen beide Z1 Domänen und Telethonin. Da die Cysteine für die Disulfidbrücken sich nahe dem C Terminus der Z1 Domänen befinden, trägt nur ein kleiner Teil der Polypeptidkette der Z1 Domänen zum Konturlängenzuwachs bei. Die Entfaltung der verbliebenen Z2 Domäne schlägt sich im letzten Entfaltungseignis nieder ($29,6 \pm 0,3 \text{ nm}$).²

Die Stabilität des Titin-Telethonin-Komplexes ist bemerkenswert. Um herauszufinden, wie stark das Domänenpaar stabilisiert wird, wenn es im Komplex mit Telethonin gebunden ist, wurde die Bruchkraft von Z1Z2 alleine bestimmt. Hierzu wurden die beiden Ig-Domänen zwischen zwei Ubiquitin Trimere, die wieder als Angriffspunkte für Blattfeder und Oberfläche dienen, eingebaut (vgl. Abbildung 4.6 A). Die beiden Domänen werden hierbei an N und C Terminus belastet.

² Hierbei muss beachtet werden, dass der Titin-Telethonin Komplex nicht symmetrisch ist, da die beiden Z1Z2 Domänenpaare mit unterschiedlichen Abschnitten von Telethonin interagieren. Aufgrund von Konturlängenzuwächsen kann jedoch nicht unterschieden werden, welche der beiden Z2 Domänen (vgl. Abbildung 4.3 B) sich zuerst vom Komplex löst. In Abbildung 4.5 ist nur eine Möglichkeit gezeigt.

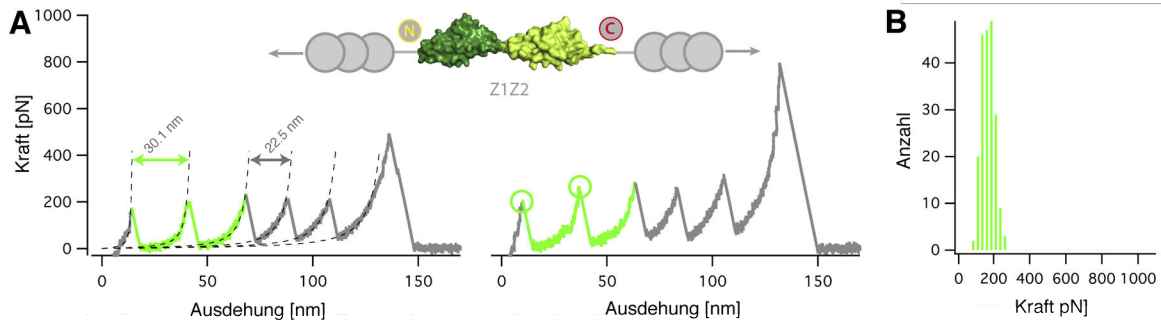


Abbildung 4.6: Stabilität des Z1-Z2 Domänenpaars.

(A) Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurven eines chimären Ubiquitin-Z1Z2 Proteins. Ubiquitinentfaltungseignisse sind in grau dargestellt, Entfaltungseignisse der Z1Z2 Domänen in grün. (B) Bruchkraftverteilung des Z1Z2 Domänenpaars.

Mit einer mittleren Entfaltungskraft von $168 \pm 0,2$ pN (Abbildung 4.6 B) bewegt sich die Stabilität am unteren Ende der Kräfte, die zum Entfalten von Ig-Domänen aus Titin nötig sind (Rief, Gautel et al. 1998; Li, Linke et al. 2002). Die Komplexbildung erhöht somit die Bruchkraft der Ig-Domänen um das vierfache.

Wird ein analoges Experiment nach Bildung des Komplexes mit Telethonin durchgeführt (Abbildung 4.7 A), steigt die Bruchkraft (Mittelwert 194 ± 4 pN) nur geringfügig an (Abbildung 4.7 B). Hierbei ist zu beachten, dass in diesem Experiment die Kraft an N und C Termini des Z1Z2 Domänenpaars anlag, während eine Belastung ausschließlich an den C Termini (Abbildung 4.5) die bemerkenswert hohe mechanische Stabilität > 700 pN zur Folge hatte.

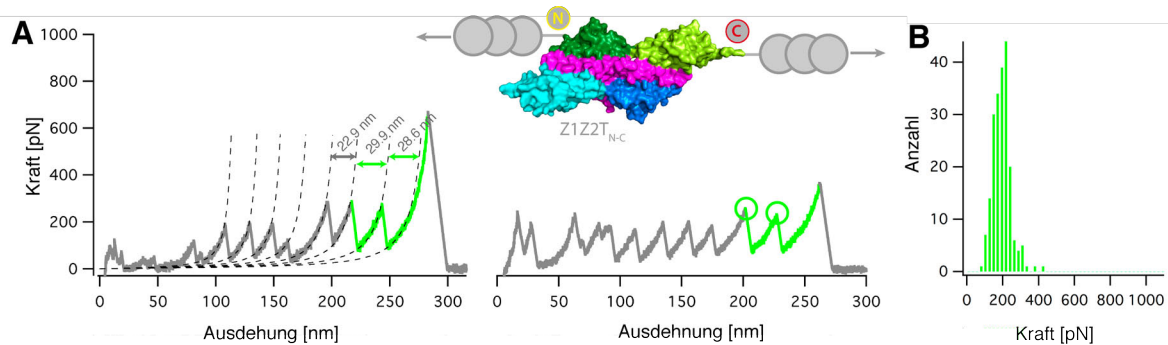


Abbildung 4.7: Stabilität des Z1Z2 Domänenpaars im Komplex mit Telethonin.

(A) Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurven eines chimären Ubiquitin-Z1Z2 Proteins nach Komplexbildung mit Telethonin (Ubiquitin grau, Z1Z2 grün). (B) Bruchkraftverteilung der Z1Z2 Domänen.

Dieser Unterschied hinsichtlich der mechanischen Stabilität legt nahe, dass der Titin-Telethonin-Komplex ein schwaches (N Terminus) und ein starkes (C Terminus) Ende hat. Um diese Hypothese direkt experimentell zu überprüfen, wurde die physiologische Kraftbela-

stungsgeometrie (C Termini) invertiert und der Komplex an den N Termini der Z1 Domänen belastet. In dieser Zuggeometrie ($Z1Z2T_{N-N}$) befinden sich die Disulfidbrücken nahe den C Termini der Z2 Domänen, weit vom Kraftangriffspunkt in den Z1 Domänen entfernt. Die geringere Stabilität des Komplexes bei N-terminal angelegter Kraft wird in den Kraft-Ausdehnungs-Kurven (Abbildung 4.8 A, grünes Ereignis) direkt deutlich. Die mittlere Entfaltungskraft (Abbildung 4.8 B) von $Z1Z2T_{N-N}$ ist im Vergleich zum $Z1Z2$ Domänenpaar mit 237 ± 5 pN nur leicht erhöht. Im ersten Schritt der Dissoziation des Komplexes wird eine der Z1 Domänen entfaltet (grün in Abbildung 4.8 A), gefolgt von Telethonin (rot) und den verbleibenden drei Ig Domänen (Z1 und zwei mal Z2, vgl Abbildung 4.8 C).

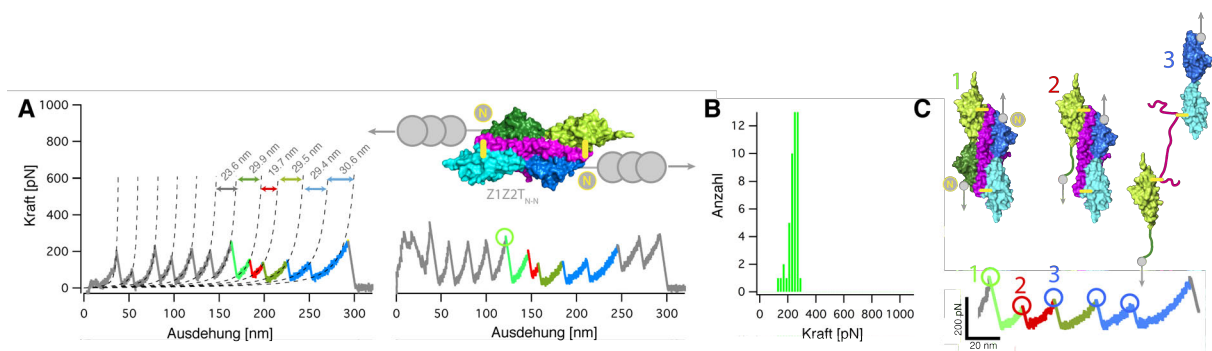


Abbildung 4.8: Stabilität des Titin-Telethonin-Komplexes bei N-terminaler Belastung.
(A) Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurven von $Z1Z2T_{N-N}$ (Ubiquitin: grau, $Z1Z2T_{N-N}$ farbig). **(B) Bruchkraftverteilung der Stabilität des Titin-Telethonin-Komplexes bei N-terminaler Belastung.** **(C) Strukturelle Interpretation des mechanischen Dissoziations-/Entfaltungspfades von $Z1Z2T_{N-N}$.**

4.1.2 Diskussion

Wenn ein Muskel gestreckt wird, können beträchtliche Kräfte auf Titin wirken – hierbei wird das Titinfilament gestreckt, um sich nach dem Nachlassen der Kraft wieder zusammenzuziehen und die dicken und dünnen Filamente in die korrekte Lage für eine erneute Muskelkontraktion zu bringen. Der Komplex zwischen dem N Terminus von Titin und Telethonin stellt eine robuste Verankerung in der Z-Scheibe dar, die in der Lage ist, Kräften zu widerstehen, die weit über den Kräften liegen, die nötig sind, um die Ig-Domänen zu entfalten, die den Großteil der Titin-Struktur bilden (Li, Linke et al. 2002).

Molekulardynamiksimulationen, in denen die mechanische Stabilität des Titin-Telethonin-Komplexes untersucht wurde, kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die Ig-Domänen Z1 und Z2 durch Bindung an Telethonin stark stabilisiert werden (Lee, Gao et al. 2006). Da die

experimentellen Zeitskalen aufgrund beschränkter Rechenleistung für solche Simulationen nicht zugänglich sind, laufen diese typischerweise mit um Größenordnungen höheren Ziehgeschwindigkeiten ab (1 m / s in der Simulation gegenüber 1 μm / s im Experiment), so dass die ermittelten Kraftwerte nicht vergleichbar sind. Allerdings liefern die Simulationen ein strukturelles Bild des Entbindungs-/Entfaltungsvorgangs des Titin-Telethonin-Komplexes: Wird Kraft auf die C Termini ausgeübt, so löst sich eine Z2-Domäne vom gefalteten Komplex und beginnt daraufhin, von ihrem N Terminus (β -Strang A) her zu entfalten. Der Rest des Komplexes bleibt währenddessen weitgehend intakt. Die in diesem Kapitel vorgestellten Experimente liefern, ausgehend von Konturlängenzuwächsen, dasselbe Bild (Abbildung 4.5 C). Lediglich Ablösen und Entfalten können aufgrund der geringen Längenänderung des Proteins nicht voneinander getrennt werden.

Die hohe Stabilität von Titin-Telethonin ist allerdings keine globale Eigenschaft des Komplexes, vielmehr beschränkt sie sich auf die im Muskel vorherrschende C-terminale Belastungsgeometrie. Wird der Komplex hingegen an seinen N Termini belastet, löst er sich vergleichsweise leicht. Der Titin-Telethonin-Komplex zeigt sich somit als eine hochstabile, gerichtete Bindung, die daraufhin optimiert ist, Kräften im Sarkomer zu widerstehen. Abbildung 4.9 A fasst dieses Ergebnis zusammen.

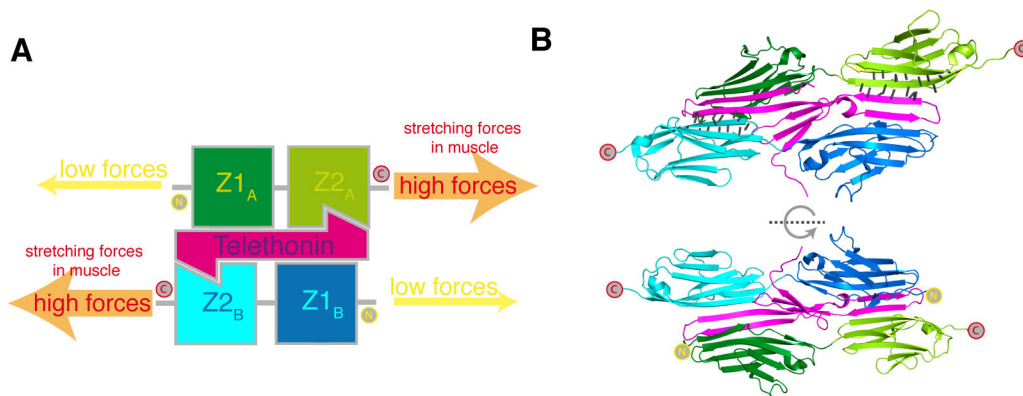


Abbildung 4.9: Der Titin-Telethonin-Komplex ist eine hochstabile, gerichtete Bindung.

(A) Schemazeichnung der richtungsabhängigen Stabilität des Titin-Telethonin-Komplexes. (B) Oben: Wasserstoffbrückennetzwerk, das die C Termini der Z2 Domänen stabilisiert. Unten: Rückseite des Komplexes: Die N Termini der Z1 Domänen interagieren nicht mit Telethonin.

Eine einfache molekulare Erklärung für die drastische Richtungsabhängigkeit der mechanischen Stabilität des Titin-Telethonin-Komplexes liegt in dem dichten Wasserstoffbrückennetzwerk, in das die C Termini der Z2 Domänen eingebettet sind (Abbildung 4.9 B oben). Die mit Kraft belasteten β -Stränge (Strang G von Z2) befinden sich im Zentrum eines großen, von

zwei Titin Ig-Domänen und Telethonin gebildeten β -Faltblatts, das insgesamt 8 Stränge umfasst. Die Zugrichtung liegt senkrecht zur Ausrichtung der Wasserstoffbrücken dieses β -Faltblatts, so dass eine Vielzahl von Interaktionen gleichzeitig gebrochen werden muss, um den mit Kraft belasteten β -Strang vom Komplex zu entfernen. Ein Blick auf die Rückseite des Titin-Telethonin Komplexes (Abbildung 4.9 B unten) hingegen zeigt, dass die N Termini der Z1 Domänen keine Interaktionen mit Telethonin eingehen. Daher erscheint es wenig verwunderlich, dass die Stabilität des Komplexes bei Belastung der N Termini nur wenig höher als die Stabilität des Z1Z2 Domänenpaars ausfällt.

An dieser Stelle ist es wichtig anzumerken, dass die richtungsabhängige Stabilität von Protein-Protein-Wechselwirkungen nicht von Gleichgewichtsparametern wie der Änderung der freien Energie oder von globalen Größen wie Bindungs- und Entbindungsraten erfasst werden kann. Die thermodynamische Stabilität für Proteine eines weiten Größenbereichs ist vergleichsweise schmal verteilt und liegt zwischen -5 bis -15 kcal/mol (Mayor, Guydosh et al. 2003). Wenn die Gesamtenergie des Proteins beschränkt ist, liegt es nahe, dass sich Strukturen bilden, die eine hohe Stabilität nur in die Belastungsrichtung zeigen, für welche die Stabilität auch benötigt wird. Gerichtete Bindungen stellen somit eine ideale Strategie dar, um mechanisch belastete Proteine stabil zu verankern.

4.2 Mechanische Stabilität der Interaktion zwischen Titin und Obscurin / Obscurin-like Protein in der M-Scheibe

Das Muskelprotein Titin reicht von der Z-Scheibe bis zur M-Scheibe des Sarkomers und geht besonders an seinen Enden eine Vielzahl an Interaktionen ein. In Abschnitt 4.1 wurde die N-terminale Verankerung von Titin in der Z-Scheibe kraftspektroskopisch untersucht. Auch in der M-Scheibe bildet Titin zusammen mit einer Reihe weiterer Interaktionspartner ein Netzwerk, welches das Muskelprotein Myosin (dickes Filament) stabil im Sarkomer verankert (Agarkova und Perriard 2005). Hauptbestandteile dieses Netzwerks sind neben Titin selbst die ebenfalls aus Immunglobulin (Ig)- oder Fibronectin-Domänen aufgebauten Proteine Obscurin und Myomesin (Abbildung 4.10). Obscurin, mit einem Molekulargewicht von ~800 kDa selbst eines der großen Muskelproteine, tritt während der Myogenese auch als Bindungspartner von Titin in der Z-Scheibe auf, findet sich in reifen Muskelzellen allerdings vor allem in der M-Scheibe. Dort interagiert seine erste, N-terminale Ig-Domäne (nachfolgend O1) mit der letzten, C-terminalen Ig-Domäne von Titin (zehnte Ig-Domäne in der M-Scheibe, nachfolgend M10). Darüber hinaus bindet Obscurin das Protein Myomesin, das seinerseits wiederum an Titin und Myosin bindet (Agarkova und Perriard 2005; Fukuzawa, Lange et al. 2008). Der C Terminus von Obscurin verbindet dieses Netzwerk mit der Membran des sarcoplasmatischen Reticulums (SR) (Kontogianni-Konstantopoulos, Ackermann et al. 2009).

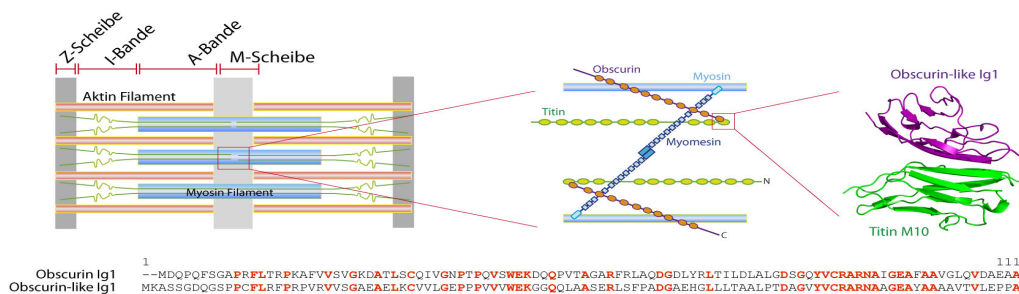


Abbildung 4.10: Lage der Titin-Obscurin Interaktion im Sarkomer.

Schemazeichnung des Sarkomers und des Netzwerks aus Titin, Myomesin, Obscurin und Myosin in der M-Scheibe. Rechts die Kristallstruktur des antiparallelen Komplexes zwischen der letzten Titin Ig-Domäne M10 und der ersten Ig-Domäne OL1 von Obscurin-like Protein. Unten: Sequenzvergleich von O1 und OL1

Einem kleineren Homolog von Obscurin, Obscurin-like Protein, fehlt die Bindestelle für das SR, es bindet nur Myomesin und Titin. Diese verschiedenen Rollen schlagen sich auch in der Lokalisation der beiden Proteine nieder – Obscurin befindet sich in der Peripherie des Sarkomers nahe dem SR, Obscurin-like Protein im Zentrum (Fukuzawa, Lange et al. 2008). In bei-

den Proteinen interagiert die erste Immunglobulindomäne (O1 aus Obscurin, OL1 aus Obscurin-like) mit M10 aus Titin.

Zahlreiche erbliche Muskelkrankheiten sind auf Mutationen in M10 zurückzuführen, diese Krankheiten gehen mit einer Schwächung der Bindung an Obscurin einher (Fukuzawa, Lange et al. 2008). Die Struktur des M10-OL1 Komplexes zeigt (Abbildung 4.10), dass sich die beiden Ig-Domänen über den B-Strang von M10 und den G-Strang von OL1 antiparallelen arrangieren. Dieses intermolekulare β -Faltblatt wird von Seitenketteninteraktionen zwischen den Aminosäuren an der Interaktionsoberfläche der Proteine ergänzt. O1 und OL1 sind zu 35 % identisch (Abbildung 4.10 unten), besonders die Aminosäuren, die an der Interaktionsfläche zu M10 gelegen sind, sind stark konserviert. Obwohl keine hochaufgelöste Struktur von M10-O1 vorliegt, kann deshalb von einem sehr ähnlichen Bindungsmodus ausgegangen werden (Pernigo, Fukuzawa et al. 2010).

In diesem Abschnitt sollen kraftspektroskopische Messungen vorgestellt werden, mit denen die mechanische Stabilität der Interaktion zwischen Titin M10 und Obscurin bzw. Obscurin-like Ig-Domäne 1 bestimmt wurde. Im Gegensatz zur rigiden Verankerung von Titin in der Z-Scheibe durch Bildung eines Komplexes mit Telethonin zeigt sich die Interaktion mit Obscurin in der M-Scheibe deutlich schwächer, was den Netzwerkcharakter der Interaktionen in der M-Scheibe unterstreicht.

4.2.1 Ergebnisse

In der M-Scheibe wirkende Kräfte werden durch das Titinfilament auf den N Terminus der Titin M10 Domäne und durch Obscurin auf den C Terminus von O1 übertragen. Um diese Situation im Kraftmikroskop nachzustellen, wurden drei Ubiquitindomänen an den N Terminus von M10 sowie an den C Terminus von O1 fusioniert. Da sich der freie C Terminus von M10 und der N Terminus von O1 im Komplex in räumlicher Nähe zueinander befinden, wurden sie durch einen flexiblen Polypeptidlinker aus den Aminosäuren Glyzin und Serin miteinander verbunden (Abbildung 4.11 A). Dieser Linker sorgt dafür, dass das Protein nach Dissoziation des M10-O1 Komplexes zwischen Oberfläche und Blattfeder des Kraftmikroskops eingespannt bleibt, so dass die nachfolgende Entfaltung der getrennten M10 und O1 Domänen beobachtbar wird.

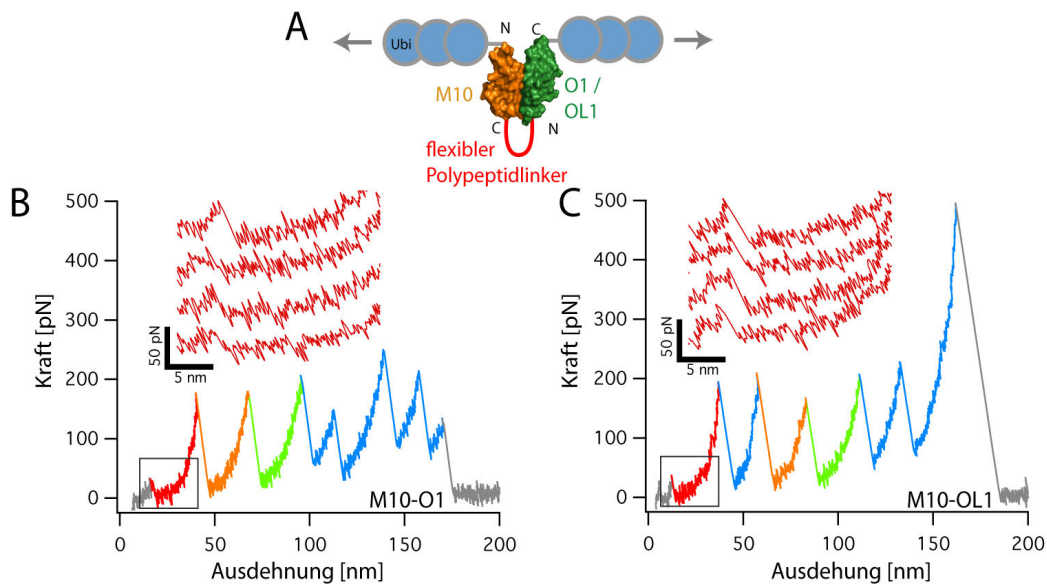


Abbildung 4.11: Mechanische Stabilität von M10-O1 / M10-OL1

(A) Schematische Darstellung des chimären Ubiquitin-M10-O1 Proteins. Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve von M10-O1 (B) sowie M10-OL1 (C). Ubiquitinentfaltungsereignisse sind blau dargestellt, die Entfaltung von O(L)1 und M10 orange bzw. grün, die Dissoziation des Komplexes rot. Da die Entfaltung von M10 und O(L)1 sowohl hinsichtlich Kraft als auch Konturlängenzuwachs ununterscheidbar ist, dient die Farbgebung nur dem besseren Verständnis.

Eine typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve des chimären Ubiquitin-M10-O1 Proteins ist in Abbildung 4.11 B dargestellt. Am Beginn der Kurve sind zwei Entfaltungsereignisse (orange / grün in Abbildung 4.11 B) zu sehen, deren mittlerer Konturlängenzuwachs ($30,3 \pm 0,3$ nm) gut mit dem Erwartungswert ($30,2$ nm) für die 92 Aminosäuren großen Ig-Domänen M10 und O1 übereinstimmt und länger als der typische Konturlängenzuwachs von Ubiquitin ($23,5$ nm,

blau in Abbildung 4.11 B) ist. Die mittlere Entfaltungskraft dieser beiden Ereignisse (181 ± 6 pN) liegt im normalen Rahmen für Ig-Domänen aus Titin. Vor den Entfaltungsereignissen von M10 und O1 ist bei niedrigeren Kräften um 30 pN ein weiterer Entfaltungsspeak zu sehen (rot in Abbildung 4.11 B). Eine Auswahl an vergrößerten Kurven in Abbildung 4.11 B zeigt, dass dieses Entfaltungsereignis reproduzierbar bei ähnlichen Kräften und Ausdehnungen des Proteins auftritt und von der Dissoziation des Komplexes zwischen M10 und O1 herrührt. Der Konturlängenzuwachs nach der Dissoziation stimmt mit $17,8 \pm 0,7$ nm gut mit dem Erwartungswert (17,8 nm) für die Dissoziation des Komplexes und Neuausrichtung der Domänen M10 und O1 entlang der Belastungsrichtung überein (vgl. Abbildung 4.12 B). Das analoge Experiment mit dem Komplex aus Titin M10 und Obscurin-like Ig1 (OL1) liefert ähnliche Kurven (Abbildung 4.11 C), in denen den Entfaltungsspeaks von M10 und OL1 (oranger und grüner Abschnitt in Abbildung 4.11 C) regelmäßig ein Entfaltungsereignis bei niedrigen Kräften (rot in Abbildung 4.11 C, Auswahl an Kurven in Vergrößerung, Konturlängenzuwachs $19,1 \pm 0,6$ nm) vorausgeht. Ein Vergleich der Bruchkräfte beider Komplexe in Abbildung 4.12 A zeigt, dass die Stabilität von M10-O1 und M10-OL1 sehr ähnlich ist. (mittlere Bruchkraft M10-O1 29 ± 2 pN, M10-OL1 32 ± 3 pN).

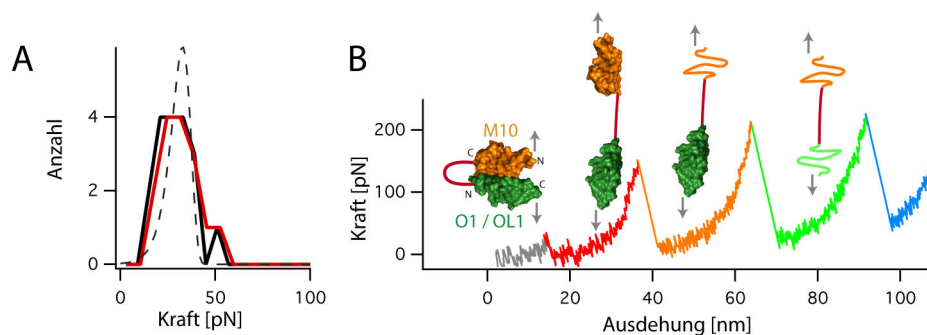


Abbildung 4.12: Dissoziation des M10-O(L)1 Komplexes.

(A) Bruchkraftverteilung von M10-O1 (schwarz) und M10-OL1 (rot). Die gestrichelte Linie ist eine rechnerische Kraftverteilung mit einer Potentialbreite $\Delta x = 8 \text{ \AA}$, einer Entbindungsrate $k_{\text{off}} = 0,7 \text{ s}^{-1}$ und einer Kraft-Ladungs-Rate von 2500 pN s^{-1} . (B) Strukturelle Interpretation der mechanischen Entbindung / Entfaltung von M10-O(L)1.

4.2.2 Diskussion

Der N Terminus von Titin bildet in der Z-Scheibe einen höchst stabilen Komplex mit Telethonin (Abschnitt 4.1). In der M-Scheibe hingegen geht der C Terminus von Titin nur eine vergleichsweise schwache Bindung mit Obscurin ein: Während der Titin-Telethonin-Komplex über beinahe die vierfache Stabilität der Titin Domänen Z1 und Z2 verfügt, bricht die Bindung zwischen Titin Domäne M10 und Obscurin / Obscurin-like Protein bei deutlich niedrigeren Kräften als denen, die nötig sind, um M10 zu entfalten (vgl. Abbildung 4.12). Diese niedrigere Bruchkraft deutet damit auf eine deutlich dynamischere Bindung hin, während der Komplex mit Telethonin ideal für eine rigide Verankerung scheint. Dies wird auch durch Bildung der beiden Komplexe *in vitro* untermauert (vgl. Anhang B.1): Um M10-O1 zu bilden, ist es ausreichend, die beiden Komponenten im Reagenzglas zu mischen, dagegen erfordert das weitreichende Wasserstoffbrückennetzwerk, das den Titin-Telethonin-Komplex stabilisiert, die vorherige chemische Entfaltung der beteiligten Proteine. Einmal gebildet, ist der Titin-Telethonin-Komplex allerdings mechanisch sehr stabil.

Als Dissoziationskonstante für M10-O1 liefert die Literatur $K_D = 27 \cdot 10^{-7}$ M sowie $7,9 \cdot 7 \cdot 10^{-7}$ M für M10-OL1 (Pernigo, Fukuzawa et al. 2010). Auf den ersten Blick mag es überraschend erscheinen, dass sich dieser Affinitätsunterschied nicht auch in der mechanischen Stabilität des Komplexes niederschlägt. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass nach dem Massenwirkungsgesetz³ ein 3,4-facher Affinitätsunterschied nur eine Energiedifferenz von $1,2 k_B T$ bedeutet. Für die wahrscheinlichste Entfaltungskraft gilt $F \approx -k_B T / \Delta x \cdot \ln(k_{\text{off}})$ mit der Potentialbreite Δx und der Entbindungsrate k_{off} (vgl. Glg. 7). Wird nun angenommen, dass der Affinitätsunterschied der beiden Komplexe allein von unterschiedlichen Entbindungsraten herrührt gilt $\Delta F \approx \Delta G / \Delta x$.⁴ Die Potentialbreite Δx lässt sich aus der Bruchkraftverteilung in Abbildung 4.12 A abschätzen und wurde für beide Komplexe mit 8 \AA angenommen. Hieraus ergibt sich ein erwarteter Kraftunterschied von $\Delta F \approx 1,2 k_B T / 8 \text{ \AA} \approx 6 \text{ pN}$, was mit dem verwendeten Messprotokoll nicht auflösbar ist. Darüber hinaus stellt dieser Wert wie erwähnt eine obere Grenze dar, da der Affinitätsunterschied nicht alleine auf den Unterschied in der Entbindungsrate zurückgehen muss. Übereinstimmend wurden in Experimenten, in denen die Entfaltungskraft eines Antikörpers von seinem Antigen gemessen wurde, nur geringe Kraftunterschiede für einen vierfachen Affinitätsunterschied festgestellt (Schwesinger, Ros et al. 2000).

³ Nach $\Delta G / k_B T = \ln(K_D)$

⁴ Aus $\Delta F \approx -k_B T / \Delta x \cdot \ln(k_{\text{off}1} / k_{\text{off}2})$ mit der Annahme, dass Δx für beide Komplexe gleich ist und der Unterschied in K_D alleine vom Unterschied in k_{off} herrührt.

Im Gegensatz zur Z-Scheibe scheint in der M-Scheibe nicht eine einzelne Bindung für die Verankerung von Titin verantwortlich zu sein, vielmehr tragen in dem in Abbildung 4.10 skizzierte Netzwerk zahlreiche Bindungen und Interaktionen Sorge für die strukturelle Integrität dieses Abschnitts des Sarkomers (Agarkova und Perriard 2005). Beispielsweise bindet Titin neben Obscurin auch Myomesin, was seinerseits mit Myosin, Obscurin und Obscurin-like Protein interagiert. Der Netzwerkcharakter der M-Scheibe wird dadurch gestützt, dass Mutationen, die die Interaktion zwischen Titin und Obscurin schwächen, nicht schon während der embryonalen Myogenese tödlich sind, sondern erst in der Jugend Symptome zeigen (Lange, Ouyang et al. 2009) – offenbar kann das restliche Netzwerk an Interaktionen den Wegfall einer Bindung kompensieren. Allerdings gilt die M-Scheibe als labilste Struktur des Sarkomers (Horowitz und Podolsky 1987), was eine generell niedrigere Stabilität der Interaktionen im Vergleich zur Z-Scheibe nahelegt .

Eine weitere M-Scheiben Interaktion, die der Dimerisierungsdomäne von Myomesin, soll im nächsten Kapitel (Abschnitt 4.3) näher untersucht werden.

4.3 Dimerstabilität des M-Scheiben-Proteins Myomesin

Neben dem in Abschnitt 4.2 diskutierten Protein Obscurin ist Myomesin die zweite Hauptkomponente der M-Scheibe des Sarkomers (Eppenberger, Perriard et al. 1981). Myomesin ist ein Homodimer, das aus jeweils 13 Immunglobulin(Ig)- oder Fibronectin Domänen aufgebaut ist. Die C-terminale Ig-Domäne 13 dient als Dimerisierungsdomäne, wobei die Assoziation über die β -Stränge A' und B erfolgt (Pinotsis, Lange et al. 2008). Zwischen den Ig-Domänen 9-12 im C-terminalen Abschnitt des Proteins befindet sich jeweils eine etwa 20 Aminosäuren lange α -Helix, die die Domänen voneinander trennt und dem Protein potentiell spezielle elastische Eigenschaften verleiht (Pinotsis, Lange et al. 2008). Das antiparallele Myomesindimer bindet mit seinem N Terminus an Myosin und kann dieses dadurch quervernetzen – analog zu den Aktin-bindenden Proteinen Filamin oder α -Actinin in der Z-Scheibe (Agarkova und Perriard 2005). Darüber hinaus bindet Myomesin an Obscurin und Titin und verbindet so die Myosinfilamente mit dem strukturellen Netzwerk der M-Scheibe und der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (Agarkova und Perriard 2005).

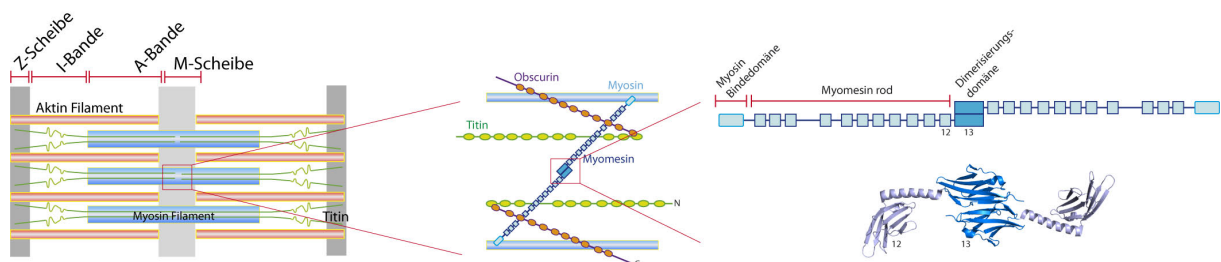


Abbildung 4.13: Lage des M-Scheiben Proteins Myomesin im Sarkomer.

Myomesin ist ein aus Immunglobulin- und Fibronectin-Domänen aufgebautes Homodimer, das in der M-Scheibe neben Myosin und Titin auch Obscurin bindet. Die molekulare Architektur sowie die Kristallstruktur der Domänen 12 und 13 sind im rechten Teil der Abbildung dargestellt.

Der Verankerung von Myosin in der M-Scheibe kommt eine zentrale Bedeutung für die Muskelstabilität zu, da die Position des dicken Filaments im kontrahierenden Muskel intrinsisch instabil ist: Nach dem Gleitfasermodell (vgl. Abbildung 4.1) führt der Kraftschlag der Myosinköpfe, die an die dünnen Aktinfilamente gebunden sind, dazu, dass die dünnen Filamente zum Sarkomerzentrum hingezogen werden – dabei verkürzt sich das Sarkomer. Da aber die Anzahl an Myosinköpfen in den beiden Hälften des Sarkomers in der A-Bande für ein dickes Filament nicht unbedingt identisch ist, kann eine unterschiedliche Kraft an den zwei Seiten der M-Scheibe wirken. Diese Kraft führt dazu, dass das dicke Filament aus dem Zentrum der M-Scheibe herausbewegt wird, was das Kraftungleichgewicht weiter erhöht. Das M-Scheiben

Netzwerk aus Titin, Obscurin und Myomesin muss diese Kräfte ausgleichen, damit sich das dicke Filament am Ende eines Kontraktionszyklus wieder im Zentrum des Sarkomers befindet. Titin, das in der Z-Scheibe verankert ist, sorgt für diese Rückstellkraft (Horowitz und Podolsky 1987). Allerdings kommt auch Myomesin eine wichtige Rolle zu: Da die Richtung des Kraftungleichgewichts eines einzelnen dicken Filaments zufällig ist, sorgt Myomesin durch die Vernetzung zahlreicher verschiedener dicker Filamente dafür, dass das Kraftungleichgewicht eines einzelnen dicken Filaments durch Mittelung über den Querschnitt des Sarkomers ausgeglichen wird. Hierdurch wird die Last auf die Titinfilamente verringert (Agarkova und Perriard 2005).

Um die Rolle von Myomesin als Myosin-Quervernetzer näher zu untersuchen, ist es nötig, näheres über das mechanische Verhalten dieses Proteins zu erfahren. Da Myomesin ein Homodimer ist, ist die mechanische Stabilität der Dimerisierungsdomäne besonders relevant – ein Bruch der Dimerisierung bei niedrigen Kräften würde eine Rolle als Myosin-Quervernetzer unter Kraft unwahrscheinlich machen. In diesem Abschnitt sollen Experimente vorgestellt werden, in denen die Dissoziationskraft dieser Protein-Protein-Interaktion direkt gemessen wurde.

4.3.1 Ergebnisse

In der M-Scheibe wirken Kräfte, die von den dicken Filamenten ausgehen, N-terminal auf das Myomesin-Dimer ein (vgl. Abbildung 4.13). Um diese Situation im Kraftmikroskop nachzustellen, wurden Myomesin-Domänen 11-13 (Myo11-13) N-terminal mit drei Ubiquitin-Domänen fusioniert, die als Angriffspunkte für Oberfläche und Cantilever dienen (Abbildung 4.14 oben). Die Untersuchung dieses chimären Proteins im Kraftmikroskop lieferte typische sägezahnartige Kraft-Ausdehnungs-Kurven (Abbildung 4.14 links, hellblau) mit einer typischen Länge von drei bis vier Entfaltungszacken. Der Konturlängenzuwachs von $29,0 \pm 0,3$ nm stimmt gut mit dem erwarteten Zuwachs von 28,9 nm für die 86 Aminosäuren großen Myomesin-Ig-Domänen⁵ überein und lässt sich eindeutig von den Ubiquitin-Domänen (Längenzuwachs 23,5 nm) unterscheiden.

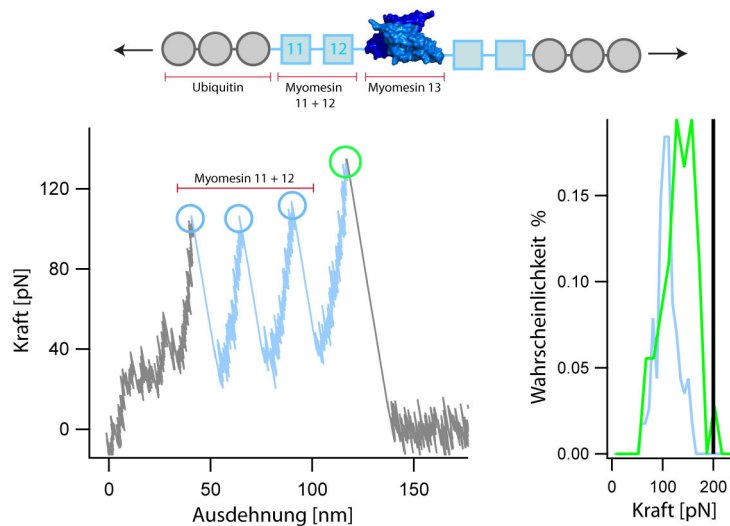


Abbildung 4.14: Stabilität des wildtyp Myomesin-Dimers.

Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve des chimären Myomesin-Ubiquitin-Dimers (links) mit normierter Bruchkraftverteilung der Myo11-12 (blau) und des letzten Entfaltungsereignis der Kraft-Ausdehnungs-Kurven (grün). Schwarze Linie: Mittlere Entfaltungskraft von Ubiquitin.

Im verwendeten rekombinanten Protein verfügt jedes Monomer über zwei Myomesin-Ig-Domänen (Myo11-12). Werden in einer Entfaltungskurve mehr als zwei Entfaltungsereignisse von Myomesin beobachtet (wie in der Kurve in Abbildung 4.14 gezeigt), bedeutet das aufgrund des Aufbaus des chimären Proteins, dass der Verankerungspunkt sowohl an der Oberfläche als auch an der Blattfederspitze im Bereich der Ubiquitineinheiten liegt. Daher wurde

⁵ Hierbei wurde zur Berechnung nur der immunglobulin-artige gefaltete Teil der Myomesin-Domänen herangezogen und die α -Helices, die die Domänen miteinander verbinden, ignoriert.

in diesen Kraft-Ausdehnungs-Kurven die Dimerisierungsdomäne Myo13 mit Kraft belastet (vgl. Abbildung 4.14 oben). In diesem Fall reflektiert der letzte Zacken der Kurve wahrscheinlich die Dissoziation der Dimerisierung (grüner Kreis in Abbildung 4.14), danach ist die Verbindung zwischen Oberfläche und Blattfederspitze getrennt und die Blattfeder relaxiert in ihre Ruhelage. Da die Anbindung an Oberfläche und Blattfederspitze im Kraftmikroskop allerdings durch unspezifische, nicht-kovalente Wechselwirkungen erfolgt, kann dieser letzte Zacken auch die Dissoziation der Polypeptidkette von der Blattfederspitze oder der Oberfläche bedeuten – die Kraftverteilung dieses Ereignis (Abbildung 4.14 rechts, grüne Verteilung) enthält beide Arten an Ereignissen, da zwischen diesen nicht unterschieden werden kann. Der Mittelwert der Bruchkraft ist daher mit 130 ± 3 pN nur eine untere Grenze. Allein der Umstand, dass Kurven mit drei oder mehr Myomesin-Entfaltungseignissen beobachtet werden konnten, bedeutet allerdings bereits, dass die mittlere Bruchkraft der Dimerisierung (Myo13) über der mittleren Entfaltungskraft von Myo11-12 liegt. Dies reflektiert auch die Kraftverteilung der Entfaltung von Myo11-12 in Abbildung 4.14 rechts (hellblau). Aus dem Aufbau des verwendeten chimären Proteins lässt sich allerdings auch eine obere Grenze der Bruchkraft der Myomesin-Dimerisierung abschätzen: In vielen Fällen wird das Protein über eine der sechs Ubiquitin-Einheiten an Oberfläche und Blattfederspitze angebunden werden. In keiner Kurve, die drei oder mehr Myomesin-Entfaltungszacken zeigte, in denen also Myo13 mit Kraft belastet wurde, konnten Entfaltungseignisse von Ubiquitin beobachtet werden. Das legt nahe, dass die Dimerisierung über Myo13 aufbricht, bevor die Kräfte erreicht werden können, die zum Entfalten von Ubiquitin notwendig sind. In der Tat fällt die Bruchkraftverteilung des letzten Entfaltungszackens (grüne Verteilung in Abbildung 4.14) unter den Mittelwert der Entfaltungskräfte von Ubiquitin (schwarze Linie Abbildung 4.14).

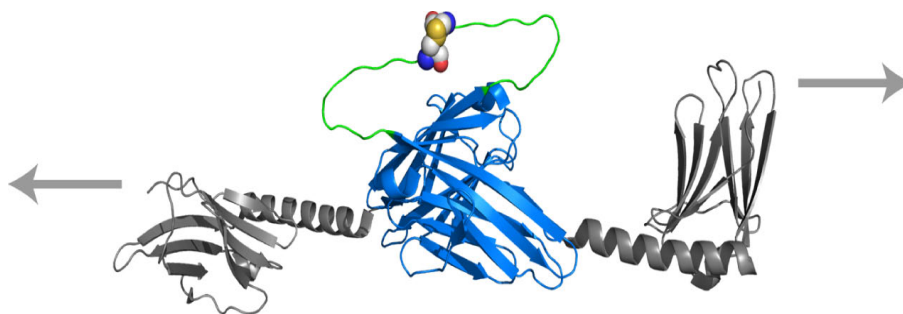


Abbildung 4.15: Modellierte Struktur des cystein-verknüpften Myomesindimers
 Myo12 ist in grau dargestellt, Myo13 in blau, der flexible Glyzin-Serin-Linker in grün
 und die C-terminale Disulfidbrücke als Kalottenmodell.

Bereits in diesem einfachen Experiment wird die mechanische Hierarchie des Myomesin-Proteins deutlich: Die Dimerisierung von Myo13 ist mechanisch stabiler als die Ig-Domänen

des Proteins (Myo11-12). Im nächsten Abschnitt sollen Experimente vorgestellt werden, die die Entbindung von Myo13 direkt sichtbar machen und ein detailliertes Bild des Mechanismus der Dissoziation liefern.

Um die Polypeptidkette des Myomesin-Ubiquitin Dimers auch nach der Dissoziation der Dimerbindung zwischen Oberfläche und Blattfederspitze des Kraftmikroskops eingespannt zu lassen, wurde ein flexibler, 10 Aminosäuren langer Linker mit einem terminalen Cystein an den C Terminus von Myo13 angefügt (grün Abbildung 4.15 links). Wenn die Länge dieser flexiblen Linker geeignet gewählt ist, werden die terminalen Cysteine in Lösung in Kontakt kommen und eine Disulfidbrücke miteinander ausbilden. Diese kovalente Bindung verbindet die Myo13 Monomere nach dem Bruch der Dimerbindung, so dass der Bruch des Dimers und eventuelle nachfolgende Entfaltungsergebnisse direkt beobachtet werden können.

Wird dieses cystein-verknüpfte Myomesindimer (vgl. Abbildung 4.16 oben) im Kraftmikroskop untersucht, treten typische Entfaltungskurven wie die in Abbildung 4.16 gezeigten Kraft-Ausdehnungs-Kurven auf.

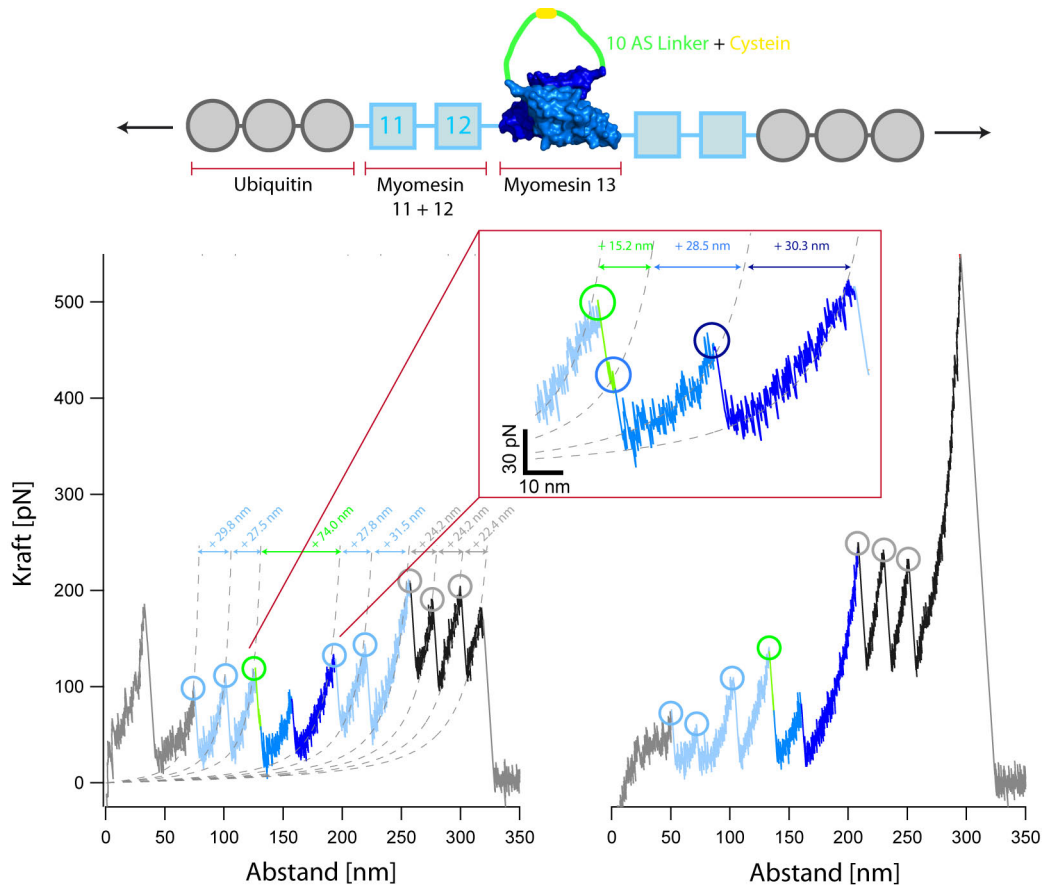


Abbildung 4.16: Stabilität des Cystein-verknüpften Myomesin-Homodimers.
Schematische Struktur des eingesetzten Proteinkonstrukts sowie typische Kraft-Ausdehnungs-Kurven.

Nach den Entfaltungseignissen von Myo11-12 (hellblaue Kreise) kommt ein neues, längeres (Konturlängenzuwachs ~ 74 nm) Entfaltungseignis hinzu (grüner Kreis), auf das die Entfaltung der Ubiquitineinheiten folgt (graue Kreise). Da jeweils vier Entfaltungszacken von Myo11-12 beobachtet wurden, wurde die Dimerisierungsdomäne Myo13 in beiden gezeigten Kurven mit Kraft belastet. Das zusätzliche Entfaltungseignis stammt daher von Myo13. Eine Vergrößerung zeigt (Abbildung 4.16 oben), dass nach dem initialen Bruchereignis bei ~ 130 pN (grüner Kreis, Abbildung 4.16 oben) zwei weitere Entfaltungseignisse (blauer & dunkelblauer Kreis) bei niedrigeren Kräften sichtbar werden. Die Konturlängenzuwächse nach diesen beiden Entfaltungseignissen sind ähnlich ($30,2 \pm 0,4$ nm und $29,2 \pm 0,4$ nm) und stimmen gut mit dem erwarteten Längenzuwachs für die Entfaltung von Myo13 (93 Aminosäuren, erwarteter Konturlängenzuwachs $30,1$ nm) überein. Der erste Entfaltungszacken (grüner Kreis) reflektiert den Bruch des Dimers. Der Konturlängenzuwachs ($13,1 \pm 0,4$ nm, Erwartungswert $13,3$ nm) nach der Dissoziation beinhaltet das Strecken des flexiblen Linkers sowie die Ausrichtung der beiden monomeren Myo13-Domänen entlang der Bela-

stungsrichtung. Der mechanische Entbindungs-/ Entfaltungspfad ist strukturell in Abbildung 4.17 dargestellt.

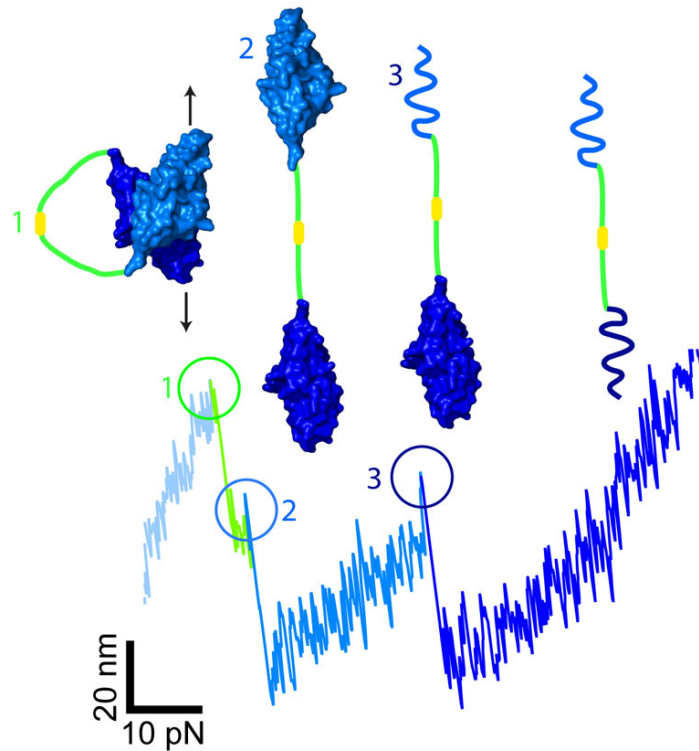


Abbildung 4.17: Strukturelle Interpretation des Entbindungs-/ Entfaltungspfad von Myomesin 13.

Die Verknüpfung von Myo13 durch flexible Polypeptidlinker mit einem C-terminalen Cystein macht den Bruch der Protein-Protein-Bindung und das darauffolgende Entfalten der getrennten Monomere direkt sichtbar. Aus den Kraft-Ausdehnungs-Kurven dieses Proteins lassen sich Kraftverteilungen gewinnen, die keine Ereignisse mehr enthalten, die vom Ablösen der Proteinkette von der Oberfläche oder der Blattfederspitze stammen. Außerdem wird die mechanische Stabilität der Myo13 Monomere zugänglich. Bruchkraftverteilungen der drei Entfaltungseignissen des mechanischen Entbindungs-/ Entfaltungspfad von Myo13 sind in Abbildung 4.18 dargestellt. Für die Entfaltung des ersten Monomers (Abbildung 4.18 mitte) wurde statt der Bruchkraft die Lebensdauer des Monomers bestimmt, da dieser Zustand oft nur sehr kurzlebig ist und dabei einer annähernd konstanten Kraft ausgesetzt wird. Im Vergleich zur mittleren Bruchkraft der Dimerbindung von Myo13 mit 137 ± 2 pN (Abbildung 4.18 links) ist die mechanische Stabilität der monomeren Myo13 Domäne (74 ± 1 pN, Abbildung 4.18 rechts) immer noch beträchtlich. Alle Kraftverteilungen konnten durch Monte-Carlo Simulationen mit drei aufeinanderfolgenden Ereignissen (Abschnitt 3.4) reproduziert werden.

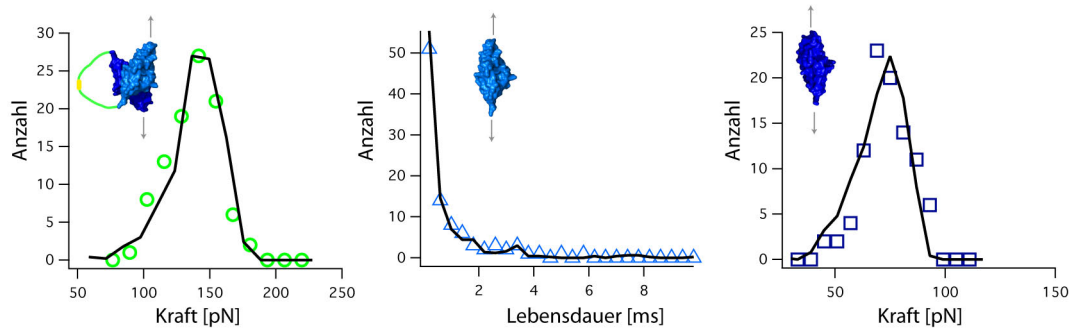


Abbildung 4.18: Bruchkraftverteilungen der Entbindung/Entfaltung von Myosin 13.
Links: Bruchkraftverteilung der Dissoziation (grün) und Monte-Carlo-Simulation mit $k_{\text{off}} = 0,01 \text{ s}^{-1}$ und $\Delta x = 2,9 \text{ \AA}$.
Mitte: Lebensdauererzeugung der Entfaltung des ersten Monomers (hellblau) und Monte-Carlo-Simulation mit $k_{\text{off}} = 0,05 \text{ s}^{-1}$ und $\Delta x = 4,5 \text{ \AA}$.
Rechts: Bruchkraftverteilung der Entfaltung des zweiten Monomers (dunkelblau) und Monte-Carlo-Simulation mit $k_{\text{off}} = 0,08 \text{ s}^{-1}$ und $\Delta x = 4,5 \text{ \AA}$.

4.3.2 Diskussion

Schon die ersten, einfachen Experimente mit wildtyp Myo11-13 machen die mechanische Hierarchie dieses Myosin-Quervernetzers deutlich: Die Dimerbindung zwischen Myo13 ist mechanisch stabiler als Domänen Myo11-12; allerdings überlappen die Bruchkraftverteilungen der Domänenentfaltung von Myo11-12 und der Dissoziation von Myo13. Diese Bruchkraftverteilung, enthält neben der Dissoziation des Dimer auch Ereignisse, die vom Abfallen des Polypeptids von der Blattfederspitze oder der Oberfläche herrühren – dennoch ist die mittlere Bruchkraft mit 130 ± 3 pN der Bruchkraft, die mit dem cystein-verknüpften Dimer (137 ± 2 pN) ermittelt wurde, sehr ähnlich. Dies bedeutet, dass in den meisten Fällen die unspezifische Anbindung an Oberfläche und Spitze stabiler war als die Bruchkraft des Dimers, so dass nur wenige ‚falsche‘ Ereignisse in die Bruchkraftverteilung eingeflossen sind. Da die Stärke der Anbindung an Oberfläche und Spitze allerdings von vielen Faktoren, wie beispielsweise Proteindichte auf der Oberfläche, der Dicke der auf die Blattfederspitze aufgetragenen Goldschicht und nicht zuletzt von der Proteinprobe selbst abhängt und damit schwer zu kontrollieren ist, kann dieses Ergebnis nicht einfach verallgemeinert werden. In Abschnitt 5.1 werden Experimente zur Dimerstabilität des α -crystallin Dimers von Hsp 16.5 aus *Methanococcus janashii* vorgestellt, in denen sogar eine deutliche Diskrepanz zwischen der indirekten Messung der Bruchkraft (Kraft des letzten Zackens der Kraftkurve) und der direkten Messung (kovalent verknüpftes Protein) auftrat. Wie oben erwähnt, erlaubt der Aufbau des chimären Proteinkonstrukts aus Myomesin und Ubiquitin, die Abschätzung einer oberen Grenze der Dissoziationskraft von ~ 200 pN. Die Bruchkraftverteilung des Cystein-verknüpften Myo13 Dimers (Abbildung 4.18 links) liegt vollständig unter dieser oberen Grenze. Die Daten aus den Experimenten mit wildtyp Myo13 und mit dem cystein-verknüpften Dimer bestätigen einander, was umgekehrt auch zeigt, dass der flexible Glyzin-Serin-Linker keinen messbaren Einfluss auf die mechanische Stabilität des Dimers hat.

Aus den Kraft- und Lebensdauerverteilungen der mechanischen Entbindung/Entfaltung von Myo13 lassen sich durch Monte-Carlo-Simulationen (schwarze durchgezogene Linien in Abbildung 4.18) Parameter der zugrundeliegenden Energielandschaft gewinnen. Für den Bruch der Dimerbindung wurde eine Lebensdauer von ~ 100 s in der Abwesenheit von Kraft extrapoliert, was vollständig ins Bild eines stabilen Myosin-Quervernetzers passt. Die Kraft, die ein einzelner Myosin II Kopf in einem dicken Filament aufbringt, beträgt 3-4 pN (Finer, Simmons et al. 1994). Wird angenommen, dass sich beispielsweise an einem Ende des dicken Filaments fünf Myosin II Köpfe mehr befinden als am anderen Ende, so ergibt sich eine Kraft von ~ 20 pN in die Richtung des Endes mit mehr Köpfen. Bei dieser Kraft reduziert sich die

Lebensdauer der Dimerbindung von Myo13 auf ~ 24 s (Glg. 4), was die Dauer des Kraftanstiegs während der Muskelkontraktion (< 100 ms) deutlich übersteigt (Buller, Eccles et al. 1960). Für diese kurze Beanspruchungsdauer ist das Myomesin Dimer in der Lage, weit höheren Kräften (~ 70 pN) zu widerstehen. Andererseits ist es wahrscheinlich, dass ein Teil dieser Belastung von elastischen Abschnitten in Myomesin aufgenommen wird, analog zur elastischen, unstrukturierten PEVK-Region in Titin (Li, Oberhauser et al. 2001). Für eine Splice-Isoform von Myomesin, die über einen zusätzlichen, ~ 100 Aminosäure langen unstrukturierten Abschnitt zwischen Domänen 6 und 7 verfügt (EH-Insert), wurde dies bereits in Einzelmolekülexperimenten gezeigt (Schoenauer, Bertoncini et al. 2005). Eine ähnliche Rolle als elastische Feder wurde aufgrund der Kristallstruktur für die α -Helices postuliert, die die Ig-Domänen am C-terminalen Ende von Myomesin miteinander verbinden (vgl. Abbildung 4.13). Dies ist gegenwärtig Gegenstand der Forschung. Die Bindung von Myomesin an die dicken Filamente ist bisher noch nicht näher untersucht. Es bleibt abzuwarten, ob sich diese Protein-Protein Wechselwirkung als das schwächste Glied dieses Myosin-Quervernetzers herausstellt.

Nach der Dissoziation der Dimerbindung ist in den Kraft-Ausdehnungs-Kurven deutlich die Entfaltungen von monomerem Myo13 zu erkennen (blaue Kreise in Abbildung 4.17). Aus den Kraftverteilungen dieses Entfaltungsübergangs wurde eine unbelastete Lebensdauer von ~ 15 s extrapoliert, was nahelegt, dass auch monomeres Myo13 thermodynamisch stabil ist (typische Faltungsraten für muskuläre Immunglobulindomänen, z.B. aus Titin, liegen um 1 s^{-1} (Li, Carrion-Vazquez et al. 2000)). Diese Interpretation deckt sich mit Experimenten, in denen durch Ladungsumkehr im Dimerisierungsinterface von Myo13 die Assoziation des Proteins unterdrückt werden konnte, wobei das so mutierte monomere Protein thermodynamisch stabil war (Pinotsis, Lange et al. 2008).

Die Ergebnisse dieses und des vorangehenden Kapitels zeigen auf, dass die M-Scheibe eine komplexe Struktur ist, deren mechanisches Verhalten von einer Vielzahl an einzelnen Bestandteilen bestimmt wird. Für zwei der beteiligten Proteine konnten Dissoziationskräfte bestimmt werden, die Mehrheit der beteiligten Proteine ist aber bislang völlig uncharakterisiert. Die Zahl an bekannten Protein-Protein Interaktionen nimmt zudem ständig zu, so dass es zu früh ist, ein mechanisches Bild der M-Scheibe zu entwerfen. Das mechanische Verhalten eines Proteinnetzwerks wird von der schwächsten Komponente dominiert. Die hier vorgestellten Interaktionsmessungen sind nur der erste Schritt auf dem Weg zu einer detaillierten mechanischen Beschreibung der M-Scheibe.

4.4 Stabilität der Dimerisierungsdomäne des Aktin-Quervernetzers Filamin

Zur Kontraktion von Muskeln ist es erforderlich, dass die dünnen Filamente stabil in der Z-Scheibe verankert sind. Dies geschieht in erster Linie durch Bindung an den dimeren Aktin-Quervernetzer α -Actinin, der ein Gerüst für die dünnen Filamente bildet. Neben α -Actinin bindet auch Filamin C (γ -Filamin, ABP280) an Aktin und verbindet die dünnen Filamente mit Integrinen und Sarcoglykanen in der Membran des Sarcomers (Frank, Kuhn et al. 2006). Neben dieser Rolle in der Z-Scheibe dienen die ubiquitär exprimierten Homologe Filamin A und B als Aktin-Quervernetzer im Cytoskelett und als Verbindung zur Zellmembran. Allen Filaminen gemeinsam ist ihr dimerer Aufbau mit zwei Aktin-Bindungsdomänen, die über einen stabartigen Abschnitt des Proteins, der aus sich wiederholenden Immunglobulindomänen aufgebaut ist, verbunden werden (Popowicz, Schleicher et al. 2006). In den folgenden Abschnitten werden Experimente vorgestellt, in denen die mechanische Stabilität der Dimerisierungsdomäne von zwei Vertretern der Filaminfamilie, Filamin aus *Dictyostelium discoideum* (ABP120, ddFLN) und humanem Filamin C (ABP280, hsFLNC) bestimmt wurde.

4.4.1 Dissoziationskraft von Domäne 6 von Filamin aus *Dictyostelium discoideum*

Einer der strukturell und mechanisch am besten untersuchten Vertreter der Filaminfamilie ist Filamin aus *Dictyostelium discoideum* (ddFLN). Im Gegensatz zu den Vertretern aus Säugtieren verfügt ddFLN nur über sechs Immunglobulindomänen pro Monomer, wobei das Protein über die sechste Ig-Domäne ddFLN6 ein antiparalleles Dimer bildet (Abbildung 4.19) (McCoy, Fucini et al. 1999; Popowicz, Muller et al. 2004). ddFLN wurde bereits in früheren Experimenten kraftspektroskopisch charakterisiert. Hierbei stellte sich heraus, dass eine der Immunglobulindomänen (ddFLN4) über einen Zwischenzustand entfaltet (Schwaiger, Kardinal et al. 2004). Da die Entfaltungskraft dieser Domäne unter der der übrigen ddFLN-Domänen liegt, und ddFLN4 darüber hinaus nach Entfernen der Kraft sehr schnell in seine native Struktur zurückfaltet, wurde angenommen, dass ddFLN4 als dehnbares Element in der Stabregion von ddFLN fungiert, welches bei Belastung ausgedehnt werden kann. Darüber hinaus wurde die Faltungskinetik von ddFLN4 mit (Schlierf, Berkemeier et al. 2007) und ohne Kraft (Schwaiger, Schleicher et al. 2005) sowie der Einfluss der Temperatur auf die Entfaltungskraft dieser Domäne (Schlierf und Rief 2005) eingehend untersucht.

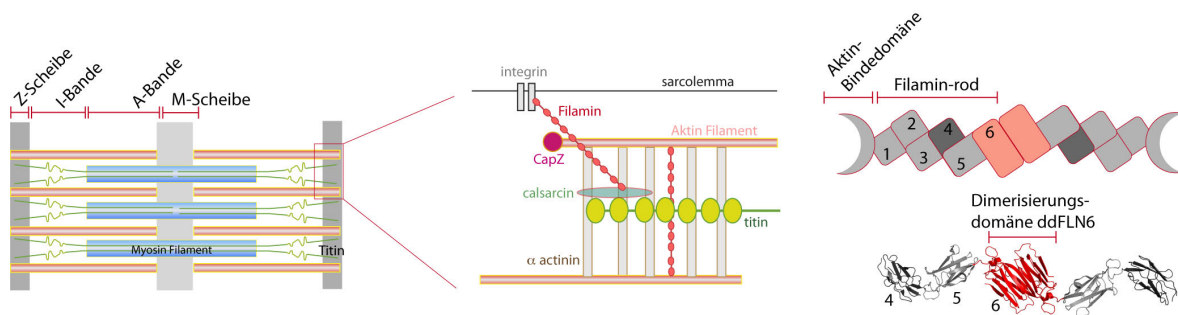


Abbildung 4.19: Lokalisation und Struktur von Filamin

Lokalisation von Filamin im Sarkomer (links) und Struktur von Filamin aus *Dictyostelium discoideum* (1WLH).

Die Dissoziationskraft der Dimerisierungsdomäne ddFLN6 konnte bislang nicht direkt gemessen werden. Da in diesen früheren Arbeiten allerdings auch Einzelmolekülkurven beobachtet werden konnten, die zwei Entfaltungsereignisse von ddFLN4 enthielten, wurde angenommen, dass die Bruchkraft des ddFLN6 Dimers höher als die mittlere Entfaltungskraft der übrigen ddFLN Domänen ist (Schwaiger, Kardinal et al. 2004). Im folgenden Abschnitt sollen Experimente vorgestellt werden, mit denen die Dissoziationskraft von ddFLN6 direkt gemessen werden konnte. Es zeigt sich, dass diese Protein-Protein Interaktion im Gegensatz zu frü-

heren Ergebnissen schwächer als die übrigen ddFLN Domänen ist. Allerdings sorgt ein Vergleichgewicht, das von einer kurzen α -Helix am N Terminus von ddFLN6 herrührt, dafür, dass das ddFLN6 Dimer bei niedrigen Kräften eine sehr hohe Lebensdauer hat.

4.4.1.1 Ergebnisse

Um die mechanische Stabilität des ddFLN6 Dimers kraftspektroskopisch zu bestimmen, wurde ein Ansatz analog zu den Messungen an Myomesin Domäne 13 gewählt (Abschnitt 4.3): Domänen ddFLN4-6 wurden an den C Terminus von Ubiquitineinheiten fusioniert. C-terminal von ddFLN6 wurde ein flexibler, aus Glyzin und Serin zusammengesetzter Polypeptidlinker mit einer Länge von 15 Aminosäuren angefügt, der ein C-terminales Cystein trägt und damit durch Bildung einer Disulfidbrücke die beiden Ubiquitin-ddFLN Fusionsproteine kovalent verknüpfen kann (vgl. Abbildung 4.20 oben). Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurven dieses Fusionsproteins sind in Abbildung 4.20 dargestellt. Ab einer Ausdehnung von ~ 100 nm sind zunächst zwei Entfaltungsereignisse von ddFLN4 (hellblaue Kreise) gefolgt von ddFLN5 (hellgrüne Kreise) zu erkennen. Darauf folgen die Entfaltungszacken von mehreren Ubiquitineinheiten, woraufhin das Polypeptid von Blattfederspitze oder Oberfläche abreißt. Da jeweils zwei Ereignisse von ddFLN4 und ddFLN5 in den Kurven zu erkennen waren, war das Fusionsprotein N-terminal von ddFLN4 an Blattfederspitze und Oberfläche angebunden und das ddFLN6 Dimer wurde mit Kraft belastet. Vor den Entfaltungsereignissen von ddFLN4 ist in den Kurven ein weiteres, ~ 90 nm langes Entfaltungsereignis zu erkennen (grüner Kreis Abbildung 4.20). Eine Vergrößerung zeigt, dass nach dem ersten Bruchereignis (schwarzer Kreis Vergrößerung Abbildung 4.20) drei weitere Entfaltungsereignisse (grüner und rote Kreise) auftreten. Auf ein kurzes Entfaltungsereignis ($3,5 \pm 0,7$ nm, schwarz) folgt die Dissoziation der beiden ddFLN6 Domänen (grün). Der Konturlängenzuwachs diese Übergangs ($16,7 \pm 0,5$ nm) entspricht dem Strecken des flexiblen Glyzin-Serin-Linkers zwischen den beiden ddFLN6 Monomeren und der Ausrichtung der beiden getrennten Domänen entlang der Kraftrichtung (Erwartungswert 15,7 nm).

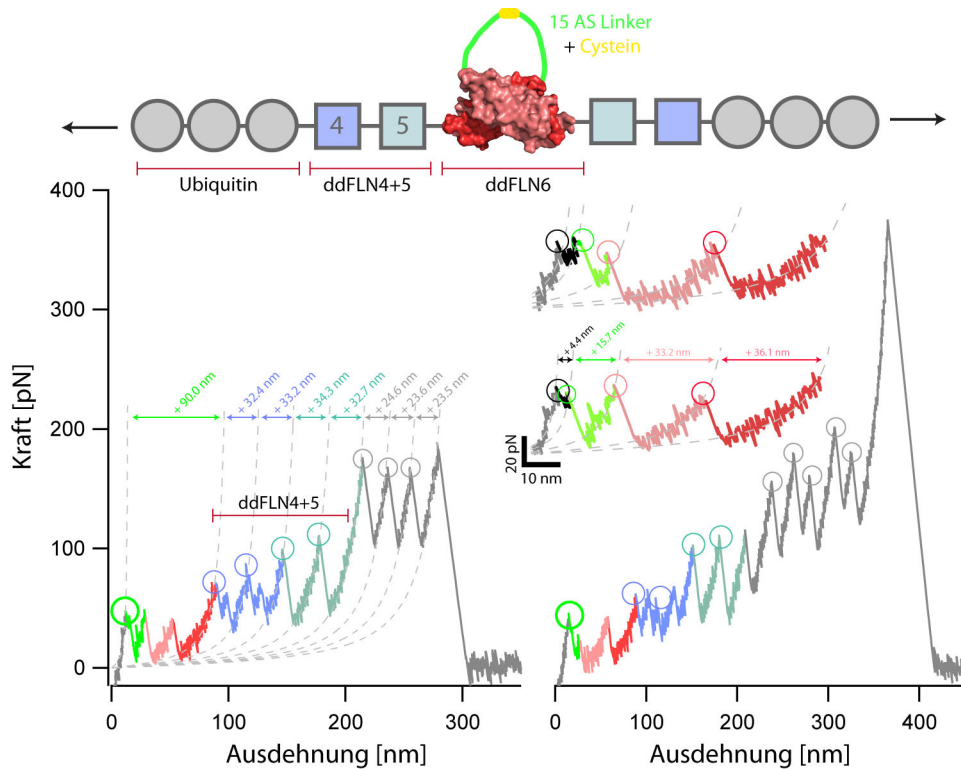


Abbildung 4.20: Dissoziation von ddFLN6 unter Kraft.

Architektur des Fusionsprotein aus drei Ubiquitineinheiten und ddFLN4-6 mit flexiblem, C-terminalen Linker (oben) und typische Kraft-Ausdehnungs-Kurven mit Vergrößerung der Dissoziation und Entfaltung von ddFLN6.

Der Konturlängenzuwachs der beiden hinteren Entfaltungsereignisse (hellrot und dunkelrot) ist nahezu identisch ($35,3 \pm 1$ nm und $35,6 \pm 0,7$ nm respektive) und stimmt gut mit dem Erwartungswert für die Entfaltung der 102 Aminosäuren großen ddFLN6 Monomere überein (Erwartungswert 34,4 nm). Es kann bereits festgehalten werden, dass die Dissoziationskraft von ddFLN6 unter der Entfaltungskraft der schwächsten ddFLN Domäne – ddFLN4 – liegt.

Bei den bisher untersuchten Dimerbindungen von Myomesin und Titin/Obscurin erfolgte die Dissoziation stets in einem Schritt, woraufhin die getrennten Monomere entfaltet wurden. Im Falle von ddFLN6 hingegen scheint zunächst ein Teil der Domänen entfaltet zu werden, bevor das Dimer dissoziiert. Um dieses neue Entfaltungsereignis näher zu untersuchen, wurden Messungen bei langsameren Ziehgeschwindigkeiten durchgeführt (Abbildung 4.21). Die Vergrößerung in den Abbildungen zeigt jeweils das Kraftsignal im Bereich dieses zusätzlichen Entfaltungsereignisses aufgetragen gegen die Zeit. Es wird deutlich, dass ab einer Geschwindigkeit von 250 nm/s mehrere Übergänge zwischen zwei Kraftniveaus (gestrichelte graue Linien) zu erkennen sind. Die Geschwindigkeit dieser Übergänge nimmt mit sinkender Ziehgeschwindigkeit zu und wird ab 50 nm/s so schnell, dass der Cantilever nicht mehr nachfolgen kann und die einzelnen Übergänge zeitlich nicht mehr aufgelöst werden können.

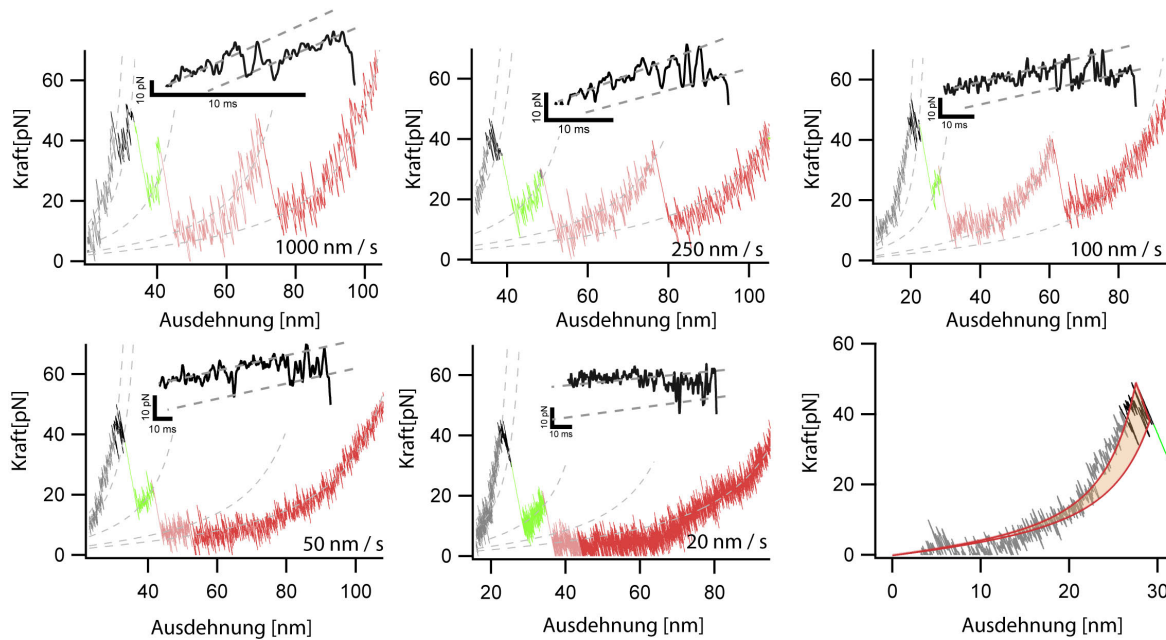


Abbildung 4.21: Dissoziation von ddFLN6 bei verschiedenen Ziehgeschwindigkeiten.

Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurven der Dissoziation von ddFLN6 bei den in den Teilabbildungen angegebenen Ziehgeschwindigkeiten. In den Vergrößerungen ist jeweils der Abschnitt des Kraftsignals gegen die Zeit aufgetragen, in dem Gleichgewichtsübergänge zwischen gefaltetem und entfaltetem Zustand eines Teils von ddFLN6 stattfinden. Unten rechts: Abschätzung der freien Energie des Gleichgewichtsübergangs (schattierter Bereich zwischen den WLC-Kurven)

Übergänge zwischen zwei Kraftniveaus bedeuten, dass sich das Protein thermischen Gleichgewicht befindet. Hierbei repräsentiert das obere Niveau den gefalteten und das untere Niveau den entfalteten Zustand. Somit lässt sich aus der Fläche zwischen den *worm-like chain* Kurven des gefalteten und entfalteten Zustands die Differenz in freier Energie dieser beiden Zustände zu $20 \pm 2 k_B T$ abschätzen (Abbildung 4.21 rechts unten, schattierter Bereich).

Da die Kraft an den N Termini des ddFLN6 Dimers anliegt, können die Gleichgewichtsfluktationen nur von N-terminalen Strukturen von ddFLN6 herrühren. Am N Terminus von ddFLN6 befindet sich vor den β -Faltblättern der Immunglobulin-Struktur, eine kurze α -Helix (Abbildung 4.22 links).

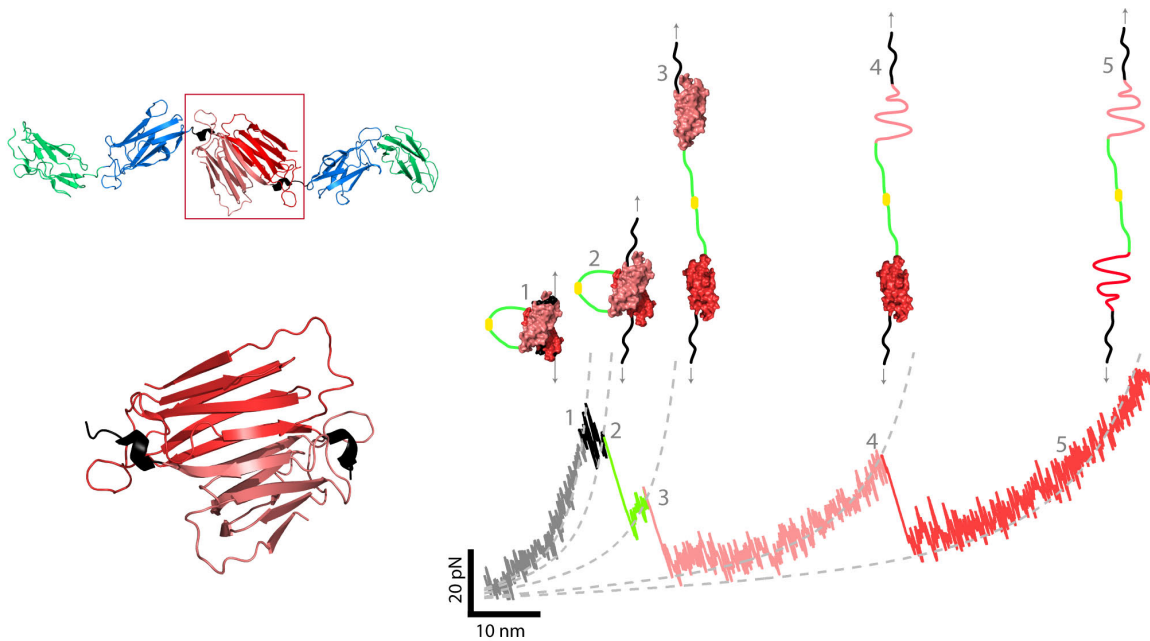


Abbildung 4.22: Strukturelle Interpretation des Entbindungs-/ Entfaltungspfads von ddFLN6.

Links: Struktur von ddFLN und Vergrößerung von ddFLN6 mit N-terminaler α -Helix (schwarz). Rechts: Strukturelle Interpretation der drei Entbindungs-/ Entfaltungsereignisse von ddFLN.

Diese α -Helix und einige weitere N-terminale Aminosäuren zeigen zahlreiche Interaktionen mit dem Ig-artigen Teil von ddFLN6, und es scheint plausibel, dass diese Struktur für die gemessenen Gleichgewichtsfluktuationen verantwortlich ist. In Abbildung 4.22 ist die strukturelle Interpretation der Entbindung / Entfaltung des ddFLN6 Dimers gezeigt. Im ersten Schritt (schwarz) lösen sich diese N-terminale α -Helices und die Polypeptidverbindungen zu ddFLN5 vom gefalteten Dimer. Das Ablösen von nur einer der beiden Helices vom gefalteten Dimer kann aufgrund des kurzen Konturlängenwachses nicht getrennt aufgelöst werden. Im nächsten Schritt dissoziiert das ddFLN6 Dimer (grün), gefolgt von der Entfaltung der beiden getrennten Monomere (rot).

Bisher wurde aufgrund der Kraftgeometrie und des Konturlängenwachses angenommen, dass die N-terminale α -Helix von ddFLN6 für die Gleichgewichtsfluktuationen verantwortlich ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde eine Mutante des ddFLN5 und ddFLN6 Domänenpaars (ddFLN56) erstellt, bei der die α -Helix durch einen gleich langen Linker aus Glyzin ersetzt wurde (ddFLN56 Δ Helix).

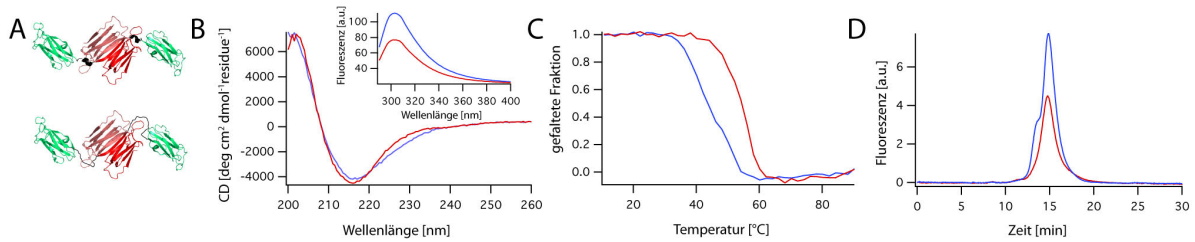


Abbildung 4.23: Thermodynamische Stabilität des ddFLN56 Domänenpaars und Einfluss des Interdomänenlinkers.

(A) Schematische Struktur von wildtyp ddFLN56 (oben) und ddFLN56ΔHelix (unten). (B) Circular dichroism (CD)- und Fluoreszenzspektren (Inset, Anregung 280 nm) von ddFLN56 (rot) und ddFLN56ΔHelix (blau). (C) Schmelzübergang von ddFLN56 (rot) und ddFLN56ΔHelix (blau) gemessen mit CD-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 205 nm und einer Heizrate von 1 °C s⁻¹. (D) Größenausschlusschromatographie von ddFLN56 (rot) und ddFLN56ΔHelix (blau) gemessen mit einer Superdex200 Säule in PBS. Das Protein wurde durch Fluoreszenz bei 330 nm (Anregung 280 nm) detektiert. Alle Messungen wurden bei 10 μM ddFLN56 (Monomer) durchgeführt.

In Abbildung 4.23 ist der Einfluss der Helix und des Linkers auf die Struktur von ddFLN56 dargestellt. Die CD-Spektren von Wildtyp und Mutante (Abbildung 4.23 B) sind nahezu identisch, was nahelegt, dass die β-Faltblattstruktur der Ig-Domänen von der Mutation unbeeinflusst bleibt. Das Fluoreszenzspektrum (Abbildung 4.23 B Inset) von ddFLN56ΔHelix zeigt eine höhere Intensität, dies ist wahrscheinlich auf eine veränderte Umgebung von Tyrosin777, welches Wasserstoffbrücken zum Linker zwischen ddFLN5 und ddFLN6 bildet, zurückzuführen. Eine Analyse der Quartärstruktur durch Größenausschlusschromatographie (Abbildung 4.23 D) zeigt, dass das Austauschen der Helix durch Glyzinreste (Sequenz in Abschnitt B.2) keinen Einfluss auf die Dimerisierung des Proteins hat. Allerdings setzt die Mutation die thermodynamische Stabilität des Komplexes herab. In Abbildung 4.23 (Abbildung 4.23 C) ist der Anteil an gefaltetem Protein (gemessen mit CD-Spektroskopie) gegen die Temperatur aufgetragen, es ergibt sich eine typische sigmoidale Kurve. Die Schmelztemperatur (Wendepunkt der Kurve) sinkt bei ddFLN56ΔHelix (blau) auf 44 °C gegenüber 54 °C für wildtyp ddFLN56.

Das Entfernen der α-Helix am N Terminus von ddFLN6 erniedrigt offenbar die thermodynamische Stabilität des Proteins beträchtlich. Um den Einfluss auf die mechanische Stabilität zu überprüfen, wurde die α-Helix auch in der Ubiquitin-ddFLN Chimäre durch Glyzine und Serine ersetzt. Eine typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve ist in Abbildung 4.24 gezeigt. Überraschenderweise steigt die mechanische Stabilität von ddFLN6ΔHelix gegenüber dem wildtyp Protein an (hellgrüner Kreis Abbildung 4.24) und das Bruchereignis des Dimers verschiebt

sich in den hinteren Teil der Kurve hinter die Entfaltungseignisse von ddFLN4 (hellblau) und ddFLN5 (dunkelgrün). Gleichgewichtsübergänge, die von den α -Helices am N Terminus von ddFLN6 stammen, waren in den Entfaltungskurven nicht mehr zu erkennen.

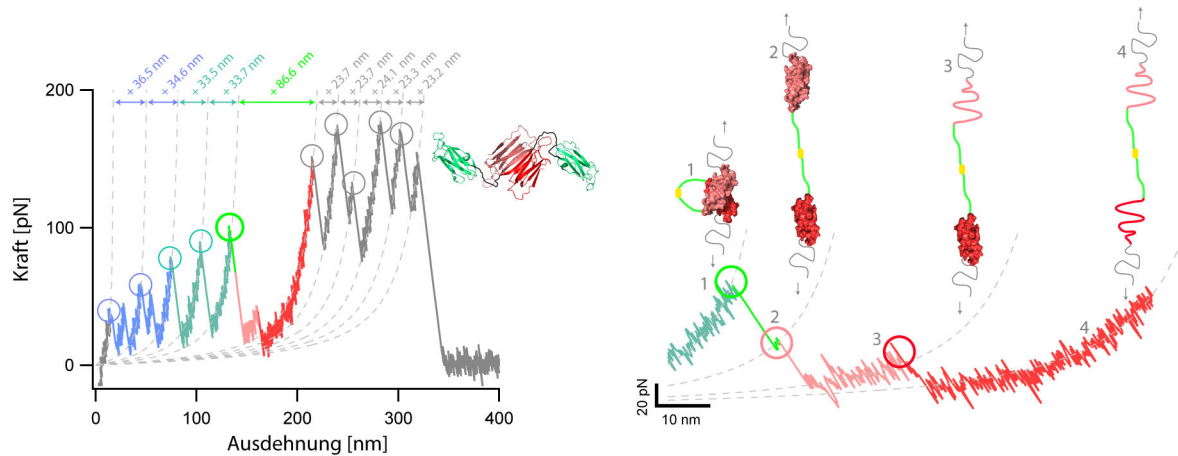


Abbildung 4.24: Mechanische Stabilität von ddFLN6 Δ Helix.

Links: Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve des Fusionsproteins von ddFLN4-6 Δ Helix und drei Ubiquitineinheiten. Das Bruchereignis von ddFLN6 ist mit einem hellgrünen Kreis markiert. **Rechts:** Strukturelle Deutung der Entbindung / Entfaltung von ddFLN6 Δ Helix

Auf den ersten Blick scheint es überraschend, dass eine Mutation, die die thermodynamische Stabilität eines Proteins herabsetzt und ein strukturelles Element entfernt, welches das ddFLN6 Dimer mechanisch zu stabilisieren scheint, zu einer höheren Dissoziationskraft des Dimers führt. In Abbildung 4.25 sind α -Helix und Verbindung zu ddFLN5 im Detail gezeigt. Hierbei ist zunächst bemerkenswert, dass der Linker und Helix, die insgesamt aus nur neun Aminosäuren bestehen, mehr als ein Viertel der Dimerisierungsgrenzfläche von ddFLN6 ausmachen (McCoy, Fucini et al. 1999). Linker und Helix interagieren stark mit dem langen Loop zwischen β -Strängen B und C der zweiten ddFLN6 Domäne des Dimers, was zu der Zick-Zack-artigen Konformation von ddFLN5 und ddFLN6 führt. β -Strang B, von dessen N Terminus die α -Helix ausgeht, scheint durch die Interaktion von Helix und Linker mit der zweiten ddFLN6 Domäne nach unten hin abgelenkt zu werden. Es ist anzunehmen, dass diese Konformation des β -Strangs nicht optimal ist. Werden nun Helix und Linker durch andere Aminosäuren ersetzt, entfernt das auch die Interaktionen zwischen Helix und der zweiten ddFLN6 Domäne. Dies setzt zwar die thermodynamische Stabilität des Proteins herab, schließlich ist nun ein großer Teil der Interaktionsfläche lösungsmittel exponiert, allerdings erlaubt die Mutation offenbar eine bessere Interaktion von β -Strang B mit der zweiten ddFLN6 Domäne. Da in ddFLN6 Δ Helix die Kraft unmittelbar auf den N Terminus von β -

Strang B wirkt, führt das Ersetzen von Helix und Linker zu einer höheren mechanischen Stabilität.

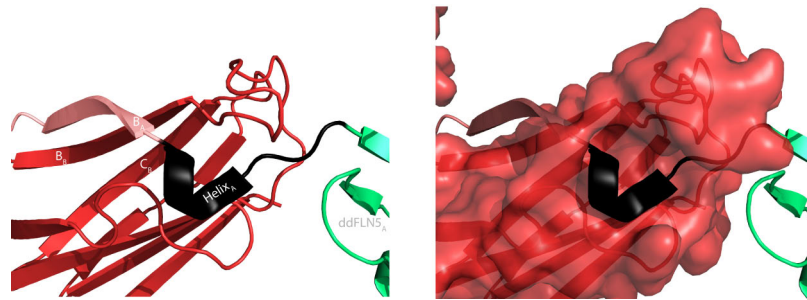


Abbildung 4.25: Struktur des Linkers zwischen ddFLN5 und ddFLN6.

Helix und Linker (schwarz) zwischen ddFLN5 (grün) und ddFLN6 (rot) bildet zahlreiche Kontakte zur zweiten ddFLN6 Domäne (dunkelrot, Domäne B) des Dimers aus. Der mit Kraft belastete β -Strang B (pink) von ddFLN6 Domäne A wird an seinem N Terminus in eine ungünstige Konformation gezwungen. Von ddFLN6 Domäne A ist nur β -Strang B dargestellt

Die Struktur der Interaktionsfläche zwischen ddFLN5 und ddFLN6 liefert somit eine Erklärung für die höhere Stabilität von ddFLN6 Δ Helix. Allerdings drängt sich die Frage auf, warum Helix und Linker überhaupt im Protein in dieser Form vorhanden sind, wenn ein willkürlich gewählter Aminosäureabschnitt an derselben Stelle zu einem mechanisch stabileren Dimer führt. Eine mögliche Antwort liefert eine Analyse der Entfaltungskräfte von wildtyp ddFLN6 und ddFLN6 Δ Helix. In Abbildung 4.26 links ist die Kraft, bei der sich beide Helices vom gefalteten ddFLN6 Dimer ablösen (vgl. Pfeil in Abbildung 4.26 mitte), gegen die Ziehgeschwindigkeit aufgetragen (schwarze Kreise). Bei Ziehgeschwindigkeiten unter 250 nm s^{-1} fällt diese Kraft mit der Dissoziationskraft von ddFLN6 zusammen, da die Lebensdauer des Dimers mit entfaltenen Helices nur noch kurz ist. Bei einer Geschwindigkeit von 1000 nm s^{-1} allerdings war die Dissoziationskraft des Dimers teilweise höher als die Kraft, die nötig war, um die Helices von der Struktur abzulösen (vgl. Abbildung 4.20 & Abbildung 4.21). Es fällt auf, dass die mittlere Kraft dieses Übergangs über einen weiten Geschwindigkeitsbereich mehr oder weniger konstant bleibt, während die Kraft, die nötig ist, um ddFLN4 (blaue Quadrate) oder ddFLN5 (grüner Rauten) zu entfalten, wie erwartet mit der Ziehgeschwindigkeit absinkt. Diese Ziehgeschwindigkeitsabhängigkeit der Entfaltungskraft wurde mit einer Monte-Carlo Simulation modelliert, in der ein Teil des Proteins entfalten und rückfalten kann, bis an einem Punkt die irreversible Dissoziation eintritt. Eine typische Kurve dieser Simulation ist in Abbildung 4.26 (mitte oben) dargestellt. Hierbei wurde angenommen, dass sich die Bar-

riere für Faltung und Entfaltung in der Mitte zwischen entfaltetem und gefaltetem Zustand befindet, was zu einer Potentialbreite von $\Delta x = 1$ nm für beide Übergänge führt⁶. Die Parameter des irreversiblen Dissoziationsschritts wurden anhand der Lebensdauerverteilung des ddFLN6 Dimers, bei dem beide Helices von der Struktur abgelöst waren, abgeschätzt. Zuletzt wurde Faltungs- und Entfaltungsrateso angepasst, dass die simulierten Kurven mit den gemessenen hinsichtlich der Länge des Bereichs der Gleichgewichtsfluktuationen und der Geschwindigkeit der Übergänge übereinstimmten.

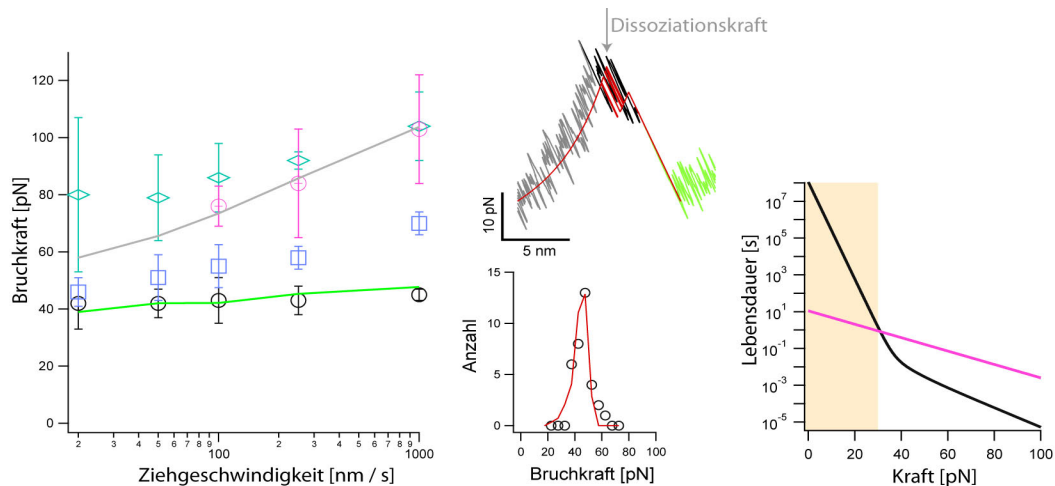


Abbildung 4.26: Die N-terminale α -Helix erhöht die Lebensdauer des ddFLN6 Dimers unter Kraft.

Ziehgeschwindigkeitsabhängigkeit der Entfaltungskräfte von ddFLN4 (blaue Quadrate), ddFLN5 (grüne Rauten) sowie Kraft des Ablösen der Helices von ddFLN6 (schwarze Kreise) oder Dissoziation von ddFLN6 Δ Helix (rosa Kreise). Die hellgrüne Linie ist das Ergebnis einer Monte-Carlo Simulation, die Entfaltung ($k_{\text{off}} = 0,009 \text{ s}^{-1}$, $\Delta x = 10 \text{ \AA}$) und Rückfaltung ($k_{\text{on}} = 1 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$, $\Delta x = 10 \text{ \AA}$) der α -Helix und Dissoziation von ddFLN6 ($k_{\text{off}} = 1 \text{ s}^{-1}$, $\Delta x = 5 \text{ \AA}$) berücksichtigt. Die graue Linie stellt eine Monte-Carlo Simulation mit $k_{\text{off}} = 0,015 \text{ s}^{-1}$ und $\Delta x = 3,8 \text{ \AA}$ dar. Mitte oben: Überlagerung einer Entfaltungskurve (Ziehgeschwindigkeit 100 nm s^{-1}) und einer Kurve, die mit einer Monte-Carlo-Simulation gewonnen wurde (rot). Der graue Pfeil markiert die bestimmte Dissoziationskraft. Mitte unten: Bruchkraftverteilung des Ablösen der α -Helix bei 1000 nm s^{-1} und Ergebnis der Monte-Carlo Simulation (rot). Rechts: Lebensdauer von wildtyp ddFLN6 (schwarz) und ddFLN6 Δ Helix (rosa) bei konstanter Kraft, der physiologische Kraftbereich ist orange hinterlegt.

Es zeigt sich, dass die Rückfaltungsrates der Helices sehr schnell gewählt werden muss, um die Daten zu reproduzieren. Hierbei muss angemerkt werden, dass nur zweimal neun Aminosäu-

⁶ Der Ausdehnungsunterschied zwischen gefaltetem und entfaltetem Zustand der Helix bei der Entfaltungskraft von $\sim 40 \text{ pN}$ beträgt $\sim 2 \text{ nm}$.

ren an den Gleichgewichtsfluktuationen beteiligt sind. Für ähnlich kurze Peptide sind Faltungszeiten auf einer μs -Zeitskala nicht ungewöhnlich (Kubelka, Hofrichter et al. 2004). Zudem ist der Rest von ddFLN6 gefaltet und kann eine Art Matrize für die Faltung der Helices zur Verfügung stellen. Lebensdauer und Barrierenposition von ddFLN6 Δ Helix wurden aus der Ziehgeschwindigkeitsabhängigkeit der Entfaltungskräfte bestimmt.

Aus diesen Parametern kann die Lebensdauer der ddFLN6-Bindung bei einer konstanten Kraft nach Glg. 4 berechnet werden (Abbildung 4.26 rechts)⁷. Es zeigt sich, dass wildtyp ddFLN6 bei niedrigen Kräften $< 30 \text{ pN}$, wie sie in zellulären Systemen wahrscheinlich vorherrschen (Brown und Discher 2009), um Größenordnungen stabiler ist als ddFLN6 Δ Helix.

4.4.1.2 Diskussion

Die im vorangegangenen Abschnitt vorgestellten Experimente erlaubten erstmals, das Aufbrechen des ddFLN6 Dimers und das Entfalten der getrennten Monomere direkt zu beobachten. Es stellte sich heraus, dass die Dissoziationskraft von ddFLN6 unter der Entfaltungskraft der schwächsten (ddFLN4) Domäne der Stabregion von ddFLN liegt. Diese Hierarchie der Entfaltungskräfte bleibt über einen weiten Ziehgeschwindigkeitsbereich erhalten (Abbildung 4.26), und obwohl sich die Dissoziationskraft von ddFLN6 und die Entfaltungskraft von ddFLN4 bei niedrigen Ziehgeschwindigkeiten annähern, wurde in allen Kraft-Ausdehnungskurven zuerst die Dissoziation von ddFLN6 beobachtet gefolgt von der Entfaltung von ddFLN4. In früheren Arbeiten zur Mechanik von ddFLN wurde die Dissoziationskraft des ddFLN6 Dimers auf $> 200 \text{ pN}$ geschätzt. Allerdings konnte in diesen Experimenten die Dissoziation nicht beobachtet werden, statt dessen wurde die Bruchkraft aus dem letzten Entfaltungszacken von Kurven bestimmt, die zweimal die Entfaltungssignatur von ddFLN4 zeigten (Schwaiger, Kardinal et al. 2004). Dieses Vorgehen ist analog zu der in Abschnitt 4.3 vorgestellten Abschätzung für das Dimer von Myo13. Während diese Vorgehensweise, wie im Falle von Myo13, durchaus valide Ergebnisse zu liefern imstande ist, sind mehrere Möglichkeiten denkbar, die zu falschen Resultaten bei dieser Art von Messung führen können. Eine simple Erklärung ist beispielsweise eine Disulfidbrücke zwischen zwei ddFLN Proteinen, wie sie

⁷ Hierzu wurde für ddFLN6 Δ Helix Glg. 4 eingesetzt. Für wild-typ ddFLN6 wurden die Entfaltungsrate k_1 , die Faltungsrate k_{-1} und die Rate der irreversiblen Dissoziation k_2 nach Glg. 4 und Glg. 5 errechnet und danach mit $k_1 k_2 / (k_1 + k_{-1} + k_2)$ addiert.

unter anderem zwischen zwei Cys747 am C-terminalen Ende von ddFLN5 ausgebildet werden können.

Zwar liegt die mechanische Stabilität des ddFLN6 Dimers augenscheinlich unter der der übrigen ddFLN Domänen, eine Analyse der Entfaltungskräfte, die Rückschlüsse auf die Energielandschaft des Entbindungs-/ Entfaltungsprozesses erlaubt, zeigt hingegen, dass die Dimerbindung bei niedrigen Kräften eine außerordentlich hohe Lebensdauer besitzt. Dies wird dadurch erreicht, dass sich vor der eigentlichen Dissoziation eine kurze α -Helix am N Terminus von ddFLN6 zusammen mit dem Linker zwischen ddFLN5 und ddFLN6 vom gefalteten Dimer in einer Gleichgewichtsreaktion ablösen und schnell wieder rückbinden kann. Das bedeutet, dass zwei aufeinanderfolgende Barrieren überquert werden müssen, um ddFLN6 zu dissoziieren – eine innere Barriere (nahe dem gefalteten Zustand) und eine äußere Barriere. Bei niedrigen Kräften dominiert die innere Barriere die Dissoziationskraft, während bei hohen Kräften die äußere Barriere überwiegt (vgl. zwei Steigungen in Abbildung 4.26). Dieser Effekt wird auch in den Daten direkt deutlich, da bei hohen Ziehgeschwindigkeiten die Dissoziationskraft höher als die Ablösekraft der Helices ist (Abbildung 4.20). Zwischen dem Energieminimum hinter der ersten Barriere und dem gefalteten Zustand besteht bei niedriger Belastung ein Gleichgewicht, was sich im schnellen hin-und-her Wechseln zwischen zwei Kraftniveaus in den Entfaltungsdaten niederschlägt (Abbildung 4.21). Dieses kraftinduzierte Vorgleichgewicht schützt die Dimerbindung vor irreversible Dissoziation und erhöht die Lebensdauer des Dimers. Hierbei muss angemerkt werden, dass sich nach dem Entfalten eines Teils einer Proteinstruktur die Richtung der angelegten Kraft und damit die Reaktionskoordinate ändern kann (Dietz und Rief 2004). Im Falle des ddFLN6-Dimers allerdings führt das Ablösen der Helices zu keiner signifikanten Änderung der Krafrichtung. Ein ähnliches Modell mit aufeinanderfolgenden Barrieren ist für Rezeptor-Liganden-Systeme vorgeschlagen worden (Merkel, Nassoy et al. 1999).

Die Änderung der freien Energie durch das Entfernen der Helices beträgt $\sim 20 k_B T$ und liegt damit höher als die Faltungsenergie vieler kleiner, monomerer Proteine (Jackson 1998). Konsequenterweise führt ein Austausch von Helices und Linker durch andere Aminosäuren zu einer deutlich reduzierten thermodynamischen Stabilität des Proteins (Abbildung 4.23), während die restliche Sekundär- und Quartärstruktur unbeeinflusst bleibt. Die mechanische Stabilität dieser Mutante - nicht aber die Lebensdauer bei niedrigen Kräften - ist allerdings höher als die des Wildtyps, was nahelegt, dass es subtile strukturelle Änderungen in ddFLN6 vor allem an den Kraftangriffspunkten geben muss. Die Kristallstruktur von des ddFLN6 Dimers zeigt, dass der N Terminus des ersten β -Strang durch die Interaktion der α -Helix mit der

zweiten ddFLN6 Domäne aus der Ebene des β -Faltblatts abgeknickt wird (Abbildung 4.25). Ersetzen der Helix durch andere Aminosäuren erlaubt offenbar die Bildung einer mechanisch stabileren Struktur an dieser Stelle des Proteins. Die am N Terminus des ersten β -Strang anliegende Kraft verhindert in wildtyp ddFLN6, dass sich die β -Stränge in die Struktur, die in ddFLN6 Δ Helix vorliegt, umordnen. Abbildung 4.27 fasst dieses Modell zusammen. Die nicht optimale Interaktion der β -Stränge ist offenbar der energetische Preis, der für die effiziente Bindung von Helix und Linker an die zweite ddFLN6 Domäne gezahlt werden muss.

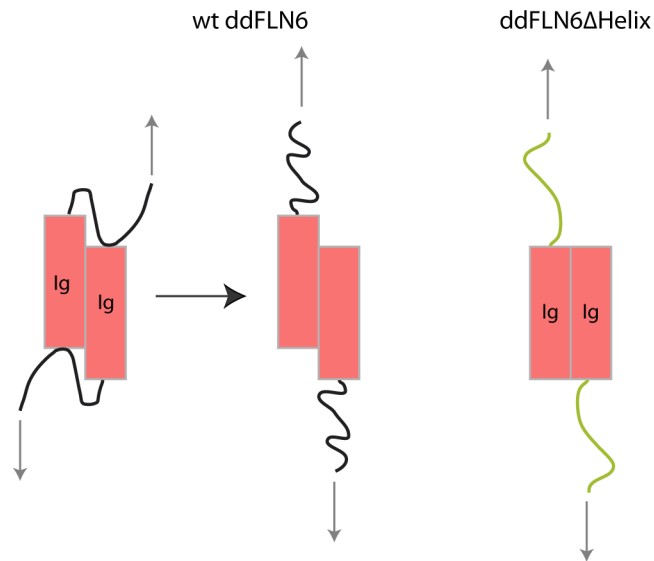


Abbildung 4.27: Destabilisierung der β -Faltblätter von ddFLN6 durch eine N-terminale α -Helix.

Der Ig-Teil von wildtyp ddFLN6 (rote Kästen) (links) wird durch eine N-terminale α -Helix (schwarz) destabilisiert. Austausch dieser Helix (grün) führt zu einer stärkeren Interaktion der β -Stränge und einem mechanisch stabileren Protein. Da nach dem Ablösen der Helices von wildtyp ddFLN6 eine Kraft auf die β -Faltblätter der Domäne wirkt, können sich diese nicht zu der Struktur umordnen, die in ddFLN6 Δ Helix vorliegt (mitte).

Bereits in frühen Experimenten zum Aufbau von ddFLN wurde die Bedeutung der Verbindung zwischen ddFLN5 und ddFLN 6 erkannt (Fucini, Koppel et al. 1999). In diesen Experimenten zeigte sich, dass ddFLN6 für sich alleine in einem Gemisch aus Monomer und Dimer vorliegt, während hingegen ddFLN56 ausschließlich als Dimer auftrat. Die Kristallstrukturen von ddFLN56 (McCoy, Fucini et al. 1999) und ddFLN456 (Popowicz, Muller et al. 2004) zeigen einige Interaktionen zwischen ddFLN5 und ddFLN6, was dieses Ergebnis strukturell untermauert. Die mechanische Experimente dieser Arbeit zeigen, dass die Verbindung zwischen ddFLN5 und ddFLN6 (Helix + Linker) wichtig für die thermodynamische (Abbildung 4.23) und mechanische Stabilität des ddFLN56 Domänenpaars sind (Abbildung

4.24). Ein Austausch von Helix und Linker durch Glyzine führt allerdings weiterhin zu dimerem Protein.

Auch in Molekulardynamiksimulationen wurden Helix und Linker am N Terminus von ddFLN6 als die mechanisch schwächste Komponente der Stabregion von ddFLN identifiziert (Kolahi und Mofrad 2008). Allerdings wurde in diesen Simulationen nicht das ddFLN6 Dimer mit Kraft belastet, vielmehr wirkte die Kraft auf den N Terminus von ddFLN4 und auf den C Terminus von ddFLN6, was keine Aussagen über die Dissoziationskraft des Dimers ermöglicht. Überraschenderweise war monomeres ddFLN6 in den Simulationen stabiler als ddFLN4 und ddFLN5, während in den oben vorgestellten Experimenten ddFLN6 Monomere bei ~35 pN entfalteten und eine extrapolierte Lebensdauer von < 1 Sekunde haben.

Aufgrund der niedrigen Entfaltungskraft und schnellen Rückfaltungsrate von ddFLN4 wurde postuliert, dass diese Domäne als elastisches Element der Stabregion von ddFLN dient, die bei Belastung ausgedehnt werden kann, um die Kraft, die auf den Rest des Proteins und seine Bindungspartner wirkt, zu verringern (Schwaiger, Kardinal et al. 2004). Da sich in den Experimenten dieser Arbeit herausstellte, dass das ddFLN6 Dimer mechanisch weniger stabil als ddFLN4 ist, scheint diese Rolle unwahrscheinlich. Im Prinzip könnte die Helix am N Terminus von ddFLN6 als solch ein elastisches Element in ddFLN dienen. Allerdings verlängert sich die Gesamtlänge des Filamindimers bei Dehnung der Helix um weniger als 10 %, was diese Hypothese unwahrscheinlich erscheinen lässt. Die Kristallstruktur von ddFLN4-6 zeigt allerdings, dass sich die sechs Domänen nicht perlenkettenartig anordnen, sondern dass Kontakte zwischen den Ig-Domänen bestehen, die zu einer zick-zack-artigen Konformation führen (Popowicz, Muller et al. 2004). Es scheint plausibel, anzunehmen, dass schon eine geringe Kraft zu einem Bruch dieser Interaktionen führt, woraufhin sich die Domänen entlang der Krafrichtung ausrichten (Molekulardynamiksimulationen legen dies nahe (Kolahi und Mofrad 2008)) und das Protein verlängern, vorausgesetzt, die angelegte Kraft liegt unter der bislang unbekanntem Dissoziationskraft der Aktinbindungsdomäne. Linker und α -Helix am N Terminus von ddFLN6 wirken somit weniger als elastisches Element, sondern vielmehr als eine elegante Lösung der Natur für eine Bindung mit hoher Lebensdauer unter Kraft.

4.4.2 Dissoziationskraft der Dimerisierungsdomäne 24 aus humanem Filamin C

Im Gegensatz zum einfacher aufgebauten ddFLN aus *Dictyostelium discoideum* besteht Filamin aus Wirbeltieren aus zwei Monomeren mit jeweils 24 Untereinheiten (Gorlin, Yamin et al. 1990; Popowicz, Schleicher et al. 2006). Diese Untereinheiten besitzen eine Immunglobulinstruktur, wobei die C-terminale Domäne 24 die Dimerisierung vermittelt (Himmel, Van Der Ven et al. 2003; Pudas, Kiema et al. 2005; Seo, Seok et al. 2009). Flexible Scharnierbereiche (engl. ‚hinge‘) zwischen Untereinheiten 23 und 24 sowie zwischen 15 und 16 sorgen für die charakteristische V-Form des dimeren Proteins, an dessen N Termini sich jeweils eine Aktinbindedomäne befindet. Domänen 9-15 („rod 1“) beinhalten eine zusätzliche Aktinbindestelle, während Untereinheiten 16-23 für die Bindung an Partnerproteine, wie beispielsweise Integrine, verantwortlich sind (Nakamura, Osborn et al. 2007).

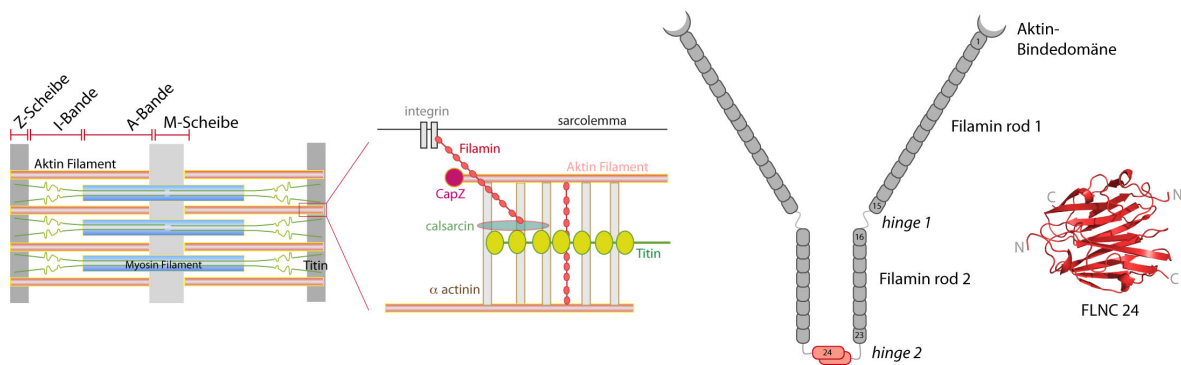


Abbildung 4.28: Lokalisation und Struktur von Filamin.

Lokalisation von humanem Filamin C im Sarkomer (links), schematische Struktur des dimeren Proteins und Röntgenstruktur der Dimerisierungsdomäne FLNC24 (1V05).

Im Menschen gibt es drei verschiedene Filamine: Filamin A und B, die im ganzen Körper exprimiert werden, und Filamin C, welches exklusiv in der Z-Scheibe des Sarkomers auftritt und Aktin mit Integrinen und Sarcoglykanen verbindet. Die Dimerisierungsdomäne von Filamin C, FLNC24, bildet ein antiparalleles Dimer (Abbildung 4.28 rechts) und ist mit der benachbarten Domäne FLNC23 durch einen flexiblen Polypeptidabschnitt verbunden.

Im folgenden Abschnitt sollen Experimente vorgestellt werden, in denen die Bruchkraft des FLNC24 Dimers bestimmt wurde. Analog zur Dimerbindung von ddFLN6 zeigt sich, dass die Dissoziationskraft des Dimers unter der mittleren Entfaltungskraft der FLNC-Domänen liegt.

4.4.2.1 Ergebnisse

Um die Dissoziationskraft von FLNC24 zu messen, wurden an den N Terminus der Filamin-domäne drei Ubiquitineinheiten fusioniert, die als Angriffspunkte für Blattfederspitze und Oberfläche dienen. Da die C Termini von FLNC24 im Dimer nicht zueinander hin orientiert sind (vgl. Abbildung 4.28 rechts), wurde ein 26 Aminosäuren langer flexibler Linker aus den Aminosäuren Glyzin und Serin an den C Terminus von FLNC angefügt (vgl. Abbildung 4.29 oben). Dieser Linker trägt an seinem C-terminalen Ende ein Cystein gefolgt von einem Leuzinzipper aus dem Hefetranskriptionsfaktor GCN4 (O'Shea, Klemm et al. 1991).

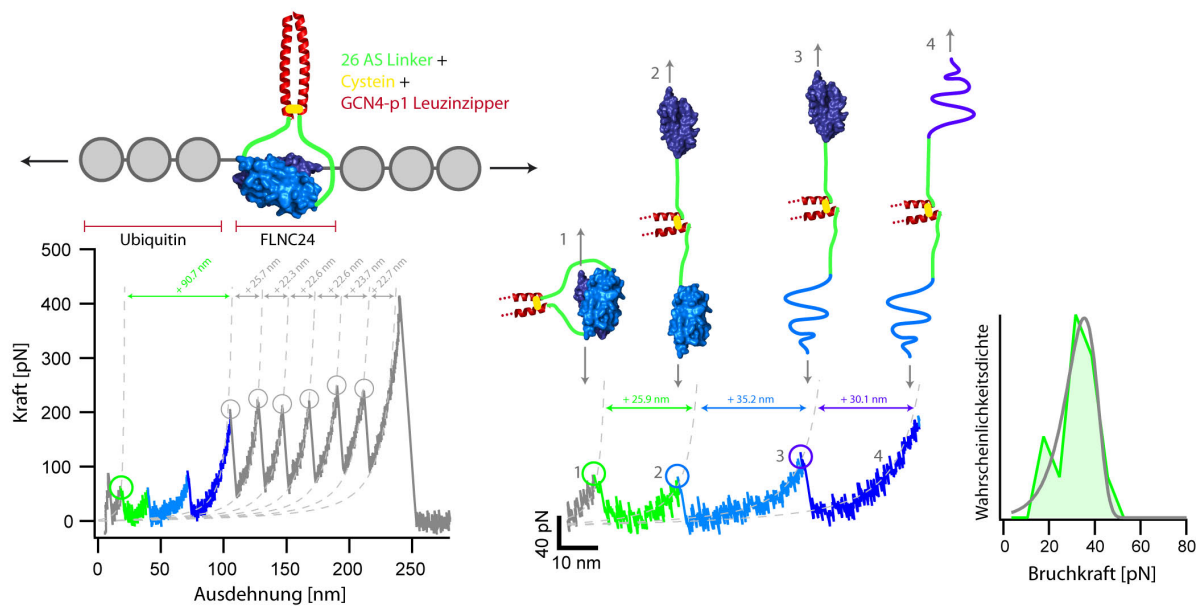


Abbildung 4.29: Dissoziationskraft von FLNC24.

Schematische Struktur des Ubiquitin-FLNC24-Fusionsproteins (links oben), typische Entfaltungskurve (links unten) und strukturelle Interpretation des Entbindungs-/Entfaltungspfades (mitte). Rechts: Verteilung der Dissoziationskräfte (grün) von FLNC24 und rechnerische Bruchkraftverteilung mit einer Kraft-Ladungsrate von 1700 pN s^{-1} , $\Delta x = 6 \text{ \AA}$ und $k_{\text{off}} = 0,4 \text{ s}^{-1}$ (grau).

Leuzinzipper sind Superhelices aus zwei α -Helices, die aufgrund der Wechselwirkungen der hydrophoben Aminosäuren (v.a. Leuzin) an der Interaktionsfläche der α -Helices mit hoher Affinität Dimere bilden. Diese Vorgehensweise führte – im Gegensatz zu den in den vorigen Abschnitten vorgestellten einfachen Polypeptidlinkern mit einem terminalen Cystein – zu

einer effizienten Disulfidbrückenbildung zwischen den Ubiquitin-FLNC-Monomeren trotz des vergleichsweise langen flexiblen Glyzin-Serin-Linkers⁸.

Eine typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve des Ubiquitin-FLNC24-Fusionsproteins ist in Abbildung 4.29 dargestellt. Im hinteren Teil der Kurve – ab einer Ausdehnung von ~100 nm – sind die sägezahnartigen Entfaltungszacken von Ubiquitin zu erkennen (graue Kreise). Im vorderen Teil der Kurve (grüner Kreis) tritt ein ~90 nm langes Entfaltungsereignis auf, das zwei Zwischenzustände aufweist (Vergrößerung mitte Abbildung 4.29). Die beiden Zwischenzustände (hell- und dunkelblauer Kreis in Abbildung 4.29 mitte) haben einen ähnlichen Konturlängenzuwachs ($29,1 \pm 0,4$ nm bzw. $30,7 \pm 0,7$ nm), der Erwartete läge bei 30,1 nm für die Entfaltung der 90 Aminosäuren großen, monomeren FLNC24 Domänen. Das erste Entfaltungsereignis (grün Abbildung 4.29 mitte) stammt von der Dissoziation des FLNC24 Dimers mit anschließender Dehnung des Linkers (Konturlängenzuwachs von $24,4 \pm 1$ nm, Erwartungswert 22 nm). Eine Kraftverteilung der Dissoziationskraft von FLNC24 ist in Abbildung 4.29 rechts dargestellt, es ergibt sich eine mittlere Dissoziationskraft von 33 ± 5 pN.

4.4.2.2 Diskussion

In früheren Arbeiten zur Mechanik von humanem Filamin wurde spekuliert, dass bei der mechanischen Belastung von filaminverknüpften Aktinnetzwerken einzelne Domänen von Filamin entfalten könnten, um die Belastung auf das Netzwerk zu verringern (Yamazaki, Furuike et al. 2002). In diesen Arbeiten wurden mittlere Entfaltungskräfte zwischen 50 und 200 pN gefunden (Furuike, Ito et al. 2001), eine in dieser Arbeit durchgeführte Messung an der isolierten Filamin C Domäne 23 (FLNC23) ergab eine mittlere Entfaltungskraft von 163 ± 5 pN für diese Domäne (Abbildung 4.30). Da die mittlere Dissoziationskraft des FLNC24 Dimers deutlich unter diesem Wert liegt, ist es unwahrscheinlich, dass Ig-Domänen aus Filamin entfalten, bevor die C-terminale Dimerbindung des Proteins dissoziiert. Die mechanische Hierarchie zwischen Entfaltung der Ig-Domänen und Dissoziation der Dimerbindung scheint somit bei humanem Filamin (hsFLN) und Filamin aus *Dictyostelium discoideum* (ddFLN) dieselbe zu sein. Die Kristallstrukturen von hsFLNC24 (Pudas, Kiema et al. 2005) und hsFLNA24 (Seo, Seok et al. 2009) sind sehr ähnlich, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese Hierarchie auch für die anderen beiden humanen Filamine zutrifft. Die Strukturen der beiden

⁸ Um weitere, nicht erwünschte Disulfidbrücken zwischen den Ketten zu vermeiden, wurden die zwei in FLNC24 vorhandenen Cysteine durch Serine ersetzt.

Dimerisierungsdomänen hsFLNC24 und ddFLN6 unterscheiden sich beträchtlich: die intermolekularen β -Faltblätter zwischen den Domänen werden von unterschiedlichen β -Strängen gebildet, zudem ist die Interaktionsfläche von ddFLN6 mit $\sim 4500 \text{ \AA}$ etwa viermal so groß wie die für hsFLNC24. Zwar ist der Unterschied der mittleren Dissoziationskraft zwischen ddFLN6 und hsFLNC24 nur gering, die kinetische Analyse der Entfaltungskräfte von ddFLN6 zeigt allerdings, dass dieses Dimer eine extrem langlebige Bindung darstellt (Abbildung 4.26), während die extrapolierte Lebensdauer des hsFLNC24 Dimers $< 10 \text{ s}$ beträgt (Abbildung 4.29).

Die durch analytische Ultrazentrifugation gemessene Dissoziationskonstante von hsFLNC24 beträgt $2,5 \mu\text{M}$ (Pudas, Kiema et al. 2005), ähnlich der Affinität von Titin Domäne M10 und Obscurin Domäne 1 (O1) (Abschnitt 4.2). Da angenommen werden kann, dass diese beiden Komplexe auch vergleichbare Bindungsraten besitzen, verwundert die ähnliche mechanische Stabilität kaum. Beide Bindungen sind offenbar eher dynamisch als rigide.

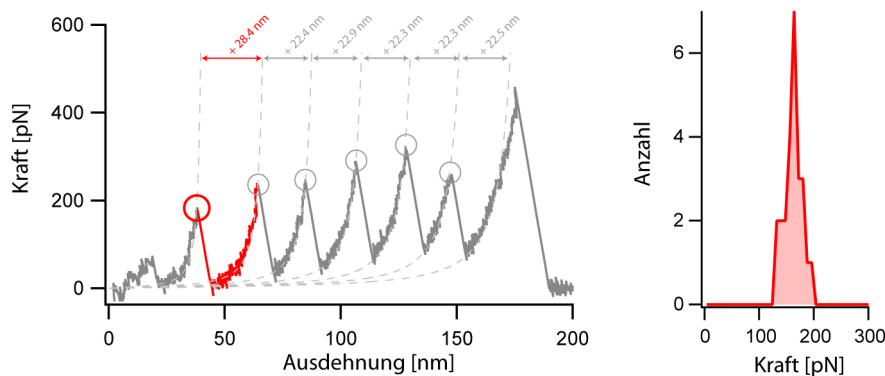


Abbildung 4.30: Entfaltung von FLNC23.

Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve (links) eines Fusionsproteins aus sechs Ubiquitineinheiten (grau) und FLNC23 (rot) und Entfaltungskraftverteilung von FLNC23 (rechts).

Eine einzelne Mutation an der Interaktionsfläche von hsFLNC24 (Pudas, Kiema et al. 2005) oder hohe Salzkonzentrationen (Himmel, Van Der Ven et al. 2003) reichen aus, um stabile hsFLNC24 Monomere zu erhalten. Diese stabilen Monomere sind in den Entfaltungskurven von hsFLNC24 deutlich zu erkennen (Abbildung 4.29 mitte, blaue Kreise); ihre Entfaltungskraft liegt mit $65 \pm 7 \text{ pN}$ über der Dissoziationskraft des Dimers. Auch in dieser Hinsicht ähnelt hsFLNC24 dem Komplex zwischen M10 und O1.

Der Linker (*hinge 2'*) zwischen hsFLNC23 und 24 trägt zur Flexibilität des Proteins bei, außerdem wurde beobachtet, dass dieser Abschnitt des Proteins die Stabilität des Dimers in Lösung erhöhen kann (Himmel, Van Der Ven et al. 2003), auch wenn niedrig aufgelöste

Strukturdaten nahelegen, dass hsFLNC23 keine Interaktionen mit dem hsFLNC24 Dimer zeigt und der Linker hauptsächlich als flexibles Element dient (Sjekloca, Pudas et al. 2007). Darüber hinaus ist die Dissoziationskonstante des vollständigen humanen Filamin Dimers mit $K_D = 2,8 \mu\text{M}$ kaum höher als die von isoliertem hsFLNC24 (Davies, Wallach et al. 1980), so dass der Einfluss des Linkers auf die Dimerstabilität bisher nicht vollständig geklärt ist. In den hier vorgestellten Messungen fehlte diese Verbindung zwischen hsFLNC23 und 24, so dass die Stabilität der hsFLNC24 Dimerbindung im vollständigen Protein eventuell höher sein könnte. Die beobachtete mechanische Hierarchie zwischen Entfaltung der Ig-Domänen und Dissoziation kann allerdings als gesichert angesehen werden: In Experimenten, in denen das hsFLNC23-24 Domänenpaar mit drei Ubiquitineinheiten fusioniert wurde, wurden keine Kurven beobachtet, die mehr als eine Entfaltung von hsFLNC23 oder drei Ubiquitineinheiten aufwiesen.

Das mechanische Verhalten eines Netzwerks wird von der schwächsten Interaktion bestimmt. Im Falle eines von Filamin quervernetzten Aktinnetzwerks kann bei Belastung entweder die Verbindung zwischen Filamin und Aktin oder die Verbindung zwischen den Filaminmonomeren brechen oder eine Ig-Domäne von Filamin entfalten, um der Belastung des Netzwerks nachzugeben. Die Ergebnisse sowohl für ddFLN als auch für hsFLN machen eine Entfaltung von Ig-Domänen der Stabregion von Filamin eher unwahrscheinlich. Für die mechanische Stabilität der Aktinbindedomäne von humanem Filamin A wurden Dissoziationskräfte zwischen 40 – 80 pN mit optischen Pinzetten gemessen und eine Lebensdauer von ~ 10 s für diese Interaktion bei Nullkraft extrapoliert (Ferrer, Lee et al. 2008), allerdings wurden für die homologe Aktinbindestelle von α -Actinin deutlich niedrigere Dissoziationskräfte und Lebensdauern ermittelt (Miyata, Yasuda et al. 1996), so dass die Interaktion zwischen Aktin und Filamin durchaus das schwächste Glied eines Aktin-Filamin-Netzwerks sein kann. ddFLN hingegen bildet ein bei niedriger Belastung sehr langlebiges Dimer, so dass für dieses Protein die Dissoziation der Aktinbindedomäne vom Aktinfilament als wahrscheinlich angesehen werden kann.

Die hier vorgestellten Messungen zu Dissoziationskraft der Dimerisierungsdomänen von Filamin haben nicht nur Implikationen für mechanische Hierarchien in Aktin-Filamin-Netzwerken. Insbesondere humanes Filamin interagiert mit einer Vielzahl an weiteren Proteinen und verbindet beispielsweise in der Z-Scheibe Aktin mit der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums, indem es an Integrine und Sarcoglycane bindet (Popowicz, Schleicher et al. 2006). Für humanes Filamin A wurde unlängst aus Molekulardynamiksimulationen (Pentikainen und Ylanne 2009) und kristallographischen Daten (Lad, Kiema et al. 2007) ge-

folgt, dass Filamin A Domänen 19-21 eine verdeckte Bindungsstelle für Integrine besitzen, die exponiert wird, wenn das Protein mit Kraft belastet wird. Die in dieser Arbeit ermittelte niedrige Dissoziationskraft des hsFLNC24 Dimer stellt somit auch eine obere Grenze für diese Kraft dar.

5 Proteinkomplexe aus Immunglobulindomänen

In Abschnitt 4 wurden Dissoziationskräfte von Proteinkomplexen zwischen Muskelproteinen wie dem Komplex aus Titin und Telethonin, Titin und Obscurin oder den Homodimeren von Myomesin oder Filamin diskutiert. Kernbestandteil dieser Proteinkomplexe waren Proteine, die eine Immunglobulin (Ig)-Faltung aufwiesen (Huber, Deisenhofer et al. 1976). Immunglobulindomänen sind eine weitverbreitete Faltungsfamilie, die neben den namensgebenden Immunglobulinen (Antikörpern) auch in einer Vielzahl weiterer Proteine vorkommt. Charakteristisch ist die Struktur mit zwei β -Faltblättern, die sich in einer sandwichartigen Struktur zusammenlagern (Bork, Holm et al. 1994).

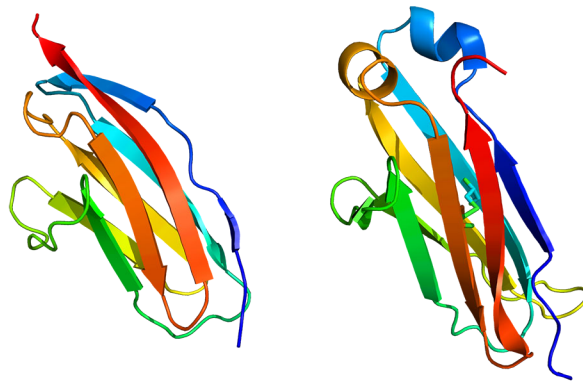


Abbildung 5.1: Struktur von Immunglobulindomänen

Struktur von der Domäne I27 aus Titin (links, 1TIT) und von C_L (rechts) aus einem Antikörper (IgG, 1FH5) mit interner Disulfidbrücke.

In Abschnitt 4 wurden bereits die Bruchkräfte von fünf Komplexen aus Ig-Domänen, die im Muskel vorkommen bestimmt. In diesen Komplexen assoziierten die beteiligten Ig-Domänen über β -Faltblätter, die sich über mehr als eine Untereinheit des Komplexes erstreckten. Im folgenden Abschnitt sollen die Dissoziationskräfte eines Komplexes aus zwei α -Crystallin-Domänen, welche eine Ig-artige Faltungsstruktur besitzen, sowie zwischen zwei Immunglobulindomänen aus einem Antikörper diskutiert werden. Bei diesen Komplexen findet die Interaktion zwischen den Monomeren eher durch Seitenketten statt durch intermolekulare β -Faltblättern statt.

5.1 Dissoziationskraft des α -Crystallin Dimers aus Hsp16,5

Kleine Hitzeschockproteine (sHsps, *small heat shock proteins*) sind eine heterogene Klasse von molekularen Chaperonen, die Zellen helfen, in Stresssituationen zu überleben (Haslbeck, Franzmann et al. 2005). Hierbei spielen sie besonders für den Schutz gegen erhöhte Temperaturen eine wichtige Rolle (Schirmer, Lindquist et al. 1994) und verhindern die unspezifische Aggregation anderer Proteine (Narberhaus 2002; McHaourab, Godar et al. 2009). Charakteristisch für sHsps ist die Bildung von Überstrukturen, die meist kugelförmig sind und aus der α -Crystallin Domäne als kleinstem Baustein bestehen (Abbildung 5.2 oben) (Kim, Kim et al. 1998; van Montfort, Basha et al. 2001). Die α -Crystallin Domäne, benannt nach dem gleichnamigen Protein aus der Augenlinse (Horwitz 2003), ist eine immunglobulin-artige Proteindomäne, die über zwei gemeinsame β -Faltblätter und hydrophobe Wechselwirkungen zum Dimer assoziiert (Abbildung 5.2 unten). C- und N-terminale Abschnitte des Proteins, die keine wohl definierte Struktur annehmen, sind für die Oligomerisierung zu funktionalen sHsps und für die Interaktion mit Partnerproteinen verantwortlich (Kim, Kim et al. 1998).

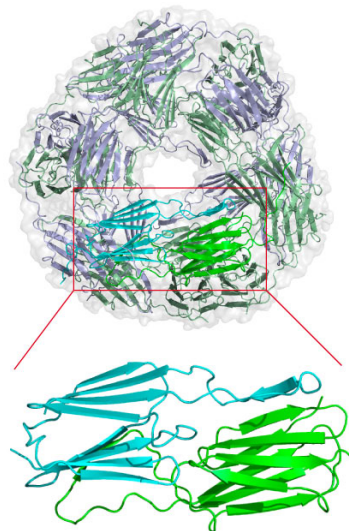


Abbildung 5.2: Struktur von Hsp16,5 aus *Methanococcus janashii*.

Das kleine Hitzeschockprotein Hsp16,5 bildet eine Kugel aus 24 Untereinheiten (oben).

Kleinster Baustein ist die dimere α -Crystallin Domäne (unten) (Kim, Kim et al. 1998) .

Um die komplexe Struktur des funktionalen sHsps korrekt auszubilden, ist die Hierarchie der Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Bestandteilen von großer Bedeutung. Das α -Crystallin Dimer ist der Baustein, von dem aus höhere oligomere Strukturen gebildet werden. Über die Faltung und Assoziation des α -Crystallin Dimers ist bislang noch wenig bekannt. Im folgenden Abschnitt sollen kraftspektroskopische Experimente vorgestellt werden, die die

strukturelle Hierarchie dieses Proteins am Beispiel von α -Crystallin aus Hsp16,5 aus *Methanococcus janashii* näher untersuchen.

5.1.1 Ergebnisse

Gleichgewichtsentfaltung von 16,5 α

In Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Biotechnologie der TU München wurde die Gleichgewichtsstabilität des α -Crystallin Dimers aus Hsp16,5 aus *Methanococcus janashii* (nachfolgend 16,5 α) gemessen. Hierzu wurde eine konstante Menge Protein mit aufsteigenden Konzentrationen des chemischen Denaturierungsmittels Guanidinium-Hydrochlorid (GdmCl) inkubiert und danach der Anteil an gefaltetem Protein spektroskopisch bestimmt.

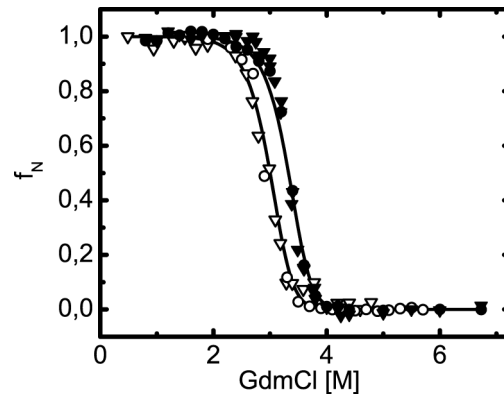
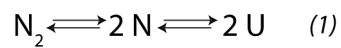


Abbildung 5.3: Gleichgewichtsstabilität von 16,5 α .

Gleichgewichtsentfaltungskurven von 16,5 α in der Gegenwart von Guanidinium-Hydrochlorid (GdmCl). Der Anteil an gefaltetem Protein (f_N) wurde durch CD-Spektroskopie (Dreiecke) oder Fluoreszenzspektroskopie (Kreise) bestimmt (offen: 5 μ M, geschlossen 50 μ M). Die durchgezogenen Linien sind Fits eines Zweizustandsmodells für Dimerentfaltung, das als Faltungsenthalpie $\Delta G = 81,4 \pm 2,4$ kJ/mol und Kooperativitätsparameter $m = 17,2 \pm 0,8$ kJ/mol·M liefert. Die Entfaltungskurven wurden von Dr. Jin Chen, Lehrstuhl für Biotechnologie, Chemiedepartment TU München, aufgenommen.

Zwei spektroskopische Verfahren, die gegenüber unterschiedlichen Parametern der Proteinstruktur empfindlich sind, wurde eingesetzt: Circular dichroismus-Spektroskopie (Dreiecke in Abbildung 5.3) misst den Anteil an Sekundärstruktur, Fluoreszenzspektroskopie hingegen ist sensitiv auf die Umgebung der fluoreszenten Aminosäure Tryptophan, die in jedem 16,5 α Monomer einmal vorkommt (Kreise in Abbildung 5.3). Es ergeben sich typische sigmoidale Entfaltungskurven (Abbildung 5.3), wobei es keine Rolle spielte, ob von vollständig gefaltetem oder vollständig entfaltetem Protein ausgegangen wurde.

Wurde die Messung mit einer zehnfach höheren Menge an Protein (50 μM) durchgeführt (gefüllte Kreise / Dreiecke in Abbildung 5.3), verschob sich der Übergangsmittelpunkt der Kurve zu höheren GdmCl Konzentrationen. Für die Entfaltung eines Dimers gibt es mehrere denkbare Entfaltungsszenarien: Einerseits könnte das gefaltete Dimer (N_2) dissoziieren und die beiden gefalteten Monomere (2 N) in zwei entfaltete Monomere (2 U) entfalten (Szenario 1), andererseits könnte das Dimer (N_2) direkt in zwei ungefaltete Monomere (2 U) übergehen (2).



Die Entfaltungskurven von 16,5 α zeigen einen sigmoidalen Übergang, Abweichungen, die auf eine zweite Spezies hindeuten, sind nicht zu erkennen. Zwei unterschiedliche spektroskopische Verfahren, die unterschiedliche Eigenschaften der Proteinstruktur messen (Kreise und Dreiecke), liefern identische Ergebnisse. Diese beiden Charakteristika des Entfaltungsübergangs deuten darauf hin, dass im Übergangsbereich nur zwei der drei möglichen Zustände in Szenario (1) besetzt werden. Würde 16,5 α schon bei sehr geringen GdmCl-Konzentrationen dissoziieren und der sigmoidale Entfaltungsübergang das Entfalten dieses Monomers darstellen, so wäre dies eine unimolekulare Reaktion, bei der keine Abhängigkeit von der Proteinkonzentration erwartet wird. Abbildung 5.3 zeigt jedoch, dass die Stabilität von 16,5 α mit steigender Proteinkonzentration zunimmt (gefüllte Dreiecke, Kreise). Das bedeutet, dass der dimere Zustand von 16,5 α (N_2) im Übergangsbereich besetzt wird. Daher ist anzunehmen, dass der monomere entfaltete Zustand während der Entfaltung nicht besetzt wird (Szenario 2) und 16,5 α vom gefalteten Dimer direkt zum ungefalteten Monomer übergeht (vgl. (Bowie und Sauer 1989)). Dissoziation und Entfaltung laufen somit hochkooperativ ab.

Mechanische Stabilität von wildtyp 16,5 α

Um die mechanische Stabilität des 16,5 α Dimers zu bestimmen, wurde der C Terminus von 16,5 α mit einem chimären Titin-Filamin Protein fusioniert (vgl. Abbildung 5.4 links). Die sechs Immunglobulin-Domänen aus Filamin (ddFLN3-5 aus Dictyostelium Filamin (Schwaiger, Kardinal et al. 2004)) und Titin (I27-29 aus humanem Titin (Li, Linke et al. 2002)) dienen zur Anbindung an Blattfederspitze und Oberfläche und lassen sich voneinander anhand ihres Konturlängenzuwachses unterscheiden. Besonders Filamin Domäne 4 (ddFLN4) sticht heraus, da bei dieser Ig-Domäne ein Entfaltungszwischenzustand durchlaufen wird. Entfaltungsereignisse von ddFLN4 lassen sich dadurch eindeutig in den Kraft-Ausdehnungs-

Kurven identifizieren. Zwei Entfaltungseignisse von ddFLN4 sind als rote Zacken in den Kraft-Abstand-Kurven in Abbildung 5.4 A zu markiert, danach sind zwei weitere Entfaltungseignisse von ddFLN (violett in Abbildung 5.4 A) in den Daten zu erkennen. Danach steigt die Kraft bis ~ 180 pN an, bevor die Blattfeder in ihre Ruhelage relaxiert. Da ddFLN4 nur einmal im monomeren Protein vorkommt, bedeutet das Auftreten von zwei Entfaltungseignissen von ddFLN4 in einer Kraft-Abstands-Kurve (rote Zacken in Abbildung 5.4 A), dass das chimäre Protein jeweils C-terminal von ddFLN4 (beispielsweise an ddFLN5 oder I27) an Oberfläche und Blattfederspitze angebunden war. In dieser Geometrie wird das $16,5\alpha$ Dimer mit Kraft belastet und der letzte Zacken der Kraftkurve (grüner Kreis in Abbildung 5.4 A) repräsentiert die Dissoziation des Dimers. Allerdings kann das Brechen der Dimerbindung nicht vom Lösen der Polypeptidkette von der Oberfläche oder der Blattfeder unterschieden werden, so dass die in Abbildung 5.4 B gezeigte Kraftverteilung beide Klassen an Ereignissen enthält. Der Mittelwert (98 ± 10 pN) stellt somit nur eine untere Grenze für die Dissoziationskraft dar.

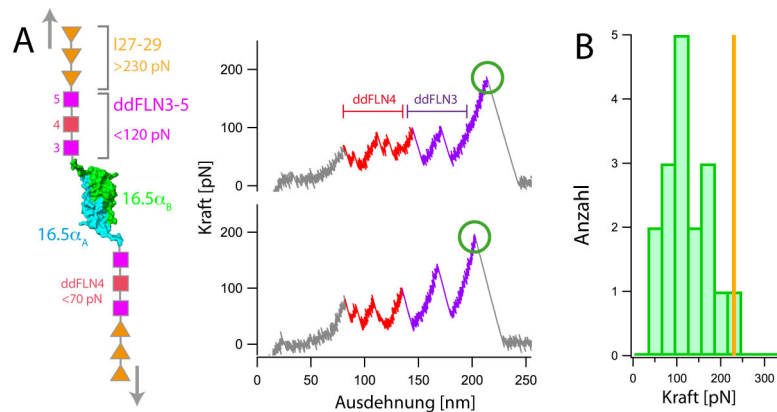


Abbildung 5.4: Mechanische Stabilität von wild-typ $16,5\alpha$.

(A) Skizze des dimeren Titin-Filamin- $16,5\alpha$ Proteins und typische Kraft-Ausdehnungs-Kurven. (B) Bruchkraftverteilung des letzten Entfaltungszackens (grüner Kreis in A).

Analog zur Diskussion in 4.3 kann aus der Architektur des chimären Titin-Filamin Proteins auch eine obere Grenze der Entfaltungskraft abgeschätzt werden: Die mittlere Entfaltungskraft der Ig-Domänen steigt ausgehend von $16,5\alpha$ zum C Terminus des Proteins hin an (vgl. Schema in Abbildung 5.4 A links). Es ist davon auszugehen, dass das Protein in vielen Fällen über eine der Ig-Domänen aus Titin (I27-29) an Oberfläche und Spitze angebunden war, wenn Kurven mit zwei Entfaltungseignissen von ddFLN4 beobachtet wurden. Allerdings wurde das Entfaltungsmuster von I27-29 in diesen Kurven nie beobachtet, was nahelegt, dass die Dimerbindung von $16,5\alpha$ bricht, bevor die Kraft ausreichend hoch angestiegen ist, um I27-29 zu entfalten. Die mittlere Entfaltungskraft dieser Domänen (230 pN, orange Linie in

Abbildung 5.4 B) stellt also eine obere Grenze für die Entfaltungskraft von $16,5\alpha$ dar. $16,5\alpha$ ist somit ein mechanisch stabiler Proteinkomplex, allerdings kann diese Art von Experimenten keine genauere Aussage über die Kooperativität von Dissoziation und Entfaltung treffen.

Mechanische Stabilität von disulfidverknüpftem $16,5\alpha$

In Abschnitt 4.1 wurde die Dissoziationskraft des Titin-Telethonin Komplexes gemessen, indem die drei Komponenten des Komplexes mittels Disulfidbrücken verbunden wurden. Analog zu dieser Vorgehensweise wurden die Aminosäuren Serin 46 und Serin 97 durch Cysteine ersetzt, um die Polypeptidketten von $16,5\alpha$ kovalent miteinander zu verbinden. Wie im vorangegangenen Abschnitt dienen sechs Ig-Domänen aus Titin und Filamin als Angriffspunkte für Oberfläche und Blattfederspitze. Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurven sind in Abbildung 5.5 dargestellt.

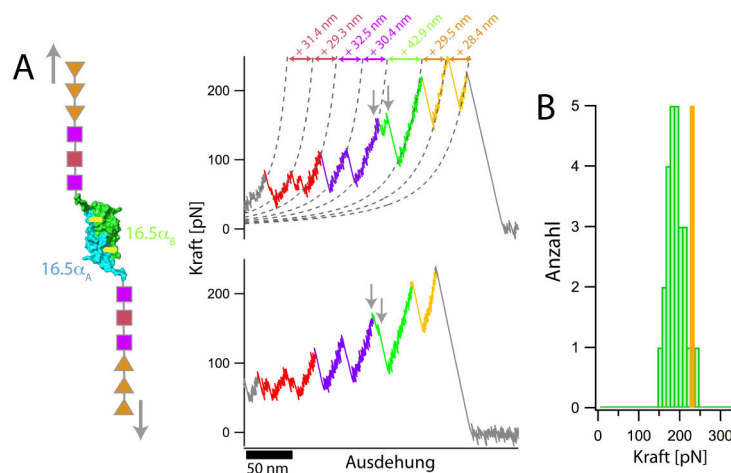


Abbildung 5.5: Dissoziation von disulfidverknüpftem $16,5\alpha$.

(A) Schema des chimären Proteins (links) und typische Kraft-Ausdehnungs-Kurven. (B) Bruchkraftverteilung von $16,5\alpha$.

Nach dem Entfalten von zweimal ddFLN4 (rot in Abbildung 5.5 A) und zwei weiteren ddFLN Domänen (violett) tritt ein neues, ~ 40 nm langes Entfaltungsereignis auf (grün), auf das die Entfaltung mehrerer Ig-Domänen aus Titin folgt (gelb). Das neu hinzugekommene Entfaltungsereignis zerfällt bei genauerem Hinsehen (graue Pfeile in Abbildung 5.5 A, vgl. Abbildung 5.6) in ein initiales Bruchereignis (hellgrüner Kreis, Abbildung 5.6), auf das ein Entfaltungszwischenzustand (dunkelgrüner Kreis, Abbildung 5.6) folgt. Diese Ereignisse stellen die Entfaltung von $16,5\alpha$ in zwei Schritten dar. Der erste Schritt beinhaltet das Entfalten der Aminosäuren vom C Terminus einer $16,5\alpha$ Untereinheiten bis zu Cystein 97, hierbei wer-

den β -Stränge 7-9 dieser Untereinheit entfaltet und damit wahrscheinlich die gesamte gefaltete Struktur des Proteins zerstört. Im zweiten Schritt entfaltet die zweite $16,5\alpha$ Untereinheit. Im Gegensatz zu den oben vorgestellten Gleichgewichtsentfaltungsexperimenten konnten hier durch mechanisches Entfalten Hinweise auf (zumindest kurzzeitig stabiles) monomeres $16,5\alpha$ gefunden werden. Eine Kraftverteilung des ersten Bruchereignisses ist in Abbildung 5.5 B dargestellt. Wie zu erwarten, fällt diese zwischen obere und untere Grenze der Entfaltungskraft, die mit wildtyp $16,5\alpha$ bestimmte wurden, ist allerdings deutlich schmaler als die Bruchkraftverteilung in Abbildung 5.4 B. Die obere Grenze (Entfaltung der Titin-Ig-Domänen I27-29) wird auch in den Kraft-Ausdehnungs-Kurven direkt deutlich, da die Entfaltungsereignisse von I27-29 (gelbe Zacken in Abbildung 5.5 A) stets nach dem Bruch des $16,5\alpha$ Dimer auftreten.

Abbildung 5.6 macht deutlich, dass die zwei Disulfidbrücken im $16,5\alpha$ Dimer einen großen, N-terminalen Abschnitt des Proteins (Aminosäuren 1-45) völlig von Kraft abschirmen, außerdem wird der Teil von $16,5\alpha$, der zwischen den beiden Disulfidbrücken liegt, parallel gedehnt. Es besteht also die Gefahr, dass die Disulfidbrücken den Entfaltungspfad beeinflussen. Im folgenden Abschnitt sollen Experimente vorgestellt werden, in denen die Dissoziation und die Entfaltung des $16,5\alpha$ Dimer direkt beobachtet werden konnten.

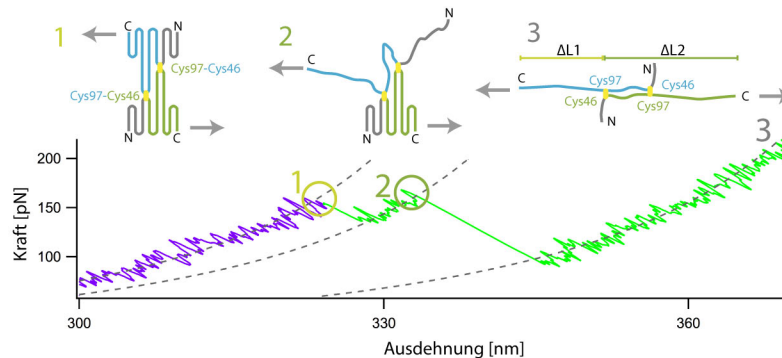


Abbildung 5.6: Schrittweiser Bruch von disulfidverknüpftem $16,5\alpha$.

Entbindung und Entfaltung von Ubiquitin-verknüpftem $16,5\alpha$

Um die Dissoziation des $16,5\alpha$ Dimer messbar zu machen und genaueres über das Schicksal der getrennten $16,5\alpha$ Untereinheiten zu erfahren, bedarf es einer flexiblen Verbindung, die beide $16,5\alpha$ Untereinheiten verbindet, nach dem Bruch des Dimers ausgestreckt werden kann und zu einem gut detektierbaren Konturlängenzuwachs führt. In Abschnitt 4.3 und 4.4 wurde dies für die dimeren Proteine Myomesin und Filamin durch Anfügen eines unstrukturierten, 10-15 Aminosäuren langen Abschnitts aus Glyzin und Serin mit einem terminalen Cystein an die Dimerisierungsdomäne realisiert. Im Fall von $16,5\alpha$ sind die Termini der beiden Unter-

einheiten im Komplex allerdings nicht zueinander hin orientiert (vgl. Termini in Abbildung 5.8 A), so dass eine starrere Verbindung, die eine größere Strecke überbrücken kann, von Vorteil wäre. 16,5 α wurde deshalb von zwei Ubiquitintrimeren, die jeweils ein C-terminales Cystein besitzen, flankiert. Durch Inkubation unter oxidierenden Bedingungen bei niedrigen Proteinkonzentrationen bilden sich intramolekulare Disulfidbrücken zwischen den chimären Ubiquitin-16,5 α Proteinen (Abbildung 5.7). Die Ausbildung dieser Disulfidbrücken ist stochastisch – ein Teil der Moleküle wird durch eine Disulfidbrücke verbunden sein (Abbildung 5.7 A + B), ein Teil durch zwei (Abbildung 5.7 C), während der Rest über keine Disulfidbrücken verfügt (Abbildung 5.7 D). Diese Populationen können anhand ihres Entfaltungsmusters unterschieden werden. Nur in der Population mit einer Disulfidbrücke (Abbildung 5.7 A + B) kann die Entbindung von 16,5 α beobachtet werden. Bei zwei Disulfidbrücken werden zwei Ubiquitinketten parallel mit Kraft belastet, was nicht zu einem regelmäßigen, sägezahnartigen Kraftsignal führt (Abbildung 5.7 C). Ist keine Disulfidbrücke vorhanden, kann nur die Entfaltung von Ubiquitin beobachtet werden, wenn das Protein wie in Abbildung 5.7 D (Pfeile) zwischen Blattfederspitze und Oberfläche eingespannt ist.

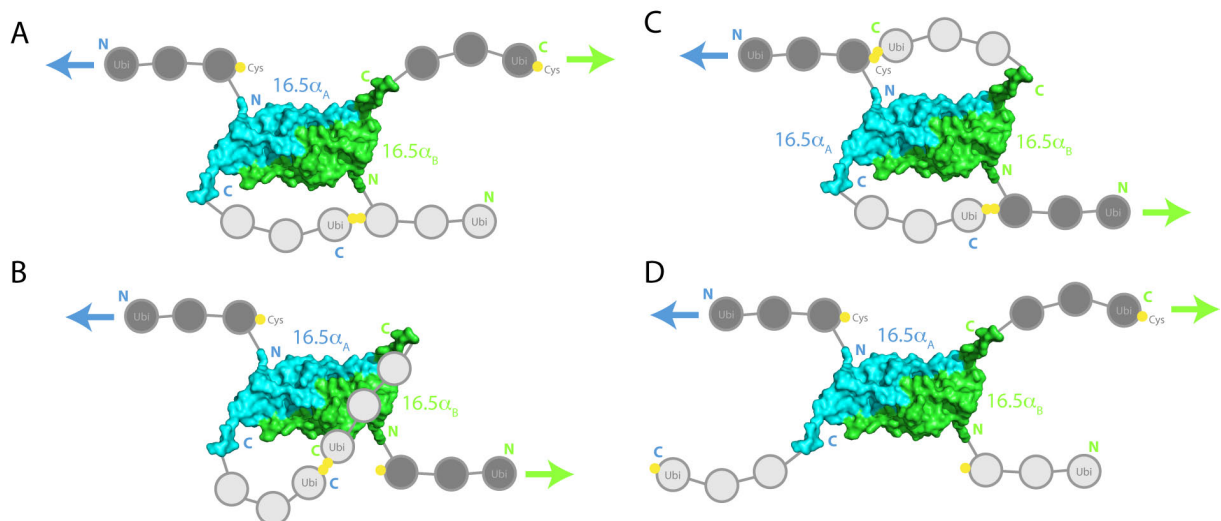


Abbildung 5.7: Verknüpfungsmöglichkeiten des chimären Ubiquitin-16,5 α Proteins.
Die Kraft (Pfeile) wirkt auf 16,5 α über die dunkel eingefärbten Ubiquitineinheiten.

Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurven für die Population mit einer Disulfidbrücke sind in Abbildung 5.8 B dargestellt. Das regelmäßige, sägezahnartige Entfaltungsmuster von Ubiquitin (graue Zacken) wird unterbrochen von einem neuen, deutlich längeren Entfaltungsereignis (verschiedene Farben), dessen Länge ($72,2 \pm 0,8$ nm) gut mit dem Längenzuwachs übereinstimmt, der für die Entfaltung der beiden 16,5 α Untereinheiten und das Ausdehnen der Verbindung aus drei Ubiquitineinheiten erwartet wird ($75,9$ nm). Dieses Entfaltungsereignis stellt

die Dissoziation des $16,5\alpha$ -Dimer gefolgt von der Entfaltung der beiden $16,5\alpha$ Monomere dar.

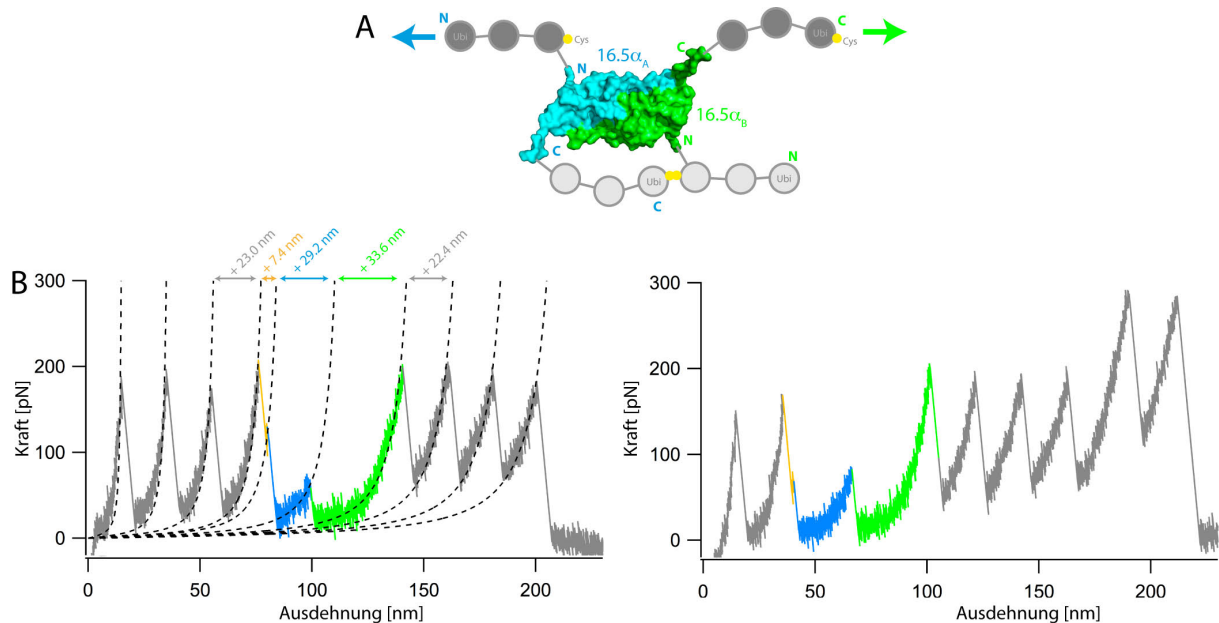


Abbildung 5.8: Entbindung und Entfaltung von Ubiquitin-verknüpftem $16,5\alpha$.

(A) Schema von durch drei Ubiquitin-Einheiten (graue Kreise) verknüpftem dimerem $16,5\alpha$. Die Richtung der Kraft ist durch Pfeile angedeutet. Mit Kraft belastete Ubiquitin-Einheiten sind dunkelgrau markiert. (B) Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurven.

Da die Polypeptidkette im Kraftmikroskop durch unspezifische Wechselwirkungen an Oberfläche und Blattfederspitze angebunden wird, sind auch andere Belastungsgeometrien als die in Abbildung 5.8 A gezeigte möglich. Beispielsweise kann das identisch verknüpfte Protein statt am N Terminus der ersten und am C Terminus der zweiten Ubiquitin- $16,5\alpha$ Kette an N und C Terminus derselben Kette aufgegriffen werden (Abbildung 5.9 A). In diesem Fall wird das $16,5\alpha$ Dimer nicht durch Kraft dissoziiert, statt dessen wird eine $16,5\alpha$ Untereinheit entfaltet, während sie Teil des Dimers ist. Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurven für diesen Fall sind in Abbildung 5.9 B gezeigt. Auf die charakteristischen Entfaltungszacken von Ubiquitin (grau) folgt ein etwas längeres Entfaltungsereignis (grün) mit einem Konturlängenzuwachs von $(31,7 \pm 0,2 \text{ nm})$ ⁹.

⁹ Diese Entfaltungsmuster würde auch auftreten, wenn die in Abbildung 5.7 D skizzierte Geometrie an N und C Terminus derselben Kette mit Kraft belastet würde.

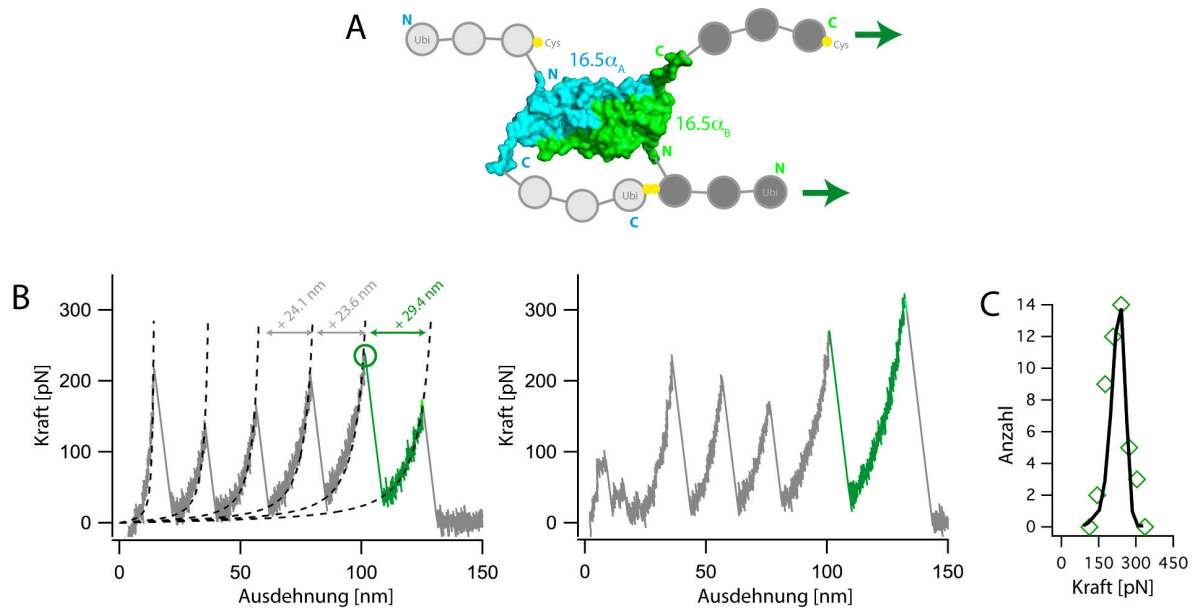


Abbildung 5.9: Entfaltung von 16,5α im Dimer.

(A) Schema von durch drei Ubiquitin-Einheiten (graue Kreise) verknüpftem dimerem 16,5α. Die Richtung der Kraft an N und C Terminus einer Proteinkette ist durch dunkelgrüne Pfeile markiert. (B) Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurven. (C) Bruchkraftverteilung (grün) der Entfaltung von 16,5α im Dimer und angepasste Monte-Carlo-Simulation (schwarze durchgezogene Linie) mit $k_{\text{off}} = 0,01 \text{ s}^{-1}$ und $\Delta x = 1,8 \text{ \AA}$.

Abhängig davon wie ein Protein zwischen Oberfläche und Blattfederspitze eingespannt wird, können also entweder die Dissoziationskraft des Dimers oder die Entfaltungskraft einer Untereinheit im Dimer im selben Experiment bestimmt werden. Aus insgesamt 418 aufgenommenen Kraft-Ausdehnungskurven mit klaren Einzelmolekülfaltungen¹⁰ zeigten 52 die Dissoziation von 16,5α und 35 die Entfaltung. In weniger als 20 % der Kurven wurden Entfaltungsmuster gefunden, die auf Disulfidbrücken zwischen den Ubiquitinketten zweier verschiedener 16,5α Dimere zurückgingen. Als Kontrolle wurden Experimente in der Gegenwart des Reduktionsmittels DTT, das Disulfidbrücken spaltet, durchgeführt. In diesen Experimenten konnten keine Dissoziationsereignisse mehr beobachtet werden, es traten ausschließlich Kurven auf, die die Entfaltung von 16,5α im Dimer zeigten.

Wie in Abbildung 5.8 durch die diversen Farben bereits angedeutet, erfolgen Entbinden und Entfalten von Ubiquitin-verknüpftem 16,5α nicht kooperativ in einem Schritt, statt dessen können in den Kraft-Ausdehnungs-Kurven nach dem ersten Bruchereignis bei 180 - 200 pN

¹⁰ Einzelmolekülfaltungskurven wurden anhand des bekannten Entfaltungsmusters von Ubiquitin selektiert. Hierzu waren mindestens zwei Entfaltungsereignisse von Ubiquitin nötig.

(gelber Kreis in Abbildung 5.10) zwei Entfaltungszwischenzustände (blauer und grüner Kreis) detektiert werden.

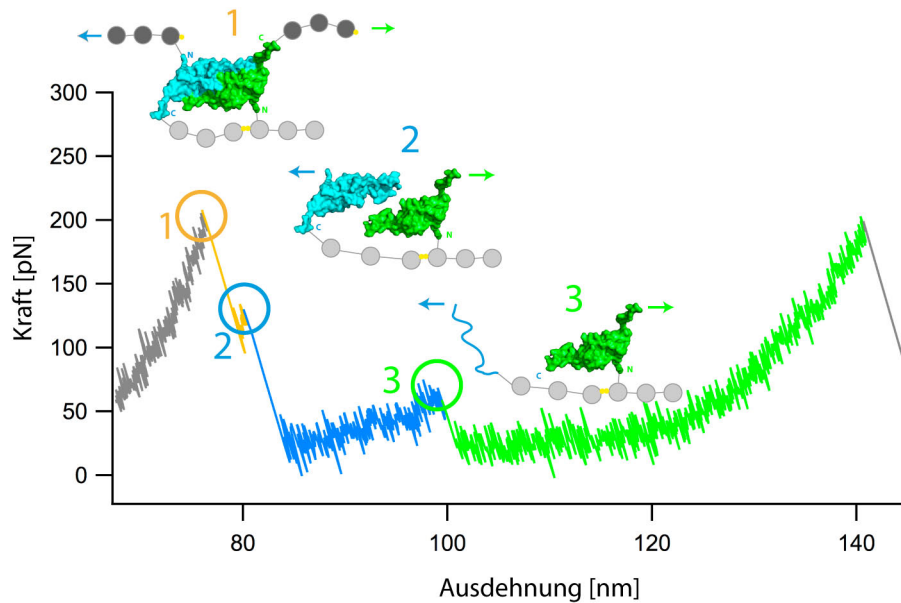


Abbildung 5.10: Entbindungs-/ Entfaltungspfad von 16,5 α .

Strukturelle Interpretation der drei Entbindungs-/ Entfaltungsereignisse von Ubiquitin-verknüpftem 16,5 α .

Im ersten Schritt (gelber Kreis in Abbildung 5.10) bricht die Bindung zwischen den beiden 16,5 α Untereinheiten, der darauffolgende Konturlängenzuwachs ($9,2 \pm 0,4$ nm) entspricht dem Strecken der trimeren Ubiquitinverbindung und der Ausrichtung der beiden 16,5 α Monomere entlang der Krafrichtung. Die nachfolgenden beiden Ereignisse (blauer und grüner Kreis in Abbildung 5.10) sind vom Konturlängenzuwachs her sehr ähnlich ($32,0 \pm 0,8$ nm (blau) und $31,1 \pm 0,6$ nm (grün)) und stammen von der Entfaltung der beiden getrennten 16,5 α Monomere. Eine Bruchkraftverteilung der Dissoziation ist in Abbildung 5.11 links dargestellt. Die mittlere Dissoziationskraft, die mit dieser Methode ermittelt wurde, liegt mit 183 ± 4 pN zwischen der für wildtyp 16,5 α ermittelten oberen und unteren Grenze für die Dissoziationskraft und stimmt ebenfalls gut mit der Kraft überein, um die nötig war, disulfid-verknüpfte 16,5 α Dimere zu entfalten. Zur Entfaltung von 16,5 α im Dimer hingegen (Abbildung 5.9 C) waren deutlich höhere Kräfte nötig (218 ± 7 pN). Für die Entfaltung der von monomerem 16,5 α sind Bruchkraft- bzw. Lebensdauerverteilungen¹¹ in Abbildung 5.11

¹¹ Die Blattfeder relaxiert nach der Dissoziation des 16,5 α Dimers nur langsam zu niedrigen Kräften. Die Entfaltungskraft des ersten Monomers ist daher in erster Linie bestimmt durch die Federkonstante der Blattfeder und die Kraft des vorhergehenden Entfaltungsereignis, da die Lebensdauer dieses Zustands bei hohen Kräften sehr

dargestellt. Alle Verteilungen wurden durch Monte-Carlo Simulationen (Abschnitt 3.4) reproduziert, um Informationen über die zugrunde liegende Energielandschaft zu erhalten.

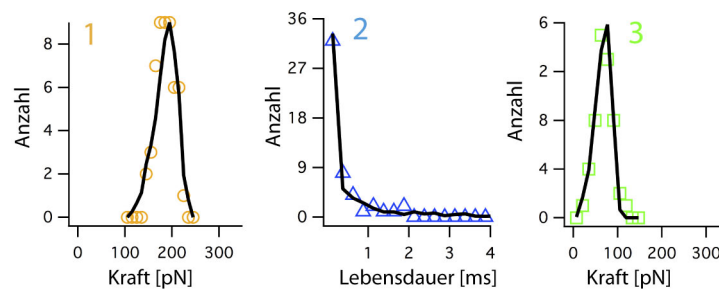


Abbildung 5.11: Bruchkraftverteilungen von der Entbindung / Entfaltung von 16,5α.

- 1) Bruchkraftverteilung der Dissoziation (gelb) und angepasste Monte-Carlo Simulation mit $k_{\text{off}} = 0,01 \text{ s}^{-1}$ und $\Delta x = 2,3 \text{ \AA}$ (schwarz).**
- 2) Lebensdauerverteilung des ersten Monomers (blau) und Monte-Carlo Simulation mit $k_{\text{off}} = 2,5 \text{ s}^{-1}$ und $\Delta x = 3 \text{ \AA}$ (schwarz).**
- 3) Bruchkraftverteilung des zweiten Monomers und Monte-Carlo Simulation mit $k_{\text{off}} = 3 \text{ s}^{-1}$ und $\Delta x = 3 \text{ \AA}$ (schwarz).**

kurz ist und die Kraft damit nahezu konstant. Aus diesem Grund findet die Entfaltung des ersten Monomers bei scheinbar höheren Kräften statt als die des zweiten Monomers (vgl. Abbildung 5.10 blauer und grüner Kreis). Die Lebensdauer ist daher ein besseres Maß für die Stabilität des ersten Monomers. Alle diese Effekte können durch Monte-Carlo Simulationen nachgestellt werden (Abschnitt 3.4).

5.1.2 Diskussion

Im vorigen Abschnitt wurden chemische und mechanische Entfaltungsexperimente vorgestellt, die ein zunehmend detailreicheres Bild des Entfaltungsmechanismus von 16,5 α ergeben. Durch GdmCl induzierten Entfaltungsübergänge (Abbildung 5.3) sprachen für eine Zwei-Zustands-Entfaltung vom gefalteten dimeren 16,5 α direkt und entfaltetem Monomer. Ein solches Verhalten ist für dimere Proteine thermophilen Ursprungs nicht ungewöhnlich (Jaenicke und Böhm 1998), allerdings kann auch angenommen werden, dass Faltung und Assoziation großer Dimere zumindest teilweise strukturierte monomere Spezies beteiligt sind. (Dams und Jaenicke 1999). Da Proteine aus thermophilen Organismen neben einer hohen thermodynamischen Stabilität oft auch sehr langsame Entfaltungskinetiken zeigen, konnten für 16,5 α keine kinetischen Messungen durchgeführt werden, die eventuell kurzlebige monomere Zustände aufgezeigt hätten.

Mechanische Methoden hingegen sind hinsichtlich Proteingröße und -stabilität weniger eingeschränkt und verfügen über eine hohe zeitliche Auflösung, so dass auch kurzlebige Zustände detektiert werden können. Drei verschiedene mechanische Messmethoden wurden eingesetzt, um die Dimerstabilität von 16,5 α zu ermitteln. Die direkte Messung mit wild-typ 16,5 α ergab eine untere (100 pN) und eine obere (230 pN) Grenze für die Dissoziationskraft, konnte aber sonst keine weitere Aussage über den Mechanismus der Entfaltung treffen. Eine ähnliche Abschätzung der Entfaltungskraft wurde in Abschnitt 4.3 für die Dimerbindung von Myomesin durchgeführt, allerdings hat das an 16,5 α fusionierte chimäre Filamin-Titin Protein einige Vorteile gegenüber den Myomesin-Ubiquitin chimären in Abschnitt 4.3. Zum einen beinhalten das Filamin-Titin Protein Ig-Domänen, die eine große Bandbreite an Entfaltungskräften umfassen. ddFLN4, die einzige Ig-Domäne in diesem chimären Protein, die einen Entfaltungszwischenzustand zeigt, entfaltet bei Kräften um 55 pN. Da die Entfaltungssignatur von ddFLN4 als Indikator dafür verwendet wird, dass das Dimer wirklich mit Kraft belastet wurde, kann mit diesem Protein bereits eine untere Grenze für Dissoziationskräfte von Dimeren abgeschätzt werden, die nur wenig höher als 55 pN liegen. Die obere Grenze wird dadurch erhalten, dass in Dimerkurven keine Entfaltungszacken der stabileren Domänen (z.B. ddFLN5 oder I27-29) detektiert werden konnten. Im verwendeten Protein waren die Abstände der Entfaltungskräfte zwischen diesen Domänen recht groß, was die Abschätzung der oberen Grenze entsprechend ungenau macht. Durch den Einsatz weiterer Proteindomänen ließe sich diese Lücke füllen und die Abschätzung deutlich verbessern.

Disulfidbrücken, die die Polypeptidkette verbinden, nachdem die zwei 16,5 α Untereinheiten entfaltet wurden, machen den Entfaltungsvorgang des Dimers direkt sichtbar und liefern erste Hinweise auf stabile monomere Strukturen. Allerdings besteht die Gefahr, dass die Cysteinmutationen den Entfaltungspfad deutlich verändern. Im Falle des Komplex zwischen Titin und Telethonin war es möglich, die Disulfidbrücken weit von den Kraftangriffspunkten entfernt in die Proteinstruktur einzufügen (Abschnitt 4.1), so dass ein möglicher Einfluss minimiert werden konnte. Für das deutlich kleinere 16,5 α Dimer war dies nicht in diesem Maße möglich. Da die steifen Disulfidbrücken keine messbare Längenänderung nach dem Dimerbruch zulassen, kann für das disulfidverknüpfte 16,5 α Dimer nicht direkt entschieden werden, ob das erste Bruchereignis die Dissoziation und Entfaltung einer monomeren 16,5 α Untereinheit oder die Entfaltung einer 16,5 α Untereinheit im Dimer widerspiegelt. Allerdings stimmen die Bruchkräfte diese Entfaltungsübergangs gut mit der für das Ubiquitin-verknüpfte 16,5 α Dimer gemessenen Dissoziationskraft überein (Abbildung 5.8), während die Kräfte für die Entfaltung einer 16,5 α Einheit im Dimer deutlich höher waren (Abbildung 5.9). Dies legt nahe, dass die Entfaltungspfade ähnlich sind und auch das disulfidverknüpfte Dimer erst dissoziiert, bevor das Monomer entfaltet. Die beiden 16,5 α Untereinheiten werden durch ein intermolekulares β -Faltblatt sowie hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehalten (Abbildung 5.2). Die Disulfidbrücken befinden sich im intermolekularen β -Faltblatt, das durch zwei flexible Polypeptidabschnitte mit dem Hauptteil der 16,5 α Untereinheiten verbunden ist. Offenbar erlauben diese flexiblen Abschnitte, dass sich die beiden Domänen beim Anlegen einer Kraft trotz der starren Disulfidbrücken trennen können.

Im Ubiquitin-verknüpften 16,5 α kann die Dissoziation des Dimers und die nachfolgende Entfaltung der zwei 16,5 α Monomere direkt beobachtet werden. Hierbei ist zu beachten, dass für disulfid-verknüpftes 16,5 α die Kraft auf die C Termini des Dimers wirkte, während in Ubiquitin-verknüpftem 16,5 α N und C Termini belastet wurden. Im Gegensatz zur hochgradig richtungsabhängigen Stabilität des Komplex zwischen Titin und Telethonin wurde für 16,5 α kein Unterschied der Entfaltungskräfte in diesen zwei unterschiedlichen Belastungsgeometrien beobachtet.

Während 16,5 α in chemischen Entfaltungsexperimenten sehr stabil war, liegt die aus den mechanischen Dissoziationsexperimenten extrapolierte Lebensdauer des Dimers im Rahmen von einigen Minuten, während die Monomere nur eine Lebensdauer von weniger als einer Sekunde hatten. Dies erklärt eventuell, warum diese durch in Gleichgewichtsexperimenten nicht detektiert werden konnten. Mechanische Entfaltungsmessungen sind Nichtgleichgewichts-

Experimente, weshalb keine Gleichgewichtsparameter wie die Änderungen der freien Energie aus den Daten abgeleitet werden können. Es scheint allerdings sinnvoll, anzunehmen, dass die Assoziation zweier gefalteter Monomere zu einem Dimer schneller abläuft als der Übergang von einer entfalteten Polypeptidkette zu einem strukturierten Monomer. Da die Dissoziation mehr als 100fach langsamer abläuft als die Entfaltung der Monomere, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die Dimerisierung von $16,5\alpha$ den überwiegenden Beitrag zur Stabilität des Proteins liefert. $16,5\alpha$ ist also in erster Linie ein stabiles Dimer, das aus zwei strukturierten Monomeren gebildet wird. Über N- und C-terminale Abschnitte interagieren diese Dimere miteinander und oligomerisieren zu funktionsfähigen kleinen Hitzeschockproteinen. Dies scheint allerdings nicht für alle sHsps zuzutreffen. Kürzlich wurde für Hsp26 aus Hefe gezeigt, dass die α -Crystallin Domäne als Monomer vorliegt und nur dimerisiert, wenn Abschnitte außerhalb der eigentlichen Domäne vorhanden sind (Chen, Feige et al.). Die Assoziation der beiden Monomere erhöht in diesem Protein die Gesamtstabilität kaum, und konsequenterweise ist das α -Crystallin Dimer aus Hsp26 thermodynamisch deutlich weniger stabil als das hier untersuchte $16,5\alpha$. Möglicherweise dienen diese unterschiedlich stabilen Dimere einer Regulierung der Chaperone-Aktivität kleiner Hitzeschockproteine in verschiedenen Organismen.

5.2 Mechanische Stabilität des C_H3-Dimers eines Antikörpers

Antikörper sind Proteine im Blut oder der Gewebeflüssigkeit, die Wirbeltiere vor eingedrungenen Krankheitserregern schützen. Der bekannteste Vertreter ist Immunglobulin G (IgG), der Hauptvertreter im Serum. IgGs bestehen aus zwei identischen leichten (L, *light*) und schweren (H, *heavy*) Ketten, die ihrerseits aus mehreren Immunglobulindomänen aufgebaut sind. Die N-terminalen Domänen (V_L und V_H) dieser Ketten sind hochvariabel und für die Bindung an Fremdkörper verantwortlich, sie bilden die Antigen-Bindungsstelle (Paratop). Die übrigen Domänen sind konserviert und für die Aktivierung weiterer Schritte der Immunantwort nach der Erkennung des Antigens verantwortlich. IgGs nehmen eine Y-artige Struktur ein, wobei die beiden kurzen Ende der Y-Struktur die Antigen-Bindungsstelle tragen und als F_{AB} (Antigen-bindendes Fragment) bezeichnet werden, während der Stamm F_C (konstantes Fragment) genannt wird – diese beiden Fragmente lassen sich durch partielle Proteolyse von IgGs erhalten. Leichte und schwere Ketten sind ebenso wie die schweren Ketten durch Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden (Abbildung 5.12) (Janeway 2001) .

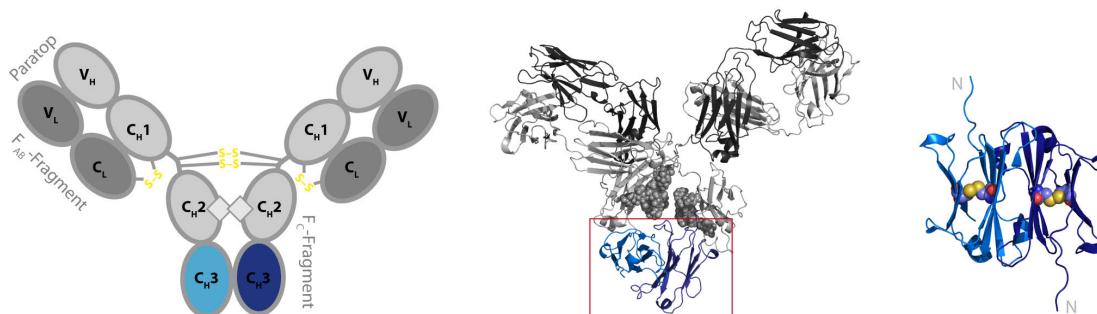


Abbildung 5.12: Lokalisation des C_H3-Dimers in der Antikörperstruktur.

Schematische Struktur eines Antikörpers (links), Kristallstruktur eines IgG mit dem C_H3-Dimer in blau (mitte) und Struktur des C_H3-Dimer (1CQK) mit Disulfidbrücken und markierten N Termini (rechts).

IgGs bestehen aus Immunglobulin(Ig)-Domänen und die Ig-Domänen aus Antikörpern stellen den prototypischen namensgebenden Vertreter dieser weitverbreiteten Faltungsklasse dar. Im Gegensatz zu vielen weiteren Ig-Domänen beispielsweise aus Muskelproteinen (Kapitel 4) besitzen Ig-Domänen aus Antikörpern eine Disulfidbrücke, die die Stränge B und F miteinander verbindet und die gefaltete Struktur stabilisiert (Goto und Hamaguchi 1979). Um die komplexe Quartärstruktur eines Antikörpers zu bilden, sind neben kovalenten Wechselwirkungen wie Disulfidbrücken eine Vielzahl an nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Domänen nötig. Die beiden C_H2-Domänen beispielsweise interagieren über

cotranslational angefügte Zuckerreste (graue Quadrate in Abbildung 5.12 links), während die C-terminalen C_H3-Domänen ein Homodimer bilden und das F_C-Fragment stabilisieren (Abbildung 5.12 rechts). Aufgrund ihrer Fähigkeit, nahezu beliebige molekulare Strukturen erkennen und binden zu können, haben Antikörper eine herausragende Bedeutung in Diagnostik, Therapie und Grundlagenforschung. Über *in vitro* Faltung und Assemblierung konnten in jüngster Zeit zahlreiche Erkenntnisse gewonnen werden (Thies, Mayer et al. 1999; Thies, Talamo et al. 2002; Feige, Walter et al. 2004; Feige, Hagn et al. 2007; Feige, Groscurth et al. 2008; Feige, Groscurth et al. 2009; Feige, Hendershot et al. 2009), ebenso wurden Dissoziationskräfte zwischen Antikörper und Antigenen kraftspektroskopisch bereits vor einiger Zeit eingehender untersucht (Hinterdorfer, Baumgartner et al. 1996; Ros, Schwesinger et al. 1998; Schwesinger, Ros et al. 2000). In vielen mechanischen Untersuchungen werden Antikörper eingesetzt, um Proteine beispielsweise an Kugeln in einer optischen Pinzette anzubinden (Cecconi, Shank et al. 2005; Gebhardt, Bornschlogl et al. 2010). Über das mechanische Verhalten der Antikörper und Antikörperdomänen selbst hingegen ist bislang wenig bekannt. In diesem Abschnitt sollen Experimente vorgestellt werden, in denen die Dissoziationskraft des C_H3-Homodimers in Abhängigkeit des Oxidationszustands der Disulfidbrücken der C_H3-Ig-Domänen bestimmt wurde.

5.2.1 Ergebnisse

Um die mechanische Stabilität des C_H3-Dimers kraftspektroskopisch zu untersuchen, wurde der N Terminus der C_H3-Domäne mit drei Ig-Domänen aus Filamin (ddFLN3-5) (Schwaiger, Kardinal et al. 2004) fusioniert (Abbildung 5.13 oben). Diese zusätzlichen Proteindomänen dienen einerseits zur Anbindung an Blattfederspitze und Oberfläche des Kraftmikroskops, erleichtern im Falle von C_H3 allerdings auch die Herstellung und Reinigung des Proteins, da Ig-Domänen aus Antikörpern aufgrund ihrer internen Disulfidbrücke im Cytoplasma von *E. coli* nicht löslich exprimiert werden können (Thies, Mayer et al. 1999; Feige, Hagn et al. 2007). Die beiden C_H3-Ig-Domänen wurden C-terminal mithilfe eines 10 Aminosäuren langen Polypeptidlinkers¹², der an seinem C-terminalen Ende ein Cystein trägt, durch eine Disulfidbrücke kovalent miteinander verbunden (grüne Linie in Abbildung 5.13 oben). Hierdurch

¹² Der Linker ist analog zu dem in Abschnitt 4.3 beschriebenen und besteht aus den Aminosäuren Glyzin und Serin. Die effektive Länge des Linkers inklusive unstrukturierter Aminosäuren am C Terminus von C_H3 beträgt 15 Aminosäuren pro monomerer C_H3-Domäne.

können nach der Dissoziation des Dimers weitere Entfaltungseignisse in den Kraft-Abstands-Kurven detektiert werden (vgl. 4.3). Wie an anderer Stelle bereits angesprochen, wird während der mechanischen Entfaltung von ddFLN4 ein Zwischenzustand populierte (Schwaiger, Kardinal et al. 2004). Dies erlaubt es, diese Domäne eindeutig in den Entfaltungskurven zu identifizieren. Da jede ddFLN-CH₃-Chimäre ddFLN4 nur einmal enthält, bedeuten zwei Entfaltungseignisse von ddFLN4, dass ein CH₃-Dimer mit Kraft belastet wurde. Eine typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve des ddFLN-CH₃-Fusionsproteins ist in Abbildung 5.13 links dargestellt. Nach der Entfaltung von fünf ddFLN-Domänen, darunter zweimal ddFLN4 (graue und pinke Kreise) steigt die Kraft bis etwa 210 pN an, bevor ein weiteres Entfaltungseignis sichtbar wird, das zu einem Konturlängenzuwachs von ~38 nm führt (grüner Kreis). Dieses zusätzliche Entfaltungseignis repräsentiert die Dissoziation und Entfaltung des CH₃-Dimers. Die Vergrößerung rechts in Abbildung 5.13 zeigt, dass dieses neue, ~38 nm lange Entfaltungseignis insgesamt drei Entfaltungsübergänge (grüner, hellblauer und dunkelblauer Kreis) beinhaltet. Dies bedeutet, dass beim Anlegen einer Kraft an das CH₃-Dimer im ersten Schritt bei ~200 pN die beiden CH₃ Domänen dissoziieren (grüner Kreis in Abbildung 5.13 rechts), woraufhin die getrennten Monomere in zwei Schritten entfalten (blaue Kreise in Abbildung 5.13, vgl. Strukturen oberhalb der Entfaltungskurve). Alle drei Entbindungs-/ Entfaltungsübergänge führen zu einem Konturlängenzuwachs um 13 nm: Im ersten Dissoziationsschritt wird der Polypeptidlinker, der die beiden C Termini des CH₃-Dimers verbindet, ausgestreckt, außerdem richten sich die beiden Domänen entlang der Kraft-richtung neu aus. In den beiden weiteren Schritten werden die CH₃-Domänen entfaltet, wobei nur die 40 Aminosäuren, die außerhalb der Disulfidbrücke zwischen Cys28 und Cys86 (vgl. Struktur Abbildung 5.12 rechts) liegen, zum Konturlängenzuwachs beitragen.

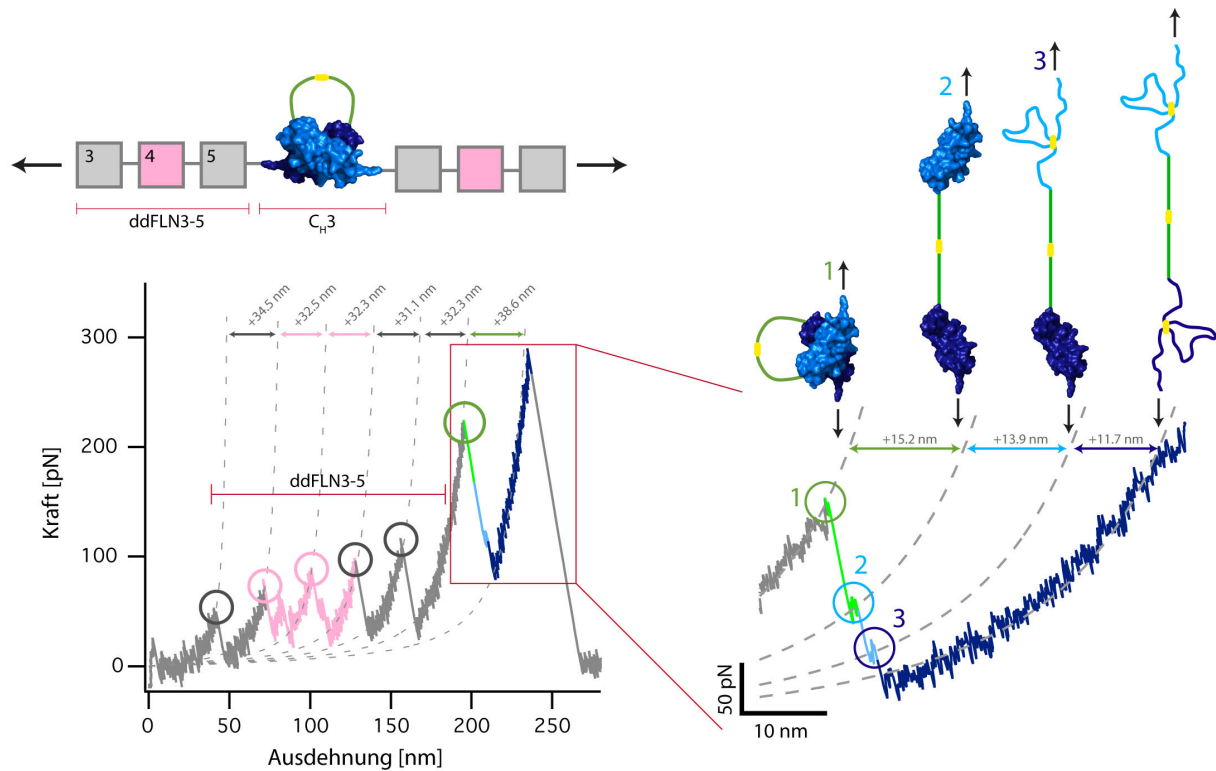


Abbildung 5.13: Dissoziation des oxidierten C_H3-Dimers:

Oben: Schematische Darstellung des ddFLN3-5-C_H3 Fusionsproteins. Der C-terminale Polypeptidlinker ist in grün, die die beiden Monomere verknüpfende Disulfidbrücke in gelb dargestellt. **Links:** Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve des ddFLN3-5-C_H3-Dimers. **Rechts:** Strukturelle Interpretation des Entbindungs- / Entfaltungspfades.

Da die Entfaltung des ersten Monomers (hellblauer Kreis Abbildung 5.13 rechts) aufgrund der kurzen Lebensdauer dieses Zustands bei einer Kraft von ~150 pN nicht in allen Kurven detektiert werden konnte, wurde der Konturlängenzuwachs für Dissoziation und Entfaltung (grüner und hellblauer Kreis in Abbildung 5.13) zusammen bestimmt - dieser Wert stimmt mit $25,3 \pm 0,2$ nm ($n = 55$) exzellent mit dem Erwartungswert für beide Übergänge (25,2 nm) überein. Für die Entfaltung des zweiten Monomers (dunkelblauer Kreis Abbildung 5.13) wurde ein Konturlängenzuwachs von $12,8 \pm 0,4$ nm ermittelt (Erwartungswert 12,6 nm).

In der in Abbildung 5.13 dargestellten Kraft-Ausdehnungs-Kurve ist in beiden C_H3-Domänen die interne Disulfidbrücke ausgebildet. Da das Protein in *E. coli* unter reduzierenden Bedingungen hergestellt wurde und während der Reinigung des Proteins nur Luftsauerstoff als Elektronenakzeptor für die Oxidation der beiden Cysteine, die die Disulfidbrücke bilden, zu Verfügung stand, ist es wahrscheinlich, dass sich nur ein Teil der C_H3-Domänen im vollständig oxidierten Zustand befindet (McAuley, Jacob et al. 2008). Die Disulfidbrücke verkürzt die Länge der Polypeptidkette, die nach der Entfaltung gestreckt werden kann, um die Anzahl an Aminosäuren, die sich zwischen den beiden Cysteinresten befindet. Anhand des Konturlängen-

genzuwachsen einer C_{H3} -Domäne kann daher ihr Redoxzustand vor der Entfaltung ermittelt werden. Eine typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve des ddFLN- C_{H3} -Dimers, bei dem sich eine C_{H3} Domäne im oxidierten und eine im reduzierten Zustand befand, ist in Abbildung 5.14 A dargestellt. Auf die Entfaltung von insgesamt fünf ddFLN-Domänen, darunter zweimal ddFLN4, folgt ein längeres ~ 56 nm langes Entfaltungsereignis bei einer Kraft von etwa 200 pN. Dieses Entfaltungsereignis setzt sich zusammen aus zwei Übergängen mit einem Konturlängenzuwachs von 13 nm und einem Übergang mit einem Längenzuwachs von ~ 33 nm (Abbildung 5.14 C).

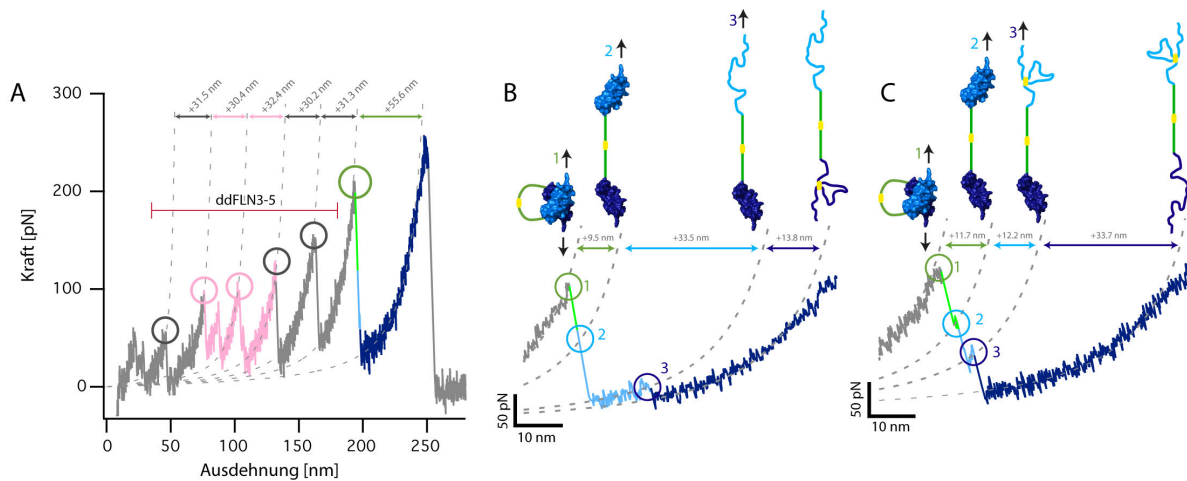


Abbildung 5.14: Dissoziation des gemischt oxidierten / reduzierten C_{H3} -Dimers.

(A) Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve des ddFLN- C_{H3} -Fusionsproteins, bei dem eine C_{H3} -Domäne im oxidierten ($C_{H3_{ox}}$) und eine C_{H3} -Domäne im reduzierten ($C_{H3_{red}}$) Zustand befand. (B) Strukturelle Interpretation des Entbindungs-/ Entfaltungspfad für Dissoziation gefolgt von der Entfaltung von zuerst $C_{H3_{red}}$ und danach $C_{H3_{ox}}$. (C) Strukturelle Interpretation des Entbindungs-/ Entfaltungspfad für Dissoziation gefolgt von der Entfaltung von zuerst $C_{H3_{ox}}$ und danach $C_{H3_{red}}$.

Die beiden kürzeren Entfaltungsereignisse repräsentieren, wie schon für das vollständig oxidiert C_{H3} -Dimer diskutiert, Dissoziation und Entfaltung eines oxidierten C_{H3} -Monomers ($C_{H3_{ox}}$, mittlerer Konturlängenzuwachs $11,6 \pm 0,8$ nm, Erwartungswert 12,6 nm). Das längere Entfaltungsereignis (Mittelwert $32,1 \pm 0,5$ nm, Erwartungswert 32,9 nm) stammt von der Entfaltung einer C_{H3} -Domäne, deren interne Disulfidbrücke nicht ausgebildet war ($C_{H3_{red}}$) – in diesem Fall tragen alle 98 Aminosäuren der Ig-Domäne zum Konturlängenzuwachs bei. Die beiden Vergrößerungen in Abbildung 5.14 rechts machen deutlich, dass nach der Dissoziation von C_{H3} entweder erst $C_{H3_{ox}}$ und danach $C_{H3_{red}}$ entfalten können (Abbildung 5.14 C), oder dass die Reihenfolge der Entfaltung der Monomere auch umgekehrt sein kann (erst $C_{H3_{red}}$, dann $C_{H3_{ox}}$, Abbildung 5.14 B).

Eine typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve der vollständig reduzierten Form des C_{H3} -Domänenpaars ist in Abbildung 5.15 dargestellt. Nach der Entfaltung von drei ddFLN-Domänen (graue und rosa Kreise), darunter zweimal ddFLN4 ist ein längeres, ~ 81 nm langes Entfaltungsereignis in den Daten zu erkennen (grüner Kreis), auf das die Entfaltung einer weiteren ddFLN Domäne folgt, bevor sich das Polypeptid von der Oberfläche oder der Blattfingerspitze löst. Dieses Entfaltungsereignis setzt sich aus der Dissoziation des C_{H3} -Dimers und zwei weiteren Entfaltungsübergängen mit einem Konturlängenzuwachs von ~ 33 nm, die von der Entfaltung von $C_{H3_{red}}$ stammen, zusammen (Abbildung 5.15 rechts).

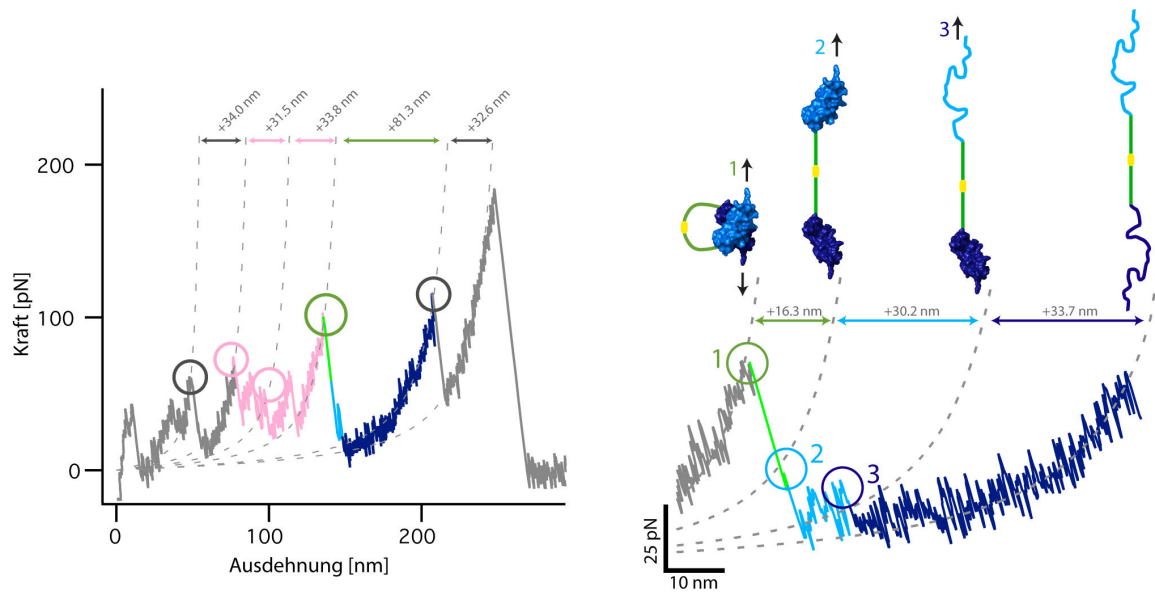


Abbildung 5.15: Dissoziation des vollständig reduzierten C_{H3} -Domänenpaars. Typische Kraft-Ausdehnungskurve des ddFLN- C_{H3} -Fusionsproteins (links) und strukturelle Interpretation des Entfaltungspfades (rechts).

Bruchkraftverteilungen der Dissoziationskraft der drei verschiedenen Redoxspezies des C_{H3} -Dimers sind in Abbildung 5.16 dargestellt. Es wird deutlich, dass die Dissoziationskraft des nativen, vollständig oxidierten Dimers am höchsten ist und durch das Reduzieren einer oder beider Disulfidbrücken absinkt. Aus den Kraftverteilungen wurden mithilfe von Monte-Carlo-Simulationen Parameter über die Energielandschaft des Entbindungsvorgangs gewonnen (schwarze Linien).

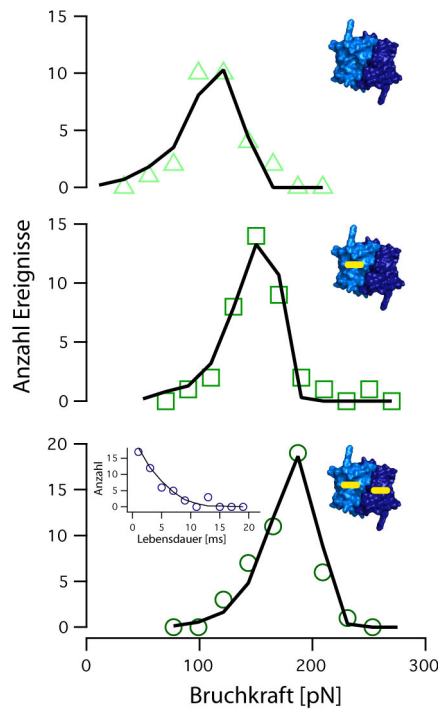


Abbildung 5.16: Dissoziationskraft von C_{H3} in Abhängigkeit des Redoxzustandes.

Bruchkraftverteilung von $C_{H3_{red}} / C_{H3_{red}}$ (oben, Dreiecke), $C_{H3_{red}} / C_{H3_{ox}}$ (mitte, Quadrate) und $C_{H3_{ox}} / C_{H3_{ox}}$ (unten, Kreise). Schwarze Linien sind die Ergebnisse einer Monte-Carlo Simulation mit $\Delta x = 2,5 \text{ \AA}$, $k_{off} = 0,2 \text{ s}^{-1}$ für $C_{H3_{red}} / C_{H3_{red}}$, $\Delta x = 2,3 \text{ \AA}$, $k_{off} = 0,05 \text{ s}^{-1}$ für $C_{H3_{red}} / C_{H3_{ox}}$ und $\Delta x = 2,4 \text{ \AA}$, $k_{off} = 0,01 \text{ s}^{-1}$ für $C_{H3_{ox}} / C_{H3_{ox}}$. Die Lebensdauerverteilung im unteren Teil der Abbildung (dunkelblaue Kreise) beinhaltet die Lebensdauer des monomeren $C_{H3_{ox}}$, die schwarze Linie ist das Ergebnis einer Monte-Carlo Simulation mit $\Delta x = 2,5 \text{ \AA}$ und $k_{off} = 3 \text{ s}^{-1}$.

5.2.2 Diskussion

Im vorangegangenen Abschnitt wurden Experimente vorgestellt, in denen die Dissoziationskraft des C_{H3} -Domänenpaares direkt gemessen wurde. Da im Cytoplasma von *E. coli* hergestelltes C_{H3} -Protein in einem Gemisch aus oxidiertem und reduziertem Protein vorliegt und diese beiden Formen des Proteins anhand ihres Konformationszustands in kraftspektroskopischen Experimenten voneinander unterschieden werden können, war es möglich, die Stabilität des nativen, vollständig oxidierten Dimers, des vollständig reduzierten Dimers und der oxidierten / reduzierten gemischten Form zu bestimmen. Es zeigt sich, dass die Bildung der Disulfidbrücke in C_{H3} die mechanische Stabilität des Dimers erhöht (Abbildung 5.16) wobei die mittlere Bruchkraft von $117 \pm 5 \text{ pN}$ ($C_{H3_{red}} / C_{H3_{red}}$) über $152 \pm 5 \text{ pN}$ ($C_{H3_{ox}} / C_{H3_{red}}$) bis zu $174 \pm 5 \text{ pN}$ ($C_{H3_{ox}} / C_{H3_{ox}}$) steigt. Bereits in früheren Experimenten wurde gezeigt, dass der Oxidationszustand von C_{H3} keinen Einfluss auf die Bildung und Struktur des Dimers hat

(Thies, Talamo et al. 2002; McAuley, Jacob et al. 2008). Allerdings ist die thermodynamische Stabilität von C_{H3} im reduzierten Zustand deutlich herabgesetzt (Thies, Talamo et al. 2002). Im gefalteten Dimer ist die Oxidation der beiden Cysteine ein sehr langsamer Prozess, der selbst unter oxidierenden Bedingungen auf einer Zeitskala von Tagen abläuft. Auch reduziertes C_{H3} bildet eine kompakt gefaltete Struktur, so dass eine teilweise Entfaltung des Proteins nötig ist, um die beiden Cysteinreste zu oxidieren (Thies, Talamo et al. 2002). Dies erklärt, warum das in den kraftspektroskopischen Experimenten untersuchte Gemisch aus den drei Oxidationsstufen von C_{H3} unter neutralen Redoxbedingungen über Wochen stabil war und keine signifikante Veränderung der Häufigkeit der einzelnen Populationen beobachtet werden konnte.

An dieser Stelle soll herausgestellt werden, dass mit der vorgestellten Methode die Dissoziationskraft einer inhomogenen Probe aus drei verschiedenen Oxidationszuständen von C_{H3} in einem Experiment bestimmt werden konnte. Kraftspektroskopische Experimente werden an einzelnen Molekülen durchgeführt und sind damit in der Lage, verschiedene Populationen in einer Probe voneinander zu trennen. Im Falle des C_{H3} -Dimers waren die verschiedenen Oxidationszustände der C_{H3} -Domänen anhand ihres Konturlängenzuwachses unterscheidbar und konnten somit anhand ihrer Entfaltungssignatur voneinander getrennt werden. Darüber hinaus ist insbesondere die Messung der Stabilität des gemischten ($C_{H3_{red}} / C_{H3_{ox}}$) Dimers mit klassischen Ensemblemethoden nur schwer vorstellbar.

Eine Analyse der Bruchkraftverteilungen durch Monte-Carlo Simulationen zeigt, dass der Oxidationszustand der C_{H3} -Domäne sich primär auf die Entbindungsrate auswirkt, während die Lage der Übergangsbarriere nahezu unverändert bleibt (Abbildung 5.16). Die Entbindungsrate der oxidierten Form ist etwa 20-fach geringer als die der reduzierten Form. Wird C_{H3} chemisch entfaltet, werden keine gefalteten Monomere auf dem Entfaltungspfad beobachtet – die Entfaltung verläuft direkt vom gefalteten Dimer zum entfalteten Monomer. Auch in mechanischen Experimenten war die Stabilität von monomerem C_{H3} gering, eine Analyse der Lebensdauer von monomerem $C_{H3_{ox}}$ zeigt (Abbildung 5.16), dass dieser Zustand bereits nach wenigen hundert Millisekunden zerfällt. Für monomeres $C_{H3_{red}}$ waren nicht genug Datenpunkte vorhanden, um eine direkte quantitative Aussage treffen zu können, allerdings lässt sich die Lebensdauer abschätzen: In Kraft-Ausdehnungs-Kurven des teiloxidierten C_{H3} -Dimers ($C_{H3_{red}} / C_{H3_{ox}}$) bilden sich nach der Dissoziation sowohl eine reduzierte als auch eine oxidierte C_{H3} -Domäne. In den meisten Fällen (39 von 45 Entfaltungsereignissen) entfaltet nun zunächst $C_{H3_{red}}$, gefolgt von $C_{H3_{ox}}$ (vgl. Abbildung 5.14 mitte). In einigen Fällen (6 von 45 Kurven) wurde hingegen die umgekehrte Reihenfolge der Entfaltung beobachtet (vgl.

Abbildung 5.14 rechts). Nach der Dissoziation des Dimers wirkt auf beide Monomere die gleiche Kraft, die für die kurze Lebensdauer der Zustände als konstant betrachtet werden kann. Unter dieser Kraft ist es siebenmal wahrscheinlicher, dass $C_{H3_{red}}$ zuerst entfaltet was unter der Annahme einer ähnlichen Position des Übergangszustands in der Potentiallandschaft eine siebenfach höhere Entfaltungsrate von $C_{H3_{red}}$ im Vergleich zu $C_{H3_{ox}}$ bedeutet.

Im Vergleich zu vielen weiteren Dimeren aus Ig-Domänen ist die Interaktion zwischen den beiden C_{H3} -Domänen mechanisch außerordentlich stabil (vgl. Kapitel 4). Das F_C -Fragment von Antikörpern (vgl. Abbildung 5.12) wird neben den beiden Disulfidbrücken in der Scharnierregion hauptsächlich durch die Interaktion zwischen den beiden C_{H3} -Domänen stabilisiert, während die Zuckerreste von C_{H2} nur wenig beitragen und kaum definierte Wasserstoffbrücken ausbilden. Auch die konstante Domäne der leichten Kette (C_L) zeigte in ihrer oxidierten Form eine hohe mechanische Stabilität mit einer mittleren Entfaltungskraft von 170 pN und ähnlichen Parametern für Barrierenhöhe und ω -position wie für die Dissoziation von C_{H3} (Bertz 2006). Allerdings ist C_L als monomere Domäne stabil, während im Falle von C_{H3} nur die Dissoziation hohe Kräfte erforderte und die isolierten Domänen eine geringe Lebensdauer hatten.

Viele Ig-Domänen aus muskulären Proteinen interagieren über die Bildung von domänenübergreifenden β -Faltblättern. Im Fall von C_{H3} sind vor allem Seitenketten an der Dimerbildung beteiligt. Eine Reduktion der im nativen Protein vorhandenen Disulfidbrücke erlaubt zwar noch die Bildung des Dimers, setzt aber dessen thermodynamische und mechanische Stabilität herab. Disulfidbrücken schränken den Konformationsraum der Polypeptidkette ein und können damit die Faltung beschleunigen, für C_{H3} wurde abgeschätzt, dass alleine dieser Effekt den Unterschied in thermodynamischer Stabilität zwischen oxidiertem und reduziertem Dimer erklären könnte (McAuley, Jacob et al. 2008). Zeitaufgelöste Entfaltungsexperimente zeigen allerdings, dass die Reduktion der Disulfidbrücken von C_{H3} die Dissoziationsrate deutlich erhöht (Thies, Talamo et al. 2002). Die mechanischen Experimente zur Dissoziationskraft von C_{H3} liefern ein ähnliches Bild: Durch Reduktion der Disulfidbrücken steigt die Dissoziationsrate an. Zudem scheint es, als ob sich die Beträge der beiden Disulfidbrücken addieren würden, wobei jede reduzierte Disulfidbrücke die Entbindungsrate um etwa einen Faktor fünf heraufsetzt. Im nativen oxidierten Dimer ermöglichen die Disulfidbrücken in C_{H3} offenbar eine stärkere Interaktion der Domänen miteinander. Spektroskopische Daten legen nahe, dass das reduzierte C_{H3} -Dimer eine kompaktere Sekundärstruktur bildet (Thies, Talamo et al. 2002), was offenbar die Interaktionsfläche verringert.

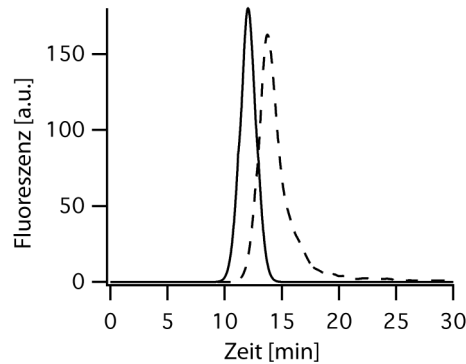


Abbildung 5.17: Größenausschlusschromatographie von C_{H3}.

Elutionsprofil des wildtyp ddFLN-C_{H3} Fusionsproteins (durchgezogene Linie) und von ddFLN-C_{H3}(C86S) (gestrichelte Linie).

Überraschenderweise führte eine Mutation von C_{H3}, bei der eines der beiden Cysteine (Cys86) durch ein Serin ersetzt wurde, zu einem Protein, das nicht mehr in der Lage war zu dimerisieren (Abbildung 5.17). Dies unterstreicht, dass die Umgebung der Disulfidbrücke, einen starken Einfluss auf die Dimerisierungsgrenzfläche hat, auch wenn sie an der eigentlichen Dimerisierung nicht beteiligt ist und keine Wechselwirkungen zur zweiten C_{H3}-Domäne bildet (Cys86 befindet sich sogar auf der der Dimerisierungsgrenzfläche abgewandten Seite der Ig-Domäne). Allerdings wirkt sich der Oxidationszustand nicht ausschließlich auf die Stabilität des Dimers aus, da auch die Entfaltungsrates des reduzierten Monomers leicht erhöht ist.

In den vorgestellten Experimenten wurde nur die mechanische Dissoziation des C_{H3}-Dimers untersucht, so dass keine direkten Aussagen über die Bildung dieses Komplexes getroffen werden können. Die hohe mechanische Stabilität der Interaktion der beiden C_{H3}-Domänen steht jedoch im Einklang mit der niedrigen Dissoziationskonstante ($< 10^{-10}$ M, (Isenman, Lancet et al. 1979)), die nahe legt, dass die Assoziation (> 23 k_BT) den dominanten Energiebeitrag zur Bildung des C_{H3}-Dimers ($\Delta G \sim 27$ k_BT (Thies, Mayer et al. 1999)) liefert. Für die monomere Antikörperdomäne C_L wurde gezeigt, dass die Disulfidbrücke den Faltungsprozess beschleunigt, nicht indem nur die Konformationsraum der Polypeptidkette eingeschränkt wird, sondern indem wichtige Aminosäuren, die die Struktur des Übergangszustands bilden, in räumliche Nähe zueinander gebracht werden (Feige, Hagn et al. 2007). Im Falle von C_{H3} scheint die Disulfidbrücke zusätzlich dafür verantwortlich zu sein, die monomere C_{H3}-Domäne in eine Struktur zu bringen, die eine optimale Interaktion mit dem zweiten Monomer ermöglicht. Die hohe Stabilität des C_{H3}-Dimers – mechanisch wie thermodynamisch – ist ein weiteres Beispiel dafür, wie Antikörper für die rauen extrazellulären Bedingungen optimiert sind.

6 Abschließende Diskussion

6.1 Messung von Dissoziationskräften verknüpfter Komplexe

Die mechanische Stabilität von Protein-Protein- oder Protein-Ligand-Wechselwirkungen stand schon früh im Zentrum des Interesses kraftspektroskopischer Experimente. Zu den ersten untersuchten Systemen gehörten die Wechselwirkung zwischen Biotin und Avidin (Florin, Moy et al. 1994) oder zwischen Antikörpern und Antigenen (Hinterdorfer, Baumgartner et al. 1996). Nur wenig später rückten Systeme, die auch im physiologischen Kontext mit Kraft belastet werden, in den Vordergrund (Nishizaka, Miyata et al. 1995) und auch in jüngster Zeit liefern mechanische Experimente wertvolle Einblicke in die Energielandschaft molekularer Interaktionen (Merkel, Nassoy et al. 1999; Evans, Leung et al. 2004; Zou, Schonherr et al. 2005; Morfill, Blank et al. 2007; Gebhardt, Ökten et al. 2010). Diesen Experimenten gemeinsam ist die Vorgehensweise: Zumeist wird eine Oberfläche mit Proteinen beschichtet und die Blattfederspitze (bzw. eine Kugel im Falle von Experimenten mit optischen Pinzetten) mit Ligand oder Bindungspartner funktionalisiert, die beiden Systeme werden in Kontakt gebracht und die Kraft gemessen, die erforderlich ist, um Blattfederspitze und Oberfläche wieder zu trennen. Um unspezifische Wechselwirkungen zwischen Blattfederspitze und Oberfläche zu minimieren werden aufwendige Maßnahmen unternommen, um die Oberflächen, beispielsweise mit Polyethylenglykol, zu passivieren. Zudem sind Kontrollexperimente, etwa mit freiem Ligand in Lösung, erforderlich, um zu zeigen, dass tatsächlich die Protein-Protein-Wechselwirkung für das gemessene Signal verantwortlich ist. Aber auch bei sorgfältigster Durchführung besitzt diese experimentelle Strategie einige inhärente Nachteile: Diese Vorgehensweise ist nicht geeignet, zwischen Dissoziation des Komplexes oder der Entfaltung einer der Komponenten zu unterscheiden. Darüber hinaus ist die Untersuchung von Homodimeren nicht möglich, ebenso die von heteromeren Komplexen, bei denen eine oder mehrere Komponenten ihre native Struktur erst im Komplex einnehmen. Auf die in dieser Arbeit untersuchten Proteinkomplexe zwischen Immunglobulin-domänen treffen diese Einschränkungen – mit Ausnahme des Komplexes zwischen Titin M10 und Obscurin Ig1 – zu, daher musste eine andere Herangehensweise entwickelt werden. Das einfachste denkbare Experiment ist in Abbildung 6.1 A skizziert. Ein Homodimer (graue Kästen) wird durch zusätzliche Proteindomänen (Kreise) an Oberfläche und Blattfederspitze angebunden. Diese Anbindung ist unspezifisch und kann prinzipiell an jeder Stelle der dimeren Polypeptidkette erfolgen. Durch Zählen von Entfaltungszacken dieser ‚Griff‘-Domänen, oder durch geschickt

aufgebaute ‚Griffe‘, bei denen eine der Domänen ein nur für sie charakteristisches Entfaltungssignal liefert (dunkelgrauer Kreis), können Kurven selektiert werden, in denen die Dimerbindung mit Kraft belastet wurde. In diesen Kurven reflektiert das letzte mechanische Ereignis die Dissoziation der Dimerbindung. Allerdings kann zwischen Dissoziation des Dimers und Ablösen der Polypeptidkette von Blattfederspitze und Oberfläche nicht unterschieden werden, so dass die erhaltene mittlere Dissoziationskraft nur eine untere Grenze darstellt. Diese Herangehensweise wurde erstmals eingesetzt, um die Dissoziationskraft der Dimerisierungsdomäne ddFLN6 aus *Dictyostelium discoideum* Filamin zu bestimmen (Schwaiger, Kardinal et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden Dissoziationskräfte für das α -Crystallin Dimer aus Hsp16,5 (16,5 α , Abschnitt 5.1) und für Myomesin Domäne 13 (Abschnitt 4.3) mit dieser Methode bestimmt. Durch geschickte Wahl der ‚Griffe‘ konnte zudem eine obere Grenze für die Entfaltungskraft gewonnen werden. Bei dieser Art von Experimenten stellt die bekannte Entfaltungssignatur der ‚Griffe‘ sicher, dass Einzelmolekülkurven sicher erkannt werden können. Da der Entbindungsvorgang nicht direkt beobachtet werden kann, muss allerdings dafür Sorge getragen werden, dass sich auf keine andere Art und Weise stabile Verbindungen zwischen den beiden Polypeptidketten ausbilden können (beispielsweise durch Disulfidbrücken). Außerdem liefert diese Methode keine Information über den Mechanismus des Entbindungsvorgangs und versagt, wenn die Dissoziationskraft des Dimers unter der Entfaltungskraft der ‚Griffe‘ liegt.

Als Lösung für diese Beschränkungen bietet sich eine stabile Verbindung zwischen den Komponenten des Komplexes an, die intakt bleibt, nachdem der Komplex dissoziiert ist (Abbildung 6.1 B). Disulfidbrücken können in die Interaktionsfläche des Komplexes eingebaut werden, was es ermöglicht, einerseits ein klares Entfaltungssignal der Dissoziation zu erhalten und obendrein auch Entfaltungsereignisse nach der Dissoziation zu beobachten. Allerdings muss bedacht werden, dass diese Art von Mutationen, durch die der Komplex an seiner Interaktionsfläche kovalent verknüpft wird, eine Veränderung des Entbindungs-/ Entfaltungspfades nach sich ziehen können. Auf zwei in dieser Arbeit untersuchte Systeme wurden Disulfidverknüpfungen angewendet – den Komplex zwischen Titin und Telethonin (Z1Z2T) und auf 16,5 α . Im Falle von Z1Z2T ist die Interaktionsfläche des trimeren Komplexes groß, so dass die Disulfidbrücken weit von den Kraftangriffspunkten eingefügt werden konnten. Für 16,5 α zeigt der Vergleich mit Daten des wildtyp Komplexes, dass die Mutation den Entfaltungspfad nicht verändert.

Als erfolgreichste Herangehensweise stellte sich in dieser Arbeit das Verknüpfen der Komponenten des Komplexes durch flexible Polypeptidabschnitte heraus (Abbildung 6.1 C grün). Je nach Orientierung der Termini der Komponenten können diese beispielsweise auf Genebene fusioniert und durch einen Linker verbunden werden. Andernfalls werden die flexiblen Linker an einen Terminus des Monomers angefügt und führen über ein Cystein am anderen Ende des Linkers zu einer kovalenten Verbindung. Hierbei muss beachtet werden, dass die physiologische Kraftrichtung – soweit sie bekannt ist – die Geometrie des Konstruktes bestimmt. Da der flexible Linker zu einem messbaren Konturlängenzuwachs führt, können Dissoziation des Komplexes und Entfaltung der Komponenten voneinander getrennt werden. Sofern der Linker ausreichend lang gewählt wird, ist zudem keine Beeinflussung des Komplexes durch die Mutation zu erwarten. Auch wenn die zu belastenden Termini des Komplexes nicht zueinander hin orientiert sind, ist dies Art von Verknüpfung möglich. Im Falle von $16,5\alpha$ wurden starrere Ubiquitinlinker eingesetzt, um die Distanz zwischen den Termini zu überbrücken. Für die Dimerisierungsdomäne 24 aus Filamin C (FLNC24) wurden an die Enden der in diesem Fall sehr langen Linker ein Leuzinzipper fusioniert. Die Leuzinzipper bilden ebenfalls mit hoher Affinität ein Homodimer und bringen damit die Termini der Linker zusammen. Ein an geeigneter Stelle in die Leuzinzippersequenz eingefügtes Cystein sorgt für eine kovalente Verknüpfung über eine Disulfidbrücke.

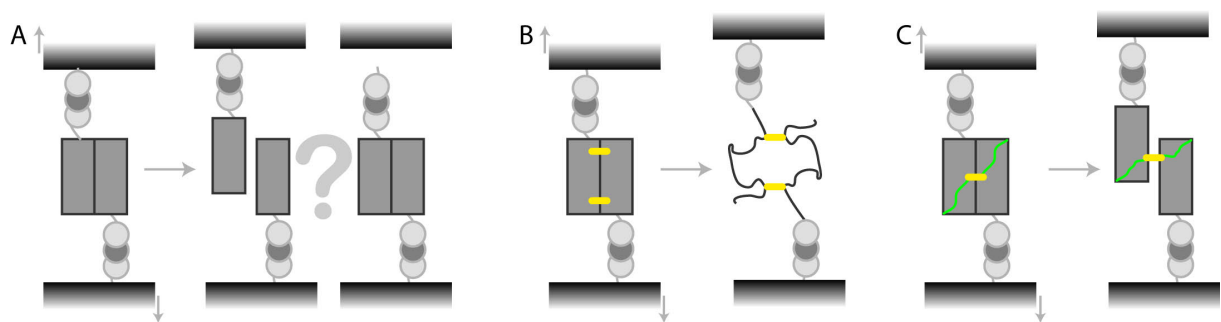


Abbildung 6.1: Messung von Dissoziationskräften

(A) Messung von Dissoziationskräften ohne Veränderung des Proteinkomplexes. Zwischen Dissoziation des Komplexes und Ablösen des Proteins von Blattfederspitze oder Oberfläche kann nicht unterschieden werden. **(B) Disulfidbrücken (gelb) als Verbindung zwischen den Komponenten des Komplexes erlauben die Detektion von Dissoziationsereignissen, lassen aber keine Unterscheidung zwischen Entfaltung oder Entbindung zu.** **(C) Flexible Verbindungen (grün) zwischen den Komponenten machen den vollständigen Entbindungs-/ Entfaltungspfad zugänglich.**

Die in dieser Arbeit vorgestellten Methoden zu Messung von Dissoziationskräften dimerer und trimerer Komplexe lassen sich problemlos auf andere Systeme übertragen. Jüngst wurde

beispielsweise das Binden und Entbinden eines an Calmodulin fusionierten Liganden unter Kraft beobachtet (Junker und Rief 2009). Verknüpfte Proteinkomplexe stellen ein potentiell mächtiges Werkzeug dar, um Entbindungsvorgänge einzelner Moleküle sicher zu detektieren und liefern darüber hinaus auch Informationen über die Kooperativität des Entbindungsvorgangs und über die Stabilität der getrennten Komponenten des Komplexes.

6.2 Stabilität von Interaktionen zwischen Immunglobulindomänen

Immunglobulin(Ig)-Domänen sind in der Natur weit verbreitet. Neben den namensgebenden Antikörpern beinhalten auch zahlreiche strukturelle Proteine und sogar Rezeptor-Tyrosinkinasen dieses Faltungsmotiv (Bork, Holm et al. 1994). Insbesondere die großen Muskelproteine Titin und Obscurin sowie weitere Bestandteile des Sarkomers oder des Cytoskeletts bestehen aus aneinandergefügten Ig-Domänen. Das mechanische Verhalten einiger dieser Proteine ist bereits in der Vergangenheit durch kraftspektroskopische Experimente näher untersucht worden (Rief, Gautel et al. 1997; Rief, Gautel et al. 1998; Marszalek, Lu et al. 1999; Furuike, Ito et al. 2001; Li, Oberhauser et al. 2001; Li, Linke et al. 2002; Schwaiger, Kardinal et al. 2004). Allerdings wirken diese Proteine nicht für sich alleine, vielmehr sind Protein-Protein-Interaktionen wichtig für die Struktur, Funktion und Regulation in einer zellulären Umgebung. Zum Verständnis des mechanischen Verhaltens des gesamten Proteins ist es deshalb erforderlich, auch die mechanische Stabilität dieser Wechselwirkungen zu kennen. In dieser Arbeit wurden dimere und trimere Komplexe aus Ig-Domänen von Muskelproteinen untersucht und die Dissoziationskräfte dieser Komplexe gemessen. In diesen Komplexen interagieren die Bindungspartner, indem sie β -Faltblätter zwischen den einzelnen Ig-Domänen ausbilden (Pinotsis, Abrusci et al. 2009). Im Gegensatz hierzu interagieren zwei weitere untersuchte Dimere – das α -Crystallin Dimer aus Hsp16,5 und das C_H3-Dimer aus einem Antikörper – nicht oder im Falle von 16,5 α kaum durch die Bildung von domänenübergreifenden Sekundärstrukturen, sondern in erster Linie durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Seitenketten. Eine Übersicht der untersuchten Proteinkomplexe ist in Abbildung 6.2 dargestellt. Es zeigt sich, dass Interaktionen zwischen Ig-Domänen nicht nur strukturell sehr verschieden sein können, sondern dass auch die Dissoziationskraft der Komplexe einen großen Kraftbereich umfasst.

Da Kraft gerichtet auf Proteinstrukturen einwirkt und die hier vorgestellten Experimente fernab des Gleichgewichts durchgeführt wurden, sind globale Parameter wie die freie Energie

oder Dissoziationskonstanten nicht geeignet, um die mechanische Stabilität der Komplexe zu erklären. Dies wird insbesondere anhand der stark richtungsabhängigen Stabilität des Komplexes zwischen Titin und Telethonin (Z1Z2T, Abschnitt 4.1) deutlich. Auch die Größe der Interaktionsfläche der Komplexe scheint keine Rolle zu spielen (Abbildung 6.2 rechte Achsen).

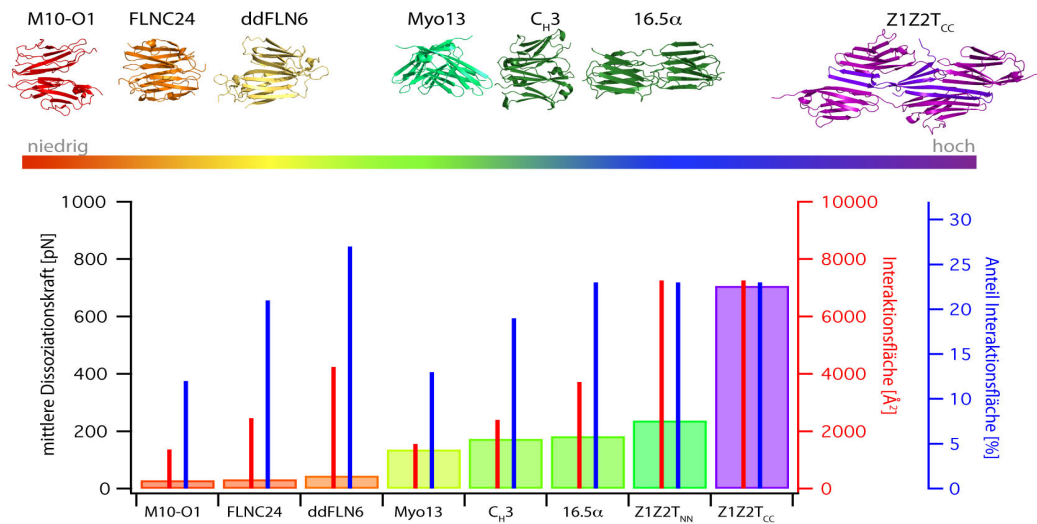


Abbildung 6.2: Übersicht der untersuchten Proteinkomplexe

Proteinkomplexe aus Ig-Domänen geordnet nach ihrer Dissoziationskraft. Auf den rechten Achsen ist die Interaktionsfläche des Komplexes (rot) sowie der Anteil der Interaktionsfläche an der Gesamtoberfläche der Proteine (blau) aufgetragen

Zwei der untersuchten Komplexe erwiesen sich als außerordentlich stabil – wenn auch auf unterschiedliche Weise: Der Komplex zwischen Titin und Telethonin kann Kräften bis zu 800 pN widerstehen, wenn die Kraft in physiologischer Richtung wirkt (Z1Z2T_{CC}). Diese Stabilität resultiert aus einem dichten Netzwerk an Wasserstoffbrücken, in das die mit Kraft belasteten β -Stränge eingebettet sind. Das Dimer zwischen der C-terminalen Domäne von *Dictyostelium discoideum* Filamin (ddFLN6) dissoziiert zwar bereits bei Kräften < 50 pN, allerdings sorgt ein Vorgleichgewicht, das vom Ablösen und Rückbinden einer kurzen α -Helix herrührt, für eine sehr lange Lebensdauer bei niedrigen Kräften.

Der Komplex von Titin und Telethonin (Z1Z2T) zeigt neben seiner hohen Stabilität noch eine Besonderheit: Während in allen anderen untersuchten Dimeren die mechanische Belastung zur Dissoziation und dem anschließenden Entfalten der Monomere führte, ist die Hierarchie der Ereignisse in Z1Z2T umgekehrt: Das erste Entfaltungsereignis spiegelt das Entfalten einer Ig-Domäne wider, die im Komplex gebunden ist.

Die gemessenen Dissoziationskräfte von Proteinkomplexen zwischen Muskelproteinen erlauben es, die mechanische Hierarchie dieser Proteine besser zu verstehen. Für viele dieser Proteine wurde postuliert, dass bei mechanischer Belastung einzelne Domänen entfalten könnten, um die Proteinkette zu entspannen. Die hohe Dissoziationskraft des Titin-Telethonin Komplexes, die weit jenseits der Entfaltungskräfte von Titin Ig-Domänen liegt, macht dies für Titin plausibel. Auch im Falle von Myomesin ist die Dimerbindung in der Lage, höheren Kräften zu widerstehen als die einzelnen Ig-Domänen. Für Filamin, sowohl aus Mensch (hsFLNC) als auch aus *Dictyostelium discoideum* (ddFLN), ist die Dimerbindung schwächer als die Ig-Domänen, die den Rest des Moleküls ausmachen – auch wenn ddFLN6, wie oben angesprochen, bei niedrigen Kräften eine sehr hohe Lebensdauer hat. Für diese Proteine ist eine Domänenentfaltung somit unwahrscheinlich. Dasselbe gilt für die Interaktion zwischen Titin und Obscurin (M10-O1), diese Bindung ist, ebenso wie FLNC24, eher dynamisch als starr.

Obwohl die Interaktionen von 16,5 α bzw. der Antikörperdomänen C_H3 unter physiologischen Bedingungen wohl keinen Kräften ausgesetzt sind, erwiesen sich diese Dimerbindungen als außerordentlich stabil. Abbildung 6.2 macht deutlich, dass ihre Dissoziationskraft nur von dem wesentlich größeren Komplex zwischen Titin und Telethonin übertroffen wird. Diese hohe mechanische Stabilität ist umso erstaunlicher, weil die Interaktion in diesen Komplexen nicht auf scheinbar rigiden intermolekularen β -Faltblättern beruht, sondern in erster Linie auf Seitenkettenwechselwirkungen basiert.

Kraftspektroskopische Experimente sind von Natur aus Einzelmolekülexperimente. Allerdings spielt dieser Einzelmolekülaspekt meist keine herausragende Rolle, statt dessen werden für gewöhnlich einfach viele Einzelmolekülereignisse zusammengefasst und diese gemittelten Verteilungen ausgewertet, wobei selten auftretende Ereignisse hierbei meist verworfen werden. Ausnahmen stellen Arbeiten zu Domäne I27 von Titin dar, in denen einzelne fehlgefaltete Spezies identifiziert werden konnten (Oberhauser, Marszalek et al. 1999), ebenso wie die Beobachtung mehrerer paralleler Entfaltungspfade bei T4 Lysozym (Peng und Li 2008) oder grün-fluoreszierendem Protein (Dietz, Berkemeier et al. 2006). In dieser Arbeit trat der Einzelmolekülcharakter der Kraftspektroskopie in zwei Fällen besonders zu Tage: In Abschnitt 5.1 wurden die Monomere des α -Crystallin Dimers aus Hsp16,5 (16,5 α) durch Ubiquitineinheiten miteinander verknüpft. Abhängig von den Punkten, an denen dieses Fusionsprotein mit Kraft belastet wird, konnte entweder die Dissoziation des Dimers und die darauffolgende Entfaltung der Monomere oder die Entfaltung eines Monomers, während es im Komplex gebunden ist, im selben Experiment beobachtet werden. Es zeigte sich, dass die Dissoziationskraft

des Dimers unter der Entfaltungskraft einer der Untereinheiten im Komplex liegt. Für das C_H3-Dimer aus einem Antikörper konnten die drei verschiedenen Redoxzustände der Domänen, die über eine interne Disulfidbrücke verfügen, unterschieden werden. Die mechanische Stabilität nahm mit zunehmender Oxidation der Disulfidbrücken zu. In einer inhomogenen Probe – hinsichtlich der Angriffspunkte der Kraft oder des Redoxzustands einer Komponente – konnten durch Einzelmolekülexperimente verschiedene Klassen an Ereignissen identifiziert werden, von denen einige, beispielsweise der gemischte Redoxzustand von C_H3, mit anderen Methoden nur schwer zugänglich sind.

7 Ausblick

Dissoziation und Assoziation von Proteinkomplexen

In dieser Arbeit wurden Experimente vorgestellt, mit denen die Dissoziationskräfte von Proteinkomplexen bestimmt werden konnten, indem die Polypeptidketten der einzelnen Untereinheiten kovalent verknüpft wurden. Der nächste darauf folgende Schritt wäre nun, die Faltung und Assoziation dieser Proteinkomplexe durch Einzelmolekülexperimente zu beobachten. Dies gestaltet sich experimentell ungleich schwieriger als die Messung von Dissoziationskräften, da sich die Faltungszeit einiger der hier untersuchten Komplexe auf einer Zeitskala von Minuten bewegt, wobei abzuwarten bleibt, ob dies auch nach mechanischer Entfaltung der Fall ist. Aufgrund der höheren experimentellen Stabilität von optischen Pinzetten bietet sich diese Methode für diese Rückfaltungs-/ Assoziationsexperimente an.

Mit Ausnahme des Komplex aus Titin und Telethonin führte in allen hier untersuchten Dimeren eine Belastung mit Kraft zur Dissoziation, woraufhin zwei mehr oder weniger stabile Monomere gebildet wurden. Allerdings ist es *a priori* nicht klar, ob diese Monomere auch auf dem Faltungspfad auftreten, oder ob die beiden entfalteten Polypeptidketten zu einem sehr frühen Zeitpunkt assoziieren und erst danach falten. Es ist auch denkbar, einen Komplex mechanisch zu dissoziieren und danach nur ein Monomer zu entfalten. Wenn danach die Rückfaltung des entfalteten Monomers gemessen wird, könnte beobachtet werden, ob die Anwesenheit des gefalteten Monomers die Faltung des ungefalteten Monomers beschleunigen kann. Hierdurch könnte zwischen einem *induced-fit* Mechanismus, bei dem die Bindung früh erfolgt, oder einem *conformational selection* Mechanismus, bei dem die Bindung von stärker strukturierten Strukturen ausgeht, unterschieden werden (Wright und Dyson 2009).

Intelligente Materialien

Die mechanischen Eigenschaften von Proteinen spielen nicht nur in einem zellulären Kontext eine Rolle sondern sind auch von Interesse für die Konstruktion von neuen elastischen Materialien oder Nanomaschinen (Cao und Li 2008; Li 2008). Die hier beschriebenen Proteinkomplexe können als weiterer Baustein auf dem Weg zu maßgeschneiderten Nanomaterialien dienen. Beispielsweise könnten die Dimerisierungsdomänen von Filamin (ddFLN6) und Myomesin (Myo13) als Sollbruchstellen bei verschiedenen Kräften dienen. Um Proteinketten mit neuartigen Eigenschaften zu erhalten, wurde unlängst eine schwache Proteindomäne in die

Struktur einer stabileren Domäne eingefügt. Diese stabile Domäne schützt die schwache Domäne vor Kraft, bis sie selbst entfaltet, danach wird die schwache Domäne mit Kraft belastet und entfaltet bei niedrigeren Kräften (Peng und Li 2009). Eine ähnliche Situation herrscht in dem von Ubiquitineinheiten verknüpften 16,5 α Dimer: Auch hier werden die drei verknüpfenden Ubiquitineinheiten erst mit Kraft belastet, wenn das Dimer dissoziiert. Analog ließen sich auch Proteindomänen hinter andere Dimerisierungsdomänen, beispielsweise Myomesin Domäne 13, einfügen, um nach dem Erreichen der Dissoziationskraft weitere schwache Domänen mit Kraft zu belasten.

Mechanische Hierarchien von Proteinen und Proteinkomplexen

In allen hier vorgestellten Experimenten fand die Dissoziation der Proteinkomplexe nicht in einem Schritt statt, vielmehr konnte nach der Trennung der Monomere auch deren Entfaltung beobachtet werden. Kraftspektroskopie ist aufgrund ihrer hohen Zeitauflösung sehr gut zur Detektion kurzlebiger Zustände geeignet. Zudem lassen sich aus den gemessenen Konturlängenzuwächsen Informationen über die Struktur von Intermediaten gewinnen. In Anhang A werden Experimente vorgestellt, in denen die Entfaltung der großen Proteine Maltosebindendes Protein (MBP) und grün-fluoreszierendes Protein (GFP) untersucht wurde. Auch für diese Systeme zeigt sich, dass die Entfaltung über mehrere Zwischenzustände verläuft, deren Struktur mithilfe lokaler Sonden in der Proteinstruktur bestimmt werden konnte. Allerdings liegt die Lebensdauer einiger dieser Zustände (beispielsweise die der Monomere von C_{H3} der die von M234 von MBP) an der unteren Grenze dessen, was mit dem verwendeten Aufbau detektiert werden kann. Zur Messung von noch kurzlebigeren Zuständen wären Blattfedern mit einer höheren Resonanzfrequenz (und einem besseren oder zumindest unveränderten Signal/Rauschverhältnis) sowie eine höhere Abtastrate des Messsignals nötig. Hierdurch könnte eventuell weitere teilentfaltete Zustände detektiert werden, wie sie in Molekulardynamiksimulationen oft beobachtet werden (Sotomayor und Schulten 2007).

Mechanische Beschreibung von Interaktionsnetzwerken

Die hier vorgestellten Methoden erlauben die verlässliche Messung von Dissoziationskräften von Proteinkomplexen. Viele Proteine – wenn nicht sogar die Mehrheit –, treten insbesondere in einem zellulären Kontext nicht alleine sondern im Komplex mit weiteren Proteinen auf. Beispielsweise im Muskel existieren mit der Z-Scheibe und der M-Scheibe zwei dichte Ab-

schnitte, in denen die Mechanik von Protein-Protein-Interaktionen eine herausragende Bedeutung hat. Viele dieser Interaktionen sind strukturell bislang noch nicht charakterisiert, allerdings ist dies keine Voraussetzung für eine Verbindung der Interaktionspartner durch – ausreichend lange – flexible Linker. Hierbei gibt die erwartete Krafrichtung *in vivo* die Verknüpfungsgeometrie vor. Allerdings sind selbstverständlich nicht nur Proteinkomplexe des Cytoskeletts von Interesse, wie in Kapitel 5 gezeigt, lassen sich mit mechanischen Methoden auch wichtige Parameter der Energielandschaft von Proteinen gewinnen, die *in vivo* keiner Kraft ausgesetzt sind. Denkbar sind auch Experimente, in denen Protein-Liganden-Wechselwirkungen mit mechanischen Methoden untersucht und manipuliert werden, wie dies in jüngster Zeit etwa für Calmodulin geschehen ist (Junker und Rief 2009).

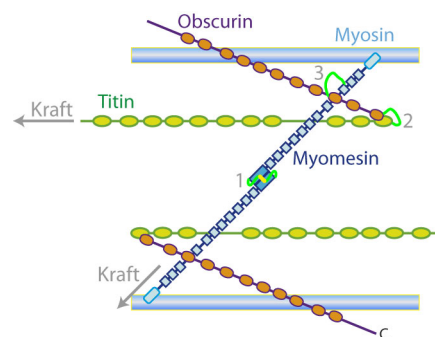


Abbildung 7.1: Messung der Mechanik von Proteinnetzwerken.

Durch Verknüpfung von mehreren Filamenten der M-Scheibe durch Disulfidbrücken (1) oder flexible Linker (2 und 3) kann dieser Abschnitt des Muskels *in vitro* nachgestellt werden.

Die Charakterisierung einzelner Protein-Protein-Interaktionen ist allerdings nur ein erster Schritt zum Verständnis von Interaktionsnetzwerken. Da in einer Zelle viele verschiedene Bindungen gleichzeitig belastet werden und die mechanische Stabilität von Protein-Protein-Interaktionen zudem von weiteren, nicht filamentartigen Proteinen beeinflusst werden kann, ist es denkbar, dass ein Netzwerk mehr als die Summe seiner Einzelteile ist. Durch flexible Linker kann nicht nur eine, sondern auch mehrere Bindungen verknüpft werden (Abbildung 7.1). Prinzipiell sind auch Verzweigungen (beispielsweise durch Disulfidbrücken oder chemische Crosslinker) denkbar, so dass mehrere Bindungen parallel belastet werden können. Durch die Zugabe löslicher Faktoren könnte die Situation *in vivo* noch genauer nachgestellt werden. Nachdem in der Vergangenheit die Mechanik der isolierten muskulären Filamente im Zentrum der Forschung stand, könnte diese Art von Experimenten ein tieferes Verständnis der Mechanik des gesamten Muskels liefern.

Anhang

A Mechanische Hierarchien in großen Proteinen

In Abschnitten 4 und 5 wurde diskutiert, dass Protein-Protein Interaktionen eine strukturelle Hierarchie zeigen und bei mechanischer Belastung – teilweise über Zwischenzustände – in strukturierte Monomere zerfallen, die ihrerseits durch Kraft entfaltet werden können. In den folgenden Abschnitten soll anhand von zwei Beispielen gezeigt werden, dass auch große Proteine aus einer einzelnen Kette mit mehreren hundert Aminosäuren Länge unter Kraft nicht in einem Schritt zerfallen, sondern mechanische und strukturelle Hierarchien aufweisen. In Abschnitt A.1 wird diskutiert, wie das Maltose-bindende Protein (MBP) bei Belastung an N und C Terminus durch sequentielles Ablösen von vier Abschnitten seiner Struktur entfaltet und dass diese vier strukturellen Abschnitte zum Teil thermodynamisch stabile Bausteine der MBP Struktur bilden. In Abschnitt A.2 wird der Einfluss von Ligandenbindung auf die mechanische Stabilität von MBP untersucht. Abschnitt A.3 zeigt, dass durch Veränderung der Belastungsrichtung von einer Scher- zu einer Abschälgeometrie zwischen zwei Entfaltungspfaden in der Energielandschaft des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) gewechselt werden kann.

A.1 Unfoldons als Bausteine des Maltose-bindenden Proteins

Das Maltose-bindende Protein (MBP) ist ein großes, aus 366 Aminosäuren bestehendes Protein, das im Periplasma von *E. coli* als Sensor für Maltose und weitere Maltodextrine dient. Strukturell besteht MBP aus zwei Abschnitten (Domänen), zwischen denen sich die Ligandenbindungsstelle befindet (Spurlino, Lu et al. 1991) (Abbildung A.1 A). Bei Bindung von Maltose bewegen sich die beiden Domänen aufeinander zu und die Ligandenbindungsstelle wird geschlossen (Sharff, Rodseth et al. 1992). Die beiden Domänen von MBP bestehen allerdings nicht aus kontinuierlichen Abschnitten der Polypeptidkette (Abbildung A.1 B), so dass sie nicht einfach als voneinander unabhängige Bausteine wie beispielsweise die Immunglobulin-Domänen in Antikörpern angesehen werden können.

Im folgenden Abschnitt werden Experimente vorgestellt, in denen mithilfe von kraftspektroskopischen Experimenten stabile Bausteine von MBP identifiziert werden konnten.

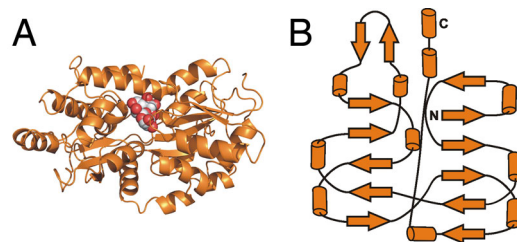


Abbildung A.1: Struktur (A) und Topologie (B) des Maltose-bindenden Proteins

A.1.1 Ergebnisse

Um MBP an seinem N und C Terminus mechanisch zu belasten, wurde das Protein von fünf Filamindomänen (ddFLN1-5 (Schwaiger, Kardinal et al. 2004), vgl. Abschnitt 4.4.1) flankiert, die als Angriffspunkte für Oberfläche und Blattfederspitze dienen. Diese Vorgehensweise ist analog zu Experimenten mit grün-fluoreszierendem Protein (Dietz und Rief 2004) und Dihydrofolat-Reduktase (Junker, Hell et al. 2005). Eine typische Kraft-Ausdehnungskurve dieses chimären Proteins ist in Abbildung A.2 A dargestellt. Vor dem charakteristischen Entfaltungsmuster von ddFLN (grau) ist ein längeres Entfaltungsereignis (koloriert) zu erkennen, das aus vier Teilen besteht: Auf ein Entfaltungsereignis bei niedrigen Kräften (blau) folgt ein deutlich sichtbarer Entfaltungszacken bei ~ 50 pN (grün), auf den während der Relaxation der Blattfederspitze ein kurzlebige Intermediat (rot) und ein weiteres, bei höheren Kräften entfaltendes Intermediat (gelb) folgt. MBP besteht demnach offenbar aus vier strukturellen Abschnitten (M1-M4, Unfoldons), die sich sequentiell von der gefalteten Struktur des

Proteins lösen, wenn eine Kraft an N und C Terminus anliegt. Die dazugehörigen gefalteten Zwischenzustände werden mit M234 (M1 abgelöst, grüner Zacken), M34 (kurzlebiges Intermediat) und M4 bezeichnet.

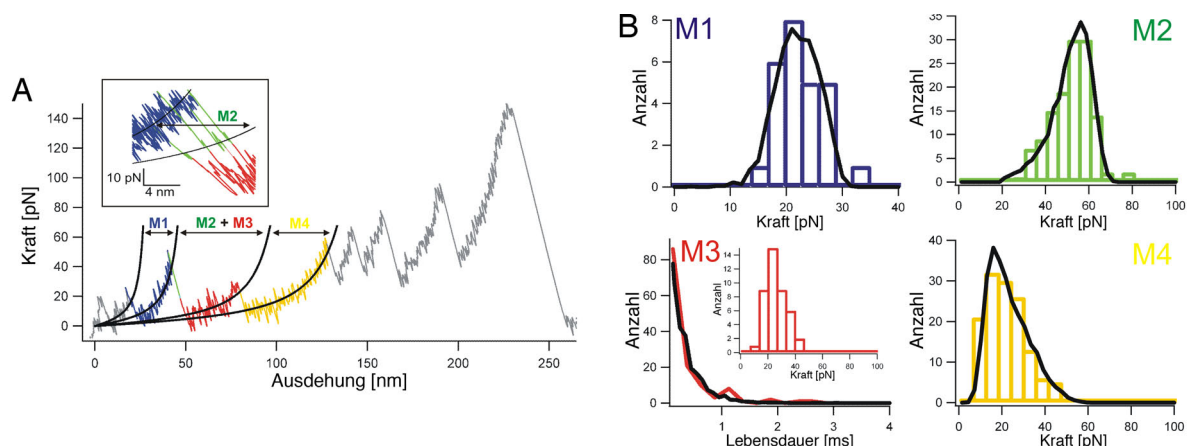


Abbildung A.2: Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurven (A) und Bruchkraft-verteilungen (B) der vier Unfoldons von MBP.

Durchgezogene schwarze Linien in (B) sind das Resultat einer Monte-Carlo-Simulation mit Parametern aus Tabelle A.1.

Bruchkraftverteilungen zu den vier Entfaltungsübergängen sind in Abbildung A.2 B dargestellt. Bemerkenswert ist, dass offenbar nicht die native MBP Struktur (M1234) den mechanisch stabilsten Zustand darstellt; vielmehr ist das Entfaltungsintermediat M234 stabiler (vgl. Tabelle A.1)

Tabelle A.1: Stabilität der vier Entfaltungsübergänge von MBP

Ablösen von Unfoldon	Stabilität	τ [s]	Δx [nm]
M1	22 ± 8 pN	700 ± 300	$2,3 \pm 0,2$
M2	51 ± 9 pN	17 ± 4	$0,66 \pm 0,02$
M3	$0,3 \pm 0,5$ ms	$0,001 \pm 0,0007$	$0,2 \pm 0,04$
M4	20 ± 9 pN	$0,1 \pm 0,06$	$0,38 \pm 0,04$

Die komplexe Topologie von MBP aus zwei Domänen macht deutlich, dass eine Zuordnung der vier Entfaltungsübergänge zu strukturellen Elementen nicht trivial ist. Hierzu ist eine strukturelle Sonde nötig, die in verschiedene Abschnitte des Proteins eingebracht werden kann und die einen der gemessenen Parameter – Entfaltungskraft und Konturlängenzuwachs – beeinflusst. Da die Kraftspektroskopie sehr genaue Längenmessungen von Entfaltungsereignissen erlaubt (Dietz und Rief 2006), bietet sich eine Sonde an, die den Konturlängenzuwachs verändert. Hierzu kann beispielsweise die Polypeptidkette durch Einfügen zusätzlicher Ami-

nosäuren an bestimmten Stellen des Proteins verlängert (Carrion-Vazquez, Marszalek et al. 1999; Schwaiger, Kardinal et al. 2004) werden. Umgekehrt kann eine Disulfidbrücke die Polypeptidkette um die Anzahl der Aminosäuren zwischen der Disulfidbrücke verkürzen (Mickler, Dima et al. 2007; Sharma, Perisic et al. 2007). Für MBP wurden drei Doppel-Cysteinmutanten mit Disulfidbrücken am N Terminus (zwischen Aminosäure 10 und 57, MBP10x57), im Zentrum des Proteins (MBP98x174) und am C Terminus (MBP230x297) erstellt. Der Einfluss der Disulfidbrücken auf die vier Unfoldons M1-M4 ist in Abbildung A.3 dargestellt.

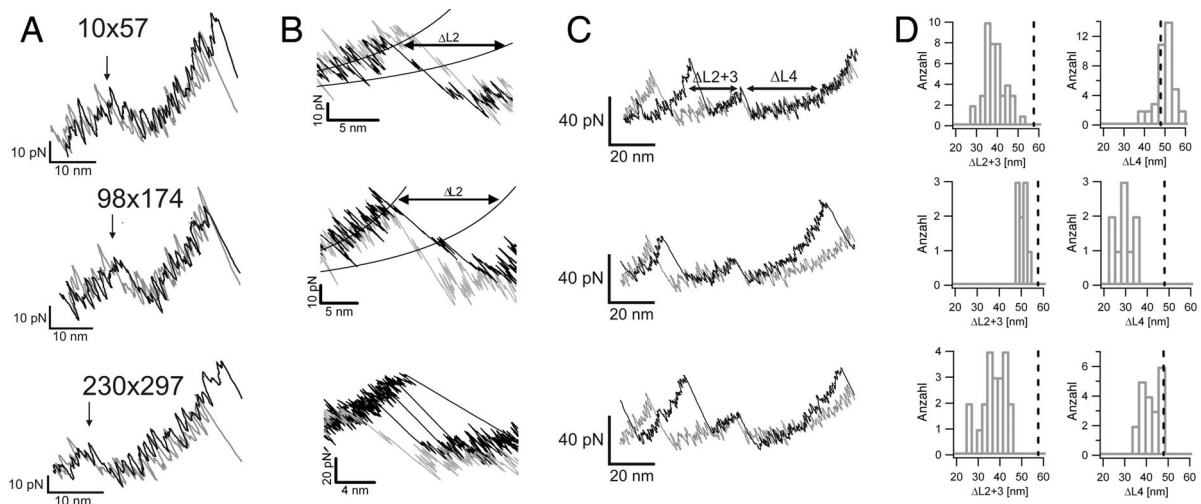


Abbildung A.3: Disulfidmutanten von MBP.

Einfluss der Disulfidbrücke (MBP10x57: oben, MBP98x174: mitte, MBP230x297: unten) auf Unfoldon M1 (A), Unfoldon M2 (B) und Unfoldons M23 und 4 (C) (wild-typ Kraft-Ausdehnungs-Kurve in grau). Konturlängenzuwachsverteilungen für die verschiedenen Entfaltungsübergänge (D) mit Mittelwert des Wildtyps als gestrichelte Linie.

Abbildung A.3 A macht deutlich, dass der erste Entfaltungsübergang, das Ablösen von Unfoldon M1 bei niedrigen Kräften, von keiner der drei Disulfidbrücken beeinflusst wird (vgl. Tabelle A.2 erste Spalte). Abbildung A.3 C oben zeigt, dass sich die Disulfidbrücke in MBP10x57 auf Unfoldons M2 und M3 auswirkt, M4 aber unbeeinflusst lässt. Eine genauere Analyse des kurzlebigen Zustands M34 (Abbildung A.3 B oben) von MBP10x57 zeigt, dass M2 von der Disulfidbrücke ebenfalls nicht verändert wird. Die Disulfidbrücke zwischen Aminosäuren 10 und 57 befindet sich somit gänzlich in M3. MBP98x174 und MBP230x297 verkürzen sowohl M23 als auch M4. Analog zu MBP10x57 zeigt sich auch für MBP98x174, dass die Disulfidbrücke auf M2 keinen Einfluss hat, womit sich die Verknüpfung in M3 und M4 befinden muss. In MBP230x297 fehlt die Entfaltungssignatur von M2 hingegen in den Kraft-Ausdehnungs-Kurven, was bedeutet, dass dieses Unfoldon von der Disulfidbrücke überbrückt und somit vollständig von Kraft abgeschirmt wird.

Aus dem Konturlängenzuwachs von M1 lässt sich abschätzen, dass M1 etwa 70 Aminosäuren umfasst. Da die drei Disulfidmutanten gleichmäßig über die ganze MBP-Struktur verteilt sind und nur am C Terminus eine ausreichend große Lücke bleibt, liegt nahe, dass M1 die C-terminalen Aminosäuren 296-366 umfasst.

Tabelle A.2: Konturlängenzuwächse von wildtyp MBP und Disulfidmutanten.

	$\Delta L1$ [nm]	$\Delta L2$ [nm]	$\Delta L2+3$ [nm]	$\Delta L4$ [nm]	$\Delta L2+3+4$ [nm]
MBP wt	$22,6 \pm 0,7$	$15,9 \pm 1,6$	$57,9 \pm 0,9$	$47,9 \pm 1,1$	$105,7 \pm 0,5$
MBP10x57	$21,7 \pm 1,2$	$15,9 \pm 1,6$	$37,5 \pm 1,0$	$49,2 \pm 0,9$	$87,4 \pm 0,5$
MBP98x174	$21,1 \pm 3,3$	$17,7 \pm 1,2$	$50,0 \pm 0,7$	$29,1 \pm 1,4$	$76,6 \pm 1,3$
MBP230x297	$21,7 \pm 1,4$	-	$36,8 \pm 1,2$	$41,7 \pm 0,9$	$80,1 \pm 1$

M2 ist in MBP230x297 nicht mehr detektierbar und muss daher vollständig zwischen Aminosäuren 230-297 liegen. Aus dem Konturlängenzuwachs für M2 ($15,9 \pm 1,6$ nm) ergibt sich, dass M2 aus Resten 244-295 besteht. M3 ist sowohl in MBP10x57 als auch in MBP98x174 verkürzt und liegt damit am N Terminus des Proteins (Aminosäuren 1-113). M4 umfasst die restlichen Aminosäuren 114-243¹³. Abbildung A.4 fasst diese Ergebnisse zusammen.

Die aus Monte-Carlo Simulationen extrapolierten Lebensdauern (Tabelle A.1) auf der Zeitskala von einigen Sekunden deuten an, dass einige der Entfaltungsintermediate von MBP auch thermodynamisch stabil sein könnten. Um dies zu überprüfen, wurden Kürzungsmutanten von MBP anhand der Unfoldongrenzen für die Unfoldonkombinationen M234, M123, M23 und M4 hergestellt und die korrekte Faltung anhand von Circular dichroismus(CD)-Spektren überprüft. M234, M123 und M23 konnten alle als lösliche Proteine gewonnen werden, ihre CD-Spektren zeigen, dass sie eine wohl definierte Struktur mit hohem α -helikalem Anteil einnehmen (Abbildung A.5). Für M234 konnte mithilfe von Pulldown-Experimenten gezeigt werden, dass diese Mutante noch Maltose binden kann (Abbildung A.5 C). Die mechanische Stabilität der kürzesten Mutante M23 wurde analog zu wild-typ MBP gemessen, indem M23 von ddFLN Ig-Domänen flankiert wurde. Eine typische Entfaltungskurve ist in Abbildung A.6 A dargestellt (rotes Entfaltungsereignis). Die Überlagerung der Bruchkraftverteilung dieses Entfaltungsereignisses (rot Abbildung A.6 B) mit der korrespondierenden Ver-

¹³ Hierbei basiert die Zuordnung der Unfoldons nicht auf der Annahme, dass an jedem Entfaltungsübergang nur ein kontinuierlicher Abschnitt des Proteins beteiligt ist. Würde das sequentielle Ablösen von M2 und M3 als ein Ereignis behandelt, so würde das Unfoldon M23 einen C- und einen N-terminalen Abschnitt der Proteinstruktur beinhalten, da es von allen drei Disulfidbrücken verkürzt wird.

teilung von wildtyp-MBP (Ablösen von Unfoldon M2) zeigt, dass es sich in der Tat um einen sehr ähnlichen Entfaltungsübergang handelt.

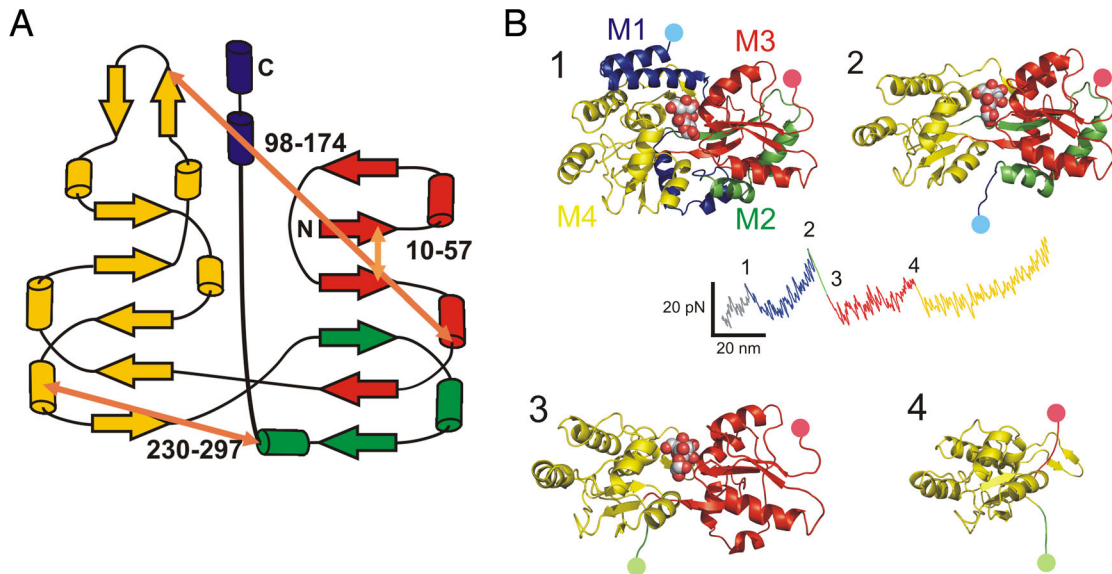


Abbildung A.4: Strukturelle Interpretation des Entfaltungspfades von MBP.

(A) Topologie von MBP (α -Helices sind als Tonnen dargestellt, β -Faltblätter als Pfeile) mit den drei Disulfidbrücken (orange Pfeile). Die Grenzen der Unfoldons sind durch Farben markiert. (B) Strukturen der Entfaltungsintermediate von MBP.

A.1.2 Diskussion

Die hier vorgestellten Experimente zeigen, wie mithilfe von Kraftspektroskopie und gezielter Mutagenese stabile Substrukturen in einem großen Protein gefunden werden konnten. Die bislang größten Proteine, deren mechanisches Verhalten untersucht wurde, sind Membranproteine. Bei diesen Proteinen wird ein Terminus an die Blattfederspitze angebunden und durch anlegen einer Kraft einzelne transmembrane Elemente vom Kraftangriffspunkt aus nacheinander aus der Membran gezogen. Diese klare Entfaltungsgeometrie macht die die strukturelle Interpretation der Kraft-Ausdehnungs-Kurven vergleichsweise einfach (Oesterhelt, Oesterhelt et al. 2000; Kedrov, Krieg et al. 2005). Im Falle von globulären Proteinen wie MBP können sich allerdings beliebige Abschnitte von beiden Termini oder sogar aus der Mitte der Proteinstruktur lösen. Die hier eingesetzte Vorgehensweise, bei der gleichmäßig über die Proteinstruktur verteilte Disulfidbrücken als strukturelle Sonden eingesetzt wurden, erlaubt es, ein komplexes, drei Entfaltungsintermediate umfassendes Entfaltungsmuster eindeutig strukturellen Elementen des Proteins zuzuordnen. Im Gegensatz zu in die Proteinsequenz eingefügten Aminosäureabschnitten bieten Cysteinmutationen den Vorteil, dass nur zwei Aminosäuren in der Struktur verändert werden müssen, was Störungen der Proteinstruktur verringert. Darüber hinaus ist zu anmerken, dass für die Platzierung der Disulfidbrücken in der Struktur keine Annahmen über die Grenzen der Intermediate nötig sind.

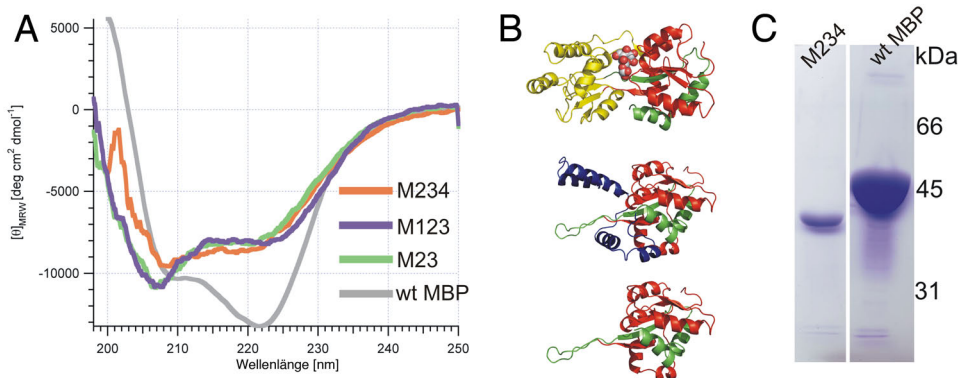


Abbildung A.5: Thermodynamische Stabilität von MBP Kürzungsmutanten.

CD-Spektren von MBP sowie Kürzungsmutanten mit Strukturmodellen (oben: M234, mitte: M123, unten: M23) (B). M234 bindet Maltose: Pull-down Experiment mit Amyloseharz und anschließende Analyse durch SDS-Gelelektrophorese.

Die Zuordnung der Unfoldons zu Abschnitten von MBP erlaubt einen Vergleich der gemessenen Stabilitäten mit der MBP Struktur. Im ersten Entfaltungsübergang (Ablösen von Unfoldon M1) werden vier C-terminale α -Helices von MBP abgelöst. Die niedrige Kraft, die hierfür nötig ist, steht im Einklang mit der niedrigen Stabilität, die für andere ausschließlich α -

helikale Strukturen ermittelt wurde (Rief, Pascual et al. 1999; Junker, Ziegler et al. 2009). Das aus dem Ablösen von M1 entstehende Intermediat M234 stellt den mechanisch stabilsten Teil der MBP-Struktur dar. Um im folgenden Übergang M2 abzulösen, ist es nötig, das zentrale β -Faltblatt der N-terminalen Domänen von MBP aufzubrechen. Dies hinterlässt M34 mit zwei ungepaarten β -Strängen, was die niedrige Lebensdauer dieses Zustands (wenige Millisekunden bei 30 pN) erklärt. M4 stellt bis dahin die weitestgehend intakte C-terminale Domäne von MBP (abzüglich zweier α -Helices von M1) dar, was erklärt, weshalb ein Abschnitt, der nur noch einem Drittel des gefalteten Proteins entspricht, immer noch einigen zehn Piconewton an Kraft widerstehen kann. Dieser komplexe Entfaltungspfad von MBP ist umso bemerkenswerter, da bei der chemischen oder thermischen Entfaltung von MBP keine stabilen Zwischenzustände detektiert werden (Chun, Strobel et al. 1993). In Übereinstimmung mit den hier vorgestellten Daten wurden auch in mechanischen Experimenten an MBP mit einer optischen Pinzette in Kombination mit Molekulardynamiksimulationen der mechanisch stabile Kern M234 von MBP gefunden – weitere Zwischenzustände konnten hingegen nicht aufgelöst werden (Bechtluft, van Leeuwen et al. 2007).

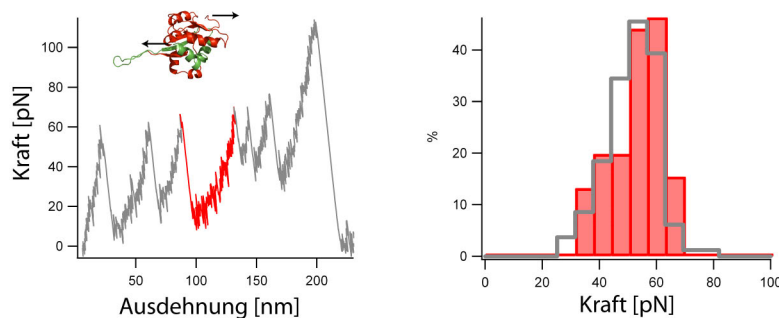


Abbildung A.6: Mechanische Stabilität von M23.

Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve (A) und Bruchkraftverteilung (B) von M23 (rot: M23, grau: Entfaltung von M234 in wildtyp MBP).

Auch wenn viele Kombinationen von Unfoldons thermodynamisch stabil waren (Abbildung A.5), so bedeutet der Ausdruck Unfoldon nicht notwendigerweise einen thermodynamisch stabilen Zustand – im Gegensatz zu Foldon, was einen wohl strukturierten, stabilen Zustand auf dem Entfaltungspfad bezeichnet (Maity, Maity et al. 2005). Wenn allerdings ein Unfoldon über eine längere Lebensdauer als die Faltungsdauer von MBP (10-15 s) verfügt (Chun, Strobel et al. 1993), ist es aller Wahrscheinlichkeit nach auch thermodynamisch stabil – dies ist beispielsweise der Fall für M2 (Tabelle A.1). Kombinationen von Unfoldons, die M2 enthielten, waren demnach auch thermodynamisch stabil. M234 war sogar weiterhin in der Lage, Maltose zu binden. C-terminale Kürzungsmutanten von MBP wurden in früheren Arbeiten

über MBP bereits beschrieben, allerdings ohne genauere strukturelle Charakterisierung (Betton und Hofnung 1994).

In der Stabilität von M23 und M234 spiegelt sich die Entstehungsgeschichte von periplasmatischen Bindeproteinen (PBPs) wie MBP wider: Es wird angenommen, dass eine Genverdopplung und –fusion der kleineren Proteine CheY oder Flavodoxin zur Bildung der PBPs geführt hat (Louie 1993; Fukami-Kobayashi, Tateno et al. 1999). Das vorgestellte Strukturmodell für M23 (Abbildung A.5 B) zeigt eine frappierende Ähnlichkeit mit diesen kleinen Vorläuferproteinen. Einigen PBPs, wie beispielsweise dem Histidin-bindenden Protein, fehlen darüber hinaus die C-terminalen Helices aus Unfoldon M1, sie ähneln damit M234 (Yao, Trakhanov et al. 1994).

Auch wenn nicht alle Kombinationen an Unfoldons von MBP stabile Strukturen ausbilden, ist es vorstellbar, dass die hier eingesetzten Methoden genutzt werden können, um stabile Fragmente eines größeren Proteins zu finden, was besonders für die Bestimmung von Kristallstrukturen großer Proteine relevant ist. Hierzu werden oft proteolytische Fragmente eingesetzt (Chang und Park 2009)¹⁴, wenn keine Domänengrenzen bekannt sind. Mechanische Methoden könnten hier helfen, stabile Abschnitte der Proteinstruktur zu identifizieren, da schon das auftreten von Zwischenzuständen in Entfaltungskurven wertvolle Hinweise auf thermodynamisch stabile Fragmente liefern kann.

¹⁴ Auch der umgekehrte Fall kann eintreten: Das durch mechanische Experimente an MBP bestimmte Unfoldon M1 wurde jüngst ebenfalls in Proteolyse-Experimenten identifiziert. (Chang and Park, 2009)

A.2 Richtungsabhängige Stabilisierung durch Ligandenbindung des Maltose-bindenden Proteins

Das Maltose-bindende Protein (MBP) bindet Maltose mit mikromolarer Affinität und ändert dabei seine Struktur von einer offenen in eine geschlossene Konformation (Sharff, Rodseth et al. 1992). Um den Einfluss von Maltose auf die mechanische Stabilität von MBP zu untersuchen, wurden Experimente, bei denen MBP analog zu Abschnitt A.1 an seinem N und C Terminus belastet wurde, in Gegenwart von 10 mM Maltose durchgeführt.

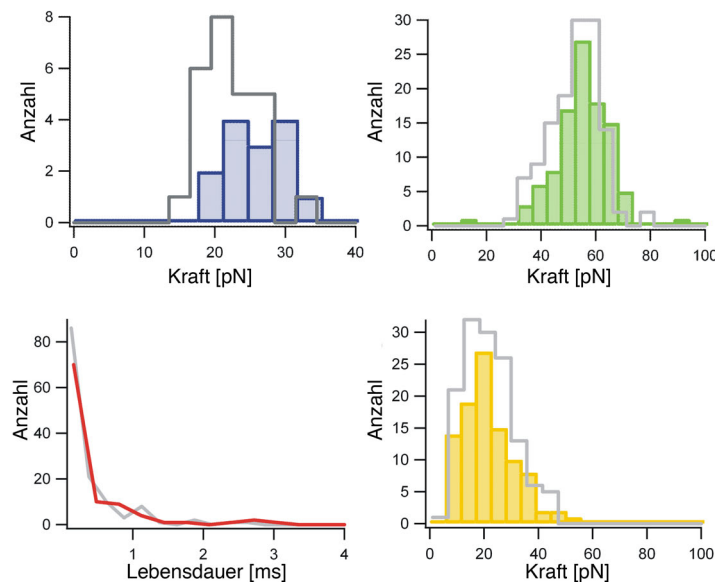


Abbildung A.7: Einfluss von Ligandenbindung auf die mechanische Stabilität von MBP
Bruchkraftverteilungen für das Ablösen der vier Unfoldons M1 (blau), M2 (grün), M3 (rot, Lebensdauer) und M4 (gelb) in Gegenwart von Maltose. Bruchkraftverteilungen ohne Maltose sind in grau dargestellt.

Bruchkraftverteilungen in Abbildung A.7 zeigen, dass keiner der vier Entfaltungsübergänge bei der mechanischen Entfaltung von MBP durch die Zugabe des Liganden Maltose stabilisiert wird. Auf den ersten Blick scheint dies überraschend, da Maltose einen großen Einfluss auf die Stabilität hat, wenn MBP chemisch oder thermisch entfaltet wird (Novokhatny und Ingham 1997). Hierbei ist allerdings zu beachten, dass mechanische Entfaltungsexperimente keine Gleichgewichtsexperimente sind, und die Entfaltungskräfte daher statt von der globalen Stabilität des Proteins von lokale Wechselwirkungen dominiert werden (Marszalek, Lu et al. 1999). Da die Interaktion mit Maltose fernab der Bereiche des Proteins liegt, die die angelegte Kraft spüren, ist kein Einfluss auf die Stabilität zu erwarten. Die strukturelle Interpretation des Entfaltungspfades von MBP deckt sich mit dieser Sichtweise (vgl. Abbildung A.4): Die ersten beiden Unfoldons, M1 und M2, besitzen nur wenige Wechselwirkungen mit dem Li-

ganden Maltose, was einen stabilisierenden Effekt unwahrscheinlich macht. Die verbleibende Struktur M34 hat nur eine Lebensdauer von einigen Millisekunden, während M4 nur noch einem kleinen Teil der gefalteten Struktur entspricht und somit wahrscheinlich keinen Liganden mehr binden kann. Wenn MBP also an seinen Termini belastet wird, werden nacheinander Abschnitte von der Proteinstruktur abgelöst, für die die Ligandenbindung keinen stabilisierenden Effekt hat.

Im Gegensatz zu chemischen Denaturierungsmitteln wirkt Kraft nicht global, sondern gerichtet auf eine Proteinstruktur ein. Im folgenden Abschnitt soll gezeigt werden, wie durch gezieltes Anlegen einer Kraft an die zwei Domänen von MBP die Ligandenbindungsstelle mechanisch belastet werden kann, wodurch Maltose die Entfaltungskraft von MBP erhöht.

A.2.1 Ergebnisse

Wie eine Proteinstruktur in nahezu jeder beliebigen Raumrichtung im Kraftmikroskop mit Kraft belastet werden kann, wurde unlängst am Beispiel des grün-fluoreszierenden Proteins demonstriert (Dietz, Berkemeier et al. 2006; Dietz und Rief 2006). Hierzu werden zwei Aminosäuren auf der Oberfläche des Proteins durch die Aminosäure Cystein ersetzt, wodurch sich nach Inkubation unter geeigneten Bedingungen lange polymere Ketten auf vielen Untereinheiten des Proteins bilden, die durch Disulfidbrücken zwischen den beiden Cysteinen auf der Oberfläche verbunden sind (Abbildung A.8).

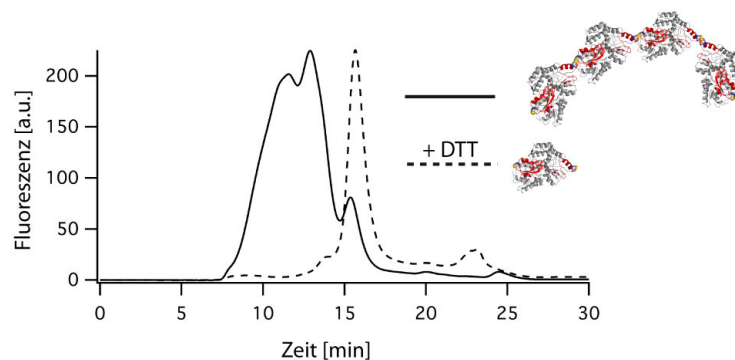


Abbildung A.8: Disulfidbrücken-verknüpfte Polymere von MBP.

Analytische Größenausschlusschromatographie von MBP(53-141) Polymeren (durchgezogene Linie). Das Reduktionsmittels DTT (gestrichelte Linie) löst die langen Polymere auf.

Die Position der beiden Cysteine gibt damit die Richtung vor, in der die Proteinstruktur belastet wird. Um die Ligandenbindungsstelle von MBP mit Kraft zu belasten, wurden Aminosäu-

ren 53 und 141 zu Cysteinen mutiert. Dadurch wirkt die angelegte Kraft entgegen der Bewegung, die MBP vollführt, wenn es von der offenen in die geschlossene Konformation übergeht. (Abbildung A.9 A oben). Eine Größenverteilung eines typischen Polymers ist in Abbildung A.8 dargestellt. Hierzu wurde MBP(53-141) nach einigen Monaten Polymerisationszeit mittels Größenausschlusschromatographie seiner Größe nach aufgetrennt, wobei längere Ketten früher von der Trennsäule eluieren als kürzere. Man erkennt, dass im Vergleich zu monomerem MBP, welches in einem einzigen scharfen Peak eluiert (Abbildung A.8 gestrichelte Linie), eine breite Verteilung langer Ketten in polymerem MBP(53-141) vorliegt (Abbildung A.8 durchgezogene Linie). Die Polymerisation über Disulfidbrücken war durch Zugabe von DTT, einem Reduktionsmittel, das Disulfidbrücken bricht, umkehrbar, es trat keine Aggregation von MBP unter den verwendeten Polymerisationsbedingungen auf (Abbildung A.8 gestrichelte Linie).

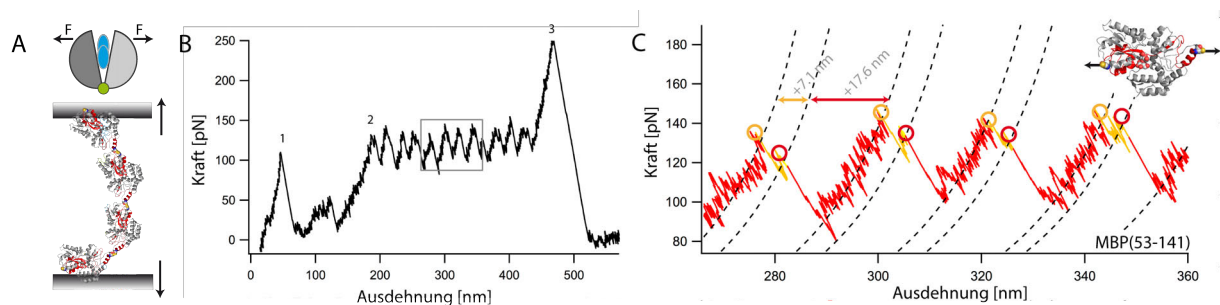


Abbildung A.9: Entfaltung von MBP entlang der Richtung 53-141.

(A) Schema des Experiments: MBP wird an seinen beiden Domänen belastet, indem eine disulfidbrücken-verknüpfte Kette im AFM gestreckt wird. (B) Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve von MBP(53-141). (C) Vergrößerung der Kraft-Ausdehnungs-Kurve aus (B). Ein Entfaltungsintermediat (roter Kreis) wird sichtbar.

Wird MBP(53-141) im Kraftmikroskop mit Kraft belastet, so treten typische Kraft-Ausdehnungs-Kurven wie in Abbildung A.9 B dargestellt auf. Hierbei tritt nach unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Blattfederspitze und Oberfläche (1 in Abbildung A.9 B) ein charakteristisches sägezahnartiges Muster, auf, das vom Entfalten der sich wiederholenden MBP(53-141) Untereinheiten des Polymers herrührt (2); bei 3 reißt die Polypeptidkette von der Blattfederspitze oder der Oberfläche ab. Bei näherer Betrachtung des regelmäßigen Entfaltungsmusters (Abbildung A.9 C) wird deutlich, dass die Entfaltung von MBP(53-141) nicht in einem Schritt abläuft, sondern nach dem deutlichen ersten Entfaltungszacken (orange Kreis, Abbildung A.9 C, Konturlängenzuwachs $7,5 \pm 0,2$ nm) ein zusätzliches Entfaltungsergebnis (roter Kreis, Abbildung A.9 C, $17,5 \pm 0,2$ nm) sichtbar wird. Dieses zweite Entfal-

tungsereignis deutet darauf hin, dass beim Entfalten von MBP bei Belastung an Aminosäuren 53 und 141 ein mechanisch stabiles Intermediat durchlaufen wird.

Der Konturlängenzuwachs bis zum Entfaltungsintermediat von $\sim 7,5$ nm bedeutet, dass im ersten Entfaltungsschritt von MBP(53-141) etwa 25 Aminosäuren von der gefalteten Struktur abgelöst werden. Allerdings ist es anhand der Struktur von MBP nicht sofort offensichtlich, ob diese ~ 25 Aminosäuren vom N- (53) oder C-terminalen (141) Kraftangriffspunkt abgelöst werden. In Abschnitt A.1 wurden Disulfidbrücken als lokale Sonden in der Proteinstruktur vorgestellt, um durch eine Verkürzung des Konturlängenzuwachses Entfaltungsereignisse entsprechenden Abschnitten der Proteinstruktur zuzuordnen. Da in MBP(53-141) insgesamt nur 88 Aminosäuren entfaltet werden, ist es schwierig, innerhalb dieses kurzen Abschnitts des Proteins zwei geeignete Aminosäuren für Disulfidbrücken zu finden. Statt dessen wurden nach Aminosäure 74 achtmal die Aminosäure Glyzin in die Proteinsequenz eingefügt (Carrion-Vazquez, Marszalek et al. 1999), um den Konturlängenzuwachs eines der beiden Entfaltungsübergänge zu verlängern (MBP(53-141)S74G₈).

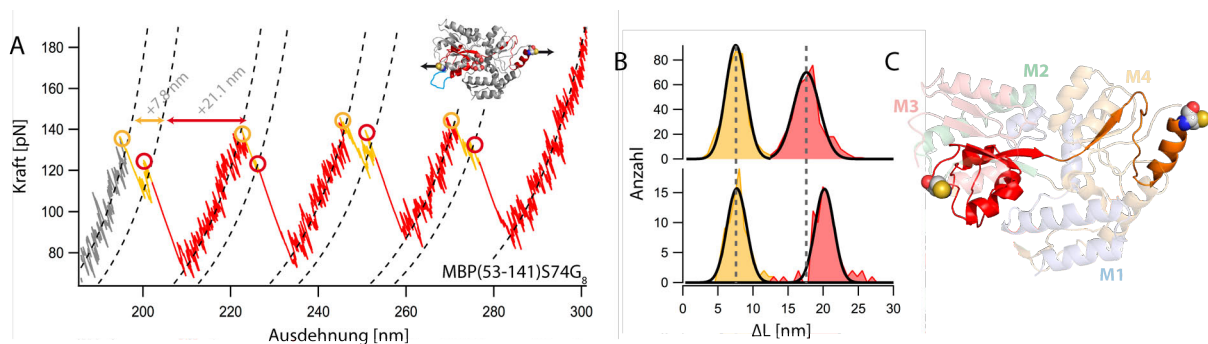


Abbildung A.10: Charakterisierung des Entfaltungsintermediats von MBP(53-141).

Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve von MBP(53-141)S74G₈ (A) und Konturlängenzuwachsverteilungen von MBP(53-141) (oben) sowie MBP(53-141)S74G₈ (unten) (B). Lage des Entfaltungsintermediats von MBP(53-141) (rot) in der MBP Struktur (blasse Farben: Unfoldons M1-M4, vgl. Abbildung A.4)

Eine typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve von MBP(53-141)S74G₈ ist in Abbildung A.10 A dargestellt. Eine Analyse der Längenzuwächse (Abbildung A.10 B) zeigt, dass der Konturlängenzuwachs für das zweite Entfaltungsereignis (rote Verteilung) durch die zusätzlichen acht Aminosäuren erhöht wird, während er beim ersten Entfaltungsereignis unverändert bleibt. Da die zusätzlichen Aminosäuren nahe dem N-terminalen Kraftangriffspunkt eingefügt wurden, bedeutet dieses Ergebnis, dass die Entfaltung von MBP(53-141) vom C-terminalen Kraftangriffspunkt beginnt (Aminosäuren 114-141), und dass das Intermediat die Reste 53-113 um-

fasst¹⁵. In Abbildung A.10 sind diese Abschnitte in der Struktur von MBP dargestellt. Hierbei ist bemerkenswert, dass die Grenze des Entfaltungsintermediats von MBP(53-141) mit der Grenze der beiden in Abschnitt A.1.1 beschriebenen Unfoldons M3 (hellrot in Abbildung A.10 C) und M4 (hellgelb) zusammenfällt.

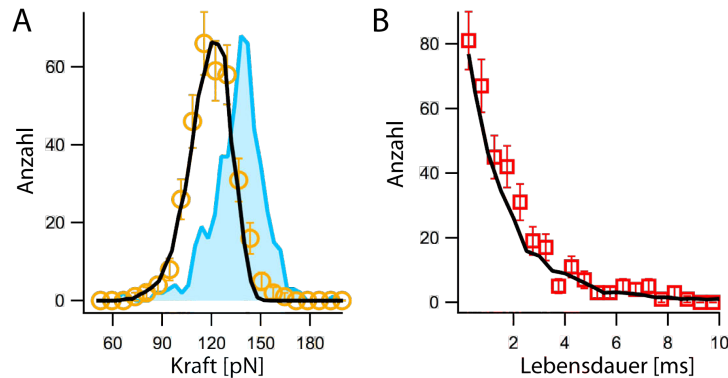


Abbildung A.11: Erhöhte mechanische Stabilität durch Ligandenbindung für MBP(53-141).

(A) Bruchkraftverteilung des ersten Entfaltungsereignis von MBP(53-141) ohne (gelb) und mit Maltose (blau). (B) Lebensdauerverteilung der Entfaltung des Intermediats. Schwarze durchgezogene Linien stellen die Ergebnisse einer Monte-Carlo Simulation mit $k_{\text{off}} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ und $\Delta x = 0,5 \text{ nm}$ (A) und $k_{\text{off}} = 0,6 \text{ s}^{-1}$ und $\Delta x = 0,25 \text{ nm}$ (B) dar.

Im Vergleich zu MBP bei N-C-terminaler Belastung ist MBP(53-141) mechanisch deutlich stabiler (vgl. Abbildung A.2). Eine Bruchkraftverteilung des ersten Entfaltungsereignis ist in Abbildung A.11 A dargestellt (gelbe Verteilung). Wird die Stabilität von MBP(53-141) in der Gegenwart von 10 mM Maltose bestimmt, so erhöht sich die mittlere Bruchkraft von $120 \pm 2 \text{ pN}$ auf $135 \pm 2 \text{ pN}$ (blaue Verteilung). Durch Monte-Carlo-Simulationen lässt sich abschätzen, dass sich die Entfaltungsrate von MBP(53-141) um einen Faktor 10 verringert, wenn Maltose gebunden wird (schwarze Linie Abbildung A.11 A), während der Zwischenzustand in seiner Stabilität unverändert bleibt.

Bindet MBP einen Liganden, rotieren die beiden Domänen beim Übergang von der offenen apo in die geschlossene holo Konformation um etwa 35° aufeinander zu, wobei sich ihr Abstand um etwa 1 nm ändert (Sharff, Rodseth et al. 1992). Ausgehend von den Kristallstrukturen von apo-MBP (pdb: 1OMP) und holo-MBP (1ANF) lässt sich abschätzen, dass sich der

¹⁵ Hierbei ist es zunächst denkbar, dass die Entfaltung statt von einem der Kraftangriffspunkte von einem Punkt im Zentrum der Polypeptidkette ausgeht. Dies würde allerdings zwei weitere Entfaltungsereignisse nach sich ziehen, die die Entfaltung der zwei verbliebenen strukturierten Bereiche an den Kraftangriffspunkten repräsentieren. In den Entfaltungsdaten wird hingegen nur ein Intermediat beobachtet.

Abstand der beiden Kraftangriffspunkte (Aminosäuren 53 und 141) um 0,7 nm verringert, wenn Maltose gebunden wird (Spurlino, Lu et al. 1991). Das Protein wird dabei kompakter, und der Konturlängenzuwachs nach der Entfaltung erhöht sich um diesen Wert, da die Anzahl der Aminosäuren, die entfaltet wird, natürlich dieselbe bleibt. Eine ausreichend hohe Zahl an Einzelmolekülmessungen vorausgesetzt liegt diese Längenänderung prinzipiell im Auflösungsvermögen der Kraftspektroskopie (Dietz und Rief 2006). In Abbildung A.12 A sind Konturlängenzuwachsvverteilungen für MBP in der offenen apo-Form ohne Ligand (gelb) und MBP in der geschlossenen holo-Form (mit 10 mM Maltose) dargestellt¹⁶. Der mittlere Konturlängenzuwachs von $24,8 \pm 0,2$ nm für apo-MBP (offen) und $24,9 \pm 0,2$ nm für holo-MBP (Maltose, geschlossen) ist beinahe identisch.

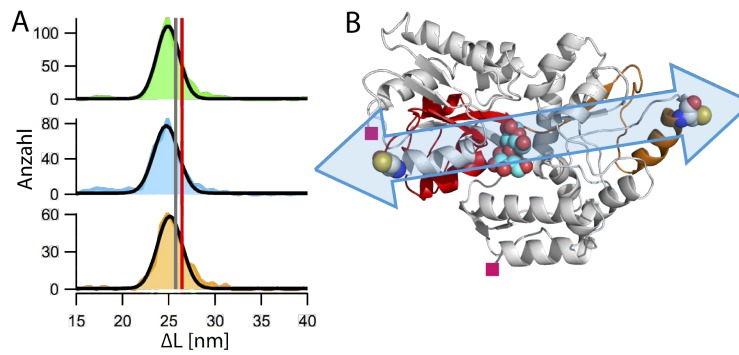


Abbildung A.12: Messen der Konformationsänderung von MBP.

(A) Konturlängenzuwachsvverteilungen von apo-MBP(53-141) (gelb), holo-MBP(53-141) mit Maltose (blau) und holo-MBP(53-141) mit β -Cyclodextrin (grün) und angepassten Gauss'schen Normalverteilungen (schwarz). Die vertikale graue Linie entspricht dem erwarteten Konturlängenzuwachs für apo-MBP, die vertikale rote Linie dem für holo-MBP. (B) Bei Belastung von MBP an Aminosäuren 53 und 141 wird die Ligandenbindungstasche direkt belastet (blauer Pfeil).

Zur Kontrolle wurden Messungen mit dem Liganden β -Cyclodextrin durchgeführt, welcher an die offene Konformation von MBP bindet (Abbildung A.12 A grün). Auch für diesen Liganden stimmt der Konturlängenzuwachs ($24,8 \pm 0,1$ nm, mittlere Entfaltungskraft 130 ± 2 pN) mit den Werten für die offene apo- und die geschlossene holo-Form überein. Zudem liegen alle drei Konturlängenzuwächse (offen apo, offen holo und geschlossen holo) unter den erwarteten Werten für sowohl offenes apo-MBP (graue vertikale Linie in Abbildung A.12 A) und geschlossenes holo-MBP (rote vertikale Linie). Offenbar lässt sich die Bindungstasche von MBP durch Anlegen einer Kraft an Aminosäuren 53 und 141 öffnen.

¹⁶ Hierzu wurde der gesamte Konturlängenzuwachs für eine MBP-Einheit bestimmt.

Neben hydrophoben Wechselwirkungen mit größtenteils aromatischen Aminosäuren, die die Ligandenbindungstasche von MBP auskleiden, sind vor allem Wasserstoffbrücken für Ligan­denbindung und Konformationsänderung des Proteins verantwortlich. Falls die erhöhte me­chanische Stabilität von MBP(53-141) in Gegenwart von Maltose tatsächlich ausschließlich auf lokalen Wechselwirkungen beruht, sollte das Entfernen einiger dieser Wechselwirkungen nahe den Kraftangriffspunkten ausreichen, um die Stabilisierung durch Ligan­denbindung aufzuheben. Einige dieser Interaktionen sind in Abbildung A.13 A dargestellt.

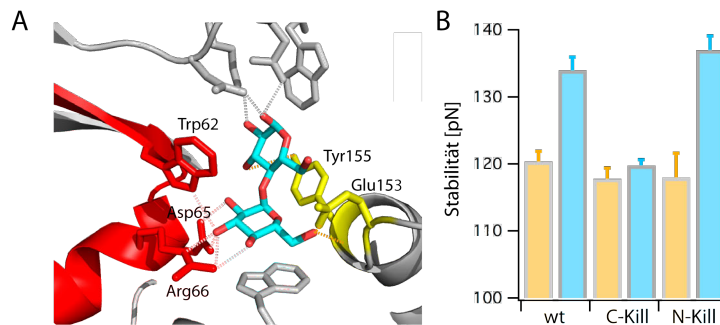


Abbildung A.13: Die Stabilisierung von MBP(53-141) durch Maltose ist ein lokaler Effekt.

(A) Ligandenbindungstasche von MBP mit wichtigen stabilisierenden Interaktionen mit dem Liganden Maltose (hellblau). (B) Stabilität von wildtyp MBP(53-141) sowie zweier Varianten mit Mutationen in der Ligandenbindungstasche (MBP(53-141) C-Kill (E153A / Y155A) / MBP(53-141) N-Kill (W62A / D65A / R66A) mit (blau) und ohne (gelb) Maltose.

Nahe dem N-terminalen Kraftangriffspunkt bilden die Aminosäuren Trp62, Asp65 und Arg66 (rot in Abbildung A.13 A) mit ihren Seitenketten Wasserstoffbrücken zu Maltose aus, diese Interaktionen wurden in der Mutante MBP(53-141) N-Kill durch Mutationen dieser Aminosäuren zu Alanin unterbrochen. Die Aminosäuren Glu153 und Tyr155, die mit dem C-terminalen Kraftangriffspunkt durch einen kurzen Polypeptidlinker verbunden sind, bilden mit ihren Seitenketten ebenfalls Wasserstoffbrücken zu Maltose aus. Darüber hinaus liegen Tyr155 und die erste Glycosyleinheit von Maltose in einer Ebene, wodurch die aromatische Seitengruppe von Tyr155 mit dem Pyranosering der ersten Glycosyleinheit von Maltose durch hydrophobes *stacking* wechselwirken kann. Diese Interaktionen wurden in der Mutante MBP(53-141) C-Kill unterbunden. Ein Vergleich der Entfaltungskräfte der beiden Mutanten mit und ohne Maltose (Abbildung A.13 B) zeigt, dass MBP(53-141) N-Kill im selben Ausmaß wie wildtyp MBP(53-141) durch Maltose stabilisiert wurde, während für MBP(53-141) C-Kill keine erhöhte mechanische Stabilität in der Gegenwart von Maltose mehr feststellbar war. Dies steht im Einklang mit dem strukturellen Bild der Entfaltung von MBP(53-141): Das

Protein entfaltet vom C-terminalen Kraftangriffspunkt ausgehend. Das Entfernen von Interaktionen mit Maltose in seiner Nähe hebt die Stabilisierung durch Maltose auf. Das Intermediat wird von der N-terminalen Domäne gebildet, Mutationen in diesem Abschnitt des Proteins haben keinen Einfluss auf den ersten Entfaltungsübergang.

A.2.2 Diskussion

Experimente zum Einfluss von Ligandenbindung auf die mechanische Stabilität von Proteinen haben in der Vergangenheit widersprüchliche Ergebnisse geliefert: Für Dihydrofolatreductase aus Maus (Junker, Hell et al. 2005) und das kleine Protein Im9 (Hann, Kirkpatrick et al. 2007) konnte nur eine geringe Stabilisierung festgestellt werden, während die Bindung von Na^+ -Ionen an einen Na^+ -Antiporter (Kedrov, Krieg et al. 2005) oder die Bindung eines F_c -Fragments an Protein G (Cao, Balamurali et al. 2007) zu einer starken Stabilisierung des Proteins führten. Die Bindung von ATP an die Kinasedomäne aus Titin führte zu einem zusätzlichen Entfaltungsintermediat (Puchner, Alexandrovich et al. 2008), und jüngst konnte durch mechanische Experimente unter Gleichgewichtsbedingungen die Interaktion und Stabilisierung von Calmodulin mit Calcium und mehreren Zielpeptiden direkt beobachtet werden (Junker und Rief 2009; Junker, Ziegler et al. 2009). Die vorgestellten Arbeiten beschränkten sich allerdings darauf, das Protein an N und C Terminus zu belasten. In den hier vorgestellten Experimenten wurde gezeigt, dass durchaus eine mechanische Stabilisierung durch einen kleinen Liganden in einem großen Protein beobachtet werden kann, wenn die Kraft direkt an die Ligandenbindungstasche angelegt wird (Abbildung A.11 A). Ein in gewisser Weise komplementärer Ansatz wurde von Cao et al. vorgeschlagen: Anstatt wie im Fall von MBP die Richtung der Kraft zu ändern, um die Ligandenbindungstasche zu belasten, wurden Ligandenbindungsstellen (in diesem Fall zwei Histidine, die ein Nickelion binden können) nahe den Positionen des Proteins eingefügt, die mit Kraft belastet werden (Cao, Yoo et al. 2008).

In Abschnitt A.1 wurden vier Unfoldons M1-M4 als Bausteine der MBP-Struktur identifiziert. Auch wenn MBP in den vorgestellten Experimenten in Abschnitt A.2 entlang einer anderen Richtung mit Kraft belastet wurde, fällt die Grenze des Entfaltungsintermediates von MBP(53-141) mit der C-terminalen Grenze von Unfoldon M3 zusammen. Das Entfaltungsintermediat von MBP(53-141) wird demnach von der N-terminalen Domäne (Unfoldons M2+M3) gebildet. Im ersten Entfaltungsschritt wird ein großer Teil der C-terminalen Domäne (Unfoldon M4) entfaltet und damit die Maltosebindungstasche zerstört. Dadurch kann das

Intermediat keine Maltose mehr binden, weswegen die Stabilität von Ligandenbindung nicht beeinflusst wird. Experimente, in denen in der N- und C-terminalen Domäne Aminosäuren, die mit dem Liganden Maltose interagieren, bestätigen diese Interpretation des Entfaltungsvorgangs, da nur Mutationen nahe dem C-terminalen Kraftangriffspunkt die Stabilisierung durch Maltose aufheben konnten (Abbildung A.13 B). Dass das Entfernen einiger weniger Wasserstoffbrücken ausreicht, um die Ligandenstabilisierung durch Maltose aufzuheben, spricht auch dafür, dass im Falle von MBP die mechanische Stabilität tatsächlich nur von lokal begrenzten Wechselwirkungen abhängt.

Wenn MBP einen Liganden wie Maltose bindet, bewegen sich die beiden Domänen des Proteins aufeinander zu und die Ligandenbindungstasche wird geschlossen. Die Scharnierregion zwischen den beiden Domänen kann hierbei als eine Feder aufgefasst werden, die gedehnt werden muss, um das Protein von der offenen in die geschlossene Konformation zu überführen (Marvin und Hellinga 2001; Millet, Hudson et al. 2003). Die Flexibilität des Scharniers zwischen den Domänen wird auch dadurch deutlich, dass MBP eine große Bandbreite an Liganden binden kann, die nicht alle zum Übergang in die geschlossene Konformation führen (Sharff, Rodseth et al. 1993). Ligandenbindung und Konformationsänderung sind demnach nur schwach aneinander gekoppelt.

Das Messen von Konturlängenzuwächsen erlaubt die Bestimmung des Abstands zwischen zwei Punkten in einer Proteinstruktur (Dietz und Rief 2006). Überraschenderweise war für offenes apo-MBP (ohne Ligand), geschlossenes holo-MBP (mit Maltose) und offenes holo-MBP (mit β -Cyclodextrin) der Abstand zwischen den beiden Kraftangriffspunkten nahezu derselbe¹⁷. Offensichtlich kann MBP durch Belastung an Aminosäuren 53 und 141 in die offene Konformation gezwungen werden, egal ob ein Ligand gebunden wurde oder nicht. Die gemessenen Abstände deuten sogar auf eine Konformation hin, in der die Ligandenbindungstasche stärker als in der Kristallstruktur der apo-Form geöffnet ist, allerdings kann diese Diskrepanz auch von anderen flexiblen Elementen in der MBP-Struktur herrühren.

Das mechanische Verhalten von MBP(53-141) stellt sich nach den oben diskutierten Ergebnissen demnach wie folgt da: Bei einer Kraft, die an die Aminosäuren 53 und 141 angelegt wird, öffnet sich zunächst die Ligandenbindungstasche des Proteins, allerdings bleibt Maltose an die Proteinstruktur gebunden. Aus dieser offenen holo-Konformation entfaltet im nächsten

¹⁷ Die hohe Anzahl an Messpunkten erlaubt eine Auflösung bis zu 0,2 nm, was deutlich unter der erwarteten Änderung von 0,7 nm liegt.

Schritt ein Teil der C-terminalen Domäne; dieser Übergang wird durch Maltose stabilisiert.
Zuletzt entfaltet die N-terminale Domäne, hierauf hat der Ligand keinen Einfluss.

A.3 Mechanische Kontrolle des Entfaltungspfad des grün-fluoreszierenden Proteins

Das grün-fluoreszierende Protein (GFP) ist ein 230 Aminosäuren großes Protein aus der Quale *Aequorea victoria*, das bei Anregung mit ultraviolettem oder blauem Licht grün fluoresziert. Das Fluorophor von GFP bildet sich autokatalytisch aus drei Aminosäuren (Serin, Tyrosin und Glyzin) der GFP-Struktur, hierzu sind keine weiteren zellulären Faktoren nötig. Diese Eigenschaft hat GFP zu einem wertvollen Werkzeug in der Zellbiologie gemacht, das es erlaubt, Vorgänge innerhalb von lebenden Zellen zu beobachten (Hsu, Blaser et al. 2009). Mechanische Experimente an GFP haben ergeben, dass bei Belastung des Proteins an seinem N und C Terminus eine Reihe von Intermediaten durchlaufen wird, bevor das Protein vollständig entfaltet. Zunächst wird eine N-terminale α -Helix entfaltet, danach spaltet sich der Entfaltungspfad und es werden entweder N- oder C-terminale β -Stränge von der gefalteten Struktur abgelöst, woraufhin das Molekül komplett entfaltet (Dietz und Rief 2004; Mickler, Dima et al. 2007). Auch wenn GFP chemisch entfaltet wird, treten Entfaltungsintermediate auf. Allerdings unterscheiden sich diese Intermediate strukturell deutlich von den Zwischenzuständen, die bei mechanischer Belastung an N und C Terminus auftreten, da in ihnen nicht nur einzelne β -Stränge der GFP Struktur fehlen, sondern durch Entfernen von Strängen 7-9 die fassartige GFP-Struktur teilweise geöffnet wird (Huang, Craggs et al. 2007). Auf den ersten Blick scheint dies wenig verwunderlich, da angenommen werden kann, dass die beteiligten Entfaltungs- und Rückfaltungspfade sehr verschieden sind.

Unlängst wurden durch Disulfidbrücken verknüpfte Polymere von GFP genutzt, um die mechanische Stabilität von GFP in verschiedenen Raumrichtungen zu messen. Während die meisten der untersuchten Belastungsgeometrien zu einem Entfalten von GFP in einem Alles-oder-Nichts Vorgang führten, trat bei Belastung an Aminosäuren 3 und 212 ein Entfaltungsintermediat auf (Dietz, Berkemeier et al. 2006), dessen Struktur bislang allerdings unbekannt ist. Im folgenden Abschnitt sollen Experimente vorgestellt werden, mit denen dieses Entfaltungsintermediat strukturell charakterisiert werden konnte. Darüber hinaus wird ein Modell vorgestellt, mit dem das Auftreten unterschiedlicher Entfaltungspfade mit unterschiedlichen Intermediaten in verschiedenen Belastungsrichtungen erklärt werden kann.

A.3.1 Ergebnisse

Wenn GFP an den Aminosäuren 3 und 212 mit Kraft belastet wird (GFP(3-212)), treten charakteristische sägezahnartige Kraft-Ausdehnungs-Kurven auf, in denen das gleichmäßige Muster aus ~ 70 nm voneinander entfernten Entfaltungszacken (grüne Kreise in Abbildung A.14) von weiteren Entfaltungsereignissen unterbrochen wird (blaue Kreise in Abbildung A.14). Diese zusätzlichen Ereignisse stellen die Entfaltung eines Intermediats dar. In manchen Fällen allerdings erfolgt die Entfaltung von GFP(3-212), ohne dass ein Zwischenzustand durchlaufen wird (rote Kreise in Abbildung A.14). Dieses Verhalten wurde als Verzweigung des Entfaltungspfades von GFP(3-212) gedeutet (Dietz, Berkemeier et al. 2006).

Um das Entfaltungsintermediat von GFP(3-212) strukturell zu charakterisieren, wurden Disulfidbrücken und Glyzin-Repeats als lokale Sonden in der GFP-Struktur eingesetzt. Beide Sonden bewirken eine Veränderung des Konturlängenzuwachs nach einem Bruchereignis: Disulfidbrücken verkürzen die gestreckte Polypeptidkette um die Zahl an Aminosäuren zwischen den Cysteinresten (vgl. Abschnitt A.1), während Glyzin-Repeats das entfaltete Molekül verlängern (vgl. Abschnitt A.2).

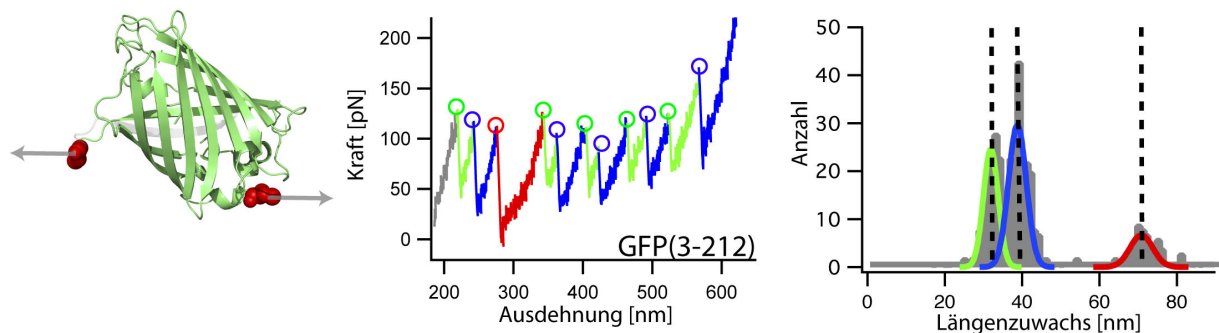


Abbildung A.14: Entfaltung von GFP(3-212).

Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve von GFP bei Belastung an Aminosäuren 3 und 212 sowie eine Verteilung der Konturlängenzuwächse nach der Entfaltung.

Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurven von drei GFP Mutanten sind in Abbildung A.15 dargestellt. In allen drei Mutanten konnten beide Entfaltungspfade - mit Intermediat (grün) und ohne Intermediat (rot) - weiterhin beobachtet werden. Längenzuwachsvverteilungen nach den Bruchereignissen sind im rechten Teil von Abbildung A.15 dargestellt, hierbei ist der Längenzuwachs nach dem initialen Entfaltungsereignis in grün, der Längenzuwachs nach Entfaltung des Intermediats in blau und der Konturlängenzuwachs bei Entfaltung ohne Intermediat in rot dargestellt. Mittelwerte der Längenzuwächse von GFP(3-212) sind durch eine gestrichelte Linie markiert. Eine Disulfidbrücke, die sich in dem Teil des Proteins befindet, der bei

Bildung des Intermediats entfaltet wird, wird die grünen Verteilungen zu kleineren Konturlängenzuwachsen verschieben; dies ist für die Disulfidbrücke zwischen Aminosäuren 154 und 195 (GFP(3-212) 154x195) der Fall (Abbildung A.15 mitte)¹⁸.

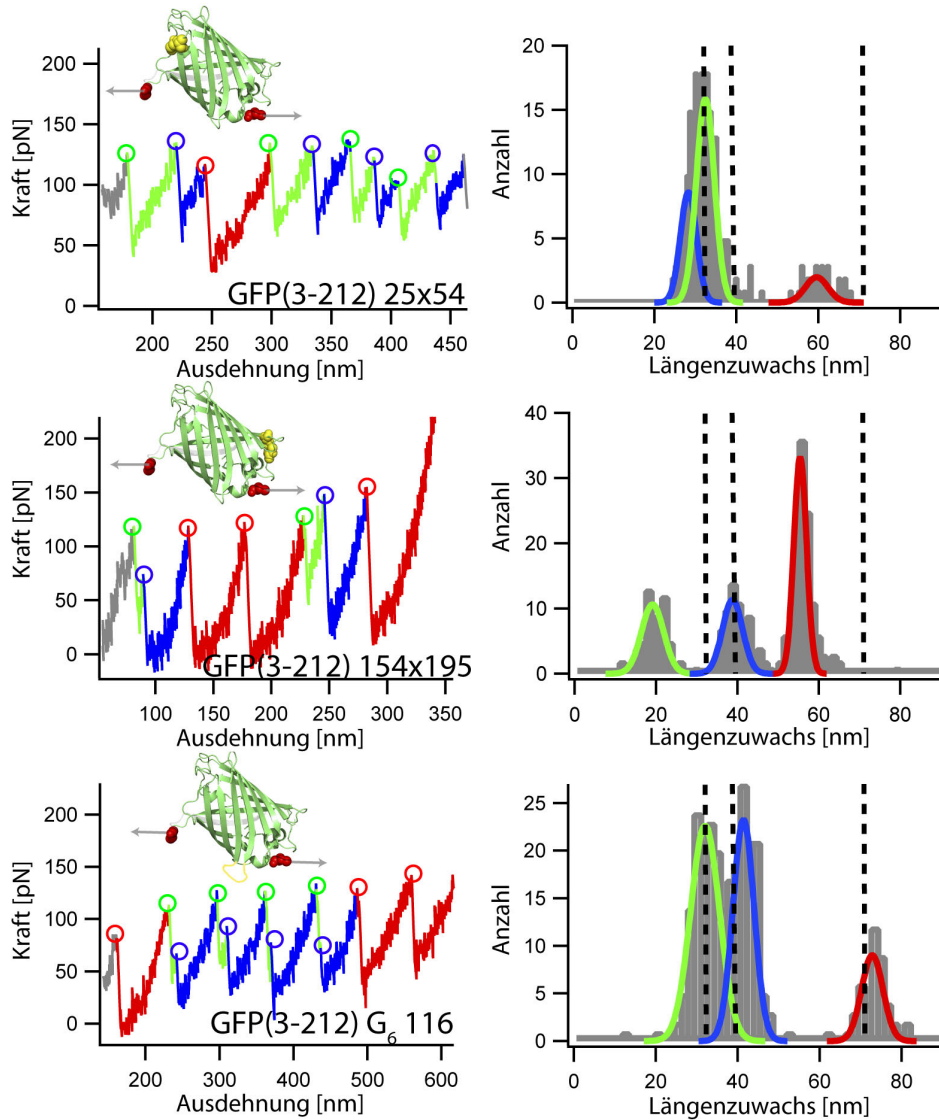


Abbildung A.15: Entfaltung von GFP(3-212) Mutanten.

Kraft-Ausdehnungs-Kurven (links) und zugehörige Konturlängenzuwachsverteilungen (rechts) für GFP(3-212) 25x54 (oben), GFP(3-212) 154x195 (mitte) und GFP(3-212) G₆116 (unten).

Die Disulfidbrücke zwischen Aminosäuren 25 und 54 hingegen verkürzt den Konturlängenzuwachs nach der Entfaltung des Intermediats (Abbildung A.15 oben). Damit ist festzuhalten,

¹⁸ Der Entfaltungspfad ohne Intermediat (rote Verteilung in Abbildung A.14) wird selbstverständlich durch beide Disulfidmutanten verkürzt sowie durch die zusätzlichen Glyzinreste verlängert.

dass GFP(3-212) vom C Terminus her entfaltet und das Intermediat von N-terminalen Aminosäuren gebildet wird.

Disulfidbrücken als strukturelle Sonden liefern nur ein grobes Bild der Struktur des Intermediats. In die Proteinstruktur eingefügte Glyzinreste hingegen erlauben eine feinere Strukturauflösung bis hinab zu einzelnen Sekundärstrukturelementen. In der Mutante GFP(3-212) G₆116 sind sechs Glyzinreste an das N-terminale Ende von β -Strang 6 eingefügt, woraufhin sich der Konturlängenzuwachs nach der Entfaltung des Intermediats verlängert (Abbildung A.15 unten). Das weist darauf hin, dass β -Strang 6 im Intermediat noch Teil der gefalteten Struktur ist; das Intermediat besteht damit aus β -Strängen 1-6 (Aminosäuren 1-128).

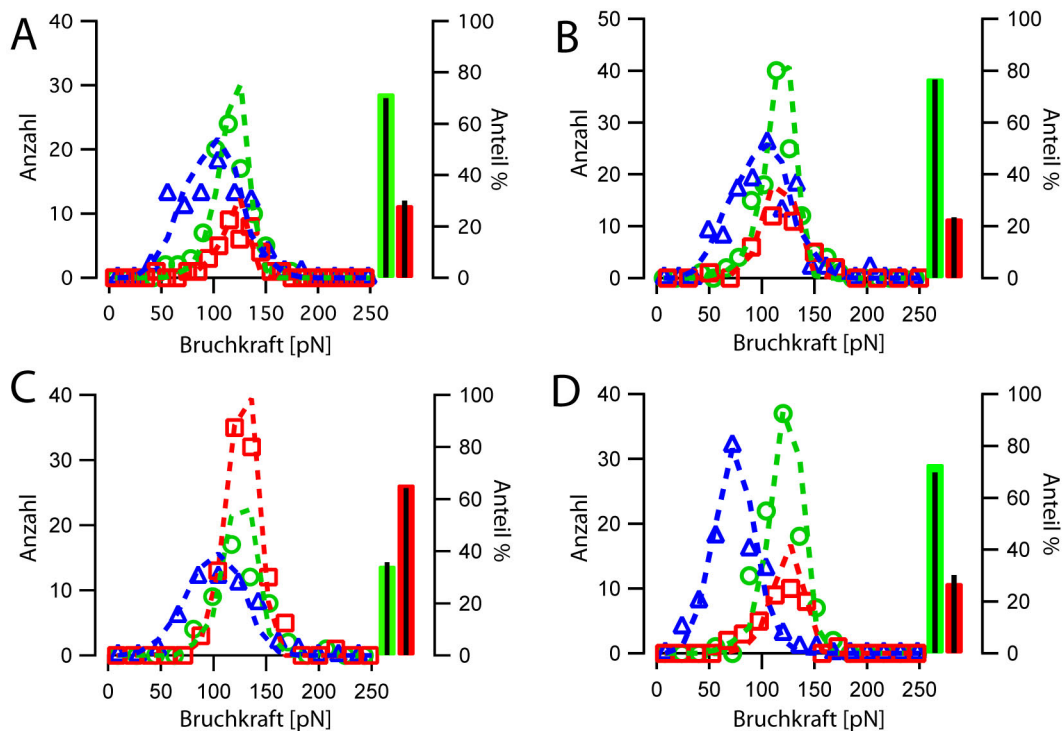


Abbildung A.16: Bruchkraftverteilungen von GFP(3-212) und Mutanten.

Bruchkraftverteilung von wildtyp GFP(3-212) (A), GFP(3-212) 25x54 (B), GFP(3-212) 154-195 (C) und GFP(3-212) G₆116 (D) für die drei Entfaltungsereignisse (grün: Entfaltung bis zum Intermediat, blau: Entfaltung des Intermediats, rot: Entfaltung ohne Intermediat). Die gestrichelten Linien stellen Ergebnisse einer Monte-Carlo Simulation dar. Auf der rechten Achse ist die Populationswahrscheinlichkeit der beiden Entfaltungspfade (grün: mit Intermediat, rot: Zwei-Zustands-Entfaltung) dargestellt.

Auf dem Entfaltungspfad ohne Intermediate von GFP(3-212) bewirken strukturelle Sonden eine triviale Veränderung des Konturlängenzuwachses. Allerdings können Mutationen Teile einer Proteinstruktur auch stabilisieren oder die mechanische Stabilität herabsetzen. In Abbildung A.16 sind Bruchkraftverteilungen für GFP(3-212) und die drei Mutanten darge-

stellt. Während die mechanische Stabilität von GFP(3-212) 25x54 sich nicht vom wildtyp Protein unterschied, war in GFP(3-212) G₆₁₁₆ die Stabilität des Zwischenzustands (Abbildung A.16 D blaue Verteilung) herabgesetzt. Da sich die eingefügten sechs Aminosäuren in dem Abschnitt des Proteins befinden, der das Intermediat von GFP(3-212) bildet, deckt sich dieses Ergebnis mit der strukturellen Interpretation des Entfaltungspfades. GFP(3-212) 154x195 hingegen zeigt ein deutlich anderes Entfungsverhalten als wildtyp GFP(3-212): Während in GFP(3-212) der Entfaltungspfad mit Intermediat etwa dreimal wahrscheinlicher ist als der Zwei-Zustands-Pfad, ist dieses Verhältnis in GFP(3-212) 154x195 umgekehrt (die Wahrscheinlichkeit der beiden Entfaltungspfade ist an der rechten Achse der Verteilungen in Abbildung A.16 aufgetragen). Offenbar stabilisiert die Disulfidbrücke zwischen Aminosäuren 154 und 195 den C Terminus von GFP, so dass die Entfaltung ohne Intermediat wahrscheinlicher wird. Das legt nahe, dass die Entfaltung von GFP(3-212) auf dem Zwei-Zustands-Pfad vom N Terminus des Proteins ausgeht. Hierbei muss angemerkt werden, dass sich die beiden Pfade hinsichtlich ihrer Übergangsbarrieren nur leicht voneinander entscheiden. Aus Monte-Carlo-Simulationen kann abgeschätzt werden, dass eine Stabilisierung des Pfades mit Intermediat um 1,5 k_BT ausreicht, um zu der beobachteten Veränderung des Auftretens der beiden Entfaltungspfade zu führen.

Strukturell unterscheidet sich der Entfaltungspfad von GFP(3-212) deutlich von dem mechanischen Entfaltungspfad von GFP bei einer Kraft an N und C Terminus (Aminosäuren 3 und 229). N-C-terminale Belastung führt zum Abschälen einzelner Sekundärstrukturelemente von der gefalteten Struktur, während in GFP(3-212) in einem Schritt beinahe die Hälfte des Moleküls entfaltet wird.

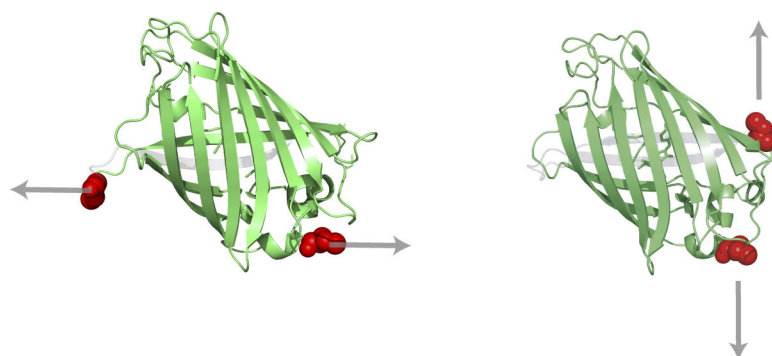


Abbildung A.17: Verschiedene Belastungsrichtungen von GFP:
 Scheren wie in GFP(3-212) (links) und Abschälen (rechts) wie in GFP(N-C).

Ein Vergleich der Belastungsrichtungen zwischen GFP(3-212) und GFP(N-C) (Abbildung A.17) macht deutlich, dass die Kraft in GFP(3-212) senkrecht auf die β -Stränge der GFP-

Struktur einwirkt, was das Abschälen einzelner β -Stränge erlaubt (Abbildung A.17 rechts). In GFP(3-212) dagegen wirkt die Kraft parallel zu den β -Strängen, wodurch diese gesichert werden (Abbildung A.17 links). Da beide Belastungsgeometrien den N-terminalen Kraftangriffspunkt gemeinsam haben, ist es offenbar möglich, durch Wahl des C-terminalen Kraftangriffspunktes das Molekül zwischen den beiden Entfaltungspfaden hin- und her zu schalten.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurde eine Mutante erstellt, in der GFP an den Aminosäuren 3 und 198 belastet wird (GFP(3-198)). Diese Belastungsgeometrie führt zu einer senkrecht auf die β -Stränge wirkenden Kraft. Eine typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve von GFP(3-198) ist in Abbildung A.18 dargestellt. Das Entfaltungsverhalten dieser Mutante unterscheidet sich deutlich von GFP(3-212): Das initiale Bruchereignis (gelber Kreis in Abbildung A.18) führt zu einem Intermediat (violetter Kreis in Abbildung A.18), von dem aus das Molekül komplett entfaltet. Der gesamte Längenzuwachs von GFP(3-198) ist mit $64,6 \pm 0,5$ nm deutlich kürzer als der erwartete Konturlängenzuwachs für die Entfaltung der 195 Aminosäuren von GFP(3-198) (69,0 nm Erwartungswert). Auch in GFP(3-229) wurde ein ähnlicher fehlender Längenzuwachs beobachtet und mit dem Ablösen der N-terminalen α -Helix von GFP vor dem eigentlichen Hauptentfaltungsereignis erklärt (Dietz und Rief 2004). Darüber hinaus ist das Intermediat von GFP(3-198) konsistent mit dem Ablösen dreier N-terminaler β -Stränge, was zu einem Intermediat führt, das auch auf dem Entfaltungspfad von GFP(3-229) auftritt.

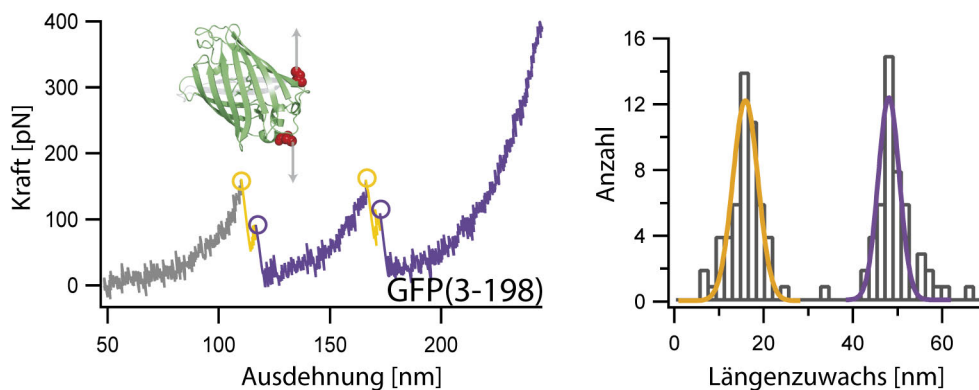


Abbildung A.18: Entfaltung von GFP(3-198).

Typische Kraft-Ausdehnungs-Kurve von GFP(3-198) (links) sowie Längenzuwachsverteilung des ersten (gelb) und zweiten (violett) Entfaltungsereignis.

Diese beiden Punkte sprechen dafür, dass der Entfaltungspfad von GFP(3-198) dem von GFP(3-229) sehr ähnlich ist. Die Wahl des C-terminalen Kraftangriffspunktes, erlaubt es also, das Protein zu Scheren oder einzelne Strukturelemente abzuschälen und damit zwischen zwei Teilen der Energielandschaft von GFP hin und her zu schalten.

A.3.2 Diskussion

In Abbildung A.19 ist die komplexe Energielandschaft von GFP dargestellt, wie sie durch kraftspektroskopische Experimente zugänglich wird. Wirkt die Kraft senkrecht zu den β -Strängen, entfaltet das Protein über das Abschälen (engl. *unzipping*) einzelner Strukturelemente, wie für GFP(3-229) und GFP(3-198) gezeigt. In beiden Zugrichtungen entfaltet zunächst eine N-terminale α -Helix (hellblauer Pfad).

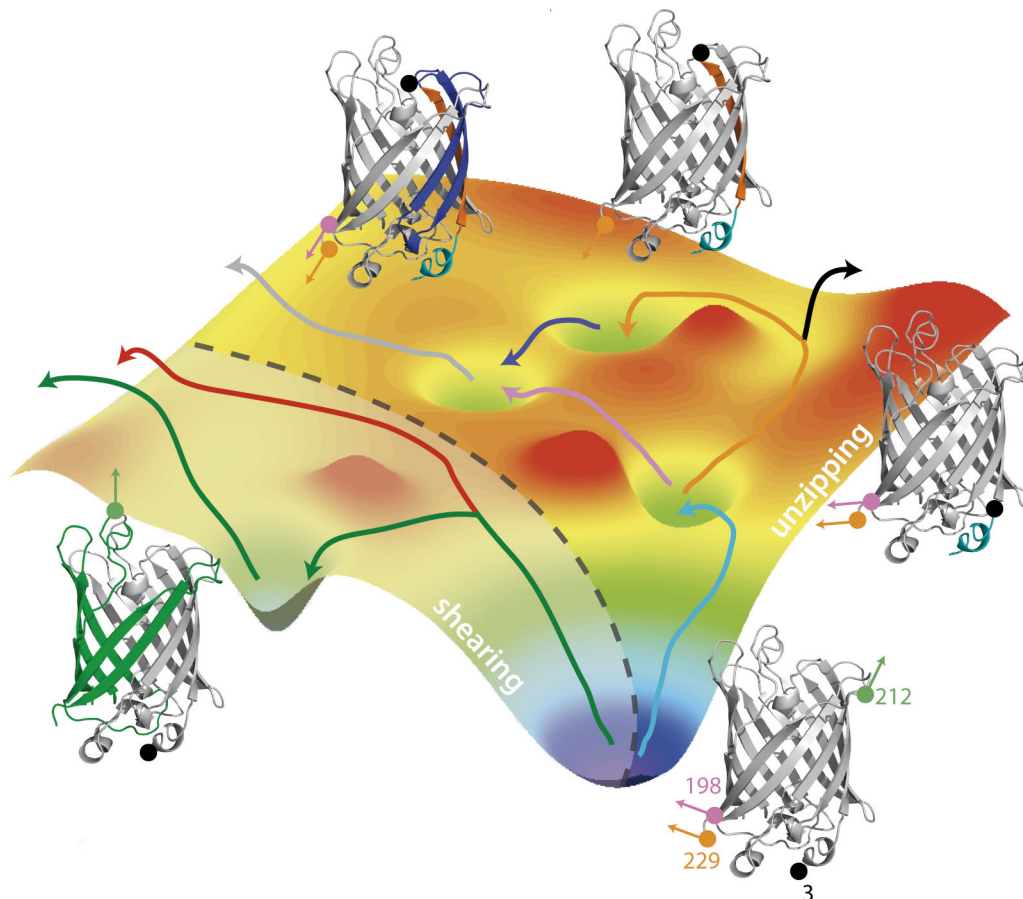


Abbildung A.19: Schematische Energielandschaft von GFP.

Wenn der N-terminale Kraftangriffspunkt (schwarz) unverändert bleibt, erlaubt es die Wahl des C-terminalen Kraftangriffspunktes (orange: 229 (C Terminus), pink: 198, grün: 212), das Protein in verschiedene Bereiche seiner Energielandschaft zu steuern. Entfaltete Sekundärstrukturelemente sind entsprechend den zugehörigen Übergängen (Pfeile in der Energielandschaft) gefärbt.

In GFP(3-229) werden daraufhin zwei weitere N-terminale Intermediate (orange und dunkelblau) durchlaufen, in denen jeweils β -Stränge vom N Terminus des Proteins abgelöst werden. Alternativ dazu kann das Protein aus diesem Zustand auch durch Ablösen eines C-terminalen β -Strangs (schwarzer Pfad) direkt entfalten. Diese Gabelung und eines der beiden Intermediate werden in GFP(3-198) umgangen (violetter Pfad). Das Scheren des Proteins (engl. *shear*-

ring’) findet in einem anderen Teil seiner Energielandschaft statt: Das Aufbrechen von GFP vom C Terminus her führt zu einem Intermediat, welches aus β -Strängen 1-6 besteht (grüner Pfad). Der zweite Pfad (rot) führt direkt zum entfalteten Zustand; auf diesem Entfaltungspfad beginnt der Bruch des GFP-Moleküls wahrscheinlich vom N Terminus her. Das Entfaltung-sintermediat, das während des Scherens von GFP durchlaufen wird, ähnelt strukturell stark einem Gleichgewichtsfaltungssintermediat, das durch Wasserstoff-Deuterium-Austauschexperimente identifiziert werden konnte (Huang, Craggs et al. 2007). Die Stabilität dieses Intermediats wurde auf etwa 6 kcal/mol geschätzt, was der Faltungsenergie vieler kleiner Proteine entspricht (Jackson 1998), zudem zeigt es einen hohen Anteil an nativer Tertiärstruktur und etwa 10 % der nativen grünen Fluoreszenz (Demidov, Dokholyan et al. 2006). Darüber hinaus stimmen die Grenzen dieses Intermediats mit einem *split-GFP*¹⁹ überein (Ozawa, Nogami et al. 2000). Unlängst wurden in Einzelmolekül-Entfaltungsexperimenten an der GFP-Variante Citrin ebenfalls zwei Entfaltungspfade bei chemischer Denaturierung beobachtet. Hierzu wurde die Entfaltung des fluoreszierenden Proteins durch Fluoreszenz-Resonanz-Transfer zu einem am N Terminus angebrachten Fluorophor gemessen. Einer der beiden Pfade führte hierbei über ein strukturiertes, schwach fluoreszierendes Intermediat, während der zweite Pfad direkt zum entfalteten Zustand führte. Dieses Entfaltungsverhalten ist der mechanischen Entfaltung von GFP beim Scheren des Proteins bemerkenswert ähnlich (Orte, Craggs et al. 2008). Ob der ‚Unzipping‘- Entfaltungspfad eine physiologische Relevanz hat, ist bislang nicht völlig klar, allerdings wurden Intermediate ähnliche denen auf diesem Pfad auftretenden vorgeschlagen, wenn GFP in die Pore der AAA+ Protease ClpXP gezogen wird (Martin, Baker et al. 2008).

¹⁹ Ein split-GFP ist ein molekularbiologisch in zwei Hälften geteiltes GFP-Molekül, dass mit einem Partnerprotein fusioniert wird. Wenn die Partnerproteine miteinander interagieren, kommen die beiden GFP-Hälften in räumliche Nähe zueinander, woraufhin sich die gefaltete GFP Struktur ausbildet. Hierdurch können Protein-Protein-Interaktionen in Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden.

A.4 Abschließende Diskussion

In den zurückliegenden drei Abschnitten A.1 - A.3 wurden kraftspektroskopische Experimente an zwei großen Proteinen, dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und dem Maltosebindenden Protein (MBP), vorgestellt. Hierbei zeigte sich, dass diese Proteine bei Belastung an N und C Termini nicht in einem Schritt entfalten, sondern dass während der Entfaltung Zwischenzustände durchlaufen werden, die teilweise sogar thermodynamisch stabil sind. Bei der Messung von Bruchkräften von Proteinkomplexen zeigte sich ebenfalls, dass eine mechanische Hierarchie zwischen der Stabilität des Komplexes und der Monomere existiert. Allerdings war in diesem Fall die Zuordnung der verschiedenen Entfaltungsereignisse zu strukturellen Abschnitten des Proteinkomplexes mehr oder weniger offensichtlich. Für MBP und GFP gestaltete sich diese Aufgabe schwieriger: MBP besteht zwar aus zwei Domänen, diese werden aber nicht von einem kontinuierlichen Abschnitt der Polypeptidkette gebildet. GFP erscheint auf den ersten Blick wie eine monolithische Struktur, von der schwer vorstellbar ist, dass einzelne Teile für sich alleine stabil sein können.

Da in kraftspektroskopischen Experimenten die Länge der entfalteten Polypeptidkette direkt mit dem Konturlängenzuwachs korreliert ist (Glg. 2), war es allerdings mithilfe struktureller Sonden – Disulfidbrücken, die die Polypeptidkette verkürzen oder zusätzliche Aminosäuren, die sie verlängern – möglich, diese Entfaltungsintermediate mit wenig Aufwand strukturell zu charakterisieren. Da auch einige weitere große Proteine, die bislang kraftspektroskopisch untersucht wurden, eines oder mehrere Entfaltungsintermediate aufweisen – beispielsweise Tinkinase (Puchner, Alexandrovich et al. 2008) oder das Knotenprotein Phytochrom (Bornschlogl, Anstrom et al. 2009) – ist zu erwarten, dass die hier eingesetzten Methoden auch auf diese Proteinen angewendet werden können. Dieses vergleichsweise einfach zugängliche strukturelle Bild des Entfaltungsvorgangs auch und gerade von großen Proteinen zeichnet die Kraftspektroskopie gegenüber anderen Methoden aus, mit denen Proteinfaltung untersucht werden kann.

Ein weiteres Alleinstellungsmerkmal kraftspektroskopischer Experimente ist der Umstand, dass Kraft gerichtet auf eine Proteinstruktur einwirkt. Für GFP wurde gezeigt, dass die mechanische Stabilität des Proteins stark von der Richtung der anliegenden Kraft abhängt (Dietz, Berkemeier et al. 2006). In Abschnitt 4.1 wird diskutiert, dass der Proteinkomplex zwischen Titin und Telethonin ebenfalls nur in einer Belastungsrichtung – nämlich der im Muskel relevanten – stabil ist. In Abschnitten A.2 wird Kraft statt an N und C Terminus direkt an die Ligandenbindungstasche von MBP angelegt, was dazu führt, dass Ligandenbindung die Entfal-

tungsbarriere erhöht. Bei GFP konnte durch verschiedene Krafrichtungen zwischen zwei Regionen der Energielandschaft gewechselt werden (Abschnitt A.3). Während sich die beiden Entfaltungspfade von GFP strukturell stark, jedoch hinsichtlich der Barrierenhöhen und –positionen nur wenig voneinander unterschieden (Dietz, Berkemeier et al. 2006), verlief die Entfaltung von MBP bei Belastung an Aminosäuren 53 und 141 zwar entlang der Grenzen der strukturellen Bausteine (Unfoldons), die bei Belastung an N und C Terminus gefunden wurden, allerdings war die Entfaltungsbarriere eine andere.

Kraftspektroskopische Experimente messen in erster Linie lokale Struktureigenschaften von Proteinen. Im Falle von MBP genügte bereits das Entfernen weniger Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein, um die Stabilisierung des Proteins durch Ligandenbindung aufzuheben. Dieser Gesichtspunkt macht die Variation der Krafrichtung umso relevanter. Zusammen mit lokalen strukturellen Sonden stellen kraftspektroskopische Experimente ein mächtiges Werkzeug dar, um lokale Eigenschaften der Energielandschaft von Proteinen oder Proteinkomplexen zu untersuchen und zu kontrollieren.

B Methoden und Sequenzen

B.1 Methoden

B.1.1 Kraftspektroskopie

Alle Experimente wurden auf einem am Lehrstuhl für Biophysik konstruierten Kraftmikroskop durchgeführt (Schwaiger, Schleicher et al. 2005). Die Federkonstante der verwendeten Blattfedern wurden nach dem Equipartitionstheorem aus dem thermischen Rauschen der Blattfedern bestimmt (Butt und Jaschke 1995). Um die aufgenommenen Messdaten – Detektorspannung der segmentierten Photodiode und Position der Piezotisches – in Kraft-Ausdehnungs-Kurven umzurechnen, musste darüber hinaus die Empfindlichkeit des Detektors ermittelt werden. Hierzu wurde die Blattfeder mit einer harten Oberfläche in Kontakt gebracht und der Piezotisch danach um eine definierte Distanz bewegt. Aus dem Quotienten des Detektorsignals und der gefahrenen Strecke ergibt sich die Detektorempfindlichkeit. Die Spannungsdaten des Detektors wurden mit diesem Kalibrierungsfaktor und der Federkonstante in Kraftdaten umgerechnet. Von den Positionsdaten des Piezotisches wurde die Verbiegung der Blattfeder abgezogen, um Ausdehnungsdaten zu erhalten.

Die Bestimmung der Detektorempfindlichkeit dominiert den Fehler der Bestimmung der Federkonstanten. Um diesen Fehler möglichst klein zu halten, wurden neben den Dissoziationskräften der untersuchten Proteinkomplexen zusätzlich die Entfaltungskräfte der Domänen, die zur Anbindung an Oberfläche und Blattfederspitze dienten (Ubiquitin oder Filamin), bestimmt. Diese Entfaltungskräfte wurden eingesetzt, um verschiedene Experimente, die mit unterschiedlichen Blattfedern aufgenommen wurden, zu vergleichen.

In allen Experimenten wurden Blattfedern der Firma Olympus (Biolever Typ A und B) mit einer typischen Federkonstante von 30 pN / nm bzw. 6 pN / nm eingesetzt. Als Puffer diente stets PBS (*phosphate-buffered saline*, phosphatgepufferte Salzlösung) mit 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM Na₂HPO₄ pH 7,4, der aus einer fertigen Mischung der Firma Sigma-Aldrich hergestellt wurde. Als Oberflächen wurden Glasträger mit einer Nickel-Nitrotetraacetic acid (NTA)-Funktionalisierung eingesetzt. Die eingesetzten Proteine konnten somit spezifisch über einen Terminalen 6xHis-Tag an die Oberfläche angebunden werden.

B.1.2 Molekularbiologische und proteinchemische Methoden

Typischerweise wurden die Gensequenzen der untersuchten Proteine durch PCR vervielfältigt und unter Verwendung geeigneter Restriktionsschnittstellen mit entsprechend präparierten Vektoren ligiert. Unstrukturierte Linker wurden durch Primer (Metabion, Deutschland) ebenso wie Restriktionsschnittstellen während der PCR die Gensequenzen angefügt. Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung bei der Firma GATC (Konstanz, Deutschland) verifiziert. Punktmutationen wurden mithilfe des QuikchangeMulti Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) durchgeführt, für Insertionen oder Deletionen wurde das Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit (Finzymes) eingesetzt. Alle Proteine wurde in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen exprimiert, die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und in Puffer A (300 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, pH8) mit 20 mM Imidazol resuspendiert. Die Zellsuspension wurde durch Beschallung mit Ultraschall aufgeschlossen, unlösliche Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand auf eine Ni-NTA-Affinitätssäule (HisTrap, GE Healthcare) aufgetragen. Nach gründlichem Waschen mit Puffer A mit 20 mM Imidazol wurde das Protein mit Puffer A mit 500 mM Imidazol von der Säule eluiert. Im zweiten Schritt wurde das Eluat der Ni-NTA-Affinitätssäule durch Größenausschlusschromatographie (Superdex200 10/30 GL in PBS, GE Healthcare) weiter gereinigt. Die Reinheit und Größe der so hergestellten Proteine wurde durch Gelelektrophorese überprüft.

B.2 Sequenzinformationen

Domänen Z1 und Z2 des N Terminus von Titin (1-197) wurden N- oder C-terminal mit drei Ubiquitineinheiten fusioniert. Für Disulfidbrücken wurde entweder Ser86 (Z1Z2T_{CC}) oder Thr188 (Z1Z2T_{NN}) durch Cysteine ersetzt.

Titin Z1Z2

```
MATQAPTFTQPLQSVVLEGSTATFEAHISGFPVPEVSWFRDQVISTST
LPGVQISFSDGRAKLTIPAVTKANSGRYSLKATNGSGQATSTAELLVKA
TAPPNFVQRLQSM TVRQGSQVRLQVRVTGIPNPVVKFYRDGAEIQSSLD
F
QISQEGDLYSLLIAEAYPEDSGTYSVNATNSVGRATSTAELLVQ
```

Von Telethonin wurde ein N-terminales Fragment der ersten 90 Aminosäuren, in dem alle Cysteine durch Serine ersetzt wurden, eingesetzt (Zou, Pinotsis et al. 2006). Für Z1Z2T_{CC} wurden Glu16 und Gln16 durch Cysteine ersetzt, in Z1Z2T_{NN} waren es Ala20 und Thr50. Der N-terminale 6xHis-Tag von Telethonin wurde nach Komplexbildung durch Verdau mit TEV-

Protease (Invitrogen) abgespalten. Der Komplex zwischen Z1Z2 und Telethonin wurde gebildet, indem die beiden Komponenten in PBS mit 4 M Harnstoff gemischt und über Nacht gegen PBS mit 10 mM DTT dialysiert wurden. Danach wurde der Komplex durch Größenausschlusschromatographie aufgereinigt.

Telethonin 1-90

MATSELSSEVSEENSERREAFWAEWKDLTLSTRPEEGSSLHEEDTQRHXT
YHQGQSQVLVQRSPXLMRMGILGRGLQEYQLPYQRVLP

Domäne M10 aus Titin (Aminosäuren 34352-35350, M10, grau) und die erste Immunglobulin-domäne von Obscurin O1 (Aminosäuren 1-106) wurde von jeweils drei Ubiquitineinheiten flankiert und mit einem 22 Aminosäuren langen Linker aus Glyzin und Serin (grün) verbunden.

Titin M10 – Obscurin Ig1

GGGIPPKIEALPSDISIDEGKVLTVACAFTGEPTPEVTWSCGGRKIHSQE
QGRFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGLYTSLGNEFGSDSATVNIHIRSI
SGGSGSGSGGASSGGSGSGSGMDQPQFSGAPRFLTRPKAFVSVGKD
ATLSCQIVGNPTPQVSWEKDQQPVTAGARFRLAQDGDLYRLTILDALGDSG
QYVCRARNAIGEAFAAVGLQVDAEAAACAEQASGEL

Myomesindomänen Domänen 11-13 (Aminosäuren 1354 – 1667 aus humanem Myomesin) wurden an den C Terminus von drei Ubiquitineinheiten fusioniert. An den C Terminus von Myomesin Domäne 13 wurde ein zehn Aminosäuren langer Linker aus Glyzin und Serin (grün) mit einem C-terminalen Cystein angefügt.

Myo13

KALNLTENVWGDPPPEVSWLKNEKALASDDHCNLKFEAGR
TAYFTINGVSTADSGKYGLVVKNKYGSETSDFTVSVFIPESGGSGSGSGC

Aminosäuren 547 – 857 von Filamin aus *Dictyostelium discoideum* (ddFLN Domänen 4-6, ddFLN4-6) wurden an den C Terminus von drei Ubiquitineinheiten fusioniert. An den C Terminus von ddFLN6 wurde ein 15 Aminosäuren langer Linker aus Glyzin und Serin (grün) mit einem terminalen Cystein (gelb) angefügt.

ddFLN6

IEGANGEDSSFGSFTFTVAAKNKKGEVKTYGGDKFEVSITGPAEEITLDA
IDNQDGTYTAAAYSLVGNRSTGVKLNKGKHEGSPFKQVLGNP
GKKNPEVKSFTTTRTANSGGSGSGSGSGSGC

Für ddFLN6ΔHelix wurden Reste 751 – 756 von ddFLN durch Glyzine (grau) ersetzt.

ddFLN6ΔHelix

IEGGGGGGGSFGSFTFTVAAKNKKGEVKTYGGDKFEVSI TGPAEEITLDA
 IDNQDGYTAAAYSLVGNRFRSTGVKLNKGKHIEGSPFKQVLGNPGKKNPEV
 KSFTTTRTANSGGSGSGSGSGSGSGC

Aminosäuren 2633 – 2725 von humanem Filamin C (FLNC24) wurden N-terminal von drei Ubiquitineinheiten flankiert. Am C Terminus von FLNC24 wurde ein 20 Aminosäuren langer Linker aus Glyzin und Serin (grün) gefolgt von einem Leuzinzipper aus dem Hefetranskriptionsfaktor GCN4 (rot) angefügt. Der Leuzinzipper trägt an seinem N-terminalen Ende ein Cystein (gelb).

FLNC24

SSDASKVVTRGPGLSQAFVQKNSFTVDSSKAGTNMMMVG VHGPKTPSEE
 VYVKHMGNRVYNVTYTVKEKGDYILIVKWGDESVPGSPFKVKVPGGGGSG
 GGGSGGGSGGGSGGGSSRCQKLEQKVEELLQKNYHLEQEVARLKQLV
 GELEG

16,5 α bestand aus Aminosäuren 33 – 141 von Hsp16,5 aus *Methanococcus janashii*. Für interne Disulfidbrücken wurden Ser46 und Ser97 durch Cysteine ersetzt. Für das Ubiquitinverknüpfte Dimer wurde 16,5 α von jeweils drei Ubiquitineinheiten mit einem C-terminalen Cystein flankiert.

16,5 α

TGIQISGKGFMPISIIEGDQHIKVIAWLPGVNKEDIILNAVGD TLEIRAK
 RSPLMITESERIIYSEIPEEEEEIYRTIKLPATVKEENASAKFENG VLSVI
 LPKAESSIK

C_{H3} bestand aus Aminosäuren 343 – 450 der schweren Kette des monoklonalen Antikörpers MAK33 aus Maus. An den N Terminus wurden Domäne 3-5 aus *Dictyostelium discoideum* Filamin (ddFLN3-5) angefügt. Am C Terminus trug C_{H3} einen 10 Aminosäuren langen Linker (grün) aus Glyzin / Serin gefolgt von einem Cystein (gelb).

C_{H3}

KGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITV E WQWNGQP AE
 NYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVNPKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNH HTEK
 SLSHSPGKSGGSGSGGSGC

Maltose-bindendes Protein aus *Escherichia coli* bestand aus Aminosäuren 1 – 366 der Kristallstruktur 1ANF (Spurlino, Lu et al. 1991). Für MBP(53-141) wurden Thr53 und Ala141 durch Cysteine ersetzt.

MBP

MAKIEEGKLVIWINGDKGYNGLAEVGGKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFP
QVAATGDGPDIIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVR
YNGKLIAYPIAVEALS LIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALM
FNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGGYDIKDVGVNAGAKAGLTFVLVDL
IKNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLP
TFKGPSPKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKP
LGAVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIPOMSAFWYAVRTAVI
NAASGRQTVDEALKDAQT

Es wurde die cycle-3 Mutante von grün-fluoreszierendem Protein mit der zusätzlichen Punktmutation S2G eingesetzt.

GFP

MKGGEELFTGVVPIIIVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTTLKFICTT
GKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTISF
KDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNV
YITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHY
LSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGI

Literaturverzeichnis

- Agarkova, I. and J. C. Perriard (2005). "The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere." Trends Cell Biol **15**(9): 477-85.
- Bechtluft, P., R. G. van Leeuwen, et al. (2007). "Direct observation of chaperone-induced changes in a protein folding pathway." Science **318**(5855): 1458-61.
- Bell, G. I. (1978). "Models for the specific adhesion of cells to cells." Science **200**(4342): 618-27.
- Bertz, M. (2006). Mechanik des Maltose-bindenden Proteins. Physikdepartment E22. München, TU München.
- Betton, J. M. and M. Hofnung (1994). "In vivo assembly of active maltose binding protein from independently exported protein fragments." Embo J **13**(5): 1226-34.
- Binnig, G., C. F. Quate, et al. (1986). "Atomic Force Microscope." Physical Review Letters **56**(9): 930.
- Bork, P., L. Holm, et al. (1994). "The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core." J Mol Biol **242**(4): 309-20.
- Bornschlogl, T., D. M. Anstrom, et al. (2009). "Tightening the knot in phytochrome by single-molecule atomic force microscopy." Biophys J **96**(4): 1508-14.
- Bowie, J. U. and R. T. Sauer (1989). "Equilibrium dissociation and unfolding of the Arc repressor dimer." Biochemistry **28**(18): 7139-43.
- Brown, A. E. and D. E. Discher (2009). "Conformational changes and signaling in cell and matrix physics." Curr Biol **19**(17): R781-9.
- Buller, A. J., J. C. Eccles, et al. (1960). "Differentiation of fast and slow muscles in the cat hind limb." J Physiol **150**: 399-416.
- Bustamante, C., J. F. Marko, et al. (1994). "Entropic elasticity of lambda-phage DNA." Science **265**(5178): 1599-600.
- Butt, H.-J. and M. Jaschke (1995). "Calculation of thermal noise in atomic force microscopy." Nanotechnology **6**: 1-7.
- Cao, Y., M. M. Balamurali, et al. (2007). "A functional single-molecule binding assay via force spectroscopy." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(40): 15677-81.
- Cao, Y. and H. Li (2008). "Engineered elastomeric proteins with dual elasticity can be controlled by a molecular regulator." Nat Nanotechnol **3**(8): 512-6.
- Cao, Y., T. Yoo, et al. (2008). "Single molecule force spectroscopy reveals engineered metal chelation is a general approach to enhance mechanical stability of proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(32): 11152-7.
- Carrion-Vazquez, M., H. Li, et al. (2003). "The mechanical stability of ubiquitin is linkage dependent." Nat Struct Biol **10**(9): 738-43.
- Carrion-Vazquez, M., P. E. Marszalek, et al. (1999). "Atomic force microscopy captures length phenotypes in single proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 11288-92.
- Cecconi, C., E. A. Shank, et al. (2005). "Direct observation of the three-state folding of a single protein molecule." Science **309**(5743): 2057-60.
- Chang, Y. and C. Park (2009). "Mapping Transient Partial Unfolding by Protein Engineering and Native-State Proteolysis." Journal of Molecular Biology **393**(2): 543-556.
- Chen, J., M. J. Feige, et al. "Regions Outside the [alpha]-Crystallin Domain of the Small Heat Shock Protein Hsp26 Are Required for Its Dimerization." Journal of Molecular Biology DOI: [10.1016/j.jmb.2010.02.022](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.02.022).
- Chun, S. Y., S. Strobel, et al. (1993). "Folding of maltose-binding protein. Evidence for the identity of the rate-determining step in vivo and in vitro." J Biol Chem **268**(28): 20855-62.

- Clausen-Schaumann, H., M. Rief, et al. (2000). "Mechanical stability of single DNA molecules." Biophys J **78**(4): 1997-2007.
- Dams, T. and R. Jaenicke (1999). "Stability and folding of dihydrofolate reductase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*." Biochemistry **38**(28): 9169-78.
- Davies, P. J., D. Wallach, et al. (1980). "Self-association of chicken gizzard filamin and heavy merofilamin." Biochemistry **19**(7): 1366-72.
- Demidov, V. V., N. V. Dokholyan, et al. (2006). "Fast complementation of split fluorescent protein triggered by DNA hybridization." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(7): 2052-6.
- Dietz, H., F. Berkemeier, et al. (2006). "Anisotropic deformation response of single protein molecules." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(34): 12724-8.
- Dietz, H. and M. Rief (2004). "Exploring the energy landscape of GFP by single-molecule mechanical experiments." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(46): 16192-7.
- Dietz, H. and M. Rief (2006). "Protein structure by mechanical triangulation." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(5): 1244-7.
- Eppenberger, H. M., J. C. Perriard, et al. (1981). "The Mr 165,000 M-protein myomesin: a specific protein of cross-striated muscle cells." J Cell Biol **89**(2): 185-93.
- Evans, E., A. Leung, et al. (2004). "Mechanical switching and coupling between two dissociation pathways in a P-selectin adhesion bond." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(31): 11281-11286.
- Feige, M. J., S. Groscurth, et al. (2009). "An unfolded CH1 domain controls the assembly and secretion of IgG antibodies." Mol Cell **34**(5): 569-79.
- Feige, M. J., S. Groscurth, et al. (2008). "The structure of a folding intermediate provides insight into differences in immunoglobulin amyloidogenicity." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(36): 13373-8.
- Feige, M. J., F. Hagn, et al. (2007). "Influence of the internal disulfide bridge on the folding pathway of the CL antibody domain." J Mol Biol **365**(4): 1232-44.
- Feige, M. J., L. M. Hendershot, et al. (2009). "How antibodies fold." Trends Biochem Sci doi:10.1016/j.tibs.2009.11.005.
- Feige, M. J., S. Walter, et al. (2004). "Folding mechanism of the CH2 antibody domain." J Mol Biol **344**(1): 107-18.
- Ferrer, J. M., H. Lee, et al. (2008). "Measuring molecular rupture forces between single actin filaments and actin-binding proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(27): 9221-6.
- Finer, J. T., R. M. Simmons, et al. (1994). "Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps." Nature **368**(6467): 113-119.
- Florin, E. L., V. T. Moy, et al. (1994). "Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs." Science **264**(5157): 415-7.
- Frank, D., C. Kuhn, et al. (2006). "The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease." J Mol Med **84**(6): 446-68.
- Fucini, P., B. Koppel, et al. (1999). "Molecular architecture of the rod domain of the Dictyostelium gelation factor (ABP120)." J Mol Biol **291**(5): 1017-23.
- Fukami-Kobayashi, K., Y. Tateno, et al. (1999). "Domain dislocation: a change of core structure in periplasmic binding proteins in their evolutionary history." J Mol Biol **286**(1): 279-90.
- Fukuzawa, A., S. Lange, et al. (2008). "Interactions with titin and myomesin target obscurin and obscurin-like 1 to the M-band: implications for hereditary myopathies." J Cell Sci **121**(Pt 11): 1841-51.
- Furuike, S., T. Ito, et al. (2001). "Mechanical unfolding of single filamin A (ABP-280) molecules detected by atomic force microscopy." FEBS Lett **498**(1): 72-5.
- Gebhardt, J. C., T. Bornschlogl, et al. (2010). "Full distance-resolved folding energy landscape of one single protein molecule." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(5): 2013-8.

- Gebhardt, J. C. M., Z. Ökten, et al. (2010). "The Lever Arm Effects a Mechanical Asymmetry of the Myosin-V-Actin Bond." *Biophys J* **98**(2): 277-281.
- Gorlin, J. B., R. Yamin, et al. (1990). "Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring." *J Cell Biol* **111**(3): 1089-105.
- Goto, Y. and K. Hamaguchi (1979). "The role of the intrachain disulfide bond in the conformation and stability of the constant fragment of the immunoglobulin light chain." *J Biochem (Tokyo)* **86**(5): 1433-41.
- Grandbois, M., M. Beyer, et al. (1999). "How strong is a covalent bond?" *Science* **283**(5408): 1727-30.
- Hann, E., N. Kirkpatrick, et al. (2007). "The effect of protein complexation on the mechanical stability of Im9." *Biophys J* **92**(9): L79-81.
- Haslbeck, M., T. Franzmann, et al. (2005). "Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins." *Nat Struct Mol Biol* **12**(10): 842-6.
- Himmel, M., P. F. Van Der Ven, et al. (2003). "The limits of promiscuity: isoform-specific dimerization of filamins." *Biochemistry* **42**(2): 430-9.
- Hinterdorfer, P., W. Baumgartner, et al. (1996). "Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(8): 3477-81.
- Horowitz, R. and R. J. Podolsky (1987). "The positional stability of thick filaments in activated skeletal muscle depends on sarcomere length: evidence for the role of titin filaments." *J Cell Biol* **105**(5): 2217-23.
- Horwitz, J. (2003). "Alpha-crystallin." *Exp Eye Res* **76**(2): 145-53.
- Hsu, S. T., G. Blaser, et al. (2009). "The folding, stability and conformational dynamics of beta-barrel fluorescent proteins." *Chem Soc Rev* **38**(10): 2951-65.
- Huang, J. R., T. D. Craggs, et al. (2007). "Stable intermediate states and high energy barriers in the unfolding of GFP." *J Mol Biol* **370**(2): 356-71.
- Huber, R., J. Deisenhofer, et al. (1976). "Crystallographic structure studies of an IgG molecule and an Fc fragment." *Nature* **264**(5585): 415-20.
- Isenman, D. E., D. Lancet, et al. (1979). "Folding pathways of immunoglobulin domains. The folding kinetics of the Cgamma3 domain of human IgG1." *Biochemistry* **18**(15): 3327-36.
- Jackson, S. E. (1998). "How do small single-domain proteins fold?" *Folding and Design* **3**(4): R81-R91.
- Jaenicke, R. and G. Bohm (1998). "The stability of proteins in extreme environments." *Curr Opin Struct Biol* **8**(6): 738-48.
- Janeway, C. A. T., Paul; Walport, Mark; Shlomchik, Mark (2001). *Immunobiology*. New York, Garland Science.
- Junker, J. P., K. Hell, et al. (2005). "Influence of substrate binding on the mechanical stability of mouse dihydrofolate reductase." *Biophys J* **89**(5): L46-8.
- Junker, J. P. and M. Rief (2009). "Single-molecule force spectroscopy distinguishes target binding modes of calmodulin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(34): 14361-6.
- Junker, J. P., F. Ziegler, et al. (2009). "Ligand-dependent equilibrium fluctuations of single calmodulin molecules." *Science* **323**(5914): 633-7.
- Kedrov, A., M. Krieg, et al. (2005). "Locating ligand binding and activation of a single antiporter." *EMBO Rep* **6**(7): 668-74.
- Kim, K. K., R. Kim, et al. (1998). "Crystal structure of a small heat-shock protein." *Nature* **394**(6693): 595-9.
- Kolahi, K. S. and M. R. Mofrad (2008). "Molecular mechanics of filamin's rod domain." *Biophys J* **94**(3): 1075-83.
- Kontogianni-Konstantopoulos, A., M. A. Ackermann, et al. (2009). "Muscle giants: molecular scaffolds in sarcomerogenesis." *Physiol Rev* **89**(4): 1217-67.

- Kubelka, J., J. Hofrichter, et al. (2004). "The protein folding 'speed limit'." Curr Opin Struct Biol **14**(1): 76-88.
- Lad, Y., T. Kiema, et al. (2007). "Structure of three tandem filamin domains reveals auto-inhibition of ligand binding." Embo J **26**(17): 3993-4004.
- Lange, S., K. Ouyang, et al. (2009). "Obscurin determines the architecture of the longitudinal sarcoplasmic reticulum." J Cell Sci **122**(Pt 15): 2640-50.
- Lee, E. H., M. Gao, et al. (2006). "Mechanical strength of the titin Z1Z2-telethonin complex." Structure **14**(3): 497-509.
- Li, H. (2008). "Mechanical Engineering of Elastomeric Proteins: Toward Designing New Protein Building Blocks for Biomaterials." Advanced Functional Materials **18**(18): 2643-2657.
- Li, H., M. Carrion-Vazquez, et al. (2000). "Point mutations alter the mechanical stability of immunoglobulin modules." Nat Struct Biol **7**(12): 1117-20.
- Li, H., W. A. Linke, et al. (2002). "Reverse engineering of the giant muscle protein titin." Nature **418**(6901): 998-1002.
- Li, H., A. F. Oberhauser, et al. (2001). "Multiple conformations of PEVK proteins detected by single-molecule techniques." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(19): 10682-6.
- Louie, G. V. (1993). "Porphobilinogen deaminase and its structural similarity to the bidomain binding proteins." Current Opinion in Structural Biology **3**(3): 401-408.
- Maity, H., M. Maity, et al. (2005). "Protein folding: the stepwise assembly of foldon units." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(13): 4741-6.
- Marszalek, P. E., H. Lu, et al. (1999). "Mechanical unfolding intermediates in titin modules." Nature **402**(6757): 100-3.
- Martin, A., T. A. Baker, et al. (2008). "Protein unfolding by a AAA+ protease is dependent on ATP-hydrolysis rates and substrate energy landscapes." Nat Struct Mol Biol **15**(2): 139-45.
- Marvin, J. S. and H. W. Hellinga (2001). "Manipulation of ligand binding affinity by exploitation of conformational coupling." Nat Struct Biol **8**(9): 795-8.
- Mayor, U., N. R. Guydosh, et al. (2003). "The complete folding pathway of a protein from nanoseconds to microseconds." Nature **421**(6925): 863-7.
- McAuley, A., J. Jacob, et al. (2008). "Contributions of a disulfide bond to the structure, stability, and dimerization of human IgG1 antibody CH3 domain." Protein Sci **17**(1): 95-106.
- McCoy, A. J., P. Fucini, et al. (1999). "Structural basis for dimerization of the Dictyostelium gelation factor (ABP120) rod." Nat Struct Biol **6**(9): 836-41.
- McHaourab, H. S., J. A. Godar, et al. (2009). "Structure and mechanism of protein stability sensors: chaperone activity of small heat shock proteins." Biochemistry **48**(18): 3828-37.
- Merkel, R., P. Nassoy, et al. (1999). "Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy." Nature **397**(6714): 50-53.
- Mickler, M., R. I. Dima, et al. (2007). "Revealing the bifurcation in the unfolding pathways of GFP by using single-molecule experiments and simulations." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(51): 20268-73.
- Millet, O., R. P. Hudson, et al. (2003). "The energetic cost of domain reorientation in maltose-binding protein as studied by NMR and fluorescence spectroscopy." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(22): 12700-5.
- Miyata, H., R. Yasuda, et al. (1996). "Strength and lifetime of the bond between actin and skeletal muscle alpha-actinin studied with an optical trapping technique." Biochim Biophys Acta **1290**(1): 83-8.
- Morfill, J., K. Blank, et al. (2007). "Affinity-matured recombinant antibody fragments analyzed by single-molecule force spectroscopy." Biophys J **93**(10): 3583-90.

- Nakamura, F., T. M. Osborn, et al. (2007). "Structural basis of filamin A functions." *J Cell Biol* **179**(5): 1011-25.
- Narberhaus, F. (2002). "Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network." *Microbiol Mol Biol Rev* **66**(1): 64-93.
- Nishizaka, T., H. Miyata, et al. (1995). "Unbinding force of a single motor molecule of muscle measured using optical tweezers." *Nature* **377**(6546): 251-4.
- Novokhatny, V. and K. Ingham (1997). "Thermodynamics of maltose binding protein unfolding." *Protein Sci* **6**(1): 141-6.
- O'Shea, E. K., J. D. Klemm, et al. (1991). "X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil." *Science* **254**(5031): 539-44.
- Oberhauser, A. F., P. E. Marszalek, et al. (1999). "Single protein misfolding events captured by atomic force microscopy." *Nat Struct Biol* **6**(11): 1025-8.
- Oesterhelt, F., D. Oesterhelt, et al. (2000). "Unfolding pathways of individual bacteriorhodopsins." *Science* **288**(5463): 143-6.
- Orte, A., T. D. Craggs, et al. (2008). "Evidence of an Intermediate and Parallel Pathways in Protein Unfolding from Single-Molecule Fluorescence." *J Am Chem Soc*.
- Ozawa, T., S. Nogami, et al. (2000). "A fluorescent indicator for detecting protein-protein interactions in vivo based on protein splicing." *Anal Chem* **72**(21): 5151-7.
- Peng, Q. and H. Li (2008). "Atomic force microscopy reveals parallel mechanical unfolding pathways of T4 lysozyme: evidence for a kinetic partitioning mechanism." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(6): 1885-90.
- Peng, Q. and H. Li (2009). "Domain insertion effectively regulates the mechanical unfolding hierarchy of elastomeric proteins: toward engineering multifunctional elastomeric proteins." *J Am Chem Soc* **131**(39): 14050-6.
- Pentikäinen, U. and J. Ylanne (2009). "The regulation mechanism for the auto-inhibition of binding of human filamin A to integrin." *J Mol Biol* **393**(3): 644-57.
- Pernigo, S., A. Fukuzawa, et al. (2010). "Structural insight into M-band assembly and mechanics from the titin-obscurin-like-1 complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(7): 2908-13.
- Pinotsis, N., P. Abrusci, et al. (2009). "Terminal assembly of sarcomeric filaments by intermolecular beta-sheet formation." *Trends Biochem Sci* **34**(1): 33-9.
- Pinotsis, N., S. Lange, et al. (2008). "Molecular basis of the C-terminal tail-to-tail assembly of the sarcomeric filament protein myomesin." *Embo J* **27**(1): 253-64.
- Popowicz, G. M., R. Muller, et al. (2004). "Molecular structure of the rod domain of dictyostelium filamin." *J Mol Biol* **342**(5): 1637-46.
- Popowicz, G. M., M. Schleicher, et al. (2006). "Filamins: promiscuous organizers of the cytoskeleton." *Trends Biochem Sci* **31**(7): 411-9.
- Puchner, E. M., A. Alexandrovich, et al. (2008). "Mechanoenzymatics of titin kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(36): 13385-90.
- Pudas, R., T. R. Kiema, et al. (2005). "Structural basis for vertebrate filamin dimerization." *Structure* **13**(1): 111-9.
- Rief, M., J. M. Fernandez, et al. (1998). "Elastically Coupled Two-Level Systems as a Model for Biopolymer Extensibility." *Phys Rev Lett* **81**: 4764-4767.
- Rief, M., M. Gautel, et al. (1997). "Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM." *Science* **276**(5315): 1109-12.
- Rief, M., M. Gautel, et al. (1998). "The mechanical stability of immunoglobulin and fibronectin III domains in the muscle protein titin measured by atomic force microscopy." *Biophys J* **75**(6): 3008-14.
- Rief, M., F. Oesterhelt, et al. (1997). "Single Molecule Force Spectroscopy on Polysaccharides by Atomic Force Microscopy." *Science* **275**(5304): 1295-7.

- Rief, M., J. Pascual, et al. (1999). "Single molecule force spectroscopy of spectrin repeats: low unfolding forces in helix bundles." *J Mol Biol* **286**(2): 553-61.
- Ros, R., F. Schwesinger, et al. (1998). "Antigen binding forces of individually addressed single-chain Fv antibody molecules." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(13): 7402-5.
- Schirmer, E. C., S. Lindquist, et al. (1994). "An Arabidopsis heat shock protein complements a thermotolerance defect in yeast." *Plant Cell* **6**(12): 1899-909.
- Schlierf, M., F. Berkemeier, et al. (2007). "Direct observation of active protein folding using lock-in force spectroscopy." *Biophys J* **93**(11): 3989-98.
- Schlierf, M. and M. Rief (2005). "Temperature softening of a protein in single-molecule experiments." *J Mol Biol* **354**(2): 497-503.
- Schoenauer, R., P. Bertoncini, et al. (2005). "Myomesin is a molecular spring with adaptable elasticity." *J Mol Biol* **349**(2): 367-79.
- Schwaiger, I., A. Kardinal, et al. (2004). "A mechanical unfolding intermediate in an actin-crosslinking protein." *Nat Struct Mol Biol* **11**(1): 81-5.
- Schwaiger, I., M. Schleicher, et al. (2005). "The folding pathway of a fast-folding immunoglobulin domain revealed by single-molecule mechanical experiments." *EMBO Rep* **6**(1): 46-51.
- Schwesinger, F., R. Ros, et al. (2000). "Unbinding forces of single antibody-antigen complexes correlate with their thermal dissociation rates." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(18): 9972-7.
- Seo, M. D., S. H. Seok, et al. (2009). "Crystal structure of the dimerization domain of human filamin A." *Proteins* **75**(1): 258-63.
- Sharff, A. J., L. E. Rodseth, et al. (1993). "Refined 1.8-A structure reveals the mode of binding of beta-cyclodextrin to the maltodextrin binding protein." *Biochemistry* **32**(40): 10553-9.
- Sharff, A. J., L. E. Rodseth, et al. (1992). "Crystallographic evidence of a large ligand-induced hinge-twist motion between the two domains of the maltodextrin binding protein involved in active transport and chemotaxis." *Biochemistry* **31**(44): 10657-63.
- Sharma, D., O. Perisic, et al. (2007). "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**(22): 9278-83.
- Shibata, M., H. Yamashita, et al. (2010). "High-speed atomic force microscopy shows dynamic molecular processes in photoactivated bacteriorhodopsin." *Nat Nanotechnol*.
- Sjekloca, L., R. Pudas, et al. (2007). "Crystal structure of human filamin C domain 23 and small angle scattering model for filamin C 23-24 dimer." *J Mol Biol* **368**(4): 1011-23.
- Sotomayor, M. and K. Schulten (2007). "Single-molecule experiments in vitro and in silico." *Science* **316**(5828): 1144-8.
- Spurlino, J. C., G. Y. Lu, et al. (1991). "The 2.3-A resolution structure of the maltose- or maltodextrin-binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis." *J Biol Chem* **266**(8): 5202-19.
- Stroh, C. M., A. Ebner, et al. (2004). "Simultaneous topography and recognition imaging using force microscopy." *Biophys J* **87**(3): 1981-90.
- Thies, M. J., J. Mayer, et al. (1999). "Folding and association of the antibody domain CH3: prolyl isomerization precedes dimerization." *J Mol Biol* **293**(1): 67-79.
- Thies, M. J., F. Talamo, et al. (2002). "Folding and oxidation of the antibody domain C(H)3." *J Mol Biol* **319**(5): 1267-77.
- van Montfort, R. L., E. Basha, et al. (2001). "Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein." *Nat Struct Biol* **8**(12): 1025-30.
- Wright, P. E. and H. J. Dyson (2009). "Linking folding and binding." *Curr Opin Struct Biol* **19**(1): 31-8.

- Yamazaki, M., S. Furuike, et al. (2002). "Mechanical response of single filamin A (ABP-280) molecules and its role in the actin cytoskeleton." J Muscle Res Cell Motil **23**(5-6): 525-34.
- Yao, N., S. Trakhanov, et al. (1994). "Refined 1.89-Å structure of the histidine-binding protein complexed with histidine and its relationship with many other active transport/chemosensory proteins." Biochemistry **33**(16): 4769-79.
- Zou, P., N. Pinotsis, et al. (2006). "Palindromic assembly of the giant muscle protein titin in the sarcomeric Z-disk." Nature **439**(7073): 229-33.
- Zou, S., H. Schonherr, et al. (2005). "Force Spectroscopy of Quadruple H-Bonded Dimers by AFM: Dynamic Bond Rupture and Molecular Time-Temperature Superposition." Journal of the American Chemical Society **127**(32): 11230-11231.

Danksagung

An dieser Stelle soll all jenen gedankt werden, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gebührt Matthias Rief, in dessen Labor und unter dessen Betreuung diese Arbeit entstand, für spannende, motivierende und zuallererst inspirierende Diskussionen. Das große Maß an Freiheit für eigene Ideen in seiner Arbeitsgruppe hat stark zu meiner Reifung als Naturwissenschaftler beigetragen.

Michael Schlierf und Jan-Philipp Junker sei gedankt für die schönen gemeinsamen Jahre, die freundschaftliche Atmosphäre im Labor, das stets kritische Hinterfragen meiner Ergebnisse und, darüber hinaus, die ungemeine Erweiterung meines Allgemeinwissens, insbesondere der deutschen Geographie. Besonders gedankt sei auch Hendrik Dietz, der mein Auge für spannende Fragestellungen geschärft hat, Felix Berkemeier für die Unterstützung bei allem, was nicht mit Molekularbiologie zusammenhing (und für nette Benzingespräche über Apple-Rechner), Melanie Reisinger für das gemeinsame Leiden mit Filamin und Fabian Ziegler für die Unterstützung auf allen Ebenen und insbesondere für seinen Geschäftssinn. Christof Gebhardt, der ein leuchtendes Vorbild an Ausdauer ist, danke ich für spannende Diskussionen und nicht zuletzt für eindrucksvolle Skitage mit Kuchen im Schneesturm.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Kooperationspartnern, von deren Know-How ich in dieser Arbeit profitieren durfte: Florian Sauer und Matthias Wilmanns vom EMBL Hamburg, Jin Chen, Matthias Feige, Titus Franzmann und Johannes Buchner vom Department für Chemie der TUM, Atsushi Fukuzawa und Mathias Gautel vom King's College, London und Patricia Abrusci, Eirini Gkoukoulia und Kristina Djinovic-Carugo von der Universität Wien.

Für die tatkräftige Unterstützung bei Proteinexpression und -aufreinigung danke ich Claudia Antrecht, Gabi Chmel, Daniela Mayr, Monika Rusp und Karin Vogt ebenso wie Andrea Kunfermann und Lorenz Kollmansberger. Nicht unerwähnt lassen möchte ich zudem Christina Lumme, Christine Semmrich, Alexander Mehlich, Thomas Bornschlögl, Lorenz Rognoni, Johannes Stiegler, Moritz Mickler, Anja Gieseke und Fabian Kilchherr, die alle dazu beigetragen haben, dass diese Doktorarbeit nicht ausschließlich Arbeit war. Gedankt sei außerdem Elke Fehsenfeld, Andreas Bausch, Günther Woehlke und Thorsten Hugel.

Zuletzt gebührt mein Dank meinen Eltern, die mich während all der Jahre in meiner Ausbildung unterstützt haben. 妻、恵美に深く感謝します。