

**Kraftinduzierte Sekundärstrukturänderungen
in einzelnen Molekülen**



Filipp Oesterhelt

Kraftinduzierte Sekundärstrukturänderungen in einzelnen Molekülen

Dissertation an der Fakultät für Physik
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Filipp Oesterhelt
aus München

München, den 27.Juni 2000

1. Gutachter: Prof. Dr. Hermann Gaub

2. Gutachter: Prof. Dr. Khaled Karrai

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Dezember 2000

Inhalt

1. Zusammenfassung.....	5
2. Einleitung.....	6
3. Die Kraftspektroskopie	8
3.1. Das Kraftmikroskop	8
3.2. Kraftkurven.....	9
3.3. Einzelmolekül-Kraftspektroskopie am Beispiel Dextran.....	11
4. Kraftspektroskopie an Poly(ethylen glycol).....	13
4.1. PEG	13
4.2. Kraftmessungen an PEG.....	14
4.2.1. Präparation	14
4.2.2. Messungen an PEG.....	14
4.2.3. Elastizität einzelner PEG-Moleküle	15
4.3. Zweizustands-Modell	20
5. Entfaltung von Proteinen.....	26
5.1. Entfaltung von Proteinen am Beispiel Titin.....	27
5.2. Vergleich mit anderen Proteinstrukturen	29
6. Kraftspektroskopie an Bakteriorhodopsin.....	31
6.1. Funktion und Struktur von Bakteriorhodopsin	32
6.2. Experimente an nativem BR.....	33
6.2.1. Abbilden von BR.....	33
6.2.2. Kraftmikroskopie und Kraftspektroskopie.....	35
6.2.3. Ankopplung an die Spitze.....	36

6.2.4.	Selektieren der Daten	37
6.2.5.	Kraftkurven an nativem BR.....	38
6.2.6.	WLC-Fit an die Entfaltungskurven.....	39
6.2.7.	Ein Modell für die Entfaltung.....	40
6.3.	Test-Experimente an Mutanten	45
6.3.1.	Messungen an enzymatisch geschnittenem BR	45
6.3.2.	Spezifische Kopplung.....	51
7.	Ausblick.....	54

1. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die in den letzten Jahren entwickelte Technik der auf dem Kraftmikroskop basierenden Einzelmolekül-Kraftspektroskopie auf zwei spezielle Systeme angewendet: Poly(ethylen Glycol) (PEG) und das Membranprotein Bakteriorhodopsin. Im Vordergrund stand dabei die Analyse der mechanischen Stabilität von Sekundärstrukturen.

PEG ist aufgrund seiner ungewöhnlich hohen Wasserlöslichkeit eines der wichtigsten Polymere mit einer Vielzahl von technischen Anwendungen. Es wurden Messungen zur Elastizität einzelner PEG in Abhängigkeit des Lösungsmittels durchgeführt. Mit diesen Messungen konnte der genaue molekulare Mechanismus nachvollzogen werden, der zu der hohen Wasserlöslichkeit führt. Zudem konnte gezeigt werden, wie mit einem einfachen Modell neben Konformationsänderungen auch Konformationsenergien des Polymers quantitativ bestimmt werden können.

Die Kraftspektroskopie als Instrument zur Untersuchung von mechanisch induzierten Strukturänderungen, z.B. der Proteinentfaltung, wurde bisher immer nur auf polymere Strukturen angewendet. Ziel der Messungen an Bakteriorhodopsin war es zu zeigen, dass sich diese Technik auch auf Moleküle anwenden lässt, die nicht aus sich wiederholenden Einheiten aufgebaut sind. Es konnte der genaue Entfaltungsweg von Bakteriorhodopsin mit all seinen stabilen Zwischenstrukturen bestimmt werden. Mechanismen der Stabilisierung wie die Nachbarschaft von Helices, hydrophobe Wechselwirkung und der Einfluss räumlicher Einschränkung konnten dabei in ihren Auswirkungen auf die Stabilität der Proteinstruktur beobachtet werden.

2. Einleitung

In den letzten Jahren wurden mehrere Techniken entwickelt, die es ermöglichen, Experimente mit einzelnen Molekülen durchzuführen. Angetrieben wurde diese Entwicklung zum einen durch den Wunsch, die physikalischen Grenzen der Miniaturisierung zu erfahren. Leitfähigkeitsmessungen an einzelnen Molekülen zeigen, wie auf kleinster Skala die elektrische Leitfähigkeit durch quantenmechanische Eigenschaften bestimmt wird. Zum anderen lassen sich bei klassischen Messungen an einem ganzen Ensemble nur durchschnittliche Eigenschaften bestimmen. Fluoreszenzspektroskopie an einzelnen Molekülen zeigt den für jedes Molekül individuellen Einfluss seiner Umgebung auf seine optischen Eigenschaften. Auch Fluktuationen in der Zeit, die bisher im Mittel verschwanden, lassen sich damit beobachten.

In letzter Zeit hat sich besonders das Kraftmikroskop als vielversprechender Zugang zum Experiment mit einzelnen Molekülen herausgestellt. Gegenüber anderen Techniken zeichnet es sich durch zwei wesentliche Eigenschaften aus: Zum einen lassen sich Oberflächen mit \AA Auflösung abbilden, ohne die Probe zu beschädigen. Im Gegensatz dazu deponiert in einer optischer Abbildung jedes Photon bereits bei 300 nm Auflösung 150 K_BT, genug, um kovalente Bindungen in biologischen Molekülen zu brechen. Dies führt zur Zerstörung dessen, was eigentlich untersucht werden soll. Elektronen erreichen diese Energie zwar erst bei ca. 1 nm Auflösung, doch die für die Elektronenmikroskopie nötigen Umgebungsbedingungen verhindern eine hochauflösende Abbildung einzelner Biomoleküle. Die Energie, die beim Abtasten der Oberfläche mit der Spitze des Kraftmikroskops deponiert wird, ist dagegen unabhängig von der Auflösung stets von der Größenordnung K_BT. Zum anderen lassen sich Kräfte messen und in definierter Weise auf die Probe ausüben. Klassischen Ensemblemessungen sind Kräfte, die in und zwischen Molekülen wirken, da es sich um vektorielle Größen handelt, nicht zugänglich.

In dieser Arbeit wird beschrieben, wie sich mit der Technik der Kraftspektroskopie einzelne Polymere einer mechanischen Belastung aussetzen lassen, wobei zugleich ihre Antwort in Form einer Längenänderung gemessen

werden kann. Lösungsmittelabhängige Messungen an Poly(ethylen Glycol) (PEG) zeigen, wie sich die Entfaltung einer Überstruktur in den gemessenen Kraft-Dehnungs-Kurven äußert. Angewendet wird diese Technik dann auf die kontrollierte Entfaltung einzelner Proteine. Messungen an Bakteriorhodopsin zeigen, wie es die hohe räumliche Auflösung des Kraftmikroskopes in Kombination mit seiner großen Kraftsensitivität ermöglicht, einzelne Moleküle zu manipulieren. Es werden einzelne Proteine durch Abbilden "sichtbar" gemacht, ein individuelles Protein ausgewählt und sein Entfaltungspfad unter mechanischer Belastung beobachtet.

3. Die Kraftspektroskopie

Unter Kraftspektroskopie wird hier das Ausüben einer Zugkraft auf eine Probe bei gleichzeitiger Detektion der resultierenden Längenänderung verstanden. Dies lässt sich mit verschiedenen in den letzten Jahren entwickelten Techniken wie Mikropipetten und magnetische Mikrokugeln verwirklichen. Mit optischen Pinzetten wurde bereits 1996 von Smith et al. (1) ein einzelnes DNA-Molekül kraftspektroskopisch vermessen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Messungen mit dem Kraftmikroskop durchgeführt.

3.1. Das Kraftmikroskop

Das Kraftmikroskop wurde 1986 von Binnig et al. (2) aus dem Tunnelmikroskop entwickelt, um auch nicht-leitende Oberflächen abbilden zu können. Wie beim Tunnelmikroskop wird mit einer scharfen Spitze die Probe abgerastert und die Höhenstruktur vermessen. Die informationsgebende Messgröße ist dabei aber nicht der Tunnelstrom, sondern die Kraft, die im Kontakt mit der Probe auf die Spitze wirkt.

Als Kraftsensor dient eine kleine Blattfeder, an deren Ende die Spitze sitzt (Abb. 1). Eine auf die Spitze ausgeübte Kraft bewirkt eine Verbiegung der Feder, die mittels eines Lichtzeigers mit sub Å Genauigkeit detektiert werden kann. Dazu wird ein Laserstrahl auf die Blattfeder fokussiert und der Reflex von einer Zweisegment-Photodiode aufgefangen. Eine Verbiegung der Feder bewirkt dann ein Wandern des Reflexes auf der segmentierten Photodiode und damit eine Änderung der Spannungsdifferenz zwischen den beiden Segmenten. Für kleine Auslenkungen der Feder ist die Spannungsdifferenz direkt proportional zur Auslenkung. Kennt man die Federkonstante der Blattfeder, lässt sich aus der Auslenkung direkt die auf die Probe ausgeübte Kraft bestimmen. Die Spitze kann mit Piezostellelementen über die Probe gerastert und auf und ab bewegt werden. Der Radius der Spitze liegt im Nanometer-Bereich und ist damit bereits von der selben Größenordnung wie einzelne Moleküle. Diese lassen sich damit einfach ansprechen und einer mechanischen Belastung aussetzen. Ausgeübte Druckkräfte verteilen sich dabei auf

das gesamte Molekül und wirken nicht in definierter Richtung. Verankert man das Molekül zwischen Spitze und Unterlage und übt eine Zugkraft aus, so greift diese je nach Verankerungspunkt in definierter Weise an der molekularen Struktur an. Konformationsänderungen lassen sich dann bei Dehnung des Moleküls als Längenänderungen beobachten.

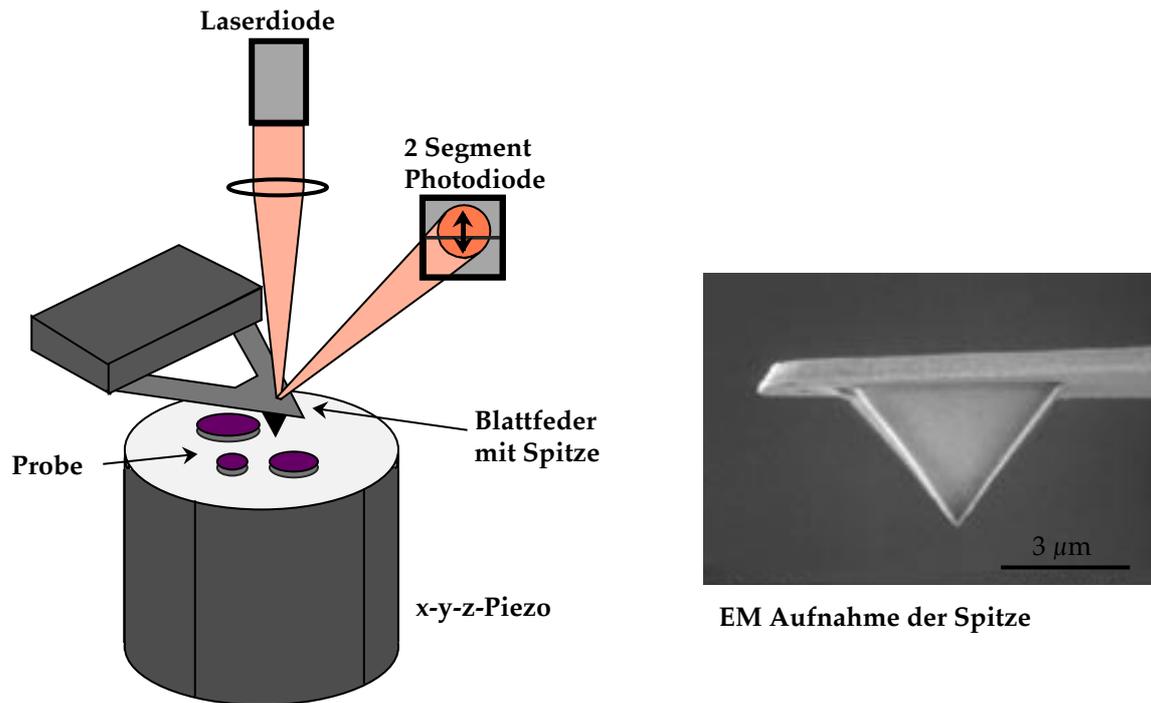


Abb. 1: Das Herzstück des Kraftmikroskopes besteht aus einer 200 µm langen Blattfeder, an deren Ende eine sehr feine Spitze befestigt ist. Die Auslenkung der Feder wird über einen Lichtzeiger gemessen und mit einer Photodiode direkt in ein Spannungssignal übersetzt. Mit Piezo-Stellelementen lässt sich die Probe so bewegen, dass die Spitze mit der Probe in Kontakt tritt und diese abrastert.

3.2. Kraftkurven

Um mit der Spitze einzelne Moleküle aufzugreifen, wird sie in Kontakt mit der Probe gebracht, wo das Molekül an die Spitze binden kann, und wieder zurückgezogen, wobei das nun zwischen Spitze und Unterlage eingespannte Molekül einer Zugkraft ausgesetzt und gestreckt wird. Der Weg, um den die Feder dabei bewegt wird, kann entweder aus der Ausdehnungscharakteristik des

Piezostellelementes bestimmt oder mit einem Dehnmessstreifen gemessen werden. Als Kraftkurve bezeichnet man die als Funktion der Dehnung gemessene Kraft.

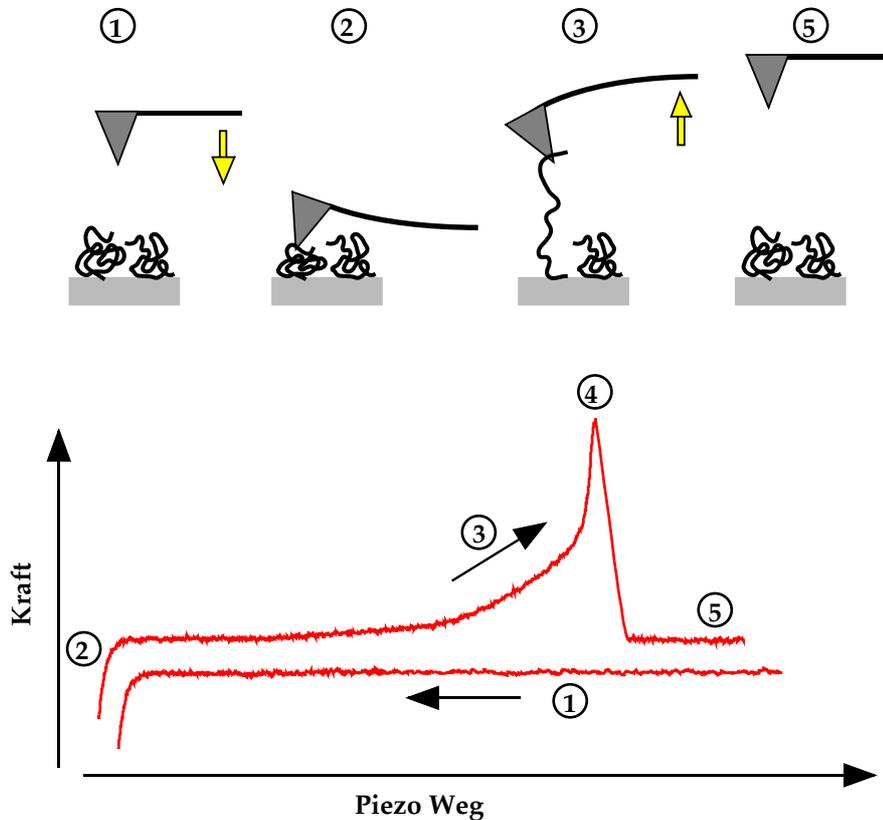


Abb. 2: Um eine Kraftkurve aufzunehmen, nähert man die Spitze bis zum Kontakt an (2) die Probe an. Bindet ein Molekül in der Kontaktphase an die Spitze, wird es beim Zurückziehen gestreckt (3), während die am Molekül anliegende Kraft als Auslenkung der Feder gemessen wird. Reißt das Molekül ab (4), schnappt die Spitze zurück in die Ruhelage.

Abbildung 2 zeigt schematisch ein solches Experiment und die entsprechende Kraftkurve. Beachtet werden muss dabei, dass der mit dem Piezo gefahrene Weg nicht direkt die Länge des gestreckten Moleküls wiedergibt. Um diese Länge, d.h. den Abstand zwischen Spitze und Unterlage zu erhalten, muss vom Piezoweg noch die Auslenkung der Feder subtrahiert werden. Erst dann erhält man ein Kraft-Längen-Diagramm, das zeigt, welche Kraft nötig ist, um das eingespannte Molekül auf eine bestimmte Länge zu dehnen.

3.3. Einzelmolekül-Kraftspektroskopie am Beispiel Dextran

Im folgenden soll am Beispiel Dextran zunächst beschrieben werden, wie mit der Technik der Kraftspektroskopie einzelne Polymere einer mechanischen Belastung ausgesetzt werden können und zugleich ihre Antwort in Form einer Längenänderung gemessen werden kann.

Dextran ist ein linearer Polyzucker aus alpha 1-6 verknüpften Dextrose-Einheiten mit einem MW von 500 kD und 1.2 μm Länge. Da Polymere aus identischen sich wiederholenden Einheiten aufgebaut sind, spielt es keine Rolle, welcher Teil des Polymers zwischen Spitze und Unterlage eingespannt wird. Der Strang wird, abgesehen von seiner Länge, stets dieselben, für das Polymer charakteristischen elastischen Eigenschaften aufweisen. Es ist daher nicht nötig, das Polymer an vorgegebenen Punkten spezifisch zu verankern, sondern man kann zur Verankerung unspezifische Wechselwirkungen des Moleküls mit der Oberfläche von Spitze oder Unterlage ausnutzen.

Um Dextran an eine Unterlage adsorbieren zu lassen, genügt es, eine wässrige Dextranlösung auf einem im Ultraschall gereinigten Glas-Objekträger eintrocknen zu lassen und anschließend nicht adsorbiertes Dextran abzuspülen. Um lose Enden oder Schlaufen der adsorbierten Polymere an der glasähnlichen Siliziumnitrid-Spitze zu verankern, lassen sich ebenso unspezifische Wechselwirkungen ausnutzen. Die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Polymer in der Kontaktphase einer Kraftkurve an die Spitze adsorbiert, lässt sich über die Kontaktkraft und Dauer steuern.

Da das Polymer aus sich wiederholenden Einheiten aufgebaut ist, muss die Dehnung des Moleküls bei jeder anliegenden Kraft stets proportional zur Anzahl der gedehnten Einheiten, d.h. zur Länge des eingespannten Teils, sein. Skaliert man alle Kraft-Dehnungs-Kurven, die an einem einzelnen Molekül gemessen wurden, auf eine Einheitslänge, z.B. die Monomerlänge, so erhält man für alle gemessenen Kurven eine identische Einheitskurve. Umgekehrt ist das Kriterium der Skalierbarkeit der gemessenen Kraftkurven ein scharfes Kriterium, um Messungen an einzelnen Molekülen von denen an mehreren parallel eingespannten zu unterscheiden. In der Einheits-Kraftkurve werden die Charakteristika des untersuchten Polymers sichtbar. Für verschiedene Polyzucker wird jeweils ein

eigener "Fingerabdruck" sichtbar (3). Dextran zeigt bei einer Kraft von 750 pN eine Schulter, in der sich eine Längenänderung des Polymerrückgrates um 15% widerspiegelt.

MD-Simulationen für die Dehnung eines einzelnen Dextrose-Moleküls haben gezeigt, dass die Ursache der Längenänderung eine Konformationsänderung im Rückgrat des Polymers ist. Unter Zug schnappt bei einer Kraft von 750 pN die C5-C6-Bindung von der kürzeren gauche-in die längere trans-Konformation um. Wenn auch das Umschnappen einer einzelnen Bindung nicht aufgelöst werden kann, so lässt sich doch durch die Hintereinanderschaltung vieler Monomereinheiten die Konformationsänderung einer definierten atomaren Bindung im Polymerrückgrat beobachten.

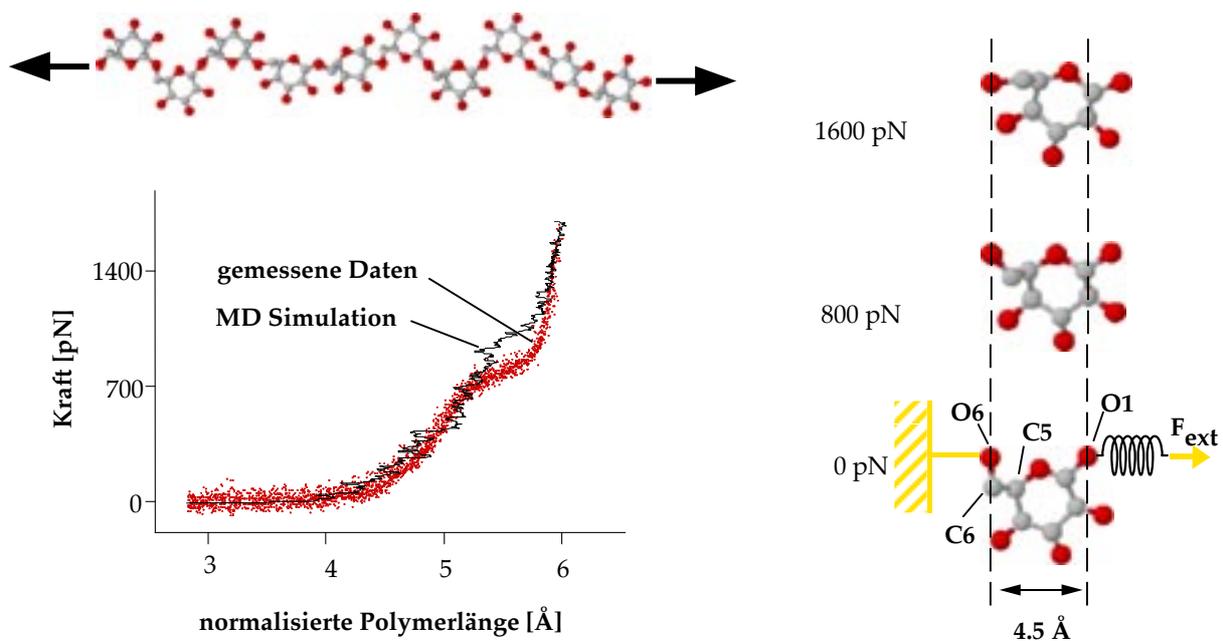


Abb. 3: Dehnt man ein einzelnes Dextranmolekül, ein Polymer aus alpha 1-6 verknüpften Glukoseeinheiten, so findet man eine plötzliche Verlängerung des Polymers bei 750 pN. Molekulardynamiksimulationen zeigen- dass die Verlängerung durch das Umschnappen der C5-C6-Bindung vom gauche-in den trans-Zustand verursacht wird.

4. Kraftspektroskopie an Poly(ethylen glycol)

Poly(ethylen glycol) (PEG) ist wohl das Standardbeispiel für wasserlösliche Polymere. In Blockcopolymeren lässt sich über den Anteil an PEG die Löslichkeit des Polymers einstellen. Da es zugleich völlig untoxisch ist, stört es die Funktion biologischer Moleküle nicht. So kann es auch in Peptiden und Proteinen zur Erhöhung der Löslichkeit eingebaut werden. PEG modifizierte Oberflächen reduzieren die Adsorption von Proteinen. In der Biochemie dient es auch dazu, Membranfusion zu induzieren (4). In biotechnologischen Anwendungen dient es oft dazu, Proteine und andere Moleküle an Oberflächen zu koppeln (5).

All diese technischen Anwendungen von PEG basieren auf seiner ungewöhnlich hohen Wasserlöslichkeit und seiner Fähigkeit, Wasser an sich zu binden. In diesem Kapitel soll gezeigt werden, wie sich die Technik der Einzelmolekül-Kraftspektroskopie darauf anwenden lässt, die Interaktion eines einzelnen Moleküls mit seiner Umgebung zu studieren.

Es werden Experimente vorgestellt, in denen mit Hilfe dieser Technik der genauere Mechanismus der Wasserlöslichkeit von Poly(ethylen-glycol) untersucht werden konnte.

4.1. PEG

PEG ist ein einfaches lineares Polymer ohne Seitengruppen mit der Struktur $\text{OH}-(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_n\text{-H}$. Bei Raumtemperatur ist PEG kristallin mit einem Schmelzpunkt bei 67°C . Im Kristall bilden die Moleküle eine helikale Struktur mit einer Helizität $7/2$ aus und lagern sich parallel zueinander an. In der helikalen Konformation nehmen die C-C-Bindungen alle dieselbe gauche-Konformation an während die C-O-Bindungen in trans-Konformation vorliegen. Die Länge des Polymers in Richtung der helikalen Achse beträgt dabei 2.8 \AA pro Monomer (6). Bei Raumtemperatur liegt es in Lösung in Form einzelner entropischer Knäuel vor. Bei 98°C hat es in wässriger Lösung einen unteren kritischen Punkt in der Löslichkeit, an dem es bei Temperaturerhöhung ausfällt. Darunter ist es in fast beliebig hohen Konzentrationen löslich. Die Ursache hierfür liegt in der Fähigkeit, über das

Dipolmoment des Sauerstoffs je Monomer zwei bis drei Wassermoleküle zu binden (7). IR spektroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass PEG, wenn es in Wasser gelöst ist, wenigstens partiell seine helikale Konformation beibehält, d.h. die C-C-Bindungen fast ausschließlich in gauche-Konformation (8). Gelöst in Wasser nimmt PEG ein viel größeres Volumen ein als in Methanol, wo sich die Überstruktur nicht mehr beobachten lässt (9). Bei gleichem Molekulargewicht nimmt PEG ein viel größeres Volumen ein als Proteine.

PEG ist kommerziell erhältlich mit Molekulargewichten bis zu mehreren Megadaltons und Längen von mehreren μm . Damit lässt sich die Technik der Kraftspektroskopie einfach auf die Untersuchung von einzelnen PEG-Strängen anwenden.

4.2. Kraftmessungen an PEG

4.2.1. Präparation

In den Messungen wurden verschiedene Thiol-endfunktionalisierte PEG verwendet. Die besten Ergebnisse wurden erzielt mit SH-PEG-(CH₃)₃ MW 30.000 und SH-PEG-SH MW 3500, welches über Disulfidbrücken aufpolymerisiert war. Die verwendeten Moleküle wurden von der Firma Shearwater (Shearwater Huntsville, Alabama, USA) bezogen.

Auf der Unterlage wurden die Moleküle über eine Thiol-Gold-Bindung fixiert. Dazu wurden Glasobjektträger im Ultraschallbad gereinigt (1 x 15 min in 2% Hellmanex Lösung, 2 x 15 min in Millipore) und mit 5 nm Chrom-Nickel und 30 nm Gold bedampft. PEG in einer 1mg/ml Lösung in H₂O wurde für 30 min auf die Goldoberfläche gegeben und anschließend mehrmals mit Millipore gespült.

4.2.2. Messungen an PEG

Die Messungen an PEG wurden an einem 1996 von Matthias Rief entworfenen Eigenbau-Kraftspektrometer durchgeführt (10, 11). Für die Messungen wurden Silizium-Nitrid-Cantilever der Firma "Park Scientific Instruments" (Park, Sunnyvale, CA, USA) verwendet. Die Federkonstanten der Federn wurden nach jedem

Experiment mit der Methode des thermischen Rauschens bestimmt (12). Die Anbindung an die Spitze erfolgte durch unspezifische Adsorption in der Kontaktphase der Kraftkurven. Die Elastizität von einzelnen PEG-Molekülen wurde in zwei verschiedenen Umgebungen bestimmt, zum einen in wässriger Umgebung. Dabei wurde Phosphatpuffer mit einem pH von 7.4 (PBS, Sigma, Deisenhofen, pH 7.4, 130 mM NaCl) gewählt, da dieser in Tablettenform zu kaufen ist und einen leicht zu reproduzierenden Standard darstellt. Ein Einfluss des Puffers im Vergleich zu Messungen im reinen Wasser konnte nicht beobachtet werden. Positiv geladene Ionen sollten zwar mit den Dipolmomenten des Rückgrates wechselwirken und die Struktur von PEG beeinflussen, der Effekt scheint jedoch deutlich schwächer zu sein als der Einfluss des Lösungsmittels Wasser. Messungen in Hexadekan (Fluka, Neu-Ulm) zeigten eine deutlich andere Elastizität des Polymers. In Hexadekan ist PEG zwar nicht löslich, aber ein zwischen Spitze und Unterlage eingespanntes Molekül wird bei einer anliegenden Kraft dazu gezwungen, sich dem unpolaren Lösungsmittel auszusetzen.

4.2.3. Elastizität einzelner PEG-Moleküle

In Abbildung 4a sind mehrere in PBS gemessene Kraftkurven verschiedener Länge dargestellt. In b sind alle Kurven auf eine beliebige Einheitslänge skaliert, hier die Monomerlänge von PEG. Alle Kurven überlagern sich exakt, auch wenn sich ihre Längen um bis zu 100% unterscheiden. Dies bedeutet, dass man jeweils die Elastizität unterschiedlich vieler hintereinander gehängter Monomere, d.h. die Elastizität einzelner Polymere, misst. Ebenso skalieren alle in Hexadekan gemessenen Kurven miteinander (Abb. 4c, d). Die Überlagerung der jeweils durch Skalieren erhaltenen "Einheitskurven" zeigt einen deutlichen Unterschied in der Elastizität der in Wasser bzw. Hexadekan gemessenen Kurven (Abb. 4e). Bei kleinen Kräften bis zu 50 pN, wo hauptsächlich entropische Beiträge zur Elastizität eine Rolle spielen, und bei hohen Kräften ab 300 pN, wo das Polymer fast vollständig gestreckt ist und enthalpische Beiträge wie die Verformung von Bindungswinkeln eine Rolle spielen, zeigt PEG in beiden Lösungsmitteln annähernd die gleiche Elastizität. Im Kraftbereich zwischen 50 pN und 300 pN, in dem Konformationsänderungen eine

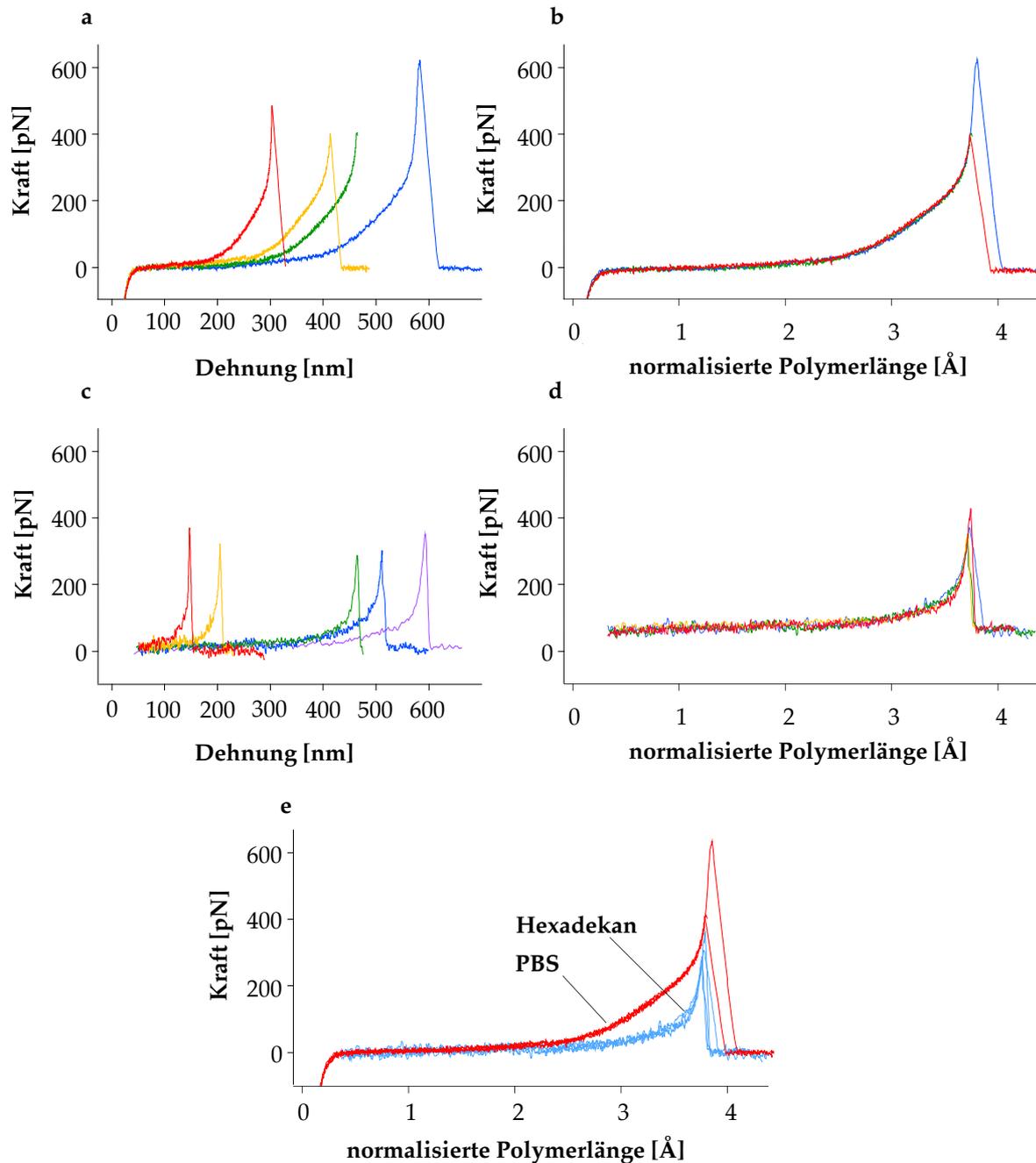


Abb. 4: Kraftkurven, die an Poly(etylen glycol) in Wasser (a, b) und in Hexadekan (c, d) aufgenommen wurden. In a und c sind jeweils mehrere gemessene Kurven dargestellt. In b und d sind dieselben Kurven auf eine Einheitslänge skaliert. Trotz ihrer verschiedenen Längen zeigen sie jeweils die selben relativen Längenänderungen unter mechanischer Belastung. In e sind die Kurven aus b und d überlagert. Das Verhalten von PEG in wässriger Umgebung weicht zwischen 50 pN und 300 pN deutlich von dem in Hexadekan ab.

Rolle spielen, weichen beide Elastizitäten deutlich voneinander ab.

Um entropische Rückstellkräfte zu beschreiben, sind verschiedene Modelle entwickelt worden (12, 13, 14, 15). PEG ist um jede Bindung seines Rückgrates um 360° drehbar. Da PEG keine Seitengruppen besitzt, wird die Drehung einzig durch das Rotationspotential erschwert. Es kommt damit der Idealvorstellung einer völlig flexiblen Kette sehr nahe. Das auf dieser Idee basierende Modell, das als frei bewegliche Kette oder "feely jointed chain" (FJC) (12, 13) bezeichnet wird, wird hier zur Beschreibung der entropischen Rückstellkräfte von PEG verwendet. Die aus diesem Modell hergeleitete Länge L des Moleküls in Abhängigkeit der anliegenden Kraft F ist gegeben durch:

$$L(F) = L_{\max} \cdot \left[\coth\left(\frac{F \cdot l_k}{k_B \cdot T}\right) - \frac{k_B \cdot T}{F \cdot l_k} \right]$$

$L_{\max} = L_{\text{mon}} \cdot N$ ist dabei die Länge der völlig ausgestreckten Kette, die sich aus der Länge der einzelnen Monomere L_{mon} und ihrer Anzahl N ergibt, k_B die Boltzmannkonstante und T die absolute Temperatur. Die Kuhnlänge l_k entspricht in der idealen Kette der Segmentlänge und ist der einzige freie Parameter, der die charakteristische Elastizität einer rein entropischen Kette beschreibt.

Im FJC-Modell steckt die Annahme, dass die Kette eine feste maximale Länge besitzt, was auf ein reales Polymer nicht zutrifft. Denn bei hohen Kräften lassen sich Bindungswinkel der einzelnen Monomere verbiegen und ihre Bindungen dehnen, was dem Polymer eine enthalpische Elastizität verleiht. Dieser Beitrag in der Elastizität der realen Kette lässt sich im FJC-Modell berücksichtigen, indem man bei der Herleitung des FJC-Modells eine Elastizität der einzelnen Kettenglieder einführt und bei der Berechnung der Zustandssumme für ein Polymer unter Zug die Energie der gestreckten Kettenglieder berücksichtigt. In den meisten Fällen ist die Elastizität der Kettenglieder groß im Vergleich zur entropischen Elastizität des Polymers. Man kann dann, anstelle dieser komplizierten Berechnung, in guter Näherung die beiden Beiträge separat behandeln, indem man zur entropischen Elastizität einen Term für die enthalpische Elastizität der einzelnen Monomere hinzufügt (12):

$$L = L_{\max} \cdot \left[\coth\left(\frac{F \cdot l_k}{k_B \cdot T}\right) - \frac{k_B \cdot T}{F \cdot l_k} \right] + \frac{N}{D} \cdot F$$

D ist dabei die Federkonstante, welche die Elastizität eines einzelnen Monomers beschreibt und N die Anzahl der Monomere.

Die in Hexadekan gemessenen Kraftkurven lassen sich mit diesem Modell der entropischen Elastizität beschreiben. Aus einem Fit an die Messdaten erhält man eine Kuhnlänge von 7\AA und eine Elastizität pro Monomer von 120 N/m . Die in Wasser gemessenen Kurven lassen sich mit diesem Modell nicht beschreiben (Abb. 5).

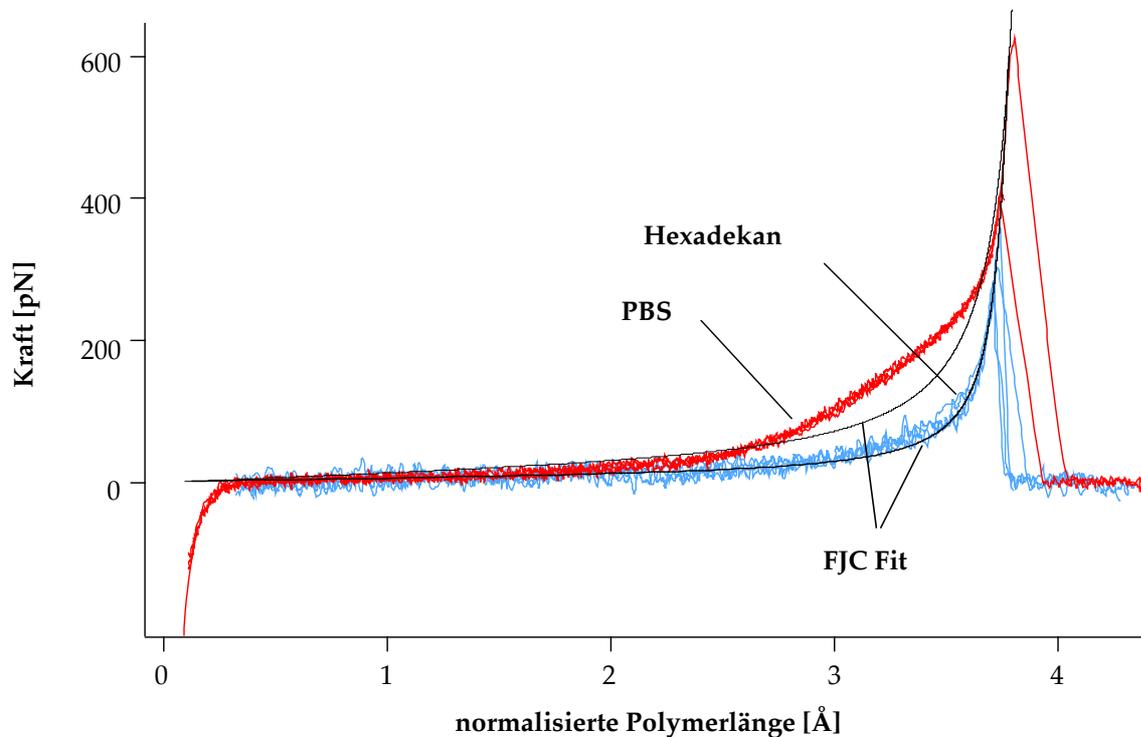


Abb. 5: Die Dehnung von PEG in Hexadekan lässt sich sehr gut mit dem erweiterten Modell der frei beweglichen Kette (FJC) beschreiben. Das Verhalten von PEG in wässriger Umgebung zeigt dagegen ein völlig anderes Verhalten und lässt sich mit diesem Modell nicht beschreiben.

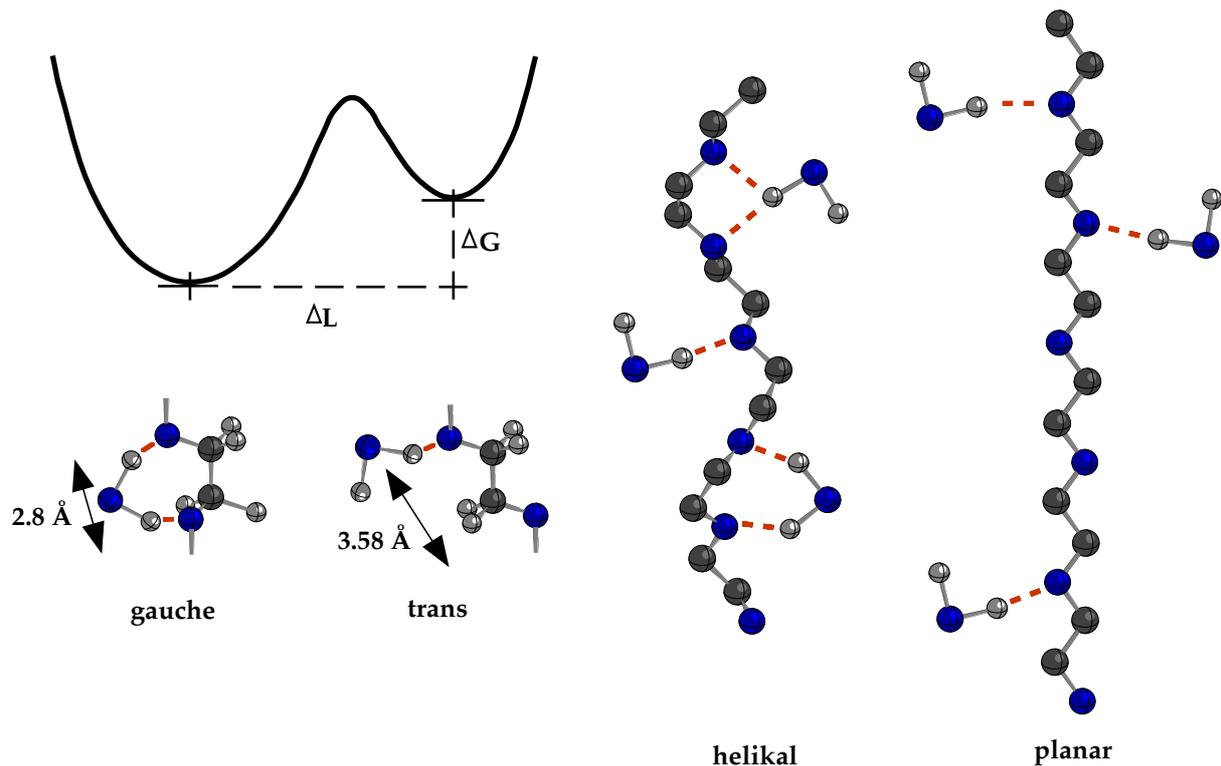


Abb. 6: Befindet sich die C-C-Bindung des Rückgrates in der gauche-Konformation, kann sich eine Wasserbrücke zwischen zwei aufeinanderfolgenden Sauerstoffatomen ausbilden. Im trans-Zustand ist dies nicht möglich. Durch die Wasserbrücke wird die gauche-Konformation gegenüber der trans-Konformation energetisch begünstigt. Die Einführung von gauche-Konformationen für die C-C Bindungen führt zu einer ähnlichen helikalen Struktur, wie sie auch im kristallinen PEG vorliegt.

Die Ursache für die unterschiedliche Elastizität in Wasser und Hexadekan lässt sich in der spezifischen Wechselwirkung des Lösungsmittels Wasser mit dem gelösten Polymer PEG finden. Wassermoleküle bilden Wasserstoffbrücken zum Sauerstoff des Rückgrates aus. Dabei kann sich auch eine Wasserbrücke zwischen zwei aufeinanderfolgenden Sauerstoffatomen ausbilden (16). Dies ist aber nur möglich, wenn sich die C-C-Bindung des Polymers im gauche-Zustand befindet, in dem sich die Sauerstoffatome in einem ähnlichen Abstand zueinander befinden wie die Wasserstoffatome des Wassers (Abb. 6). Das Ausbilden einer Wasserbrücke ist mit einem deutlichen Energiegewinn verbunden (16). Durch Ausbilden einer Wasserbrücke zwischen zwei im Rückgrat aufeinanderfolgenden Sauerstoffatomen wird also die gauche-Konformation der C-C-Bindung gegenüber der trans-

Konformation energetisch begünstigt. Es bildet sich dadurch lokal eine helikale Überstruktur, ähnlich der kristallinen Helix aus (lokal in dem Sinne, dass, wie in der kristallinen Struktur die C-C-Bindung die gauche-Konformation bevorzugt, der Drehsinn der gauche-Konformation aber nicht einheitlich ist). Um das Molekül ganz auszustrecken, muss man die kürzeren gauche-Zustände unter Aufbrechen der Wasserbrücken in die längere trans-Konfiguration strecken, d.h. die helikale Überstruktur in eine gestreckte Konfiguration, in der sich alle Bindungen des Polymers im trans-Zustand befinden, überführen. Die helikale Überstruktur muss unter Aufwendung der Bindungsenergie des Wassers entfaltet werden, (genau genommen nur der Bindungsenergieunterschied zwischen einer Wasserbrücke und einer Wasserstoffbrückenbindung des Wassers an den Sauerstoff, wenn man annimmt, dass die Wasserbrücken beim Dehnen zwar zerstört werden, das Wasser aber an einem der beiden Sauerstoffatome gebunden bleiben kann).

4.3. Zweizustands-Modell

Um den in Wasser gemessenen Einfluss der Überstruktur auf die Elastizität des Polymers beschreiben zu können, muss das rein entropische Modell erweitert werden. Jedes Kettenglied kann eine kürzere, energetisch günstigere oder eine längere, energetisch höhere Konformation annehmen. Die Länge der einzelnen Kettenglieder wird definiert durch ein Potential mit zwei unterschiedlich tiefen Minima, welche die wahrscheinlichsten Längen angeben. Mit einem solchen Potential lässt sich aber die Zustandssumme des Polymers unter Zug nicht mehr geschlossen berechnen. Um dies zu umgehen, werden entropische und enthalpische Beiträge näherungsweise als unabhängig voneinander betrachtet. In der Langevinfunktion, welche die entropischen Beiträge beschreibt, wird die Gesamtlänge L_{\max} variabel gehalten und aus der Anzahl und Länge der Monomere in gauche- bzw. trans-Konformation bestimmt:

$$L_{\max} = N_{\text{gauche}} \cdot L_{\text{gauche}} + N_{\text{trans}} \cdot L_{\text{trans}}$$

Es muss nun noch in Abhängigkeit der anliegenden Kraft die Anzahl N_{gauche} und N_{trans} bestimmt werden.

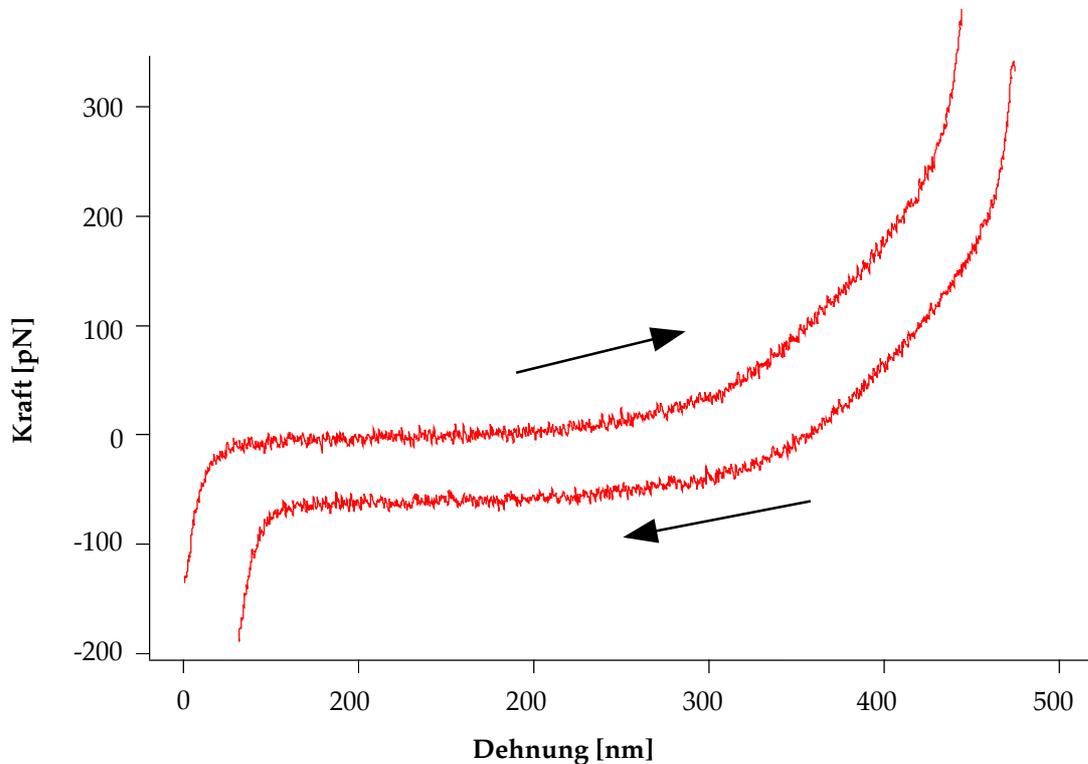


Abb. 7: Dehnt man ein PEG nur soweit, dass es noch nicht abreißt, lässt sich auch sein Verhalten während des Entspannens beobachten. Dies unterscheidet sich nicht von dem während des Dehnens. Das Polymer befindet sich also stets im thermischen Gleichgewicht. Die Kurven sind gegeneinander verschoben dargestellt.

Dazu betrachte man Abbildung 7. Sie zeigt eine Kraftkurve an einem PEG, bei der das Molekül gedehnt und wieder entspannt wurde, bevor sich die Anbindung an die Spitze gelöst hat. Dehnungs- und Entspannungskurve unterscheiden sich innerhalb der durch das thermische Rauschen gegebenen Grenzen überhaupt nicht. Dies bedeutet, dass Konformationsänderungen, die während des Dehnens stattfinden, auf einer wesentlich kleineren Zeitskala ablaufen als die Messung. Das eingespannte Molekül befindet sich also stets im thermischen Gleichgewicht. Ob sich eine C-C-Bindung also im trans- oder energetisch günstigeren gauche-Zustand

befindet, lässt sich daher aus einer Boltzmannverteilung über dem Energieunterschied des trans- bzw. gauche-Zustandes ermitteln:

$$\frac{N_{\text{gauche}}}{N_{\text{trans}}} = e^{\Delta E/k_B \cdot T}$$

Der Energieunterschied der beiden Zustände wird bestimmt durch die Bindungsenergie des Wassers ΔG und die beim Strecken durch die momentan anliegende Kraft geleistete Arbeit

$$\Delta E = \Delta G - F \cdot (L_{\text{trans}} - L_{\text{gauche}})$$

Als erweiterte Funktion für die Elastizität ergibt sich damit:

$$L(F) = N \cdot \left(\frac{L_{\text{trans}}}{e^{-\Delta E/k_B \cdot T} + 1} + \frac{L_{\text{gauche}}}{e^{+\Delta E/k_B \cdot T} + 1} \right) \cdot \left[\coth\left(\frac{F \cdot l_k}{k_B \cdot T} \right) - \frac{k_B \cdot T}{F \cdot l_k} \right] + \frac{N}{D} \cdot F$$

Mit diesem Modell lassen sich die in Wasser gemessenen Kurven sehr genau beschreiben (Abb. 8). Für die Kuhnlänge und Monomerelastizität wurden die Werte, wie sie sich aus den Messungen in Hexadekan ergaben- eingesetzt. Für die gestreckte trans-Konfiguration erhält man bei tetraedrischen Winkeln des Rückgrates und Bindungslängen von 1.54 Å für die C-C-Bindung und 1.43 Å für die C-O-Bindung eine Monomerlänge von 3.58 Å. Durch empirisches Anpassen der noch freien Parameter Energiedifferenz und Länge der gauche-Konformation L_{gauche} wurde das Modell der erweiterten Langevin Funktion den Messkurven angepasst.

Für die gauche Konformation erhält man $L_{\text{gauche}} = 2.8 \pm 0.05 \text{ \AA}$, dieselbe Länge wie in der helikalen Konformation im kristallinen Zustand (6). Diese Messungen zeigen in Übereinstimmung mit IR spektroskopischen Messungen (8), dass die helikale Konformation durch die Wechselwirkung mit dem Wasser auch in Lösung erhalten bleibt.

Für den Energiegewinn beim Ausbilden einer Wasserbrücke zwischen zwei Monomeren, den Energieunterschied ΔG zwischen gauche- und trans-Konfiguration, erhält man $3 \pm 0.3 \text{ KbT}$. Quantenmechanische ab initio-Berechnungen zur

Hydratisierung von PEG in verschiedenen Konformationen von Wang et al. (16) bestätigen diesen Wert.

Für ein Trimer wurde von Kreuzer et al. basierend auf den diesen quantenmechanisch berechneten Potentialen mit statistischer Mechanik die exakte Kraft-Dehnungs-Abhängigkeit berechnet (17). Diese Berechnungen beschreiben quantitativ die Messungen an PEG sowohl in Wasser als auch in unpolarer Umgebung.

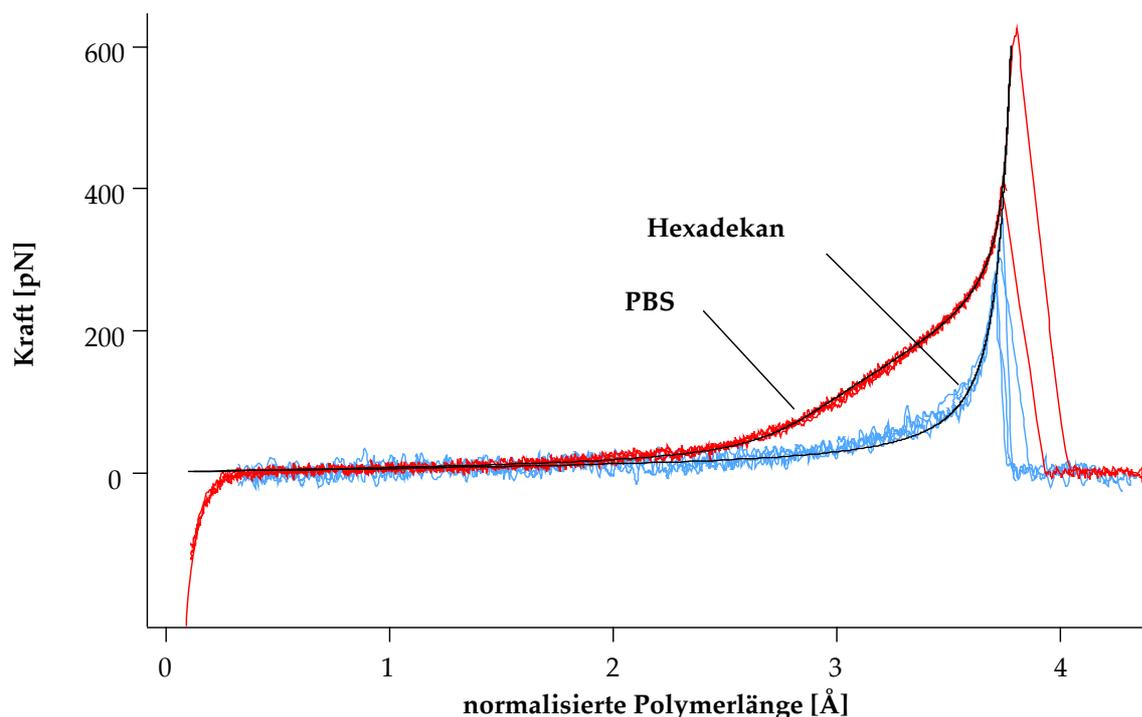


Abb. 8: Mit dem zwei-Zustands-Modell lassen sich die in wässrigem Medium gemessenen Kurven exakt beschreiben. Aus dem reinen FJC-Fit an die Hexadecan-Kurven erhält man 7Å für die Kuhnlänge von PEG und 120 N/m für die Elastizität der einzelnen 3.58 Å langen Monomere. Aus dem zwei-Zustands-Fit erhält man zusätzlich 2.8 Å für die Länge der Monomere in gauche-Konformation und $3 k_B T$ für die Energie einer Wasserbrücke.

Abbildungen 9 und 10 zeigen die Genauigkeit, mit der die Parameter L_k und ΔG aus dem Fit bestimmt werden können. L_k bestimmt die entropische Rückstellkraft, die bei kleinen Kräften die Elastizität dominiert. Eine Erhöhung von ΔG vergrößert die Fläche unter der Kurve, indem sie zwischen 50 und 250 pN die

Kraft erhöht. Eine Änderung der Länge L_{gauche} verändert im wesentlichen nur die Form der Kraftkurve. Wird L_{gauche} größer, d.h. ΔL kleiner, muss die Bindungsenergie ΔG über einen kürzeren Weg aufgebracht werden, d.h. die Steigung der Kraftkurve im Bereich des Konformationsübergangs verläuft steiler.

Mit diesem einfachen zwei-Zustands-Modell lässt sich die Energie, die in dem gestreckten Polymer steckt, von einer Konformations- oder Bindungsenergie trennen, während gleichzeitig eine charakteristische Länge der Konformationsänderung bestimmt wird. Dass sich in diesem Modell die Verteilung der Zustände über eine Boltzmannverteilung bestimmen lässt, zeigt, dass die helikale Überstruktur von PEG ein Beispiel für eine völlig unkooperative Sekundärstruktur darstellt.

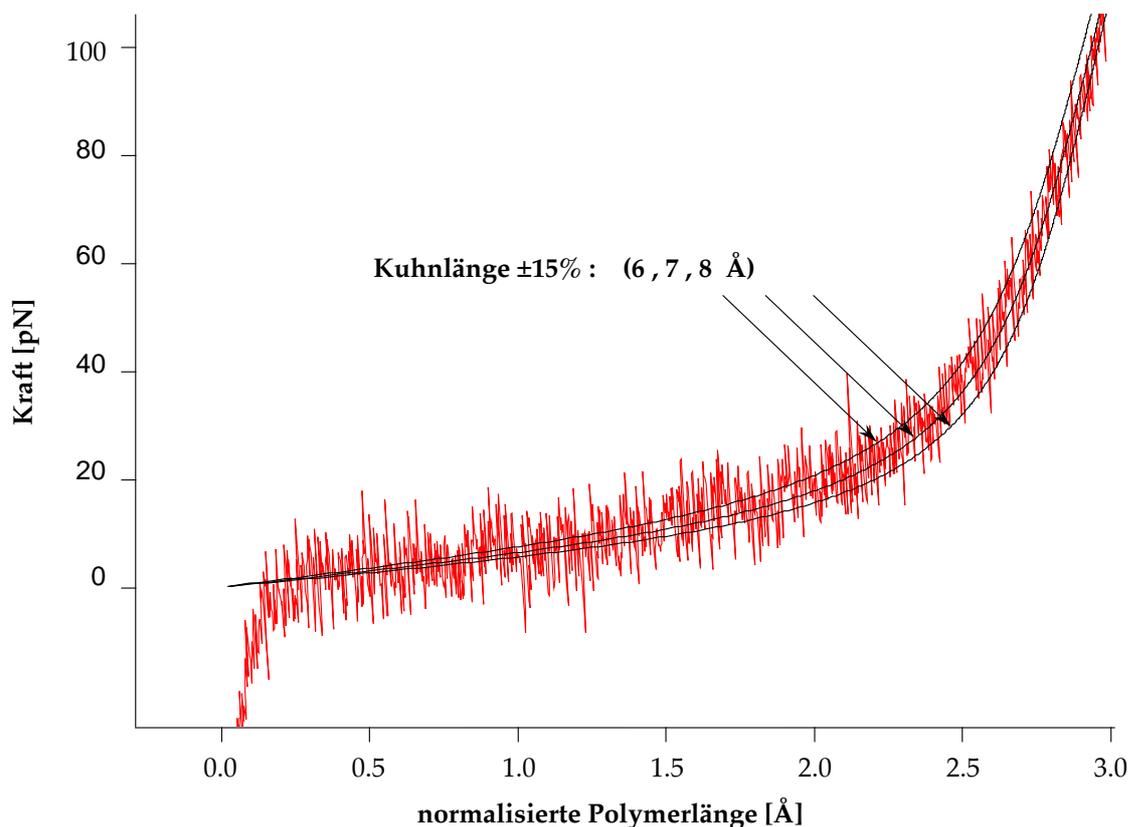


Abb. 9: Die Kuhnlänge bestimmt die Elastizität bei kleinsten Kräften. Aus der Steigung der Kraftkurven bei Kräften unter 20 pN erhält man eine Kuhnlänge von $7 \pm 1 \text{ \AA}$.

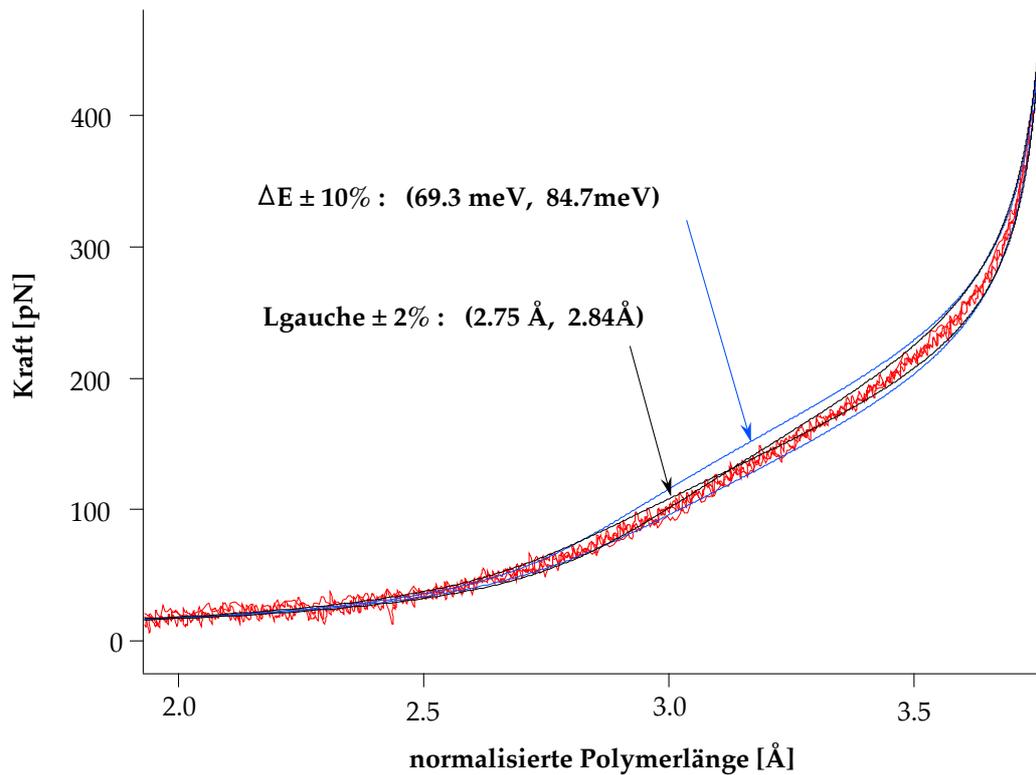


Abb. 10: Die Energie, die zum Aufbrechen der Wasserbrücken benötigt wird, ist proportional zur Fläche, die von den Kraftkurven in Wasser und Hexadekan eingeschlossen wird. Eine höhere Konformationsenergie ΔE vergrößert die Fläche unter der in Wasser gemessenen Kurve. Die Länge L_{gauche} bestimmt, über welche Strecke die Energie aufgebracht werden muss und ändert daher die Steigung im Bereich des Konformationsübergangs.

5. Entfaltung von Proteinen

Spannt man ein Protein zwischen Spitze und Unterlage ein und setzt es einer mechanischen Belastung aus, kann man beobachten, welche Kräfte zum Entfalten nötig sind und welche Längenänderungen während des Entfaltens auftreten. Damit lässt sich Information über Struktur und Stabilität eines Proteins gewinnen.

Das Problem der Proteinfaltung ist auch heute noch nicht gelöst. Auch mit heutigen "Superrechnern" ist die eindeutige Vorhersage einer Proteinstruktur aufgrund der Komplexität des Problems noch nicht möglich. Strukturen müssen experimentell charakterisiert werden. Neben den strukturgebenden Techniken Röntgenbeugung an Proteinkristallen und NMR-Spektroskopie, die sehr aufwendig sind, werden auch andere Methoden verwendet, um Strukturinformationen über das Protein zu erhalten. Mit Techniken wie Zirkulardichroismus, Infrarot-, und Raman-Spektroskopie lässt sich der Anteil an Sekundärstrukturelementen innerhalb der Proteinstruktur bestimmen. Da mit der Kraftspektroskopie neben Energien auch Konformationslängen gemessen werden können, stellt sie einen neuen Zugang zur Strukturinformation dar.

Für die Funktionalität einer Vielzahl von Proteinen ist ihre mechanische Stabilität wesentlich. Motorproteine, die mechanische Arbeit verrichten, Rezeptor-Ligand-Systeme und Proteine, die zur passiven mechanischen Stabilisierung in fast jedem Organismus dienen, müssen Kräften widerstehen. Die Stabilität von Proteinen wird definiert über die thermische oder chemische Denaturierung, welche mittels differentieller scanning-Kalorimetrie (DSC) gemessen wird.

Die mechanische Stabilität hängt aber davon ab, welcher Kraft eine Struktur widerstehen kann. Diese ist aber als vektorielle Größe den üblichen Ensemblemessungen nicht zugänglich. Zugleich birgt die Kraft, die nötig ist, um eine Struktur zu entfalten, aber eine ungleich detailliertere Information, da sie in verschiedenen Richtungen unterschiedlich wirkt.

Im folgenden soll anhand von bekannten Beispielen eine Einführung in die Entfaltung von Sekundärstrukturelementen gegeben werden.

5.1. Entfaltung von Proteinen am Beispiel Titin

Ein Protein, an dem bereits erfolgreich die Technik der Kraftspektroskopie angewendet wurde, ist das Muskelprotein Titin. Es dient, im Muskel parallel zu den Aktin- und Myosin-Filamenten eingebaut, als passives elastisches Element und schützt ihn vor Überdehnung. Es ist das größte bekannte Protein mit einem Molekulargewicht von 3000 kD und hat im gestreckten, aber gefalteten Zustand eine Länge von mehr als 1 μm . Titin besitzt eine modulare Struktur. Es ähnelt einer Perlenkette aus über 200 Immunoglobulin (Ig) und Fibronectin (Fn) Beta-Faltblatt-Domänen. Jede Domäne besteht aus ca. 100 Aminosäuren, die sich mit insgesamt 7 antiparallelen Strängen in zwei aufeinander liegenden Beta-Faltblättern anordnen. Dabei werden die hydrophoben Reste im Inneren der Struktur verborgen und die hydrophilen dem umgebenden Wasser zugewandt. Beim Entfalten der Struktur werden die Wasserstoffbrücken der Beta-Faltblattstruktur aufgebrochen und die inneren hydrophoben Reste hydratisiert.

Die polymere Struktur erleichtert das Experiment ungemein. Man kann zum Verankern des Proteins zwischen Spitze und Unterlage wie bei Polymeren die unspezifische Wechselwirkung mit Oberflächen ausnutzen. Unabhängig von den Ankopplungspunkten sind immer mehrere Domänen, an denen die Kraft anliegt, zwischen Spitze und Unterlage eingespannt.

Nimmt man eine Kraftkurve an einem eingespannten Titin-Molekül auf, erhält man ein typisches Sägezahnmuster (Abb. 11). Die Anstiege zu den einzelnen Spitzen lassen sich alle auf eine Einheitslänge skalieren bzw. lassen sich alle mit ein und derselben Kuhnlänge anfitten, was zeigt, dass man immer nur einen einzelnen Aminosäurestrang dehnt (s. Kapitel Einzelmolekül-Kraftspektroskopie am Beispiel Dextran), welcher nach jeder Spitze plötzlich länger wird. Die Abstände der Spitzen entsprechen genau dem Längenunterschied zwischen einer gefalteten Domäne und dem entsprechenden entfalteten Aminosäurestrang. Jede Spitze reflektiert also die Entfaltung einer einzelnen Domäne.

Die Elastizität des entfalteten Aminosäurestranges lässt sich gut mit dem sogenannten "worm like chain"-Modell (WLC) (12) beschreiben. Im Kraftbereich bis 50 pN lässt sich die Elastizität mit einer Persistenzlänge von 8 Å , bei höheren Kräften, bei denen auch die Elastizität der Bindungswinkel eine Rolle spielt, mit

einer Persistenzlänge von 4 \AA beschreiben. Man erhält damit einen universellen Standard für die Elastizität eines entfalteten Aminosäurestranges.

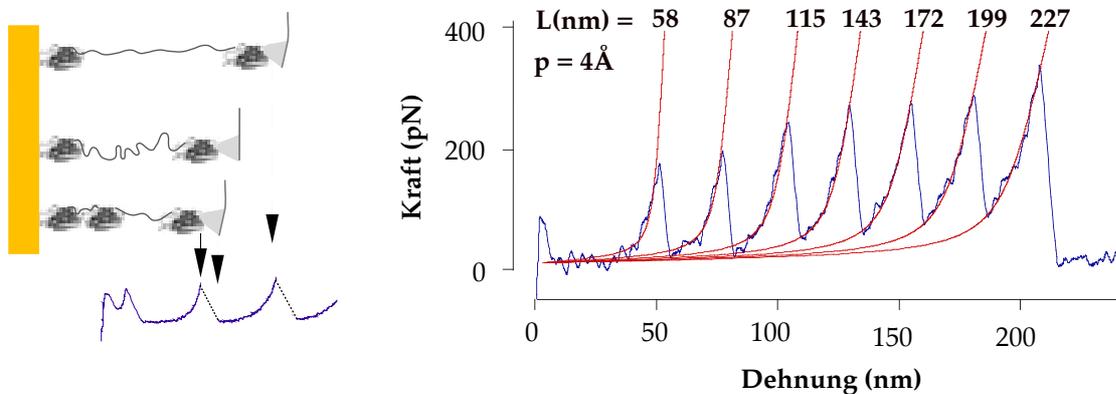


Abb. 11: Dehnt man ein einzelnes Titin-Molekül, entfalten bei etwa 200 pN die einzelnen Beta-Faltblatt-Sekundärstrukturelemente. Die Anstiege zu den Kraftspitzen lassen sich mit dem WLC-Modell beschreiben, wobei man für alle Spitzen dieselbe Persistenzlänge erhält. Die Längenänderung nach jeder Spitze entspricht genau dem Betrag einer entfalteten Domäne.

Interessanterweise wurden bei der Entfaltung der Domänen keine Zwischenschritte beobachtet. Die Entfaltung der Beta-Faltblatt-Domänen passiert hier also in einem alles oder nichts Prozess. In Messungen von Marszalek et al. an Konstrukten von punktmultierten Titin-Domänen konnte ein veränderter Entfaltungspfad beobachtet werden. Das Aufbrechen der stabilisierenden Wasserstoffbrücken passierte in zwei Schritten (18).

Titin besteht aus einer Vielzahl von Domänen, die sich in Struktur und Anzahl der Aminosäuren geringfügig voneinander unterscheiden. Messungen an Konstrukten aus verschiedenen Bereichen des Moleküls, bestehend aus mehreren jeweils gleichen Domänen, zeigen unterschiedliche Entfaltungskräfte und Spitzenabstände in sehr guter Übereinstimmung mit ihrer Struktur (19). Dies zeigt, dass die Technik der Kraftspektroskopie sensitiv genug ist, um noch Strukturunterschiede innerhalb einer Sekundärstruktur unterscheiden zu können.

Ist das Protein einmal eingespannt, lässt sich damit eine Vielzahl von Experimenten durchführen. So ist die Stabilität von Titin-Domänen in Abhängigkeit

von verschiedenen Umgebungsbedingungen bestimmt worden. Auch Rückfaltung lässt sich an einem derartigen System unter verschiedensten Umgebungsbedingungen beobachten (20). Man entspannt dazu den entfalteten Aminosäurestrang wieder, bevor er von der Spitze abreißt, um ihn nach verschiedenen langen Wartezeiten nochmals zu dehnen. Die Anzahl der Domänen, die sich innerhalb dieser Wartezeit wieder in ihre Struktur gefaltet haben, lässt sich an den erneut auftretenden Entfaltungsspitzen abzählen (20).

5.2. Vergleich mit anderen Proteinstrukturen

Vergleicht man die Stabilität von sogenannten Fibronectin-Domänen des Proteins Tenascin mit denen des Titins, so findet man für beide dieselbe thermische Stabilität, d.h. dieselbe Schmelztemperatur und -wärme. Anders verhält es sich jedoch in der mechanischen Stabilität: Während die Titin-Domänen im Mittel bei 180 pN entfalten, entfalten die Tenascin-Domänen bereits bei 113 pN (19). Aus der Abhängigkeit der Entfaltungskräfte von der Ziehgeschwindigkeit lässt sich die Breite des Entfaltungspotentials bestimmen (21, 22). Aus solchen Messungen wurde für die Domänen aus Titin eine Breite des Entfaltungspotentials von $3 \pm 1 \text{ \AA}$ bestimmt, während für Tenascin entsprechend der geringeren Entfaltungskraft ein breiteres Potential mit $5.5 \pm 1 \text{ \AA}$ gefunden wurde.

Messungen an Proteinen mit alpha helikalen Domänen zeigen generell deutlich geringere Entfaltungskräfte (23). Spektrin ist wie Titin ein modular aufgebautes Protein, in dem jede Domäne aus ca. 106 Aminosäuren besteht, die drei antiparallel angeordnete Alpha Helices bilden. Man erhält die gleichen sägezahnartigen Entfaltungskurven, wobei die mittlere Entfaltungskraft nur 30 pN beträgt. Die Entfaltung passiert auch dabei in einem Schritt. Es wird kein langsames Entfalten der Helices beobachtet. Interessant ist daran, dass die alpha helikalen Sekundärstrukturelemente nur mit Hilfe der gegenseitigen Stabilisierung existieren können bzw. ihre mechanische Stabilität so gering ist, dass sie bereits bei wenigen pN entfalten.

Um ein genaueres Verständnis der Entfaltungskräfte und Stabilisationsmechanismen zu gewinnen, wurden von Lu et al. (24)

Molekulardynamiksimulationen zur Entfaltung von Titin Ig-Domänen durchgeführt. Die Simulationen zeigten, dass die Ursache für die besonders hohe Stabilität der Titin-Domänen in der Anzahl der Wasserstoffbrücken begründet liegt, die den ersten mit dem letzten Beta-Faltblatt-Strang jeder Domäne verbinden. Die Brücken zwischen dem ersten und letzten Strang müssen beim Entfalten gleichzeitig gebrochen werden und können so eine große Kraft aufbauen. Anders in den Spektrin-Domänen. Dort sind die Alpha-Helices nur über hydrophobe Wechselwirkung miteinander verbunden, was zu einem 1,5 nm breiten Entfaltungspotential (23) und der sehr kleinen Entfaltungskraft führt.

6. Kraftspektroskopie an Bakteriorhodopsin

Alle bisher durchgeführten kraftspektroskopischen Messungen wurden an polymeren Strukturen durchgeführt. Der Grund hierfür liegt in ihrer einfachen Handhabung. Die Ankopplungspunkte können beliebig gewählt werden, denn unabhängig davon, welcher Teil des Moleküls zwischen Spitze und Unterlage eingespannt ist, misst man immer die gleichen charakteristischen Eigenschaften. Zur Ankopplung lässt sich daher die stets vorhandene völlig unspezifische, aber meist starke Wechselwirkung zwischen Polymer und Oberfläche ausnutzen. Das zwischen Spitze und Unterlage eingespannte Polymer hängt senkrecht zu den Oberflächen frei in der Lösung, so dass es im Experiment nicht durch die Oberflächen gestört wird. Zugleich ist auch aufgrund der Länge des Polymers die Spitze weit genug von der Unterlage entfernt, um nicht mehr von ihr beeinflusst zu werden. Kleinste Längenänderungen in den einzelnen Einheiten sind sehr genau bestimmbar (z.B. das Umschnappen einer einzelnen Bindung in Dextran), da sie sich entlang des Polymers zu einer messbaren Länge aufsummieren.

Ziel dieser Arbeit war es, die Technik der Kraftspektroskopie auch auf nicht modulare und wesentlich kleinere Proteine anzuwenden. Dazu müssen zwei Dinge sichergestellt sein: Zum einen, dass keine unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Spitze, Protein und Unterlage auftreten, zum anderen, dass die Spitze das Protein an einer bestimmten Stelle spezifisch binden kann, ohne dass mit dem Rest des Proteins eine unspezifische Wechselwirkung eintritt. Der Entfaltungspfad und die gemessenen Entfaltungskräfte hängen wesentlich von der Wahl dieser Bindungsstelle ab.

Einzelne Proteine so zu präparieren, dass diese Bedingungen erfüllt sind, ist im Prinzip möglich, aber äußerst aufwendig. Oberflächen können z.B. durch dichtes Belegen mit PEG passiviert werden. Dann müssen zwei Polymere am Protein befestigt werden über die das Protein zwischen Unterlage und Spitze eingespannt wird. Bei Messungen an Membranproteinen lässt sich das Problem der Passivierung und des Anbindens der Proteine an die Unterlage umgehen, indem man die gesamte Zellmembran auf die Unterlage adsorbiert. Man erhält damit eine definierte Unterlage, in der die Proteine bereits mit bekannter Orientierung fixiert sind.

6.1. Funktion und Struktur von Bakteriorhodopsin

Bakteriorhodopsin (BR) ist ein Membranprotein des Archaeobakteriums *Halobacterium salinarium*. Es gehört zu der Gruppe der Retinalproteine und arbeitet als lichtgetriebene Protonenpumpe, die ein elektrochemisches Potential über die Membran aufbaut, das von dem Bakterium zur Synthese energiereicher Substanzen verwendet werden kann (25).

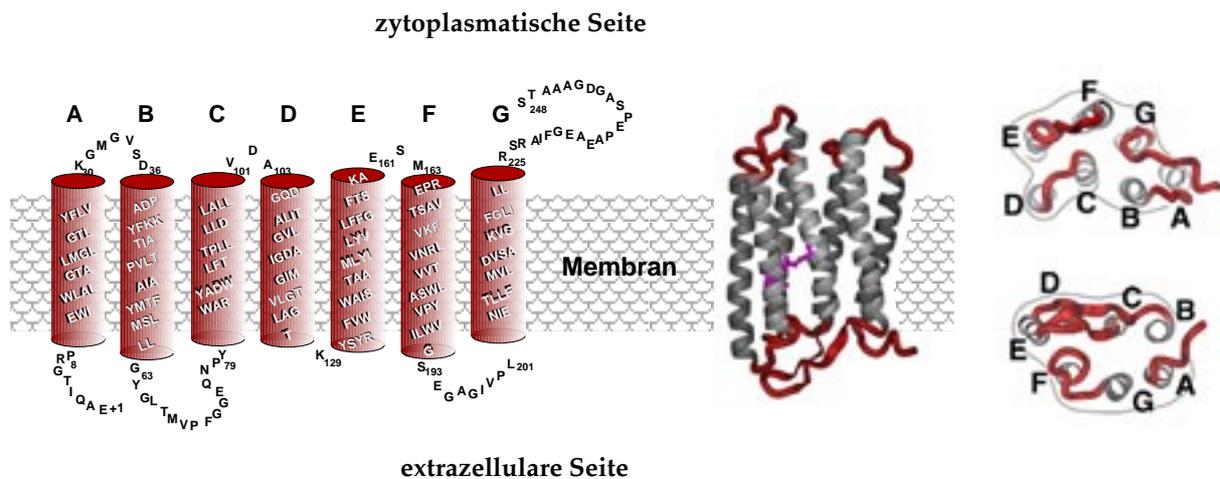


Abb.12: Bakteriorhodopsin ist ein Membranprotein aus 7 transmembranen Alpha-Helices, welche einen Farbstoff, das Retinal (violett), umgeben. Auf der zytoplasmatischen Seite der Membran sind die Schleifen, welche die Helices A&B, C&D und E&F verbinden, und der C-Terminus zugänglich.

Bakteriorhodopsin lagert sich zu Trimeren zusammen, welche einen hexagonalen zweidimensionalen Kristall bilden. Diese wegen ihrer Farbe als Purpurmembra bezeichneten Areale haben einen Durchmesser von ca. 500 nm, eine Dicke von etwa 5 nm und einen Proteinanteil von 75 Gewichtsprozent (26). Auf jedes Protein kommen drei Lipide, die sich innerhalb des Trimers, und acht Lipide, die sich zwischen den Trimeren befinden (26).

BR besteht aus 248 Aminosäuren, die 7 durch flexible Schleifen miteinander verbundene transmembrane Alpha-Helices bilden (Abb.12). In ihrer Mitte formen sie einen Kanal, in dem das an Lysin 216 gebundene Retinal, ein lichtempfindlicher Farbstoff, sitzt. Dieser erfährt bei Lichtabsorption eine Konformationsänderung,

welche eine Kettenreaktion auslöst, die schließlich zu dem Transport eines Protons durch die Membran führt. Die Struktur von BR ist im Detail bekannt und macht BR damit zu einem geeigneten Testobjekt für die Kraftspektroskopie.

6.2. Experimente an nativem BR

Die Fixierung von Bakteriorhodopsin auf der Unterlage erfolgt durch Adsorption der gesamten Purpurmembran (PM) auf Glimmer. Wie in Ref. (27) beschrieben, wurde eine 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Purpurmembran-Lösung in 10 mM Tris-HCl 300 mM KCl bei pH 7.8 für 20 Minuten auf frisch gespaltenen Glimmer gegeben und anschließend mit Puffer gespült.

6.2.1. Abbilden von BR

PM adsorbiert zufällig mit der zytoplasmatischen oder extrazellulären Seite an die Glimmeroberfläche. Um kraftspektroskopische Messungen an Bakteriorhodopsin durchzuführen, muss man daher zuerst die Oberfläche abbilden, um eine Membran zu lokalisieren und ihre Orientierung zu bestimmen. Die Messungen wurden daher in Zusammenarbeit mit Daniel Müller vom Biozentrum in Basel durchgeführt, der bereits langjährige Erfahrung im Abbilden von Purpurmembranen besitzt. Da mit dem Kraftspektrometer nicht mehr abgebildet werden konnte, wurden die Messungen an einem kommerziellen Kraftmikroskop, einem Nanoskop (Nanoscope III, Digital Instruments, Santa Barbara, USA) durchgeführt.

Abgebildet wurde unter 10 mM Tris-HCl Puffer mit 100-150 mM KCl bei pH 7.8. Zum Abbilden und für die anschließenden kraftspektroskopischen Messungen wurden "oxide sharpened" Silizium-Nitrid-Federn mit Federkonstanten von 0.1 N/m der Firma Olympus (Olympus Ltd., Tokyo, Japan) verwendet.

Die Abbildung 13 zeigt ein typisches AFM-Bild einzelner auf Glimmer adsorbierter Purpurmembranen. Bei höherer Vergrößerung erkennt man deutlich die einzelnen Proteine, die sich zu Trimeren zusammenlagern (weiße Linie, zytoplasmatische Seite) und das hexagonale Kristallgitter. Bei dieser Auflösung lässt sich die zytoplasmatische von der extrazellulären Seite der Membran eindeutig

unterscheiden (28). Doch auch auf größerer Skala lassen sich die beiden Membranseiten voneinander unterscheiden. Adsorbiert PM mit der extrazellulären Seite auf Glimmer, entstehen Verwerfungen in Form von flachen Buckeln mit ca. 50 nm Durchmesser.

Die Entfaltungsexperimente wurden nur auf der zytoplasmatischen Seite durchgeführt.

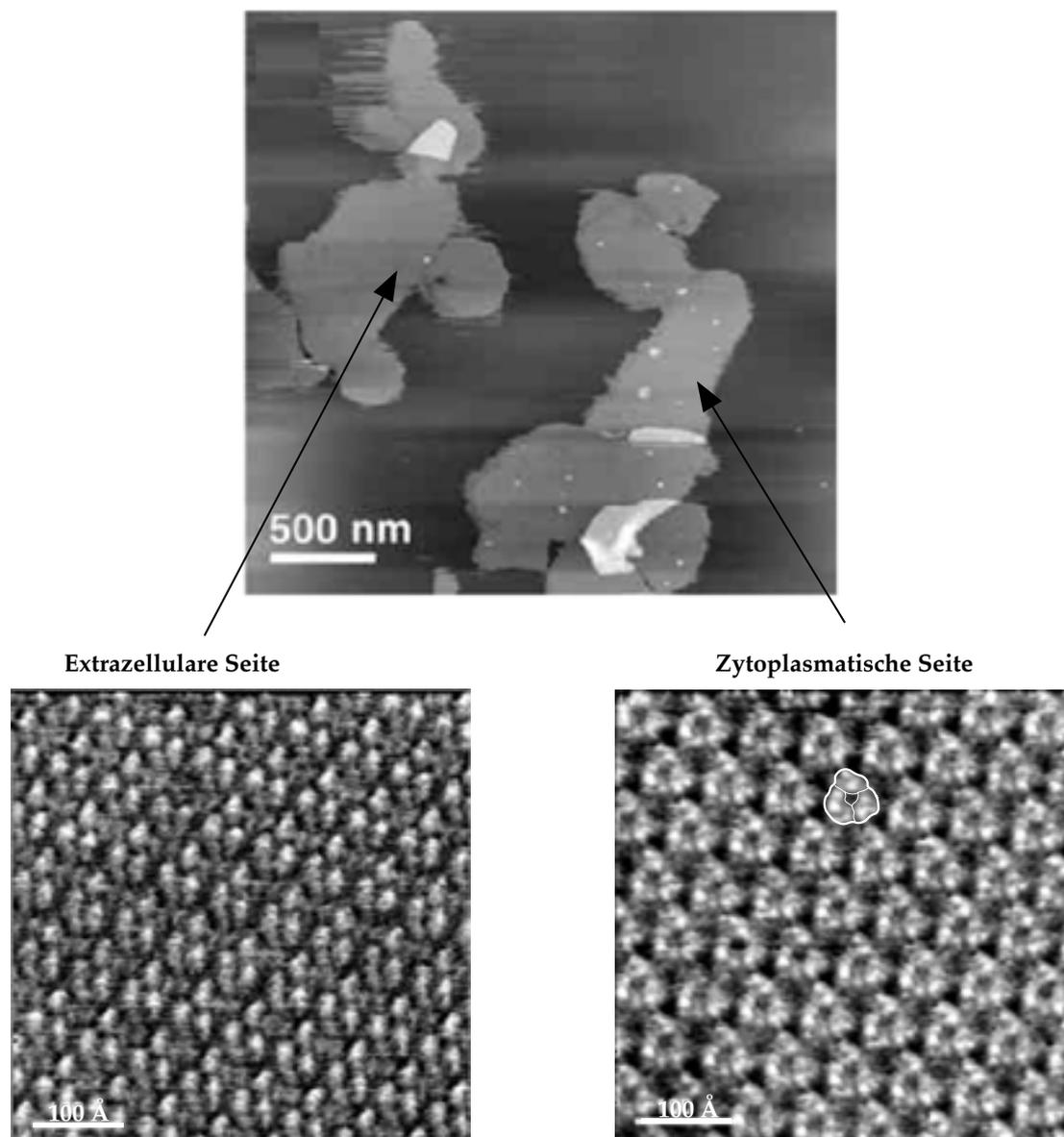


Abb. 13: Purpurchromatium adsorbiert auf Glimmer zufällig mit der zytoplasmatischen oder extrazellulären Seite. Beide Oberflächen zeigen in hoher Auflösung jeweils ihre typische Struktur.

6.2.2. Kraftmikroskopie und Kraftspektroskopie

Die Kombination von Kraftspektroskopie mit hochauflösender Kraftmikroskopie eröffnet einem die Möglichkeit, nicht nur Entfaltungskräfte zu messen, sondern gleichzeitig zu beobachten, welche Auswirkungen die Entfaltung auf die Struktur der Probe hatte. Dies wurde in den Experimenten dazu verwendet sicherzustellen, dass in einer Kraftkurve wirklich nur ein einzelnes Protein entfaltet wurde. Die Membran wurde jeweils vor und nach jeder kraftspektroskopischen Messung abgebildet (Abb. 14). Kraftkurven wurden nur dann zur Auswertung zugelassen, wenn nach der Kraftmessung genau ein einziges Monomer fehlte.

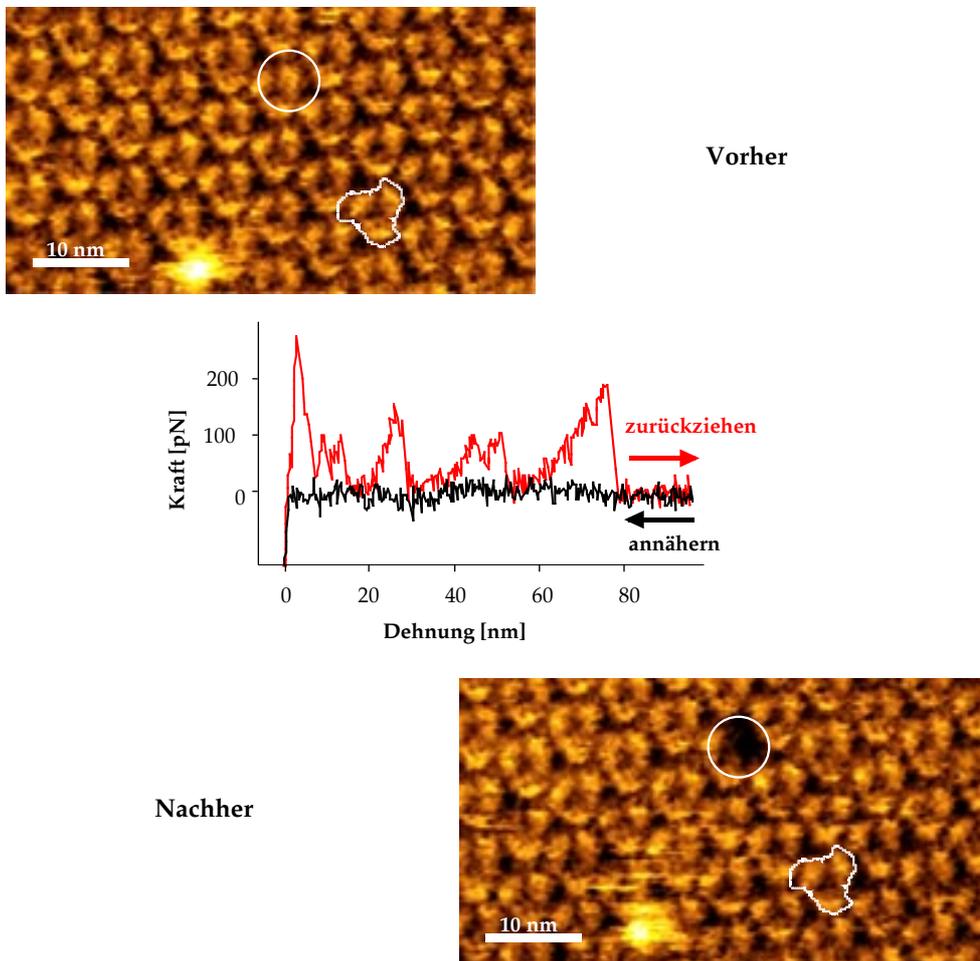


Abb. 14: Ein typisches Entfaltungsexperiment: Zuerst wird die Membranoberfläche abgebildet, dann eine Kraftkurve aufgenommen und anschließend durch nochmaliges Abbilden die Veränderung der Probe kontrolliert. Fehlt nachher genau ein Monomer (weißer Kreis), gibt die Kraftkurve das Herausziehen eines Proteins wieder.

6.2.3. Ankopplung an die Spitze

Um nach dem Abbilden mit derselben Spitze ein Protein zu entfalten, muss es an die Spitze gebunden werden. Dies wurde hier zunächst wieder durch unspezifische Adsorption erreicht. Nach dem Abbilden wurde die Spitze über der gewünschten Stelle der PM positioniert und eine Kraftkurve gefahren. Das Protein hat dabei in der Kontaktphase die Möglichkeit, eine stabile Wechselwirkung mit der Spitze einzugehen. Dabei können natürlich mehrere Proteine gleichzeitig an die Spitze binden, oder ein Protein kann mit mehreren Punkten an der Spitze haften. Um die Wahrscheinlichkeit für solche Ereignisse klein zu halten, wurde die Wahrscheinlichkeit der Anbindung über die Kontaktkraft und Kontaktdauer so eingestellt, dass sich nur in 10 % der Kraftkurven eine stabile Wechselwirkung aufbaute. Die maximale Kraft im Kontakt betrug dabei 1 nN, die Kontaktdauer lag zwischen 0.1 bis 1 s.

Diese Kopplung über Adsorption besitzt gegenüber einer spezifischen Kopplung den großen Vorteil, dass sie im Prinzip auf jedes beliebige Protein anwendbar ist, ohne dass dazu irgendwelche Mutationen oder chemische Veränderungen nötig sind. Allerdings müssen dann noch scharfe Kriterien entwickelt werden, nach denen sich die Messungen selektieren lassen, die wirklich nur an einem einzelnen Protein durchgeführt wurden, und Kriterien, die entscheiden, an welcher Stelle die Kraft angegriffen hat. Ersteres ist das Kriterium, dass nach dem Entfalten genau ein Protein aus der Membran verschwunden ist. Ein Kriterium, mit dem sich entscheiden lässt, an welcher Stelle das Protein angebonden wurde, wird weiter unten erläutert werden.

Zum Abbilden sind scharfe Spitzen nötig. Bleiben die entfaltenen Proteine an der Spitze hängen, geht die Schärfe verloren, die nötig ist, um eine molekulare Auflösung zu erhalten. Man muss das Protein also auch wieder loslassen können, damit man die Probe erneut abbilden und das Experiment mit anderen Proteinen wiederholen kann. Reversible spezifische Kopplungen sind Gegenstand der aktuellen Forschung, sind aber im Moment noch nicht verfügbar. Bei den Experimenten hat sich gezeigt, dass es an BR mit unspezifischer Kopplung durchaus möglich ist, nach dem Entfalten von Proteinen beim Abbilden molekulare Auflösung zu erhalten. Oft findet man nach dem Entfalten beim Abbilden eine Verunreinigung

auf der Oberfläche. Die Anzahl dieser Verunreinigungen nimmt mit der Anzahl der Entfaltungen zu, was nahelegt, dass es sich um aus der Membran herausgezogene Proteine handelt. Die Tatsache, dass man sie abbilden kann, erklärt zugleich, warum sie nicht an der Spitze hängen bleiben. Die Wechselwirkung entfalteter Proteine mit der Membran scheint größer zu sein als die mit der Spitze. Die entfalteten Proteine werden also beim Abbilden auf der Membran wieder abgestreift.

6.2.4. Selektieren der Daten

Wie ein Protein unter mechanischer Belastung entfaltet, hängt vom Angriffspunkt der angelegten Kraft ab. Koppelt man das Protein durch Adsorption an die Spitze, gibt es mehrere bevorzugte Punkte aufgrund der Orientierung des Proteins in der Membran. Misst man an der zytoplasmatischen Seite der Membran, so sind dies die Schlaufen, die Helix A mit Helix B, C mit D und E mit F verbinden und der C-Terminus. Die maximale Länge des entfalteten Aminosäure-Stranges kann man nur dann messen, wenn das Protein mit dem C-Terminus an der Spitze fixiert und das andere Ende mit dem N-Terminus noch in der Membran verankert ist. Die maximale Länge des eingespannten Aminosäurestranges kann also als scharfes Kriterium dienen, um die Kraftkurven zu selektieren, bei denen das Protein am C-Terminus verankert ist.

Kürzere Kraftkurven, d.h. Messungen, bei denen das Protein an einer Schlaufe aus der Membran gezogen wurde, werden hier nicht analysiert. Das System besitzt aufgrund der zwei Stränge, die dabei zugleich aus der Membran gezogen werden müssen, einen wesentlich komplexeren Entfaltungsweg. Bei der Kraftauflösung, die mit dem kommerziellen AFM erreichbar ist, war es nicht möglich, die gemessenen Kraftkurven in Kategorien einzuteilen, die einer Verankerung an den verschiedenen Schlaufen entsprechen.

Eine Anbindung des Proteins an die Spitze erfolgte etwa in 10 % der Kraftkurven. In 33 % dieser Kraftkurven erhielt man lange Abrisse, d.h. das Protein war mit dem C-Terminus an die Spitze adsorbiert. Dies ist ein sehr vernünftiger Wert, wenn man bedenkt, dass der C-Terminus etwa ein Viertel der

zytoplasmatischen Oberfläche bedeckt und etwa die Hälfte aller zugänglichen Aminosäuren enthält.

Es sei hier noch betont, dass die Auswahl von Daten, die zur Interpretation zugelassen werden, keine Verfälschung der Messergebnisse darstellt, da sie nach rationalen und scharfen Kriterien vorgenommen wird. Es ist vielmehr eine Möglichkeit, die einen zusätzlichen Gewinn an Information bringt und aus der Tatsache resultiert, dass die Experimente an individuellen Molekülen und nicht an einem ganzen Ensemble durchgeführt werden.

6.2.5. Kraftkurven an nativem BR

Die Kraftkurven wurden alle mit einer maximalen Eindrückkraft von 1 nN und einem Weg von 100 nm aufgenommen. Die Ziehgeschwindigkeit betrug 0.2 $\mu\text{m/s}$. Die maximale Länge der Kraftkurven lag bei etwa 70 nm. Eine Kette aus 248 Aminosäuren, die im gestreckten Zustand etwa jeweils 0.36 nm lang sind (29), lässt sich auf maximal 90 nm strecken. Da die Spitze irgendwo am C-Terminus angreifen kann und der Strang noch in der Membran verankert sein muss, damit man daran ziehen kann, ist dies etwa die Länge, die man erwartet, wenn BR komplett entfaltet ist.

Man erkennt ein typisches Verhalten in allen Kraftkurven. Bei 10, 25, 45 und 65 nm, gemessen bei 100 pN, tritt jeweils ein Kraftmaximum auf (Abb. 15). Überlagert man alle Abrisse, wird dieses Muster noch deutlicher (Abb. 16). Die Variation der Anbindungsstelle am C-Terminus und an der Spitze führt zu einem variablen Nullpunkt der x-Achse von ± 3 nm. Die Kurven sind daher auf der zweiten Spitze überlagert. Dies führt dann zu einem exakten Überlagern der Spitzen 3 und 4. Diese Längen sind also typisch für BR und markieren Schritte auf dem Weg der Entfaltung.

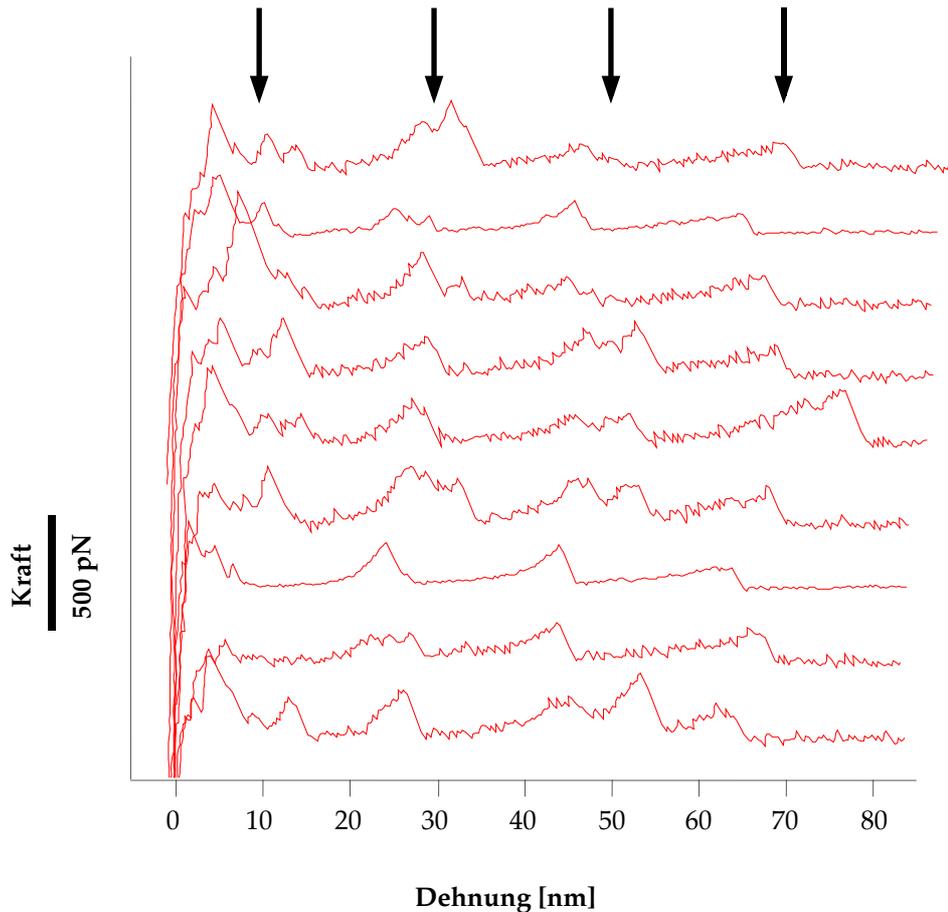


Abb. 15: Kraftkurven an Bakteriorhodopsin zeigen eine maximale Länge von 75 nm. Es fällt dabei ein typisches Muster aus vier Kraftmaxima auf.

6.2.6. WLC-Fit an die Entfaltungskurven

An die gemessenen Kurven lässt sich eine Kurve des WLC-Modells anpassen. Anzunehmende Parameter sind dabei die Persistenzlänge, das Maß für die Steifheit der Aminosäurenkette und die Länge des entfalteten Proteinstranges. Für die Persistenzlänge erhält man 4 \AA , denselben Wert, den man für den entfalteten Aminosäurestrang von Titin erhalten hat. Die einzelnen Kraftspitzen stellen also auch hier das Dehnen des bereits teilweise entfalteten Proteins dar. Aus dem WLC-Fit an die Spitzen erhält man die Anzahl der Aminosäuren des entfalteten Stranges.

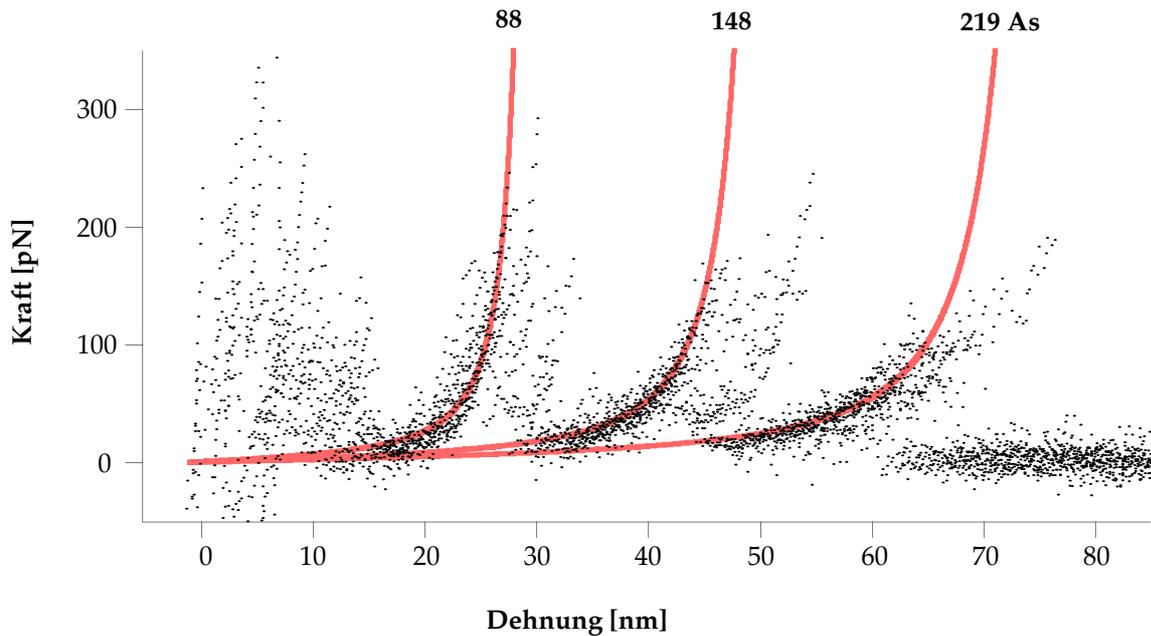


Abb. 16: Eine Überlagerung von 13 an nativem BR aufgenommenen Kraftkurven. Es wird deutlich, dass die Abstände zwischen den Kraftmaxima in allen Kraftkurven dasselbe typische Muster bilden. Die Anstiege der Spitzen lassen sich mit dem WLC-Modell beschreiben, welches die Elastizität eines einzelnen Aminosäurestranges wiedergibt. Aus der Länge der Fitkurven erhält man die Anzahl der im entfalteten Strang enthaltenen Aminosäuren.

6.2.7. Ein Modell für die Entfaltung

Reflektieren die Kraftspitzen wirklich die Entfaltung einer Proteinstruktur, oder handelt es sich bei ihnen um ein Artefakt, z.B. das Ablösen des Proteins von einer der Oberflächen? Zwei Szenarien sind dabei denkbar. Bei der Adsorption der Purpurmembran auf Glimmer adsorbieren auch die extrazellulären Schlaufen von BR an die Oberfläche. Zieht man am C-Terminus, löst man eine Schlaufe nach der anderen von der Unterlage, was zu einem vergleichbaren Muster mit vier Kraftmaxima führen würde. Um dies auszuschließen, wurden Messungen an zwei aufeinander liegenden Membranen durchgeführt. Die Voraussetzungen für die Desorption von der Unterlage waren damit nicht mehr gegeben. Dennoch wurden exakt die gleichen Kurven gemessen. Eine andere Möglichkeit wäre die Adsorption

aller Schlaufen der zytoplasmatischen Seite und des C-Terminus an die Spitze und das sukzessive Lösen der Schlaufen unter Zug. Die Länge der Aminosäurekette zwischen den einzelnen Schlaufen ergäbe aber andere Abstände zwischen den Spitzen als die beobachteten. Zudem müssten die einzelnen Spitzen in den Kraftkurven völlig unabhängig voneinander auftreten oder wegfallen. Dies wird jedoch nicht beobachtet. In den Kraftkurven treten z.B. die zweite und vierte Spitze nie ohne die dazwischen liegende dritte auf.

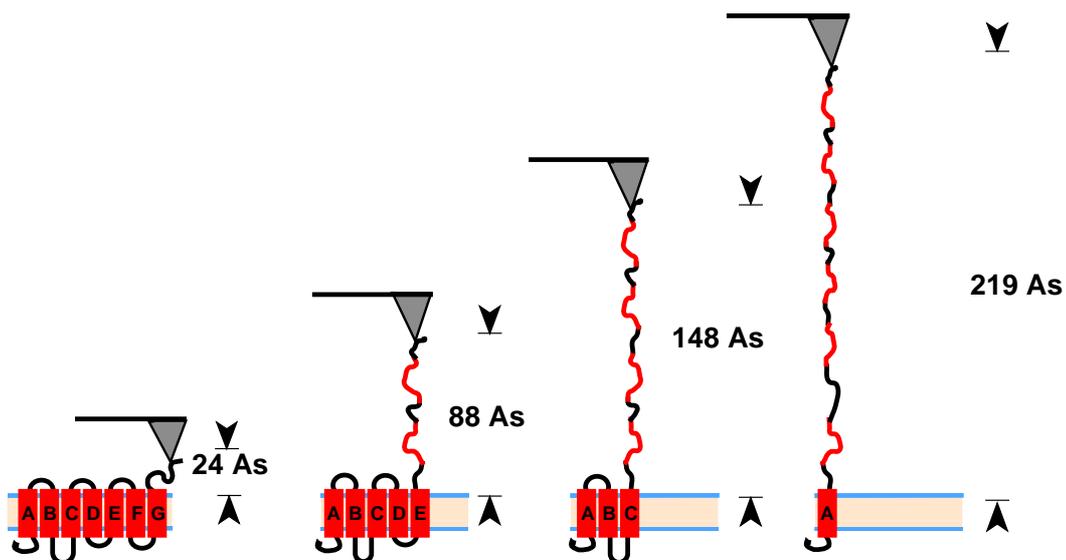


Abb. 17: Zieht man am C-Terminus, so übt man stets eine Zugkraft auf die letzte der noch in der Membran steckenden Aminosäuren aus. Es ist ein Entfaltungsweg dargestellt, in dem die letzten beiden Helices immer gemeinsam entfalten. Angegeben ist jeweils die Anzahl der bereits entfalteten Aminosäuren.

BR entfaltet also unter mechanischer Belastung nicht auf einmal, sondern in drei Schritten mit drei stabilen Zwischenzuständen (die letzte Spitze reflektiert stets das Loslösen des Proteins von der Spitze oder die Extraktion aus der Membran). Im Anstieg der verschiedenen Kraftspitzen spiegelt sich das Dehnen des bereits entfalteten Aminosäurestranges wieder. Ist die maximale Haltekraft der nächsten Zwischenstruktur erreicht, wird diese aufgebrochen und die entfaltete Aminosäurekette wird entsprechend länger.

Zählt man vom C-Terminus weg die Anzahl der Aminosäuren, die man aus den WLC-Fits an die Entfaltungskurven erhalten hat, findet man mit dem

Strukturmodell von BR die Stelle im Protein, an der die Kraft an den jeweiligen Zwischenzuständen angreift. Es ergibt sich daraus folgendes Bild des Entfaltungspfades für Bakteriorhodopsin (Abb. 17):

Zieht man am C-Terminus, so streckt man diesen und übt eine Kraft auf die Helix G aus, bis diese schließlich mitsamt dem daran gebundenen Retinal aus der Membran gezogen und entfaltet wird. Dies führt zu dem ersten Kraftmaximum, welches sich aber nicht als eine deutliche Spitze beobachten lässt, da bei diesen kurzen Abständen auch die die Helices verbindenden Schlaufen mit der Spitze wechselwirken können.

Die zweite Kraftspitze tritt bei einer Länge von 88 Aminosäuren auf. Dies entspricht genau der Anzahl an Aminosäuren aus Helix F, G und den Schlaufen E-F und F-G. Im ersten Kraftmaximum sind also die Helices G und F entfaltet worden. Dehnt man nun den entfalteten Strang, übt man eine Kraft auf Helix E aus. Diese widersteht einer Kraft bis zu 200 pN. Helices A bis E bilden also die erste stabile Zwischenstruktur.

Das Ziehen an Helix E führt zum Entfalten von Helices D und E und gibt eine entfaltete Länge von 148 As. Helices A bis C verbleiben in der Membran.

Im nächsten Schritt werden Helix B und C entfaltet und nur Helix A bleibt noch in der Membran verankert. Die Länge des entfalteten Stranges beträgt dann 219 As. Wird Helix A aus der Membran gezogen, reißt damit die Verbindung zwischen Spitze und Unterlage, und es wird keine weitere Kraft mehr gemessen.

Auffällig ist an der Entfaltung, dass die Helices unter Zug am C-Terminus paarweise die Membran verlassen. Dies ist ein Pfad, der auch für die Insertion von Proteinen in die Membran diskutiert wird (30).

Im Abfall der Kraft nach jeder der drei Spitzen äußert sich das Entfalten der Zwischenstrukturen. In Abbildung 18 a sind die einzelnen Spitzen noch einmal im Detail zu sehen. Die verschiedenen Spitzen zeigen unterschiedliche Unterstrukturen im Abriss. Die verschiedenen Helices gehen also deutlich unterschiedliche Wege bei ihrer Entfaltung. Während das Herausziehen von Helix A plötzlich geschieht, tritt beim Entfalten der Helices B&C manchmal ein deutlicher Zwischenschritt auf. Das Entfalten der Helices F&G dagegen scheint in vielen nicht einzeln aufgelösten Zwischenschritten mit einer Gesamtlänge von ca. 6 nm zu passieren.

Die mittlere Kraft zum Entfalten von F&G beträgt 150 pN, die für B&C 112 pN und die zum Herausziehen von Helix A 97 pN. Je mehr Helices also bereits aus dem Proteinverband entfernt wurden, desto leichter lassen sich die anderen Helices entfalten. In den gemessenen Kräften und Entfaltungsschritten äußert sich also die Wechselwirkung zwischen den verschiedenen Sekundärstrukturelementen des Proteins. Ob diese spezifischer Natur ist oder auf räumlicher Einschränkung beruht, bleibt in zukünftigen Messungen zu klären. Man hat prinzipiell die Möglichkeit, Untersuchungen zu Stabilisationsmechanismen innerhalb eines Proteins durchzuführen.

a) im Wildtyp BR

b) in der geschnittenen Mutante

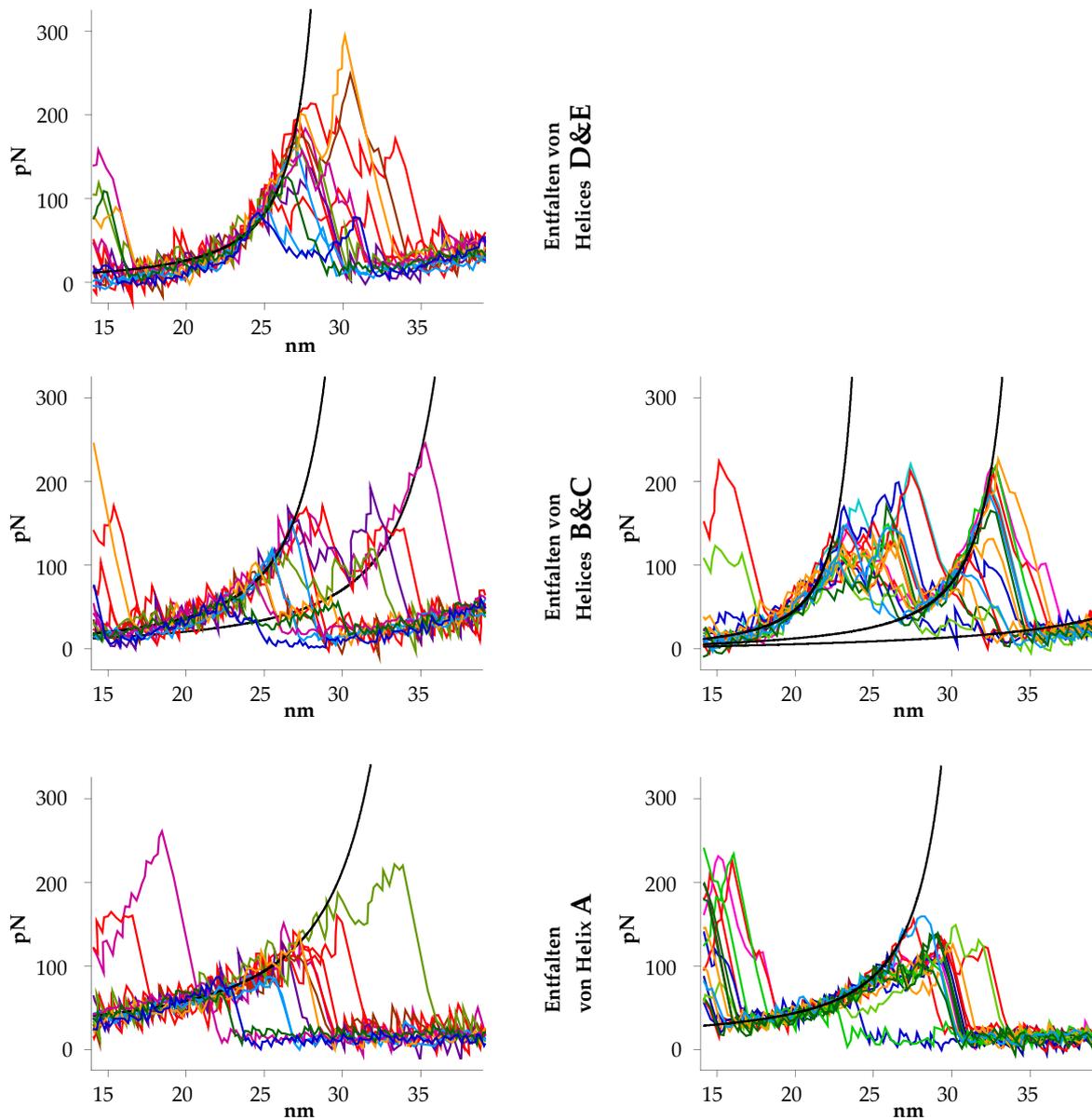


Abb. 18: Betrachtet man die einzelnen Entfaltungsschritte genauer, wird deutlich, dass die verschiedenen Helices jeweils in individueller Weise entfalten. Ihr Entfaltungsweg ist von ihrer Nachbarschaft abhängig. Entfaltet man BR mit durchgetrennter E-F-Schleufe (b), so bleiben die Helices F&G in der Membran zurück und beeinflussen den Entfaltungsweg der anderen Helices.

6.3. Test-Experimente an Mutanten

Um die Hypothese der schrittweisen Entfaltung von Bakteriorhodopsin zu überprüfen, wurden Messungen an zwei verschiedenen modifizierten BR Proben durchgeführt: Zum einen Messungen an BR, bei dem die E-F-Schleife durchtrennt worden war, zum anderen BR, bei dem im C-Terminus ein Cystein eingebaut worden war, über das sich das Protein spezifisch an eine vergoldete AFM-Spitze binden ließ.

6.3.1. Messungen an enzymatisch geschnittenem BR

BR, bei dem gentechnisch in der E-F-Schleife mehrere Schnittstellen für Protease V8 (endoproteinase Glu-C; Boehringer Mannheim) eingebaut wurden, unterscheidet sich in seiner inneren Struktur und Funktionalität nicht von nativem BR. Es wird genauso in die Bakterienmembran eingebaut und bildet dort zweidimensionale Kristalle aus. Durch Zugabe der Protease V8 konnten nun die E-F-Schleifen enzymatisch abverdaut werden, ohne die Struktur der Proteine oder die der Proteinkristalle zu stören (27).

Präparation und Experiment wurden genauso durchgeführt wie bei den Messungen an nativem BR. Zur Analyse wurden wieder nur die längsten Abrisse ausgewählt. Das Protein besteht nun aber aus zwei nicht verbundenen Untereinheiten. Die längsten Abrisse treten nun in dem Fall auf, in dem die Spitze am Ende der Helix E angreift. In Abbildung 19 sind einige der aufgenommenen Kraftkurven dargestellt. Anstelle der vier sind nur noch drei Kraftmaxima zu finden, wobei das mittlere stets als deutliche Doppelspitze ausgeprägt ist.

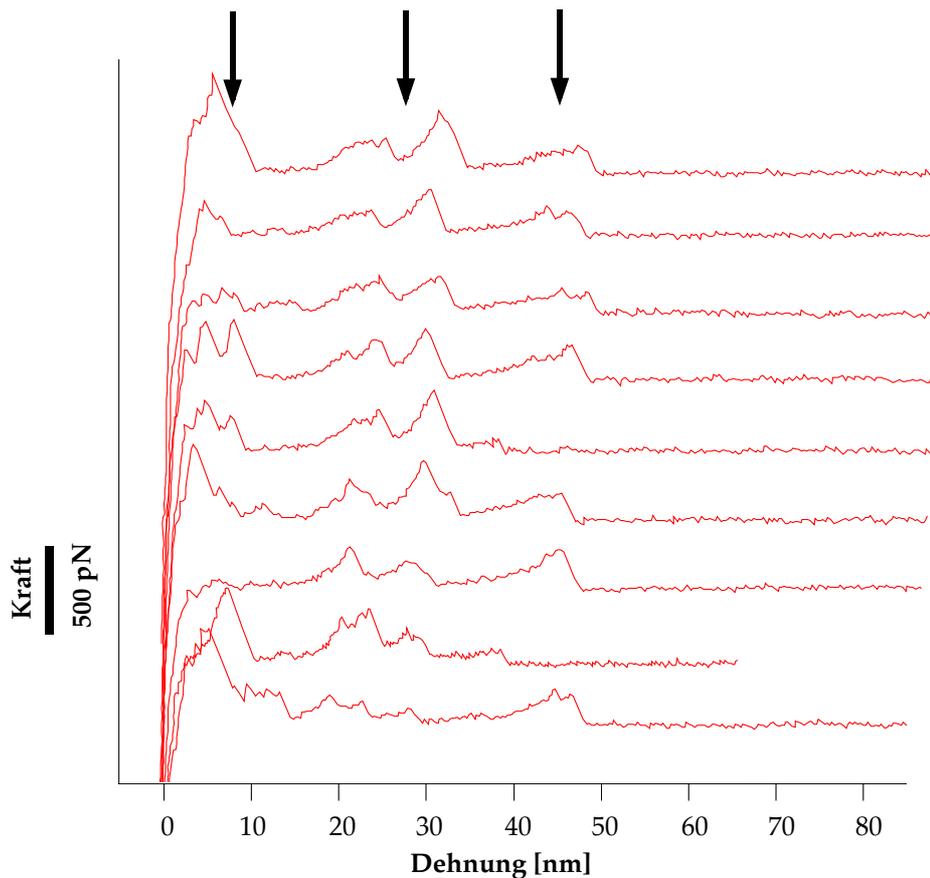


Abb. 19: Nimmt man Kraftkurven an Bakteriorhodopsin auf, dessen E-F-Schleufe durchtrennt wurde, findet man als maximale Länge der Kraftkurven nur noch 50 nm. Es treten auch nur drei Kraftmaxima auf, wobei das mittlere stets als Doppelspitze ausgeprägt ist.

In Abbildung 20 ist schematisch die Entfaltung des geschnittenen BR dargestellt. Nach diesem Modell gibt die erste Kraftspitze das Herausziehen der Helices D&E wieder. Wie bei der Entfaltung des nativen BR ist diese wegen paralleler Adsorption von Schlaufen und C-Terminus an die Spitze nicht scharf ausgeprägt. Die zweite Kraftspitze entsteht, wenn Helix D&E entfaltet sind und die Kraft an Helix C angreift. Die Länge des entfalteten Stranges beträgt dann 60 Å. Sind schließlich auch Helix B&C entfaltet, beträgt die maximale Länge des Stranges 131 Å, bevor auch als letztes Helix A aus der Membran gezogen wird.

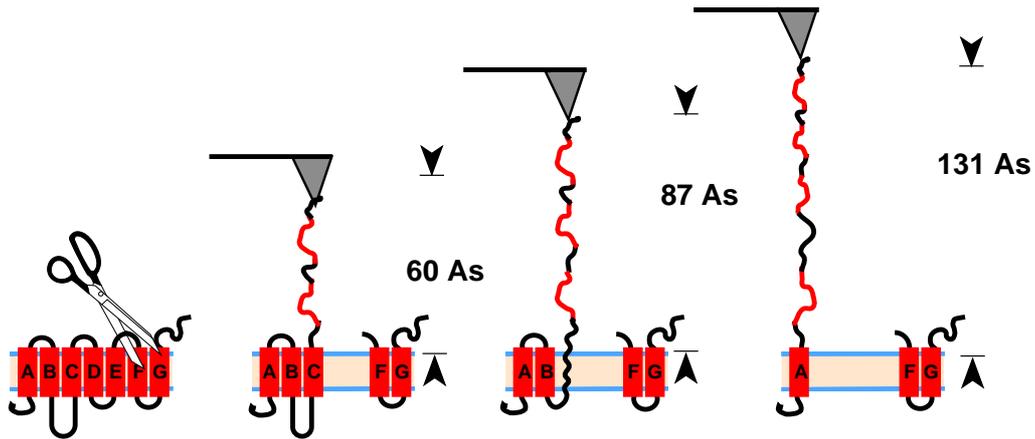


Abb. 20: Die längsten Kraftkurven erhält man, wenn die Spitze direkt an der Helix E angreift. Die Helices können wieder paarweise aus der Membran gezogen werden. Als zusätzlicher Zwischenschritt ist auch das separate Entfalten von Helix C und B dargestellt.

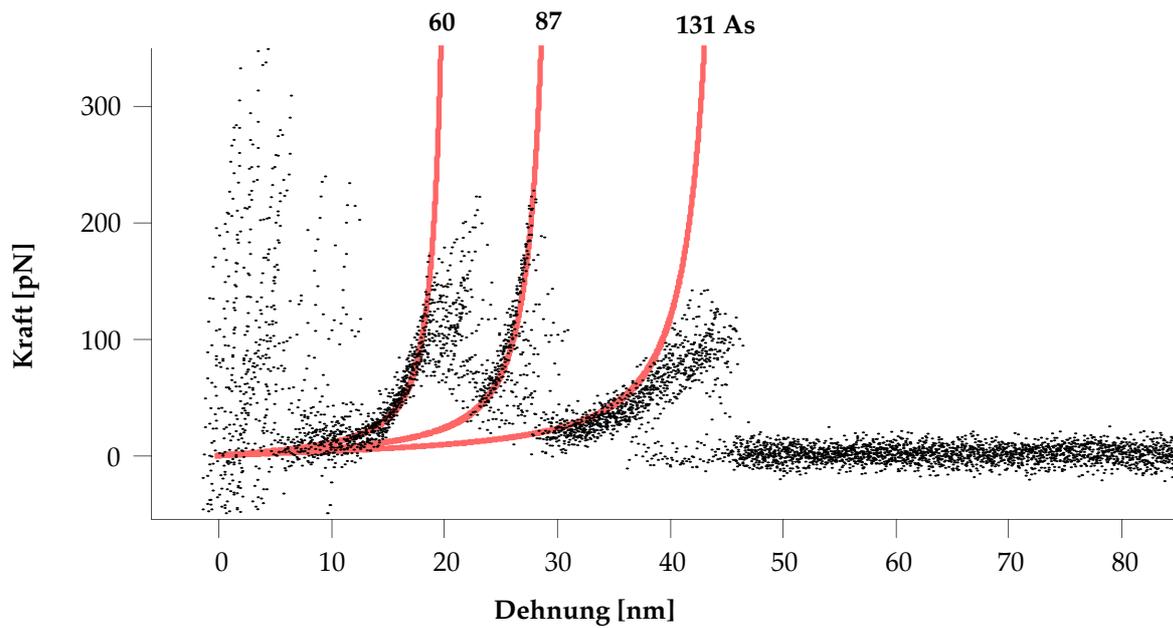


Abb. 21: Überlagerung aus 17 der längsten Kraftkurven, aufgenommen an geschnittenem BR. Es zeigt sich deutlich sein typisches Entfaltungsmuster. Mit eingezeichnet sind die Fit-Kurven für eine entfaltete Aminosäurekette mit Längen, wie man sie aus dem Modell in Abb. 20 erhält.

In Abbildung 21 sind alle langen Messkurven auf dem Anstieg der zweiten Kraftspitze überlagert. Mit eingezeichnet ist zweimal das WLC-Modell für eine Aminosäurekette mit den Längen 60 und 131 As, wie sie aus dem Modell der Entfaltung berechnet wurden. Wie beim nativen BR findet man auch hier eine exakte Übereinstimmung der Position der Kraftspitzen und der Längen der je paarweise entfalteten Helices. Allerdings findet man ein Kraftmaximum weniger, da die Helices F&G fehlen bzw. nicht entfaltet wurden und in der Membran zurückgeblieben sind.

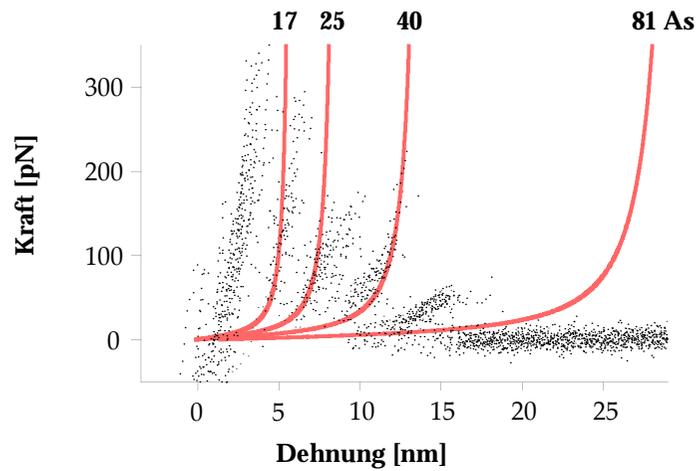
Ein deutlicher Unterschied zur Entfaltung des nativen BR ist in der Unterstruktur der zweiten Kraftspitze, beim Entfalten der Helices B&C zu beobachten. Es ist eine ausgeprägte Doppelspitze zu sehen, welche das Auftreten einer weiteren stabilen Zwischenstruktur aufzeigt. Helices B & C entfalten also nicht auf einmal. Die Zwischenstruktur widersteht im Mittel Kräften von 200 pN und ist damit deutlich stabiler als der Zustand, bei dem sich die Helices B&C noch in der Membran befinden. Dieser gibt bereits bei 150 pN nach. Der Zwischenzustand tritt bereits beim Entfalten der Helices B & C des nativen BR gelegentlich auf. Im geschnittenen BR tritt dieser Zwischenzustand aber immer auf. Die Länge des entfalteten Stranges beträgt im Zwischenzustand 87 Aminosäuren. Dies entspricht der Länge der entfalteten Helix C zusammen mit der gestreckten Schlaufe BC, wenn man in Rechnung stellt, dass, solange Helix B ihre Konformation behält, die Kraft in diesem Zustand am unteren Ende der Helix angreift, welches sich um ca. 4 nm weiter unten befindet. Dies entspricht bei 0.36 nm pro Aminosäure einer Verkürzung der gemessenen Länge des entfalteten Aminosäurestranges um 11 Aminosäuren. Ein entsprechender WLC-Fit ist in Abbildung 21 eingezeichnet und deckt sich genau mit der Messkurve.

Die zweite Spitze der Doppelspitze reflektiert also die Entfaltung der Helix B, die erste die der Helix C. Auch letztere zeigt wiederum eine Unterstruktur (Abb. 18). Die Kraft fällt nicht sofort ab, sondern bleibt während des Entfaltens bei etwa 100 pN bzw. lässt nach 4 nm einen zweiten Zustand erahnen. Das bedeutet, dass auch das Entfalten von Helix C in mehreren Schritten vor sich geht. 4 nm Verlängerung ist etwa der Betrag, der sich ergibt, wenn die Helix C ihre Struktur verliert, die BC-Schlaufe aber nicht in den hydrophoben Bereich der Membran eintritt.

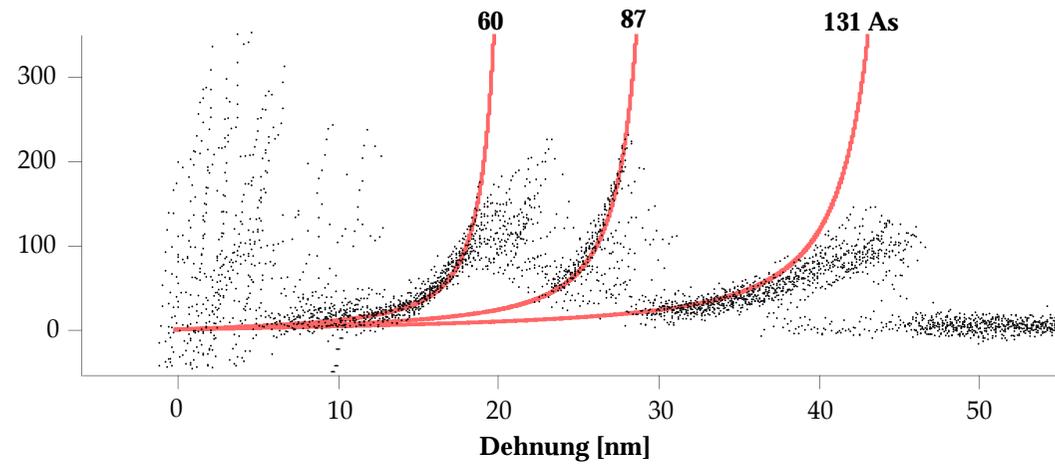
Die Ursache für die unterschiedlichen Entfaltungswege von nativem und geschnittenem BR ist in der Stabilisierung von Helix B&C durch die Helices F & G zu suchen. Diese verbleiben hier ja, anders als bei der Entfaltung des nativen BR, in der Membran. Auch das Retinal, welches kovalent an die Helix G, an Lysin 216 gebunden ist, bleibt dort zurück. Aus kalorimetrischen Messungen ist bekannt, dass das Retinal einen wesentlichen Einfluss auf die Stabilität des Proteins hat (31, 32). Aus Abbildung 12 wird auch deutlich, dass Helices G und F benachbart zu B und C sind und zu ihrer Stabilisierung beitragen können.

Auch das Herausziehen von Helix A passiert im geschnittenen BR in zwei Schritten. Der zweite Zustand ist wieder nach einer Verlängerung von 4 nm zu finden. Dies entspricht wieder dem Entfalten der Helix A, während der N-Terminus noch auf der extrazellulären Seite der Membran hängt.

Bei der Analyse der Kraftkurven fällt neben den 45 nm langen Abrissen eine weitere Teilmenge auf. Diese Kraftkurven sind genau 15 nm lang und besitzen eine Unterstruktur aus fünf Spitzen in definierten Abständen. Es liegt nahe, diese als das Entfalten der anderen Hälfte des geschnittenen Proteins zu interpretieren. Dabei greift die Spitze am C-Terminus an und entfaltet die Helices F&G in mehreren Schritten. In Abbildung 22 sind die beiden Teilmengen, die Kraftkurven des F&G-Fragmentes und die des A-E-Fragmentes, zusammen dargestellt. Der Entfaltung der Helices F&G sind WLC-Kurven angepasst, mit Längen, wie sie im nächsten Abschnitt, bei der Entfaltung der Cystein-Mutante, für die einzelnen Entfaltungsschritte der F&G Helices besprochen werden. Es treten dieselben Zwischenschritte auf wie bei der Entfaltung der Helices F&G im ungeschnittenen Protein. Ein weiterer Zwischenzustand taucht bei der Entfaltung der Helix F auf und sollte daher mit dem Fehlen der E-F-Schleufe in Zusammenhang stehen.



**Entfalten des F&G-Fragments
(Spitze am C-Terminus)**



**Entfalten des A-E-Fragments
(Spitze an Helix E)**

Abb. 22: Zwei Teilmengen der Kraftkurven, die man an Bakteriorhodopsin erhält, wenn die E-F-Schleife durchtrennt ist. Vergleicht man die beiden Diagramme in dieser Darstellung mit Abbildung 23, so wird eindeutig klar, dass es sich hier um die Entfaltung der beiden Fragmente A-E und F&G handelt.

6.3.2. Spezifische Kopplung

Um sicherzustellen, dass bei der Auswertung der Messungen an nativem BR bei der Selektion der Daten tatsächlich die Ereignisse ausgewählt wurden, bei denen das Protein mit dem C-Terminus an der Spitze verankert war, wurden Messungen mit spezifischer Kopplung durchgeführt. An Mutanten, in denen im C-Terminus die Aminosäure Nummer 241 gegen ein Cystein ausgetauscht worden war, wurden die Experimente mit einer goldbedampften AFM-Spitze wiederholt. Da die Spitze beim Bedampfen mit Gold ihre Schärfe einbüßt, ließ sich in der Abbildung keine molekulare Auflösung mehr erreichen. Anhand der typischen, nur auf der zytoplasmatischen Seite zu sehenden Verwerfungen, war es jedoch dennoch möglich, die zytoplasmatische und extrazelluläre Seite der auf Glimmer adsorbierten Purpurmembran voneinander zu unterscheiden.

Auf der zytoplasmatischen Seite durchgeführte Kraftkurven ergaben zu 80% lange Abrisse, welche dasselbe Entfaltungsmuster der vier Kraftmaxima wie natives BR zeigten. Anders als bei nativem BR konnte jetzt auch das erste Kraftmaximum, das Entfalten der Helices F&G, in mehrere Einzelschritte aufgelöst werden. Abbildung 23 zeigt damit den kompletten Entfaltungsweg von Bakteriorhodopsin unter Zug am C-Terminus:

1. Im Kontakt mit der Probe kann sich neben der spezifischen Anbindung des C-Terminus an die vergoldete Spitze eine unspezifische Wechselwirkung mit der Proteinoberfläche ausbilden, die im Mittel 250pN aushält.
2. Hat sich die unspezifische Wechselwirkung mit der Unterlage gelöst, kann der C-Terminus mit seinen 17 Aminosäuren auf 6 nm gestreckt werden. Dabei wird eine Kraft auf die Helix G ausgeübt.
3. Im Entfalten der Helix G wird bei 12 nm Länge ein Zwischenschritt beobachtet. Dies passiert etwa bei der Länge, bei der das Retinal aus seiner hydrophoben Umgebung heraus in das wässrige Medium gezogen wird.
4. Ist die Helix G ganz entfaltet, dehnt man einen Strang von 55 As, über welchen nun die Kraft am unteren Ende der Helix F angreift. Da der Strang an der

Unterseite der Membran angreift, scheint er um die Membrandicke kürzer als 55 gestreckte Aminosäuren.

5. Ist auch Helix F entfaltet, besteht die Kette aus 81 As.
6. Helices D&E entfalten mit einem oder mehreren Zwischenschritten und verlängern die entfaltete Aminosäurenkette auf 141 As.
7. Manchmal entfalten die Helices C&B nacheinander, was zu dem Zwischenschritt bei 50 nm führt, der beim Entfalten des geschnittenen BR immer auftritt.
8. Ist auch die Helix B entfaltet, verbleibt nur noch die Helix A in der Membran und wird schließlich herausgezogen.

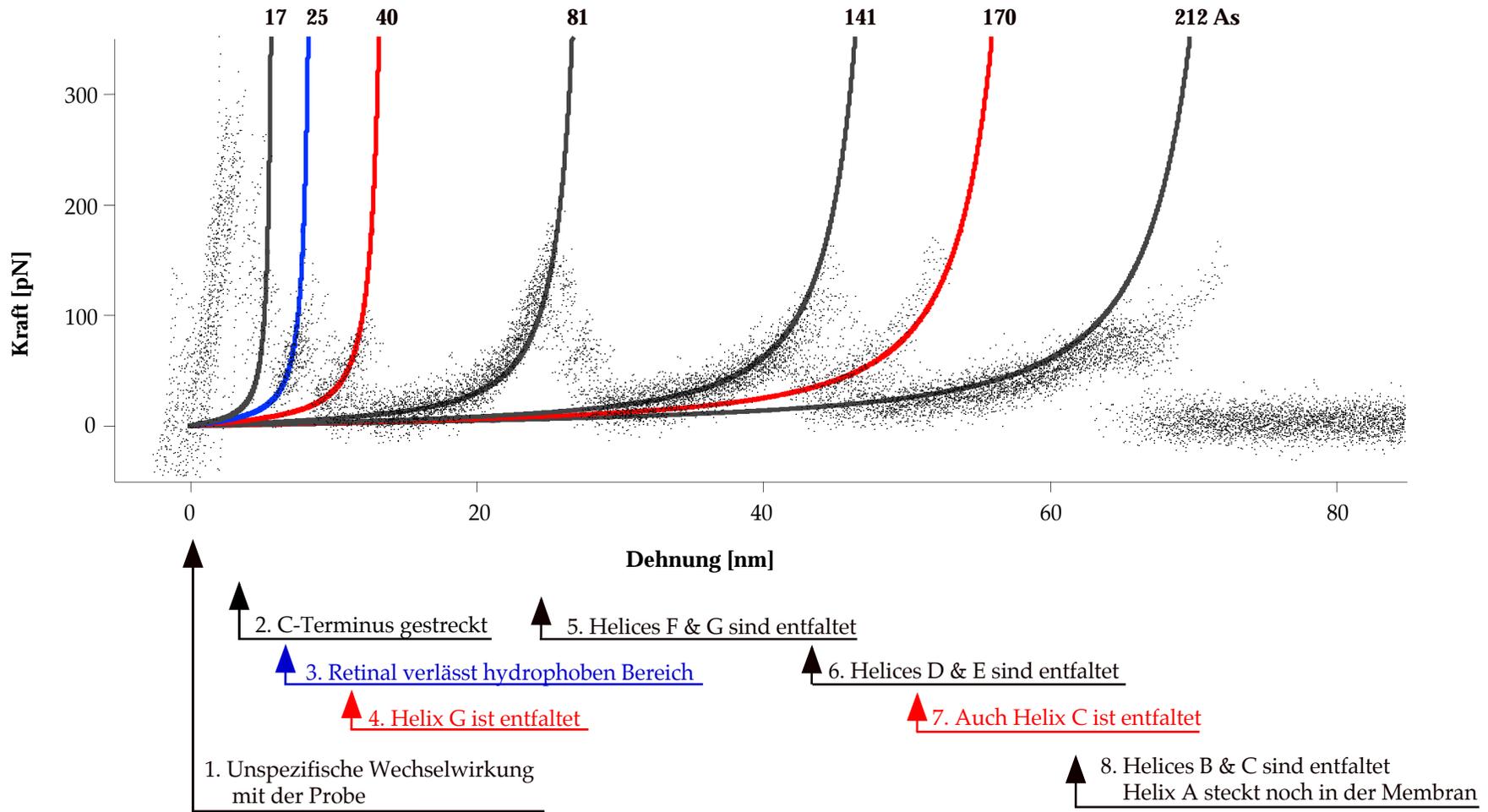


Abb. 23: Verankert man BR über eine spezifische Bindung an der Spitze, hier ein Cystein, an Position 241, welches an eine Goldspitze bindet, lässt sich auch die Unterstruktur des ersten Kraftmaximums auflösen. Damit wird der gesamte Entfaltungspfad von Bakteriorhodopsin sichtbar.

7. Ausblick

Die Messungen an BR haben gezeigt, dass es auch möglich ist, einzelne kleine Proteine, die nicht aus sich wiederholenden Einheiten aufgebaut sind, mit der Technik der Kraftspektroskopie zu untersuchen. Das Prinzip ist demonstriert und sollte sich auch auf andere Proteine, besonders Membranproteine, deren Struktur noch unbekannt ist, anwenden lassen.

Aber auch an dem Modellsystem BR lassen sich noch einige Fragen klären. Die These, dass sich das Herausziehen des Retinals beobachten lässt, muss noch mit einer Messung an BR, in dem das Retinal durch Bleichen entfernt worden ist, überprüft werden.

Das hochauflösende Kraftspektrometer wird gerade so umgebaut, dass man mit ihm auch abbilden kann. Dann wird es möglich sein, die Zwischenschritte in der Entfaltung mit deutlich besserer Kraftauflösung zu untersuchen. Experimente mit Punktmutationen können zeigen, wie detaillierte Informationen über Struktur und Stabilisierungsmechanismen mit dieser Technik erhalten werden können.

Verschiedene Cysteinmutanten machen eine spezifische Kopplung an beliebige Stellen der Proteinoberfläche möglich. Damit könnte zum ersten Mal die mechanische Stabilität eines Proteins mit seinen verschiedenen Entfaltungspfaden richtungsabhängig bestimmt werden.

Literaturverzeichnis

1. S. B. Smith, Y. Cui, C. Bustamante, "Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules" *Science* **271**, 795, (1996).
2. G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber, "Atomic force microscope" *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930, (1986).
3. H. Li, M. Rief, F. Oesterhelt, H. E. Gaub, "Single-molecule force spectroscopy on xanthan by AFM" *Advanced Materials* **3**, 316, (1998).
4. B. R. Lentz, "Polymer-induced membrane fusion: potential mechanism and relation to cell fusion events" *Chem. Phys. Lipids* **73**, 91, (1994).
5. P. Hinterdorfer, W. Baumgartner, H. J. Gruber, K. Schilcher, H. Schindler, "Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3477, (1996).
6. H. Tadokoro, "Structure of crystalline Polymers" Krieger, Malabar, (1990).
7. J. M. Harris, "Poly(ethylene glycol) chemistry" Plenum Press, New York, (1992).
8. R. Begum, H. Matsuura, "Conformational properties of short poly(oxyethylene) chains in water studied by IR spectroscopy" *Journal of Chemical Society Faraday Trans.* **93**, 3839, (1997).
9. K. Devanand, J. C. Selser, "Polyethylene oxide does not necessarily aggregate in water" *Nature* **343**, 739, (1990).
10. M. Rief, "Kräfte in der molekularen Erkennung" Diplomarbeit, Technische Universität München (1995).
11. F. Oesterhelt, M. Rief, H. E. Gaub, "Single molecule force spectroscopy by AFM indicates helical structure of Poly(ethylene-glycol) in water" *NJP* **1**, 1, (1998).
12. M. Rief, "Kraftspektroskopie an einzelnen Molekülen" Promotion, Ludwig - Maximilians-Universität München (1997).
13. P. J. Flory, "Statistical Mechanics of Chain Molecules" Hanser, München, (1988).

14. J. Kovac, C. C. Crabb, "Modified Gaussian Model for Rubber Elasticity, The Wormlike Chain" *Macromolecules* **15**, 537, (1982).
15. J. F. Marko, E. D. Siggia, "Stretching DNA" *Macromolecules* **28**, 8759, (1995).
16. R. L. C. Wang, H. J. Kreuzer, M. Grunze, "Molecular conformation and solvation of oligo(ethylene glycol) terminated self-assembled monolayers and their resistance to protein adsorption" *J. Phys. Chem. B.* **101**, 9767, (1997).
17. H. J. Kreuzer, "Effect of stretching on the molecular conformation of oligo (ethylene oxide): a theoretical Study" *NJP* **1**, 1, (1999).
18. P. E. Marszalek et al., "Mechanical unfolding intermediates in titin modules" *Nature* **402**, 100, (1999).
19. M. Rief, M. Gautel, A. Schemmel, H. E. Gaub, "The mechanical stability of Immunoglobulin and Fibronectin III Domains in the muscle protein Titin measured by AFM" *Biophys. J.* **75**, 3008, (1998).
20. A. Schemmel, "Kraftspektroskopie an einzelnen Molekülen zur Untersuchung von Proteinfaltung" Promotion, Ludwig -Maximilians-Universität München (1998).
21. R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, E. Evans, "Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy" *Nature* **397**, 50, (1999).
22. M. Rief, J. M. Fernandez, H. E. Gaub, "Elastically coupled two-level-systems as a model for biopolymer extensibility" *Phys. Rev. Lett.* **81**, 4764, (1998).
23. M. Rief, J. Pascual, M. Saraste, H. E. Gaub, "Single Molecule Force Spectroscopy of Spectrin Repeats: Low Unfolding Forces in Helix Bundles" *Molecular Biology* **286**, 553, (1999).
24. H. Lu, B. Isralewitz, A. Krammer, V. Vogel, K. Schulten, "Unfolding of titin immunoglobulin domains by steered molecular dynamics simulation" *Biophys. J.* **75**, 662, (1998).
25. U. Haupts, J. Tittor, D. Oesterhelt, "Closing in on Bacteriorhodopsin: Progress in understanding the Molecule" *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**, 367, (1999).

26. L.-O. Essen, R. Siegert, W. D. Lehmann, D. Oesterhelt, "Lipid patches in membrane protein oligomers: Crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex" *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 11673, (1998).
27. J. B. Heymann et al., "Conformations of the rhodopsin third cytoplasmic loop grafted onto bacteriorhodopsin, using AFM imaging and molecular modeling" *submitted*.
28. A. Engel, C.-A. Schoenenberger, D. J. Müller, "High-resolution imaging of native biological sample surfaces using scanning probe microscopy" *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 279, (1997).
29. A. L. Lehninger u. a., "Prinzipien der Biochemie" Spektrum, Heidelberg, 2. Aufl., (1994).
30. D. M. Engelman, T. A. Steitz, "The spontaneous insertion of proteins into and across membranes: The helical hairpin hypothesis" *Cell* **23**, 411, (1981).
31. T. W. Kahn, M. J. Sturtevant, D. M. Engelman, "Thermodynamic measurements of the contributions of helix connecting loops and retinal to the stability of Bacteriorhodopsin" *Biochemistry* **31**, 8829, (1992).
32. S. H. White, W. C. Wimley, "Membrane protein folding and stability: Physical principles" *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**, 319, (1999).

Lebenslauf

Name: Philipp Oesterhelt

geboren am 25. Juli 1969

in: München

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Eltern: Monika Oesterhelt

Dieter Oesterhelt

1975 - 1980 Besuch der Grundschule in Würzburg.

1980 - 1990 Besuch des Theresien-Gymnasiums in München.

1990 - 1991 Zivildienst in der Vereinigung Integrationsförderung (VIF) in München im Bereich der individuellen Schwerstbehindertenbetreuung.

1991 - 1996 Studium der allgemeinen Physik an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

1996 -1997 Diplomarbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität München am Lehrstuhl für Angewandte Physik bei Prof. Gaub.

Seit Juli 1997 Promotion am selben Lehrstuhl.

Danksagung

Ich möchte all denen, die in vieler Hinsicht am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren, danken. Zuallererst meinem Professor Hermann Gaub, der mich mit stetem Enthusiasmus gelehrt hat, neues zu suchen. Dann auch Daniel Müller, ohne dessen Erfahrung im Abbilden von einzelnen Proteinen die Experimente an Bakteriorhodopsin nicht möglich gewesen wären. Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls, die immer zu offenen Diskussionen bereit waren möchte ich auch dafür danken, dass sie, zusammen mit unserem Chef, eine offene und angenehme Atmosphäre geschaffen haben, auf der sich eine wissenschaftliche Kreativität entwickeln konnte. Zuletzt ganz besonders danke ich Matthias Rief, der mich bereits in der Diplomarbeit in die wissenschaftliche Arbeitsweise eingeführt hat und sich immer für kritische und fruchtbare Diskussionen begeistern konnte.