

Kraftspektroskopische Untersuchung einzelner Zytoskelett-Proteine

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

vorgelegt von

Ingo Schwaiger
aus München

München, 6. Mai 2005

Erster Gutachter:
Zweiter Gutachter:
Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. Matthias Rief
Prof. Dr. Hermann E. Gaub
3. August 2005

Inhalt

1.	Zusammenfassung	2
2.	Einleitung	3
3.	Experiment	5
3.1	Das Kraftspektrometer	6
4.	Theorie	8
4.1	Entropische und enthalpische Kräfte	8
4.2	Freie Enthalpie als Funktion der Kraft	10
4.3	Änderung der freien Enthalpie als Funktion der Kraft	11
4.4	Übergangsraten als Funktion der Kraft	13
4.5	Gleichgewichtskonstante als Funktion der Kraft	14
4.6	Dynamische Kraftspektroskopie	16
4.7	Ratenmodell der Dreizustandsfaltung	18
4.8	Analyse des Konturlängenzuwachses einer 3-Zustands Protein-Domäne	19
5.	Probenmoleküle	20
5.1	Myosin II	21
5.2	ddFLN	23
6.	Ergebnisse	25
6.1.1	Die mechanischen Eigenschaften der Superhelix-Struktur	25
6.1.2	Die mechanischen Eigenschaften der Superhelix-Struktur als mögliche Ursache für das makroskopische Dehnungsverhalten von Haaren	27
6.2	Die mechanischen Eigenschaften von ddFLN	28
6.3	Kraftspektroskopische Untersuchung der Faltungs- und Entfaltungskinetik von ddFLN4	31
7.	Anhang	36
6.	Literaturverzeichnis	52

1. Zusammenfassung

Die Kraftspektroskopie hat sich als eine moderne Methode zur Untersuchung der Elastizität und Entfaltung einzelner Proteine etabliert. Kraftspektroskopische Experimente zeichnen sich unter anderem dadurch aus, dass die Entfaltungskinetik einzelner Proteine bestimmt werden kann. In dieser Arbeit wurde die Kraftspektroskopie zur Analyse der Elastizität und der Entfaltungskinetik einzelner Zytoskelett-Proteine verwendet. Die untersuchten Moleküle, die Superhelix-Struktur des Myosin Schwanzes und das Aktin-bindende Protein Filamin (ddFLN) repräsentieren dabei zwei wichtige Strukturmodule der Proteinfaltung. Die Messungen wurden mit dem Ziel durchgeführt, ein detailliertes Verständnis hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen der Struktur der Proteine und deren mechanischen Eigenschaften zu gewinnen. Der Anwendungsbereich der Methode konnte mit Hilfe eines neu entwickelten Messprotokolls erweitert werden. So wurde in Rückfaltungsexperimenten neben der Entfaltungskinetik auch die Rückfaltungskinetik einzelner Proteine bestimmt.

Die kraftspektroskopische Untersuchung des Schwanzes des Muskelmotor-Proteins Myosin II zeigte, dass das Molekül über elastische Dehnungseigenschaften verfügt. Die Superhelix-Struktur des Schwanzes weist ein charakteristisches Kraftdehnungsverhalten auf, das bei Dehnung und Entspannung des Moleküls reversibel ist. Das Kraftdehnungsverhalten der Superhelix konnte erfolgreich durch ein Zwei-Zustands-Modell analytisch beschrieben werden. Das Modell beruht auf der Annahme, dass einzelne Segmente der Helix entweder einen gefalteten oder entfalteten Zustand einnehmen. Ferner liegt dem Modell zugrunde, dass ein thermodynamisches Gleichgewicht beim Übergang zwischen den Zuständen besteht.

In den Experimenten mit dem Aktin-bindenden Protein ddFLN wurden die Entfaltungskräfte der Immunoglobulindomänen sowie die mechanische Stabilität der Dimerbindung des inelastischen Moleküls bestimmt. Es zeigte sich, dass die Dimerbindung im Vergleich zu den benachbarten Domänen von ddFLN über eine größere mechanische Stabilität verfügt. Experimente mit verschiedenen Konstrukten des Moleküls zeigten außerdem, dass die Entfaltung einer der ddFLN-Domänen, nämlich Domäne 4 (ddFLN4), über einen stabilen Zwischenzustand erfolgt. Auf Basis der NMR-Struktur und der kraftspektroskopischen Daten verschiedener Mutationen von ddFLN4 wurde eine Analyse der Primärstruktur dieses Zwischenzustandes vorgenommen. Demnach entfalten im ersten Entfaltungsschritt 50 Aminosäuren, währenddessen die restlichen 50 Aminosäuren von ddFLN4 den stabilen Zwischenzustand bilden.

Wiederholtes Dehnen und Entspannen von ddFLN ergab, dass es sich bei dem Entfaltungszwischenzustand von ddFLN4 ebenfalls um einen Faltungszwischenzustand handelt. Die Analyse der Rückfaltungsereignisse führte zu dem Ergebnis, dass die Rückfaltung von ddFLN4 nur durch ein kinetisches Drei-Zustands-Modell mit einem obligaten Zwischenzustand beschrieben werden kann. Der Zwischenzustand stellt also einen „on-pathway“ Zwischenzustand dar, der von ddFLN4 zuerst eingenommen wird, bevor die Domäne in ihre native Struktur übergeht. Die quantitative Bestimmung der Faltungskinetik von ddFLN4 erfolgte durch Anpassung des Modells an die Daten. Der Vergleich der Faltungskinetik von ddFLN4 und allen anderen Domänen von ddFLN führte zu dem Ergebnis, dass ddFLN4 mit Zwischenzustand eine ca. 10fach schnellere Faltung aufweist, obwohl alle Domänen eine homologe Struktur besitzen. Domäne ddFLN4 stellt demnach ein Beispiel dar, inwiefern ein Faltungszwischenzustand zu einer substantiellen Beschleunigung der Faltung führen kann.

2. Einleitung

Proteine stellen die bedeutendste Gruppe von Makromolekülen in der Biologie dar; als Nanomaschinen sind sie praktisch an allen biochemischen Prozessen der Zelle beteiligt. So sind Proteine als Enzyme z. B. nicht nur für die Herstellung aller wichtigen Lebensbausteine, sondern auch für den Abbau bzw. das „Recycling“ fehlerhafter Bausteine eines Organismus verantwortlich. Die Bedeutsamkeit dieser Makromoleküle für die Biologie spiegelt sich in deren Namen wieder – Protein leitet sich von *protos* („erstes, wichtigstes“) oder *proteuo* („ich nehme den ersten Platz ein“) ab.

Proteine werden als lineare Sequenz aus 20 verschiedenen Aminosäuren (Primärstruktur) in der Zelle synthetisiert. Die Primärstruktur eines Proteins ist wiederum im Gencode der Desoxyribonukleinsäure (DNA) festgelegt. Im Prozess der Proteinbiosynthese wird die Sequenz der DNA in eine entsprechende Primärstruktur umgewandelt. Damit Proteine biologisch aktiv werden können, muss eine strukturelle Transformation, ausgehend von der inaktiven linearen (denaturierten) in die biologisch funktionsfähige (native) 3-D-Struktur des Moleküls, stattfinden. Dieser allgemein als Proteinfaltung bezeichnete Prozess ist im Bereich der Biowissenschaften Objekt intensiver Forschung. Die Frage nach dem Zusammenhang zwischen Primär- und nativer Struktur, bzw. Funktion des Proteins, ist seit Jahrzehnten Thema zahlreicher Arbeiten und stellt aufgrund der Komplexität des Problems eine große wissenschaftliche Herausforderung dar. Sie zu beantworten wäre von großem Nutzen: Ein tieferes Verständnis über den Zusammenhang zwischen Primär- und nativer Struktur würde z. B. die pharmakologische Forschung in die Lage versetzen, schneller und effektiver neue Zielmoleküle für eine gerichtete Medikamentenentwicklung für diverse Krankheiten zu finden. Darüber hinaus würde man ein grundlegendes Wissen über die Funktionsweise biologischer Organismen erhalten.

Biologische Systeme besitzen die besondere Eigenschaft der Selbstorganisation. Aufgrund verschiedenartiger inter- und intramolekularer Wechselwirkungen kommt es zur Bildung komplexer Systeme wie Zellen oder ganzer Organismen. Auch die Proteinfaltung ist ein Beispiel für den Prozess der Selbstorganisation: In ersten experimentellen Studien in den 50er und 60er Jahren konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Faltung um einen reversiblen und spontanen Prozess handelt¹. Trotz der immens großen Anzahl an möglichen Protein-Konformationen findet das Protein innerhalb kürzester Zeit (1 ms - min) den richtigen Weg (Faltungspfad) durch den komplexen Phasenraum, bis das Ziel, der native Zustand, eingenommen ist. Dieses Phänomen, auch als Levinthal-Paradoxon bekannt, führte zunächst zu der Annahme, dass der Faltungsprozess entlang eines spezifischen Faltungspfades erfolgen müsste, d. h. eine bestimmte Abfolge an Konfigurationen bei der Faltung des Proteins eingenommen wird. Die fortschreitende Weiterentwicklung der Experimente sowie der Einsatz theoretischer Modelle gewährten indes einen zunehmend detaillierteren Einblick in die Faltungsmechanismen von Proteinen und stellten das ursprüngliche Bild in Frage. Inzwischen geht man von einer erweiterten Sicht der Proteinfaltung aus, wonach Proteine beim Übergang in ihren nativen Zustand diversen Faltungspfaden folgen können^{2,3}. Es wird angenommen, dass sich Proteine entlang einer Vielzahl von Routen auf der Oberfläche eines dreidimensionalen Faltungstrichters der Energie bewegen, bis sie den Boden des Trichters – den nativen Zustand – erreichen. Um ein detailliertes Verständnis der Proteinfaltung zu gewinnen, ist es daher von großer Wichtigkeit, die Eigenschaften des Faltungstrichters zu bestimmen.

In klassischen Proteinfaltungsexperimenten wie z. B. der Kalorimetrie lassen sich zwar seit längerer Zeit Durchschnittswerte von Faltungsenergien von Proteinlösungen bestimmen. Solche Experimente liefern jedoch keine Information über die Form des Faltungstrichters, die der Faltung eines Proteins zugrunde liegt. Zudem lassen sich aus klassischen Experimenten aufgrund der Mittelung

der Messergebnisse vieler Moleküle nur bedingt Informationen über einzelne Faltungspfade gewinnen. Damit aber einzelne Faltungspfade von Proteinen untersucht werden können, ist es erforderlich, Versuche an einzelnen Molekülen durchzuführen.

Die Kraftspektroskopie ist eine moderne Methode, die vor allem zur Analyse der mechanischen Eigenschaften einzelner Moleküle eingesetzt wird. Ein weiterer Anwendungsbereich der Spektroskopie liegt in der Untersuchung der Faltung von Proteinen. Dabei bietet die Methode die einzigartige Möglichkeit, experimentell Informationen über die Form des Faltungstrichters einzelner Proteine zu gewinnen. In einem kraftspektroskopischen Experiment werden für gewöhnlich die Entfaltungspfade der Proteine betrachtet. Um jedoch ein umfassendes Bild der Faltung zu erhalten, ist es notwendig, auch den Faltungstrichter entlang von Faltungspfaden zu charakterisieren.

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die Kraftspektroskopie eine effektive Methode nicht nur zur Bestimmung der Entfaltungs-, sondern auch zur Quantifizierung der Faltungskinetik einzelner Proteine darstellt. Es werden außerdem Experimente zur Messung der besonderen elastischen Eigenschaften dieser Proteine vorgestellt.

3. Experiment

Die Untersuchungen zur Charakterisierung der Dehnbarkeit einzelner Moleküle wurden zum Großteil mittels eines eigens für die Messungen konstruierten und optimierten Kraftspektrometers durchgeführt. Die Funktionsweise des Kraftspektrometers geht auf das Funktionsprinzip der Rasterkraftmikroskopie zurück, deren biophysikalische Anwendung vor allem in der topographischen Abbildung von biologischen Proben wie Biopolymeren bis hin zu lebenden Zellen liegt. Bei der Rasterkraftmikroskopie wird die Probe lateral nanometergenau bewegt, währenddessen - im sog. Kontakt Modus - eine feine Spitze am Ende einer Blattfeder auf die Probe eindrückt (s. Abb. 3). Es kommt zu einer Verbiegung der Feder proportional zum Höhenprofil der Probe. Die Verbiegung der Feder wird mithilfe eines Lichtzeigers nachgewiesen. Dieser ist auf eine Vierquadrantendiode ausgerichtet, die proportional zur vertikalen Bewegung des Zeigers bzw. der Verbiegung der Feder einen Fotostrom ausgibt (s. Abb. 3). Aus der lateralen Position und dem Diodensignal erhält man dann eine dreidimensionale Abbildung der Probe, auch – und das ist einer der Vorteile der Methode - unter physiologischen Bedingungen.

Im Unterschied zum Rasterkraftmikroskop wird beim Kraftspektrometer die Probe während der Messung nur vertikal bewegt. Als Messsignale werden lediglich die vertikale Probenposition und das Diodensignal aufgenommen. Als Ergebnis erhält man folglich statt eines Höhenprofils Kraft-Dehnungskurven. Wie in zahlreichen Arbeiten gezeigt werden konnte, liegt der besondere Einsatzbereich des Kraftspektrometers in der Analyse der Dehnungseigenschaften einzelner Moleküle⁴. Alternative Methoden, wie die optische Pinzette, die sich insbesondere durch eine hohe Kraftauflösung auszeichnet, haben sich ebenfalls als sehr effizient bei der kraftspektroskopischen Untersuchung einzelner Moleküle erwiesen^{5,6}. Für den Kraftspektrometer spricht jedoch seine deutlich bessere Positionsgenauigkeit im Vergleich zur optischen Pinzette und seine einfache Handhabung, insbesondere bei der mechanischen Untersuchung einzelner Moleküle.

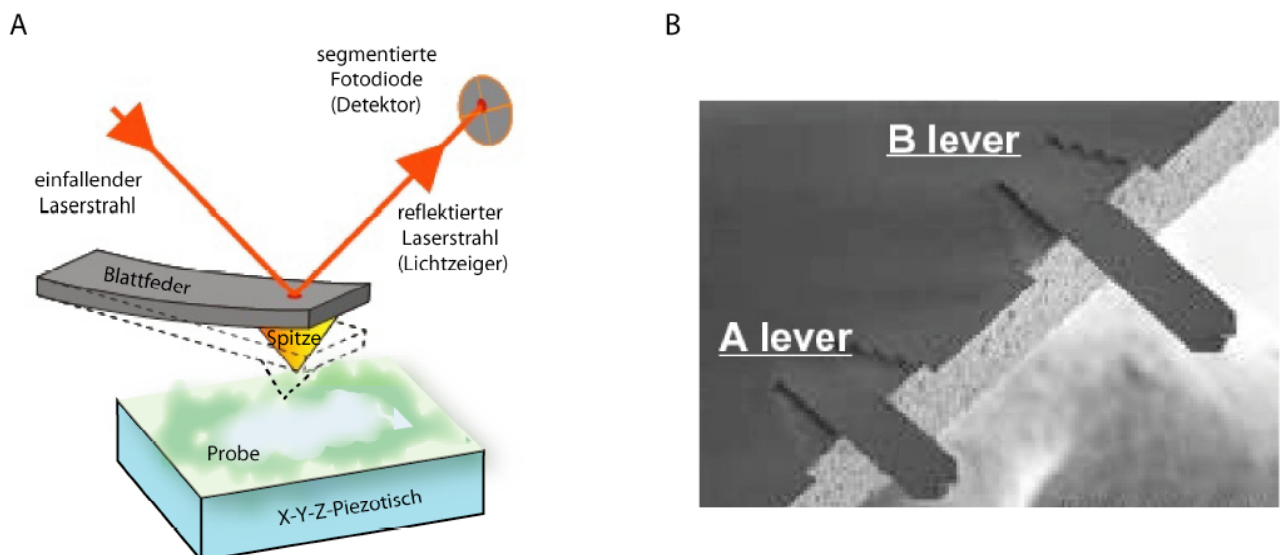


Abb. 3: A) Funktionsprinzip des Rasterkraft- und Kraftspektrometers: Die Richtung des reflektierten Laserstrahls ändert sich proportional zur Verbiegung der Blattfeder, die über die Spitze mit der Probe in Kontakt steht. Gleichzeitig wird die Probe durch einen X-Y-Z-Piezotisch bewegt. Die Fotodiode dient als Detektor und misst die Verschiebung des Lichtzeigers entsprechend der Verbiegung der Feder. B) Elektronenmikroskopische Aufnahme der Olympus Bio-Lever des Typs A und B. Die Blattfedern werden aus einem SiN-Chip geätzt und weisen unterschiedliche Steifigkeiten auf: Typ A 6 mit pN/nm und Typ B mit 30 pN/nm.

3.1 Das Kraftspektrometer

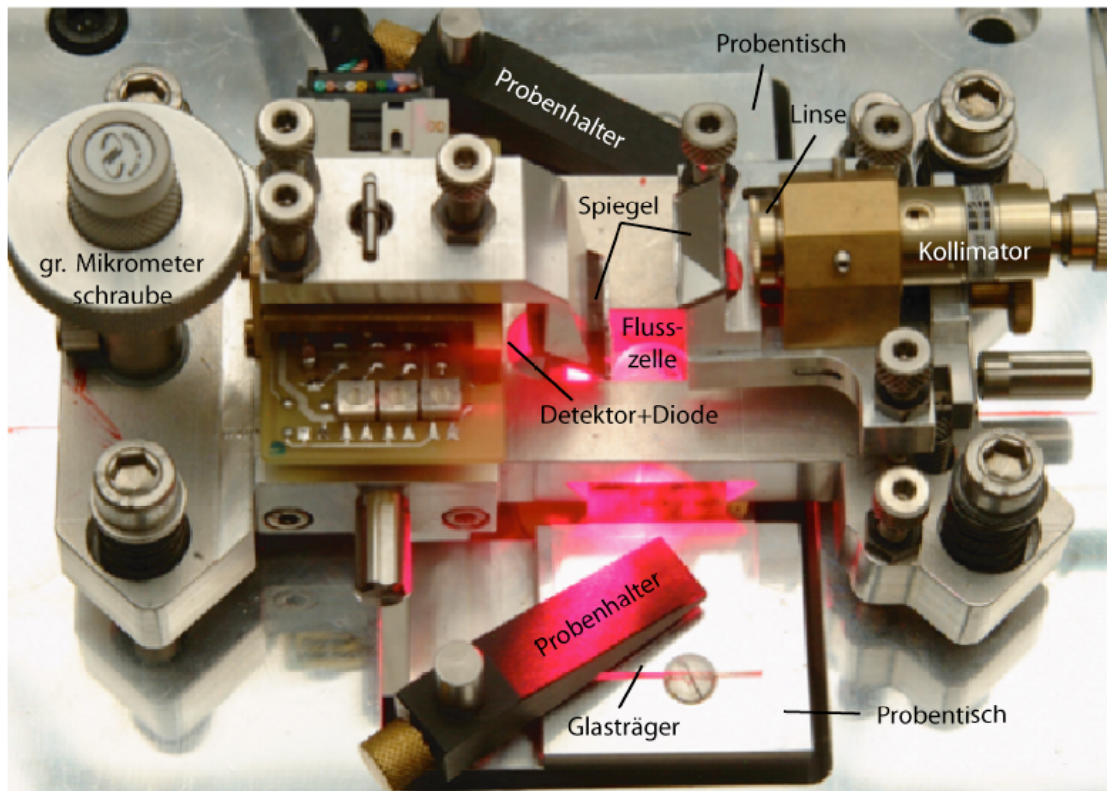


Abb. 3.1: Fotografische Darstellung des Kraftspektrometers. Das Laserlicht aus einer Lichtfaser wird kollimiert, fokussiert und über einen Spiegel auf die Oberseite der Blattfeder reflektiert. Die Bewegung des reflektierten Strahls (Lichtzeiger) wird über die Diode detektiert. Die Flusszelle, an deren Unterseite sich der Chip mit den Blattfedern befindet, ist rot angeleuchtet. Über die große Mikrometerschraube wird der AFM-Kopf der Probe auf dem Glasträger angenähert. Die Probenhalter fixieren den Glasträger auf dem Probentisch, der von einem darunter liegenden X-Y-Z-Piezotisch bewegt wird.

Im Folgenden wird kurz der Aufbau des Kraftspektrometers in Abb. 3.1 erläutert: Das Probenmolekül befindet sich in gelöster Form in einem Probentropfen auf einem mit Gold bedampften Glasträger. Nach einer Inkubationszeit von mehreren Minuten ist die Goldoberfläche vollständig mit adsorbierten Probenmolekülen bedeckt. Die nanometergenaue Verschiebung des Glasträgers bzw. der Probe erfolgt mithilfe eines X-Y-Z-Piezotisches (P-517.3, Physik Instrumente, Karlsruhe, Deutschland), der sich durch eine hohe Verstellgenauigkeit für alle drei Raumrichtungen ($Z: < 0.5$ nm; $X, Y: 2$ nm) sowie durch eine Apertur auszeichnet. In Abb. 3 B sind die Blattfedern (Olympus, Tokyo, Japan) dargestellt, die bei den meisten der Experimente verwendet wurden. Diese wurden speziell zur kraftspektroskopischen Analyse einzelner Moleküle entwickelt und gewährleisten ein besonders günstiges Signal-zu-Rausch-Verhältnis für Experimente in wässriger Umgebung. Der SiN-Chip, auf dessen Oberkante sich 4 Blattfedern mit unterschiedlichen Steifigkeiten befinden, wird zur Messung mit Silikonfett auf eine sog. Flusszelle geklebt. Die durchsichtige Flusszelle aus Plexiglas verfügt über 2 Kanäle, durch die Pufferlösung gespritzt wird. Auf diese Weise entsteht zwischen den Ausgängen der Kanäle auf dem Chip ein Tropfen, in dem die Blattfedern vollständig eingetaucht sind. Nach dem Einbau der Flusszelle in den Kraftspektrometer-Kopf bringt man beide Tropfen, den Proben- und Puffertropfen, über die Mikrometerschraube in Kontakt (s. Abb. 3.1). Es bildet sich ein Meniskus zwischen Glasträger und Zelle aus - der Meniskus stellt somit die eigentliche Messkammer des Experiments dar. Als Lichtquelle dient ein superlumineszierender

Diodenlaser (Superlum Diodes, Moskau, Russland). Der Infrarotlaser zeichnet sich durch seine breite Wellenlängenverteilung (>40 nm) aus und verhindert größtenteils, dass Interferenzen zwischen den reflektierenden Strahlen ausgehend von der Blattfeder und dem reflektiven Substrat das Messsignal verfälschen. Die Strahlformung erfolgt mittels einer Optik, bestehend aus einem Kollimator und einer Linse (Schäfter+Kirchhoff, Hamburg, Deutschland). Über einen Spiegel wird der Strahl nach der Linse in Richtung Flusszelle und auf die Oberseite der Blattfeder gelenkt. Von dort aus kommt es zu einer erneuten Reflexion des Strahls, sodass der Strahl als Lichtzeiger über einen zweiten Spiegel die Vierquadrantendiode erreicht (s. Abb. 3.1).

Die Blattfeder kann leicht durch äußere Störquellen angeregt werden. Aus diesem Grund wurde beim Bau des Kraftspektrometers z. B. darauf geachtet, dass die Eigenschwingungen der einzelnen Bauteile des Mikroskops möglichst nicht mit der Schwingung der Blattfedern interferieren. Zudem steht das Mikroskop auf einem Dämpfungstisch, der Störquellen mit einer Frequenz von 0.7 bis über 100 Hz und darüber hinaus aktiv ausgleicht bzw. passiv dämpft. Der Piezotisch mit seiner Apertur gewährleistet einen bequemen optischen Zugang zum Glasträger von der Unterseite des Piezotisches her. So lässt sich auf praktische Weise die Blattfeder mittels eines Objektivs und einer CCD-Kamera durch den Glasträger filmen. Man erhält dadurch die nötige Orientierung beim Ausrichten des Laserstrahls auf die Feder.

Für das simultane Einlesen der Messsignale (Diodensignal und Positionssignal des Piezotisches in vertikaler Richtung) und die Ausgabe des Positionssignals des Piezos wurde eine 16 Bit DA-Wandlerkarte (Data Translation, Boston, USA) mit einer Samplingrate von 20 kHz eingesetzt. Ansteuerung und Auswertung erfolgte mithilfe des Programms Igor 4.0 (Wave Metrics, Portland, USA). Die Eichung der Blattfedern wurde mithilfe der Methode des thermischen Rauschens durchgeführt.

4. Theorie

Vorrangiges Ziel dieser Doktorarbeit ist es, die mechanischen Eigenschaften von einzelnen Proteinen, insbesondere von Filamin und der Superhelix von Myosin, zu untersuchen. Hierfür wurden die Moleküle mit Hilfe eines Kraftmikroskops kontrolliert gedehnt. Aus den Kraft-Dehnungskurven konnten dann Steifigkeit und Stabilität der Proteine bestimmt werden; unter Berücksichtigung einiger Besonderheiten der Kraftspektroskopie, wie sie im Folgenden theoretisch erläutert werden. Es wird sich z. B. zeigen, dass kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen den Bildungsenergien, wie sie üblicherweise in klassischen Proteinfaltungsexperimenten bestimmt werden, und der mechanischen Stabilität eines Proteins besteht, dagegen aber die Form der Potentiallandschaft, die der Faltung und Entfaltung des Proteins zugrunde liegt, maßgeblich für dessen mechanische Stabilität ist. Eine weitere Besonderheit der Kraftspektroskopie liegt darin, dass die mechanische Stabilität einzelner Moleküle vom zeitlichen Verlauf der Belastung selbst abhängt - so bedingt eine erhöhte Zuggeschwindigkeit einen Anstieg der Entfaltungskräfte eines Proteins. Das dynamische Verhalten von Entfaltungskräften wird gezielt in der dynamischen Kraftspektroskopie untersucht (s. Kap. 4.6) mit dem Bestreben, Information hinsichtlich der Form der Potentiallandschaft sowie der Entfaltungskinetik des Proteins im unbelasteten Zustand zu gewinnen. Im Folgenden werden die theoretischen Grundlagen der Kraftspektroskopie aus einer thermodynamischen Sichtweise dargelegt^a. Wir betrachten den Einfluss der mechanischen Größe Kraft auf klassische thermodynamische Größen wie der freien Energie (s. 4.1), Entropie (s. Kap. 4.1), freien Enthalpie (s. Kap. 4.2 und 4.3), den Reaktionsraten (s. Kap. 4.4) und der Gleichgewichtskonstante (s. Kap. 4.5) des Einzelmolekülsystems. Hierbei wird grundsätzlich zwischen dem Fall des thermischen Gleichgewichts und Nichtgleichgewichts unterschieden.

Neben der mechanischen Charakterisierung der Entfaltung einzelner Proteine wurde mit Hilfe eines neuen Messprotokolls das Kraftmikroskop ebenfalls zur Untersuchung der Faltung einzelner Proteindomänen eingesetzt. Zur Beschreibung der Faltungsdynamik der Domänen wurde ein 3-Zustands-Ratenmodell verwendet (s. Kap. 4.7).

Auch strukturelle Informationen wie z. B. die Primärstruktur von Entfaltungszwischenzuständen einzelner Domänen lassen sich auf Grundlage von Röntgen- oder NMR-Strukturdaten anhand kraftspektroskopischer Daten gewinnen. Die Beschreibung für eine derartige Strukturanalyse ist Thema des letzten Abschnitts 4.8.

4.1 Entropische und enthalpische Kräfte

Angesichts der großen Anzahl von Konformationen eines Proteins erfolgt deren theoretische Beschreibung mittels Methoden der statistischen Physik. Betrachten wir nun eine in Wasser gelöste Polypeptidkette, die idealerweise keine Sekundärstruktur ausbildet. Aus Sicht der statistischen Physik stellt die Polypeptidkette eine statistische Kette dar. Aufgrund der Voraussetzung der Entropiemaximierung im thermischen Gleichgewicht bildet die Kette bevorzugt eine im Vergleich zu ihrer Konturlänge kompakte Faltungsstruktur. In Bezug auf das kraftspektroskopische Experiment stellt sich die Frage, wie die eingespannte verknäulte Kette auf die mechanische Zugbelastung des Kraftmikroskops reagiert. Unabhängig vom genauen mikroskopischen Mechanis-

^a Aufgrund des Themas dieser Arbeit werden zwar die Grundlagen der Kraftspektroskopie anhand des Beispiels der Proteine erklärt, jedoch sind diese ebenfalls im Bezug auf andere Molekülsysteme wie z. B. Zell-Zell Adhäsion oder Ligand-Rezeptor-System gültig.

mus kommt es bei äußerer Belastung des Moleküls zu einer Änderung der freien Energie A , und einer damit verbundenen Gegenkraft

$$F = \left(\frac{\partial A}{\partial x} \right)_T = \left(\frac{\partial U}{\partial x} \right)_T - T \left(\frac{\partial S}{\partial x} \right)_T \quad (1)$$

des Moleküls. Hierbei stellt x die Dehnung des Moleküls dar. Die Ableitung wird unter isothermen Bedingungen betrachtet, angedeutet durch den Index T . Drückt man die freie Energie A als Funktion der inneren Energie U sowie der Entropie S aus, stellt der erste und zweite Term den enthalpischen bzw. entropischen Beitrag der Gegenkraft dar. Beide Anteile führen zu einer positiven, attraktiven Kraft. Bei Dehnung eines Moleküls bis auf eine Länge kleiner als seine Konturlänge überwiegt der entropische Kraftanteil. Die Gegenkraft beruht dann hauptsächlich auf einer Reduktion der Entropie durch Einschränkung der Konfigurationsmöglichkeiten; die innere Energie bleibt dabei konstant. Der enthalpische Anteil gewinnt dann an Bedeutung, wenn das Molekül eine Dehnung über seine Konturlänge hinaus erfährt^a. Eine Entropieabnahme bei Streckung ist verbunden mit einer Zunahme der molekularen Ordnung des Systems. Negatives ∂S bedeutet aber auch Wärmeabgabe, wie sie beispielsweise bei rascher Dehnung eines Muskels beim Aufwärmen spürbar ist. Darüber hinaus gibt Gl. (1) die spezielle Tatsache wieder, dass die entropische Kraft linear mit der Temperatur ansteigt.

Zur analytischen Beschreibung des Kraft-Dehnungs-Verhaltens ist eine mathematische Modellierung des realen Moleküls erforderlich. Insbesondere haben sich zwei Ansätze aus der großen Anzahl an Modellen bewährt: die freigelenkige und die wurmartige Kette. Die freigelenkige Kette (freely jointed chain = FJC) besteht aus N starren Segmenten der Kuhlänge l , die über frei drehbare Gelenke aneinander gekoppelt sind (s. Abb. 4.1 A).

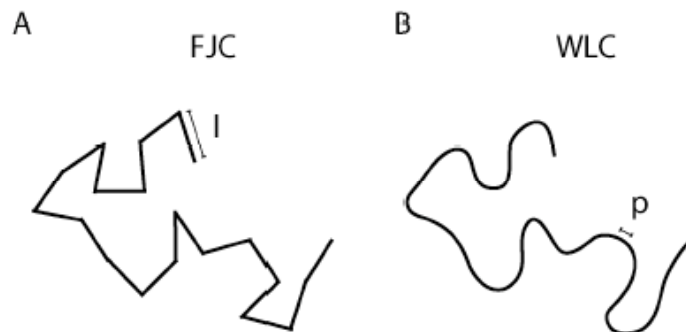


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Polymermodelle FJC (A) und WLC (B).

In Abb. 4.1 B ist zum Vergleich die wurmartige Kette („wormlike chain“= WLC) schematisch dargestellt. Das WLC-Modell beschreibt das Polymer als homogenen Faden konstanter Biegefestigkeit, der auf der Skala der Persistenzlänge p gerade erscheint. Obwohl man im Ansatz des WLC-Modells von entropischen und enthalpischen Beiträgen ausgeht, ist die Zuglänge auf die Konturlänge begrenzt^b. Gl. (2) beschreibt als analytische Näherungsformel das Kraft-Dehnungs-Verhalten des WLC-Modells⁶.

^a Die Änderung der inneren Energie ist hierbei die Folge einer Änderung von Bindungswinkel und Bindungslängen.

^b Beim Kraftmikroskop greift die Messspitze das einzelne Molekül an verschiedenen Stellen auf. Es sei daher bemerkt, dass im Falle der Kraftspektroskopie die Konturlänge L im Folgenden für jenen Abschnitt des Moleküls steht, der zwischen Substrat und Spitze eingespannt ist. L steht hier nicht für die Gesamtlänge des Moleküls.

$$F(x) = \frac{k_B T}{p} \left[\frac{1}{4} \left(1 - \frac{x}{L} \right)^{-2} + \frac{x}{L} - \frac{1}{4} \right] \quad (2)$$

Das WLC-Modell ist nach Gl. (2) definiert durch zwei Parameter: die Kontur- und Persistenzlänge p bzw. L (k_B =Boltzmannkonstante). Die Persistenzlänge stellt ähnlich wie die Kuhnlänge ein Maß für die Flexibilität des Moleküls dar. Für beide Längen gilt: je kleiner, desto größer die Entropie des Polymers und desto größer der Widerstand der Kette bei Dehnung. Andererseits gilt: je größer, desto weniger ist das Polymer in der Lage, sich zu „verknäulen“.

Beide Modelle sind unabhängig vom molekularen Aufbau des betrachteten Polymers. Das WLC-Modell geht sogar von einem Kontinuum ohne Feinstruktur aus. Es ist daher für gewöhnlich kein einfacher Zusammenhang zwischen den Parametern l und p und realen Strukturgrößen wie Bindungslängen oder der Länge einer Monomereinheit zu erwarten. Für Dehnungen größer als die Konturlänge des Moleküls muss für das WLC-Modell neben der Biege- auch die Dehnungselastizität berücksichtigt werden. Dazu wird einfach in einem erweiterten WLC-Modell Gl. (2) mit einem zusätzlichen Dehnungsterm erweitert, d. h. der Term x/L wird durch den Term $x/L - F/\phi$ ersetzt. Der Parameter ϕ steht hierbei für die spezifische Steifigkeit des Polymers.

Die Entscheidung welches Modell, ob FJC, WLC oder erweitertes WLC, zur Beschreibung der Messdaten am besten geeignet ist, wird je nach Polymer empirisch getroffen. So hat sich die FJC-Theorie zur Beschreibung flexibler Moleküle wie Oligonukleotide, Polydimethylsiloxan, Polysaccharide und Polymethacrylat bewährt⁷⁻¹⁰, während sich das WLC-Modell insbesondere für die Beschreibung des Kraft-Dehnungs-Verhaltens von DNA und Proteinen eignet^{6,11}. Wegen des relevanten Kraftbereichs der in dieser Arbeit untersuchten Moleküle bis 300 pN wurde zur Beschreibung des Kraft-Dehnungs-Verhaltens das WLC-Modell nach Gl. (2) herangezogen. Die gemessenen Persistenzlängen von 0.35 bis 0.8 nm für Filamin und Myosin stimmen mit den Flexibilitäten anderer bereits untersuchter Proteine im entfalteten Zustand wie Titin, Spektrin, Ubiquitin etc. überein¹¹⁻¹³.

4.2 Freie Enthalpie als Funktion der Kraft

Gemäß des ersten Hauptsatzes der Thermodynamik ist die Änderung der inneren Energie eines eingespannten Moleküls dU gegeben durch die Summe der mit der Umgebung ausgetauschten Wärme dQ und Arbeit dW . Im Falle des eingespannten Moleküls setzt sich dW ferner aus zwei Anteilen zusammen, nämlich der Volumenarbeit PdV sowie der mechanischen Arbeit der Blattfeder Fdx .

$$dU = dQ + dW = (TdS) + (-PdV + Fdx). \quad (3)$$

Für gewöhnlich sind im Experiment Temperatur T und der Druck P die unabhängigen Variablen. Mit Hilfe einer Legendre-Transformation lässt sich Gl. (3) in eine praktikablere Form, nämlich als eine Funktion der freien Enthalpie G umwandeln

$$dG = -SdT + Vdp + Fdx \quad (4)$$

Bei konstanter Temperatur und konstantem Druck berechnet sich die notwendige Arbeit W zur Dehnung des Moleküls um eine Länge Δx zu

$$W = \int_{x_0}^{x_0 + \Delta x} F dx. \quad (5)$$

Im kraftspektroskopischen Experiment erfolgt die Dehnung meist langsam genug, sodass das System während des gesamten Experiments den Zustand eines quasi-statischen Gleichgewichts nicht verlässt^a. Damit ist die aufgewendete Arbeit W identisch mit der Änderung der freien Enthalpie $\Delta G_{Dehnung}(\Delta x)$ ^b. Zur Berechnung von $\Delta G_{Dehnung}(\Delta x)$ wird also einfach Gl. (2) nach der Dehnung integriert. Gl. (5) gibt die schon oben erwähnte Tatsache wieder, dass zur Streckung steiferer Moleküle weniger Energie erforderlich ist. Generell gilt, dass sich die Beiträge der freien Enthalpie sowie Entropie und Kraft aufgrund der Dehnung im entropischen Kraftbereich umgekehrt proportional zur Persistenzlänge p verhalten.

4.3 Änderung der freien Enthalpie als Funktion der Kraft

Betrachtet werden zwei Zustände A und B eines Moleküls mit den Dehnungen x_A bzw. x_B bei $F=0$ (A, B sind z. B. gleich dem gefalteten bzw. denaturierten Zustand eines Proteins). Aus energetischer Sicht stellen beide Zustände Minimas an Positionen x_A und x_B in einer eindimensionalen Potentiallandschaft der freien Enthalpie dar (s. Abb. 4.3). Die Zustände seien über eine Distanz von $\Delta x_{A \rightarrow B} = x_B - x_A$ entlang der mechanischen Reaktionskoordinate voneinander getrennt, wobei der energetische Unterschied beider Zustände $\Delta G_{A \rightarrow B}$ beträgt. Zwischen den Zuständen befindet sich zudem eine Reaktionsbarriere der Höhe $\Delta G_{A \rightarrow T}$ und $\Delta G_{B \rightarrow T}$ ausgehend von A bzw. B mit dem Übergangszustand T an Position x_T . Im Folgenden wird der Einfluss einer äußeren Kraft auf die Form der Potentiallandschaft untersucht. Für den reversiblen Übergang von Zustand A nach B bei konstanter Kraft setzt sich die aus der Transformation resultierende Änderung der freien Enthalpie aus der reversiblen Arbeit $F \Delta x_{A \rightarrow B}$ und der Änderung der Dehnungsarbeit $\Delta G_{Dehnung}^{A \rightarrow B}$ zusammen¹⁴:

$$\Delta G_{A \rightarrow B}(F) = -F \Delta x_{A \rightarrow B}(F) + \Delta G_{Dehnung}^{A \rightarrow B}(F) + c \quad (6)$$

Wegen der Verlängerung des Moleküls ist für den Übergang A \rightarrow B die reversible Arbeit $F \Delta x$ positiv, die wiederum selber von F abhängt: $\Delta x_{A \rightarrow B}(F) = x_B(F) - x_A(F)$, mit $x_A(F)$ und $x_B(F)$ gleich der Dehnung des Moleküls im Zustand A bzw. B bei Kraft F . Die Änderung der Dehnungsarbeit $\Delta G_{Dehnung}^{A \rightarrow B}$ ist identisch mit der Differenz der Dehnungsarbeiten des Moleküls im Zustand A und B, gemäß Gl. (5).

$$\Delta G_{Dehnung}^{A \rightarrow B} = \int_0^{x_B(F)} F(x'_B) dx'_B - \int_0^{x_A(F)} F(x'_A) dx'_A \quad (7)$$

$\Delta G_{Dehnung}^{A \rightarrow B}$ ist stets positiv, da dieser Energiebeitrag aus der Umgebung (Blattfeder) bezogen wird^c. Für die Konstante c folgt $c = \Delta G_{A \rightarrow B}$ aufgrund der Zwangsbedingung $\Delta G_{A \rightarrow B}(F=0) = \Delta G_{A \rightarrow B}$.

^a Dies gilt, wenn kein Phasenübergang des Systems eintritt (z. B. Entfaltung eines Proteins).

^b W ist tatsächlich eine Arbeit, die am System verrichtet wird, da beide Variablen F und x und folglich auch W positiv sind.

^c Für Zustand B ist mehr Energie zur Dehnung nötig als für Zustand A (s. Gl. (5)).

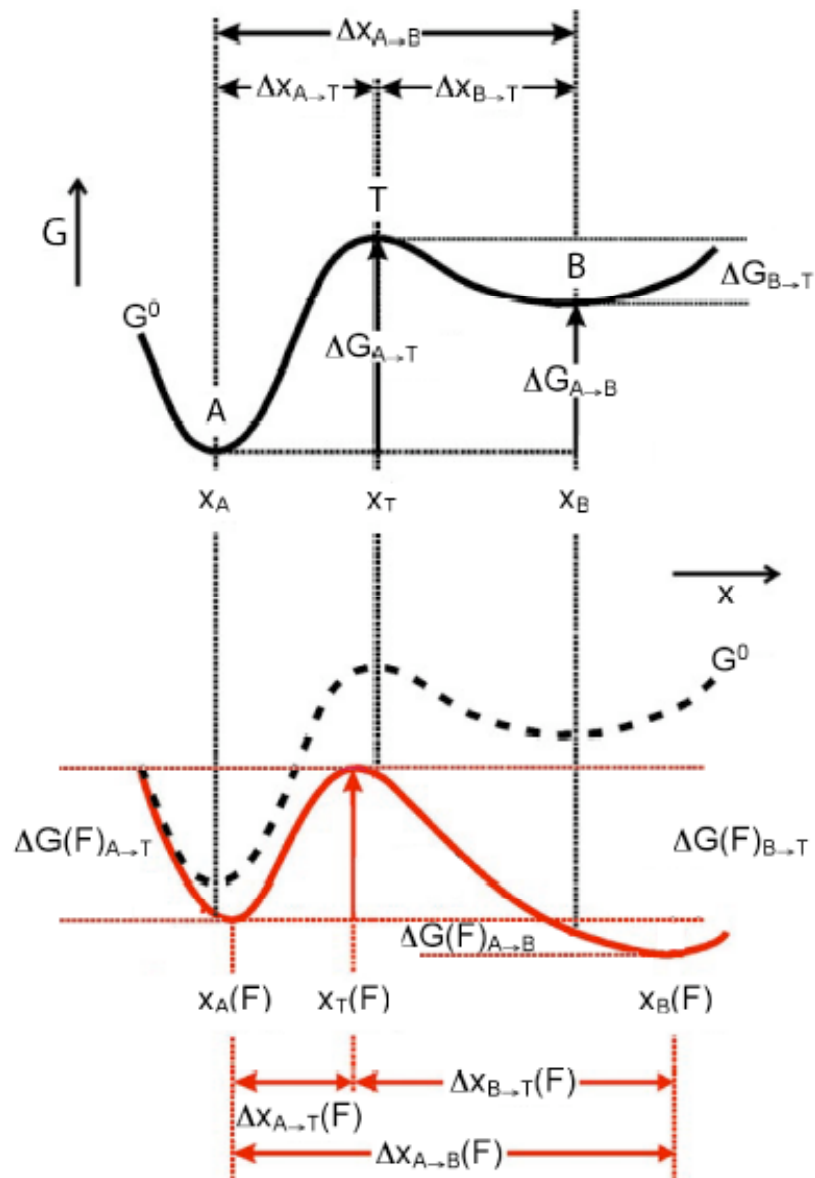


Abb. 4.3: Effekt der Kraft auf die eindimensionale Potentiallandschaft eines Zweizustandssystems. Die Reaktionskoordinate x ist gleich der Dehnung des Moleküls. Im oberen und unteren Teil ist die Potentiallandschaft für den Fall des unbelasteten bzw. belasteten Moleküls schematisch dargestellt, wobei A, T und B gleich der native, Übergangs- und denaturierte Zustand ist. Die Kraft bewirkt eine energetische Absenkung der Zustände T und B i. Vgl. zu Zustand A bzw. eine Verkipfung in erster Ordnung um den Betrag $-Fx$.

Zusammenfassend gilt:

$$\Delta G_{A \rightarrow B}(F) = \Delta G_{A \rightarrow B} - F\Delta x_{A \rightarrow B}(F) + \Delta G_{\text{Dehnung}}^{A \rightarrow B}(F) \quad (8)$$

Gl. (8) ist auch für die Rückreaktion $A \leftarrow B$ gültig. Hierzu werden einfach Zustand A und B miteinander vertauscht. In erster Ordnung impliziert Gl. (8), dass durch Belastung eines Moleküls die eindimensionale Potentiallandschaft, wie in Abb. 4.3 schematisch dargestellt, um den Betrag Fx abgesenkt bzw. zu negativen Energien hin „verkippt“ wird. Dies hat eine Reduktion bzw. Erhöhung der Barriere $\Delta G_{A \rightarrow T}$ und $\Delta G_{B \rightarrow T}$ zur Folge.

4.4 Übergangsraten als Funktion der Kraft

Reaktionen, die in Lösung ablaufen, wie z. B. Proteinfaltung und – Entfaltung können allgemein als eine überdämpfte Bewegung des Molekülsystems entlang der Reaktionskoordinate angesehen werden. Für diesen Fall ist die Theorie nach Arrhenius heranzuziehen, nach der die Übergangsraten $k_{A \rightarrow B}$ und $k_{B \rightarrow A}$ zwischen Zustand A und B gegeben sind zu

$$k_{A \rightarrow B} = \omega \cdot e^{-\Delta G_{A \rightarrow T} / k_B T}, k_{B \rightarrow A} = \omega \cdot e^{-\Delta G_{B \rightarrow T} / k_B T} \quad (9)$$

Gl. (9) beruht auf der Annahme, dass zum Übergang von Zustand A in Zustand B - und umgekehrt - zuerst der aktivierte Übergangszustand T vom Molekül überwunden werden muss. Die Boltzmann-Faktoren entsprechen dabei der Wahrscheinlichkeit, dass es ausgehend von Zustand A oder B zu einer Besetzung des Übergangszustandes T kommt, wobei beide Faktoren exponentiell von den Aktivierungsenergien $\Delta G_{A \rightarrow T}$ und $\Delta G_{B \rightarrow T}$ abhängen. Der Vorfaktor ω wird als Probiefrequenz bezeichnet. Invertiert ist ω gleich der mittleren Diffusionszeit, die das Molekül zum Erreichen des Übergangszustands ausgehend von Zustand A oder B benötigt. In erster Näherung wird in Gl. (9) davon ausgegangen, dass die Probiefrequenz für beide Raten identisch ist. Mit der mechanischen Belastung des Moleküls geht, wie oben erwähnt, eine „Verkipfung“ der Potentiallandschaft einher, verbunden mit einer Reduzierung bzw. einem Anstieg der Aktivierungsbarrieren. Zu den Funktionen der kraftabhängigen Raten kommt man, wenn $\Delta G_{A \rightarrow T}$ und $\Delta G_{B \rightarrow T}$ aus Gl. (9) durch die entsprechenden kraftabhängigen Funktionen $\Delta G_{A \rightarrow T}(F)$ und $\Delta G_{B \rightarrow T}(F)$ gemäß Gl. (8) ersetzt werden:

$$k_{A \rightarrow B}(F) = \omega \cdot e^{-(\Delta G_{A \rightarrow T} - F(x_T(F) - x_A(F) + \Delta G_{Dehnung}^{A \rightarrow T})) / k_B T}; k_{B \rightarrow A}(F) = \omega \cdot e^{-(\Delta G_{B \rightarrow T} - F(x_T(F) - x_B(F) + \Delta G_{Dehnung}^{B \rightarrow T})) / k_B T} \quad (10)$$

Hierbei stellt $k_{A \rightarrow B}(F)$ und $k_{B \rightarrow A}(F)$ die kraftabhängige Dissoziations- und Faltungsrate dar. Der Effekt von Kraft auf die Kinetik von Reaktionen wurde erstmals von Bell im Zusammenhang mit Zelladhäsion beschrieben¹⁵. Bell ist dabei von einer linearen Approximation ausgegangen, bei der sich die Barriere $\Delta G_{A \rightarrow T}$ bzw. $\Delta G_{B \rightarrow T}$ um den Betrag $F(x_T - x_A)$ linear mit der Kraft reduziert bzw. um den Betrag $F(x_T - x_B)$ erhöht. Nach Gl. (8) ist diese Annahme für Zustände gerechtfertigt, die durch Belastung nur eine geringe Dehnung, verglichen mit ihrer Konturlänge, erfahren. Für derartige Zustände A und B gilt dann $x_T(F) - x_{A,B}(F) \approx x_T(F=0) - x_{A,B}(F=0) = \Delta x_{A,B \rightarrow T}$ sowie $\Delta G_{A \rightarrow B}^{Dehnung} \approx 0$. Die Ratengleichungen nach Bell können somit aus Gl. (10) abgeleitet werden:

$$\begin{aligned} k_{A \rightarrow B}(F) &= \omega \cdot e^{-(\Delta G_{A \rightarrow T} - F \Delta x_{A \rightarrow T}) / k_B T} = k_{A \rightarrow B} \cdot e^{F \Delta x_{A \rightarrow T} / k_B T} \\ k_{B \rightarrow A}(F) &= \omega \cdot e^{-(\Delta G_{B \rightarrow T} - F \Delta x_{B \rightarrow T}) / k_B T} = k_{B \rightarrow A} \cdot e^{F \Delta x_{B \rightarrow T} / k_B T} \end{aligned} \quad (11)$$

Hierbei nimmt die Rate $k_{A \rightarrow B}(F)$ wegen $x_{A \rightarrow T} > 0$ ausgehend von $k_{A \rightarrow B}$ exponentiell zu, während $k_{B \rightarrow A}(F)$ ausgehend von $k_{B \rightarrow A}$ exponentiell wegen $x_{B \rightarrow T} < 0$ abnimmt. Die Faktoren $k_{A \rightarrow B}$ und $k_{B \rightarrow A}$ sind gleich der spontanen Dissoziations- bzw. Faltungsrate des unbelasteten Moleküls (s. Gl. (9)).

Gl. (11) zeigt, dass bei zunehmender Kraft und der damit verbundenen Verkipfung der Potentiallandschaft die Dissoziations- bzw. Faltungsrate eines eingespannten Proteins exponentiell mit der angelegten Kraft größer bzw. kleiner wird, wenn Zustand A den nativen und B den denaturierten Zustand des Proteins repräsentiert. Gefaltete Proteine stellen z. B. aus mechanischer Sicht starre Strukturen dar; deren kraftabhängige Dissoziationsrate wird über Gl. (11) beschrieben.

Im Folgenden wird der Einfluss von Kraft auf eine weitere thermodynamische Größe, die Gleichgewichtskonstante, erläutert.

4.5 Gleichgewichtskonstante als Funktion der Kraft

Anhand des Verlaufs von Kraft-Dehnungskurven kann schnell abgelesen werden, ob der kraftinduzierte Konformationsübergang eines Probenmoleküls entweder im thermischen Un- oder Gleichgewicht stattfindet: Sind nämlich die Dehnungs- und Entspannungskurven äquivalent, erfolgt der Übergang im Gleichgewicht, wogegen bei Auftreten einer Hysterese zwischen den Kurven Ungleichgewicht vorliegt - man spricht dann von elastischen bzw. inelastischen Molekülen.

Bisher konnte kein Nachweis für ein elastisches Protein erbracht werden. Für Proteine wie Titin, Ubiquitin oder Tenascin wurde in zahlreichen kraftspektroskopischen Studien ein inelastisches Dehnungsverhalten beobachtet^{11,13,16}. Die Moleküle wiesen eine sukzessive Verlängerung ihres Molekülrückgrats als Konsequenz der Entfaltung einzelner Untereinheiten der Moleküle- den Proteindomänen - auf. Diese entfalten bei mechanischer Belastung irreversibel und unabhängig voneinander, mit der Folge, dass bei nachfolgender Entspannung der Proteine eine Hysterese in den Messkurven zu beobachten ist. Auf die theoretische Beschreibung der Entfaltung inelastischer Proteine wird noch im nächsten Kapitel ausführlich eingegangen werden.

Im Gegensatz zum Ungleichgewicht ist für den Fall des thermischen Gleichgewichts neben der kraftinduzierten Entfaltung auch die Möglichkeit zur Rückfaltung des Moleküls bei angelegter Kraft gegeben. Beispiele für elastische Moleküle sind DNA, Polyethylenglycol oder Dextran^{6,9,17}.

Zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstante als Funktion der Kraft betrachten wir nun ein elastisches Molekül mit N Untereinheiten, die unabhängig voneinander entweder die Konfiguration A oder B aufweisen (z. B. A=nativer Zustand, B=denaturierter Zustand). Im gedehnten Zustand besitzen die Segmente nach Gl. (5) die Eigenenergien

$$G_{A,B} = G_{Dehnung}^{A \rightarrow B, B \rightarrow A} + G_{A,B}(F = 0). \quad (12)$$

Es wird angenommen, dass Hin- und Rücktransformation zwischen Zustand A und B für jedes Molekülsegment sehr schnell im Vergleich zur experimentellen Zeitskala ist; das Molekül erreicht quasi sofort das thermodynamische Gleichgewicht. Für das Molekül als kanonische Gesamtheit mit n Untereinheiten im Zustand A und $(N-n)$ in Zustand B gilt die Boltzmann-Statistik. Die Zustandssumme für das System berechnet sich zu

$$Z(N, n, T) = \binom{N}{n} \left(e^{-G_A / k_B T} \right)^n \left(e^{-G_B / k_B T} \right)^{N-n} \quad (13)$$

Der Binomialkoeffizient gibt die Anzahl aller Permutationen der n Untereinheiten aus N -Möglichkeiten wieder. Die Gesamtlänge des gedehnten Moleküls ist,

$$x(n) = nx_A + (N - n)x_B \quad (14)$$

mit x_A und x_B den Längen des belasteten Segments in Zustand A bzw. B. Die mittlere Kraft bei konstanter Länge erhält man durch Ableitung der Zustandssumme nach Länge x des Moleküls bei konstantem T und N :

$$\langle F \rangle = -kT \left(\frac{\partial \ln Z}{\partial x} \right)_{T,N} = \frac{1}{(x_B - x_A)} \left(\Delta G_{A \rightarrow B} + \Delta G_{\text{Dehnung}}^{A \rightarrow B} + k_B T \ln \left(\frac{n}{N-n} \right) \right) \quad (15)$$

Hierbei wurde zur Lösung der Ableitung die Stirling Näherung verwendet. Auflösung nach der Gleichgewichtskonstante $K=n/(N-n)$ ergibt:

$$K(F) = \frac{n(F)}{N-n(F)} = e^{-(\Delta G_{A \rightarrow B} - F(x_B - x_A) + \Delta G_{\text{Dehnung}}^{A \rightarrow B})/k_B T} = e^{-\Delta G_{A \rightarrow B}(F)/k_B T} \quad (16)$$

mit $\Delta G_{A \rightarrow B}(F)$ aus Gl. (8). Die Gleichgewichtskonstante K kann alternativ aus Gl. (11) abgeleitet werden, da für K auch die Identität $K(F) = k_{A \rightarrow B}(F)/k_{B \rightarrow A}(F)$ gilt. In Abb. 4.5 ist die Besetzungswahrscheinlichkeit $P[B]$ für Zustand B als Funktion der Kraft F , berechnet nach Gl. (16) dargestellt. Für Zustand A und B wurden die Persistenzlängen 40 bzw. 0.4 nm angenommen. Für $\Delta G_{A \rightarrow B} = 10, 30, 40, 70$ und 90 kT kommt es bei einer mittleren Kraft von ca. 40, 77, 109, 140 bzw. 170 pN zu einem Phasenübergang von A nach Zustand B^a, wobei die Besetzungswahrscheinlichkeit des denaturierten Zustands mit ansteigender Kraft kontinuierlich größer wird.

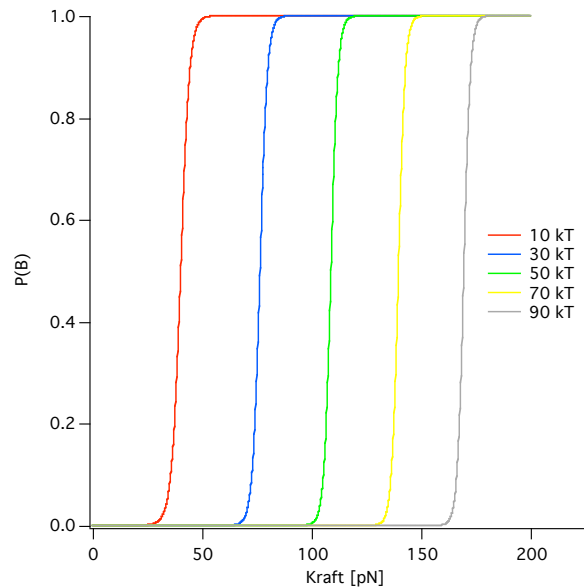


Abb. 4.5: Besetzungswahrscheinlichkeit des denaturierten Zustands als Funktion der Kraft, berechnet für verschiedene Werte für $\Delta G_{A \rightarrow B} = 10, 30, 50, 70$ und 90 kT. Für A und B wurde eine Konturlänge von 2 bzw. 3 nm angenommen.

Das Ungleichgewicht bei der Entfaltung von Proteinen lässt sich auf die Verkippung der asymmetrischen Landschaft zurückführen; der entfaltete Zustand B wird hierbei im Vergleich zu A so stark energetisch favorisiert, dass keine Rückfaltung mehr auftritt. Dieser Fall ist Thema des folgenden Abschnitts, in dem die Prinzipien der dynamischen Kraftspektroskopie erläutert werden.

^a Es handelt sich hierbei um einen Phasenübergang zweiter Ordnung.

4.6 Dynamische Kraftspektroskopie

Im kraftspektroskopischen Experiment werden einzelne Moleküle mit konstanter Ziehgeschwindigkeit v_p gedehnt. Wie bereits gezeigt, führt dies zu einer Verkipfung der Potentiallandschaft, verbunden mit einer Favorisierung des dissoziierten Zustands des Systems. Der Prozess der Dissoziation ist ein thermisch induzierter Prozess, d. h. das Überwinden der Barriere kann zu jeder Zeit bei jeder Kraft in Folge von thermischen Fluktuationen auftreten. Der Dissoziationsvorgang ist ein stochastischer Prozess: Entfaltet man eine Proteindomäne mehrmals bei gleicher Ziehgeschwindigkeit, so beobachtet man eine Verteilung an Entfaltungskräften. Die Kraft, bei der die Verteilung ihr Maximum aufweist, ist dabei ein Maß für die mechanische Stabilität der Domäne. Im Folgenden wird gezeigt, dass die Stabilität von der Ziehgeschwindigkeit v_p sowie von der Potentialbreite Δx abhängt, jedoch nicht von $\Delta G_{A \rightarrow B}$, der Bildungsenergie.

Unter der Annahme, dass Rückfaltung (Übergang $B \rightarrow A$) vernachlässigt werden kann (Ungleichgewicht!), gilt für die Abnahme der Anzahl der nativen Domänen N_A (A=nativer Zustand) pro Zeit Gl. (17).

$$\frac{dN_A}{dt} = -k_{A \rightarrow B} N_A \quad (17)$$

Hierbei ist $k_{A \rightarrow B}$ die Rate für den Übergang des Proteins vom nativen in den denaturierten Zustand. Teilt man Gl. (17) durch die Gesamtzahl der Domänen N , erhält man die Änderung der Besetzungswahrscheinlichkeit dP_A des gefalteten Zustands pro Zeitintervall dt :

$$\frac{dP_A}{dt} = \frac{d(N_A / N)}{dt} = -k_{A \rightarrow B} \frac{N_A}{N} = -k_{A \rightarrow B} P_A. \quad (18)$$

Die Lösung für P_A ergibt sich aus Integration von Gl. (18):

$$P_A(t) = \exp\left(-\int_0^t k_{A \rightarrow B}(t') dt'\right). \quad (19)$$

Für die Verteilung der Entfaltungskräfte ist jedoch die Besetzungswahrscheinlichkeit des entfaltenen Zustands B gleich P_B maßgeblich. Da gilt $P_B = 1 - P_A(t)$, ist

$$P_B(t) = 1 - \exp\left(-\int_0^t k_{A \rightarrow B}(t') dt'\right). \quad (20)$$

Bei Kraftmessungen wird die Domäne mit einer wachsenden Kraft belastet:

$$F(t) = v_p \cdot k_{Gesamt}(F) \cdot t. \quad (21)$$

Im Fall einer zwischen Substrat und Blattfeder eingespannten Domäne sind zwei Federn in Serie - die Blattfeder und der elastische Teil des Moleküls, der bereits entfaltet ist - an die Domäne

gekoppelt. Demnach hängt k_{Gesamt} von der Federkonstante der Blattfeder k_{Feder} und von der Federkonstante des Moleküls k_{Mol} ab. Letztere ist eine Funktion der Kraft, sodass insgesamt gilt:

$$k_{Gesamt}(F) = \frac{k_{Feder} \cdot k_{Mol}(F)}{k_{Feder} + k_{Mol}(F)}. \quad (22)$$

Mit Hilfe von Gl. (21) lässt sich eine Koordinatentransformation durchführen, bei der die Zeit t durch die Kraft F in Gl. (20) ersetzt wird:

$$P_B(F) = 1 - \exp\left(-\int_0^F k_{A \rightarrow B}(F') \frac{1}{F(F')} dF'\right) \quad (23)$$

mit F als neuer Integrationsvariable und

$$\dot{F}(F') = \frac{v_p k_{Feder}}{1 + (k_{Feder} / k_{Mol}(F'))} \quad (24)$$

der so genannten Kraftladungsrate. Für die Beschreibung der Entfaltung „steifer“ Domänen für $k_{A \rightarrow B}(F)$ gilt die Bell'sche Näherung (s. Gl. (11)). Durch Differenzieren von Gl. (23) nach der Kraft erhält man schließlich die Verteilung der Dissoziationskräfte

$$P(F) = \frac{dP_B(F)}{dF} = k_{A \rightarrow B}(F) \frac{1}{F(F)} \exp\left(-\int_0^F k_{A \rightarrow B}(F') \frac{1}{F(F')} dF'\right). \quad (25)$$

Das Maximum der Verteilungsfunktion befindet sich an Position F^* , der Kraft, bei der die Wahrscheinlichkeit zur Entfaltung der Domäne am größten ist. Für F^* gilt:

$$\frac{d}{dF} \left(\frac{dP_B}{dF}(F^*) \right) = 0. \quad (26)$$

F^* stellt daher ein Maß für die mechanische Stabilität der Domäne dar. In erster Näherung sei die Kraftladungsrate $dF/dt = \text{konstant}$. Man erhält für F^* eine logarithmische Abhängigkeit von der Kraftladungsrate:

$$F^* = \frac{k_B T}{\Delta x} \ln \left(\frac{\dot{F}}{k_{A \rightarrow B}^0} \frac{\Delta x_{A \rightarrow T}}{kT} \right). \quad (27)$$

Hierbei ist entsprechend nach Gl. (11) $\Delta x_{A \rightarrow T}$ gleich der Potentialbreite und $k_{A \rightarrow B}$ gleich die spontane Entfaltungsrate. Wie schon eingangs erwähnt, hängt also die mechanische Stabilität in erster Näherung logarithmisch von der Zuggeschwindigkeit v_p bzw. von der Kraftladungsrate dF/dt ab. Um Aussagen über die Form der Energielandschaft zu treffen, wird bei der dynamischen Kraftspektroskopie die Stabilität von Proteindomänen bei verschiedenen Zuggeschwindigkeiten untersucht. Aus der linearen Abhängigkeit der Entfaltungskräfte der Domänen vom Logarithmus der Zugge-

schwindigkeit kann dann nach Gl. (27) über einen linearen Fit die Steigung und damit die Potentialbreite $\Delta x_{A \rightarrow T}$ bestimmt werden. Eine weitere Möglichkeit die Parameter $\Delta x_{A \rightarrow T}$ und $k_{A \rightarrow B}$ zu quantifizieren, ist es, die theoretische Verteilung (s. Gl. (25)) an die gemessene Kräfteverteilung anzupassen. Beide Verfahren wurden zur quantitativen Analyse der Messdaten in Kap. 6.2 und 6.3 verwendet. Wie aus Gl. (27) ersichtlich, existiert kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen den Bindungsenergien und der mechanischen Stabilität eines Proteins. Vielmehr bestimmt die Form, d. h. die Potentialbreite und die Barrierenhöhe, maßgeblich die mechanische Belastbarkeit: Chemische Stabilität kann daher nicht mit mechanischer Stabilität gleichgesetzt werden.

Abschließend noch eine wichtige Ergänzung zur dynamischen Kraftspektroskopie: Wegen der Bewegung der Blattfeder durch das Medium kommt es bei den Messungen zu einer Überlagerung der Dehnungskräfte des eingespannten Moleküls mit hydrodynamischen Kräften, welche auf die Blattfeder wirken. Diese sind proportional zur Zuggeschwindigkeit v_p . Zur quantitativen Analyse der gemessenen Entfaltungskräfte F_{Messung} ist es erforderlich, den Beitrag der hydrodynamischen Kräfte auszuschließen. Man erhält somit die korrigierten Entfaltungskräfte F_{Real} mit

$$F_{\text{Real}} = F_{\text{Messung}} + F_{\text{Reibung}} \left(\frac{k_{\text{Mol}}}{k_{\text{Mol}} + k_{\text{Feder}}} \right). \quad (28)$$

Der zweite Term gibt die Reibungskraft im Moment der Entfaltung an. F_{Reibung} ist hierbei gleich der halben Hysterese zwischen Hin- und Rückfahrkurve der freien Blattfeder.

4.7 Ratenmodell der Dreizustandsfaltung

In der bisherigen Betrachtung ist man von 2 Zuständen ausgegangen, die ein Protein einnehmen kann. Derartige Proteine werden deshalb auch als Zwei-Zustands-Falter bzw. -Entfalter bezeichnet. Neben dieser Proteinklasse existieren noch weitere Arten von Proteinen, die während ihrer Faltung und Entfaltung stabile Zwischenzustände einnehmen. Diese werden je nach Anzahl der intermediären Zustände als 3-Zustands-, 4-Zustands-Falter etc. klassifiziert. Bei den Zwischenzuständen unterscheidet man grundsätzlich zwischen obligaten und nicht-obligaten Zuständen, d. h. ob zur Faltung die Bildung eines Zwischenzustands notwendig ist oder nicht. Zur Interpretation der Daten in Kap. 6.3 wird das Reaktionsschema (29), das Schema eines 3-Zustands-Falters angewendet.



Es beschreibt den Übergang eines Proteins vom Ausgangszustand U (denaturierter Zustand) in seinen Endzustand N (nativer Zustand) über einen obligaten Zwischenzustand I bei den Raten k_1 und k_2 . Spontane Entfaltung von I nach U bzw. N nach U wird vernachlässigt. Obiges Reaktionsschema führt zu folgenden Differenzialgleichungen für die Besetzungswahrscheinlichkeiten der drei Zustände [U], [I] und [N]:

$$\frac{d[U](t)}{dt} = -k_1[U](t); \quad \frac{d[I](t)}{dt} = k_2[I](t) \quad (30)$$

Unter Berücksichtigung der Randbedingungen $[U](t)+[I](t)+[N](t)=1$, $[U](t=0)=1$ und $[F](t=0)=0$ kommt man zu folgenden Endergebnis:

$$[U](t) = \exp(-k_1 t); [F](t) = \frac{k_2}{(k_1 - k_2)} \exp(-k_1 t) - \left(\frac{k_2}{(k_1 - k_2)} + 1 \right) \exp(-k_2 t) + 1. \quad (31)$$

4.8 Analyse des Konturlängenwachses einer 3-Zustands Protein-Domäne

Betrachten wir nun eine native Proteindomäne mit insgesamt N aa, die über zwei denaturierte Peptidketten („Spacer“) zwischen AFM-Spitze und Unterlage eingespannt ist. Die Proteindomäne sei ein 3-Zustands-Entfalter mit einem stabilen obligaten Zwischenzustand. Die Konturlänge des gesamten Moleküls im nativen Zustand ist gleich L_N (s. Abb. 4.8).

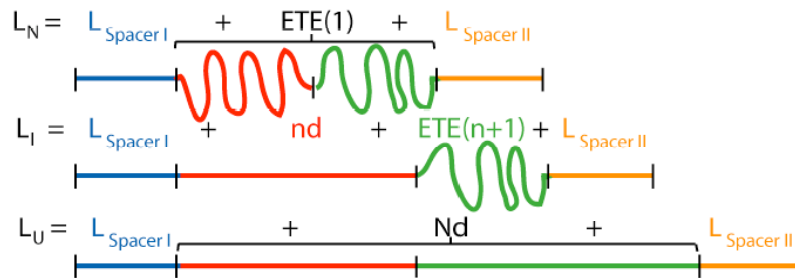


Abb. 4.8: Konturlängenänderung einer Proteindomäne mit stabilem Entfaltungszwischenzustand. Die Domäne ist über zwei Spacer an Spitze und Substrat gebunden ($L_{\text{Spacer I}}$ (blau) und $L_{\text{Spacer II}}$ (gelb)). Bei dem Parameter d und der Funktion ETE („End-To-End-Distance“) handelt es sich um die Konturlängenänderung pro entfalteter aa bzw. um den Abstand einzelner aa in der Domäne i . Vgl. zum C-Terminus der Domäne. L_N , L_I und L_U sind die Konturlängen des eingespannten Moleküls, wenn sich die Domäne im nativen, intermediären bzw. entfalteten Zustand befindet. Die roten und grünen Abschnitte stehen für die aa der Domäne, die im ersten bzw. zweiten Schritt entfalten.

Durch mechanische Belastung des Moleküls entfalten zunächst n aa, während $N-(n+1)$ aa den stabilen Zwischenzustand bilden. Es kommt zu einer Verlängerung des Moleküls um $\Delta L1 = L_I - L_N$, mit L_I gleich der Konturlänge des Moleküls mit der Domäne im Zwischenzustand (Abb. 4.8, Mitte). In einem zweiten Schritt verlängert sich das Molekül um die Länge $\Delta L2 = L_U - L_I$ erneut; die Domäne ist jetzt komplett entfaltet, und die Konturlänge des eingespannten Moleküls beträgt L_U (Abb. 4.8, Unten). Geht man davon aus, dass die Struktur der aa, die den Zwischenzustand bilden, nach dem ersten Entfaltungsschritt erhalten bleibt, kann eine Strukturanalyse der Primärstruktur des Zwischenzustands unter Verwendung von NMR- oder Röntgenstrukturdaten auf einfache Weise durchgeführt werden. Dazu wird der End-zu-End-Abstand aller aa der Domäne zu einem Aufpunkt, z. B. der C-terminalen aa als Funktion von aa (i. F. $ETE(aa)$) aus den Strukturdaten errechnet. Zudem muss der Längenzuwachs pro entfalteter aa gleich d bekannt sein. Zur Bestimmung der Anzahl der aa, die im ersten Schritt freigesetzt werden ($=n$) bzw. der Primärstruktur des Zwischenzustands, wird schließlich folgende Gleichung verwendet,

$$nd + ETE(n + 1) = 0.5(Nd + ETE(1) - (\Delta L2 - \Delta L1)) \quad (32)$$

die sich aus den theoretischen Konturlängenänderungen $\Delta L1$ und $\Delta L2$ aus Abb. 4.8 ergibt. Für $\Delta L1$ und $\Delta L2$ werden dann die experimentell bestimmten Werte in Gl. (32) eingesetzt.

5. Probenmoleküle

In der Biologie werden lebende Organismen in 2 Gruppen eingeteilt: Die Prokaryonten und Eukaryonten. Organismen wie Bakterien gehören den Prokaryonten an, während Tiere, Pflanzen und Pilze Vertreter der Eukaryonten sind. Letztere können als Mehrzeller aus mehreren Arten von eukaryotischen Zellen aufgebaut sein. Im Gegensatz zu den prokaryontischen besitzen eukaryontische Zellen einen Kern, der das Erbgut der Zelle enthält. Eukaryontische wie prokaryontische Zellen grenzen sich durch eine Hülle, der sog. Zellmembran, von der Umwelt ab. Das Zytoskelett, bis vor kurzem noch eine Besonderheit ausschließlich von eukaryontischen Zellen, unterstützt die Zellmembran und stellt das mechanische Gerüst der Zelle dar¹⁸. Neben seinen statischen mechanischen Eigenschaften zeichnet es sich durch seine Dynamik aus. Es ist in der Lage, den Lebensbedingungen und Anforderungen der Zelle entsprechend, sich auf- und wieder abzubauen. Eine starke Umstrukturierung des Skeletts ist erforderlich, wenn z. B. die Zelle eine Teilung eingeht oder sich fortbewegt. Die passiven mechanischen Eigenschaften des Zytoskeletts gehen letztlich auf dessen molekulare Bausteine, die Zytoskelett-Proteinen zurück.

Ziel dieser Arbeit war es, die mechanische Eigenschaften zweier Zytoskelett-Proteine, Myosin II und Filamin oder abp 120 (i. F. ddFLN) am einzelnen Molekül zu untersuchen, um damit speziell im Fall von ddFLN eventuell Rückschlüsse auf dessen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften des Zytoskeletts ziehen zu können. Zudem wurde eine quantitative Bestimmung der Faltungskinetik der Probenmoleküle mittels Kraftspektroskopie am einzelnen Molekül angestrebt.

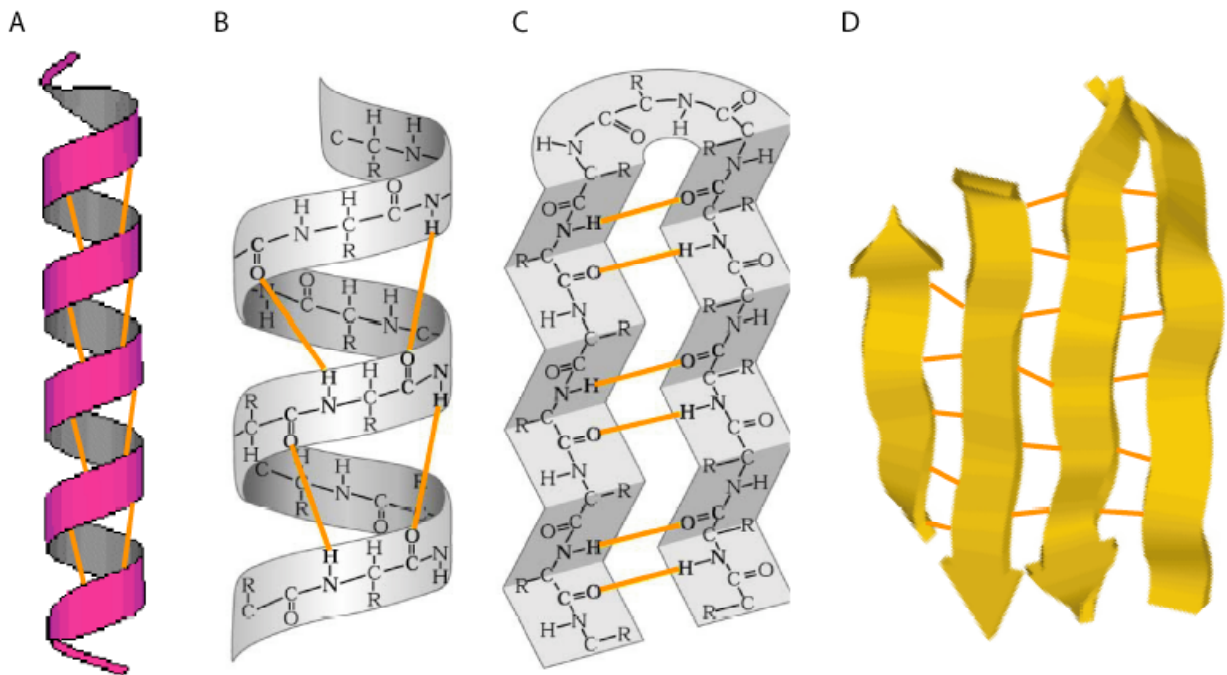


Abb. 5: A) Band-Darstellung einer rechtsgängigen α -Helix. Die Struktur wird über Wasserstoffbrückenbindungen (orange Linien) stabilisiert. B) Jede CO-Gruppe ist mit der NH-Gruppe einer Peptidbindung über eine H-Brücke verbunden, die jeweils vier Aminosäurereste (R) entfernt in derselben Kette vorliegt. C) Die Ketten der β -Faltblattstruktur liegen nebeneinander mit H-Brücken zwischen der CO-Gruppe der einen und der NH-Gruppe einer anderen Peptidbindung der benachbarten Kette. D) Mehrere Ketten können ausgedehnte Faltblattstrukturen bilden. Dabei verlaufen die Ketten entweder in entgegengesetzter (antiparalleles Faltblatt) oder gleicher Richtung (paralleles Faltblatt; nicht dargestellt). Die Ketten können entweder vom gleichen oder einem anderem Peptid stammen.

Die Probenmoleküle Myosin II und ddFLN sind aus zwei grundlegenden Strukturmotiven der Proteinfaltung aufgebaut: Die α -Helix und das β -Faltblatt (s. Abb. 5). Die als Sekundärstrukturen bezeichneten Konformationen der Peptidkette sind eine Konsequenz intramolekularer Wechselwirkungen. Abb. 5 A und B zeigen schematisch die Struktur einer rechtsgängigen α -Helix, einer der am häufigsten vorkommenden Sekundärstrukturen. Die Peptidkette ist hier schraubenförmig gewunden, sodass auf jede Umdrehung der Helix 3.6 Aminosäurereste entfallen. Stabilisiert werden α -Helices durch Wasserstoff-Brücken zwischen den NH- und CO-Gruppen von Aminosäureresten, die in der Kette jeweils um 4 Positionen voneinander entfernt sind. Wasserstoff-Brücken haben auch bei den Faltblattstrukturen den größten Anteil am Zusammenhalt der Struktur, bilden sich aber im Gegensatz zur α -Helix zwischen weiter auseinanderliegenden Abschnitten der Polypeptidkette, aber auch zwischen verschiedenen Ketten aus (s. Abb. 5 C). Verlaufen beide Stränge in entgegengesetzter Richtung, spricht man von einem antiparallelen Faltblatt (s. Abb. 5 D), laufen sie gleichsinnig, liegt ein paralleles Faltblatt vor. Im Folgenden werden die Probenmoleküle Myosin II und ddFLN vorgestellt und in ihren strukturellen Eigenschaften beschrieben.

5.1 Myosin II

Das Zytoskelett ist ein feinmaschiges Netzwerk, das sich aus drei Arten von Protein-Filamenten zusammensetzt: Mikrotubuli, Aktinfilamente und Intermediärfilamente. Neben seiner Rolle als mechanisches Gerüst der Zelle sowie seiner Funktion als Motor der Zellbewegung dient es zusätzlich als „Schienensystem“ für den Stofftransport innerhalb der Zelle. Das Protein Myosin II ist ein Motorprotein und besitzt die Fähigkeit, unter Verbrauch von chemischer Energie an Aktinfilamenten entlangzuwandern. Myosin war und ist Thema zahlreicher aktueller Forschungsarbeiten, vor allem im Zusammenhang mit dem Mechanismus der Muskelkontraktion; hierbei hat man z. B. festgestellt, dass die Kontraktion auf molekularer Ebene letztlich auf eine Konformationsänderung der Myosinstruktur unter Hydrolyse von ATP zurückgeht¹⁹.

Abb. 5.1.1 A zeigt das elektronenmikroskopische Bild eines Myosin II Moleküls²⁰. Für die kraftspektroskopischen Untersuchungen wurde das Molekül aus Hasen extrahiert. Myosin ist ein Hexamer, das sich aus 2 schweren Peptidketten (HMM) und 4 leichten Ketten (LMM) zusammensetzt (s. Abb. 5.1.1 B). Das Monomer besitzt einen globulären Kopf, der sich zum Ende hin in einem 150 nm langen Schwanz fortsetzt (= schwere Ketten; s. Abb. 5.1.1 B). Als Sekundärstruktur weist der Schwanz eine langgestreckte α -Helix mit Wiederholungen eines charakteristischen Aminosäure-Sequenzmotivs auf, welches man als Heptaden (Siebener)-Wiederholung bezeichnet. Dieses Motiv, bestehend aus 7 Aminosäuren ist für die Bildung von linksgängigen Doppelwendel-Dimeren (Superhelix) aus zwei parallel verlaufenden α -Helices verantwortlich (s. Abb. 5.1.1 B, C)²¹.

Die Einteilung der 20 verschiedenen Aminosäuren von Proteinen erfolgt einerseits nach der chemischen Struktur ihrer Seitenketten, andererseits nach deren Polarität. Zu den stabilisierenden Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren gehören Wasserstoff-Brücken, kovalente Bindungen (Disulfid-Brücken) und elektrostatische Wechselwirkungen. Ein weiterer, besonders wichtiger Stabilisierungsfaktor bei der Proteinfaltung ist der hydrophobe Effekt: Proteine gehen eine Faltung in der Weise ein, dass die aa mit apolaren (hydrophoben) Seitenresten möglichst im Inneren der Faltungsstruktur lokalisiert sind, während die polaren (hydrophilen) aa an der Oberfläche der Struktur im direkten Kontakt mit der wässrigen Umgebung stehen.

Innerhalb der Heptaden-Wiederholung befindet sich jeweils eine hydrophobe Aminosäure an Position 1 und 4. Aufgrund des hydrophoben Effekts kommt es zu einer Anlagerung mehrerer dieser hydrophoben Seitenreste zweier komplementärer α -Helices, sodass die Kontaktfläche der apolaren Seitenketten zum Wasser hin minimal ist. Es entsteht ein Dimer mit linksgängiger

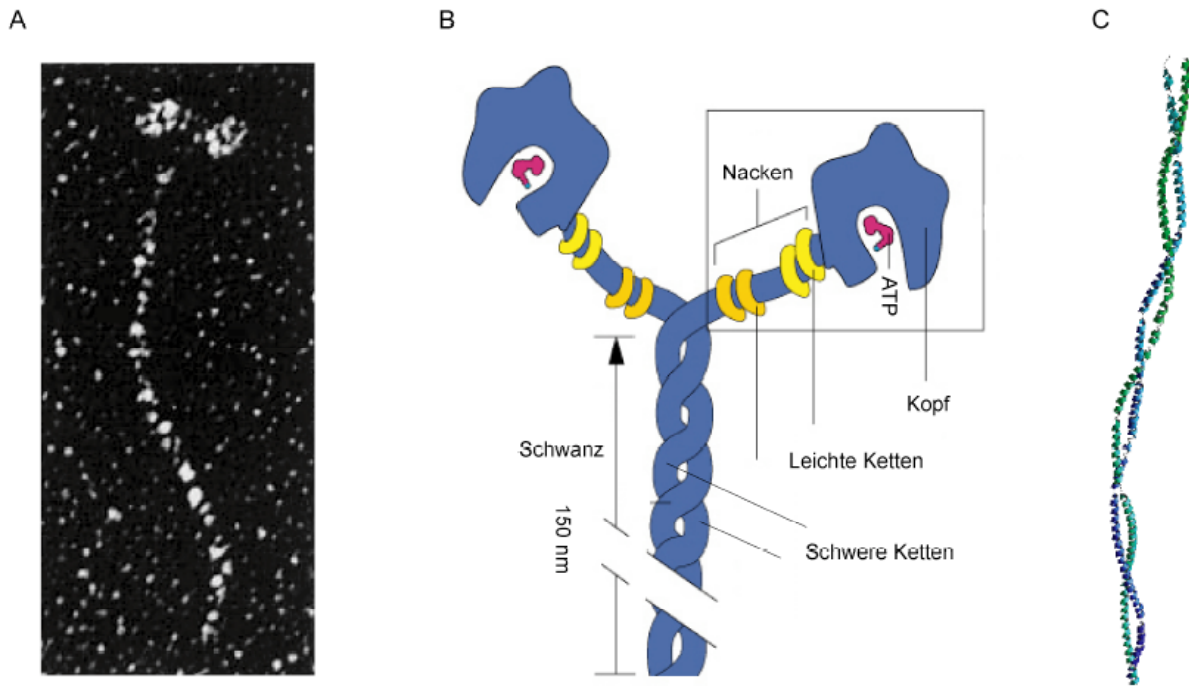


Abb. 5.1.1: A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Myosin-Moleküls¹. B) Schematische Darstellung des Muskelmotors Myosin. Myosin ist ein Hexamer, das aus zwei identischen schweren Peptidketten und vier leichten Ketten zusammengesetzt ist und als Monomer die Gestalt eines Hockeyschlägers hat. Die beiden α -helikalen schweren Ketten bilden zusammen eine linksgängige Superhelix aus. C) Röntgenstruktur des Myosin-Schwanzes.

Superhelix-Struktur (s. Abb. 5.1.1 C). Außerdem weist die Heptaden-Wiederholung der linksgängigen Superhelix charakteristischerweise polare aa an Position 5 und 7 auf. Sie bewirken eine zusätzliche Stabilisierung der Superhelix durch deren elektrostatische Wechselwirkung untereinander. Die Stabilität der Superhelix hängt demnach auch von der Ionenkonzentration und dem pH-Wert der Umgebung ab. Die zwar einfache, aber sehr vielseitige Superhelix-Struktur ist eine der wenigen Faltungsmotive, die direkt anhand ihrer Primärsequenz mit großer Wahrscheinlichkeit vorhergesagt werden können.

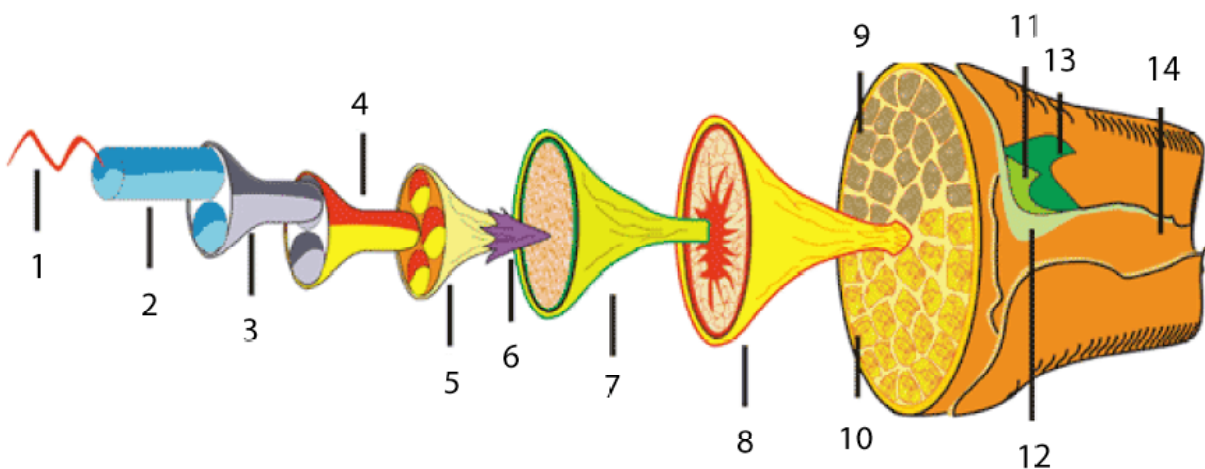


Abb. 5.1.2: Der schematische Aufbau von Haaren. Alle Strukturelemente sind der Größe nach nummeriert: (1) α -Helix; (2) Superhelix; (3) Protofilament; (4) Proto-, (5) Mikro-, (6) Interfilamentmaterial; (7) Makrofibrille; (8) Paracortezelle; (9) Ortho-, (10) Paracortex; (11) Endo-, (12) Exo-, (13) Epicuticula; (14) Cuticula.

In Kap. 6.1 werden Rückschlüsse aus der Dehnbarkeit der molekularen Superhelix-Struktur auf das mechanische makroskopische Verhalten von Haaren sowie Wolle gezogen. Im Folgenden wird daher kurz erläutert, inwieweit die Superhelix am Aufbau von Haaren beteiligt ist²²: Haare, aber auch Wolle, Federn, Nägel etc. bestehen überwiegend aus dem Strukturprotein Keratin. Grundbaustein von Keratinen sind zum Großteil rechtsgängig α -helikal gewundene Peptidketten, die in dimerisierter Form eine linksgängige Superhelix-Struktur bilden - die gleiche Struktur, wie sie auch der Myosin-Schwanz aufweist. Die nächste größere Struktureinheit mit einem Durchmesser von 3 nm ist das Protofilament, das sich aus 4 aggregierten Superhelices zusammensetzt. 8 Protofilamente wiederum aggregieren zu einem Intermediär-Filament mit einem Durchmesser von 10 nm usw. (s. Abb. 5.1.2).

5.2 ddFLN

Das Protein ddFLN, ein Aktin-bindendes Protein, besitzt ein molekulares Gewicht von 120 kD und wird in den Zellen des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* exprimiert. Das Protein gehört der großen Familie der Filamine an und wird auch als ABP120 bezeichnet²³. Die biologische Funktion der Filamine liegt in der Vernetzung von Aktin-Filamenten des Zytoskeletts. Ferner sind Filamine für die Verankerung von Aktin-Filamenten an die Zellmembran verantwortlich. Abb. 5.2 A zeigt schematisch die Struktur von ddFLN. An den beiden Enden (N-Termini) des stabförmigen Moleküls befinden sich sog. Aktin-bindende Domänen (ABD), die, zusammen mit der Fähigkeit des Moleküls eine Dimerbindung einzugehen, dessen biologische Funktion gewährleisten. Das Monomer ist aus 6 homologen Ig (Immunoglobulin)-Faltungsdomänen und der ABD am N-Terminus zusammengesetzt. Die Dimerisierung basiert auf einem Überlapp der Monomere zwischen den Domänen 6, sodass die Monomere antiparallel zueinander ausgerichtet sind. Wie McCoy et al. anhand einer röntgenspektroskopischen Analyse zeigen konnten, basiert die Dimerbindung auf insgesamt 6 Wasserstoff-Brücken zwischen β -Faltblätter der beiden Domänen 6²⁴.

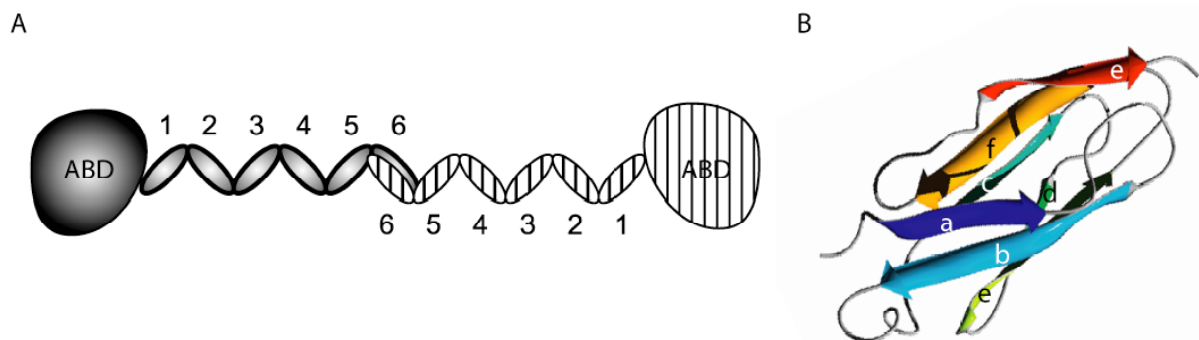


Abb. 5.2: A) Schematische Darstellung des nativen Aktin-bindenden Proteins ddFLN. Das Molekül setzt sich als Monomer aus insgesamt 6 homologen Immunoglobulin Domänen und einer Aktin-bindende Domäne (ABD) zusammen. Die Dimerbindung beruht auf einem Überlapp zwischen den Domänen 6. B) NMR-Struktur von ddFLN4²⁵. Die 7 Faltblätter sind der Reihe nach mit Buchstaben gekennzeichnet.

Abb. 5.2 B zeigt die NMR-Struktur für Domäne 4 von ddFLN (i. F. ddFLN4), wie sie von Fucini et al. bestimmt wurde²⁵. Wie alle anderen ddFLN-Domänen – die ABD ausgenommen - weist ddFLN4 im nativen Zustand eine Ig-Faltungsstruktur auf. Dieses häufig vorkommende Faltungsmotiv besitzt eine fassförmige Struktur, die sich aus mehreren antiparallelen β -Faltblättern zusammensetzt- 7 im Falle von ddFLN. Für die kraftspektroskopische Untersuchung wurden mehrere Konstrukte auf Basis des nativen ddFLN-Proteins mit biotechnologischen Methoden entwickelt: ddFLN1-6 mit insgesamt 12 Ig-Domänen aber ohne ABD, ddFLN1-5 ebenfalls ohne ABD mit insgesamt 5 Ig-Domänen, ohne Domäne 6. Für die Mutationsexperimente wurden Mutanten von ddFLN1-5

expressiert, die 5 zusätzliche Glycine an verschiedenen Schlaufen der Ig-Struktur von ddFLN4 aufweisen (s. Anhang). Des Weiteren wurden zur Untersuchung einzelner ddFLN-Domänen diese in ein 8-mer des Muskelproteins Titin eingebaut.

6. Ergebnisse

Die nachfolgenden Kapitel fassen den Inhalt der Publikationen dieser Arbeit kurz zusammen. Zum besseren Verständnis sowie zur Komplettierung werden hierbei auch bisher unveröffentlichte Ergebnisse vorgestellt. Für detaillierte Informationen sei an dieser Stelle auf die Veröffentlichungen im Anhang verwiesen.

In Abschnitt 6.1.1 werden die besonderen mechanischen Eigenschaften der Superhelix-Struktur von Hasen-Myosin II vorgestellt. Erstmals konnte in der Veröffentlichung „The myosin coiled-coil is a truly elastic protein structure“ der Nachweis für ein Protein mit elastischen Dehnungseigenschaften geführt werden. Die kraftspektroskopische Untersuchung eines weiteren Cytoskelett-Proteins, dem Aktin-bindenden Protein ddFLN, zeigte, dass im Gegensatz zu Myosin ddFLN ein inelastisches Protein darstellt mit der besonderen Eigenschaft, dass eine seiner Faltungsuntereinheiten ddFLN4 als einzige Domäne einen stabilen Zwischenzustand bei der mechanischen Entfaltung bildet (s. Kap. 6.2). Alle Ergebnisse und Diskussionen hierüber sind in der Publikation „A mechanical unfolding intermediate in an actin-crosslinking protein“ zusammengefasst. In der jüngsten Publikation „The folding pathway of a fast folding immunoglobulin domain revealed by single molecule mechanical experiments“ wird die kraftspektroskopische Analyse auf die Faltungseigenschaften von ddFLN hin erweitert. Die Kraftspektroskopie erweist sich hierbei als effektive Methode bei der quantitativen Analyse der Faltungskinetik sogar einzelner Proteindomänen (s. Kap. 6.3).

6.1.1 Die mechanischen Eigenschaften der Superhelix-Struktur

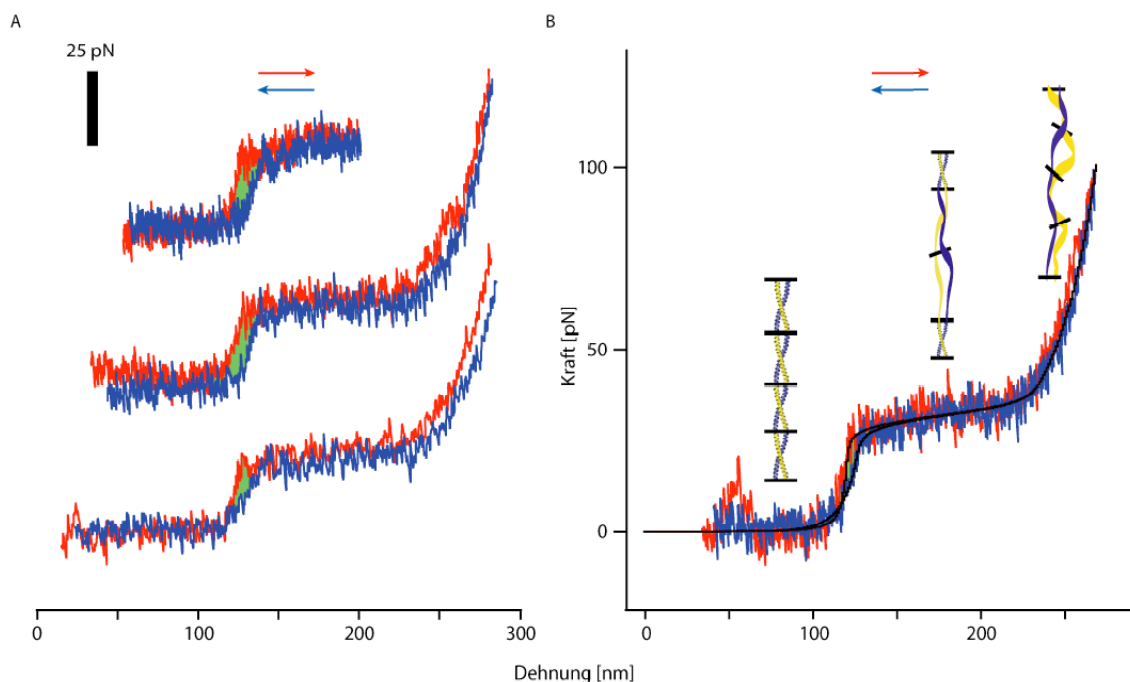


Abb. 6.1.1: A) 3 Dehnungs- und Entspannungszyklen der Superhelix-Struktur von Myosin II aus einer Serie von über 20 Zyklen. Dehnungskurve (rot) und Entspannungskurve (blau) weisen lediglich eine kleine Abweichung im grün markierten Bereich auf^a. B) Vergleich zwischen theoretischem Fit (schwarze Graphen) und Daten. Darüber schematisch die Superhelix-Struktur, deren Segmente in Abhängigkeit von der Kraft entsprechend eines Zwei-Zustandmodells entweder in ihrem entfaltenen oder gefalteten Zustand vorliegen.

^a Die Abweichung beider Graphen am zweiten Kraftanstieg ist auf thermische Drift der Blattfeder zurückzuführen.

In Abb. 6.1.1 A sind 2 typische Kraft-Dehnungskurven (rot: Dehnung; blau: Entspannung) von Hasen-Myosin II aus einer Serie von insgesamt über 20 Dehnungs- und Entspannungszyklen dargestellt. In allen Zyklen war das gleiche mechanische Verhalten des Moleküls zu beobachten. Wie in Kontrollexperimenten mit rekombinanten Myosin ohne Köpfe gezeigt werden konnte, geht das gemessene Dehnungsverhalten des Moleküls ausschließlich auf den Myosin-Schwanz mit seiner Superhelix-Struktur zurück - die mechanischen Eigenschaften der Myosin-Köpfe sind in Bezug auf die Dehnbarkeit des gesamten Moleküls vernachlässigbar. Auch wurden Myosine aus anderen Quellen untersucht: Myosine des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* wiesen ein äquivalentes mechanisches Verhalten auf.

Wie in Abb. 6.1.1 A zu sehen, liegt bis ca. 120 nm Dehnung noch keine Kraft am Molekül an. Erst bei Dehnung im Bereich der Konturlänge des eingespannten Moleküls baut sich eine Gegenkraft auf. Durch das willkürliche Aufgreifen der Moleküle an verschiedenen Stellen variiert die Position des ersten Kraftanstiegs in einem Dehnungsbereich zwischen 60 und 140 nm. Diese Beobachtung ist konsistent mit der tatsächlichen Länge des Myosin-Schwanzes, welche für Hasen-Myosin II 150 nm beträgt. Nach dem ersten Kraftanstieg weisen die Kraft-Dehnungskurve zwischen ca. 20 und 30 pN ein ausgeprägtes Kraftplateau auf, bei dem das Molekül eine starke Strukturänderung bei geringer Kraftzunahme eingeht und sich auf über das Doppelte seiner Länge dehnt. Für Kräfte größer als ca. 30 pN ist ein weiterer deutlicher Kraftanstieg festzustellen.

Die Überdehnung von Myosin ist ein nahezu reversibler Prozess: Bei Entspannung des Moleküls folgt die Entspannungskurve (blau) - bis auf die kleine Abweichung (grüne Fläche) am ersten Kraftanstieg - der Dehnungskurve (rot). Die Superhelix von Myosin ist daher als eine Struktur mit elastischen mechanischen Eigenschaften anzusehen. Der kraftinduzierte Konformationsübergang vom gefalteten zum entfalteten Zustand des Moleküls ist reversibel und erfolgt im thermischen Gleichgewicht (s. Kap. 4.5). Neben der Reversibilität stellt die Geschwindigkeitsunabhängigkeit des Konformationsübergangs eine weitere Konsequenz des Gleichgewichts dar. Tatsächlich konnten in Experimenten mit unterschiedlichen Ziehgeschwindigkeiten zwischen 200 und 3000 nm/s keine Veränderungen im mechanischen Verhalten des Moleküls festgestellt werden.

Der theoretischen Beschreibung des mechanischen Verhaltens der Superhelix liegt die Annahme zu Grunde, dass Segmente der Struktur entsprechend eines Zwei-Zustandmodells entweder in einem gefalteten oder entfalteten Zustand vorliegen (s. Kap. 4.3 und 4.5). Die Besetzung beider Zustände erfolgt unter der Voraussetzung des thermodynamischen Gleichgewichts. In Abb. 6.1.1 B ist das Ergebnis (schwarze Graphen) der theoretischen Berechnungen nach Gl. (14) und (16) auf Basis eines solchen Zwei-Zustandmodells zusammen mit einer experimentell gemessenen Dehnungs- und Entspannungskurve zum Vergleich dargestellt. Für folgende Fitparameter geben beide Kurven das gemessene mechanische Verhalten der Superhelix sehr gut wieder: $N=40$ (Gesamtanzahl der Segmente); $p_N=40$ nm und $p_U=0.4$ nm (Persistenzlänge des Segments im nativen bzw. entfalteten Zustand); $LN=3.04$ nm und $LU=7.92$ (Konturlänge des Segments im nativen bzw. entfalteten Zustand). Auch die kleine Abweichung zwischen den Kurven im ersten Kraftanstieg wird von dem Modell beschrieben: Sie geht auf 3 permanent entfaltete Segmente zurück, die nach einmaliger Entfaltung keine Rückfaltung mehr eingehen. Unter der Annahme eines Zwei-Zustandsmodells ergibt sich folgendes Bild für die Dehnung der Superhelix-Struktur: Der untere Kraftbereich bis 20 pN spiegelt die entropische Elastizität des vollständig gefalteten steifen Moleküls wieder. In diesem Zustand weist das Molekül noch eine hohe Persistenzlänge von 40 ± 20 nm auf, ein Wert, wie er auch in Lichtstreuungsexperimenten (55 nm) ermittelt wurde²⁶. Im Kraftbereich zwischen 20 und 30 pN wird die Besetzung des denaturierten Zustands der Segmente immer wahrscheinlicher; das Molekül verlängert sich in diesem Bereich bei kaum zunehmender Kraft auf bis das ca. 2.6-fache seiner ursprünglichen Länge und es kommt zur Bildung des charakteristischen Plateaus. Oberhalb 30 pN sind schließlich alle Segmente des Moleküls entfaltet. Das Molekül befindet sich nun im

Zustand maximaler Dehnbarkeit mit einer Persistenzlänge von 0.4 nm, exakt die Länge, wie sie charakteristisch ist für entfaltete Polypeptidstränge^{27,28}. Der denaturierte Zustand des Moleküls entspricht deshalb der Konfiguration des entfalteten Monomers.

Im thermischen Gleichgewicht ist es möglich, direkt die Faltungsenergien der Zustände ΔG zu bestimmen: Der obige Fit ergab ein ΔG von 7.5 kcal/(mol·nm). Das kraftspektroskopische Experiment kann daher auch als „Einzel-Molekül-Kalorimetrie-Experiment“ angesehen werden.

Die mittels Kraftspektroskopie gemessenen Daten bestätigen das Ergebnis klassischer Faltungsexperimente, wonach der Prozess der Faltung der Superhelix als kooperativ angesehen wird und mit dem Prozess der Dimerisierung der Struktur zusammenfällt^{29,30}. Gezielte Änderungen der Primärsequenz der Superhelix können jedoch eine Faltung über einen obligaten Zwischenzustand bewirken³¹. In diesem Zusammenhang wäre es von Interesse, in fortführenden Experimenten die mechanischen Eigenschaften genetisch manipulierter Superhelices zu untersuchen.

6.1.2 Die mechanischen Eigenschaften der Superhelix-Struktur als mögliche Ursache für das makroskopische Dehnungsverhalten von Haaren

Die Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften von Haaren oder Wolle ist Thema zahlreicher wissenschaftlicher Arbeiten aus weiten Bereichen der Kosmetik, Medizin, Biologie sowie der Textilindustrie^{32,33}. Vor allem in der Medizin wird durch intensive Forschung des mechanischen Verhaltens von Haaren versucht, Rückschlüsse über das Vorliegen bestimmter Erkrankungen, das Alter, die Rasse etc. von Menschen ziehen zu können. Den rheologischen Eigenschaften von Wolle kommt im Bereich der Textilindustrie eine besondere Bedeutung zu, da sie das Trageverhalten von Kleidung (Faltenbildung, Flexibilität) maßgeblich bestimmen. Die Analyse des Dehnungsverhaltens von Haaren erfolgt durch einen einfachen Zugversuch. Hierbei wird das einzelne, in Wasser eingelegte Haar bei gegebener Temperatur mit konstanter Geschwindigkeit gedehnt und die Widerstandskraft der Probe gemessen. Trägt man die Spannung (Verhältnis von Verlängerung zur Gesamtlänge) gegen die Dehnung auf, ergibt sich eine Kurve mit 3 charakteristischen Bereichen: (i) Hookscher Bereich (pre-yield), (ii) Fließbereich (yield) und (iii) Nach-Fließbereich (post-yield) (s. Abb. 6.1.2 A). Die Dehnung ist reversibel, vorausgesetzt das Haar

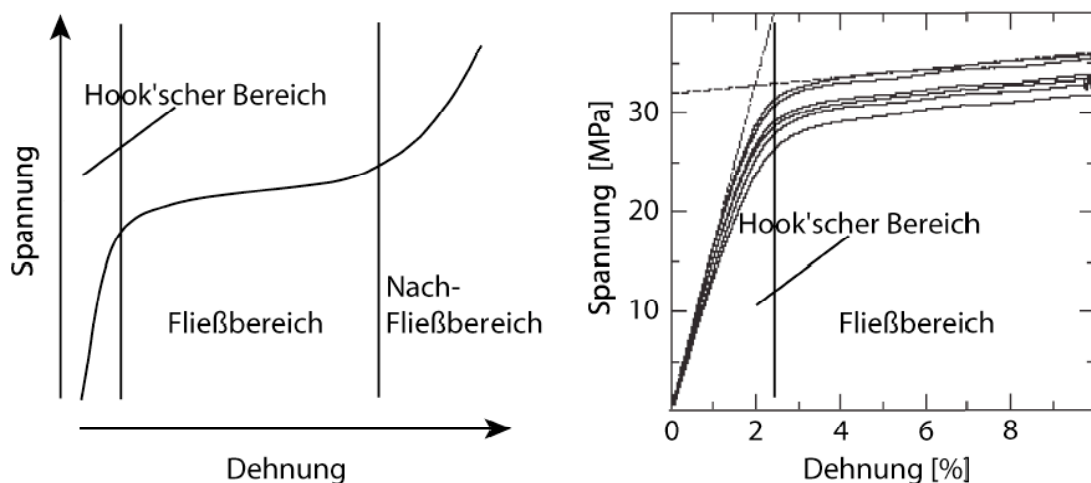


Abb. 6.1.2: A) Spannungs-Dehnungskurve von Haaren qualitativ dargestellt B) Experimentell bestimmtes Dehnungsverhalten von Menschenhaaren bei verschiedenen Messtemperaturen zwischen 295 und 300 K³⁴. Die Dehnung ist hier auf die Gesamtlänge des Probe-Haares bezogen.

befindet sich in wässriger Umgebung. Vergleicht man Abb. 6.1.1 A mit Abb. 6.1.2 A liegt der Verdacht nahe, dass möglicherweise ein Zusammenhang zwischen dem mikroskopischen Dehnungsverhalten der Superhelix - dem Grundbaustein von Haaren (s. Kap. 5.1) - und dem makroskopischen von Haaren besteht. Eine Abschätzung der Plateaukraft der Superhelix-Struktur aus der mittleren Spannung des Fließbereichs von Haaren unterstützt diese Annahme: Reinier et al. beobachteten eine mittlere Spannung für den Nach-Fließbereich bei einer Meßtemperatur von 300 K von 31 MPa (s. Abb. 6.1.2 B)³⁴. Geht man von einem Querschnitt 1 nm² der Superhelix aus, entspricht diese Zahl gerade der Plateaukraft von 31 pN pro Superhelix, was der im kraftspektroskopischen Experiment gemessenen Plateaukraft der einzelnen Superhelix bei ca. 25 pN sehr nahe kommt. Dennoch kann das elastische Verhalten von Haaren nicht vollständig auf das mikroskopische Dehnungsverhalten einzelner Superhelices zurückgeführt werden. Neben der entropischen Elastizität der Superhelix muss zusätzlich noch ein enthalpischer Beitrag existieren, da ansonsten der positive thermische Ausdehnungskoeffizient von Haaren nicht erklärbar wäre (s. Abb. 6.1.2 B)^a.

Zur Interpretation des besonderen Kraft-Dehnungsverhaltens von Haaren wurden bisher diverse Modelle in Betracht gezogen³⁵. All diese Modelle gehen von der Annahme aus, dass die Superhelix-Struktur des Keratins im Nach-Fließbereich ausgehend von seinem nativen Zustand bei Belastung in einen stabil gefalteten, sog. β -Zustand übergeht. Unsere kraftspektroskopischen Daten haben jedoch das gleiche Ergebnis zur Folge wie das der klassischen Faltungsexperimente: Die Superhelix vollzieht einen kooperativen Übergang direkt in einen denaturierten gestreckten Zustand der einzelnen Polypeptidkette des Monomers. Anzeichen für die Existenz eines β -Zustands wurden nicht festgestellt.

6.2 Die mechanischen Eigenschaften von ddFLN

Dank des komplexen Dehnungsverhaltens des Moleküls ddFLN konnten neue Einsichten in die Faltungsmechanik einzelner Ig-Faltungsdomänen im speziellen, Dehnungseigenschaften von Aktinbindenden Proteinen im allgemeinen gewonnen werden. Dabei stellte sich heraus, dass sich ddFLN für die kraftspektroskopische Analyse in besonderem Maße eignet. Für die kraftspektroskopischen Untersuchungen von ddFLN wurde neben einem molekularbiologischen auch ein erheblicher technischer Aufwand betrieben, da neben der Expression zahlreicher Konstrukte des Moleküls auch die Entwicklung eines leistungsfähigeren Kraftmikroskops erforderlich war. Abb. 6.2.1 A zeigt das Kraft-Dehnungsverhalten des Konstrukts ddFLN1-6 bestehend aus 6 Ig-Domänen. In seinem nativen Zustand bildet das Protein ein antiparalleles Homodimer aus (s. Kap. 5.2). Die für ddFLN typischen Kraftkurven weisen ein periodisches Sägezahnmuster auf, eine Konsequenz des sequentiellen Entfaltens der einzelnen ddFLN-Domänen. Allgemein gilt: N Peaks stehen für die Entfaltung von N-1 Domänen. Im Experiment werden die Moleküle an verschiedenen Stellen aufgenommen; die Anzahl der eingespannten Domänen N-1 ist daher variabel. Die beiden gezeigten Kraftkurven resultieren demnach aus der Entfaltung von 7 bzw. 8 Ig Domänen entsprechend den 8 bzw. 9 Entfaltungspeaks des Sägezahnmodells. Die häufig gemachte Beobachtung der Entfaltung von mehr als 6 Domänen lässt schließen, dass die Dimerbindung mechanisch stabiler sein muss als die benachbarten Ig-Domänen. Bei mechanischer Belastung entfalten diese mit größerer Wahrscheinlichkeit als Erste, bevor das ganze Molekül vollständig in seine beiden, 6 Domänen umfassende Monomere dissoziiert. Eine untere Abschätzung anhand des letzten Desorptionsspeaks in den Kraft-Dehnungskurven ergab eine mittlere Dissoziationskraft der Dimerbindung von mindestens 200 pN. Neben den periodischen Peaks (grün und rot) des Sägezahnmodells sind

^a Die rein entropische Elastizität führt zu einem gegenteiligen Effekt, nämlich der Verkürzung des Haares bei zunehmender Temperatur.

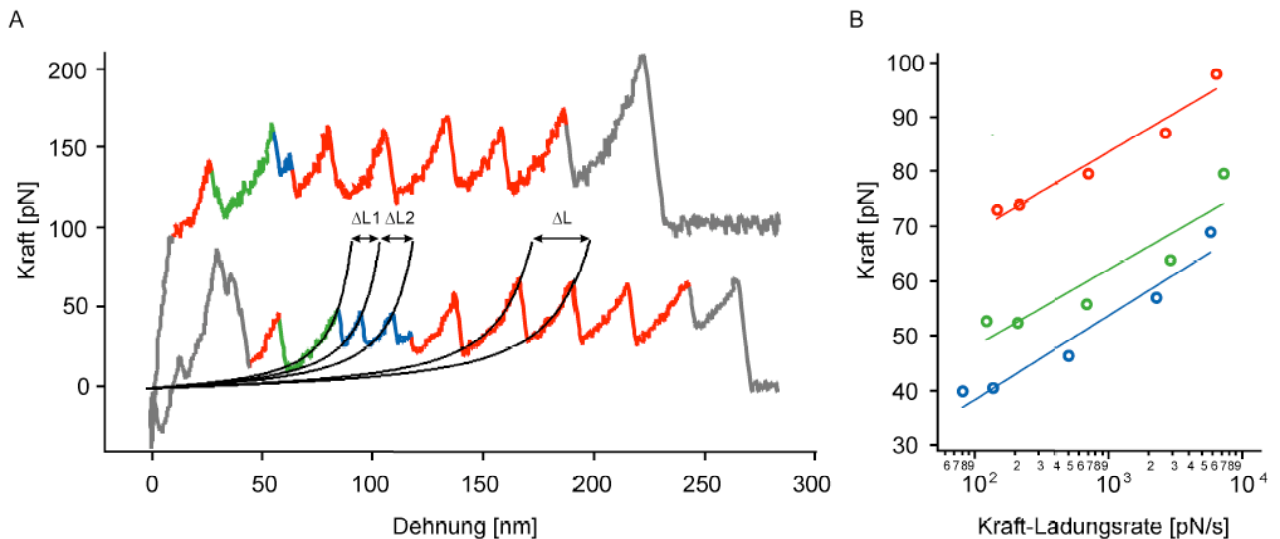


Abb. 6.2.1: A) Zwei charakteristische Kraft-Dehnungskurven von ddFLN1-6 als Folge der Entfaltung von 7 (obere Kurve) bzw. 8 ddFLN-Ig Domänen (untere Kurve). Grüne und blaue Peaks stehen für die Entfaltung von ddFLN4, rote Peaks für alle anderen Domänen. Die schwarzen Graphen sind WLC-Fits, berechnet nach Gl. (2) bei gleicher Persistenzlänge $p=0.5$ nm. $\Delta L1$, $\Delta L2$ und ΔL stehen für den Konturlängenzuwachs, bedingt durch die Entfaltung der nativen ddFLN4-Domäne in ihren Zwischenzustand, vom Zwischenzustand in dessen denaturierte Konfiguration bzw. durch die Entfaltung aller anderen Domänen. B) Entfaltungskräfte dargestellt in Abhängigkeit von der Kraft-Ladungsrate. Lineare Fits ergeben für den nativen (blau) und intermediären Zustand (grün) von ddFLN4 eine Potentialbreite von 0.6 bzw. 0.62 nm, für alle anderen Domänen (rot) eine Breite von 0.58 nm (s. Kap. 4.6).

zusätzliche Zacken zu beobachten (blau markiert). Mithilfe diverser Filamin-Konstrukte konnte nachgewiesen werden, dass diese Zwischenzacken die Konsequenz eines stabilen Entfaltungszwischenzustands von ddFLN4 sind. Andere potentielle Ursachen wie die Dimerbindung oder intermolekulare Wechselwirkung zwischen benachbarten Domänen konnten indessen ausgeschlossen werden. Die Existenz eines Entfaltungszwischenzustands für eine Ig-Domäne war zuerst einmal nicht zu erwarten. So konnte z. B. in einer früheren kraftspektroskopischen Untersuchung des zu ddFLN verwandten humanen Filamins (hFLN oder abp280) kein Zwischenzustand irgendeiner Domäne nachgewiesen werden³⁶.

Im Gegensatz zu allen anderen ddFLN-Domänen erfolgt die Entfaltung von ddFLN4 in zwei Schritten. Zur quantitativen Analyse der Kurvenform der Zacken wurden die Flanken mit dem WLC-Modell (s. Gl. (2)) verglichen, das offensichtlich mit einer Persistenzlänge von 0.5 nm und den entsprechenden Konturlängen (über den Zacken) die Elastizität des Moleküls reproduziert. Hierbei skaliert die Elastizität des Moleküls mit der Konturlänge des gedehnten, bereits entfalten Peptidstranges, die sich für ddFLN4 nach dem ersten und zweiten Entfaltungsschritt um 15 nm ($=\Delta L1$) bzw. um 17 nm ($=\Delta L2$) und für alle anderen Domänen bei deren Entfaltung um 31.5 nm ($=\Delta L$) vergrößert. Dies zeigt, dass die Elastizität des Moleküls praktisch nur durch die entropische Elastizität des bereits entfalten Polymerstrangs festgelegt ist.

Zur quantitativen Charakterisierung der Potentialbreiten für den Übergang $N \rightarrow I$ und $I \rightarrow U$ (N , I und U = nativer, intermediärer bzw. denaturierter Zustand) von ddFLN4 wurde zunächst ddFLN1-6 mittels dynamischer Kraftspektroskopie untersucht. In Abb. 6.2.1 B sind die Ergebnisse dieser Untersuchung zusammengefasst. Hierbei wurden die zur Entfaltung erforderlichen Abrisskräfte des nativen Zustands (grüne Kreise) bzw. Zwischenzustands (blaue Kreise) bei verschiedenen Ziehgeschwindigkeiten zwischen 30 nm/s bis 2 μ m/s analysiert. Offensichtlich steigt die mittlere Abrisskraft für beide Übergänge mit steigender Geschwindigkeit bzw. Kraft-Ladungsrate an. Jedoch kann die theoretisch vorhergesagte Proportionalität zur Bestimmung der Potentialbreiten

zwischen den Abrisskräften und dem Logarithmus der Kraft-Ladungsrate beider Übergänge nicht durch das Experiment verifiziert werden (s. Kap. 4.6). Dagegen ist ein nichtlinearer Anstieg vor allem für den Übergang N→I zu beobachten. Die roten Kreise stehen für die Abrisskräfte aller anderen ddFLN-Domänen. Auch bei diesen Domänen ist tendenziell ein nichtlinearer Anstieg festzustellen. Eine Erklärung für diese Diskrepanz wäre, dass ddFLN4 bei mechanischer Belastung zwischen 40 und 50 pN je nach Übergang eine Rückfaltung eingeht. Demnach wären die Abrisskräfte unabhängig von der Ziehgeschwindigkeit und Kraftplateaus im unteren Kraft-Ladungsratebereich wären die Folge. Evans et al. konnten jedoch theoretisch zeigen, dass, für der ddFLN4-Domäne ähnlichen Faltungsstrukturen Rückfaltung von Ig-Domänen erst bei Kräften von unter ca. 15 pN auftritt³⁷. Zudem wurden im Experiment keine Anzeichen für die Existenz eines Gleichgewichts festgestellt. Der nichtlineare Verlauf wird daher nicht auf die Ursache einer möglichen Rückfaltung von ddFLN4 bzw. auf einen möglichen Gleichgewichtsfall zurückgeführt. Eine genauere Analyse der Potentialbreiten für ddFLN4 wurde in späteren Versuchen bei den Rückfaltungsexperimenten (s. Kap. 6.3) vorgenommen. Ein neu entwickeltes Messprotokoll führte zu einer deutlich höheren Datenausbeute, mit der Folge, dass im Gegensatz zu den oben durchgeführten dynamischen Kraft-Dehnungsmessungen eine deutlich größere Anzahl von Kraftkurven aus einem Experiment für die Analyse zur Verfügung steht. Experimentelle Artefakte wie Eichfehler der Blattfeder konnten im Vergleich zu den dynamischen Messungen somit minimiert werden.

Mit Hilfe von NMR-Strukturdaten von ddFLN4 nach Fucini et al. lässt sich zusammen mit den gemessenen mittleren Konturlängenänderungen $\Delta L1$ und $\Delta L2$ eine Analyse der Primärsequenz des Zwischenzustandes durchführen (s. Kap. 4.8)²⁵. Hierzu wurde der Abstand aller 100 ddFLN4-aa zum C-Terminus der Domäne bestimmt (s. Abb. 6.2.2 A). Abb. 6.2.2 B gibt Gl. (32) wieder, mit dem Ergebnis, dass 50 aa (u. a. Band a, b, und c) von ddFLN4 im ersten Schritt entfalten, während die restlichen aa (u. a. Band d, e, f, und g) der Domäne den Zwischenzustand bilden. Hierbei wurde ein Konturlängenzuwachs pro entfalteter aa $d=0.36$ nm angenommen^{38,a}.

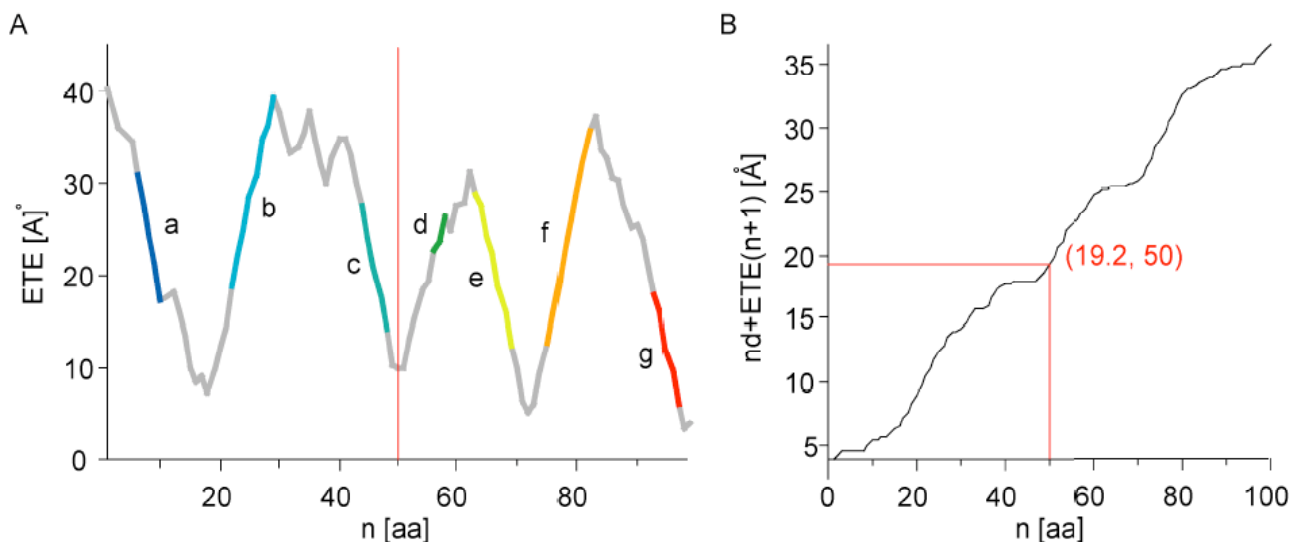


Abb. 6.2.2: A) End-zu-End-Abstand (ETE) aller 100 aa von ddFLN4 zum Aufpunkt, der C-terminalen aa der Domäne in Abhängigkeit von der Nummer der aa's gleich n. Die aa der 7 β -Faltblätter von ddFLN4 sind farbig markiert B) $50d+ETE(51) = 0.5(100*0.36+ETE(1)-(\Delta L2-\Delta L1))=19.2$ (s. Gl. 32). Dies bedeutet 50 aa entfalten im 1. Schritt, während die restlichen aa der Bänder d, e, f und g den Zwischenzustand bilden.

^a Dieser Faktor wurde in Mutationsexperimenten nachgewiesen und stimmt sehr gut mit Faktoren aus anderen Arbeiten überein.

In der Veröffentlichung ist man zur Bestimmung der Primärsequenz des Zwischenzustands noch nicht von dieser Art der Analyse ausgegangen. Zur Bestimmung der Primärstruktur wurden Mutationsexperimente herangezogen, mit dem Ergebnis, dass mindestens 40 aa im ersten Schritt entfalten. Unglücklicherweise konnte der Nachweis für die Entfaltung von 50 aa nicht mittels der Mutationsexperimente vollständig erbracht werden, da die Mutation am C/D-Loop zu einer kompletten Destabilisierung der Domäne führte. Zusammenfassend kommen wir zu dem Schluss, dass bei der Entfaltung von ddFLN4 50 aa im ersten Schritt entfalten, d. h. sich der Zwischenzustand aus den aa der β -Faltblätter d, e, f, g zusammensetzt (s. Abb. 5.2 B). Um genauere Informationen über die Struktur des Zwischenzustands zu erhalten, sind weitere Messungen mit NMR oder mit Röntgenstrukturanalyse notwendig. Erste Ergebnisse einer NMR-Analyse der Arbeitsgruppe unseres Kooperationspartners Prof. Schleicher bestätigten die in den Mutationsexperimenten gemachte Beobachtung (Mutante BC), nämlich dass der Zwischenzustand selbst eine stabile Faltungsstruktur aufweist.

Auch nach dem bisherigen Stand der Untersuchungen kann keine endgültige Antwort auf die Frage nach der physiologischen Bedeutung des Entfaltungszwischenzustands gegeben werden. Es wäre denkbar, dass ddFLN4 eine Art Sollbruchstelle darstellt, die bei Überbelastung des Moleküls durch Entfaltung bis in den Zwischenzustand oder bei Bedarf bis in den denaturierten Zustand eine Verlängerung des Dimers bewirkt und somit dessen komplette Dissoziation verhindert. Eine mechanische Überlastung des Cytoskeletts der Zelle könnte auf diese Weise schlagartig abgebaut, irreparable Schäden des Skeletts könnten vermieden werden. Dieser Hypothese geht jedoch voraus, dass die Bindung des Moleküls zum Aktinfilament via ABD mechanisch stabiler ist als die Dimerbindung oder die Entfaltungskräfte der 6 Ig-Domänen des Moleküls. Um dies zu zeigen, sind fortführende Experimente erforderlich.

Obwohl ddFLN4 von der Struktur her homolog zu allen anderen ddFLN-Domänen ist, d. h. die Strukturen der Domänen bei unterschiedlicher Primärsequenz sehr ähnlich sind, bildet sie erstaunlicherweise als einzige Domäne einen Entfaltungszwischenzustand aus. Inwieweit dieser Zustand Einfluss auf die Faltungseigenschaften von ddFLN4 im Vergleich zu den anderen Domänen hat, wird im nächsten Abschnitt diskutiert.

6.3 Kraftspektroskopische Untersuchung der Faltungs- und Entfaltungskinetik von ddFLN4

Die Untersuchungen der Superhelix von Myosin haben gezeigt, dass sich die Kraftspektroskopie neben der Charakterisierung der Entfaltung auch zur Charakterisierung der Faltung einzelner Proteine in einem hervorragenden Maße eignet, allerdings bisher unter der Voraussetzung, dass es sich bei der Probe um ein elastisches Molekül handelt. Die mechanische Untersuchung der Faltung inelastischer Moleküle wie ddFLN ist aber dennoch möglich. Für die Untersuchung der Faltung eines inelastischen Moleküls wie ddFLN war es notwendig, ein neues Messprotokoll zu entwickeln, welches am Beispiel von Abb. 6.3.1 im Folgenden erläutert wird:

Die 6 Dehnungs- und Entspannungszyklen aus Abb. 6.3.1 A-F sind charakteristisch für die kraftspektroskopische Analyse der Faltungskinetik von ddFLN4. Sie stammen aus Messungen mit dem Konstrukt ddFLN1-5, welches aus den ddFLN-Domänen 1-5 besteht. In Abb. 6.3.1 G ist zum besseren Verständnis des Messprotokolls auch der zeitliche Verlauf der Probenposition abgebildet. Zunächst wird im ersten Schritt die Probe der Spitze angenähert, bis diese mit einer Kraft von etwa 300 pN auf das Substrat eindringt (nicht zu sehen). Währenddessen wird eine sog. „Eindrückkurve“ aufgenommen, die dazu dient, die Probenposition a des Kontaktpunkts zu berechnen, der für die weitere kontrollierte Belastung des Moleküls als Referenzposition dient (s. Abb. 6.3.1 A).

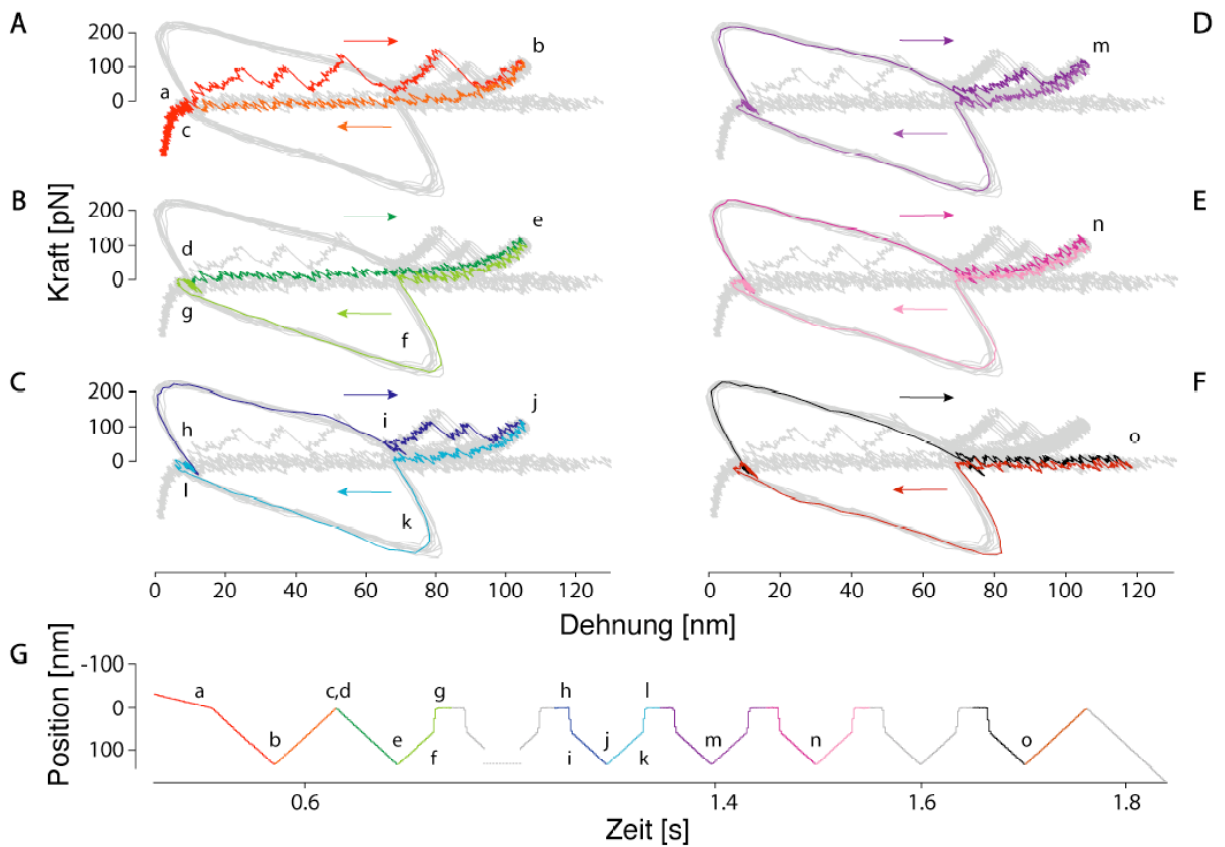


Abb. 6.3.1: A-E) Dehnungs- und Entspannungszyklen von ddFLN1-5 (s. Erläuterung im Text). F) Desorption des Moleküls von Substrat oder Spitze. G) Probenposition in Abhängigkeit von der Zeit. Als Wartezeit wurden 30 ms vorgegeben (s. Plateaus).

Anschließend wird die Probe von der Spitze mit konstanter Geschwindigkeit entfernt, es kommt zu einer ersten Entfaltung eines eingespannten ddFLN1-5 Moleküls. Die Kraft-Dehnungskurve aus Abb. 6.3.1 A zwischen Position a und b gibt diesen Entfaltungsvorgang wieder. Offenbar entfalten ddFLN4 und 2 weitere ddFLN-Domänen. Nach Relaxierung des Moleküls (zw. Position b und c) folgt eine erneute Dehnung im Bereich zwischen 10 und 100 nm (zw. Position d zu e, Abb. 6.3.1 B) bei konstanter Piezogeswindigkeit. Im Gegensatz zur ersten Dehnung treten keine Entfaltungspicks auf, da keine Rückfaltung des Moleküls vorher an Position c stattgefunden hat, das Molekül ist aber weiterhin an Spitze und Substrat gebunden. Ausgehend von Position d bei 100 nm wird das Molekül wieder entspannt, bis sich die Spitze etwa bei 70 nm über dem Substrat befindet (Position e). Danach wird zwischen Position e und dem Ausgangspunkt c die Probe mit maximaler Geschwindigkeit innerhalb ca. 2 ms bis auf Position g angehoben. Das Molekül befindet sich jetzt im Zustand minimaler Belastung, aus dem heraus für eine definierte Wartezeit (hier 30 ms) dem Molekül die Gelegenheit zur spontanen Faltung gegeben ist. Hinterher wird die Probe von 10 nm auf 70 nm (Position h bzw. i, Abb. 6.3.1 C) innerhalb von 2 ms in umgekehrter Richtung abgesenkt. Der letzte Schritt des eigentlichen Messzyklus in Abb. 6.3.1 ist die Dehnung des Moleküls zwischen 70 und 100 nm (Position i bzw. j) bei konstanter Piezogeswindigkeit von $2 \mu\text{m/s}$. 3 Entfaltungsereignisse sind hier zu beobachten: Entfaltung von ddFLN4 ausgehend vom nativen Zustand mit 2 Entfaltungspicks (Abb. 6.3.1 C), Entfaltung des Zwischenzustands mit 1 Entfaltungspick (Abb. 6.3.1 D) und keine Entfaltung des Moleküls, da sich ddFLN4 vorher erst gar nicht zurückgefaltet hat (Abb. 6.3.1 E). Die Entfaltungspicks von ddFLN4 haben sich auf die Position des letzten Entfaltungspicks aus Abb. 6.3.1 A zu höheren Dehnungen hin verschoben. Diese Verschiebung geht darauf zurück, dass ddFLN4 im Vergleich zu den anderen Domänen in über 85 % der Fälle als einzige schnell genug war, eine Rückfaltung einzugehen. Die zwei anderen

Domänen stehen daher dem Experiment als „Opferdomänen“ zur Verfügung. Diese gewährleisten im entfalteten Zustand eine möglichst kontrollierte Faltung von ddFLN4, d. h. eine Faltung, die unter der Bedingung minimaler entropischer Kraft des eingespannten ddFLN1-5 Moleküls stattfindet. Wären diese entropischen Kräfte zu groß (ca. $>5\text{pN}$), könnten andernfalls keine definierten Messbedingungen hergestellt werden. Im Falle, dass doch in unter 15 % der Rückfaltungseignisse neben ddFLN4 ebenfalls eine andere Domäne eine Rückfaltung eingeht, ist ein einzelner Peak wie in Abb. 6.3.1 A statt den beiden Entfaltungspeaks von ddFLN4 zu sehen. Diese „verschwinden“ stattdessen in der ausgeprägten Hysterese zwischen 10 und 70 nm. Die Hysterese, eine Folge des schnellen Hin- und Herschaltens zwischen Position h und i bzw. k und l und den daraus resultierenden, auf die Blattfeder wirkenden hydrodynamischen Kräften, stellt ein „blindes Messfenster“ dar. Entfaltungspeaks, die in diesen Bereich fallen, können nicht mehr nachgewiesen werden. Zwar kommt es in diesem Bereich zu einer starken Verbiegung der Blattfeder, jene Reibungskräfte stellen aber keine unmittelbare Belastung des eingespannten Moleküls dar, sodass während des Schaltens das Molekül nicht verloren geht. Das beschriebene Messprotokoll wird automatisch durchgeführt und kann beliebig lange fortgesetzt werden. In Abb. 6.3.1 (grauer Hintergrund) und in Abb. 3 B aus der Veröffentlichung ist die Überlagerung aller Kraft-Dehnungskurven von 8 bzw. 50 Zyklen dargestellt. In beiden Messreihen treten offensichtlich die Entfaltungspeaks von ddFLN4 immer wieder im Messfenster zwischen 70 und 100 nm an gleicher Position auf, eine Konsequenz dessen, dass die Länge des eingespannten Moleküls während der Messung konstant bleibt. Dies vermittelt einen ersten Eindruck, von der Effizienz dieses Messverfahrens, das mittels eines einzelnen Moleküls den Gewinn großer Datenmenge gewährleistet. So konnten z. B. über 300 Messzyklen innerhalb von 10 s durchgeführt werden, bevor das Molekül schließlich desorbierte (s. Abb. 6.3.1 F)^a.

Das oben beschriebene Messprotokoll ist ein Einzel-Molekül-Analogon zur klassischen Methode der Double-Jump Stop-Flow Technik, bei der zur Analyse der Faltungskinetik von Proteinlösungen zwischen renaturierenden und denaturierenden Lösungsbedingungen nach einer definierten Zeitdauer hin und her geschaltet wird³⁹. Re- und denaturierende Bedingung entsprechen für das oben beschriebene Messprotokoll den Situationen, wenn die Spitze an Position a in die Probe eindrückt bzw. auf das Molekül eine genügend große Kraft einwirkt, sodass für das Molekül nur die Möglichkeit zur Entfaltung besteht. Letztere Voraussetzung ist für das Messfenster zwischen 70 und 100 nm gegeben.

Anstatt wie bei der klassischen Methode den strukturellen Zustand des Moleküls mittels optischer Spektroskopie nachzuweisen, wird im mechanischen Einzelmolekül-Experiment einfach der Zustand des Moleküls nach der Rückfaltung durch mechanische Entfaltung abgefragt. Bei ddFLN4 sind 3 Typen von Entfaltungskurven zu beobachten; sie geben an, dass die Domäne sich nach kompletter Entspannung entweder im nativen, intermediären oder denaturierten Zustand befindet (s. Abb. 6.3.1D-F). Analog zur klassischen Technik ist zu erwarten, dass sich durch Variation der Schaltzeit die Besetzungswahrscheinlichkeit der Zustände ändert. Abb. 6.3.2 zeigt die Besetzungswahrscheinlichkeit dafür an, dass ddFLN4 nach Wartezeiten von 5, 10, 20, 30, 40 ms für die Rückfaltung entweder den nativen (grünen Kreise) oder intermediären (blauen Kreise) Zustand erreicht hat. Die roten Kreise entsprechen dem Fall, dass ddFLN4 keine spontane Rückfaltung eingegangen ist. Offensichtlich kommt es zu einer signifikanten Änderung der Besetzungswahrscheinlichkeiten bei zunehmenden Wartezeiten. Insbesondere für den nativen und denaturierten Zustand ist ein starker Anstieg bzw. Abfall der Wahrscheinlichkeiten von 5 % auf 80 %

^a Zur Gewährleistung einer minimalen Belastung des eingespannten Moleküls aufgrund entropischer Kräfte zum Zeitpunkt der Rückfaltung von ddFLN4 wird die Feder mit einer Kraft von ca. 150 pN in die Probe eingedrückt. Für gewöhnlich wird dabei kein weiteres Molekül aufgenommen.

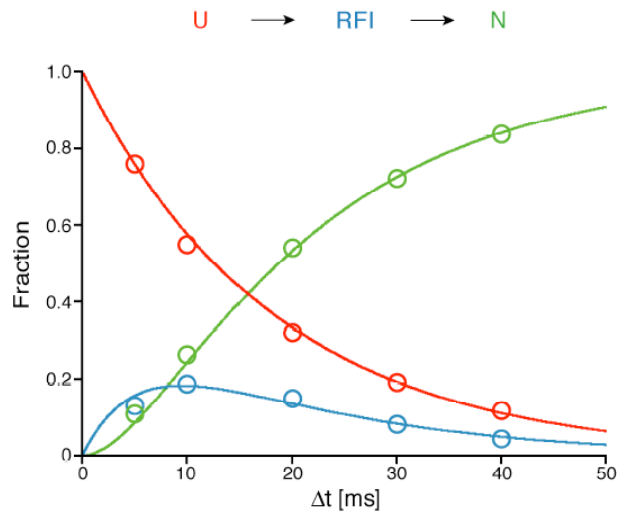


Abb. 6.3.2: Besetzungswahrscheinlichkeiten für den nativen Zustand N (N=“native“; grüne Kreise), intermediären (RFI=“refolding intermediate“; blaue Kreise) und denaturierten Zustand (U=“unfolded“; rote Kreise). Die Fits entstammen dem Ratenmodell aus Kap. 4.8, welches auf dem Reaktionsschema im oberen Teil basiert.

bzw. 80 % und 10 % aller Rückfaltungsereignisse bei 5 und 40 ms zu beobachten. Aus der Abhängigkeit der Besetzungswahrscheinlichkeiten von der Wartezeit lässt sich die Faltungskinetik von ddFLN4 bestimmen. Dazu wird das in Kap. 4.7 diskutierte Ratenmodell an den gemessenen Daten angepasst (durchgehende Graphen; s. Gl. (31)). Es zeigt sich, dass das Modell mit den Übergangsraten $k_1=50\pm 4\text{ s}^{-1}$ für den Übergang $U\rightarrow I$ und $k_2=179\pm 20\text{ s}^{-1}$ für $I\rightarrow N$ die Daten sehr gut beschreibt (s. Gl. (29)). Das Modell gibt die Faltung über einen obligaten Zwischenzustand wieder. Andere Modelle mit einem nichtobligaten Zwischenzustand sind dagegen nicht in der Lage, die Daten zu reproduzieren. Wir kommen daher zum ersten Hauptergebnis der Untersuchung: Die Faltung von ddFLN4 erfolgt über einen obligaten Zwischenzustand.

Mit den Kraftverteilungen aus Abb. 6.3.3 lassen sich für die angegebenen Übergänge die Parameter k gleich der spontanen Entfaltungsrates und Δx gleich der Potentialbreite bestimmen. Dazu werden die Kraftverteilungen mit der Kurve der theoretischen Verteilung gefittet (s. Gl (25)), die offensichtlich die experimentell bestimmten Kraftverteilungen sehr gut mit den Fitparametern $k_{N\rightarrow I}=0.28\text{ s}^{-1}$ und $\Delta x_{N\rightarrow I}=4\pm 0.35\text{ \AA}$ bzw. $k_{I\rightarrow U}=k_{RFI\rightarrow U}=0.33\text{ s}^{-1}$ und $\Delta x_{I\rightarrow U}=\Delta x_{RFI\rightarrow U}=5.25\pm 0.4\text{ \AA}$

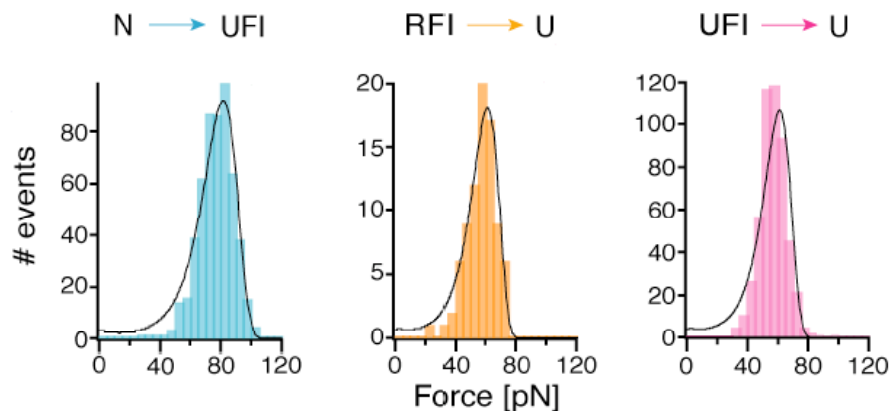


Abb. 6.3.3: Histogramme der Entfaltungskräfte für die oben stehenden Übergänge. Die schwarzen Graphen sind Fits, berechnet nach Gl. (25).

wiedergeben. Eine signifikante Abweichung ist lediglich im Bereich bis 45 pN zu beobachten. Diese geht auf den begrenzten Messbereich zwischen 70 und 100 nm zurück. Entfaltungseignisse, die bei kleineren Kräften als 45 pN auftreten, also in einem Detektionsbereich zwischen 0 und 70 nm liegen, entziehen sich zum Großteil der Detektion und werden nicht in der Statistik berücksichtigt.

In der Veröffentlichung wird anfänglich zwischen Entfaltungs- und Faltungszwischenzustand unterschieden, da per se nicht von der Identität der beiden Zustände ausgegangen werden kann. Da aber beide Zwischenzustände die gleichen Kraftverteilungen (s. mittleres und rechtes Histogramm in Abb. 6.3.3) sowie die gleiche Konturlängenänderung aufweisen, kann im Rahmen der Auflösung des Experiments davon ausgegangen werden, dass beide Zustände sehr ähnlich wenn nicht identisch sind, zumal kleine Änderungen in der Primärstruktur von Proteinen bekanntlich zu drastischen Änderungen der mechanischen Stabilität führen⁴⁰.

Die schon oben erwähnte Beobachtung, dass in unter 15 % der Rückfaltungseignisse auch eine der beiden anderen ddFLN-Domänen gefaltet ist, erlaubt eine Abschätzung der Faltungskinetik der anderen Domänen im Vergleich zu ddFLN4. Wir kommen zu dem zweiten Hauptergebnis der Untersuchung: ddFLN4 mit Zwischenzustand faltet mindestens zehnmal schneller als alle anderen ddFLN-Domänen ohne Zwischenzustand, obwohl alle ddFLN-Domänen homologe Strukturmerkmale aufweisen. Demnach ist anzunehmen, dass ein Zusammenhang zwischen der Existenz eines obligaten Zwischenzustands und der Faltungskinetik eines Proteins besteht. In der bisherigen Literatur wird die Bedeutung von Zwischenzuständen kontrovers diskutiert. Ergebnisse einiger theoretischer Arbeiten sagen eine Faltungsbeschleunigung aufgrund der Existenz stabiler Zwischenzustände voraus⁴¹. Es konnten zwar auch Zwischenzustände experimentell nachgewiesen werden, jedoch stellen sie in Anbetracht der sog. „Downhill-Folder“, die direkt in kürzester Zeit vom Grundzustand in ihren nativen Zustand falten, keine Grundvoraussetzung für schnelle Faltung dar⁴². Zur Klärung der Rolle von stabilen Zwischenzuständen bei der Faltung ist es notwendig, die Faltungskinetik homologer Domänen mit und ohne Zwischenzustand zu vergleichen. Dies wurde in einer von Plaxco et al. durchgeführten klassischen Proteinfaltungsstudie anhand homologer Fibronectin Domänen FN10 und FN9 erreicht⁴³. Ergebnis der Studie war, dass FN10 um ein Vielfaches schneller faltet als FN9. Später wiesen Clarke et al. nach, dass für FN 10 ein obligater Zwischenzustand bei der Faltung existiert⁴⁴. Beide Studien unterstützen unsere Annahme, dass obligate Zwischenzustände zu einer Faltungsbeschleunigung führen können.

Das beschriebene Messverfahren zeigt, dass das Kraftmikroskop ein potentes Mittel zur Untersuchung der Faltung von Proteinen darstellt. Auf einzigartige Weise ist man dadurch nun in der Lage die Faltungskinetik einzelner Proteine, sogar einzelner Proteindomänen zu charakterisieren. Für die Zukunft ist denkbar, das Messverfahren für die Erforschung der Faltungskinetik einzelner Proteine in Abhängigkeit äußerer Parameter wie z. B. Temperatur oder pH-Wert oder Zuggeschwindigkeit anzuwenden. Ferner könnte durch den Einsatz von besonders schnellen Piezotischen das Verfahren weiter in seiner Qualität d. h. in seiner zeitlichen Auflösung verbessert werden - die bestehenden technischen Möglichkeiten dahingehend sind bei weitem noch nicht ausgeschöpft. In jedem Fall ist es möglich, den Einsatzbereich sowie die Leistungsfähigkeit der Kraftspektroskopie weiter auszubauen.

Anhang

Die Publikationen dieser Arbeit sind in der folgenden Reihenfolge im Anhang zusammengefasst:

1. Schwaiger, I., Sattler, C., Hostetter, D.R. & Rief, M. The myosin coiled-coil is a truly elastic protein structure. *Nat Mater* **1**, 232-5 (2002).
2. Schwaiger, I., Kardinal, A., Schleicher, M., Noegel, A.A. & Rief, M. A mechanical unfolding intermediate in an actin-crosslinking protein. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 81-5 (2004).
3. Schwaiger, I., Schleicher, M., Noegel, A.A. & Rief, M. The folding pathway of a fast-folding immunoglobulin domain revealed by single-molecule mechanical experiments. *EMBO Rep.* **6**, 46-51 (2005).

The myosin coiled-coil is a truly elastic protein structure

INGO SCHWAIGER*¹, CLARA SATTLER*¹, DANIEL R. HOSTETTER² AND MATTHIAS RIEF†¹

¹Lehrstuhl für Angewandte Physik, Amalienstrasse 54, 80799 München, Germany

²Department of Biochemistry B400, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305-5307, USA

*These authors contributed equally to this work

†e-mail: Matthias.Rief@physik.uni-muenchen.de

Published online: 24 November 2002; doi: 10.1038/nmat776

Coiled-coils occur in a variety of proteins involved in mechanical and structural tasks in the cell. Their mechanical properties are important in various contexts ranging from hair elasticity¹ to synaptic fusion². Beyond their importance in biology, coiled-coils have also attracted interest as programmable protein sequences for the design of novel hydrogels and materials³. We have studied the elastic properties of the myosin coiled-coil at the single molecule level. The coiled-coil undergoes a massive structural transition at forces between 20 and 25 pN where the coil extends to about 2.5 times its original length. Unlike all other proteins investigated mechanically so far, this transition is reversible on a timescale of less than a second, making the coiled-coil a truly elastic protein.

The amino acid sequence of parallel left-handed coiled-coils shows a characteristic seven-residue periodicity with apolar residues in the first and fourth position. The resulting hydrophobic stripe drives the assembly of two α -helices into a coiled-coil with a crossover repeat of 14 nm. Examples of coiled-coils⁴ are the tails of myosin and kinesin motors and cytoskeletal proteins such as cortexillin, lamin and keratin. Keratins occur in hair and skin, providing the necessary elasticity. Mechanical stability of the coiled-coils against deformation forces is no doubt important for the molecular function in all of the above examples. However, as yet no direct measurements of molecular elasticity have been available. Recently, single-molecule techniques such as atomic force microscopy (AFM) or optical tweezers have been used to study the mechanical properties of DNA^{5–7}, polysaccharides^{8,9} and the muscle protein titin^{10–13}. Here, we have used single-molecule force spectroscopy, to investigate the elasticity of a coiled-coil. Because the myosin II tail is one of the longest coiled-coil structures known, we have chosen this molecule as a model system for our experiments.

The muscle motor myosin II is the most prominent member of the myosin motor family¹⁴. Myosin II is a hexamer consisting of two heavy chains and four light chains. Each heavy chain has a globular N-terminal motor domain. The two heavy chains dimerize into a 150-nm-long parallel coiled-coil and form the myosin tail. This tail mediates the assembly of single myosin molecules into the thick filaments of muscle¹⁴.

The experimental geometry is sketched in Fig. 1a. Full-length rabbit skeletal myosin molecules were adsorbed onto an amino-reactive aldehyde surface or a gold surface and single molecules were picked up by an AFM cantilever tip. In numerous studies, non-specific anchoring

of proteins and other biopolymers to a non-functionalized AFM cantilever tip has proved a powerful way to achieve high coupling forces of up to several hundred piconewtons¹⁵.

Figure 1b (upper trace) shows a typical force against extension curve of the myosin tail. Up to an extension of ~100 nm the molecule experiences no measurable force. When the myosin tail is fully straightened the force rises steeply. Because the myosin molecule can be picked up anywhere along its tail, the stretched coiled-coil parts vary in length. The maximum contour length was always below 150 nm for full-length rabbit skeletal myosin, consistent with the total length of a single molecule. At forces beyond 20 pN a shallow force-plateau marks a massive structural transition of the tail. The molecule extends to more than twice its original contour length while the force rises only from 20 to 25 pN. Beyond this extension the force again rises steeply.

Because the skeletal myosin was purified from muscle tissue it is important to rule out contributions of other long muscle proteins to the measured elasticity. In fact, one myosin sample obtained from a commercial source (Cytoskeleton, Denver, Colorado) had large amounts of impurities in the form of titin or a similar long modular muscle protein. Although these impurities were not visible in the gels provided with the sample, they were readily detectable in our single-molecule mechanical experiments. We therefore did additional experiments with myosin II purified from other sources. A sample trace of myosin II purified from *Dictyostelium discoideum* is given in Fig. 1b (middle trace). The plot of force against extension is virtually indistinguishable from the one obtained from skeletal myosin. Because of the non-specific anchoring of the protein to the AFM tip it is also important to rule out contributions from the unfolding of the motor domain of myosin II. Figure 1b (lower trace) shows data obtained on a bacterially expressed shortened construct comprising 768 amino acids of the *Dictyostelium* myosin II tail, lacking the entire motor domain and two-thirds of the tail. Because the folded contour length of this construct is only 109 nm, the observed lengths are shifted to shorter values. However, the molecular fingerprint is identical to the ones obtained from the full-length molecules, indicating that the observed elasticity is indeed due to stretching of the coiled-coil.

To corroborate this point further, we also investigated the dependence of the coiled-coil elasticity on anion concentration. The histograms in Fig. 1c show the midpoint transition force in the absence and presence of 0.6 M sodium acetate. The average forces increased from 23 ± 4 pN

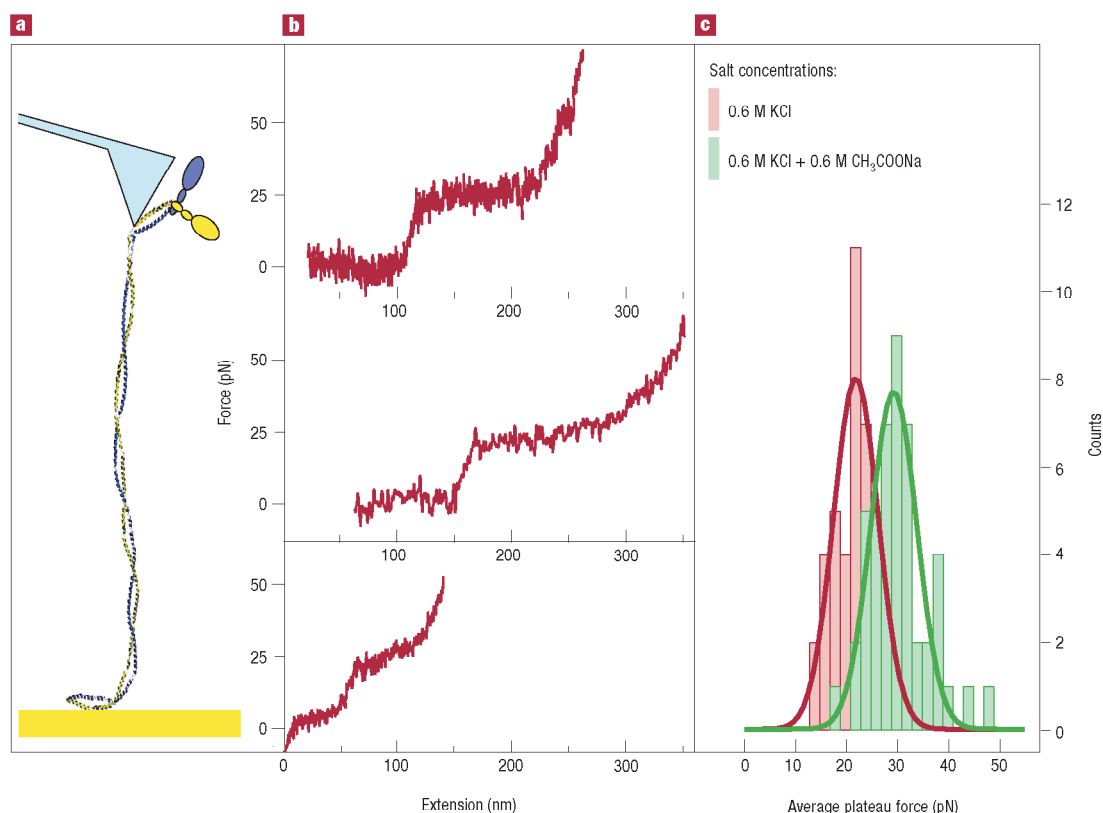


Figure 1 Extensibility of the myosin coiled-coil. **a**, Experimental geometry. **b**, Sample plots of force against extension for rabbit skeletal myosin II (upper trace), *Dictyostelium* myosin II (middle trace) and from a shortened tail construct of *Dictyostelium* myosin II expressed in bacteria (lower trace). **c**, Dependence of the average plateau force on sodium acetate concentration (buffer conditions as indicated).

(without acetate) to 31 ± 6 pN (with 0.6 M acetate). In both buffers an additional concentration of 0.6 M KCl was present. No change in stability was observed for a KCl variation in the range 0.6 M to 1.2 M (data not shown). The strong dependence of the transition force on acetate concentration (Fig. 1c) is in agreement with temperature denaturation experiments of the myosin rod by Stafford¹⁶, where addition of 0.6 M sodium acetate led to an increase in melting temperature by more than 7°C.

Myosin overstretching is an almost fully reversible process. In Fig. 2a, a molecule is repeatedly stretched (red curve) and relaxed again (blue curve). The force-extension profile of relaxation follows almost exactly the same trace as during pulling. There is, however, a consistent small hysteresis in the early part of the plateau (shaded in light blue). Even at pulling velocities of up to $3 \mu\text{m s}^{-1}$ stretching remains fully reversible (data not shown). In comparison, unfolding and refolding of modular proteins like titin (Fig. 2b) at similar extension rates occurs far from equilibrium with a large hysteresis between unfolding (red) and refolding traces (blue).

Biomolecular elasticity is governed by different processes in different force regimes. At low forces, entropic elasticity due to the different polymer conformations dominates, whereas at higher forces, structural transitions lead to pronounced deviations. Models combining entropic elasticity with force-induced transitions have successfully reproduced the elasticity of many biopolymers such as DNA^{17,18}, polysaccharides and proteins¹⁹. An analysis of the force-extension traces based on an elastically coupled two-level

system¹⁹ allows for a quantitative interpretation of the data (for details see Methods). In brief, the model (see Fig. 3) divides the myosin tail into small folded segments of contour length l_1 that can each undergo a transition into a stretched, unfolded state of contour length l_2 . An external force F changes the difference in free energy between the two states $\Delta G(F)$ (see in Fig. 3, lower panels) so that with increasing force more and more segments unfold. The two states have different persistence lengths p_1 and p_2 . A fit to the data traces (for example, the black curve in Fig. 3) yields the following parameters: $l_1 = 3 \pm 1$ nm, $l_2/l_1 = 2.5 \pm 0.2$, $p_1 = 25 \pm 10$ nm, $p_2 = 0.4 \pm 0.1$ nm, $\Delta G(F=0) = 2.3 \pm 0.7$ kcal mol⁻¹ nm⁻¹.

Our data and the fit suggest the following mechanism of myosin elasticity: starting at low extensions, the coiled-coil is in its intact folded structure forming a semi-flexible polymer. The initial part of the force-extension curve up to 20 pN reflects the entropic elasticity of the folded coiled-coil. The value of $p_1 = 25 \pm 10$ nm is broadly consistent with data derived from light-scattering experiments²⁰. Between 20 and 25 pN short coiled-coil segments start to unfold. The unfolding leads to the observed plateau. At the end of the plateau the coiled-coil is completely unfolded and the force rises again. Supporting this conclusion, the persistence length of $p_2 = 0.4$ nm in this high force part is identical to the persistence length of unfolded polypeptide strands obtained for other proteins such as titin¹², spectrin²¹, tenascin²² and fibronectin²³. Moreover, during the force plateau the coiled-coil is overstretched to 2.5 times its original length. This number is very close to the expected length difference between a folded coiled-coil (1.4 Å per amino acid) and the

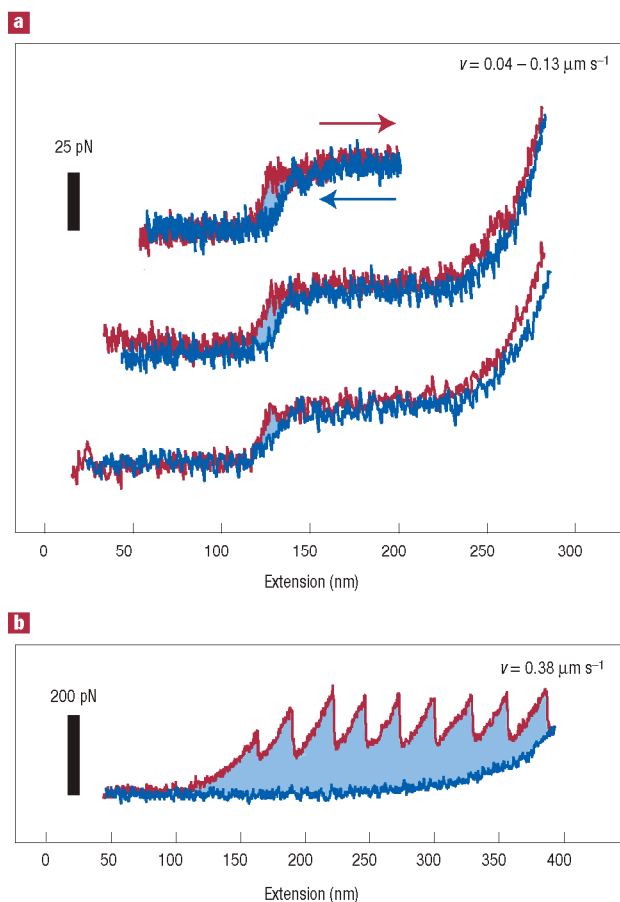


Figure 2 Elasticity of the myosin coiled-coil. **a**, Series of three pulling (blue) and relaxing (red) cycles of a single molecule of rabbit skeletal myosin at extension rates between 0.04 and $0.13 \mu\text{m s}^{-1}$. **b**, Extension (red) and relaxation (blue) of native human cardiac titin with a pulling velocity of $0.38 \mu\text{m s}^{-1}$. The light blue area reflects the energy dissipated during unfolding of titin domains.

completely unfolded polypeptide (3.6 \AA per amino acid). Free-energy values for the unfolding–refolding transition can be obtained from our mechanical experiment. Because the stretching process occurs under equilibrium conditions, the area underneath the plateau reflects the free-energy changes associated with the transition. The force–extension trace can thus be viewed as a calorimetric experiment with a single molecule.

The main difference between myosin coiled-coil elasticity and the forced unfolding of all other proteins mechanically characterized so far, such as titin, tenascin or spectrin, resides in the timescales on which structural transitions occur. An example of a stretch-release cycle of the muscle protein titin, a modular protein responsible for passive muscle elasticity, is given in Fig. 2b. Titin shows discrete non-equilibrium unfolding of single domains at high forces ranging from 150 to 300 pN . At such high forces refolding rates are negligible¹⁹. Therefore, on relaxation, considerable hysteresis is visible. Refolding can only occur at forces below 4 pN (ref. 10) and elasticity is entirely dominated by entropic forces of the unfolded polypeptide chain (blue trace in Fig. 2b). The high unfolding forces together with discrete unfolding events add high toughness to the titin molecule. It is able to dissipate high amounts of

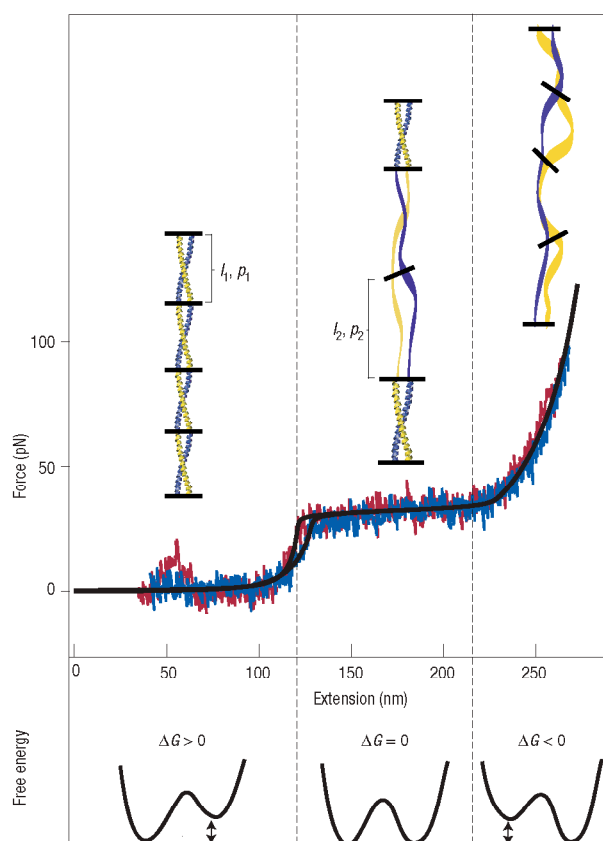


Figure 3 Two-state model of coiled-coil elasticity (see Methods). Pulling (blue) and relaxing (red) cycle of a single molecule of rabbit skeletal myosin. Superimposed (black curves) are the results of the two-state model fit. Between the two cycles there is a small hysteresis which can be accounted for by a small number of permanently unfolded segments in the model fit.

energy ($1,000kT$; light blue area underneath the peaks) although the free energy of folding is only of the order of $10kT$. This property makes titin ideally suited to act as a shock absorber in muscle, in spite of its poor elasticity. Similar characteristics of proteins have been shown to be important for the mechanical properties of sea shells and bones^{24,25}.

In contrast the myosin coiled-coil undergoes rapid folding–refolding transitions in equilibrium making the myosin tail a truly elastic protein structure able to refold against considerable forces of up to 30 pN on a timescale of much less than a second. No energy is dissipated and the complete mechanical energy absorbed in the stretching cycle (free energy of folding) is given back during relaxation. Nature seems to choose a topologically simple coiled-coil fold in order to realize elasticity in a protein structure. This observation blends in with recent observations in protein folding that folding rates of proteins are determined to a large degree by topology²⁶. The topologically simple coiled-coil has fast refolding rates rendering its mechanical unfolding reversible, whereas the topologically more complicated Ig domains of titin require longer refolding times, which results in non-equilibrium discrete unfolding events. Interestingly, double-helical DNA shows elastic properties similar to those reported here for the myosin coiled-

coil^{5–7}. DNA can be overstretched at a force of 65 pN in an equilibrium transition to 1.7 times its length. Although the interactions and the nature of the stretching transition in detail are different from those of the coiled-coil, the similarity of topology and force-profile is intriguing.

It was once thought that coiled-coil folding–unfolding transitions in the tail part might have a role in force production in myosin²⁷. Nowadays, motor activity can be unequivocally attributed to the myosin motor domain, and such a mechanism can therefore be excluded. On the other hand, coiled-coil unwinding in the head–rod junction seems to contribute considerably to the flexibility needed for proper mechanical performance both in myosin II²⁸ and in the motor protein kinesin^{29,30}.

Hair and wool fibres are highly elastic and can be reversibly stretched by more than 30% of their length. Hair elasticity has been attributed to a conformational transition of the keratin coiled-coil. The exact molecular mechanism of keratin elasticity, however, is still under debate¹. In current models, researchers have attributed the elastic component in hair to a conformational transition in the keratin coiled-coil with an estimate of 0.07 GPa (ref. 1). Assuming a cross-section of 1 nm per coiled-coil this number corresponds to 70 pN per coiled-coil. This is close to the 30 pN we measure for the force-plateau in single myosin coiled-coils, given the uncertainties of such an estimate.

The myosin II coiled-coil has shown that it can actively produce forces of up to 30 pN on folding. We anticipate that beyond the examples discussed here, nature may take advantage of these properties in many other contexts where coiled-coil mechanics is important. Moreover, coiled-coils are important building blocks for the design of nanobiomaterials, and their special mechanical properties could be exploited to realize simple motor function through the folding of the two strands into a coiled-coil.

METHODS

SAMPLE PREPARATION

Rabbit skeletal muscle myosin and light meromyosin was prepared according to previous methods³¹. Myosin II from *Dictyostelium discoideum* was purified as described elsewhere³². Unless otherwise stated the experimental buffer contained 25 mM Imidazole, 600 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.4. Myosin was allowed to bind to an amino-reactive aldehyde surface (Xenopore, Hawthorne, New Jersey) or a freshly evaporated gold surface from a 20- μ l drop of a myosin solution (1 mg ml⁻¹) for 10 min. Before the experiment the sample was thoroughly rinsed with buffer to remove excess myosin. Experiments were done at ambient temperature (20 °C).

FORCE MEASUREMENTS

Myosin molecules were picked up with an untreated Si₃N₄ AFM tip (Microlevers, Park Scientific Instruments, Sunnyvale, California). The extension of the molecule was controlled with sub-ångström precision with a piezo translator and the force was measured from the deflection of the AFM cantilever spring. The spring constant of each lever was calibrated by measuring the amplitude of the thermal fluctuations. Spring constants varied between 10 and 14 pN nm⁻¹, and the resonance frequency of the cantilevers in buffer was between 900 and 1.1 kHz. The measurements were carried out on a custom-built AFM. The sampling rate was 60 kHz. Each force curve consisted of 4,096 steps. We averaged 1 to 200 data points per step depending on the desired pulling speed. A box smoothing window was applied to some of the data shown.

TWO-STATE MODEL

Force–extension curves of the myosin coiled-coil were modelled with a modified version of the two-state model by Rief *et al.*¹⁹. The chain was divided into segments with two possible forms, a folded form of length l_1 and an unfolded form of length l_2 (see Fig. 3). The total contour length of the tail is then given by $L_c = n_1 l_1 + n_2 l_2$, where n_1 and n_2 are the numbers of segments in the folded and unfolded conformation respectively. The total extension $L(F)$ of the chain is $L(F) = n_1 l_1 x_1(F, p_1) + n_2 l_2 x_2(F, p_2)$, where $x_1(F, p_1)$ and $x_2(F, p_2)$ are the fractional extensions of the segments at a given force F determined by entropy elasticity according to the approximation of the worm-like chain model for polymer elasticity³³. The lengths l_1 and p_1 are the persistence lengths of the segments in their respective states (folded or unfolded). The numbers n_1 and n_2 also depend on force according to

$$\frac{n_2(F)}{n_1(F)} = e^{\frac{-\Delta G(F)}{kT}} \quad (1)$$

where $\Delta G(F)$ is the free energy as a function of force $\Delta G(F) = \Delta G(0) - F[l_2 x_2(F) - l_1 x_1(F)]$.

Received 11 June 2002; accepted 29 October 2002; published 24 November 2002.

References

- Hearle, J. W. A critical review of the structural mechanics of wool and hair fibres. *Int. J. Biol. Macromol.* **27**, 123–138 (2000).
- Jahn, R. & Grubmüller, H. Membrane fusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 488–498 (2002).
- Petka, W. A., Harden, J. L., McGrath, K. P., Wirtz, D. & Tirrell, D. A. Reversible hydrogels from self-assembling artificial proteins. *Science* **281**, 389–392 (1998).
- Burkhardt, P., Stetefeld, J. & Strelkov, S. V. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.* **11**, 82–88 (2001).
- Smith, S. B., Cui, Y. & Bustamante, C. Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science* **271**, 795–798 (1996).
- Cluzel, P. *et al.* DNA: an extensible molecule. *Science* **271**, 792–794 (1996).
- Rief, M., Clausen-Schaumann, H. & Gaub, H. E. Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules. *Nature Struct. Biol.* **6**, 346–349 (1999).
- Rief, M., Oesterhelt, F., Heymann, B. & Gaub, H. E. Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by AFM. *Science* **275**, 1295–1297 (1997).
- Marszalek, P. E., Oberhauser, A. F., Pang, Y. P. & Fernandez, J. M. Polysaccharide elasticity governed by chair-boat transitions of the glucopyranose ring. *Nature* **396**, 661–664 (1998).
- Kellermayer, M. S., Smith, S. B., Granzier, H. L. & Bustamante, C. Folding–unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers. *Science* **276**, 1112–1116 (1997).
- Tskhovrebova, L., Trinick, J., Sleep, J. A. & Simmons, R. M. Elasticity and unfolding of single molecules of the giant muscle protein titin. *Nature* **387**, 308–312 (1997).
- Rief, M., Gautel, M., Oesterhelt, F., Fernandez, J. M. & Gaub, H. E. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science* **276**, 1109–1112 (1997).
- Marszalek, P. E. *et al.* Mechanical unfolding intermediates in titin modules. *Nature* **402**, 100–103 (1999).
- Sellers, J. R. *Myosins* (Oxford Univ. Press, Oxford, 1999).
- Fisher, T. E., Marszalek, P. E. & Fernandez, J. M. Stretching single molecules into novel conformations using the atomic force microscope. *Nature Struct. Biol.* **7**, 719–724 (2000).
- Stafford, W. F. III Effect of various anions on the stability of the coiled coil of skeletal muscle myosin. *Biochemistry* **24**, 3314–3321 (1985).
- Marko, J. F. DNA under high tension: Overstretching, undertwisting and relaxation dynamics. *Phys. Rev.* **57**, 276–283 (1998).
- Ahsan, A., Rudnick, J. & Bruinsma, R. Elasticity theory of the B-DNA to S-DNA transition. *Biophys. J.* **74**, 132–137 (1998).
- Rief, M., Fernandez, J. M. & Gaub, H. E. Elastically coupled two-level systems as a model for biopolymer extensibility. *Phys. Rev. Lett.* **81**, 4764–4767 (1998).
- Swenson, C. A. & Stellwagen, N. C. Flexibility of smooth and skeletal tropomyosins. *Biopolymers* **28**, 955–963 (1989).
- Rief, M., Pascual, J., Saraste, M. & Gaub, H. E. Single molecule force spectroscopy of spectrin repeats: low unfolding forces in helix bundles. *J. Mol. Biol.* **286**, 553–561 (1999).
- Oberhauser, A. F., Marszalek, P. E., Erickson, H. P. & Fernandez, J. M. The molecular elasticity of the extracellular matrix protein tenascin. *Nature* **393**, 181–185 (1998).
- Rief, M., Gautel, M. & Gaub, H. E. Unfolding forces of titin and fibronectin domains directly measured by AFM. *Adv. Exp. Med. Biol.* **481**, 129–136 (2000).
- Smith, B. L. *et al.* Molecular mechanistic origin of the toughness of natural adhesives, fibres and composites. *Nature* **399**, 761–763 (1999).
- Thompson, J. B. *et al.* Bone indentation recovery time correlates with bond reforming time. *Nature* **414**, 773–776 (2001).
- Baker, D. A surprising simplicity to protein folding. *Nature* **405**, 39–42 (2000).
- Tsong, T. Y., Karr, T. & Harrington, W. F. Rapid helix–coil transitions in the S-2 region of myosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1109–1113 (1979).
- Lauzon, A. M., Fagnant, P. M., Warshaw, D. M. & Trybus, K. M. Coiled-coil unwinding at the smooth muscle myosin head–rod junction is required for optimal mechanical performance. *Biophys. J.* **80**, 1900–1904 (2001).
- Thormählen, M., Marx, A., Sack, S. & Mandelkow, E. The coiled-coil helix in the neck of kinesin. *J. Struct. Biol.* **122**, 30–41 (1998).
- Grummt, M. *et al.* Importance of a flexible hinge near the motor domain in kinesin-driven motility. *EMBO J.* **17**, 5536–5542 (1998).
- Marquissian, S. S. & Lowey, S. Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. *Method. Enzymol.* **85**, 55–71 (1982).
- Uyeda, T. Q. & Spudis, J. A. A functional recombinant myosin II lacking a regulatory light chain-binding site. *Science* **262**, 1867–1870 (1993).
- Bustamante, C., Marko, J. F., Siggia, E. D. & Smith, S. Entropic elasticity of lambda-phage DNA. *Science* **265**, 1599–1600 (1994).

Acknowledgements

We thank H. Gaub, H. Grubmüller and J. Trinick for helpful discussions. This work was supported by an SFB413 grant of the DFG.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.R.

Competing financial interests

The authors declare that they have no competing financial interests.

A mechanical unfolding intermediate in an actin-crosslinking protein

Ingo Schwaiger¹, Angelika Kardinal¹, Michael Schleicher³, Angelika A Noegel² & Matthias Rief¹

Many F-actin crosslinking proteins consist of two actin-binding domains separated by a rod domain that can vary considerably in length and structure. In this study, we used single-molecule force spectroscopy to investigate the mechanics of the immunoglobulin (Ig) rod domains of filamin from *Dictyostelium discoideum* (ddFLN). We find that one of the six Ig domains unfolds at lower forces than do those of all other domains and exhibits a stable unfolding intermediate on its mechanical unfolding pathway. Amino acid inserts into various loops of this domain lead to contour length changes in the single-molecule unfolding pattern. These changes allowed us to map the stable core of ~60 amino acids that constitutes the unfolding intermediate. Fast refolding in combination with low unfolding forces suggest a potential *in vivo* role for this domain as a mechanically extensible element within the ddFLN rod.

In a moving cell, the cytoskeleton undergoes constant reorganization. The protein components of the cytoskeletal meshwork are therefore subject to mechanical deformation. Despite its obvious importance, we know little about the mechanical response of the individual cytoskeletal components to a force. Many actin crosslinking proteins share a common building scheme: two actin-binding domains are connected by a rod domain. The length and structure of the connecting rod varies considerably among actin crosslinkers. The family of filamins has rod domains of the Ig fold. Depending on the specific filamin isoform, the number of rod domains can vary from 6 to 24 (ref. 1). Here we have used single-molecule mechanical experiments in combination with protein engineering to characterize the mechanical response to a stretching force of the rod domains of the *Dictyostelium discoideum* filamin ddFLN.

ddFLN consists of an N-terminal actin-binding domain and a rod domain of six Ig domains (1–6, N terminus to C terminus; Fig. 1a). Fucini *et al.*² and McCoy *et al.*³ have shown that ddFLN dimerizes into an antiparallel homodimer via Ig domain 6. Here we explore the response of the ddFLN rod domains to a stretching force using single-molecule force spectroscopy.

RESULTS

Mechanical stability of the ddFLN rod

We investigated the stability of the dimer bond between each domain 6 of the two ddFLN monomers using a construct containing the entire dimerized rod lacking the N-terminal actin-binding domain (ddFLN1–6). The dimers were incubated on a freshly evaporated gold surface and picked up by an atomic force microscope (AFM) tip (Fig. 1b). In force-extension curves obtained for this construct

(Fig. 1c), similar to those of many other modular proteins investigated so far, a sawtooth pattern reflects the unfolding of individual Ig domains^{4,5}. In the experiment, the molecules can be picked up anywhere along their contour, and so the number of unfolding peaks per force curve can vary from zero to the total number of domains in the rod. Many of the traces (see Fig. 1c) exhibit clearly more than six unfolding peaks, which is the number of domains present in a ddFLN monomer. This result shows that under deformation forces the individual domains in the rod unfold before the dimer bond breaks. A lower estimate for the average strength of the dimer bond of ~200 pN at pulling velocities between 100 nm s⁻¹ and 1 μm s⁻¹ can be obtained from the average force of the last rupture in our traces. This number is a lower estimate because we cannot distinguish rupture of the dimer bond from desorption of the molecule from either the tip or the substrate. Both events disrupt the mechanical connection between tip and substrate.

Domain 4 unfolds via an intermediate state

Most unfolding peaks show clear two-state unfolding of the Ig domains. The distance between two adjacent peaks is $\Delta L = 31.5 \pm 0.1$ nm ($n = 636$) and thus is consistent with the gain in length expected for the unfolding of a 100-residue domain. However, in the initial part of the force-extension curves, unfolding events with intermediate peaks are observed in the sawtooth pattern (green arrows, Fig. 1c). This indicates that at least one of the six Ig domains does not unfold in a two-state manner but via an intermediate state. To identify the Ig domain with these special mechanical properties, we studied the domains individually. In force spectroscopy experiments, single-molecule unfolding events must be distinguished from multiple

¹Lehrstuhl für Angewandte Physik, Ludwig-Maximilians-Universität München, Amalienstrasse 54, 80799 München, Germany. ²Institut für Biochemie I, Med. Fakultät der Universität zu Köln, Joseph-Stelzmann-Strasse 52, 50931 Köln, Germany. ³Adolf-Butenandt-Institut Zellbiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Schillerstrasse 42, 80336 München, Germany. Correspondence should be addressed to M.R. (Matthias.Rief@physik.uni-muenchen.de).

Published online 29 December 2003; doi:10.1038/nsmb705



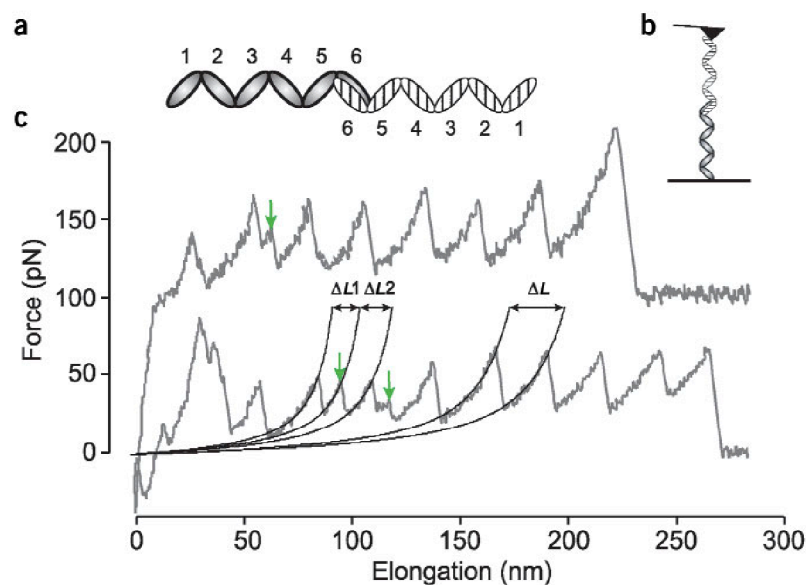


Figure 1 Single-molecule mechanics of ddFLN. **(a)** Schematic illustration of the rod construct ddFLN1-6. The rod consists of six Ig domains and forms a tail-to-tail dimer. **(b)** Experimental geometry. **(c)** Sample traces of force-extension curves of ddFLN1-6. The sawtooth pattern reflects unfolding of seven (upper trace) and eight (lower trace) Ig domains, respectively. At low forces and extensions, intermediate peaks (green arrows) indicate the presence of unfolding intermediates. The fits to the left-hand slopes of the lower unfolding trace were calculated using the worm-like chain model (see Methods). The length change $\Delta L1$ corresponds to unfolding from the native to the intermediate state, $\Delta L2$ to unfolding from the intermediate to the fully unfolded state and ΔL to unfolding from the native to the fully unfolded state.

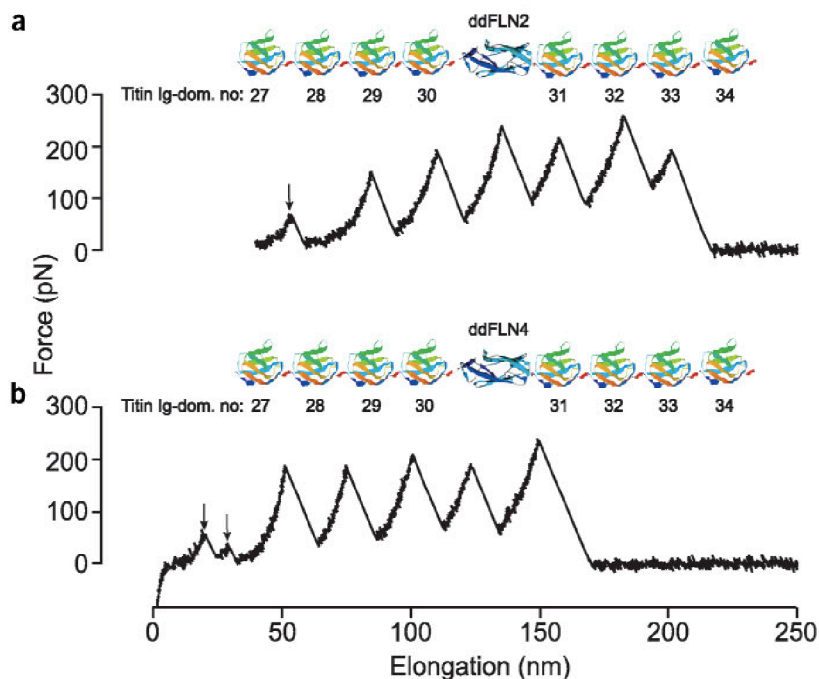
contrast, domain 2 unfolds cooperatively without any intermediate visible.

The number of amino acids forming the structured part of the intermediate can be estimated by measuring the distance between

interactions and nonspecific background. Protein domains are often studied by constructing polyproteins composed of identical subunits⁶. The resulting sawtooth pattern serves as a selection criterion for single-molecule events. However, the interpretation of data from polyproteins may become complicated if the individual domains do not unfold in a two-state manner. We therefore chose a different strategy combining the advantage of a clear single-molecule fingerprint with the ability to carry out experiments with only a single protein domain. We sandwiched each of the ddFLN Ig domains between four C-terminal and four N-terminal Ig domains from the muscle protein titin (Fig. 2). Titin Ig domains are mechanically well characterized and provide a clear sawtooth pattern allowing the detection of single unfolding events⁷. Sample traces of two such constructs (Ti/ddFLN2 and Ti/ddFLN4) with domains 2 and 4, respectively, from ddFLN are shown in Figure 2. At large extensions the sawtooth pattern of titin domains unfolding at forces between 150 and 250 pN is clearly visible. Because ddFLN domains unfold at forces <100 pN (Fig. 1c), the sandwiched ddFLN domain unfolds in the initial part of the force curve with the titin domains still folded (arrows, Fig. 2). Domain 4 shows a clear double peak that indicates an unfolding intermediate. In

the respective unfolding peaks. This was done for the dimeric construct (ddFLN1-6), for a monomeric construct lacking the dimerization domain 6 (ddFLN1-5) and for Ti/ddFLN4. The fits to the rising slope of the peaks (Fig. 1c) yield a distance of $\Delta L1 = 15.1 \pm 0.1$ nm and $\Delta L2 = 16.9 \pm 0.1$ nm ($n = 296$) for ddFLN1-6, $\Delta L1 = 14.2 \pm 0.1$ nm and $\Delta L2 = 16.0 \pm 0.2$ nm ($n = 53$) for ddFLN1-5 and $\Delta L1 = 14 \pm 0.2$ nm and $\Delta L2 = 16.6 \pm 0.2$ nm ($n = 17$) for Ti/ddFLN4. Assuming a length of 0.36 Å per residue, a length change of 14–15 nm for $\Delta L1$ indicates that ~40 residues unfold during the first unfolding step and the remaining 60 residues constitute the structured portion of the intermediate. Also, the forces required for unfolding from the ground state to the

Figure 2 Single-domain force spectroscopy. **(a)** Schematics of the construct Ti/ddFLN2, with rod domain 2 sandwiched between Ig domains I27–30 and domains I31–34 from titin. A force-extension curve of this construct is shown below. The peak marked with an arrow is due to the unfolding of domain 2 showing no intermediate states. **(b)** Schematics of the construct Ti/ddFLN4. The force-extension curve of this construct shows two peaks (marked with arrows) for the unfolding of Ig domain 4 via a stable unfolding intermediate.



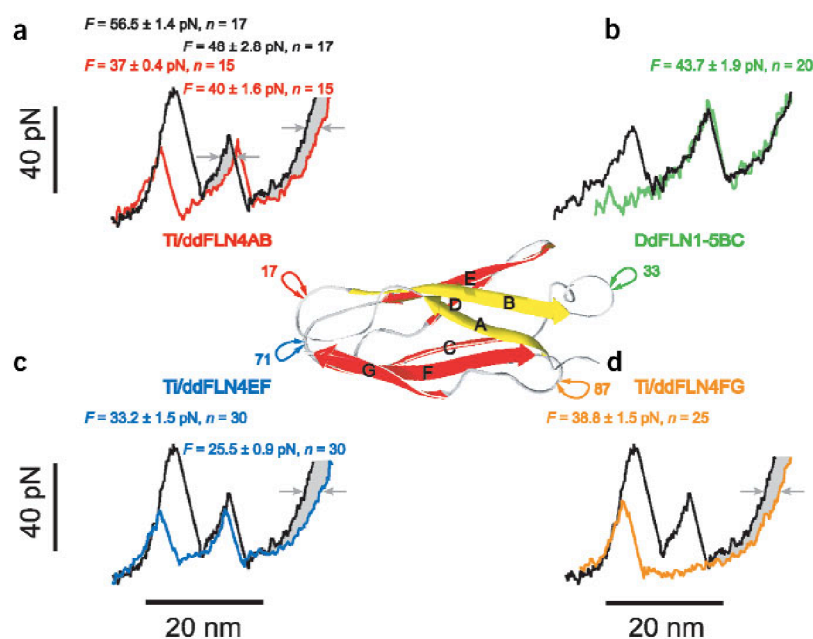


Figure 3 Characterization of the unfolding intermediate structure in single-molecule experiments using loop mutations. The NMR structure of ddFLN domain 4 is shown in the center⁸. Five glycine residues were inserted in various loops of the domain. The numbers above each peak are the average unfolding forces measured for the respective peaks and constructs. **(a)** Superimposed are the average curves of Ti/ddFLN4 (black) and Ti/ddFLN4AB (red). The gray area reflects the additional change in contour length after the first step of unfolding of Ig domain 4 owing to the five glycines integrated at position 17. **(b)** Superimposed are the average curves of ddFLN1-5 (black) and ddFLN1-5BC (green). **(c)** Superimposed are the average curves of Ti/ddFLN4 (black) and Ti/ddFLN4EF (blue). The gray area reflects the additional change in contour length after unfolding of the structured portion of the intermediate owing to the five glycines integrated at position 71. **(d)** Superimposed are the average curves of Ti/ddFLN4 (black) and Ti/ddFLN4FG (orange). The gray area reflects the additional change in contour length after unfolding of Ig domain 4 owing to the five glycines integrated at position 87.

intermediate (peak 1) are consistently higher (62.9 ± 3 pN, $n = 296$, ddFLN1-6) than those for unfolding from the intermediate to a completely unfolded structure (peak 2) (52.5 ± 3 pN, $n = 296$, ddFLN1-6).

Structured portion of the intermediate

To unequivocally identify the amino acids that form the structured portion of the intermediate, a more elaborate approach is necessary. Insertion of residues into the various loops of the domain⁶ should result in length changes of $\Delta L1$ or $\Delta L2$ depending on the position of the inserts. If the inserted amino acids are part of the structured portion of the intermediate, $\Delta L2$ will increase; if not, $\Delta L1$ will increase. We chose four different positions in the loops of domain 4 (Fig. 3) and inserted five glycine residues into each of these positions. Figure 3 shows averaged force-extension traces for the unfolding of domain 4 in the mutated constructs Ti/ddFLN4AB, ddFLN1-5BC, Ti/ddFLN4EF and Ti/ddFLN4FG (see Methods). We chose the positions for inserts considering that the unfolding of middle strands during the first step would be highly unlikely. For any scenario involving strands other than terminal ones, the domain would have to break into two folded portions plus an unfolded middle portion in the first step. We did not observe such additional intermediate peaks. Insertion in the loop connecting strands A and B (AB loop) increases $\Delta L1$ by 1.7 ± 0.4 nm ($n = 17$) and leave $\Delta L2$ unaffected (Fig. 3a). At the same time, the average unfolding force for peak 1 is reduced but the unfolding force of peak 2 is unchanged (Fig. 3a). This indicates that the amino acid insert occurred in the part of the protein that unfolds during the first unfolding event but that the insert is not part of the structured portion of the intermediate. We obtained a similar result for a five-glycine insert into the BC loop of domain 4 (Fig. 3b). The effects are even more pronounced and the first unfolding peak vanishes completely. However, the unfolding force of the second peak is unchanged, as is $\Delta L2$. This insertion apparently affects the stability of the domain so much that it does not fold completely and unfolding starts from the intermediate as the stable ground state. The BC loop is therefore not part of the structured portion of the intermediate either. In contrast,

glycine inserts into the EF loop result in a length increase of $\Delta L2$ by 1.6 ± 0.4 nm ($n = 30$); this suggests that the EF loop is part of the folded intermediate structure (Fig. 3c). This insertion reduces the average unfolding force of both peak 1 and peak 2. The insert in the FG loop destabilizes the intermediate state so substantially that in the averaged trace (Fig. 3d) peak 2 can no longer be detected.

Combining all the information obtained from the loop variants, we suggest the following sequence of events for the mechanical unfolding of domain 4: during the first unfolding event strands A and B (yellow parts of the structure in Fig. 3) detach from the domain and unfold. Strands C-G (red parts in Fig. 3) form a stable intermediate structure, which then unfolds in the second unfolding event. This result agrees well with our above estimate of ~40 amino acids unfolding in the first unfolding event, judged from the length gain of 14–15 nm. According to the NMR structure⁸ strand C starts at Phe43.

DISCUSSION

Intermediates in Ig domains

A force-induced intermediate structure for the Ig domain I27 from the muscle protein titin has been reported^{9,10}. However, this intermediate is very similar to the full native structure and lacks only seven amino acids at the N terminus. In contrast, the unfolding intermediate we find for domain 4 of ddFLN lacks the complete strands A and B and is only 60% of the size of the native folded domain. This result expands the current picture of the interactions stabilizing an Ig domain against mechanical forces. A patch of six hydrogen bonds between the A' and G strands includes the key residues controlling mechanical stability of the Titin I27 Ig domain⁹. Mutations in this localized region had marked effects on the unfolding force whereas mutations outside this region did not affect mechanical stability¹¹. In contrast, all of our mutations in various regions of the domain had a pronounced effect on mechanical stability. Thus, the stability of domain 4 cannot be attributed to a localized patch of hydrogen bonds. In fact, even the core of only 60 residues that forms the structured portion of the inter-

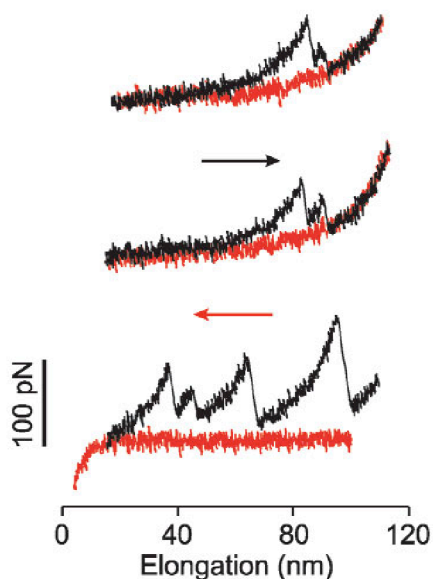


Figure 4 Series of three unfolding (black) and refolding (red) cycles of a single ddFLN1-5 rod. The curves were recorded at an pulling velocity of 200 nm s^{-1} . The lowest black curve reflects the unfolding of domain 4 (intermediate peak) at low forces and two more stable domains at higher forces of a fully folded molecule. Relaxation (middle and upper red curves) and subsequent restretching of the molecule (middle and upper black curves) shows, that only domain 4 folds fast enough at the time scale of the experiment ($\sim 0.5 \text{ s}$).

mediate seems to fold independently into a stable structure, as our results on the ddFLN1-5BC construct show. The different interactions that stabilize this domain in comparison to I27 of titin may also explain the lower unfolding forces of the Ig domains of ddFLN (60–90 pN) as compared with unfolding forces of titin Ig domains (100–300 pN) at similar pulling velocities. Sequence details can strongly influence stability and unfolding pathways even for domains similar structures. Earlier findings that β -structures are mechanically more stable than domains with an all α -fold seem therefore not generally applicable^{12–14}. For fibronectin type 3 domains, molecular dynamics simulations have predicted the existence of an unfolding intermediate similar to the one observed here¹⁵. A clear experimental indication of this intermediate, however, is missing. Oberhauser *et al.*¹⁶ have observed possible intermediate states for the domain FN1 from fibronectin. However, folding of this domain seems to be compromised by the absence of its neighboring domains. Notably, in an equilibrium NMR study, McParland *et al.*¹⁷ report an unfolding intermediate in an Ig domain from microglobulin. This intermediate is different from that described by our results in that it lacks strands A and G, with the other strands forming a native-like β -sheet. Although unfolding pathways in these experiments using denaturants cannot be directly related to our forced-unfolding data, these studies show that different domains with the same fold can adopt various stable substructures during unfolding.

Physiological relevance of the intermediate

What are the physiological implications of the mechanical behavior of domain 4, which is distinct from that of all the other Ig domains in this protein? Notably, domain 4 not only has the lowest unfolding force of all rod domains in ddFLN but also refolds fastest. Repeated unfolding

and refolding experiments with ddFLN1-5 (Fig. 4) illustrate this behavior. The lowest trace shows the unfolding of the folded rod, with domain 4 unfolding first and two other domains following at higher extensions. If the unfolded polypeptide is relaxed and subsequently extended again, only domain 4 refolds within the experimental timescale of 0.5 s (middle and top trace, Fig. 4). Low unfolding forces in combination with fast refolding make domain 4 unique among the rod domains of ddFLN. The presence of the intermediate could serve two purposes: reducing the overall unfolding forces and, at the same time, ensuring fast refolding. An intermediate can reduce unfolding forces if it breaks up the free energy barrier to unfolding of a two-state folder (native \rightarrow unfolded) into two barriers (native \rightarrow intermediate \rightarrow unfolded) and if each of them is lower than the two-state unfolding barrier. If the intermediate that we observed during forced unfolding is also transiently populated during the folding process, it may guide the protein through a productive folding pathway and hence speed up folding. With its low unfolding forces and fast refolding kinetics, domain 4 may act as an extensible element within the ddFLN rod; this would allow the rod to double in length compared with its folded length. Notably, in the much longer rod of human filamin A containing 24 Ig domains, such intermediates have not been observed¹⁸.

We have shown here that mechanical single-molecule unfolding experiments in combination with site-directed mutagenesis can yield structural information about unfolding intermediates in single protein domains. We cannot yet determine whether the β -strands in the structured portion of the intermediate will retain their native fold or adopt a non-native structure. Future experiments combining mechanical and fluorescence experiments may be able to address this question, even on the single-molecule level.

METHODS

Cloning and protein expression. The full-length rod construct ddFLN1-6 containing six Ig rod domains and the shortened construct ddFLN1-5 are identical to those described elsewhere². The titin construct I27-134 was as described⁷. To insert single ddFLN domains into the titin construct, two restriction sites, *NcoI* and *BstEII*, were introduced between I30 and I31 using the QuikChange mutagenesis kit (Stratagene). The vector was digested and the ddFLN domain of choice was introduced and religated. Protein purification was done using an N-terminal His₆-tag. Glycine inserts were introduced using the QuikChange protocol. The four constructs Ti/ddFLN4AB, ddFLN1-5BC, Ti/ddFLN4EF and Ti/ddFLNFG were expressed with five glycines inserted at positions 17, 33, 71 and 87. All mutations were introduced into the Ti/ddFLN4 construct except for ddFLN1-5BC, which was derived from ddFLN1-5. The presence of the inserts was verified by DNA sequencing.

Force spectroscopy of single proteins. All single-molecule force measurements were made on a custom-built AFM¹⁹. Calibration was done in solution by using the equipartition theorem. Si₃N₄ tips with spring constants between 8 and 15 pN nm⁻¹ were used. A drop of protein solution was placed on an amino-reactive aldehyde surface or, alternatively, on a freshly evaporated gold surface and incubated for 5 min at room temperature. Subsequently the sample was thoroughly rinsed with PBS buffer to remove excess protein. The force curves of all constructs except ddFLN1-6 ($v = 25 \text{ nm s}^{-1}$, $1.5 \mu\text{m s}^{-1}$) were collected at a pulling speed ranging from 250 to 350 nm s⁻¹. Experiments were conducted at room temperature.

Data analysis. For quantitative analysis the force-extension curves were fit to an analytical approximation of the worm-like chain model²⁰, $F(x) = (kT/p) [0.25(1 - x/l)^{-2} - 0.25 + x/l]$. p denotes the persistence length, l the contour length, k is Boltzmann's constant, T is the temperature in Kelvin and x is the distance between the attachment points of the protein. For the high-force regime (forces >30 pN), a value of $p = 0.5 \text{ nm}$ provided the best fit; this value was $p = 0.9 \text{ nm}$ for the low-force regime (forces <30 pN). To improve the signal-to-noise ratio for the curves presented in Figure 3 an average of ten

curves for each construct was computed. In addition to the averaged traces in Figure 3 we also fitted the individual data traces for each construct and computed average values. All data were analyzed using Igor pro (Wavemetrics).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank H. Gaub and E. Paci for helpful discussions and R. Müller for technical assistance. This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to A.A.N. and the Sonderforschungsbereich 413 to M.R. and M.S.

COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare that they have no competing financial interests.

Received 4 July; accepted 8 October 2003

Published online at <http://www.nature.com/natstructmolbiol/>

1. Stossel, T.P. *et al.* Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 138–145 (2001).
2. Fucini, P. *et al.* Molecular architecture of the rod domain of the *Dictyostelium* gelation factor (ABP120). *J. Mol. Biol.* **291**, 1017–1023 (1999).
3. McCoy, A.J., Fucini, P., Noegel, A.A. & Stewart, M. Structural basis for dimerization of the *Dictyostelium* gelation factor (ABP120) rod. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 836–841 (1999).
4. Best, R.B. & Clarke, J. What can atomic force microscopy tell us about protein folding? *Chem. Commun.* 183–192 (2002).
5. Carrion-Vazquez, M. *et al.* Mechanical design of proteins studied by single-molecule force spectroscopy and protein engineering. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **74**, 63–91 (2000).
6. Carrion-Vazquez, M., Marszalek, P.E., Oberhauser, A.F. & Fernandez, J.M. Atomic force microscopy captures length phenotypes in single proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11288–11292 (1999).
7. Rief, M., M. Gautel, F. Oesterhelt, Fernandez, J.M. & Gaub, H.E. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science* **276**, 1109–1112 (1997).
8. Fucini, P., Renner, C., Herberhold, C., Noegel, A.A. & Holak, T.A. The repeating segments of the F-actin cross-linking gelation factor (ABP-120) have an immunoglobulin-like fold. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 223–230 (1997).
9. Marszalek, P.E. *et al.* Mechanical unfolding intermediates in titin modules. *Nature* **402**, 100–103 (1999).
10. Williams, P.M. *et al.* Hidden complexity in the mechanical properties of titin. *Nature* **422**, 446–449 (2003).
11. Li, H., Carrion-Vazquez, M., Oberhauser, A.F., Marszalek, P.E. & Fernandez, J.M. Point mutations alter the mechanical stability of immunoglobulin modules. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1117–1120 (2000).
12. Rief, M., Pascual, J., Saraste, M. & Gaub, H.E. Single molecule force spectroscopy of spectrin repeats: low unfolding forces in helix bundles. *J. Mol. Biol.* **286**, 553–561 (1999).
13. Yang, G. *et al.* Solid-state synthesis and mechanical unfolding of polymers of T4 lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 139–144 (2000).
14. Altmann, S.M. *et al.* Pathways and intermediates in forced unfolding of spectrin repeats. *Structure* **10**, 1085–1096 (2002).
15. Paci, E., Clarke, J., Steward, A., Vendruscolo, M. & Karplus, M. Self-consistent determination of the transition state for protein folding: application to a fibronectin type III domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 394–399 (2003).
16. Oberhauser, A.F., Badilla-Fernandez, C., Carrion-Vazquez, M. & Fernandez, J.M. The mechanical hierarchies of fibronectin observed with single-molecule AFM. *J. Mol. Biol.* **319**, 433–447 (2002).
17. McParland, V.J. *et al.* Partially unfolded states of $\beta(2)$ -microglobulin and amyloid formation *in vitro*. *Biochemistry* **39**, 8735–8746 (2000).
18. Furuie, S., Ito, T. & Yamazaki, M. Mechanical unfolding of single filamin A (ABP-280) molecules detected by atomic force microscopy. *FEBS Lett.* **498**, 72–75 (2001).
19. Rief, M., Oesterhelt, F., Heymann, B. & Gaub, H.E. Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by AFM. *Science* **275**, 1295–1297 (1997).
20. Bustamante, C., Marko, J.F., Siggia, E.D. & Smith, S. Entropic elasticity of λ -phage DNA. *Science* **265**, 1599–1600 (1994).

The folding pathway of a fast-folding immunoglobulin domain revealed by single-molecule mechanical experiments

Ingo Schwaiger¹, Michael Schleicher², Angelika A. Noegel³ & Matthias Rief¹⁺

¹Physik-Department E22, TU-München, Garching, Germany, ²Adolf-Butenandt-Institut/Zellbiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, München, Germany, and ³Institut für Biochemie I, Medizinische Fakultät der Universität zu Köln, Köln, Germany

The F-actin crosslinker filamin from *Dictyostelium discoideum* (ddFLN) has a rod domain consisting of six structurally similar immunoglobulin domains. When subjected to a stretching force, domain 4 unfolds at a lower force than all the other domains in the chain. Moreover, this domain shows a stable intermediate along its mechanical unfolding pathway. We have developed a mechanical single-molecule analogue to a double-jump stopped-flow experiment to investigate the folding kinetics and pathway of this domain. We show that an obligatory and productive intermediate also occurs on the folding pathway of the domain. Identical mechanical properties suggest that the unfolding and refolding intermediates are closely related. The folding process can be divided into two consecutive steps: in the first step 60 C-terminal amino acids form an intermediate at the rate of 55 s^{-1} ; and in the second step the remaining 40 amino acids are packed on this core at the rate of 179 s^{-1} . This division increases the overall folding rate of this domain by a factor of ten compared with all other homologous domains of ddFLN that lack the folding intermediate.

Keywords: atomic force microscope; filamin; folding kinetics

EMBO reports (2005) 6, 46–51. doi:10.1038/sj.embor.7400317

INTRODUCTION

An actin-crosslinking protein is constantly subject to mechanical forces as the cytoskeleton rearranges itself during cell division or movement (Pollard & Borisy, 2003). In the F-actin crosslinker

filamin from *Dictyostelium discoideum* (ddFLN), among the six immunoglobulin rod domains, domain 4 shows significantly lower unfolding forces than all the other domains. In addition, this domain also unfolds via an intermediate where the 60 carboxy-terminal residues form a folded core (Schwaiger *et al*, 2004). In an earlier study, low unfolding forces suggested a role for domain 4 (ddFLN4) as an extensible link that is able to buffer high-tension forces before they can do damage to the structural integrity of the cytoskeletal meshwork (Schwaiger *et al*, 2004). A key question that has remained unresolved is whether the occurrence of a stable unfolding intermediate has any influence on the folding properties of this domain. So far, many mechanical single-molecule studies have given detailed insight into unfolding pathways along the N–C-terminal reaction coordinate in the high-dimensional protein energy landscape biased by an external force (Brockwell *et al*, 2003; Carrion-Vazquez *et al*, 2003; Williams *et al*, 2003; Zhuang & Rief, 2003; Schlierf *et al*, 2004). What can we learn about folding pathways of proteins from single-molecule mechanical experiments?

To detect intermediates in classical double-jump stopped-flow studies, experimenters switch solvent conditions rapidly from denaturing to renaturing for a varying time span, and then back to denaturing to follow the accumulation of intermediate states (Eaton *et al*, 2000). Inspired by this technique, we have developed a single-molecule mechanical double-jump experiment, where the applied force allows switching rapidly between denaturing and renaturing conditions. Here, we use this technique to follow, in detail, the folding pathway and kinetics of the fast-folding immunoglobulin domain ddFLN4.

RESULTS AND DISCUSSION

The experimental geometry of mechanical unfolding experiments is shown in Fig 1A. All mechanical experiments described here were performed with a rod construct from ddFLN comprising immunoglobulin rod domains 1–5 (ddFLN1–5, ddFLN4 is coloured blue in Fig 1A). A mechanical unfolding sample trace in which four of the five immunoglobulin domains unfold is given

¹Physik-Department E22, TU-München, James-Franck-Strasse, 85747 Garching, Germany

²Adolf-Butenandt-Inst./Zellbiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Schillerstrasse 42, 80336 München, Germany

³Institut für Biochemie I, Med. Fakultät der Universität zu Köln, Joseph-Stelzmann-Strasse 52, 50931 Köln, Germany

*Corresponding author. Tel: +49 28 91 2472; Fax: +49 28 91 2523;

E-mail: mrief@ph.tum.de

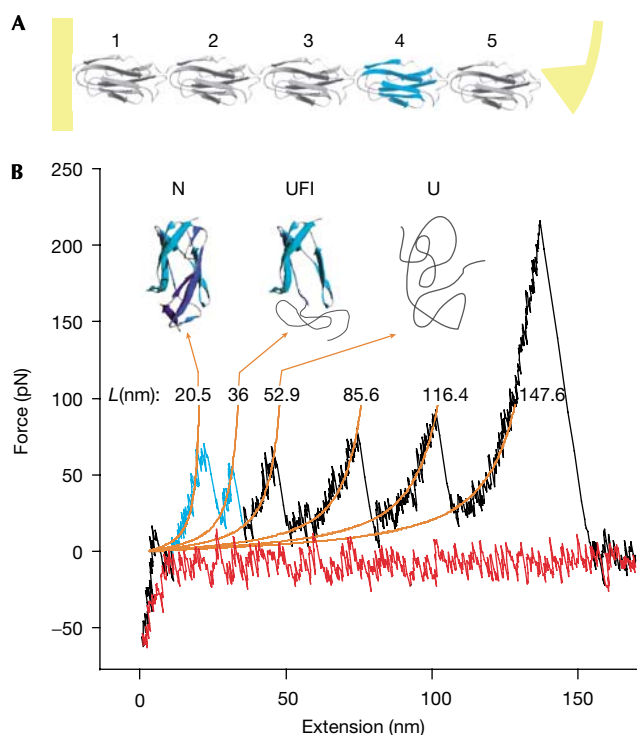


Fig 1 | Single-molecule mechanics of ddFLN1-5. (A) Structure of the ddFLN1-5 construct comprising immunoglobulin domains 1-5 including domain 4 (blue). (B) Force-extension curve of ddFLN1-5 unfolding. A total of four immunoglobulin domains are unfolded. Domain 4 unfolding (highlighted in blue) proceeds by means of a stable unfolding intermediate, whereas other immunoglobulin domains are two-state unfolders. (Nuclear magnetic resonance structures are adapted from Fucini *et al* (1997) and Schwaiger *et al* (2004).) Orange lines are worm-like chain fits using $P = 0.5$ nm and contour lengths as indicated above the peaks (Bustamante *et al*, 1994).

in Fig 1B. Most domains unfold in a clear two-state manner and only domain 4 shows a characteristic double peak (marked in blue) due to the presence of an intermediate along its unfolding pathway (Schwaiger *et al*, 2004). The first unfolding peak reflects detachment and unfolding of strands A and B, whereas strands C-G remain structured (Schwaiger *et al*, 2004). The second peak marks complete unfolding (Fig 1B).

Refolding of ddFLN4 in single-molecule mechanical experiments occurs at a faster rate compared with all other immunoglobulin domains in ddFLN1-5 if the polypeptide chain is relaxed to almost zero tension (Schwaiger *et al*, 2004). Stretch and relax experiments can provide direct insight into the folding pathway of ddFLN4. In the experimental series shown in Fig 2A, a single ddFLN4 domain is stretched and relaxed repeatedly at high pulling velocities ($2 \mu\text{m/s}$) so that the time allowed for the polypeptide strand to refold is short (< 50 ms).

Three different outcomes of ddFLN4 refolding experiments can be observed: complete refolding (Fig 2A, trace II), refolding only to an intermediate structure (Fig 2A, trace IV) or no refolding within the short time span (Fig 2A, trace VI). Obviously, an intermediate state is populated not only during mechanical unfolding experi-

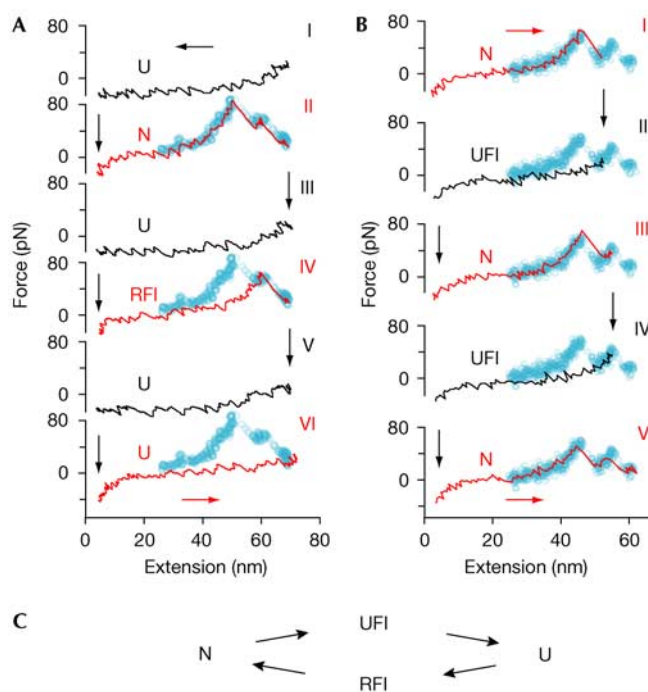


Fig 2 | Domain 4 of ddFLN has a stable refolding intermediate. (A) Mechanical refolding experiments with ddFLN4. Three typical outcomes from a series of 50 stretch and relax cycles with a single ddFLN4 domain. Black traces represent relaxation curves and red traces stretching curves. Starting from the unfolded state U (traces I, III and V), ddFLN4 can either fold back to the native state N (II), to a folding intermediate RFI (IV) or not fold at all (VI). The blue pattern superimposed in the background is a complete unfolding pattern of ddFLN4. (B) Refolding experiments from the unfolding intermediate. (I) Unfolding trace, starting from the native state N and ending in the unfolding intermediate state UFI. (II) Domain 4 is relaxed and allowed to refold. (III) Subsequent stretching shows that ddFLN4 has folded back to the native state N from UFI. This experiment is repeated in traces IV and V. (C) Kinetic scheme of the mechanical unfolding and refolding pathways of ddFLN4.

ments but also during refolding. *A priori*, there is no reason to assume that this refolding intermediate is identical to the mechanical unfolding intermediate we observe in Fig 1. We will therefore refer to the intermediate state populated during mechanical unfolding from the native state as UFI and to the intermediate populated during refolding experiments as RFI (Fig 2C).

We cannot yet decide whether RFI is on or off the folding pathway. However, we can directly show that, from UFI as a starting conformation, the domain refolds quickly to the native state N. Such a series is shown in Fig 2B. In the first trace (Fig 2B, trace I), we unfold a completely folded ddFLN4 domain to UFI. Instead of further rupturing the domain, we now relax the polypeptide chain to a near zero force (Fig 2B, trace II) and immediately stretch it again (Fig 2B, trace III). In such experiments, we observe that the domain always folds into its native conformation at a timescale of < 50 ms.

Investigation of protein refolding kinetics of multidomain constructs in mechanical experiments has produced considerably (up to 30 times) lower refolding rates than solution studies for domain I27 of titin. Carrion-Vazquez *et al* (1999) have explained this discrepancy by entropic costs of tethering. Small mechanical forces can drastically slow refolding. Also, in multidomain constructs, gradual shortening of the polypeptide chain due to the sequential refolding of the domains leads to increasing force constraints for those domains that fold later in the process. As the force–distance relation of a polypeptide chain in the relevant force range below 5 pN is not known and may be sequence specific, such effects cannot be accurately accounted for.

Quantitative investigation of the refolding of ddFLN4 therefore relies on three important prerequisites: (i) refolding experiments have to be performed with only a single domain, (ii) switching between unfolding and refolding conditions has to occur fast, and (iii) residual strain within the polypeptide chain during

refolding must be minimized. We thus developed a mechanical pulse protocol that allows rapid switching between renaturing and denaturing conditions by subjecting the protein to a mechanical force.

In the initial cycle, the tip indents into the surface to contact a single molecule. After a waiting time of 1 s, it is then retracted to about 100 nm above the surface. At this distance, three domains of the protein will be unfolded. In many cases, domain 4 will be among those three domains. As two of the domains fold slowly compared with ddFLN4, they serve as sacrificial domains that will stay unfolded throughout the experiment and provide a long-enough polypeptide polymer spacer such that the entropic costs of tethering for refolding of ddFLN4 will be minimal. Now, periodic folding–refolding cycles can be started. The time course of this pulse protocol is shown in Fig 3A (upper panel). From the fully extended position (position a), the polypeptide chain is relaxed to a distance of about 70 nm above the surface (position b) at a speed

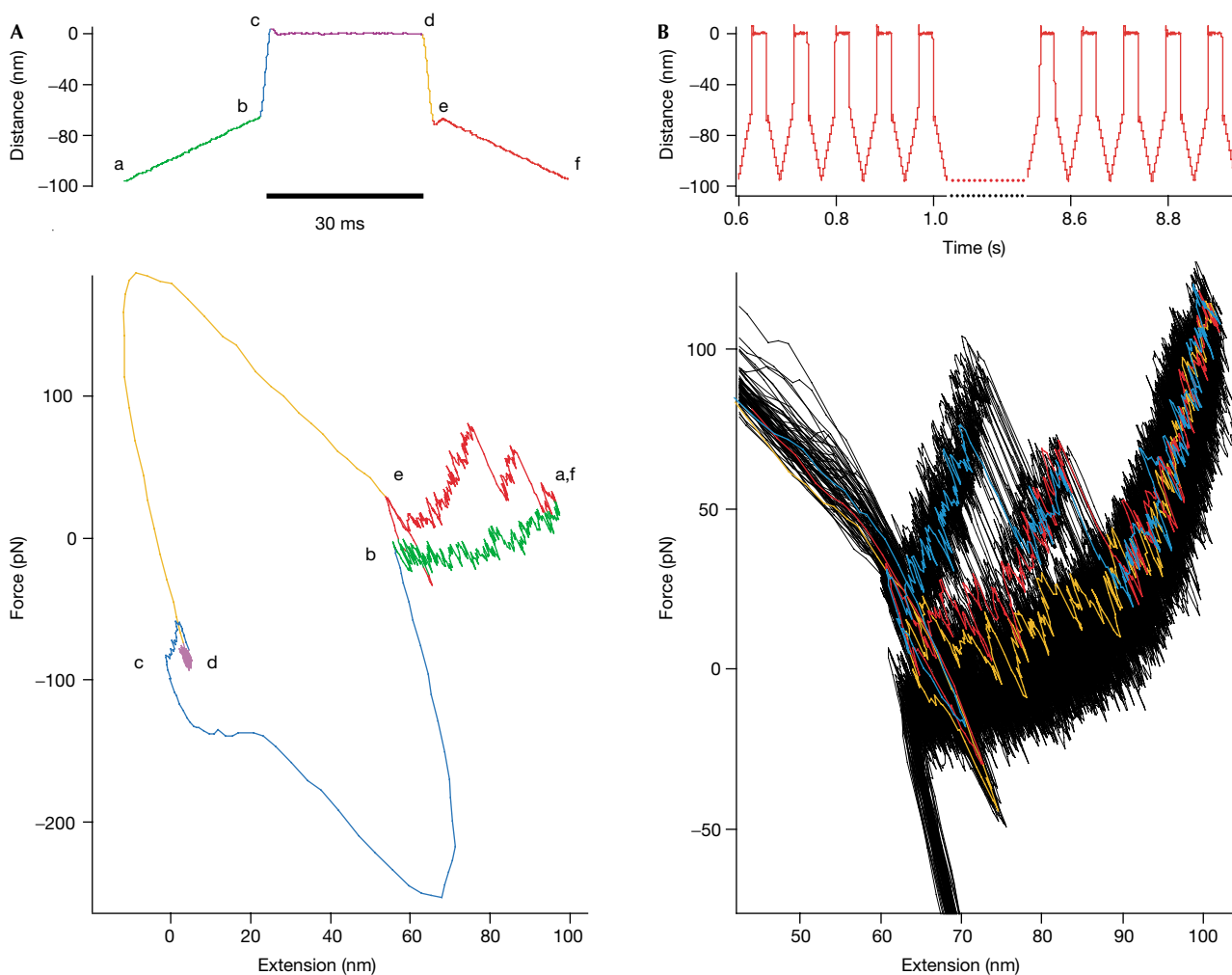


Fig 3 | Double-jump mechanical single-molecule experiment. (A) Time course of the mechanical extension (upper left) and corresponding force–extension curve of a single double jump. (B) Time course of the mechanical extension for a typical experiment running through 50 unfolding–refolding cycles (upper right). Lower right: superposition of the corresponding force–extension traces. Sample traces for the three possible outcomes of the refolding experiments are coloured in blue (complete refolding), red (refolding to the intermediate RFI) and orange (no refolding).

of 2 $\mu\text{m/s}$. At this position, the polypeptide chain is still sufficiently strained so that refolding does not occur. From here, the tip is then rapidly approached to the surface (position c) within 2 ms to start refolding. To minimize tensile strain on the polypeptide chain, the tip indents slightly into the surface with a force of < 150 pN. After a variable waiting time of 5–40 ms, during which the protein is allowed to attempt refolding under minimal strain (positions c and d), the position is rapidly (2 ms) switched back to position e, again 70 nm above the surface. At this position, refolding will be mechanically quenched and the amount of structure that has refolded can now be probed in a force versus distance curve at 2 $\mu\text{m/s}$ up to the initial position (f).

The rapid switching phases are essential: if approach and retraction phases took an essential fraction of the total refolding time allowed, the protein would refold under ill-defined force conditions and quantitative analysis would be impossible. During the switching phases (b,c and d,e), the cantilever probe is subject to large hydrodynamic forces visible in the sample traces (Fig 3A, lower panel). These phases will therefore impose a ‘blind window’ on our experiment.

The protocol described above is a close single-molecule analogue of bulk double-jump stopped-flow techniques. The superposition of 50 cycles from a single ddFLN4 domain shown in Fig 3B (lower panel) demonstrates that we can obtain statistically significant amounts of data and force distributions from one individual protein domain. So far, in single-molecule force measurements, unbinding or unfolding force data from different individual domains are compiled into histograms. Such measurements assume that all molecules behave the same and any different local environments are generally averaged over.

Varying the time allowed for ddFLN4 to refold from 5 to 40 ms and counting the events that lead to either complete refolding (green circles), refolding to the intermediate (blue circles) or no refolding (red circles) now allows us to reconstruct the complete refolding pathway of ddFLN4 (Fig 4A, graph). The data closely follow a kinetic scheme in which the refolding intermediate RFI is obligatory (Fig 4A, top) and is populated at a rate of $55 \pm 4 \text{ s}^{-1}$ from the unfolded state. The transition from the intermediate to the completely folded conformations occurs at $179 \pm 20 \text{ s}^{-1}$ (see Methods). Models in which the intermediate lies off-pathway fail to describe our data. The total folding rate we find for ddFLN4 of 42 s^{-1} is among the fastest observed for an immunoglobulin domain so far. This is even more surprising because in our experimental geometry the molecule is tethered between tip and substrate, and refolding should rather be slower than in solution studies.

An obligatory intermediate occurs both on the mechanical unfolding pathway (UFI) and on the refolding pathway (RFI; Fig 2C). However, we have experimental evidence that RFI and UFI are closely related if not identical. Although single-molecule mechanical experiments do not provide direct structural information, they provide many parameters that sensitively depend on protein structure (Li *et al*, 2000). The core of folded amino acids constituting those amino acids that form the structured portion of the unfolding intermediate UFI has been mapped previously (Schwaiger *et al*, 2004). By analysing the length gain upon unfolding, we find that the number of amino-acid residues constituting RFI is identical to the number we obtain for UFI (60 residues). Other parameters that sensitively depend on protein

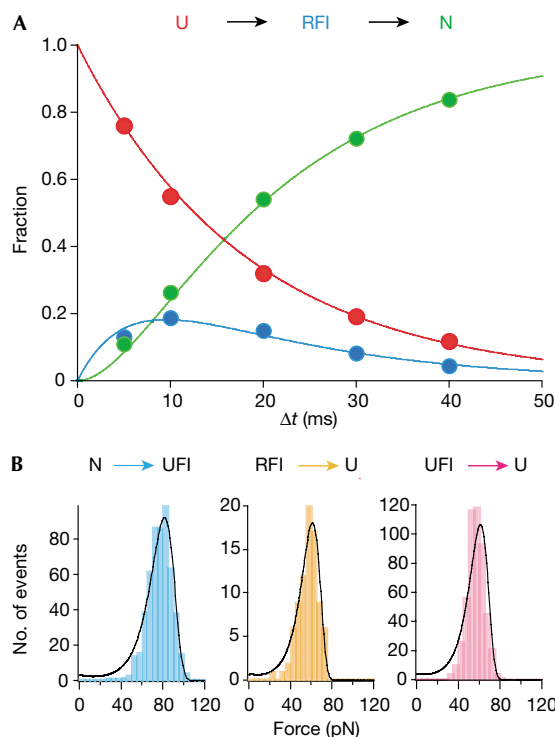


Fig 4 | Single-molecule folding and unfolding kinetics of ddFLN4. (A) Fraction of observed events for mechanical refolding as a function of the allowed refolding time (red: no refolding; green: complete refolding; blue: refolding to RFI). For each time point at 5, 10, 20, 30 and 40 ms, 1,377, 404, 417, 536 and 270 events were analysed, respectively. The lines are fits according to the kinetic folding scheme shown at the top with $k_1 = 55 \pm 4 \text{ s}^{-1}$ and $k_2 = 179 \pm 20 \text{ s}^{-1}$ (see Methods). (B) Histograms of unfolding forces for unfolding from native state N to UFI (left), from RFI to unfolded state U (middle) and from UFI to U (right). The solid lines in the left and middle histograms are fits according to a two-state model (see text and Methods).

structure are the average unfolding force and the width of the measured force distribution. We find that the unfolding force distribution is identical for UFI (Fig 4B, right histogram) and RFI (Fig 4B, middle histogram). The shape of the unfolding force distribution is determined by the unfolding rate at zero force k_{off} and the position of the transition state along the direction of the force applied Δx (Evans & Ritchie, 1999). From the fit to the measured unfolding force distribution of RFI (solid line in Fig 4B, middle histogram), we obtain values of $k_{\text{off}} = 0.33 \text{ s}^{-1}$ and $\Delta x = 5.25 \pm 0.4 \text{ \AA}$. The same parameters exactly describe the unfolding force distribution of UFI (solid line in Fig 4B, right histogram). As unfolding force distributions generally change strongly on changes in structure or on mutations (Li *et al*, 2000), we conclude that, at the resolution of our experiments, RFI and UFI are indistinguishable. Our finding that refolding from UFI to the native state is fast (Fig 2B) supports this conclusion. The left histogram in Fig 4B shows the force distribution for the unfolding transition from the native state to the intermediate state of ddFLN4. In this transition, strands A and B detach from the barrel

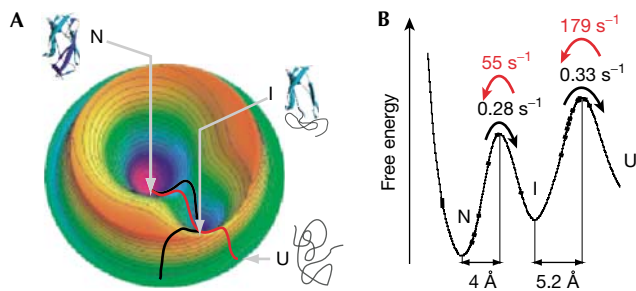


Fig 5 | Mechanical unfolding and refolding pathways in the energy landscape. (A) Schematic view of the ddFLN4 folding and unfolding energy landscape. The native state N and the intermediate state I correspond to minima in the energy landscape. The mechanical unfolding pathway (black line) and the folding pathway (red) are probably different. However, they both proceed through the same intermediate state. (B) Projection of the mechanical unfolding pathway on the mechanical reaction coordinate (N-C-terminal distance).

(Schwaiger *et al*, 2004; Fig 1B). From the fit, we obtain values of $k_{\text{off}} = 0.28 \text{ s}^{-1}$ and $\Delta x = 4 \pm 0.35 \text{ \AA}$.

Our results of the folding and unfolding pathway of ddFLN4 are summarized in Fig 5. The same intermediate state is populated during refolding and unfolding (Fig 5A). However, the pathways over the transition barriers and the associated transition states are probably different during mechanical unfolding as compared with refolding at zero force. Fig 5B shows a cross-section through the energy landscape along the pathway of mechanical unfolding. The unfolding rates over the barrier at zero force and the position of the transition state along the axis of pulling were obtained from the histograms in Fig 4B.

The mechanical refolding experiments provide a direct comparison of the folding kinetics between ddFLN4 and the other immunoglobulin domains of the rod. In our double-jump experiments, together with ddFLN4, we always stretch two sacrificial immunoglobulin domains that serve as polymer spacers. We, therefore, have a direct comparison between the ddFLN4 folding rate and those of the sacrificial domains. Refolding of one of the sacrificial domains would lead to only one unfolding peak in the subsequent unfolding pattern, lacking the intermediate state UFI. This happens in less than 20% of the events in which we observe complete refolding of a domain. If we attribute all these events to refolding of one of the two sacrificial domains, we can conclude that refolding of ddFLN4 is at least ten times faster than refolding of all other domains in ddFLN1–5. Folding of ddFLN4 is therefore a clear example that the presence of a stable folding intermediate can accelerate folding drastically as compared with homologous domains lacking such a stable intermediate.

Interestingly, Plaxco *et al* (1997) have found that the fibronectin type III domain FN10 from fibronectin folds much faster than the structurally homologous domain FN9. Later, Cota & Clarke (2000) reported the presence of a folding intermediate in FN10. Although structural information for the folding intermediate of FN10 is not available, we suggest that, similar to ddFLN4, also in FN10 the presence of the folding intermediate is the main determinant of fast folding for this domain.

Fernandez & Li (2004) have recently reported a continuum of intermediates during mechanical refolding of ubiquitin. In contrast, we observe a discrete, structurally well-defined intermediate consistent with the view that protein-folding landscapes are dominated by discrete, native-like, partially folded intermediates (Baldwin & Rose, 1999).

Is there a potential physiological implication for the fast-folding kinetics and the obligatory folding intermediate of ddFLN4? The combination of low unfolding forces of ddFLN4 and the fast-refolding kinetics we observe in this study suggests a role for ddFLN4 as a reversible, extensible mechanical link in the ddFLN rod (Schwaiger *et al*, 2004). Another intriguing possibility is a potential role as a molecular strain sensor that can sense highly strained conformations of the cytoskeleton. Partial unfolding of ddFLN4 on external strain may expose a cryptic binding site that allows a specific binding partner (Ingham *et al*, 1997; Sechler *et al*, 2001; Oberhauser *et al*, 2002). As soon as the tension drops, fast refolding would ensure closing of the binding site. Identification of specific binding partners to the ddFLN4 intermediate will be an important task for the future.

METHODS

Cloning and protein expression. The ddFLN1–5 construct, containing five immunoglobulin rod domains, was purified as described earlier (Schwaiger *et al*, 2004).

Force spectroscopy of single proteins. All single-molecule force measurements were performed with a custom-built atomic force microscope apparatus under conditions identical to those described by Schwaiger *et al* (2004; also see supplementary information online).

Single-domain mechanical double-jump experiments. For a detailed description, see main text and Fig 3.

Modelling of unfolding force distributions. In Fig 4B, the corrected unfolding force values for the transitions N→UFI, U→RFI and UFI→U are compiled into histograms (see supplementary information online). To determine unfolding rates k_{off} and positions of transition state Δx for the transitions N→UFI and U→RFI (left and middle histograms), the respective unfolding force distributions were fitted with a two-state model including the worm-like chain elasticity of the polypeptide spacers as introduced by Evans & Ritchie (1999) using a fixed contour length.

Kinetic schemes to model refolding. To model refolding kinetics, we assumed an irreversible consecutive three-state transition $U \xrightarrow{k_1} \text{RFI} \xrightarrow{k_2} \text{F}$. Solving the rate equations leads to $[U](t) = \exp(-k_1 t)$, $[F](t) = (k_2/(k_1 - k_2)) \exp(-k_1 t) - ((k_2/(k_1 - k_2)) - 1) \exp(-k_2 t)$, and $[\text{RFI}](t) = 1 - [U](t) - [F](t)$, where $[U]$, $[F]$ and $[\text{RFI}]$ are the probabilities of observing the unfolded, the completely folded or the intermediate conformation, respectively.

Supplementary information is available at *EMBO reports* online (<http://www.emboreports.org>).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by an SFB 413 grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

REFERENCES

Baldwin RL, Rose GD (1999) Is protein folding hierarchic? II. Folding intermediates and transition states. *Trends Biochem Sci* **24**: 77–83

- Brockwell DJ, Paci E, Zinober RC, Beddard GS, Olmsted PD, Smith DA, Perham RN, Radford SE (2003) Pulling geometry defines the mechanical resistance of a β -sheet protein. *Nat Struct Biol* **10**: 731–737
- Bustamante C, Marko JF, Siggia ED, Smith S (1994) Entropic elasticity of λ -phage DNA. *Science* **265**: 1599–1600
- Carrion-Vazquez M, Oberhauser AF, Fowler SB, Marszalek PE, Broedel SE, Clarke J, Fernandez JM (1999) Mechanical and chemical unfolding of a single protein: a comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 3694–3699
- Carrion-Vazquez M, Li H, Lu H, Marszalek PE, Oberhauser AF, Fernandez JM (2003) The mechanical stability of ubiquitin is linkage dependent. *Nat Struct Biol* **10**: 738–743
- Cota E, Clarke J (2000) Folding of β -sandwich proteins: three-state transition of a fibronectin type III module. *Protein Sci* **9**: 112–120
- Eaton WA, Munoz V, Hagen SJ, Jas GS, Lapidus LJ, Henry ER, Hofrichter J (2000) Fast kinetics and mechanisms in protein folding. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**: 327–359
- Evans E, Ritchie K (1999) Strength of a weak bond connecting flexible polymer chains. *Biophys J* **76**: 2439–2447
- Fernandez JM, Li H (2004) Force-clamp spectroscopy monitors the folding trajectory of a single protein. *Science* **303**: 1674–1678
- Fucini P, Renner C, Herberhold C, Noegel AA, Holak TA (1997) The repeating segments of the F-actin cross-linking gelation factor (ABP-120) have an immunoglobulin-like fold. *Nat Struct Biol* **4**: 223–230
- Ingham KC, Brew SA, Huff S, Litvinovich SV (1997) Cryptic self-association sites in type III modules of fibronectin. *J Biol Chem* **272**: 1718–1724
- Li H, Carrion-Vazquez M, Oberhauser AF, Marszalek PE, Fernandez JM (2000) Point mutations alter the mechanical stability of immunoglobulin modules. *Nat Struct Biol* **7**: 1117–1120
- Oberhauser AF, Badilla-Fernandez C, Carrion-Vazquez M, Fernandez JM (2002) The mechanical hierarchies of fibronectin observed with single-molecule AFM. *J Mol Biol* **319**: 433–447
- Plaxco KW, Spitzfaden C, Campbell ID, Dobson CM (1997) A comparison of the folding kinetics and thermodynamics of two homologous fibronectin type III modules. *J Mol Biol* **270**: 763–770
- Pollard TD, Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**: 453–465
- Schlierf M, Li H, Fernandez JM (2004) The unfolding kinetics of ubiquitin captured with single-molecule force-clamp techniques. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 7299–7304
- Schwaiger I, Kardinal A, Schleicher M, Noegel AA, Rief M (2004) A mechanical unfolding intermediate in an actin-crosslinking protein. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 81–85
- Sechler JL, Rao H, Cumiskey AM, Vega-Colon I, Smith MS, Murata T, Schwarzbauer JE (2001) A novel fibronectin binding site required for fibronectin fibril growth during matrix assembly. *J Cell Biol* **154**: 1081–1088
- Williams PM, Fowler SB, Best RB, Toca-Herrera JL, Scott KA, Steward A, Clarke J (2003) Hidden complexity in the mechanical properties of titin. *Nature* **422**: 446–449
- Zhuang X, Rief M (2003) Single-molecule folding. *Curr Opin Struct Biol* **13**: 88–97

Literaturverzeichnis

1. Anfinsen, C.B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-30 (1973).
2. Yon, J.M. Protein folding in the post-genomic era. *J Cell Mol Med* **6**, 307-27 (2002).
3. Radford, S.E. Protein folding: progress made and promises ahead. *Trends Biochem Sci* **25**, 611-618 (2000).
4. Clausen-Schaumann, H., Seitz, M., Krautbauer, R. & Gaub, H.E. Force spectroscopy with single bio-molecules. *Curr Opin Chem Biol* **4**, 524-30. (2000).
5. Bustamante, C., Marko, J.F., Siggia, E.D. & Smith, S. Entropic elasticity of lambda-phage DNA. *Science* **265**, 1599-600 (1994).
6. Bustamante, C., Chemla, Y.R., R., F.N. & D., I. Mechanical processes in biochemistry. *Annu Rev Biochem* **73**, 705-48 (2004).
7. Lee, G.U., Chrisey, L.A. & Colton, R.J. Direct measurement of the Forces between complementary strands of DNA. *Science* **266**, 771-3 (1994).
8. Senden, T.J., di Meglio, J.M. & Auroy, P. *Eur. Phys. J. B* **3**, 211 (1998).
9. Rief, M., Oesterhelt, F., Heymann, B. & Gaub, H.E. Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by AFM. *Science* **275**, 1295-1297 (1997).
10. Ortiz, C. & Hadziioannou, G. *Macromolecules* **32**, 780 (1999).
11. Rief, M., M. Gautel, F. Oesterhelt, Fernandez, J.M. & Gaub, H.E. Reversible Unfolding of Individual Titin Immunoglobulin Domains by AFM. *Science* **276**, 1109-1112 (1997).
12. Rief, M., Pascual, J., Saraste, M. & Gaub, H.E. Single Molecule Force Spectroscopy of Spectrin Repeats: Low Unfolding Forces in Helix Bundles. *J. Mol. Biol.* **286**, 553-61 (1999).
13. Schlierf, M., Li, H. & Fernandez, J.M. The unfolding kinetics of ubiquitin captured with single-molecule force-clamp techniques. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7299-304 (2004).
14. Tinoco, I. & Bustamante, C. The effect of force on thermodynamics and kinetics of single molecule reactions. *Biophys Chem.* **101**, 513-33 (2002).
15. Bell, G.I. Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science* **200**, 618-627 (1978).
16. Oberhauser, A.F., Marszalek, P.E., Erickson, H.P. & Fernandez, J.M. The molecular elasticity of the extracellular matrix protein tenascin. *Nature* **393**, 181-5 (1998).
17. Oesterhelt, F., Rief, M. & Gaub, H.E. *New J. Phys.* **1**, 6.1-6.11 (1999).
18. Errington, J. Dynamic proteins and a cytoskeleton in bacteria. *Nature Cell Biology* **5**, 175-178 (2003).
19. Rief, M. et al. Myosin-V stepping kinetics: a molecular model for processivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9482-6. (2000).
20. Liang, W., Warrick, H.M. & Spudich, J.A. A structural model for phosphorylation control of Dictyostelium myosin II thick filament assembly. *J Cell Biol* **147**, 1039-48 (1999).
21. Burkhard, P., Stetefeld, J. & Strelkov, S.V. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.* **11**, 82-8 (2001).
22. Hearle, J.W. A critical review of the structural mechanics of wool and hair fibres. *Int J Biol Macromol.* **27**, 123-38 (2000).
23. Stossel, T.P. et al. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 138-45. (2001).
24. McCoy, A.J., Fucini, P., Noegel, A.A. & Stewart, M. Structural basis for dimerization of the Dictyostelium gelation factor (ABP120) rod. *Nat Struct Biol* **6**, 836-41. (1999).

25. Fucini, P. et al. Molecular architecture of the rod domain of the Dictyostelium gelation factor (ABP120). *J Mol Biol* **291**, 1017-23. (1999).
26. Swenson, C.A. & Stellwagen, N.C. Flexibility of smooth and skeletal tropomyosins. *Biopolymers* **28**, 955-63 (1989).
27. Carrion-Vazquez, M. et al. Mechanical design of proteins studied by single-molecule force spectroscopy and protein engineering. *Prog Biophys Mol Biol* **74**, 63-91 (2000).
28. Li, H., Oberhauser, A.F., Fowler, S.B., Clarke, J. & Fernandez, J.M. Atomic force microscopy reveals the mechanical design of a modular protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6527-31 (2000).
29. Thompson, K.S., Vinson, C.R. & Freire, E. Thermodynamic characterization of the structural stability of the coiled-coil region of the bZIP transcription factor GCN4. *Biochemistry* **32**, 5491-6 (1993).
30. Zitzewitz, J.A., Bilsel, O., Luo, J., Jones, B.E. & Matthews, C.R. Probing the folding mechanism of a leucine zipper peptide by stopped- flow circular dichroism spectroscopy. *Biochemistry* **34**, 12812-9. (1995).
31. Zhu, H., Celinski, S.A., Scholtz, J.M. & Hu, J.C. An engineered leucine zipper a position mutant with an unusual three-state unfolding pathway. *Protein Sci* **10**, 24-33 (2001).
32. Leszek, J. & Wolfram, P. Human hair: A unique physicochemical composite. *J Am Acad Dermatol.* **48**, 107-14 (2003).
33. Fuchs, E. Keratins and the Skins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**, 123-53 (1995).
34. Reinier, L.C., Akkermans, C. & Warren, P.B. Multiscale modelling of human hair. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* **362**(2004).
35. Hearle, J.W. A critical review of the structural mechanics of wool and hair fibres. *Int J Biol Macromol* **27**, 123-38. (2000).
36. Furuike, S., Ito, T. & Yamazaki, M. Mechanical unfolding of single filamin A (ABP-280) molecules detected by atomic force microscopy. *FEBS Lett* **498**, 72-5 (2001).
37. Evans, E. PROBING THE RELATION BETWEEN FORCE—LIFETIME—AND CHEMISTRY IN SINGLEMOLECULAR BONDS. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30**, 105-28 (2001).
38. Carrion-Vazquez, M., Marszalek, P.E., Oberhauser, A.F. & Fernandez, J.M. Atomic force microscopy captures length phenotypes in single proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11288-92 (1999).
39. Nolting, B. *Protein folding kinetics*, (Springer-Verlag, 1999).
40. Li, H., Carrion-Vazquez, M., Oberhauser, A.F., Marszalek, P.E. & Fernandez, J.M. Point mutations alter the mechanical stability of immunoglobulin modules. *Nat Struct Biol* **7**, 1117-20 (2000).
41. Wagner, C. & Kiefhaber, T. Intermediates can accelerate protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6716-21 (1999).
42. Jackson, S.E. How do small single-domain proteins fold? *Folding&Design* **3**, 81-91 (1998).
43. Plaxco, K.W., Spitzfaden, C., Campbell, I.D. & Dobson, C.M. A comparison of the folding kinetics and thermodynamics of two homologous fibronectin type III modules. *J Mol Biol* **270**, 763-70 (1997).
44. Cota, E. & Clarke, J. Folding of beta-sandwich proteins: three-state transition of a fibronectin type III module. *Protein Sci* **9**, 112-20 (2000).

Lebenslauf

Name: Ingo Heinz Otto Schwaiger
Geburtsdatum: 15.7.1972
Geburtsort: München

Ausbildung

Schule: Grundschule in München, 1979-1983
Nymphenburger Gymnasium in München, 1983-1992

Wehrdienst: Zivildienst im Integrationskindergarten in Garmisch-Partenkirchen, 1992-1993

Hochschulstudium: Physik Diplom (Vorstudium):
Ludwigs-Maximilians-Universität München
1993-1995

Technische Physik (Hauptstudium):
Technische Universität Ilmenau
1996-1998

Diplomarbeit:
Technische Universität München, Lehrstuhl f. Oberflächenphysik
Thema: "Schwingungsspektroskopische Untersuchung der
Adsorption und Dissoziation von 1,3-Butadien auf der Silizium
(100)-(2x1)-Oberfläche"
1998-2000

Promotion:
Ludwigs-Maximilians-Universität München und Technische
Universität München, Lehrstuhl f. angewandte Physik bzw. Biophysik
2001-2005
Thema: "Kraftspektroskopische Untersuchung einzelner
Zytoskelett-Proteine"

Danksagung

Wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit hat die Unterstützung beigetragen, die ich am Lehrstuhl für angewandte Physik an der LMU und für Biophysik an der TU München erfahren habe. Insbesondere sei Matthias Rief gedankt, der mich für das Thema dieser Arbeit gewinnen konnte und mir die Möglichkeit gab unter seiner Anleitung diese Doktorarbeit durchzuführen. Seine wissenschaftliche Kompetenz sowie seine freundliche und geduldige Art waren mir, gerade in den kritischen Phasen der Arbeit eine große Hilfe. Ihm ist es zu verdanken, dass aus mir ein überzeugter „Zupfer“ geworden ist.

Bei Hermann Gaub bedanke ich mich für die Aufnahme an seinen Lehrstuhl und für die motivierenden Diskussionen. Insbesondere habe ich von seinen anregenden Vorträgen profitiert, die mir die Faszination der Physik und des Essens vor Augen führten.

Einen besonderen Beitrag zu dieser Arbeit hat Angelika Kardinal geleistet, die für die Mehrheit der Probenmoleküle verantwortlich ist. Die erfolgreiche Zusammenarbeit mit Ihr hat mir viel Spaß gemacht.

Beim Bau des Kraftspektrometers konnte ich auf die Unterstützung der AFM-Profis der Gambicrew zählen. Mit hilfreichen Tipps standen mir Max Kessler, Thorsten Hugel, Ruppert Krautbauer, Ferdinand Kühner und Claudia Friedsam zur Seite. Auch möchte ich mich bei Hendrik Dietz bedanken, der an der Programmierung des Experiments beteiligt war. Für die gute Zusammenarbeit bei den Rückfaltungsexperimenten möchte ich mich insbesondere bei Michael Schlierf bedanken.

Bei allen Institutsmitgliedern vom Lehrstuhl für angewandte Physik und von E22, die hier nicht namentlich erwähnt sind, möchte ich mich für das gute Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig ausgeführt und keine weiteren Hilfsmittel als die im Text und im Literaturverzeichnis aufgeführten verwendet zu haben.

München, den

Ingo Schwaiger