

EINZELMOLEKÜL- MECHANOENZYMATIK

Dr. Elias M. Puchner

Dissertation an der
Ludwig-Maximilian-Universität München,
Fakultät für Physik

München, Oktober 2009
Autor: Dr. Elias Puchner, Nürnberg
Veröffentlichung: Innovatrades, München



innovatrades

Ihre Plattform für Information.

1.0	ZUSAMMENFASSUNG	04	5.0	ERGEBNISSE	15
2.0	EINLEITUNG	05	5.1	Der molekulare Kraftsensor Titinkinase	15
3.0	MECHANOENZYMATIK	06		<ul style="list-style-type: none"> • Kraftinduzierte Entfaltungscharakteristik einzelner Titinkinase-Proteinkonstrukte • Mechanisch aktivierte ATP-Bindung • Lokalisierung des aktiven Zustandes durch mechanisches „pump-and-probe“ • Strukturelle Untersuchung des molekularen Aktivierungsmechanismus • Titinkinase-Mechanismus im physiologischen Zusammenhang 	
3.1	Enzyme: Konformation & Funktion	06	5.2	Mechanische Manipulation von CalB	20
3.2	Das Muskelenzym Titinkinase	08		<ul style="list-style-type: none"> • Antikörper-funktionalisierte Agarosekugel als Manipulator • Mechanische Charakterisierung der Antikörper-Sollbruchstelle • Enzymatische Aktivität unter Kraft 	
3.3	Flukturierende Enzyme	11	5.3	Funktionelle Nanoassemblierung	22
	<ul style="list-style-type: none"> • Muskelaufbau • Autoinhibierung der Titinkinase 			<ul style="list-style-type: none"> • Mechanische und optische Charakterisierung einzelner SMCP-Zyklen • Selbstorganisation an nanoassemblierten Bindungsstellen 	
	<ul style="list-style-type: none"> • Modellsystem Candida Antarctica Lipase B • Antikörper-Peptid basierte Sollbruchstelle für mechanische Manipulation 				
4.0	BEOBACHTUNG UND 3D-KONTROLLE EINZELNER BIOMPOLEKÜLE	13	6.0	AUSBLICK	25
4.1	Rasterkraft- & TIRF-Mikroskopie	13			
4.2	Nanoassemblierung durch molekulare Erkennung	13			
	<ul style="list-style-type: none"> • DNA als programmierbarer Baustein • Hierarchische Trennkräfte von DNA für gezielte Nanoassemblierung 				

7.0	ANHANG	27
7.1	Kraftspektroskopie	27
7.2	Kombination von AFM mit TIRF-Mikroskopie	30
7.3	Publikationen	32
	<ul style="list-style-type: none">• P1 „Mechanoenzymatics of Titin Kinase“• P2 „Force-based Analysis of Multidimensional Energy Landscapes:“• P3 „Comparing Proteiny by their Unfolding Pattern“• P4 „Single-Molecule Cut-and-Paste Surface Assembly“• P5 „Nanoparticle Self-Assembly to a DNA-Scaffold Written by Single-Molecule Cut-and-Paste“• P6 „Optically Monitoring the Mechanical Assembly of Single Molecules“	
7.4	Manuskripte für Publikationen	32
	<ul style="list-style-type: none">• M1 „Triggering enzymatic activity with force“• M2 „A combined AFM-TIRF microscope for simultaneous single molecule Experiments“	
8.0	REFERENZEN	33
9.0	DANKSAGUNG	38

ZUSAMMENFASSUNG

Enzyme zählen zu den wichtigsten funktionellen Einheiten von Organismen. Sie produzieren Biomoleküle oder bauen diese ab, wirken als molekulare Motoren oder regulieren biologische Prozesse in Antwort auf beispielsweise mechanische Reize.

Für die Medizin und Nano-Biotechnologie ist das Verständnis der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen und ihres Zusammenspiels von großer Bedeutung.

Das autoinhibierte Muskelenzym Titinkinase befindet sich im langen Sarkomer-Protein Titin an idealer Position, um im Muskel Ungleichgewichte der Krafterzeugung zu detektieren. In dieser Arbeit wurde die Funktion und der molekulare Aktivierungsmechanismus der Titinkinase in der natürlichen biomolekularen Umgebung mit Einzelmolekül-Kraftspektroskopie entschlüsselt. Durch das Dehnen einzelner Proteinkonstrukte konnte gezeigt werden, dass die Titinkinase über fünf Energiebarrieren und mit Kräften unter 50 pN vor den strukturell wirkenden Titindomänen (Ig/Fn) entfaltet. In Anwesenheit des Cosubstrates ATP, das nicht an die autoinhibierte Konformation bindet, wurde im Entfaltungsmuster eine zusätzliche Energiebarriere beobachtet. Die präzise Lokalisierung der Energiebarrieren bis auf wenige Aminosäuren genau erlaubte durch den Vergleich mit Molekulardynamik-Simulationen die Bestimmung aller strukturellen Veränderungen während der Entfaltung. Die zusätzliche Barriere beim mechanisch induzierten Binden von ATP wurde durch Wechselwirkung von ATP mit den Aminosäuren Methionin-34 und Lysin-36 erklärt. Neu entwickelte mechanische „pump-and-probe“-Protokolle, mit denen die Konformation des Enzyms kontrolliert wurde, erlaubten die detaillierte Vermessung der ATP-Bindungskinetik, die Lokalisierung der mechanischen Aktivierung nach der zweiten Energiebarriere und wiesen die essenzielle Rolle der Aminosäure Lysin-36 für die ATP-Bindung nach. Durch Binden von ATP wird die Blockierung der katalytischen Aminosäure Aspartat-127 durch Autophosphorylierung von Tyrosin-170 aufgehoben. Die Titinkinase ist somit katalytisch aktiv und startet über Phosphorylierung von Substraten die Signalkaskade zur Regulation von Muskel-Genexpression und Proteinumsatz. Die Position der Titinkinase im Titin, sowie die Aktivierungskräfte und Längen im physiologischen Bereich lassen

den Schluss zu, dass die Titinkinase als natürlicher Kraftsensor wirkt, um den Muskelaufbau zu steuern. Das Konzept der mechanisch induzierten Konformationsänderung wurde in dieser Arbeit auch auf die Lipase CalB übertragen, die keine mechanisch kontrollierte Funktion besitzt. Die Aktivität einzelner kovalent immobilisierter Enzyme wurde mit TIRF-Mikroskopie und einem Substrat beobachtet, das nach enzymatischer Spaltung fluoresziert. Dabei wurde ein charakteristisch fluktuierendes Blinkverhalten mit An- und Auszeiten im Sekundenbereich festgestellt. Durch gleichzeitige mechanische Manipulation von CalB über eine gut charakterisierte molekulare Sollbruchstelle wurde das Enzym in höherenergetische und katalytisch inaktive Zustände gebracht, von wo aus eine Relaxation über den aktiven Zustand ins Gleichgewicht stattfand und eine erhöhte Aktivität nach 1,7 Sekunden festgestellt wurde.

Die entwickelte Basistechnologie erlaubt die Nanoassemblierung verschiedenster funktioneller Einheiten und könnte die Konstruktion von synergetischen Enzymkaskaden, oder das Imitieren biologischer Signalwege ermöglichen.

Die Kenntnis der Mechanismen einzelner Enzyme ist die Voraussetzung für das Verständnis ihres Zusammenspiels, bei dem ihre räumliche Anordnung essenziell ist. Um solche funktionelle Einheiten kontrolliert auf Oberflächen zu assemblieren, wurde in dieser Arbeit das natürliche Prinzip der Selbstorganisation, basierend auf molekularer Erkennung, mit der Präzision des Atomic Force Microscope (AFM) kombiniert. Bei dieser „Single-Molecule Cut-and-Paste“-Technik wurden mit der Spitze eines AFM kleine DNA-Oligomere nacheinander von einem Depot aufgenommen und im Ziel bis auf 10 nm genau an vordefinierten Positionen abgesetzt. Durch diesen Prozess, der optisch und mechanisch kontrolliert wurde, konnten Strukturen verschiedener Form und Größe bis zu beugungslimitierten Arrangements von 5 Molekülen mit Abständen von 50 nm erzeugt und optisch rekonstruiert werden. In einer Weiterentwicklung wurde diese Technik mit Selbstorganisation kombiniert. Durch das Anheften von Biotin an die DNA konnten Strukturen aus Bindungsstellen erzeugt werden. Verschiedene fluoreszierende Nanokristalle mit

dem Gegenstück Streptavidin an der Oberfläche lagerten sich so von selbst zu Superstrukturen zusammen. Die entwickelte Basistechnologie erlaubt die Nanoassemblierung verschiedenster funktioneller Einheiten und könnte die Konstruktion von synergetischen Enzymkaskaden, oder das Imitieren biologischer Signalwege ermöglichen.

2.0

EINLEITUNG

Ein Ziel der Nano-Biotechnologie ist, biologische Prozesse auf grundlegendster molekularer Ebene zu verstehen und zu nutzen. Die Größe der einzelnen molekularen Bausteine im Nanometer-Bereich, sowie deren Komplexität und Interaktion miteinander stellen dabei eine Herausforderung dar. Allein die Anzahl der unterschiedlichen menschlichen Proteine im International Protein Index [3] beträgt ca. 40.000, Schätzungen belaufen sich sogar auf ca. 84.0000 [4], Proteine erfüllen die unterschiedlichsten Funktionen und wirken beispielsweise als Motoren, Filter, Sensoren oder Gerüst, und regulieren sich gegenseitig über chemische oder mechanische Signale. Die räumliche Anordnung der interagierenden Biomoleküle ist dabei essenziell. Sie wird durch das fundamentale Prinzip der Natur erreicht: die Selbstassemblierung durch molekulare Erkennung. Durch die Brownsche Molekularbewegung erkunden die funktionellen Einheiten das ihnen zugängliche Volumen und suchen ihre Andockstellen, binden aber nur an ihr spezifisches Gegenstück. Mit diesem Prinzip erzeugt die Natur nicht nur komplexe Nanostrukturen innerhalb von Zellen, sondern auch die Wechselwirkung ganzer Zellen wird auf diese Weise gesteuert und lässt sie in Organen oder ganzen Organismen zusammenarbeiten. Diese Selbstassemblierungsprozesse, die von der Natur in Milliarden von Evolutionsjahren entwickelt und optimiert wurden, stellen deshalb die wichtigste Grundlage bei der künstlichen Erzeugung von Nanostrukturen dar. Kraft ist essenziell im Prozess der Selbstassemblierung und des dynamischen Zusammenspiels biologischer Einheiten. Sie bestimmt nicht nur wie stark einzelne Moleküle oder Zellen aneinander haften, sondern sie wird auch aktiv erzeugt und manchmal sogar in biochemische Signale übersetzt, um biologische Prozesse zu regulieren. Auf der Ebene von Organen wird sie von Muskeln generiert, wodurch diese selbst der erzeugten Kraft ausgesetzt sind. Auf zellulärer Ebene ist besonders das Zytoskelett Kräften ausgesetzt, und schließlich wird auf molekularer Ebene Kraft durch molekulare Motoren erzeugt und auf

assoziierte Proteine übertragen. Für biologische Reaktionen auf diese mechanischen Reize bedarf es molekularer Kraftsensoren, die mechanische in biochemische Signale übersetzen. Die Kraft stellt deshalb eine wichtige biologische Größe dar, um die Mechanismen dieser Prozesse zu erforschen und die Natur bei der künstlichen Erzeugung von Nanostrukturen zu imitieren, wie sich in dieser Arbeit zeigen wird. Kraft ist jedoch nicht nur eine Größe, um Proteine mit mechanischer Funktion zu untersuchen. Sie erlaubt vielmehr einen tiefen Einblick in die Organisation und Architektur von Biomolekülen. Denn die Funktion von Proteinen wird durch die selbstorganisierte dreidimensionale Faltung der Aminosäurenkette in einer ganz bestimmten Anordnung, der Tertiärstruktur, erlangt. Durch die verschiedenen physikalischen und chemischen Eigenschaften der zwanzig kanonischen Aminosäuren entsteht eine vieldimensionale Potenziellandschaft, deren Grundzustand mit niedrigster Energie von der Proteinkette in der Regel eingenommen wird und die funktionelle Konformation darstellt. Die strukturaufklärenden Methoden wie NMR oder Röntgenstrukturanalyse haben hier einen Durchbruch erwirkt, da durch sie die Positionen der einzelnen Atome kartographiert werden können. Jedoch stellen solche Messwerte einen Mittelwert dar, und die dynamische Untersuchung einzelner Proteine, die einen tiefen Einblick in molekulare Mechanismen erlaubt, ist damit nicht möglich. Die Kraftspektroskopie, bei der einzelne Moleküle gedehnt werden, wobei Kraft und Abstand als Messsignal dienen, ermöglicht die Untersuchung dieser Potenziellandschaft und der dynamischen Wechselwirkungskräfte. Für die Erforschung der molekularen Mechanismen biologischer Einheiten und ihres Zusammenspiels ist die Kontrolle der einzelnen Bausteine sowie die Beobachtung ihrer Reaktion von größter Wichtigkeit. Das „Atomic Force Microscope“ (AFM) und seine weiterentwickelte Form für AFM-basierte Kraftspektroskopie sind hierfür wichtige Messinstrumente. Mit einer Präzision im Nanometerbereich in allen drei Raumrichtungen können einzelne Moleküle kontrolliert, manipuliert und ihre Reaktion mechanisch oder in Kombination mit Mikroskopietechniken optisch detektiert werden. Entscheidend ist hier die Schnittstelle zwischen der makroskopisch kontrollierten Spitze des AFM-Cantilevers, der als mechanischer Detektor und Manipulator wirkt, und der molekularen Welt, in die makroskopische Techniken nicht übertragbar sind. Richard Feynman hat 1959 in seinem legendären und visionären Vortrag „There is plenty of room at the bottom“ veranschaulicht, dass die Herstellung miniaturisierter Versionen unserer makroskopischen Werkzeuge und Maschinen,

und ihre Anwendung auf molekularer Größenordnung fehlschlägt. Zudem treten auf molekularer Ebene folgende physikalischen Effekte in den Vordergrund: Die Reibungskräfte nehmen überhand und die thermische Energie stößt Moleküle umher und hält alles in ständiger Bewegung, sodass die Gravitation keine essenzielle Rolle mehr spielt. Übertrüge man diese Welt, in der die Newtonschen Bewegungsgleichungen in die Langevin-Gleichung übergehen, in unsere makroskopische Welt, so würde dies dem Leben in einer honigartigen Flüssigkeit inmitten eines Hurrikans entsprechen. Würde es gelingen, einen Greifarm nanoskopisch nachzubauen, so könnte man damit trotzdem nicht ein einzelnes Molekül greifen und an einer bestimmten Position einfach absetzen. Um es zu ergreifen, müsste das Molekül zuerst nanometergenau lokalisiert und dann innerhalb einer millisekunde gepackt werden¹, da sich der Ort aufgrund der Brownschen Molekularbewegung ständig ändert. Selbst wenn das Molekül mit einer ausreichenden Kontaktfläche der Greifzange festhalten werden könnte, wäre es nicht aufzunehmen, da es aufgrund der laminaren Strömung beim Schließen der Zange ausweichen würde². Beim Absetzen des Moleküls würde man außerdem mit dem von Smalley und Drexler debattierten Problem der „sticky fingers“ konfrontiert werden: Der für das Molekül „klebrige“ Greifarm müsste das Objekt wieder loslassen. Für die Kontrolle und gezielte Assemblierung von Molekülen ist also nicht eine Miniaturisierung makroskopischer Hilfsmittel die Lösung, sondern die gezielte Anwendung makroskopisch präzise gesteuerter Messsonden in Kombination mit dem Prinzip der molekularen Erkennung, das die Evolution in Milliarden von Jahren entwickelt hat, um die komplexe und vielseitige Nano-Biotechnologie der Natur zu ermöglichen. Zentrales Thema dieser Dissertation ist die Kontrolle, Manipulation und Erforschung der molekularen Mechanismen einzelner Enzyme und anderer Biomoleküle, sowie deren Nanoassemblierung zu beliebigen Strukturen. Neben dem Muskelenzym Titinkinase, dessen Funktion und molekularer Mechanismus diese Arbeit entschlüsselt, wird das ebenfalls mechanisch manipulierte, aber optisch beobachtete Enzym CalB vorgestellt. Außerdem werden Biomoleküle eingeführt, deren Fähigkeit der molekularen Erkennung die Kontrolle, Manipulation und gezielte Assemblierung funktioneller Einheiten zu komplexen Strukturen erlaubt. Für die detaillierte Beschreibung, Analyse sowie für technische Details dieser kumulativen Dissertation wird an den entsprechenden Stellen auf die zugehörigen Publikationen im Anhang verwiesen.

1

Für den Wert von $1 \cdot s$ wurde eine mittlere Diffusionslänge von 10 nm und ein Diffusionskoeffizient von $10^7 \text{ nm}^2/s$ vorausgesetzt.

2

Bakterien gelingt es durch eine kurzzeitige hohe Geschwindigkeit, zum Reißen von Beute in turbulente Bereiche zu gelangen.

MECHANOENZYMATIK

Enzyme zählen zu den aktiven Einheiten von Zellen. In diesem Kapitel werden ihr Aufbau und ihre Funktion dargestellt. Neben dem möglichen Einfluss externer Kräfte auf ihre Aktivität werden das in dieser Arbeit untersuchte Muskelenzym Titinkinase und die Lipase CalB vorgestellt.

3.1 Enzyme: Konformation und Funktion

Enzyme bilden die katalytisch aktive Klasse unter den Proteinen. Sie erfüllen in Organismen eine enorme Vielfalt spezifischer Funktionen und sind für den Stoffwechsel, für Signalkaskaden und gerichtete Bewegung in Form molekularer Motoren verantwortlich. Aufgebaut sind Enzyme aus den 20 kanonischen Aminosäuren, die kovalent zu einer Aminosäurekette verknüpft sind. Durch die Eigenschaften der Aminosäuren entsteht eine Potenziallandschaft im Konformationsraum, die die Faltung des Proteins in den funktionellen Zustand und seine Dynamik bestimmt. Während die Abfolge der Aminosäuren als Primärstruktur bezeichnet wird, nennt man die verschiedenen Strukturelemente wie α -Helix, β -Faltblatt oder „random coil“ Sekundärstruktur (s. Abb. 1).

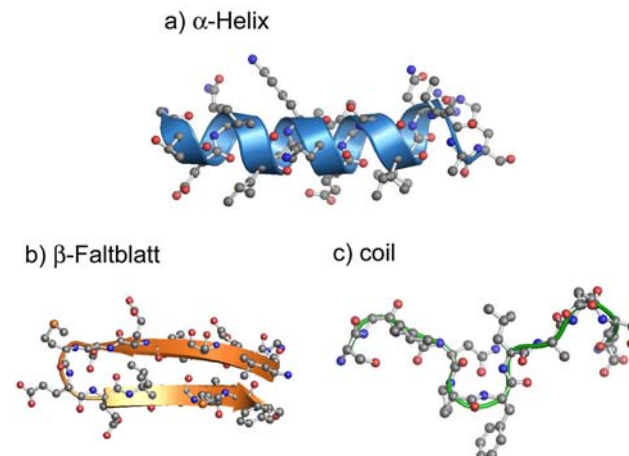


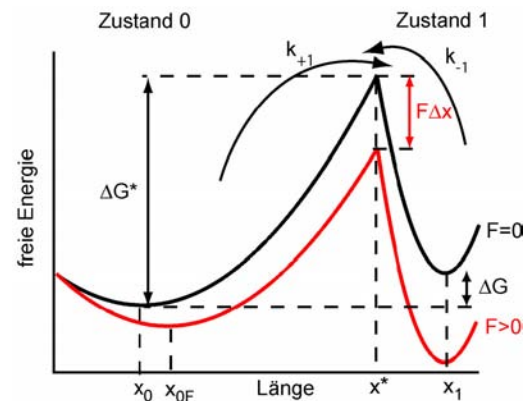
Abb. 1

Strukturelemente von Proteinen. Je nach Eigenschaft der Aminosäuren und der lokalen Umgebung falten sich Teile der Aminosäurekette zu den stabilen Strukturelementen α -Helix (a) und β -Faltblatt (b), oder bilden flexiblere Schlaufen, auch „coil“ genannt (c). In den gezeigten Kristallstrukturen sind die Atome der Aminosäuren sowie die Schemata der Peptidrückgrate dargestellt.

Aus diesen Elementen ist die gesamte Struktur eines Enzyms, die Tertiärstruktur, aufgebaut. Während ein großer Teil der Elemente nur strukturelle Beiträge liefert, besitzen Enzyme, je nach Art, eine oder mehrere spezifische Bindungstaschen für die molekulare Erkennung von Substraten oder Cofaktoren, sowie ein katalytisches Zentrum mit meist nur wenigen katalytischen Aminosäuren. Für viele biologische Prozesse ist eine Steuerung von enzymatischer Aktivität wesentlich. Die Regulation geschieht meist durch Konformationsänderungen des Enzyms, die durch kovalente Modifikationen, das Binden von Liganden oder, wie bei der Titinkinase, durch Kraft induziert werden. Durch diese Modifikationen wird die Energielandschaft des Enzyms so verändert, dass Teile der Aminosäurekette in einen neuen Zustand übergehen. Diese Konformationsänderungen können nur Teile des Enzyms, beispielsweise nahe einer Substratbindungsstelle, betreffen, oder im Fall von kovalenten Modifikationen, wie der Phosphorylierung, sogar nur einzelne Aminosäuren. Biologische Prozesse wie die Regulation von Proteinfunktionen, sind angepasst an die thermische Energie $k_B T$ (k_B bezeichnet die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur). Für Funktionen, die gezielt gesteuert werden, müssen einerseits die Barrieren zwischen zwei funktionellen Zuständen hoch genug sein, um nicht zufällig eingenommen zu werden, und andererseits sollte der reversible Prozess nicht viel an wertvoller Energie verbrauchen. Aufgrund der thermischen Energie und ihrer Flexibilität sind Enzyme hoch dynamische Einheiten [5].

Abb. 2

Schematische Darstellung zweier Zustände, die durch eine Energiebarriere getrennt sind. Durch eine externe Kraft wird die Energielandschaft verkippt, sodass sich die Energiebarriere bei x^* erniedrigt und die Besetzung von Zustand 1 wahrscheinlicher wird. Konformationsänderungen können so durch Kraft induziert werden.



Es wurde von Frauenfelder erkannt, dass sie eine Vielzahl von Konformationen in dem kleinen, durch die thermische Energie erkundbaren Bereich durchlaufen [6–9]. Außerdem konnte durch eine Reihe von Einzelmolekülmessungen gezeigt werden, dass verschiedene Enzyme auch ohne externe Einflüsse zwischen aktiven und inaktiven Zuständen wechseln, und Perioden von An- und Auszeiten zeigen [10–12]. Dieses Verhalten wurde auch in dieser Arbeit bei der Lipase CalB beobachtet, wie in folgenden Kapiteln beschrieben wird. Da eine externe Kraft die Energielandschaft beeinflusst, ist Einzelmolekül-Kraftspektroskopie eine ideale Messmethode, um die Konformation von Enzymen zu kontrollieren und eine mögliche konformationsinduzierte Funktionsänderung zu beobachten.

Wie in *Abbildung 2* schematisch dargestellt, verkippt eine externe Kraft F die Energielandschaft, sodass die Energiebarriere ΔG^* bei x^* für kleine Änderungen des Grundzustandes $x_{0F} - x_0 \ll x_1 - x_0$ verringert wird zu: $\Delta G^* = \Delta G^*(0) - F\Delta x^*$, $\Delta x^* = x^* - x_0$. In gleicher Weise ändert sich die freie Energie zwischen Zustand 0 und Zustand 1, sodass für die Rate k_{+1} in Zustand 1 und die Gleichgewichtskonstante K_{eq} unter Kraft gilt

$$k_{+1}(F) = a \cdot e^{-\frac{\Delta G^*(0) - F\Delta x^*}{k_B T}} = k_{+1}^0 e^{\frac{F\Delta x^*}{k_B T}}$$

bzw.

$$K_{eq}(F) = e^{-\frac{\Delta G - F\Delta x}{k_B T}} = K_{eq}^0 e^{\frac{F\Delta x}{k_B T}}$$

wobei a den Frequenzfaktor bezeichnet. Es ist offensichtlich, dass durch die externe Kraft die Raten und das Gleichgewicht zugunsten von Zustand 1 verändert werden. Da eine weiterreichende Beschreibung der Theorie zur Dissoziation molekularer Bindungen unter Kraft zu weit führen würde, sei hier auf die Fachliteratur verwiesen [13–16].

3.2 Das Muselenzym Titinkinase

Biologische Gewebe sind ständig Kräften ausgesetzt. Überall dort, wo Bewegung erzeugt wird sei es auf makroskopischer Ebene, zum Beispiel im Muskel, oder auf mikroskopischer Ebene durch molekulare Motoren, entstehen mechanische Spannungen, auf die die Zelle reagieren muss.

Für mechanisch gesteuerte Signalkaskaden bedarf es molekularer Kraftsensoren, die Kräfte detektieren und in Form chemischer Signale weiterleiten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die katalytische Domäne des Titin, die Titinkinase, mechanisch aktiviert wird und so als Kraftsensor im Muskel den Proteinumsatz und die Muskel-Genexpression steuert. Die physiologische Bedeutung dieses Enzyms sowie der Mechanismus, der die enzymatische Aktivität inhibiert, werden im Folgenden dargestellt.

Muskelaufbau

Der quergestreifte Muskel, zu dem Skelett- und Herzmuskel zählen, ist aus Muskelfasern aufgebaut, die viele Zentimeter lang und einige 100 μm dick sein können. Sie bilden sich in der embryonalen Phase durch Fusion vieler Myoblasten und enthalten deshalb viele Zellkerne und Mitochondrien. Muskelfasern bestehen wiederum aus vielen faserartigen Myofibrillen, die aus mehreren hunderttausend hintereinander gereihten Sarkomeren, den krafterzeugenden Einheiten des Muskel, aufgebaut sind. Wie in *Abbildung 3* schematisch dargestellt, sind die Aktinfilamente fest mit den Enden des Sarkomers verankert, sodass die Myosinfilamente, die aus den molekularen Myosin-Motoren aufgebaut sind, Kraft auf die Aktinfilamente ausüben können. Wegen der Spiegelsymmetrie des Sarkomers ziehen die Myosinfilamente auf beiden Seiten in entgegengesetzte Richtungen, wodurch das Sarkomer kontrahiert. In Position gehalten werden die Myosinfilamente durch das sehr lange Protein Titin, das sich von der Z-Bande bis zu MBande erstreckt. Neben seiner entscheidenden biochemischen Funktion bei der Selbstassemblierung des Sarkomers gibt es dem Muskel wichtige mechanische Eigen-

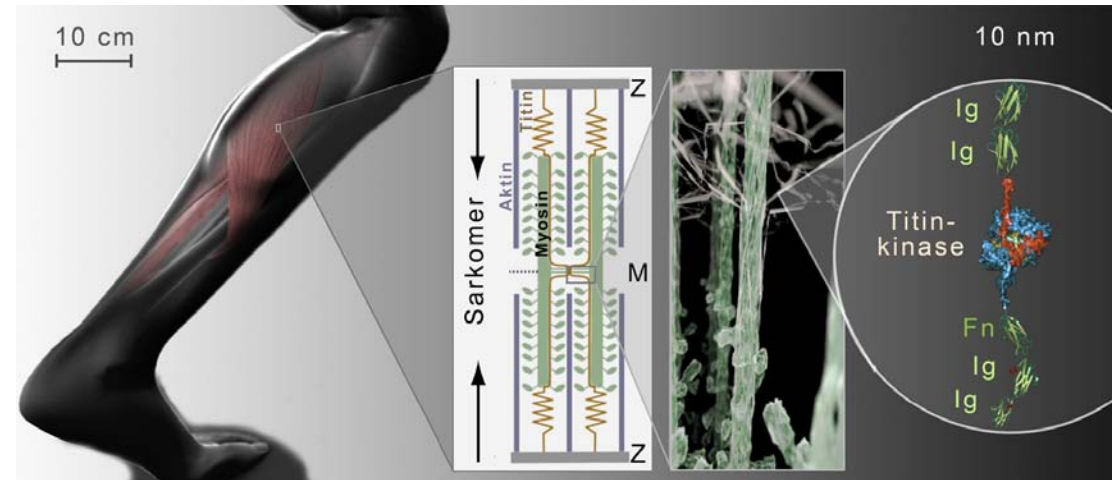


Abb. 3

Schematische Darstellung des Muskels. Die krafterzeugende Einheit des Muskels ist das Sarkomer. Die Myosinfilamente (grün) sind über das Titin (gelb) elastisch mit der Z-Bande verbunden und bestehen aus den molekularen Motoren Myosin. Sie üben in den zwei Hälften des Sarkomers auf die fest verankerten Aktinfilamente Kräfte in entgegengesetzte Richtung aus, wodurch die Kontraktion entsteht. An der M-Bande verzweigen sich die Titine vom Myosinfilament. In dieser quervernetzten Struktur treten bei Ungleichgewichten der Krafterzeugung Scherkräfte auf. In dieser Region des Titins befindet sich die Titinkinase, umgeben von globulären Ig- und Fn-Domänen, als einzige katalytische Domäne des Titins.

schaften. Denn der Bereich zwischen Z-Bande und Myosinfilament enthält „PEVK-Regionen“, die nach der Zusammensetzung der Aminosäuren benannt sind und strukturell entropische Knäule bilden. Durch die entropische Kraft beim Dehnen [17, 18] erhält der Muskel seine passive Elastizität [19]. Die übrigen Teile des Titins bestehen zum größten Teil aus globulär gefalteten Immunoglobulin (Ig)- und Fibronectin-Domänen (Fn), die unter Kraft schlagartig aufbrechen, und so den Muskel bei zu hohen Kräften vor Zerstörung schützen können. Diese Teile des Titins sind mit kraftspektroskopischen Messmethoden intensiv untersucht worden [20–24]. Der hexagonalen Querschnittsstruktur des Sarkomers entsprechend, winden sich sechs Titine an einem Myosinfilament entlang bis zur M-Bande, wo sie sich vom Myosinfilament ablösen und in der netzartigen Struktur der M-Bande über Myomesin und Obscurin quervernetzt sind [25, 26]. Genau in diesem Bereich des Titins, der die ideale Position zur Detektion von mechanischen Spannungen zwischen Myosinfilamenten darstellt, befindet sich die Titinkinase.

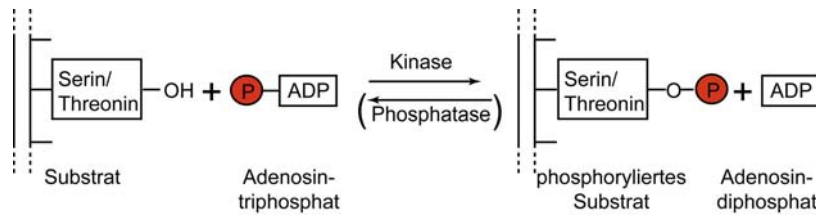
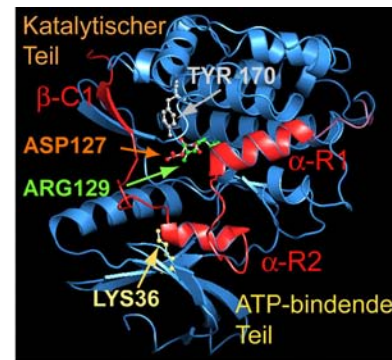
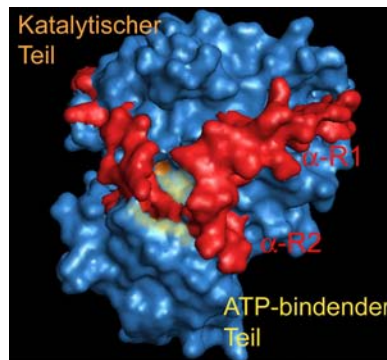


Abb. 4

Schematische Darstellung der von Kinasen katalysierten Reaktion. Im Fall von Serin/Threonin-Kinasen wird das Gamma-Phosphat eines ATP- oder GTP-Moleküls auf die Aminosäuren Serin oder Threonin des Substrates übertragen, wodurch eine Veränderung des funktionellen Zustandes erreicht wird.

Abb. 5

Kristallstruktur der Titinkinase pdb: 1TKI. Die Titinkinase besteht aus einem größeren Teil, der für die Katalyse verantwortlich ist, und einem kleineren Teil, der die ATP-Bindungstasche enthält. Die Bindungstasche ist jedoch von der α -Helix α 2 des in rot markierten C-terminalen regulatorischen Teils blockiert, wodurch ATP nicht bindet. Der zweite inhibitorische Mechanismus besteht in der Blockierung der katalytischen Base ASP127 durch TYR170. Ebenfalls markiert sind die für die Katalyse wichtigen Aminosäuren ARG129 und LYS36, das in den meisten Kinasen konserviert ist und mit ATP interagiert.

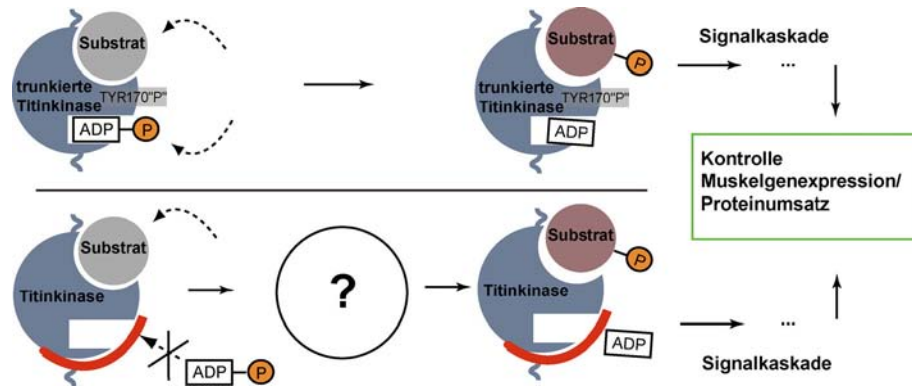


Autoinhibierung der Titinkinase

Proteinkinasen sind wichtige regulatorische Enzyme und steuern viele zelluläre Signalwege. Sie verändern den funktionellen Zustand ihrer Substrate durch Phosphorylierung, d.h. durch Anheften einer Phosphatgruppe (siehe Abbildung 4). Dadurch wird die Aktivität eines Enzyms entweder direkt beeinflusst oder ein Substrat erhält durch die Phosphorylierung eine veränderte Affinität zu weiteren Bindungspartnern im Signalweg. Resultat eines durch Kinasen initiierten Signalweges kann z. B. die Regulation der Genexpression oder des Proteinumsatzes sein. Die Titinkinase zählt zu den Serin/Threonin spezifischen Kinasen. Obwohl sie eine Bindungsstelle für Calcium/Calmodulin besitzt, wird sie durch Binden von Calcium/Calmodulin im Gegensatz zu verwandten Kinasen nicht aktiviert. Es konnte vielmehr gezeigt werden, dass die Titinkinase zwei autoinhibierende Elemente enthält. Zum Einen ist die Bindungstasche für ATP in der nativen Konformation durch eine α -Helix verschlossen, zum Anderen wird die katalytische Base Aspartat-127 (ASP127) durch Tyrosin-170 (TYR170) blockiert [27]. Die Kristallstruktur der Titinkinase ist in Abbildung 5 dargestellt, wobei die inhibitorischen Elemente rot hervorgehoben sind. Zur Untersuchung der möglichen Signalwege aktivierter Titinkinasen wurden die inhibitorischen Elemente biochemisch entfernt [2]. Dazu wurde zum Einen TYR170 zu Glutaminsäure mutiert, um die inhibitorische Wirkung zu beseitigen und den phosphorylierten Zustand von TYR170 zu imitieren. Zum Anderen wurde der C-terminale regulatorische Teil, der die ATP-Bindungstasche verschließt, trunziert. Auf diese Weise konnten aktive Titinkinasen gewonnen und Substrate wie nbr1 oder p62 identifiziert werden (siehe Abbildung 6). Die ausgelöste Signalkaskade steuert letztlich den Proteinumsatz im Muskel und reguliert im Zellkern die Expression von Muskelproteinen. Die ausgesprochen wichtige Funktion der Titinkinase bei der Bildung und Erhaltung des Muskels zeigt sich auch bei einer erblichen Myopathie, bei der das Arginin-279 der Helix α 1 zu Tryptophan mutiert ist [2, 28]. Die Patienten leiden schon in jungen Jahren an Muskelschwäche, die bei Versagen der Atemmuskulatur tödlich ist [29]. Auf mikroskopischer Ebene zeigen sich die Auswirkungen vor allem in einer verwachsenen, schwammigen Sarkomerstruktur, bei der die Mund Z-Banden nicht mehr klar definiert sind. Ganze Myofibrillen brechen zusammen und können keine Kraft mehr erzeugen. Dass der regulatorische Signalweg der Titinkinase auch im Herzmuskel essenziell ist, konnte an KO-Mäusen gezeigt werden, bei denen die Titinkinase deletiert wurde [30]. Auch hier löst sich die Sarko-

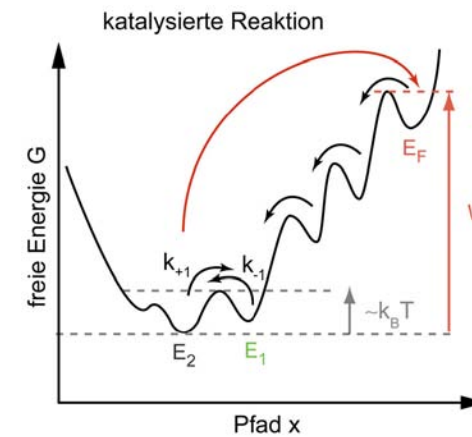
Abb. 6

Schematische Darstellung der enzymatischen Aktivität der Titinkinase. Durch Trunkation des regulatorischen Teils, der die ATP-Bindungstasche verschließt, und durch Imitation des phosphorylierten TYR170 wurden in Referenz [2] aktive Kinasen gewonnen. Der untersuchte Signalweg, der über mehrere Zwischenschritte führt, steuert Proteinumsatz und Muskel-Genexpression. Der erste Schritt der ATP-Bindung, der für die Phosphorylierung von Substraten notwendig ist, findet jedoch in der ursprünglichen Konformation der natürlichen kompletten Titinkinase nicht statt.



merstruktur auf, sodass keine Kraft mehr erzeugt werden kann, was letztlich zum Herzstillstand führt. Es ist also für die Grundlagenforschung und die Medizin von Interesse, den molekularen Aktivierungsmechanismus der kompletten Titinkinase in ihrer natürlichen Proteinumgebung zu entschlüsseln (Abbildung 6). Die Ergebnisse der Erforschung des molekularen Aktivierungsmechanismus finden sich im Kapitel 5 und in der Publikation P1 im Anhang.

Abb. 7



Schematische Darstellung der Energielandschaft eines Enzyms. Durch die thermische Energie ist ein Ensemble von enzymatisch aktiven (E_1) oder inaktiven (E_2) Zuständen erreichbar, was zur „dynamischen Unordnung“ führt. Durch eine externe Kraft wird die Energielandschaft verkippt, und das Enzym nimmt durch die geleistete Arbeit W höherenergetische Zustände ein (E_F). Wirkt die Kraft nicht mehr, so kann das Enzym von dort ins ursprüngliche Gleichgewicht relaxieren.

3.3 Fluktuierende Enzyme

In gleicher Weise wie die Energielandschaft die Konformation und Funktion des mechanisch aktivierten Muskelenzyms Titinkinase bestimmt, erhalten auch andere Enzyme, die keine mechanische Aufgabe erfüllen, durch sie ihre Funktion. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Energielandschaft ein ganzes Ensemble an Konformationen zulassen kann, das durch die thermische Energie höchst dynamisch ist [9, 31, 32]. Diese Umwandlung zwischen verschiedenen Konformationen kann direkt mit der enzymatischen Funktion verbunden [8, 9, 33, 34] und, wie aktuelle Studien zeigen, für die Regulation von Enzymen von Bedeutung sein [31, 32]. In Ensemble-Experimenten sind Enzyme nicht synchronisiert, wodurch ihre zeitlich variierende Aktivität nicht zugänglich ist. Um das Wechseln eines Enzyms zwischen unterschiedlichen funktionellen Zuständen beobachten zu können, muss deshalb die Aktivität einzelner Enzyme beobachtet werden. Dazu wurde in mehreren Studien die Aktivität einzelner Enzyme mit Fluoreszenztechniken wie TIRF oder Konfokaler Mikroskopie beobachtet, indem ein Substrat verwendet wurde, dass als Produkt umgewandelt zu fluoreszieren beginnt [10, 35, 36]. Diese zeigen, dass die untersuchten Enzyme verschiedene Reaktionsraten aufweisen, was im Extremfall zu An- und Auszeiten im Sekundenbereich führt. Erklärt wird dieses als „dynamische Unordnung“ bezeichnete Phänomen durch die Konversion der Enzyme in unterschiedlich aktive Zustände der Energielandschaft, wie in *Abbildung 7* schematisch dargestellt ist. Für eine weitergehende Untersuchung der Energielandschaft einzelner Enzyme bietet sich auch hier die Kraft als externer Parameter an. Durch sie wird die Energielandschaft verkippt, wodurch sich das Gleichgewicht der Zustandsbesetzungen verschiebt. Bei gleichzeitiger Beobachtung der Enzymaktivität kann das mechanische Protokoll mit der Aktivität korreliert werden, wodurch sich verfolgen lässt, wann sich das Enzym wieder im aktiven Zustand befindet. Dieser Ansatz wurde in der vorliegenden Arbeit gewählt, um die Reaktion des Enzyms Candida Antarctica Lipase B (CaLB) auf externe Kräfte zu untersuchen und Einblick in die Konformationsdynamik zu erlangen.

Modellsystem Candida Antarctica Lipase B

Als Modellsystem wurde in dieser Arbeit die Lipase B des arktischen Hefepilzes Candida Antarctica gewählt. Sie zeichnet sich durch hohe Thermostabilität und Stabilität in organischen Lö-

sungsmitteln aus, weshalb sie auch in der industriellen Katalyse Anwendung findet. Triacylglycerollipasen, zu denen CaLB zählt, katalysieren die Hydrolyse von Carboxylesterbindungen in Alkohol und Carbonsäure (*Abbildung 8*). In der Natur erfüllen sie die Aufgabe, vor allem in Fettzellen gespeicherte Energie durch den Abbau von Triglyceriden nutzbar zu machen. Triacylglycerollipasen besitzen neben dem konservierten katalytischen Zentrum eine als „lid“ bezeichnete α -Helix. Sie verschließt meist die Substratbindungstasche, wodurch in Lösung keine enzymatische Aktivität möglich ist. An einer Wasser-Lipid Grenzschicht öffnet sich die Bindungstasche durch eine Konformationsänderung des „lid“, die durch hydrophobe Wechselwirkung induziert wird und die Aktivierung verursacht [37]. In CaLB ist diese Struktur jedoch so schwach ausgebildet, dass das Enzym auch in wässriger Lösung aktiv ist. Die Röntgenstruktur von CaLB zeigt, dass der „lid“ einen hohen b-Faktor³ besitzt, was auf eine hohe Mobilität und Fluktuation dieser Struktur schließen lässt [39]. Die Kristallstruktur von CaLB mit farblich codiertem b-Faktor sowie die katalysierte Reaktion sind in *Abbildung 8* dargestellt. Aktivitätsmessungen an einzelnen immobilisierten Enzymen enthüllten, dass CaLB An- und Auszeiten zeigt und dass die Aktivität nicht durch einen einfachen Poisson-Prozess beschreibbar ist [40, 41]. Der gestreckt-exponentielle Verlauf der Wahrscheinlichkeitsdichte von Auszeiten lässt vielmehr auf ein ganzes dynamisches Ensemble von Zuständen schließen, deren unterschiedliche Katalyseraten den multiexponentiellen Verlauf verursachen [42–44]. Für tiefere Einblicke in die Energielandschaft von CaLB und die interne Dynamik wurden im Rahmen dieser Arbeit Techniken entwickelt, um auf immobilisierte CaLB Enzyme Kräfte auszuüben und gleichzeitig ihre Aktivität zu beobachten. Dadurch wird das Enzym aus dem Gleichgewicht gebracht und besetzt Stellen in der Energielandschaft, die bei Raumtemperatur allein durch die thermische Energie nicht zugänglich sind. Durch den Einbau einer Antikörper-Peptid basierten Sollbruchstelle, die im nächsten Abschnitt vorgestellt wird, konnte in dem Kraftsprung-Experiment gewährleistet werden, dass das Enzym nicht voll entfaltet und nach dem Bindungsbruch relaxieren kann. Das simultane optische Signal erlaubt die gleichzeitige Beobachtung der Aktivität und gibt somit Auskunft, mit welchen Zeiten die Gleichgewichtsverteilung der Zustände wieder erreicht wird. Die gewonnenen Ergebnisse sowie eine Beschreibung der Experimente finden sich im Kapitel 5 und im Manuskript M1 im Anhang.

Abb. 8

Struktur und Katalyse von CalB. Die Röntgenstruktur pdb 1LBS mit farblich codiertem b-Faktor zeigt die katalytische Triade bestehend aus Serin, Histidin und Aspartat. Vor dem katalytischen Zentrum befindet sich eine kleine α -Helix, die durch eine hohe Mobilität auffällt (b-Faktor 95). CalB katalysiert je nach Gleichgewicht die Hydrolyse oder Veresterung.

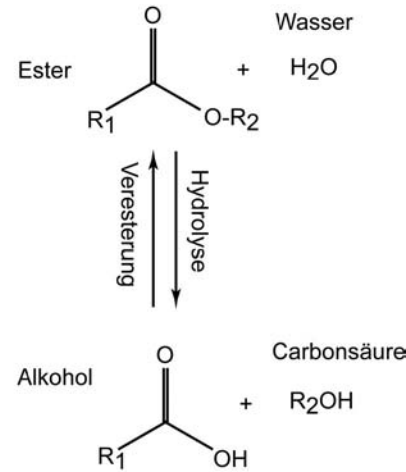
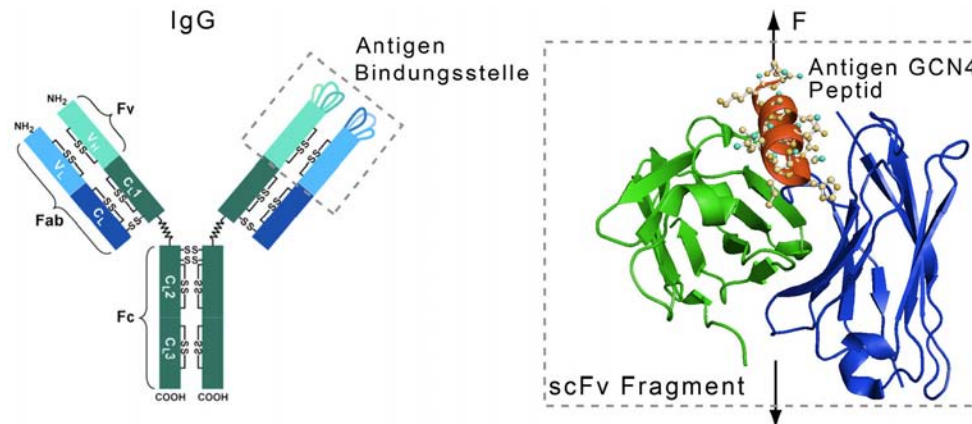


Abb. 9

Darstellung eines IgG Antikörpers und der Kristallstruktur eines scFv Fragmentes mit gebundenem Peptid. Die jeweils zwei identischen leichten und schweren Ketten sind durch Disulfidbindungen miteinander verbunden. Der variable Bereich der leichten Kette V_L und der schweren Kette V_H binden spezifisch das Antigen durch molekulare Erkennung. Sie können isoliert und rekombinant als scFv Fragment gewonnen werden. Die Kristallstruktur pdb 1P4B zeigt solch ein Fragment, welches das Peptid GCN4 bindet und in dieser Arbeit als Sollbruchstelle charakterisiert und eingesetzt wurde.



Antikörper-Peptid basierte Sollbruchstellen für mechanische Manipulation

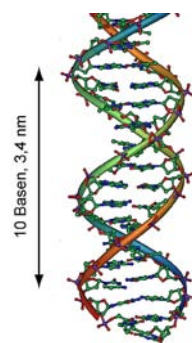
Für die mechanische Manipulation von Enzymen bedarf es molekularer Sollbruchstellen, die durch molekulare Erkennung eine mechanische Verbindung zwischen dem Enzym und z.B. der Spitze eines AFMCantilevers herstellen. Durch die vordefinierte Abrisskraft und Kontaktposition der Sollbruchstelle wird gewährleistet, dass das Enzym nicht komplett entfaltet wird und die Kraft immer in der gleichen Geometrie wirkt. Nach dem Abriss ist die Sollbruchstelle im Ausgangszustand und steht für einen weiteren Messzyklus zur Verfügung. Zwar eignet sich DNA für diesen Zweck hervorragend, da sie frei programmierbar ist und spezifisch bindet, aufgrund der Schwierigkeit, sie an definierten Stellen von Proteinen anzukoppeln, wurde jedoch in dieser Arbeit eine Antikörper-Peptid basierte Sollbruchstelle charakterisiert und für die mechanische Manipulation von CalB eingesetzt. Die häufigste Form von Antikörpern sind die IgG Proteine (Abbildung 9). Sie bestehen aus zwei gleichen schweren Ketten und zwei gleichen leichten Ketten, die über Disulfide miteinander verbunden sind und so die typische Y-Form ergeben. Die leichte und die schwere Kette besitzen jeweils einen variablen Bereich V_L und V_H , die für die spezifische Erkennung des Antigens verantwortlich sind. Dieses als scFv abgekürzte Fragment ist somit der kleinste spezifische Teil eines Antikörpers, der rekombinant z. B. im Bakterium e.coli hergestellt werden kann [45]. Ein großer Vorteil gegenüber direkt aus Tiereserum gewonnenen Antikörpern ist, dass sie aus Gendatenbanken auswählbar sind und ihre Bindungseigenschaften durch Mutationen verändert werden können [46]. Besonders geeignet als Sollbruchstelle sind Antikörperfragmente, die eine kurze Peptidsequenz binden. Denn das Peptid kann als Fusionsprotein an Enzyme oder andere Proteine angehängt exprimiert werden. Zudem ist die Peptidsequenz mutierbar, um unterschiedliche Sollbruchkräfte zu erhalten. Die Bindungsaffinität der in dieser Arbeit verwendeten Antikörperfragment-Peptid-Wechselwirkung wurde in Referenz [47] bestimmt und verschiedene Varianten von scFv Fragmenten wurden auf ihre mechanischen Eigenschaften mit AFM basierter Kraftspektroskopie untersucht [1]. Für diese Arbeit wurde die Bindung dieser Antikörper-Peptid-Wechselwirkung kraftspektroskopisch weiter charakterisiert und für die mechanische Manipulation an CalB eingesetzt. Die Ergebnisse finden sich im Kapitel 5, in Publikation P2 und im Manuskript M1 im Anhang.

BEOBACHTUNG UND 3D-KONTROLLE EINZELNER BIOMOLEKÜLE

Um einzelne Biomoleküle zu kontrollieren und zu beobachten, bedarf es einerseits präziser und sensibler Positionier- und Messmethoden, und andererseits der Spezifität der molekularen Erkennung. In diesem Kapitel werden die in dieser Arbeit weiterentwickelten experimentellen Einzelmolekültechniken kurz vorgestellt und eine Einführung zur molekularen Erkennung von DNA gegeben. Die darauf basierende „Single-Molecule Cut-and-Paste“-Technik erweitert die kraftspektroskopische vertikale Kontrolle von Biomolekülen um ihre gezielte laterale Positionierung.

4.1 Rasterkraft- und TIRF Mikroskopie

Die mechanische Kontrolle und Positionierung von einzelnen Biomolekülen in allen drei Raumrichtungen erfolgt mit einem Rasterkraftmikroskop, das auf der Erfindung des „Atomic Force Microscope“ von Binnig, Quate und Gerber basiert [48]. Das Prinzip des Rasterkraftmikroskops beruht auf einer sehr sensiblen Blattfeder, an deren Ende sich eine feine Spitze mit einem Krümmungsradius im 10 nm-Bereich befindet. Diese Spitze kann mit Piezos in allen drei Raumrichtungen mit Nanometer Präzision bewegt werden, um Moleküle zu kontaktieren, Kräfte auf sie auszuüben oder sie zu positionieren. Die Kraft wird dabei über die Verbiegung der Blattfeder mit einem Lichtzeiger so genau bestimmt, dass molekulare Wechselwirkungskräfte im pN-Bereich detektierbar sind. Mit den aufgezeichneten Kraft-Abstandskurven können Wechselwirkungskräfte bestimmt, die Position von Energiebarrieren in charakteristischen Entfaltungsmustern vermessen und sogar das Binden von Liganden an Proteine beobachtet werden. Die Kombination mit TIRF-Mikroskopie (Total Internal Reflection Fluorescence) ermöglicht die gleichzeitige Beobachtung von Einzelmolekülfluoreszenz. Der Anregungslaser wird dabei über das Objektiv so eingekoppelt, dass er vom Mikroskopdeckglas an der Glas-Wasser-Grenzfläche total reflektiert wird. Dadurch entsteht im Probenvolumen ein exponentiell abklingendes Anregungsfeld mit einer Eindringtiefe im 100 nm-Bereich. Die Unterdrückung der Hintergrundfluoreszenz des restlichen Volumens erlaubt die Beobachtung von Einzelmolekülfluoreszenz auf der Oberfläche. So wurde in dieser Arbeit die Assemblierung von Nanostrukturen und die Aktivität des Enzyms CalB beobachtet. Die Konstruktion und Weiterentwicklung dieses kombinierten AFM-TIRFHybrids ist zwar Teil dieser Arbeit, aufgrund des technischen Charakters ist jedoch die ausführlichere Beschreibung im Anhang, in der Publikationen P3 und im Manuskript M2 zu finden.



4.2 Nanoassemblierung durch molekulare Erkennung

DNA als programmierbarer Baustein Die Desoxyribonucleinsäure (DNA) ist Träger der genetischen Erbinformation und somit eines der wichtigsten Moleküle, auf dem das Leben basiert. Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass sich die DNA durch besondere Eigenschaften wie Robustheit, Spezifität und Einfachheit auszeichnet. Aufgrund der sequenzspezifischen molekularen Erkennung wurde DNA in der Nano-Biotechnologie als Baustein entdeckt und wird auch in dieser Arbeit für die gezielte Nanoassemblierung verwendet. Ein DNA Einzelstrang setzt sich aus den vier verschiedenen Basen Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C) zusammen, die über ein Zucker-Phosphat-Rückgrat miteinander kovalent verbunden sind. Watson und Crick konnten durch Röntgenstrukturanalyse zeigen, dass sich jeweils zwei DNA-Stränge zu einer Doppelhelix zusammenlagern [49], wobei sich jeweils zwischen den gegenüberliegenden Basen A–T und G–C Wasserstoffbrücken ausbilden und so zur sequenzspezifischen Stabilisierung führen⁴. Die beiden Stränge sind dabei antiparallel zueinander ausgerichtet, sodass jeweils das 5'-Ende dem 3'-Ende gegenüberliegt und umgekehrt (siehe Abbildung 10).

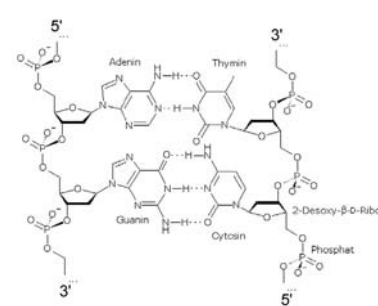


Abb. 10

Struktur von DNA. Zwei komplementäre DNA-Stränge lagern sich über die spezifischen Basenpaarungen zu einer Doppelhelix zusammen. Dabei bilden jeweils Adenin und Thymin zwei Wasserstoffbrücken miteinander aus und Guanin und Cytosin jeweils drei. Abbildung nach: <http://de.wikipedia.org/wiki/Desoxyribonucleinsäure>

4

Misspaarungen destabilisieren die Doppelhelix zwar, führen aber, je nach ihrer Anzahl, nicht unbedingt zur Dissoziation.

Diese Fähigkeit komplementärer DNA-Stränge miteinander zu hybridisieren, wird für die spezifische Anbindung von Bausteinen oder zur Selbstassemblierung komplexer Strukturen aus DNA ausgenutzt. Wichtig für die schnelle Entwicklung auf diesem Gebiet sind industriell verwendete biotechnologische Methoden, mit denen bis zu 200 Basen lange DNA-Stränge mit beliebiger Sequenz künstlich synthetisiert werden können. Auch interne Modifikationen wie Farbstoffmarkierungen oder spezifische Bindungsstellen können so per Katalog bestellt werden. Die Vielseitigkeit auf dem Gebiet der DNA-basierten Selbstassemblierung zeigt die Erzeugung von Würfeln [50], Oktaedern [51], Röhren [52] oder zweidimensionalen Gittern [53]. Dabei hybridisieren DNA-Stücke mit speziell programmierter Sequenz so, dass überlappende, „klebrige“ Enden entstehen, an die wiederum weitere Stränge binden können. In einem darauf aufbauenden und mit DNA-Origami neu benannten Gebiet wird ein langer DNA-Strang durch viele kleine DNA-Stränge in eine bestimmte Form gefaltet und stabilisiert. Die DNA-Sequenzen für bestimmte Strukturen wie Smilies oder Kontinente können mit Computerprogrammen vorher bestimmt und dann über Selbstassemblierung erzeugt werden [54]. DNA kann aber auch für die Selbstorganisation von anderen Bausteinen, wie beispielsweise Nanopartikeln, verwendet werden [55]. Die Bausteine werden mit den entsprechenden DNA-Strängen funktionalisiert, und je nach Anbindungsichte können sich Dimeren oder ganze Kristallstrukturen bilden [56–58].

Hierarchische Trennkräfte von DNA für gezielte Nanoassemblierung

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Strategie zur AFM-basierten Assemblierung einzelner funktioneller Einheiten, auch Single Molecule Cut-and-Paste (SMCP) genannt, kombiniert die molekulare Erkennung von DNA mit der Präzision des AFM. Die spezifische Hybridisierung von DNA dient dabei zur Verankerung, zum Aufgreifen und zum Absetzen der Transport-DNA. Entscheidend für den Transport sind dabei die verschiedenen Trennkräfte, die durch unterschiedliche Belastungsgeometrien und die Sequenzlänge der DNA bestimmt werden. Wie in *Abbildung 11* schematisch dargestellt, sind in einem Depotbereich 30 Basen lange DNA-Oligomere kovalent über einen Polyethylenglycol-Spacer (PEG) an der Oberfläche verankert. Sie hybridisieren an die 30 Basen lange Ankersequenz der Transport-DNA und dienen so ihrer Speicherung. Die Transport-DNA besitzt

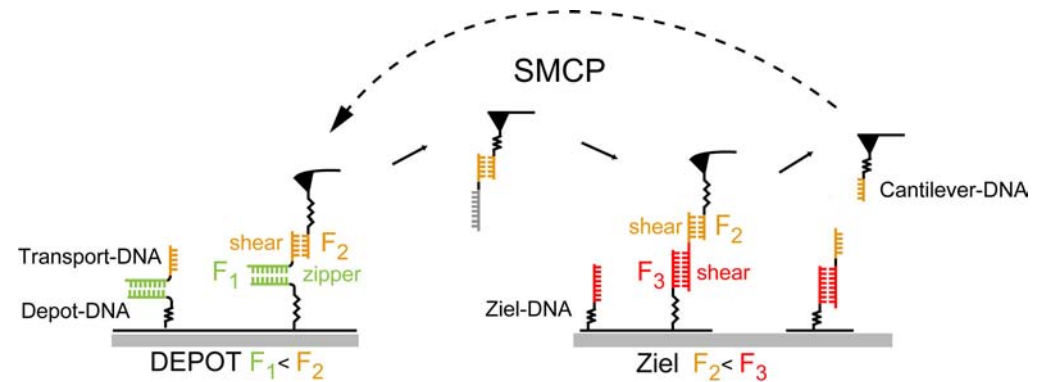


Abb. 11

Hierarchische Trennkräfte von DNA für SMCP. Im Depot ist die 30 Basen lange Depot-DNA über PEG kovalent an der Oberfläche befestigt, um mit der Ankersequenz der Transport-DNA in der „zipper“-Geometrie zu hybridisieren (Trennkraft F_1).

Die so gespeicherte Transport-DNA kann mit ihrer Transportsequenz an die 20 Basen lange Cantilever-DNA in der „shear“-Geometrie, die höhere Trennkräfte aufweist (F_2), hybridisieren. Nach dem Zurückziehen des Cantilevers wird die Transport-DNA an eine definierte Stelle im

Ziel transportiert, wo sie über die 30 Basen lange Ankersequenz mit der Depot-DNA hybridisiert – diesmal jedoch ebenfalls in der „shear“-Geometrie und mit der größten Trennkraft F_3 . Dadurch bleibt sie beim Zurückziehen des Cantilevers im Ziel verankert.

zudem einen überlappenden Teil mit den 20 Basen der Transportsequenz, die komplementär zur ebenfalls kovalent angebondenen Cantilever-DNA ist. Wird die Spitze nun in Kontakt mit dem Depotbereich gebracht, hybridisiert der Teil der Transportsequenz mit der Cantilever-DNA in der „shear“-Geometrie [1, 59]. In dieser Geometrie wirkt die Kraft auf die gegenüberliegenden Enden des Duplexes. Obwohl der Duplex mit der Ankersequenz mehr Basen besitzt, ist er unter der aufgebauten Kraft beim Zurückziehen des Cantilevers instabiler als der Duplex mit der Cantilever-DNA, da er in der sogenannten „unzipper“-Geometrie belastet wird [60–62]. Der anschauliche Grund liegt darin, dass beim „unzippen“ der DNA die Kraft am gleichen Ende des Duplexes angreift und somit ein Basenpaar nach dem anderen getrennt wird. Die Arbeit zum Trennen wird deshalb über

5

Die Kräfte für A-T liegen wegen der zwei ausgebildeten Wasserstoffbrücken etwas niedriger bei ca. 10 pN, die Kräfte für G-C dementsprechend etwas höher bei ca. 20 pN.

6

Aufgrund des statistischen Prozesses muss prinzipiell mit Wahrscheinlichkeiten gerechnet werden. Die Dissoziationsrate der 20 Basen langen DNA ist laut Referenz [1] $k_0 = 6 \cdot 10^{-13} \text{ 1/s}$ und die Potentialweite $\Delta x = 2,7 \text{ nm}$. Die Rate unter dem 17 pN-Kraftplateau ist nach der Gleichung aus Kapitel 3.1 $k(17\text{pN}) = 4.4 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, was viele Größenordnungen von der ziehgeschwindigkeitsbestimmten Dissoziationsrate der zipper-Geometrie von ca. 33 s^{-1} entfernt ist.

5.0

ERGEBNISSE

Nachdem in den vorigen Kapiteln eine Einführung in die biologischen und biophysikalischen Fragestellungen sowie in die dafür verwendeten und weiterentwickelten Techniken gegeben wurde, werden nun die Ergebnisse dieser Arbeit zusammengefasst.

eine wesentlich längere Strecke als bei der „shear“-Geometrie verrichtet, weshalb die resultierende Kraft ein Plateau bei ca. 17 pN⁵ zeigt. Die Transport-DNA bleibt so mit fast 100 prozentiger Wahrscheinlichkeit an der Cantilever-DNA verankert und kann zur vorbestimmten Position in der Zielregion transportiert werden⁶. Die Ziel-DNA ist, wie im Depotbereich, kovalent an die Oberfläche angebunden und besitzt die gleiche Ankersequenz, jedoch ist sie mit dem anderen Ende angebunden. Wird der Transportstrang in Kontakt gebracht, hybridisiert die freie Ankersequenz mit den 30 Basen der Ziel-DNA, diesmal jedoch aufgrund der anderen Orientierung in der „shear“-Geometrie. Beim Zurückziehen des Cantilevers ist nun der 10 Basen längere Anker-Duplex mit der Ziel-DNA stärker, sodass der Transport-Duplex mit wesentlich höherer Wahrscheinlichkeit reißt, die Transport-DNA im Ziel verankert bleibt und die Cantilever-DNA wieder frei für den nächsten Zyklus ist. Auf diese Weise wurden verschiedenste Strukturen aus einzelnen DNA Strängen erzeugt, wobei als funktionelle Einheiten Farbstoffe oder spezifische Bindungsstellen an die Transport-DNA gebunden wurden. Die gleichzeitige optische Beobachtung der so erzeugten Strukturen mit TIRF-Mikroskopie lieferte zusätzlich eine optische Kontrolle und weitere Untersuchungsmöglichkeiten der erzeugten Strukturen. Die Charakterisierung und die Ergebnisse finden sich im Kapitel 5 und in den Publikationen P4–P6.

5.1 Der molekulare Kraftsensor Titinkinase

Im einführenden Kapitel 3 wurde dargestellt, dass sich die Titinkinase im Titin an idealer Position befindet, um Kräfte zu detektieren. Jedoch ist sie durch einen dualen Mechanismus autoinhibiert: Die α -Helix $\alpha R2$ blockiert die ATP Bindungstasche und TYR170 blockiert in nichtphosphoryliertem Zustand die katalytische Base ASP127. Um die Funktion und den molekularen Mechanismus der Titinkinase zu erforschen, wurden einzelne Titinkinasen mit ihren natürlichen Nachbardomänen, den Immunoglobulin (Ig)- und Fibronectin-Domänen (Fn), kraftspektroskopisch untersucht. Das untersuchte Proteinkonstrukt stammt aus dem Labor von Prof. Mathias Gautel am King's College London.

Kraftinduzierte Entfaltungscharakteristik einzelner Titinkinase-Proteinkonstrukte

Im Zyklus eines kraftspektroskopischen Experimentes wird die Spitze eines AFM-Cantilevers in Kontakt mit dem Protein gebracht, das vorher auf einer Goldoberfläche unspezifisch angebunden wurde. Beim Zurückziehen des Cantilevers wird das Protein gedehnt, wobei als Messsignal Kraft- Abstandskurven aufgezeichnet werden (Abbildung 12). Am Anfang der Kraft-Abstandskurve wird das Proteinkonstrukt gestreckt, bis die schwächsten Wechselwirkungen brechen und Kraftpeaks bei ca. 50 pN verursachen (orange). Im weiteren Verlauf ist das charakteristische Sägezahnmuster erkennbar (blau), das fünf gleichmäßige Konturlängeninkremente ΔL aufweist und durch das Entfalten der fünf Ig/Fn-Domänen verursacht wird, die die Titinkinase umrahmen. Somit wird der in orange eingefärbte Teil am Anfang der Kraftkurve durch das Entfalten der Titinkinase verursacht. Zwar wird das Proteinkonstrukt an willkürlichen Stellen kontaktiert, sodass in vielen Messkurven nicht das komplette Entfaltungsprofil erkennbar ist. Der Fingerabdruck der Ig/Fn-Domänen erlaubt jedoch die Selektion der Kurven, in denen die Entfaltung der kompletten Titinkinase enthalten ist. In all diesen Kraftkurven entfaltet die Titinkinase vor den strukturellen Ig/Fn-Domänen, was Voraussetzung für den molekularen Kraftsensor ist. Im Gegensatz zu den unabhängig entfaltenden Ig/Fn-Domänen, ist die Reihenfolge der Entfaltungsereignisse innerhalb der Titinkinase trotz vergleichbarer Kräfte immer gleich und somit topologisch vorgegeben.

Abb. 12

Kraftspektroskopisches Experiment mit dem Titinkinase-Proteinkonstrukt. Am Anfang der Kraft-Abstandscurve wird das Protein mit freier Konturlänge L_0 gedehnt, bis die Titinkinase bei Kräften unter 50 pN sequenziell entfaltet (orange) und insgesamt eine freie Konturlänge L_1-L_0 von 121 ± 2 nm aufweist. Danach entfalten die fünf umliegenden Ig/Fn-Domänen mit einem mittleren Konturlängeninkrement ΔL von 30.5 ± 0.6 nm (blau).

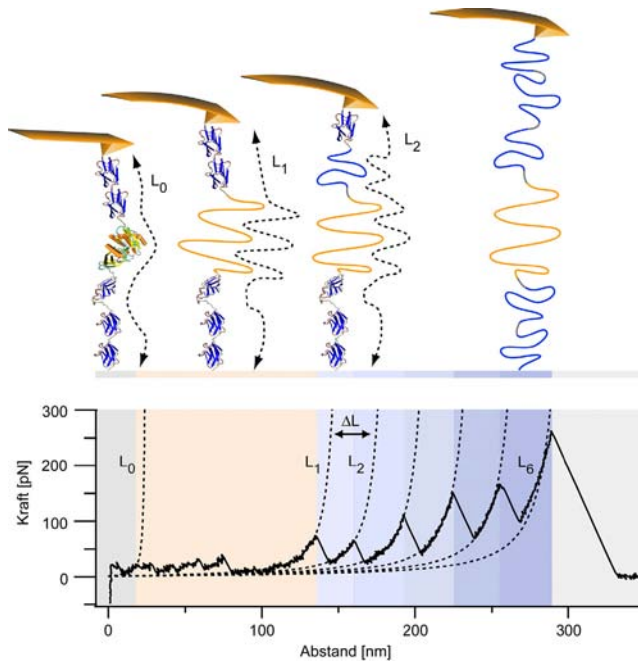
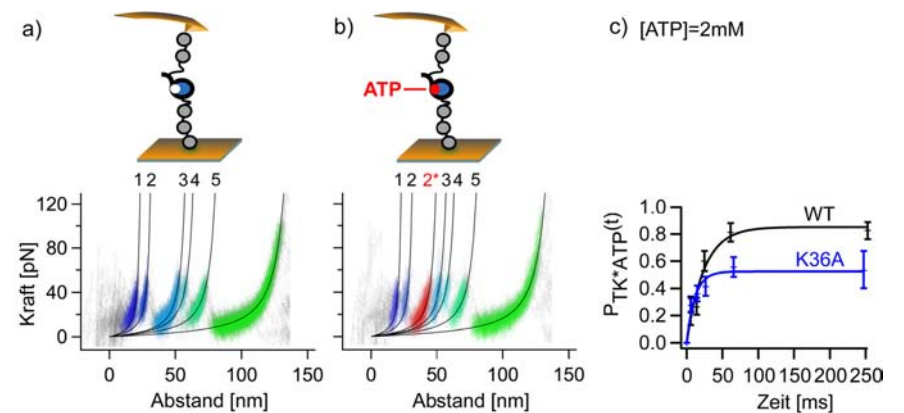


Abb. 13

Mechanisch aktivierte ATP-Bindung. In Anwesenheit von ATP sind in der Überlagerung der Kraft-Abstandscurven zwei Entfaltungsmuster erkennbar. In a) (66 Kurven) werden die gleichen 5 Energiebarrieren wie in Abwesenheit von ATP beobachtet. Jedoch zeigt ein bestimmter Teil an Kraftkurven in b) eine zusätzliche Energiebarriere (44 Kurven), die durch das Binden von ATP und die Stabilisierung der Bindungstasche verursacht wird.

c) zeigt die Bindungskinetik von ATP an die Wildtyp Titinkinase (WT) und an die Mutante K36A. Die relative Häufigkeit der Bindung hängt stark von der Öffnungszeit der Bindungstasche ab, die durch die Entfaltungsgeschwindigkeit kontrolliert wird. Für die Kinetik wurden über 1700 einzelne Messkurven verwendet, und die Fehler geben das 95% Konfidenzintervall der jeweiligen Stichprobe an.



Mechanisch aktivierte ATP-Bindung

Das komplette Entfaltungsmuster der Titinkinase ist durch Überlagerung von 66 Kraft-Abstandscurven in *Abbildung 13* dargestellt. Es zeigt die insgesamt fünf Energiebarrieren, die in jeder Kurve mit der gleichen Reihenfolge auftreten. In Anwesenheit von 2 mM ATP weist jedoch ein bestimmter Anteil an Kraftkurven eine zusätzliche Energiebarriere auf, die ohne ATP nicht beobachtet wird. Da die native Konformation der Titinkinase kein ATP bindet, ist dies ein erster Hinweis, dass ATP mechanisch induziert in die geöffnete Titinkinase bindet und durch die Wechselwirkung mit der Bindungstasche eine zusätzliche Energiebarriere verursacht. Der molekulare Mechanismus der ATP-Bindung kann durch den Zugang zur Bindungskinetik geklärt werden. Falls die Bindungstasche mechanisch geöffnet wird, sollte die relative Häufigkeit des ATP-Bindens einer Nichtgleichgewichtskinetik folgen und von der Zeit abhängen, in der die Bindungstasche geöffnet, aber noch nicht entfaltet ist. Wird die Hin- und Rückrate mit k_{hin} bzw. $k_{\text{rück}}$ und die ATP-Konzentration mit $[\text{ATP}]$ bezeichnet, dann folgt die zeitabhängige Wahrscheinlichkeit der ATP-Bindung $P_{\text{ATP}}(t)$ nach Öffnen der Bindungstasche der Gleichung:

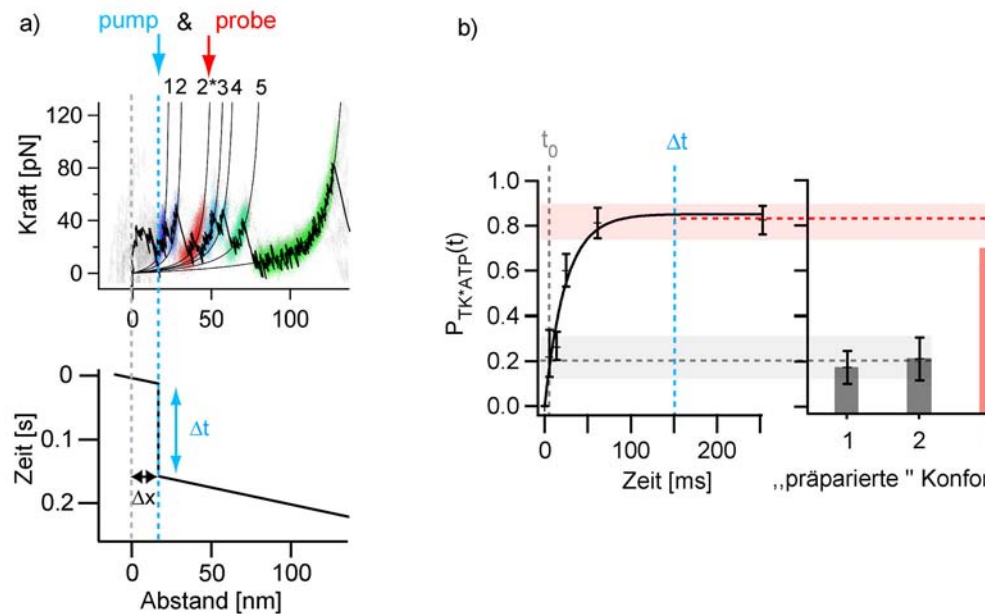
$$\frac{dP_{\text{ATP}}(t)}{dt} = k_{\text{on}}[\text{ATP}] - k_{\text{off}}P_{\text{ATP}}(t)$$

mit der Lösung:

$$P_{\text{ATP}}(t) = \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{on}} + k_{\text{off}}} \left(1 - e^{-(k_{\text{on}} + k_{\text{off}}) \cdot t} \right)$$

Die Öffnungszeit der Bindungstasche wurde aus der Ziehgeschwindigkeit und der Längenänderung bestimmt, in der die Bindungstasche geöffnet, aber noch nicht zerstört ist. Molekulardynamik-Simulationen zeigen, dass diese Längenänderung etwa 18 nm entspricht.

Ist jedoch ATP von Anfang an und nicht mechanisch induziert gebunden, sollte die relative Häufigkeit der Bindung nicht von der Öffnungszeit der Bindungstasche abhängen. Da die Konformation der Titinkinase durch den Abstand des Cantilevers von der Oberfläche kontrolliert wird, kann diese Öffnungszeit über die Ziehgeschwindigkeit reguliert werden. Tatsächlich wurde eine starke Abhängigkeit der ATP-Bindung von der Öffnungszeit der Bindungstasche⁷ beobachtet, die dem Verlauf der Nichtgleichgewichtskinetik folgt. Dieses Ergebnis zeigt, dass dieser erste und notwendige Schritt zur katalytischen Aktivität der Titinkinase durch eine kraftinduzierte Konformationsänderung erfolgt. Darüber hinaus konnten durch Fitten der Daten die Hin- und Rückraten der ATP-Bindung, und daraus die Gleichgewichtskonstante bestimmt werden. Experimente mit einer Mutante, bei der Lysin-36 (LYS36) zu Alanin mutiert wurde, zeigen eine mehr als sechsfach höhere Rückrate der ATP-Bindung und eine Dissoziationskonstante im millimolaren Bereich (siehe Abbildung 13). Das konservierte LYS36 ist somit auch bei der Titinkinase eine für die ATP Bindung essenzielle Aminosäure.



Lokalisierung des aktiven Zustandes durch mechanisches „pump-and-probe“

Die Bindungskinetik von ATP zeigt, dass die Bindungstasche der Titinkinase mechanisch geöffnet wird, und dass LYS36 eine wichtige Aminosäure für das Binden von ATP ist. Aber nach welcher der Energiebarrieren wird die aktive Konformation erreicht? Um dies herauszufinden wurde ein kraftspektroskopisches Messprotokoll entwickelt, das sowohl die Nichtgleichgewichtskinetik als auch die Konformationskontrolle der Titinkinase durch den AFM-Cantilever ausnützt. Wegen der Analogie der Herangehensweise zu optischen „pump-and-probe“-Experimenten wird die entsprechende Nomenklatur verwendet: ein bestimmter Zustand der Titinkinase wird mechanisch für die Zeit Δt präpariert, und die daraus folgende Reaktion durch die ATP-Bindung wird mechanisch anhand der Barriere 2* ausgelesen. In *Abbildung 14* ist dargestellt, wie bei diesem mechanischen „pump-and-probe“-Experiment die Titinkinase bis vor eine bestimmte Energiebarriere entfaltet und die entsprechende Konformation für eine bestimmte Zeit Δt präpariert wird. Während dieser Zeit hat das ATP die Möglichkeit zu Binden. Danach wird die Titinkinase weiter entfaltet, um mit der Energiebarriere 2* auszulesen, ob ATP gebunden hat oder nicht. Falls der Zeitpuls Δt in der inaktiven Konformation gesetzt wurde, wird aufgrund der endlichen Ziehgeschwindigkeit von 2 $\mu\text{m/s}$ nur eine geringe relative Häufigkeit

Abb. 14 Mechanisches „pump-and-probe“.

a) Die Titinkinase wird bis vor eine bestimmte Energiebarriere entfaltet, wo sie für die Zeit Δt die Möglichkeit hat ATP zu binden. Bei weiterer Entfaltung wird mit Barriere 2* ausgelesen, ob ATP gebunden hat. Die präparierte Konformation kann durch Vorgabe von Δx variiert werden.

b) Anhand der Nichtgleichgewichtskinetik der ATP-Bindung können die verschiedenen Konformationen auf Aktivität untersucht

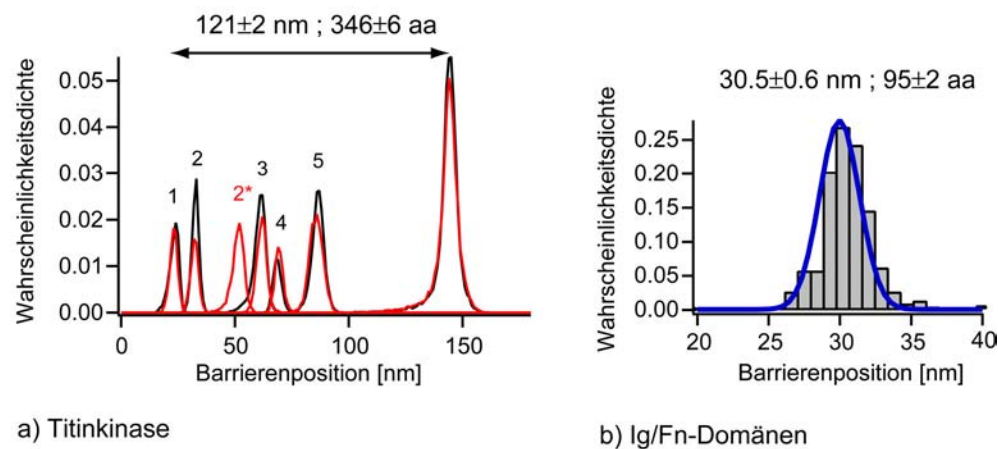
werden. Konformation 1 (vor der 1. Barriere) und 2 (zwischen der 1. und 2. Barriere) weisen lediglich die relative Grundhäufigkeit der ATP-Bindung auf, die durch die endliche Ziehgeschwindigkeit, und somit durch die Grundöffnungszeit t_0 verursacht wird. Konformation 3 (nach der 2. Barriere) zeigt im Rahmen des Fehlers die dem Zeitpuls Δt entsprechende relative Häufigkeit der ATP-Bindung. Die ATP-Bindungstasche wird somit nach der 2. Energiebarriere geöffnet.

figkeit für die ATP-Bindung erwartet. Denn $2 \mu\text{m/s}$ entsprechen einer Grund-Öffnungszeit t_0 von 10 ms , was in einer relativen Grundhäufigkeit von ca. 0.2 resultiert. Wird jedoch die aktive Konformation präpariert, so sollte die relative Häufigkeit stark zunehmen und entsprechend dem Zeitpuls von 150 ms einen Wert von ca. 0.8 erreichen. Die Variation des präparierten Zustandes erfolgt durch die Position Δx , wodurch jede Konformation vor der Barriere 2^* auf Aktivität überprüft werden kann. In *Abbildung 14 b)* sind die Ergebnisse dieser Experimente dargestellt. Wird vor Barriere 1 und zwischen Barriere 1 und 2 präpariert, so beträgt die relative Häufigkeit der ATP-Bindung wegen der Grundöffnungszeit t_0 0.19 ± 0.07 bzw. 0.2 ± 0.1 . Diese Konformationen sind somit nicht aktiv, und die Bindungstasche der Titinkinase ist verschlossen. Wird jedoch zwischen Position 2 und 3 präpariert, so erhöht sich die relative Häufigkeit der ATP-Bindung drastisch auf 0.7 ± 0.1 . Dieser Wert stimmt im Rahmen des Fehlers mit dem erwarteten Wert bei einem Zeitpuls von 150 ms überein. Somit wird die Bindungstasche der Titinkinase erst nach der zweiten Energiebarriere geöffnet.

Strukturelle Untersuchung des molekularen Aktivierungsmechanismus

Um die verschiedenen Entfaltungs- und Aktivitätszustände strukturell zuordnen zu können, müssen die während der Entfaltung überwundenen Energiebarrieren mit hoher Präzision vermessen werden. Dazu wurden die Kraft-Abstandskurven mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode in Histogramme transformiert, die direkt die Positionen der Energiebarrieren entlang der Konturlänge zeigen (*siehe Abbildung 15*, Anhang und Publikation P3). Mit Berücksichtigung des Proteindurchmessers [22], der aus der Kristallstruktur bekannt ist, konnte so die Anzahl gefalteter Aminosäuren der Titinkinase und der Ig/Fn-Domänen bestimmt werden. Für die Titinkinase, die einen Durchmesser von 5.5 nm besitzt, ergibt sich bei einer Aminosäurenlänge von 0.365 nm die experimentelle Anzahl von Aminosäuren zu $(5.5 \text{ nm} + (121 \pm 2) \text{ nm}) / 0.365 \text{ nm} = 346 \pm 6$. Dieses Ergebnis stimmt mit der tatsächlichen Anzahl von 344 Aminosäuren gut überein. Die gleiche Rechnung führt bei einem mittleren Durchmesser der Ig/Fn-Domänen von 4.3 nm zu 95 ± 2 Aminosäuren, was mit dem Mittelwert von 96 gefalteten Aminosäuren ebenfalls gut übereinstimmt. Somit wurde gezeigt, dass die Energiebarrieren entlang der freien Konturlänge mit einer Genauigkeit bis auf 2% bestimmt werden können, was, je nach betrachteter Länge, in der Größenordnung einiger Aminosäuren liegt. Für die strukturelle Untersuchung der Titinkinase wurden am Max-Planck Institut

Abb. 15 Histogramme der Barrierenpositionen, gemessen als freie Konturlänge.



a) Die Konturlängeninkremente der Titinkinase betragen ohne ATP (schwarz) $9.1, 28.6, 7.3, 18.0$ und 57.9 nm , und mit ATP (rot) $9.1, 19.4, 10.1, 7.5, 16.4$ und 58.3 nm , wobei der relative Fehler 2% beträgt. Die experimentell bestimmte Anzahl an gefalteten Aminosäuren beträgt 346 ± 6 , was mit dem tatsächlichen Wert von 344 gut übereinstimmt.

b) Das mittlere Konturlängeninkrement der Ig/Fn-Domänen beträgt $30.5 \pm 0.6 \text{ nm}$, was 95 ± 2 Aminosäuren entspricht und ebenfalls mit dem tatsächlichen Wert von 96 gut übereinstimmt. Für die Transformation wurde das QM-WLC-Modell mit einer Persistenzlänge von $0,8 \text{ nm}$ verwendet. Die Konturlängenhistogramme in a) wurden durch Transformationen von 66 Kraftkurven (ATP) bzw. 44 Kraftkurven (kein ATP) erzeugt, und das Histogramm in b) durch Fitten von 250 Ig/Fn-Domänen.

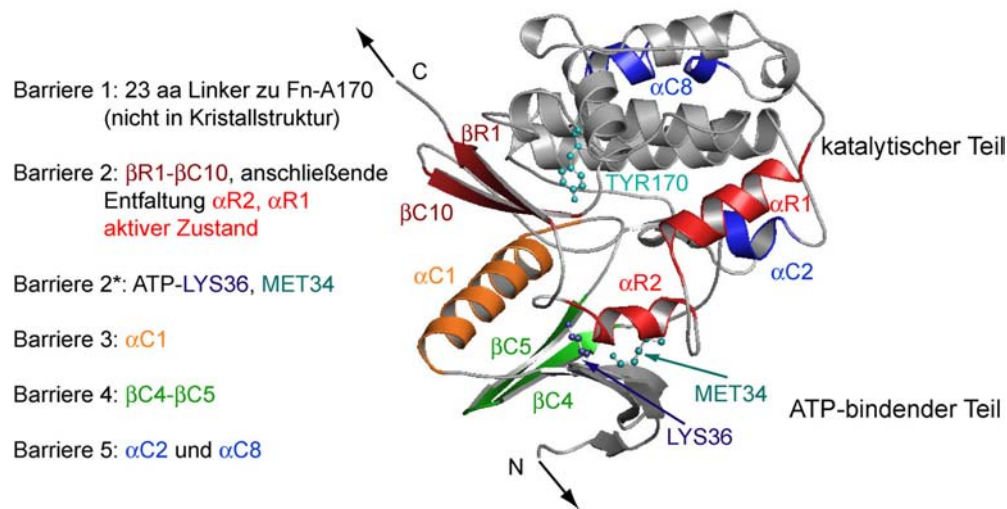


Abb. 16

Strukturelle Zuordnung der experimentell beobachteten Energiebarrieren nach MDSimulationen (PDB 1TKI). Bei Barriere 1 wird der 23 Aminosäuren lange Linker zur Domäne Fn-A170 entfaltet (nicht in Kristallstruktur vorhanden). Barriere 2 wird durch $\beta R1$ - $\beta C10$ verursacht danach wird $\alpha R2$ und $\alpha R1$ entfaltet, wodurch der aktive Zustand erreicht wird. Die ATP-Barriere 2* entsteht vor allem durch Wechselwirkung mit LYS36 und MET34, und Barriere 3 wird durch die Helix $\alpha C1$ verursacht. Barriere 4 ist $\beta C4$ - $\beta C5$ zugewiesen und Barriere 5 entsteht letztlich durch den kombinierten Effekt von $\alpha C2$ und $\alpha C8$.

Eine 3D-Animation der Muskelfunktion und der mechanischen Aktivierung der Titinkinase, die auf den Ergebnissen dieser Arbeit basiert, steht auf der Autorenhomepage zur Ansicht bereit. <http://www.elias-puchner.de/zusatzmaterialien.html>

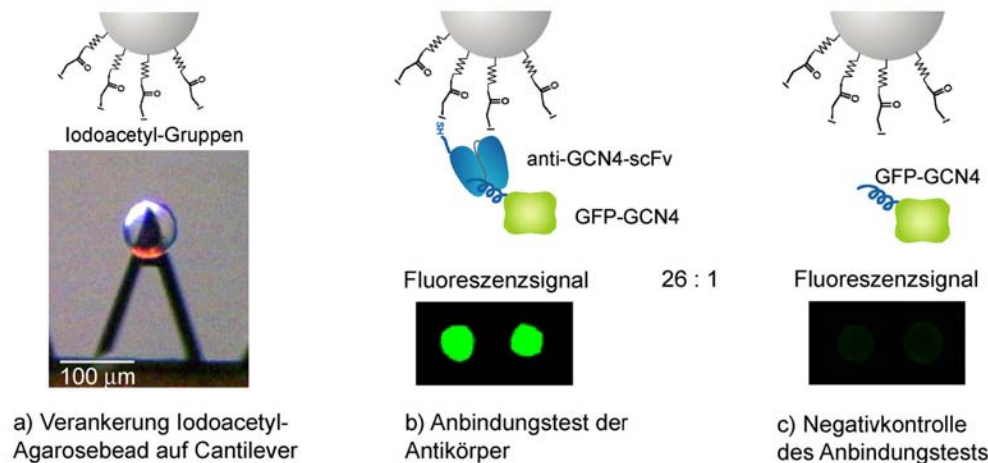
Göttingen unter der Leitung von Helmut Grubmüller Molekular-dynamik-Simulationen durchgeführt. Durch Entfalten der Titin-kinase mit einer virtuellen Feder wurden dabei die Bewegungen aller Atome von der Kristallstruktur ausgehend simuliert. Die auftretenden Energiebarrieren, die ebenfalls in Kraft- Abstands-kurven sichtbar werden, konnten erfolgreich mit den experimentellen Barrierepositionen korreliert werden. Dadurch sind die strukturellen Veränderungen während der Entfaltung und die strukturellen Ursachen der Energiebarrieren mit atomarer Auflösung bekannt. Auch die zusätzliche Energiebarriere 2*, die beim Binden von ATP beobachtet wird, konnte erfolgreich simuliert werden. Die Hauptwechselwirkungen liegen dabei zwischen ATP und LYS36 (wie auch im Experiment gezeigt wurde) und zwischen ATP und MET34 Auf diese Weise konnte der komplette experimentell beobachtete Entfaltungsweg der Titinkinase strukturell rekonstruiert werden. Details dazu finden sich in der Publikation P1, hier soll nur eine Zusammenfassung gegeben werden: Bis Barriere 1 wird das komplett gefaltete Proteinkonstrukt gedehnt, wobei die addierten Durchmesser aller Domänen eine Länge von 26.8 nm beitragen. Bei Barriere 1 wird der 23 Aminosäuren lange N-terminale Linker zur Domäne Fn-A170 entfaltet. Bei Barriere 2 wird der regulatorische Teil, der die Bindungstasche verschließt, entfaltet. Dabei bricht zuerst das β -Faltblatt $\beta R1$ - $\beta C10$, woraufhin die α -Helices $\alpha R2$ und $\alpha R1$ entfalten und die Bindungstasche freigeben. Bindet ATP, so verursacht seine Wechselwirkung vor allem mit LYS36 und MET34 die Barriere 2*. Barriere 3 und 4 werden von der Entfaltung von $\alpha C1$ und $\alpha C4$ - $\alpha C5$ verursacht, und $\alpha C2$ und $\alpha C8$ resultieren gemeinsam in Barriere 5. Die Aminosäureketten der entfaltenen Strukturelemente werden bei weiterem Strecken gedehnt und weisen ein gesamtes Konturlängeninkrement von 121 ± 2 nm auf, was, wie bereits gezeigt wurde, 346 ± 6 Aminosäuren entspricht und mit der tatsächliche Anzahl von 344 gut übereinstimmt.

Titinkinase-Mechanismus im physiologischen Zusammenhang

Die Entschlüsselung des molekularen Mechanismus der Titin-kinase führt zu dem wichtigsten Ergebnis, dass die Bindungstasche durch eine kraftinduzierte Konformationsänderung geöffnet wird und ATP nur an diesen Zustand bindet. Wie in Publikation P1 ausführlicher dargestellt, konnten die Kollaborationspartner dieses Projektes von der Gruppe um Mathias Gautel am King's College London mit Phosphorylierungsversuchen zeigen, dass durch Binden von ATP an trunkierte Kinasen mit

offener Bindungstasche das inhibierende TYR170 autophosphoryliert. Überträgt man diese Ergebnisse auf die mechanisch geöffnete Bindungstasche der natürlichen Titinkinase, so bedeutet dies, dass das mechanisch induzierte Binden von ATP zur Autophosphorylierung von TYR170 führt und das Enzym so komplett aktiviert ist. Die dadurch initiierte Signalkaskade, die im Kapitel 3 zusammengefasst wurde, steuert Proteinumsatz und Muskel-Genexpression. Die Position der Titinkinase im Netzwerk der M-Bande sorgt dafür, dass nur an den Stellen Kräfte wirken und zur Aktivierung führen, an denen Verzerrungen der M-Banden auftreten. Diese Verzerrungen werden auch in elektronenmikroskopischen Aufnahmen beobachtet und treten bei Ungleichgewichten der Krafterzeugung durch die Myosinfilamente auf. Die Aktivierungskräfte der Titinkinase bei 37 °C betragen lediglich 20–30 pN (siehe Supplement Publikation P1), was einem Ungleichgewicht von ca. 6 Myosinmotoren oder 3% der Motoren pro Filament entspricht [63, 64] und somit im physiologischen Bereich liegt [65]. Auch die Längenänderung bei Aktivierung von 9.1 nm zwischen Barriere 1 und Barriere 2 liegen im physiologischen Bereich von 10 nm, der mit Röntgenstreuung am kontrahierenden Sarkomer beobachtet wurde [66–68]. Die Ig/Fn-Domänen, von denen die Titinkinase umrahmt wird, besitzen jedoch ausreichende Stabilität, weshalb ihre Entfaltung unter physiologischen Bedingungen unwahrscheinlich ist [68] und strukturelle Integrität gewahrt wird.

Abb. 17



5.2 Mechanische Manipulation von CalB

Nachdem im Vorigen Kapitel der molekulare Mechanismus des natürlichen Kraftsensors Titinkinase entschlüsselt wurde, soll nun die Reaktion der Lipase CalB, die keine natürliche mechanische Funktion besitzt, auf eine externe Kraft untersucht werden. Die enzymatische Aktivität konnte dabei über ein fluoreszierendes Produkt nachgewiesen werden, während mit dem AFM gleichzeitig Kräfte ausgeübt wurden. Um möglichst viele Enzyme gleichzeitig zu manipulieren, wurden Agarosekugeln mit Antikörpern funktionalisiert, die an CalB durch molekulare Erkennung binden. Gleichzeitig wirkt die Antikörper-Peptid-Wechselwirkung als Sollbruchstelle.

Antikörperfunktionalisierte Agarosekugeln als Manipulator

Das verwendete CalB Konstrukt wurde auf genetischer Ebene so verändert, dass es mit einem C-terminalen Cystein kovalent über Polyethylenglycol (PEG) an die Oberfläche eines Mikroskopdeckglases angebunden werden kann [69]. N-terminal befindet sich das Peptid GCN4, das von dem Antikörperfragment anti-GCN4-scFv durch molekulare Erkennung gebunden wird [70]. Da die Dichte aktiver Enzyme auf der Oberfläche nur ca. 1/20 μm^2 beträgt, musste eine Strategie entwickelt werden, um möglichst viele Enzyme auf der Oberfläche gleichzeitig zu kontaktieren und Kräfte auf sie auszuüben. Dazu wurden Agarosekugeln, auch Agarosebeads genannt, mit Epoxidharzkleber auf Cantilevern befestigt (Abbildung 17 a). Im nächsten Schritt wurde das anti-GCN4-scFv Antikörperfragment über Cystein an die Iodoacetylgruppen des Agarosebeads angebunden, was im Fluoreszenzsignal durch Zugabe von GFP-GCN4 bestätigt werden konnte (Abbildung 17 b und c). Der so erzeugte Manipulator kann über molekulare Erkennung gleichzeitig an eine Vielzahl von CalBs binden und Kräfte auf sie ausüben.

Agarosebead als paralleler Manipulator. a) Agarosebeads mit funktionellen Iodoacetylgruppen wurden in trockenem Zustand mit Epoxidharzkleber am Cantilever befestigt. b) An die Iodoacetylgruppen wurde in Lösung das Antikörperfragment über Cystein angebunden, was durch Zugabe des Peptids GCN4 mit angekoppeltem grün fluoreszierendem Protein (GFP) im Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden konnte. c) ohne Antikörperfragment wird ein 26-fach schwächeres Signal beobachtet, was die Spezifität der Bindung zeigt.

Mechanische Charakterisierung der Antikörper-Sollbruchstelle

Um die mechanischen Eigenschaften der Antikörperfragmente zu untersuchen, wurde das Peptid GCN4 an einen Cantilever über PEG angebunden. Details zur Immobilisierung können der Publikation P3 und Referenz [71] entnommen werden. Mit dem Cantilever wurden nun auf antikörperfunktionalisierten Agarosebeads Kraft-Abstandskurven aufgenommen (Abbildung 18 a). Die Krafthistogramme, die aus den charakteristischen Kraftkurven erzeugt wurden, weisen eine wahrscheinlichste Kraft von $F_{\max} = 80 \pm 8$ pN auf (Abbildung 18 b). Zusätzlich wurde auch die Ladungsrate dF/dt bestimmt, da die Abrisskraft davon abhängt und bei Auftragung gegen die Ladungsrate in logarithmischer Skalierung eine Gerade ergibt [14]. Der so ermittelte Punkt stimmt mit dem Verlauf von Referenz [1] im Rahmen der Streuung überein (Abbildung 18 c). Diese Ergebnisse zeigen, dass die molekulare Erkennung des Peptids durch das Antikörperfragment während des Kontaktes stattfindet. Die häufige Beobachtung multipler Wechselwirkungen deutet auf eine hohe Dichte an Antikörperfragmenten hin. Somit eignet sich der charakterisierte molekulare Aufbau als reversible Sollbruchstelle mit bekannter Bruchkraft.

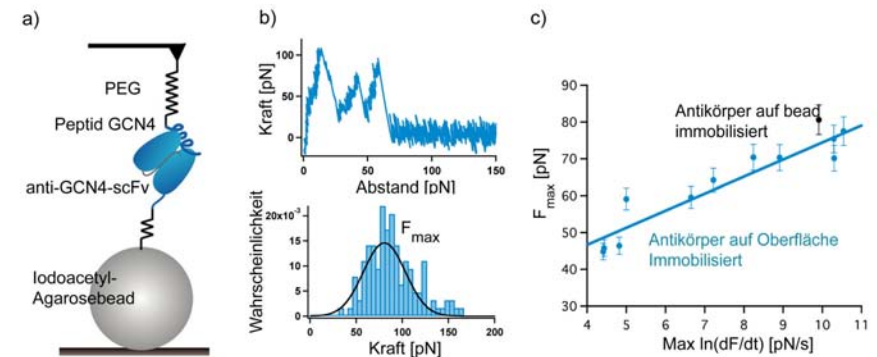


Abb. 18 Mechanische Charakterisierung der Antikörper-Peptid-Wechselwirkung.

- a) Auf den Antikörper-modifizierten Agarosebeads wurden Kraftkurven aufgenommen, die oft mit einem Peptidfunktionalisierten Cantilever aufgenommen werden.
- b) Aus den charakteristischen Kraft-Abstandskurven, in denen oft multiple Abrisse erkennbar sind, wurden mit den letzten Abrissen Krafthistogramme erzeugt. Die Maximalkraft liegt bei 80 ± 8 pN.
- c) Die bestimmte Maximalkraft stimmt mit zugehöriger Ladungsrate im Rahmen der Streuung mit den Werten aus Referenz [1] überein.

Enzymatische Aktivität unter Kraft

Mit dem Antikörper-modifizierten Agarosebead wurde nun ein periodisches Kraftsprung-Experiment an den kovalent immobilisierten CalB-Enzymen durchgeführt. Bei Kontakt mit der Oberfläche binden die Antikörper an das Peptid von CalB, wodurch bei Zurückziehen des Cantilevers eine Kraft aufgebaut wird (Abbildung 19 a) und CalB in einen höherenergetischen Zustand der Energielandschaft gebracht wird. Brechen die Bindungen der Sollbruchstelle, so können die Enzyme wieder relaxieren. Während diesem periodischen Kraftprotokoll wurde die Aktivität der einzelnen Enzyme mit TIRF-Mikroskopie über das fluoreszierende Produkt gemessen, das durch die Spaltung des Substrates 5-(und-6)-Carboxyfluorescein Diacetat (CFDA) entsteht. Abbildung 19 a zeigt das Bild eines integrierten Films, auf dem neben Hintergrundfluoreszenz die immer wiederkehrende Fluoreszenz der Enzyme als helle Flecken zu erkennen ist. In Abbildung 19 b ist sowohl das aufgezeichnete Kraft- und Abstandssignal des Agarosebeads als auch das gleichzeitige Fluoreszenzsignal eines einzelnen Enzyms dargestellt. Die Aktivität zeigt das charakteristische Blinkverhalten mit An- und Auszeiten im Sekundenbereich, das auch von anderen Forschergruppen beobachtet

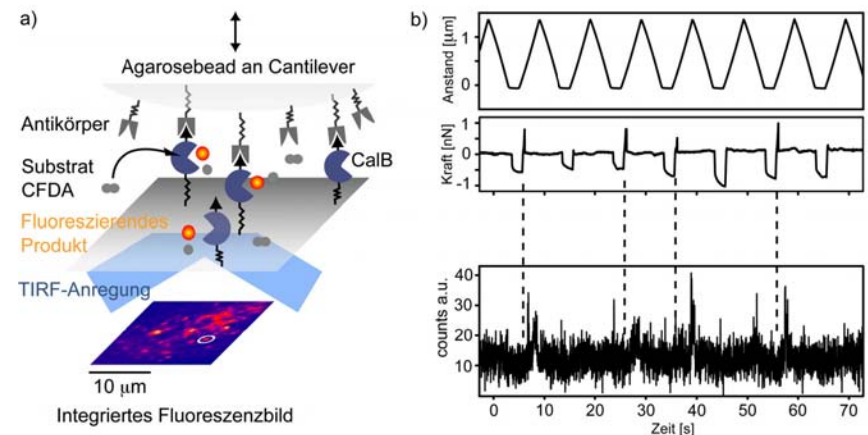


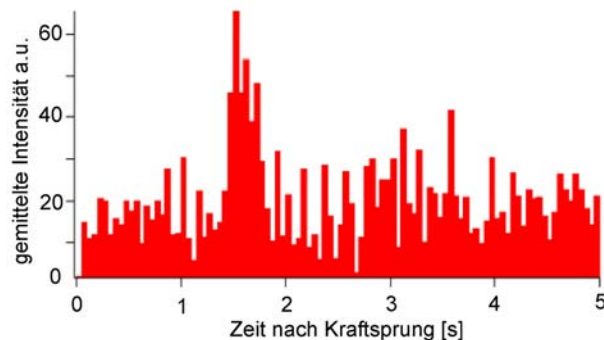
Abb. 19 Mechanische Manipulation mit gleichzeitiger Beobachtung von Einzelenzymaktivität.

- a) Die Aktivität einzelner immobilisierter CalB Enzyme wird über das fluoreszierende Produkt mit TIRF-Mikroskopie beobachtet.
- Gleichzeitig übt der mit Antikörpern modifizierte Agarosebead Kräfte auf die Enzyme aus. b) Neben dem TIRF-Mikroskopie beobachtet.
- Cantilever befestigten Agarosebead kann zu jedem Enzym die zeitliche Aktivität im Form des Fluoreszenzsignals aufgezeichnet werden.

wurde. Auffällig ist neben diesem Blinkverhalten, dass nach Perioden starker Wechselwirkung die Aktivität nach einem gewissen Zeitversatz verstärkt aufzutreten scheint. Um dies genauer zu untersuchen, wurden die Zeitkurven von insgesamt 11 Enzymen in die 10 sekundigen Zyklen der mechanischen Manipulation aufgeteilt. Der Zeitnullpunkt wurde jeweils beim Abriss der Antikörper-Peptid-Wechselwirkung gewählt. Durch Mitteln der Zeitkurven wurde ein Histogramm erzeugt, das zu den Zeitpunkten nach dem Abriss die jeweilige Fluoreszenzintensitäten zeigt (Abbildung 20). Zu erkennen ist eine Zunahme der enzymatischen Aktivität bei ca. 1.7 Sekunden nach dem Abriss. Diese Zunahme könnte durch folgendes Modell erklärt werden: Durch die Kraft wird CalB in einen höherenergetischen Zustand der Energielandschaft gehoben. Nach dem abrupten Sprung der Kraft beim Abriss kann das Enzym wieder relaxieren. Sein Weg zum Gleichgewicht zwischen Aktivität und Inaktivität führt dabei durch die komplexe und raue Energielandschaft mit mehreren Energiebarrieren in der Größenordnung $k_B T$, und über den aktiven Zustand. Details zu den experimentellen Methoden, zur Auswertung und zum Modell können dem Manuskript M1 entnommen werden.

Abb. 20

Gemittelttes Fluoreszenzhistogramm. Die Zeitverläufe der Fluoreszenz verschiedener Enzyme wurden in Bereiche mit der Länge der Manipulationsperiode eingeteilt. Nullpunkt ist jeweils beim Abriss der Antikörper-Peptidwechselwirkungen. Das gezeigte Histogramm enthält 10 Zyklen von insgesamt 11 Enzymen und zeigt eine Zunahme der Fluoreszenz nach ca. 1.7 Sekunden.



5.3 Funktionelle Nanoassemblierung

In den vorherigen Abschnitten wurden die Funktionen und Mechanismen einzelner Enzyme untersucht. Im natürlichen Netzwerk der Zelle entsteht jedoch durch die Interaktion der einzelnen funktionellen Einheiten untereinander eine neue Dimension an Komplexität und Funktion. Erst durch das räumlich meist wohldefinierte Arrangement entsteht ein Zusammenspiel, das Signale verarbeitet oder biologische Prozesse reguliert. Um solche Netzwerke künstlich aus funktionellen Einheiten zu schaffen oder Signalkaskaden nachstellen zu können, wurde in dieser Arbeit die „Single-Molecule Cut-and-Paste“-Technik (SMCP) entwickelt. Sie kombiniert die Präzision des AFM mit der Selektivität von DNA, um mit der Kontrolle über einzelne Moleküle gezielt Strukturen oder räumlich definierte Bindungsstellen für die Selbstassemblierung weiterer Einheiten zu schaffen.

Mechanische und optische Charakterisierung einzelner SMCP-Zyklen

Wie im einleitenden Kapitel 4 beschrieben, basiert der Assemblierungsprozess auf molekularer Erkennung und einem System hierarchischer Bindungskräfte von DNA. Im ersten Schritt wird die Cantilever-DNA in Kontakt mit der Transport-DNA gebracht, deren Ankersequenz (grün in Abbildung 21) in der „zipper“-Geometrie an die Depot-DNA hybridisiert. Im Kontakt hybridisiert die Transportsequenz (orange) an die Cantilever-DNA in der „shear“-Geometrie, sodass sich beim Zurückziehen des Cantilevers Kraft aufbaut. Die zugehörige Kraft-Abstandskurve zeigt, dass der Kraftanstieg, der auf die Elastizität des PEGspacer zurückzuführen ist, in einem Plateau bei 17 ± 2 pN endet, bis die Bindung bricht. In diesem Plateau wird zwischen Transport- und Depot-DNA ein Basenpaar nach dem anderen getrennt, weshalb diese Kräfte kleiner sind als jene, mit denen die parallele Belastungsgeometrie zur Cantilever-DNA getrennt wird. Nach dem Transfer zum Ziel wird die Transport-DNA wieder in Kontakt mit der Oberfläche gebracht, wo die Ankersequenz an die Ziel-DNA in der „shear“-Geometrie hybridisiert. Beim Zurückziehen des Cantilever baut sich wieder eine Kraft auf, die die Basenpaare beider Teilsequenzen der Transport-DNA parallel belastet. Da die Bindung zur Ziel-DNA 10 Basen mehr enthält, ist das Brechen der Bindung zur Cantilever-DNA wesentlich wahrscheinlicher, was auch optisch verifiziert wurde. In der Kraft-Abstandskurve ist dies als charakteristischer Kraftanstieg der kombinierten PEG-DNA-Elastizität bis zum Bindungsbruch bei 50 ± 5 pN zu erkennen.

Somit wurde im gezeigten Fall eine DNA transportiert, wonach der Cantilever für den nächsten Zyklus bereit war. Um den Transport und die assemblierten Strukturen gleichzeitig optisch mit TIRF-Mikroskopie beobachten und kontrollieren zu können, war die Transport-DNA mit einem Farbstoff modifiziert, dessen Fluoreszenz im grünen Kanal des Mikroskops aufgezeichnet wurde. Gleichzeitig war im roten Kanal die Eigenfluoreszenz der Cantileverspitze sichtbar, sobald sie in das evaneszente Anregungsfeld eindrang. Die optische Beobachtung eines SMCP-Zyklus ist in *Abbildung 21 b* dargestellt. Nachdem im Depot eine DNA aufgenommen und über die Zielregion gebracht wurde, war noch kein optisches Signal detektierbar, da sich sowohl die Spitze als auch die farbstoffmarkierte DNA außerhalb des Anregungsfeldes befanden. Bei Kontakt mit der Oberfläche war im roten Kanal die Eigenfluoreszenz der Cantileverspitze und im grünen Kanal der Farbstoff sichtbar. Nach Zurückziehen des Cantilevers und Bruch der Bindung zwischen Cantilever- und Transport-DNA blieb die farbstoffmarkierte Transport-DNA im Ziel zurück. Nach einigen Sekunden bleichte der Farbstoff.

Wie in Publikation P4 im Anhang gezeigt, kann dieser Zyklus bis zu 5000 mal bei einem Effizienzverlust von ca. 10% wiederholt werden. Die Anzahl der pro Zyklus transportierten DNA-Stränge hängt vom Krümmungsradius der Spitze und der Funktionalisierungsdichte ab. Sie kann so eingestellt werden, dass der Transport eines einzelnen Stranges am wahrscheinlichsten ist. Die tatsächliche Anzahl der aufgenommenen und abgesetzten DNA-Stränge, die dem Zufall unterworfen ist, kann man jedoch bei nicht zu hohen Funktionalisierungsdichten anhand der Kraft-Abstandskurven zählen, wodurch ein Korrekturmechanismus möglich ist. Auf diese Weise konnten sowohl große Strukturen im 10 μm -Bereich (siehe Publikation P4) als auch Muster unterhalb der optischen Auflösungsgrenze mit Punktabständen von 50 nm erzeugt werden (siehe Publikation P5). Die Positionen dieser einzelnen Farbstoffe wurden über die Bleichstufen mit Nanometer-Präzision rekonstruiert. Die Analyse der Experimente ergibt eine untere Schranke der SMCP-Präzision von 10 nm, die vor allem auf die Länge der DNA und der verwendeten PEG-Spacer zurückzuführen ist.

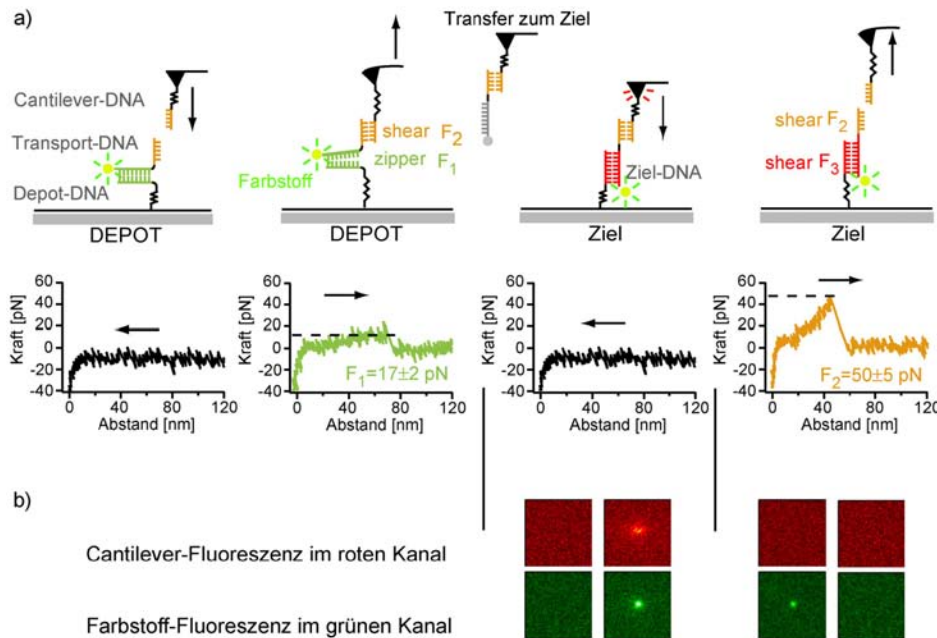


Abb. 21

Mechanische und optische Charakterisierung von SMCP. a) Die Kraftkurven zeigen den Kontakt mit der Oberfläche und das Aufnehmen der Transport-DNA im Depot, wie auch das Absetzen im Ziel. Deutlich erkennbar ist der Kraftunterschied zwischen Depot (17 pN) und Ziel (50 pN) aufgrund der unterschiedlichen Belastungsgeometrien. b) Gleichzeitig kann das Positionieren und Absetzen einzelner farbstoffmarkierter Transport-DNAs mit TIRF-Mikroskopie beobachtet werden. Der rote Kanal zeigt den Kontakt des Cantilevers mit der Oberfläche, wobei in grün auch eine aufgenommene DNA erkennbar ist. Beim Zurückziehen des Cantilevers bricht die Bindung, die Transport-DNA bleibt jedoch verankert. Nach einigen Sekunden bleicht der Farbstoff.

Selbstorganisation an nanoassemblierten Bindungsstellen

Der universelle Ansatz, einen DNA-Strang als „Transporter“ zu nutzen, erlaubt im Prinzip die Assemblierung verschiedenster Nanoobjekte organischer oder anorganischer Natur. Einzige Voraussetzung für ihre direkte Assemblierung ist, dass sie an die Transport-DNA angebunden werden können und den Transportprozess nicht stören. Um diese mögliche Einschränkung zu umgehen, wurde die SMCP-Technik erweitert, indem die Transport-DNA mit zusätzlichen spezifischen Bindungsstellen modifiziert wurde. Dadurch kann eine beliebige Struktur von Bindungsstellen erzeugt werden, an die sich im nächsten Schritt die funktionellen Einheiten mit dem entsprechenden Gegenstück durch molekulare Erkennung von selbst anlagern. Als Rezeptor-Ligand-Paar wurde dazu Biotin-Streptavidin gewählt. Einerseits ist Biotin ein kleines Molekül, das den Hybridisierungsprozess während des Transports nicht behindert, andererseits ist seine Bindung zum tetramerischen Protein Streptavidin mit einer Affinität von 10^{15} M^{-1} eine der stärksten biologischen nichtkovalenten Bindungen. Darüber hinaus ist die Verwendung dieser Bindung so weit verbreitet, dass viele Enzyme oder Nanopartikel als Konjugat mit Streptavidin kommerziell erhältlich sind. Ein Experiment dieser Art ist in *Abbildung 22* dargestellt. Zuerst wurde mit SMCP und Biotinmodifizierter Transport-DNA ein Muster aus Bindungsstellen in der Form eines „M“ geschrieben. Nach Zugabe von fluoreszenzmarkiertem Streptavidin konnte die spezifische Selbstassemblierung mit dem TIRF-Mikroskop beobachtet und dokumentiert werden. Die Vielseitigkeit dieser Strategie wurde demonstriert, indem aus unterschiedlichen Streptavidin-modifizierten und fluoreszierenden Nanokristallen verschiedene Superstrukturen erzeugt wurden. Die zeitliche Verfolgung des Selbstassemblierungsprozesses zeigt, dass selbst bei Konzentrationen im pMBereich die Struktur nach 100 Sekunden komplett und spezifisch ausgebildet ist. Details und Ergebnisse dieser Experimente finden sich in der Publikation P6.

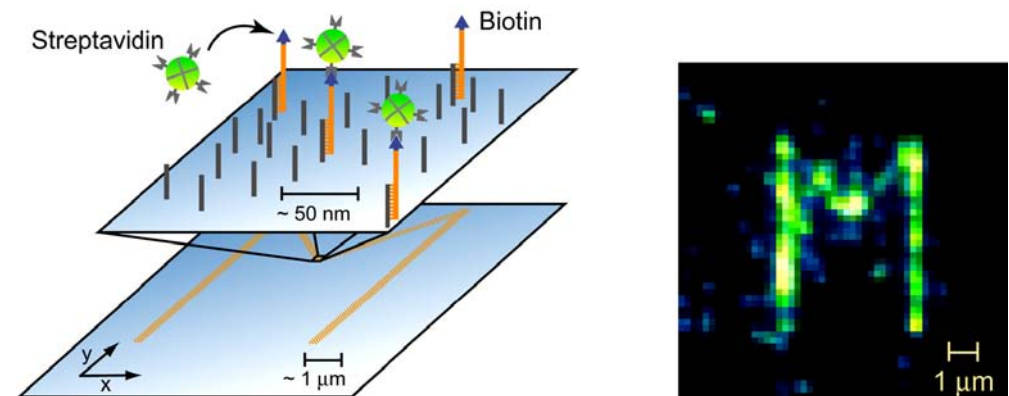


Abb. 22 Assemblierung von Bindungsstellen für Selbstorganisation.

Die Transport-DNA wurde mit Biotin modifiziert, wodurch im Zielbereich eine frei programmierbare Struktur von Bindungsstellen, in diesem Fall ein „M“, erzeugt werden kann. Nach

der SMCP Assemblierung wurde 1 nM fluoreszenzmarkiertes Streptavidin in Lösung dazugegeben, das sich spezifisch an die vordefinierten Bindungsstellen anlagerte.

Das gezeigte Fluoreszenzbild wurde nach einer Minute Inkubationszeit und Waschen der Oberfläche mit 1x SSC Puffer mit TIRF-Mikroskopie aufgenommen

AUSBLICK

Die neuen Erkenntnisse dieser Arbeit in dem Gebiet der Mechanoenzymatik und Assemblierung funktioneller Einheiten schafft direkte Anknüpfungspunkte und eine neue Basis für synthetische Einzelmolekülbiologie. In diesem abschließenden Teil der Arbeit werden konkrete, bereits geplante Forschungsvorhaben und generelle Ansätze zur Weiterführung dieses Gebietes vorgestellt. Der experimentell neu entdeckte Mechanismus der mechanischen Aktivierung der Titinkinase ist nicht nur aus Sicht der Grundlagenforschung von Interesse, sondern auch für die Medizin von Bedeutung. Mutationen in der Titinkinase führen zur Muskelschwäche, die bei Versagen der Atemmuskulatur tödlich ist (Edström-Krankheit) [29]. Unterbrechungen des Signalweges verursachen pathogene Hypertrophie des Herzmuskels. Durch kraftspektroskopische Experimente an einzelnen Titinkinasen und in Anwesenheit weiterer Interaktionspartner könnten auch Fehlfunktionen in molekularem Detail verstanden werden. Dies könnte einen Ansatz zum gezielten Design von Wirkstoffen eröffnen, die es erlauben könnten, Fehlfunktionen zu beheben und in das Muskelwachstum regulatorisch einzugreifen. Neben dem Titin gibt es eine Vielzahl weiterer struktureller Proteine, die vor allem im Zytoskelett der Zelle mechanischen Reizen ausgesetzt sind. Auch hier müssen Kräfte in biochemische

Signale übersetzt werden, um biologische Reaktionen auszulösen. Einige dieser Proteine, die in *Abbildung 23* schematisch dargestellt sind, beinhalten Kinasen aus dem Zweig des menschlichen Kinoms, dem auch die Titinkinase zugeordnet wird. Die in dieser Arbeit entwickelte Automatisierung der Datenanalyse ermöglicht ein effektives Screening und eine große Messdatenstatistik. Es wurde bereits begonnen, Mitglieder dieser Spezies des Kinoms auf Mechanoenzymatik zu untersuchen. Mechanische „pump-and-probe“-Protokolle helfen vor allem, strukturelle Einsicht in die Mechanismen jener Kinasen zu gewinnen, deren Struktur noch nicht bekannt ist. Um das Binden von Substraten und weitere enzymatische Schritte gleichzeitig über Fluoreszenz beobachten zu können, muss das Anregungsvolumen drastisch verringert werden. Denn hierfür sind oft millimolare Konzentrationen von farbstoffmarkierten Molekülen notwendig. Das Volumen einzelner Moleküle liegt dadurch im Zeptoliter-Bereich. Möglich ist dies z. B. mit „zero-mode waveguides“, die die Feldverstärkung in Löchern von Metallfilmen und eine laterale Einschränkung im 50 nm Bereich ausnutzen [72] (*Abbildung 24*). Von größter Wichtigkeit ist insbesondere für die Untersuchung von Enzymen, die nicht mechanisch aktiviert werden, dass sowohl ihre Position als auch ihre Anzahl auf Einzelmolekülebene

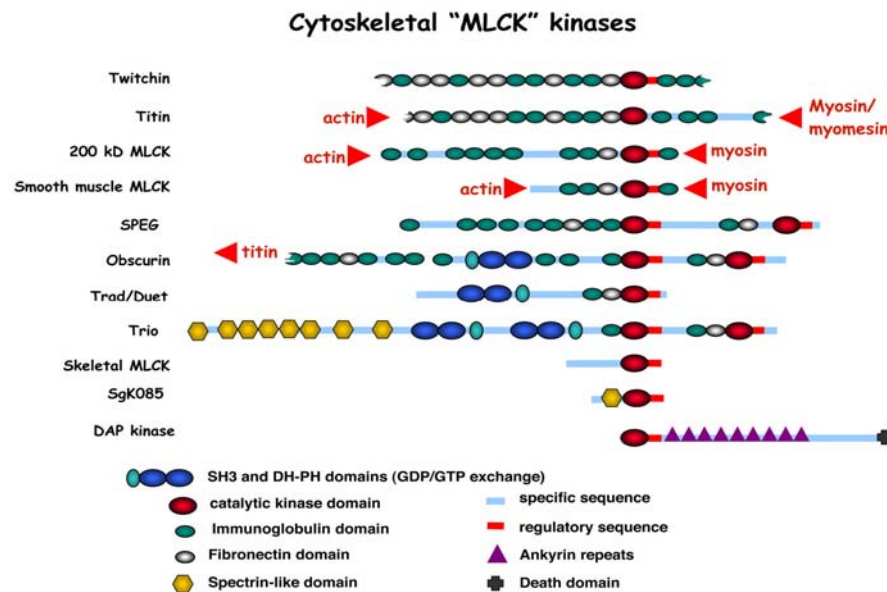


Abb. 23

Strukturelle Proteine im Zytoskelett mit „MLCK“-ähnlichen Kinasen. Durch die biomolekulare Umgebung sind sie so positioniert, dass, wie im Titin, Kräfte auf sie wirken. Aufgrund der Verwandtschaft mit der Titinkinase könnten auch diese Mitglieder des Kinoms mechanisch aktiviert werden. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Mathias Gautel zur Verfügung gestellt.

kontrolliert und gesteuert werden kann. Die in dieser Arbeit entwickelte SCMP Technik stellt eine Basistechnologie mit der erforderliche Präzision und Spezifität dar, um einzelne Moleküle für diesen Zweck zu positionieren (Abbildung 24). Ein visionärer Ansatz für das Verständnis, wie einzelne Enzyme im komplexen Zusammenspiel zellulärer Regelkreise agieren und reagieren, ist die gezielte Erzeugung und Untersuchung von wohldefinierten Netzwerken. In diesem Ansatz synthetischer Einzelmolekülbiologie ließen sich dadurch Signalwege oder synergetische Enzymkaskaden nachbauen. SMCP liefert hierzu den Beitrag die aktiven

Einheiten an vordefinierten Netzwerkpositionen präzise zu platzieren (Abbildung 25 a). Die Aktivität der einzelnen Einheiten im Netzwerk könnte wie bei der Lipase CalB über ein fluoreszierendes Substrat ausgelesen und analysiert werden. Ein mögliches Modellsystem könnte z. B. auch die alkalische Phosphatase darstellen, die auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. Die Verfügbarkeit dieses Enzyms mit spezifischer Streptavidin-Bindungsstelle und fluoreszierendem Substrat macht es für die Anbindung an Biotin-Strukturen, die mit SMCP erzeugt werden, direkt einsetzbar.

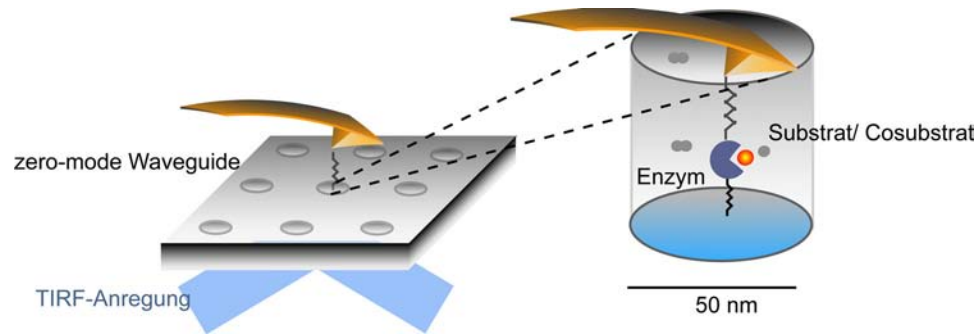


Abb. 24

Untersuchung der Titinkinase oder anderer Enzyme in „zero-mode waveguides“: Durch die Einschränkung des Anregungsvolumens in den Zeptoliter-Bereich können einzelne farbstoffmarkierte Substrate

mit einer Konzentration im millimolaren Bereich optisch aufgelöst werden. Die Positionierungspräzision und Kontrolle der Anzahl an Enzymen kann mit SMCP erreicht werden.

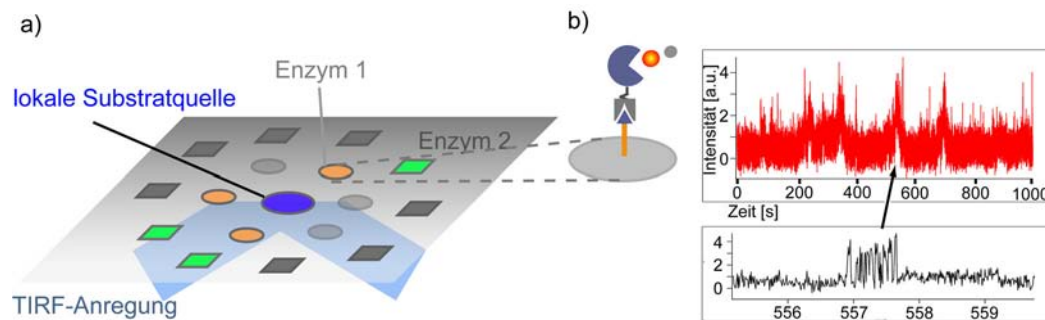


Abb. 25 Erzeugung enzymatischer Netzwerke oder Kaskaden mit SMCP.

a) Durch die Platzierung synergetischer Enzyme um eine lokale Substratquelle könnten Enzymnetzwerke oder Signalkaskaden über fluoreszierende Produkte untersucht werden.

b) Die Assemblierung könnte über Streptavidin-modifizierte Enzyme erfolgen, wie im gezeigten Fall der über Streptavidin immobilisierten alkalischen Phosphatase. Die enzymatische Aktivität wurde über das fluoreszierende Produkt durch Umsetzung von 3-O-Methyl-Fluoreszein-Phosphat beobachtet und zeigt das charakteristische Blinkverhalten.

7.1 Kraftspektroskopie

Das grundlegende Prinzip der Kraftspektroskopie besteht darin, ein Molekül zwischen einer Unterlage und einer Feder einzuspannen und zu dehnen. Als Messsignal wird die Ausdehnung des Moleküls x und die anliegende Kraft F aufgezeichnet, die über die Ausdehnung der Feder bestimmt wird (Abbildung 26). Die verschiedenen kraftspektroskopischen Techniken unterscheiden sich durch die Art der Federn und des Messverfahrens von Kraft und Abstand. Die Hauptvertreter sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Bei der optischen Falle werden mikrometergroße Kügelchen mit einem zum Medium unterschiedlichen Brechungsindex im Fokus eines Laserstrahls eingefangen [73, 74]. Der stetige Impulsübertrag der Photonen des gebrochenen, des reflektierten und des gestreuten Lichtes übt auf das Kügelchen eine Kraft aus. Senkrecht zur Einfallsrichtung tritt die Kraft F_{grad} auf, die durch die Brechung verursacht wird und ins Zentrum des Strahles mit höchster Intensität wirkt. In Einfallsrichtung entsteht eine stabile Falle, wenn sich die Kräfte des gestreuten und reflektierten Lichtes $F_{r,s}$ mit der in entgegengesetzter Richtung wirkenden Komponente der gebrochenen Strahlen F_{br} kompensieren. Durch Verschieben des Strahlencentrums kann das Kügelchen bewegt werden, wobei die Kraft aus seinem Abstand zum Strahlmittelpunkt Δz und dem effektiven Fallenpotenzial k_{eff} bestimmt wird. Wichtige Anwendungsbeispiele können in den Referenzen [75–81] gefunden werden. Bei magnetischen Fallen [82, 83] ist die Messsonde ein paramagnetisches Kügelchen, das in einem Magnetfeld magnetisiert wird. Herrscht zu dem ein Magnetfeldgradient, so wird auf die Sonde eine Kraft $\vec{F}_{\text{mag}} = \vec{m} \cdot \text{grad}(\vec{B})$ ausgeübt.

Die „biomembrane-forceprobe“-Technik wurde ursprünglich entwickelt, um Trennkräfte zwischen einzelnen Rezeptor-Ligand-Paaren zu untersuchen [84]. Hierbei wurde eine rote Blutzelle mit einer Glaskapillare angesaugt. Ein mit Liganden funktionalisiertes Kügelchen, das fest an die Blutzelle angebunden ist, wurde in Kontakt mit Rezeptoren gebracht und die Kraft beim Trennen über die Deformation der Blutzelle bestimmt.

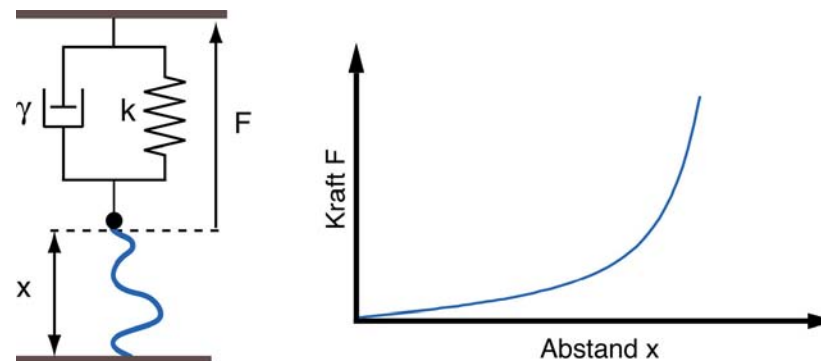
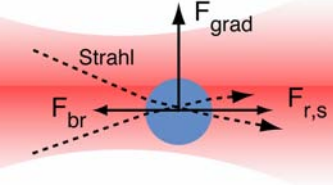
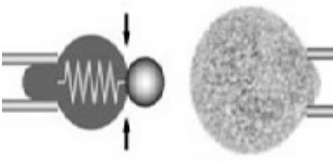



Abb. 26

Kraftspektroskopisches Messverfahren. Das Molekül wird zwischen Unterlage und Feder eingespannt. Die Feder besitzt eine Federkonstante k und aufgrund der Viskosität der Flüssigkeit eine Dämpfung γ . Wird die Feder von der Oberfläche entfernt, so baut sich eine Kraft F auf, wodurch das Molekül auf einen End-zu-Endabstand x gedehnt wird. Das Messergebnis ist eine Kraft-Abstandskurve.

Technik	Prinzip	Kraftbereich	Vorteil
Optische Falle 	Mikrometer große Kügelchen werden durch Impulsübertragung im Zentrum eines fokussierten Lasers gefangen. Auslenkungen resultieren in Kraft.	0.1 - 150 pN	Hohe Kraftauflösung
Magnetische Falle 	Im Gradienten eines Magnetfeldes wirkt auf parametrische Partikel eine Kraft.	10 fN - 10 pN	Parallelität
Biomembran forceprobe 	Vesikel oder Zellen werden mit Mikropipetten angesaugt und in Kontakt gebracht. Die Kraft wird über die Deformation bestimmt.	0.5 pN - 1 nN	Direkt biokompatible Grenzschicht
AFM 	Die Verbiegung einer mikrofabrizierten Blattfeder wird über einen Lichtzeiger detektiert.	> 1 pN	*Automatisierung *Kontrolle in 3D *Abrastern von Oberflächen

AFM basierte Kraftspektroskopie

Das „Atomic Force Microscope“ wurde von Binnig, Quate und Gerber ursprünglich entwickelt, um Festkörperoberflächen abzurastern und so topografische Aufnahmen zu gewinnen und atomare Kräfte zu messen [48]. Dabei wird die Spitze einer Blattfeder mit Hilfe von Piezos über die Oberfläche gerastert und ihre Verbiegung gemessen. In der ursprünglichen Variante geschah dies über den Tunnelstrom zwischen der Blattfeder und einer darüber montierten Spitze. Am häufigsten wird mittlerweile jedoch die Methode eines von der Blattfeder reflektierten Laserstrahles verwendet, der von einer geteilten Photodiode detektiert wird (siehe Tabelle 1 und Abbildung 2). Schon bald wurde das Potenzial des AFM erkannt, um biologische Proben in wässriger Umgebung mit einer Auflösung im nm-Bereich abzubilden [85–88]. Durch die Weiterentwicklung der Technik zur Kraftspektroskopie wurde es möglich, Bindungskräfte von Rezeptor-Ligand-Paaren und die Entfaltung von Proteinen zu messen. Die AFM-basierte Kraftspektroskopie hat den entscheidenden Vorteil gegenüber den anderen erwähnten Techniken, dass sie zusätzlich zur vertikalen Beobachtung und Kontrolle einzelner Biomoleküle eine präzise laterale Kontrolle erlaubt. Zudem ermöglicht ein spezielles Design die Kombination mit Mikroskopiermethoden.

Auflösungsvermögen

Die frequenzabhängige Oszillationsamplitude $A(v)$ eines Cantilevers in Flüssigkeit lässt sich gut durch einen gedämpften harmonischen Oszillator beschreiben:

$$A(v) = A_{dc} G(v), \quad G(v) = \frac{v_0^2}{\sqrt{(v_0^2 - v^2)^2 + \frac{v_0^2 v^2}{Q}}}$$

wobei A_{dc} die Amplitude bei Frequenz gleich Null, v_0 die Resonanzfrequenz und Q den Qualitätsfaktor bezeichnet. Zur Eichung der Federkonstante k von Cantilevern wird ausgenutzt, dass die Auslenkung x nach dem Equipartitionstheorem den energetischen Beitrag der thermischen Energie $k_B T$ zur Verfügung hat. Somit gilt: $k \langle x^2 \rangle = k_B T$, wobei k_B die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur bezeichnet [89, 90]. Typische Werte z. B. für einen Olympus Biolever A mit einer Federkonstanten von $k=7$ pN/nm sind für die Standardabweichung des Ortsrauschens $\sqrt{\langle x^2 \rangle} = 0.7$ nm und für die Standardabweichung des Kraustrauchens entsprechend $\sqrt{\langle F^2 \rangle} = 5$ pN. Limitiert wird das Auflösungsvermögen durch die vom Cantilever dissipierte Energie. In Referenz [91] wurde gezeigt, dass die minimal auflösbare Kraft F_{min} bei einer Bandbreite B und einem Dämpfungskoeffizienten γ gegeben ist durch $F_{min} = \sqrt{4k_B T \gamma B}$. Deshalb ist bei gleichbleibender Temperatur eine Erhöhung der Auflösung nur durch eine Verkleinerung der Dämpfung γ erreichbar. Ansätze hierzu sind neben der Verkleinerung der üblichen „Balken-Geometrie“ die Aufhängung kleiner Cantilever im Torsionsmodus [92]. Für die Auflösung muss jedoch auch das gerätespezifische Detektorrauschen (DR) berücksichtigt werden. Denn bei einem periodischen Kraftsignal $F(v)$ gilt für das Signal-Rausch-Verhältnis [91]:

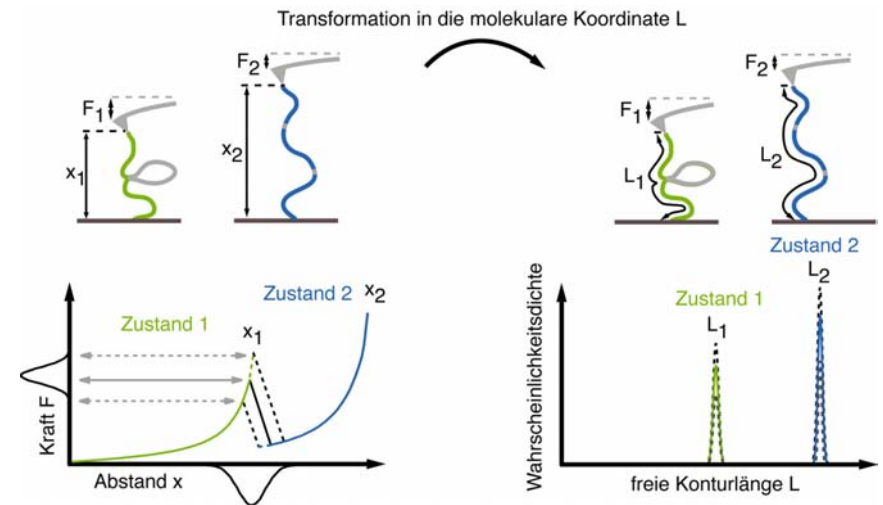
$$S/R = \frac{F(v) \cdot G(v)}{\sqrt{4k_B T \gamma B G^2(v) + (k \cdot DR)^2}}$$

Es ist offensichtlich, dass das Signal-Rausch-Verhältnis durch eine höhere Federkonstante verschlechtert wird weshalb in der Praxis, je nach Detektor, längere, aber dafür weichere Cantilever vorteilhafter sind.

Modelle für Polymerelastizität und Transformation in molekulare Koordinaten

Im Zyklus eines Kraftspektroskopieexperimentes wird die Spitze eines AFM-Cantilevers mit Hilfe eines Piezos in Kontakt mit der Oberfläche gebracht, wobei das zu untersuchende Molekül entweder gerichtet oder unspezifisch kontaktiert wird. Durch Zurückziehen des Cantilevers wird das Molekül gedehnt, was in den aufgenommenen Kraft-Abstandskurven zu einem charakteristischen Muster führt, das durch Modelle für Polymerelastizität erklärt werden kann. Die Analyse dieser Kraft-Abstandskurven erlaubt die Bestimmung molekularer Abstände und Rückschlüsse auf inter- und intramolekulare Wechselwirkungskräfte. Wie in **Abbildung 26** schematisch dargestellt, führt das Dehnen eines Polymers mit interner Verknüpfung zu einem Anstieg der Kraft, bis die interne Bindung bricht.

Abb. 26



Kraft-Abstandskurve eines Polymers mit internem Bindungsbruch und zugehöriges Konturlängenhistogramm. Sowohl der Abrissort als auch die Kraft sind Fluktuationen unterworfen und ändern sich mit variierenden experimentellen Para-

metern. Im Gegensatz dazu werden die Positionen von Energiebarrieren entlang der molekularen Konturlänge im erzeugten Konturlängenhistogramm direkt sichtbar und stellen einen festen und charakteristischen Fingerabdruck dar.

Da nun wieder mehr freie Polymerlänge zu Verfügung steht, sinkt die Kraft abrupt. Bei weiterer Dehnung entsteht erneut der charakteristische Anstieg der Kraft. Der Abstand des Bindungsbruches ist jedoch keine charakteristische Größe, da er Fluktuationen unterworfen ist und stark von experimentellen Bedingungen wie z. B. Zuggeschwindigkeit [14], Temperatur [93, 94] und Eigenschaften des Lösungsmittels abhängt. Die relevante und charakteristische Länge ist die Konturlänge L , mit der die Position von Bindungen entlang des Polymerrückgrates gemessen wird und die in die Anzahl dazwischen liegender Monomereinheiten umgerechnet werden kann. Deshalb wurde in dieser Arbeit eine Methode entwickelt, um kraftspektroskopische Messdaten mit Hilfe der geeigneten Modelle für Polymerelastizität $F(x,L)$ vom Kraft-Abstandsraum in den Kraft-Konturlängenraum zu transformieren (siehe [Abbildung 26](#) und Publikation P4). Dabei wird jeder Messpunkt (F_i, x_i) mit dem inversen Modell $L(F,x)$ auf den Punkt (F_i, L_i) abgebildet. Die dann erzeugten Konturlängenhistogramme zeigen die Barrierenpositionen bezüglich der Konturlänge an, die unabhängig von Fluktuationen und variierenden experimentellen Parametern sind. Mit diesem charakteristischen Fingerabdruck können kraftspektroskopische Daten nun automatisiert selektiert und Proteine miteinander verglichen werden. Um das Potenzial für ein automatisiertes Screening zu zeigen, wurde in dieser Arbeit zudem ein Experiment mit rohem Zellextrakt durchgeführt, in dem ein spezielles Protein-konstrukt aus Tausenden anderer Moleküle automatisch erkannt wurde. Das gebräuchlichste Modell für Polymerelastizität ist das Worm-like Chain Modell (WLC), das ein Polymer als flexiblen Stab beschreibt, der sich aufgrund der thermischen Energie $k_B T$ verbiegt. Betrachtet man die Korrelation der Einheitstangentenvektoren \vec{t} mit Konturlängenabstand s , so stellt man fest, dass diese exponentiell abklingt:

$$\langle \vec{t}(0) \cdot \vec{t}(s) \rangle = e^{-\frac{s}{p}}$$

Die Persistenzlänge p ist also ein Maß für die Länge, ab der eine Verbiegung durch die thermische Energie stattfindet. Um Kraft-Abstandskurven mit einer analytischen Funktion anpassen zu können, wurde eine Näherungsformel entwickelt [95, 96], die das Verhalten von Polymeren unter Kraft gut beschreibt:

$$F_{WLC}(x) = \frac{k_B T}{p} \cdot \left(\frac{1}{4 \cdot (1 - x/L)^2} - \frac{1}{4} - \frac{x}{L} \right)$$

Durch das Fitten von Kraft-Abstandskurven mit fester Persistenzlänge kann so die freie Konturlänge bestimmt werden. Sie stellt im Gegensatz zum End-zu-End-Abstand die charakteristische Größe dar, die z. B. die Position von Energiebarrieren entlang des Polymerrückgrates misst und in die Anzahl dazwischen liegender Monomere umgerechnet werden kann. Soll beispielsweise die Elastizität einer entfalteten Aminosäurekette über einen größeren Kraftbereich (>100 pN) beschrieben werden, muss eine Kraftabhängigkeit der Persistenzlänge berücksichtigt werden [22], die von 0.8 nm bei ca. 50 pN bis 0.4 nm bei ca. 300 pN reicht. Für noch höhere Kräfte müssen enthalpische Anteile einberechnet werden, die aus der Rotation und Dehnung von chemischen Bindungen des Peptidrückgrates verursacht werden und zu modifizierten Modellen wie dem QM-WLC-Modell führen [97]. Neben dem WLC-Modell sind noch das Freely-Jointed-Chain-Modell [82, 98] und das Freely-Rotating-Chain-Modell [99] gebräuchlich, sowie Modifikationen, die die Rückgratelastizität berücksichtigen [100].

7.2 Kombination vom AFM- mit TIRF-Mikroskopie

Neben der mechanischen Beobachtung und Kontrolle einzelner Biomoleküle hat sich auch die optische Beobachtung von Einzelmolekülfluoreszenz zu einer der wichtigsten biophysikalischen Techniken entwickelt. Das für diese Arbeit konstruierte AFM ermöglicht die Kombination mit Einzelmolekül-Total Internal Reflection Fluorescence Mikroskopie (TIRF), wodurch gleichzeitig unabhängige Messsignale detektiert und die Vorteile beider Techniken vereint werden.

TIRF-Mikroskopie

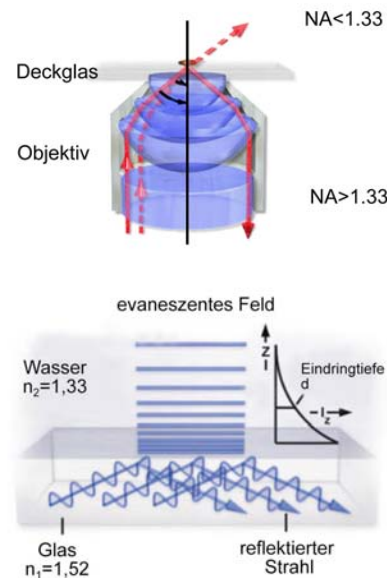
Anders als beim Konfokalen Mikroskop, bei dem der Fokus des Anregungslasers über die Probe gerastert wird, ist bei der TIRF-Mikroskopie [101, 102] das ganze Gesichtsfeld ausgeleuchtet. Der Anregungslaser mit der Wellenlänge λ_0 trifft dabei oberhalb des kritischen Winkels $\theta > \theta_c = \arcsin(n_1/n_2)$ auf das Probendeckglas mit Brechungsindex n_1 . An der Grenzschicht zum Medium mit Brechungsindex n_2 tritt totale Reflexion auf, sodass sich ein evaneszentes Anregungsfeld mit einer Eindringtiefe d im 100 nm-Bereich ausbildet (Abbildung 27).

$$a_{\min} \approx 0.61 \frac{\lambda}{NA}$$

Der große Vorteil dieser Technik im Vergleich zur Epi-Fluoreszenz ist, dass nur eine dünne Schicht an der Probenoberfläche angeregt wird, was die Hintergrundfluoreszenz unterdrückt und die Beobachtung einzelner Moleküle ermöglicht. Moderne Objektive besitzen eine ausreichende numerische Apertur ($NA > 1,4$), um den Laser durch das Objektiv einzukoppeln [103] [104].

Abb. 27

Schematik der Objektiv-basierten TIRF-Mikroskopie. Der Anregungslaser wird über das Objektiv mit einer hohen numerischen Apertur so eingekoppelt, dass er vom Deckglas total reflektiert wird. Auf der Probenseite entsteht so ein exponentiell abklingendes evaneszentes Feld, das nur ein kleines Probenvolumen anregt. Abbildung übernommen aus: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/tirf/tirfintro.html>



Optisches Auflösungslimit und Farbstofflokalisierung

Die beugungslimitierte Auflösungsgrenze optischer Mikroskope wird durch das Rayleigh-Kriterium beschrieben. Nach ihm sind zwei Punktlichtquellen trennbar, wenn ihr Abstand a größer ist als der Radius ihrer zentralen Beugungsscheibchen.

$$I(z) = I(0) \cdot e^{-\frac{z}{d}} \quad \text{mit} \quad d = \frac{\lambda_0}{4\pi \sqrt{n_1^2 \sin^2(\theta) - n_2^2}}$$

Bei einer numerischen Apertur von 1.45 und einer Lichtwellenlänge von 488 nm liegt die theoretische laterale Auflösungsgrenze somit bei ca. 200 nm. Wird das Intensitätsprofil eines einzelnen Farbstoffes auf mehr als vier Pixel einer CCD Kamera abgebildet, kann sein Ort mit wesentlich höherer Präzision durch Anfitzen einer Gauß-Kurve bestimmt werden [105]. Abhängig vom Signal-Rausch-Verhältnis kann so eine Lokalisationsgenauigkeit im Nanometer-Bereich erreicht werden [106–109]. Aus diesem Prinzip wurden einige hochauflösende Mikroskopiermethoden entwickelt, bei denen ein Bild der fluoreszenzmarkierten Probe jenseits des Rayleigh-Kriteriums rekonstruiert werden kann. Entscheidend ist, dass pro Bildes des aufgenommenen Films nur so wenige Farbstoffe aktiv sind, dass sie optisch trennbar und somit präzise zu lokalisieren sind. Da auf verschiedenen Bildern unterschiedliche Farbstoffe aktiv und inaktiv sind, kann so die Position aller Farbstoffe rekonstruiert werden. Bei der Stochastic Optical Reconstruction Mikroskopie (STORM) [110–113] und der Photoactivated Localization Mikroskopie, (PALM) [114] wird dies z. B. durch die stochastische Aktivierung lichtschtbarer Farbstoffe erreicht. Aber auch das Bleichen kann ausgenutzt werden, um mehrere Farbstoffe in einer beugungslimitierten Fläche zu trennen [115]: Da ein Farbstoff nach dem anderen bleicht, kann der letzte aktive Farbstoff lokalisiert und sein Intensitätsprofil von dem Bild abgezogen werden, auf dem der Beitrag des letzten und vorletzten Farbstoffes enthalten ist. Dadurch kann wiederum der vorletzte aktive Farbstoff lokalisiert werden. Auf diese Art und Weise können die Positionen aller Farbstoffe rückwärts rekonstruiert werden. Diese Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um ein mit dem AFM nanoassembliertes DNA-Muster zu rekonstruieren (siehe Kapitel 5 und Publikation P5). Details zum experimentellen Aufbau finden sich im Manuskript M2.

7.3 Manuskripte

M1:

Hermann Gump, Elias M. Puchner, Julia Morfill, Kerstin Blank and Hermann E. Gaub Triggering enzymatic activity with force

M2:

H Gump, SW Stahl, M Strackharn, Elias M. Puchner and Hermann E. Gaub A combined AFM-TIRF microscope for simultaneous single molecule experiments

7.4 Publikationen

Folgende Publikationen, die Teil dieser kumulativen Dissertation sind, können aus rechtlichen Gründen nicht direkt zugänglich gemacht werden. Sie können aber mit einer Zugangsberechtigung über die Links über die Verlage heruntergeladen werden.

P1:

Puchner, E.M., A. Alexandrovich, A.L. Kho, U. Hensen, L.V. Schafer, B. Brandmeier, F. Grater, H. Grubmuller, H.E. Gaub, and M. Gautel. 2008. Mechanoenzymatics of titin kinase. PNAS 105(36):13385–13390. DOI: 10.1073/pnas.0805034105 <http://www.pnas.org/content/105/36/13385> download open access pdf

P2:

Morfill, J., J. Neumann, K. Blank, U. Steinbach, E.M. Puchner, K.E. Gottschalk, and H.E. Gaub. 2008. Force-based analysis of multidimensional energy landscapes: application of dynamic force spectroscopy and steered molecular dynamics simulations to an antibody fragment-peptide complex. J Mol Biol 381(5):1253-1266. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.06.065 <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002228360800781X> download pdf

P3:

Puchner, E.M., G. Franzen, M. Gautel, and H.E. Gaub. 2008. Comparing proteins by their unfolding pattern. Biophys J 95(1):426-434. DOI: 10.1529/biophysj.108.129999 [http://www.cell.com/biophysj/fulltext/S00063495\(08\)70315-1](http://www.cell.com/biophysj/fulltext/S00063495(08)70315-1) download pdf

P4:

Kufer, S.K., E.M. Puchner, H. Gump, T. Liedl, and H.E. Gaub. 2008. Single-molecule cut-and-paste surface assembly. Science 319(5863):594-596. DOI: 10.1126/science.1151424 <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/319/5863/594>

P5:

Kufer, S.K., M. Strackharn, S.W. Stahl, H. Gump, E.M. Puchner, and H.E. Gaub. 2009. Optically monitoring the mechanical assembly of single molecules. Nature Nanotechnology 4(1): 45-9 DOI: 10.1038/NNANO.2008.333 <http://www.nature.com/nnano/journal/v4/n1/abs/nnano.2008.333.html> download pdf

P6:

Puchner, E.M., S.K. Kufer, M. Strackharn, S.W. Stahl, and H.E. Gaub. 2008. Nanoparticle Self- Assembly on a DNA-Scaffold Written by Single-Molecule Cut-and-Paste. Nano Letters 8(11): 3692-5 DOI: 10.1021/nl8018627 <http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/nl8018627> download pdf 8. Referenzen <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/tirf/tirfintro.html>

REFERENZEN

1. Morfill, J., et al., B-S transition in short oligonucleotides. *Biophys J*, 2007. 93(7): p. 2400–2409.
2. Lange, S., et al., The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science*, 2005. 308(5728): p. 1599–1603.
3. Kersey, P.J., et al., The International Protein Index: An integrated database for proteomics experiments. *Proteomics*, 2004. 4(7): p. 1985–1988.
4. Davison, D.B., The number of human genes and proteins. 2006 International Conference on Computational Nanoscience and Nanotechnology - ICCN 2002 - AN INTERDISCIPLINARY INTEGRATIVE FORUM ON NANOTECHNOLOGY COMPUTATIONAL EFFORTS IN THE BIOLOGY, CHEMISTRY, PHYSICS AND MATERIALS FIELDS, 2002: p. 6–9.
5. Debrunner, P.G. and H. Frauenfelder, Dynamics of Proteins. *Annual Review of Physical Chemistry*, 1982. 33: p. 283–299.
6. Frauenfelder, H., F. Parak, and R.D. Young, Conformational Substates in Proteins. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 1988. 17: p. 451–479.
7. Frauenfelder, H., S.G. Sligar, and P.G. Wolynes, The Energy Landscapes and Motions of Proteins. *Science*, 1991. 254(5038): p. 1598–1603.
8. Eisenmesser, E.Z., et al., Enzyme dynamics during catalysis. *Science*, 2002. 295(5559): p. 1520–1523.
9. Eisenmesser, E.Z., et al., Intrinsic dynamics of an enzyme underlies catalysis. *Nature*, 2005. 438(7064): p. 117–121.
10. Edman, L., et al., The fluctuating enzyme: a single molecule approach. *Chemical Physics*, 1999. 247(1): p. 11–22.
11. Lu, H.P., L. Xun, and X.S. Xie, Single-molecule enzymatic dynamics. *Science*, 1998. 282(5395): p. 1877–1882.
12. English, B.P., et al., Ever-fluctuating single enzyme molecules: Michaelis-Menten equation revisited. *Nat. Chem. Biol.*, 2006. 2(2): p. 87–94.
13. Bell, G.I., Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science*, 1978. 200(4342): p. 618–627.
14. Evans, E. and K. Ritchie, Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys J*, 1997. 72(4): p. 1541–1555.
15. Evans, E. and K. Ritchie, Strength of a weak bond connecting flexible polymer chains. *Biophys J*, 1999. 76(5): p. 2439–2447.
16. Dudko, O.K., et al., Beyond the conventional description of dynamic force spectroscopy of adhesion bonds. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003. 100(20): p. 11378–11381.
17. Sarkar, A., S. Caamano, and J.M. Fernandez, The elasticity of individual titin PEVK exons measured by single molecule atomic force microscopy. *J Biol Chem*, 2005. 280(8): p. 6261–6264.
18. Li, H., et al., Multiple conformations of PEVK proteins detected by single-molecule techniques. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(19): p. 10682–10686.

- 19.** Linke, W.A., et al., PEVK domain of titin: an entropic spring with actin-binding properties. *J Struct Biol*, 2002. 137(1-2): p. 194–205.
- 20.** Rief, M., et al., Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science*, 1997. 276(5315): p. 1109–1112.
- 21.** Kellermayer, M.S., et al., Folding-unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers. *Science*, 1997. 276(5315): p. 1112–1116.
- 22.** Rief, M., et al., The mechanical stability of immunoglobulin and fibronectin III domains in the muscle protein titin measured by atomic force microscopy. *Biophys J*, 1998. 75(6): p. 3008–3014.
- 23.** Li, H., et al., Reverse engineering of the giant muscle protein titin. *Nature*, 2002. 418(6901): p. 998–1002.
- 24.** Li, H., et al., Point mutations alter the mechanical stability of immunoglobulin modules. *Nat Struct Biol*, 2000. 7(12): p. 1117–1120
- 25.** Lange, S., et al., Dimerisation of myomesin: Implications for the structure of the sarcomeric M-band. *Journal of Molecular Biology*, 2005. 345(2): p. 289–298.
- 26.** Fukuzawa, A., et al., Interactions with titin and myomesin target obscurin and obscurin-like 1 to the M-band: implications for hereditary myopathies. *J Cell Sci*, 2008. 121(Pt 11): p. 1841–1851.
- 27.** Mayans, O., et al., Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. *Nature*, 1998. 395: p. 863–869.
- 28.** Nicolao, P., et al., Autosomal dominant myopathy with proximal weakness and early respiratory muscle involvement maps to chromosome 2q. *Am J Hum Genet*, 1999. 64(3): p. 788–92.
- 29.** Edstrom, L., et al., Myopathy with respiratory failure and typical myofibrillar lesions. *J Neurol Sci*, 1990. 96(2-3): p. 211–28.
- 30.** Peng, J., et al., Cardiac hypertrophy and reduced contractility in hearts deficient in the titin kinase region. *Circulation*, 2007. 115(6): p. 743–751.
- 31.** Volkman, B.F., et al., Two-state allosteric behavior in a singledomain signaling protein. *Science*, 2001. 291(5512): p. 2429–2433.
- 32.** Henzler-Wildman, K. and D. Kern, Dynamic personalities of proteins. *Nature*, 2007. 450: p. 964–972.
- 33.** Boehr, D.D., et al., The dynamic energy landscape of dihydrofolate reductase catalysis. *Science*, 2006. 313(5793): p. 1638–1642.
- 34.** Hammes-Schiffer, S. and S.J. Benkovic, Relating protein motion to catalysis. *Annu. Rev. Biochem.*, 2006. 75: p. 519–541.
- 35.** Xie, X.S. and H.P. Lu, Single-molecule enzymology. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. 274(23): p. 15967–15970.
- 36.** Edman, L. and R. Rigler, Memory landscapes of single-enzyme molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000. 97(15): p. 8266–8271.
- 37.** Sarda, L. and P. Desnuelle, Action De La Lipase Pancreatique Sur Les Esters En Emulsion. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1958. 30(3): p. 513–521.
- 38.** Yuan, Z., J. Zhao, and Z.X. Wang, Flexibility analysis of enzyme active sites by crystallographic temperature factors. *Protein Engineering*, 2003. 16(2): p. 109–114.
- 39.** Uppenberg, J., et al., Sequence, Crystal-Structure Determination and Refinement of 2 Crystal Forms of Lipase-B from *Candida-Antarctica*. *Structure*, 1994. 2(4): p. 293–308.
- 40.** Velonia, K., et al., Single-enzyme kinetics of CALB-catalyzed hydrolysis. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2005. 44(4): p. 560–564.
- 41.** Engelkamp, H., et al., Do enzymes sleep and work? *Chem Commun (Camb)*, 2006(9): p. 935–40.
- 42.** Flomenbom, O., et al., Stretched exponential decay and correlations in the catalytic activity of fluctuating single lipase molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(7): p. 2368–2372.
- 43.** De Cremer, G., et al., Dynamic disorder and stepwise deactivation in a chymotrypsin catalyzed hydrolysis reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007. 129(50): p. 15458–15459.

- 44.**
Luo, G., et al.,
Dynamic distance disorder in proteins is caused by trapping.
J. Phys. Chem. B, 2006. 110(19): p. 9363–9367.
- 45.**
Pluckthun, A., *Antibody Engineering*.
Current Opinion in Biotechnology, 1991. 2(2): p. 238–246.
- 46.**
Hanes, J. and A. Pluckthun, In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. 94(10): p. 4937–4942.
- 47.**
Zahnd, C., et al., Directed in vitro evolution and crystallographic analysis of a peptidebinding single chain antibody fragment (scFv) with low picomolar affinity.
Journal of Biological Chemistry, 2004. 279(18): p. 18870–18877.
- 48.**
Binnig, G., C.F. Quate, and C. Gerber, *Atomic Force Microscope*.
Physical Review Letters, 1986. 56(9): p. 930–933.
- 49.**
Watson, J.D. and F.H.C. Crick, *Molecular Structure of Nucleic Acids - a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*.
Nature, 1953. 171(4356): p. 737–738.
- 50.**
Chen, J.H. and N.C. Seeman,
Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube.
Nature, 1991. 350(6319): p. 631–633.
- 51.**
Shih, W.M., J.D. Quispe, and G.F. Joyce, A 1.7-kilobase singlestranded DNA that folds into a nanoscale octahedron.
Nature, 2004. 427(6975): p. 618–621.
- 52.**
Rothemund, P.W., et al.,
Design and characterization of programmable DNA nanotubes.
J Am Chem Soc, 2004. 126(50): p. 16344–16352.
- 53.**
Winfree, E., et al.,
Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals.
Nature, 1998. 394(6693): p. 539–544.
- 54.**
Rothemund, P.W.,
Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns.
Nature, 2006. 440(7082): p. 297–302.
- 55.**
Pellegrino, T., et al., On the development of colloidal nanoparticles towards multifunctional structures and their possible use for biological applications.
Small, 2005. 1(1): p. 48–63.
- 56.**
Mirkin, C.A., et al., A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials.
Nature, 1996. 382(6592): p. 607–609.
- 57.**
Nykypanchuk, D., et al.,
DNA-guided crystallization of colloidal nanoparticles.
Nature, 2008. 451(7178): p. 549–552.
- 58.**
Alivisatos, A.P., et al.,
Organization of nanocrystal molecules' using DNA.
Nature, 1996. 382(6592): p. 609–611.
- 59.**
Strunz, T., et al.,
Dynamic force spectroscopy of single DNA molecules.
Proc Natl Acad Sci USA, 1999. 96(20): p. 11277–11282.
- 60.**
EssevazRoulet, B., U. Bockelmann, and F. Heslot, Mechanical separation of the complementary strands of DNA.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. 94(22): p. 11935–11940.
- 61.**
Rief, M., H. Clausen-Schaumann, and H.E. Gaub,
Sequencedependent mechanics of single DNA molecules.
Nat Struct Biol, 1999. 6(4): p. 346–349.
- 62.**
Krautbauer, R., M. Rief, and H.E. Gaub, Unzipping DNA oligomers.
Nano Letters, 2003. 3(4): p. 493–496.
- 63.**
Finer, J.T., R.M. Simmons, and J.A. Spudich, Single Myosin Molecule Mechanics - Piconewton Forces and Nanometer Steps.
Nature, 1994. 368(6467): p. 113–119.
- 64.**
Molloy, J.E., et al.,
Single-Molecule Mechanics of Heavy-Meromyosin and S1 Interacting with Rabbit or Drosophila Actins Using Optical Tweezers.
Biophysical Journal, 1995. 68(4): p. 298–305.
- 65.**
Tskhovrebova, L. and J. Trinick,
Titin: Properties and family relationships.
Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2003. 4(9): p. 679–689.
- 66.**
Huxley, H.E., et al., Time-Resolved X-Ray-Diffraction Studies of the Myosin Layer-Line Reflections During Muscle-Contraction.
Journal of Molecular Biology, 1982. 158(4): p. 637–684.
- 67.**
Linari, M., et al.,
Interference fine structure and sarcomere length dependence of the axial xray pattern from active single muscle fibers.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. 97(13): p. 7226–7231.
- 68.**
Minajeva, A., et al., Unfolding of titin domains explains the viscoelastic behavior of skeletal myofibrils.
Biophysical Journal, 2001. 80(3): p. 1442–1451.

- 69.** Blank, K., J. Morfill, and H.E. Gaub, Site-specific immobilization of genetically engineered variants of *Candida antarctica* lipase B. *Chembiochem*, 2006. 7(9): p. 1349–1351.
- 70.** Blank, K., et al., Functional expression of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 2006. 125(4): p. 474–483.
- 71.** Morfill, J., et al., Force-based analysis of multidimensional energy landscapes: Application of dynamic force spectroscopy and steered molecular dynamics simulations to an antibody fragment-peptide complex. *Journal of Molecular Biology*, 2008. 381(5): p. 1253–1266.
- 72.** Levene, M.J., et al., Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations. *Science*, 2003. 299(5607): p. 682–686.
- 73.** Ashkin, A., Applications of Laser Radiation Pressure. *Science*, 1980. 210(4474): p. 1081–1088.
- 74.** Ashkin, A., Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997. 94(10): p. 4853–4860.
- 75.** Dumont, S., et al., RNA translocation and unwinding mechanism of HCVNS3 helicase and its coordination by ATP. *Nature*, 2006. 439(7072): p. 105–108.
- 76.** Maier, B., D. Bensimon, and V. Croquette, Replication by a single DNA polymerase of a stretched single-stranded DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000. 97(22): p. 12002–12007.
- 77.** Smith, D.E., et al., The bacteriophage phi 29 portal motor can package DNA against a large internal force. *Nature*, 2001. 413(6857): p. 748–752.
- 78.** Rock, R.S., et al., In vitro assays of processive myosin motors. *Methods-a Companion to Methods in Enzymology*, 2000. 22(4): p. 373–381.
- 79.** Bockelmann, U., et al., Unzipping DNA with optical tweezers: high sequence sensitivity and force flips. *Biophysical Journal*, 2002. 82(3): p. 1537–1553.
- 80.** Visscher, K., M.J. Schnitzer, and S.M. Block, Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp. *Nature*, 1999. 400(6740): p. 184–189.
- 81.** Mehta, A.D., et al., Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature*, 1999. 400(6744): p. 590–593.
- 82.** Smith, S.B., L. Finzi, and C. Bustamante, Direct Mechanical Measurements of the Elasticity of Single DNA-Molecules by Using Magnetic Beads. *Science*, 1992. 258(5085): p. 1122–1126.
- 83.** Strick, T.R., V. Croquette, and D. Bensimon, Single-molecule analysis of DNA uncoiling by a type II topoisomerase. *Nature*, 2000. 404(6780): p. 901–904.
- 84.** Merkel, R., et al., Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature*, 1999. 397(6714): p. 50–55.
- 85.** Lindsay, S.M., et al., Stm and Afm Images of Nucleosome DNA under Water. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 1989. 7(2): p. 279–287.
- 86.** Weisenhorn, A.L., et al., Molecular-Resolution Images of Langmuir-Blodgett-Films and DNA by Atomic Force Microscopy. *Langmuir*, 1991. 7(1): p. 8–12.
- 87.** Radmacher, M., et al., From Molecules to Cells - Imaging Soft Samples with the Atomic Force Microscope. *Science*, 1992. 257(5078): p. 1900–1905.
- 88.** Radmacher, M., et al., DIRECT OBSERVATION OF ENZYMEACTIVITY WITH THE ATOMIC-FORCE MICROSCOPE. *Science*, 1994. 265(ISI:A1994PF33600034).
- 89.** Butt, H.J. and J. M., CALCULATION OF THERMAL NOISE IN ATOMIC-FORCE MICROSCOPY. *Nanotechnology*, 1995. 6(1): p. 1–7.
- 90.** Walters, D.A., et al., Short cantilevers for atomic force microscopy. *Review of Scientific Instruments*, 1996. 67(10): p. 3583–3590.
- 91.** Viani, M.B., et al., Small cantilevers for force spectroscopy of single molecules. *Journal of Applied Physics*, 1999. 86(4): p. 2258–2262.
- 92.** Beyder, A. and F. Sachs, Microfabricated torsion levers optimized for low force and highfrequency operation in fluids. *Ultramicroscopy*, 2006. 106(8-9): p. 838–846.
- 93.** Schlierf, M. and M. Rief, Temperature softening of a protein in single-molecule experiments. *J Mol Biol*, 2005. 354(2): p. 497–503.
- 94.** Janovjak, H., et al., Unfolding pathways of native bacteriorhodopsin depend on temperature. *Embo J*, 2003. 22(19): p. 5220–5229.

- 95.** Bustamante, C., et al., Entropic elasticity of lambda-phage DNA. *Science*, 1994. 265(5178): p. 1599–1600.
- 96.** Marko, J.F. and E.D. Siggia, Stretching DNA. *Macromolecules*, 1995. 28(26): p. 8759–8770.
- 97.** Hugel, T., et al., Highly stretched single polymers: atomic-force-microscope experiments versus ab-initio theory. *Phys Rev Lett*, 2005. 94(4): p. 048301.
- 98.** Verdier, P.H., Relaxation Behavior of Freely Jointed Chain. *Journal of Chemical Physics*, 1970. 52(11): p. 5512–&.
- 99.** Perico, A., S. Bisio, and C. Cuniberti, Polymer Dynamics in Dilute-Solutions - the Freely Rotating Chain. *Macromolecules*, 1984. 17(12): p. 2686–2689.
- 100.** Livadaru, L., R.R. Netz, and H.J. Kreuzer, Stretching Response of Discrete Semiflexible Polymers. *Macromolecules*, 2003. 36(10): p. 3732–3814.
- 101.** Axelrod, D., Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic*, 2001. 2(11): p. 764–774.
- 102.** Funatsu, T., et al., Imaging of Single Fluorescent Molecules and Individual Atp Turnovers by Single Myosin Molecules in Aqueous-Solution. *Nature*, 1995. 374(6522): p. 555–559.
- 103.** Tokunaga, M., et al., Single molecule imaging of fluorophores and enzymatic reactions achieved by objective-type total internal reflection fluorescence microscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997. 235(1): p. 47–53.
- 104.** Axelrod, D., Selective imaging of surface fluorescence with very high aperture microscope objectives. *Journal of Biomedical Optics*, 2001. 6(1): p. 6–13.
- 105.** Ober, R.J., S. Ram, and E.S. Ward, Localization accuracy in single-molecule microscopy. *Biophysical Journal*, 2004. 86(2): p. 1185.
- 106.** Yildiz, A., et al., Myosin V walks hand-over-hand: Single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science*, 2003. 300(5628): p. 2061–2065.
- 107.** Bobroff, N., Position Measurement with a Resolution and Noise-Limited Instrument. *Review of Scientific Instruments*, 1986. 57(6): p. 1152–1157.
- 108.** Lacoste, T.D., et al., Ultrahigh-resolution multicolor colocalization of single fluorescent probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000. 97(17): p. 9461–9466.
- 109.** Qu, X.H., et al., Nanometer-localized multiple single-molecule fluorescence microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. 101(31): p. 11298–11303.
- 110.** Rust, M.J., M. Bates, and X.W. Zhuang, Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature Methods*, 2006. 3(10): p. 793–795.
- 111.** Huang, B., et al., Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science*, 2008. 319(5864): p. 810–813.
- 112.** Bates, M., et al., Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science*, 2007. 317(5845): p. 1749–1753.
- 113.** Heilemann, M., et al., Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2008. 47(33): p. 6172–6176.
- 114.** Betzig, E., et al., Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 2006. 313(5793): p. 1642–1645.
- 115.** Gordon, M.P., T. Ha, and P.R. Selvin, Single-molecule high-resolution imaging with photobleaching. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. 101(17): p. 6462–6465.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich ganz herzlich bei allen Bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben.

Größter Dank gilt meinem Doktorvater Hermann Gaub, der mich in jeder Hinsicht gefördert hat. Er stand mir jederzeit auf herzhafte Art mit Rat, Inspiration und Zuspruch zur Seite und hat mir äußerst spannende und lehrreiche Projekte ermöglicht. Überdies sollte sein Lehrstuhl im Michelin-Führer Erwähnung finden.

Meinem IDK-Mentor Joachim Rädler möchte ich für Unterstützung und Rat danken, wie auch dem IDK und seinen Mitarbeitern für das vielseitige und interdisziplinäre Forschungs- und Bildungsprogramm.

Der ganzen Gambicrew möchte ich für die unvergleichlich angenehme, abwechslungsreiche und inspirierende Zeit Dank sagen. Besonders: Stefan Kufer für seine Kontinuität, den durchhaltenden Ehrgeiz und die angenehme Experimentieratmosphäre. Hätten wir nur „a bissi“ früher gewusst wie toll das alles wird, dann wär's noch schöner gewesen!

Stefan Stahl für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bei vielen Projekten, sowie für das Aufbauen des besten New-Generation-AFM mit optothermischer Cantileverregelung. May the force be with you!

Hermann Gumpff für die lange und gute Zusammenarbeit bei vielen Projekten.

Kerstin Blank für die gute Zusammenarbeit bei fluktuierenden Enzymen und anderen Projekten, wie auch bei Ralf David, Mathias Strackharn, und Julia Zimmermann, der besten Banknachbarin überhaupt.

Kay Gottschalk, Julia Schmitz für die Zell-Experimente, bei denen ich seit langer Zeit wieder etwas Größeres als einzelne Moleküle gesehen habe.

Philip Tinnefeld, Jan Vogelsang und Thorben Cordes für die neuen SMCP-Versuche auf dem besten Mikroskop überhaupt.

Ann Fornof for correcting my papers and our interesting discussions.

Angelika Kardinal und Thomas Nicolaus für die chemische Unterstützung und Vorbereitung.

Dominik Ho, Philip Severin und allen Stemplern für die geselligen Grill-Zeiten und Diskussionen.

Prof. Mathias Gautel vom King's College London möchte ich für die sehr spannende Kollaboration bezüglich der Titinkinase danken, das Projekt hat mir spannende medizinisch relevante Forschung ermöglicht und er fand immer für lehrreiche Diskussionen Zeit.

Auch den Mitgliedern seiner Gruppe, Birgit Brandmeier, Alexander Alexandrovich, Gereon Franzen und Ay Lin Kho, sei für die gute Zusammenarbeit gedankt.

Prof. Helmut Grubmüller vom Max-Planck Institut Göttingen danke ich ganz herzlich für die tolle Zusammenarbeit bei unserem Titinkinase-Projekt. Auch er stand mir immer mit wertvollem Rat zur Seite. Besonderer Dank auch an seine Gruppe, Frauke Gräter, Ulf Hensen und Lars Schäfer.

Stephan von Cölln aus Prof. Manfred Radmachers Gruppe für die Kollaboration mit der alkalischen Phosphatase.

Prof. Hans Heuss, Nijmegen, für die Zusammenarbeit mit RNA-Riboswitches und die interessanten und lehrreichen Gespräche.

Den Korrekturlesern meiner Arbeit möchte ich für die Unterstützung im Endspurt danken: Stefan Kufer, Stefan Stahl, Philip Severin, Mathias Strackharn, Hermann Gumpff, Ralf David, Britta Person und Stephan Puchner.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich immer auf meinem Weg unterstützt und motiviert hat. Meiner Mutter vor allem für ihre Fürsorge und Unterstützung, meinen Brüdern Martin und Stephan für ihre hilfreichen Ratschläge, anspornende Diskussionen und unseren Humor.



innovatrades

Ihre Plattform für Information.