

Einzelmolekülkraftspektroskopie an molekularerkennenden Systemen

Diplomarbeit

von

André Körnig

Fakultät für Physik
Universität Bielefeld
Juni 2008

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und dabei keine weiteren als die verwendeten Hilfsmittel verwendet habe.

Bielefeld, den 10.06.2008

André Körnig

Gutachter:

Prof. Dr. Dario Anselmetti

Prof. Dr. Norbert Sewald

Abgabedatum der Arbeit: 10. Juni 2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
2	Die untersuchten Systeme	5
2.1	Transkriptionsfaktoren	5
2.1.1	Allgemeines	5
2.1.2	Der Transkriptionsfaktor PhoB	6
2.2	Zellaggregationsfaktoren	8
2.2.1	Zelladhäsion in Schwämmen	8
2.2.2	Aggregationsfaktoren	9
2.2.3	Der Aggregationsfaktor in <i>microciona prolifera</i>	9
3	Kraftspektroskopie	12
3.1	Rasterkraftmikroskopie	12
3.1.1	Allgemeines	12
3.1.2	Abbildungsmodi	13
3.1.3	Kraft-Distanz-Kurven	14
3.1.4	Kalibrierung der Kraftsensoren	15
3.2	Kräfte und Kinetik in der Kraftspektroskopie	17
3.2.1	Theorie der Reaktionsraten	17
3.2.2	Dissoziation unter externen Kräften	19
4	Materialien und Methoden	22
4.1	Instrumente	22
4.2	Auswertung der Kraft-Distanz-Kurven	22
4.3	PhoB-Experimente	24
4.4	g200-Experimente	27

5 Resultate und Diskussion	28
5.1 Zelladhäsion in Schwämmen	28
5.1.1 Kraftspektroskopieexperimente	29
5.1.2 DFS-Experimente mit g200	31
5.2 PhoB	34
5.2.1 Spezifität der Proteinbindung	35
5.2.2 Vergleich von PhoB Protein mit Peptid	36
5.2.3 Spezifität der Peptidbindung	39
6 Zusammenfassung	41
Abkürzungsverzeichnis	43
Literaturverzeichnis	45

1 Einleitung

Für lebende Organismen sind Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen von großer Bedeutung. Dabei ist es oft notwendig, dass ein Biomolekül einen bestimmten Bindepartner aus einer Vielzahl anderer Moleküle erkennt und mit diesem eine reversible Bindung eingeht. Dieser Prozess wird molekulare Erkennung genannt und beruht auf dem sog. Schlüssel-Schloss-Prinzip. Die an solch einer spezifischen Bindung beteiligten Wechselwirkungen, wie z.B. Ionenbindungen, Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Kräfte sind alle sehr schwach und nur von kurzer Reichweite. Passen zwei Moleküle aufgrund ihrer räumlichen Anordnung und ihrer chemischen Struktur zueinander wie der Schlüssel zu einem Schloss, summieren sich diese schwachen Effekte zu einer wirksamen Bindung. Die Reversibilität und die damit zusammenhängende begrenzte Lebensdauer dieser Bindung ermöglichen eine variable Steuerung organischer Prozesse in Abhängigkeit äußerer Einflüsse.

Die klassischen molekularbiologischen Verfahren untersuchen die Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen in einem großen Molekülensemble (oft in der Größenordnung von $1 \mu\text{Mol} \approx 10^{17}$ Moleküle). Dabei gehen jedoch oft Informationen über schwach bindende oder nur in geringen Mengen vorkommende Moleküle (z.B. Subpopulationen oder heterogene Proben) verloren. Außerdem kann mit diesen Methoden wenig über die molekularen Mechanismen der Bindung herausgefunden werden.

Auf Grund dieser Tatsache haben sich in den vergangenen zwei Jahrzehnten experimentelle Methoden entwickelt, die es ermöglichen molekulare Komplexe auf Einzelmolekülebene zu untersuchen. Eine dieser Methoden ist die Einzelmolekülkraftspektroskopie (*single molecule force spectroscopy*, SMFS), bei der ein einzelner Molekülkomplex durch Anlegen einer äußeren Kraft zur Dissoziation gebracht wird. Um die geringen Kräfte, die für diese Dissoziationsereignisse notwendig sind detektieren zu können, benötigt man einen sehr sensitiven Kraftmesser wie das Rasterkraftmikroskop (*atomic force*

microscope, AFM) [1]. Die Bestimmung der Kräfte erfolgt über die Detektion der mechanischen Verbiegung eines mikrofabrizierten Federbalkens (engl.: *cantilever*) mit Hilfe eines reflektierten Laserstrahls.

Experimente der dynamischen Kraftspektroskopie (*Dynamic Force Spectroscopy*, DFS; eine Serie von SMFS-Messungen bei unterschiedlichen Ziehgeschwindigkeiten) ermitteln die Abhängigkeit der Kraftverteilungen von der „Loading-Rate“ [2]. Solche DFS-Experimente ermöglichen die Bestimmung kinetischer Informationen wie der thermischen Off-Ratenkonstante des Dissoziationsprozesses und somit eine Quantifizierung der Bindung [3].

Die AFM-Kraftspektroskopie wurde schon auf eine Vielzahl von spezifisch bindenden biologischen Rezeptor-Ligand-Systemen angewandt, wie dem (Strept)avidin-Biotin-Komplex [4, 5], komplementären DNA-Strängen [6, 7], Antikörper-Antigen-Paaren [8, 9] und Protein-DNA-Komplexen [10, 11].

In dieser Arbeit wurden kraftspektroskopische Untersuchungen an zwei verschiedenen biologischen Systemen durchgeführt. Zum einen werden DNA-Protein bzw. DNA-Peptid Wechselwirkungen mit Hilfe des Transkriptionsfaktor PhoB aus *E. coli* untersucht. Zum anderen wird die Bindung zwischen Kohlenhydratkomplexen erforscht. Dazu wird die aus dem Schwamm *microciona prolifera* gewonnene Glykaneinheit g200 betrachtet, die einen wichtigen Teil der an Zelladhäsion in Schwämmen beteiligten Zellaggregationsfaktoren darstellt.

Im folgenden Kapitel (Kapitel 2) werden die beiden biologischen Systeme vorgestellt. Anschließend werden die Grundlagen der Kraftspektroskopie erläutert und der Zusammenhang zwischen Kräften, Kinetik und Thermodynamik dargestellt (Kapitel 3). Nach der Beschreibung der verwendeten Materialien und Methoden (Kapitel 4) werden die gewonnenen Resultate vorgestellt und diskutiert (Kapitel 5) und abschließend folgt eine kurze Zusammenfassung.

2 Die untersuchten Systeme

In diesem Kapitel werden die beiden biologischen Systeme, die in dieser Arbeit untersucht wurden, erläutert. Der erste Teil stellt die Funktion von Transkriptionsfaktoren vor und geht näher auf den im Bakterium *E.coli* vorkommenden Transkriptionsaktivator PhoB ein. Der zweite Teil beschreibt die Zelladhäsion in Schwämmen und zeigt auf, welche molekularen Untereinheiten daran beteiligt sind.

2.1 Transkriptionsfaktoren

2.1.1 Allgemeines

Lebende Organismen haben die Fähigkeit auf Veränderungen in der Umwelt zu reagieren und sich anzupassen. Dies geschieht, indem sie die Produktion bestimmter Proteine verändern. Selbst einfache Lebewesen wie das Bakterium *E. coli* können die Synthese von vielen Proteinen in Abhängigkeit der Umwelt um den Faktor 10^3 verändern. Diese Anpassungsfähigkeit beruht unter anderem auf der Genregulation, der Kontrolle der Genexpression. Unter Genexpression versteht man den Prozess, bei dem aus einer bestimmten DNA-Sequenz das entsprechende Protein synthetisiert wird. Dieser kann in drei Phasen eingeteilt werden. Er beginnt mit der Transkription eines Gens zu einer mRNA. Danach erfolgt an den Ribosomen die Translation der mRNA Information zu einer Proteinsequenz. Abschließend kann noch eine posttranslationale Modifikation stattfinden, in der die entstandenen Proteine noch bearbeitet und verändert werden.

Der erste und ein entscheidender Schritt der Genregulation ist die Steuerung des Transkriptionsstarts. Hier wird entschieden, ob und wie stark das entsprechende Gen exprimiert wird. Dabei spielen Proteine, die Transkriptionsfaktoren genannt werden, die entscheidende Rolle. Diese Proteine binden über die DNA-Bindedomäne (DBD) spezifisch an eine bestimmte DNA-Sequenz und beeinflussen über die Wechselwirkung mit der RNA-Polymerase die Transkription. Unterschieden wird dabei zwischen Represso-

ren, welche die Bindung der RNA-Polymerase an die DNA blockieren und damit die Transkription hemmen, und Aktivatoren, welche die Rate der Transkription erhöhen. Neben der DBD besitzen Transkriptionsfaktoren oft noch eine regulatorische Domäne, die Veränderungen der Umgebung detektiert und daraufhin die Aktivität der DBD beeinflusst. Eine Einteilung der Transkriptionsfaktoren findet oft über die Struktur der DNA-Bindedomäne statt. Bekannte Strukturen sind das *helix-loop-helix* Motiv, der Leucizipper und der Zinkfinger. Der in dieser Arbeit untersuchte Transkriptionsfaktor PhoB gehört zur Klasse der *helix-turn-helix* Transkriptionsfaktoren.

2.1.2 Der Transkriptionsfaktor PhoB

Phosphor ist ein für Lebewesen wichtiges Element. Es spielt eine bedeutende Rolle im Energiestoffwechsel (z.B. ATP) und im Aufbau von Membranlipiden, Nukleinsäuren und komplexen Kohlenhydraten. Das Bakterium *E.coli* kann alle Phosphorquellen nutzen, die in der Natur vorkommen. Die Gene der Proteine, die an der Aufnahme und Verwertung von Phosphor beteiligt sind, werden alle von einem Zweikomponentensystem reguliert: der Sensorkinase PhoR, welche die Phosphatkonzentration detektiert und dem Transkriptionsfaktor PhoB, der die Genexpression aktiviert.

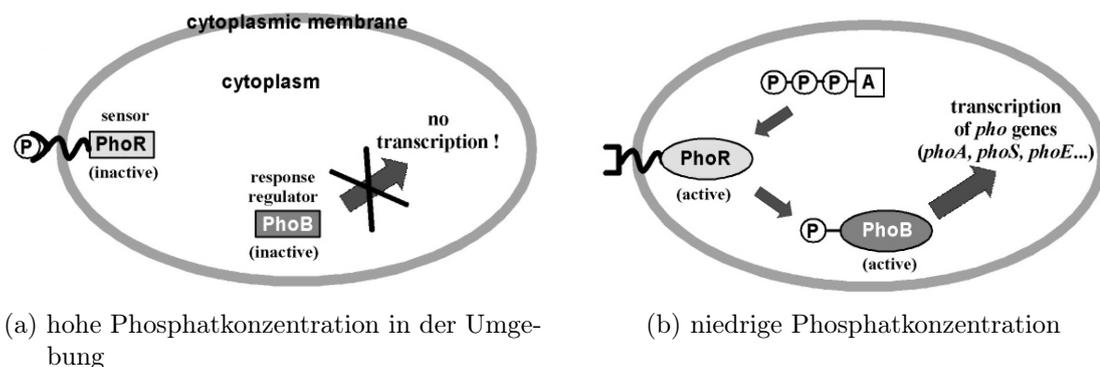


Abbildung 1.1: PhoR/PhoB Regulationssystem in *E.coli*. Aus [12]

Bei hohen Phosphatkonzentrationen ist Phosphat an der außerhalb der Zelle liegenden Domäne des PhoR-Proteins gebunden, sodass dieses inaktiv ist (Abb.: 1.1a). Sinkt die Konzentration in der Umgebung der Zelle unter einen bestimmten Wert ($< 4\mu\text{mol l}^{-1}$),

dissoziiert ein Phosphat vom PhoR und bewirkt eine Konformationsänderung. Dadurch wird PhoR aktiviert und überträgt den γ -Phosphatrest eines ATP auf den Transkriptionsfaktor PhoB. Die Phosphorylierung führt zu einer Konformationsänderung des PhoB. Er bindet an die DNA und aktiviert durch Wechselwirkung mit der σ^{70} -Untereinheit der RNA-Polymerase [13] die Transkription fast 40 verschiedener Gene auf 9 Operons [13–15]. Dadurch werden die Proteine synthetisiert, die es der Zelle ermöglichen auf kleine Phosphatkonzentrationen zu reagieren. Steigt die Phosphatkonzentration in der Umgebung der Zelle wieder an, wird PhoB von PhoR wieder dephosphoryliert, wodurch die Bindungsaffinität von PhoB an die Bindungsstelle der DNA sinkt und sich dadurch auch die Transkription der entsprechenden Gene verringert.

PhoB ist ein 25kDa Transkriptionsfaktor. Er besteht aus insgesamt 229 Aminosäuren und gehört zur Klasse der *helix-turn-helix* Proteine. Er setzt sich zusammen aus einer regulatorischen Phosphorylierungsdomäne im N-terminalen Bereich (1-124) und einer DNA-Bindedomäne im C-terminalen Bereich (130-229), die über einen 6 Aminosäuren großen Linker miteinander verbunden sind. Für beide Domänen sind die Kristallstrukturen bekannt [16, 17]. Die DNA-Bindedomäne hat die Topologie $\beta^1\beta^2\beta^3\beta^4\alpha^1\beta^5\alpha^2\alpha^3\beta^6\beta^7$, besteht also aus 7 β -Faltblättern und 3 α -Helices [15].

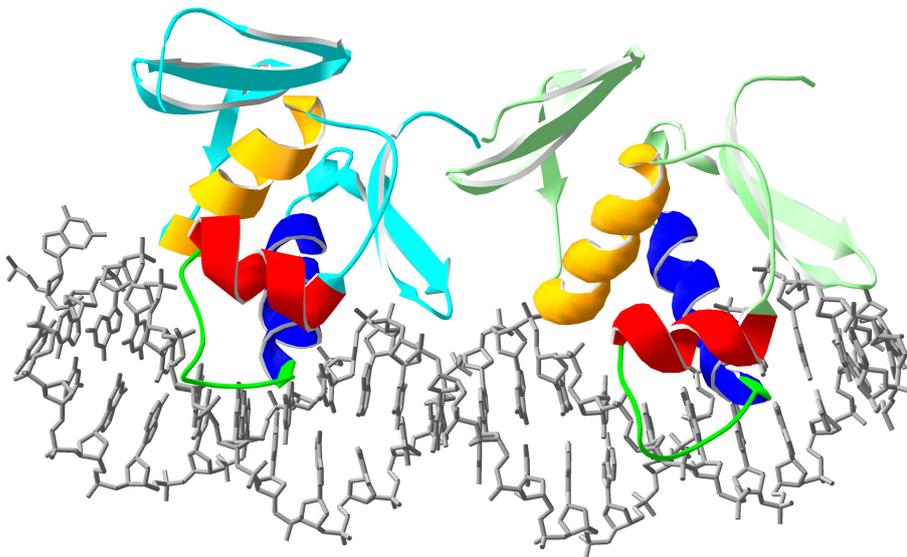


Abbildung 1.2: Zwei PhoB DNA-Bindedomänen an die DNA gebunden. (PDB-Datenbank: 1GXP.pdb)

Das *helix-turn-helix* Motiv der DNA-Bindedomäne des PhoB besteht aus der α^3 Erkennungshelix (Abb. 1.2: blaue Helix), die in die große Furche der DNA bindet und der α^2 Helix (rot), welche die DNA-Protein-Wechselwirkung stabilisiert. Die starre Biegung (*turn*), die meist in Proteinen der HTH-Klasse zu finden ist, ist hier durch eine Schleife (*loop* - grün) zwischen α^3 und α^2 ersetzt. Über diesen *loop* findet auch die Wechselwirkung mit der σ^{70} -Untereinheit der RNA-Polymerase statt und wird deshalb auch *transactivation loop* genannt.

Die an der sequenzspezifischen Bindung zwischen PhoB und der DNA-Sequenz (pho-Box) beteiligten Kräfte sind die gleichen, die auch bei unspezifischen Wechselwirkungen auftreten, wie z.B. elektrostatische Kräfte, Van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen. Die hohe Selektivität und Sequenzabhängigkeit beruht auf der räumlichen Anordnung und der Komplementarität der Strukturen. Hydrophile Aminosäuren des PhoB, wie Asparagin, Glutamin, Serin oder Tyrosin binden über Van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen an die Basenpaaren der DNA, während basische Seitenketten, wie Lysin oder Arginin, die Bindung verstärken in dem sie unspezifisch an das negativ geladenen Rückgrat der DNA binden [15].

Die pho-Boxen der verschiedenen Operons weisen kleine Unterschiede auf. Sie haben aber die Sequenz 5'-CTGTCATA(A/T)A(T/A)CTGTCA(C/T)3' gemeinsam [13] mit zwei Bindestellen für PhoB (TGTC A). Für die Experimente in dieser Arbeit wurde die pho-Box des *pstS* Operons genutzt, welcher 4 PhoB Bindestellen enthält.

2.2 Zellaggregationsfaktoren

2.2.1 Zelladhäsion in Schwämmen

Zelladhäsion spielt bei vielzelligen Lebewesen eine wichtige Rolle bei strukturbildenden und selbstorganisierenden Prozessen. Ein tiefgehendes und molekulares Verständnis der Zelladhäsion ist von großer Bedeutung für biomedizinische Anwendungen wie z.B. Transplantation oder Zellmetastasierung. Um solch fundamentale Prozesse wie die Zelladhäsion zu verstehen, untersucht man am besten sehr einfache Modellsysteme, um dort die grundlegenden Mechanismen zu erkennen und dann auf Organismen höherer Komplexität anwenden zu können.

Schwämme sind die ältesten und primitivsten existierenden Vielzeller und dienen da-

her schon lange als Modellsystem, um die Zelladhäsion zu studieren. Sie besitzen keine Organe, sondern nur ein paar verschiedenen Zelltypen, die Aufgaben wie z.B. Nahrungsaufnahme, Bildung von Epithelgewebe oder self-nonselb Erkennung übernehmen. Bereits im Jahr 1907 beschrieb Wilson [18] die Existenz einer artspezifischen Reaggregation von Zellen aus Meeresschwämmen. Er dissoziierte die Zellen voneinander, indem er sie durch ein feines Tuch presste. Die Zellen senkten sich danach ab und fingen an sich zu bewegen. Wenn Zellen miteinander in Kontakt kamen, wuchsen sie in der Regel zusammen, bildeten auf diese Art zunächst größere Aggregate, bis sie sich letztendlich zu kleineren funktionsfähigen Schwämmen reorganisierten [19]. Wurden die dissoziierte Zellen zweier verschiedener Schwammspezies mit einander vermischt, so beobachtete Wilson, wie sich nur Zellen der selben Spezies miteinander verbanden, jedoch keine Zellen verschiedener Spezies. Dieser Prozess ist bei Meeresschwämmen stark von der Kalziumkonzentration der Umgebung abhängig. Wurden die Zellen in Meerwasser gemischt, dass statt der üblichen Konzentration von 10 mM Ca^{2+} kein Kalzium enthielt, waren sie nicht mehr in der Lage zu reaggregieren oder bildeten nur kleine Klumpen [20].

2.2.2 Aggregationsfaktoren

Die artenspezifische Assoziation der Schwammzellen erfolgt über verschiedene Interaktionen eines proteoglykanartigen extrazellulären Komplexes, der Aggregationsfaktor (AF) genannt wird. AF von drei verschiedenen Schwammarten wurden aufgereinigt und mit farbigen oder fluoreszierenden Beads gekoppelt und dann ähnliche Experimente wie mit den oben beschriebenen Schwammzellen durchgeführt. Auch hier aggregierten nur die AF einer Schwammart miteinander [21], woraus geschlossen wurde, dass die AF die molekulare Einheit sind, die für die artenspezifische Zellaggregation verantwortlich sind. Diese Experimente verdeutlichen, welche zentrale Rolle diese Proteoglykane in der Artenspezifität der Zelladhäsion einnehmen.

2.2.3 Der Aggregationsfaktor in *microciona prolifera*

Der Aggregationsfaktor vom Meeresschwamm *microciona prolifera* (MAF) ist die globale Molekülstruktur bereits erfolgreich in elektronen- und rasterkraftmikroskopischen Experimenten untersucht worden [22]. Es ist ein ungefähr 20 MDa großes Proteoglykan-Makromolekül und hat eine „sonnenartige“ Struktur (Abb. 2.2). Der Ring besteht aus

ungefähr 20 Proteineinheiten MAFp3 (leere Kreise), von denen jedes nichtkovalent mit einer Einheit des Proteins MAFp4 verbunden ist (schwarzen Kreise), die, sich wiederholend, den MAF „Arm“ bilden.



Abbildung 2.1: Der „Red Beard Sponge“ - *microciona prolifera*

Neben den Proteineinheiten bestehen die MAF aus verschiedenen Glykanuntereinheiten. An den MAFp4 Proteinen hängen mehrere Einheiten eines 6 kDa großen Glykan (g6), die an Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden. Eine andere 200 kDa große Glykaneinheit (g200) ist an die MAFp3 Ringeinheiten gebunden. Abbildung 2.3 zeigt ein Modell, wie artspezifische Zelladhäsion über die MAF vermittelt werden soll, wobei die beiden AF zur Vereinfachung nicht als Ring sondern als Kette dargestellt sind. Die MAFp4 Proteine binden über die g6 (nicht dargestellt) Ca^{2+} -unabhängig an Rezeptoren auf der Zellmembran. Die Wechselwirkung zwischen zwei MAF erfolgt über die g200, von denen ein bis zwei Einheiten an die MAFp3 Proteine gebunden sind.

Die Bindung zwischen den Proteoglykanen MAF wurde schon in mehreren Experimenten untersucht. In den schon beschriebenen bead assay Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass die Bindung speziesspezifisch und von der Anwesenheit von Kalziumionen abhängig ist [22, 25]. Auch in Einzelmolekülexperimenten wurde diese Bindung der Proteoglykane untersucht und gezeigt, dass die Verringerung der Kalziumkonzentration die Bindung verschlechtert. [26]

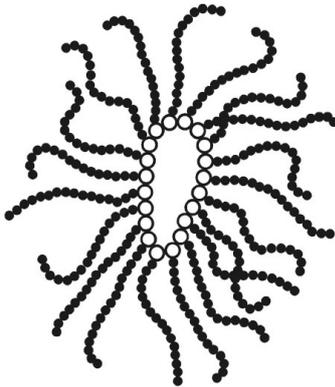


Abbildung 2.2: Struktur des AF aus *micrococcina prolifera*. Aus [23]

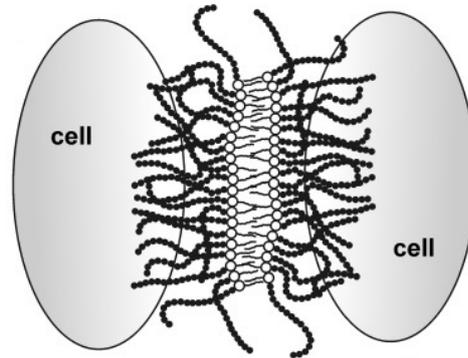


Abbildung 2.3: Zelladhäsion durch MAF. Aus [24]

Die globale Struktur der MAF und deren Bindevverhalten sind also bereits gut bekannt. Die lokale Struktur der Glykane, über die die Bindung zweier MAF vermittelt werden soll, ist dagegen noch nicht sehr gut untersucht. Es ist eine 200 kDa große Glykaneinheit mit einer sehr komplexen Struktur, von der einige Unterstrukturen, wie z.B. ein Trisaccharid [27] oder ein weiteres Disaccharid mit einer Sulfatgruppe [28] identifiziert wurden.

3 Kraftspektroskopie

In diesem Kapitel soll auf die Methode der Kraftspektroskopie eingegangen werden. Dazu wird das Rasterkraftmikroskop vorgestellt, eine Kraft-Distanz-Kurve diskutiert und die theoretischen Grundlagen, vor allem die hinter den Kräften stehende Kinetik und Thermodynamik, erläutert.

3.1 Rasterkraftmikroskopie

3.1.1 Allgemeines

Das Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscope, AFM) wurde erstmals im Jahr 1986 von Binnig, Quate und Gerber [1] vorgestellt und stellte eine Weiterentwicklung des Rastertunnelmikroskops (Scanning Tunneling Microscope, STM) [29, 30] dar. Beides sind so genannte Rastersondenmikroskope, bei denen eine sehr feine Sonde systematisch in einem Raster über die Probe bewegt wird. Dabei wird punktweise die Wechselwirkung zwischen der Sonde und der Oberfläche der Probe detektiert und anschließend zu einem Bild zusammengefügt. Das STM setzt eine leitfähige Probe voraus, da es den stark abstandsabhängigen Tunnelstrom zwischen der Probe und einer feinen Spitze detektiert. Deswegen ist es, trotz seiner hohen Ortsauflösung, nicht gut geeignet für biologische Proben, die in der Regel Nichtleiter sind.

Für das AFM hingegen wird keine leitfähige Probe benötigt. Eine sehr feine Spitze mit einem Radius von nur wenigen Nanometern befindet sich am Ende eines Federbalkens (engl.: Cantilever). Wirken Kräfte auf die Spitze, wird der Cantilever verbogen. Diese Verbiegung wird mit Hilfe eines Lasers gemessen, der von der Rückseite des Cantilevers reflektiert und von einer 4-Quadrantenphotodiode detektiert wird. Auf diese Weise kann sowohl die vertikale als auch die laterale Verbiegung des Cantilevers gemessen werden. Die relative Position zwischen der Probe und der Spitze kann durch sog. Piezoelemente sehr präzise eingestellt werden. Meist ist die Position der Probe fest und die Position

des Federbalkens wird durch einen xyz-Piezo variiert und detektiert.

3.1.2 Abbildungsmodi

Wird das AFM dazu verwendet die Oberfläche abzubilden, kann man zwei verschiedene Messmodi unterscheiden. Beim *contact mode* befindet sich die Spitze in direktem Kontakt mit der Oberfläche. Die Verbiegung des Cantilevers, und damit die Kraft mit der die Spitze auf die Oberfläche drückt, wird konstant gehalten, in dem eine Feedbackschleife die z-Position des Cantilevers variiert. Dadurch wird die Topographie der Oberfläche detektiert. Diese Methode eignet sich gut für harte Oberflächen, während sie für weiche Proben ungeeignet ist, da laterale Reibungskräfte die Probe zerstören können. Für Abbildungen weicher Materialien wie zum Beispiel Biomolekülen, ist der *tapping mode* besser geeignet. In diesem Modus wird der Cantilever durch ein Piezoelement zur

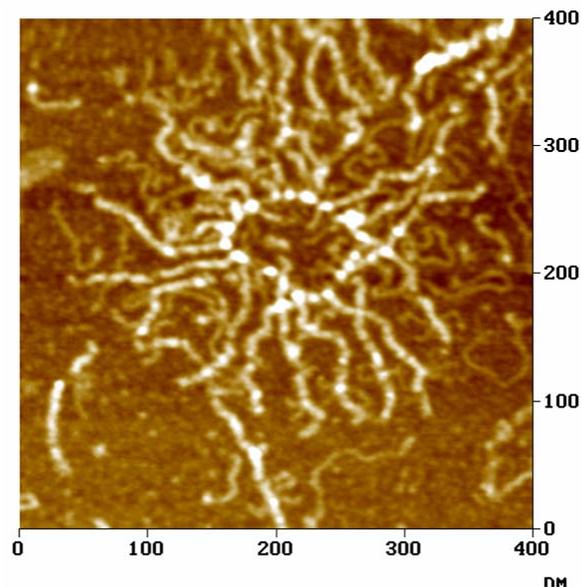


Abbildung 1.1: AFM tapping-mode-Abbildung eines Aggregationsfaktors aus *micrococcina proliferans*. Aus [22]

Schwingung nahe seiner Resonanzfrequenz angeregt. Wird die oszillierende Spitze der Oberfläche angenähert, kommt es zu einer Veränderung der Amplitude der Schwingung, woraus sich der Abstand zwischen Spitze und Probe bestimmen lässt. Die Amplitude wird auf einem konstanten Wert gehalten, indem die z-Position des Cantilevers gesteu-

ert wird. Neben der Topographie der Probe, ergeben sich in diesem Modus zusätzliche Informationen durch Detektion der Phasenverschiebung der Oszillation des Cantilevers, die durch unterschiedliche Materialien hervorgerufen wird. Da sich die Spitze immer nur sehr kurz im Kontakt mit der Oberfläche befindet und die Probe nur „abklopft“ (engl. to tap) ist die Belastung der Probe durch laterale Reibungskräfte im *tapping mode* sehr gering. Eine gute AFM-Messung im Tapping Modus des in Abschnitt 2.2.2 beschriebenen Aggregationsfaktors ist in Abbildung 1.1 zu sehen.

3.1.3 Kraft-Distanz-Kurven

Das Rasterkraftmikroskop bietet neben der Bestimmung der Oberflächenbeschaffenheit eine zweite Anwendungsmöglichkeit als Kraftmesser. Anstatt die Probe abzurastern werden die x und y Position des Sensors konstant gehalten und die Wechselwirkung zwischen der Probe und des Cantilevers in Abhängigkeit ihres gegenseitigen Abstandes bestimmt. Die dabei wirkenden Kräfte können über die Verbiegung der Blattfeder mit einer Genauigkeit von einigen Piconewton gemessen werden. Diese Methode wird AFM-Kraftspektroskopie (Force Spectroscopy) genannt, deren Grundlagen in diesem Abschnitt vorgestellt werden.

Eine typische Kraft-Distanz-Kurve, bei der das an den Photodioden gemessene Deflekti-

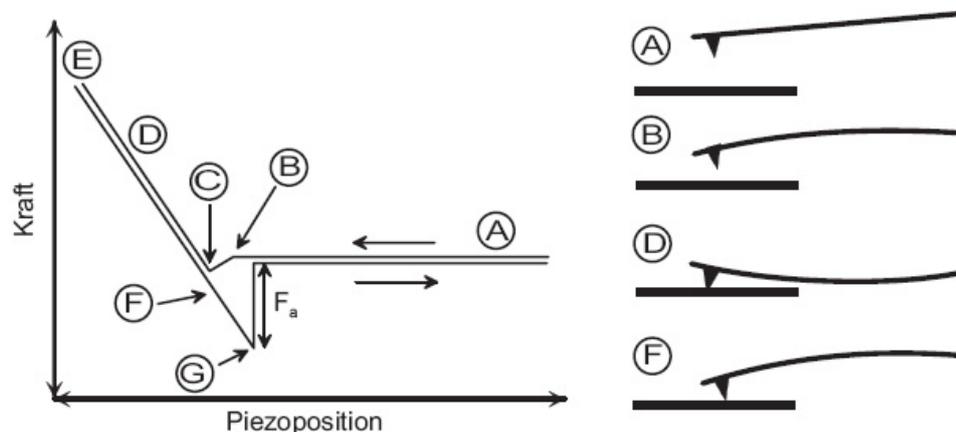


Abbildung 1.2: schematische Darstellung einer Kraft-Distanz-Kurve

onssignal gegenüber der Position des z-Piezos aufgetragen ist, kann man in unterschiedliche Phasen unterteilen (Abb. 1.2). Am Anfang befindet sich der Cantilever weit von der Oberfläche entfernt in seiner Ruheposition und es wirken keine Kräfte auf ihn (A). Ab

einer bestimmten Annäherung (B) überwiegen attraktive Kräfte (van-der-Waals, elektrostatisch) die Cantileverrückstellkraft, sodass Spitze zur Oberfläche „springt“ („Snap-in“). Bei weiterer Annäherung verbiegt sich die Blattfeder zunächst wieder in ihre Ruheposition (C) und verbiegt sich darauf folgend in die andere Richtung. Dabei verändert sich das Deflektionssignal proportional zur Position des Piezoelements. Dieser lineare Teil der Kurve (D) ist wichtig um die an der Photodiode gemessenen Signale mit Hilfe der Federkonstante in Kraftwerte umzurechnen (vgl. Abschnitt 3.1.4). Bei einer vorher festgelegten maximalen Auslenkung des Federbalkens (E) wird die Bewegung umgekehrt. Beim Zurückziehen verhält sich der Cantilever zunächst genauso wie beim Annähern, bis attraktive (Adhäsions-)Kräfte dazu führen, dass die Spitze in Kontakt mit der Probe bleibt und der Federbalken zur Oberfläche verbogen wird (F) bis die Federkraft des Cantilevers größer als die attraktive ist und er in seine Ruhelage zurückspringt (G). Aus der Differenz zwischen der maximalen Verbiegung und der Ruheposition wird die Abrisskraft F_a bestimmt.

3.1.4 Kalibrierung der Kraftsensoren

Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt, wird die Verbiegung des Cantilevers und damit die wirkenden Kräfte mit Hilfe von Photodioden gemessen, die den an der Oberseite des Cantilevers reflektierten Laserstrahl detektieren. Zur Kalibrierung wird zunächst der lineare Teil der Kraft-Distanz Kurve genutzt, deren inverse Steigung als „Sensorresponse“ bezeichnet wird

$$s_r = \frac{\Delta z [m]}{\Delta d [V]} . \quad (3.1)$$

Er setzt das Spannungssignal der Photodioden ins Verhältnis mit der Verbiegung des Cantilevers. Nach dem Hook'schen Gesetz gilt für die Kraft die ein Cantilever (Federkonstante k) ausübt:

$$F = k \Delta z . \quad (3.2)$$

Damit kann das Deflektionssignal in eine Kraft umgerechnet werden:

$$F = k s_r \Delta d . \quad (3.3)$$

Das bedeutet, dass zur Bestimmung der Kräfte eine genaue Kenntnis der Federkonstante k des verwendeten Cantilevers erforderlich ist. Es gibt verschiedene Methoden die Feder-

konstante zu bestimmen. Man kann sie aus der Geometrie und den Materialeigenschaften (Länge, Dicke, Dichte etc.) des Cantilevers errechnen [31], oder sie durch Beladen mit einer zusätzlichen Masse [32] bzw. durch Kopplung mit einer Eichfeder bestimmen [33]. Eine weitere Methode, die in dieser Arbeit verwendet wurde, ist die Federkonstante aus dem Rauschverhalten des Cantilevers abzuleiten [34, 35] und soll jetzt kurz skizziert werden.

Für kleine Auslenkungen kann ein Cantilever als harmonischer Oszillator mit dem Hamilton Operator

$$H = \frac{p^2}{2m_{eff}} + \frac{1}{2}m_{eff}\omega_0^2q^2 \quad (3.4)$$

betrachtet werden, wobei m_{eff} die effektive Masse, q die Auslenkung, p den Impuls und ω_0 die Resonanzfrequenz des Cantilevers darstellt. Das Verhältnis zwischen der thermischen Energie $k_B T$ (k_B Boltzmann-Konstante, T Temperatur) und der mittleren quadratischen Auslenkung $\langle q^2 \rangle$ ist durch das Äquipartitionstheorem gegeben:

$$\left\langle \frac{1}{2}m\omega_0^2q^2 \right\rangle = \frac{1}{2}k_B T . \quad (3.5)$$

Mit $\omega_0^2 = k/m_{eff}$ ergibt sich für die Federkonstante:

$$k = \frac{k_B T}{\langle q^2 \rangle} . \quad (3.6)$$

Die Langevin Gleichung für die Bewegung eines gedämpften harmonischen Oszillator mit erzwungener Schwingung ist

$$\frac{d^2q}{dt^2} + 2\alpha \frac{dq}{dt} + f_r^2 q = \frac{F}{m_{eff}} e^{ift} , \quad (3.7)$$

wobei f die Frequenz f_r die Resonanzfrequenz, α die Dämpfungskonstante und F die externe Kraft darstellt. Im Falle geringer Dämpfung ($2\alpha \ll f_r$) und $f \approx f_r$ ist die partikuläre Lösung für stationäre Schwingung im thermischen Gleichgewicht durch ein Lorentzprofil gegeben:

$$q(t) = \frac{F}{2m_{eff}\nu_r \sqrt{(\nu_r - \nu)^2 + \alpha^2}} \cos(\nu t + \delta) . \quad (3.8)$$

Messungen des Spektrums der zeitabhängigen quadratischen Auslenkung, also die Fouriertransformierte $q^2(t)$ ergeben wiederum ein Lorentzprofil für die durchschnittliche quadratische Auslenkung $\hat{q}^2(f)$, welches durch einen Fit der Messdaten dargestellt werden kann als:

$$\hat{q}^2(f) = q_0 + \frac{A}{(f_r - f)^2 + B}, \quad (3.9)$$

wobei q_0 , A und B Fitkonstanten sind. Die mittlere quadratische Auslenkung $\langle q^2 \rangle$ des Cantilevers kann jetzt über folgendes Integral berechnet werden:

$$\langle q^2 \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} (\hat{q}^2(f) - q_0) df. \quad (3.10)$$

Die Federkonstante des Cantilevers kann dann über Gleichung (3.6) ermittelt werden und dann mit Hilfe von Gleichung (3.3) das Spannungssignal der Photodioden in eine Kraft konvertiert werden.

3.2 Kräfte und Kinetik in der Kraftspektroskopie

Ergebnisse aus Experimenten der Kraftspektroskopie an Ligand-Rezeptor Systemen sind zunächst die Dissoziationskräfte. Die Frage ist jetzt, wie diese Kräfte mit biochemisch relevanten Reaktionsparametern (z.B. Reaktionsraten oder Dissoziationslängen) zusammenhängen.

Die erste Annahme, dass die Abrisskräfte direkt die Stärke der Bindung wieder geben, konnte verworfen werden. Die gemessenen Abrisskräfte unterliegen einer statistischen Verteilung und variieren darüber hinaus mit der Ziehgeschwindigkeit. Ein entscheidender Durchbruch im Verständnis der Zusammenhänge gelang 1997 Evans und Ritchie [2]. Sie postulierten, dass die Dissoziation einer Bindung unter einer äußeren Kraft mit einem thermisch aktivierten Zerfall eines metastabilen Zustands verglichen und damit mit im Rahmen der klassischen Reaktionsratentheorie beschrieben werden kann.

3.2.1 Theorie der Reaktionsraten

Betrachtet werden soll die Bindung zwischen einem Ligand L und dem dazugehörigen Rezeptor R



Die Klammern $[L]$, $[R]$, $[L \cdot R]$ bezeichnen die Konzentrationen des freien Liganden (z.B. die DNA), des freien Rezeptor (z.B. das bindende Protein) beziehungsweise des gebundenen Komplexes. Die On-Ratenkonstante k_{on}^0 (in $M^{-1}s^{-1}$) ist die kinetische Rate der Hinreaktion, während die Off-Ratenkonstante k_{off}^0 (in s^{-1}) die der Rückreaktion darstellt. Aus dem Kehrwert der Off-Ratenkonstante ergibt sich die mittlere Lebensdauer der Bindung $\tau = 1/k_{off}^0$. Bei konstanter Temperatur und konstantem Druck ist die freie Reaktionsenthalpie durch die Differenz der Gibbschen freien Enthalpie des End- und Anfangszustandes definiert:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = G_E - G_A . \quad (3.12)$$

mit der Reaktionsenthalpie ΔH und ΔS der Entropieänderung im System. Führt man die freie Standardenthalpie ΔG^0 (unter Standardbedingungen) ein, so gilt für die freie Reaktionsenthalpie

$$\Delta G = \Delta G^0 - RT \ln \frac{[L][R]}{[L \cdot R]} \quad (3.13)$$

mit der molaren Gaskonstante $R = N_A k_B$.

Im thermischen Gleichgewicht ($t \rightarrow \infty$) wird $\Delta G = 0$ und für die Dissoziationskonstante gilt

$$\frac{[L][R]}{[L \cdot R]} = K_D = \frac{k_{on}}{k_{off}} , \quad (3.14)$$

sodass sich die wohl bekannte Beziehung zwischen der freien Standardenthalpie des Dissoziationsprozesses und der Dissoziationskonstanten ergibt:

$$\Delta G^0 = RT \ln K_D . \quad (3.15)$$

Die freie Standardenthalpie ist außerdem die Zustandsfunktion, die angibt, ob eine Reaktion spontan abläuft (ΔG^0) oder nicht.

Die Dissoziation eines gebunden Komplexes kann als Überwinden einer Potentialbarriere aufgrund thermischer Fluktuationen interpretiert werden (Abb. 2.1a). Die Geschwindigkeit und damit die Off-Ratenkonstante des Prozesses ist eine Funktion der Potentialbarriere ΔG^\ddagger :

$$k_{off}^0 = C e^{-\beta \Delta G^\ddagger} \quad (3.16)$$

mit $\beta = (k_B T)^{-1}$. Obwohl dieser Zusammenhang bereits im späten 19. Jahrhundert von Arrhenius [36] entdeckt wurde, dauerte es mehr als 50 Jahre bis es Kramers gelang einen Ausdruck für den Proportionalitätsfaktor C zu bestimmen [37].

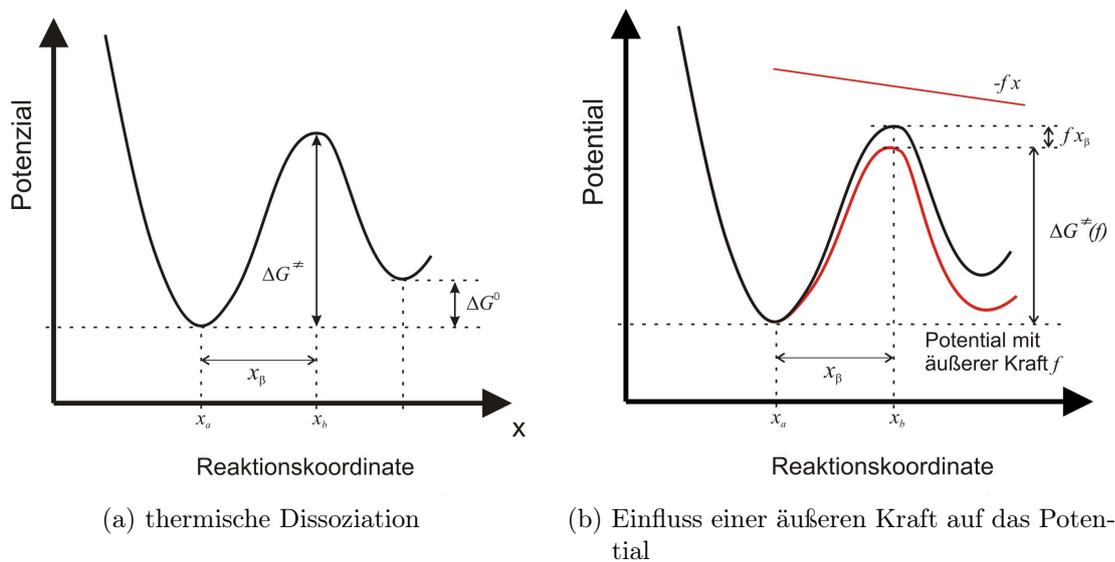


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Dissoziationspotentiale

3.2.2 Dissoziation unter externen Kräften

Die Dissoziation eines Komplexes unter einer äußeren Kraft kann auch im Rahmen der klassischen Reaktionsratentheorie beschrieben werden (Abb. 2.1b). Nach Bell sowie Evans und Ritchie [2] verkleinert eine Kraft f entlang der Reaktionskoordinate x die Höhe der Potentialbarriere

$$\Delta G^\ddagger(f) = \Delta G^\ddagger - f x_\beta, \quad (3.17)$$

wobei die Reaktionslänge $x_\beta = x_B - x_A$ die Differenz zwischen dem Maximum der Potentialbarriere und dem Minimum des metastabilen Zustands entlang der Reaktionskoordinate ist. Obwohl die äußere Kraft auch den Proportionalitätsfaktor C beeinflusst, wird er als konstant betrachtet, da die Gleichung (3.16) vom exponentiellen Term dominiert wird. Setzt man jetzt Gleichung (3.17) darin ein, erhält man die Off-Ratenkonstante als

Funktion der wirkenden Kraft

$$k_{off}(f) = k_{off}^0 \exp(\beta f x_\beta) . \quad (3.18)$$

Nach Evans und Ritchie entspricht die Dissoziation einem thermisch aktivierten Zerfall eines metastabilen Zustands und kann durch die folgende Reaktionskinetik beschrieben werden:

$$\frac{dp(t)}{dt} = -k_{off}(f(t))p(t) . \quad (3.19)$$

wobei $p(t)$ die Wahrscheinlichkeit ist, dass die Bindung bis zum Zeitpunkt t überlebt. Dabei wird angenommen, dass die Dissoziationswahrscheinlichkeit nur von der instantanen Kraft abhängt. Die auf die Bindung wirkende Kraft ist zwar nicht konstant, allerdings ist deren Änderung sehr langsam im Vergleich zum molekularen Relaxationsprozess. Eine zweite Annahme von Evans und Ritchie ist, dass die Kraft $f(t)$ nur von der gesamten Auslenkung $s = vt$ aller elastischen Komponenten (Moleküle, Linker, Cantilever etc.) abhängt:

$$F(s) = F(v \cdot t) = f(t) \quad (3.20)$$

und $F(s)$ unabhängig von der Ziehgeschwindigkeit v sein soll.

Wird die Ziehgeschwindigkeit als konstant angenommen, so folgt eine zeitliche Änderung der Kraft, die auf den Komplex wirkt mit:

$$f(t) = \kappa_{eff} v \cdot t = r \cdot t \quad (3.21)$$

mit der effektiven Federkonstante des Systems κ_{eff} , die sich aus der Federkonstante k des Cantilevers und der Elastizität des an die Spitze gebundenen Polymerlinkers zusammensetzt. Der Wert r wird als Loading-Rate bezeichnet.

Mit (3.19) ergibt sich für die Überlebenswahrscheinlichkeit der Bindung unter einer äußeren Kraft f für beliebige $k_{off}(f)$ und $F(s)$

$$p_v(f) = \exp \left\{ -\frac{1}{v} \int_f^{f_{min}} df' \frac{k_{off}(f')}{F'(F^{-1}(f'))} \right\} \quad (3.22)$$

mit $p_v(f(t)) = p(t)$ und $p(t = 0) = p_v(f = f_{min}) = 1$. f_{min} ist der Schwellenwert unter dem Dissoziationskräfte nicht von thermischen Fluktuationen unterschieden werden

können. Außerdem wird angenommen, dass $F(s)$ eine streng monoton wachsende Funktion ist und die inverse Funktion F^{-1} existiert. Nutzt man Gleichung (3.21) und die Annahme $x_\beta = \text{konstant}$, ist es möglich die Integration auszuführen und es ergibt sich:

$$p_v(f) = \exp \left\{ - \frac{k_{off} e^{\frac{x_\beta f}{k_B T}} - e^{\frac{x_\beta f_{min}}{k_B T}}}{v \kappa_{eff} \frac{x_\beta f}{k_B T}} \right\}. \quad (3.23)$$

Aus dem Maximum der Verteilung $-dp_v(f)/df$ kann man mit Gleichung (3.18) auf die wahrscheinlichste Abrisskraft \hat{F} bei einer gegebenen Loading-Rate r schließen:

$$\hat{F} = \frac{k_B T}{x_\beta} \ln \left(\frac{x_\beta \cdot r}{k_B T \cdot k_{off}^0} \right). \quad (3.24)$$

Diese Gleichung ist die Basis der dynamischen Kraftspektroskopie (Dynamic Force Spectroscopy, DFS). Kraftspektroskopieexperimente werden mit unterschiedlichen Ziehgeschwindigkeiten und damit unterschiedlichen Loading-Raten durchgeführt. Werden die wahrscheinlichsten Abrisskräfte \hat{F} in halblogarithmischer Darstellung gegen ihre jeweiligen Loading-Raten aufgetragen, so sollte sich ein linearer Zusammenhang ergeben. Aus dem Anstieg der Regressionsgeraden kann die Reaktionslänge x_β bestimmt werden. Die Extrapolation zum Wert $\hat{F} = 0$ (keine äußere Kraft) führt zur thermischen Off-Ratenkonstante k_{off}^0 . Die mittlere Lebensdauer einer Bindung entspricht dem Kehrwert der Off-Ratenkonstante. Die dynamische Kraftspektroskopie ist daher eine gute Methode, um kinetische Informationen über eine Bindung zu erhalten.

4 Materialien und Methoden

In den vorangegangenen Kapiteln wurden die theoretischen Grundlagen dieser Arbeit betrachtet. In diesem Kapitel sollen die für die Durchführung der Experimente verwendeten Instrumente, Verfahren und Versuchsanordnungen beschrieben werden.

4.1 Instrumente

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente der Einzelmolekülkraftspektroskopie wurden mit einem kommerziellen AFM (MFP-3D; Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA) durchgeführt. Die Aufnahme der Kraft-Distanz-Kurven erfolgte mit der mitgelieferten Software, basierend auf Igor Pro 6 (Wavemetrics).

Für die Messungen kamen Si_3N_4 Cantilever (Microlevers; Veeco Instruments, Woodbury, NY, USA) zum Einsatz, deren Federkonstante jeweils mit Hilfe der mitgelieferten Software über das thermische Rauschen (vgl. Abschnitt 3.1.4) bestimmt wurden. Als Probenoberfläche dienten Glimmerschein (Mica; Provac, Balzers, Lichtenstein) oder goldbedampfte Glasplättchen, die jeweils auf einem Objektträger fixiert wurden.

4.2 Auswertung der Kraft-Distanz-Kurven

Die Auswertung der Kraft-Distanz-Kurven erfolgte mit einem von Alexander Fuhrmann geschriebenen Programm, basierend auf Matlab (MathWorks, Natick, MA, USA) [38]. Zunächst wurden die Messdaten, die mit dem Igorprogramm aufgenommen und in diesem Format abgespeichert werden in Matlab-Daten konvertiert, wobei alle wichtigen Informationen (wie z.B. Federkonstante, Temperatur, Geschwindigkeiten) erhalten bleiben. Das Auswerteprogramm untersucht die Kurven auf Abrisse und ermittelt automatisch Größen wie die Abrisskraft oder die Elastizität des Komplexes beim Abriss, die für die DFS für die Berechnung der Loading-Rate von Bedeutung sind.

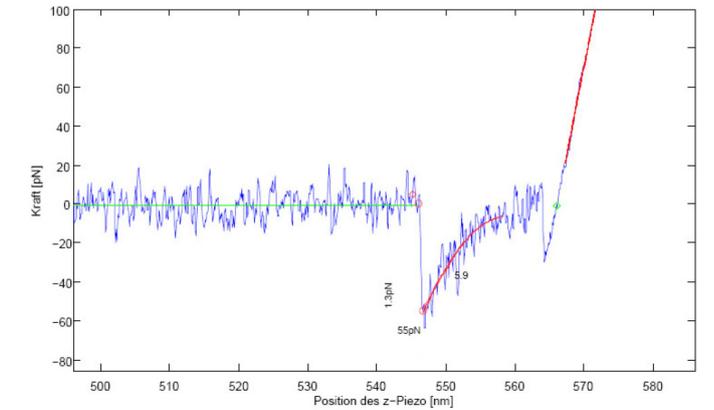


Abbildung 2.1: Typischer Kurvenverlauf für ein Dissoziationsereignis inklusive der vom Auswerteprogramm bestimmten Nulllinie (grüne Gerade), Regressionsgeraden (rote Gerade), Polynomfit 2. Ordnung (rote Kurve) und ermittelten Abrisskraft $F_a = 55 \text{ pN}$.

Die Routine mit der das Programm vorgeht, soll im Folgenden anhand Abbildung 2.1 kurz skizziert werden. Das Programm untersucht eine Kraft-Distanz-Kurve vom Ende her nach möglichen Abrissen, indem es die Differenz zwischen benachbarten Punkten überprüft ($\Delta F_i = F_{i+1} - F_i > 0$). Die darauf folgenden Differenzen werden solange addiert bis $\Delta F_j \leq 0$. Übersteigt die Summe einen bestimmten Schwellenwert, wird dies als erstes Indiz für einen Abriss gewertet. Um den Einfluss des Rauschens zu verringern, wird durch lineare Regression eine Nulllinie (grün) ermittelt. Die mögliche Abrisskraft F_a ergibt sich aus der Differenz des Wertes an der Stelle j zur Nulllinie.

Neben einem Schwellenwert für die Kraft ist es möglich Grenzwerte für die Abrisslänge festzulegen. Das Programm ermittelt die Abrisslänge des potentiellen Abrisses als Abstand der Stelle j zum Schnittpunkt der Null. Sind die Bedingungen für Kraft und Abrisslänge eines potentiellen Abrisses erfüllt, ist die Form der Abrisskurve ein letztes entscheidendes Kriterium. In den Experimenten dieser Arbeit wurden Polymerlinker verwendet, deren stetiges Spannen vor dem Abriss zu einer konkaven Krümmung der Kurve führt. Deswegen wird ausgehend vom Abrisspunkt j ein Polynomfit zweiter Ordnung (rote Kurve) durchgeführt, der die Kurven auf diesen signifikanten konkaven Verlauf überprüft.

Ein potentieller Abriss muss also drei Bedingungen erfüllen, um in die Auswertung

einbezogen zu werden. Die Abrisskraft muss einen bestimmten (manuell festgelegten) Schwellenwert übersteigen. Der Abriss darf nicht zu nah an der Oberfläche stattfinden und die Kurve muss vor dem Abriss den durch das Spannen des PEG-Linkers hervorgerufenen konkaven Verlauf besitzen. Sind diese Bedingungen erfüllt, speichert das Programm neben der Abrisskraft auch die Elastizitätskonstante c , die aus dem Anstieg des Polynomfits kurz hinter der Abrissstelle bestimmt wird. Durch Multiplikation der Elastizitätskonstante mit der Ziehgeschwindigkeit ergibt sich die Loading-Rate, d.h. die zeitliche Änderung der von außen am Komplex anliegenden Kraft.

4.3 PhoB-Experimente

DNA Die Isolierung der DNA Sequenzen erfolgte durch PCR. Ein 268bp DNA Fragment, welches die *pho*-Box des *pst*-Operons enthält, wurde in ein pUC18 Plasmid kloniert¹ und anschließend mit *Taq*-Polymerase und M13 als Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer amplifiziert. Die daraus resultierende 360 bp DNA Sequenz wurde mittels PCR Cleanup aufgereinigt und die Konzentration bestimmt [39].

Die Sequenz der *pho*-Box DNA mit den grau hinterlegten Bindestellen für PhoB ist:

```
1 CGCCAGGGTT TTCCCAGTCA CGACGTTGTA AAACGACGGC CAGTGCCAAG CTTACCGTCA
61 TCTTCGGCTA CTTTTTCTCT GTCACAGAAT GAAAATTTTT CTGTCATCTC TTCGTTATTA
121 ATGTTTGTA TTTACTGAAT ATCAACGCTT ATTTAAATCA GACTGAAGAC TTTATCTCTC
181 TGTCATAAAA CTGTCATATT CCTTACATAT AACTGTCACC TGTTTGTCCT ATTTTGCTTC
241 TCGTAGCCAA CAAACAATGC TTTATGAATC CTCCCAGGAG ACATTATGAA AGTTATGCGT
301 ACCACCGTCG AATTCGTAAT CATGGTCATA GCTGTTTCCT GTGTGAAATT GTTATCCGCT
```

Für die Kontrollexperimente wurde ein 75 bp ExpG DNA-Fragment [40] in ein pUC18 Plasmid kloniert, aus dem durch PCR eine 177 bp DNA-Sequenz ohne Bindestelle für PhoB gewonnen wurde.

```
1 CGCCAGGGTT TTCCCAGTCA CGACGTTGTA AAACGACGGC CAGTGCCAAG CTGCTCAAGA
61 GCACGCAATT TCGGGGCAGG GGTGTTATGA AATTACTTCA AGTTTTGAAG TAATTTTCCG
121 GAATTGGAAT TCGTAATCAT GGTCATAGCT GTTTCCTGTG TGAAATTGTT ATCCGCT
```

¹Die Klonierung wurde von der Arbeitsgruppe von Anke Becker (Lehrstuhl für Genetik, Universität Bielefeld) durchgeführt

Das 226 bp EcoRI-AvaI EBNA (*Epstein-Barr virus nuclear antigen*) DNA-Fragment wurde in ein pK18mob Plasmid kloniert, aus dem eine 356 bp DNA amplifiziert wurde. Diese DNA war ursprünglich als DNA gedacht, allerdings enthält sie dreimal die TGTC A-Sequenz, an die PhoB binden kann.

```

1 CGCCAGGGTT TTCCCAGTCA CGACGTTGTA AAACGACGGC CAGTGCCAAG CTTGCATGCC
61 TGCAGGTCGA CTCTAGAGGA TCCCCCGGG ATACACTCCG CTATCGCTAC GTGACTGAGC
121 TTATCGATGA TAAGCTGTCA AACATGAGAA TTAGATCCAT TTTGGCTTGA AGCCAATATG
181 ATGGATCTAG AGGATCCATT AGGATAGCAT ATGCTACCCA GATAGGATCC AATTCTTGAA
241 GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTTT TATAGGTAA TGTCATGATA ATAATGGTTT
301 CTTAGGGAAT TCGTAATCAT GTCATAGCTG TTCCTGTGT GAAATTGTTA TCCGCT

```

Die Verwendung von 5'-thiol-markierter Vorwärtsprimer ermöglichte die Bindung der DNA Sequenzen über Maleimid an die AFM-Cantilever.²

PhoB DNA-Bindedomäne Das Protein *E. coli* PhoB (126-229) wurde als Fusionsprotein bestehend aus einer Chitin Bindedomäne, einem Intein und der eigentlichen Proteinsequenz exprimiert. Die entsprechende DNA wurde mit Hilfe von PCR aus der genomischen DNA amplifiziert und über NdeI und SapI in einem pTwin2-Plasmiden (NEB) kloniert. Zur Expression wurde die DNA in *E. coli* ER2655 Zellen transformiert und die Bakterien bei 37°C kultiviert. Durch Bindung des Fusionproteins an eine Chitinmatrix und inteininduzierter Spaltung konnte dann das Protein gewonnen werden. Die erhaltenen Proteine wurden mittels nativer chemischer Ligation mit einem Cysteinrest ligiert, der die Bindung an eine Goldoberfläche ermöglicht und gegen Phosphatpuffer (100mM Na₂HPO₄, 50 mM NaCl, pH 7.4) dialysiert.²

Peptidsynthese Das C-terminal funktionalisierte Peptid (PhoB 190-209) wurden in einem Mikrowellensynthesizer über Festphasensynthese unter Anwendung der Fmoc/tBu Schutzgruppenstrategie synthetisiert. 2-Chlorotriylharz wurde manuell zunächst mit dem Linker 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan dann der ersten Aminosäure beladen. Anschließend erfolgte die Synthese im Mikrowellensynthesizer. Das fertige Peptid wurde durch HPLC mit TFA/Acetonitril/Wasser-Gradienten aufgereinigt und per MALDI-ToF analysiert.²

²Proteine, Peptide und DNA-Fragmente wurden mir von Dr. Katrin Wollschläger (Arbeitsgruppe Organische und Bioorganische Chemie, Universität Bielefeld) zur Verfügung gestellt.

Modifikation der Cantilever Es wurden Si_3N_4 Cantilever (Microlevers, Veeco Instruments) verwendet. Diese wurden kurz in Salpetersäure getaucht und anschließend bei Raumtemperatur zwischen 90 und 120 min in einer Lösung aus 2% Aminopropyltriethoxysilan (APTES; Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland) in trockenem Toluol (Fluka, Seelze, Deutschland) aufbewahrt. Die so silanisierten Cantilever wurden mit Toluol und reinem Wasser ($18.2 \text{ M}\Omega/\text{cm}$ mit MilliQ-Maschine; Millipore, Eschborn, D) gespült und 60 min bei Raumtemperatur in je $10 \mu\text{l}$ einer $25 \mu\text{M}$ PEG-Linker Lösung (N-hydroxysuccinimid-poly(ethylenglycol)-maleimid (NHS-PEG-MAL, MW 3,4 kD; Nektar, Huntsville, Alabama, USA) in Wasser) inkubiert. Anschließend wurde jede Spitze gespült und in $10 \mu\text{l}$ DNA-Lösung ($10 \text{ ng}/\mu\text{l} \hat{=} 20 \mu\text{M}$) bei 4°C über Nacht aufbewahrt. Die so präparierten Cantilever konnten nach Abspülen mit Phosphatpuffer ($100 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, 50 mM NaCl , pH 7,4) in diesem Puffer ca. 1 Woche bei 4°C ohne Aktivitätsverlust gelagert werden.

Immobilisierung der Peptide Als Substrat dienten $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ große Glimmerscheiben (Mica; Provac, Balzers, Lichtenstein), die im Exsikkator mit Aminopropyltriethoxysilan funktionalisiert wurden. Danach wurden sie mit $20 \mu\text{M}$ BS³ (bis(sulfosuccinimidyl)-suberat, Sigma-Aldrich) und $10 \mu\text{M}$ mit C-terminal 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan-Linker funktionalisierten Peptide in Phosphatpuffer für mindestens 60-90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden sie mit Puffer gespült und für die Experimente verwendet.

Immobilisierung der Proteine Die mit einem Cysteinrest versehenen Proteine wurden auf einer Goldoberfläche immobilisiert. Die Goldoberfläche wurde selbst hergestellt. Eine Micaoberfläche wurde mit Gold bedampft. Mit Hilfe eines Epoxy-Zweikomponentenklebers wurden Glasplättchen auf die Goldfläche geklebt und das Mica wieder abgezogen, sodass eine Goldoberfläche mit geringerer Rauigkeit verfügbar war. Die Oberfläche wurde mit Ethanol gesäubert und für 90-120min mit $10 \mu\text{M}$ Protein in Phosphatpuffer inkubiert. Nach dem Spülen mit Puffer wurden sie für die Experimente verwendet.

4.4 g200-Experimente

Isolierung der g200 Die Schwammzellen des Schwammes *microciona prolifera* wurden im Department of the Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA gesammelt. Die Zellaggregationsfaktoren wurden isoliert, wie es in [41] beschrieben ist. Anschließend wurden die Proteoglykane in einer Lösung mit Proteasen gespalten um proteinfreie Glykane zu erhalten. Die 200 kDa Glykane wurden mittels Gelelektrophorese und Ionenaustauschchromatographie von freien Aminosäuren und Peptiden separiert [41].³

Immobilisierung der g200 Die g200 besitzen Sulfatgruppen [28], welche die Immobilisierung über Maleimid auf der Substratoberfläche bzw. den AFM Cantilevern ermöglichen. $1\mu\text{M}$ g200 und $1\mu\text{M}$ NHS-PEG-MAL (N-hydroxysuccinimid-poly(ethylenglycol)-maleimid) wurden in MilliQ-Wasser gemischt und für 4-5 Stunden bei 4°C gelagert. Si_3N_4 Cantilever (Microlevers, Veeco Instruments) wurden kurz in Salpetersäure getaucht und anschließend bei Raumtemperatur zwischen 90 und 120 min in einer Lösung aus 2% Aminopropyltriethoxysilan (APTES; Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland) in trockenem Toluol (Fluka, Seelze, Deutschland) aufbewahrt. Die so silanisierten Cantilever wurden mit Toluol und reinem Wasser $18.2\text{ M}\Omega/\text{cm}$ mit MilliQ-Maschine; Millipore, Eschborn, D) gespült. $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ große Micaplättchen wurden 2 Stunden im Exsikkator mit Aminopropyltriethoxysilan silanisiert. Die silanisierten Substrate und Cantilever wurden über Nacht bei 4°C mit ca $15\mu\text{l}$ der g200-PEG-linker Lösung inkubiert. Nach Spülen mit künstlichem Meerwasser ($0,5\text{ M NaCl}$, 10 mM KCl , $7\text{ mM Na}_2\text{SO}_4$, 20 mM tris puffer, $\text{pH}7,4$) wurden die Proben und Cantilever für die Experimente verwendet. Für die Experimente mit Kalzium wurde dem künstlichen Meerwasser CaCl_2 zugefügt und als Puffer verwendet.

³Die isolierten g200-Moleküle wurden mir von Prof. Xavier Fernandez Busquets (Institute for Bioengineering of Catalonia, Parc Scientific Barcelona) zu Verfügung gestellt.

5 Resultate und Diskussion

In diesem Kapitel werden die Resultate der kraftspektroskopischen Messungen dargestellt und diskutiert. Eine Unterteilung erfolgt zunächst aufgrund der untersuchten biologischen Systeme, obgleich sich die Messungen auch im Bezug auf anderen Kriterien unterscheiden. Der erste Teil beschäftigt sich mit dem Einfluss der Pufferlösung, bzw. deren Kalziumkonzentration, auf die Bindung zwischen Glykanuntereinheiten der Zellaggregationsfaktoren von Schwämmen. Im zweiten Teil wird mit Hilfe von Konkurrenzexperimenten die Spezifität der Bindung zwischen DNA und Teilen eines Transkriptionsfaktors untersucht.

5.1 Zelladhäsion in Schwämmen

Schwammzellen, die dissoziiert wurden, können sich wieder zu größeren Aggregaten verbinden. Diese Aggregation ist speziesspezifisch und nur bei Anwesenheit von Kalzium in der Umgebung möglich. Für die Zelladhäsion sind die sog. Aggregationsfaktoren verantwortlich. Die Aggregationsfaktoren des roten Schwammes *microciona prolifera* (MAF) sind hochkomplexe Proteoglykanmoleküle, die zum einen an die Oberfläche der Schwammzellen binden und sich zum anderen untereinander verbinden. Dammer et. al. [26] zeigte im Jahr 1995 in kraftspektroskopischen Experimenten, dass die Bindung zwischen zwei MAF abhängig von der Kalziumkonzentration der verwendeten Pufferlösung ist. Die Einheit über welche die Bindung zwischen zwei MAF höchst wahrscheinlich vermittelt wird ist eine Glycanuntereinheit, mit einer Größe von 200 kDa.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Bindung zwischen diesen g200 genannten Molekülen in kraftspektroskopischen Experimenten untersucht. Im Mittelpunkt der Betrachtung stand die Frage, ob sich auch hier eine Abhängigkeit der Kalziumkonzentration der Pufferlösung auf die Stärke der Bindung nachweisen lässt

5.1.1 Kraftspektroskopieexperimente

Um die Bindung der g200 Moleküle kraftspektroskopisch zu untersuchen, wurden diese über ihre Sulfatgruppen an der AFM-Spitze bzw. der Substratoberfläche immobilisiert. Dazu wurde ein PEG-Linker verwendet, der jeweils kovalent an die Sulfatgruppen der g200 und die Aminogruppen der silanisierten Oberfläche bzw. AFM-Spitze bindet. Zwischen einem auf diese Weise funktionalisiertem Paar aus Spitze und Oberfläche wurden Kraft-Distanz-Kurven aufgenommen. Die Messungen wurden in künstlichem Meerwasser (0,5 M NaCl, 10 mM KCl, 7 mM Na₂SO₄, 20 mM tris puffer, pH7,4) durchgeführt, dem wahlweise Kalzium zugeführt wurde. In Abbildung 1.1 ist ein typischer Kurvenver-

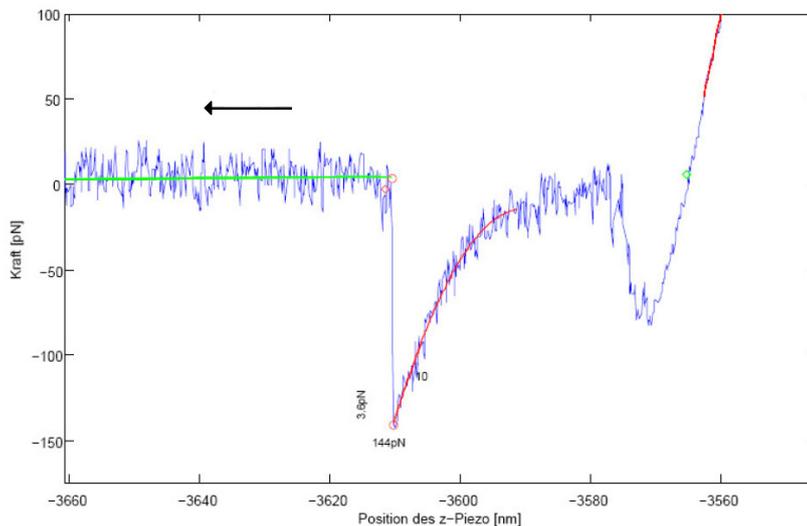


Abbildung 1.1: Typischer Kurvenverlauf für ein Dissoziationsereignis

lauf für das Zurückziehen der Spitze mit einem Dissoziationsereignis von g200 Molekülen gezeigt. Der Kurvenverlauf lässt sich von rechts nach links verfolgen. Kräfte die auf die Spitze in Richtung der Oberfläche wirken, sind „negativ“ angegeben. Die Spitze ist zunächst in Kontakt mit der Probe und ist nach oben gebogen, das heißt eine „positive Kraft“ wirkt auf sie. Durch den Piezo z-Piezo wird die Spitze von der Probe wegbewegt, wobei sie nahe der Probe (Position des z-Piezo ca. 3570 nm) durch Adhäsionskräfte zur Oberfläche gebogen wird. An dieser Stelle ist ein weiterer Nutzen der Verwendung des PEG-Linkers erkennbar, der nicht nur der kovalenten Immobilisierung der Moleküle dient, sondern auch eine leichtere Detektion der Abrisse ermöglicht. Durch die Länge des Linkers von ca. 30 nm finden die Dissoziationsereignisse der Moleküle nicht direkt

an der Oberfläche statt und sie können somit leicht von unspezifischen Adhäsionseffekten zwischen Spitze und Oberfläche unterschieden werden. Die Detektion der Abrisse erfolgte mit Hilfe eines Auswerteprogramms. Es ermittelt die Abrisskraft, indem es die Differenz zwischen dem niedrigsten Punkt vor dem Abriss und der Nulllinie (grüne Linie) bildet. Der Fit eines Polynoms zweiter Ordnung (rote Linie) ermöglicht zum einen die Bestimmung der Gesamtelastizität des Komplexes, die mit der Ziehgeschwindigkeit multipliziert die Loading-Rate ergibt (eine wichtige Größe für die DFS - siehe Abschnitt 3.2.2 bzw. 5.1.2). Zum anderen ergibt sich durch das Spannen des Polymerlinkers vor dem Abriss ein signifikanter konkaver Verlauf der Abrisskurve, der durch den Polynomfit erkannt wird. In Abbildung 1.1 erkennt man ein Dissoziationsereignis mit solch einem konkaven Kurvenverlauf, für das eine Abrisskraft von $F_a = 144 \text{ pN}$ notwendig war, um die Bindung zum Reißen zu bringen.

Es werden mehrere tausend solcher Kurven gemessen, wobei nicht bei jeder ein Dissoziationsereignis stattfindet. Je öfter ein Abriss detektiert wird, umso höher ist Bindewahrscheinlichkeit. Allerdings haben die Konzentrationen, die beim Immobilisieren der Moleküle verwendet werden, einen großen Einfluss auf die Bindewahrscheinlichkeit [42]. Die Wahl der Konzentrationen ist somit sehr wichtig für das Gelingen der Experimente. Kleinere Konzentrationen verringern Bindewahrscheinlichkeit und können dazu führen, dass gar keinen Abrisse mehr detektiert werden können. Bei zu großen Konzentrationen besteht die Gefahr, dass keine Einzel- sondern Mehrfachabriss detektiert werden.

Die Abrisskräfte der Dissoziationsereignisse für g200-Moleküle wurden zum einen in künstlichem Meerwasser mit einer physiologischen Ca^{2+} -Konzentration von 10 mM gemessen und zum anderen in Meerwasser ohne Kalzium. Die Abrisskräfte ergeben die Verteilungen die in Abbildung 1.2 bzw. 1.3 dargestellt sind.

Die Kraftverteilungen sind sich sehr ähnlich. Die wahrscheinlichsten Abrisskräfte ergeben einen Wert von $\hat{F} = 163 \text{ pN}$ (mit Kalzium) bzw. $\hat{F} = 140 \text{ pN}$ (ohne Kalzium), einem Unterschied von 15%. Außerdem hat die Änderung der Kalziumkonzentration keinen starken Einfluss auf die Bindewahrscheinlichkeit, die in beiden Fällen ungefähr 50% beträgt.

In SMFS-Messungen mit den kompletten MAF wurden eine wesentlich stärkere Abhängigkeit von der Kalziumkonzentration, sowohl in der Bindewahrscheinlichkeit, als auch in der Abrisskraft festgestellt [26]. Dass sich diese Ergebnisse nicht so direkt auf Bindung zwischen den Glykanuntereinheiten übertragen lassen, stellten die Annahme in Frage, dass die g200 die für die Bindung zwischen zwei MAF und somit die für die Zelladhäsion

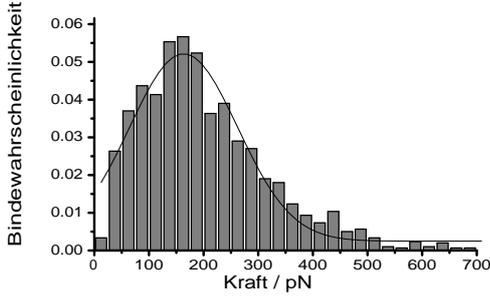


Abbildung 1.2: SMFS-Experiment mit g200-Glykanen in künstlichem Meerwasser mit 10mM Ca^{2+} , Ziehgeschwindigkeit $v=1700$ nm/s, $\hat{F}=163.5$ pN

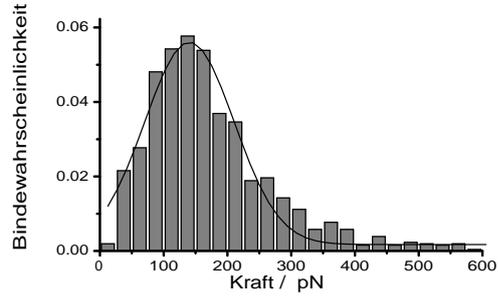


Abbildung 1.3: SMFS-Experiment mit g200-Glykanen in künstlichem Meerwasser mit 0 mM Ca^{2+} , Ziehgeschwindigkeit $v=1700$ nm/s, $\hat{F}=140.5$ pN

bei Schwämmen entscheidende Untereinheit ist. Denn wenn die Bindung zwischen den MAF stark kalziumabhängig ist, so sollte auch die Bindung zwischen deren Untereinheiten eine, wenn auch möglicherweise viel schwächere, Kalziumabhängigkeit aufweisen.

5.1.2 DFS-Experimente mit g200

Um kinetische Informationen über die Dissoziation der Bindung zwischen zwei g200 Molekülen zu erhalten, wurde die Bindung mittels dynamischer Kraftspektroskopie (DFS) genauer untersucht. Die Kraftverteilungen wurden bei unterschiedlichen Ziehgeschwindigkeiten bestimmt, um die Zeitabhängigkeit der äußeren Kraft, die sog. Loading-Rate (=Ziehgeschwindigkeit*Gesamtelastizität), zu variieren. In Abbildung 1.4 sind die Verteilungen der Abrisskräfte für g200 in künstlichem Meerwasser ohne Kalzium dargestellt. Die wahrscheinlichste Abrisskraft wird durch den Fit einer Gaußkurve ermittelt und ist für jede Verteilung mit angegeben. Werden die wahrscheinlichsten Abrisskräfte gegen die Logarithmen der zugehörigen Loading-Raten aufgetragen (Abb. 1.5), ergibt sich der von Evans und Ritchie postulierte Zusammenhang (Gleichung (3.24)):

$$\hat{F} = \frac{k_B T}{x_\beta} \ln \left(\frac{x_\beta \cdot r}{k_{off}^0} \right)$$

Hier ist \hat{F} die wahrscheinlichste Abrisskraft, $k_B T$ die thermische Energie, r die Loading-Rate, x_β die molekulare Reaktionslänge und k_{off}^0 die Off-Ratenkonstante im thermi-

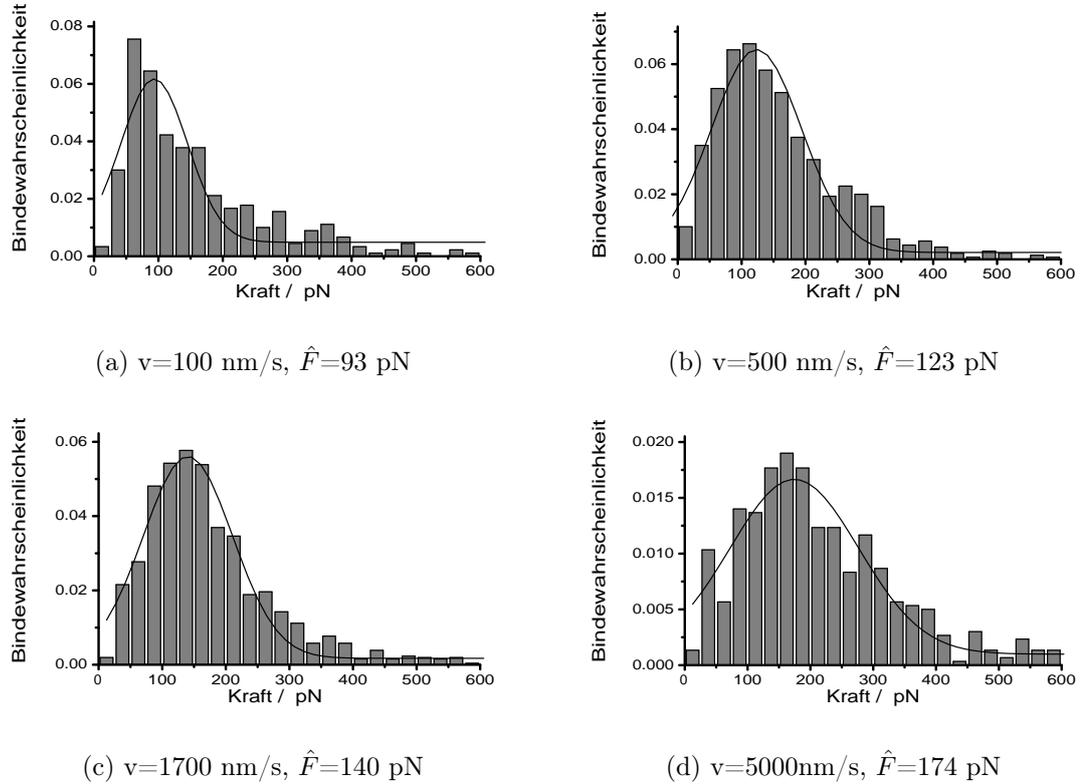


Abbildung 1.4: SMFS Experimente mit g200-Molekülen in künstlichem Meerwasser ohne Ca^{2+} bei unterschiedlichen Ziehgeschwindigkeiten.

schen Gleichgewicht. In Abbildung 1.5 ist der lineare Zusammenhang zwischen den wahrscheinlichsten Abrisskräften und den Logarithmen der Loading-Rate gut erkennbar. Die Extrapolation der gefitteten Gerade bis zum Schnittpunkt mit der x-Achse (äußere Kraft $\hat{F} = 0$), ergibt einen Wert für die Off-Ratenkonstante im thermischen Gleichgewicht von $k_{off}^0 = (0,38 \pm 0,24) \text{ s}^{-1}$ für die Bindung zwischen g200-Molekülen in Meerwasser ohne Kalzium. Die mittlere Lebensdauer der Bindung entspricht dem Kehrwert der Off-Ratenkonstante: $1/k_{off}^0 = \tau = (2,6 \pm 1,6) \text{ s}$. So erhält man mittels dynamischer Kraftspektroskopie kinetische Informationen über die Bindung.

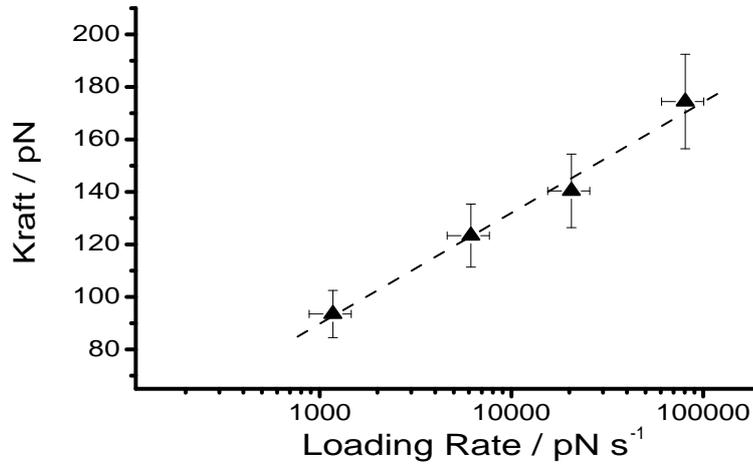


Abbildung 1.5: Dynamische Kraftspektroskopie mit g200-Molekülen in Meerwasser ohne Ca^{2+} . Durch Extrapolation der Geraden zum Wert $\hat{F} = 0$ ergibt eine Off-Ratenkonstante von $k_{off}^0 = (0,38 \pm 0,24) s^{-1}$

Um den Einfluss der Kalziumkonzentration in der Umgebung auf die Lebensdauer der Bindung zwischen g200 Molekülen zu untersuchen, wurde die eben beschriebene Durchführung in künstlichem Meerwasser mit $10\text{ mM } Ca^{2+}$ wiederholt. Auch hier wird der lineare Zusammenhang zwischen den wahrscheinlichsten Abrisskräften und den Logarithmen der Loading-Rate deutlich. Abbildung 1.6 zeigt die Ergebnisse für die Messungen in Meerwasser ohne bzw. mit $10\text{ mM } Ca^{2+}$.

Erkennbar ist, dass die Kräfte bei gleicher Loading-Rate bei Anwesenheit von Kalzium höher sind, als die Kräfte, die in Meerwasser ohne Kalzium ermittelt wurden. Die Extrapolation der Geraden für die Messungen mit Kalzium führt zu einer Off-Ratenkonstante von $k_{off}^0 = (1,46 \pm 1,23) 10^{-3} s^{-1}$. Dieser Wert ist um mehr als zwei Zehnerpotenzen kleiner als die Off-Ratenkonstante ohne Kalzium von $k_{off}^0 = (0,38 \pm 0,24) s^{-1}$. Das bedeutet, die mittlere Lebensdauer der Bindung zweier g200 Moleküle erhöht sich durch Zugabe von Kalziumionen von $\tau = (2,6 \pm 1,6) s$ auf $\tau = (680 \pm 570) s$, also um einen Faktor von mehr als 250. Mit der dynamischen Kraftspektroskopie gelang es die für die Bindung zwischen den Aggregationsfaktoren des Schwammes *microciona prolifera* bekannte Kalziumabhängigkeit auch für deren Glykanuntereinheiten g200 nachzuweisen. Der Einfluss der Ionen auf die Bindung der freien Glykane ist zwar schwächer, allerdings ist es gut vorstellbar, dass dieser Effekt aufgrund der festen räumlichen Anordnung der

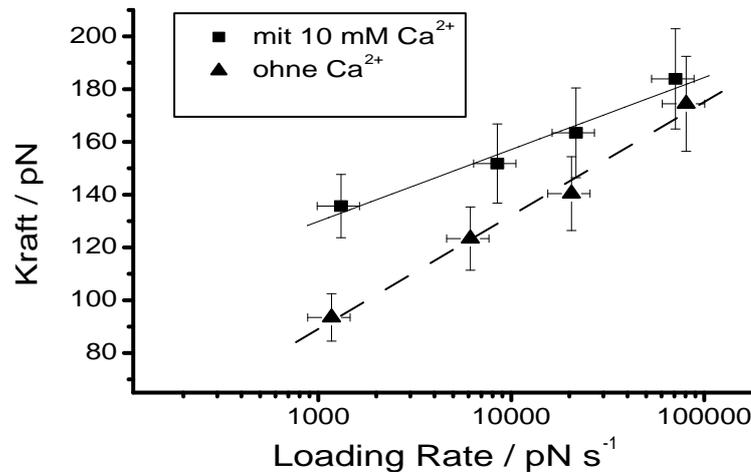


Abbildung 1.6: Dynamische Kraftspektroskopie mit g200-Molekülen in Meerwasser mit bzw. ohne Ca^{2+} . Durch Zugabe von Kalziumionen erhöht sich die mittlere Lebensdauer der Bindung um mehr als das 250-fache.

Glykane an den AF entsprechend verstärkt wird. Die Ergebnisse sind somit ein weiterer Hinweis darauf, dass die Zelladhäsion in Schwämmen auf die Wechselwirkung zwischen Kohlenhydraten zurückzuführen ist.

5.2 PhoB

Der Transkriptionsfaktor PhoB bindet über die DNA-Bindedomäne (DBD) mittels eines *helix-turn-helix*-Motivs an die pho-Box DNA und aktiviert so die Transkription von mehr als 40 Proteinen im Bakterium *E.coli*. Die pho-Boxen der einzelnen Operons unterscheiden sich leicht, stimmen aber in der Sequenz 5'-CTGTCATA(A/T)A(T/A)CTGTCA)-(C/T)-3' miteinander überein, mit je 2 Bindestellen für die DBD von PhoB (TGTC A). Für diese Arbeit wurde sowohl die komplette DNA-Bindedomäne, das Protein *E.coli* PhoB (126-229) exprimiert, als auch das der Erkennungshelix entsprechende Peptid PhoB (190-209) synthetisiert. In Kraftspektroskopieexperimenten wurde die Bindung des Proteins und des Peptids an die pho-Box DNA vor allem auf ihre Spezifität untersucht.

5.2.1 Spezifität der Proteinbindung

Um die Spezifität einer Bindung zu überprüfen, werden in der Einzelmolekülkraftspektroskopie Kontrollexperimente durchgeführt. Dabei gibt es zwei Arten. Bei sog. Kompetitionsmessungen wird nach einer Messung der Bindung in normaler Pufferlösung ein Kompetitor in die Pufferlösung gebracht. In vielen Fällen wird als Kompetitor einer der Bindepartner verwendet, was zu einem starken Abfall der Bindewahrscheinlichkeit führen sollte. Nachdem der Puffer wieder ausgetauscht wurde, sollte sich die Bindewahrscheinlichkeit wieder auf das vorhergehende Niveau begeben. Die Abbildungen 2.1 (a-c) zeigen die von Rainer Eckel [12] gemessenen Histogramme eines solchen Kompetitionsexperimentes für die DBD (PhoB Protein) mit der *pho*-Box-DNA als freien Kompetitor. Kompetitionsexperimente dieser Art zeigen, dass die gemessenen Dissoziationsereignisse auch tatsächlich auf die Bindung zwischen DNA und Protein zurückzuführen sind.

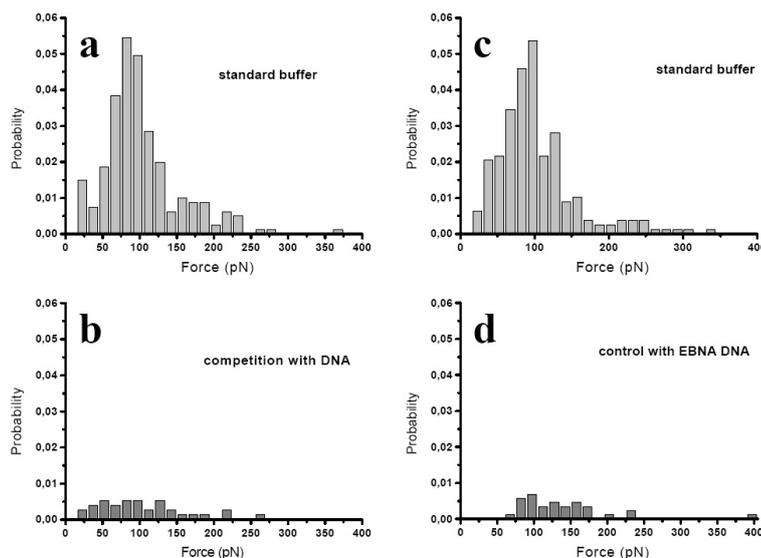


Abbildung 2.1: Kompetitionsexperiment mit der PhoB DBD. (a) Experiment mit Standardpuffer. (b) Konkurrenz mit freier *pho*-Box DNA im Puffer. Die Bindewahrscheinlichkeit sinkt auf ca. 10%. (c) Experiment nach Spülen mit Standardpuffer. Probe reaktiviert und Bindewahrscheinlichkeit wieder auf gleichem Niveau. (d) Kontrollexperiment mit EBNA DNA als Bindepartner. Aus [12]

Die andere Möglichkeit Kontrollexperimente durchzuführen ist, einen der ursprünglichen Bindepartner gegen einen anderen auszutauschen. Damit kann überprüft werden,

ob z.B. das Protein nur an eine bestimmte DNA-Sequenz bindet. Abbildung 2.1(d) zeigt das Kontrollexperiment für die DNA-Bindedomäne des PhoB mit EBNA-DNA. Das Histogramm zeigt, dass fast keine Dissoziationsereignisse detektiert wurden. Die damals von Rainer Eckel verwendete EBNA-DNA enthält allerdings die TGTCA-Sequenz, die als Zielsequenz für PhoB vermutet wird.

Deswegen wurden weitere Kontrollexperimente mit ExpG-DNA durchgeführt, welche keine TGTCA Sequenz enthält (Abb.: 2.2). Es sind fast keine Dissoziationsereignisse zwischen dem Protein und der Kontroll-DNA detektiert worden. Die Kontrollexperimente machen deutlich, dass die DBD des PhoB spezifisch an die pho-Box DNA bindet. Darüber hinaus zeigt die Messung mit der EBNA-DNA, dass die TGTCA-Sequenz für die Bindung nicht auszureichen scheint. Vielmehr scheint auch die Umgebung der Sequenz einen Einfluss auf die Bindung zu haben.

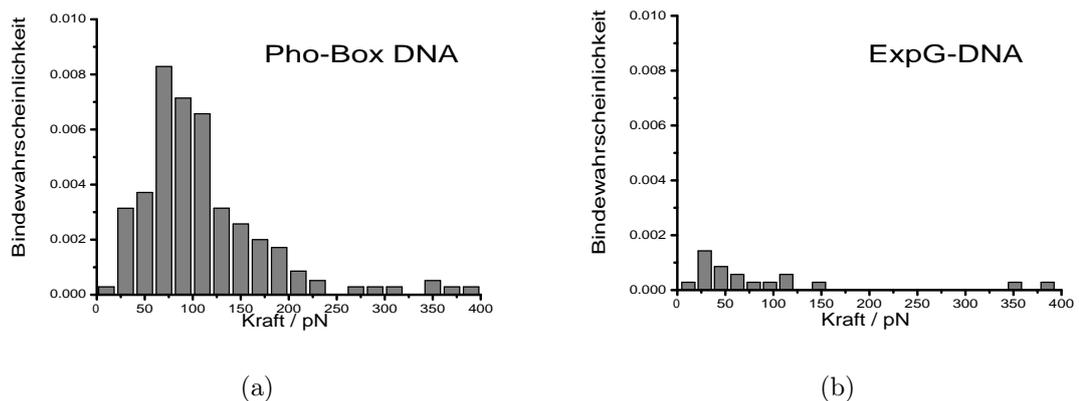


Abbildung 2.2: SMFS Kontrollexperiment. (a) PhoB Protein mit pho-Box DNA. (b) mit ExpG-DNA (ohne TGTCA Sequenz); Ziehgeschwindigkeit 1000 nm/s

5.2.2 Vergleich von PhoB Protein mit Peptid

Neben der kompletten DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors PhoB wurde die Bindung der Erkennungshelix α^3 an die pho-Box DNA in kraftspektroskopischen Experimenten untersucht. Rainer Eckel bestimmte in seiner Dissertation in DFS-Experimenten die Off-Ratenkonstanten der beiden Bindungen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.3 bzw. Tabelle 5.1 dargestellt. Die Off-Ratenkonstante für den Komplex zwischen DNA und der PhoB DNA-Bindedomäne (Protein) ist um den Faktor 10^3 kleiner, als die zwi-

schen DNA und Erkennungshelix. Das bedeutet, dass der Protein-DNA Komplex wesentlich stabiler ist, was mit den zusätzlichen Aminosäuren erklärt werden kann, welche die Bindung an die DNA verstärken.

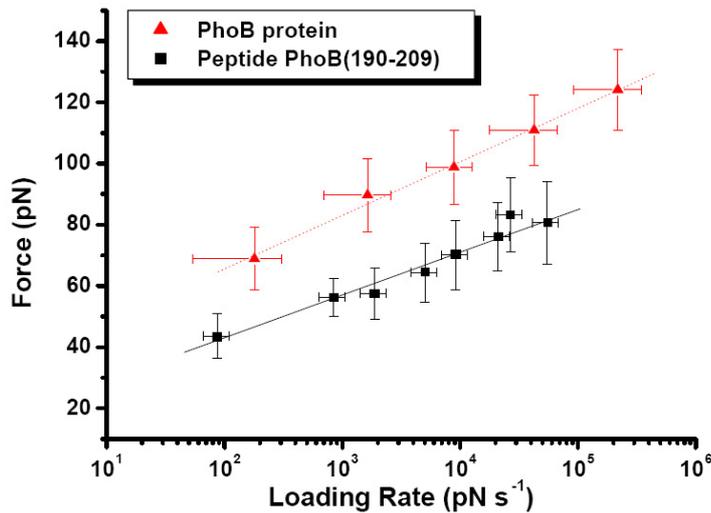


Abbildung 2.3: DFS Ergebnisse für PhoB Protein (komplette DBD) und PhoB Peptid (Erkennungshelix). Aus [12]

System	$x_{\beta}(nm)$	$k_{off}(s^{-1})$	$\tau(s)$
Protein PhoB(126-229)	0.24 ± 0.17	$(2.41 \pm 2.15) \cdot 10^{-3}$	415
Peptide PhoB(190-209)	0.68 ± 0.12	3.1 ± 2.1	0.32

Tabelle 5.1: DFS Ergebnisse für PhoB Protein und Peptid. Aus [12]

Um einen weiteren Vergleich zwischen Protein und Peptid zu bekommen und die bisherigen Ergebnisse zu überprüfen wurden Kompetitionsmessungen zwischen Protein und Peptid durchgeführt (Abb. 2.4). DNA und Protein wurden an AFM-Spitze bzw. auf der Probenoberfläche immobilisiert und zunächst SMFS-Experimente in Standardpuffer durchgeführt (Abb. 2.4 (a)). Die zweite Serie (Abb. 2.4 (b)) erfolgte in Standardpuffer, dem ein 25-facher Überschuss freier Peptide zugefügt wurde, wodurch sich die Bindewahrscheinlichkeit auf ungefähr 55% des ursprünglichen Wertes verringerte. Danach wurde die Probe gespült und eine weitere Kraftverteilung in Standardpuffer aufgenom-

men (Abb. 2.4 (b)), wodurch die Bindewahrscheinlichkeit wieder auf das Anfangsniveau anstieg.

Das Hinzufügen freier Peptide in die Pufferlösung führte also zu einer Halbierung der Bindewahrscheinlichkeit, aber nicht dazu, dass die Bindung komplett geblockt wurde, wie es in den Experimenten mit freier DNA als Kompetitor gemessen wurde (Abb. 2.1 (a-c)). Dies macht deutlich, dass die Bindung der *pho*-Box DNA an die komplette DBD stärker und spezifischer ist, als die an das Peptid. Allerdings ist das Peptid in der Lage die Wechselwirkung zwischen Protein und DNA zu hemmen und teilweise zu blockieren.

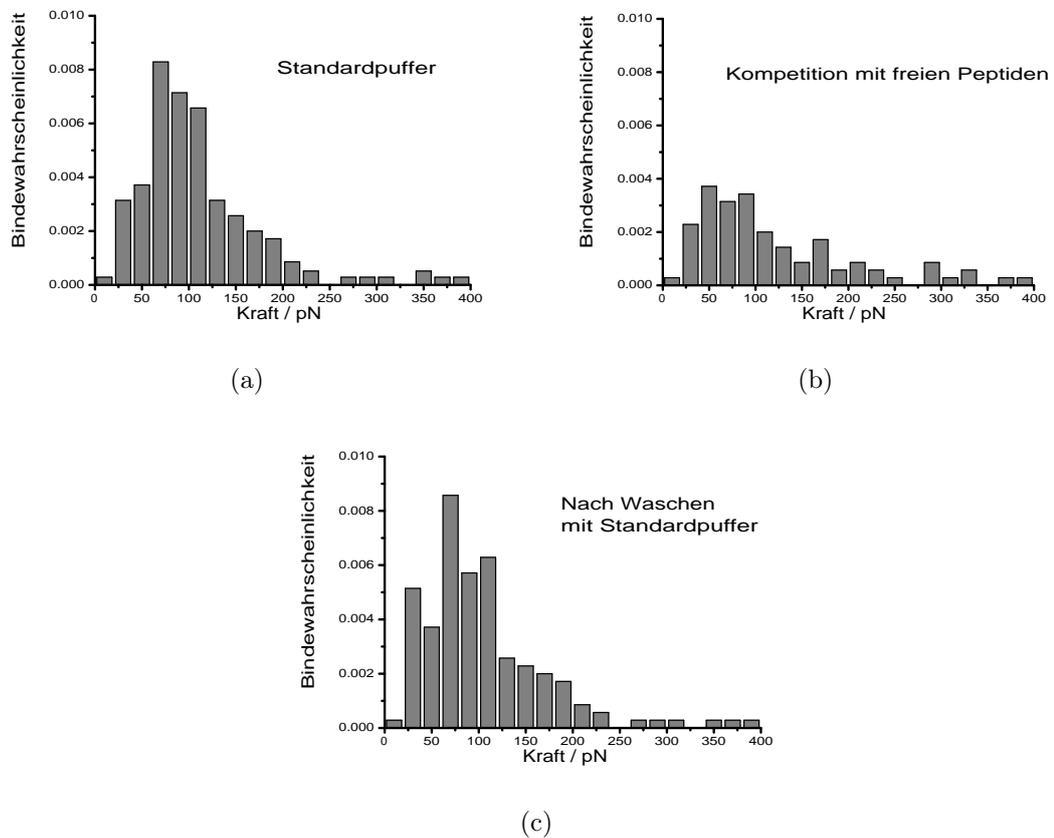


Abbildung 2.4: Konkurrenzexperiment mit *PhoB* Protein und *pho*-Box DNA bei einer Ziehgeschwindigkeit von 1000 nm/s. (a) in Standardpuffer. (b) Konkurrenz mit 25-fachem Überschuss freier Peptide, die Bindewahrscheinlichkeit sinkt auf ungefähr die Hälfte ab. (c) Experiment nach Spülen mit Standardpuffer. Die Bindewahrscheinlichkeit steigt auf das gleiche Niveau wie in (a)

5.2.3 Spezifität der Peptidbindung

Die Bindung des Peptids an die DNA Sequenz ist schwächer als die Bindung zwischen Protein und DNA. Es stellt sich die Frage, ob die Bindung trotzdem genauso sequenzspezifisch ist. Dies wurde zum Teil ebenfalls schon von Rainer Eckel untersucht.

Wie bei den Kompetitionsmessungen für das Protein wurde auch hier zunächst EBNA-DNA als Kontrollsequenz verwendet, welche allerdings die TGTCA-Sequenz enthält. Doch wie bei den Proteinen konnte keine Wechselwirkung zwischen EBNA-DNA und dem PhoB Peptid detektiert werden [43]. Wegen der TGTCA-Sequenz in der EBNA-DNA wurde ein weiteres Kontrollexperiment mit TGTCA-freier ExpG-DNA durchgeführt. Doch im Gegensatz zu den Ergebnissen mit den PhoB-Proteinen (Abb. 2.2b), wurden für das PhoB-Peptid Wechselwirkung mit der ExpG-DNA festgestellt. Abbildung 2.5

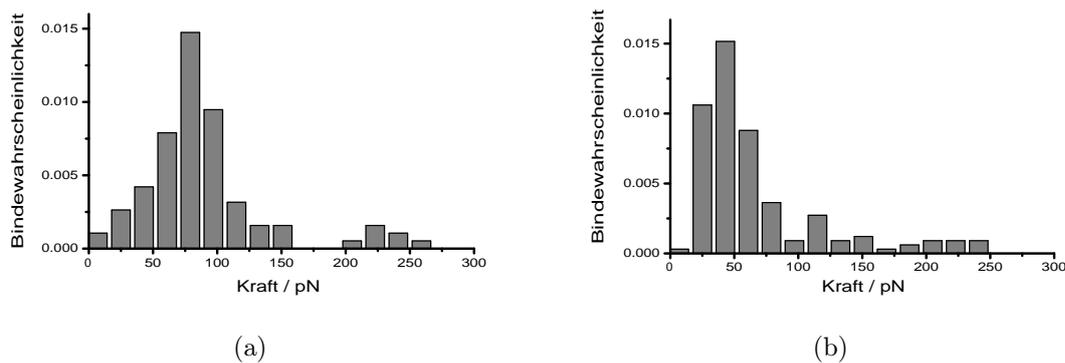


Abbildung 2.5: SMFS Kontrollexperiment. (a) PhoB Peptid mit pho-Box DNA. (b) mit ExpG-DNA (ohne TGTCA Sequenz); Ziehgeschwindigkeit 1000 nm/s

zeigt das Kontrollexperiment. Sowohl für die pho-Box DNA als auch für die ExpG-DNA konnten Interaktionen mit dem Peptid gemessen werden. Allerdings sind die detektierten Abrisskräfte für die Bindung zwischen Peptid und ExpG-DNA für eine Ziehgeschwindigkeit von 1000 nm/s relativ klein. Das legt nahe, dass es sich um unspezifische Wechselwirkungen handelt. Dennoch scheint die 20 Aminosäure große Erkennungshelix α_3 des Transkriptionsfaktors PhoB in der Lage zu sein, nicht nur mit der TGTCA-Sequenz der pho-Box zu interagieren, sondern auch schwache Wechselwirkung mit anderen Sequenzen einzugehen.

Dieses Ergebnis erhöht die Bedeutung der Aminosäuren, welche die Erkennungshelix α_3 umgeben und zusätzlich in der Proteinsequenz enthalten sind. Sie dienen nicht nur, wie

bisher angenommen [12], der Stabilisierung der Bindung des Transkriptionsfaktors PhoB an die pho-Box DNA, sondern haben auch Einfluss auf die Spezifität der Bindung. Dabei ist zum einen die Helix α_2 zu nennen, die an das Rückrat der DNA bindet, vor allem aber der C-terminale Hairpin, bei dem angenommen wird, dass er Wechselwirkungen mit der kleinen Furche der DNA [15].

6 Zusammenfassung

Die Kraftspektroskopie mit dem atomaren Kraftmikroskop (AFM) ist eine Methode, mit der die Wechselwirkung zweier Moleküle auf Einzelmolekülebene untersucht werden kann. Ein Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit sie auf sehr unterschiedliche Systeme anzuwenden. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene biologische Systeme untersucht.

In einem Teil dieser Arbeit konnte mit Hilfe der dynamischen Kraftspektroskopie der Effekt von Kalziumionen auf eine Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkung nachgewiesen werden. Untersucht wurde die Glykanuntereinheit g200, der an der speziesspezifischen Zelladhäsion in Schwammzellen beteiligten Aggregationsfaktoren. Es wurde gezeigt, dass sich durch eine Veränderung der Kalziumkonzentration der Umgebung von 0 mM auf 10 mM die Lebensdauer der Bindung zweier g200 Moleküle um mehr als das 250fache erhöht. Dieses Ergebnis ist ein Nachweis dafür, dass die Zelladhäsion in Schwämmen auf die Wechselwirkung zwischen Kohlenhydratketten zurückzuführen ist. Es unterstreicht außerdem, dass die Bedeutung der Kohlenhydrate als molekularerkennende Systeme immer größer wird.

In dem anderen Teil der Arbeit wurde der Transkriptionsfaktor PhoB aus *E.coli* und dessen Bindung an die Zielsequenz in der pho-Box DNA untersucht. Es wurde die Spezifität der Bindung zwischen der DNA-Bindedomäne (DBD) des Transkriptionsfaktors und der pho-Box DNA bestätigt. Das Peptid, welches die Erkennungshelix α_3 der DBD von PhoB darstellt, bindet ebenfalls an die pho-Box DNA. In Konkurrenzexperimenten konnte gezeigt werden, dass es in der Lage ist die Bindung zwischen DBD und pho-Box DNA teilweise, aber nicht vollständig zu blockieren. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass das Peptid nicht nur an die pho-Box DNA bindet, sondern auch in der Lage war schwache Wechselwirkungen mit einer Kontroll DNA-Sequenz einzugehen. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Umgebung der Erkennungshelix nicht nur die Bindung

des Transkriptionsfaktors stabilisieren, sondern auch einen Einfluss auf die Selektivität hat. Für die Zukunft wäre es sicherlich interessant, die Bindung von Peptiden zu untersuchen, die größer sind als die Erkennungshelix, aber nicht der kompletten DBD von PhoB entsprechen.

Abkürzungsverzeichnis

AF	Aggregationsfaktor
AFM	<i>Atomic Force Microscope</i> , Rasterkraftmikroskop
ATP	Adenosintriphosphat
Da	Dalton, Einheit des Molekulargewichtes $1Da = 1,661 * 10^{-27}kg$
DBD	DNA-Bindedomäne
DFS	<i>Dynamic Force Spectroscopy</i> , Dynamische Kraftspektroskopie
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EBNA	<i>Epstein-Barr virus nuclear antigen</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>exp</i>	Galactoglucan-Biosynthesecluster auf dem Plasmid pSymB von <i>S. meliloti</i>
\hat{F}	wahrscheinlichster Wert einer Verteilung von Abrisskräften
F_a	Abrisskraft eines Dissoziationsereignisses
g200	Glykaneinheit im Schwamm <i>microciona prolifera</i>
HTH	<i>Helix-Turn-Helix</i>
k	Federkonstante
k_B	Boltzmann-Konstante: $k_B = 1,381 * 10^{-23} J/K$
K_D	Dissoziationskonstante: $K_D = k_{off}/k_{on}$
k_{off}	Off-Ratenkonstante: Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation
k_{on}	On-Ratenkonstante: Geschwindigkeitskonstante der Assoziation
MAF	Aggregationsfaktor vom Schwamm <i>microciona prolifera</i>
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
PEG-Linker	Poly(ethylenglycol)-Linker
Piezo	Kurzform für piezoelektrisches Stellelement
r	Loading-Rate
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> , Ribonukleinsäure
SMFS	<i>Single Molecule Force Spectroscopy</i> , Einzelmolekülkraftspektroskopie

SPM	<i>Scanning Probe Microscope</i> , Rastersondenmikroskop
STM	<i>Scanning Tunneling Microscope</i> , Rastertunnelmikroskop
τ	mittlere Lebensdauer eines gebundenen Komplexes $\tau = 1/k_{off}$
T	Temperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan: Biochemischer Standardpuffer
v	Ziehgeschwindigkeit

Literaturverzeichnis

- [1] BINNIG, G., C.F. QUATE und C. GERBER: *Atomic Force Microscope*. Physical Review Letters, 56(9):930–933, März 1986.
- [2] EVANS, E. und K. RITCHIE: *Dynamic strength of molecular adhesion bonds*. Biophysical Journal, 72(4):1541–1555, April 1997.
- [3] MERKEL, R., P. NASSOY, A. LEUNG, K. RITCHIE und E. EVANS: *Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy*. Nature, 397(6714):50–53, Januar 1999.
- [4] LEE, G.U., D.A. KIDWELL und R.J. COLTON: *Sensing discrete streptavidin-biotin interactions with atomic force microscopy*. Langmuir, 10(2):354–357, Februar 1994.
- [5] FLORIN, E. L., V. T. MOY und H. E. GAUB: *Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs*. Science, 264(5157):415–417, Apr 1994.
- [6] LEE, G. U., L. A. CHRISEY und R. J. COLTON: *Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA*. Science, 266(5186):771–773, Nov 1994.
- [7] STRUNZ, T., K. OROSZLAN, R. SCHÄFER und H.-J. GÜNTHERODT: *Dynamic force spectroscopy of single DNA molecules*. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 96:11277–11282, 1999.
- [8] DAMMER, U., M. HEGNER, D. ANSELMETTI, P. WAGNER, M. DREIER, W. HUBER und H. J. GÜNTHERODT: *Specific antigen/antibody interactions measured by force microscopy*. Biophys J, 70(5):2437–2441, May 1996.
- [9] IDIRIS, ALIMJAN, SATORU KIDOAKI, KENGO USUI, TEI MAKI, HARUKAZU SUZUKI, MASAYOSHI ITO, MAKOTO AOKI, YOSHIHIDE HAYASHIZAKI und TAKEHISA

- MATSUDA: *Force measurement for antigen-antibody interaction by atomic force microscopy using a photograft-polymer spacer*. *Biomacromolecules*, 6(5):2776–2784, 2005.
- [10] KÜHNER, F., L. T. COSTA, P. M. BISCH, S. THALHAMMER, W. M. HECKL und H. E. GAUB: *LexA-DNA bond strength by single molecule force spectroscopy*. *Biophys J*, 87(4):2683–2690, Oct 2004.
- [11] BARTELS, FRANK WILCO, MATTHEW MCINTOSH, ALEXANDER FUHRMANN, CHRISTOPH METZENDORF, PATRIK PLATTNER, NORBERT SEWALD, DARIO ANSELMETTI, ROBERT ROS und ANKE BECKER: *Effector-stimulated single molecule protein-DNA interactions of a quorum-sensing system in Sinorhizobium meliloti*. *Biophys J*, 92(12):4391–4400, Jun 2007.
- [12] ECKEL, RAINER: *Single Molecules and Nanocrystals: Molecular Recognition Forces and Optomechanical Switching*. Dissertation, Universität Bielefeld, 2005.
- [13] MAKINO, K., M. AMEMURA, T. KAWAMOTO, S. KIMURA, H. SHINAGAWA, A. NAKATA und M. SUZUKI: *DNA binding of PhoB and its interaction with RNA polymerase*. *J Mol Biol*, 259(1):15–26, May 1996.
- [14] WANNER, B. L.: *Gene regulation by phosphate in enteric bacteria*. *J Cell Biochem*, 51(1):47–54, Jan 1993.
- [15] BLANCO, A.G., M. SOLA, F.X. GOMIS-RUTH und M. COLL: *Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator*. *Structure*, 10(5):701–713, Mai 2002.
- [16] BACHHAWAT, PRITI, G. V T SWAPNA, GAETANO T MONTELIONE und ANN M STOCK: *Mechanism of activation for transcription factor PhoB suggested by different modes of dimerization in the inactive and active states*. *Structure*, 13(9):1353–1363, Sep 2005.
- [17] SOLÀ, M., F. X. GOMIS-RÜTH, L. SERRANO, A. GONZÁLEZ und M. COLL: *Three-dimensional crystal structure of the transcription factor PhoB receiver domain*. *J Mol Biol*, 285(2):675–687, Jan 1999.

-
- [18] WILSON, H.V.: *On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges*. J. Exp. Zool., 5:223–255, 1907.
- [19] GALTSOFF, P.S.: *Regeneration after dissociation (an experimental study on sponges)*. I. Behavior of dissociated cells of *Microciona prolifera* under normal and altered conditions. J. Exp. Zool., 42:183–221, 1925.
- [20] MOSCONA, A. A.: *Studies on Cell Aggregation: Demonstration of materials with selective Cell-Binding Activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 49(5):742–747, May 1963.
- [21] JARCHOW, J. und M. M. BURGER: *Species-specific association of the cell-aggregation molecule mediates recognition in marine sponges*. Cell Adhes Commun, 6(5):405–414, 1998.
- [22] JARCHOW, J., J. FRITZ, D. ANSELMETTI, A. CALABRO, V. C. HASCALL, D. GEROSA, M. M. BURGER und X. FERNÁNDEZ-BUSQUETS: *Supramolecular structure of a new family of circular proteoglycans mediating cell adhesion in sponges*. J Struct Biol, 132(2):95–105, Nov 2000.
- [23] GARCIA-MANYES, S., I. BUCIOR, R. ROS, D. ANSELMETTI, F. SANZ, M.M. BURGER und X. FERNÁNDEZ-BUSQUETS: *Proteoglycan mechanics studied by single-molecule force spectroscopy of allotypic cell adhesion glycans*. Journal of Biological Chemistry, 281(9):5992–5999, März 2006.
- [24] FERNÁNDEZ-BUSQUETS, X.: *Sourcebook of Models for Biomedical Research*, Kapitel 10, Seiten 75–83. Humana Press Inc, Totowa, NJ, 2008.
- [25] JUMBLATT, J. E., V. SCHLUP und M. M. BURGER: *Cell-cell recognition: specific binding of Microciona sponge aggregation factor to homotypic cells and the role of calcium ions*. Biochemistry, 19(5):1038–1042, Mar 1980.
- [26] DAMMER, U., O. POPESCU, P. WAGNER, D. ANSELMETTI, H.J. GUNTHERODT und G.N. MISEVIC: *Binding Strength Between Cell-Adhesion Proteoglycans Measured by Atomic-Force Microscopy*. Science, 267(5201):1173–1175, Februar 1995.
- [27] SPILLMANN, D., K. HÅRD, J. THOMAS-OATES, J. F. VLIAGENTHART, G. MISEVIC, M. M. BURGER und J. FINNE: *Characterization of a novel pyruvylated carbohydrate unit implicated in the cell aggregation of the marine sponge Microciona prolifera*. J Biol Chem, 268(18):13378–13387, Jun 1993.

- [28] SPILLMANN, D., J. E. THOMAS-OATES, J. A. VAN KUIK, J. F. VLIAGENTHART, G. MISEVIC, M. M. BURGER und J. FINNE: *Characterization of a novel sulfated carbohydrate unit implicated in the carbohydrate-carbohydrate-mediated cell aggregation of the marine sponge Microciona prolifera*. J Biol Chem, 270(10):5089–5097, Mar 1995.
- [29] BINNIG, G., H. ROHRER, CH. GERBER und E. WEIBEL: *Tunneling through a controllable vacuum gap*. Applied Physics Letters, 40(2):178–180, 1982.
- [30] BINNING, G., H. ROHRER, CH. GERBER und E. WEIBEL: *Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy*. Phys. Rev. Lett., 49(1):57–, Juli 1982.
- [31] NEUMEISTER, J.M. und W.A. DUCKER: *Lateral, Normal, and Longitudinal Spring Constants of Atomic-Force Microscopy Cantilevers*. Review of Scientific Instruments, 65(8):2527–2531, August 1994.
- [32] CLEVELAND, J.P., S. MANNE, D. BOCEK und P.K. HANSMA: *A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy*. Rev.Sci.Instr., 64(2):403–405, 1993.
- [33] GIBSON, C.T., G.S. WATSON und S. MYHRA: *Determination of the spring constants of probes for force microscopy/spectroscopy*. Nanotechnology, 7(3):259–262, September 1996.
- [34] HUTTER, J.L. und J. BECHHOEFER: *Calibration of Atomic-Force Microscope Tips*. Review of Scientific Instruments, 64(7):1868–1873, Juli 1993.
- [35] ROTERS, A. und D. JOHANNSMANN: *Distance-dependent noise measurements in scanning force microscopy*. Journal of Physics-Condensed Matter, 8(41):7561–7577, Oktober 1996.
- [36] ARRHENIUS, S.: *Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei Inversion von Rohrzucker durch Säuren*. Zeitschr. für Phys. Chemie, 4:226–248, 1889.
- [37] KRAMERS, H.A: *Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions*. Physica, 7(4):284–341, 1940.
- [38] FUHRMANN, ALEXANDER: *Single Molecule Force Spectroscopy on Protein-Nucleicacid-Complexes*. Diplomarbeit, Universität Bielefeld, 2006.

- [39] WOLLSCHLÄGER, KATRIN: *Klonierung, Isolierung und funktionelle Studien des Proteins PhoB aus Escherichia coli*. Diplomarbeit, Universität Bielefeld, 2005.
- [40] BAUMGARTH, BIRGIT, FRANK WILCO BARTELS, DARIO ANSELMETTI, ANKE BECKER und ROBERT ROS: *Detailed studies of the binding mechanism of the Sinorhizobium meliloti transcriptional activator ExpG to DNA*. Microbiology, 151(1):259–268, Jan 2005.
- [41] MISEVIC, G. N., J. FINNE und M. M. BURGER: *Involvement of carbohydrates as multiple low affinity interaction sites in the self-association of the aggregation factor from the marine sponge Microciona prolifera*. J Biol Chem, 262(12):5870–5877, Apr 1987.
- [42] BARTELS, F.W.: *Kraftspektroskopische Bindungsstudien an einzelnen DNA-Protein-Komplexen*. Dissertation, Universität Bielefeld, 2005.
- [43] ECKEL, RAINER, SVEN DAVID WILKING, ANKE BECKER, NORBERT SEWALD, ROBERT ROS und DARIO ANSELMETTI: *Single-molecule experiments in synthetic biology: an approach to the affinity ranking of DNA-binding peptides*. Angew Chem Int Ed Engl, 44(25):3921–3924, Jun 2005.