
Einzelmolekül-Kraftspektroskopie an PhoB-DNA-Komplexen

Diplomarbeit

Zur Erlangung des Grades eines Diplomphysikers

vorgelegt von

Michael Birlo

**Fakultät für Physik
Universität Bielefeld**

15. Mai 2009

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe. Dabei wurden keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet.

Bielefeld, 15. Mai 2009

Michael Birlo

Gutachter:

Prof. Dr. Dario Anselmetti

Prof. Dr. Andreas Hütten

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glycin	Gly	G
Glutamin	Glu	Q
Glutaminsäure	Gln	E
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Physikalische Grundlagen	4
2.1	Das Rasterkraftmikroskop	4
2.2	Kraftspektroskopie	8
2.2.1	Das Prinzip der AFM-Kraftspektroskopie	8
2.2.2	Funktionalisierung der Kraftsensoren	11
2.2.3	Bestimmung der Federkonstanten	11
2.2.4	Kraftauflösung der Kraftsensoren	16
2.2.5	Kinetik und Thermodynamik von Rezeptor-Ligand-Bindungen	17
2.2.6	Die Theorie von Bell, Evans und Ritchie	20
2.2.7	Die Heterogenität chemischer Bindungen	24
3	Biologische Grundlagen	32
3.1	Proteine und Peptide	32
3.1.1	Protein-Ligand-Wechselwirkungen	36
3.2	DNA	36
3.3	Protein-DNA-Wechselwirkungen	40
3.3.1	Genexpression	40
3.3.2	Kontrolle der Genexpression	42
3.3.3	Spezifität der Transkriptionsfaktor-DNA-Wechselwirkung	45
3.3.4	Der Transkriptionsfaktor PhoB	48
4	Materialien und Methoden	53
4.1	Rasterkraftmikroskop	53
4.1.1	Kraftspektroskopie-Parameter	53
4.2	Kraftsensoren	55

4.3	Substrate	56
4.4	Zusätzlich verwendete Geräte	56
4.5	Chemikalien und Puffer	57
4.6	DNA	58
4.7	PhoB-Mutante und PhoB-Peptid	58
4.8	Präparation der Kraftsensoren	59
4.9	Immobilisierung von V197A und PhoB(190-220)	61
4.10	Analyse der Kraft-Distanz-Kurven	62
5	Ergebnisse	66
5.1	Allgemeines	66
5.1.1	Einzeldissoziationsereignisse vs. Mehrfachdissoziationsereignisse . .	67
5.2	Nachweis der spezifischen Bindungen von PhoB(190-220) und V197A . . .	69
5.3	Dynamische Kraftspektroskopie an V197A	73
6	Zusammenfassung und Ausblick	80
	Literatur	83
	Danksagung	95

1 Einleitung

Protein-Wechselwirkungen sind essentiell für die Abläufe in lebenden Systemen. Sie bestimmen die Funktion und die Eigenschaften eines jeden Zelltyps, dienen der molekularen Erkennung, übernehmen Transportfunktionen, dienen als Antikörper der Immunabwehr und steuern als Enzyme den Stoffwechsel. Was aber legt die Art und die Menge der Proteine fest, die eine Zelle charakterisieren und bestimmte Aufgaben wahrnehmen? Proteine sind genetisch codiert, ihr Bauplan und damit die charakteristische (die Proteinfunktion bestimmende) Aminosäuresequenz liegt in Form von DNA-Sequenzen im Genom eines Organismus vor. Die Steuerung der Proteinbiosynthese erfolgt dabei durch eine Kontrolle der Transkription dieser DNA-Sequenzen zur mRNA. Für die Kontrolle dieser sogenannten Genexpression sorgen *Transkriptionsfaktoren*, die die Transkription der DNA an- und abschalten. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die über eine DNA-bindende Domäne spezifisch an definierte DNA-Sequenzen binden. Die DNA-Protein-Wechselwirkungen müssen somit hochspezifisch und zugleich reversibel sein. Dies wird durch eine Vielzahl von schwachen Bindungen, vermittelt durch van-der-Waals-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken und Ionenbindungen, gewährleistet. Da diese Wechselwirkungen unter physiologischen Bedingungen nur eine kurze Reichweite in der Größenordnung von 1 nm [1] besitzen, ist eine stabile Bindung nur möglich, wenn die DNA und das Protein über chemisch komplementäre Oberflächen verfügen (Schlüssel-Schloss-Prinzip [2]). *Synthetische Transkriptionsfaktoren* hätten die faszinierende Möglichkeit in diesen Prozess der Genexpression eingreifen zu können und somit den zellulären Metabolismus zu steuern. Damit wären sie auch therapeutisch einsetzbar. Ein genaues Verständnis der Komplexbildung zwischen einem Transkriptionsfaktor und der DNA ist daher unerlässlich. Hierzu sind Informationen über die Funktion einzelner Aminosäuren und deren Beitrag zur Bindung nötig. Desweiteren wäre eine Reduzierung der Komplexität der DNA-bindenden Domäne ohne einen Verlust der Bindungsspezifität wünschenswert.

Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen werden in der Biologie, Biochemie und Che-

mie im Ensemble untersucht, wobei Eigenschaften von schwach bindenden oder in geringer Konzentration vorliegender Moleküle verborgen bleiben, die andererseits nur durch eine Einzelmolekülanalyse aufgedeckt werden können. Eine geeignete experimentelle Methode zur quantitativen Untersuchung von Bindungen zwischen Proteinen und DNA auf *Einzelmolekülniveau* ist die *AFM-Kraftspektroskopie*. Dabei wird die DNA kovalent an die Spitze eines mikrofabrizierten Kraftsensors (Cantilever) gebunden, während die Proteine kovalent auf einer geeigneten Oberfläche immobilisiert werden. Die Cantileverspitze wird durch eine piezoelektrische Keramik bis zum Kontakt mit der Oberfläche an diese angenähert und anschließend wieder zurückgezogen. Hat sich während der Kontaktzeit ein DNA-Protein-Komplex ausgebildet, so wird der Cantilever beim Zurückziehen so lange zunehmend ausgelenkt, bis der Komplex dissoziiert. Die dazu nötige Dissoziationskraft (im pN-Bereich) kann dann aus der Auslenkung des Cantilevers (mit einer geeigneten Federkonstanten) bestimmt werden. Die Detektion der Dissoziationskraft ist der direkteste Weg um eine Information über die Beiträge einzelner Aminosäuren zum molekularen Mechanismus der DNA-Sequenzerkennung zu erlangen. Mit der Einzelmolekül-Kraftspektroskopie kann außerdem die thermische Off-Ratenkonstante k_{off}^0 (und damit die mittlere Lebensdauer $\tau = 1/k_{\text{off}}^0$) von DNA-Protein-Komplexen bestimmen werden und mit den aus Ensemblemessungen gewonnen thermischen Off-Ratenkonstante verglichen werden. Außerdem kann ein Einblick in die Energielandschaft der Bindung gewonnen werden. Hierzu wird die Abhängigkeit der wahrscheinlichsten Dissoziationskraft einer Verteilung von Dissoziationskräften von der Rückzieh-Geschwindigkeit des Cantilevers und damit der Belastungsrate der Bindung untersucht. Dieses Verfahren bezeichnet man als *dynamische Kraftspektroskopie* [3, 4].

Als Modellsystem für die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Transkriptionsfaktoren und DNA dient im Rahmen dieser Arbeit der Transkriptionsfaktor *PhoB* aus dem Bakterium *Escherichia Coli*. Die Bindungseigenschaften der kompletten DNA-bindenden Domäne von PhoB sowie davon abgeleitete, synthetisierte Teilbereiche (Peptide) wurden

bereits mittels AFM-Kraftspektroskopie untersucht [5, 6]. Das Ziel dieser Arbeit ist es, einen weiteren Baustein für das Verständnis der Beiträge bestimmter Aminosäuren an der Spezifität der DNA-Bindung von PhoB und Lebensdauer des DNA-PhoB-Komplexes zu liefern. Im folgenden Kapitel werden die für die Kraftspektroskopie nötigen physikalischen Grundlagen erläutert. Anschließend folgt eine Einführung in die biologischen Grundlagen der Protein-DNA-Wechselwirkungen. Nach einer genauen Angabe der verwendeten Materialien und Methoden werden die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse der kraftspektroskopischen Experimente an der punktmutierten DNA-bindenden Domäne von PhoB und eines davon abgeleiteten Peptids präsentiert. Abschließend wird eine Zusammenfassung dieser Arbeit und ein Ausblick für weitere Experimente gegeben.

2 Physikalische Grundlagen

Dieser Abschnitt stellt das Rasterkraftmikroskop und das Prinzip der Kraftspektroskopie vor. Weiterhin wird auf thermodynamische und kinetische Aspekte von Rezeptor-Ligand-Bindungen eingegangen und die Theorie zur Analyse von Kraftspektroskopiemessungen auf Einzelmolekülniveau präsentiert.

2.1 Das Rasterkraftmikroskop

Das Rasterkraftmikroskop (engl.: atomic force microscope, kurz AFM) [7] gehört zur Familie der Rastersondenmikroskope (engl.: scanning probe microscopy, kurz SPM). Einen Überblick über die wichtigsten Rastersondenmikroskope findet man z.B. in [8]. Die Messsonde ist im Fall des AFM eine Spitze (engl.: tip) mit einem typischen Radius von ca. 10 nm [9], die an einem (ca. $100 - 500\ \mu\text{m}$) langen (rechteckigen oder V-förmigen) Federbalken (engl.: cantilever) befestigt ist. Der Cantilever und die Cantileverspitze bestehen aus Silizium (Si) oder Siliziumnitrid (Si_3N_4), wobei es Variationen in der Beschaffenheit der Spitzeoberfläche gibt (z.B. eine Beschichtung mit Gold). Diese Kombination aus Spitze und Cantilever ermöglicht es Strukturen und Objekte mit atomarer Auflösung abzubilden (laterale Auflösung von $0,1\text{ nm}$ [9] und vertikale Auflösung $< 0,1\text{ nm}$ [10]).

Nähert man die Spitze an die zu untersuchende Probenoberfläche an, so erfährt die Spitze verschiedene attraktive und repulsive Wechselwirkungen [11]. Die Art dieser Wechselwirkung hängt stark von dem umgebenden Medium (Luft, Vakuum, Inertgas oder Flüssigkeiten) und von der chemischen Beschaffenheit der Spitze und der Probenoberfläche sowie von chemischen Modifizierungen der Oberflächen ab [12]. Natürlich ist auch der Abstand zwischen Spitze und Probenoberfläche für die Natur der Wechselwirkung entscheidend, da man zwischen kurz- und langreichweitigen Wechselwirkungen unterscheidet. Als kurzreichweitig werden Kräfte bezeichnet, die eine Reichweite von weniger als 1 nm besitzen [13]. Entsprechend nennt man Kräfte mit einer Reichweite ab 1 nm

aufwärts langreichweitig. Eine allgegenwärtige Kraft zwischen Spitze und Probenoberfläche ist die *van-der-Waals-Kraft*, die durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen entsteht. Dabei unterscheidet man Wechselwirkungen zwischen permanenten Dipolen, zwischen einem Dipol und einem induzierten Dipol und zwischen induzierten Dipolen (Dispersionskräfte). Die Dispersionskraft entsteht durch zeitliche Schwankungen der Ladungsverteilungen in Atomen oder Molekülen, die in benachbarten Atomen oder Molekülen ein Dipolmoment erzeugen. Zwischen diesen beiden Dipolen wirkt dann die Dispersionskraft. Alle drei Beiträge der van-der-Waals-Kraft haben eine $1/r^6$ -Abhängigkeit [12] (r ist der Abstand zwischen zwei punktförmigen Teilchen). Die van-der-Waals-Kräfte gehören zu den langreichweitigen Wechselwirkungen mit einer Reichweite von bis zu $\sim 100 \text{ nm}$ [11]. In Luft und im Vakuum sind van-der-Waals-Kräfte immer attraktiv, sie können allerdings in Flüssigkeit auch repulsiv sein, wenn die Spitze und die Probenoberfläche aus verschiedenen Materialien bestehen und der effektive Brechungsindex des umgebenden Mediums zwischen dem des Spitzenmaterials und dem des Probenmaterials liegt [14]. In Flüssigkeit sind van-der-Waals-Kräfte stets schwächer als in Luft, da Wasser eine hohe Dielektrizitätskonstante ($\epsilon_{H_2O} \approx 80$ im Vergleich zu $\epsilon_{\text{Luft}} \approx 1$) besitzt und alle drei van-der-Waals-Beiträge eine $1/\epsilon^2$ -Abhängigkeit aufweisen. Bei Messungen in Luft werden die van-der-Waals-Kräfte von den typischerweise stärkeren Kapillarkräften ($\sim 10 - 100 \text{ nN}$ [12]) überlagert. Diese Kapillarkräfte resultieren aus dünnen Wasserfilmen, die auf der Spitze und der Probenoberfläche durch Kondensation von Wasserdampf vorhanden sind [15]. Berühren sich die beiden Wasserfilme von Spitze und Probenoberfläche, so wirkt auf die Spitze eine anziehende Kraft durch Meniskusbildung. In wässrigen Medien sind häufig repulsive und attraktive elektrostatische Kräfte dominierend, die von dem pH-Wert und der Ionenkonzentration der Lösung abhängen. Diese Coulombkräfte entstehen durch geladene Oberflächen, die durch Anlagerung von freien Ionen oder durch chemische Veränderungen von funktionellen Oberflächengruppen (durch Aufnahme oder Dissoziation von H^+ -Ionen) entstehen [16]. Kommt die Spitze in Kontakt mit der Pro-

benoberfläche, wirkt die kurzreichweitige Pauli-Abstoßung mit einer $1/r^{12}$ -Abhängigkeit (Reichweite $\sim 0,1 \text{ nm}$ [11]). Coulomb-Kräfte haben eine größere Reichweite als van-der-Waals-Kräfte und sind ebenfalls in Flüssigkeit schwächer als in Luft ($1/\epsilon$ -Abhängigkeit). Wirken nun Kräfte auf die Spitze, so fungiert der Cantilever als kraftübertragendes Element (engl.: transducer), dessen Auslenkung gemessen werden kann. Die am weitesten verbreitete Methode die Cantileverauslenkung zu messen, ist die sogenannte Lichtzeiger-Methode (Abbildung 1) [17]:

Ein Laserstrahl (erzeugt durch eine Laserdiode) wird auf das Ende des Cantilevers ge-

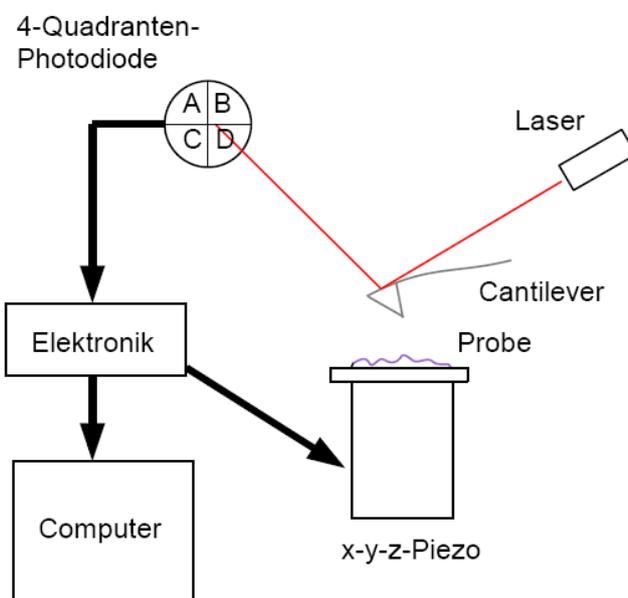


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops mit Lichtzeiger-Detektion. Die Elektronik verarbeitet die durch die Photodiode aufgenommenen Informationen und regelt die piezoelektrische Keramik.

richtet und von diesem wiederum auf einen Spiegel reflektiert, der ihn schließlich auf eine sogenannte Vier-Quadranten-Photodiode lenkt. Wenn der Cantilever ausgelenkt wird, registriert die Photodiode eine Veränderung der Position des Laserstrahls mit einer minimalen nachweisbaren Auslenkung $< 3 \text{ pm}$ [10].

Ein Abbild der zu untersuchenden Probenoberfläche wird mit diesem Messprinzip er-

zeugt, indem die Spitze die Probenoberfläche horizontal abrastert (ähnlich einer Plattenspielnadel). Die detektierten ortsabhängigen Cantileverauslenkungen werden dann als Rückkopplungssignal zur Steuerung der vertikalen Abstandsänderungen der Spitze benutzt und vom Computer zu einem Bild verarbeitet. Diese Abstandsänderungen werden durch piezoelektrische Keramiken erzeugt, die je nach AFM-Aufbau entweder die Spitze oder die Probenoberfläche mit einer Genauigkeit im Sub-Ångström-Bereich [18] reproduzierbar vertikal bewegen. Das AFM lässt sich in verschiedenen Messmodi betreiben [19]:

- *Kontaktmodus* (engl.: contact mode): der Cantilever hat Kontakt zur Probenoberfläche und repulsive Kräfte (Pauli-Verbot) wirken auf ihn. Während des Rastervorgangs wird entweder die auf die Spitze wirkende Kraft konstant¹ gehalten (engl.: constant force mode) oder der Abstand der Spitze zur Probenoberfläche (engl.: constant height mode).
- *Nichtkontaktmodus* (engl.: non-contact mode): der Cantilever wird in diesem Modus nahe seiner Resonanzfrequenz zum Schwingen angeregt und an die Probenoberfläche angenähert. Wirken Kräfte auf die Spitze, so verschiebt sich die Resonanzfrequenz des Cantilevers und damit auch die Schwingungsamplitude. Diese Frequenzverschiebung wird als Regelgröße für die Abstandsregelung benutzt und die Amplitude konstant gehalten. Der Nichtkontaktmodus ist sehr gut für Messungen im Vakuum geeignet, da hier die Resonanzkurve des Cantilevers einen scharfen Peak besitzt und somit die Amplitude sehr empfindlich auf Änderungen der Resonanzfrequenz reagiert.
- *Tapping Mode*: das AFM wird im Nichtkontaktmodus betrieben, allerdings hat die Spitze kurzzeitigen Kontakt (μs -Bereich [1]) mit der Probenoberfläche. Die

¹Hierzu wird der Abstand zwischen Spitze und Probe durch einen Regelkreis nachgeregelt.

Spitze tippt oder klopft an die Probenoberfläche (engl.: tapping). Der Vorteil des Tapping Mode ist, dass man sensible Biomoleküle schonender als im Kontaktmodus abbilden kann, da die wirkenden lateralen Kräfte minimiert sind.

2.2 Kraftspektroskopie

2.2.1 Das Prinzip der AFM-Kraftspektroskopie

Das AFM ist auch in der Lage Kräfte zu ermitteln, die zwischen der Spitze und der Probenoberfläche wirken (engl.: tip-sample interactions). Dabei dient der Cantilever als sehr sensibler *Kraftsensor* (Kräfte bis in den pN-Bereich² sind zugänglich [21]). Die Kraftauflösung wird hierbei durch das thermische Rauschen des Cantilevers begrenzt [22, 23] (Abschnitt 2.2.4). Die Auslenkung des Cantilevers Δz wird durch die Positionsänderung des Laserspots auf der Photodiode ausgelesen und mit der Federkonstanten k (Abschnitt 2.2.3) nach dem Hooke'schen Gesetz

$$\Delta F = -k \Delta z \tag{1}$$

in eine Kraft ΔF umgewandelt. Die auf den Cantilever wirkenden Kräfte werden durch sogenannte *Kraft-Distanz-Kurven* bestimmt. Dabei wird die Spitze (kontrolliert durch eine piezoelektrische Keramik (Abschnitt 2.1) vertikal auf die Probenoberfläche zu und wieder von ihr weg bewegt. Die durch Spannung erzeugte Extension der piezoelektrischen Keramik (kurz: Piezo) senkrecht zur Probenoberfläche wird durch einen sogenannten *LVDT-Positionssensor* (*Linear Variable Differential Transformator*) gemessen.

Möchte man spezifische Dissoziationskräfte zwischen Molekülen mit dem AFM messen, so muss man die Cantileverspitze und die Oberfläche (Substrat) mit den zu untersuchenden Molekülen funktionalisieren. Dabei müssen sowohl die Spitze als auch das Substrat in vielen Fällen vorher chemisch präpariert werden, um eine geeignete Immobilisierung

²Mit Federkonstanten von 10 – 100 nN/nm sind Kräfte im Bereich von 10 pN bis 10 μ N detektierbar [20].

der Moleküle zu gewährleisten [5, 24]. Hierbei ist entscheidend, dass die Bindungen zur Spitze und zum Substrat um Größenordnungen stärker sind als die Dissoziationskräfte der wechselwirkenden Moleküle. Somit sorgt die kovalente Anbindung der Moleküle dafür, dass die zu untersuchende (schwächere) nichtkovalente Bindung zuerst reißt. Die Untersuchung von Biomolekülen (Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen) *in situ* erfordert Kraft-Distanz-Kurven in Flüssigkeit [12, 24]. Neben den erwünschten *spezifischen* Wechselwirkungen zwischen den an Spitze und Substrat immobilisierten Molekülen, können auch unerwünschte *unspezifische*³ Adhäsionen auftreten. Diese Adhäsionen können das spezifische Dissoziationsereignis in der Rückzieh-Kurve (engl.: *retract-line*) verdecken, weshalb man in der Regel die Moleküle über einen sogenannten *PEG-Linker*⁴ an die Spitze bindet. Durch den PEG-Linker erfolgt die Bindung in einer ausreichenden (durch die Linkerlänge definierten) Entfernung von typischerweise $\sim 30 \text{ nm}$ zur Probenoberfläche, so dass das spezifische Dissoziationsereignis leichter von einer unspezifischen Adhäsion unterschieden werden kann [26].

Ein typischer Kraft-Distanz-Zyklus durchläuft dabei verschiedene charakteristische Phasen (Abbildung 2):

- (1) Der Cantilever wird von seiner Anfangsposition⁵ ausgehend an die Probenoberfläche angenähert (engl.: *approach-line*). In dieser Annäherungsphase wirken noch keine Kräfte auf die Spitze und es tritt keine Cantileverauslenkung auf ($\Delta z = 0$).
- (2) Die Spitze kommt in Kontakt mit der harten⁶ Probenoberfläche. Im Kontaktbereich wird der Cantilever proportional zur Piezoposition von der Probenoberfläche weg ausgelenkt ($\Delta z > 0$) und es gilt: *Piezo-Extension* = $-\Delta z$. Der Oberflächenabstand der Spitze ist in diesem Kontaktbereich Null.

³Adhäsionen sind unspezifisch, da keine spezifischen Einzelmoleküle involviert sind. Sie entstehen meist durch organische Kontaminationen von Spitze und Substrat [25]. Auch van-der-Waals-Wechselwirkungen und Coulomb-Kräfte können zu Adhäsionen führen [12].

⁴PEG steht für Polyethylenglykol.

⁵Die Anfangsposition ist ein definierter vertikaler Abstand zur Probenoberfläche

⁶Hier wird der Idealfall einer unendlich harten (nicht deformierbaren) Probenoberfläche angenommen [24].

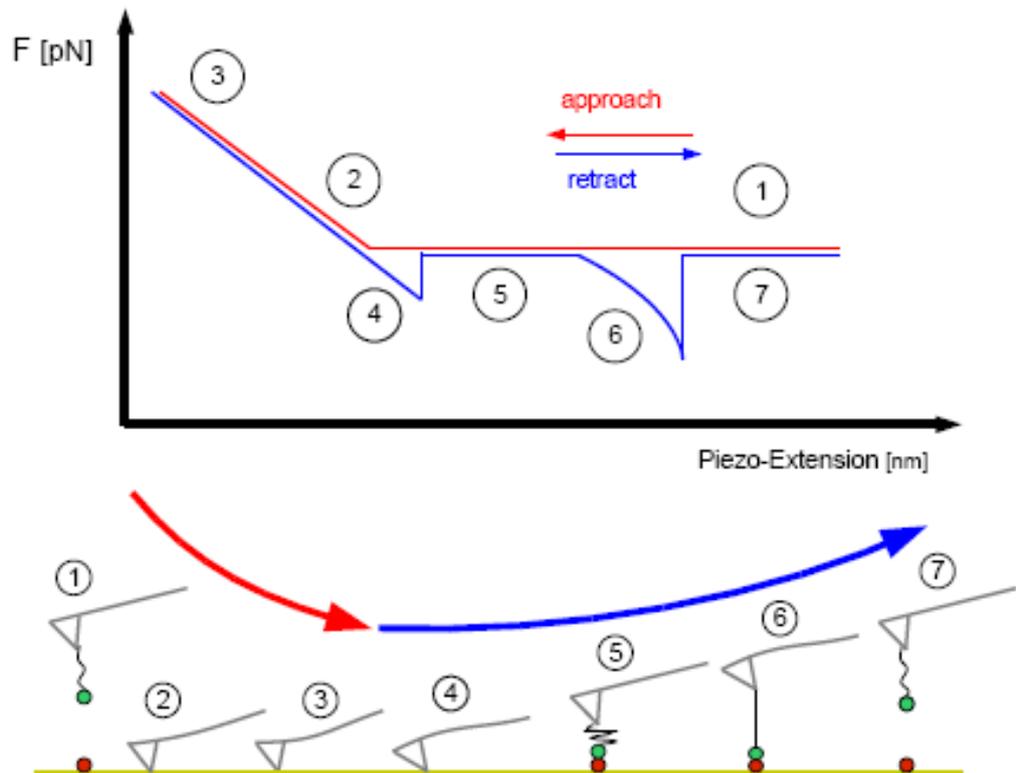


Abbildung 2: Die verschiedenen Phasen einer typischen Kraft-Distanz-Kurve in Flüssigkeit. Oben: die auf den Cantilever wirkende Kraft in Abhängigkeit der Piezoposition. Unten: je nach Piezoposition zeigt der Cantilever eine charakteristische Auslenkung oder bleibt in seiner Ruhelage.

- (3) Der Cantilever wird sukzessiv ausgelenkt bis eine vorgegebene Maximalkraft bzw. maximale Verbiegung erreicht ist. Danach wird der Piezo (durch eine entsprechende Änderung der Spannung) gestaucht und die Spitze entfernt sich von der Probenoberfläche.
- (4) Die Auslenkung des Cantilevers verringert sich mit zunehmender Kontraktion des Piezos kontinuierlich und erreicht den Bereich mit $\Delta z = 0$. Wird die Spitze jedoch durch eine unspezifische Adhäsion in Kontakt mit der Probenoberfläche gehalten, so wird der Cantilever zur Probenoberfläche hin ausgelenkt ($\Delta z < 0$). Sobald die Adhäsionskraft überschritten ist, entfernt sich die Spitze abrupt von der Probenoberfläche und es gilt wieder $\Delta z = 0$.

(5) Mit zunehmender Entfernung der Spitze von der Probenoberfläche wird der PEG-Linker gestreckt. Es gilt weiterhin $\Delta z = 0$.

(6) Hat sich während der Kontaktzeit ein Rezeptor-Ligand-Komplex gebildet, bewirkt das weitere Wegfahren der Spitze eine Dehnung des PEG-Linkers (sobald die Länge des PEG-Linkers erreicht ist). Die PEG-Linker-Dehnung zeigt ein nichtlineares, parabolisches Kraft-Distanz-Verhalten [27, 28]. Der Cantilever wird durch die wirkende Kraft ausgelenkt ($\Delta z < 0$).

(7) Die zunehmende Auslenkung des Cantilevers führt schließlich zum Erreichen der Dissoziationskraft des Rezeptor-Ligand-Komplexes. Nachdem der Komplex dissoziiert ist, kehrt der Cantilever in die Position mit $\Delta z = 0$ zurück.

2.2.2 Funktionalisierung der Kraftsensoren

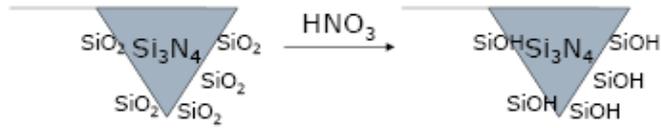
Die kovalente Immobilisierung der PEG-Linker an die in dieser Arbeit verwendeten Cantilever mit Spitzen aus Si_3N_4 (ohne Beschichtung) erfordert eine chemische Funktionalisierung mit 3-Aminopropyltriethoxysilan [1, 29]. Dazu muss zunächst die SiO_2 -Schicht der Cantileverspitze durch eine Behandlung mit Salpetersäure (HNO_3) oxidiert werden. Durch diese Oxidation wird die SiO_2 -Schicht mit OH -Gruppen versehen. An das 3-Aminopropyltriethoxysilan kann dann der PEG-Linker (genauer: N-Hydroxysuccinimid-Polyethylenglykol-Maleimid, kurz NHS-PEG-MAL) kovalent durch seine NHS-Gruppe binden (Abbildung 3). Schließlich kann sich die DNA über ihre Thiolgruppe⁷ (SH-) kovalent an die Maleimidgruppe des PEG-Linkers binden (Abbildung 4).

2.2.3 Bestimmung der Federkonstanten

Die präzise Messung von Dissoziationskräften erfordert eine genau bekannte Federkonstante des Cantilevers. Es ist eine wohlbekannt Tatsache, dass die Federkonstanten von

⁷An die DNA wurde für diese Arbeit eine SH -Gruppe kovalent gebunden [6].

- Aktivieren der Spitze mit HNO_3



- Reaktion mit APTES (Aminopropyltriethoxysilane)



Abbildung 3: 3-Aminopropyltriethoxysilan-Moleküle binden kovalent an die Si_3N_4 -Spitze. Aus [30].

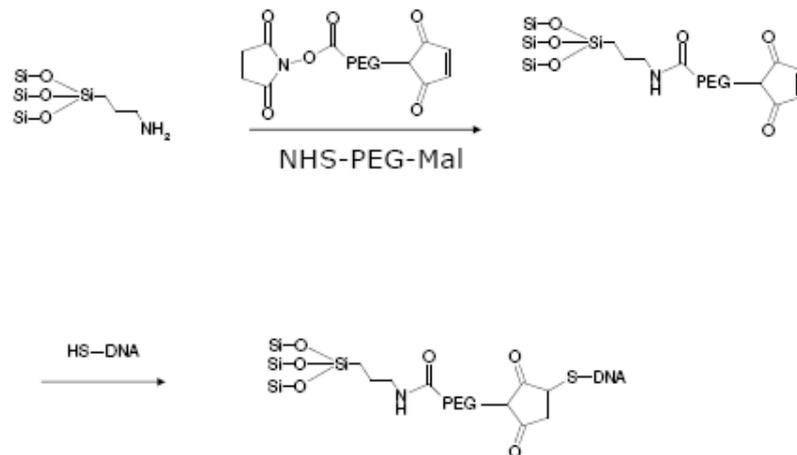


Abbildung 4: Der *NHS-PEG-MAL-Linker* bindet kovalent an die 3-Aminopropyltriethoxysilan-Moleküle an der Si_3N_4 -Spitze. An den immobilisierten *NHS-PEG-MAL-Linker* wird die DNA kovalent über ihre *SH-Gruppe* gebunden. Aus [30].

Cantilevern⁸ aus einer Hersteller-Charge nicht nur von den Herstellerangaben abweichen, sondern sich auch untereinander unterscheiden [18][31]-[34]. Daher muss man vor jeder Messung die Federkonstante des verwendeten Cantilevers ermitteln. Hierzu gibt es mehrere Verfahren, die man in statische und dynamische Methoden unterteilt. Bei den

⁸Mit der gleichen Federkonstante laut Hersteller-Angabe.

statischen Methoden übt man eine exakt bekannte Kraft auf den Cantilever aus und bestimmt die resultierende Auslenkung. Die dynamischen Methoden dagegen ermitteln die Federkonstante über Cantilever-Schwingungen, da diese von der Federkonstante abhängen. Einen Überblick und Vergleich über die verschiedenen Methoden liefert [35].

Da in dieser Arbeit die dynamische Methode *Thermal Noise Methode* [18] verwendet wurde, soll diese hier kurz vorgestellt werden:

Die *Thermal Noise Methode* ist eine weit verbreitete und sehr schonende Methode die Federkonstante zu bestimmen. Mit ihr lassen sich Cantilever mit Federkonstanten bis $\approx 200 \text{ pN/nm}$ kalibrieren [9].

Da die Cantileverauslenkungen bei Raumtemperatur im Å-Bereich liegen [18], gilt die Näherung des harmonischen Oszillators mit einem Freiheitsgrad (unter Vernachlässigung höher Schwingungs-Moden). Ein harmonischer Oszillator im thermischen Gleichgewicht mit seiner Umgebung oszilliert als Antwort auf das thermische Rauschen (Brownsche Molekularbewegung). Die Hamiltonfunktion dieses Systems ist

$$H = \frac{p^2}{2m_{\text{eff}}} + \frac{1}{2}m_{\text{eff}}\omega_0^2 \Delta z^2 \quad , \quad (2)$$

mit Δz der Auslenkung des Oszillators, p dem Impuls des Oszillators, m_{eff} der effektiven bzw. oszillierenden Masse und ω_0 der Resonanzfrequenz des Oszillators.

Nach dem Äquipartitionstheorem gilt

$$\left\langle \frac{1}{2}m_{\text{eff}}\omega_0^2 \Delta z^2 \right\rangle = \frac{1}{2}k_B T \quad , \quad (3)$$

wobei k_B die Boltzmann-Konstante und T die absolute Temperatur bezeichnen. Mit $\omega_0 = k/m$ lässt sich dann die Federkonstante k des Cantilevers durch

$$k = \frac{k_B T}{\langle \Delta z^2 \rangle} \quad (4)$$

berechnen. Um die mittlere quadratische Cantileverauslenkung $\langle \Delta z^2 \rangle$ zu berechnen, benötigt man zunächst die zeitabhängige Cantileverauslenkung $\Delta z(t)$. Diese erhält man als Lösung der Bewegungsgleichung eines gedämpften harmonischen Oszillators unter dem Einfluss einer externen Kraft (*Langevin-Gleichung*)

$$m_{\text{eff}} \frac{d^2}{dt^2} \Delta z(t) + 2b \frac{d}{dt} \Delta z(t) + k \Delta z(t) = F_0 \exp(i \omega t) , \quad (5)$$

wobei m_{eff} die effektive Cantilevermasse, $\Delta z(t)$ die zeitabhängige Cantileverauslenkung, k die Federkonstante des Cantilevers, b die viskose Dämpfungskonstante des Cantilevers und $F_0 \exp(i \omega t)$ die zeitabhängige (durch Brownsche Molekularbewegung auf den Cantilever) wirkende periodische Kraft mit der Frequenz ω darstellen. Die vollständige reelle Lösung dieser Differentialgleichung ist

$$\Delta z(t) = \exp\left(-\frac{b t}{2 m_{\text{eff}}}\right) A \cos(\omega_0 t + \varphi) + \frac{F_0}{2 m_{\text{eff}} \omega} \sqrt{(\omega_0 - \omega)^2 + \frac{b^2}{2}} \cos(\omega t + \varphi) , \quad (6)$$

mit A der Amplitude der Schwingung, ω_0 der Resonzfrequenz des Cantilevers und dem Phasenwinkel $\varphi = \arctan\left(\frac{b \omega}{\omega^2 - \omega_0^2}\right)$ [9]. Integriert man nun die Fouriertransformierte dieser Lösung $\Delta \tilde{z}(\omega)$ über den Frequenzraum, so erhält man die mittlere quadratische Cantileverauslenkung

$$\langle \Delta z^2 \rangle = \int_0^\infty d\omega \Delta \tilde{z}(\omega)^2 . \quad (7)$$

$\langle \Delta z^2 \rangle$ ist die Rauschleistung und $\Delta \tilde{z}(\omega)^2$ ist die Rauschleistungsdichte. Sieht man von anderen Rauschquellen ab, so hat die Rauschleistungsdichte ein Lorentz-Profil

$$\Delta \tilde{z}(\omega)^2 = \frac{A_0^2 \omega_0^4}{(\omega^2 - \omega_0^2)^2 + \frac{\omega^2 \omega_0^2}{Q^2}} , \quad (8)$$

wobei A_0 die Amplitude der Lorentz-Kurve, ω_0 die Resonanzfrequenz des Oszillators und $Q = \omega_0/b$ die Güte der Lorentz-Kurve bezeichnen [36]. Durch einen Fit⁹ werden A_0 , ω_0 und Q ermittelt und dann zum Berechnen der Federkonstante verwendet.

Da die Rauschleistungsdichte durch die Position des Laserspots auf der Vier-Quadranten-Photodiode ermittelt wird, hat sie die Einheit V^2/Hz . Für die Bestimmung der Federkonstante ist aber eine Umrechnung in nm^2/Hz erforderlich, da die mittlere quadratische Cantileverauslenkung $\langle q^2 \rangle$ in nm^2 bekannt sein muss (Gleichung (4)). Dazu wird eine Kraft-Distanz-Kurve auf hartem Untergrund (z.B. auf einem Gold-Plättchen) aufgenommen und die Steigung im Kontaktbereich (Abbildung 2) in V/nm bestimmt. Dabei wird die Auslenkung (engl.: deflection) des Cantilevers von Volt ($Defl[V]$) in nm ($Defl[nm]$) umgewandelt. Mit der sogenannten *inversen optischen Cantileversensitivität* $InvOLS[nm/V]$ (engl.: invertical otical lever sensivity) erhält man

$$Defl[nm] = Defl[V] \cdot InvOLS \left[\frac{nm}{V} \right] . \quad (9)$$

Mit der $InvOLS$ wird (4) zu

$$k = \frac{k_B T}{\langle \delta V^2 \rangle \chi^2 InvOLS^2} , \quad (10)$$

wobei $\langle \delta V^2 \rangle$ die mittlere quadratische Cantileverauslenkung in Volt und χ ein Korrekturfaktor darstellen. Der Korrekturfaktor resultiert daraus, dass die $InvOLS$ -Werte für einen frei schwingenden Cantilever und einem statisch (durch Oberflächenkontakt) ausgelenkten Cantilever verschieden sind. Außerdem hängt der Korrekturfaktor auch von der Größe und Position des Laserspots auf dem Cantilever ab (genauerer dazu findet man in [37]).

⁹Zur Berechnung der Federkonstanten wird die Amplitude des Weißen Rauschens A_{White} von der Fit-Funktion subtrahiert.

Die auf den Cantilever wirkende Kraft F wird nun zugänglich:

$$F[pN] = Defl[nm] \cdot k \left[\frac{pN}{nm} \right] . \quad (11)$$

Diese Kalibrierungs-Methode hat allerdings (wie alle anderen Methoden auch) eine Ungenauigkeit von 10-20 % [35, 38].

2.2.4 Kraftauflösung der Kraftsensoren

Das thermische Rauschen führt durch die Ortsfluktuationen (Oszillationen) $\langle \Delta z^2 \rangle$ auch zu Kraftfluktuationen $\langle \Delta F^2 \rangle$ des Cantilevers. Aus (1) und (2) erhält man für die minimal messbare Kraft

$$\Delta F = \sqrt{k_B T k} , \quad (12)$$

wobei hier mit ΔF der RMS-Wert (engl.: root mean square value) gemeint ist. Nimmt man z.B. eine Federkonstante von 10 pN/nm und eine Temperatur von 300 K an, so erhält man eine minimal messbare Kraft von $\approx 6,43 \text{ pN}$.

Allerdings sind die Ortsfluktuationen nicht gleichmäßig über das Frequenzspektrum verteilt. Das Frequenzspektrum des Cantilevers wird durch seine Fähigkeit bestimmt, thermische Energie aufzunehmen und durch Reibung wieder an das umgebende Medium abzugeben (Fluktuations-Dissipations-Theorem). Der Cantilever kann der Anregung durch die umgebenden Moleküle irgendwann nicht mehr folgen und die Amplitude klingt ab. Oberhalb der sogenannten *Grenzfrequenz* reagiert der Cantilever immer weniger auf die Anregung, was sich in der Abnahme der Rauschleistungsdichte (Abbildung 5) zeigt. Die Grenzfrequenz ω_g lässt sich durch die Federkonstante k und die viskose Reibung b ausdrücken:

$$\omega_g = \frac{k}{b} . \quad (13)$$

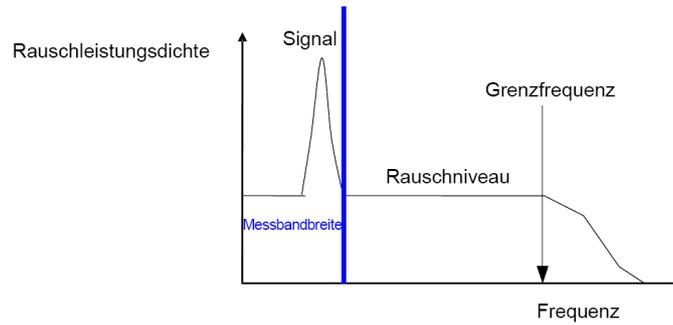


Abbildung 5: Rauschspektrum eines Cantilevers (schematisch) bei Umgebungsbedingungen. Oberhalb seiner Resonanzfrequenz reagiert der Cantilever zunehmend weniger auf eine äußere Anregung. Das Rauschniveau lässt sich nur durch eine höhere Grenzfrequenz verringern.

Für das Integral über die Rauschleistungsdichte $\langle \Delta z^2 \rangle$ gilt immer

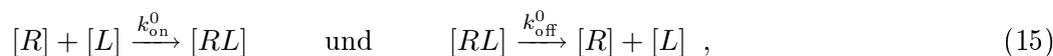
$$\langle \Delta z^2 \rangle = \frac{k_B T}{k} . \quad (14)$$

Die Fläche unterhalb der Frequenzkurve hängt damit bei gegebener Temperatur nur von der Federkonstanten ab und ist unabhängig von der Grenzfrequenz. Damit hängt bei einer definierten Federkonstante das Signal-zu-Rausch-Verhältnis nur von der Grenzfrequenz ω_g ab. Somit ist das Kraft-Rauschen ΔF bei vorgegebener Messbandbreite der Frequenz kleiner, wenn die Grenzfrequenz höher ist. Ein Cantilever mit einer kleineren Federkonstante ist also nicht sensitiver als einer mit einer großen Federkonstante. Die einzige Möglichkeit die Auflösung zu erhöhen ist demnach eine Verkleinerung der viskosen Dämpfungskonstante b . Da Biomoleküle allerdings häufig in wässriger Umgebung (physiologische Bedingungen) untersucht werden müssen, kann man für eine Verringerung der viskosen Dämpfung nur die Dimensionen des Cantilevers reduzieren.

2.2.5 Kinetik und Thermodynamik von Rezeptor-Ligand-Bindungen

Ein Rezeptor-Ligand-Komplex assoziiert mit einer On-Ratenkonstante (Assoziationsratenkonstante) k_{on}^0 (in $s^{-1}M^{-1}$) und dissoziiert mit einer Off-Ratenkonstante (Dissozia-

tionsratenkonstante) k_{off}^0 (in s^{-1}) nach folgenden Reaktionsgleichungen:



wobei $[R]$ und $[L]$ die Konzentrationen der freien Rezeptormoleküle und der freien Ligandmoleküle und $[RL]$ die Konzentration der Rezeptor-Ligand-Komplexe darstellt.

Der Kehrwert der Off-Ratenkonstante $\tau = \frac{1}{k_{\text{off}}^0}$ ist die mittlere Lebensdauer der Bindung.

Die Off-Ratenkonstante k_{off}^0 charakterisiert also die mittlere Lebensdauer der Rezeptor-Ligand-Bindung: Je niedriger ihr Wert ist, desto länger hält die Bindung und umgekehrt.

Auch die Affinität (Bindungsstärke) einer Rezeptor-Ligand-Bindung lässt sich mit k_{on}^0 und k_{off}^0 ausdrücken; hierzu werden die Reaktionsgeschwindigkeiten der Assoziation und der Dissoziation betrachtet:

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_{\text{on}}^0 [R][L] \quad \text{und} \quad -\frac{d[RL]}{dt} = k_{\text{off}}^0 [R][L] . \quad (16)$$

Im thermodynamischen Gleichgewicht gilt dann $k_{\text{on}}^0 [R][L] = k_{\text{off}}^0 [RL]$ und schließlich erhält man damit die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation (kurz Dissoziationskonstante)

$$K_D = \frac{[R][L]}{[RL]} = \frac{k_{\text{off}}^0}{k_{\text{on}}^0} \quad (\text{in M}) , \quad (17)$$

die ein Maß für die Affinität der Rezeptor-Ligand-Bindung ist: Je niedriger die Dissoziationskonstante ist, desto größer ist die Affinität der Rezeptor-Ligand-Bindung. Mit der Einzelmolekül-Kraftspektroskopie ist jedoch nur die Off-Ratenkonstante k_{off}^0 zugänglich. Allerdings wird die Affinität einer Rezeptor-Ligand-Bindung durch die Off-

Ratenkonstante k_{off}^0 dominiert, wohingegen die On-Ratenkonstanten k_{on}^0 weniger stark variieren [5, 39]. Nimmt man eine diffusionskontrollierte Assoziation einer Rezeptor-Ligand-Bindung mit einer typischen On-Ratenkonstante von $k_{\text{on}}^0 = 10^5 M^{-1} s^{-1}$ [39] an, so kann man letztlich die Dissoziationskonstante K_D abschätzen.

Mit der Dissoziationskonstanten K_D lässt sich die Energiedifferenz von Anfangs- und Endzustand der Rezeptor-Ligand-Reaktion ermitteln. Da biologische Reaktionen bei einer konstanten Temperatur und einem konstantem Druck ablaufen, benutzt man zur Beschreibung von Reaktions-Energien hier die freie Enthalpie $G(T, p)$ (T ist die absolute Temperatur und p der Druck (in bar)). In welche Richtung eine Rezeptor-Ligand-Reaktion abläuft, wird somit durch die Differenz ΔG ausgedrückt:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad , \quad (18)$$

wobei ΔH die Differenz der Enthalpien und ΔS die Differenz der Entropien von Anfangs- und Endzustand sind. Mit der freien Standardenthalpie¹⁰ ΔG^0 gilt dann

$$\Delta G = \Delta G^0 - RT \ln K_D \quad , \quad (19)$$

mit der universellen Gaskonstanten¹¹ $R = 8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. Im thermodynamischen Gleichgewicht ($\Delta G = 0$) wird somit die freie Standard-Enthalpie durch die Dissoziationskonstante definiert:

$$\Delta G^0 = RT \ln K_D \quad . \quad (20)$$

¹⁰($T = 1K$, $p = 1\text{bar}$, pH-Wert = 7 und Anfangskonzentrationen der Rezeptor- und Ligandmoleküle von 1M)

¹¹ $R = N_A k_B$, wobei N_A die Avogadro-Konstante und k_B die Boltzmann-Konstante sind.

Für Rezeptor-Ligand-Reaktionen ist $\Delta G^0 < 0$, d.h. die Assoziation läuft spontan ab und für die Dissoziation muß Energie zugeführt werden. Die Dissoziation kann nach Van't Hoff und Arrhenius [40] als das thermisch aktivierte Überwinden einer endlich hohen Potentialbarriere betrachtet werden, deren Höhe ΔG^\ddagger die Off-Ratenkonstante festlegt:

$$k_{\text{off}}^0(T) = \omega_0 \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{k_B T}\right), \quad (21)$$

wobei ω_0 der Frequenzfaktor (auch Präexponentialfaktor genannt) ist, den erst Kramers genau berechnen konnte [41]. Übertragen auf Rezeptor-Ligand-Komplexe heißt das:

Je nach Stärke der Rezeptor-Ligand-Bindung (ΔG^\ddagger) und je nach Temperatur hat man also eine endliche Anzahl an Rezeptor-Ligand-Komplexen, die pro Sekunde thermisch aktiviert dissoziieren. Welchen Einfluss nun eine äußere Kraft auf die Off-Ratenkonstante k_{off}^0 hat, soll im folgenden Abschnitt erläutert werden.

2.2.6 Die Theorie von Bell, Evans und Ritchie

Für die theoretische Beschreibung und Analyse von Rezeptor-Ligand-Dissoziationsprozessen unter dem Einfluss einer äußeren Kraft waren zwei Erkenntnisse fundamental:

1. Legt man eine äußere Kraft an einen Rezeptor-Ligand-Komplex an, wird die Potentialbarriere zwischen gebundenem und dissoziiertem Zustand abgesenkt [42].
2. Die Stärke einer Rezeptor-Ligand-Bindung hängt von der zeitlichen Entwicklung der äußeren Kraft ab und unterliegt einer Verteilung [4].

Die äußere Kraft durch den Cantilever kann in der harmonischen Näherung durch das Potential

$$V(x, t) = \frac{1}{2} k_{\text{eff}} (x - vt)^2, \quad (22)$$

beschrieben werden, wobei k_{eff} die effektive Federkonstante¹², x die Reaktionskoordinate¹³ und v die Rückzieh-Geschwindigkeit des Cantilevers sind.

Beschränkt man sich auf kleine Werte für k_{eff} , was auf die meisten realistischen Kraftspektroskopieexperimente¹⁴ zutrifft, so kann man $V(x, t)$ als annähernd linear betrachten (Abbildung 6)[43]. Kleine Federkonstante meint hier, dass diese klein gegen die typischen Krümmungen bzw. Strukturen in der zu untersuchenden Energielandschaft ist. Somit wird die freie Reaktions-Enthalpie $G(x)$ zu $G(x) + V(x, t)$ und damit zeitabhängig. Damit wird auch die Höhe der Potentialbarriere ΔG^\ddagger und die Off-Ratenkonstante k_{off}^0 zeitabhängig. Je länger die äußere Kraft wirkt, desto kleiner wird also die Potentialbarriere. Die Dissoziation des Rezeptor-Ligand-Komplexes setzt ein, wenn die Höhe der Potentialbarriere soweit abgesenkt ist, dass sie thermisch aktiviert Überwunden werden kann. Dies erfolgt auf einer Zeitskala von $\tau = \Delta G^\ddagger / (k_{\text{eff}} v x_\beta)$, die durch die sogenannte Belastungsrate $r := \dot{f}(t) = k_{\text{eff}} v$ (engl.: loading rate) festgelegt wird:

$$\Delta G^\ddagger(t) = \Delta G^\ddagger - r t x_\beta = \Delta G^\ddagger(t) = \Delta G^\ddagger - f(t) x_\beta \quad , \quad (23)$$

wobei x_β die Reaktionslänge, d.h. der Abstand zwischen dem Minimum des gebundenen Zustands und dem Maximum der Potentialbarriere auf Reaktionskoordinate (Abbildung 6) und $f(t)$ die äußere Kraft ist.

Mit (23) wird auch die Off-Ratenkonstante k_{off}^0 zeitabhängig¹⁵:

$$k_{\text{off}}(t) = \omega_0 \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger - r t x_\beta}{k_B T}\right) \quad . \quad (24)$$

¹²Die effektive Federkonstante setzt sich aus der Federkonstanten des Cantilevers, der Elastizitätskonstanten des PEG-Linkers und der Elastizität der komplexbildenden Moleküle und der eventuell vorhandenen Polymer-Linker für die Immobilisierung der Moleküle auf dem Substrat zusammen.

¹³Der gesamte Phasenraum wird hier auf die Reaktionskoordinate projiziert

¹⁴In Einzelmolekülexperimenten gilt meist der Grenzfall der kleinen effektiven Federkonstante. Auch deshalb, weil noch ein Polymer-Linker vorhanden ist, der zur effektiven Federkonstante beiträgt.

¹⁵Gilt solange $\Delta G^\ddagger - r t x_\beta > k_B T$ ist und Rückreaktionen in den gebundenen Zustand vernachlässigt werden können.

Um nun die Dissoziationskräfte von Rezeptor-Ligand-Komplexen zu analysieren, nutzt man aus, dass es zwei Zeitskalen gibt:

1. Die ultraschnelle diffusive Relaxationszeit ($t_D \approx 10^{-10} - 10^{-9} \text{s}$ [3, 44].) in das thermodynamische Gleichgewicht des gebundenen Zustands.
2. Die im Vergleich dazu extrem langsame Änderung der äußeren Kraft $f(t) = r t$ im Experiment ($\sim 10^{-4}$ bis min [44]).

Das heißt also, dass die Off-Ratenkonstante $k_{\text{off}}(t)$ nur von der instantan wirkenden äußeren Kraft abhängt. Damit hängt das Verhalten des Rezeptor-Ligand-Komplexes nur vom aktuellen Zustand ab, die vorherigen Zustände spielen keine Rolle. Mit dieser Voraussetzung lässt sich die Wahrscheinlichkeit $p_r(t)$ des Überlebens der Bindung bis zum Zeitpunkt t unter einer äußeren Kraft durch einen Markov-Prozess erster Ordnung¹⁶ ausdrücken [45]:

$$\frac{dp_r(t)}{dt} = -p_r(t) k_{\text{off}}(t) = -p_r(t) \omega_0 \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger - r t x_\beta}{k_B T}\right), \quad (25)$$

mit $p_r(t=0) = 1$.

Die Lösung von (25) ist (mit $\beta = 1/k_B T$)

$$p_r(t) = \exp\left[\frac{\omega_0}{\beta r x_\beta} e^{-\beta \Delta G^\ddagger} (1 - e^{\beta r t x_\beta})\right]. \quad (26)$$

Mit dieser Lösung erhält man eine Verteilung von Dissoziationszeiten t_D bei einer definierten Belastungsrate r

¹⁶Sobald $f(t) > k_B T/x_\beta$ gilt, nimmt die Off-Ratenkonstante $k_{\text{off}}(t)$ sehr schnell zu. Außerdem entfernen sich Rezeptor und Ligand nach der Dissoziation schneller voneinander, als sie durch Diffusion erneut assoziieren können, so dass die On-Ratenkonstante k_{on}^0 sehr schnell Null wird.

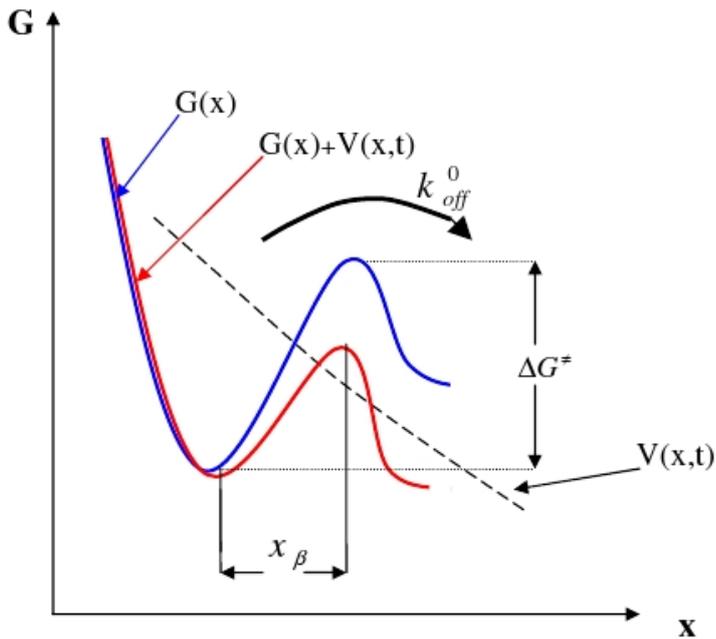


Abbildung 6: Ein zeitabhängiges Potential $V(x,t)$ beschreibt die äußere Kraft, die durch den Cantilever ausgeübt wird. Dadurch verkleinert sich die Höhe der Potentialbarriere.

$$-\left. \frac{dp_r(t)}{dt} \right|_{t_D} dt_D = \omega_0 e^{-\beta(\Delta G^\ddagger - r t_D x_\beta)} \exp \left[\frac{\omega_0}{\beta r x_\beta} e^{-\beta \Delta G^\ddagger} (1 - e^{\beta r t_D x_\beta}) \right] dt_D \quad (27)$$

und entsprechend eine Verteilung von Dissoziationskräften $F_D = r t_D$

$$-\left. \frac{dP_r(f(t))}{df} \right|_{F_D} dF_D = \omega_0 e^{-\beta(\Delta G^\ddagger - r F_D x_\beta)} \exp \left[\frac{\omega_0}{\beta r x_\beta} e^{-\beta \Delta G^\ddagger} (1 - e^{\beta r F_D x_\beta}) \right] dF_D \quad (28)$$

Aus dem Maximum dieser Verteilung erhält man die wahrscheinlichste Dissoziationskraft

$$F_{\max}(r) = \frac{\Delta G^\ddagger}{x_\beta} + \frac{1}{\beta x_\beta} \ln \left(\frac{\beta r x_\beta}{\omega_0} \right) . \quad (29)$$

Mit (21) erhält man daraus die für die Bestimmung der Reaktionslänge x_β und der Off-Ratenkonstante k_{off}^0 grundlegende Formel

$$F_{\max}(r) = \frac{1}{\beta x_\beta} \ln \left(\frac{\beta r x_\beta}{k_{\text{off}}^0} \right) . \quad (30)$$

Dieser Zusammenhang zwischen der wahrscheinlichsten Dissoziationskraft und der Belastungsrate r ist die Grundlage der dynamischen Kraftspektroskopie (engl.: dynamic force spectroscopy, kurz DFS).

Um nun die Off-Ratenkonstante k_{off}^0 zu ermitteln, wird die Rückzieh-Geschwindigkeit v (und damit r) über mehrere Größenordnungen variiert die jeweilige Belastungsrate r gegen die jeweilige wahrscheinlichste Dissoziations-Kraft $F_{\max}(r)$ halblogarithmisch aufgetragen. Dabei ergibt sich eine lineare Abhängigkeit. Die Steigung der resultierenden Regressions-Geraden liefert dann die Reaktionslänge x_β . Aus der Extrapolation zum Wert $F_{\max}(r_0) = 0$ kann schließlich die Off-Ratenkonstante k_{off}^0 berechnet werden.

2.2.7 Die Heterogenität chemischer Bindungen

Die oben beschriebene Theorie von Bell, Evans und Ritchie wird als *Standardtheorie* für die Analyse von kraftspektroskopischen Experimenten bezeichnet. Diese Standardtheorie wurde in mehrere Richtungen erweitert und verfeinert [44][46]-[50], allerdings blieb das zugrunde liegende physikalische Bild der Dissoziationsvorgänge unverändert. Im Jahr 2003 wurde von Mykhaylo Evstigneev (Universität Bielefeld) und Peter Reimann (Universität Bielefeld) eine optimierte Theorie und daraus folgend eine optimierte Analyse der experimentell erlangten kraftspektroskopischen Daten vorgeschlagen [51]. Die wesentlichen Punkte dieses neuen Ansatzes sollen hier kurz vorgestellt werden.

Die Standardtheorie beschreibt einen Dissoziationsvorgang als thermisch aktivierten Zerfall eines metastabilen Zustands, der durch einen Markov-Prozess erster Ordnung (Gleichung (25)) charakterisiert wird. Ein weiterer Hauptbestandteil der Standardtheorie ist die Unabhängigkeit der instantan am Rezeptor-Ligand-Komplex wirkenden äußeren Kraft

$$f(t) = F(v t) \quad (31)$$

von der Rückzieh-Geschwindigkeit v . Die instantan wirkende Kraft $f(t)$ hängt damit nur von der Extension $s = v t$ aller elastischen Komponenten des Setups (Cantilever, Linker, Moleküle etc.) ab. Da sich unter realen Bedingungen alle elastischen Komponenten nahe an ihrem thermodynamischen Gleichgewichtszustand befinden (Abschnitt 2.2.6), ist $f(t)$ unabhängig von der Geschwindigkeit v , mit der diese Extension ansteigt. Einen experimentellen Beleg für die Geschwindigkeitsunabhängigkeit der Kraft-Distanz-Charakteristik $f(t)$ zeigt Abbildung 7. Desweiteren zeigt Abbildung 7, dass die Kraft-Distanz-Charakteristik $f(t)$ näherungsweise als linear angenommen werden kann. Mit dieser linearen Approximation erhält man eine Kraft-Distanz-Charakteristik der Form

$$F(s) = k_{\text{eff}} s \quad , \quad (32)$$

die für die Herleitung von $p_r(t)$ und damit F_{max} (Gleichungen (26) und (30)) bereits vorausgesetzt wurde.

Aus den Gleichungen (25) und (31) folgt für die Überlebenswahrscheinlichkeit der Bindung $P_r(f)$ bis zur äußeren Kraft f bei definierter Rückzieh-Geschwindigkeit v

$$P_r(f) = \exp \left(-\frac{1}{v} \int_{f_{\text{min}}}^f df' \frac{K_{\text{off}}(f')}{F'(F^{-1}(f'))} \right) \quad . \quad (33)$$

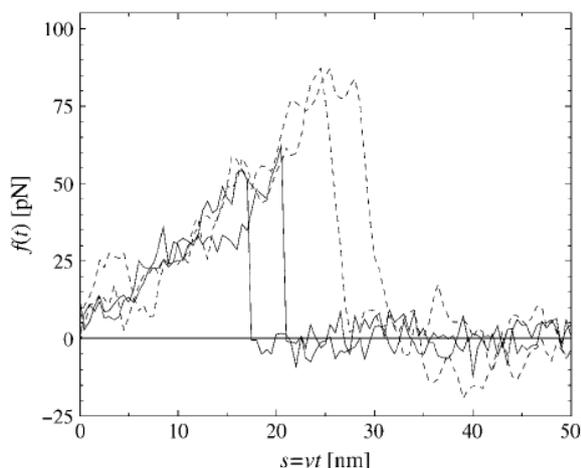


Abbildung 7: *Auschnitt aus vier verschiedenen Kraft-Distanz-Kurven mit jeweils einem Dissoziationsereignis zwischen einem expE1/E5-DNA-Fragment und einem expG-Protein. Zwei Kraft-Distanz-Kurven wurden mit einer Rückzieh-Geschwindigkeit von 100 nm/s (durchgezogene Linien) und zwei weitere mit einer Rückzieh-Geschwindigkeit von 5000 nm/s (gestrichelte Linien) aufgenommen. Vor dem Dissoziationspunkt fallen die vier $f(t)$ -Kurven (abgesehen von Rauscheinflüssen) zu einer Masterkurve zusammen. Aus [52].*

Hierbei ist $K_{\text{off}}(f) = k_{\text{off}}(t)$ und f_{min} bezeichnet die Kraft, unterhalb derer Dissoziationskräfte nicht mehr vom Krafrauschen (Abschnitt 2.2.4) unterschieden werden können. Zusätzlich wird hier angenommen, dass $F(s)$ mit zunehmender Extension der elastischen Komponenten streng monoton wächst, so dass die inverse Funktion $F^{-1}(F(s))$ existiert. Gleichung (33) impliziert, dass die Funktion $-v \ln P_r(f)$ geschwindigkeitsunabhängig ist. Wenn man folglich $-v \ln P_r(f)$ für verschiedene Rückzieh-Geschwindigkeiten gegen f plottet, müssen demnach alle Daten zu einer einzelnen *Masterkurve* zusammenfallen. Die steht jedoch im Widerspruch zu den experimentellen Resultaten [53, 52].

Aus einem Datensatz von N_v experimentell bestimmten Dissoziationskräften f_n bei einer definierten Rückzieh-Geschwindigkeit v ($n = 1, \dots, N_v, f_n > f_{\text{min}}$ für alle n) kann man einen Schätzwert $\tilde{P}_r(f)$ für die wahre Überlebenswahrscheinlichkeit der Bindung $P_r(f)$

bestimmen:

$$\tilde{P}_r(f) = \frac{1}{N_r} \sum_{n=1}^{N_r} \theta(f_n - f) , \quad (34)$$

wobei $\theta(x) := \int_{-\infty}^x dy \delta(y)$ die Heavyside-Sprungfunktion mit der Konvention $\theta(0) = \frac{1}{2}$ bezeichnet. Nach Definition gilt $\tilde{P}_r(f) \rightarrow P_r(f)$ für $N_r \rightarrow \infty$ mit einer Wahrscheinlichkeit von 1. Ohne weitere a priori Annahmen über das gegebene System ist Gleichung (34) die beste Abschätzung für $P_r(f)$ aus einem endlichen Datensatz von N_r Dissoziationskräften bei einer festen Belastungsrate r [52]. Wie in Abbildung 8 zu erkennen ist, fallen die mit einem experimentell erhaltenen Datensatz bestimmten Schätzwerte $-v \ln \tilde{P}_r(f)$ nicht zu einer Masterkurve zusammen. Daraus folgt eine Unvereinbarkeit der experimentellen Beobachtung mit Gleichung (33) und damit eine Inkompatibilität mit der Standardtheorie. Es wurden verschiedene Systeme diesbezüglich mit dynamischer Kraftspektroskopie untersucht und in allen Fällen wurde die Inkompatibilität mit der von der Standardtheorie vorhergesagten Masterkurve für die Funktionen $-v \ln P_r(f)$ bestätigt [54].

Um diese Widersprüche zu beseitigen, wird daher in der optimierten Theorie [51] eine *Heterogenität chemischer Bindungen* angenommen. Dadurch bleiben die Gleichungen (25) und (31) gültig, mit der Ausnahme, dass $K_{\text{off}}(f)$ zufälligen Variationen bei der Wiederholung der Kraft-Distanz-Zyklen unterworfen ist. Als Konsequenz hieraus folgt, dass die experimentell bestimmte Wahrscheinlichkeit $\tilde{P}_r(f)$ (Gleichung (34)) nicht mit $P_r(f)$ (Gleichung (33)) verglichen werden kann. Ein Vergleich von $\tilde{P}_r(f)$ ist nur mit dem über die (einer Wahrscheinlichkeitsverteilung unterworfenen) Off-Ratenkonstanten $K_{\text{off}}(f)$ gemittelten Wert $\bar{P}_r(f)$ sinnvoll. Eine Wahrscheinlichkeitsverteilung von $K_{\text{off}}(f)$ kann die folgenden möglichen physikalischen Ursachen haben:

- Zufällige Variationen und Fluktuationen der lokalen Umgebung (Ionen, Wasser und Lösungsmittelmoleküle) des Rezeptor-Ligand-Komplexes. Eine Veränderung der lokalen Umgebung führt zu einer Variation von Ionenstärke, pH-Wert und

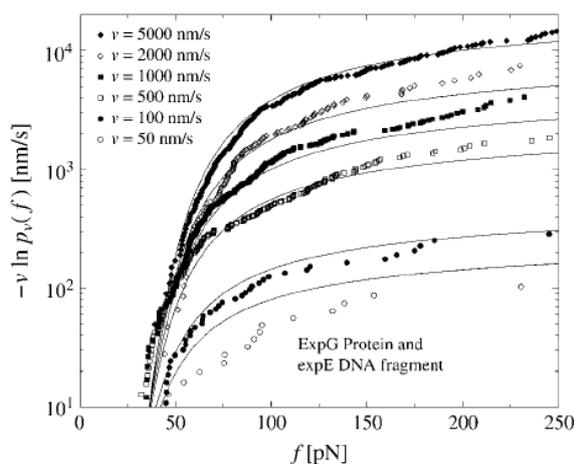


Abbildung 8: Die Funktion $-v \ln \tilde{p}_v(f) = -v \ln \tilde{P}_r(f)$ für verschiedene Rückziehgeschwindigkeiten v angewendet auf eine Verteilung von experimentell bestimmten Dissoziationskräften eines DNA-Protein-Komplexes (ExpG-Protein und die expE1-Promotorregion). Wie hier deutlich zu erkennen ist, fallen die Funktionen $-v \ln \tilde{P}_r(f)$ für verschiedene v nicht zu einer Masterkurve zusammen. Die durchgezogenen Linien wurden mit der Annahme einer Heterogenität von chemischen Bindungen theoretisch vorhergesagt. Aus [52].

elektrischen Feldern, wodurch der Dissoziationsprozess beeinflusst wird.

- Strukturelle Fluktuationen infolge thermischer Aktivierung können zu verschiedenen Konformationen des Rezeptor-Ligand-Komplexes führen.
- Der Rezeptor-Ligand-Komplex kann verschiedene Orientierungen zur Richtung der äußeren Kraft f haben. Dadurch resultieren unterschiedliche Abhängigkeiten der Off-Ratenkonstanten $K_{\text{off}}(f)$ von f .
- Verschiedene unspezifische Bindungen können in geringer, aber nicht zu vernachlässigender Anzahl die gleiche Kraft-Distanz-Charakteristik der zugehörigen Dissoziationsprozesse wie die spezifischen Bindungen besitzen. Dadurch können die unspezifischen Dissoziationsereignisse nicht von den spezifischen unterschieden werden und sind folglich im experimentellen Datensatz der Dissoziationskräfte enthalten.

Um den Einfluss der Heterogenität chemischer Bindungen zu quantifizieren, wird die Off-Ratenkonstante $K_{\text{off}}(f) = K_{\text{off}}(f; \vec{\lambda})$ von einem Satz von Parametern $\vec{\lambda}$ bestimmt. Diese Parameter sind zufällig verteilt, ausgedrückt durch die Wahrscheinlichkeitsdichte $\rho(\vec{\lambda}; \vec{\mu})$, die selbst noch von Fitparametern $\vec{\mu}$ anhängt. Die $\vec{\lambda}$ -Abhängigkeit der Off-Ratenkonstante $K_{\text{off}}(f; \vec{\lambda})$ führt zu einer Überlebenswahrscheinlichkeit der chemischen Bindung bis zur äußeren Kraft f der Form

$$P_r(f; \vec{\lambda}) = \exp \left(-\frac{1}{v} \int_{f_{\min}}^f df' \frac{K_{\text{off}}(f'; \vec{\lambda})}{F'(F^{-1}(f'))} \right) . \quad (35)$$

Gleichung (34) kann dann mit dem Mittelwert

$$\bar{P}_r(f; \vec{\mu}) = \frac{\int d\vec{\lambda} \rho(\vec{\lambda}; \vec{\mu}) P_r(f; \vec{\lambda})}{\int d\vec{\lambda} \rho(\vec{\lambda}; \vec{\mu}) P_r(f_{\min}; \vec{\lambda})} \quad (36)$$

verglichen werden. Die angenommene Heterogenität chemischer Bindungen führt schließlich zu einer *Randomisierung* der beiden Parameter k_{off}^0 und α ($\vec{\lambda} = (k_{\text{off}}^0, \alpha)$) in Gleichung (24)

$$K_{\text{off}} = k_{\text{off}}^0 \exp(\alpha f) , \quad (37)$$

wobei $\alpha = x_{\beta}/k_B T$ gilt. Eine Randomisierung von k_{off}^0 ist jedoch nicht mit den experimentellen Daten kompatibel [1]. Außerdem hat eine Randomisierung von α aufgrund der Exponentialfunktion einen größeren Einfluss als die zufällige Verteilung von k_{off}^0 , so dass man zur Vereinfachung k_{off}^0 als konstant annehmen kann. Die zugehörige Wahrscheinlichkeitsdichte lässt sich durch eine abgeschnittene Gaußfunktion

$$\rho(\alpha; \vec{\mu}) = N \exp(-(\alpha - \alpha_m)^2/2 \sigma^2) \theta(\alpha) \quad (38)$$

ausdrücken [54], wobei α_m und σ den Mittelwert und die Streuung (Dispersion) von α

approximieren und N eine Normalisierungskonstante darstellt. Ab einer bestimmten relativen Dispersion σ/α_m kann jedoch der aktuelle Mittelwert $\bar{\alpha} = \bar{\alpha}(\vec{\mu}) := \int d\alpha \alpha \rho(\alpha; \vec{\mu})$ deutlich größer als der wahrscheinlichste Wert α_m werden [52]. Unphysikalische negative Werte für α werden durch die Heavyside-Sprungfunktion $\theta(\alpha)$ ausgeschlossen. Da k_{off}^0 hier als konstant angenommen wird, wechselt dieser Parameter von dem Satz $\vec{\lambda}$ in den Satz der Fitparameter $\vec{\mu} = (k_{\text{off}}^0, \alpha_m, \sigma)$. Im Grenzfall $\sigma \rightarrow 0$ gilt $\bar{P}_r(f) \rightarrow P_r(f)$ mit $\alpha = \alpha_m$ und es bleiben noch zwei Fitparameter $\vec{\lambda} = (k_{\text{off}}^0, \alpha)$.

Bis jetzt wurden die Funktion $-v \ln \bar{P}_r(f)$ und $-v \ln \tilde{P}_r(f)$ betrachtet. Traditionell wird aber in den meisten Fällen die Verteilung der Dissoziationskräfte $-d\bar{P}_r(f)/df$ (und entsprechend $-d\tilde{P}_r(f)/df$) für die Analyse von kraftspektroskopischen Messungen verwendet (Abschnitt 2.2.6). Ein bekanntes Problem der Standardtheorie wird in Abbildung 9 deutlich: die theoretischen Fitkurven (gestrichelte Linien) und die aus experimentell erlangten Daten erstellten Histogramme der Dissoziationskräfte-Verteilungen weichen merklich von einander ab. Die Fitkurven nach der Standardtheorie wurden mit den Fitparametern k_{off}^0 und $\alpha = \alpha_m$ erstellt [52]. Die aus der optimierten Theorie hervorgehenden Fitkurven (durchgezogene Linien) mit den Fitparametern k_{off}^0 , α und σ stimmen dagegen gut mit den experimentellen Daten (Histogrammen) überein (Abbildung 9). Die wahrscheinlichste Dissoziationskraft F_{max} maximiert nach Definition die Verteilung

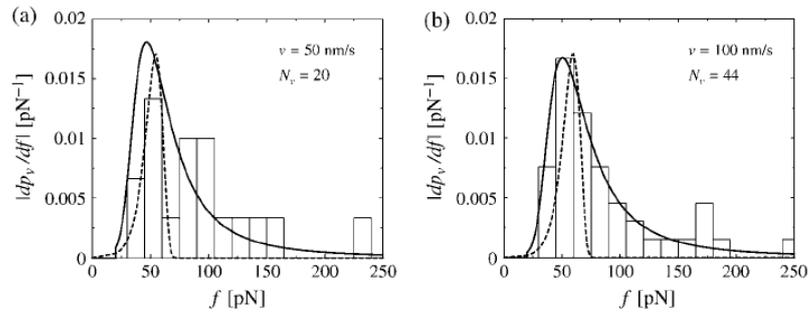


Abbildung 9: Histogramme: dieselben experimentell erlangten Dissoziationskräfte wie in Abbildung 8 für (a) $v = 50 \text{ nm/s}$ und (b) $v = 100 \text{ nm/s}$ mit $N_v = N_r$. Durchgezogene Linien: theoretische Kurven $-d\bar{p}_v(f)/df = -d\bar{P}_r(f)/df$. Aus [52].

$-d\bar{P}_r(f)/df$ innerhalb des Bereichs $f \geq f_{\min}$:

$$F_{\max} = \max\{f_{\min}, f_0\} \quad \text{mit} \quad d^2\bar{P}_r(f_0)/df^2 = 0 \quad . \quad (39)$$

Aus der Standardtheorie folgt mit Gleichung (30)

$$F_{\max} = \max\{f_{\min}, \alpha^{-1} \ln(\alpha k_{\text{eff}} v/k_{\text{off}}^0)\} \quad . \quad (40)$$

Nach der *Standardmethode* plottet man F_{\max} gegen $\ln r$ und bestimmt k_{off}^0 und α durch einen linearen Fit (Abschnitt 2.2.6). Dabei wird $F_{\max}(r)$ für jede Belastungsrate r durch einen Fit der experimentell erlangten Dissoziationskräfte-Histogramme mit der Gaußfunktion

$$y(f) = c_1 \exp(-c_2 (f - c_3)^2) + c_4 \quad (41)$$

abgeschätzt, wobei c_1, \dots, c_4 die Fitparameter sind. Die Anwendung des Gaußfits (Gleichung (41)) auf die Dissoziationskräfte-Histogramme liefert allerdings immer noch eine zufriedenstellende Approximation für k_{off}^0 und $\bar{\alpha}$, da die Abhängigkeit dieses Fits von der Dispersion σ annähernd vernachlässigbar ist [52]. Wichtig ist hier die Unterscheidung zwischen Standardmethode und Standardtheorie. Die Standardtheorie ist im Gegensatz zur Standardmethode nicht mehr zufriedenstellend.

3 Biologische Grundlagen

In diesem Abschnitt werden die für diese Arbeit relevanten Biomoleküle und biologischen Prozesse vorgestellt.

3.1 Proteine und Peptide

Proteine sind polymere Makromoleküle, die aus sogenannten proteinogenen *Aminosäuren* aufgebaut sind. Dabei werden die Aminosäuren in einer exakt vorgegebenen Reihenfolge zu einer linearen, unverzweigten Kette zusammengefügt. Es gibt 20 verschiedene proteinogene Aminosäuren, deren gemeinsames Strukturmerkmal ein zentrales C-Atom (C_α) mit vier verschiedenen Substituenten ist: eine Aminogruppe ($-NH_2$), eine Carboxylgruppe ($-COOH$), ein H-Atom und eine variable Seitenkette ($-R$). Die variable Seitenkette ist charakteristisch für jede Aminosäure und bestimmt ihre Größe, ihre Form, ihre elektrische Polarität bzw. Ladung und ihre chemische Reaktivität. Durch die unterschiedliche Polarität der Seitenketten werden Proteine in drei Kategorien eingeteilt:

1. *unpolare* Aminosäuren
2. *polare* Aminosäuren
3. *geladene* Aminosäuren.

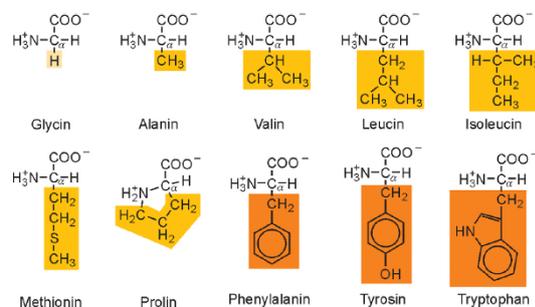


Abbildung 10: 10 proteinogene Aminosäuren haben unpolare Seitenketten. Aus [55].

Aminosäuren werden durch CO-NH-Bindungen verknüpft, sogenannte Peptidbindungen. Die Peptidbindung entsteht dabei immer zwischen der α -Carboxylgruppe der einen Aminosäure und der α -Aminogruppe der anderen Aminosäure. Eine einzelne Aminosäureeinheit ($-NH-C_\alpha HR-CO-$) in der Aminosäurekette (auch Peptidkette genannte) wird als

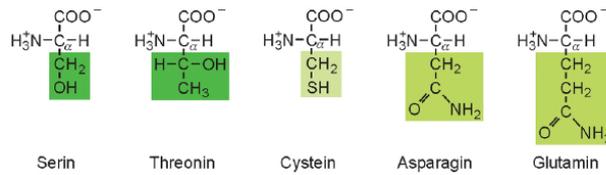


Abbildung 11: 5 proteinogene Aminosäuren haben polare Seitenketten. Aus [55].

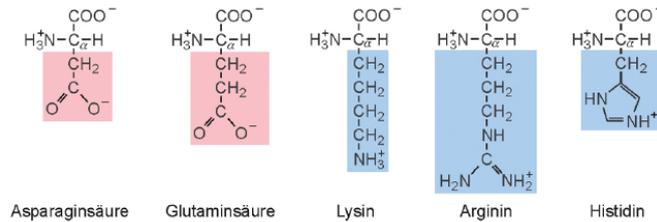


Abbildung 12: 5 proteinogene Aminosäuren haben geladene Seitenketten. Aus [55].

Aminosäurerest bezeichnet. Ein Polymer mit weniger als 50 Aminosäuren wird konventionsgemäß als *Peptid* bezeichnet, ab 50 Aminosäuren spricht man von einem Protein¹⁷. Da die α -Aminogruppen alle auf derselben Seite der C_α -Atome liegen, befindet sich an einem Ende der Peptidkette eine freie Aminogruppe (*N-Terminus*). Am anderen Ende befindet sich eine freie Carboxylgruppe (*C-Terminus*). Somit haben Proteine eine fest vorgegebene Richtung, in der die einzelnen Aminosäuren verknüpft werden: immer vom N-Terminus zum C-Terminus. Die lineare Abfolge von Aminosäuren in einem Protein wird als *Sequenz* oder *Primärstruktur* bezeichnet.

Damit ein Protein eine bestimmte Funktion ausüben kann, muss die durch die Primärstruktur definierte Peptidkette in eine dreidimensionale Anordnung gebracht werden. Als *Sekundärstruktur* bezeichnet man die räumliche Anordnung von einzelnen Abschnitten der Peptidkette. Dabei kommt es zu Wechselwirkungen zwischen in der Primärstruktur nahe beieinander liegender Aminosäuren und es bilden sich regelmäßige¹⁸ Sekundärstrukturen. Zu den regelmäßigen Sekundärstrukturen zählen die α -*Helix* und das β -*Faltblatt*. Die α -Helix ist eine spiralförmig verdrehte, stabförmige Struktur der Peptidkette, die

¹⁷Proteine können bis zu 4000 Aminosäuren enthalten [56, 55]

¹⁸Hier sind typische repetitive Elemente vorhanden.

durch *Wasserstoffbrücken* zwischen Peptidbindungen entstehen. Jedes über Wasserstoffbrücken wechselwirkende Paar von Peptidbindungen ist durch drei Aminosäurereste getrennt und die Seitenketten zeigen wie Stacheln aus der α -Helix heraus. Das β -Faltblatt ist eine planare Aneinanderreihung von sogenannten *β -Strängen*. *β -Stränge* sind vollständig gestreckte, kurze Bereiche des Peptidrückgrats¹⁹, die so nebeneinander angeordnet sind, dass sich Wasserstoffbrücken in regelmäßigen alternierenden Abständen zwischen den Peptidbindungen benachbarter Stränge bilden können. Die Seitenketten befinden sich abwechselnd ober- und unterhalb der faltblattförmigen Ebene der β -Stränge.

Zu den unregelmäßigen Sekundärstrukturelementen gehören die *Haarnadelschleife* (engl.: *turn*) und die *Schleife* (engl.: *loop*). Haarnadelschleifen sind U-förmig und bestehen aus drei bis vier Aminosäuren [56], die durch Wasserstoffbrücken zwischen dem ersten und letzten Aminosäurerest stabilisiert werden. Diese Sekundärstrukturelemente bilden enge Kurven an Proteinoberflächen. Mit diesen Kurven windet sich die Peptidkette wieder zurück ins Innere des Proteins. Im Gegensatz zu den wohldefinierten kurzen Haarnadelschleifen, sind Schleifen komplex und lang.

Um die große Zahl von Sekundärstrukturelementen in einem Protein übersichtlich darzustellen, wurde das Bändermodell entwickelt (Abbildung 13).

Viele Proteine enthalten sogenannte *Struktur motive*, die durch eine spezifische Kombination von Sekundärstrukturen definiert sind und eine charakteristische dreidimensionale Struktur bilden. Ein Beispiel dafür ist das *helix-loop-helix*-Motiv (Abschnitt 3.3.2).

Die gesamte dreidimensionale Anordnung der Peptidkette (mit all ihren Sekundärstrukturelementen) wird als *Tertiärstruktur* bezeichnet. In der Tertiärstruktur werden die Sekundärstrukturelemente überwiegend²⁰ durch nicht kovalente Bindungen zusammengefügt: Salzbrücken (ionische Bindungen), Wasserstoffbrücken und van-der-Waals-Kräfte [55]. Die Gesamttertiärstruktur eines Proteins lässt sich oft in kleinere, unabhängige Tertiärstruktureinheiten untergliedern, die man als *Domänen* bezeichnet. Domänen haben

¹⁹Eine Peptidkette ohne Seitenketten nennt man Peptidrückgrat.

²⁰Einige Proteine enthalten auch Disulfidbrücken.

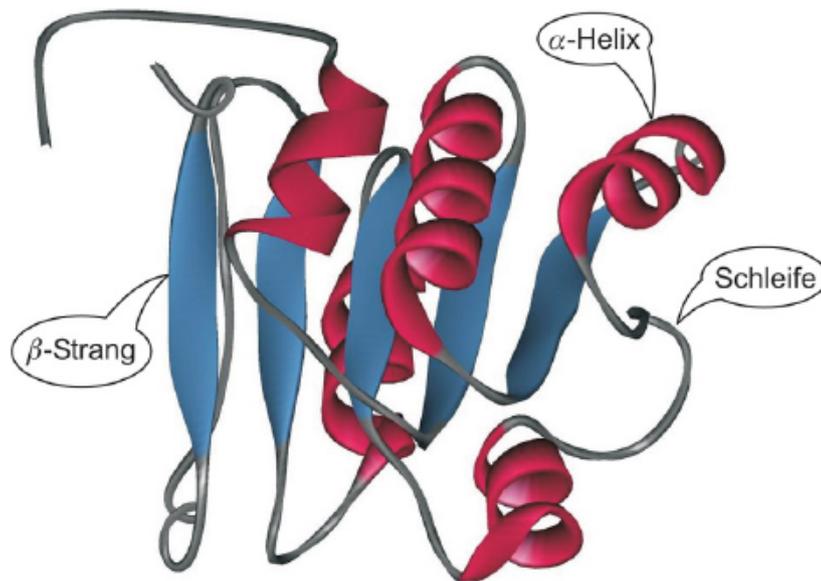


Abbildung 13: *Beispiel für das Bändermodell der Sekundärstrukturelemente. Aus [55].* Hierbei wird nur der Verlauf des Peptidrückgrats dargestellt, wobei eindeutige Symbole für α -Helices (Spirabänder) und β -Faltblätter (breite Bänder oder Pfeile) benutzt werden. Die restliche Peptidkette wird als 'Kabel' dargestellt.

oft eine bestimmte Funktion innerhalb eines Proteins, wie z.B. das Binden von anderen Molekülen [57]. Komplexe Aufgaben erfordern oft, dass sich mehrere Peptidketten zur sogenannten *Quartärstruktur* zusammenlagern. Dabei wird die Quartärstruktur durch dieselben nichtkovalenten Wechselwirkungen wie bei der Tertiärstruktur stabilisiert. Auch kovalente Disulfidbrücken können hier zusätzliche Stabilität liefern.

Aminosäuren werden häufig durch Kürzel dargestellt. Beim sogenannten *Dreibuchstabencode* gibt man in der Regel die ersten drei Buchstaben des Trivialnamens an (z.B. Ala für Alanin). Wenn lange Abfolgen von Aminosäuren angegeben werden, benutzt man den sogenannten *Einbuchstabencode* (z.B. A für Alanin).

3.1.1 Protein-Ligand-Wechselwirkungen

Eine der Hauptaufgaben der Proteine ist das spezifische Erkennen und Binden von anderen Molekülen, sogenannten *Liganden*. Die enorme Kombinationsmöglichkeit der Aminosäuren in der Peptidkette ermöglicht der Proteinoberfläche im Prinzip jede vorstellbare Form anzunehmen, die für die *molekulare Erkennung* von Liganden nötig ist. Protein und Ligand bilden dabei komplementäre Oberflächen aus, die genau ineinander passen (Schlüssel-Schloss-Prinzip). Da Proteine ihre Liganden nur vorübergehend binden sollen, sind die Wechselwirkungskräfte in den meisten Fällen²¹ relativ schwach. Die reversiblen Protein-Ligand-Bindungen werden durch Wasserstoffbrücken, van-der-Waals-Bindungen und Salzbrücken generiert [55].

3.2 DNA

Nucleinsäuren liefern als Träger der Erbinformation die Informationen für die Aminosäuresequenzen der Proteine. Sie sind langkettige Polymere und bestehen aus Nucleotidbausteinen, deren linearen Abfolge die gesamte Information für den Aufbau einer Zelle oder eines Organismus enthält. Es gibt zwei Typen von Nucleinsäuren: die *DNA* (Desoxyribonucleinsäure) und die *RNA* (Ribonucleinsäure), die jeweils aus vier verschiedenen *Nucleotiden* aufgebaut sind. Ein Nucleotid besteht aus drei Komponenten: eine *Phosphatgruppe* ist mit einem *Zuckermolekül* (Pentose²²) verknüpft, welches wiederum mit einer organischen *Base* verbunden ist. Die Pentose der DNA ist eine *Desoxyribose*, die RNA enthält eine *Ribose*. Beide Pentosen unterscheiden sich nur durch eine H-Gruppe bei der DNA anstatt der OH-Gruppe bei der RNA am zweiten C-Atom (Abbildung 15). Außerdem unterscheiden sich DNA und RNA im Basensatz. Sowohl die DNA als auch die RNA enthalten die Basen *Adenin*, *Guanin* und *Cytosin*. *Thymin* kommt nur in der DNA vor, *Uracil* dagegen nur in der RNA. Die Nucleinsäure-Basen sind heterozyklische

²¹Enzyme können ihre Liganden zwischenzeitlich kovalent binden [55].

²²Zuckermolekül mit fünf C-Atomen.

Verbindungen²³, die sich in *Purine* (Adenin und Guanin) und *Pyrimidine* (Thymin, Cytosin und Uracil) unterteilen (Abbildung 14).

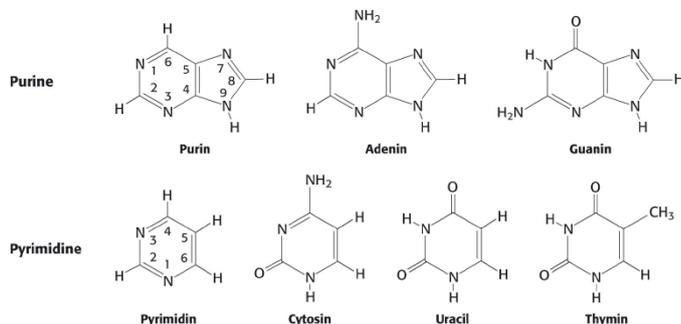


Abbildung 14: Nucleinsäure-Basen unterteilen sich in Purine und Pyrimidine. Die N- und C-Atome der Basen werden ohne Strich durchnummeriert. Aus [58].

Die vier unterschiedlichen Basen erlauben sowohl der DNA als auch der RNA eine enorme Kombinationsmöglichkeit verschiedene Nucleotide zu einem Polymer zusammenzufügen. Nucleotide haben 2 Verknüpfungsstellen, durch die sich weitere Nucleotide über sogenannte *Phosphodiesterbindungen* (Abbildung 16) kovalent binden können: das phosphorylierte 5'-Ende und die freie 3'-OH-Gruppe. Nucleinsäuren wachsen immer in 5'-3'-Richtung (Abbildung 16). Wegen dieser biologischen Syntheserichtung von Polynucleotidsequenzen gibt es die Kovention, Polynucleotidsequenzen immer von links nach rechts in der Richtung 5' → 3' zu schreiben und zu lesen. Die Zuckermoleküle der Nucleotide verändern sich nicht, die Basen allerdings schon. Deswegen wird die Sequenz der fertigen Polynucleotid-Kette im Einbuchstabencode der Basen²⁴ in 5'-3'-Richtung angegeben.

Die Sequenz der Polynucleotidkette wird analog zu Peptidketten als *Primärstruktur der Nucleinsäuren* bezeichnet. Und vergleichbar zu den Peptidketten nehmen auch Polynucleotidketten eine dreidimensionale Struktur an, die durch nichtkovalente Wechselwirkungen zusammengehalten wird. Primärstrukturen von DNA und RNA sind sich oft

²³Die Ringe der Basen enthalten N- und C-Atome.

²⁴A, G, T, C und U stehen für die einzelnen Basen, sie werden aber auch oft als Symbol für die kompletten Nucleotide benutzt.

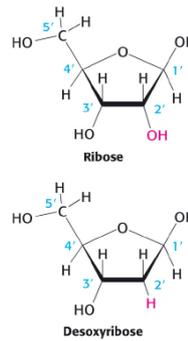


Abbildung 15: Ein RNA-Nucleotid enthält immer eine Ribose, das DNA-Nucleotid dagegen immer eine Desoxyribose. Die Ring-Atome sind durchnummeriert und zur Unterscheidung der Basen-Atome mit Strichen versehen. Aus [58].

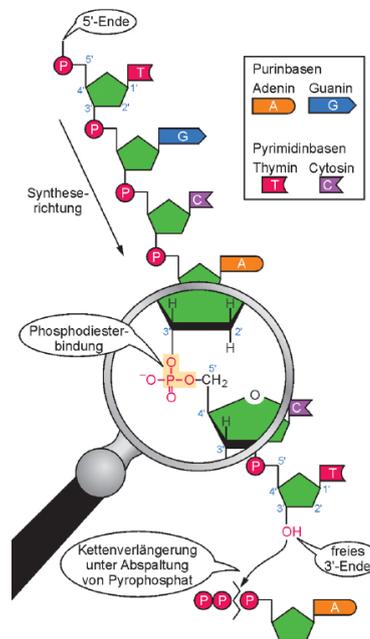


Abbildung 16: Nucleotide polymerisieren zu einer einsträngigen DNA-Sequenz. Aus [55].

sehr ähnlich, sie unterscheiden sich allerdings deutlich in ihrer Konformation [55, 56, 58]. Im Gegensatz zur RNA besteht die DNA aus zwei Polynucleotid-Strängen, die schraubenförmig umeinander gewunden sind, weshalb diese Anordnung auch als *Doppelhelix* bezeichnet wird. Zur Unterscheidung von Einzelstrang-DNA und Doppelstrang-DNA

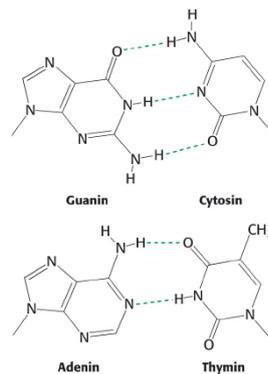


Abbildung 17: Durch Wasserstoffbrücken vermittelte Watson-Crick-Basenpaarung. Aus [58].

werden auch die Kürzel *ssDNA* (engl.: single stranded dna) und *dsDNA* (engl.: double stranded dna) benutzt. In der DNA-Doppelhelix bilden die Zucker-Phosphat-Stränge die Außenseite (DNA-Rückgrat) und die Basen sind im Inneren der Doppelhelix in parallelen Ebenen dicht übereinander gestapelt. Die beiden Polynucleotid-Stränge der dsDNA sind antiparallel zueinander angeordnet²⁵. Dabei werden die Polynucleotid-Stränge durch eine spezifische *Basenpaarung* zusammengehalten. Hierbei wechselwirkt Adenin über zwei Wasserstoffbrücken mit Thymin, wohingegen Guanin mit Cytosin drei Wasserstoffbrücken ausbildet (Abbildung 17).

Neben dieser *Basenpaarkomplementarität* erhält die DNA-Doppelhelix weitere Stabilität durch van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den eng gestapelten Basenpaaren. Die *A/T*- und *G/C*-Basenpaare bezeichnet man auch als *Watson-Crick-Basenpaare*.

Eine DNA-Helix kann in der links- oder rechtsgängigen Form vorliegen, die rechtsgängige Helix ist allerdings vorherrschend [56]. Die am häufigsten vorkommende²⁶ DNA-Struktur ist die sogenannte *B-DNA* (Abbildung 18). Die dichtgestapelten Basenpaare sind entlang der Helixachse in einem regelmäßigen Abstand von $0,34\text{ nm}$ angeordnet und eine komplette Windung hat einen helikalen Abstand von $3,4\text{ nm}$ (Abbildung 18). Auf diese

²⁵Die 5'-3'-Orientierungen verlaufen entgegengesetzt

²⁶Die B-DNA ist die stabilste Form unter physiologischen Bedingungen.

3,4 nm entfallen 10 Basenpaare [55]. Durch die Verwindung der beiden DNA-Stränge in der B-DNA-Helix bilden sich auf der Oberfläche zwei Typen von Furchen aus: eine *große Furche* (engl.: major groove) mit einer Tiefe von ca. 0,85 nm und eine *kleine Furche* (engl.: minor groove) mit einer Tiefe von ca. 0,75 nm aus (Abbildung 18) [55]. Diese Furchenbildung hat eine funktionelle Bedeutung. Ein Bereich jeder Base ist dadurch für kleine und große Moleküle zugänglich, die durch Kontakte mit in den Furchen lokalisierten chemischen Gruppen an die DNA binden. Somit wird die spezifische DNA-Bindung regulatorischer Proteine möglich (Abschnitt 3.3.2). Die B-DNA wechselt bei sehr geringen Feuchtigkeitsbedingungen in die *A-DNA*. Eine komplette Windung enthält in der A-DNA 11 Basenpaare und hat eine Länge von 2,3 nm. Im Gegensatz zur B-DNA liegen hier die gestapelten Basen leicht gekippt vor. Die *Z-DNA* hat eine linksgängige Helix und besteht aus alternierenden Purin- und Pyrimidinnucleotiden. Das Zucker-Phosphat-Rückgrat hat eine Zickzack-Form, wodurch der Name Z-DNA inspiriert ist.

Die Länge von dsDNA-Strängen wird in Basenpaaren (kurz *bp*) angegeben. Dabei entspricht ein bp dem helikalen Abstand zwischen zwei benachbarten Basenpaaren, der in der B-DNA eine Länge von 0,34 nm hat [55].

3.3 Protein-DNA-Wechselwirkungen

3.3.1 Genexpression

Ein *Gen* ist eine DNA-Sequenz, die für die Produktion eines bestimmten Proteins oder eines RNA-Moleküls²⁷ zuständig ist [56]. Die *Genexpression* bezeichnet den gesamten Prozess, bei dem die Information einer DNA-Sequenz durch die Bildung eines Proteins entschlüsselt wird. Der erste Schritt der Genexpression ist die sogenannte *Transkription*, die Umschrift der DNA-Sequenz in eine RNA-Sequenz (*messenger-RNA*, kurz *mRNA*). Die Sequenz-Information der mRNA wird dann von sogenannten *Transfer-RNAs*, kurz

²⁷Es gibt verschiedene RNA-Typen, die unterschiedliche Aufgaben in der Zelle wahrnehmen [55].

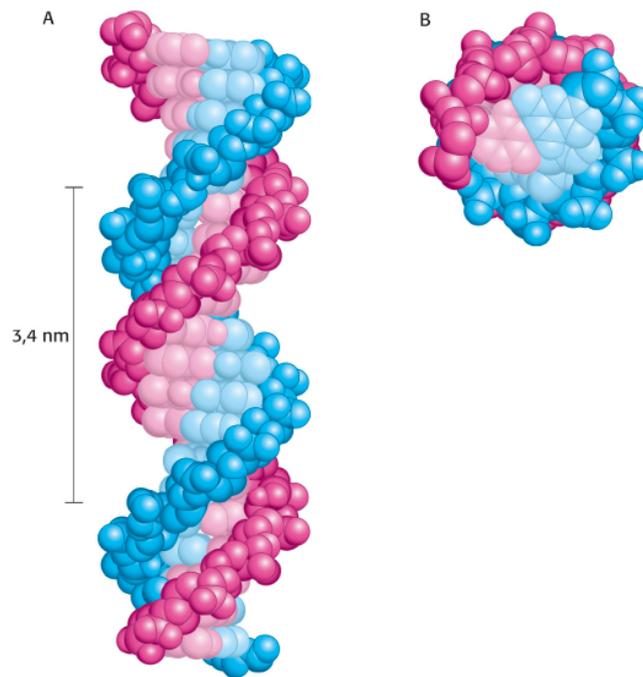


Abbildung 18: *B-DNA. Die Rückgrate der Polynucleotid-Stränge sind farbig (blau und violett) verschieden. Die Purin- und Pyrimidenbasen sind durch hellere Farben gekennzeichnet. A) Die Struktur wiederholt sich alle 3,4 nm entlang der Helix-Achse. B) Blick auf die Helix von oben. Aus [58].*

tRNA ausgelesen, die als Adaptermoleküle jeweils einem Nucleotid-Triplett²⁸ genau eine Aminosäure zuordnen. Die einzelnen Aminosäuren werden dann zu einer Peptidkette zusammengefügt.

Die Transkription wird durch die *RNA-Polymerase* realisiert, einem Enzym²⁹ das nach der Vorlage der DNA-Matrize einzelne Nucleotide zu langen Polynucleotiden verknüpft. Eukaryoten³⁰ besitzen drei Polymerasen mit verschiedenen Funktionen. Man unterscheidet drei Phasen der Transkription: *Initiation*, *Elongation* und *Termination*. Gene besitzen Erkennungssequenzen für RNA-Polymerasen (*Promotor*-Regionen) an die diese in der Initiationsphase binden.

²⁸Genetischer Code: Triplets von Nucleotiden definieren jeweils eine Aminosäure.

²⁹Enzym: Protein mit einem aktiven Zentrum. Enzyme beschleunigen chemische Reaktionen.

³⁰Eukaryoten sind groß und haben einen Zellkern, im Gegensatz zu den kleineren, kernlosen Prokaryoten.

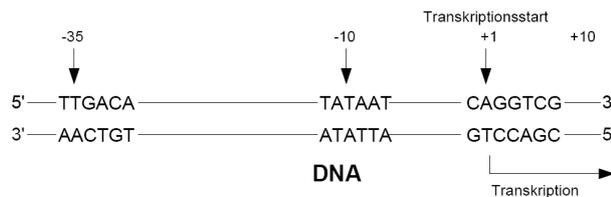


Abbildung 19: Startsignale der Transkription in Prokaryoten. Die Position +1 gibt die Startstelle der Transkription an. Die Plattform für RNA-Polymerase bilden die Positionen -40 bis +20. Die Startsignale liegen ca. 10 bzw. 35 Nucleotide stromaufwärts vom Transkriptionsstart.

In Prokaryoten sind die Startsequenzen der RNA-Polymerase oft DNA-Abschnitte aus sechs Nucleotiden wie z.B. die *TATA-Box* (TATAAT) und TTGACA (Abbildung 19). Solche Sequenzen, die in ähnlicher Weise häufig in Genen vorkommen, nennt man *Consensussequenzen*. In der Elongationsphase wandert die RNA-Polymerase die DNA in 3'-5'-Richtung entlang und synthetisiert dabei einen zur DNA-Matrize komplementären RNA-Strang immer in 5'-3'-Richtung. Die RNA-Synthese wird so lange kontinuierlich fortgeführt, bis die RNA-Polymerase auf ein Stopp-Signal trifft. Diese Terminationsphase ist bei Eukaryoten komplexer, da hier außer einem Stoppsignal noch andere Faktoren zur Termination beitragen.

3.3.2 Kontrolle der Genexpression

Zellen müssen oft die Produktion neuer Proteine an veränderte Umweltbedingungen (z.B. Nährstoffangebot) anpassen. Daher ist eine Kontrolle der Genexpression unerlässlich. Ein wichtiger Ansatzpunkt für die kontrollierte Genexpression ist die Transkription. Dabei spielen sogenannte *Transkriptionsfaktoren* eine wichtige Rolle. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die aktivierend (Aktivatoren) oder hemmend (Repressoren) auf die Transkription wirken können. Sie binden über DNA-bindende Domänen spezifisch an bestimmte DNA-Sequenzen, um die benachbarte Transkription zu beeinflussen [59]. Diese regulatorischen DNA-Abschnitte haben eine Länge von 6-20 bp [60]. Einen Einblick in die Methoden zur Identifizierung dieser DNA-Sequenzen findet man in [61]-[64].

Ein Aktivator kann den DNA so verbiegen, dass der Promotor-Bereich für die RNA-Polymerase leichter zugänglich wird, so dass die Transkription verstärkt wird. Repressoren können sich derart an die DNA binden, dass die RNA-Polymerase keinen Zugang mehr zur Promotor-Region hat. Daneben gibt es noch Repressoren, die an zwei verschiedenen Stellen stromaufwärts der Promotor-Region binden, so dass sich eine DNA-Schleife bildet, die die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor verhindert. In Eukaryoten wird im Gegensatz zu den Prokaryoten ein Proteinkomplex aus allgemeinen und spezifischen Transkriptionsfaktoren gebildet [55, 56].

Die spezifische Bindung zwischen Transkriptionsfaktoren und DNA erfolgt typischerweise durch eine α -Helix (Abschnitt 3.1), die mit der großen Furche³¹ der DNA (Abschnitt 3.2) wechselwirkt [55, 66]. Diese Helix bezeichnet man als *Erkennungshelix*. Die Geometrie der α -Helix ist dabei ideal für eine Wechselwirkung der Seitenketten mit den Basen der DNA [66]. Transkriptionsfaktoren unterteilen sich in verschiedene Familien [67, 68], die sich durch die Sekundärstrukturelemente (Abschnitt 3.1) der DNA-bindenden Domänen unterscheiden. Eine wichtige Gruppe unter den Transkriptionsfaktoren bildet jene, die über ein *helix-turn-helix*-Motiv an die DNA bindet [69]-[72]. Dieses DNA-erkennende Motiv besteht aus zwei α -Helices (bestehend aus je 7-9 Aminosäuren [55]), die durch einen β -turn von 3 bis 4 Aminosäuren verbunden sind. Beide α -Helices sind in einem Winkel von 120° angeordnet [73]. Die zweite³² α -Helix ist hierbei die Erkennungshelix, sie bindet spezifisch an eine entsprechende Erkennungssequenz in der großen Furche der DNA. Die erste α -Helix (nicht eingelagert in die große Furche) wechselwirkt dagegen unspezifisch mit der DNA und sorgt dadurch für eine Stabilisierung der Wechselwirkung zwischen der zweiten α -Helix und der DNA (Abbildung 20). Auch außerhalb des *helix-turn-helix*-Motivs gelegene Proteinregionen haben einen Anteil an der spezifischen DNA-Erkennung.

³¹Es gibt auch Transkriptionsfaktoren die mit α -Helices in der kleinen Furche binden [65].

³²Die zweite α -Helix vom N-Terminus aus betrachtet.

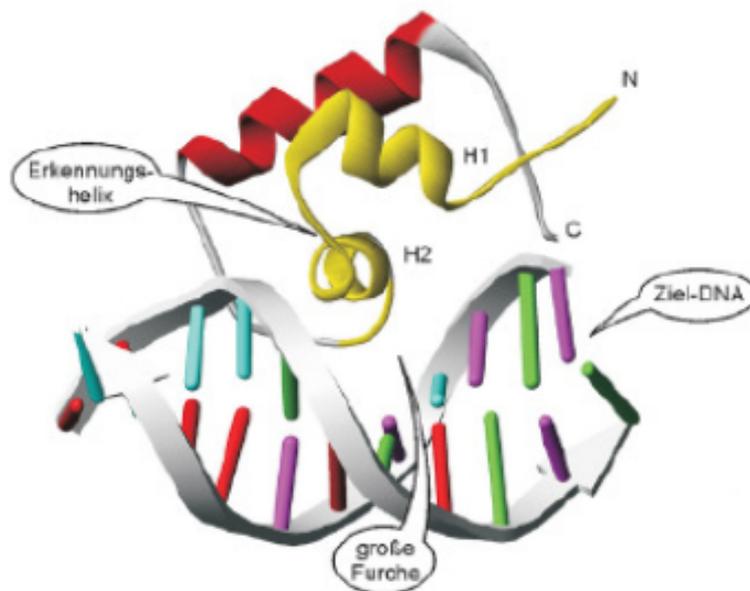


Abbildung 20: Die spezifische DNA-Erkennung des lac-Repressors als Beispiel für einen Transkriptionsfaktor mit einem helix-turn-helix-Motiv. Die Erkennungshelix H2 bindet spezifisch mit der großen Furche der DNA, während die zweite α -Helix H2 in einem 120° -Winkel über H1 angeordnet ist. Aus [55]

Es gibt aber auch helix-turn-helix-Motive, deren α -Helices durch eine Schleife (Abschnitt 3.1) aus bis zu 21 Aminosäuren verknüpft sind [74], die zusammen mit den beiden α -Helices an der DNA-Bindung teilnimmt [75]. Zur Subfamilie der helix-turn-helix-Transkriptionsfaktoren mit einer Schleife anstatt eines β -turns gehören die *winged helix-turn-helix* Proteine (kurz *winged helix*). Die winged-helix-Topologie beinhaltet drei α -Helices (H1, H2 und H3 bzw. α^1 , α^2 und α^3), drei β -Stränge (S1, S2 und S3 bzw. β^1 , β^2 und β^3) und zwei 'Flügel'³³ (engl.: wings) (W1 und W2). In der N-terminalen Hälfte des winged-helix-Motivs befinden sich die drei α -Helices und ein kurzer β -Strang (S1). Die C-terminale Hälfte enthält zwei antiparallel angeordnete β -Stränge (S2 und S3) (auch *β -hairpin* genannt) und die beiden Flügel (W1 und W2). Der Flügel W1 verbindet dabei die β -Stränge S3 und S2, während sich der Flügel W2 vom β -Strang S3 bis

³³Mit Flügel sind hier Schleifen (loops) gemeint.

zum C-Terminus der DNA-bindenden Domäne erstreckt [76]. Diese Schleifen flankieren die Erkennungshelix H3 und erinnern so an die Flügel eines Schmetterlings (Abbildung 21), wodurch auch der Name *winged helix* inspiriert ist. Die beiden Flügel W1 und W2

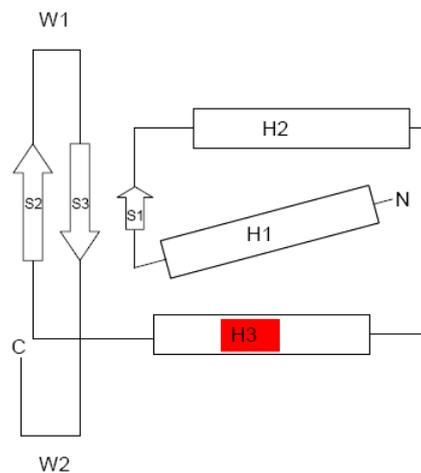


Abbildung 21: Schematische Darstellung der *winged-helix*-Topologie. Die Erkennungshelix H3 ist rot markiert.

können die DNA-Bindung durch unspezifische Wechselwirkung mit der DNA zusätzlich stabilisieren [77]. Da die α -Helices H2 und H3 in dem *winged-helix*-Motiv durch eine Schleife verbunden sind, können diese in Winkeln von 100° bis 150° relativ zu einander angeordnet sein [78, 79].

Die meisten Proteine, die über eine *helix-turn-helix*-Struktur an die DNA binden, bilden *Dimere* und haben somit ein Paar von Erkennungs-Helices [72].

3.3.3 Spezifität der Transkriptionsfaktor-DNA-Wechselwirkung

Transkriptionsfaktoren sind in der Lage, die korrekte DNA-Bindungssequenz unter einer enorm großen Anzahl von potentiellen Bindungsstellen innerhalb des Genoms³⁴ zu erkennen [80]. Diese DNA-Erkennungsstellen haben durch ihre individuellen Kombinationen von Basenpaaren eine chemische 'Signatur', die durch die Seitenketten der DNA-

³⁴Das Genom ist die Gesamtheit der genetischen Information einer Zelle oder eines Organismus [56].

bindenden Domäne erkannt werden kann [66]. Die spezifische Erkennung wird dabei durch eine zur DNA-Erkennungssequenz strukturell komplementäre Proteinoberfläche (z.B. das helix-turn-helix-Motiv, Abschnitt 3.3.2) und durch spezifische Wechselwirkungen³⁵ zwischen den Aminosäure-Seitenketten und den Basen der DNA gewährleistet [81]. Es gibt jedoch keine 1:1-Korrespondenz zwischen Aminosäuren und Basen bzw. keinen einfachen Code, der die Wechselwirkungen zwischen Seitenketten und den Basen beschreibt [82]-[84]. Allerdings kann man durch eine statistische Analyse der Verteilung von Aminosäuren, die eine Base umgeben, Präferenzen für bestimmte Aminosäure-DNA-Wechselwirkungen angeben [82, 85]. Diese Analyse zeigt, dass Purin-Basen starke Präferenzen für vier Aminosäuren (Arginin, Lysin, Glutamin und Asparagin) haben, während Pyrimidin-Basen große Variationen in ihren Aminosäure-Präferenzen aufweisen. Die *Sequenz-Spezifität* der Bindung wird hauptsächlich durch *Wasserstoffbrücken* zwischen Aminosäure-Seitenketten und DNA-Basen gewährleistet, da Wasserstoffdonor- und Wasserstoffakzeptor-Gruppen nahe und kollinear zueinander angeordnet sein müssen [66]. Eine höhere Spezifität wird erreicht, wenn eine Aminosäure-Seitenkette zwei oder

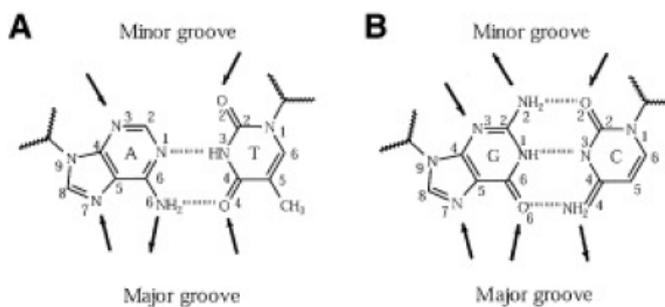


Abbildung 22: Übersicht über die möglichen Erkennungsstellen der großen Furche (major groove) und der kleinen Furche (minor groove). Die Pfeile verlaufen auf die Wasserstoffakzeptoren zu und von den Wasserstoffdonatoren weg. Das Basenpaar Adenin/Thymin hat 5 Erkennungsstellen, während das Basenpaar Guanin/Cytosin 6 Erkennungsstellen bereit stellt. Aus [86].

³⁵Die wechselwirkenden chemischen Gruppen der Aminosäuren-Seitenketten und der Basen müssen kompatibel sein.

mehr Wasserstoffbrücken mit einer Base oder einem Basenpaar ausbildet. Auch komplexere Wasserstoffbrücken zwischen einer Aminosäure und mehr als einem Basenpaar sind möglich. Dabei sind folgende Wasserstoffbrücken-ausbildende Paare von Aminosäuren und Basen besonders häufig zu finden: Arginin, Lysin, Serin und Histidin mit Guanin und Asparagin und Glutamin mit Adenin [86]. Durch Wassermoleküle vermittelte Wasserstoffbrücken spielen ebenfalls eine Rolle in der Protein-DNA-Komplexbildung, allerdings ist immer noch nicht vollständig aufgeklärt, welche Rolle diese Bindungen in der spezifischen DNA-Erkennung spielen [80, 87]. Den größten Anteil an Protein-DNA-Wechselwirkungen haben die *van-der-Waals*-Kontakte [86], die eine wichtige Rolle in der Bildung des Protein-DNA-Komplexes spielen [66]. Auch auf die spezifische DNA-Erkennung haben *van-der-Waals*-Bindungen einen Einfluss. Insbesondere *van-der-Waals*-Bindungen zwischen Aminosäure-Seitenketten und der Methyl-Gruppe (CH_3-) von Thymin sind für die Spezifität der Protein-DNA-Bindung wichtig [86].

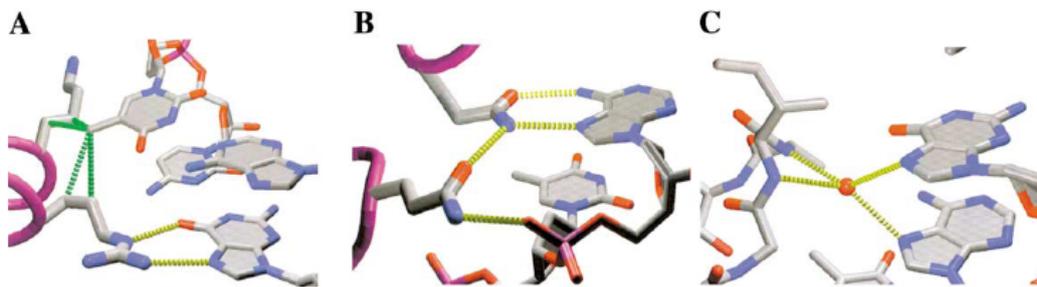


Abbildung 23: Beispiele von Protein-DNA-Kontakten. (A) Zweifache Wasserstoffbrücken zwischen einer Arginin-Seitenkette und Guanin (gelb gestrichelte Linien) und *van-der-Waals*-Kontakte zur Methyl-Gruppe von Thymin. (B) Zweifache Wasserstoffbrücken zwischen Glutamin und einer Adenin-Seitenkette im λ Repressor-DNA-Komplex. Diese Seitenkette bindet noch über eine weitere Wasserstoffbrücke an eine zweite Glutamin-Seitenkette, die mit einer Phosphatgruppe wechselwirkt. (C) Durch ein Wassermolekül vermittelte Wasserstoffbrücke im Trp Repressor-DNA-Komplex. Aus [66].

Mehr als zwei Drittel aller Typen von Protein-DNA-Kontakten besteht aus Wechselwirkungen mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA [86]. Die Bindungsstärke wird da-

bei hauptsächlich durch Salzbrücken zwischen positiv geladenen Aminosäure-Seitenketten und den negativ geladenen Phosphatgruppen und Wasserstoffbrücken mit den Phosphatgruppen bestimmt. Diese Wechselwirkungen hängen nicht direkt von der zugrunde liegenden DNA-Sequenz ab und liefern somit den Hauptbeitrag für die Stabilität des Protein-DNA-Komplexes. Auch sequenzabhängige Konformationsänderungen der DNA im Protein-DNA-Komplex tragen zur spezifischen DNA-Erkennung bei [80].

3.3.4 Der Transkriptionsfaktor PhoB

PhoB ist ein Transkriptionsfaktor (Größe: 26 kDa [88]) aus dem Bakterium *Escherichia Coli*³⁶, der den Phosphatmetabolismus regelt [89]. Dabei aktiviert PhoB die Expression von mehreren Genen (*phoA*, *phoE*, *pstS* etc.) und aktiviert so den Transport und die Aufnahme von Phosphat [88, 90, 91]. Wenn die Phosphatkonzentration in dem Kulturmedium gering wird, phosphoryliert das Transmembranprotein³⁷ *PhoR* den Aktivator PhoB [92]. Durch die Phosphorylierung ändert sich die Konformation von PhoB derart, dass sich der Transkriptionsfaktor an die sogenannte *Pho-Box* mit der Consensussequenz (Abschnitt 3.3.1) (5'-CTGTCATA(A/T)A(T/A)CTGTCA(C/T)-3')³⁸ binden kann [88]. Dadurch ändert sich die DNA-Struktur und die RNA-Polymerase (Abschnitt 3.3.1) kann mit PhoB wechselwirken und somit die Transkription starten.

PhoB besteht aus zwei Domänen³⁹, einer N-terminalen regulatorischen Phosphorylierungs-Domäne PhoB(1-127) und einer C-terminalen DNA-bindenden Domäne PhoB(128-229) [92, 94, 95]. Die DNA-bindende Domäne gehört zu den *winged helix-turn-helix*-Proteinen (Abschnitt 3.3.2) [96] und besteht aus 7 β -Strängen und 3 α -Helices (Reihenfolge: $\beta^1 \beta^2 \beta^3 \beta^4 \alpha^1 \beta^5 \alpha^2 \alpha^3 \beta^6 \beta^7$ [93]). In jedem PhoB-DNA-Komplex bindet die Erkennungshelix α^3 (Aminosäurereste 192-206) spezifisch an die TGTCA-Sequenz in der großen Fur-

³⁶Escherichia Coli ist ein Darmbakterium von Säugern [55].

³⁷Transmembranproteine durchqueren sowohl die Innen- als auch die Außenseite der Zellmembran.

³⁸(T/A) bedeutet T oder A etc..

³⁹Die regulatorische Domäne ist mit der DNA-bindenden Domäne über einen 6 Aminosäurereste umfassenden Linker (bzw. Schleife) verbunden [93].

che der Pho-box-DNA. Die Schleife, die die Erkennungshelix α^3 mit der Stabilisierungshelix α^2 (Aminosäurereste 176-184) verbindet, wechselwirkt dabei mit der sogenannten σ^{70} -Untereinheit [55] der RNA-Polymerase und aktiviert dadurch die Transkription [88, 93, 97]. Man bezeichnet diese Schleife deshalb auch als *transactivation loop*. Der C-terminale β -*hairpin*-turn (Aminosäurereste 219-221) bildet den *wing*, der für die Erkennung der kleinen Furche verantwortlich ist.

PhoB wechselwirkt unter Involvierung von drei α -Helices (α^1 , α^2 und α^3), des *transactivation loop* und des C-terminalen β -*hairpin* über spezifische und unspezifische Kontakte mit der großen Furche der Pho-Box-DNA (Abbildung 24). Die Helix α^1 wechselwirkt unspezifisch mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA: Pro157 bildet eine van-der-Waals-Bindung mit dem Zucker von C4 und Thr158 bindet über zwei Wasserstoffbrücken mit dem Phosphodiester zwischen C4 und T5 in der TGTCA-Sequenz. Die Helix α^2 ist parallel zur DNA-Helix-Achse angeordnet und überbrückt die große Furche durch unspezifische DNA-Rückgrat-Kontakte mit ihren beiden terminalen Aminosäureresten Arg176 und Trp184. Dabei wechselwirkt Arg176 mit dem Phosphodiester zwischen T12' und T13' und Trp184 bindet an den Phosphodiester zwischen T5 und G6. Der *transactivation loop* bildet über Glu191 eine Wasserstoffbrücke mit dem Phosphodiester zwischen T7 und G8 in der TGTCA-Sequenz aus. Die Erkennungshelix α^3 ist fast senkrecht zur DNA-Helix-Achse orientiert und sorgt für spezifische und unspezifische DNA-Kontakte: Arg193, His198, Arg200 und Arg203 wechselwirken unspezifisch über Salzbrücken mit verschiedenen Phosphodiestern im DNA-Rückgrat (Abbildung 24). Weitere unspezifische Kontakte der Helix α^3 werden durch Thr194 und Arg200 ausgebildet, die über zwei Wasserstoffbrücken mit Phosphodiestern (zwischen G6 und T7 und zwischen T16' und G17') wechselwirken.

Die spezifischen Kontakte mit der TGTCA-Sequenz beinhalten van-der-Waals-Bindungen zwischen Thr194 und Val197 mit T7. Diese van-der-Waals-Bindungen verhindern, dass

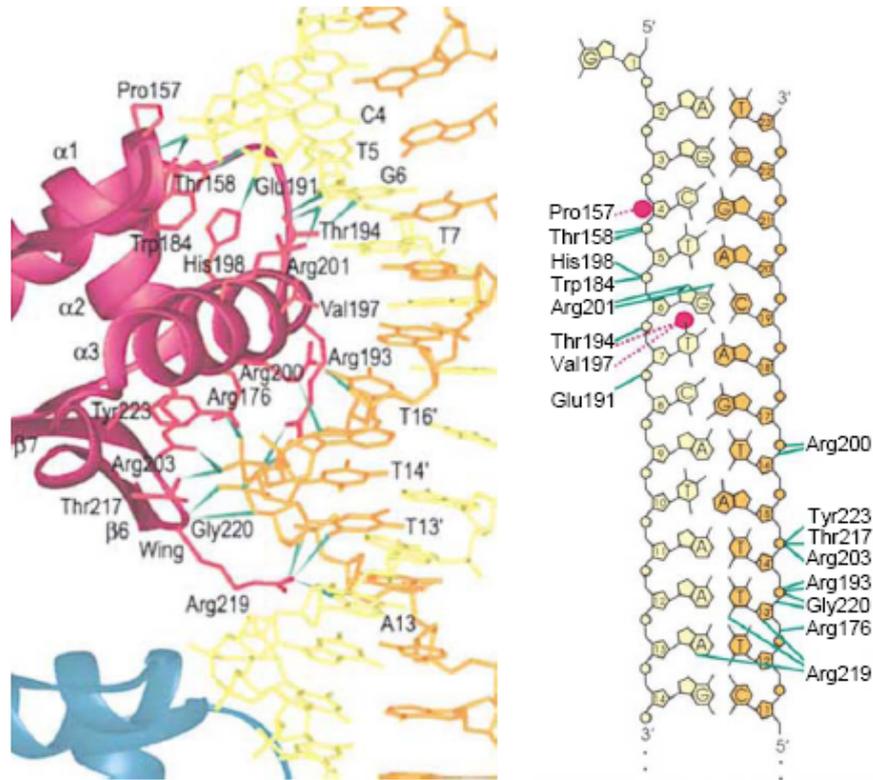


Abbildung 24: Die Kontakte zwischen PhoB und der Pho-Box-DNA im Detail. Links: Die an der DNA-Bindung von PhoB beteiligten Sekundärstrukturelemente mit den bindungsrelevanten Aminosäuren. Rechts: grüne Striche kennzeichnen Wasserstoffbrücken und Salzbrücken und rote Punkte symbolisieren van-der-Waals-Bindungen. Aus [93].

sich PhoB in einer invertierten Orientierung an die DNA bindet⁴⁰. Weitere spezifische Kontakte mit der TGTCA-Sequenz werden durch die zwei Wasserstoffbrücken zwischen Arg 201 und G6 vermittelt. Der C-terminale β -hairpin wechselwirkt unspezifisch über vier Wasserstoffbrücken mit den beiden Phosphodiestern zwischen A15' und T13', die durch Thr217, Tyr223 und Gly220 vermittelt werden. Diese Wasserstoffbrücken sorgen dafür, dass sich die im wing (β -hairpin-turn) plazierte Aminosäure Arg219 in die kleine Furche eindringen kann (24). Dadurch kann Arg219 spezifische und unspezifische

⁴⁰Die zu TGTCA komplementäre Sequenz im Gegenstrang ist ACAGT und unterscheidet sich damit nur durch A18 anstatt T7 von dieser in 5' – 3'-Richtung gelesen.

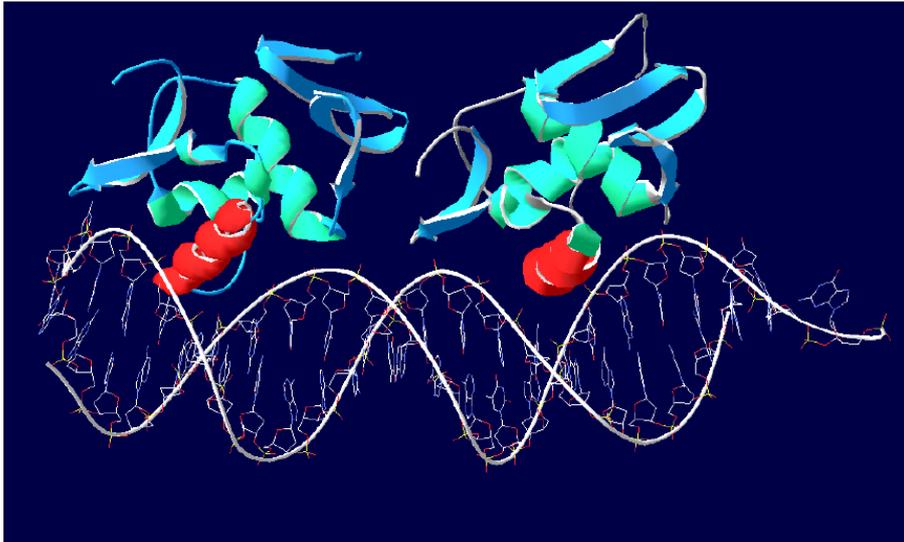


Abbildung 25: *PhoB* bindet als Dimer an die *Pho-Box-DNA*. Dargestellt sind die DNA-bindenden Domänen, die jeweils eine *TGTCA*-Sequenz erkennen. Die Erkennungshelices sind rot markiert. Aus 1GXP.pdb.

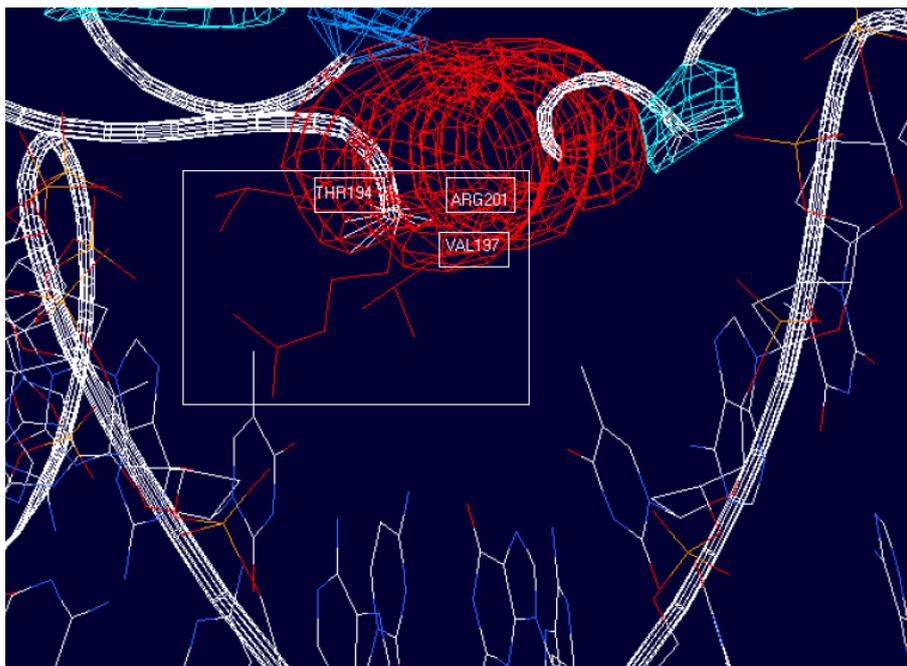


Abbildung 26: Detailansicht der spezifischen DNA-Kontakte der Erkennungshelix durch die drei Aminosäuren *Thr194*, *Val197* und *Arg201*. Aus 1GXP.pdb.

Kontakte mit der AT-reichen Region, die an die TGTCA-Sequenz angrenzt, herstellen. Arg219 bindet unspezifisch über eine Wasserstoffbrücke mit dem Zucker von T13' und spezifisch über zwei Kontakte zu den Basen von A13 und T13'.

Wird die regulatorische Domäne phosphoryliert, so bilden sich PhoB-Dimere [98] (Abbildung 25). Die C-terminale DNA-bindende Domäne von PhoB kann allerdings auch ohne die N-terminale Phosphorylierungs-Domäne an die Pho-Box binden [88] und ist sogar ein noch besserer Transkriptions-Aktivator als das gesamte PhoB-Protein [96].

4 Materialien und Methoden

In diesem Abschnitt werden die angewendeten Präparationen der Cantilever und Substrate sowie die verwendeten Materialien und Geräte vorgestellt. Außerdem werden die für die kraftspektroskopischen Messungen relevanten Parameter und die Analyse der Kraft-Distanz-Kurven dargestellt.

4.1 Rasterkraftmikroskop

Das für die Kraftspektroskopie-Messungen in dieser Arbeit verwendete Rasterkraftmikroskop ist das MFP-3D-BIOTM (*Asylum Research*, Santa Barbara, CA 93117, USA). Das Herzstück dieses Rasterkraftmikroskops ist ein Messkopf (Abbildung 27), der die Kraft-Distanz-Kurven durch einen integrierten Z-Piezo⁴¹ generiert. Der Z-Piezo im Standard MFP-3D-BIOTM-Messkopf hat eine maximale Extensionslänge von $16\ \mu\text{m}$, der in dieser Arbeit verwendete Messkopf wurde jedoch durch einen Z-Piezo mit einer maximal ausfahrbaren Distanz von $35\ \mu\text{m}$ erweitert. Die Steuerung und Aufnahme der Kraft-Distanz-Kurven sowie die Bestimmung der Federkonstanten durch die Thermal-Noise-Methode wurde mit der Standard-Software von Asylum Research (basierend auf *Igor Pro* 6.04, Wavemetrics) durchgeführt.

4.1.1 Kraftspektroskopie-Parameter

Für die Durchführung der Kraft-Distanz-Kurven sind die folgenden Parameter bedeutend :

1. *Force Distance*: die maximale Distanz, um die sich der Z-Piezo während eines Kraft-Distanz-Zyklus ausdehnt.

⁴¹Der Mess-Kopf kann auch zum Abbilden von Proben benutzt werden. Zu diesem Zweck besitzt das MFP-3D-BIOTM eine sogenannte *X-Y-Stage* [99], die die Oberfläche durch Piezos in X-Y-Richtung bewegt.

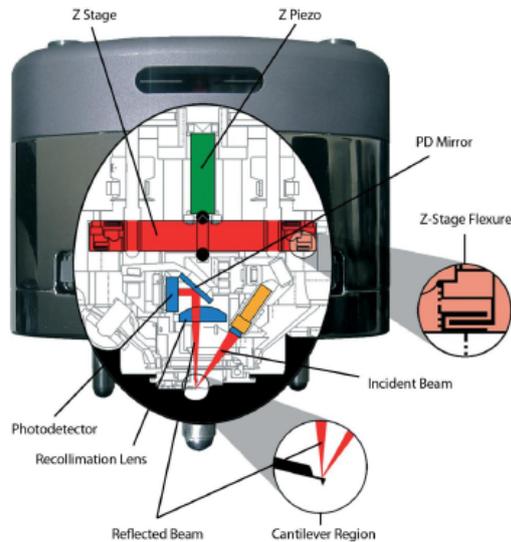


Abbildung 27: Schematischer Aufbau des MFP-3D-BIOTM-Messkopfes. Aus [99].

2. *Approach Velocity*: die Geschwindigkeit, mit der sich der Cantilever an die Probenoberfläche annähert.
3. *Retract Velocity*: die Geschwindigkeit, mit der sich der Cantilever von der Probenoberfläche entfernt.
4. *Sample Rate*: die Anzahl der aufgenommenen Datenpunkte der Rückzieh-Kurve pro Sekunde.
5. *Dwell Time*: die Verweilzeit der Cantileverspitze im Kontaktbereich.
6. *Trigger Point*: die maximale Kraft, die der Cantilever im Kontaktbereich auf die Probenoberfläche während eines Kraft-Distanz-Zyklus ausübt.
7. *Fit Width*: der Frequenzbereich, der für den Fit des thermischen Rauschspektrums verwendet wird.
8. *Maximum Samples*: die Anzahl der Frequenzdurchläufe, die für für das thermische Rauschspektrum durchgeführt werden.

Parameter	Wert
Force Distance	120 nm
Approach Velocity	3000 nm/s
Retract Velocity	85 – 8000 nm/s
Dwell Time	0 – 0,1 s
Trigger Point	400 pN
Fit Width	6 kHz
Maximum Samples	100

Tabelle 1: Die für diese Arbeit verwendeten Werte der Kraftspektroskopie-Parameter.

Der Betrag der Sample Rate wurde immer auf das Vierfache des Betrages der Retract Velocity eingestellt. Hat der Cantilever z.B. eine Rückzieh-Geschwindigkeit von 1000 nm/s, so wird die Sample Rate auf 4000 kHz eingestellt.

4.2 Kraftsensoren

Für diese Arbeit wurden zwei verschiedene Typen von Si_3N_4 -Cantilevern mit pyramidenförmigen, unbeschichteten Spitzen (ebenfalls aus Si_3N_4) benutzt: MSCT-AUHW (Veeco Instruments, Santa Barbara, CA, USA) und OMCL-TR400PSA (Olympus, Tokyo, Japan). Die OMCL-TR400PSA-Chips⁴² besitzen jeweils zwei verschieden große V-förmige Cantilever. Dagegen haben die MSCT-AUHW-Chips jeweils sechs Cantilever unterschiedlicher Größe (Cantilever A-F), fünf davon sind V-förmig und einer ist rechteckig. Für die Messungen wurden nur V-förmige Cantilever verwendet. Die Rückseiten sind sowohl bei den MSCT-AUHW-Cantilevern als auch bei den OMCL-TR400PSA-Cantilevern beschichtet (äußere Schicht: Gold, innere Schicht: Chrom).

⁴²Chip meint hier das Substrat, an dem die Cantilever montiert sind.

Hersteller	Olympus	Veeco
Federkonstante	Nominal-Wert: 20 pN/nm	Nominal-Wert: 10 pN/nm
Spitzen-Radius	Nominal-Wert: 15 nm	Nominal-Wert: 10 nm
Spitzen-Höhe	Nominal-Wert: 2,9 μm	2,5 - 3,5 μm
Dicke	Nominal-Wert: 0,8 μm	Nominal-Wert: 0,6 μm

Tabelle 2: Herstellerangaben der verwendeten Cantilever. Es wurde sowohl bei den MSCT-AUHW-Chips als auch bei den OMCL-TR400PSA-Chips jeweils der Cantilever mit der kleinsten Federkonstante für die Messungen benutzt.

4.3 Substrate

Als Substrate für die Immobilisierung der Protein-Mutanten wurden mit Gold beschichtete Borosilikat-Glasplättchen der Firma ArrandeeTM (Werther, Deutschland) verwendet. Zwischen der Goldschicht und dem Glasplättchen befindet sich noch eine Chromschicht, die für einen optimalen Halt zwischen Gold und Glas sorgt.

Dicke der Glasplättchen	0,7 \pm 0,1 mm
Dicke der Chromschicht	2,5 \pm 1,5 mm
Dicke der Goldschicht	250 \pm 50 nm
Fläche der Glasplättchen	11 x 11 \pm 0,2 mm

Tabelle 3: Herstellerangaben für die goldbeschichteten Glasplättchen.

Als Substrate für die Immobilisierung der Peptide wurde 8 x 8 mm große Deckgläser der Firma Menzel-Gläser verwendet.

4.4 Zusätzlich verwendete Geräte

Für die Präparation der Cantilever und Substrate kamen zusätzlich eine Plasmaanlage (ein Eigenbau nach [100]), ein Ultraschallbad (Elma, Modell: Transsonic Digital S) und ein Autoklav (ZIRBUS technology, Modell: Tischautoklav ZIRBUS LTA 300) zum Einsatz.

4.5 Chemikalien und Puffer

Zum Einsatz kamen folgende Chemikalien und Puffer:

Name	Hersteller
Aceton	AnalaR NOMAPUR
Ethanol	AnalaR NOMAPUR
MilliQ-Wasser	Millipore (Eschborn, Deutschland)
Schwefelsäure	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Malhex-NH-PEG-O-C ₃ H ₆ -CONHS	Rapp Polymere (Tübingen, Deutschland)
bis(Sulfosuccinimidyl)suberat-Natriumsalz	Sigma (Seelze, Deutschland)
Phosphatpuffer A	Katrin Wollschläger (Universität Bielefeld)
Phosphatpuffer B	Katrin Wollschläger (Universität Bielefeld)

Tabelle 4: Die verwendeten Chemikalien und ihre Hersteller.

Name	Bemerkungen
Aceton	p.A.
Ethanol	p.A.
MilliQ-Wasser	MilliQ-Anlage
Schwefelsäure	p.A., 65 %
Malhex-NH-PEG-O-C ₃ H ₆ -CONHS	PEG-Linker für die DNA
bis(Sulfosuccinimidyl)suberat-Natriumsalz	BS ³ -Linker für die Peptide
Phosphatpuffer A	50 mM NaCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ , pH = 7,4
Phosphatpuffer B	100 mM NaCl, 50 mM Na ₂ HPO ₄ , pH = 8,5

Tabelle 5: Bemerkungen zu den verwendeten Chemikalien.

4.6 DNA

Die verwendete DNA wurde von Katrin Wollschläger (Organische und Bioorganische Chemie, Universität Bielefeld) hergestellt. Das Verfahren für die Herstellung der DNA wird detailliert in [101, 102] beschrieben. Die DNA hat eine Länge von 360 *bp* und enthält die 268 *bp* lange Pho-Box-Sequenz des *pstS*-Promotors (Abschnitt 3.3.4).

Die *pstS*-Pho-Box enthält vier Bindungsstellen für PhoB (TGTCA, TGTCA, TTACA und TGTCA) [88].

```
CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGA
CGGCCAGTGCCAAGCTTACCGTCATCTTCGGCTACT
TTTTCTCTGTACAGAATGAAAATTTTTCTGTCATC
TCTTCGTTATTAATGTTTGTAAATGACTGAATATCA
ACGCTTATTTAAATCAGACTGAAGACTTTATCTCTC
TGTCATAAACTGTCATATTCCTTACATATAACTGT
CACCTGTTTGTCTATTTTGCTTCTCGTAGCCAACA
AACAAATGCTTTATGAATCCTCCAGGAGACATTATG
AAAGTTATGCGTACCACCGTCGAATTCGTAATCATG
GTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCT
```

Abbildung 28: Die Sequenz der verwendeten DNA. Unterstrichen: die vier PhoB-Bindungsstellen; Fett: die Consensussequenz der Pho-Box. Aus [102].

4.7 PhoB-Mutante und PhoB-Peptid

Als Bindungspartner für die DNA wurde eine Alanin-Mutante der gesamten DNA-bindenden Domäne von PhoB (PhoB(127-229)) sowie ein davon abgeleitetes Peptid verwendet. Bei der Alanin-Mutante ist Valin an Position 197 der Aminosäuresequenz (Abbildung 29) durch Alanin ausgetauscht (Mutante V197A). Das Peptid besteht aus den Aminosäuren 190 bis 220 und enthält damit die komplette Erkennungshelix α^3 und Teile des β -hairpin (PhoB(190-220)). Zusätzlich wurde PhoB(190-220) noch am C-Terminus mit einem kurzen Linker (1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan) funktionalisiert. Sowohl V197A als auch PhoB(190-220) wurden von Katrin Wollschläger (Organische und Bioorganische Chemie, Universität Bielefeld) hergestellt [102, 101].

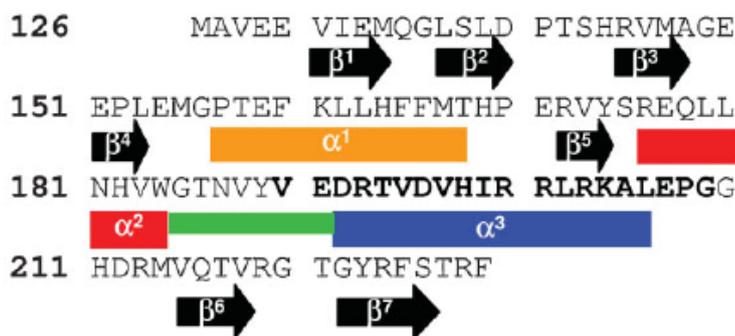


Abbildung 29: Die Aminosäuresequenz der DNA-bindenden Domäne von PhoB. Die β -Stränge sind durch Pfeile dargestellt, die α -Helices werden durch Rechtecke gekennzeichnet. Der transactivation loop ist grün markiert. Aus [102].

4.8 Präparation der Kraftsensoren

Für die Immobilisierung der DNA an die Cantileverspitze wurden die Cantilever einer chemischen Funktionalisierung wie in Abschnitt 4.8 beschrieben unterzogen. Zu diesem Zweck sind die Cantilever in dieser Arbeit verschiedenen Chemikalien für jeweils eine genau definierte Dauer ausgesetzt worden. Die Präparationschritte sind im Folgenden chronologisch aufgelistet:

1. Die Cantilever werden 20 s in Aceton getaucht.
2. Die Cantilever werden 10 s in Ethanol getaucht.
3. Die Cantilever werden 10 s in Milli-Q-Wasser getaucht.
4. Die Cantilever werden 10 min zum Trocknen auf einen Teflon-Cantilever-Halter⁴³ gelegt.
5. Die Cantilever werden 45 s in Salpetersäure getaucht.
6. Die Cantilever werden 20 s in Milli-Q-Wasser gewaschen.

⁴³Der Cantilever-Halter wurde in der M-Werkstatt der Universität Bielefeld angefertigt.

7. Die Cantilever werden 10 s in Ethanol getaucht.
8. Die Cantilever werden 5 min zum Trocknen auf einen Teflon-Cantilever-Halter gelegt.
9. Die Cantilever werden 90 min in eine Glas-Petrischale mit 10 mL trockenem Toluol und 200 μ L 3-Aminopropyltriethoxysilan gelegt.
10. Die Cantilever werden 20 s in trockenem Toluol gewaschen.
11. Die Cantilever werden 10 s in Ethanol gewaschen.
12. Die Cantilever werden 2 min in Milli-Q-Wasser getaucht.
13. Die Cantilever werden in die Vertiefungen⁴⁴ des Teflon-Halters gelegt und mit jeweils 50 μ L einer PEG-Linker-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Die PEG-Linker-Lösung besteht aus 1 mM NHS-PEG-MAL in Phosphatpuffer B.
14. Die Cantilever werden 10 s in Phosphatpuffer A gespült.
15. Die Cantilever werden in die Vertiefungen des Teflon-Halters gelegt und mit jeweils 30 μ L einer DNA-Lösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die DNA-Lösung besteht aus 4,5 nM DNA in Phosphatpuffer A.
16. Nach der Inkubation mit DNA über Nacht werden die Cantilever 10 s in Phosphatpuffer A gespült und für die Messung verwendet.

Alle für die Präparation der Cantilever benötigten Materialien (Pinzette, Glasbechergläser, Glaspetrischale und der Cantilever-Halter) wurden vor der Benutzung mit Aceton und Ethanol gereinigt. Außerdem wurden alle Pipettenspitzen und Eppendorfgefäße vor der Benutzung autoklaviert (Aufheizphase ca. 30 min, Sterilisierungsdauer 60 min und Abkühlphase ca. 30 min).

⁴⁴Die Vertiefungen haben eine Länge von 8 mm, eine Breite von 2 mm und eine Tiefe von 1,5 mm.

4.9 Immobilisierung von V197A und PhoB(190-220)

Für die Immobilisierung von V197A wurden folgende Präparationsschritte der Substrate in chronologischer Reihenfolge durchgeführt:

1. Die goldbeschichteten Glasplättchen werden in Aceton gegeben und 10 *min* einer Ultraschallbadbehandlung (Ultrasoundpower: 100 %) ausgesetzt.
2. Die goldbeschichteten Glasplättchen werden mit Aceton gespült und anschließend 10 *min* in Ethanol der Ultraschallbadbehandlung (Ultrasoundpower: 100 %) ausgesetzt. Anschließend werden sie mit Ethanol gespült, mit Stickstoff trocken geblasen und auf den Probenhalter der Plasmaanlage abgelegt.
3. Die Plasmaanlage wird für die Oxidation der goldbeschichteten Glasplättchen mit einem Sauerstoffplasma vorbereitet. Zunächst wird die Kammer der Plasmaanlage mit einer Vorvakuumpumpe abgepumpt. Ist ein Druck von $6 \cdot 10^{-1}$ *mbar* erreicht, wird eine Turbopumpe hinzugeschaltet und die Kammer auf einen Druck von $6 \cdot 10^{-3}$ *mbar* gebracht. Nun wird Sauerstoff zugeführt, bis ein Kammerdruck von $8 \cdot 10^{-2}$ *mbar* erreicht ist. Anschließend wird das Plasma durch eine Teslaspule mit einer Spannung von 50 *kV* und einer Frequenz von 500 *kHz* für 20 *s* gezündet. Nachdem durch Stickstoffzufuhr wieder Umgebungsdruck erreicht ist, werden die goldbeschichteten Glasplättchen auf dem Probenhalter in die Kammer gegeben und die gleiche Prozedur wie oben beschrieben durchgeführt. Anstatt einer Zündungsdauer von 20 werden die goldbeschichteten Glasplättchen 60 *s* dem Sauerstoffplasma ausgesetzt.
4. Die so vorbehandelten goldbeschichteten Glasplättchen werden für 30 *min* mit jeweils 100 μL einer V197A-Lösung (12 μM V197A in Phosphatpuffer A) bei 4°C inkubiert und anschließend mit Phosphatpuffer A gespült.

Die Substrate für die Immobilisierung von PhoB(190-220) wurden in folgenden chronologischen Schritten präpariert:

1. Die Glasplättchen werden auf die gleiche Weise einer Behandlung mit Aceton, Ethanol und dem Ultraschallbad ausgesetzt, wie oben für die goldbeschichteten Glasplättchen beschrieben.
2. 100 μL 3-Aminopropyltriethoxisilan werden zusammen mit den Glasplättchen in einen Exsikkator gegeben. Anschließend wird eine Vorvakuumpumpe für eine Abpumpdauer von 60 *min* aktiviert. Der erreichte Druck im Exsikkator beträgt nach dieser Abpumpdauer 0,5 *mbar*. Nach einer Wartezeit von 60 *min* wird das Belüftungsventil langsam geöffnet und die Glasplättchen werden entnommen.
3. Die Glasplättchen werden mit jeweils 50 μL einer bis(Sulfosuccinimidyl)suberat-Natriumsalz-Lösung (10 *mM* bis(Sulfosuccinimidyl)suberat-Natriumsalz in Phosphatpuffer A) für 60 *min* bei Raumtemperatur inkubiert und danach mit Phosphatpuffer A gespült.
4. Jeweils 50 μL einer PhoB(190-220)-Lösung (10 μM PhoB(190-220) in Phosphatpuffer A) wird auf die Glasplättchen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 120 *min* bei 4°C werden die Glasplättchen mit Phosphatpuffer A gespült.

4.10 Analyse der Kraft-Distanz-Kurven

Die Auswertung der gemessenen Kraft-Distanz-Kurven erfolgte mit einer auf Matlab 7.3.0 (The Mathworks, Inc.) basierenden Software, entwickelt von Lennart Ochel (Fachhochschule Bielefeld).

Der Algorithmus benötigt zunächst folgende Parameter für die Analyse einer gemessenen Kraft-Distanz-Kurve:

- Die aufgenommenen *Messpunkte* einer Kraft-Distanz-Kurve. Aus den *ibw*-Dateien der

Igor-Software wird dabei für jeden Messpunkt die LVDT-Position in m und die Cantileverauslenkung (Deflection) in m ausgelesen.

- *Spring Constant*. Aus den ibw-Dateien wird die Federkonstante in pN/nm ausgelesen.
- *Clipping*. Durch die Dwell Time des Cantilevers am Umkehrpunkt zwischen der Annäherungskurve und der Rückziehkurve entsteht eine Ansammlung von Messpunkten, da auch während der Verweilzeit des Cantilevers auf der Probenoberfläche Messpunkte aufgenommen werden. Diese Ansammlung von Messpunkten am Umkehrpunkt muss für eine weitere Analyse der Kraft-Distanz-Kurve von der Rückziehkurve abgetrennt werden. Hierzu wird eine Abtrennlänge in nm in die Softwareoberfläche eingegeben.
- *Min Abstand* und *Max Abstand*. Der minimale und der maximale Abstand (jeweils in nm) für die Untersuchung auf ein Dissoziationsereignis kann in die Softwareoberfläche eingegeben werden.

Nachdem die Werte für die obigen Parameter vorliegen, werden die Eingabedaten vorbereitet. Die Messpunkte aus den ibw-Dateien müssen zunächst auf einen Standard gebracht werden, um eine optimale Auswertung aller Kraft-Distanz-Kurven zu gewährleisten. Hierfür sind folgende Schritte nötig:

- Abschneiden der Annäherungskurve. In dieser Version der Software wird nur die Rückziehkurve benötigt.
- Das Umrechnen der Deflection und Position der Messpunkte in nm.
- Clipping. Die durch die Dwell Time entstandene Ansammlung von Messpunkten am Umkehrpunkt wird entfernt.
- Die Punktdichte der Rückziehkurve wird ermittelt (Punkte pro nm).

Als nächster Schritt wird der *Offset* zwischen der aufgenommenen Rückziehkurve und dem Deflection-Position-Koordinatensystem beseitigt. Dabei wird die Rückziehkurve von ihrem Ende ausgehend stückweise linear angefittet, bis eine signifikante Änderung der Steigung auftritt (Dissoziationsereignis, Adhäsion oder der Anfang des Kontaktbereichs). Mit den bis zur Änderung der Steigung bereits angefitteten Teilstücken wird dann die sogenannte *Baseline* berechnet und die gesamte Rückziehkurve auf die Nulllinie (x-Achse) des Koordinatensystems transformiert. Die Baseline meint hier die Linie, innerhalb der der Cantilever (abgesehen vom thermischen Rauschen) keine Auslenkung zeigt (Abbildung 30). Die Steigung im Kontaktbereich (die sogenannte *Sensor Response*) wird durch stückweises Anfitten der Rückziehkurve vom Anfang ausgehend erhalten. Das Anfitten erfolgt solange, bis sich die Steigung merklich ändert. Mit den bereits angefitteten Teilstücken wird dann (analog zur Bestimmung der Baseline) die Sensor Response berechnet. Als nächstes wird der Schnittpunkt zwischen der Sensor Response und der Baseline bestimmt. Sobald dieser Schnittpunkt (Kontaktpunkt des Cantilevers mit der Probenoberfläche) ermittelt ist, wird dieser in den Nullpunkt des Koordinatensystems verschoben. Nun wird die Deflection mit der ausgelesenen Federkonstante aus den ibw-Dateien in pN/nm umgerechnet und das *RMS-Rauschen* der Rückziehkurve bestimmt. Ist das RMS-Rauschen ermittelt, wird das minimale Signal-zu-Rausch-Verhältnis für die Akzeptanz eines möglichen Dissoziationsereignisses auf 4:1 festgelegt. Der folgende Schritt ist das Auswerten der Rückziehkurve, der sich in zwei Etappen untergliedert:

- *Dissoziationsereignis finden*: es werden alle Intervalle gesucht, innerhalb derer Messpunkte einen mindestens viermal kleineren Deflectionwert als das negative RMS-Rauschen besitzen. Dann wird untersucht, ob in den Intervallen nur ein statistischer Ausreißer eines Messpunktes oder ein Dissoziationsereignis vorliegt. Als Kriterium für ein Dissoziationsereignis wird der RMS-Wert für den Abstand zweier benachbarter Messpunkte bestimmt. Ein Intervall wird nur zugelassen, wenn es eine Mindestlänge von dem Vierfachen des RMS-Wertes besitzt.

- *Dissoziationsereigniss charakterisieren:* Innerhalb der gefundenen Intervalle wird das Teilstück der Rückziehkurve charakterisiert. Zu diesem Zweck werden die Grenzen der Intervalle, die Dissoziationskraft und die effektive Federkonstante gespeichert. Die effektive Federkonstante wird berechnet, indem das Kurventeilstück vom Anfang des Intervalls bis zum Dissoziationspunkt durch ein Polynom zweiter Ordnung ($ax + bx + c$) gefittet wird. Damit ein potentielles Dissoziationsereignis zugelassen wird, müssen zwei Voraussetzungen erfüllt sein:

1. Der Fitparameter a muss negativ sein.
2. Die Ableitung des Polynoms am Dissoziationspunkt muss negativ sein.

Die effektive Federkonstante wird dann durch die Ableitung des Fit-Polynoms am Dissoziationspunkt bestimmt.

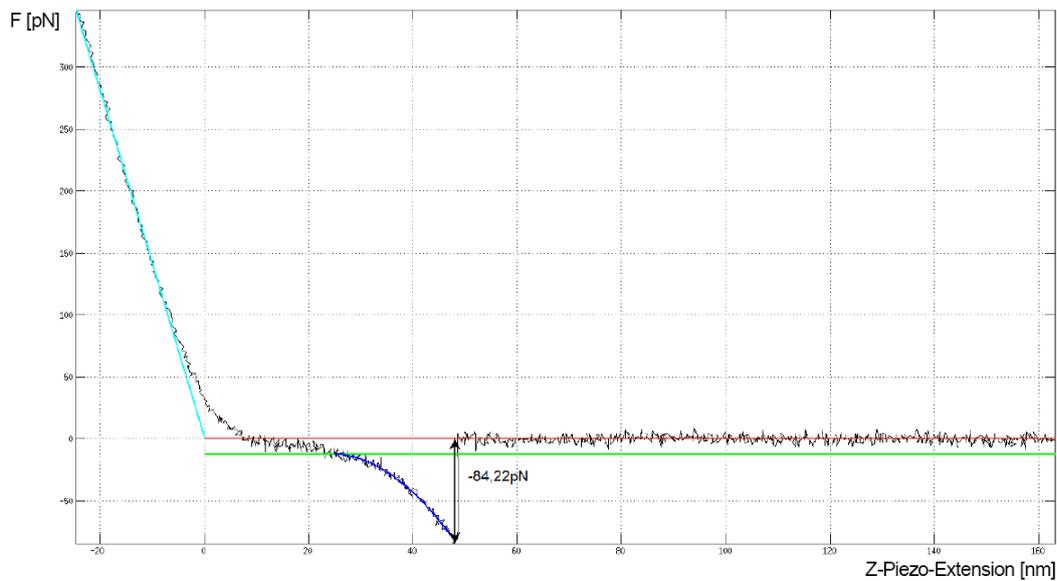


Abbildung 30: Die Analyse einer in dieser Arbeit gemessenen Kraft-Distanz-Kurve. Dargestellt sind die Softwarefits für die Sensor Response (türkise Linie), die Baseline (rote Linie), das RMS-Rauschniveau (grüne Linie) und die effektive Federkonstante (blaue Kurve).

5 Ergebnisse

Dieser Abschnitt präsentiert die in dieser Arbeit erlangten kraftspektroskopischen Daten für die Proteinmutante V197A und das Peptid PhoB(190-220).

5.1 Allgemeines

Für eine kraftspektroskopische Untersuchung von V197A und PhoB(190-220) wurde die PhoB-DNA kovalent über einen PEG-Linker mit einer mittleren molaren Masse von 3000 Da (Herstellerangabe) und einer daraus resultierenden mittleren Länge von ca. 27 nm an die Cantilverspitze immobilisiert (Abschnitte 2.2.2, 4.8). Die Verwendung eines PEG-Linkers hat dabei mehrere Vorteile. Einerseits wird durch den flexiblen PEG-Linker für eine ausreichende Bewegungsfreiheit der DNA gesorgt, so dass die Bindung mit dem Protein bzw. Peptid eingegangen werden kann. Andererseits sorgt er dafür, dass ein Dissoziationsereignis in einer räumlichen Entfernung der Cantileverspitze von der Probenoberfläche erfolgt (Abbildung 31). Somit kann das spezifische Dissoziationsereignis leichter von einer unspezifischen Adhäsion (Abschnitt 2.2.1) zwischen Cantileverspitze und der Probenoberfläche unterschieden werden. Außerdem vereinfacht der PEG-Linker die Unterscheidung zwischen Einzeldissoziationsereignissen und Mehrfachdissoziationsereignissen (Abschnitt 5.1.1).

Die Proteinmutanten V197A wurden über ihre Thiolgruppe kovalent auf dem Goldsubstrat immobilisiert. Die Immobilisierung der Peptide erfolgte über eine kovalente Bindung zwischen ihrem C-terminalen Linker und dem bis(Sulfosuccinimidyl)suberat-Natriumsalz-Linker auf dem silanisierten Glassubstrat. Durch den C-terminalen Linker wird eine gerichtete Immobilisierung von PhoB(190-220) gewährleistet und eine Physisorption und damit ein Verlust der nativen Tertiärstruktur (Denaturierung) auf der Oberfläche vermieden [5]. Alle Kraftspektroskopie-Experimente erfolgten in Standardpuffer (Phosphatpuffer A, Abschnitt 4.5) mit dem physiologischen pH-Wert von 7,4. Somit wird gewährleistet, dass die Proteine und Peptide ihre native Tertiärstruktur und

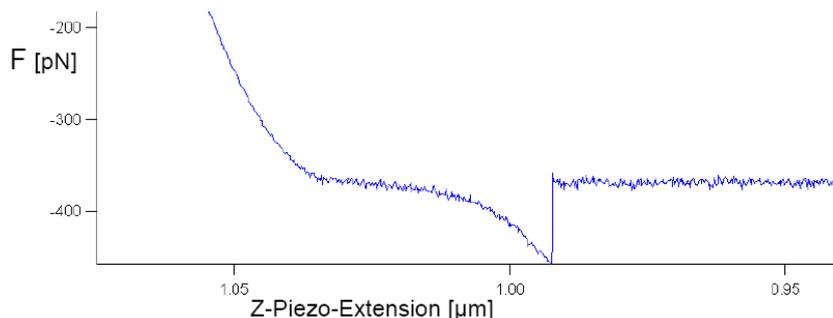


Abbildung 31: *Ausschnitt aus einer in dieser Arbeit aufgenommenen Kraft-Distanz-Kurve mit einer Rückzieh-Geschwindigkeit von 85 nm/s. Durch den PEG-Linker findet das DNA-V197A-Dissoziationsereignis in einer räumlichen Entfernung der Cantileverspitze zur Probenoberfläche statt.*

damit ihre Funktionsfähigkeit beibehalten. Für die Erstellung der Dissoziationskräfte-Histogramme wurden für V197A jeweils 20.000 bis 80.000 Kraft-Distanz-Kurven und für PhoB(190-220) jeweils 5000 Kraft-Distanz-Kurven aufgenommen. Mit den verwendeten Konzentrationen der PhoB-DNA und der Proteine und Peptide (Abschnitte 4.8, 4.9) ergab sich sowohl bei V197A als auch bei PhoB(190-220) eine durchschnittliche Bindewahrscheinlichkeit von 2 %. Die Bindewahrscheinlichkeit wird dabei durch das Verhältnis der Anzahl der Dissoziationsereignisse zur Anzahl der insgesamt aufgenommenen Kraft-Distanz-Kurven bestimmt.

5.1.1 Einzeldissoziationsereignisse vs. Mehrfachdissoziationsereignisse

Es stellt sich die Frage, ob ein beobachtetes Dissoziationsereignis nur durch einen einzelnen Rezeptor-Ligand-Komplex verursacht wird, oder ob mehrere Rezeptor-Ligand-Komplexe beteiligt sind. Die Wahrscheinlichkeit, dass mehre entstandene Komplexe aus DNA und Protein bzw. Peptid zur selben Zeit dissoziieren, ist allerdings sehr gering [1]. Dagegen beobachtet man durchaus, dass mehrerer Rezeptor-Ligand-Komplexe nacheinander dissoziieren. Solche *Mehrfachdissoziationsereignisse* entstehen dadurch, dass die an verschiedenen Positionen der Cantileverspitze gebundenen DNA-Moleküle mit jeweils

einem Protein bzw. Peptid eine Bindung eingehen. Wird der Cantilever zurückgezogen, werden die PEG-Linker nacheinander gedehnt und die Einzeldissoziationsereignisse finden jeweils bei verschiedenen Entfernungen der Cantilverspitze zur Probenoberfläche statt. Dabei können die einzelnen Dissoziationsereignisse voneinander unabhängig oder voneinander abhängig erfolgen. Zwei Dissoziationsereignisse sind dabei voneinander unabhängig, wenn der zum später stattfindenden Dissoziationsereignis gehörige PEG-Linker erst dann gedehnt wird, wenn die vorherige Bindung schon dissoziiert ist (Abbildung 32). Andernfalls beeinflussen sich die zeitlichen Entwicklungen der Kräfte $f(t)$ gegenseitig. Die Dissoziationskraft des zuerst stattfindenden Dissoziationsereignis ist durch die Dehnung des zum zweiten Dissoziationsereignis zugehörigen PEG-Linkers zu einem größeren Kraftwert verschoben. Und strenggenommen kann auch die zum später auftretenden Dissoziationsereignis gehörige Dissoziationskraft nicht in den Datensatz der Kräfte der Einzeldissoziationsereignisse aufgenommen werden, da hier die anfängliche Zeitentwicklung der Kraft durch die hinzukommende Dehnung des anderen PEG-Linkers verändert ist. Mehrfachdissoziationsereignisse kamen in dieser Arbeit allerdings nur in weniger als 0,02 % aller aufgenommenen Kraft-Distanz-Kurven vor. Die Konzentration der Rezeptoren und der Liganden ist dabei sehr wichtig, um die Anzahl der entstehenden

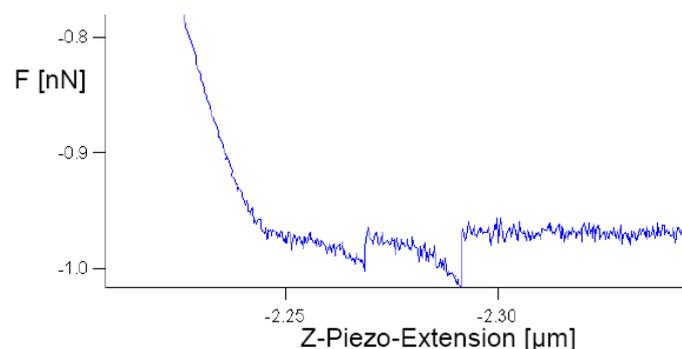


Abbildung 32: *Ausschnitt aus einer in dieser Arbeit aufgenommenen Kraft-Distanz-Kurve mit zwei nacheinander stattfindenden, voneinander unabhängigen DNA-V197A-Dissoziationsereignissen. Die Rückziehggeschwindigkeit beträgt hier 200 nm/s.*

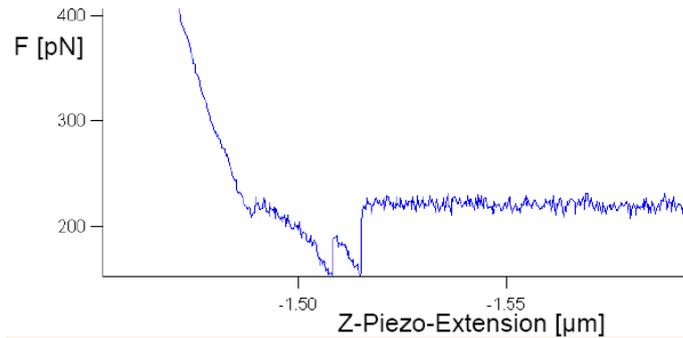


Abbildung 33: Ausschnitt aus einer in dieser Arbeit aufgenommenen Kraft-Distanz-Kurve mit zwei nacheinander stattfindenden, abhängigen DNA-V197A-Dissoziationsereignissen bei einer Rückzieh-Geschwindigkeit von 200 nm/s.

Rezeptor-Ligand-Komplexe möglichst gering zu halten. Somit bleibt auch die Häufigkeit von Mehrfachdissoziationsereignissen klein [1]. Natürlich müssen die Konzentrationen andererseits so gewählt werden, dass für eine ausreichende Bindewahrscheinlichkeit gesorgt ist.

5.2 Nachweis der spezifischen Bindungen von PhoB(190-220) und V197A

Aus der Beobachtung von Dissoziationsereignissen (wie in Abbildung 31 dargestellt) kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die V197A-Proteine und PhoB(190-220)-Peptide *spezifisch* an die TGTCA-Sequenz der Pho-Box DNA (Abschnitt 3.3.4) binden. Um die Spezifität der Bindung zu überprüfen, wurden als Kontrollexperimente in dieser Arbeit sogenannte *Kompetitionsexperimente* durchgeführt. Kompetitionsexperimente haben sich bereits in Ensemblemessungen mit biochemischen Untersuchungsmethoden etabliert. Die dieser Methode zugrunde liegende Idee ist, dass durch die Zugabe freier Bindungspartner in Lösung (Kompetitoren) die TGTCA-Sequenzen besetzt werden und somit für die immobilisierten Proteine bzw. Peptide auf der Substratoberfläche blockiert sind. Werden die TGTCA-Sequenzen blockiert, so reduziert sich die Bindewahrscheinlichkeit.

Die Überprüfung der spezifischen DNA-Bindung von PhoB(190-220) wurde mit freien V197A-Proteinen in Lösung als Kompetitoren durchgeführt. Auf die Verwendung freier PhoB(190-220)-Peptide in Lösung wurde hier verzichtet, da diese über ihren C-terminalen Linker freie Bindungsstellen auf der mit dem bis(Sulfosuccinimidyl)suberat-Natriumsalz-Linker funktionalisierten Substratoberfläche besetzen können.

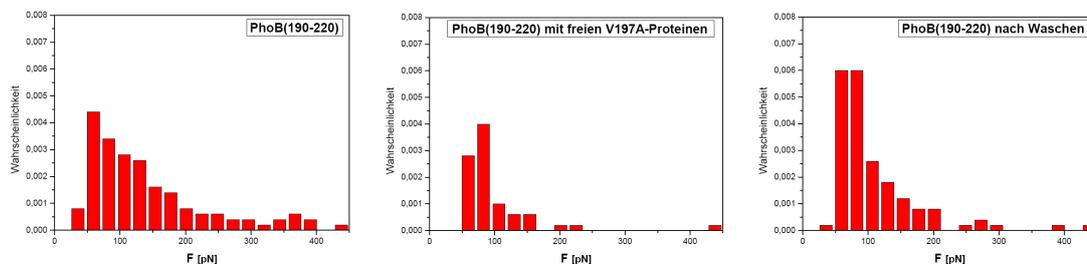


Abbildung 34: *Kompetitionsexperiment an PhoB(190-220) mit freien V197A-Proteinen als Kompetitoren. Links: in Phosphatpuffer A ohne Kompetitoren. Mitte: in Phosphatpuffer A mit freien V197A-Proteinen als Kompetitoren (Verhältnis 3,7:1 zu den immobilisierten Peptiden). Rechts: nach Waschen der Probenoberfläche mit Phosphatpuffer A.*

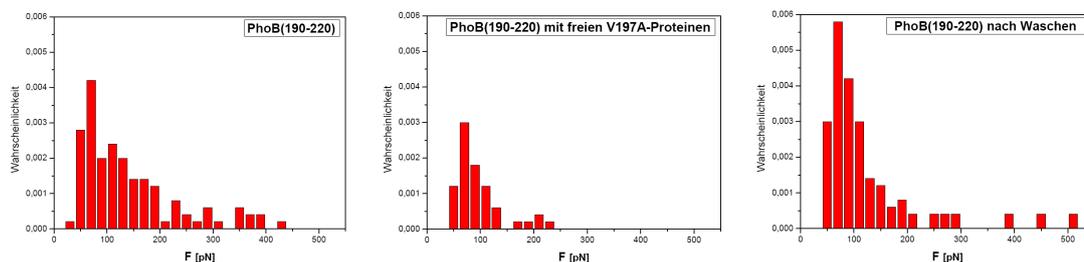


Abbildung 35: *Wiederholtes Competitionsexperiment an PhoB(190-220) mit freien V197A-Proteinen als Kompetitoren. Links: in Phosphatpuffer A ohne Kompetitoren. Mitte: in Phosphatpuffer A mit freien V197A-Proteinen als Kompetitoren (Verhältnis 3,7:1 zu den immobilisierten Peptiden). Rechts: nach Waschen der Probenoberfläche mit Phosphatpuffer A.*

Es wurden drei Serien von Kraftspektroskopieexperimenten durchgeführt, jeweils bei einer Rückzieh-Geschwindigkeit des Cantilevers von 1000 nm/s . Zunächst wurde eine Dissoziationskräfte-Verteilung unter Standardbedingungen (Phosphatpuffer A ohne Kompetitoren) und einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ der immobilisierten Peptide (Abschnitt

4.9) aufgenommen. Nach gründlichem Abwaschen der Probenoberfläche mit Phosphatpuffer A wurde eine zweite Dissoziationskräfte-Verteilung mit freien V197A-Proteinen ($37 \mu\text{M}$ V197A in Phosphatpuffer A) und demselben Cantilever⁴⁵ aufgenommen. Anschließend wurde die Probenoberfläche erneut gründlich mit Phosphatpuffer A abgewaschen und eine dritte Dissoziationskräfte-Verteilung (wiederum mit demselben Cantilever) aufgenommen. Abbildung 34 zeigt die Ergebnisse dieses Konkurrenzexperimentes. Die Zugabe freier V197A-Proteine bewirkt ein Rückgang der Bindewahrscheinlichkeit auf 41 % des Ausgangswertes. Nach dem Waschen mit Phosphatpuffer A wurde die ursprüngliche Bindewahrscheinlichkeit wieder erreicht. Um dieses Ergebnis zu stützen, wurde das Konkurrenzexperiment wiederholt (Abbildung 35). Dabei wurden die gleichen Konzentrationen für die immobilisierten PhoB(190-220)-Peptide und die freien V197A-Proteine verwendet und auch wiederum nur ein Cantilever eingesetzt. Auch in diesem Konkurrenzexperiment wurde die Bindewahrscheinlichkeit auf 41 % des Ausgangswertes verringert. Nach dem Waschen der Probenoberfläche mit Standardpuffer A konnte die Bindewahrscheinlichkeit auf den Ausgangswert reaktiviert werden. Diese Konkurrenzexperimente belegen, dass V197A TGTCA-Sequenzen der Pho-Box DNA blockiert, an die PhoB(190-220) spezifisch bindet. Anzumerken ist hier, dass lediglich ein 3,7-facher Überschuss an freien V197A-Proteinen verwendet wurde. In biochemischen Konkurrenzexperimenten führt normalerweise erst ein 50- bis 200-facher Überschuss an freien Konkurrenten dazu, dass keine Komplexbildungen mehr detektiert werden [103]. Demnach ist der Rückgang auf 41 % der Bindewahrscheinlichkeit mit einem Verhältnis an freien V197A-Proteinen zu PhoB(190-220)-Peptiden von 3,7:1 schon signifikant.

Auch für V197A wurden solche Konkurrenzexperimente durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden ebenfalls drei Serien von Kraftspektroskopieexperimenten für die Aufnahme von Dissoziationskräfte-Verteilungen bei einer Rückzieh-Geschwindigkeit des Cantilevers von

⁴⁵Nur durch die Verwendung desselben Cantilevers kann für eine gleichbleibende Bindewahrscheinlichkeit gesorgt werden, was natürlich auch für die Probenoberfläche gilt.

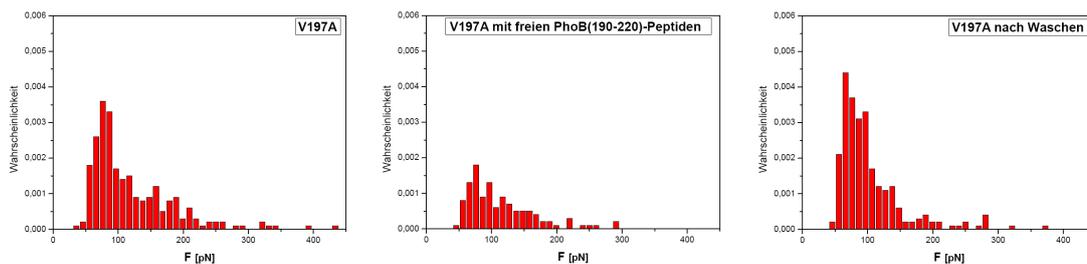


Abbildung 36: *Kompetitionsexperiment an V197A mit freien PhoB(190-220)-Peptiden als Kompetitoren. Links: in Phosphatpuffer A ohne Kompetitoren. Mitte: in Phosphatpuffer A mit freien PhoB(190-220)-Peptiden als Kompetitoren (Verhältnis 0,83:1 zu den immobilisierten V197A-Proteinen). Rechts: nach Waschen der Probenoberfläche mit Phosphatpuffer A.*

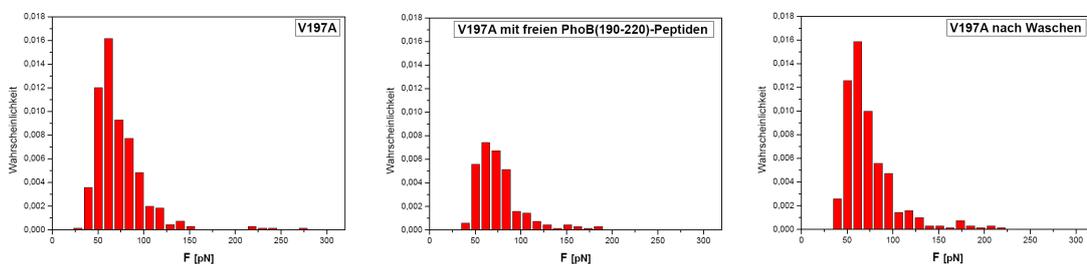


Abbildung 37: *Wiederholtes Kompetitionsexperiment an V197A mit freien PhoB(190-220)-Peptiden als Kompetitoren. Links: in Phosphatpuffer A ohne Kompetitoren. Mitte: in Phosphatpuffer A mit freien PhoB(190-220)-Peptiden als Kompetitoren (Verhältnis 0,83:1 zu den immobilisierten V197A-Proteinen). Rechts: nach Waschen der Probenoberfläche mit Phosphatpuffer A.*

1000 nm/s durchgeführt. Für die Immobilisierung von V197A wurde eine 12 μM -Lösung verwendet (Abschnitt 4.9). Es wurde auch hierbei durchgehend derselbe Cantilever verwendet. Die erste Dissoziationskräfte-Verteilung wurde unter Standardbedingungen (Phosphatpuffer A ohne Kompetitoren) aufgenommen. Nachdem gründlichen Waschen der Probenoberfläche mit Phosphatpuffer A, wurde eine zweite Verteilung von Dissoziationskräften in einer Lösung mit freien PhoB(190-220)-Peptiden (10 μM in Phosphatpuffer A) aufgenommen. Wiederum wurde die Probenoberfläche gründlich mit Phosphatpuffer A abgewaschen und eine dritte Dissoziationskräfte-Verteilung in Phosphatpuffer A

aufgenommen. Die freien PhoB(190-220)-Peptide in Lösung sorgten für eine Reduzierung der Bindewahrscheinlichkeit auf 47 % des ursprünglichen Wertes (Abbildung 36). Durch das Abwaschen der Probenoberfläche konnte die anfängliche Bindewahrscheinlichkeit auch hier wieder erreicht werden. Zur Bestätigung dieses Ergebnisses, wurde das Konkurrenzexperiment unter den gleichen Rahmenbedingungen (gleiche Rückzieh-Geschwindigkeit, durchgehende Verwendung eines Cantilevers und gleiche Konzentrationen) durchgeführt (Abbildung 37). Die Bindewahrscheinlichkeit konnte in diesem Konkurrenzexperiment auf 52 % gesenkt werden und nach Waschen der Probenoberfläche wieder auf ihr Ausgangsniveau gebracht werden. Damit wurde bestätigt, dass die Bindewahrscheinlichkeit von V197A durch die Zugabe von freien PhoB(190-220)-Peptiden mit einem Verhältnis von 0,83:1 zu den immobilisierten V197A-Proteinen auf etwa die Hälfte gesenkt wird. Da hier kein Überschuss des Kompetitors vorlag, ist dies schon eine deutliche Reduzierung der Bindewahrscheinlichkeit. Dieses Ergebnis ist somit zusammen mit dem Resultat aus den Konkurrenzexperimenten für das PhoB(190-220)-Peptid ein eindeutiger Beleg dafür, dass sowohl die Alanin-Mutante der kompletten DNA-Bindedomäne PhoB(127-229) V197A als auch PhoB(190-220) spezifisch an die TGTC A-Sequenz der Pho-Box DNA binden. Zukünftige Experimente werden zeigen, welcher Überschuss an freien Kompetitoren für einen vollständigen Verlust der Bindungsaktivität nötig sein wird.

5.3 Dynamische Kraftspektroskopie an V197A

Mit dynamischer Kraftspektroskopie (Abschnitt 2.2.6) wurde die Off-Ratenkonstante k_{off}^0 von V197A und damit auch die mittlere Lebensdauer $\tau = 1/k_{\text{off}}^0$ des V197A-DNA-Komplexes ermittelt. Dazu wurden Verteilungen von Dissoziationskräften bei verschiedenen Rückzieh-Geschwindigkeiten des Cantilevers von 85 nm/s bis 8000 nm/s aufgenommen. Durch eine Variation der Rückzieh-Geschwindigkeit erhält man unterschiedliche Werte für die Belastungsrate $r = k_{\text{eff}} \cdot v$, wobei k_{eff} die effektive Federkonstante be-

zeichnet (Abschnitt 2.2.6). Für die Bestimmung der Belastungsraten wurden jeweils der über eine Dissoziationskräfte-Verteilung gemittelte Wert der effektiven Federkonstanten verwendet. Da die Länge des PEG-Linkers einer gewissen Verteilung unterliegt [1], erhält man auch eine Verteilung von effektiven Federkonstanten bei einer definierten Federkonstante des Cantilevers. Es ergaben sich Belastungsraten von 571 pN/s bis 92632 pN/s . Der über alle Dissoziationskräfte-Verteilungen gemittelte Wert für die effektive Federkonstante beträgt 10,2 pN/nm . Für die 11 verschiedenen Rückzieh-Geschwindigkeiten wurden 11 Cantilever verwendet (jeweils ein Cantilever für die Aufnahme einer Dissoziationskräfte-Verteilung). Für die Federkonstante ergab sich ein Mittelwert von 13,9 pN/nm . Dies verdeutlicht den Beitrag des PEG-Linkers und der Moleküle zur effektiven Federkonstanten. Die Auswertung der Dissoziationskräfte-Verteilungen erfolgte nach der Standardtheorie (Abschnitt 2.2.6). Hierzu wurde das für jede Rückzieh-Geschwindigkeit erstellte Histogramm der Dissoziationskräfte durch einen Fit mit einer Gaußfunktion der Form (Gleichung (41))

$$y(f) = c_1 \exp(-c_2 (f - c_3)^2) + c_4$$

analysiert (Abbildungen 38 und 39). Dabei sind c_1, \dots, c_4 die Fitparameter. Die wahrscheinlichsten Dissoziationskräfte F_{\max} wurden dann aus den Fitparametern c_3 erhalten. In Einklang mit der aus der Standardtheorie abgeleiteten Formel (Gleichung (30))

$$F_{\max}(r) = \frac{1}{\beta x_\beta} \ln \left(\frac{\beta r x_\beta}{k_{\text{off}}^0} \right)$$

wurde eine Zunahme der wahrscheinlichsten Dissoziationskraft mit ansteigenden Werten für die Rückzieh-Geschwindigkeit v (und somit zunehmenden Werten für die Belastungsrate r) beobachtet (Abbildungen 38 und 39). Die angegebenen Fehler für die wahrscheinlichsten Dissoziationskräfte wurden aus den Standardfehlern der Mittelwerte der Gaußverteilungen für eine 95,4 %-ige Konfidenz ($2 \sigma / \sqrt{N}$) zuzüglich des jeweiligen

Fitfehler für die wahrscheinlichste Dissoziationskraft berechnet.

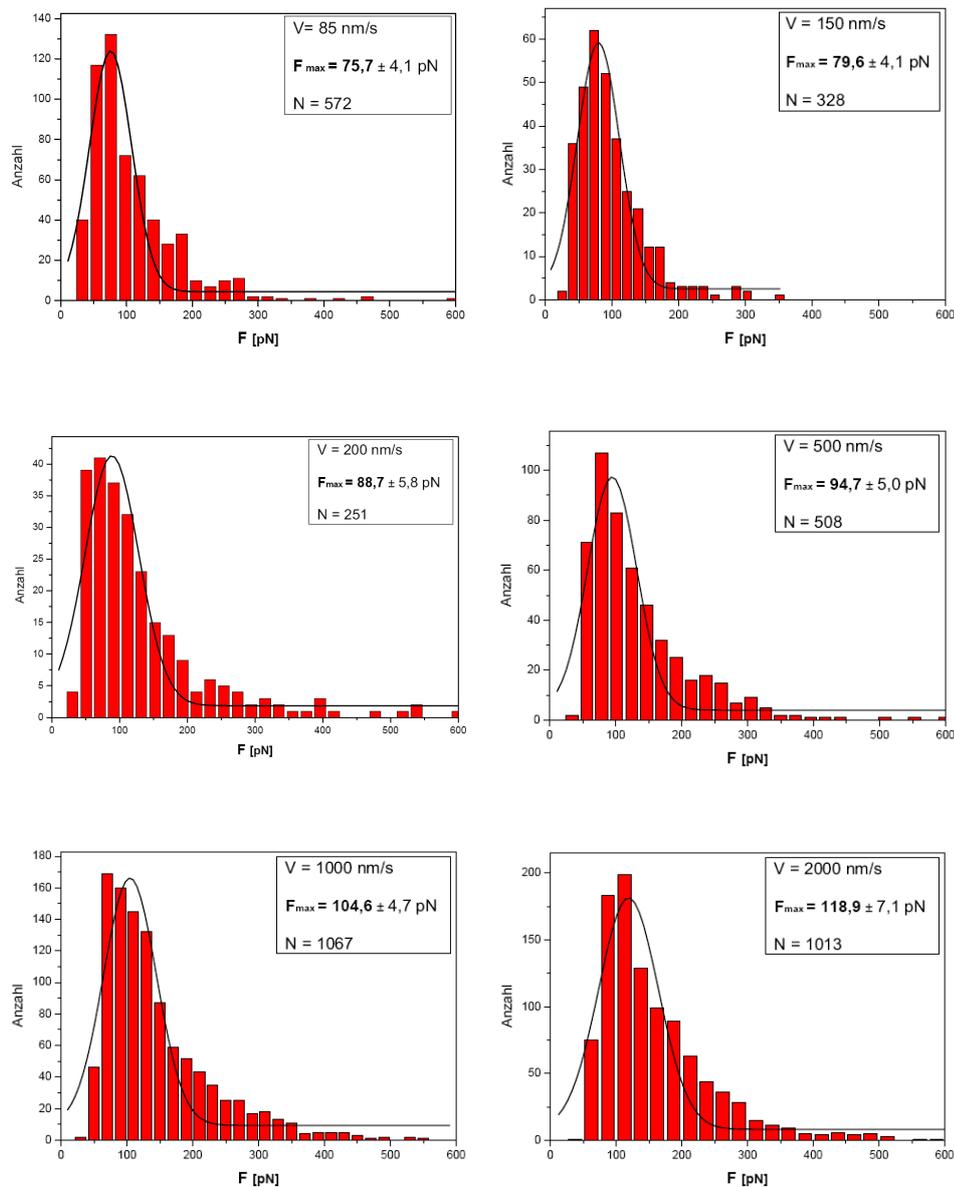


Abbildung 38: Die Dissoziationskräfte-Verteilungen für die Rückziehgeschwindigkeiten 85 nm/s und 2000 nm/s. In den Kästen ist die absolute Anzahl an aufgenommenen Dissoziationsereignissen N und die wahrscheinlichste Dissoziationskraft F_{max} angegeben.

Die erhaltenen Werte für die wahrscheinlichsten Dissoziationskräfte wurden dann halblogarithmisch gegen die Belastungsraten aufgetragen (Abbildung 40). Durch eine lineare

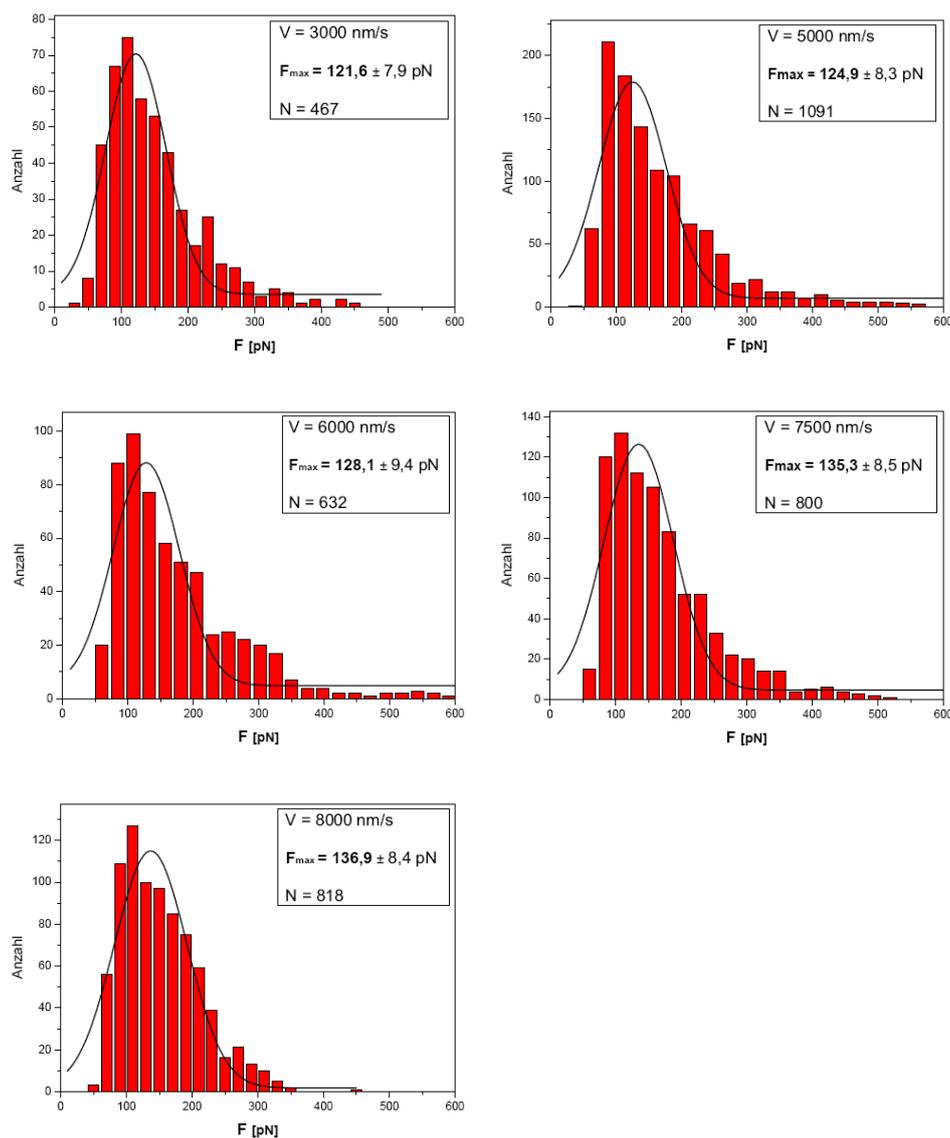


Abbildung 39: Die Dissoziationskräfte-Verteilungen für die Rückziehggeschwindigkeiten 3000 nm/s bis 8000 nm/s. In dem Kasten ist die absolute Anzahl an aufgenommenen Dissoziationsereignissen N und die wahrscheinlichste Dissoziationskraft F_{max} angegeben.

Regression der Daten wurde schließlich aus der Extrapolation zum Wert $F_{max}(r_0) = 0$ die Belastungsrate r_0 bestimmt, bei der die Änderung der äußeren Kraft so langsam erfolgt, dass der DNA-V197A-Komplex thermisch angetrieben dissoziiert, bevor die äußere Kraft die Dissoziationskraft erreicht hat. Für diese Belastungsrate ergibt sich ein Wert

von $r_0 = 1,4 \text{ pN/s}$. Aus der inversen Steigung dieser Regressionsgeraden kann dann die Reaktionslänge x_β (Abschnitt 2.2.6) bestimmt werden. Mit einer Temperatur von $293,15 \text{ K}$, bei der die kraftspektroskopischen Experimenten durchgeführt wurden, ergibt sich eine Reaktionslänge von $x_\beta = 0,34 \pm 0,03 \text{ nm}$.

Damit lässt sich schließlich die gesuchte Off-Ratenkonstante k_{off}^0 durch eine Umformung der Gleichung $F_{\text{max}}(r_0) = 0$ zu

$$k_{\text{off}}^0 = \frac{1}{k_B T} x_\beta r_0 \quad (42)$$

berechnen. Die gesuchte Off-Ratenkonstante für die Alaninmutante V197A der gesamten DNA-bindenden Domäne von PhoB beträgt somit $k_{\text{off}}^0 = (0,12 \pm 0,05) \text{ s}^{-1}$. Daraus folgt eine mittlere Lebensdauer des DNA-V197A-Komplexes von $\tau = 8,3 \text{ s}$. Vergleicht man diesen Wert mit der Off-Ratenkonstante $k_{\text{off}}^0 = (0,00241 \pm 0,00215) \text{ s}^{-1}$ [29] für die bereits untersuchte native DNA-bindene Domäne von PhoB (Abbildung 40) und der daraus resultierenden mittleren Lebensdauer des Komplexes von $\tau = 415 \text{ s}$, so wird der Beitrag von Valin 197 (Abschnitt 3.3.4) an der Stabilität des DNA-V197A-Komplexes deutlich. Beide Methylgruppen von Valin 197 wechselwirken über van-der-Waals-Kräfte mit der Methylgruppe des zweiten Thymins des TGTCA-Motivs (Abschnitt 3.3.4). Die höhere Dissoziationsgeschwindigkeit und damit verkürzte Lebensdauer des V197A-DNA-Komplexes kann durch den Verlust der beiden Methylgruppen von Val197 und den daraus resultierenden fehlenden van-der-Waals-Kontakten und/oder einer strukturellen (sterisch ungünstigeren) Veränderung der Erkennungshelix α^3 erklärt werden. Laut Kristallstruktur [93] ist Val197 an der spezifischen Erkennung der TGTCA-Sequenz beteiligt (Abschnitt 3.3.4). Dennoch ist V197A immer noch in der Lage die TGTCA-Sequenz spezifisch zu erkennen (Abschnitt 5.2). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die anderen beiden laut Kristallstruktur [93] an der spezifischen TGTCA-Sequenzerkennung beteiligten Erkennungshelix-Aminosäuren Thr194 und Arg201 (Abschnitt 3.3.4) für

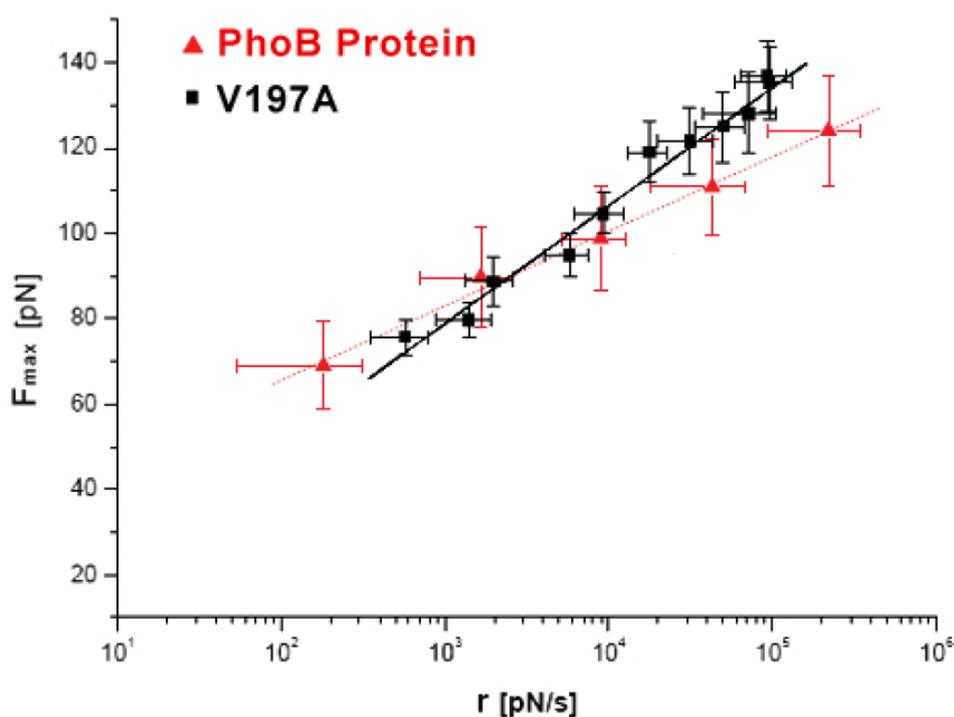


Abbildung 40: Die wahrscheinlichsten Dissoziationskräfte F_{max} sind logarithmisch gegen die Belastungsraten r aufgetragen. Dargestellt sind die Regressionsgeraden der in dieser Arbeit untersuchten Alaninmutante *PhoB(127-229)V197A* (schwarz) und der bereits gemessenen [29] nativen DNA-bindenden Domäne *PhoB(127-229)* (rot). Der Vergleich verdeutlicht die Unterschiede zwischen beiden Regressionsgeraden, aus denen die verschiedenen Off-Ratenkonstanten resultieren. Die Fehler für die Belastungsraten wurden aus den Standardabweichungen der jeweiligen effektiven Federkonstanten berechnet.

die Spezifität der Bindung essentiell sind. In Ensemblemessungen konnte zudem keine DNA-Bindung der Proteinmutanten *PhoB(127-229)T194A* und *PhoB(127-229)R201A* festgestellt werden, im Gegensatz zu *V197A* [104]. Die hier gezeigte spezifische DNA-Bindung von *V197A* verdeutlicht zusammen mit diesen Ensemblemessungen für *T194A* und *R201A* die Wichtigkeit dieser beiden Aminosäuren für die Bindung und Erkennung der Pho-Box-DNA. Zusätzlich unterstützt gemäß Kristallstruktur [93] der durch *Arg201* vermittelte spezifische Kontakt des β -hairpin mit der an das TGTCA-Motiv angrenzen-

den AT-reichen Region die molekulare Erkennung (Abschnitt 3.3.4). Unterstützend dazu wurde nun hier gezeigt, dass das aus der Erkennungshelix α^3 und einem Teil des β -hairpin bestehende Peptid PhoB(190-220) für eine spezifische Bindung an die TGTCA-Sequenz ebenfalls ausreicht. Diese Ergebnisse verdeutlichen die wichtige Rolle der α^3 -Helix und des β -hairpin in der spezifischen DNA-Bindung von PhoB. Die besondere Bedeutung der α^3 -Helix in der Erkennung der TGTCA-Sequenz konnte bereits in Konkurrenzexperimenten mit dem Peptid PhoB(190-209) gezeigt werden [5, 105, 106]. In zukünftigen Experimenten soll durch eine Bestimmung der Off-Ratenkonstanten für PhoB(190-229) der Beitrag des β -hairpin-Fragments an der DNA-Bindung aufgeklärt werden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Die spezifische molekulare Erkennung zwischen Transkriptionsfaktoren und DNA ist die Grundlage für eine gezielte Regulierung von Lebensprozessen. Für die Herstellung synthetischer Transkriptionsfaktoren ist ein genaues Verständnis der molekularen Mechanismen der Transkriptionsfaktor-DNA-Bindung nötig. Eine geeignete experimentelle Methode um quantitative Aussagen über die Spezifität von intermolekularen Bindungen und Lebensdauern (bzw. Off-Ratenkonstanten) von Molekülkomplexen auf Einzelmolekülebene zu machen, ist die AFM-Kraftspektroskopie. Als Modellsysteme wurden die DNA-bindende Domäne und ein daraus abgeleitetes Peptid des Transkriptionsfaktors PhoB bereits im Ensemble bezüglich DNA-Bindung und Struktur sowie quantitativ auf Einzelmolekülniveau mittels AFM-Kraftspektroskopie untersucht [6, 29]. Dabei wurden zudem sowohl für die DNA-bindende Domäne PhoB(127-229) als auch für das Peptid PhoB(190-209) jeweils die Punktmutanten R193A, H198A und R203A hergestellt und in kraftspektroskopischen Experimenten hinsichtlich spezifischer DNA-Bindung und Off-Ratenkonstante erforscht [6]. Die dabei gegen Alanin ausgetauschten Aminosäuren Arg193, His198 und Arg203 sind laut Kristallstruktur wichtig für unspezifische Wechselwirkungen mit dem DNA-Rückgrat [93]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden kraftspektroskopische Untersuchungen an der Proteinmutante PhoB(127-229)V197A und dem nativen Peptid PhoB(190-220) durchgeführt. Die in der Proteinmutante V197A ausgetauschte Aminosäure Valin ist laut Kristallstruktur [93] an der spezifischen DNA-Erkennung beteiligt. Das Peptid besteht aus der Erkennungshelix α^3 und Teilen des β -hairpin. Dabei wurde die spezifische Erkennung der TGTCA-Sequenz von PhoB(127-229)V197A und PhoB(190-220) in Konkurrenzexperimenten nachgewiesen. Damit wurde gezeigt, dass der Austausch von Valin gegen Alanin in der DNA-bindenden Domäne von PhoB nicht zum Verlust der Fähigkeit zur spezifischen Bindung an die TGTCA-Sequenz führt. Außerdem wurde durch die Bestätigung der spezifischen DNA-Bindung des Peptids PhoB(190-220) die wichtige Rolle der α^3 -Erkennungshelix und des β -hairpin an der

Erkennung der TGTCA-Sequenz deutlich. Desweiteren wurde durch dynamische Kraftspektroskopie an der Proteinmutante V197A eine Abhängigkeit der wahrscheinlichsten Dissoziationskraft von der Belastungsrate im Einklang mit der Standardtheorie beobachtet. Daraus resultierend wurde die Reaktionslänge x_β und die Off-Ratenkonstanten k_{off} für V197A erhalten. Die im Vergleich zur bereits untersuchten nativen DNA-bindenden Domäne PhoB(127-229) deutlich höhere Off-Ratenkonstanten verdeutlicht, dass die beiden Methylgruppen von Valin 197 wichtig für die Stabilität des PhoB-DNA-Komplexes sind.

Zukünftige kraftspektroskopische Experimente sollten zunächst eine Off-Ratenkonstante für das Peptid PhoB(190-220) hervorbringen. Dadurch wird ein Vergleich mit der Off-Ratenkonstante für das bereits mit dynamischer Kraftspektroskopie untersuchte Peptid PhoB(190-209) möglich. Dadurch kann der Beitrag des β -hairpin-Fragments an der DNA-Bindung quantifiziert werden. Weitere Peptide und Proteinmutanten stehen für eine rasterkraftspektroskopische Untersuchung bereit. Dadurch soll die Bedeutung der Aminosäuren Thr194 und Arg201 und verschiedener Regionen, die an die α^3 -Helix angrenzen, erfasst werden. Weitere Proteinmutanten der DNA-bindenden Domäne von PhoB, bei denen interessante Aminosäure in der α^2 -Helix, im transactivation loop und im β -hairpin durch Alanin ausgetauscht sind, sollten in der nahen Zukunft hergestellt und untersucht werden. Die durch AFM-Kraftspektroskopie bestimmten aktiven linearen Peptide sollen anschließend mit fotoschaltbaren Aminosäuren versehen und in den jeweiligen Schaltzuständen quantitativ auf Einzelmolekülniveau untersucht werden. Auch die Synthese von cyclischen PhoB-Proteinen mit fotoschaltbaren Aminosäuren ist geplant. Dadurch ist die Möglichkeit gegeben, durch Licht modulierbare Transkriptionsfaktoren zu erhalten und die Transkriptionsaktivierung geeigneter Proteine *in vivo* zu testen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem eine Optimierung der Präparationsschritte für die Kraftsensoren und Substrate bezüglich der Reproduzierbarkeit der kraftspektroskopischen Experimente angestrebt und erfolgreich umgesetzt. Zusätzlich wurde die

Entwicklung einer neuen automatisierten Analysesoftware zur Standardisierung der Auswertung von einzelmolekularen Kraft-Distanz-Kurven in Hinblick auf eine robuste und objektivere Bedienbarkeit und effektiver Kriterien für die Erkennung von Dissoziationsergebnissen realisiert.

Literatur

- [1] F.W.BARTELS: *Kraftspektroskopische Bindungsstudien an einzelnen Protein-DNA-Komplexen*. Doktorarbeit, Universität Bielefeld, 2005.
- [2] E.FISCHER: *Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme*. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 27:2985–2993, 1894.
- [3] E.EVANS: *Energy landscapes of biomolecular adhesion and receptor anchoring at interfaces explored with dynamic force spectroscopy*. Faraday Discussions, (111):1–16, 1998.
- [4] E.EVANS und K.RITCHIE: *Dynamic Strength of Molecular Adhesion Bonds*. Biophysical Journal, 72(4):1541–1555, 1997.
- [5] R.ECKEL, S.D.WILKING, A.BECKER, N.SEEWALD, R.ROS und D.ANSELMETTI: *Einzelmolekülexperimente in der synthetischen Biologie - ein Ansatz für das Affinitätsranking DNA-bindender Peptide*. Angewandte Chemie, 117:3989, 2005.
- [6] K.WOLLSCHLÄGER, K.GAUS, A.KÖRNIG, R.ECKEL, S.D.WILKING, M.McINTOSH, Z.MAJER, A.BECKER, R.ROS, D. ANSELMETTI und N.SEWALD: *Single-molecule experiments to elucidate the minimal requirement for DNA recognition by transcription factor epitopes*. Small, 5(4):484–495, 2009.
- [7] G.BINNING, C.F.QUATE und C.GERBER: *Atomic force microscopy*. Physical Review Letters, 56(9):930–933, 1986.
- [8] D.BONNELL: *Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy : Theory , Techniques, and Applications*. John Wiley & Sons, 2001.
- [9] V.WALHORN: *Rasterkraftmikroskopie mit kleinen Cantilevern*. Diplomarbeit, Universität Bielefeld, 2004.

-
- [10] J.OPPERMANN: *Untersuchung zur Adsorption und Reaktion von Stickstoffwasserstoffsäure an NaCl(100)-und Si(111)-Einkristallflächen mittels Polarisations-FTIR-Spektroskopie, SPA-LEED, XPS und AFM*. Doktorarbeit, Universität Hannover, 1998.
- [11] P.BARTH: *Hochauflösende Strukturierung von Siliziumoberflächen mittels Mikrokontaktdruck-Technik untersucht mit Rasterkraftmikroskopie*. Doktorarbeit, Universität Ulm, 2006.
- [12] A.JANSHOFF, M.NEITZERT, Y.OBERDÖRFER und H.FUCHS: *Kraftspektroskopie an molekularen Systemen- Einzelmolekülspektroskopie an Polymeren und Biomolekülen*. *Angewandte Chemie*, 112:3346–3374, 2000.
- [13] E.SCHNELL: *Rasterkraftmikroskopie als Methode zur Charakterisierung amphiphiler Strukturen*. Doktorarbeit, Universität Regensburg, 2002.
- [14] U.HARTMANN: *Manifestation of zero-point quantum fluctuations in atomic force microscopy*. *Physical Review B*, 42(3):1541–1545, 1990.
- [15] D.A.GRIGG, P.E.RUSSELL und J.E.GRIFFITH: *Tip-sample forces in scanning probe microscopy in air and vacuum*. *The Journal of Vacuum Science and Technology A*, 10(4):680–683, 1992.
- [16] H.J.BUTT: *Electrostatic interaction in atomic force microscopy*. *Biophysical Journal*, 60(4):777–785, 1991.
- [17] G.MEYER und N.M.AMER: *Novel optical approach to atomic force microscopy*. *Applied Physics Letters*, 53(12):1045–1047, 1988.
- [18] J.L.HUTTER und J.BECHHOEFER: *Calibration of atomic-force microscope tips*. *Review of Scientific Instruments*, 63(7):1868–1873, 1993.

- [19] M.GÖRLICH: *Rasterkraftmikroskopie an weichen Materialien (Dissertation)*. Universität Osnabrück, 2003.
- [20] R.ROS, R.ECKEL, F.BARTELS, A.SISCHKA, B.BAUMGARTH, S.D.WILKING, A.PÜHLER, N.SEEWALD, A.BECKER und D.ANSELMETTI: *Single molecule force spectroscopy on ligand-DNA complexes: from molecular binding mechanisms to biosensor applications*. Journal of Biotechnology, 112(1-2):5–12, 2004.
- [21] G.PUCCI, M.P.DESANTO, G.CARBONE und R.BARBERI: *A novel method to prepare probes force atomic force spectroscopy*. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 1(3):99–103, 2006.
- [22] R.ROS, F.SCHWESINGER, D.ANSELMETTI, M.KUBON, R.SCHÄFER, A.PLÜCKTHUN und L.TIEFENAUER: *Antigen binding forces of individually addressed single-chain Fv antibody molecules*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 95(13):7402–7405, 1998.
- [23] J.H.HOH, J.P.CLEVELAND, C.B.PRATER, J.P.REVEL und P.K.HANSMA: *Quantized Adhesion Detected with the Atomic Force Microscope*. Journal of the American Chemical Society, 114(12):4917–4918, 1992.
- [24] H.J.BUTT, B.CAPPELLA und M.KAPPL: *Force measurement with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications*. Surface Science Reports, 59(1-6):1–152, 2005.
- [25] L.SIRGHI, O.KYLIAN, D.GILLILAND, G.CECCONE und F.ROSSO: *Cleaning and Hydrophilization of Atomic Force Microscopy Silicon Probes*. The Journal of Physical Chemistry, 110(51):25975–25981, 2006.
- [26] S.ALLEN, S.M.RIGBY-SINGLETON, H.HARRIS, M.C.DAVIES und P.O'SHEA: *Measuring and visualizing single molecular interactions in biology*. Biochemical Society Transactions, 31(Part 5):1052–1057, 2003.

- [27] F.KIENBERGER, V.P.PASTUSHENKO, G.KADA, H.J.GRUBER, C.RIENER, H.SCHINDLER und P.HINTERDORFER: *Static and Dynamical Properties of Single Poly(Ethylene Glycol) Molecules Investigated by Force Spectroscopy*. *Single Molecules*, 1(2):123–128, 2000.
- [28] E.THORMANN, P.L.HANSEN, A.C. SIMONSEN und O.G.MOURITSEN: *Dynamic force spectroscopy on soft molecular systems: improved analysis of unbinding spectra with varying linker compliance*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 53(2):149–156, 2006.
- [29] R.ECKEL: *Single Molecules and Nanocrystals: Molecular Recognition Forces and Optomechanical Switching*. Doktorarbeit, Universität Bielefeld, 2005.
- [30] K.WOLLSCHLÄGER: *DNA-peptide interaction forces on the single molecule level*. Seminarvortrag, Universität Bielefeld, 2007.
- [31] J.P.CLEVELAND, S.MANNE, D.BOECK und P.K.HANSMA: *A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy*. *Review of Scientific Instruments*, 64(2):403–405, 1993.
- [32] Y.Q.LI, N.J.TAO, J.PAN, A.A.GARCIA und S.M.LINDSAY: *Direct measurement of interaction forces between colloidal particles using the scanning force microscope*. *Langmuir*, 9 (3):637–641, 1993.
- [33] T.J.SENDEN und W.A.DUCKER: *Experimental Determination of Spring Constants in Atomic Force*. *Langmuir*, 10(4):1003–1004, 1994.
- [34] J.E.SADER und L.WHITE: *Theoretical analysis of the static deflection of plates for atomic force microscope applications*. *Journal of Applied Physics*, 74(1):1–9, 1993.
- [35] S.B.AKSU und J.A.TURNER: *Calibration of atomic force microscope cantilevers using piezolevers*. *Review of Scientific Instruments*, 78(4):043704.1–043704.8, 2007.

- [36] S.ROES: *Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen von Membraneigenschaften und Membran-Protein-Wechselwirkungen*. Doktorarbeit, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 2004.
- [37] R.PROKSCH, T.E.SCHÄFFER, J.P.CLEVELAND, R.C.CALLAHAN und M.B.VIANI: *Finite optical spot size and position corrections in thermal spring constant calibration*. *Nanotechnology*, 15(9):1344–1350, 2004.
- [38] C.T.GIBSON, G.S.WATSON und S.MYHRA: *Determination of spring constants of probes for force microscopy/spectroscopy*. *Nanotechnology*, 7(3):259–262, 1996.
- [39] R.ECKEL, R.ROS, BJÖRN DECKER, J.MATTAY und D.ANSELMETTI: *Supramolekulare Chemie mit einzelnen Molekülen*. *Angewandte Chemie*, 117(3):489–492, 2005.
- [40] M.MENZIGER und R.L.WOLFGANG: *Bedeutung und Anwendung der Arrhenius-Aktivierungsenergie*. *Angewandte Chemie*, 81(12):446–452, 1969.
- [41] P.HÄGGI, P.TALKNER und M.BORKOVEC: *Reaction-rate theory: fifty years after Kramers*. *Review of Modern Physics*, 62(2):251–341, 1990.
- [42] G.I.BELL: *Models for the Specific Adhesion of Cells to Cells*. *Science*, 200(4342):618–627, 1978.
- [43] H.GRUBMÜLLER: *Force probe molecular dynamics simulations*. *Methods in Molecular Biology*, 305:493–515, 2005.
- [44] E.EVANS: *Probing the relation between force–lifetime–and chemistry in single molecular bonds*. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 30:105–128, 2001.
- [45] N.G.VANKAMPEN: *Stochastic Processes in Physics and Chemistry*. North-Holland, Amsterdam, 1992.

- [46] R.MERKEL: *Force Spectroscopy on Single Passive Biomolecules and Single Biomolecular Bonds*. Physics Reports, 346(5):343–385, 2001.
- [47] B.HEYMANN und H.GRUBMÜLLER: *Dynamic force spectroscopy of molecular adhesion bonds*. Physical Review Letters, 84(26 Pt 1):6126–6129, 2000.
- [48] M.NGUYEN-DUONG, K.W.KOCH und R.MERKEL: *Surface anchoring reduces the lifetime of single specific bonds*. Europhysics Letters, 61(6):845–851, 2003.
- [49] T.STRUNZ, K.ORSZLAN, I.SCHUMAKOVITCH, H.GÜNTHERODT und M.HEGNER: *Model energy landscapes and the force-induced dissociation of ligand-receptor bonds*. Biophysical Journal, 79(3):1206–1212, 2000.
- [50] M.RIEF, J.M.FERNANDEZ und H.E.GAUB: *Elastically coupled two-level systems as a model for biopolymer extensibility*. Physical Review Letters, 81(21):4764–4767, 1998.
- [51] M.EVSTIGNEEV und P.REIMANN: *Dynamic force spectroscopy: optimized data analysis*. Physical Review E statistical, nonlinear and soft matter physics, 68(4 Pt 2):045103, 2003.
- [52] M.RAIBLE, M.EVSTIGNEEV, F.W.BARTELS, R.ECKEL, M.NGUYEN-DUONG, R.MERKEL, R.ROS, D.ANSELMETTI und P.REIMANN: *Theoretical analysis of single-molecule force spectroscopy experiments: heterogeneity of chemical bonds*. Biophysical Journal, 90(11):3851–3864, 2006.
- [53] M.RAIBLE, M.EVSTIGNEEV, P.REIMANN, F.W.BARTELS und R.ROS: *Theoretical analysis of dynamic force spectroscopy experiments on ligand-receptor complexes*. Journal of Biotechnology, 112(1-2):13–23, 2004.
- [54] M.RAIBLE und P.REIMANN: *Single-molecule force spectroscopy: Heterogeneity of chemical bonds*. Europhysics Letters, 73(4):628–634, 2006.

- [55] W.MÜLLER-ESTERL: *Biochemie*, Band 1. Spektrum Akademischer Verlag, 2004.
- [56] H.LODISH, A.BERK, S.L.ZIPURSKY, P.MATSUDAIRA, D.BALTIMORE und J.E.DARNELL: *Molekulare Zellbiologie*, Band 4. Spektrum Akademischer Verlag, 2001.
- [57] H.R.HORTON, L.A.MORAN, K.G.SCRIMGEOUR, M.D.PERRY und J.D.RAWN: *Biochemie*, Band 4. Pearson Studium, 2008.
- [58] J.M.BERG, J.L.TYMOCZKO und L.STRYER: *Stryer Biochemie*, Band 6. Spektrum Akademischer Verlag, 2007.
- [59] Z.QUAN, L.LU, X.J.LIU, Y.D.CHAI und Y.LI: *An approach to predict transcription factor DNA binding site specificity based upon gene and transcription factor functional categorization*. *Bioinformatics*, 23(182007):2449–2454, 2007.
- [60] M.DJORDJEVIC, A.M.SENGUPTA und B.I.SHRAIMAN: *A biophysical approach to transcription factor binding site discovery*. *Genome Research*, 13(11):2381–2390, 2003.
- [61] L.A.LIU und J.S.BADER: *Ab initio prediction of transcription factor binding sites*. *Pacific Symposium on Biocomputing*, 12:484–495, 2007.
- [62] M.B.EISEN: *All motifs are not equal: structural properties of transcription factor-dna interactions and the interference of sequence specificity*. *Genome Biology*, 6:P7, 2005.
- [63] E.A.KOTELNIKOVA, V.J.MAKEEV und M.S.GELFAND: *Evolution of transcription factor DNA binding sites*. *Gene*, 347(2):255–263, 2005.
- [64] M.L.BULYK: *Computational prediction of transcription-factor binding site locations*. *Genome Biology*, 5(1):201, 2003.

- [65] M.LEWIS, G.CHANG, N.C.HORTON, M.A.KERCHER, H.C.PACE, M.A.SCHUMACHER, R.G.BRENNAN und P.LU: *Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer*. Science, 271(5253):1247–1254, 1996.
- [66] C.W.GARVIE und C.WOLBERGER: *Recognition of specific DNA sequences*. Molecular Cell, 8(5):937–946, 2001.
- [67] C.O.PABO und R.T.SAUER: *Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition*. Annual Review of Biochemistry, 61:1053–1095, 1992.
- [68] N.M.LUSCOMBE, S.E. AUSTIN, H.M.BERMAN und J.M.THORNTON: *An overview of the structures of protein-DNA complexes*. Genome Biology, 1(1):REVIEWS001, 2000.
- [69] R.G.BRENNAN und B.W.MATTHEWS: *The helix-turn-helix DNA binding motif*. Journal of Biological Chemistry, 264(4):1903–1906, 1989.
- [70] S.C.HARRISON und A.K.AGGARWAL: *DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif*. Annual Review of Biochemistry, 59:933–969, 1990.
- [71] L.ARAVIND, V.ANANTHARAMAN, S.BALAJI, M.MOHAN BABU und L.M.LYER: *The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond*. FEMS Microbiology Reviews, 29(2):231–262, 2005.
- [72] M.SUZUKI, N.YAGI und M.GERSTEIN: *DNA recognition and superstructure formation by helix-turn-helix proteins*. Protein Engineering, 8(4):329–338, 1995.
- [73] R.G.BRENNAN, Y.TAKEDA, J.KIM, W.F.ANDERSON und B.W.MATTHEWS: *Crystallization of a complex of cro repressor with a 17 base-pair operator*. Journal of Molecular Biology, 188(1):115–118, 1986.

- [74] J.A.ROSINSKI und W.R.ATCHLEY: *Molecular evolution of helix-turn-helix proteins*. Journal of Molecular Evolution, 49(3):301–309, 1999.
- [75] F.F.DAMBERGER, J.G.PELTON, C.J.HARRISON, H.C.NELSON und D.E.WEMMER: *Solution structure of the DNA-binding domain of the heat shock transcription factor determined by multidimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy*. Protein Science, 3(10):1806–1821, 1994.
- [76] K.S.GAJIWALA und S.K.BURLEY: *Winged helix proteins*. Current Opinion in Structural Biology, 10(1):110–116, 2000.
- [77] I.MARSDEN, Y.CHEN, C.JIN und X.LIAO: *Evidence that the DNA binding specificity of winged helix proteins is mediated by a structural change in the amino acid sequence adjacent to the principal DNA binding helix*. Biochemistry, 36(43):13248–13255, 1997.
- [78] K.P.WILSON, L.M.SHEWCHUK, R.G.BRENNAN, A.J.OTSUKA und B.W.MATTHEWS: *Escherichia coli biotin holoenzyme synthetase/bio repressor crystal structure delineates the biotin- and DNA-binding domains*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 89(19):9257–9261, 1992.
- [79] N.ZHENG, E.FRAENKEL, C.O.PABO und N.P.PAVLETICH: *Structural basis of DNA recognition by the heterodimeric cell cycle transcription factor E2F-DP*. Genes & Development, 13(6):666–674, 1999.
- [80] A.SARAI und H.KONO: *Protein-DNA recognition patterns and predictions*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 34:379–398, 2005.
- [81] Y.MANDEL-GUTFREUND, O.SCHUELER und H.MARGALIT: *Comprehensive analysis of hydrogen bonds in regulatory protein DNA-complexes: in search of common principles*. Journal of Molecular Biology, 253(2):370–382, 1995.

- [82] H.KONO und A.SARAI: *Structure-based prediction of DNA target sites by regulatory proteins*. Proteins, 35(1):114–131, 1999.
- [83] C.O.PABO und L.NEKLUDOVA: *Geometric analysis and comparison of protein-DNA interfaces: why is there no simple code for recognition?* Journal of Molecular Biology, 301(3):597–624, 2000.
- [84] M.SUZUKI: *A framework for the DNA-protein recognition code of the probe helix in transcription factors: the chemical and stereochemical rules*. Structure, 2(4):317–326, 1994.
- [85] Y.MANDEL-GUTFREUND und H.MARGALIT: *Quantitative parameters for amino acid-base interaction: implications for prediction of protein-DNA binding sites*. Nucleic Acids Research, 26(10):2306–2312, 1998.
- [86] N.M.LUSCOMBE, R.A.LASKOWSKI und J.M.THORNTON: *Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level*. Nucleic Acids Research, 29(13):2860–2874, 2001.
- [87] M.OOBATAKE, H.KONO, Y.WANG und A.SARAI: *Anatomy of specific interactions between lambda repressor and operator DNA*. Proteins, 53(1):33–43, 2003.
- [88] K.MAKINO, M.AMEMURA, T.KAWAMOTO, S.KIMURA, H.SHINAGAWA, A.NAKATA und M.SUZUKI: *DNA binding of PhoB and its interaction with RNA polymerase*. Journal of Molecular Biology, 259(1):15–26, 1996.
- [89] B.L.WANNER: *Signal transduction in the control of phosphate-regulated genes of Escherichia coli*. Kidney International, 49(4):964–967, 1996.
- [90] H.W.VANVEEN: *Phosphate transport in prokaryotes: molecules, mediators and mechanisms*. Antonie Van Leeuwenhoek, 72(4):299–315, 1997.

- [91] M.YAMADA, K.MAKINO, H.SHINAGAWA und A.NAKATA: *Regulation of the phosphate regulon of Escherichia coli: properties of phoR deletion mutants and subcellular localization of PhoR protein*. Molecular and General Genetics, 220(3):366–372, 1990.
- [92] P.BACHHAWAT, G. V .SWAPNA, G.T.MONTELLIONE und A.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, 2005.
- [93] A.G.BLANCO, M.SOLA, F. X. GOMIS-RÜTH und M.COLL: *Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator*. Structure, 10(5):701–713, 2002.
- [94] H.OKAMURA, S.HANAOKA, A.NAGADOI, K.MAKINO und Y.NISHIMURA: *Structural comparison of the PhoB and OmpR DNA-binding/transactivation domains and the arrangement of PhoB molecules on the phosphate box*. Journal of Molecular Biology, 295(5):1225–1236, 2000.
- [95] M.SOLÁ, F.X.GOMIS-RÜTH, L.SERRANO, A.GONZÁLEZ und M.COLL: *Three-dimensional crystal structure of the transcription factor PhoB receiver domain*. Journal of Molecular Biology, 285(2):675–687, 1999.
- [96] D.W.ELLISON und W.R.MCCLEARY: *The unphosphorylated receiver domain of PhoB silences the activity of its output domain*. Journal of Bacteriology, 182(23):6592–6597, 2000.
- [97] K.MAKINO, M.AMEMURA, S.K.KIM, A.NAKATA und H.SHINAGAWA: *Role of the sigma 70 subunit of RNA polymerase in transcriptional activation by activator protein PhoB in Escherichia coli*. Genes & Development, 7(1):149–160, 1993.

- [98] U.FIEDLER und V.WEISS: *A common switch in activation of the response regulators NtrC and PhoB: phosphorylation induces dimerization of the receiver modules.* The EMBO Journal, 14(15):3696–3705, 1995.
- [99] ASYLUM RESEARCH, Santa Barbara CA 93117: *Installation and Operation Manual*, 2008.
- [100] U.AEBI und T.D.POLLARD: *A glow discharge unit to render electron microscope grids and other surfaces hydrophilic.* Journal of Electron Microscopy Technique, 7(1):29–33, 1987.
- [101] K.WOLLSCHLÄGER: *Klonierung, Isolierung und funktionelle Studien des Proteins PhoB aus Escherichia Coli.* Diplomarbeit, Universität Bielefeld, 2005.
- [102] K.WOLLSCHLÄGER, K.GAUS, A.KÖRNIG, R.ECKEL, S.D.WILKING, M.McINTOSH, Z.MAJER, A.BECKER, R.ROS, D.ANSELMETTI und N.SEWALD: *Single-molecule experiments to elucidate the minimal requirement for DNA recognition by transcription factor epitopes.* Small, 5(4):484–495, 2009.
- [103] F.W.BARTELS: *Rasterkraftmikroskopie und Rasterkraftspektroskopie an einzelnen Biomolekülen.* Diplomarbeit, Universität Bielefeld, 2002.
- [104] K.WOLLSCHLÄGER: *Persönliche Mitteilung*, 2009.
- [105] S.D.WILKING: *Synthese und Charakterisierung DNA-bindender Peptide.* Doktorarbeit, Universität Bielefeld, 2006.
- [106] KÖRNIG, ANDRÉ: *Einzelmolkülkraftspektroskopie an molekularerkennenden Systemen.* Diplomarbeit, Universität Bielefeld, 2008.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Dario Anselmetti für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit unter optimalen Bedingungen durchzuführen zu können. Besonders bedanken möchte ich mich für das Vertrauen, dass er mir entgegengebracht hat und seine aufmunternden Worte. Seine Anregungen und sein Optimismus hatten großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit. Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe *Experimentelle Biophysik und angewandte Nanowissenschaften* für die Professionalität und das sehr angenehme Arbeitsklima. Jeder Einzelne hat durch die Beantwortung meiner Fragen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ganz besonders bedanke ich mich bei Lennart Ochel für die Entwicklung einer tollen Analysesoftware und die Umsetzung meiner Wünsche, bei Daniel Wesner für die Geduld in der Beantwortung meiner chemischen, biochemischen und kraftspektroskopischen Fragen, bei Volker Walhorn für seine Ratschläge bezüglich der Kraftspektroskopie, bei Christoph Pelargus, Lukas Bogunovic und Sebastian Horstmeier für die Hilfe bei Computerproblemen, bei Alexander Harder für seine positive Grundeinstellung und die anregenden Gespräche, bei André Körnig für Anregungen bezüglich der Analyse von kraftspektroskopischen Experimenten, bei Dr. Rainer Eckel für die Beantwortung von chemischen Fragen via Email, bei Katrin Wollschläger für die Herstellung der DNA, der Proteine und der Peptide und ihre biochemischen Ratschläge und bei Dr. Andy Sischka für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Bei Prof. Dr. Andreas Hütten bedanke ich mich dafür, dass er sich bereit erklärt hat für diese Arbeit als zweiter Gutachter aufzutreten. Ich danke meiner Familie für das grenzenlose Vertrauen in mich und die volle Unterstützung in allen Lebenslagen.