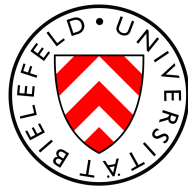


**Untersuchung der PhoB-Interaktion
mit der kleinen Furche der DNA
mittels
Einzelmolekül-Kraftspektroskopie**

MASTERARBEIT
zur Erlangung des akademischen Grades
Master of Science
(M.Sc.)

dem Fachbereich Physik der
Universität Bielefeld



vorgelegt von
Adeline Bieker

September 2011

*Wer die Welt nicht von Kind auf gewohnt wäre,
müsste über ihr den Verstand verlieren.
Das Wunder eines einzigen Baumes würde genügen,
ihn zu vernichten.*
Christian Morgenstern

ERKLÄRUNG

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

Bielefeld, den 30.09.2011

Adeline Bieker

Gutachter:

Prof. Dr. Dario Anselmetti (Fakultät für Physik)

Prof. Dr. Norbert Sewald (Fakultät für Chemie)

Abgabedatum der Arbeit: 30.09.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Physikalische Grundlagen	5
2.1	Das Rasterkraftmikroskop	5
2.1.1	Der Aufbau	5
2.1.2	Wechselwirkungskräfte	8
2.2	Die Kraftspektroskopie	11
2.2.1	Aufnahme einer Kraft-Distanz-Kurve	12
2.3	Der Cantilever	13
2.3.1	Bestimmung der Federkonstanten	17
2.4	Kräfte und Kinetik in der Kraftspektroskopie: Die Auswertung von Kraft-Distanz-Kurven	20
2.4.1	Die Wechselwirkung im thermodynamischen Gleichgewicht	20
2.4.2	Dissoziation unter einer externen Kraft	23
3	Biologische Grundlagen	27
3.1	Proteine	27
3.1.1	Der Aufbau von Proteinen	28
3.2	Nucleinsäuren	32
3.3	Genexpression	34
3.4	Der Transkriptionsaktivator PhoB	36
4	Materialien und Methoden	39
4.1	Verwendete Chemikalien	39
4.2	Verwendete Geräte	40
4.3	Piezo-Kalibration	41
4.4	Cantilever	42
4.5	Substratoberflächen	42

Inhaltsverzeichnis

4.6	Die Biomoleküle	42
4.6.1	DNA	42
4.6.2	Proteine	43
4.7	Präparation	44
4.7.1	Immobilisierung der DNA an den Cantilever	44
4.7.2	Immobilisierung der Proteine auf einer Goldoberfläche	45
4.8	Auswertung der Kraft-Distanz-Kurven	46
5	Auswertung und Ergebnisse	49
5.1	Die Mutante V218A	52
5.2	Die Mutante R176A	58
5.3	Die Mutante T217A	65
5.4	Das heterogene Bindungsmodell	72
6	Zusammenfassung und Ausblick	75
	Danksagung	77
	Anhang	79
	Anhang A	79
	Anhang B	81
	Literatur	83

1 Einleitung

„In Ihrer bahnbrechenden Arbeit haben Sie den Grund für die entscheidenden Entwicklungen moderner Mikroskopie gelegt. Es ist jetzt möglich, die kleinsten Einzelheiten der Struktur von Materie zu erkennen. Dies ist von grösster Bedeutung - nicht nur in der Physik, sondern auch in vielen anderen Bereichen der Wissenschaft.“

Mit diesen Worten leitete Professor Sven Johannson von der Royal Academy of Sciences in seiner Rede die Übergabe des Nobelpreises an Gerd Binnig und Heinrich Rohrer (sowie Ernst Ruska) 1986 ein [Fra93]. Diese hatten 1981 das Rastertunnelmikroskop (engl. Scanning Tunneling Microscope, STM) erfunden. Wie vorhergesagt hat sich diese Mikroskopietechnik innerhalb kürzester Zeit etabliert und weiterentwickelt. Insbesondere hat sich aus diesen Arbeiten das Rasterkraftmikroskop (engl. Atomic Force Microscope, AFM) entwickelt, das in vielen verschiedenen Forschungsgebieten Anwendung gefunden hat: In der Festkörperphysik wird es zum Beispiel zur Schichtdickenbestimmung, der Untersuchung von Beschichtungsfehlern oder zur Vermessung der Strukturen von Speichermedien verwendet. In der Chemie wird es zur Aufklärung der Wechselwirkung chemischer Substanzen benutzt. Des Weiteren findet es Verwendung in der Biophysik, wie in der vorliegenden Arbeit.

Die Faszination der Biophysik liegt in ihrer Interdisziplinarität. Sie versucht, physikalische Gesetzmäßigkeiten in der Struktur und der Funktion von biologischen Systemen zu entdecken. Außerdem erforscht sie Prozesse in biologischen Systemen mit Hilfe von physikalischen Methoden.

Für Stoffwechselprozesse eines Organismus ist die Wechselwirkung von Proteinen untereinander und mit anderen Molekülen essentiell. Proteine sind für den Aufbau von biologischen Systemen zuständig, zum Beispiel das Protein Titin in Skelett- und Herzmuskelsarkomeren, das für die Stabilität und Elastizität eines Muskels verantwortlich ist und die Kontraktionsgeschwindigkeit mitbestimmt. Des Weiteren greifen Proteine in die Regulation von biologischen Systemen ein, wie beispielsweise Insulin,

1 Einleitung

das den Blutzuckerspiegel senken, und Glucagon, das ihn erhöhen kann.

Intermolekulare Kräfte spielen bei diesen Prozessen eine entscheidende Rolle. Mit Hilfe eines AFM können diese Bindungskräfte zwischen Molekülen auf einzelmolekularem Niveau vermessen werden. In solchen kraftspektroskopischen Experimenten werden sowohl an die AFM-Spitze als auch an die Oberfläche Moleküle immobilisiert. Beim Annähern des Cantilevers an die Oberfläche und während der Kontaktzeit können die Moleküle aneinander binden. Wird nun die Spitze von der Oberfläche mit einer konstanten Geschwindigkeit entfernt, so baut sich eine steigende Zugkraft auf den Molekülkomplex auf, bis es zur Dissoziation kommt. Durch solche Dissoziationskraftmessungen an Einzelmolekülen können Entbindungsraten bzw. die Lebensdauer des Komplexes, sowie Wechselwirkungslängen der Bindungsepitope gewonnen werden.

In dieser Arbeit wird das Verständnis der Bindung zwischen DNA und DNA-bindenden Proteinen mit Hilfe der Einzelmolekül-Kraftspektroskopie vertieft. Als Modellsystem dient die DNA-bindende Domäne (DBD, Aminosäurereste 128-229) des Transkriptionsfaktors PhoB aus dem Bakterium *Escherichia coli*.

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die die Genexpression, also die Transkription der DNA zur mRNA kontrollieren. Sie binden spezifisch an definierte DNA-Sequenzen über eine DNA-bindende Domäne.

Ein Ziel der Forschung ist es, künstliche Transkriptionsfaktoren herzustellen, die sequenzspezifisch an DNA binden, damit man in die Biosynthese von Proteinen, die an pathologischen Prozessen beteiligt sind, regulierend eingreifen kann. Dafür wird die Wechselwirkung der Epitope mit der DNA auf Aminosäuren-Niveau untersucht.

Im folgenden Kapitel 2 werden die physikalischen Grundlagen der Kraftspektroskopie dargelegt. Darin wird die Funktionsweise des Rasterkraftmikroskops erklärt, um anschließend auf die Kraftspektroskopie selbst einzugehen. Dabei werden auch die Kalibration der Cantilever und die Theorie der Wechselwirkung eines Rezeptors mit einem Liganden erläutert.

In den Biologischen Grundlagen wird auf den Aufbau von Proteinen und DNA im Allgemeinen, sowie auf deren Wechselwirkung miteinander eingegangen. Im Besonderen wird der Transkriptionsfaktor PhoB des Bakteriums *Escherichia coli* beschrieben.

1 Einleitung

Um die Wechselwirkung des Proteins PhoB und dessen Mutanten mit DNA zu messen, sind mehrere Präparationsschritte vorab nötig. Die Präparation und die dazu verwendeten Chemikalien sind im Materialien und Methoden - Teil beschrieben. Im darauffolgenden Kapitel werden die erhobenen Messdaten ausgewertet und die Ergebnisse dieser Masterarbeit vorgestellt. Abschließend erfolgt eine Zusammenfassung und es wird auf mögliche weitere Untersuchungsmethoden eingegangen.

2 Physikalische Grundlagen

Die Entwicklung des AFMs hat unter anderem die Untersuchung von Einzelmolekülwechselwirkungen ermöglicht. In diesem Kapitel werden die physikalischen Grundlagen zum Verständnis dieser Mikroskopietechnik dargestellt. Dabei wird zunächst das Rasterkraftmikroskop vorgestellt. Dazu wird auf den Aufbau und die bei der Messung auftretenden Wechselwirkungskräfte eingegangen. Im Anschluss wird die Methode der Kraftspektroskopie, die auch mit einem AFM durchgeführt werden kann, eingeführt. Darauf aufbauend werden die theoretischen Grundlagen über den Cantilever und die Wechselwirkung zwischen Molekülen dargestellt, die benötigt werden, um kraftspektroskopische Messungen auswerten zu können.

2.1 Das Rasterkraftmikroskop

Das Rasterkraftmikroskop, engl. Atomic Force Microscope (AFM), gehört zu den Rastersondenmikroskopen. Deren zugrundeliegende Prinzip ist das Abtasten einer Oberfläche mit einer Sonde. Beim AFM ist diese Sonde eine Spitze, die sich am sogenannten Cantilever befindet. Der Cantilever besteht aus einem rechteckigen oder V-förmigen Federbalken, an dessen Ende sich die pyramiden- oder kegelförmige Spitze befindet. Über die detektierte Verbiegung des Cantilevers lässt sich auf die Oberflächenstruktur rückschließen. Im Folgenden wird der Aufbau des AFMs erklärt.

2.1.1 Der Aufbau

Den Mittelpunkt des AFMs bildet der Cantilever und die zu untersuchende Oberfläche. Um die Oberfläche abzubilden, benötigt man drei Dinge:

2 Physikalische Grundlagen

- Der Cantilever muss kontrolliert an die Oberfläche genähert werden.
- Der Cantilever muss auf der Oberfläche in x- und y-Richtung bewegt werden.
- Die Verbiegung des Cantilevers muss detektiert werden.

Die kontrollierte und reproduzierbare Ortsveränderung des Cantilevers wird durch einen sogenannten *Scanner* erzeugt. Dieser besteht typischerweise aus piezoelektrischem Material, das proportional zur angelegten Spannung gestreckt oder gestaucht werden kann. Im Materialien und Methoden - Teil wird kurz auf die Kalibration des Piezos eingegangen.

Die Verbiegung des Cantilevers wird über ein Lichtzeigersystem, engl. optical beam deflection, detektiert. Dieses System besteht aus einem Laser und einer Quadrantenphotodiode. Der Laser wird auf den Cantilever über der Spitze fokussiert. Die Rückseite des Cantilevers ist meistens mit Gold bedampft und somit wird der Laserstrahl reflektiert. Der Reflex wird über einen Spiegel auf die Quadrantendiode gelenkt, siehe Abbildung 2.1.

Die Quadrantendiode besteht aus 4 Detektionsfeldern. In jedem Feld wird das auftreffende Licht über den Photoeffekt in einen elektrischen Strom umgewandelt. Um die Bewegung des Cantilevers nachvollziehen zu können, betrachtet man folgende Spannungen:

-

$$U_{\text{Summe}} = U_A + U_B + U_C + U_D \quad (2.1)$$

ist die Summe der Spannungen der 4 Felder. Diese wird bei der Kalibration anfänglich durch die Veränderung des Laserspots auf dem Cantilever maximiert.

- Die vertikale Auslenkung wird durch das so genannte *Deflection-Signal* detektiert.

$$U_{\text{Deflection}} = U_A + U_B - (U_C + U_D). \quad (2.2)$$

Bei der Kalibration werden die Felder der Quadrantendiode so ausgerichtet, dass der Laserspot mittig zwischen den oberen und unteren beiden Feldern auftrifft. Damit ist am Anfang $U_{\text{Deflection}} = 0$.

2 Physikalische Grundlagen

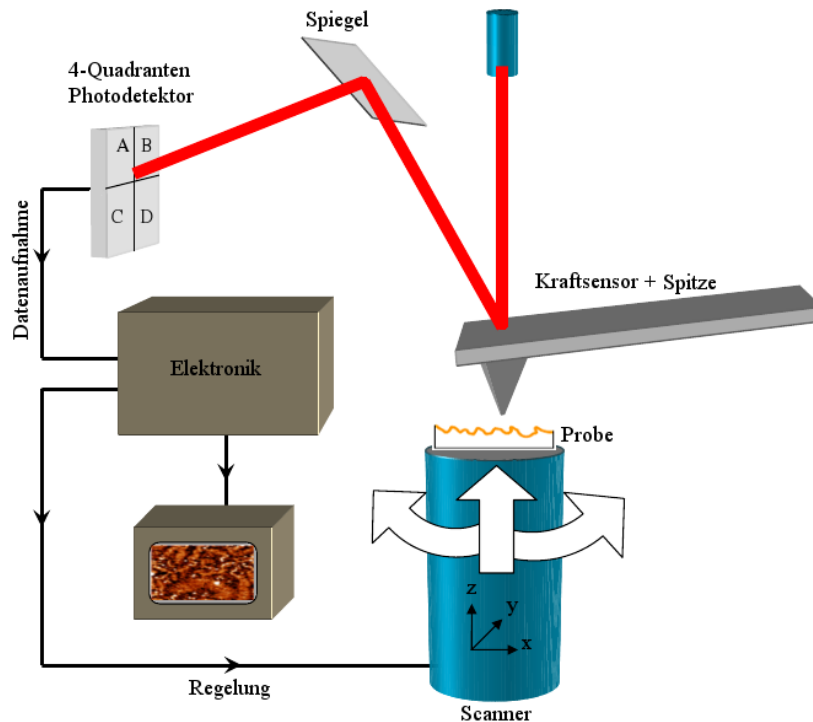


Abbildung 2.1: Aufbau eines AFMs [Har09]. An der Quadrantendiode sind die Felder beschriftet.

- Eine Torsionsauslenkung des Cantilevers wird über das *Lateral-Signal*

$$U_{Lateral} = U_A + U_C - (U_B + U_D) \quad (2.3)$$

detektiert. Bei der Kalibration wird der Laserspot mittig zwischen den beiden linken und rechten Feldern positioniert. Damit ist auch $U_{Lateral} = 0$.

Wirkt nun eine Kraft auf den Cantilever, verbiegt sich dieser, was eine Verschiebung des Laserspots auf der Quadrantendiode zur Folge hat. Damit ändern sich auch $U_{Deflection}$ und $U_{Lateral}$.

Das *Deflection-Signal* wird außerdem verwendet, um die Bewegung des Cantilevers in vertikale Richtung zu steuern, siehe Abbildung 2.1. Wenn die auf den Cantilever wirkenden Kräfte einen vorher definierbaren Wert übersteigen, wird der Cantilever so weit von der Oberfläche weggefahren, bis die Kräfte wieder geringer sind als der definierte Wert. Dadurch wird gewährleistet, dass der Cantilever nicht zerstört wird.

Da in dieser Arbeit der Schwerpunkt auf der Kraftspektroskopie liegt, werden die verschiedenen Abbildungsmodi nur kurz erläutert.

2 Physikalische Grundlagen

Die Unterscheidung der abbildenden Messmodi kann anhand verschiedener Kriterien erfolgen. Als Kriterium ist hier die während der Messung genutzte Wechselwirkung gewählt. Im Kontaktmodus, engl. Contact Mode, steht der Cantilever im ständigen Kontakt mit der Oberfläche. Dabei wird entweder mit einer definierten Kraft (constant force mode) oder mit konstanter z-Piezo-Position (constant height mode) die Oberfläche abgerastert.

Im dynamischen Modus wird der Cantilever durch eine externe periodische Kraft zur Schwingung angeregt. Treten nun zwischen dem Cantilever und der Oberfläche Kräfte auf, so verändert sich die Schwingung. Hier wird zwischen dem Nicht-Kontakt-Modus, engl. Non-Contact mode, und dem intermittierenden Modus, engl. Tapping Mode, unterschieden.

Beim Non Contact Mode schwingt der Cantilever nahe seiner Resonanzfrequenz. Durch auftretende Kräfte verändert sich die Resonanzfrequenz, und damit auch die Amplitude und die Phase zwischen Anregungs- und Detektionssignal.

Beim Tapping Mode berührt der Cantilever kurzzeitig die Oberfläche. Dadurch werden die lateralen Kräfte minimiert, wodurch sich dieser Modus zum Abbilden von weichen Materialien, wie zum Beispiel Biomolekülen, eignet.

Im Folgenden wird näher auf die auftretenden Kräfte eingegangen.

2.1.2 Wechselwirkungskräfte

Nähert man einen Cantilever einer Oberfläche, so wirken Kräfte von unterschiedlicher Stärke und Reichweite auf den Cantilever. Durch diese attraktiven oder repulsiven Kräfte wird der Cantilever aus seiner Ruheposition ausgelenkt. In Abbildung 2.2 ist die Reichweite der verschiedenen Kräfte dargestellt. Die Ursache dieser Kräfte wird im Folgenden in der Reihenfolge der Reichweite beschrieben.

Fluidfilmdämpfung

Diese Wechselwirkung erfahren nur Cantilever im Tapping Mode. Es entsteht eine dämpfende Luftschicht, wenn sich ein schwingender Cantilever sich im Bereich von 10 μm über der Oberfläche befindet. Bei der Abwärtsbewegung wird die Luft zusammengepresst und bei der Aufwärtsbewegung entsteht ein Unterdruck.

2 Physikalische Grundlagen

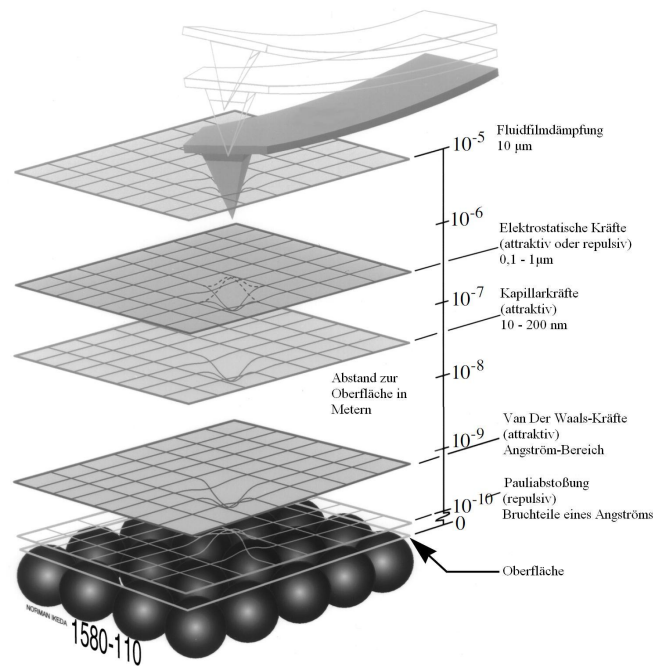


Abbildung 2.2: Darstellung der Reichweite der Wechselwirkungskräfte [Ell95]: Die elektrostatischen Kräfte mit dieser Reichweite treten an Luft auf, in Flüssigkeit ist die Reichweite geringer. Die Kapillarkräfte treten in Flüssigkeit nicht auf.

Elektrostatische Kräfte

Zwischen zwei Ladungen Q_1 und Q_2 , die voneinander den Abstand r haben, wirkt die Coulombkraft

$$|\vec{F}_C| = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon} \frac{Q_1 Q_2}{r^2}. \quad (2.4)$$

ϵ_0 ist die Dielektrizitätskonstante des Vakuums und ϵ die des umgebendes Mediums. Auf dem Cantilever und der Substratoberfläche können sich elektrische Ladungen sammeln, die dann miteinander wechselwirken. Über das Material des Cantilevers, dem Material der Oberfläche, sowie dem umgebenden Medium kann man die Entstehung elektrostatischer Wechselwirkungen beeinflussen. Durch leitende Materialien werden sie verringert. In Flüssigkeit kann auch über die Ionenkonzentration Einfluss auf die Stärke der elektrostatischen Kraft genommen werden.

Kapillarkräfte

An Luft wird jede Oberfläche durch einen dünnen Wasserfilm benetzt. Nähert sich der Cantilever der Oberfläche bildet sich eine Kapillare aus und dadurch wirkt eine zusätzliche Adhäsionskraft. Sie liegt im Bereich von 10 nN bis 100 nN [JNOF00]. Dieser

2 Physikalische Grundlagen

Effekt tritt hier nicht auf, da in Flüssigkeit gemessen wird.

Van-der-Waals-Kräfte

Man fasst folgende Kräfte zu der Van-der-Waals-Kraft zusammen:

- die Wechselwirkung zwischen 2 Dipolen (Dipol-Dipol-Kraft),
- die Wechselwirkung zwischen einem Dipol und einem induzierten Dipol in einem polarisierbaren Molekül (Dipol-induzierter Dipol-Kraft), und
- die Dispersionskraft, welche die Wechselwirkung zwischen 2 induzierten Dipolen beschreibt (induzierter Dipol-induzierter Dipol-Kraft).

Diesen Wechselwirkungen ist gemeinsam, dass die Wechselwirkungsenergie umgekehrt proportional zur 6. Potenz des Abstandes r zwischen den Atomen oder Molekülen ist:

$$V(r) = -\frac{C}{r^6}, \quad (2.5)$$

mit einer Konstanten C . Um Moleküle, die über die Van-der-Waals-Kraft miteinander verbunden sind, zu trennen, benötigt man zwischen 1-2 kJ/mol [Toe04]. Damit ist die Van-der-Waals-Kraft eine relativ schwache, nicht-kovalente Wechselwirkung und hat eine geringe Reichweite.

Es folgt noch eine Erklärung für die Entstehung der Van-der-Waals-Kraft zwischen neutralen Atomen, also der Dispersionskraft. Diese Wechselwirkung lässt sich mit Hilfe der Quantenmechanik erklären: Der Erwartungswert des elektrischen Dipolmoments eines einzelnen Atoms verschwindet normalerweise, d.h. über die Zeit gemittelt ist die Ladungsverteilung der Elektronen sphärisch symmetrisch. In einer kurzen Momentaufnahme ist dies aber nicht der Fall, sondern die Ladungsverteilung weist Dipol- und auch Multipolmomente auf. Ein solch induziertes Dipolmoment erzeugt ein elektrisches Feld, das am Ort eines anderen Atoms wiederum ein Dipolmoment erzeugt.

Ein Beispiel für die Wirkung der Van-der-Waals-Kraft ist Graphit. Hier werden die C-Atom-Lagen durch diese Kraft zusammengehalten. Dass die Kräfte sehr gering sind, kann man daran erkennen, dass sich beim Schreiben mit einem Bleistift die Schichten leicht ablösen.

Pauliabstoßung

Das Pauli-Prinzip besagt, dass Elektronen, die sich am selben Ort befinden, sich in mindestens einer Quantenzahl unterscheiden müssen. Wenn der Cantilever die Oberfläche berührt, so überlappen die Elektronenorbitale. Bei der Überlappung von voll besetzten Elektronenorbitalen werden die Elektronen in unbesetzte Orbitale höherer Energie gezwungen. Der damit verbundene Energiezuwachs des Gesamtsystems führt zu einer starken repulsiven Kraft. Die Reichweite liegt unterhalb von 0,1 nm [Bar06].

2.2 Die Kraftspektroskopie

Mit einem Rasterkraftmikroskop kann man nicht nur Oberflächen abbilden, sondern auch Kräfte, die zwischen dem Cantilever und der Oberfläche wirken, bestimmen. Dazu betrachtet man den Cantilever als Feder. Über das Hook'sche Gesetz

$$\vec{F} = -k \Delta \vec{z} \quad (2.6)$$

kann man die Kraft F bestimmen. Dabei ist k die Federkonstante des Cantilevers und Δz die Auslenkung des Cantilevers aus der Ruheposition. Mit einem Cantilever können sehr kleine Kräfte (im Piconewton-Bereich) detektiert werden.

Die Kraftspektroskopie hat ein breites Anwendungsspektrum, zum Beispiel untersucht man die Entfaltung von Proteinen, oder, wie in dieser Arbeit, die Wechselwirkung von Rezeptor - Ligand - Bindungen. Der Rezeptor ist das Protein PhoB und der Ligand die DNA. Für die Untersuchung von spezifischen Dissoziationskräften zwischen Molekülen müssen der Cantilever und die Oberfläche mit diesen Molekülen funktionalisiert werden. Die dafür nötigen Schritte werden im Material und Methoden - Teil erläutert.

Die Proteine werden auf der Oberfläche immobilisiert, während die DNA an den Cantilever gebunden wird. Um die spezifischen Dissoziationsereignisse beobachten zu können, verwendet man einen PEG-Linker (Polyethylenglykol) zwischen der DNA und dem Cantilever. Der Linker hat eine Länge von ungefähr 30 nm. Durch den PEG-Linker erhält die DNA eine höhere sterische Flexibilität, das heißt, dass man die Möglichkeit einer Bindung der DNA an das Protein aufgrund der größeren räumlichen Erreichbarkeit erhöht. Die Dehnbarkeit des Linkers führt zu einem speziellen Abriss in der Kraft - Distanz - Kurve, wodurch sie von unspezifischen Wechselwirkungen unterscheidbar wird.

2.2.1 Aufnahme einer Kraft-Distanz-Kurve

Im Folgenden wird nun das Prinzip einer Kraft-Distanz-Kurve erläutert. Der funktionalisierte Cantilever wird der Oberfläche angenähert. Dabei wird die Verbiegung des Cantilevers in Abhängigkeit des Abstandes zwischen Cantileverspitze und Oberfläche gemessen, siehe Abbildung 2.3.

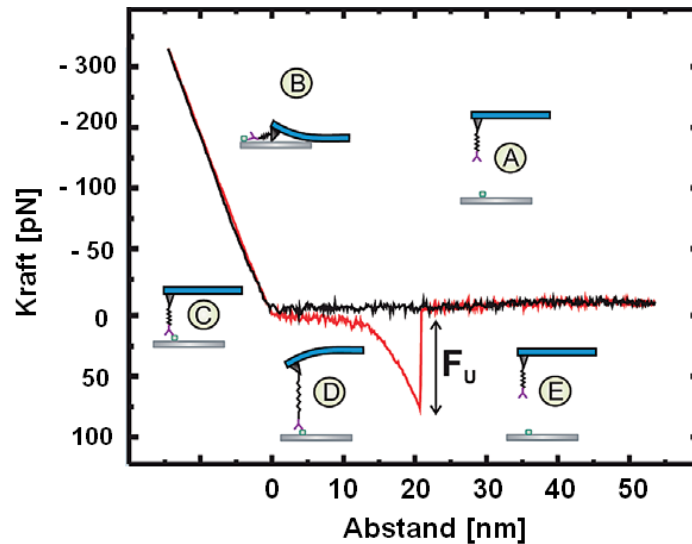


Abbildung 2.3: Kraft-Distanz-Kurve aus [EGH06]. Erläuterungen siehe Text.

- A. Vor dem Kontakt von Cantileverspitze und Oberfläche kommt es zu keiner Verbiegung des Cantilevers, da keine Kräfte auf ihn wirken.
- B. Berührt der Cantilever die Oberfläche, so verbiegt sich der Cantilever langsam nach oben, bis eine vorgegebene Kraft erreicht wird. Während der Kontaktzeit kann die DNA an das Protein binden. Dann wird der Cantilever von der Oberfläche weggefahren.
- C. Zunächst geht der Cantilever in seine Ruheposition zurück. Hat sich während der Kontaktzeit ein DNA-Protein-Komplex ausgebildet, so wird beim weiteren Wegfahren der PEG-Linker gedehnt und der Cantilever verbiegt sich nach unten.
- D. Die steigende Kraft auf den Komplex bewirkt eine Dissoziation zwischen DNA und Protein. Der Cantilever springt in seine Ruheposition zurück.

2 Physikalische Grundlagen

E. Der Cantilever bleibt während dem weiteren Wegfahren in seiner Ruheposition.

Zwischen Schritt C und D können unspezifische Adhäsionen auftreten, weshalb die Spitze des Cantilevers auf der Oberfläche haften bleibt und der Cantilever sich nach oben durchbiegt. Erst wenn die Rückziehkraft die Adhäsionskraft übersteigt, springt der Cantilever in seine Ruheposition zurück. Tritt keine Adhäsion auf, kehrt der Cantilever beim Berührungsverlust zwischen Spitze und Oberfläche direkt in seine Ruheposition zurück. In Abbildung 2.4 ist eine Kraft-Distanz-Kurve mit einem Adhäsionspeak und anschließender Dissoziation eines DNA-Protein-Komplexes zu sehen.

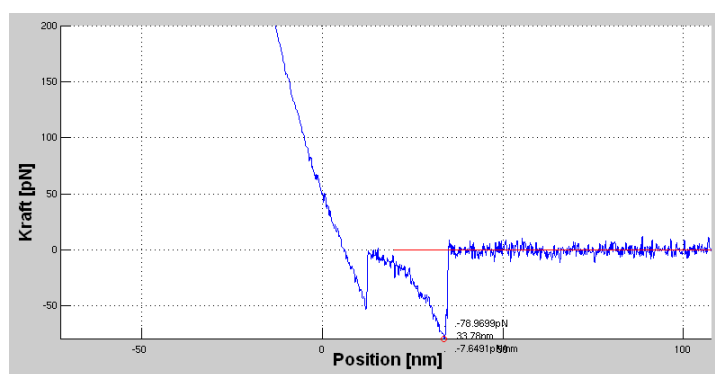


Abbildung 2.4: Kraft-Distanz-Kurve mit Adhäsionsereignis (aus einer meiner Messungen).

Mit Hilfe der Federkonstanten kann die Kraft berechnet werden, die im Moment des Abrisses auf den Komplex gewirkt hat; deren Bestimmung wird später erläutert.

2.3 Der Cantilever

Die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Einzelmolekülen erfordert das Ausüben und Detektieren von Kräften auf einen Molekülkomplex. Normalerweise hat dieses Element mikroskopische Dimension [BMW00].

Beim Rasterkraftmikroskop ist dieses zentrale Element der Cantilever. Diese werden industriell gefertigt und sind in einer großen Vielfalt bezüglich ihrer Eigenschaften wie Größe, Geometrie, Material und damit einhergehend Federkonstante und Resonanzfrequenz erhältlich. Diese Eigenschaften sind auf die zugrundeliegende Fragestellung und daraus folgenden zu untersuchenden Kräften abzustimmen. Ansonsten ist es möglich, dass man die Wechselwirkung, die man beobachten möchte, nicht detektieren kann.

2 Physikalische Grundlagen

Zum Beispiel werden bei der Untersuchung der DNA-Protein-Wechselwirkung, deren Bindungsstärke im PicoNewton-Bereich liegt, Cantilever verwendet, die eine Federkonstante im Bereich von pN/nm aufweisen. Würden Cantilever mit einer höheren Federkonstanten verwendet, wird der Cantilever aufgrund seiner Steifheit durch diese Kraft nicht verbogen. Damit wäre die Wechselwirkung der DNA mit dem Protein nicht beobachtbar.

Zunächst wird nun die Bewegung eines Cantilevers rein mathematisch betrachtet. Mit dieser Grundlage kann dann die Bestimmung der Federkonstanten eines Cantilevers erklärt werden.

Ein Cantilever kann als eindimensionaler harmonischer Oszillator betrachtet werden, unter der Voraussetzung, dass er

- kleine Auslenkungen (das bedeutet, dass der Cantilever ungefähr mit seiner Resonanzfrequenz schwingen kann) und
- eine geringe Dämpfung (was bedeutet, dass sich der Cantilever nicht zu nah an der Oberfläche befinden darf)

erfährt.

Die Bewegungsgleichung (auch Langevin-Gleichung genannt) lautet dann in der komplexen Schreibweise:

$$m\ddot{q}(t) = -\gamma\dot{q}(t) - kq(t) + F_0e^{i\omega t}. \quad (2.7)$$

Dabei entspricht

- $m\ddot{q}(t)$ der Gesamtkraft, die sich aus folgenden Kräften zusammensetzt:
- $\gamma\dot{q}(t)$ ist die viskosen Dämpfung, und
- $kq(t)$ ist die Rückstellkraft, die beide der Bewegung entgegenwirken.
- $F_0e^{i\omega t}$ ist die zeitabhängige, durch die Brownsche Molekularbewegung auf den Cantilever wirkende Kraft.

Zur Lösung dieser Differentialgleichung stellt man sie wie folgt um:

$$\ddot{q}(t) + \frac{\gamma}{m}\dot{q}(t) + \omega_0^2q(t) = \frac{F_0}{m}e^{i\omega t}, \quad (2.8)$$

2 Physikalische Grundlagen

mit

$$\omega_0 = \sqrt{\frac{k}{m}}. \quad (2.9)$$

Die allgemeine Lösung einer Differentialgleichung setzt sich aus

$$q(t) = q_{hom}(t) + q_{part}(t) \quad (2.10)$$

zusammen. $q_{part}(t)$ ist die partikuläre, d.h. eine spezielle Lösung, und $q_{hom}(t)$ ist die Lösung der homogenen Differentialgleichung:

$$\ddot{q}(t) + \frac{\gamma}{m}\dot{q}(t) + \omega_0^2 q(t) = 0. \quad (2.11)$$

Zur Lösung der homogenen Gleichung wählt man als Lösungsansatz:

$$q_{hom}(t) = Ce^{-ivt}, \quad C \in \mathbb{C}. \quad (2.12)$$

Eingesetzt in die homogene Differentialgleichung erhält man

$$v^2 + i\frac{\gamma}{m}v + \omega_0^2 = 0. \quad (2.13)$$

Unter Verwendung der quadratischen Ergänzung folgt als Lösung:

$$v = \pm \sqrt{\frac{\gamma^2}{4m^2} - \omega_0^2} - \frac{i\gamma}{2m}. \quad (2.14)$$

Für eine kleine Dämpfung, d.h. $\omega_0 > \frac{\gamma}{2m}$, folgt

$$\sqrt{\frac{\gamma^2}{4m^2} - \omega_0^2} = i\tilde{\omega}_0. \quad (2.15)$$

$\tilde{\omega}_0$ ist die durch die Reibung reduzierte Resonanzfrequenz. Damit gilt

$$v = \pm i\tilde{\omega}_0 - \frac{i\gamma}{2m}. \quad (2.16)$$

Setzt man dies in den Lösungsansatz ein, erhält man als allgemeinste Lösung

$$q_{hom}(t) = e^{-\frac{\gamma t}{2m}} \left(C_1 e^{i\tilde{\omega}_0 t} + C_2 e^{-i\tilde{\omega}_0 t} \right). \quad (2.17)$$

Mit

$$C_1 = \frac{A}{2} e^{i\phi}, \quad (2.18)$$

$$C_2 = \frac{A}{2} e^{-i\phi} \quad (2.19)$$

2 Physikalische Grundlagen

(siehe Anhang A) erhält man als Lösung der homogenen Differentialgleichung

$$q_{hom}(t) = Ae^{-\frac{\gamma t}{2m}} \cos(\tilde{\omega}_0 t + \phi). \quad (2.20)$$

Diese Bewegung beschreibt den Einschwingvorgang und klingt exponentiell ab.

Um eine Lösung der inhomogenen Differentialgleichung zu finden, wählt man als Lösungsansatz

$$q_p(t) = q_0 e^{i\omega t}. \quad (2.21)$$

Setzt man diesen in die Bewegungsgleichung ein, erhält man

$$q_0 = \frac{F_0}{m(\omega_0^2 - \omega^2) + i\gamma\omega}. \quad (2.22)$$

Damit lautet

$$q_p(t) = \frac{F_0}{m(\omega_0^2 - \omega^2) + i\gamma\omega} e^{i\omega t}. \quad (2.23)$$

Die physikalische Lösung ist der Realteil von $q_p(t)$:

$$\operatorname{Re}[q_p(t)] = \frac{F_0}{m^2(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + \gamma^2\omega^2} \left(m(\omega_0^2 - \omega^2) \cos \omega t + \gamma\omega \sin \omega t \right). \quad (2.24)$$

Diese Lösung lässt sich schreiben als (siehe Anhang B):

$$\operatorname{Re}[q_p(t)] = \frac{F_0}{\sqrt{m^2(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + \gamma^2\omega^2}} \cos(\omega t + \Phi) \quad (2.25)$$

mit

$$\Phi = \arctan\left(\frac{\gamma\omega}{m(\omega_0^2 - \omega^2)}\right). \quad (2.26)$$

Da der Cantilever ungefähr mit der Resonanzfrequenz schwingt, folgt mit der Näherung $\omega \simeq \omega_0$:

$$(\omega_0^2 - \omega^2)^2 = ((\omega_0 - \omega)(\omega_0 + \omega))^2 \simeq 4\omega_0^2(\omega_0 - \omega)^2. \quad (2.27)$$

Damit lautet die partikuläre Lösung

$$q_{part}(t) = \frac{F_0}{2m\omega_0 \sqrt{(\omega_0 - \omega)^2 + \frac{\gamma^2}{4m^2}}} \cos(\omega t + \Phi). \quad (2.28)$$

Dies ist eine harmonische Schwingung mit der Kreisfrequenz ω , der Amplitude $\frac{F_0}{2m\omega \sqrt{(\omega_0 - \omega)^2 + \frac{\gamma^2}{4m^2}}}$ und der Phasenverschiebung Φ gegenüber den anregenden Schwingung. Die Amplitude und die Phasenverschiebung hängen neben der Frequenz auch von der viskosen Dämpfung γ ab.

2.3.1 Bestimmung der Federkonstanten

Der Cantilever wird, wie bereits zuvor beschrieben, als Feder benutzt, um über das Hook'sche Gesetz Kräfte zu messen. Die Auslenkung Δz ist bekannt, da sie der Ausdehnung des z-Piezoelements entspricht. Um die Kraft bestimmen zu können, benötigt man also noch die Federkonstante. Bei der Herstellung von Cantilevern sind die lateralen Abmessungen gut definiert, aber die Dicke des Cantilevers unterliegt Schwankungen. Da die Federkonstante von der dritten Potenz der Dicke abhängt, führt dies zu einer erheblichen Unsicherheit der Federkonstante [SLMW95, CS05]. Damit muss sie für jeden Cantilever experimentell bestimmt werden.

Zur Bestimmung der Federkonstanten wurden verschiedene Methoden entwickelt, wobei die Methode auf die Cantilevereigenschaften, wie zum Beispiel der Größenordnung der Federkonstanten abzustimmen ist. Da in dieser Arbeit die Thermal Noise Methode [HB93] verwendet wird, wird auf die anderen Methoden nicht eingegangen (für weitere Informationen, siehe zum Beispiel [LM02]).

Die *Thermal Noise Methode* beruht auf dem Äquipartitionstheorem (auch Gleichverteilungssatz genannt), das besagt, dass die thermische Energie pro Freiheitsgrad gleich $k_B T/2$ sind.

Wenn man annimmt, dass der Cantilever eine ideale Feder mit der Federkonstanten k ist, so kann der Cantilever als harmonischer Oszillator betrachtet werden, der durch den Hamiltonfunktion

$$H = \frac{p^2}{2m} + \frac{1}{2}m\omega_0^2 q^2 \quad (2.29)$$

beschrieben wird. Dabei ist q die verallgemeinerte Ortskoordinate und p der Impuls. Nach dem Äquipartitionstheorem gilt nun

$$\frac{1}{2}m\omega_0^2 \langle q^2 \rangle = \frac{1}{2}k_B T. \quad (2.30)$$

Mit Gleichung (2.9) folgt

$$k = \frac{k_B T}{\langle q^2 \rangle}. \quad (2.31)$$

Die Messung der thermischen Fluktuationen des freien Endes des Cantilevers ermöglicht also die Bestimmung der Federkonstanten. Die thermischen Fluktuationen sind die Auslenkungen des Cantilevers aus der Ruhelage aufgrund der Brownschen Molekularbewegung des umgebenden Mediums. Man bezeichnet es auch als thermisches Rauschen.

2 Physikalische Grundlagen

Die mittlere quadratische Auslenkung $\langle q^2 \rangle$ entspricht der Fläche unter dem Resonanzpeak im „Energiespektrum“, dabei wird die quadrierte Amplitude in Abhängigkeit von der Frequenz aufgetragen, abzüglich des weißen Rauschens. Die Fläche berechnet man, indem man die quadrierte Fouriertransformierte der Bewegungsgleichung $FT[q(t)] = q(\omega')$ berechnet:

$$\langle q^2 \rangle = \frac{1}{2} \int_0^\infty q^2(\omega') d\omega'. \quad (2.32)$$

Mit

$$q(\omega') = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^\infty q(t) e^{-i\omega' t} dt \quad (2.33)$$

und

$$q(t) = \frac{F_0}{2m\omega \sqrt{(\omega_0 - \omega)^2 + \frac{\gamma^2}{4m^2}}} \cos(\omega t + \Phi) \quad (2.34)$$

$$= \operatorname{Re} \left[\frac{F_0}{2m\omega \sqrt{(\omega_0 - \omega)^2 + \frac{\gamma^2}{4m^2}}} e^{i\omega t} \right] \quad (2.35)$$

erhält man

$$\langle q^2 \rangle = \operatorname{Re} \left[\frac{1}{2} \int_0^\infty \left(\frac{1}{\sqrt{2\pi}} \frac{F_0}{2m\omega \sqrt{(\omega_0 - \omega)^2 + \frac{\gamma^2}{4m^2}}} \int_{-\infty}^\infty e^{i(\omega - \omega')t} dt \right)^2 d\omega' \right]. \quad (2.36)$$

In dieser Gleichung lässt sich die Fourierdarstellung der Delta-Distribution identifizieren:

$$\frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^\infty e^{i(\omega - \omega')t} dt = \delta(\omega - \omega'). \quad (2.37)$$

Damit vereinfacht sich $\langle q^2 \rangle$ zu

$$\langle q^2 \rangle = \sqrt{\frac{\pi}{2}} \int_0^\infty \frac{F_0^2}{4m^2 \omega'^2 \left((\omega_0 - \omega')^2 + \frac{\gamma^2}{4m^2} \right)} d\omega'. \quad (2.38)$$

Der Peak im Energiespektrum hat also die Form einer Lorentzkurve und durch einen Fit an die Messdaten können die Parameter der Lorentzkurve und damit $\langle q^2 \rangle$ bestimmt werden.

2 Physikalische Grundlagen

Da die Quadrantendiode eine Spannungsänderung misst, muss dieses Signal in die Einheit nm umgerechnet werden. Das gemessene Energiespektrum hat zunächst die Einheit V^2/Hz , was in nm^2/Hz umgerechnet werden muss. Dazu fährt man eine Kraft-Distanz-Kurve auf einer Goldoberfläche (mit dieser vermeidet man starke elektrostatische Wechselwirkungen). Im Kontaktbereich erhält man eine Gerade, deren Steigung die Maßeinheit V/nm hat. Jetzt gilt

$$\text{Deflection}[\text{nm}] = \text{InvOLS} \left[\frac{\text{nm}}{\text{V}} \right] \cdot \text{Deflection}[\text{V}]. \quad (2.39)$$

InvOLS ist die sogenannte inverse optische Cantileversensitivität. Damit berechnet sich die Federkonstante zu

$$k = \frac{k_B T}{\langle U^2 \rangle \text{InvOLS}^2 \chi^2}, \quad (2.40)$$

wobei $\langle U^2 \rangle$ die mittlere quadratische Cantileverauslenkung in Volt angibt. χ^2 ist ein Korrekturfaktor, der verschiedene Korrekturen enthält, zum Beispiel wird darin berücksichtigt, dass man mit der Photodiode nicht die Auslenkung des Cantilevers, sondern die Neigung am Ende des Federbalkens bestimmt [BJ95]. Normalerweise verwendet man zur Kalibration die erste Mode, da sie das beste Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufweist.

Des Weiteren geht in den Korrekturfaktor die Form des Cantilevers ein. Für V-förmige Cantilever, wie sie hier in der Arbeit verwendet werden, wurde in [SDH01] ein Korrekturfaktor von 0,97 berechnet.

Der Fehler der *Thermal Noise Methode* liegt, wie bei den anderen Methoden auch, bei 10-15%. Der Vorteil gegenüber den anderen Methoden ist, dass der Cantilever während der Kalibration nicht beschädigt wird.

Wenn die Federkonstante bestimmt ist, können die gemessenen Kraft-Distanz-Kurven ausgewertet werden. Die theoretischen Grundlagen werden dazu im folgenden Abschnitt erläutert.

2.4 Kräfte und Kinetik in der Kraftspektroskopie: Die Auswertung von Kraft-Distanz-Kurven

Die Kraftspektroskopie ermöglicht die Messung von Dissoziationskräften. Zunächst wird auf den Fall des thermischen Gleichgewichts eingegangen [Kri97, Upa06]. Darauf folgt die Beschreibung der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung unter dem Einfluss einer externen Kraft, wie sie bei den kraftspektroskopischen Messungen auftritt.

2.4.1 Die Wechselwirkung im thermodynamischen Gleichgewicht

Ein Rezeptormolekül R besitzt eine definierte Bindungsstelle, an welcher ein Ligandmolekül L spezifisch binden kann. Die Assoziationsreaktion



ist proportional zu der Rezeptor $[R]$ - als auch der Ligandenkonzentration $[L]$. Das bedeutet, dass sich die Zunahme der Rezeptor-Ligand-Konzentration $[RL]$ mit folgender Differentialgleichung

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_a[R][L] \quad (2.42)$$

beschreiben lässt. k_a nennt man Assoziationsratenkonstante.

Die Dissoziationsreaktion



ist eine sogenannte monomolekulare Reaktion. Das heißt, dass keine anderen Moleküle für diese Reaktion erforderlich sind. Damit gilt für die Dissoziation

$$\frac{d[RL]}{dt} = -k_d[RL], \quad (2.44)$$

mit der Dissoziationsratenkonstante k_d .

Es bilden sich also im thermodynamischen Gleichgewicht genauso viele neue Rezeptor-Ligand-Komplexe dissoziieren. Damit gilt für die Rezeptor-Ligand-Konzentration

$$\frac{d[RL]}{dt} = 0. \quad (2.45)$$

Daraus folgt nun

$$k_a[R][L] = k_d[RL] \quad (2.46)$$

2 Physikalische Grundlagen

und man erhält die so genannte Gleichgewichtskonstante

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} = \frac{[R][L]}{[RL]}. \quad (2.47)$$

K_D ist ein Maß für die Bindungsstärke (Affinität) einer Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung: Je größer die Assoziationsratenkonstante, bzw. je kleiner die Dissoziationsratenkonstante, desto größer ist die Affinität der Bindung.

Der Kehrwert der Gleichgewichtskonstante beschreibt die mittlere Lebensdauer der Bindung des Rezeptor-Ligand-Komplexes.

Biologische und chemische Reaktionen laufen nach den Gesetzen der Thermodynamik ab. Die Thermodynamik stellt die Beziehungen zwischen verschiedenen Energieformen her. Mit ihr können Fragen ob, unter welchen Bedingungen und in welchem Umfang eine Umsetzung von Stoffen abläuft, beantwortet werden. Da biologische Reaktionen unter konstanter Temperatur und konstantem Druck ablaufen, ist hier die freie Enthalpie G das relevante thermodynamische Potential:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S. \quad (2.48)$$

Dabei bezeichnen H die Enthalpie, T die Temperatur, sowie S die Entropie.

Es gilt für $\Delta G < 0$, dass die Reaktion von selbst abläuft (ohne Energiezufuhr),
 $\Delta G = 0$, dass die Reaktion sich im Gleichgewichtszustand befindet, und
 $\Delta G > 0$, dass die Reaktion nur unter Energiezufuhr abläuft.

Mit Hilfe der freien Standardenthalpie ΔG^0 läßt sich die freie Enthalpie schreiben als

$$\Delta G = \Delta G^0 - RT \ln K_D, \quad (2.49)$$

mit der universellen Gaskonstante $R = N_A \cdot k_B$, definiert als Produkt der Avogadro- und der Boltzmannkonstanten.

Im thermodynamischen Gleichgewicht gilt $\Delta G = 0$ und damit $\Delta G^0 = RT \ln K_D$.

Für Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen gilt $\Delta G^0 < 0$. Das bedeutet, dass die Reaktionsrichtung auf der Produktseite liegt und damit die Assoziation spontan abläuft, während die Dissoziation eine Energiezufuhr erfordert. Da thermische Fluktuationen auftreten, kann die Dissoziation eines Rezeptor-Ligand-Komplexes als thermisch aktiviertes Überwinden einer endlich hohen Potentialbarriere betrachtet werden, siehe

Abbildung 2.5.

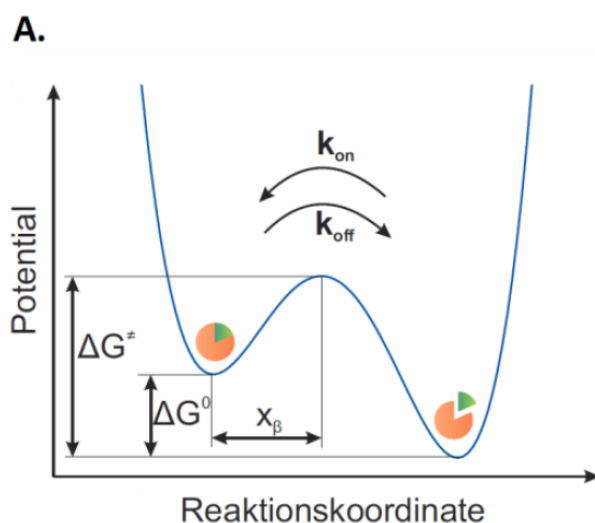


Abbildung 2.5: Reaktionssystem mit zwei metastabilen Zuständen. Durch thermische Fluktuationen ist ein Überwinden der Potentialbarriere möglich. Entweder erfolgt eine Komplexbildung oder eine Dissoziation [Wal09].

Über die Dissoziationsratenkonstante lässt sich die Höhe ΔG^\ddagger der Potentialbarriere bestimmen:

$$k_d = C e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{k_B T}}. \quad (2.50)$$

Diese Gleichung stellt also einen Zusammenhang her zwischen der Stärke der Bindung des Rezeptor-Ligand-Komplexes, ΔG^\ddagger , der Temperatur und der Anzahl der Rezeptor-Ligand-Komplexe, die pro Zeiteinheit thermisch aktiviert dissoziieren.

Den Faktor C hat Kramer bestimmen können [Kra40]. Dafür hat er die Bewegungsgleichung für die Bindung im Potential aufgestellt. Dabei wird die Bewegung durch Kraftfluktuationen angeregt und durch Viskosität und Reibung gedämpft. Er hat diese Bewegungsgleichung für zwei Grenzfälle gelöst: Beim ersten Fall wird eine hohe Viskosität betrachtet. Eine hohe Viskosität bedeutet, dass die Wirkung der Brownschen Kräfte auf die Geschwindigkeit des Teilchens viel größer ist als die der äußeren Kraft. Beim zweiten Fall wird eine niedrige Viskosität, sowie eine oszillierende Bewegung des Objektes, wenn keine Brownschen Kräfte es wirken, angenommen. Dadurch führen die Brownschen Kräfte zu einer kleinen Variation der Energie während

der Dauer einer Schwingung.

Die Auswirkung einer externen Kraft auf den Rezeptor-Ligand-Komplex wird im nächsten Abschnitt betrachtet.

2.4.2 Dissoziation unter einer externen Kraft

Bei kraftspektroskopischen Messungen wird die Dissoziation nicht durch thermische Fluktuationen, sondern durch eine externe Kraft, die über den Cantilever auf den Rezeptor-Ligand-Komplex ausgeübt wird, induziert. Die Grundlagen zur Beschreibung dieses Vorganges haben Bell, Evans und Ritchie gelegt [Bel78] [ER97].

Die Manipulation am Potential durch das Anlegen einer externen Kraft f senkt die Potentialbarriere zwischen gebundenem und dissoziiertem Zustand:

$$\Delta G^\ddagger(f) = \Delta G^\ddagger - f \cdot x_\beta, \quad (2.51)$$

dabei ist x_β der Abstand zwischen dem Minimum, das dem metastabilen Zustand entspricht, und dem Maximum der Potentialbarriere, siehe Abbildung 2.6.

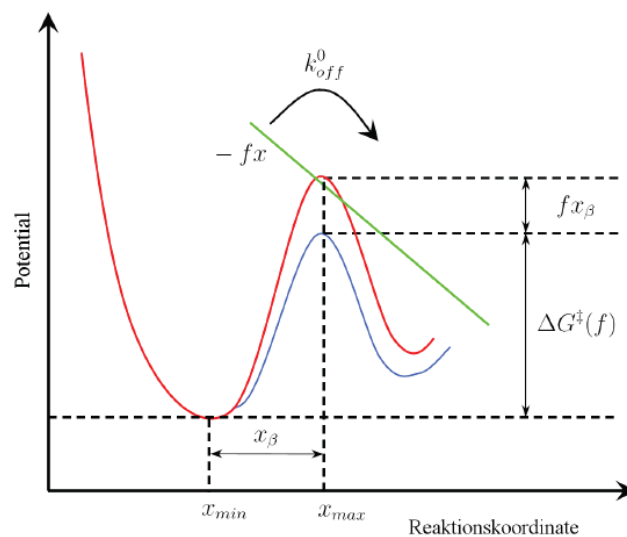


Abbildung 2.6: Absenkung der Potentialbarriere durch eine externe Kraft [Har09].

Damit wird die Dissoziationsratenkonstante k_d zeit- und kraftabhängig:

$$k'_d(f) = k_d e^{\frac{f x_\beta}{k_B T}}. \quad (2.52)$$

2 Physikalische Grundlagen

Wirkt eine Kraft, so verringert dies die Lebensdauer, welche durch die Dissoziationskonstante bestimmt ist, und erhöht die Zerfallswahrscheinlichkeit des Komplexes.

Allen Übergängen mit einem metastabilen Zustand ist gemein, dass sie auf einer viel längeren Zeitskala stattfinden als lokale Ortsschwankungen [HGIW85]. Deshalb ist die Dissoziationsratenkonstante $k'_d(f)$ nur von der momentanen externen Kraft abhängig. Da man sich im thermischen Gleichgewicht befindet, nehmen die vorherigen Zustände des Komplexes keinen Einfluss auf den aktuellen Zustand des Rezeptor-Ligand-Komplexes. Die Überlebenswahrscheinlichkeit der Bindung unter einer externen Kraft kann als ein Markov-Prozess erster Ordnung beschrieben werden [VK92]:

$$\dot{p}(t) = -k'_d(t) p(t). \quad (2.53)$$

Eine weitere Annahme ist, dass die Kraft $f(t)$ nur von der Auslenkung $s = v \cdot t$ und nicht von der Ziehgeschwindigkeit v abhängig ist:

$$f(t) = F(v \cdot t) = F(s). \quad (2.54)$$

Für eine konstante Ziehgeschwindigkeit ergibt sich

$$f(t) = k_{eff} \cdot v \cdot t = r \cdot t. \quad (2.55)$$

$r = k_{eff} \cdot v$ bezeichnet man als Belastungsrate, engl. loading rate. k_{eff} ist die effektive Federkonstante und setzt sich aus der Federkonstante des Cantilevers und der Elastizität der Moleküle zusammen.

Bei den Messungen mit dem AFM ist die auf die Bindung wirkende Kraft und die Verteilung der einzelnen Abrisskräfte bekannt. Deshalb wird die Zeit durch die Kraft substituiert und die kraftabhängige Überlebenswahrscheinlichkeit ermittelt. Unter der bereits erwähnten Annahme, dass nur die Kraft zeitabhängig ist, also $p(t) = p_v(f(t))$ und der Voraussetzung, dass zur Zeit $t = 0$ die Bindung besteht, also $p(t = 0) = p_v(f = f_{min}) = 1$, folgt für die Überlebenswahrscheinlichkeit der Bindung

$$p_v(f) = \exp \left[-\frac{1}{v} \int_{f_{min}}^f df' \frac{k'_d(f')}{F'(F^{-1}(f'))} \right]. \quad (2.56)$$

f_{min} bezeichnet die Kraft, unterhalb derer die Dissoziationskräfte während der Messung nicht mehr von thermischen Fluktuationen unterscheidbar sind.

Eine weitere notwendige Annahme ist, dass $f(t) = F(s)$ streng monoton steigend ist, damit die Umkehrfunktion F^{-1} existiert. Mit den Gleichungen (2.52) und (2.54),

2 Physikalische Grundlagen

sowie der Annahme, dass x_β konstant ist, kann die Integration ausgeführt werden

$$p_v(f) = \exp \left[\frac{k'_d}{v k_{eff}} \frac{e^{\frac{x_\beta f}{k_B T}} - e^{\frac{x_\beta f_{min}}{k_B T}}}{\frac{x_\beta f}{k_B T}} \right]. \quad (2.57)$$

Aus dem Maximum der Verteilung $-\frac{dp_v(f)}{df}$ erhält man die wahrscheinlichste Dissoziationskraft

$$F_{max} = \frac{k_B T}{x_\beta} \ln \left(\frac{x_\beta r}{k_d k_B T} \right). \quad (2.58)$$

Diesen Zusammenhang nutzt die dynamische Kraftspektroskopie. Bestimmt man die maximalen Dissoziationskräfte für verschiedene Belastungsraten und trägt diese abhängig von der Belastungsrate halblogarithmisch auf, erhält man eine Gerade. Die Steigung ist proportional zur Reaktionslänge x_β und aus dem y-Achsenabschnitt kann die Dissoziationsratenkonstante k_d bestimmt werden.

3 Biologische Grundlagen

Dieses Kapitel dient dem Verständnis der zu untersuchenden Rezeptor - Ligand - Wechselwirkung auf biologischer Basis. Als Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung wird die molekulare Erkennung von einem hochspezifischen Bindungspartner (Ligand) durch ein Protein (Rezeptor) bezeichnet. In dieser Arbeit ist der Ligand ein DNA-Strang. Der Ligand wird nicht kovalent, sondern über Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe oder hydrophile Wechselwirkungen in der Bindungstasche des Rezeptors gebunden [Det99].

Zu Beginn wird auf Proteine und DNA im Allgemeinen eingegangen. Darauf aufbauend wird die DNA-Protein-Wechselwirkung während der Genexpression erklärt, um abschließend einen Einblick in den Aufbau und die Interaktion des Transkriptionsaktivators PhoB mit den am Phosphatstoffwechsel beteiligten DNA-Sequenzen zu geben.

Die Darstellung beschränkt sich dabei auf die zum Verständnis der durchgeführten Messungen grundlegenden Zusammenhänge. Als weiterführende Literatur seien zum Beispiel [BTS06] genannt.

3.1 Proteine

Betrachtet man das Trockengewicht normaler Zellen, so besteht dieses mengenmäßig zu mehr als 50 % aus Protein [BS99]. Proteine zählen zu den wichtigsten biologischen Molekülen. Sie sind modular aus Einzelkomponenten, den sogenannten Aminosäuren, aufgebaut, wobei deren Abfolge wesentlich die Eigenschaften des Proteins bestimmt. Proteine übernehmen viele verschiedene Aufgaben, unter anderem wirken sie in Form von Enzymen als Biokatalysatoren, oder leiten als regulatorische Proteine Signale weiter. Es gibt Strukturproteine, die für die Form und die Stabilität einer Zelle sorgen, und Proteine, die der Signaltransduktion im Organismus dienen.

3.1.1 Der Aufbau von Proteinen

Proteine werden am Ribosom synthetisiert. Dabei werden die 20 natürlich vorkommenden (proteinogenen) Aminosäuren in einer durch die DNA exakt vorgegebenen Reihenfolge zu einer linearen, unverzweigten Kette verknüpft.

Die 20 Standardamino­säuren sind bis auf das Prolin α -Aminosäuren, das heißt, dass sie am zentralen C-Atom eine Aminogruppe (-NH₂), eine Carboxylgruppe (-COOH) und ein Wasserstoffatom (-H) tragen und sich nur in der Seitenkette (-R) unterscheiden, siehe Abbildung 3.1. Prolin besitzt eine sekundäre Aminogruppe.

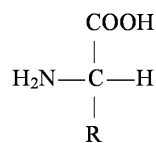


Abbildung 3.1: α -Aminosäuren-Struktur dargestellt in der Fischer-Projektion.

Die Seitenkette R ist für jede Aminosäure charakteristisch und bestimmt ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften. Eine Eigenschaft ist die Polarität. Unpolare Seitenketten enthalten Kohlenwasserstoff-Reste, welche der Aminosäuren hydrophobe Eigenschaften verleihen. Aminosäuren mit polaren Resten hingegen sind hydrophil. Deshalb werden die Aminosäuren anhand ihrer Polarität in drei Kategorien unterteilt: In unpolare, polare und geladene Aminosäuren, wie in der Tabelle in Abbildung 3.4 dargestellt.

Die Verbindung zweier Aminosäuren geschieht über die Peptidbindung (CO-NH). Diese entsteht durch Kondensation der Carboxylgruppe einer Aminosäure mit der Aminogruppe einer weiteren Aminosäure unter Wasserabspaltung. Dadurch entsteht eine Aminosäurenkette, auch Polypeptidkette genannt.

Damit ein Protein seine biologische Funktion erhält, muss in dem Organismus eine Faltung der Polypeptidkette in eine wohldefinierte dreidimensionale Struktur erfolgen. Zur Beschreibung der Proteinstruktur hat sich folgende Unterteilung bewährt.

- Die Primärstruktur ist die Abfolge der Aminosäuren der Polypeptidkette.
- Die Sekundärstruktur eines Proteins entsteht durch die Ausbildung von Was-

3 Biologische Grundlagen

serstoffbrückenbindungen zwischen den Carboxylgruppen und den Amino-
gruppen der Peptidkette. Die dabei am häufigsten vorkommenden Strukturen
sind die so genannte α -Helix und das β -Faltblatt: Die α -Helix ist eine Spiral-
struktur, bei der sich zwischen den wechselwirkenden Aminosäurepaaren 3
Aminosäuren befinden. Die Seitenketten R zeigen aus der α -Helix heraus, siehe
Abbildung 3.2.

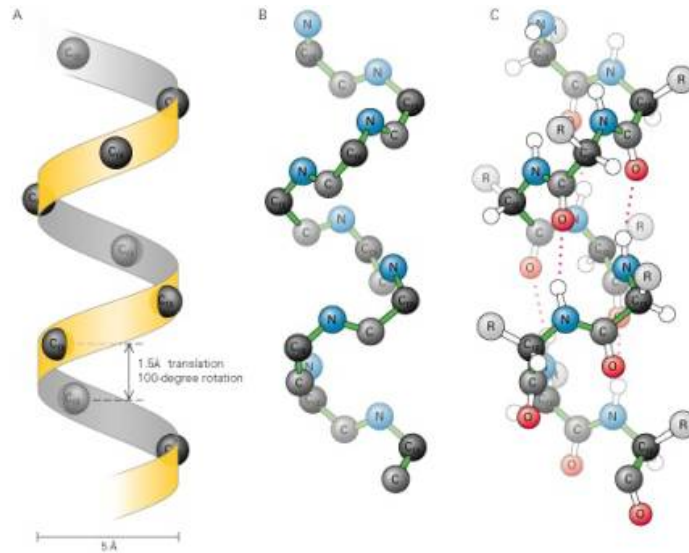


Abbildung 3.2: Darstellung einer rechtsgängigen α -Helix. A: Es werden nur die α -Kohlenstoffatome gezeigt. B: Darstellung des Rückgrats ($-N-C_{\alpha}-C-$). C: Darstellung der gesamten Helix. Die Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gepunktete Linien angedeutet [BTS00].

Das β -Faltblatt ist eine ziehharmonikaähnliche Struktur. Die Polypeptidketten eines Faltblattes nennt man β -Stränge, die unterschiedlich miteinander verknüpft werden können.

Bei der antiparallelen Verknüpfung besteht die Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Carboxylgruppe des einen Stranges und der Aminogruppe des anderen Stranges und umgekehrt. Bei der parallelen Verknüpfung wird die Wasserstoffbrücke der Carboxylgruppe des zweiten Stranges nicht mit der gegenüberliegenden Aminogruppe des ersten Stranges gebildet, sondern mit der Aminogruppe, die zwei Aminosäurenreste weiter auf dem ersten Strang liegt, siehe Abbildung 3.3. So ist dann jeder Aminosäurenrest des einen Stranges mit zwei Aminosäureresten des anderen Stranges verbunden. Ein β -Strang wird oft als

Pfeil dargestellt.

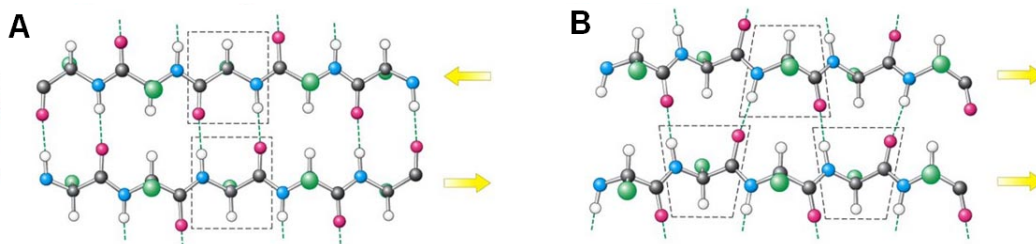


Abbildung 3.3: A: Antiparalleles Faltblatt, B: Paralleles Faltblatt [BTS06].

Die Stränge eines β -Faltblattes werden über eine β -Schleife, auch Haarnadelschleife oder *turn* genannt, verbunden. Sie besteht aus 4 Aminosäuren, wobei sich zwischen der ersten und der vierten Aminosäure die Wasserstoffbrückenbindung ausbildet.

Ein so genanntes *loop* ist ein weiteres Verbindungselement zwischen Helices oder Faltblättern. Er hat aber keine einheitliche Struktur wie der *turn*.

Auf weitere Strukturen wird hier nicht näher eingegangen.

- Die Tertiärstruktur beschreibt die dreidimensionale Anordnung der Sekundärstrukturelemente. Sie entsteht durch kovalente Wechselwirkungen wie Disulfidbrücken oder nicht-kovalente Wechselwirkungen wie ionische Bindungen und Van-der-Waals-Kräfte zustande.
- Die Quartärstruktur ist die Zusammenfassung mehrerer gleicher oder unterschiedlicher Tertiäreinheiten, falls das Protein aus mehreren Untereinheiten besteht.

Es stellt sich nun die Frage nach der biologischen Grundlage der Proteinsynthese, also woher der Organismus weiß, wie er welches Protein herstellen kann. Auf diese Fragestellung wird im nächsten Abschnitt eingegangen.

3 Biologische Grundlagen

Aminosäure	Einbuch- stabencode	Dreibuch- stabencode	Polarität der Seitenkette	Relative Häufigkeit [%] ^a
Alanin	A	Ala	unpolar	9.0
Arginin	R	Arg	positiv geladen	4.7
Asparagin	N	Asp	polar	4.4
Asparaginsäure	D	Asn	negativ geladen	5.5
Cystein	C	Cys	polar	2.8
Glutamin	Q	Gln	polar	3.9
Glutaminsäure	E	Glu	negativ geladen	6.2
Glycin	G	Gly	unpolar	7.5
Histidin	H	His	positiv geladen ^b	2.1
Isoleucin	I	Ile	unpolar	4.6
Leucin	L	Leu	unpolar	7.5
Lysin	K	Lys	positiv geladen	7.0
Methionin	M	Met	unpolar	1.7
Phenylalanin	F	Phe	unpolar	3.5
Prolin	P	Pro	unpolar	4.6
Serin	S	Ser	polar	7.1
Threonin	T	Thr	polar	6.0
Tryptophan	W	Trp	unpolar	1.1
Tyrosin	Y	Tyr	polar	3.5
Valin	V	Val	unpolar	6.9

^a Relative Häufigkeit der Aminosäuren in nicht-verwandten Proteinen, ^b Bei neutralem pH liegt gewöhnlich ein Gleichgewicht zwischen positiv geladener und polarer Form der Seitenkette vor

Abbildung 3.4: Auflistung der Aminosäuren mit Angabe des Einbuchstaben- und Dreibuchstaben-codes, sowie der Polarität der Seitenkette [BS99].

3.2 Nucleinsäuren

Die gesamte Erbinformation ist in den Desoxyribonucleinsäuren, DNA, enthalten [VS03]. Um diese Information in die Synthese von Proteinen zu übersetzen, wird die Ribonucleinsäure, RNA, benötigt. Die Nucleinsäuren sind neben den Proteinen, Kohlenhydraten und Fetten eine der Hauptgruppen der biologische relevanten Moleküle.

Nucleinsäuren sind aus Monomereinheiten, den sogenannten Nucleotiden, aufgebaut. Sie besitzen genau wie die Aminosäuren charakteristische Struktureigenschaften. Jedes Nucleotid setzt sich aus einer Phosphatgruppe, einem Zuckermolekül und einer Base zusammen. Bei der DNA sind die vier vorkommenden Basen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T). Bei der RNA befindet sich anstelle von Thymin Uracil (U). Diese Basen lassen sich anhand ihrer Grundstruktur in die

- Purinbasen Adenin und Guanin (Grundstruktur: Purin) und

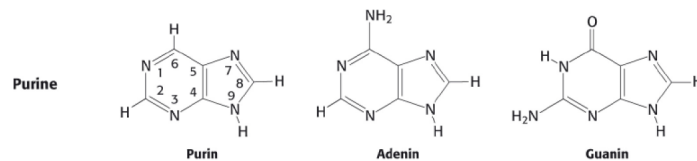


Abbildung 3.5: Struktur des Purins und der Purinbasen [BTS06].

- Pyrimidinbasen Cytosin, Thymin und Uracil (Grundstruktur: Pyrimidin)

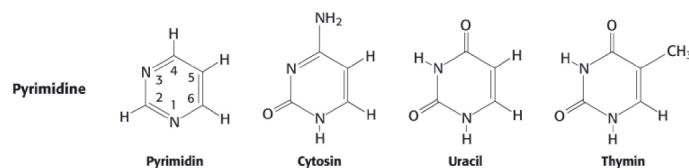


Abbildung 3.6: Struktur des Pyrimidins und der Pyrimidinbasen [BTS06].

unterteilen.

Das Zuckermolekül hat eine 5-gliedrige Ringstruktur, eine sogenannte Pentose. Der Zuckeranteil der RNA ist die Ribose. Die fünf Kohlenstoffatome werden von 1' bis

3 Biologische Grundlagen

5' nummeriert, um sie von den Kohlenstoffatomen der Base zu unterscheiden. Am C-Atom 1' ist die Base, am Atom 5' ist der Phosphatrest gebunden, siehe Abbildung 3.7. Der charakteristische Zucker der DNA ist die 2'-Desoxyribose, das heißt, dass die Hydroxylgruppe (OH) am Kohlenstoffatom 2' fehlt.

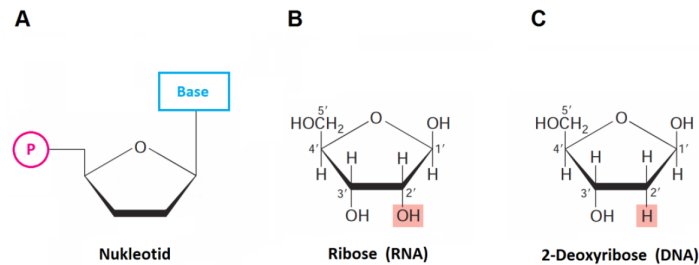


Abbildung 3.7: Aufbau der Nucleinsäuren. A: Struktur des Nucleotids. B: Ribose, Zuckereinheit der RNA. C: 2'-Desoxyribose, Zuckereinheit der DNA [Hor09].

Das Polymer Nucleinsäure entsteht, indem Zuckereinheiten, an denen jeweils eine der verschiedenen Basen gebunden ist, miteinander verknüpft werden. Dafür werden Phosphodiesterbindungen vom Atom C5' (auch 5'-Ende genannt) des Zuckers eines Nucleotids zum Atom C3' (3'-Ende) der Zuckereinheit eines anderen Nucleotids aufgebaut. Die Abfolge von aneinandergereihten Zucker-Phosphat-Einheiten wird als das Rückgrat der Nucleinsäuren bezeichnet.

Die Nucleinsäuren werden immer in 5'-3'-Richtung aufgebaut. Die spezifische Abfolge der Basen kodiert die genetische Information.

DNA liegt normalerweise als Doppelhelix vor. Es lagern sich zwei Einzelstränge aneinander, so dass sich zwei Basen gegenüber stehen. Dabei binden immer nur Adenin und Thymin über zwei Wasserstoffbrückenbindungen und Cytosin und Guanin über drei Wasserstoffbrückenbindungen.

Damit läßt sich aus der Sequenz des einen Stranges die des anderen Stranges ableiten, die Sequenzen sind also komplementär.

Jedes Basenpaar liegt bezüglich seines vorhergehenden Basenpaares um ungefähr 36° um die Längsachse der Helix gedreht vor. Eine vollständige Drehung wird folglich nach 10 Basen erreicht [Wat11].

Außerdem beträgt der Winkel, unter dem die beiden Zuckerreste an die beiden Basen eines Basenpaares gebunden sind, ungefähr 120° beziehungsweise 240° auf der anderen Seite. Beim Umeinanderwinden von zwei Einzelsträngen entstehen so seitli-

che Lücken, bei denen die Basen direkt an der Oberfläche liegen. Die kleineren Winkel führen zur Ausbildung einer kleinen Furche, während die große Furche aus den größeren Winkeln auf der anderen Seite entsteht. Die Basen in der großen Furche sind also besser zugänglich. Deshalb binden dort meistens die Proteine, die sequenzspezifisch mit der DNA wechselwirken [SP84].

Während der Genexpression wird die Basensequenz der DNA mit Hilfe der RNA in die Aminosäuresequenz der Proteine übersetzt. Die RNA wird nach ihrer Funktion in der Zelle klassifiziert:

- Die so genannte Messenger-RNA, kurz mRNA, ist die Matrix, die für die Aminosäuresequenz der Proteine verantwortlich ist.
- Die Transfer-RNA, kurz tRNA, ist für die Beschaffung der benötigten Aminosäuren zuständig, indem sie die Aminosäure an ihr 3'-Ende bindet und zum Ribosom befördert.
- Die ribosomale RNA, rRNA, ist ein Bestandteil der Ribosomen, welche die Bildung der Peptidbindung zum Aufbau eines Proteins ermöglicht.

Auf den Prozess der Genexpression wird im nächsten Abschnitt genauer eingegangen.

3.3 Genexpression

Zu den wichtigsten regulatorischen Prozessen in einem Organismus gehört die spezifische Erkennung und Bindung eines anderen Moleküls, wie zum Beispiel DNA, durch Proteine. Durch Protein-DNA-Wechselwirkungen werden die Genexpression und der gesamte Zell-Zyklus, unter anderem die DNA-Replikation, gesteuert.

Die Genexpression ist der Prozess des Umsetzens der genetischen Information in das entsprechende Genprodukt, zum Beispiel ein Protein. Sie erfolgt in mehreren Schritten, auf die hier kurz eingegangen wird.

- Zuerst findet die Transkription statt. Dabei wird die für die Proteinsynthese

3 Biologische Grundlagen

benötigte Information von der DNA abgelesen und in die mRNA übersetzt. Die mRNA wird nach der Synthese von der DNA abgespalten [VS03].

- Bevor die mRNA aus dem Zellkern ins Cytoplasma gelangen kann, wird sie prozessiert. Dies ist notwendig, damit die mRNA vom Ribosom erkannt werden kann. Auf die Details dieses Prozesses wird hier nicht näher eingegangen.
- Die Entschlüsselung des Codes in die Aminosäuresequenz geschieht in der Translation. Dabei codiert jede Sequenz von drei Basen der mRNA, Codon genannt, eine Aminosäure. Des Weiteren gibt es Codons als Signal zum Start oder zur Beendigung der Synthese einer Polypeptidkette. Die tRNA unterstützt die Translation, indem sie die benötigten Aminosäuren zur mRNA transportiert.
- Bei der Proteinreifung faltet sich das neu synthetisierte Protein teilweise mit Hilfe anderer Proteine in seine charakteristische Sekundär- und Tertiärstruktur.

Da eine Anpassung auf die sich ändernde Umgebung, wie zum Beispiel ein wechselndes Nährstoffangebot, möglich sein muss, bedarf es einer Steuerung der Genexpression. Diesen Vorgang nennt man Regulation der Genexpression beziehungsweise Genregulation. An jedem Schritt der Genexpression können regulatorische Faktoren einwirken und den Prozess steuern.

Bei den meisten Genen ist der wichtigste Schritt der Start der Transkription [Wat11]. Hier wird entschieden, ob ein Gen exprimiert wird oder nicht. Dieser Schritt ist bezüglich der Energieeffizienz der günstigste Punkt zur Regulation, da dadurch eine Vergeudung von Energie und Nährstoffressourcen vermieden wird.

Die Entscheidung wird nicht am Gen selbst, sondern an der regulatorischen Sequenz, dem sogenannten Promotor gefällt. Diese Region liegt meistens in der Nähe des Gens auf der DNA. An diesen Promotor kann ein Schlüsselprotein so binden, dass sich die räumliche Anordnung (Konformation) der DNA ändert und so die Transkription ermöglicht oder unterdrückt wird. Diese Schlüsselproteine nennt man Transkriptionsfaktoren. Ein aktivierender Transkriptionsfaktor wird auch Transkriptionsaktivator, ein hemmender Transkriptionsrepressor genannt.

Auf weitere Regulationsmechanismen wird hier nicht eingegangen. Im folgenden Abschnitt wird der in dieser Arbeit zu untersuchende Transkriptionsfaktor PhoB vorgestellt.

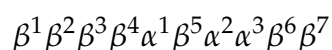
3.4 Der Transkriptionsaktivator PhoB

Phosphor ist in einem Organismus ein wesentlicher Bestandteil. Es wird zum Aufbau von Nucleinsäuren, Kohlenhydraten und Membranlipiden, sowie für den Energiestoffwechsel in Form von Adenosintriphosphat (ATP) benötigt. Bei dem Bakterium *Escherichia coli* werden die Gene der Proteine, die für die Aufnahme und Verwertung von Phosphor zuständig sind, durch das Zweikomponentensystem PhoR-PhoB reguliert.

PhoR ist eine Sensorkinase, die in der Zellmembran verankert ist und die externe Phosphatkonzentration detektieren kann. Des Weiteren kontrolliert sie die Aktivität von PhoB.

Wenn die Phosphatkonzentration außerhalb des Bakteriums unter $4 \cdot 10^{-6}$ mol/L sinkt [Wan93, BSMS05], liegt PhoR in aktivierter Form vor. In dieser Konformation überträgt PhoR einen γ -Phosphatrest eines ATPs auf PhoB. Diese Phosphorylierung bewirkt eine Konformationsänderung des PhoBs, so dass zwei PhoBs an den beiden Bindungsstellen der DNA binden können. Dies hat wiederum eine Konformationsänderung der DNA an der Bindungsstelle zur Folge. Dieser Vorgang und die Rekrutierung der Polymerase durch das PhoB, ermöglicht den Start der Transkription. Wenn die externe Phosphatkonzentration wieder ansteigt, wird PhoB durch PhoR dephosphoryliert. Dadurch sinkt die Bindungsaffinität von PhoB für die DNA und somit auch die Transkription der dazugehörigen Gene. PhoB reguliert mehr als 30 Gene, die zum größten Teil bei der Aufnahme und Umsetzung von Phosphat eine Rolle spielen [HW10].

Der Transkriptionsaktivator PhoB setzt sich aus 229 Aminosäuren zusammen, wobei zwei strukturelle Domänen zu unterscheiden sind, siehe Abbildung 3.8. Die Erste ist die sogenannte regulatorische Phosphorylierungsdomäne im N-terminalen Bereich und umfasst die Aminosäuren 1-124. Mit diesem Bereich kann PhoR wechselwirken und eine Konformationsänderung hervorrufen, so dass PhoB in seiner inaktiven oder aktivierten Form vorliegt. Die zweite Domäne ist die DNA-Bindedomäne (DBD) im C-terminalen Bereich von Aminosäure 131-229. Die Sekundärstruktur der DBD setzt sich aus 7 Faltblättern und 3 Helices zusammen, deren Abfolge



ist [Wan93].

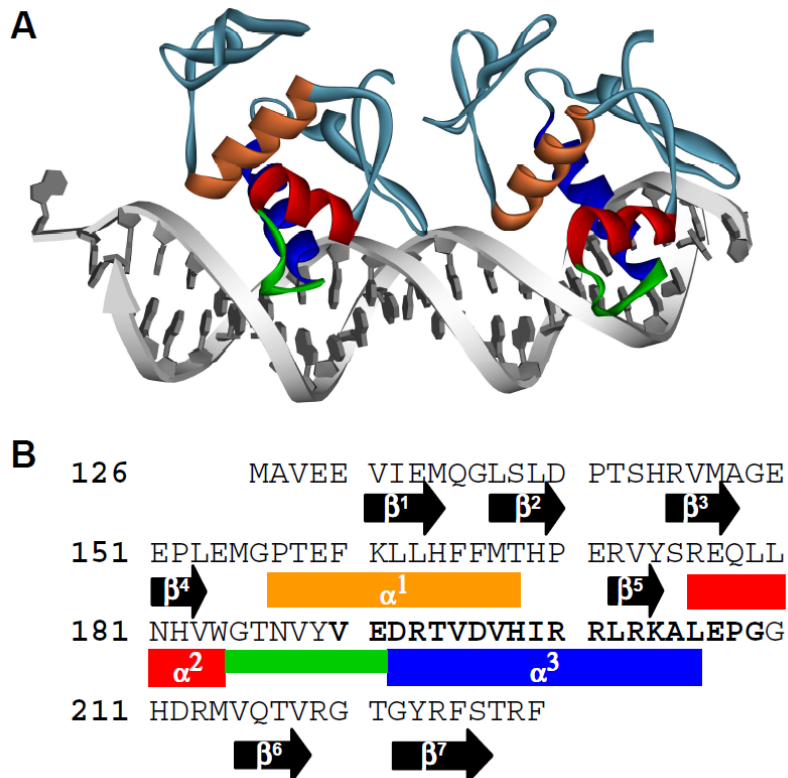


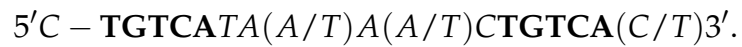
Abbildung 3.8: A: Kristallstruktur der Bindung zweier PhoB-DBD an die *phoBox*. Die Erkennungshelix α^3 ist blau, α^1 orange und α^2 rot, sowie der loop grün dargestellt. B: Die Aminosäuresequenz der DBD. Pfeile stellen β -Faltblätter und Kästen α -Helices dar [Wol09].

Die Wechselwirkung von PhoB mit der DNA geschieht über ein *winged helix-turn-helix* Motiv. Dieses Motiv setzt sich aus zwei α -Helices zusammen, die über den *turn* verbunden sind. Der *turn* setzt sich aus einer kurzen Sequenz an Aminosäuren zusammen. Die Bindung an die DNA erfolgt über die Erkennungshelix, die mit den DNA-Basen in Wechselwirkung tritt. Eine Stabilisierung der Bindung erfolgt über eine zweite Helix.

Die Erkennungshelix wird bei PhoB α^3 -Helix genannt, und α^2 ist die stabilisierende Helix. Der *turn* ist hier durch ein *transactivation-loop* zwischen α^3 und α^2 ersetzt. Damit findet die Wechselwirkung mit der RNA-Polymerase (über die σ^{70} -Untereinheit [MAK⁺96, YOI⁺08, BSGRC02]) statt. β^6 und β^7 bilden eine Struktur, die an die kleine Furche der DNA bindet.

3 Biologische Grundlagen

Der Bindebereich des PhoBs an der DNA wird *pho* box genannt und beinhaltet zwei Bindestellen mit der spezifischen Erkennungssequenz **TGTCA**. Daran binden zwei PhoBs als Dimer. Die DNA-Sequenz der *pho* box lautet [MAK⁺96]



Sie hat also zwei Bindungsstellen für das Protein PhoB. Bei der Wechselwirkung von PhoB mit der *pho* box spielen hydrophobe Van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den hydrophilen Aminosäuren und den Basenpaaren der DNA eine Rolle.

In dieser Arbeit werden punktmutierte Proteine der DBD verwendet, um den Beitrag einzelner Aminosäuren zur PhoB-DNA-Bindung bewerten zu können.

4 Materialien und Methoden

In diesem Kapitel werden die für die Durchführung der kraftspektroskopischen Messungen benötigten Chemikalien und Geräte vorgestellt. Des Weiteren werden die Schritte zur Immobilisierung der Proteine auf eine Oberfläche und der DNA auf einen Cantilever beschrieben. Außerdem wird auf die verwendete Software zur Analyse der Kraft-Distanz-Kurven eingegangen.

4.1 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller und sonstige Bemerkungen
Aceton p.A.	AnalaR NOMAPUR
3-Aminopropyl-triethoxysilan	Fluka, Reinheit $\geq 98\%$, Abkürzung APTES
Ethanol p.A.	AnalaR NOMAPUR
Maleimid-PEG-Succinimidyl Valerat	Laysan Bio, molare Masse: 3400 g/mol, PEG-Linker für die DNA-Immobilisierung
MilliQ-Wasser	
Phosphatpuffer	100 mM Na_2HPO_4 , 50mM NaCl, pH = 7,4
Natriumchlorid	Fluka
Natriumphosphat	Sigma-Aldrich
Toluol, trocken	Sigma-Aldrich, Reinheit $\geq 99\%$

4.2 Verwendete Geräte

Die Kraftspektroskopie-Messungen werden an einem Nanoscope V (Bruker,) durchgeführt, siehe Abbildungen 4.1 und 4.2. Die Steuerung und Aufnahme der Kraft-Distanz-Kurven erfolgt über eine in der Arbeitsgruppe entwickelten LabView-basierte Software.

Die Federkonstanten werden an einem MFP-3D-BIO^[TM] (Asylum Research, Santa Barbara, CA 93117, USA) mit Hilfe der Thermal Noise Methode der Standard-Software von Asylum Research bestimmt. Die Software basiert auf Igor Pro, Wavemetrics.

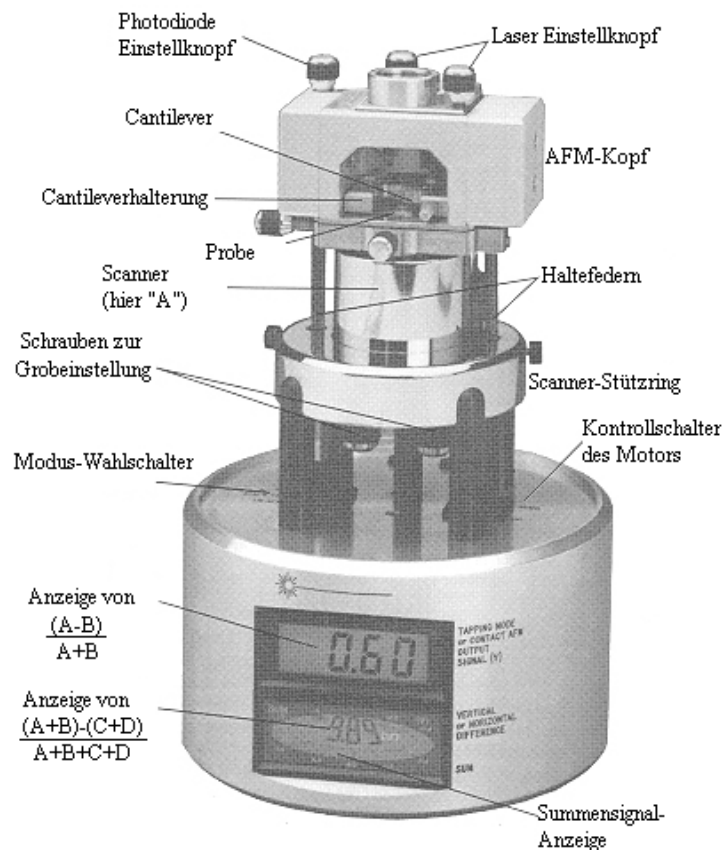


Abbildung 4.1: Aufbau des Nanoscopes V [Kow04].

Des Weiteren wurden zur Präparation verwendet:

- Plasmaanlage (Eigenbau, siehe [AP87]),
- Ultraschallbad (Transsonic DigitalS von Schalltec GmbH),

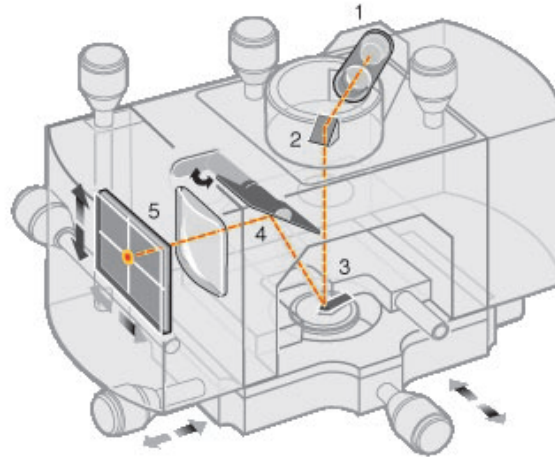


Abbildung 4.2: Schema des AFM-Kopfes des verwendeten Nanoscopes V [Kow04]. Dabei ist 1. der Laser, 2. der Dichroid, 3. der Cantilever, 4. der Umlenkspiegel und 5. die Photodiode.

- Teflonhalterungen für die Cantilever (Eigenbau),
- Ofen zum Ausheizen der Pipettenspitzen und zum Trocknen der Glasobjekte (APT.Line Serie BD / ED / FD (E2) von Binder, Tuttlingen, Deutschland).

4.3 Piezo-Kalibration

Piezo-Scanner ohne integrierte Positionssensoren haben aufgrund des Alterungsprozesses (Depolarisation des Materials) und leichter Variationen der Materialdicke des Piezos, ihr eigenes Verhältnis von angelegter Spannung zu Piezo-Bewegung, auch Sensitivität genannt. Außerdem ist die Sensitivität nicht linear: Bei größeren Spannungen weist ein Piezo eine höhere Sensitivität auf als bei kleineren Spannungen. Hinzu kommt noch die Hysterese des Piezos: Die Antwort des piezoelektrischen Materials auf eine steigende Spannung ist unterschiedlich zur Antwort auf eine abfallende Spannung.

Deshalb muss ein Piezo regelmäßig kalibriert werden, das heißt, dass die angelegte Spannung diesen Effekt kompensieren muss.

Zur Kalibration verwendet man ein Gitter mit definierten Maßen.

Für diese Arbeit wird bei den kraftspektroskopischen Messungen am Nanosope ein

J-Scanner von Bruker verwendet. Dieser sollte regelmäßig alle 4-6 Wochen kalibriert werden.

4.4 Cantilever

In dieser Arbeit werden die MSCT-AUHW Microlever (Veeco Instruments, Santa Barbara, Kalifornien, USA) verwendet. Dies sind Siliziumnitrid-Cantilever mit unbeschichteten, pyramidenförmigen Spitzen. An den Microlevern befinden sich 6 Cantilever. Fünf davon sind V-förmig und einer ist rechteckig. Sie unterscheiden sich in ihrer Größe, Federkonstanten und Resonanzfrequenz. Die Rückseite der Microlever ist mit Gold beschichtet.

Der verwendete Cantilever hat eine nominale Federkonstante von 10 pN/nm.

4.5 Substratoberflächen

Für die Immobilisierung der Proteine werden Gold-beschichtete Borosilikat-Glasplättchen der Firma ArandeeTM (Werther, Deutschland) verwendet.

4.6 Die Biomoleküle

Die verwendeten PhoB-Proteine und die DNA werden von Markus Ritzefeld aus der Arbeitsgruppe Organische und Bioorganische Chemie an der Universität Bielefeld hergestellt. Für weitere Informationen zur Herstellung der DNA und der Proteine, sei auf [Wol09, Rit09] hingewiesen.

4.6.1 DNA

Das DNA-Fragment hat eine Länge von 360 Basenpaaren (bp). Es beinhaltet die *pho* box-Sequenz des Promotors, die 268 bp lang ist. Dieser Promotor enthält vier TGTCA-

Bindestellen für das Protein PhoB.

Bei der Synthese werden 5'-thiolmarkierte Primer verwendet. Dies ist wichtig, um die DNA über die Thiolgruppe (-SH) an den Cantilever binden zu können, weiteres siehe im Abschnitt Präparation.

4.6.2 Proteine

Die zu untersuchenden Proteine enthalten die komplette DNA-bindende Domäne PhoB(127-229) und wechselwirken alle in ihrer Wildtyp-Konformation mit dem Rückgrat der DNA in der kleinen Furche. Bei der Punktmutation wird die zu untersuchende Aminosäuren gegen die Aminosäure Alanin ausgetauscht. Alanin ist als Ganzes eine ungeladene Aminosäure.

Die Mutanten sind

R176A: Hier ist Arginin gegen Alanin vertauscht. Die Mutation befindet sich am Anfang der Stabilisierungshelix α^2 . Arg176 wechselwirkt unspezifisch mit dem DNA-Rückgrat, genauer mit dem Phosphodiester zwischen T12' und T13' in der kleinen Furche.

T217A: Anstelle von Threonin befindet sich Alanin in dem β -Faltblatt β^6 . Threonin hat eine hydrophile Seitenkette. Thr217 sorgt mit Tyr223 und Gly220 für Wasserstoffbrückenbindungen zum DNA-Rückgrat. Dadurch kann dann die Aminosäure Arg219 in die kleine Furche der DNA eindringen und mit den Basen A13 und T13' wechselwirken.

V218A: Das Valin an Stelle 218 im Faltblatt β^6 wird gegen Alanin ausgetauscht. Valin ist als Ganzes ungeladen und hat eine unpolare Seitenkette. Val218 wechselwirkt unspezifisch mit dem DNA-Rückgrat.

Die Proteine werden noch mit einem Cysteinrest versehen, der eine direkt Bindung an eine Goldoberfläche ermöglicht, siehe nächster Abschnitt.

4.7 Präparation

Bei der Immobilisierung der Moleküle ist zu beachten, dass die zu untersuchende Bindung die Schwächste ist, damit der Molekülkomplex bei den Dissoziationskraftmessungen auch nur an dieser Stelle aufbrechen kann.

Die kovalente Bindung ist eine chemische Bindung zwischen Atomen in molekular aufgebauten chemischen Verbindungen und wird über die Wechselwirkung der Valenzelektronen vermittelt. Die Bindungsenergie von zum Beispiel der Bindung C-H beträgt 413 kJ/mol und ist damit viel stärker als Wasserstoffbrückenbindungen, über die Proteine an DNA binden (≤ 17 kJ/mol [Jef97]). Deshalb werden die Moleküle kovalent an den Cantilever beziehungsweise an die Oberfläche gebunden.

Die zur Präparation benötigten Glaswaren, wie Petrischalen und Messbecher, werden in einem KOH-Isopropanol-Bad von organischen Rückständen gereinigt. Dabei wirkt Isopropanol lösend und das KOH ätzt die Glasoberfläche an. Nach gründlichem Spülen unter fließendem Wasser werden die Glaswaren in einem 2-3 % HCl-Bad neutralisiert. Die durch das KOH-Isopropanol-Bad entzogenen H^+ -Ionen werden durch das HCl-Bad wieder hinzugefügt. Abschließend werden die Glasobjekte mit MilliQ-Wasser abgespült und bei 120°C für eine Stunde im Ofen getrocknet.

4.7.1 Immobilisierung der DNA an den Cantilever

Um die DNA an die Spitze des Cantilevers binden zu können, muss diese mit APTES funktionalisiert werden. Dafür werden die Cantilever in der Plasmaanlage oxidiert. Dadurch wird die Siliziumoxid-Schicht mit OH-Gruppen versehen. An diese kann APTES binden und die Oberfläche mit reaktiven, freien Aminogruppen (NH_2) versehen. Daran kann wiederum der PEG-Linker mit seiner NHS-Gruppe kovalent binden: Abschließend kann die thiolmodifizierte DNA auch kovalent an die Maleimid-Gruppe des PEG-Linkers binden.

Der Ablauf der einzelnen Präparationsschritte ist wie folgt:

1. Plasmaoxidation der Cantilever von beiden Seiten (damit sich die Cantilever nicht zu stark verbiegen) für jeweils 10 Sekunden.

4 Materialien und Methoden

2. Inkubation der Cantilever in einer 2%-igen APTES - Trocken-Toluol - Lösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur.
3. Abspülen in trockenem Toluol und Ethanol für jeweils ungefähr 10 Sekunden.
4. Vorsichtiges Trocknen der Cantilever in einem Stickstoffstrom.
5. Inkubation der Cantilever in 60 μ l einer 1mM PEG-Linker-Lösung in Phosphatpuffer in der Cantilever-Halterung für 40 Minuten bei Raumtemperatur.
6. Abspülen mit Phosphatpuffer.
7. Vorsichtiges Trocknen der Cantilever in einem Stickstoffstrom.
8. Die Cantilever werden wieder in die Halterung gelegt und jeweils 12,5 μ l DNA darauf pipettiert. Die DNA hat eine Konzentration von 10 ng/ μ l und wird über Nacht im Kühlschrank (ungefähr 4°C) inkubiert.
9. Abspülen mit Phosphatpuffer und Lagerung in Phosphatpuffer in der Halterung.

Die DNA behält für ungefähr 5-6 Tage ihre Aktivität.

4.7.2 Immobilisierung der Proteine auf einer Goldoberfläche

Die kovalente Bindung der Proteine geschieht über den Cysteinrest des Proteins. Dieser enthält ein Schwefelatom, das eine stabile Bindung zu einem Goldatom der Oberfläche eingeht.

Für die Immobilisierung sind folgende Schritte nötig:

1. Reinigung der Oberfläche für 10 Minuten in Aceton im Ultraschallbad (Ultrasound Power: 140%).
2. Trocknen der Oberfläche im Stickstoffstrom.

3. Nochmals Reinigung im Ultraschallbad (Ultrasound Power: 140%) für 10 Minute, diesmal in Ethanol.
4. Trocknen der Oberfläche im Stickstoffstrom.
5. Reinigung der Oberfläche für 2 Minuten in der Plasmaanlage.
6. Möglichst schnell (damit nicht Moleküle aus der Luft auf der Goldoberfläche adsorbieren) 100 μl der Proteinlösung auf die Oberfläche pipettieren. Die Konzentration liegt immer bei ungefähr 10 μM . Für die Inkubation wird die Oberfläche bis zu 2 Stunden im Kühlschrank gelagert.
7. Spülen der Oberfläche mit Phosphatpuffer, um ungebundene Proteine zu entfernen.

4.8 Auswertung der Kraft-Distanz-Kurven

Das Matlab-basierte (Version 2010b, MathWorks, Natick, MA, USA) Programm zur Auswertung der Kraft-Distanz-Kurven wurde von Lennart Ochel und Jan Lettau von der Fachhochschule Bielefeld geschrieben.

Der Vorteil dieses Programms ist, dass die Kraft-Distanz-Kurven von Rasterkraftmikroskopen verschiedener Hersteller und damit verschiedenen Dateiformaten mit derselben Routine ausgewertet werden können. Dazu untersucht es die Kurven auf Dissoziationsereignisse und bestimmt deren Dissoziationslänge, Dissoziationskraft und Steigung im Dissoziationspunkt, was der Elastizität des Komplexes entspricht.

Die Abrisserkennung funktioniert wie folgt:

Zuerst werden zwei Geraden an die Kurve gefittet. Die Erste wird mit Hilfe der linearen Regression für die Steigung im Kontaktbereich des Cantilevers mit der Oberfläche berechnet. Die zweite Gerade bestimmt mit der linearen Regression die Nulllinie, also den Bereich, wo der Cantilever sich von der Oberfläche entfernt hat und in seiner Ruheposition ist.

Der Schnittpunkt S beider Geraden ist dann der Punkt, an dem der Cantilever die Oberfläche verläßt und, falls keine Wechselwirkungskräfte auf ihn wirken, in seine

Ruheposition zurückkehrt.

Ab dem Fit-Bereich der ersten Geraden wird nun für die Kraft-Distanz-Kurve die durchschnittliche Steigung in jedem Intervall mit einer Breite von 2 nm berechnet und mit der Steigung der ersten Regressionsgeraden verglichen. Dabei überlappen sich die Intervalle immer um jeweils 1 nm.

Ändert sich die Steigung nach dem Schnittpunkt S nicht, so handelt es sich um einen Adhäsionspeak. Allerdings kann dieser, wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, eine geringe Breite haben, so dass die Beobachtung eines Dissoziationsereignisses noch möglich sein kann. Deshalb wird dann das Intervall gesucht, in dem sich die Steigung signifikant ändert, und in diesem Intervall wird das Minimum gesucht. Dann wird die Breite bestimmt, definiert als Abstand des Minimums vom Schnittpunktes S.

Ist diese größer als das am Anfang eingestellte Dissoziationslängenminimum, so wird die Kurve nicht weiter ausgewertet, da davon auszugehen ist, dass, falls ein Dissoziationsereignis stattgefunden hat, dieses nicht ausgewertet werden kann. Ist der Abstand kleiner, so wird weiter nach einem Dissoziationsereignis gesucht.

Wenn kein Adhäsionspeak aufgetreten ist, so verschwindet die Steigung nach dem Schnittpunkt S. Um ein Dissoziationsereignis zu finden, wird weiter die durchschnittliche Steigung in den Intervallen bis zu dem einstellbaren Dissoziationslängenmaximum bestimmt.

Wird ein Intervall gefunden, in dem sich die Steigung signifikant ändert, wird dann in diesem das Minimum gesucht und die Dissoziationskraft sowie die Dissoziationslänge bestimmt.

Der Abriss wird allerdings nur gewertet, wenn er folgende Kriterien erfüllt.

1. Die Dissoziation muss zurück auf die Nulllinie erfolgen.
2. Die Dissoziationskraft muss größer sein als ein wählbares Minimum.
3. Die Dissoziationskraft muss auch größer als der dreifache Wert der mittleren Rauschens der Nulllinie sein.
4. Es wird der Punkt Z auf der Dissoziationskurve bestimmt, der 20 % des Maximums der Dissoziationskraft entspricht. Der Abstand dieses Punktes zum Dissoziationspunkt muss über einem wählbaren Minimum liegen.

Ab diesem Punkt Z wird ein Polynom 2. Ordnung an die Dissoziationskurve gefittet,

4 Materialien und Methoden

das auch durch das Minimum M verläuft. Anhand des Polynoms wird die Steigung im Dissoziationspunkt bestimmt.

Sind alle Bedingungen erfüllt, so wird der Abriss als Dissoziationsereignis gewertet und die Werte der Dissoziationslänge, -kraft und Elastizitätskonstante werden gespeichert.

Für die wählbaren Kriterien werden folgende Werte gewählt:

Abrisslängenminimum	20 nm
Abrisslängenmaximum	150 nm
Minimale Länge	3 nm
Minimale Dissoziationskraft	10 pN.

Die minimale Länge wird so klein gewählt, da ansonsten Dissoziationen mit kleinen Kräften nicht erkannt werden.

5 Auswertung und Ergebnisse

Die in den Messreihen aufgenommenen Daten zur Untersuchung der Bindung zwischen der DNA und den verschiedenen Mutanten V218A, T217A und R176A werden in diesem Kapitel analysiert und interpretiert.

Wie in Kapitel 2 ausführlich dargestellt, ist die zentrale Beziehung für die dynamische Kraftspektroskopie die folgende:

$$F_{max} = \frac{k_B T}{x_\beta} \ln \left(\frac{x_\beta r}{k_d k_B T} \right). \quad (5.1)$$

Gemessen wird die wahrscheinlichste Dissoziationskraft in Abhängigkeit der Belastungsrate r , $r = k_{eff} \cdot v$.

Über obige Gleichung können dann die Wechselwirkungslänge x_β , sowie die Dissoziationsratenkonstante k_d bestimmt werden, und damit auch die Lebensdauer τ des Protein-DNA-Komplexes, da $\tau = 1/k_d$ gilt.

Die Messungen werden in der in 4.1 beschriebenen Pufferlösung durchgeführt.

Die bei den Messungen aufgenommenen Kraft-Distanz-Kurven werden mit dem im Abschnitt 4.8 beschriebenen Programm ausgewertet. Die von dem Programm erkannten Dissoziationsereignisse werden mit den relevanten Daten, unter anderem der Dissoziationslänge, Dissoziationskraft und Elastizität, abgespeichert. Aus diesen Daten werden dann die Histogramme erstellt.

An diese Histogramme wird eine Gauß-Kurve gefittet, die durch

$$y = y_0 + \frac{A}{w\sqrt{\pi/2}} e^{-2\frac{(x-x_c)^2}{w^2}} \quad (5.2)$$

beschrieben wird. Dabei sind y_0 , A , w und x_c die Fitparameter. x_c entspricht der wahrscheinlichsten Dissoziationskraft und $w = FWHM/\sqrt{\ln 4}$ beschreibt die Breite der Kurve. $FWHM$ ist die Breite der Kurve auf der halben Höhe des Maximums. Der Fehler für die wahrscheinlichste Dissoziationskraft wird berechnet als die Summe

5 Auswertung und Ergebnisse

aus dem Standardfehler des Mittelwerts der Gaußverteilung für eine 95,4%-ige Konfidenz (w/\sqrt{N}) und dem Fitfehler für die wahrscheinlichste Dissoziationskraft.

Die gleiche Vorgehensweise wird bei der Auswertung der Elastizitäten k_{eff} , also den berechneten Steigungen im Dissoziationspunkt, sowie den Dissoziationslängen vorgenommen. Mit Hilfe der Histogramme erfolgt eine Kontrolle der Dissoziationsereignisse. Es wird aufgrund des verwendeten PEG-Linkers MW 3400 eine wahrscheinlichste Dissoziationslänge von 30 nm erwartet, und dass keine Ereignisse überhalb einer Dissoziationslänge von 60 nm stattfinden, da sich der PEG-Linker nicht weiter ausdehnen kann. Die Ereignisse, die eine Dissoziationslänge von mehr als 60 nm aufweisen, sind meistens unspezifische Ereignisse oder Ereignisse von Mehrfachabrissen.

In Abbildung 5.1 ist ein Abrisslängenhistogramm der Mutante V218A bei einer Rückziehgeschwindigkeit von 500 nm/s zu sehen. Wie erwartet, beträgt die wahrscheinlichste Dissoziationslänge ungefähr 30 nm.

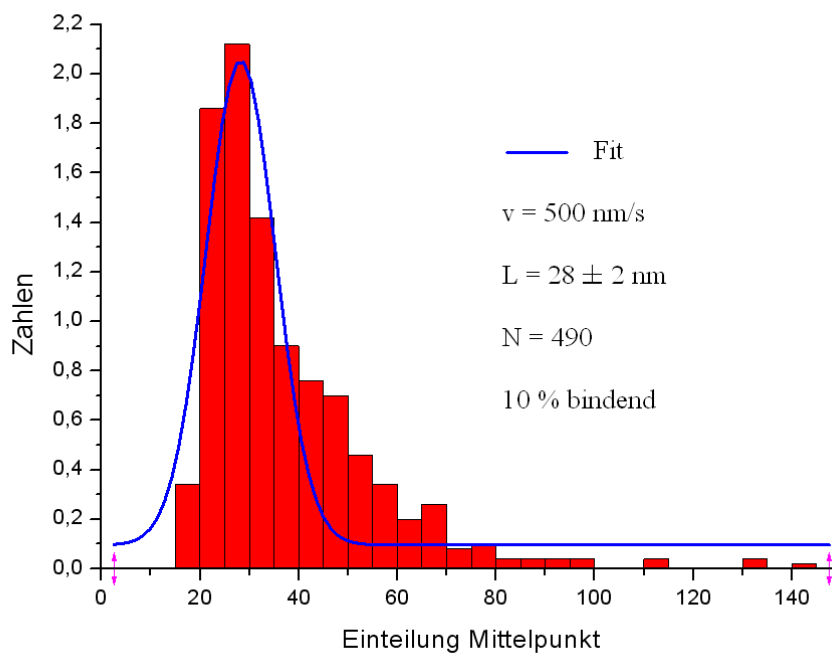


Abbildung 5.1: Verteilung des Abrisslängen am Beispiel der Rückziehgeschwindigkeit 500 nm/s der Mutante V218A, mit einer wahrscheinlichsten Abrisslänge von (28 ± 2) nm. Ereignisse mit einer Abrisslänge von weniger als 19 nm werden von dem Auswerteprogramm nicht berücksichtigt.

5 Auswertung und Ergebnisse

Eine weitere Kontrolle der Messung erfolgt über die Erstellung von 2D-Histogrammen der Dissoziationskräfte und deren Elastizitäten. Für jede Rückziehggeschwindigkeit wird ein 2D-Histogramm erstellt. Nach der Theorie von Bell, Evans und Ritchie geht man davon aus, dass der Kurvenverlauf jedes Dissoziationsereignisses einer so genannten Masterkurve folgt. Anhand der Darstellungsweise in einem 2D-Histogramm wird der Kurvenverlauf deutlich. Man beobachtet bei größeren Dissoziationskräften eine größere Elastizität, siehe Abbildung 5.2.

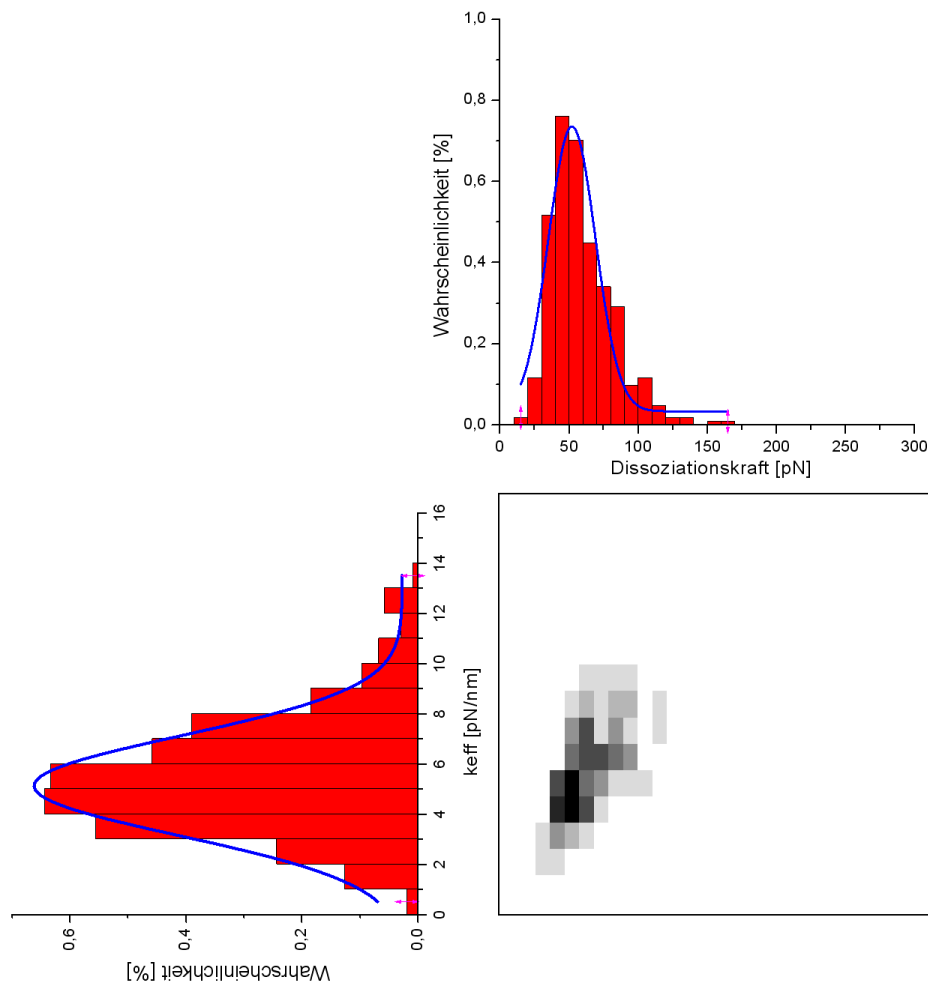


Abbildung 5.2: Darstellung des Aufbaus des 2D-Histogramms, am Beispiel der Rückziehggeschwindigkeit 2000 nm/s für die Mutante V218A.

Ist dieser Verlauf in den 2D-Histogrammen zu beobachten, so ist einerseits die Wahrscheinlichkeit der Beobachtung einer spezifischen Bindung hoch und andererseits ist

dies eine Kontrolle des Analyseprogramms, ob unspezifische Ereignisse wie Adhäsionsereignisse von spezifischen Dissoziationsereignisse unterschieden werden.

Für die Berechnung der Wechselwirkungslänge x_β und der Dissoziationsratenkonstante k_d hat man nun zwei Möglichkeiten zur Auswertung der Datenpunkte. Die erste Möglichkeit ist, dass an die Datenpunkte direkt der logarithmische Verlauf nach Gleichung 5.1 gefittet wird.

Die zweite Möglichkeit ist die halblogarithmische Auftragung und Berechnung der wahrscheinlichsten Geraden an die Datenpunkte mit Hilfe der linearen Regression. Für die lineare Regression modifiziert man Gleichung 5.1. Um einen Maßeinheiten-unabhängiges Argument des Logarithmus' zu erhalten, wird eine Nulladdition mit einer frei wählbaren Konstante r_0 durchgeführt. Durch Umformung über die Logarithmusgesetze erhält man:

$$\ln\left(\frac{x_\beta r}{k_d k_B T}\right) = \ln\left(\frac{r}{r_0}\right) + \ln\left(\frac{x_\beta r_0}{k_d k_B T}\right).$$

r_0 wird nun passend gewählt, hier gilt $r_0 = 1$ pN/s. Damit wird Gleichung 5.1 zu

$$F_{max} = \frac{k_B T}{x_\beta} \ln\left(\frac{r}{r_0}\right) + \frac{k_B T}{x_\beta} \ln\left(\frac{x_\beta r_0}{k_d k_B T}\right). \quad (5.3)$$

Dies ist eine Geradengleichung der Form

$$y = m \cdot x + b \quad (5.4)$$

mit der Steigung $m = \frac{k_B T}{x_\beta}$ und dem y-Achsenabschnitt $b = \frac{k_B T}{x_\beta} \ln\left(\frac{x_\beta r_0}{k_d k_B T}\right)$. Des Weiteren können nun die Maßeinheiten der Steigung und des y-Achsenabschnittes bestimmt werden. Die Maßeinheit ist bei beiden Größen pN.

Aus m und b erhält man die Wechselwirkungslänge $x_\beta = \frac{k_B T}{m}$ und die Dissoziationsratenkonstante $k_d = \frac{r_0}{m} e^{-\frac{b}{m}}$.

Bei der Fehlerabschätzung wird die Antikorrelation der Steigung und des y-Achsenabschnittes nicht berücksichtigt und mit der Gaußschen Fehlerfortpflanzung berechnet.

5.1 Die Mutante V218A

Für die Mutante V218A wurden Kraft-Distanz-Kurven bei Rückziehgeschwindigkeiten von 50 nm/s - 4000 nm/s, siehe Tabelle 5.1 aufgenommen, wobei die Annähe-

5 Auswertung und Ergebnisse

rungsgeschwindigkeit bei 2000 nm/s konstant gehalten wird.

Des Weiteren wurden bei dieser Mutante die verschiedenen Rückziehgesehwindigkeiten mit demselben funktionalisierten Cantilever durchgeführt. Dadurch wird der Fehler minimiert, der entsteht, wenn man verschiedene Cantilever verwendet, deren Federkonstante einen Fehler von 10-15% aufweist.

Dadurch erhält man die Dissoziationskräfte-Verteilungen wie sie in Abbildungen 5.3 und 5.4 zu sehen sind.

Außerdem sind in der rechten Spalte die 2D-Histogramme dargestellt. Sie zeigen, dass bei größeren Dissoziationskräften größere Elastizitäten auftreten, was dem erwarteten Verlauf entspricht.

Zusätzlich wurden die Abrisslängen- und Elastizitätshistogramme ausgewertet. Die wahrscheinlichste Abrisslänge liegt bei allen Rückziehgesehwindigkeiten bei 30 nm. Die wahrscheinlichste Elastizität wird mit der Rückziehgesehwindigkeit multipliziert, dies ergibt die so genannte Belastungsrate r . Diese ist in Tabelle 5.1 angegeben.

Für die Mutante V218A erhält man als Werte für die verschiedenen Rückziehgesehwindigkeiten:

Gesehwindigkeit [nm/s]	r [pN/s]	Fehler von r [pN/s]	F_{max} [pN]	Fehler von F_{max} [pN]
50	146	23	40	4
100	542	160	42	9
500	2956	616	47	7
1000	5431	1681	47	9
2000	10222	1050	52	5
4000	18820	6113	46	5

Tabelle 5.1: Datenpunkte der Mutante V218A.

5 Auswertung und Ergebnisse

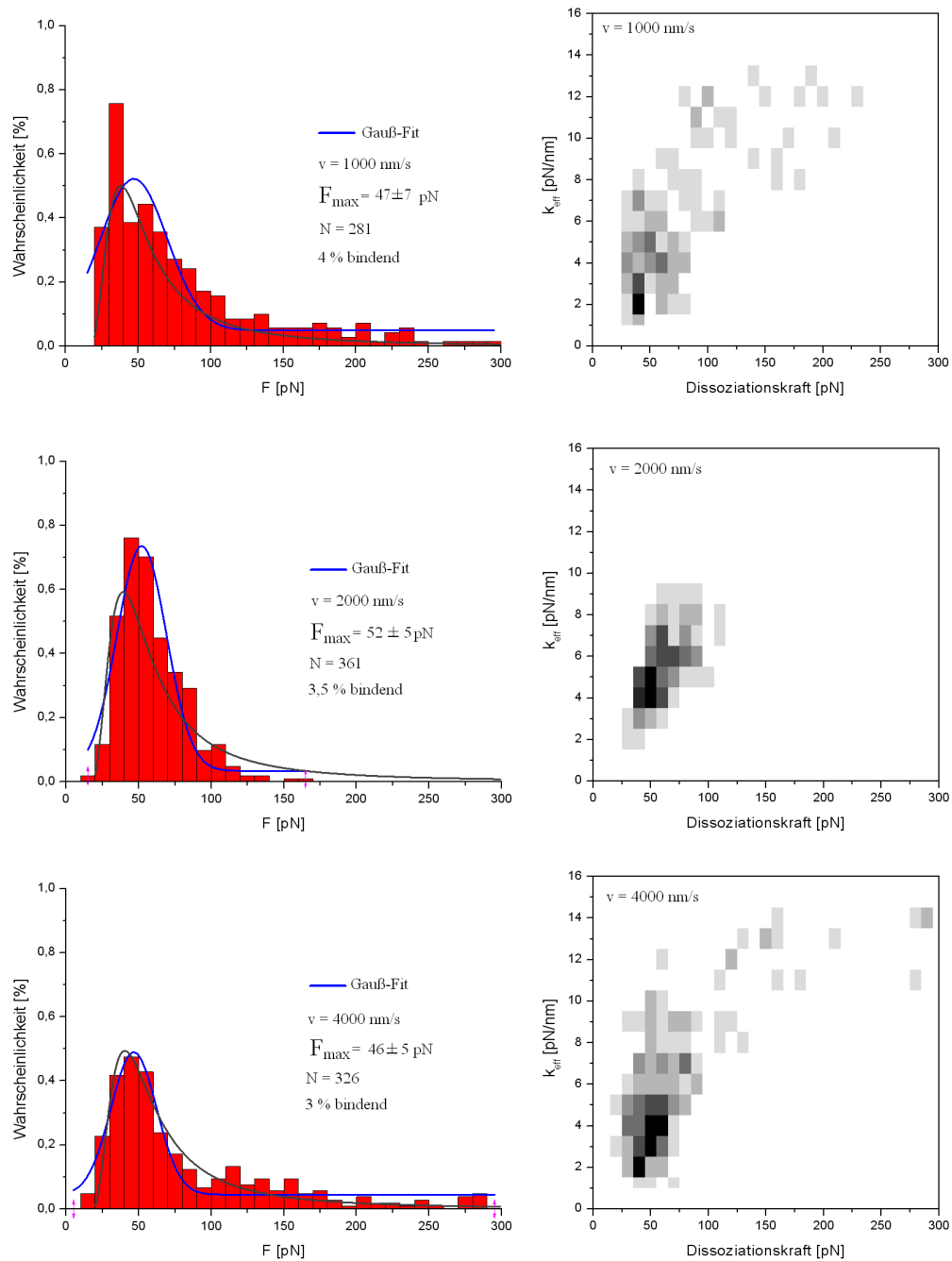


Abbildung 5.4: Analog zu Abbildung 5.3, für die Rückziehgeschwindigkeiten von 1000 nm/s bis 4000 nm/s gezeigt.

Nun wird die wahrscheinlichste Dissoziationskraft F_{\max} in Abhängigkeit von r aufgetragen, siehe Abbildung 5.6.

5 Auswertung und Ergebnisse

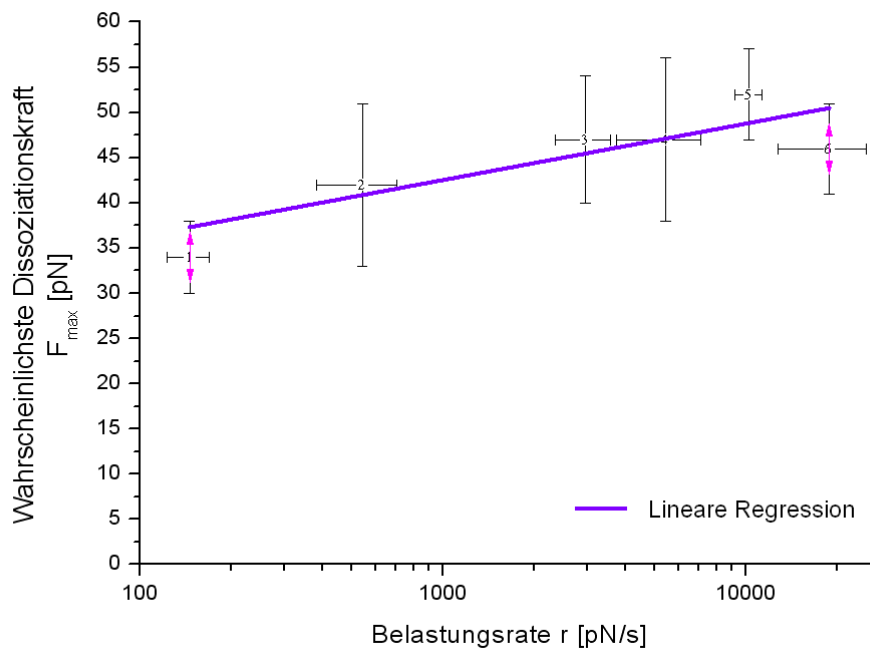


Abbildung 5.5: Halblogarithmische Auftragung der wahrscheinlichsten Dissoziationskräfte F_{\max} gegen die Belastungsrate r .

Unter der Berücksichtigung aller Datenpunkte erhält man mit Hilfe der linearen Regression für die Gerade eine Steigung von

$$m = (2,7 \pm 0,8) \text{pN} \quad (5.5)$$

und einen y-Achsenabschnitt von

$$b = (24 \pm 6) \text{pN}. \quad (5.6)$$

Daraus berechnet sich

$$x_{\beta} = (1,5 \pm 0,5) \text{nm} \quad (5.7)$$

und

$$k_d = (5 \pm 20) \cdot 10^{-5} \frac{1}{\text{s}}. \quad (5.8)$$

Vergleicht man dieses Ergebnis mit dem des Wildtyps [WGK⁺09],

$$k_d = (2,5 \pm 2,1) \cdot 10^{-3} \frac{1}{\text{s}}, \quad (5.9)$$

so ist ersichtlich, dass das k_d der Mutante V218A kleiner ist als das des Wildtyps und somit eine größere Lebensdauer hat. Dass der V218A-DNA-Komplex eine mehrere

5 Auswertung und Ergebnisse

Größenordnungen höhere Lebensdauer als der Wildtyp-DNA-Komplex hat, ist sehr unwahrscheinlich.

Bei eingehender Betrachtung des Datensatzes, vor allem der Darstellung der Daten in Abbildung 5.6, fällt auf, dass der Datenpunkt der Rückziehggeschwindigkeit von 4000 nm/s von dem Verlauf der anderen Datenpunkte abweicht.

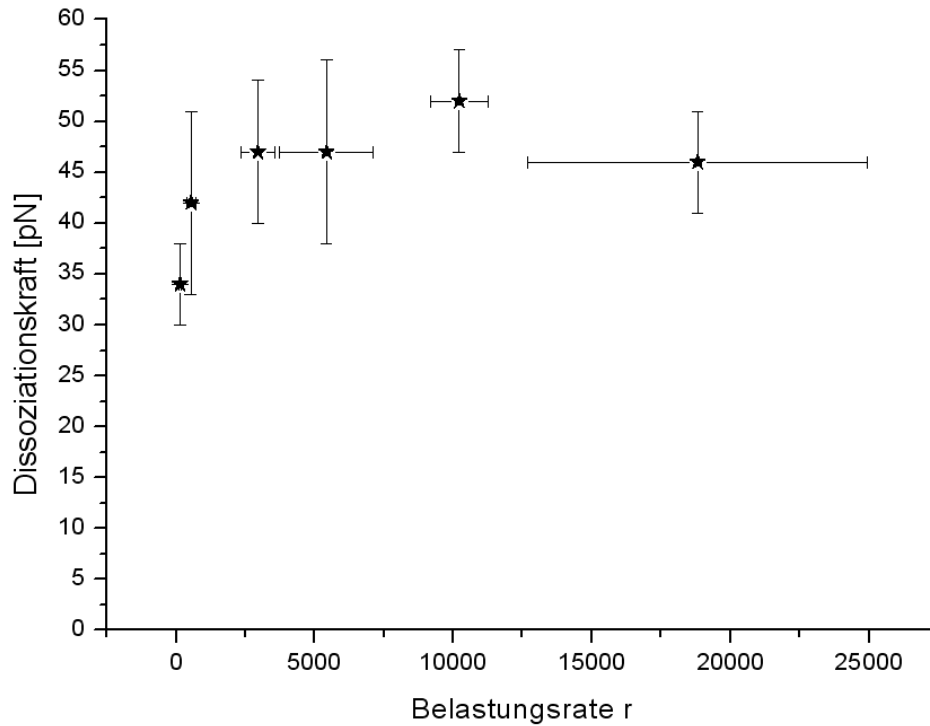


Abbildung 5.6: Lineare Auftragung der wahrscheinlichsten Dissoziationskräfte F_{max} in Abhängigkeit von der Belastungsrate r für die Mutante V218A.

Bei dieser Darstellungsweise sieht man, dass der letzte Datenpunkt (für die Rückziehggeschwindigkeit 4000 nm/s) unterhalb des erwarteten Niveaus liegt.

Wird der Datenpunkt der Rückziehggeschwindigkeit von 4000 nm/s bei der linearen Regression nicht berücksichtigt, so erhält man

$$x_{\beta} = (0,7 \pm 0,1) \text{ nm} \quad (5.10)$$

und

$$k_d = (2 \pm 1) \cdot 10^{-3} \frac{1}{\text{s}}. \quad (5.11)$$

Damit liegt die Dissoziationsratenkonstante k_d im Bereich des Wildtyps und die Lebensdauer kann auf ungefähr $\tau = 500\text{s}$ abgeschätzt werden.

Eine Ursache für die Abweichung des Datenpunktes der Rückziehggeschwindigkeit von 4000 nm/s konnte nicht gefunden werden. Deshalb sollte die Messung für diese Rückziehggeschwindigkeit wiederholt werden.

Dasselbe Ergebnis wird erhalten, wenn man an die Datenpunkte ohne Berücksichtigung der Rückziehggeschwindigkeit von 4000 nm/s , direkt den logarithmischen Verlauf nach Gleichung 5.1 anfittet.

Dieses Ergebnis stimmt mit der Erwartung überein, da Valin genau wie Alanin eine ungeladene Aminosäure ist und Val218 unspezifisch mit dem DNA-Rückgrat wechselwirkt. Deshalb führt diese Mutation zu keiner Veränderung der Bindungsaffinität im Vergleich zu dem Wildtyp-Protein [WGK⁺09], der die Auswertung analog ausgeführt hat.

5.2 Die Mutante R176A

Die Mutante R176A wurde zwei Mal mit jeweils neu exprimierten Proteinen vermessen. Dabei wurden verschiedene Cantilever verwendet und einige Rückziehggeschwindigkeiten wurden zur Kontrolle mehrfach vermessen.

Die Kraft-Distanz-Kurven wurden wie vorne beschrieben ausgewertet und die Verteilungen der Dissoziationskräfte sind in den Abbildungen 5.7 - 5.10 dargestellt.

Des Weiteren wurden auch 2D-Histogramme der Kräfte und Elastizitäten erstellt. Deren Analyse motivierte den Ausschluss der Daten zu einigen Rückziehggeschwindigkeiten, da sie nicht den erwarteten Verlauf zeigen: Die Daten mit 100 nm/s (vom 18.07.2011), sowie 4000 nm/s (vom 19.07.2011) werden in der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt. Mit dem Cantilever der Rückziehggeschwindigkeit 100 nm/s (vom 18.07.2011), die aufgrund der Verteilung im 2D-Histogramm nicht verwendet wird, konnte auch nur eine Geschwindigkeit vermessen werden. Die Rückziehggeschwindigkeit 4000 nm/s (vom 19.07.2011) zeigt genau wie die bei der Mutanten V218A einen Rückgang der Bindungswahrscheinlichkeit und vor allem einen mehr zufälligen Verteilungsverlauf im 2D-Histogramm, was darauf schließen lässt, dass viele unspezifische Ereignisse aufgetreten sind.

Zusätzlich wird die Rückziehggeschwindigkeit von 500 nm/s (vom 21.07.) nicht ver-

5 Auswertung und Ergebnisse

wendet, da die wahrscheinlichste Dissoziationskraft stark nach oben abweicht und auch nur diese Geschwindigkeit mit dem Cantilever aufgenommen werden konnte.

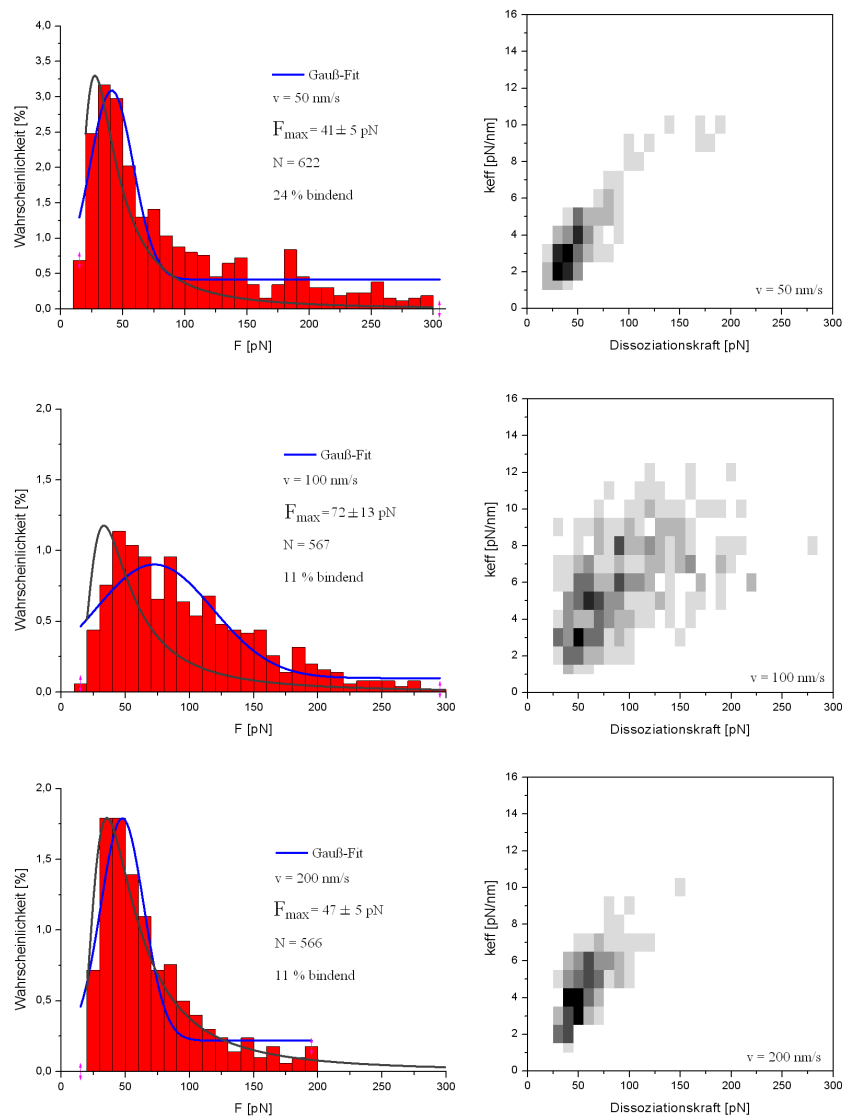


Abbildung 5.7: Verteilungen der Dissoziationskräfte für die Rückziehggeschwindigkeiten 50 nm/s (vom 24.07.2011), 100 nm/s (vom 18.07.2011) und 200 nm/s (vom 25.07.2011) der Mutanten R176A. In der rechten Spalte sind 2D-Histogramme der Kräfte und Elastizitäten dargestellt. Darin sind die Fits der Gaußverteilung (blau) und des heterogenen Bindungsmodells (grau) zu sehen. Auf das heterogene Bindungsmodell wird in Kapitel 5.4 näher eingegangen.

5 Auswertung und Ergebnisse

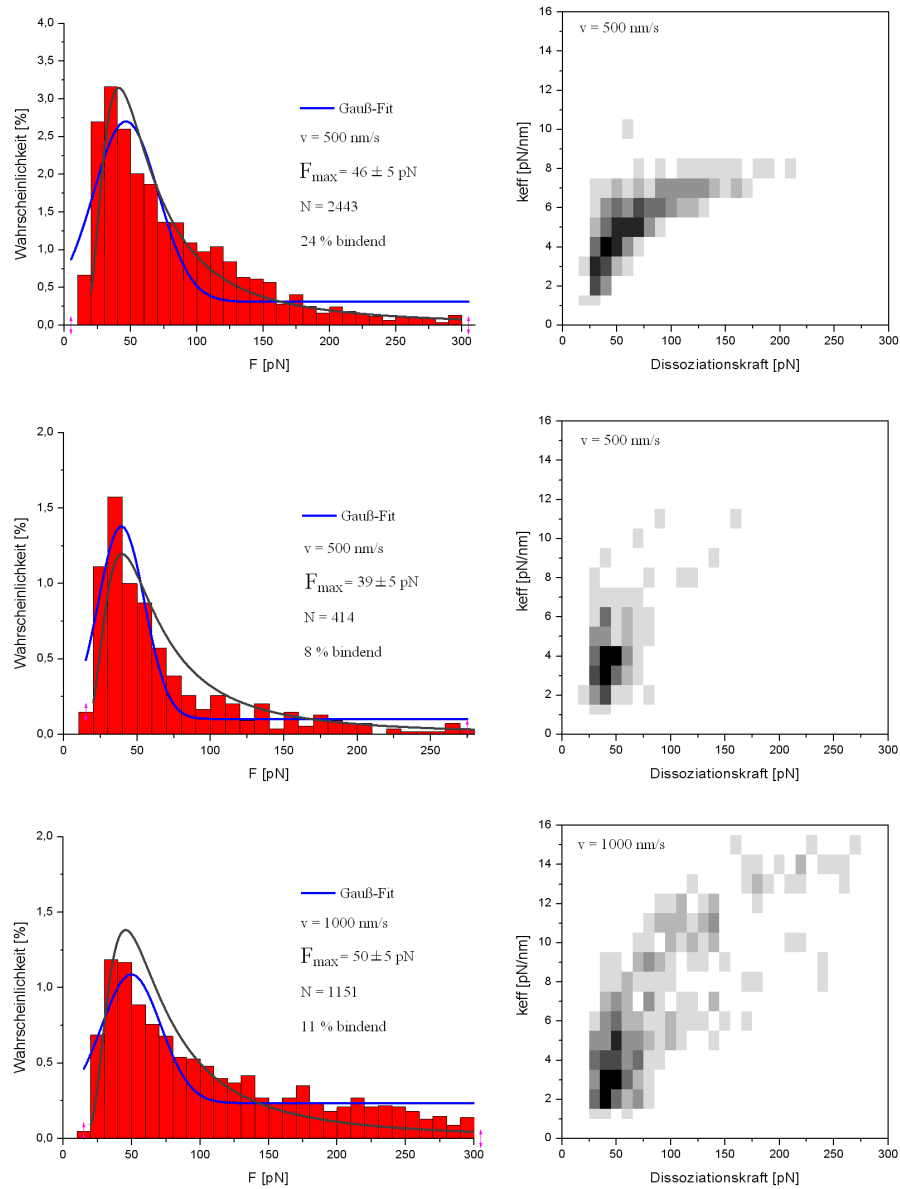


Abbildung 5.8: Analog zu Abbildung 5.7 für die Rückziehgeschwindigkeiten 500 nm/s (vom 07.05.2011), 500 nm/s (vom 21.07.2011) und 1000 nm/s (vom 05.05.2011) für die Mutante R176A.

5 Auswertung und Ergebnisse

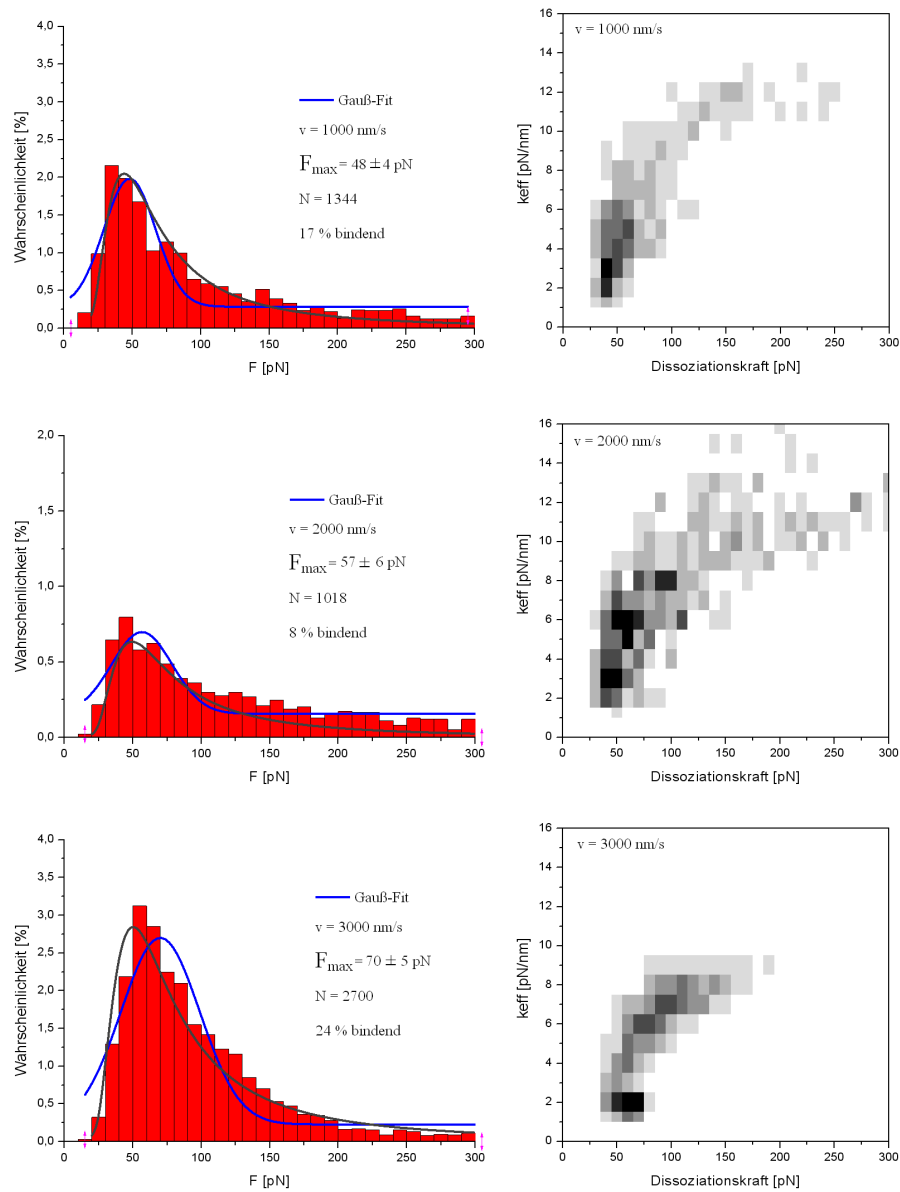


Abbildung 5.9: Analog zu den vorherigen Abbildungen für die Rückziehgeschwindigkeiten 1000 nm/s (vom 19.07.2011), 2000 nm/s (vom 05.05.2011) und 3000 nm/s (vom 07.05.2011).

5 Auswertung und Ergebnisse

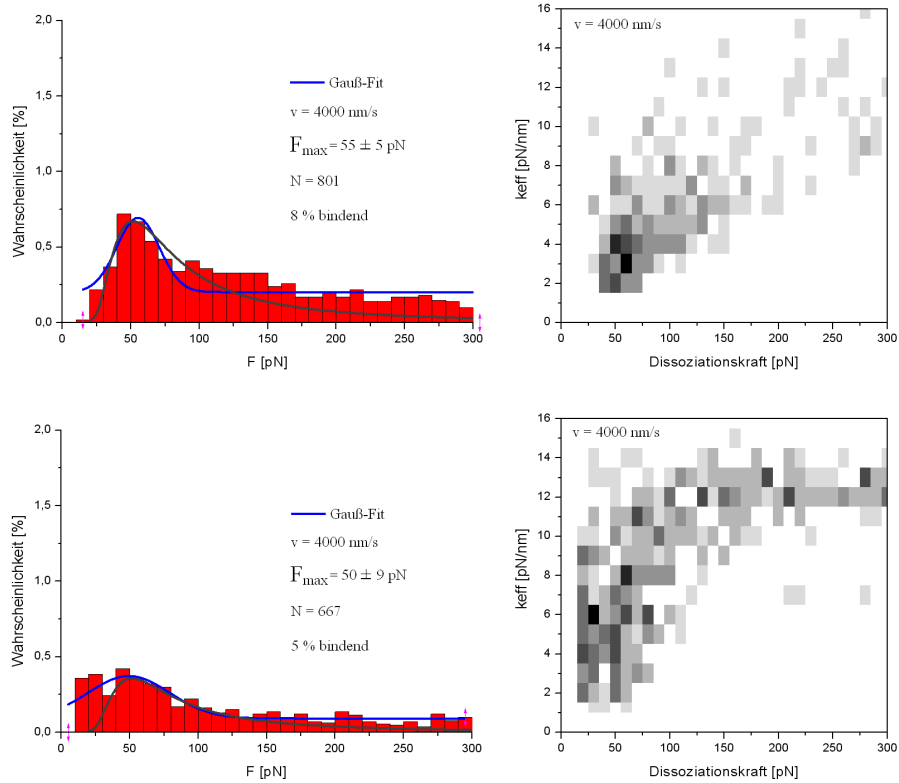


Abbildung 5.10: Ebenfalls analog zur Abbildung 5.7 für die Rückziehggeschwindigkeiten 4000 nm/s (vom 05.05.2011) und 4000 nm/s (vom 19.07.2011).

5 Auswertung und Ergebnisse

Aus den Histogrammen erhält man für die verschiedenen Rückziehggeschwindigkeiten folgende Werte, wobei nur die Daten der Rückziehggeschwindigkeiten aufgelistet werden, die in der weiteren Auswertung verwendet werden:

Geschwindigkeit [nm/s]	r [pN/s]	Fehler von r [pN/s]	F_{max} [pN]	Fehler von F_{max} [pN]
50	163	27	41	5
200	863	102	47	5
500	2660	141	46	5
1000	6596	1727	50	5
1000	4894	1270	48	4
2000	14785	1700	57	6
3000	17219	1758	70	5
4000	23282	3620	55	5

Tabelle 5.2: Datenpunkte der Mutante R176A.

In Abbildung 5.11 sind diese Daten halblogarithmisch aufgetragen.

Aus der linearen Regression erhält man als Steigung

$$m = (4 \pm 1)\text{pN} \quad (5.12)$$

und als y-Achsenabschnitt

$$b = (18 \pm 12)\text{pN}. \quad (5.13)$$

Daraus berechnet sich eine Wechselwirkungslänge von

$$x_\beta = (1 \pm 0,3)\text{nm} \quad (5.14)$$

und eine Dissoziationsratenkonstante von

$$k_d = (3 \pm 8) \cdot 10^{-3} \frac{1}{\text{s}}. \quad (5.15)$$

Die Lebensdauer des R176A-DNA-Komplexes läßt sich damit auf $\tau = 300$ s abschätzen. Damit liegen die Dissoziationsratenkonstante k_d und die Lebensdauer des Komplexes im Bereich des Wildtyps. Wieder wird dieses Ergebnis durch den logarithmischen Fit an die Datenpunkte ohne Berücksichtigung der Rückziehggeschwindigkeit

5 Auswertung und Ergebnisse

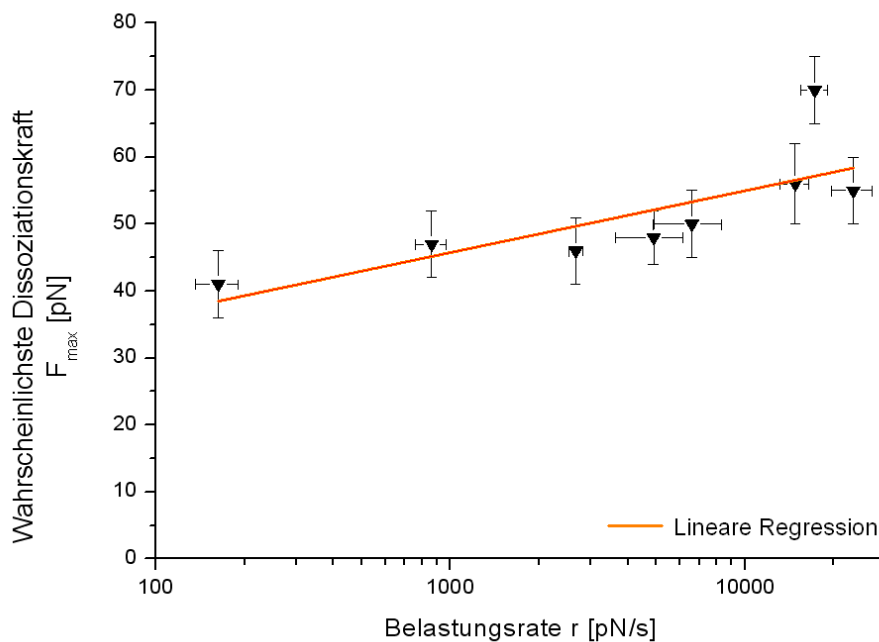


Abbildung 5.11: Halblogarithmische Auftragung der wahrscheinlichsten Dissoziationskräfte F_{\max} gegen die Belastungsrate r für die Mutante R176A.

von 100 nm/s (vom 18.07.2011), 4000 nm/s (vom 19.07.2011), sowie der Rückziehggeschwindigkeit von 500 nm/s (vom 21.07.) wiedergegeben.

R176 ist, wie bereits erwähnt, eine Aminosäure der Stabilisierungshelix α_2 , wobei R176 an dem DNA-Rückgrat der kleinen Furche unspezifisch bindet. Eine sequenzspezifische Wechselwirkung mit der kleinen Furche stellen die Aminosäuren Asparagin 196 (Asp196 / N196) und Arginin (Arg219 / R219) her. Werden diese jeweils gegen Alanin ausgetauscht, so ist mittels der Untersuchungsmethode Surface Plasmon Resonance (SPR) keine Bindungsaffinität mehr zu beobachten [RWN⁺11]. Also ist die sequenzspezifische Bindung von R219 und N196 essentiell für die Bindung des Proteins PhoB an die DNA.

Dagegen ist R176 nicht essentiell für die Bindung des Proteins PhoB an die DNA, da die Bindungsaffinität durch Austausch gegen Alanin weiterhin beobachtet und nicht signifikant verändert wird. Die Lebensdauer des R16A-DNA-Komplexes ist konsistent mit der Lebensdauer des Wildtyp-DNA-Komplexes. Über eine mögliche mäßige Verschlechterung der Bindung läßt sich aufgrund des Fehlers keine Aussage machen. Damit zeigt dieses Ergebnis, dass Arginin nicht generell wesentlich für die Bindung

mit der kleinen Furche ist, sondern die Bindungsweise des Arginins berücksichtigt werden muss.

5.3 Die Mutante T217A

Diese Mutante wurde mit verschiedenen Cantilevern vermessen. Die Kraft-Distanz-Kurven wurden mit dem Auswertungsprogramm analysiert und aus den gewonnenen Daten Histogramme erstellt, siehe Abbildung 5.13 - 5.16. Daraus lassen sich folgende Werte ermitteln:

Trägt man diese Datenpunkte halblogarithmisch auf, siehe Abbildung 5.12, so zeigt

Geschwindigkeit [nm/s]	r [pN/s]	Fehler von r [pN/s]	F_{max} [pN]	Fehler von F_{max} [pN]
100	551	90	48	7
100	620	89	66	11
200	644	107	40	7
500	2233	350	64	9
1000	6757	657	65	18
1000	2347	366	59	4
2000	12800	3310	55	9
2000	10522	3291	49	6
2000	11215	1827	52	4
3000	15176	1823	65	5
4000	34249	13339	54	16

Tabelle 5.3: Datenpunkte der Mutante T217A.

sich kein linearer Verlauf, wie man ihn eigentlich erwartet.

Bei eingehender Betrachtung fällt insbesondere auf, dass die Datenpunkte 2, 4, 5, 6 und 10 weit über der angefitteten Geraden liegen. Diese Datenpunkte, außer dem Datenpunkt 6, wurden mit demselben Cantilever aufgenommen. Deshalb werden diese

5 Auswertung und Ergebnisse

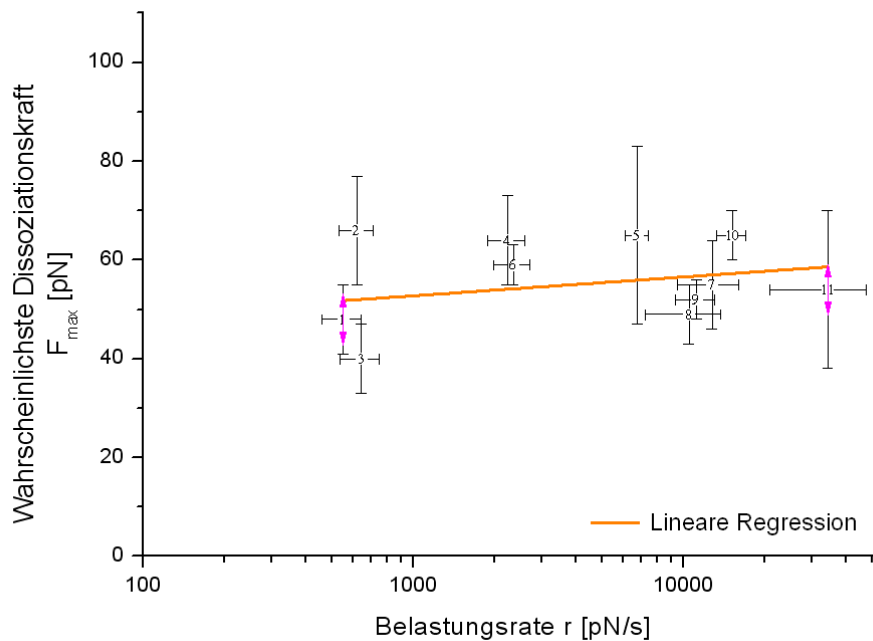


Abbildung 5.12: Halblogarithmische Auftragung aller Datenpunkte der wahrscheinlichsten Dissoziationskraft in Abhängigkeit von der Belastungsrate für die Mutante T217A.

Daten in der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt. Dazu gehört auch der Datenpunkt 3, da er auch mit diesem Cantilever vermessen wurde. Der Cantilever für den Datenpunkt 6 (also die Rückziehggeschwindigkeit von 1000 nm/s (vom 09.07.) konnte nur für diese Messung verwendet werden, deshalb wird dieser Punkt auch nicht weiter berücksichtigt.

Die Vermutung, dass ein Fehler bei der Federkonstantenbestimmung am MFP-3D (Asylum Research) aufgetreten ist, konnte durch wiederholtes Bestimmen am Multimode (Bruker) mit der dazugehörigen Software widerlegt werden. Es wurde die Federkonstante von 14,6 pN/nm reproduziert. Möglich wäre, dass dieser Cantilever einen mechanischen Defekt aufweist.

Es wurden auch die Daten getrennt nach den Messwochen aufgetragen, um zum Beispiel einen Einfluss der Lagerung ausfindig zu machen, aber es hat keine Verbesserung hervorgerufen.

Legt man eine Gerade durch die übrigen Datenpunkte mit Hilfe der linearen Regres-

5 Auswertung und Ergebnisse

sion, so erhält man für die Steigung

$$m = (3 \pm 2)\text{pN} \quad (5.16)$$

und für den y-Achsenabschnitt

$$b = (40 \pm 7)\text{pN}. \quad (5.17)$$

Daraus berechnet sich die Wechselwirkungslänge zu

$$x_\beta = (1,4 \pm 0,9)\text{nm} \quad (5.18)$$

und eine Dissoziationskonstante von

$$k_d = (5 \pm 13) \cdot 10^{-7}\text{pN}. \quad (5.19)$$

Damit würde die Lebensdauer mehrere Größenordnungen über denen des Wildtyp-DNA-Komplexes liegen. Bei dieser Mutation ist dies allerdings unwahrscheinlich, da T217A an der kleinen Furche unspezifisch bindet.

Die Messungen an dieser Mutation sollten also wiederholt werden und zusätzlich mit noch ausstehenden SPR-Messungen verglichen werden.

5 Auswertung und Ergebnisse

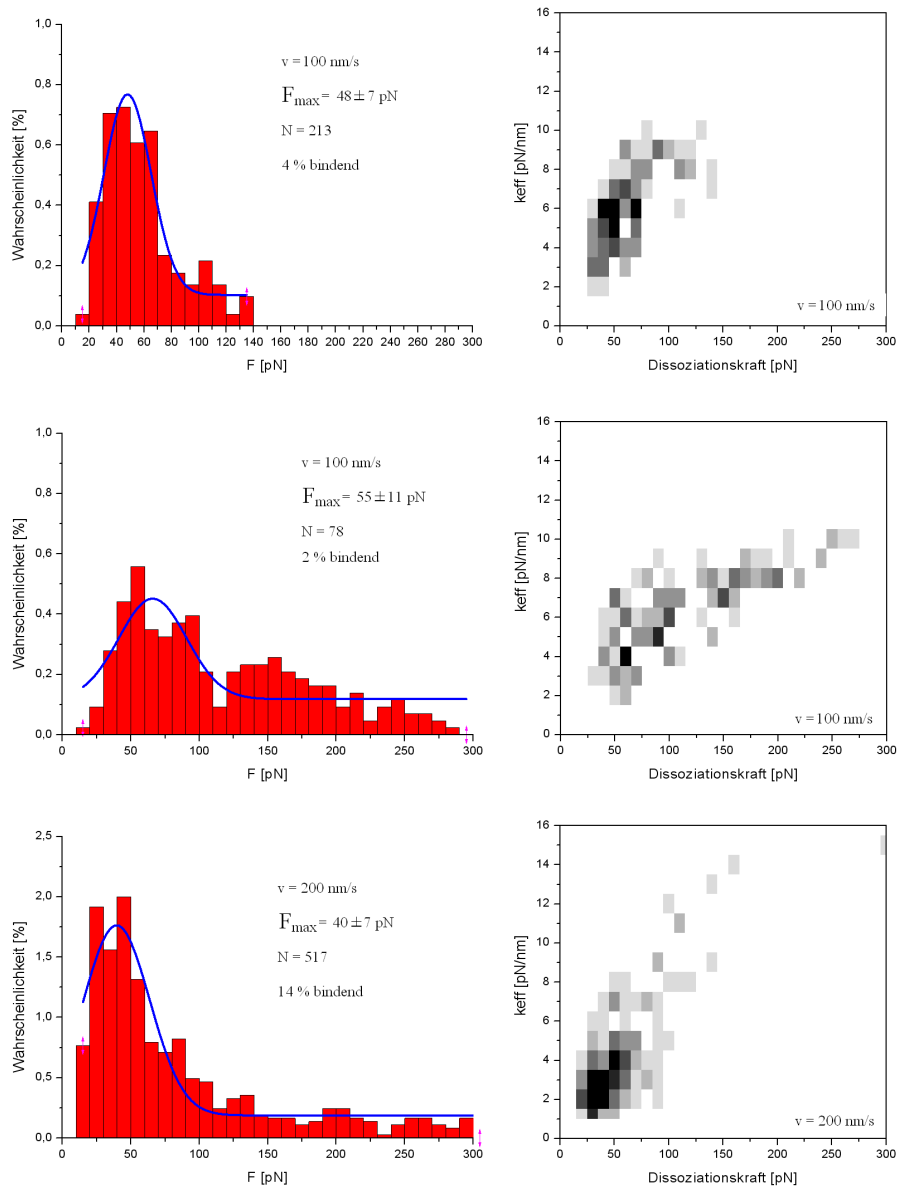


Abbildung 5.13: In der ersten Spalte sind die Dissoziationskräfte-Verteilungen für die Rückziehggeschwindigkeiten von 100 nm/s (vom 15.07.2011), 100 nm/s (vom 10.07.2011), sowie 200 nm/s (vom 12.07.2011) gezeigt der Mutanten T217A. Die blaue Kurve ist der Verlauf des Gauß-Fits. In der zweiten Spalte sind 2D-Histogramme der Kraft/Elastizitäten für die jeweilige Rückziehggeschwindigkeit zu sehen. Je höher der Grauwert, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit.

5 Auswertung und Ergebnisse

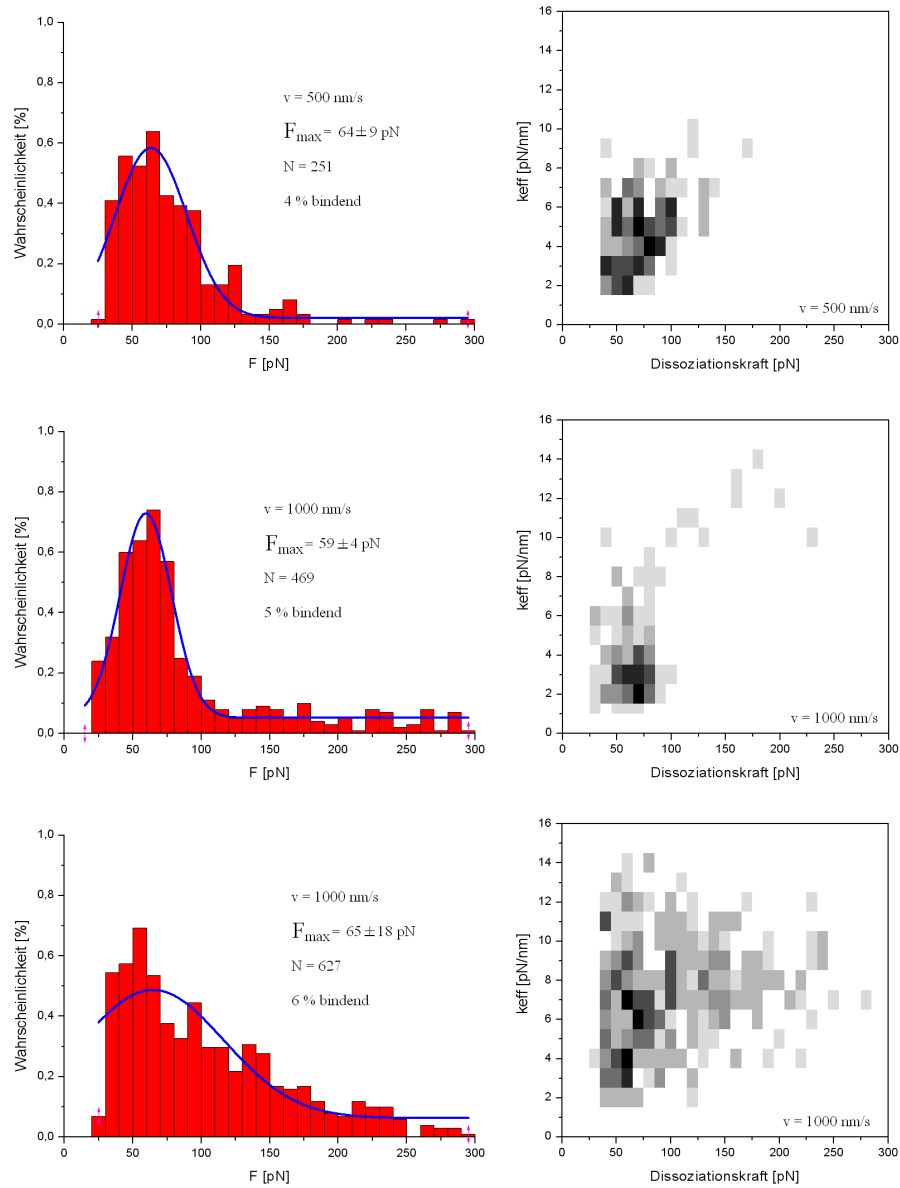


Abbildung 5.14: Analog zu Abbildung 5.13, für die Rückziehgeschwindigkeiten 500 nm/s (vom 11.07.2011), 1000 nm/s (vom 11.07.2011) und 1000 nm/s (vom 09.07.2011) für T217A.

5 Auswertung und Ergebnisse

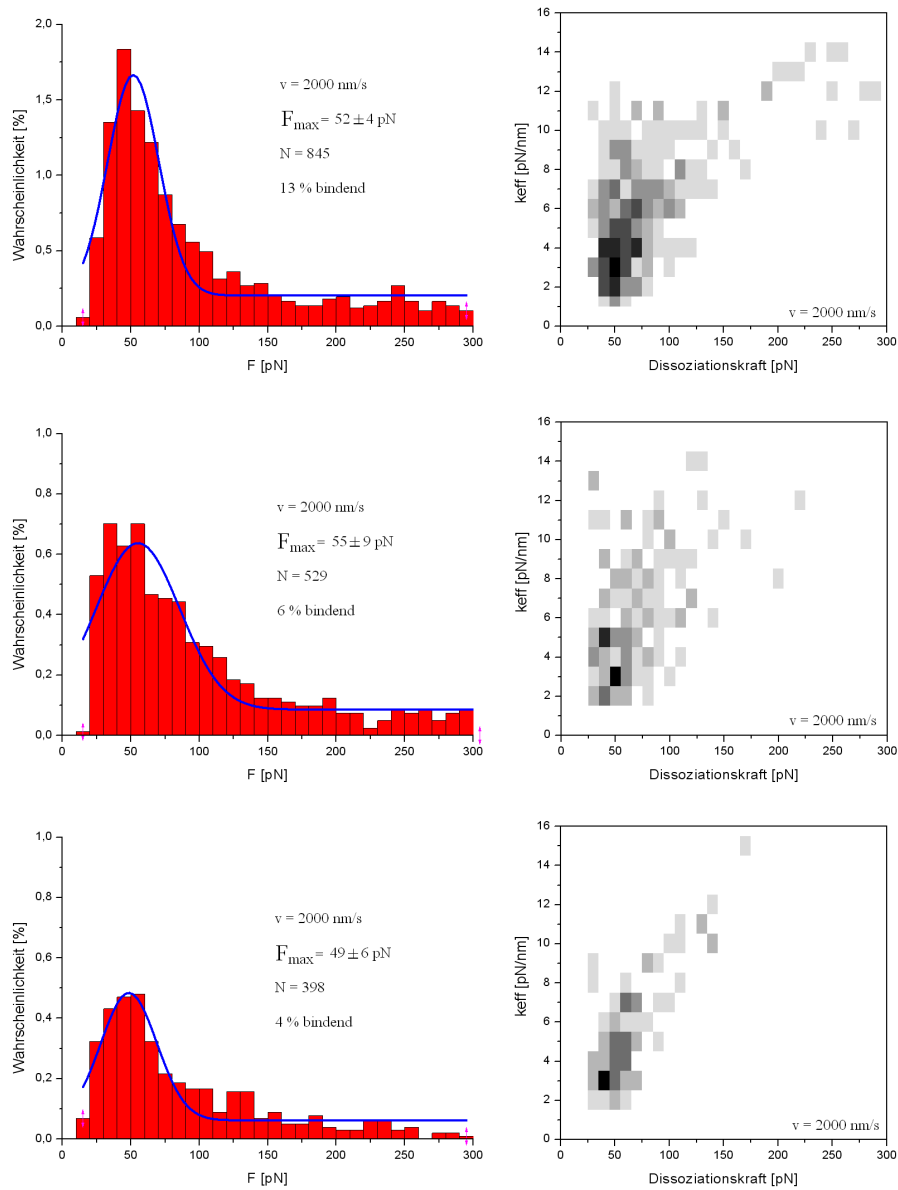


Abbildung 5.15: Analog zu Abbildung 5.13, für die Rückziehgeschwindigkeiten 2000 nm/s (vom 13.07.2011), 2000 nm/s (vom 21.06.2011) und 2000 nm/s (vom 22.06.2011) für T217A.

5 Auswertung und Ergebnisse

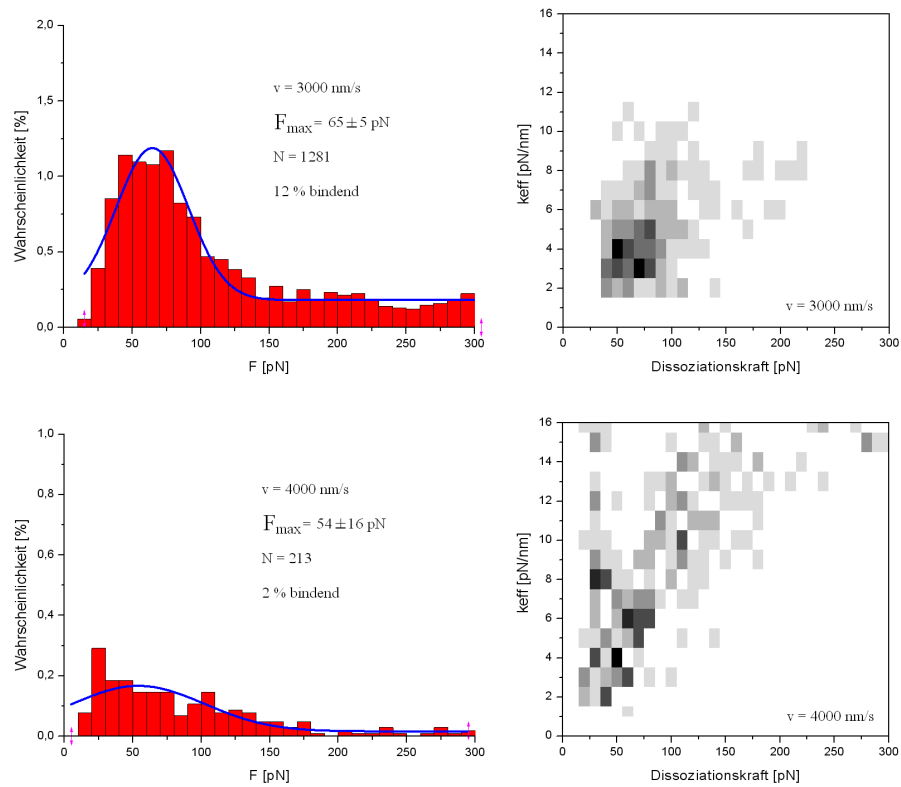


Abbildung 5.16: Analog zu Abbildung 5.13, für die Rückziehggeschwindigkeiten 3000 nm/s (vom 10.07.2011) und 4000 nm/s (vom 22.06.2011) für die Mutante T217A.

5.4 Das heterogene Bindungsmodell

Mit einem Gauß-Fit an die Verteilung der Dissoziationskräfte in den bisher vorgestellten Histogrammen läßt sich gut die wahrscheinlichste Dissoziationskraft extrahieren. Allerdings zeigt dieser Fit und erklärt das Modell von Bell, Evans und Ritchie nicht die auftretenden höheren Kräfte und den dadurch entstehenden unsymmetrischen Verlauf der Verteilungen.

Dieser Verlauf kann durch den „Adhoc“-Ansatz, siehe [REB⁺06], dass sich die Wechselwirkungslänge leicht von Dissoziationsereignis zu Dissoziationsereignis ändert, erhalten werden. Dieser Ansatz läßt sich dadurch motivieren, dass man im Experiment die Normalkraft mißt.

Die Auswertung der Daten mit diesem heterogenen Bindungsmodell wurden von Sebastian Getfert aus der Arbeitsgruppe „Kondensiert Materie“ durchgeführt. Wendet man dieses Modell auf die Daten an, so erhält man als Fit die Kurven, die in den Histogrammen der Mutanten V218A und R176A in grau dargestellt sind. Es kann festgestellt werden, dass sie die Verteilungen gut wiedergeben, bis auf die Rückziehggeschwindigkeit 100nm/s der Mutante R176A. Jedoch wurde diese bereits aufgrund des 2D-Histogramms von der Auswertung ausgeschlossen.

Als Wechselwirkungslänge und Dissoziationsratenkonstante ergeben sich für die Mutante V218A (ohne Berücksichtigung der Rückziehggeschwindigkeit von 4000 nm/s)

$$x_{\beta} = (1,1 \pm 0,2)\text{nm} \quad (5.20)$$

und

$$k_d = 5 \cdot 10^{-4} \frac{1}{\text{s}}. \quad (5.21)$$

Damit erhält man mit diesem Modell für den V218A-DNA-Komplex eine höhere Lebensdauer als des Wildtyps. Dies ist, wie bereits erwähnt, unwahrscheinlich.

Für die Mutante R176A erhält man unter Verwendung aller Datenpunkte

$$x_{\beta} = (0,27 \pm 0,02)\text{nm} \quad (5.22)$$

und

$$k_d = 1,2 \cdot 10^{-2} \frac{1}{\text{s}}. \quad (5.23)$$

5 Auswertung und Ergebnisse

Daraus ergibt sich eine Lebensdauer von ungefähr $\tau = 80$ s. Diese Mutante sollte noch untersucht werden, wenn die Datenpunkte, die hier ausgeschlossen wurden, auch bei der Anwendung des Modells ausgeschlossen werden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Bindung punktmutierter Proteine der DNA-bindenden Domäne des Transkriptionsaktivators PhoB und der DNA des Bakteriums *Escherichia coli* mit Hilfe der Einzelmolekülkraftspektroskopie untersucht. Der Transkriptionsaktivator PhoB wird untersucht, da *Escherichia coli* zu den am Besten erforschten Bakterien gehört.

Die hier verwendete Methode der AFM-Einzelmolekülkraftspektroskopie ist eine sehr sensitive Methode und dafür geeignet quantitative Aussagen über die Spezifität von intermolekularen Bindungen und deren Lebensdauer treffen zu können.

Die mutierten Aminosäuren binden alle unspezifisch an das DNA-Rückgrat der kleinen Furche der DNA. Dabei konnte bei den Mutanten V218A und R176A keine signifikante Änderung der Bindungsaffinität im Bereich der Messgenauigkeit im Vergleich zum Wildtyp [WGK⁺09] beobachtet werden. Bei der Mutanten V218A stimmt dieses Ergebnis mit der Erwartung überein, da Valin 218 eine ungeladene Aminosäure ist und der Austausch gegen Alanin keine große Veränderung der chemisch-physikalischen Eigenschaften darstellt.

Allerdings zeigt auch die Mutante R176A innerhalb des Fehlers eine ähnliche Bindungsaffinität wie der Wildtyp bei der Auswertung nach dem Modell von Bell, Evans und Ritchie. Dies ist beachtenswert, da die These vertreten wird, dass Arginine wesentlich für die Bindung des Proteins und der kleinen Furche ist [RWN⁺11]. Diese These kann nicht bestätigt werden.

Beide Mutanten sollten nun mittels Surface Plasmon Resonance (SPR) untersucht werden, um diese Ergebnisse zu verifizieren. Bei diesem Verfahren können unspezifische Wechselwirkungen von spezifischen Bindungen unterschieden werden.

Zu der Mutanten T217A können keine Aussagen gemacht werden. Generell wird ein ähnliches Verhalten wie der Mutanten V218A erwartet, da auch T217 unspezifisch an das DNA-Rückgrat bindet. Die Daten zeigen jedoch nicht den erwarteten Verlauf und das Ergebnis der Auswertung erscheint nicht plausibel. Trotz ausführ-

licher Fehlersuche (unter anderem der Kontrolle der Federkonstanten) konnte die Ursache hierfür nicht gefunden werden. Die kraftspektroskopischen Messungen für diese Mutante müssen daher wiederholt werden. Außerdem sollte die Bindung durch SPR-Messungen untersucht werden.

Bei den Mutanten V218A und R176A konnte die erwartete Abhängigkeit der wahrscheinlichsten Dissoziationskraft von der Belastungsrate beobachtet werden. Allerdings muss noch geklärt werden, warum bei hohen Rückziehggeschwindigkeiten ein Rückgang der wahrscheinlichsten Dissoziationskraft beobachtet wurde.

Die von Markus Ritzfeld bereits durchgeführten SPR-Messungen zeigen, dass die basenspezifische Bindung an die kleine Furche essentiell für die Bindung des Proteins PhoB an die DNA ist. Hingegen sind die hier untersuchten Mutanten, die unspezifisch am DNA-Rückgrat binden, nicht wesentlich für die Bindung des Proteins an die DNA.

Des Weiteren müssen Kompetitionsexperimente durchgeführt werden, um die spezifische Bindung der Mutanten an die DNA nachzuweisen.

Bei zukünftigen kraftspektroskopischen Untersuchungen könnten längere Linker (>30 nm) oder steifere Cantilever (>20 pN) ausprobiert werden, da eine Simulation von Dissoziationsereignissen durch Sebastian Getfert [Get] ergeben hat, dass bei einem wie dem hier verwendeten System (mit einer Linkerlänge kleiner als 30 nm und einer Federkonstanten kleiner als 20 pN) bei Mehrfachbindungen die Wahrscheinlichkeit eines gleichzeitigen Dissoziierens nicht vernachlässigbar ist. Diese Ereignisse sind dann nicht als Mehrfachereignis erkennbar.

Als Nächstes sind Messungen am PhoB-DNA-Komplex mit fluoreszenzmarkierten Bindungspartnern geplant. Durch die Kombination von Einzelmolekül-Kraftspektroskopie mit lokalen Energietransfereffekten (Fluorescence Resonant Energy Transfer, FRET) sollten durch ein korreliertes Fluoreszenzsignal spezifische von unspezifischen Ereignissen unterschieden werden. Dies ist ein Vorteil bei der Auswertung und Bestimmung der Wechselwirkungslänge x_β und der Dissoziationsratenkonstante k_d im Vergleich zur Kraftspektroskopie.

Danksagung

Prof. Dr. Anselmetti möchte ich danken, dass diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 613 im Teilgebiet K2 ermöglicht wurde, für die Unterstützung, für die Bereitstellung der Mittel und für die gute Arbeitsatmosphäre in seiner Arbeitsgruppe.

Bei Prof. Dr. Sewald bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit in der Kooperation und der Bereiterklärung zum zweiten Gutachter.

Volker Walhorn danke ich für seine permanente Unterstützung, für Rat und Tat zu jeder Zeit, aufmunternde Worte, wenn es mal nicht so lief und Begeisterung, wenn es funktioniert.

Dank geht auch an Markus Ritzefeld für die Herstellung der Proteine und der DNA, sowie für die Unterstützung in Fragen der Chemie und der Diskussion meiner Ergebnisse.

Ich danke Katja Tönsing und Christoph Pelargus für die biochemische und technische Unterstützung, ein offenes Ohr und außerfachliche Gespräche.

Vielen Dank auch unserer Sekretärin, Gaby Krohme, deren Arbeit ungemein wichtig für das reibungslose Funktionieren der Arbeitsgruppe ist und ihrer immer sofortigen Hilfe.

Ein besonderer Dank geht auch an meine Bürokollegen Alexander Harder, Sören Grannemann und Andre Spiering, sowie Andy Sischka, der sich öfter in unserem Büro aufhält als in seinem eigenen, für technischen Rat und Unterstützung, lustige und ernste Gespräche.

Sebastian Rahn danke ich für seine Geduld und Zeit bei der Einarbeitung in die Präparation und der Bedienung des AFMs, sowie des Korrekturlesens des biologischen Teils.

Vielen Dank an Mareike Dieding und Verena Mohaupt, die mit mir lange Abende und Wochenenden in der Uni verbracht haben, und diese mit Eis-Essen, Spät-Abend-Picknicken und Mittagessen-Kochen verschönert haben.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Ich danke Annika Willunat und Katrin Unseld für ihre Unterstützung in der Endphase der Arbeit und die Erinnerung daran, dass es ein Leben außerhalb der Physik gibt.

Dank geht auch an den Sportkurs „Pilates für Mitarbeiterinnen“, der mich als Studentin aufgenommen, für einen freien Kopf gesorgt und viele Kontakte innerhalb der Uni ermöglicht hat.

Ich danke meinen Eltern für die Finanzierung des Studiums.

Ein besonderer Dank geht an Martin Jung, meinen Freund, kritischsten Korrekteur und Begleiter seit Studienbeginn. Danke für deine Geduld, Hilfe bei der Datenauswertung, deine Sicht als Teilchenphysiker auf mein Forschungsgebiet, deinen Rat und finanzielle Unterstützung, sowie technischen Support.

Anhang A

Erklärung der Umformung von Gleichung (2.17) zur Gleichung (2.20):

Die komplexen Konstanten C_1 und C_2 kann man in der Polardarstellung schreiben als:

$$C_1 = Ae^{i\phi}, \quad (6.1)$$

$$C_2 = Be^{i\delta}. \quad (6.2)$$

Damit ist

$$q(t) = e^{-\frac{\gamma}{2m}} \left(Ae^{i\tilde{\omega}_0 t + \phi} + Be^{-i\tilde{\omega}_0 t + \delta} \right). \quad (6.3)$$

Der Imaginärteil von $q(t)$ muss gleich 0 sein, weil (*Warum?*). Damit erhält man zwei Bedingungen für C_1 und C_2 . Mit

$$\operatorname{Re}[C_1] = A \cos \phi, \quad \operatorname{Im}[C_1] = A \sin \phi, \quad (6.4)$$

$$\operatorname{Re}[C_2] = B \cos \delta, \quad \operatorname{Im}[C_2] = B \sin \delta, \quad (6.5)$$

$$(6.6)$$

und

$$e^{ix} = \cos x + i \sin x \quad (6.7)$$

kann man Gleichung (6.3) umformen zu:

$$q(t) = e^{-\frac{\gamma}{2m}} \left((A \cos \phi + iA \sin \phi)(\cos \tilde{\omega}_0 t + i \sin \tilde{\omega}_0 t) + (B \cos \delta + iB \sin \delta)(\cos \tilde{\omega}_0 t + i \sin \tilde{\omega}_0 t) \right). \quad (6.8)$$

Der Imaginärteil von $q(t)$ lautet nun

$$\operatorname{Im}[q(t)] = e^{-\frac{\gamma}{2m}} \left(\sin(\tilde{\omega}_0 t)(A \cos \phi - B \cos \delta) + \cos(\tilde{\omega}_0 t)(A \sin \phi + B \sin \delta) \right). \quad (6.9)$$

Daraus folgen aus der Bedingung $\operatorname{Im}[q(t)] = 0$ die Gleichungen

$$A \cos \phi = B \cos \delta, \quad (6.10)$$

$$A \sin \phi = -B \sin \delta. \quad (6.11)$$

Löst man dieses Gleichungssystem erhält man

$$A = B, \quad (6.12)$$

$$\delta = -\phi. \quad (6.13)$$

6 Zusammenfassung und Ausblick

Damit lauten die Konstanten C_1 und C_2 nun

$$C_1 = Ae^{i\phi}, \quad (6.14)$$

$$C_2 = Ae^{-i\phi}. \quad (6.15)$$

Nun wählt man noch $A = \frac{A}{2}$, und man erhält die Bedingungen (2.18) und (2.19).

Anhang B

Erklärung der Umformung von Gleichung (2.24) zur Gleichung (2.25):

Durch die Einführung von

$$y = \frac{1}{\sqrt{m^2(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + \gamma^2\omega^2}} \left(m(\omega_0^2 - \omega^2) \cos(\omega t) + \gamma\omega \sin(\omega t) \right)$$

wird (2.24) zu

$$\operatorname{Re}(q_p(t)) = \frac{F_0}{\sqrt{m^2(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + \gamma^2\omega^2}} y \quad (6.16)$$

Durch Umformung von y erhält man

$$\begin{aligned} y &= \frac{m(\omega_0^2 - \omega^2)}{\sqrt{m^2(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + \gamma^2\omega^2}} \cos(\omega t) + \frac{\gamma\omega}{\sqrt{m^2(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + \gamma^2\omega^2}} \sin(\omega t) \\ &= \frac{m(\omega_0^2 - \omega^2)}{m(\omega_0^2 - \omega^2) \sqrt{1 + \frac{\gamma^2\omega^2}{m(\omega_0^2 - \omega^2)}}} \cos(\omega t) + \frac{\gamma\omega}{m(\omega_0^2 - \omega^2) \sqrt{1 + \frac{\gamma^2\omega^2}{m(\omega_0^2 - \omega^2)}}} \sin(\omega t). \end{aligned}$$

Mit

$$x = \frac{\gamma\omega}{m(\omega_0^2 - \omega^2)}$$

wird

$$y = \frac{1}{\sqrt{1+x^2}} \cos(\omega t) + \frac{x}{\sqrt{1+x^2}} \sin(\omega t).$$

Mit

$$\cos(\arctan x) = \frac{1}{\sqrt{1+x^2}}, \quad \sin(\arctan x) = \frac{x}{\sqrt{1+x^2}}$$

und

$$\cos(\omega t + \Phi) = \cos(\omega t) \cos \Phi + \sin(\omega t) \sin \Phi$$

folgt

$$y = \cos(\omega t + \Phi).$$

Damit wird (6.16) zu Gleichung (2.25).

Literaturverzeichnis

- [AP87] U. Aebi and T. D. Pollard. A glow discharge unit to render electron microscope grids and other surfaces hydrophilic. *Journal of Electron Microscopy Technique*, 1(7):29–33, 1987.
- [Bar06] P. Barth. Hochauflösende Strukturierung von Siliziumoberflächen mittels Mikrokontaktdruck-Technik untersucht mit Rasterkraftmikroskopie. *Dissertation, Universität Ulm*, 2006.
- [Bel78] G. I. Bell. Models for the Specific Adhesion of Cells to Cells. *Science*, 200(4342), 1978.
- [BJ95] H. J. Butt and M. Jaschke. Calculation of thermal noise in atomic force microscopy. *Nanotechnology*, 6(1-7), 1995.
- [BMW00] C. Bustamante, J. C. Macosko, and G. J. L. Wuite. Grabbing the cat on the tail: manipulating molecules one by one. *Nature*, 1(130-136), 2000.
- [BS99] J. Bille and W. Schlegel. *Medizinische Physik*. Springer Verlag, 1999.
- [BSGRC02] A. G. Blanco, M. Sola, F. X. Gomis-Rueth, and M. Coll. Tandem dna recognition by phob, a two-component signal transduction transcriptional activator. *Structure (London)*, 10(5):701–713, 2002.
- [BSMS05] P. Bachhawat, G. V. T. Swapna, G. T. Montelione, and A. M. Stock. Mechanism of activation for transcription factor phob suggested by different modes of dimerization in the inactive and active states. *Structure (London)*, 13(19):1353–1363, 2005.
- [BTS00] J. Berg, J. L. Tymoczko, and L. Stryer. *Biochemistry*. W. H. Freeman, 2000.

Literaturverzeichnis

- [BTS06] J. Berg, J. L. Tymoczko, and L. Stryer. *Biochemistry*. W. H. Freeman, 2006.
- [CS05] C.A. Clifford and M.P. Seah. The determination of atomic force microscope cantilever spring constants via dimensional methods for nanomechanical analysis. *Nanotechnology*, 16(1666-1680), 2005.
- [Det99] W. Dettmann. Dynamische Kraftspektroskopie von einzelnen Rezeptor-Ligand Paaren zu Interaktionen von Zellen. *Dissertation, Universitaet Muenchen*, 1999.
- [EGH06] A. Ebner, H. J. Gruber, and P. Hinterdorfer. Molekulare Kraftmikroskopie und Kraftspektroskopie. *BIOspektrum*, 12(5), 2006.
- [Ell95] V. Ellings. *Digital Instruments Nanoscope Comand Reference Manual*. Santa Barbara CA, 1995.
- [ER97] E. Evans and K. Ritchie. Dynamic Strength of Molecular Adhesion Bonds. *Biophysical Journal*, 72(4), 1997.
- [Fra93] T. Fraengsmyr. Nobel Lectures, Physics 1981-1990. *World Scientific Publishing Co.*, 1993.
- [Get] S. Getfert. private communication.
- [Har09] A. Harder. Kraftmikroskopische und kraftspektroskopische Untersuchungen an Proteoglykanen. *Diplomarbeit, Universitaet Bielefeld*, 2009.
- [HB93] J.L. Hutter and J. Bechhoefer. Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev. Sci. Instrum.*, 64(1868-1873), 1993.
- [HGIW85] P. Hanggi, H. Grabert, G. L. Ingold, and U. Weiss. Quantum theory of activated events in presence of long-time memory. *Phys. Rev. Lett.*, 55:761-764, 1985.
- [Hor09] F. Horn. *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch fuer das Medizinstudium*. Georg Thieme Verlag KG, 2009.

Literaturverzeichnis

- [HW10] Y. J. Hsieh and B. L. Wanner. Global regulation by the seven-component pi signaling system. *Y.-J. Hsieh and B. L. Wanner*, 13(2):198–203, 2010.
- [Jef97] G. A. Jeffrey. *An Introduction to Hydrogen Bonding*. Oxford University Press, 1997.
- [JNOF00] A. Janshoff, M. Neitzert, Y. Oberderfer, and H. Fuchs. Kraftspektroskopie an molekularen Systemen - Einzelmolekuelnspektroskopie an Polymeren und Biomolekuelen. *Angewandte Chemie*, 112(3346 - 3374), 2000.
- [Kow04] C. Kowalski. *Digital Instruments MultiMode SPM Instruction Manual*. Santa Barbara CA, 2004.
- [Kra40] H. A. Kramers. Brownian Motion in a Field of Force and the Diffusion Model of Chemical Reactions. *Physica*, 7(4), 1940.
- [Kri97] V. A. Kriksman. Ludwig wilhelmy, jacobus h. van't hoff, svante arrhenius und die geschichte der chemischen kinetik. *Chemie in unserer Zeit*, 31(6):291–300, 1997.
- [LM02] R. Levy and M. Maaloum. Measuring the spring constant of atomic force microscope cantilevers: thermal fluctuations and other methods. *Nanotechnology*, 13(33-37), 2002.
- [MAK⁺96] K. Makino, M. Amemura, T. Kawamoto, S. Kimura, H. Shinagawa, A. Nakata, and M. Suzuki. Dna binding of phob and its interaction with rna polymerase. *J Mol Biol*, 259(1):15–26, 1996.
- [REB⁺06] M. Raible, M. Evstigneev, F. W. Bartels, R. Eckel, M. Nguyen-Duong, R. Merkel, Ros, D. Anselmetti, and P. Reimann. Theoretical analysis of single-molecule force spectroscopy experiments: Heterogeneity of chemical bonds. *Biophysical Journal*, 90(11):3851?3864, 2006.
- [Rit09] M. Ritzefeld. Dna-peptid-interaktionen am beispiel des transkriptionsaktivators phob. *Universitaet Bielefeld, Diplomarbeit*, 2009.
- [RWN⁺11] M. Ritzefeld, K. Wollschlaeger, G. Niemann, D. Anselmetti, and N. Se-

Literaturverzeichnis

wald. Minor groove recognition is important for the transcription factor phob: a surface plasmon resonance study. *Mol. BioSyst.*, 2011.

- [SDH01] R. W. Stark, T. Drobek, and W. M. Heckl. Thermomechanical noise of a free v-shaped cantilever for atomic-force microscopy. *Ultramicroscopy*, 86(207-215), 2001.
- [SLMW95] J.E. Sader, I. Larson, P. Mulvaney, and L.R. White. Method for the calibration of atomic force microscope cantilevers. *Rev. Sci. Instrum.*, 66(3789-3798), 1995.
- [SP84] R. T. Sauer and C. O. Pabo. Protein-dna recognition. *Ann. Rev. Biochem.*, (53):293–321, 1984.
- [Toe04] A. Toepel. Chemie und Physik der Milch: Naturstoff- Rohstoff- Lebensmittel. *Behr's Verlag*, 2004.
- [Upa06] S. K. Upadhyay. *Chemical kinetics and reaction dynamics*. Springer, 2006.
- [VK92] N. G. Van Kampen. Stochastic Processes in Physics and Chemistry. *North-Holland Amsterdam*, 1992.
- [VS03] K. P. C. Vollhardt and N. E. Schore. *Organische Chemie*. Wiley-VCH, 2003.
- [Wal09] V. Walhorn. Photonische Rasterkraftmikroskopie an fluoreszierenden Nanokristallen und molekularen Photoschaltern. *Dissertation, Universitaet Bielefeld*, 2009.
- [Wan93] B. L. Wanner. Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *J. Cell. Biochem.*, 51(1):47–54, 1993.
- [Wat11] J. D. Watson. *Molekularbiologie*. Pearson Studium, 2011.
- [WGK⁺09] K. Wollschlaeger, K. Gaus, A. Koernig, R. Eckel, M. Wilking, S.-D. and McIntosh, Z. Majer, A. Becker, R. Ros, D. Anselmetti, and N. Sewald. Single-molecule experiments to elucidate the minimal requirement for dna recognition by transcription factor epitopes. *small*, 5(4):484–495, 2009.

Literaturverzeichnis

- [Wol09] K. Wollschlaeger. Modulation der Bindung des Transkriptionsfaktors PhoB aus *Escherichia coli* an DNA. *Dissertation, Universitaet Bielefeld*, 2009.
- [YOI⁺08] T. Yamane, H. Okamura, M. Ikeguchi, Y. Nishimura, and A. Kidera. Water-mediated interactions between dna and phob dna-binding/transactivation domain: Nmr-restrained molecular dynamics in explicit water environment. *Proteins: Struct., Funct., Genet.*, 71(4):1970–1983, 2008.