

Einleitung

Proteine gehören zu den Grundbausteinen der Zelle, sie verleihen ihr Stabilität und agieren als Nanomaschinen, die an allen zellulären Prozessen beteiligt sind. Sie bestehen aus einer linearen Aneinanderreihung von Aminosäuren, wobei 20 verschiedene Aminosäuren mit jeweils spezifischen, physikalischen Eigenschaften Verwendung finden. Ihre Funktion können Proteine nur in ihrer korrekt gefalteten, dreidimensionalen Tertiär- bzw. Quartärstruktur ausüben. Bei einer Vielzahl von Proteinen findet diese Faltung spontan und ohne weitere Hilfsproteine in physiologischer Umgebung statt. Die sich ergebende Struktur des Proteins hängt dann nur von der sequentiellen Anordnung der Aminosäuren innerhalb der Kette ab. Der Faltungsprozess ist äußerst komplex und eine Vorhersage der gefalteten Struktur allein aus der Sequenz der Aminosäurekette ist nur in Spezialfällen oder durch vergleichende Methoden möglich.

Eine häufig in Proteinen vorkommende Struktur ist die Superhelix, die sich durch ihren sehr einfachen Aufbau auszeichnet. Superhelices bestehen aus mindestens zwei α -Helices, die sich gegenseitig umwinden. Trotz dieser einfachen Struktur sind die intra- und intermolekularen Wechselwirkungen der einzelnen α -Helices sehr vielschichtig. Dies macht die Superhelix zu einem viel erforschten Modellsystem, von welchem ausgehend versucht wird, allgemeine Fragen zur Proteinfaltung zu klären. Tatsächlich ist die Superhelix bisher die einzige bekannte Struktur, die allein aus der Aminosäuresequenz mit Hilfe eines Satzes parametrischer Gleichungen vorher gesagt werden kann. Diese frei verfügbaren Vorhersageprogramme ermöglichten die Abschätzung, dass etwa 2% der in Proteinen vorkommenden Aminosäuren in einer dimeren oder trimeren Superhelixstruktur auftreten.

Dabei sind Superhelices nicht allein aufgrund ihrer Häufigkeit, sondern auch wegen ihrer speziellen mechanischen Eigenschaften an Orten zu finden, die der Wirkung von Kräften ausgesetzt sind. Beispiele hierfür sind die Gruppe der Intermediärfilamente, die unter anderem Bestandteil des Zytoskeletts sind oder als Keratin in Haar, Horn und Federn vorkommen sowie das Fibrinogen, das bei der Blutgerinnung eine Rolle spielt. Auch können Superhelices bei ihrer Faltung aktiv Kraft ausüben. Physiologisch relevant ist dies beispielsweise bei der Membranfusion wie sie bei Viren (HIV-gp41 Komplex) oder Transport Vesikeln (SNARE-Komplex) vorkommt. Als weiteres Beispiel sind noch molekulare Motoren zu nennen, die bei allen zellulären Prozessen, die Bewegung erfordern eine wichtige Rolle spielen. Molekulare Motoren treten häufig als Oligomere auf, wobei die Oligomerisation meist durch Superhelices erreicht wird. Diese sind lateralen Kräften ausgesetzt, wenn sich der Motor fortbewegt.

In allen, oben genannten Beispielen sind die mechanischen Eigenschaften der Superhelices von Bedeutung, die nur mit Einzelmolekültechniken experimentell zugänglich sind. So machten es experimentelle Aufbauten, wie die optische Pinzette oder das Kraftmikroskop möglich, einzelne Proteine einer definierten Kraft auszusetzen und sowohl die mechanischen Eigenschaften gefalteter Proteine zu testen, als auch die Vorgänge bei mechanisch induzierten Entfaltungen.

In dieser Arbeit wird die mechanische Methode der Kraftmikroskopie angewandt, um dimere Superhelices schrittweise aufzutrennen. Es wird gezeigt, dass das Auflösungsvermögen der Methode ausreichend ist, um die Effekte einzelner Aminosäuresubstitutionen zu detektieren. Außerdem werden die Kräfte bestimmt die zum Entfalten verschiedener Superhelices benötigt werden, die in molekularen Motoren vorkommen. Ferner ist die Kraftspektroskopie in der Lage, Antworten zu liefern, die mit klassischen Ensemble-Methoden nicht direkt zugänglich sind. So ist es mit der hier vorgestellten Methode möglich, das Faltungsverhalten und die Stabilität einzelner α -helikaler Windungen innerhalb einer Superhelix lokal aufzulösen. Mit dieser Methode können also wichtige Fragen zur Proteinfaltung, wie die der Größe, Kinetik und der Lokalisation von Faltungskeimen direkt beantwortet werden.

Kapitel 1

Thermodynamik der mechanischen Entfaltung von Superhelices

Dieses Kapitel gibt einen Überblick über die theoretische Beschreibung der mechanischen Entfaltung von Superhelices. Dazu wird zuerst der strukturelle Aufbau dimerer Superhelices umrissen, anschließend werden die thermodynamischen Grundlagen der Proteinentfaltung eingeführt. Es wird gezeigt, dass die Entfaltung von Superhelices sowohl im thermodynamischen Gleichgewicht als auch im Nichtgleichgewicht beobachtet werden kann, was in den Abschnitten 1.2 und 1.3 behandelt wird. In Abschnitt 1.4 werden die kürzlich aufgestellten Fluktuationstheoreme vorgestellt, die eine Brücke zwischen Nichtgleichgewichts- und Gleichgewichtsbeschreibung schlagen.

1.1 Der Aufbau dimerer Superhelices

Superhelices sind drei-dimensionale Strukturen, die sich aus der korrekten Anordnung mehrerer α -Helices zusammensetzen. Die einfachsten Superhelices bestehen aus nur zwei α -Helices, die sich gegenseitig umwinden. Da in dieser Arbeit nur dimere Superhelices untersucht werden, wird sich dieser Abschnitt auf solche beschränken. Ein umfassender Überblick über komplexere Superhelices ist in [1][2] zu finden.

Die Strukturen der α -Helix und der Superhelix wurden bereits in den 50er Jahren von Pauling [3] und Crick [4] beschrieben. Abbildung 1.1 a) zeigt drei Windungen einer einzelnen α -Helix. Nur die Atome des Rückgrats sind eingezeichnet; die nicht gezeigten Restgruppen der Aminosäuren würden immer von der Helixachse weg zeigen. Stabilisiert wird die α -Helix durch Wasserstoffbrücken zwischen der C=O Gruppe der n -ten Aminosäure und der N-H Gruppe der $n + 4$ ten Aminosäure (grün gestrichelt in Abbildung 1.1 a)), wobei die Nummerierung vom N-terminalen Ende her erfolgt. Eine α -helikale Windung fasst im Mittel 3.6 Aminosäuren. Bezeichnet man also die Aminosäuren mit Buchstaben von a bis g (abcdefg) _{n} , so kommt die Aminosäure a_1 fast senkrecht über der Aminosäure a_0 zu liegen. Die Nummerierung durch die „Heptadenwiederholung“ ist in Abbildung 1.1 b) gezeigt. Dort sind schematisch zwei Windungen von zwei sich nebeneinander befindenden

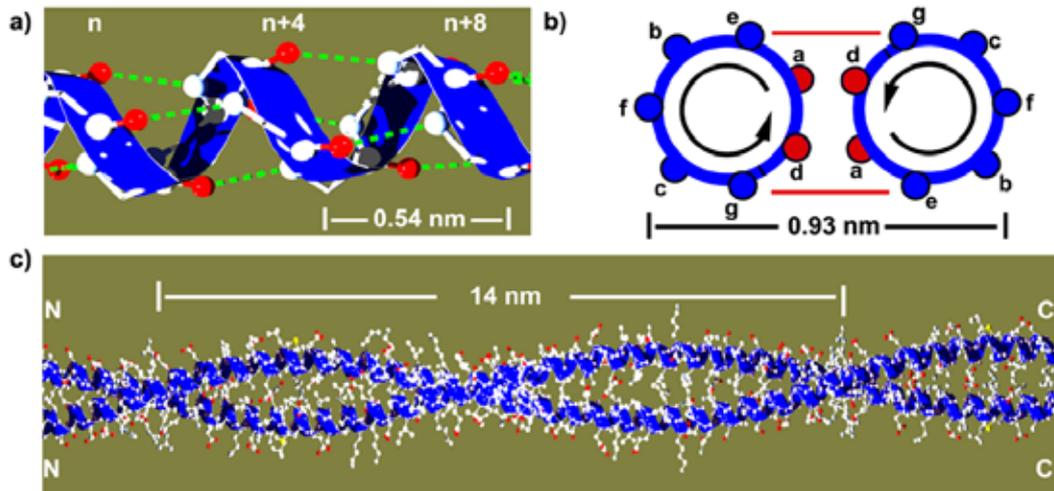


Abbildung 1.1: a) Schematischer Aufbau einer α -Helix. Die Restgruppen der Aminosäuren sind nicht gezeigt. b) Schematischer Querschnitt durch eine Superhelix. Gezeigt sind zwei α -helikale Windungen. Die Blickrichtung ist vom C-terminalen Ende zum N-terminalen Ende hin. Die Aminosäuren a und d bilden den hydrophoben Streifen der α -Helix, die Aminosäuren e und g zeigen häufig elektrostatische Wechselwirkungen („Salzbrücken“). c) Schematische Struktur einer Superhelix mit eingezeichneten Aminosäureresten. Die α -Helices umwinden einander mit einer Ganghöhe von etwa 14 nm. Alle in der Abbildung angegebenen Maße können zwischen verschiedenen Superhelices variieren, angegeben sind Mittelwerte [5].

α -Helices aufgetragen. Man blickt dabei vom C-terminalen Ende entlang der Superhelixachse. Sollen sich zwei α -Helices zu einer Superhelix verbinden, so müssen sie sich an ihrer Kontaktfläche nahe kommen. Da die Aminosäurereste von der jeweiligen α -Helix Achse weg zeigen, wird dies wie in Abbildung 1.1 b) geschehen. Um sterische Behinderungen zu vermeiden wird die Restgruppe der Aminosäure d' des einen Stranges zwischen den Restgruppen der Aminosäuren a_0 und a_1 des anderen Stranges zu liegen kommen (rot in Abbildung 1.1 b)). Eine schöne Veranschaulichung dieser „knob-into-holes“-Anordnung wurde bereits 1953 von Crick gegeben [4]. Damit diese Anordnung der beiden α -Helices thermodynamisch stabil bleibt, müssen die Aminosäuren an a- und d-Positionen der Heptade hydrophobe Restgruppen aufweisen. Dieses sich streng wiederholende Muster in der Aminosäuresequenz, das einen hydrophoben Streifen an der jeweiligen α -Helix bildet, ist essentiell für die exakte Vorhersage superhelikaler Strukturen (siehe Seite 45ff in [1]). Die Aminosäuren an den e- und g-Positionen sind meist hydrophil und sie können über intermolekulare, elektrostatische Wechselwirkungen der Superhelix Spezifität verleihen (rote Striche in Abbildung 1.1 b)). Da pro α -helikaler Windung 3.6 Aminosäuren Platz finden, wird sich mit zunehmender Höhe (n) die a_n -Position zunehmend zur a_0 Position verschieben, der jeweilige hydrophobe Streifen wird sich also um die Achse seiner α -Helix winden. Dies führt dazu, dass sich die aneinander liegenden α -Helices gegenseitig umwinden (Abbildung 1.1 c)); aus der strukturellen Geometrie ergibt sich eine Ganghöhe von etwa 14 nm [5].

1.2 Beschreibung im thermodynamischen Gleichgewicht

1.2.1 Grundlagen

In jüngster Zeit wurde es durch neue, experimentelle Techniken möglich, einzelne Makromoleküle gezielt zu strecken und damit einer definierten Kraft auszusetzen¹ [9]. Makromoleküle bestehen aus einer sehr großen Anzahl von Atomen, weshalb mit Hilfe der Ergodenhypothese eine thermodynamische Beschreibung eines einzelnen Moleküls erlaubt ist. Die Ergodenhypothese besagt, dass die thermodynamischen Eigenschaften eines einzelnen Moleküls auch durch eine zeitliche Mittelung gewonnen werden können. Daher kann das Konzept der thermodynamischen Potentiale auch auf Experimente mit einzelnen Molekülen angewandt werden. Berücksichtigt man als neue Variablen die intensive Größe der am Molekül anliegenden Kraft F und die extensive Größe des End-zu-End Abstands z des Moleküls, so lassen sich die bekannten Potentiale erweitern.

$$dE = TdS - pdV + Fdz \quad (1.1)$$

$$dA = -SdT - pdV + Fdz \quad (1.2)$$

$$dG = -SdT + Vdp + Fdz \quad (1.3)$$

$$dG' = -SdT + Vdp - zdF \quad (1.4)$$

Dabei ergeben sich die Potentiale der freien Energie von Helmholtz ($A = E - TS$), der freien Energie von Gibbs ($G = E - TS + PV$) und das Potential $G' = E - TS + PV - FZ$ jeweils durch Legendre-Transformationen aus Gleichung 1.1. Bezeichnet F die Kraft, die parallel zur Richtung der Ausdehnung z wirkt, so darf Fdz als Skalar geschrieben werden. Kraftspektroskopische Experimente mit unendlich steifer Blattfeder, bei denen der Abstand z kontrolliert und die Kräfte F detektiert werden, sind mit der freien Energie G (Gleichung 1.3) verbunden, während bei einer Messung mit unendlich weicher Blattfeder die Kraft F kontrolliert werden kann und somit G' das zugehörige Potential ist [10]. Speziell bei der Beschreibung von Proteinen kann man die Unterschiede zwischen der freien Energie $A(T, V, z)$ von Helmholtz und der freien Energie $G(T, p, z)$ von Gibbs vernachlässigen, da Volumenänderungen der Proteine in Abhängigkeit des Druckes äußerst klein sind. Darüber hinaus kann in kraftspektroskopischen Experimenten der Druck p und die Temperatur T konstant gehalten werden, womit sich aus Gleichung 1.3

$$dG = Fdz \quad \text{oder} \quad G(z_2) = G(z_1) + \int_{z_1}^{z_2} Fdz \quad (1.5)$$

ergibt. Seit Boltzmann lassen sich die Potentiale der klassischen Thermodynamik (Gleichungen 1.1 - 1.4) mit der statistischen Physik in Verbindung bringen. So gilt beispielsweise für ein kanonisches Ensemble der Zusammenhang

$$A(T, V, z) = -k_B T \ln Z_k(T, V, z) \quad (1.6)$$

¹Dieser Abschnitt ist an [6][7][8] angelehnt

zwischen der Helmholtz'schen freien Energie und der kanonischen Zustandssumme Z_k . Diese ist durch

$$Z_k = \sum_n \exp\left(-\frac{E_n}{k_B T}\right) \quad (1.7)$$

gegeben, wobei E_n die Energie aller einnehmbarer Zustände n des Systems bei gegebener Temperatur darstellt. Kennt man also die kanonische Zustandssumme Z_k , so kann mit Gleichung 1.6 auf alle Parameter des Systems geschlossen werden. Ein anderer Weg besteht in der direkten Berechnung der Erwartungswerte der gewünschten Parameter. Mit Kenntnis der Zustandssumme Z_k lässt sich mit dem Gesetz von Boltzmann die Wahrscheinlichkeit, einen bestimmten Zustand n des Systems mit Energie E_n vorzufinden, mit

$$p_n = \frac{1}{Z_k} \exp\left(-\frac{E_n}{k_B T}\right) \quad (1.8)$$

angeben. Somit kann der Erwartungswert einer beliebigen Observablen O mit

$$\langle O \rangle = \sum_n O_n p_n = \frac{\sum_n O_n \exp(-E_n/k_B T)}{\sum_n \exp(-E_n/k_B T)} \quad (1.9)$$

berechnet werden, wobei über alle einnehmbaren Zustände n summiert werden muss. Unter anderem lässt sich auf diese Art die mittlere Energie $\langle E \rangle$ (Gleichung 1.1) des thermodynamischen Systems berechnen. Möchte man in der Praxis die kanonische Zustandssumme beispielsweise eines einzelnen Moleküls angeben, welches sich in wässriger Lösung zwischen Blattfeder und Oberfläche eines Kraftmikroskops befindet, so müssten alle möglichen Zustände n mit berücksichtigt werden. Dazu würden auch sämtliche Beiträge aus den Interaktionen der einzelnen Wasseratome untereinander und mit dem Molekül zählen; eine solche Berechnung würde sehr viel Zeit beanspruchen. Auch ist es in dieser detaillierten Sichtweise schwierig, experimentell zugängliche Zustände, wie den entfalteten oder den gefalteten Zustand eines Proteins zu definieren, da diese sich aus einem Ensemble verschiedener Konformationen zusammensetzen. Um die Rechnungen zu vereinfachen, kann man mehrere Zustände des Systems zusammenfassen. Beispielsweise lässt sich das Ensemble der Zustände T_i , die den entfalteten Zustand i bilden, betrachten. Besteht der Zustand i aus vielen verschiedenen Unterzuständen $n = [1\dots m]$, so ergibt sich als Wahrscheinlichkeit das System im Zustand i zu finden²,

$$p_i = \frac{1}{Z_k} \exp\left(-\frac{G_i}{k_B T}\right) \quad \text{mit} \quad Z_k = \sum_i \exp\left(-\frac{G_i}{k_B T}\right) \quad (1.10)$$

wobei G_i die freie Energie des jeweiligen Ensembles an Unterzuständen beschreibt. Bei einer Vereinfachung der theoretischen Beschreibung durch Zusammenführen von mehreren Zuständen in Unterensembles T_i , hängt die Zustandssumme also eher von der freien als von der potentiellen Energie ab. Dies ist sinnvoll, da für die Energie eines solchen Ensembles neben den enthalpischen Energiebeiträgen auch die entropischen Beiträge berücksichtigt werden müssen.

² $p_i = \sum_n p_n = 1/Z_{k(i)} \sum_n \exp(E_n/k_B T)$ mit Gleichung 1.6 wird dies zu $1/Z_{k(i)} \exp(-A_i/k_B T)$ und bei $p, V = \text{const}$ ergibt sich Gleichung 1.10