

DNS-Importmotor und Azobenzol als Bauteil eines künstlichen molekularen Motors

MORITZ MICKLER | THORSTEN HUGEL

Dieses Dokument enthält Ergänzungen zum Artikel „Von Molekularen Motoren zu künstlichen Nanomaschinen“ in *Physik in unserer Zeit*, 39. Jahrgang 2008, Nr. 1, S. 14.

DNS-Importmotor

Der DNS-Importmotor des Bakteriophagen mit dem Namen phi29 füllt bei der Reproduktion dieses Virus' im Wirtsbakterium das lange DNS-Molekül in die Proteinkapsel eines neuen Exemplars. Dabei setzt der molekulare Motor chemische Energie in mechanische Arbeit um. Intensive Forschungsarbeit konnte klären, an welcher Stelle des dabei ablaufenden, siebenschrittigen chemomechanischen Zyklus der eigentliche mechanische Transportschritt erfolgt. Diese Studien geschahen in mehreren Schritten [1], wir geben sie hier vereinfacht wieder.

1) Die Packgeschwindigkeit der DNS (v) wird für unterschiedliche ATP Konzentrationen ($[ATP]$) gemessen. Diese Abhängigkeit kann sehr gut durch die folgende Michaelis-Menten Gleichung beschrieben werden (Abbildung 1 links):

$$v = v_{\max} \frac{[ATP]}{K_M + [ATP]}$$

mit einer Maximalgeschwindigkeit von $v_{\max} \approx 100$ Basenpaaren/s und einer Michaelis-Menten-Konstante von $K_M \approx 30 \mu\text{M}$ ($30 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/l}$). Dies entspricht der Konzentration, bei der $v_{\max}/2$ erreicht ist.

2) Nun wird die Packgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration für verschiedene Phosphatkonzentrationen $[P_i]$ gemessen (Abbildung 1 rechts). Die Abspaltung von Phosphat liefert Energie bei der Umsetzung von ATP in ADP und ist bei vielen Motoren der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Damit erhält man für jede Phosphatkonzentration aus der Michaelis-Menten-Gleichung ein $v_{\max}([P_i])$ und ein $K_M([P_i])$. Da beide Werte unabhängig von $[P_i]$ sind, ist die Gleichgewichtskonstante für das Entlassen von Phosphat (aus der ATPase) sehr groß. Deshalb kann dieses Entlassen des Phosphates als irreversibler Schritt betrachtet werden.

3) Die Packgeschwindigkeit wird nun für unterschiedliche ATP-Konzentrationen gemessen und dabei noch variierende Kräfte entgegen der Packrichtung der DNS angelegt (Abbildung 1 rechts). Damit erhält man für jede solche Kraft F aus der Michaelis-Menten-Gleichung ein $v_{\max}(F)$ und ein $K_M(F)$. Aus der Kraftabhängigkeit dieser Parameter (hier sind beide kraftabhängig, ihr Quotient aber nicht) folgt, dass der Motor stark gekoppelt ist [2]: Die Wahrscheinlichkeit, dass pro ATP-Hydrolyse ein Schritt auf der DNS gemacht wird, ändert folglich sich nicht mit der angelegten Kraft – der Motor rutscht nicht durch. Phosphat hat keinen Effekt auf die kraftabhängigen Raten, das heißt, dass auch unter Kraft dieser Prozess als irreversibel betrachtet werden kann.

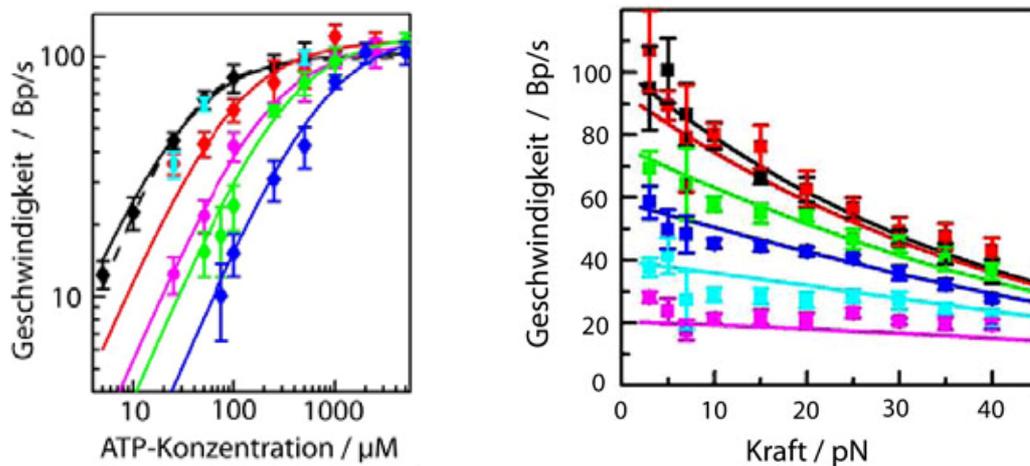


Abb. 1 Links: Die mittlere Packgeschwindigkeit in DNS-Basenpaaren/s gegen die ATP-Konzentration in Mikromol für verschiedene ADP-Konzentrationen (von links nach rechts zunehmend) und eine sehr hohe Phosphatkonzentration (türkis) in der Flusskammer (μM: Mikromolar). Die Abhängigkeit lässt sich sehr gut mit einer Michaelis-Menten-Gleichung beschreiben (Fit). Rechts: Die Messung der Packgeschwindigkeit in Abhängigkeit von einer angelegten Kraft bei unterschiedlichen ATP-Konzentrationen in der Flusskammer, von oben nach unten abnehmend.

4) Bei niedrigen ATP-Konzentrationen – hier limitiert die Bindung von ATP an die ATPase die Geschwindigkeit – ist v_{\max} unabhängig von der angelegten Kraft. Damit hängt die Bindungsrate nicht von der anliegenden Kraft ab. Der krafterzeugende Schritt muss demnach in einem (etwas vereinfachten) Schema nach dem ersten irreversiblen Schritt nach der Bindung von ATP folgen: ATP-Bindung kann also nicht der krafterzeugende Schritt sein.

5) Die Gleichgewichtskonstante für das feste Binden von ATP ($T \rightarrow T^*$ in Abbildung 2 im Artikel im Heft) ist sehr hoch, deshalb kann auch dies als irreversibler Schritt betrachtet werden. Abgeschätzt wurde das durch eine Analyse der Pausen, die durch Zugabe von schwer oder nicht hydrolysierbarer ATP-analoger AMP-PMP (Adenylylimido-Diphosphat) induziert wurden. Dieser Schritt ist also zwar der erste irreversible Schritt, der aber noch nicht die Kraft auf den DNS-Strang erzeugt.

6) Die Gleichgewichtskonstante k_{eq} ist der Quotient aus Binderate (k_{on}) und Dissoziationsrate (k_{off}) und wird bestimmt durch den Boltzmann-Faktor:

$$k_{eq} = \frac{k_{on}}{k_{off}} = \exp\left(\frac{\Delta G}{k_B T}\right),$$

dabei sind T die Temperatur, k_B die Boltzmann-Konstante und ΔG eine Energiedifferenz, die wir uns nun genauer anschauen. Nimmt man die Distanz von zwei Basenpaaren mit $\Delta x = 0,68$ nm und die Kraft, gegen die der Motor arbeitet, mit $F = 57$ pN an (dies ist die maximale von außen angelegte Kraft, gegen die Packung beobachtet wurde), so ergibt sich eine Energie $\Delta G = \Delta x \cdot F = 39$ pN · nm. Ausgedrückt in thermischer Energie ist dies $\Delta G = 10 k_B T$. Daraus ergibt sich eine

Gleichgewichtskonstante k_{eq} von $2 \cdot 10^4$. Die Hydrolyse von ATP (3. Schritt in Abbildung 2 im Heft) bewirkt jedoch nur eine kleine Änderung der Konformation [1]. Es ist deshalb sehr unwahrscheinlich, dass damit eine Energie ΔG von $10 k_{\text{B}}T$ aufgebracht werden kann.

7) Damit ist der vierte Schritt in Abbildung 2 (im Heft), nämlich das irreversible Entlassen von Phosphat sehr wahrscheinlich der krafterzeugende Translationsschritt – dies wird in [1] durch weitere Messungen bestätigt.

Einzelmolekülzyklus von Azobenzol-Polymeren

Dieser Abschnitt beschäftigt sich detaillierter mit dem Einzelmolekülzyklus von Azobenzol-Polymeren. Wenn wir – wie im Heft beschrieben – die Azobenzol-Polymere bei hoher, über das AFM angelegter Kraft von etwa 350 pN verkürzten, gab uns ihr Verhalten zunächst zwei Rätsel auf. Zum einen maßen wir dann nur etwa 50 % der erwarteten Längenänderung. Zum anderen sollte das Polymermolekül bei diesen hohen Kräften (350 pN) innerhalb weniger Mikrosekunden in den gestreckten *trans*-Zustand zurückgezogen werden, was jedoch in den Experimenten nicht geschah. Beide Rätsel sind inzwischen gelöst.

Zum ersten Rätsel: Die Längenänderung zwischen dem *cis*- und dem *trans*-Zustand beträgt 0,3 nm. Aus der Länge des Polymers (Abbildung 6 im Heft) ergeben sich 22 Einheiten und damit eine Längenänderung von 6,6 nm. Bei einer Schalteffizienz von 70 % (basierend auf Messungen an vielen Molekülen in Lösung / UV-VIS [6]) – also bei einem Umschalten von etwa 15 der 22 Einheiten – müssten also 4,6 nm beobachtet werden. Unsere Experimente zeigten aber kaum die Hälfte dieser Längenänderung! Diesen Befund konnte Roland Netz von der TU jedoch durch quantenmechanische Ab-initio-Rechnungen erklären [4], seine Rechenergebnisse bestätigte inzwischen auch Helmut Grubmüllers Gruppe am MPI in Göttingen mit Molekulardynamik-Simulationen [5].

Die Rechnungen zeigen, dass die Elastizität in den beiden Zuständen des Azobenzol (*trans* und *cis*) sehr verschieden ist. Der *cis*-Zustand ist so weich, dass bei Kräften von etwa 3 nN beide Zustände gleich lang sind (Abbildung 8 im Heft), schon bei einer Kraft von 350 pN wird nur noch eine Längenänderung von etwa 0,15 nm pro Azobenzol erwartet - in sehr guter Übereinstimmung mit dem beobachteten Wert. Das Beispiel in Abbildung 6 (Heft) zeigt ein Azobenzol-Polymer mit 22 Einheiten, das bei 350 pN angelegter Kraft von 19 auf 8 *trans*-Einheiten schaltet – und beim Zurückschalten von 3 auf 14 *cis*-Einheiten übergeht. Die theoretische Längenänderung wäre in diesem Fall 2,45 nm, experimentell beobachtet man etwa den gleichen Wert (Abbildung 6 im Heft).

Zum zweiten Rätsel: Aus unterschiedlichen Messungen ist bekannt, dass die Energiebarriere für die thermische Umwandlung von Azobenzol von der *cis*- in die *trans*-Konfiguration etwa $40 k_{\text{B}}T$ ($170 \text{ pN} \cdot \text{nm}$) beträgt. Der *cis*-Zustand hat damit eine Lebensdauer τ_0 von mehreren Stunden. Die sogenannte Bell-Gleichung [7] beschreibt die Änderung dieser Lebensdauer beim Anlegen einer Kraft F entlang der Koordinate der Energiebarriere wie folgt:

$$\tau_F = \tau_0 \exp [-F \Delta z / (k_{\text{B}}T)].$$

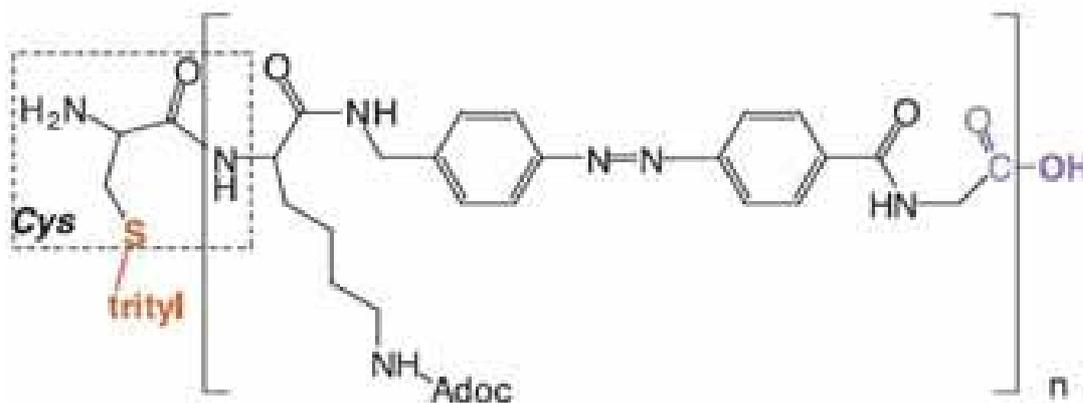


Abb. 2 Chemische Formel des Azo-Benzol-Peptid-Polymers. Die Anzahl der Einheiten n im jeweiligen Experiment konnte anhand der Länge des Polymers bestimmt werden.

Damit läge die Lebensdauer τ_F bei einer Kraft von 350 pN und einem Δz zwischen *cis* und *trans* von 0,3 nm unterhalb einer Mikrosekunde. Es wird aber eine Stabilität der *cis*-Konfiguration über mehrere Minuten beobachtet. Dies lässt sich inzwischen sehr gut aus einer Kombination der folgenden beiden Effekte erklären: Die entscheidende Koordinate beim thermischen Übergang ist im Azobenzol eine Rotation um die Achse N=N-C (Bindung in der Mitte der hier gezeigten Abbildung 2). Mit dem Kraftmikroskop wird dagegen nicht um diese Bindung rotiert, sondern in Richtung dieser Bindung gezogen. Die Energiebarriere entlang der AFM-Koordinate ist deshalb etwa $80 k_B T$ und $\tau_{0,AFM}$ dadurch 10^{13} Jahre. Durch die Kraft von 350 pN bleibt die Stabilität immer noch bei vielen Jahren – das heißt, dieser Prozess beeinflusst (beschleunigt) die thermische Umwandlung bei Raumtemperatur kaum.

Zusätzlich muss die Bell-Gleichung modifiziert werden, wenn die beiden Zustände (*cis* und *trans*) nicht die gleiche Elastizität haben. Wird wie hier im Experiment von einem weicheren (flaches Potenzial) in einen härteren (steiles Potenzial) Zustand gezogen, so erniedrigt sich die Barriere nicht so stark wie durch die Bell-Gleichung bestimmt [4].

Theoretischer Wirkungsgrad eines Azobenzol-Motors

Tabelle 1 zeigt verschiedene theoretische Wirkungsgrade für einen molekularen Motor, in dessen Azobenzol-Polymer elf verschiedene Einheiten zwischen dem *cis*- und *trans*-Zustand umgeschaltet werden.

TAB. 1 THEORETISCHER WIRKUNGSGRAD EINES AZOBENZOL-MOTORS

| Kraft 1 → Kraft 2 in 10^{-9} N (nN) | Wirkungsgrad bei $K_{cis} = 0,1 K_{trans}$ | Wirkungsgrad bei $K_{cis} = K_{trans}$ | Wirkungsgrad bei $K_{cis} = 10 K_{trans}$ |
|--|---|---|--|
| 0 → 0,35 | 1,3 % | 1,4 % | 1,5 % |
| 2 → 4,5 | 3,3 % | 10,7 % | 11,5 % |
| 0,35 → 4,5 | 8,3 % | 17,7 % | 18,6 % |
| 0 → 4,5 | 10,1 % | 19,1 % | 20,2 % |

Literatur

- [1] Y. R. Chemla et al., Cell **2005**, 122(5), 683.
- [2] K. Visscher, M. J. Schnitzer, S. M. Block, Nature **1999**, 400, 184.
- [3] G. Oster, H. Wang, Biochim. Biophys. Acta **2000**, 1485, 482.
- [4] G. Neuert et al., Macromolecules, **2006**, 39(2), 789.
- [5] L. V. Schafer et al., Angew. Chem. I. E. **2007**, 46(13), 2232.
- [6] T. Nagele et al., Chem. Phys. Lett. **1997**, 272(5-6), 489.
- [7] G. I. Bell, Science **1978**, 200, 618.